Sezonska varijabilnost sadržaja ukupnih polifenola i trjeslovina vrste Laurus nobilis L. (Lauraceae) s područja Lovrana

Rastija, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:528192

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Helena Rastija

Sezonska varijabilnost sadržaja ukupnih polifenola i trjeslovina vrste *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) s područja Lovrana

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju *Analitika lijekova* Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova, u suradnji s Farmaceutskim botaničkim vrtom „Fran Kušan“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Renate Jurišić Grubešić.

Zahvaljujem ponajprije svojoj mentorici, prof. dr. sc. Renati Jurišić Grubešić, na strpljenju i pomoći prilikom izrade mog diplomskog rada te organiziranosti i razumijevanju ukazanom tijekom naše suradnje.
Najviše zahvaljujem svojim roditeljima, bratu, baki i djedu, što su me podupirali, motivirali i pomagali mi tijekom cijelog studija, zbog Vas sam ovako daleko dogurala.
Posebno zahvaljujem Mihaeli, koja mi je bila podrška od samog početka studiranja, i veliko hvala Tinu na svim savjetima i ohrabrivanju, studentski dani bili su mi lakši i još ljepši zbog vas. Puno hvala svim mojim ostalim kolegicama koje su bile uz mene, drago mi je što sam stekla prijateljice poput vas i nadam se da će se naša suradnja nastaviti.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Botanički podatci 3

1.1.1. Porodica Lauraceae Juss. 1789. (lovori, lovorovke, lovorike) 3

1.1.2. Rod *Laurus* L. (lovori) 5

1.1.3. Vrsta *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) – lovor, pravi lovor, lovorika 6

1.2. Pregled istraživanja vrste *Laurus nobilis* L. 9

1.3. Ispitivane bioaktivne tvari lovora 12

1.3.1. Polifenoli 12

1.3.2. Trjeslovine ili tanini 17

2. OBRAZLOŽENJE TEME 21

3. MATERIJALI I METODE 22

3.1. Biljni materijal 22

3.2. Aparatura i kemikalije 23

3.3. Metode i postupci istraživanja 23

3.3.1. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina 23

4. REZULTATI I RASPRAVA 26

4.1. Rezultati kvantitativne analize ukupnih polifenola i trjeslovina lovora 26

5. ZAKLJUČCI 35

6. LITERATURA 36

7. SAŽETAK/SUMMARY 41

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

Od liječenja biljem tijekom povijesti, preko dominacije kemijski sintetiziranih spojeva u svrhu liječenja, u današnje vrijeme fitoterapija doživljava svoj ponovni procvat. S obzirom da ujedinjuje emocionalni, duhovni i racionalni pristup liječenju, fitoterapija se ubraja u oblik holističke terapije. Uvriježeno je mišljenje da su biljne tvari ili biljni preparati zbog svog prirodnog podrijetla ujedno i manje štetni od kemijski sintetiziranih molekula, no to ne mora uvijek biti točno. Potencijalna toksičnost može se javiti uslijed pogrešne identifikacije biljne droge, neispravnog postupka izrade biljnog pripravka te uslijed drugih pogrešaka nedovoljno educiranih osoba. Postoje biljke koje imaju 'drug like' svojstva i čija je velika dostupnost ograničena zakonom, npr. vrsta Digitalis u Velikoj Britaniji. Mnoge biljke pokazuje i određena pozitivna djelovanja na zdravstveno stanje ljudskog organizma, primjerice na različite oblike karcinoma, Alzheimerovu bolest, aterosklerozu, dijabetes ili kardiovaskularne bolesti (Karimi i sur., 2015).

Među brojnim biljnim pripravcima koji su danas dostupni na tržištu, važno je razumjeti razliku između dodataka prehrani i tvari koje su registrirane kao biljni lijekovi ili tradicionalni biljnih lijekova. Naime, dodatci prehrani podliježu najblažoj zakonskoj regulativi, tj. svi opći propisi koji vrijede za hranu, primjenjuju se i na dodatke prehrani te je stoga pri njihovom odabiru potreban povećan oprez. S druge strane, sigurnost primjene i djelotvornost tradicionalnog biljnog lijeka moguće je prepoznati na temelju njegove tradicionalne uporabe i ako ispunjava uvjete određene Zakonom o lijekovima (NN, 76/13, 90/14, 100/18). Najstroža regulativa u ove tri kategorije primjenjuje se na biljni lijek koji je definiran kao lijek koji kao djelatne tvari sadrži isključivo jednu ili više biljnih tvari, ili jedan ili više biljnih pripravaka, ili jednu ili više biljnih tvari u kombinaciji s jednim ili više biljnih pripravaka, koji su dobiveni različitim postupcima iz biljnih tvari (npr. usitnjavanje), te obuhvaćaju usitnjene ili praškaste biljne tvari, tinkture, ekstrakte, eterična ulja, istisnute sokove i prerađene izlučine biljaka (NN, 76/13, 90/14, 100/18). Farmaceutska struka stoga ima zahtjevan zadatak u razvoju komplementarnih kompetencija svojih stručnjaka koje će im omogućiti pružanje odgovarajućih i pravovremenih savjeta pacijentima pri odabiru prikladnih kvalitetnih, djelotvornih i sigurnih ljekovitih pripravaka.

Biljna vrsta *Laurus nobilis* L., Lauraceae (lovor) u uporabi je još od daleke prošlosti, a poznata je njegova uloga u nagrađivanju slavnih pjesnika te pobjednika Olimpijskih igara u drevnoj antici. Kruna od lovora simbolizirala je neke od najplemenitijih karakteristika pobjednika, poput slave, moći, mudrosti, pobjede i časti (Rhizopoulou, 2004). Danas se lovor uglavnom primjenjuje u prehrambenoj industriji kao začin, ali suvremena znanstvena istraživanja, koja su temelj novih spoznaja o sastavu i djelovanju lovora, ukazuju na njegova raznorodna biološka djelovanja i ljekoviti potencijal.

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je spektrofotometrijska analiza ukupnih polifenola i trjeslovina iz listova lovora, dobivenih ekstrakcijom uzoraka sabranih na području Lovrana u razdoblju od svibnja 2015. do travnja 2016. godine. Svrha je predmetne studije praćenje varijabilnosti sadržaja spomenutih bioaktivnih tvari kroz jednogodišnji period, kako bi se spoznala varijabilnost fitoterapijske vrijednosti lovora te sukladno tome i definirao najpogodniji period sabiranja biljnog materijala s obzirom na sadržaj polifenolnih tvari.

1.1 Botanički podatci

1.1.1 Porodica Lauraceae Juss. 1789. (lovori, lovorovke, lovorike)

Porodica Lauraceae ubraja se u carstvo Plantae, odjeljak Spermatophyta (sjemenjače), pododjeljak Magnoliophytina ili Angiospermae (kritosjemenjače), razred Magnoliatae ili Dicotyledoneae (dvosupnice), red Laurales (Mägdefrau i Ehrendorfer, 1997).

Spomenutu porodicu uglavnom čine drvenaste biljke koje rastu u tropskim i suptropskim krajevima (jugoistočna Azija i tropska Amerika), a manjim dijelom ih nalazimo u umjerenom pojasu. Također je i najbrojnija porodica reda Laurales jer sadrži oko 85% svih obuhvaćenih vrsta. U nekim tropskim, šumskim područjima, porodica Lauraceae pripada među pet porodica koje imaju najviše biljnih vrsta te čine takozvane „lovorove šume“. Specifična je i prilagodba biljaka iz ove porodice na veliku količinu kiše i vlage na područjima u kojima raste, a odlikuje se uskim i ovalnim kožnatim listovima te voštanim slojem na površini lista (Nikolić, 2013).

Porodica Lauraceae sadrži 67 rodova i 2747 vrsta, a važniji rodovi ove porodice su: *Aniba* (npr. ruža drvo – *Aniba rosaeodora*), *Cinnamomum* (npr. kamforovac *Cinnamomum camphora*, pravi cimetovac – *Cinnamomum verum*), *Laurus* (npr. lovor – *Laurus nobilis*), *Litsea* (npr. licea – *Litsea citrata*), *Ravensara* (npr. ravensara – *Ravensara aromatica*), *Sassafras* (npr. sasafras – *Sassafras album*) (Marković, 2005).

Biljke porodice Lauraceae pretežno su aromatične i imaju eterično ulje lokalizirano u raznim dijelovima, poput lista (lovor, ravensara) (Slika 1), kore i grančica (cimet) (Slika 1), drva (ruža) i plodova (licea) (Marković, 2005).



Slika 1. Kore i grančice cimeta (lijevo) i list lovora (desno) (https://www.pfaf.org/).

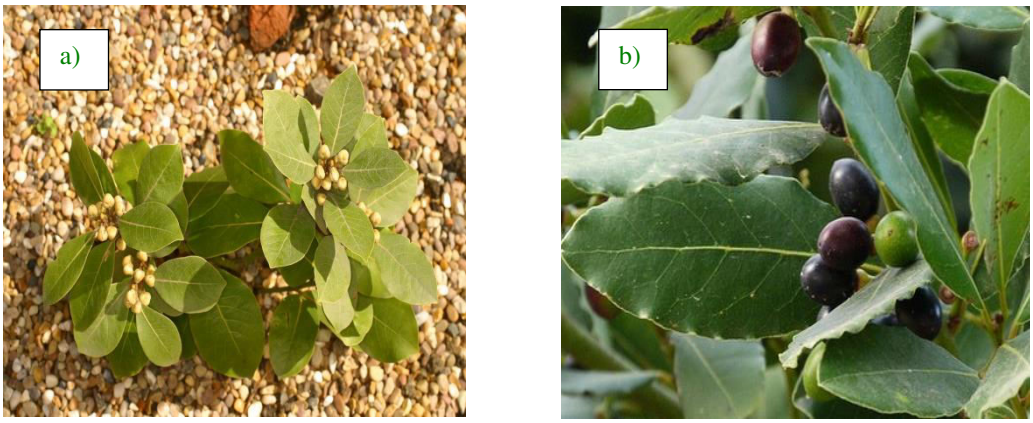
Fitokemijski sastav porodice Lauraceae obuhvaća aporfirine, benzilizokinoline, eterična ulja (alifenoli, benzoati, terpenoidi, itd.). Eterična ulja obično su prisutna i u relativno visokim koncentracijama. Alkaloidi i proantocijanidini (cijanidin) uglavnom su prisutni, dok iridioidi nisu utvrđeni. Od flavonola su prisutni obično kemferol i kvercetin. Arbutin i saponini izostaju. Zabilježena je prisutnost inulina te je dokazana akumulacija aluminija.

Velik je ekonomski značaj biljaka iz porodice Lauraceae, zbog navedenih eteričnih ulja te nutritivnih i ljekovitih osobina. Primjerice, plod avokada (*Persea americana*) koristi se u prehrani, cimet (*Cinnamomum spp.*) kao začinsku biljku, kamfor u kozmetologiji, a mnoge druge biljke spomenute porodice primjenu su pronašle u drvnoj industriji ili kao insekticidi. Sasafrasovo ulje dobiva se od sasafrasa, *Sassafras albidum* (Nutt.), a ima više različitih primjena, poput terapije infekcija, ublažavanja menstrualnih tegoba, u terapiji hipertenzije, kao hipnotik, imunostimulans, insekticid te u prevenciji karcinoma. Ulje može sadržavati i seskviterpen safrol koji ima dokazano kancerogeno djelovanje te je stoga važan oprez.

List lovora (*Laurus nobilis* L.) služi kao začinska biljka u kulinarstvu te kao ljekovita biljka u narodnoj medicini i kozmetologiji, a cijela biljka ima i dekorativnu vrijednost (www.britannica.com).

1.1.2 Rod *Laurus* L. (lovori)

Rod obuhvaća tri vazdazelene vrste, a to su: *Laurus azorica* (Seub.) Franco, rasprostranjena na Azorima, Kanarskom otočju, Madeiri te u Maroku; *Laurus nobilis* L. u Francuskoj, na Pirenejskom, Apeninskom i Balkanskom poluotoku, u Turskoj te na Kavkazu; te *Laurus chinensis* Blume (www.theplantlist.org). *L. azorica* ima otrovne listove te se stoga ne smije koristiti kao začin, za razliku od vrste *L. nobilis*, a nalazi se i na crvenoj listi ugroženih biljaka (Slika 2) (Guido i sur., 2015; Conforti i sur., 2006).



Slika 2. Vrste roda *Laurus*: a) *L. azorica* (https://www.kew.org/science), b) *L. nobilis* (https://plants.ces.ncsu.edu).

Vrste roda *Laurus* L. drvenaste su i vazdazelene biljke koje rastu kao drveća ili grmovi. Listovi su im jednostavni, izmjenično poredani i aromatični zbog prisutnih žlijezda s eteričnim uljem. Biljke su dvodomne, a cvjetovi aktinomorfni, jednospolni, sa četiri pri dnu međusobno srasla listića perigona, 8 – 12 prašnika poredanih po četiri u dva ili tri kruga i jednim tučkom. Prašnice se otvaraju s dva zaklopca prema unutrašnjosti cvijeta. Pri osnovici svih ili većine prašnika nalaze se po dvije žlijezde koje izlučuju nektar (medonosna vrsta). Plodnica tučka je nadrasla, jednopretinčana, s jednim sjemenim zametkom, a plod je jednosjemena kuglasta boba, promjera 1 – 1,5 cm, koja dozrijeva u kasnu jesen (Grdinić i Kremer, 2009).

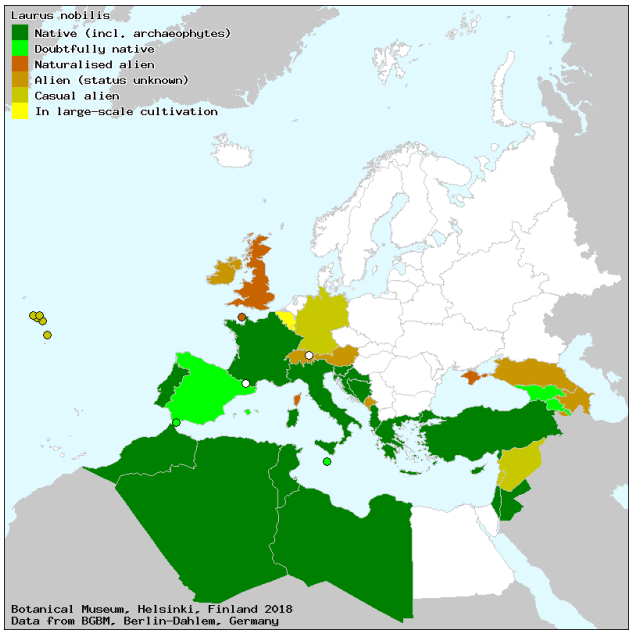
1.1.3 Vrsta *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) - lovor, pravi lovor, lovorika

Općenito o lovoru

Naziv biljke potječe od latinskih riječi *laudare* – što znači hvaliti, uzdizati, i *nobilis* – što znači plemenit (Kuštrak, 2005). Pojam *laureat* upotrebljava se za obilježavanje postignuća u nekoj djelatnosti, a također potječe od latinskog imena za rod lovor – *Laurus*. Kao iznimno popularna biljka s dugom tradicijom uporabe, o čemu svjedoče zapisi još iz antičke Grčke i Rima, lovor je našao svoje mjesto na zastavama Dominikanske Republike i Perua, nacionalnom amblemu Grčke, japanskim kovanicama, brojnim grbovima itd. (Nikolić, 2013; Marković, 2005).

Stanište i rasprostranjenost

Lovor je drvenasta mediteranska kultura s prirodnim populacijama u primorskom području Hrvatske i zemljama oko Sredozemnog mora (Slika 3). Podrijetlo lovora je Mala Azija, a raste i u Južnoj Americi (Pahlow, 1999).



Slika 3. Rasprostranjenost lovora u Europi (http://www.maltawildplants.com).

Na području Republike Hrvatske zastupljena je samo jedna vrsta roda *Laurus*, lovor (*Laurus nobilis* L.), a rasprostranjena je većinom uz obalu Jadranskog mora pa je tako i naselje u Istri, pod nazivom Lovran (nekadašnja Lauriana), ime dobilo upravo po toj biljnoj vrsti koja u izobilju raste na tom podneblju (www.tz-lovran.hr). Lovor raste u priobalju ili na otocima, i to pojedinačno, tako da tvori malene šume, ili u skupinama s ostalim vazdazelenim biljem, posebice u listopadnim hrastovim šumama.

Izgled i uzgoj biljke

Lovor je višegodišnji, vazdazeleni mediteranski grm ili srednje visoko stablo (10 – 15 m), s prsnim promjerom debla do 60 cm. U mlađih je biljaka kora debela, glatka i siva, a u zrelijih je hrapava i crna. Listovi su jednostavni, bez palistića, naizmjenično zavojito raspoređeni i imaju kratku peteljku. Eliptični su do duguljasti, ili duguljasto suličasti, šiljata ili ušiljena vrha, cijela i uglavnom valovita ruba, dugi 7 – 12 cm, a široki 2,5 – 4,5 cm. Kožasti su, s gornje strane tamnozeleni i sjajni, a s donje zeleni bez sjaja, goli i vrlo aromatični (Grdinić i Kremer, 2009).

Eterično ulje lokalizirano je u mezofilu lista, tj. u zasebnim stanicama – uljenicama. Okus listova vrlo je specifičan, a najbolje se opisuje kao opor, gorak i ljut, a miris jak i ugodan (Kuštrak, 2005). S obzirom na godišnje varijacije u produkciji eteričnog ulja, njegova najveća sinteza započinje u rano ljeto, a doseže vrhunac sredinom ljeta (Nikolić, 2013).

Cvjetovi su jednospolni (a biljke dvodomne: muški i ženski cvjetovi razvijaju se na različitim stablima), sitni, žućkastobijeli i široki oko 1 cm. Pri dnu se nalaze četiri listića perigona koji su srasli, skupljeni u postrane paštitaste cvatove, a razvijaju se od ožujka do svibnja. Muški cvjetovi imaju 8 – 12 prašnika raspoređenih po četiri u dva ili tri kruga, a prašnice se otvaraju s dva zaklopca prema unutrašnjosti cvijeta. Pri osnovici svih ili većine prašnika nalaze se po dvije žlijezde koje izlučuju nektar. U ženskim je cvjetovima jedan tučak i 2 – 4 zakržljala prašnika. Iz ženskog se cvijeta razvija plod koji je tamnoplava, jednosjemena, jajolika koštunica, promjera 1 – 1,5 cm, koja dozrijeva u kasnu jesen. Mesnati dio ploda sadrži eterično ulje. Biljka najbolje raste na svježim humusno-karbonatnim tlima, ali uspijeva i na suhim tlima i prilično je osjetljiva na niske temperature. Listovi se sabiru u kasnu jesen, suše u hladu u tankom sloju i u prozračnom i toplom prostoru oko mjesec dana (Grdinić i Kremer, 2009). S obzirom da je sušenje listova dugotrajno, povoljnije ih je sušiti u sušari uz umjerenu toplinu. Budući da listovi sadrže eterično ulje, temperatura na kojoj se suši ne smije biti viša od 40 °C jer bi povećanjem topline došlo do gubitka eteričnog ulja, a time bi se umanjila kakvoća lovorova lista, odnosno njegova aroma. Osim listova, sabiru se također plodovi, Lauri fructus, iz kojih se tiještenjem dobiva smjesa masnog i eteričnog ulja (Kuštrak, 2005).

Kemijski sastav lovora

Destilacijom listova vodenom parom dobiva se eterično ulje lovora, a nakon procesa destilacije, ulje mora odstajati godinu dana da bi bilo spremno za uporabu. U listu lovora prosječno se nalazi 1 – 3% eteričnog ulja.

Glavna sastavnica eteričnog ulja je 1,8-cineol (do 45%), monoterpenoli (do 15% linalola, do 5% terpineola), a sadrži i malu količinu vrlo aktivnih seskviterpenskih laktona (do 2% kostunolida i dehidrokostuslaktona, artemorina, verlotorina, santamarina i rejnosina) koji mogu izazvati kontaktni alergijski dermatitis. U listu su također prisutne i trjeslovine u velikom postotku te malo gorkih tvari (D'Auria i Racioppi, 2015; Nikolić, 2013; Kuštrak, 2005; Marković, 2005).

Plod lovora, uz eterično, sadrži i masno ulje (30%), škrob i šećer. U ulju ima glicerida palmitinske, laurinske, oleinske i linolne masne kiseline te miricidnog alkohola. Najviše ulja ima u zrelom plodu, i to oko 1% eteričnog i oko 30% biljnog masnog ulja (Živković, 1997).

Farmakološko djelovanje i upotreba lista i ploda lovora

U pučkoj medicini lovor se preporučuje kao imunostimulans kod gripe, kašlja ili prehlade. Koristio se u brojne svrhe, primjerice kod neuravnotežene krvne slike, povišenih masnoća, u terapiji infekcija prostate te ostalih infekcija urogenitalnog trakta, neuroloških bolesti, probavnih smetnji, nesanice i razdražljivosti te protiv depresije, stresa, glavobolje i migrene (Lesinger, 2006).

Jaki čaj kuhao se od listova te se ulijevao u kadu prije kupanja da bi na taj način pomogao protiv reumatskih bolova. S druge strane, blagi čaj koristio se protiv grčeva i probavnih smetnji, a alkoholna iscrpina od narezanih listova koristila se kod nategnutih tetiva ili uganuća (Ašič, 1999).

Lovor ima umjerenu antibakterijsku aktivnost, ali vrlo je aktivan protiv gljivica, pogotovo iz roda *Candida*. Djeluje također kao takospazmolitik, analgetik i ekspektorans.

Postoje brojne indikacije za upotrebu lovora, npr. lokalno protiv afti, inhalacijski protiv virusnih respiratornih infekcija, a dermalno se koristi protiv mišićnih bolova ili reumatoidnog artritisa, ali kontraindicirano je njegovo dugoročno nanošenje na kožu zbog potencijalnog razvoja alergijskih reakcija (Marković, 2005).

Jedna od najpoznatijih primjena lovora očituje se u kulinarstvu jer se lovor koristi kao začin u različitim jelima. Njegov gorki okus povećava apetit, a u Dalmaciji se suhi listovi lovora koriste i kao konzervans kod pakiranja suhog voća, npr. smokava (Živković, 1997). Lovorovo lišće upotrebljava se u proizvodnji alkoholnih pića i voćnih sokova, a u ponekim zemljama meso se suši u dimu od lovorovih grančica (Grlić, 2005; Kuštrak, 2005).

Farmakološko djelovanje i upotreba eteričnog ulja lista lovora

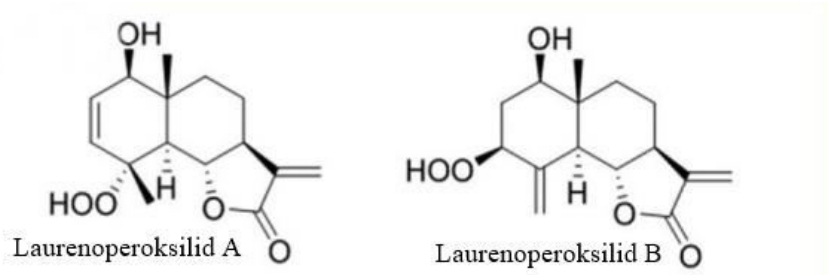
Eterično ulje lovora je zelenožute boje, intenzivnog karakterističnog mirisa i aromatičnog okusa. Djeluje kao antiseptik, a primjenjuje se samo eksterno za masažu, protiv kožnih osipa, te analogno upotrebi lista i ploda, koristi se protiv boli u mišićima i zglobovima (antireumatik), za smirivanje zubobolje, u aromaterapiji za inhaliranje i pogotovo u veterinarstvu (Lesinger, 2006; Živković, 1997).

U obliku ulja koje se dobije iz listova i plodova, lovor se koristi i u industriji parfema, sapuna i krema (Ašič, 1999).

1.2 Pregled istraživanja vrste *Laurus nobilis* L.

Iako je lovor poznat kao začinska biljka i koristi se prvenstveno u kulinarstvu, na spomenutoj se biljnoj vrsti i dalje provode brojna istraživanja, ponajprije zbog polifenolnih tvari i eteričnog ulja koje sadrži, a sukladno tome i zbog njegovog antioksidativnog i antimikrobnog potencijala.

Jedno od najnovijih istraživanja iz 2019. godine dokazuje inhibitornu aktivnost seskviterpenskih laktona izoliranih iz listova biljne vrste *L. nobilis*, prikupljenih na području Libanona, na LPS-induciranu NF-κB transkripcijsku aktivnost RAW 264.7 stanica makrofaga. Izoliran je 21 seskviterpen, a dva su novootkrivena – laurenoperoksilid A i B (Slika 4). Kao najpotentniji inhibitor NF-κB, pokazao se 11-egzometilensantonin (Turk i sur., 2019).



Slika 4. Prikaz kemijskih struktura laurenoperoksilida A (lijevo) i laurenoperoksilida B (desno) (www.sciencedirect.com).

Sljedeće istraživanje, također iz 2019. godine, govori o evaluaciji antifungalne i antioksidativne aktivnosti. Uspoređene su navedene aktivnosti sastavnica eteričnih ulja biljnih vrsta *Salvia officinalis, Lavandula dentata* te *Laurus nobilis.* Najbronija je monoterpenska sastavnica eteričnog ulja navedenih biljnih vrsta 1,8-cineol, što je utvrđeno GC-MS analizom, te je istražen njegov antioksidativni potencijal protiv eukariotske plijesni *Aspergillus carbonarius*, koja je korištena kao izvor okratoksina A. Najveća antifungalna i antioksidativna aktivnost (IC_{50}=0.35±0.05mg/mL) te najveći udio fenolnih sastavnica (15,15 ± 1,64 mg ekvivalenta galne kiseline/g eteričnog ulja), utvrđene su kod biljne vrste *L. nobilis* (Dammak i sur., 2019).

S obzirom da je antibiotska rezistencija postala globalni zdravstveni problem, sve se više traže alternativna rješenja protiv bakterijskih oboljenja, poput biljnih pripravaka. Istraživanje iz 2018. godine još je jedno istraživanje koje potvrđuje antimikrobni učinak vodeno-alkoholnog ekstrakta lovora na Gram pozitivnu bakteriju *Paenibacillus larvae,* koja uzrokuje bolest pčela („američka gnjilоća“). Med može sadržavati spore navedene bakterije i tako negativno utječe na ljudsko zdravlje, a problematična je i uporaba antibiotika čiji se ostatci mogu pronaći u medu, stoga su fenolne sastavnice lovora obećavajućeg antimikrobnog djelovanja predložena alternativa za kontrolu te bolesti (Fernandez i sur., 2018).

Antifungalna aktivnost biljne vrste *L. nobilis* dokazana je studijom na vrsti *Cryptococcus neoformans.* GC-MS metodom određen je kemijski sastav eteričnog ulja, dok su minimalna fungicidna koncetracija (MFC) i minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) određene tehnikom mikrorazređenja bujona. MFC_{50} eteričnog ulja iznosio je 1024 g/mL, dok je MIC_{100} iznosio 256 µg/mL, te je dokazan antifungalni učinak eteričnog ulja *in vitro* (Pinheiro i sur., 2017).

Antifungalna aktivnost potvrđena je i na kulturi *Candida spp*., u radu koji je publiciran u siječnju 2017. godine. Dokazano je da eterično ulje lovora ima utjecaj na biosintezu stanične stijenke i permeabilnost membrane te nepovoljno djeluje na biofilm vrste *C. albicans* i sprječava daljnju adheziju, što je ujedno i jedan od najvećih problema kod kandidijaze. Najaktivnije antifungalne tvari iz eteričnog ulja najvjerojatnije su seskviterpeni i monoterpeni (Peixoto i sur., 2017).

Uz antibakterijsko i antifungalno djelovanje vrste *L. nobilis*, istraženo je također djelovanje flavonoida i glikozida lovora na lipidni profil iračkog ženskog kunića. Rezultati pokazuju da peroralna primjena lista lovora učinkovito snižava razine TC, TG, LDL-C i VLDL-C, u odnosu na kontrolnu skupinu te je stoga koristan antihiperlipidemik (AL-Samarrai i sur., 2017).

Cilj istraživanja koje je publicirano u rujnu 2017. godine, bio je objasniti i klinički dokazati utjecaj lovora na glikemijski odgovor organizma. Peroralnom primjenom, tj. u obliku keksa s lovorom (masenih udjela 3% i 6%), ispitan je utjecaj na postprandijalnu glikemiju i apetit ispitanika. Kontrola su bili keksi bez listova lovora, a glukoza u krvi i subjektivni osjećaj apetita ispitani su neposredno prije obroka i postprandijalno nakon 2 sata. Značajno snižavanje razine glukoze u krvi postigli su keksi sa 6% lovorova lista u odnosu na one bez lovora. Keksi s 3% lovorova lista pokazali su neznatnu redukciju glukoze u krvi. Kod ispitanika nije zabilježena nikakva nelagoda u gastrointestinalnom traktu (Abdullah i sur., 2017).

Eterično ulje lovora ima i važnu ulogu u prevenciji oralnih infekcija, što je rezultat istraživanja znanstvenika iz Tunisa koji su ispitivali učinke lovorovog ulja na oralne sojeve bakterije *Staphylococcus aureus.* Utvrđeno je baktericidno djelovanje te inhibiranje stvaranja biofilma, koje može poslužiti kao podloga za razvoj novih preventivnih mjera kod oralnih infekcija (Merghni i sur., 2016).

Narodna medicina koristila je lovorov list u tretmanu atopijskog dermatitisa i astme pa su znanstvenici, potaknuti činjenicom da su spomenute bolesti i danas jako zastupljene, 2013. godine proveli *in vitro* istraživanje na preosjetljivost tipa I posredovanu imunoglobulinom-E. Razmatrali su učinak pojedinih sastavnica lista lovora na mastocite. Mjereni parametri bili su: aktivnost β-heksozaminidaze, učinak na proizvodnju interleukina 4 (IL-4) i interleukina 5 (IL-5), u ovisnosti o proliferaciji ranih pro-B stanica. Dobiveni su rezultati koji ukazuju da se magnolialid potencijalno može koristiti u liječenju navedenih bolesti, s obzirom na to da inhibira degranulaciju mastocita, proizvodnju IL-4 i proliferaciju (Lee i sur., 2013).

Budući da je utvrđena povezanost rizika oboljenja od šećerne bolesti i povišene koncentracije reaktivnih kisikovih specija (ROS), ta je spoznaja poslužila kao polazišna točka za studiju iz 2013. godine. Antioksidativna aktivnost eteričnog ulja lovora ispitana je korištenjem pet različitih *in vitro* metoda: inhibicija hidroksilnih, superoksidnih i DPPH radikala, inhibicija vodikovog peroksida i inhibicija lipidne peroksidacije kod oboljelih od dijabetesa. Spregnutom GC/GC-MS metodom dokazana je prisutnost 29 sastavnica koje čine 99,18% sastava ispitanog eteričnog ulja. Tri glavne sastavnice bile su: 1,8-cineol (68,82%), 1-(S)-α-pinen (6,94%), i R-(+)-limonen (3,04%). Promatrani parametri bili su inhibicija α-glukozidaze ili uklanjanje takvih reaktivnih spojeva, a za procjenu *in vitro* antidijabetičke aktivnosti ulja korišten je test za inhibiciju α-glukozidaze. Utvrđeno je da eterično ulje lovora inhibira α-glukozidazu preko 90% te pokazuje najveću inhibicijsku aktivnost protiv hidroksilnih radikala (Basak i Candan, 2013).

Jordanska narodna medicina koristi lovor kao antidijaroik te je navedena uporaba lovora i znanstveno ispitana. U ekstraktu lista lovora dokazana je prisutnost alkaloida, flavonoida i tanina, a utvrđena je inhibicija dijareje izazvane ricinusovim uljem primjenom navedenog ekstrakta u štakora. Dokazano je također da ekstrakt lovora inhibira crijevnu tranziciju ugljena i tako uzrokuje o dozi ovisnu relaksaciju glatkih mišića crijeva štakora. Ovim je istraživanjem potvrđena antidijaroička aktivnost lovora i opravdana je njegova uporaba kod dijareje (Qnais i sur., 2012).

Godine 2010. objavljena je studija koja je pojasnila strukturu aktivnih antioksidativnih sastavnica lista lovora te su navedene sastavnice i izolirane iz 70%-tnog vodeno-alkoholnog ekstrakta lovorova lista. Dokazana je sposobnost hvatanja slobodnih 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala u navedenom ekstraktu. Kromatografskim metodama, poput kolonske kormatografije i TLC, izolirane su tri aktivne sastavnice iz lovorova lista, a spektroskopski i kemijskim reakcijama dokazani su flavonoidi, poput kemferola, kemferol-3-ramnopiranozida i kemferol-3,7-diramnopiranozida (Emam i sur., 2010).

Važan doprinos saznanjima o antioksidativnom potencijalu lovora, donijela je studija iz 2003. godine. Ispitan je utjecaj različitih ekstrakata lovora na razine lipidne peroksidacije u liposomima induciranim Fe^{2+}/askorbatnim sustavom. Analizirani su metanolni ekstrakti listova, kore i plodova lovora. Rezultati su dobiveni spektrofotometrijskim mjerenjem pomoću TBA testa. Najznačajniju inhibiciju lipidne peroksidacije pokazali su ekstrakti kore lovora (70,6% inhibicije s 1,0 mg sirovog ekstrakta), a važno je istaknuti da su i svi ostali ekstrakti pokazali antioksidativnu aktivnost. TLC analizom utvrđena je prisutnost flavonoida, fenolnih kiselina i alkaloida u ispitanim ekstraktima lovora (Simić i sur., 2003).

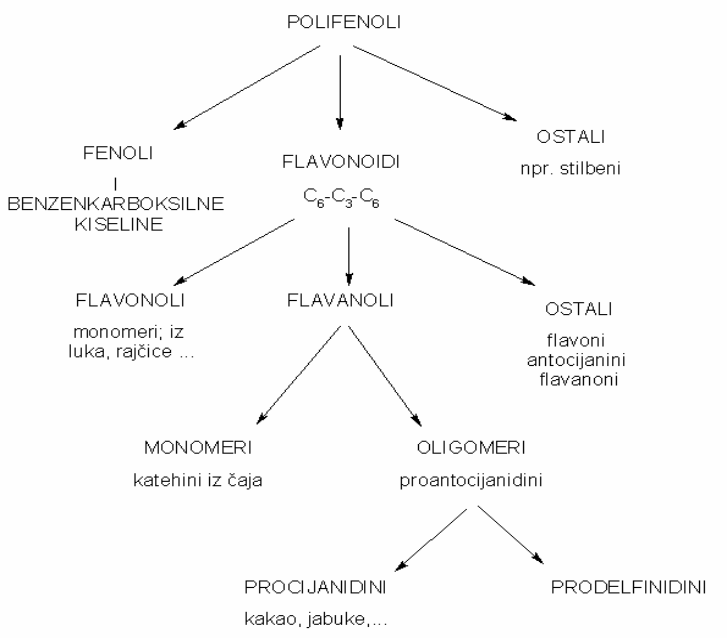
1.3 Ispitivane bioaktivne tvari lovora

1.3.1 Polifenoli

Kemijska struktura i obilježja

Skupina polifenola broji više od 8000 spojeva različite kemijske strukture te su stoga oni jedna od najzastupljenijih i najbrojnijih skupina biljnih tvari. Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti; nisu kao primarni metaboliti izravno uključeni u razvoj biljnog organizma, ali imaju važnu ekološku ili zaštitnu ulogu. Glavna je karakteristika polifenola prisutnost jednog

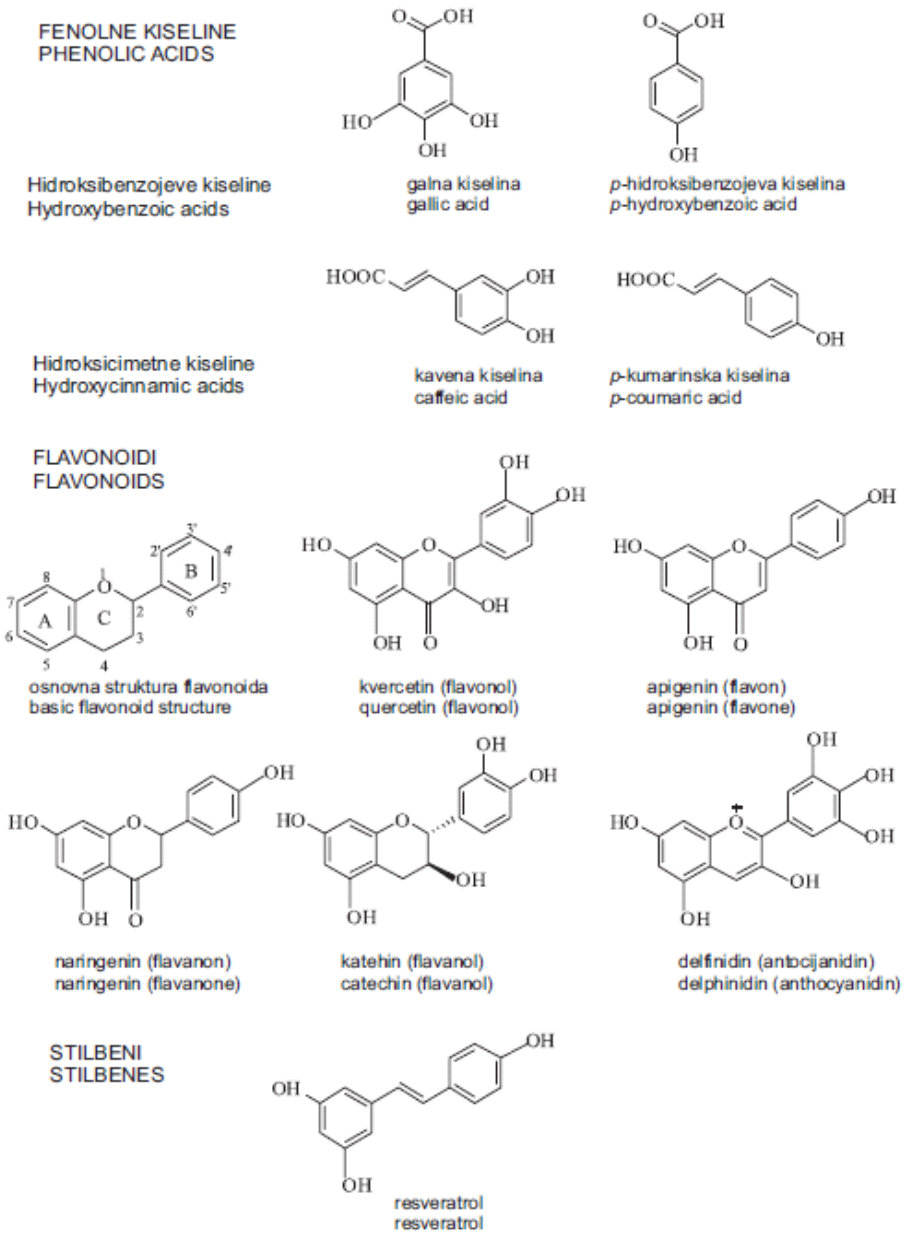
ili više hidroksiliranih aromatskih prstenova (Bravo, 1998). U polifenole se ubrajaju fenolne kiseline (derivati hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline), flavonoidi i stilbeni (Slike 5 i 6). Aglikoni flavonoida (flavonoidi bez vezanih molekula šećera) u sebi sadrže strukturu tipa C_6-C_3-C_6. Atomi ugljika raspoređeni su tako da su dvije benzenske jezgre povezane propanskim lancem koji može ili ne mora formirati treći prsten. Stilbeni su polifenoli koji ne posjeduju osnovnu strukturu flavonoida, ali imaju 1,2-difenileten kao funkcionalnu skupinu (Rastija i Medić-Šarić, 2009; Haslam i Cai, 1994). Dva su glavna biosintetska puta iz kojih se sintetiziraju polifenoli: put šikiminske kiseline i acetatni put (acilpolimalonatni put). Šikiminska kiselina glavna je tvar u nastanku prirodnih aromatskih spojeva, a ujedno je i univerzalni prekursor u biosintezi aromatskih aminokiselina u mikroorganizmima poput bakterija i gljivica te višim biljkama, ali ne i u životinjskim organizmima (Vladimir-Knežević, 2008; Bravo, 1998).



Slika 5. Glavna podjela polifenola (Berend i Grabarić, 2008).

U prirodi su polifenoli prisutni uglavnom u konjugiranom obliku, tj. kao glikozidi, s jednom ili više šećernih jedinica vezanih na hidroksilne skupine, iako postoje i oblici u kojima su šećerne jedinice vezane izravno na aromatski ugljikov atom. Najzastupljenija je šećerna jedinica glukoza, ali vezani šećeri mogu biti u obliku monosaharida, disaharida ili

oligosaharida. Šećerna komponenta može sadržavati i mnoge druge šećere, poput galaktoze, ramnoze, ksiloze i arabinoze, kao i glukoronsku te galakturonsku kiselinu. Polifenoli se mogu konjugirati i s drugim tvarima, kao što su različite karboksilne i organske kiseline, amini i lipidi. Česte su i konjugacije s drugim fenolnim spojevima (Bravo, 1998). Podjela polifenola temelji se na broju fenolnih prstenova koje sadrže i na strukturnim elementima koji te prstenove povezuju (Berend i Grabarić, 2008).



Slika 6. Kemijske strukture polifenola (Rastija i Medić-Šarić, 2009).

Rasprostranjenost

Kao glavni antioksidansi u ljudskoj prehrani te kao vrlo česti sastojci hrane biljnog podrijetla, ističu se upravo polifenoli. Prehranom se dnevno unese prosječno 1 g polifenola, a to je znatno više od unosa ostalih poznatih antioksidansa. Navedena količina čak je deset puta veća od prosječnog unosa vitamina C te je sto puta veća od prosječnog unosa vitamina E i karotenoida, kao primjera poznatih antioksidansa. Glavni su izvori polifenola u prehrani voće i pića dobivena od biljaka, poput pojedinih voćnih sokova, čaja, kave ili crnog vina. Primjerice, čaša crnog vina, šalica čaja ili kave sadržavaju približno 100 mg polifenola, a s druge strane, grožđe, jabuke, kruške i bobičasto voće sadrže oko 200-300 mg polifenola na 100 g svježeg voća (Pandey i Rizvi, 2009; Scalbert i sur., 2005).

Kvercetin i njemu slični polifenoli prisutni su u svim biljnim produktima, dok su neki ograničeni na specifične namirnice, npr. flavanoni u citrusnom voću, izoflavoni u soji i floridzin u jabukama. Točan sastav polifenola slabo je poznat zbog toga što se u namirnicama većinom nalaze u kompleksnim smjesama. Okolišni čimbenici mogu bitno utjecati na sastav polifenola, ponajviše pedoklimatski (tip tla, izloženost sunčevoj svjetlosti, količina padalina) ili agronomski (staklenički uzgoj ili uzgoj na otvorenom, ukupni urod po jednoj biljci itd.). Ukoliko se radi o polifenolima koji su podložni oksidaciji, skladištenje može biti bitan čimbenik koji utječe na sadržaj polifenola. Oksidacija dovodi do nastanka jedne ili više polimernih molekula, a to može utjecati na kakvoću namirnice i promjenu organoleptičkih svojstava, koje mogu biti poželjne (crni čaj) ili nepoželjne (smeđa boja narezanog voća). Priprema hrane također može utjecati na količinu polifenola, npr. guljenje kore voća i povrća uklanja veliku količinu polifenola, koji su vrlo često prisutni u većim koncetracijama u vanjskim biljnim dijelovima u odnosu na unutarnje. Termičkom obradom hrane također dolazi do značajnih gubitaka polifenola (Manach i sur., 2004).

Biološki učinci

U prvoj polovici 90-ih godina prošlog stoljeća, najviše antioksidacijskih ispitivanja provodilo se na vitaminima, karotenoidima i mineralima. Godine 1995. započinju istraživanja na flavonoidima i ostalim polifenolima, u svrhu ispitivanja njihovih antioksidativnih svojstava te uloge u prevenciji različitih bolesti. Velika različitost i kompleksne kemijske strukture polifenola bile su razlog odgađanja takvih istraživanja (Scalbert i sur., 2005).

Od pozitivnih djelovanja polifenola na zdravlje, znanstvena istraživanja ističu njihovo antiinflamatorno, antimikrobno, antifungalno, diuretičko, antihepatotoksično, antihipertenzivno, antiaritmično, antikoagulirajuće, spazmolitičko, kardiotonično, antialergijsko, antiulkusno,

analgetsko, antimalarijsko, hipoglikemijsko i antioksidativno djelovanje (Petrik, 2008).

Postoji poveznica između polifenola i prevencije kardiovaskularnih bolesti, raka i osteoporoze, a otvaraju se i potencijalne mogućnosti u prevenciji dijabetesa i neurodegenerativnih bolesti. Primjerice, crno je vino bogat izvor polifenolnih antioksidansa i smatra se uzrokom fenomena znanog kao „francuski paradoks“ (niska pojavnost koronarnih bolesti u Francuskoj, unatoč konzumaciji masne hrane, a povezana je s konzumacijom crnog vina koje sadrži visoke količine polifenola). Polifenolni antioksidansi koji su prisutni u ekstra djevičanskom maslinovom ulju smatraju se glavnim uzročnicima pozitivnog učinka mediteranske prehrane na zdravlje (Castañer i sur., 2011; Scalbert i sur., 2005).

Pojedinim studijama pokazan je pozitivan utjecaj polifenola iz crnog čaja i crnog vina na crijevnu mikrobiotu. Studija iz 2013. godine, za razliku od prethodnih, usredotočila se na polifenole kao kompleksne strukture, a ne samo na pojedine molekule. Na *in vitro* model crijeva primijenjeni su ekstrakt crnog čaja i crnog vina. Pirosekvenciranjem dokazano je da crni čaj stimulira rast enterokoka te vrsta *Klebsiella, Akkermansia,* a smanjuje rast bifidobakterija, *B. coccoides, Anaeroglobus* i *Victivallis.* Ekstrakt crnog vina inducira rast vrsta *Klebsiella, Alisipes, Cloacibacillus, Victivallis i Akkermansia,* dok smanjuje rast bifidobakterija, *B. coccoides, Anaeroglobus, Subdoligranulum* i *Bacteroides.* Ovom je studijom pokazano da kompleksni polifenoli iz navedenih ekstrakta, mogu selektivno modulirati ljudsku crijevnu mikrobiotu. Ishod tog istraživanja pokazao je da polifenoli potencijalno mogu djelovati i na rezistentne mikroorganizme (Kemperman i sur., 2013).

Polifenoli su, između ostalog, prisutni kao fitokemikalije u većini namirnica biljnog podrijetla te moduliraju aktivnost velikog broja enzima (telomeraza, ciklooksigenaza, lipooksigenaza i dr.) te staničnih receptora. Također mogu interferirati s različitim signalnim putevima i tako utječu na transdukciju signala, a sve je više dokaza koji govore o pozitivnom utjecaju polifenola na regulaciju staničnog ciklusa i na funkciju trombocita (D'Archivio i sur., 2007; Manach i sur., 2004).

Većinom se u pokusima na životinjama ili *in vitro* istraživanjima, koja govore o prevenciji bolesti primjenom polifenola, koriste znatno veće doze od onih koje ljudi mogu unijeti prehranom. Nužno je zato poznavati bioraspoloživost i metabolizam, rasprostranjenost i sadržaj različitih polifenolnih spojeva u hrani. Takva su znanja neophodna za razumijevanje odnosa između unosa polifenola hranom i rizika za razvoj različitih bolesti. Važno je poznavati bioraspoloživost polifenolnih spojeva, koja značajno može varirati, budući da

polifenoli koji su najzastupljeniji u pojedinoj prehrani ne moraju nužno imati i najbolju bioraspoloživost. Dokazano je da polifenoli poboljšavaju status biomarkera oksidativnog stresa, ali i dalje postoji mnogo nesuglasica vezanih uz značaj takvih biomarkera kao prediktora bolesti i prikladnosti korištenih metoda. Postoje i studije koje pokazuju kontradiktorne rezultate, koji govore o prooksidativnom učinku polifenola, što upućuje na to da oni također mogu inducirati apoptozu te inhibirati staničnu proliferaciju. Glavni je razlog ovih neslaganja upravo činjenica da polifenolne tvari čine brojni spojevi različitog biološkog djelovanja pa se učinak jednog polifenolnog spoja ne može poistovjetiti s ostalima (Primorac, 2012; Scalbert i sur., 2005; Sun i sur., 2002).

1.3.2 Trjeslovine ili tanini

Kemijska struktura i obilježja

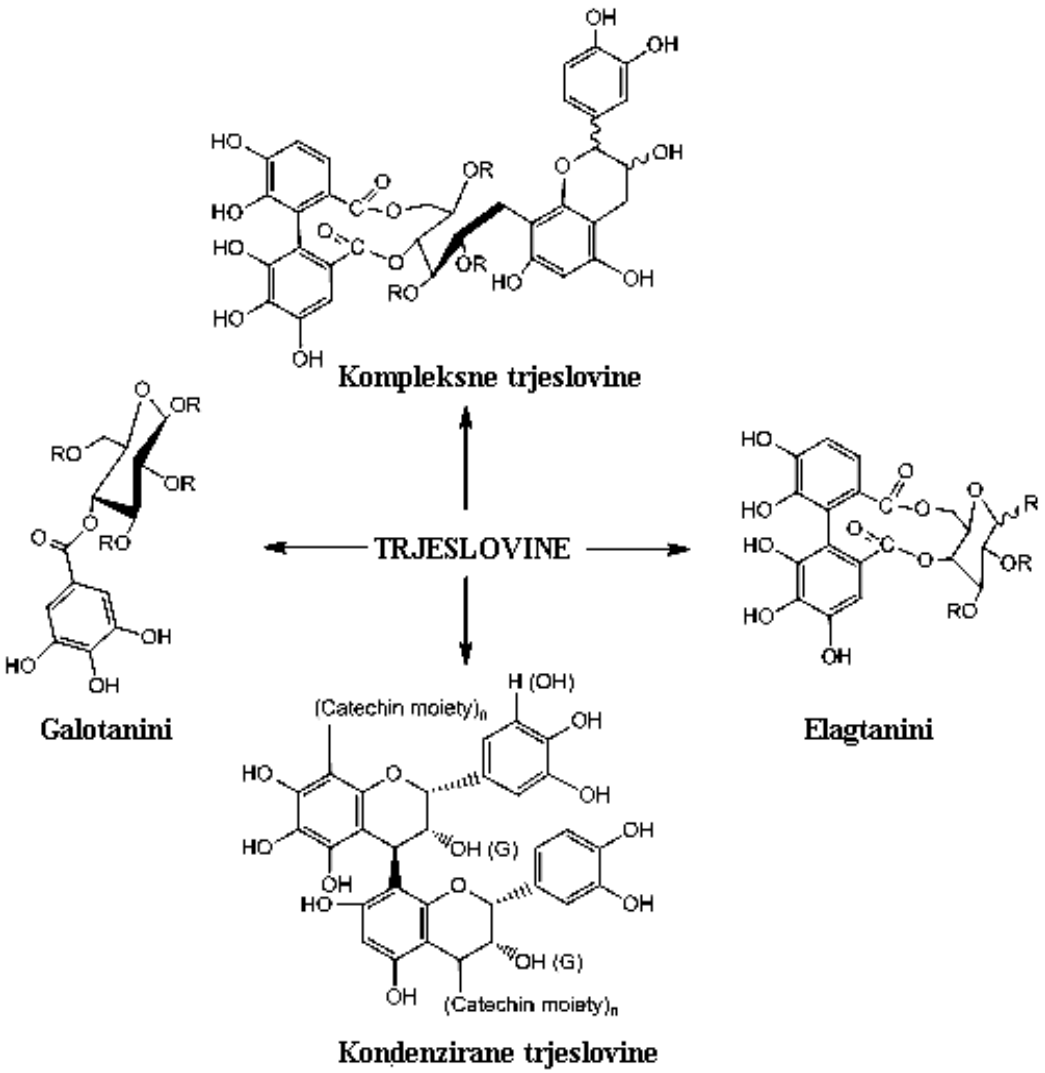
Trjeslovine su skupina fenolnih spojeva koji su značajan produkt sekundarnog metabolizma biljaka, a ime im potječe iz 1796. kada je opisana njihova sposobnost da reagiraju sa životinjskom kožom pri njenoj obradi („tanning“). Obilježja koja razlikuju trjeslovine od ostalih vrsta biljnih polifenola su: vezivanje na proteine, baze, pigmente, velike molekule i metalne ione, antioksidativno djelovanje i drugo. Te se značajke koriste za njihovo kvalitativno i kvantitativno razlikovanje pri analizi polifenola. Postoje različiti pristupi kategorizaciji trjeslovina, a jednu od podjela prikazuje Slika 7. Trjeslovine su prvotno podijeljene u dvije grupe, prema polifenolnim skupinama u svojim molekulama, na trjeslovine tipa pirogalola i trjeslovine tipa katehola (katehina). Razvojem kemije trjeslovina, došlo je do preimenovanja tih dviju grupa u trjeslovine koje hidroliziraju (galotanini i elagtanini) te kondenzirane trjeslovine (katehinske trjeslovine) (Okuda i Ito, 2011; Kalođera, 2010; Zhang i Lin, 2008; Rangari, 2007).

Izolacijom bioaktivnih stilbenoida i različitih oligomera resveratrola, kao i florotanina iz smeđih algi, proširila se skupina trjeslovina i povezanih polifenola na navedene grupe spojeva.

Često je nemoguće provjeriti strukture trjeslovina koje su opisane u pojedinim istraživanjima, a to je neophodno za karakterizaciju bioloških i farmakoloških svojstava nekog spoja pa je došlo do uvođenja dodatne kategorizacije trjeslovina i povezanih polifenola u dvije grupe: tip A (s konstantnom strukturom) i tip B (s promjenjivom strukturom) (Okuda i Ito, 2011).

Trjeslovine koje hidroliziraju

Iz samog je naziva vidljivo da su trjeslovine koje hidroliziraju spojevi topljivi u vodi djelovanjem mineralnih kiselina ili enzima poput tanaze. Struktura im se sastoji od nekoliko molekula fenolnih kiselina (npr. galna, heksahidrofenolna ili elagna kiselina) povezanih esterskim vezama na središnju molekulu šećera koji je najčešće glukoza (Slika 7). Ovisno o fenolnim kiselinama koje nastaju kao produkti hidrolize, dalje se dijele na galotanine (sastavljene od galne kiseline) ili elagtanine (sadrže heksahidrodifenolnu kiselinu koja nakon intraesterifikacije daje elagnu kiselinu) (Vladimir-Knežević, 2008; Rangari, 2007).



Slika 7. Podjela trjeslovina (Ascacio-Valdés i sur., 2011).

Kondenzirane trjeslovine

Molekule ove skupine još se nazivaju i proantocijanidini. Kondenzirane se trjeslovine, za razliku od prethodne grupe, neće hidrolizirati na jednostavnije molekule djelovanjem mineralnih kiselina ili enzima. Prema kemijskoj strukturi to su polimerni flavonoidi koji mogu imati preko 50 jedinica (a rijetko su oligomerne strukture). Flavonoidi su raznolika skupina metabolita temeljena na heterocikličnoj prstenastoj bazi nastaloj od fenilalanina u poliketidnoj biosintezi. U trjeslovinama se najčešće nalaze katehin i epikatehin koji su flavan-3-oli, dok su leukoantocijanidini flavan-3,4-diolne strukture. Takvi su polifenoli često dalje vezani na ugljikohidrate ili proteine kako bi tvorili još složenije trjeslovine (Rangari, 2007). Iako se naziv kondenzirane trjeslovine i dalje koristi za opisivanje spomenutih polifenola, polako se usvaja kemijski pojam koji ih bolje označava – „proantocijanidini". Riječ je o spojevima koji daju antocijanidinske pigmente nakon oksidativnog cijepanja (ne hidrolize!) u vrućem alkoholu. Kada se na njih djeluje kiselinama ili enzimima, obično polimeriziraju, dajući netopljive crvene produkte poznate pod imenom flobafeni (npr. kod kininovca) (Hagerman, 2002).

Rasprostranjenost

Široka je rasprostranjenost trjeslovina/tanina u biljnom svijetu, a najpoznatije porodice čije sve vrste sadrže trjeslovine jesu: od dvosupnica – Aceraceae, Actinidiaceae, Anacardiaceae, Bixaceae, Burseraceae, Combretaceae, Dipterocarpaceae, Ericaceae, a od jednosupnica Najadaceae i Typhaceae (Mole, 1993). Vrste porodica Brassicaceae i Papaveraceae ne sadrže trjeslovine (Rangari, 2007). Trjeslovine su neravnomjerno raspoređene u biljci, a najviše ih sadrži kora stabljike, zatim kora korijena, ksilemski dijelovi, listovi, i konačno, plodovi. Trjeslovinama su najbogatije patološke tvorevine, npr. Gallae ili sisarke (šiške). To su patološke izrasline na listu, koje su nastale razvojem ličinke ose (na azijskom hrastu) ili vrste biljnih uši (na kineskom ruju), a mogu sadržavati do 75% trjeslovina. Tijekom razvoja spomenutih larvi, biljke uslijed podražaja stvaraju trjeslovine. S obzirom na starost pojedinih biljnih organa, utvrđeno je da se trjeslovine javljaju u većoj količini u mlađim dijelovima biljke (lisnim pupoljcima, mladim listovima i cvjetovima), a razlog tome je da biljka nakuplja trjeslovine u onim dijelovima koji su joj najvrjedniji. Količina tanina u biljci varira ovisno o različitim okolišnim i sezonskim klimatskim čimbenicima. Suša, visoka temperatura, velika izloženost svjetlu i slaba kvaliteta zemlje stvaraju uvjete koji pogoduju povećanom sadržaju trjeslovina u biljci. Sezonska varijabilnost sadržaja ovisi o fazi rasta biljke pa je stoga sinteza tanina najintenzivnija u fazi cvatnje biljke, kada je smanjen njezin rast pa su tada brojni prekursori na raspolaganju za sintezu fenolnih spojeva (Kalođera, 2010; Vladimir-Knežević, 2008).

Biološki učinci

Nije potpuno razjašnjeno fiziološko značenje trjeslovina. Naime, u prošlosti se smatralo da njihov gorak okus štiti biljku od štetočina, a to se kasnije pokazalo netočnim. Pretpostavljalo se i da su trjeslovine pričuvne tvari, ali i to je opovrgnuto jer se rijetko nalaze u biljnim dijelovima koji služe kao spremnici pričuvnih tvari. Ipak, sa sigurnošću se može ustvrditi da kod nekih biljaka trjeslovine sudjeluju u izmjeni tvari stvaranjem redoks sustava. Zahvaljujući mnogobrojnim hidroksilnim skupinama u svojoj strukturi, trjeslovine djeluju kao snažni antioksidansi, pri čemu one veće molekulske mase, djeluju kao jači hvatači slobodnih radikala. Trjeslovine mogu također i taložiti proteine, te su kelatori metala, a mogu same po sebi biti i djelatne tvari ili mogu sinergistički djelovati s drugim aktivnim tvarima, pri čemu utječu na terapijski učinak glavne aktivne sastavnice (Primorac, 2012; Hagerman, 2002). S obzirom na to da su trjeslovine adstringensi, njihova glavna upotreba povezana je upravo s tim učinkom. Djeluju antidijaroički, antiseptički, oblažu izložene membrane sluznice koagulacijom, stvarajući vodonepropusni sloj. Antimikrobno i antifungalno mogu djelovati tako što precipitiraju proteine. Imaju i hemostatsko djelovanje, a mogu biti i antidoti kod slučajeva trovanja (teškim metalima i većinom alkaloida). Interno se mogu koristiti kod želučanog i crijevnog katara te u tretmanu hiperaciditetnog gastritisa. Stvaraju zaštitni sloj preko ozlijeđenog tkiva i omogućavaju da se ispod njega slobodno odvija cijeljenje te tako djeluju u procesu liječenja rana, opeklina, ozeblina i upala. Studije su pokazale da trjeslovine neutraliziraju slobodne radikale, a dokazano je da su mnoge degenerativne bolesti i stanja (rak, multipla skleroza, ateroskleroza, proces starenja) povezane s visokim koncentracijama slobodnih radikala između stanica. Pojedine vrste trimernih proantocijanidina mogu djelovati protiv bolesti urinarnog trakta.

Dakle, trjeslovine su spojevi vrlo različitih i mnogobrojnih složenih struktura. Zbog tako kompleksne građe te uslijed nedostatka odgovarajućih metoda za njihovu karakterizaciju i standardizaciju, znatno su ograničena biomedicinska istraživanja pozitivnih i negativnih učinaka na organizam pri povećanom unosu trjeslovina (de Jesus i sur., 2012; Kalođera, 2010; Zhang i Lin, 2008; Rangari, 2007).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj je ovoga diplomskog rada kvantitativna analiza ukupnih polifenola i trjeslovina iz pulveriziranih uzoraka listova vrste *Laurus nobilis* L. (lovor) s područja Lovrana, prikupljanih u razdoblju od 12 mjeseci (od svibnja 2015. do travnja 2016. godine), sa svrhom praćenja povezanosti godišnjih varijacija vremenskih uvjeta sa sadržajem polifenola i tjeslovina u navedenoj biljnoj vrsti.

Sadržaj (%) ukupnih polifenola i trjeslovina određeni su UV-Vis spektrofotometrijski. Provedenim istraživanjem utvrđena su godišnja razdoblja s najvećim i najmanjim postotkom ukupnih polifenola i trjeslovina, a nove spoznaje mogu poslužiti za određivanje najpovoljnijeg perioda prikupljanja biljnog materijala s obzirom na sadržaj navedenih polifenolnih tvari.

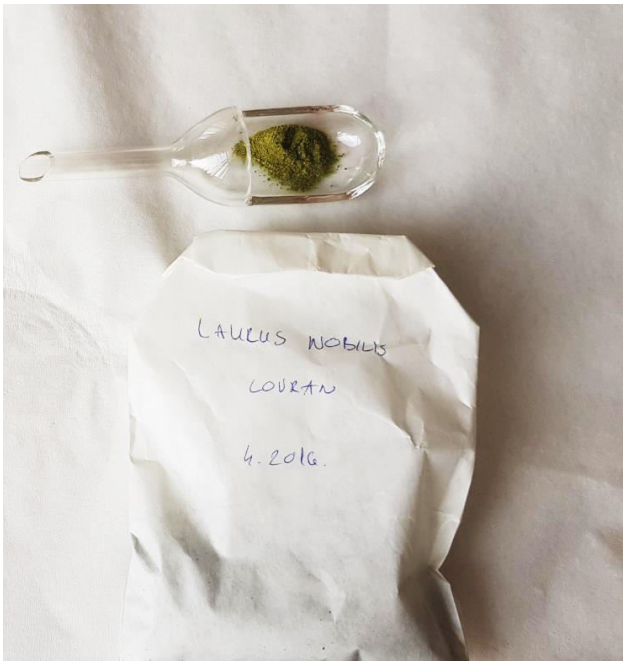
Konačna svrha studije provedene u okviru ovoga diplomskog rada očituje se u općem doprinosu znanstvenim istraživanjima lovora, a dobiveni rezultati predstavljaju također podlogu budućim ispitivanjima biološke aktivnosti i fitoterapijskog potencijala vrste *Laurus nobilis* L.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Biljni materijal

U ovoj su studiji analizirani uzorci listova lovora (vrsta *Laurus nobilis* L., Lauraceae*)*, prikupljeni na području Lovrana (sjeveroistočna Istra, Republika Hrvatska).

Biljni materijal prikupljan je tijekom razdoblja od dvanaest mjeseci, tj. od svibnja 2015. do travnja 2016. godine. Prije analize, listovi lovora su pulverizirani u mlinu za mljevenje biljnih droga.



Slika 8. Izvagani uzorak pulveriziranog lista lovora, *L. nobilis* L.

Identifikacija biljnog materijala provedena je u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, prema dostupnim literaturnim podatcima (Domac, 1994).

3.2. Aparatura i kemikalije

Aparatura i pribor:

- UV-Vis spektrofotometar Agilent 8453E (Hewlett Packard, Njemačka)
- kiveta za spektrofotometar (1 cm)
- pipete, propipete, menzure, lijevci, čaše, kapaljke, stakleni štapići, filtar papir
- tikvice s okruglim dnom i odmjerne tikvice
- povratna hladila
- plamenik, tronožac, keramička mrežica, stalak, kleme
- šprica, filtar 0,45 µm

Kemikalije:

- Folin-Ciocalteuov fenolni reagens (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- kazein (Calbiochem, Darmstadt, Njemačka)
- metanol (J.T.Baker, Deventer, Nizozemska)
- natrijev acetat (Alkaloid, Skopje, Makedonija)
- natrijev karbonat dekahidrat (Poch, Gliwice, Poljska)
- octena kiselina, led. (Panreac, Barcelona, Španjolska)

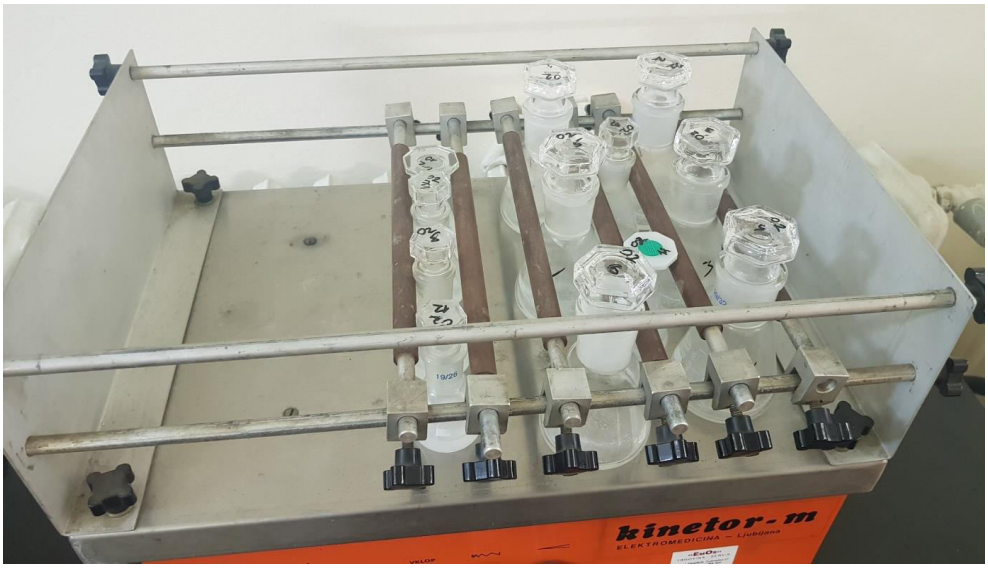
3.3. Metode i postupci istraživanja

3.3.1. Spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina

Količina ukupnih polifenola u listovima vrste *Laurus nobilis* L. određena je spektrofotometrijskom metodom (Vuković Rodríguez i sur., 2016; Schneider, 1976).

Fino usitnjeni nadzemni biljni dijelovi (0,25 g) ekstrahiraju se s 80 mL 30%-tnog metanola u tikvici s povratnim hladilom, zagrijavanjem na kipućoj vodenoj kupelji oko 15 minuta.
Nakon hlađenja, iscrpina je profiltrirana u odmjernu tikvicu od 100,0 mL te nadopunjena do oznake 30%-tnim metanolom. 2,0 mL filtrata pomiješano je s 8 mL destilirane vode i 10 mL otopine natrijeva acetata (1,92 g natrijeva acetata trihidrata i 0,34 mL octene kiseline

pomiješano je i nadopunjeno destiliranom vodom do 100,0 mL). Puferska otopina održava stalnu pH-vrijednost medija (pH = 5) koja je optimalna za taloženje trjeslovina. Otopina dobivena na opisani način označena je kao *otopina 1*. 10,0 mL *otopine 1* mućkano je s 50 mg kazeina na mućkalici 45 minuta (Slika 9), potom je otopina profiltrirana, a dobiveni je filtrat predstavljao *otopinu 2*.



Slika 9. *Otopine 1* s kazeinom na mućkalici.

Po 1,0 mL *otopine 1* i *otopine 2* pomiješano je odvojeno u odmjernim tikvicama od 10,0 mL s po 0,5 mL Folin-Ciocalteuova reagensa i nadopunjeno do oznake s 33%-tnom otopinom natrijeva karbonata dekahidrata (Folin-Ciocalteuov fenolni reagens sadrži natrijev volframat, natrijev molibdat, destiliranu vodu, 85%-tnu fosfatnu kiselinu, 36%-tnu klorovodičnu kiselinu, litijev sulfat i brom). Apsorbancije dobivenih plavih otopina izmjerene su na 720 nm, uz destiliranu vodu kao slijepi pokus. Vrijednost koju daje *otopina 1* odgovara količini ukupnih polifenola, dok razlika vrijednosti dobivenih za *otopinu 1* i *otopinu 2* predstavlja količinu trjeslovina vezanih na kazein.

Za izračunavanje koncentracije trjeslovina izrađen je baždarni pravac. U tu je svrhu 10 mg tanina (*Acidum tannicum*) osušeno na 80 ºC i otopljeno u 100,0 mL destilirane vode (osnovna otopina standarda). Radni standard pripremljen je miješanjem 5,0 mL osnovne otopine standarda i 5,0 mL puferske otopine. Koncentracijski niz, dobiven razrjeđivanjem volumena od 0,2 do 1,2 mL radnog standarda do 10,0 mL puferskom otopinom (što odgovara koncentraciji trjeslovina od 0,001 do 0,006 mg/mL), daje linearni porast apsorbancije. Za izmjerene vrijednosti apsorbancija *otopine 1* i *2* očitaju se pripadajuće koncentracije iz baždarnog dijagrama i izraze kao grami ukupnih polifenola, odnosno trjeslovina, na 100 g droge (%).

Odnosno, za izražavanje sadržaja u gramima polifenola na 100 g droge (%), vrijedi izraz:

$$\% \text{ polifenola} = \frac{A}{0{,}025} = 40A$$

A = izmjerena apsorbancija otopine 1, odnosno otopine 2

Razlika sadržaja (%) ukupnih polifenola, koji je dobiven spektrofotometrijskom analizom *otopine 1*, i sadržaja određenog za *otopinu 2*, predstavlja sadržaj (%) trjeslovina koje su istaložene kazeinom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Rezultati kvantitativne analize ukupnih polifenola i trjeslovina lovora

Kvantitativna analiza ukupnih polifenola i trjeslovina u listovima lovora s područja Lovrana provedena je UV-Vis spektrofotometrijskom metodom. Trjeslovine se istalože kazeinom, a zatim se provodi reakcija polifenolnih spojeva s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom (FCR). Nakon dodatka FCR-a, izmjerene su apsorbancije dobivenih otopina plave boje na 720 nm, uz destiliranu vodu kao slijepu probu.

Količina ukupnih polifenola i trjeslovina određena je pomoću prethodno dobivenog baždarnog pravca, na osnovi izmjerenih apsorbancija analiziranih poredbenih otopina taninske kiseline propisanih koncentracija.

Za izmjerene vrijednosti apsorbancija *otopine 1* (odgovara stadržaju ukupnih polifenola) i *otopine 2* (odgovara sadržaju polifenola koji nisu istaloženi kazeinom) dobiju se pripadajuće koncentracije i izraze kao grami ukupnih polifenola, odnosno trjeslovina, na 100 g droge (%), pri čemu vrijedi izraz:

$$\% \text{ polifenola} = \frac{A}{0{,}025} = 40A$$

A = izmjerena apsorbancija otopine 1, odnosno otopine 2

Svi uzorci listova lovora (ukupno dvanaest uzoraka prikupljanih tijekom razdoblja od jedne godine) ekstrahirani su jedanput te su pripremljene tri otopine za spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina. Apsorbancija svakog pojedinog uzorka tri je puta izmjerena (A1, A2, A3) na dvije valne duljine – na 720 nm (prema izvornoj metodi) i na 748 nm (maksimum apsorpcije), te je izračunata aritmetička sredina mjerenja ($\bar{A}$).

Provedena je i statistička obrada rezultata te je izračunato standardno odstupanje (SD) prema izrazu $SD = \sqrt{\frac{\Sigma(A-\bar{A})^2}{N-1}}$, gdje je N broj mjerenja, koji u ovom slučaju iznosi 3.

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola i trjeslovina prikazani su u Tablicama 1 i 2.

Tablica 1. Sadržaj ukupnih polifenola i trjeslovina tijekom dvanaest mjeseci u ekstraktima listova lovora s područja Lovrana; izmjereno na 720 nm (prema izvornoj metodi).

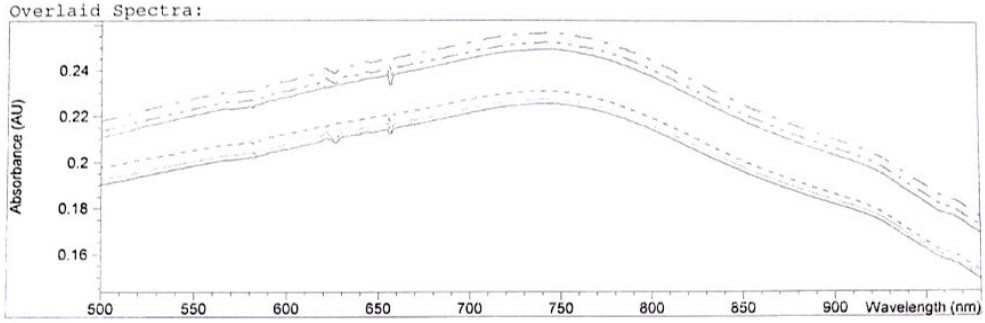
		Ukupni polifenoli		Polifenoli nevezani na kazein		Trjeslovine vezane na kazein		Sadržaj ukupnih polifenola		Sadržaj trjeslovina vezanih na kazein	
Mjesec/ Godina	m (uzorka)/g	$A_{720\ nm}$ otopina 1	Srednja vrijednost ot1 ± SD	A_{720nm} otopina 2	Srednja vrijednost ot2 ± SD	A1-A2	Srednja vrijednost (ot1-ot2) ± SD	%	Srednja vrijednost ± SD	%	Srednja vrijednost ± SD
5./2015.	0,2528	0,1427	0,1419 ± 0,0009	0,0828	0,0841 ± 0,0014	0,0599	0,0578 ± 0,0019	5,7080	5,67 ± 0,04	2,3960	2,31 ± 0,07
		0,1409		0,0840		0,0569		5,6360		2,2760	
		0,1420		0,0855		0,0565		5,6800		2,2600	
6./2015.	0,2512	0,1659	0,1663 ± 0,0015	0,1117	0,1099 ± 0,0016	0,0542	0,0564 ± 0,0026	6,6360	6,65 ± 0,06	2,1692	2,25 ± 0,1
		0,1650		0,1094		0,0556		6,6000		2,2240	
		0,1679		0,1087		0,0592		6,7160		2,3696	
7./2015.	0,2508	0,1545	0,1551 ± 0,0005	0,1100	0,1136 ± 0,0034	0,0445	0,0415 ± 0,003	6,1800	6,2 ± 0,02	1,7800	1,66 ± 0,12
		0,1553		0,1139		0,0414		6,2120		1,6560	
		0,1554		0,1168		0,0386		6,2160		1,5440	
8./2015.	0,2528	0,2114	0,2111 ± 0,0006	0,1114	0,1114 ± 0,0013	0,1000	0,0997 ± 0,0008	8,4560	8,44 ± 0,02	4,0000	3,99 ± 0,03
		0,2104		0,1102		0,1002		8,4160		4,0080	
		0,2115		0,1127		0,0988		8,4600		3,9520	
9./2015.	0,2513	0,2244	0,2269 ± 0,0029	0,1053	0,1042 ± 0,0013	0,1191	0,1228 ± 0,0034	8,9760	9,08 ± 0,12	4,7640	4,91 ± 0,13
		0,2263		0,1028		0,1235		9,0520		4,9400	
		0,2301		0,1044		0,1257		9,2040		5,0280	
10./2015.	0,2518	0,1644	0,1641 ± 0,0012	0,1010	0,0998 ± 0,001	0,0634	0,0643 ± 0,0014	6,5760	6,56 ± 0,05	2,5360	2,57 ± 0,06
		0,1651		0,0992		0,0659		6,6040		2,6360	
		0,1627		0,0992		0,0635		6,5080		2,5400	
11./2015.	0,2518	0,1854	0,1862 ± 0,0009	0,1168	0,1194 ± 0,0035	0,0686	0,0669 ± 0,0027	7,4160	7,45 ± 0,03	2,7440	2,67 ± 0,11
		0,1862		0,1179		0,0683		7,4480		2,7320	
		0,1871		0,1234		0,0637		7,4840		2,5480	
12./2015.	0,2518	0,1619	0,1619 ± 0	0,1309	0,1297 ± 0,0014	0,0310	0,0321 ± 0,0014	6,4764	6,48 ± 0	1,2392	1,29 ± 0,06
		0,1619		0,1282		0,0337		6,4744		1,3484	
		0,1619		0,1302		0,0317		6,4756		1,2696	
1./2016.	0,2505	0,1888	0,1881 ± 0,0007	0,1286	0,1283 ± 0,0005	0,0602	0,0598 ± 0,0009	7,5520	7,53 ± 0,03	2,4080	2,39 ± 0,04
		0,1874		0,1286		0,0588		7,4960		2,3520	
		0,1882		0,1277		0,0605		7,5280		2,4200	
2./2016.	0,2507	0,2144	0,2132 ± 0,0011	0,1157	0,1159 ± 0,0004	0,0987	0,0972 ± 0,0015	8,5760	8,53 ± 0,04	3,9480	3,89 ± 0,06
		0,2129		0,1157		0,0972		8,5160		3,8880	
		0,2122		0,1164		0,0958		8,4880		3,8320	
3./2016.	0,2500	0,1632	0,1637 ± 0,0006	0,1261	0,1266 ± 0,0005	0,0371	0,0371 ± 0,0007	6,5280	6,55 ± 0,02	1,4840	1,48 ± 0,03
		0,1643		0,1266		0,0377		6,5720		1,5080	
		0,1635		0,1271		0,0364		6,5400		1,4560	
4./2016.	0,2506	0,1453	0,1444 ± 0,0008	0,1126	0,1125 ± 0,0003	0,0327	0,032 ± 0,0007	5,8128	5,78 ± 0,03	1,3072	1,28 ± 0,03
		0,1441		0,1121		0,0320		5,7644		1,2812	
		0,1439		0,1127		0,0312		5,7552		1,2488	

Tablica 2. Sadržaj ukupnih polifenola i trjeslovina tijekom dvanaest mjeseci u ekstraktima listova lovora s područja Lovrana; izmjereno na 748 nm (maksimum apsorpcije).

		Ukupni polifenoli		Polifenoli nevezani na kazein		Trjeslovine vezane na kazein		Sadržaj ukupnih polifenola		Sadržaj trjeslovina vezanih na kazein	
Mjesec/ Godina	m (uzorka)/g	$A_{748\ nm}$ otopina 1	Srednja vrijednost ot1 ± SD	A_{748nm} otopina 2	Srednja vrijednost ot2 ± SD	A1-A2	Srednja vrijednost (ot1-ot2) ± SD	%	Srednja vrijednost ± SD	%	Srednja vrijednost ± SD
5./2015.	0,2528	0,1458	0,145 ± 0,0009	0,0845	0,0859 ± 0,0014	0,0613	0,0591 ± 0,0019	5,8320	5,8 ± 0,03	2,4520	2,37 ± 0,08
		0,1441		0,0859		0,0582		5,7640		2,3280	
		0,1452		0,0873		0,0579		5,8080		2,3160	
6./2015.	0,2512	0,1683	0,1687 ± 0,0014	0,1131	0,1112 ± 0,0016	0,0552	0,0574 ± 0,0026	6,7320	6,75 ± 0,06	2,2092	2,3 ± 0,1
		0,1675		0,1107		0,0568		6,7000		2,2724	
		0,1702		0,1099		0,0603		6,8080		2,4104	
7./2015.	0,2508	0,1575	0,158 ± 0,0005	0,1114	0,1148 ± 0,0032	0,0461	0,0433 ± 0,0028	6,3000	6,32 ± 0,02	1,8440	1,73 ± 0,11
		0,1583		0,1151		0,0432		6,3320		1,7280	
		0,1583		0,1178		0,0405		6,3320		1,6200	
8./2015.	0,2528	0,2137	0,2134 ± 0,0006	0,1134	0,1133 ± 0,0013	0,1003	0,1001 ± 0,0008	8,5480	8,54 ± 0,02	4,0120	4 ± 0,03
		0,2127		0,1120		0,1007		8,5080		4,0280	
		0,2138		0,1146		0,0992		8,5520		3,9680	
9./2015.	0,2513	0,2255	0,2279 ± 0,0027	0,1073	0,1062 ± 0,0012	0,1182	0,1217 ± 0,0033	9,0200	9,12 ± 0,11	4,7280	4,87 ± 0,13
		0,2273		0,1049		0,1224		9,0920		4,8960	
		0,2309		0,1063		0,1246		9,2360		4,9840	
10./2015.	0,2518	0,1676	0,1672 ± 0,0012	0,1031	0,102 ± 0,001	0,0645	0,0652 ± 0,0012	6,7040	6,69 ± 0,05	2,5800	2,61 ± 0,05
		0,1681		0,1015		0,0666		6,7240		2,6640	
		0,1659		0,1014		0,0645		6,6360		2,5800	
11./2015.	0,2518	0,1891	0,1899 ± 0,0008	0,1202	0,1226 ± 0,0031	0,0689	0,0673 ± 0,0024	7,5640	7,6 ± 0,03	2,7560	2,69 ± 0,1
		0,1899		0,1214		0,0685		7,5960		2,7400	
		0,1907		0,1261		0,0646		7,6280		2,5840	
12./2015.	0,2518	0,1652	0,1652 ± 0,0001	0,1333	0,1322 ± 0,0014	0,0319	0,033 ± 0,0014	6,6084	6,61 ± 0	1,2752	1,32 ± 0,05
		0,1651		0,1306		0,0345		6,6024		1,3796	
		0,1652		0,1327		0,0325		6,6096		1,3016	
1./2016.	0,2505	0,1928	0,1922 ± 0,0007	0,1303	0,1301 ± 0,0005	0,0625	0,0621 ± 0,0009	7,7120	7,69 ± 0,03	2,5000	2,48 ± 0,04
		0,1915		0,1305		0,0610		7,6600		2,4400	
		0,1922		0,1295		0,0627		7,6880		2,5080	
2./2016.	0,2507	0,2181	0,217 ± 0,001	0,1183	0,1185 ± 0,0003	0,0998	0,0985 ± 0,0012	8,7240	8,68 ± 0,04	3,9920	3,94 ± 0,05
		0,2167		0,1184		0,0983		8,6680		3,9320	
		0,2162		0,1188		0,0974		8,6480		3,8960	
3./2016.	0,2500	0,1670	0,1674 ± 0,0006	0,1291	0,1296 ± 0,0005	0,0379	0,0379 ± 0,0007	6,6800	6,7 ± 0,02	1,5160	1,51 ± 0,03
		0,1681		0,1296		0,0385		6,7240		1,5400	
		0,1672		0,1300		0,0372		6,6880		1,4880	
4./2016.	0,2506	0,1488	0,1479 ± 0,0008	0,1150	0,1147 ± 0,0003	0,0338	0,0332 ± 0,0007	5,9500	5,92 ± 0,03	1,3516	1,33 ± 0,03
		0,1476		0,1144		0,0333		5,9044		1,3300	
		0,1473		0,1148		0,0325		5,8920		1,2984	

Method file : POLIFEN.M (modified) Last update: Date 2/4/19 Time 9:41:50 AM
Information : Default Method
Data File : C:\HELENAR\TP5.SD Created : 1/29/19 12:37:56

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<720nm>	Abs<748nm>
1		0.22444	0.22550
2		0.22629	0.22731
3		0.23010	0.23093
4		0.25530	0.25629
5		0.25103	0.25219
6		0.24813	0.24923

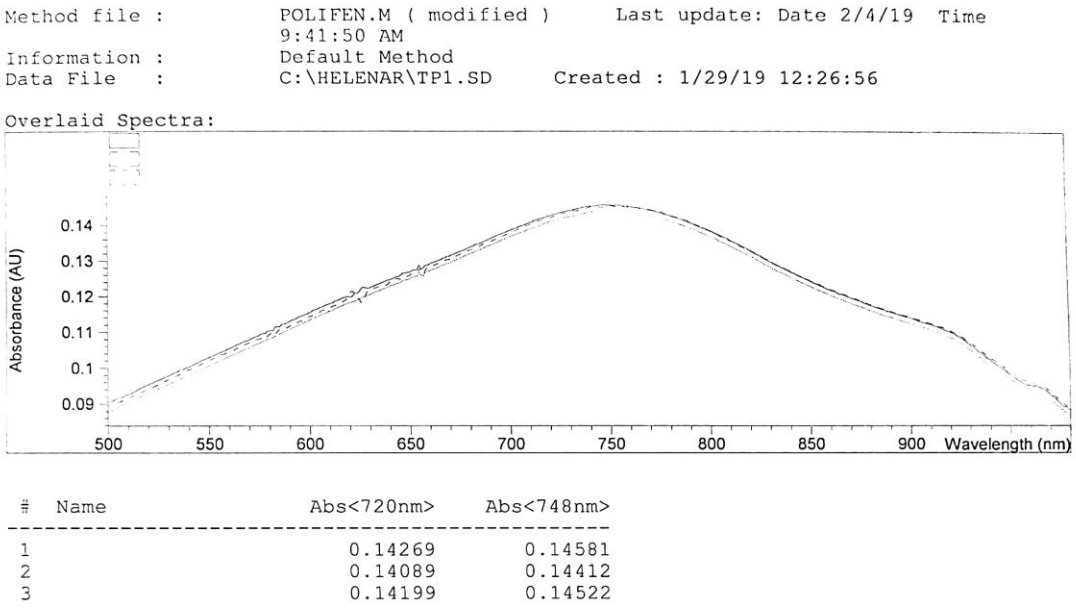
Slika 10. UV-Vis spektar dobiven mjerenjem apsorbancije ukupnih polifenola u ekstraktu lista lovora te razlika mjerenja filtriranog uzorka (dolje: 1-3) i nefiltriranog uzorka (4-6) od rujna 2015.

Gornja tri UV-Vis spektra prikazuju rezultate (4-6) dobivene mjerenjem nefiltrirane otopine uzorka, bez zagrijavanja reagensa, dok donja tri spektra predstavljaju rezultate (1-3) za istu otopinu koja je filtrirana kroz filtar 0,45 μm.

Opaska: S obzirom da se javila velika pogreška u mjerenju nakon dodatka 33%-tnog natrijeva karbonata dekahidrata u ekstrakte lovora, pokazalo se potrebnim prethodno ga zagrijati (na oko 60 °C) i profiltrirati neposredno prije svakog mjerenja te tada nije bilo potrebno dodatno filtrirati otopinu uzorka. Ukoliko se Na_2CO_3, $10H_2O$ (33%) prethodno ne zagrije, dolazi do zamućenja mjerene otopine uzorka i značajnog odstupanja rezultata, što je pokazano na primjeru u Tablici 3.

Tablica 3. Prikaz odstupanja vrijednosti apsorbancija nefiltriranog i filtriranog uzorka nakon dodatka Na_2CO_3, $10H_2O$ (33%).

	$A_{720\ nm}$	Srednja vrijednost ± SD	$A_{748\ nm}$	Srednja vrijednost ± SD
Filtrirani uzorak	0,224	0,2267 ± 0,0031	0,226	0,228 ± 0,0026
	0,226		0,227	
	0,230		0,231	
Nefiltrirani uzorak	0,255	0,2513 ± 0,0035	0,256	0,2523 ± 0,0035
	0,251		0,252	
	0,248		0,249	
Odstupanje nefiltriranog uzorka	/	9,79%	/	9,63%

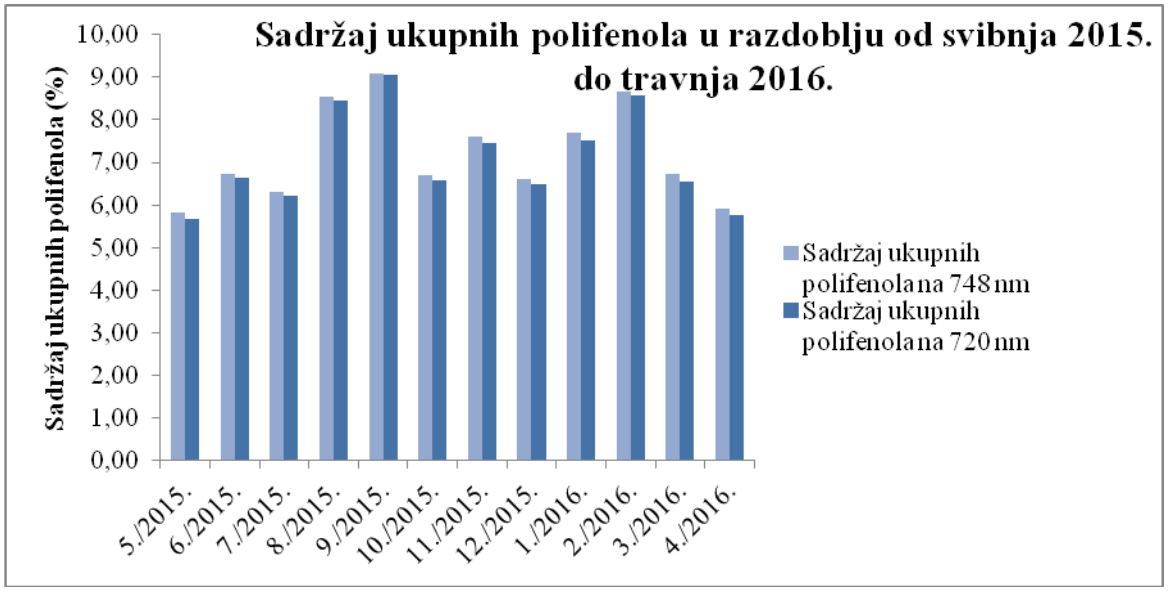


#	Name	Abs<720nm>	Abs<748nm>
1		0.14269	0.14581
2		0.14089	0.14412
3		0.14199	0.14522

Slika 11. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije ukupnih polifenola u ekstraktu lista lovora – svibanj 2015.

Najveći sadržaj ukupnih polifenola zabilježen je u listovima lovora prikupljenim u rujnu 2015. godine (Slika 10) i iznosio je 9,08% na 720 nm te 9,12% na 748 nm, dok je najmanja vrijednost zabilježena u svibnju 2015. godine (Slika 11) i iznosila je 5,67% (720 nm) i 5,80% (748 nm).

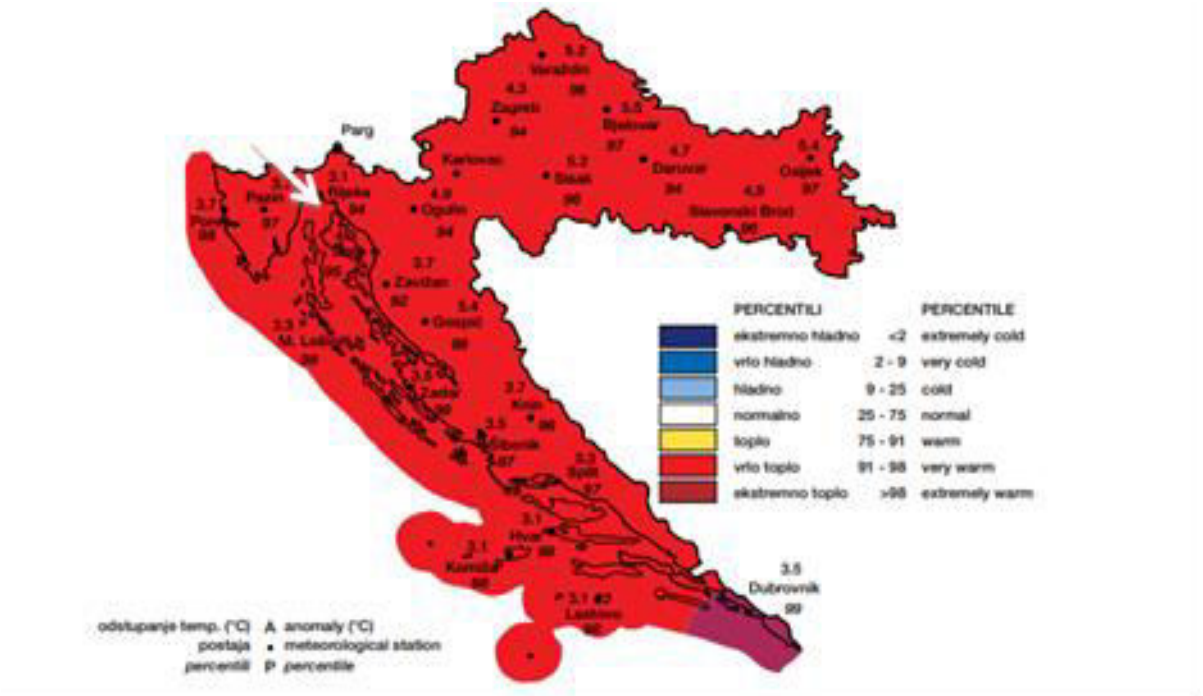
Grafički prikaz 1 upućuje na značajan pad sadržaja ukupnih polifenola u zimskim mjesecima, što je povezano s nižim temperaturama zraka tijekom tog razdoblja i općenito s vremenskim uvjetima zimi i u rano proljeće.



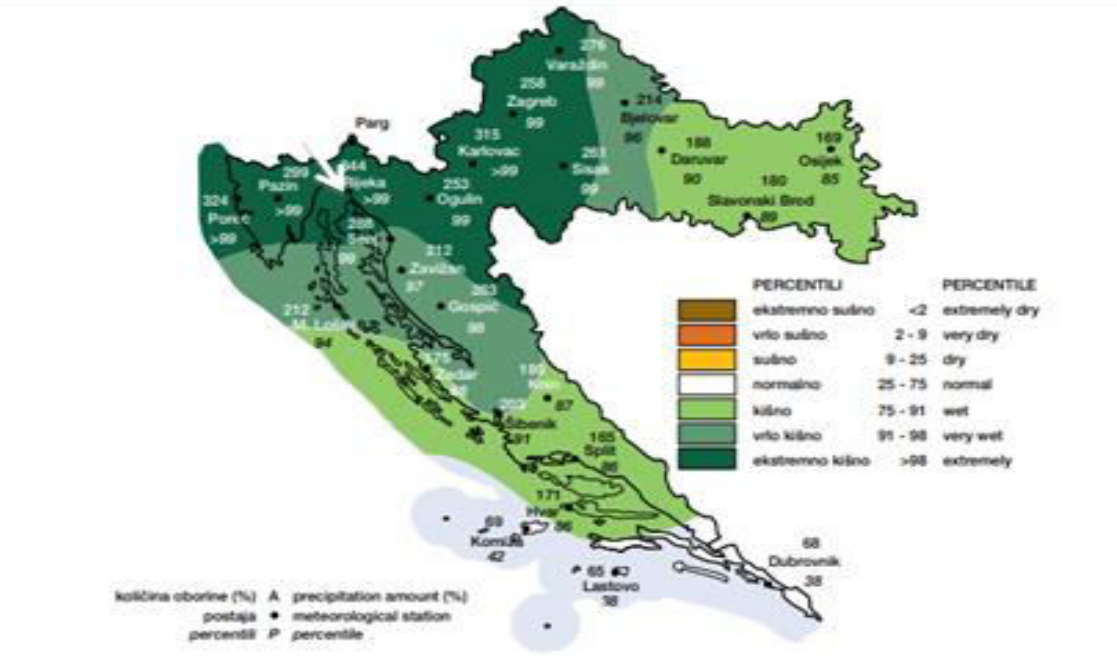
Grafički prikaz 1. Sadržaj ukupnih polifenola u razdoblju od svibnja 2015. do travnja 2016.

Kao posebnost ističe se činjenica da je u veljači 2016. godine sadržaj ukupnih polifenola bio znatno veći od sadržaja u ostalim zimskim mjesecima. Sadržaj ukupnih polifenola iznosio je 8,53% na 720 nm i 8,68% na 748 nm. Ovaj rezultat podudara se i s istraživanjem sadržaja fenolnih kiselina, u ekstraktu lista lovora s područja Lovrana, koji je također znatno povećan u veljači 2016. godine (Kirchbauer, 2018).

Prema podatcima Državnog hidrometeorološkog zavoda za vremenske uvjete u Lovranu u veljači 2016. godine, evidentirane su natprosječne temperature zraka za to doba godine, a uz to je zabilježena i velika količina oborina, što može utjecati na povišen sadržaj ukupnih polifenola lovora u tom razdoblju (Slike 12 i 13).

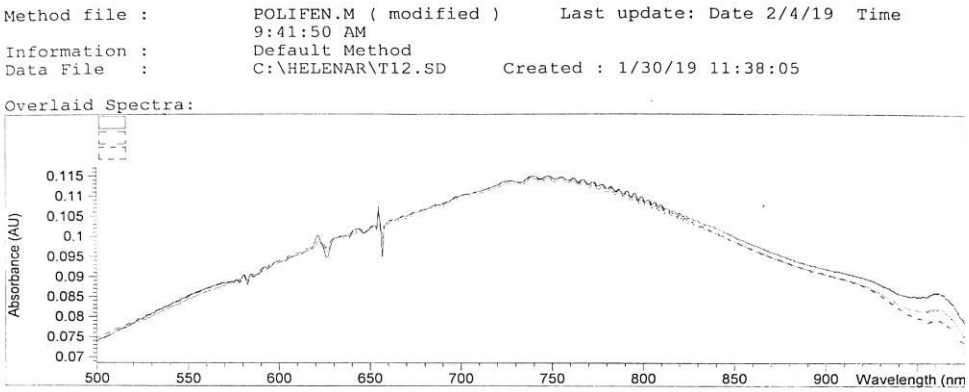


Slika12. Odstupanje srednje mjesečne temperature zraka (°C) za veljaču 2016. od višegodišnjeg prosjeka u RH (DHMZ).



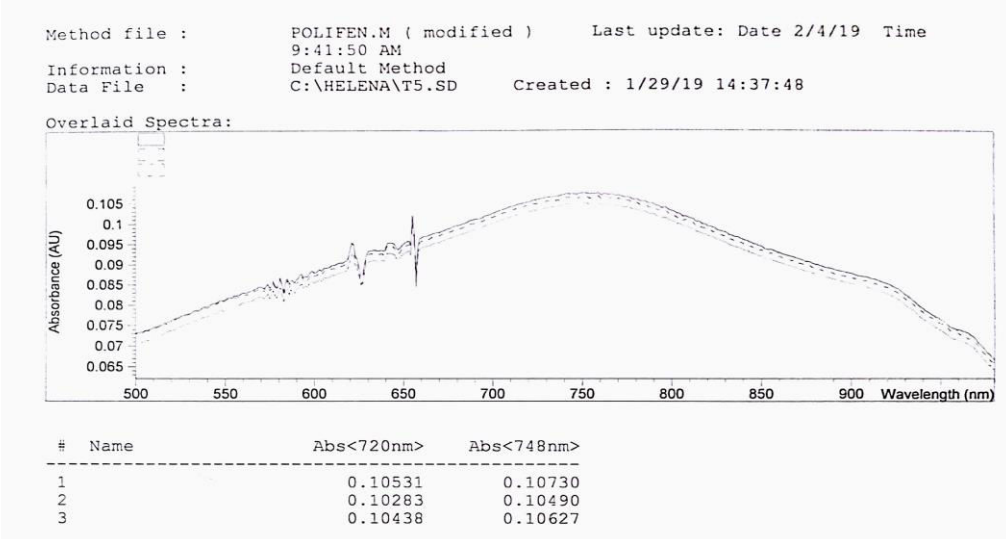
Slika 13. Odstupanje mjesečne količine oborina za veljaču 2016. od višegodišnjeg prosjeka u RH (DHMZ).

Najveći udio trjeslovina, analogno sadržaju ukupnih polifenola, zabilježen je u ekstraktu listova lovora prikupljenim u rujnu 2015. godine (Slika 14) te je iznosio 4,91% na 720 nm i 4,87% na 748 nm, dok je najmanja vrijednost zabilježena za svibanj 2015. godine (Slika 15) i iznosila je 2,31% (720 nm) te 2,37% (748 nm).



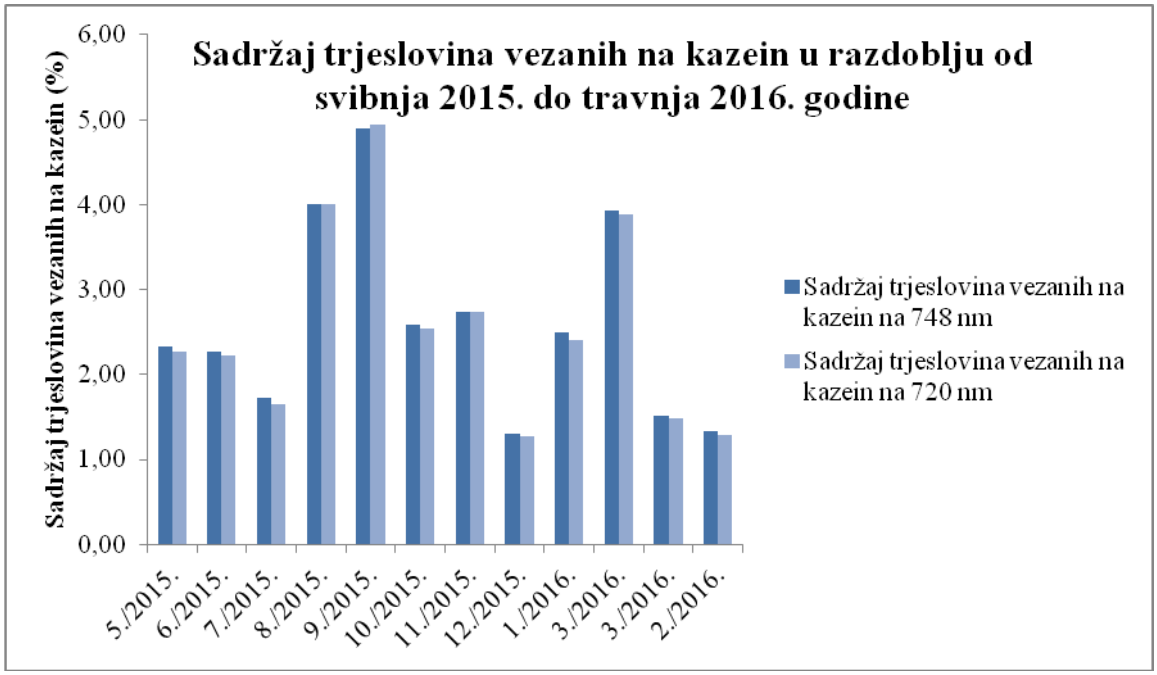
#	Name	Abs<720nm>	Abs<748nm>
1		0.11264	0.11496
2		0.11208	0.11436
3		0.11266	0.11484

Slika 14. UV-Vis spektar dobiven mjerenjem apsorbancije polifenola bez trjeslovina, koje se talože kazeinom, u ekstraktu listova lovora – rujan 2015.



#	Name	Abs<720nm>	Abs<748nm>
1		0.10531	0.10730
2		0.10283	0.10490
3		0.10438	0.10627

Slika 15. UV-Vis spektar dobiven mjerenjem apsorbancije polifenola bez trjeslovina koje se talože kazeinom u ekstraktu listova lovora – svibanj 2015.



Grafički prikaz 2. Sadržaj trjeslovina vezanih na kazein u razdoblju od svibnja 2015. do travnja 2016.

Grafičkim prikazom 2 pokazan je raspon sadržaja trjeslovina tijekom razdoblja od jedne godine, a godišnje varijacije udjela trjeslovina prate varijaciju sadržaja ukupnih polifenola. Objašnjenje velikog sadržaja trjeslovina u veljači 2016. analogno je objašnjenju povišenog sadržaja ukupnih polifenola u istom mjesecu i povezuje se s povoljnim vremenskim uvjetima u navedenom razdoblju.

5. ZAKLJUČCI

U okviru ovoga diplomskoga rada provedena je kvantitativna analiza ukupnih polifenola i trjeslovina u uzorcima listova lovora (*Laurus nobilis* L., Lauraceae), s područja Lovrana, prikupljanih mjesečno, u razdoblju od svibnja 2015. do travnja 2016. godine, a u svrhu praćenja godišnjih varijacija sadržaja spomenutih polifenolnih tvari.

Primjenom UV-Vis spektrofotometrijske metode s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom, kojoj prethodi taloženje trjeslovina s kazeinom, određen je sadržaj ukupnih polifenola i trjeslovina u ispitanim ekstraktima listova lovora, mjerenjem apsorbancije na 720 nm (prema izvornoj metodi) te na 748 nm (maksimum apsorpcije).

Najveći udio ukupnih polifenola zabilježen je u uzorku lista lovora iz rujna 2015. godine i iznosio je 9,08% (720 nm), odnosno 9,12% (748 nm), dok je najmanja vrijednost zabilježena u svibnju 2015. godine i iznosila je 5,67% (720 nm), odnosno 5,80% (748 nm).

Analogni rezultati dobiveni su i za sadržaj trjeslovina, a najveći udio dobiven je za uzorak lista lovora prikupljen u rujnu 2015. godine i iznosio je 4,91% (720 nm) i 4,87% (748 nm), dok je najmanja vrijednost zabilježena u svibnju 2015. godine i iznosila je 2,31% (720 nm), odnosno 2,37% (748 nm).

Među navedenim se rezultatima ističe visoki sadržaj ukupnih polifenola i trjeslovina u veljači 2016., za razliku od ostalih zimskih mjeseci promatranih u navedenom razdoblju. Ova bi se pojava mogla objasniti iznadprosječnom temperaturom zraka za to doba godine te velikom količinom padalina u navedenom razdoblju, što je potvrđeno uvidom u vremenske uvjete u Lovranu za 2016. godinu (DHMZ).

Rezultati dobiveni u okviru ovoga diplomskog rada nadopunjuju i potvrđuju saznanja o utjecaju vremenskih uvjeta na godišnju varijaciju sadržaja ukupnih polifenola i trjeslovina u listovima lovora s područja Lovrana, a općenito pridonose istraživanjima polifenola vrste *Laurus nobilis* L. s područja Republike Hrvatske te su potvrda fitoterapijskog potencijala ove biljne vrste s obzirom na analizirani sadržaj antioksidativnih polifenolnih tvari.

6. LITERATURA

AL-Samarrai, Othman Rashid, Nazar Ahmed Naji, and Rafaa Razooq Hameed. Effect of Bay leaf (Laurus nobilis L.) and its isolated (flavonoids and glycosides) on the lipids profile in the local Iraqi female rabbits. *Tikrit Journal of Pure Science,* 2017, 22 (6), 73-75.

Ascacio-Valdés JA, Buenrostro-Figueroa JJ, Aguilera-Carbo A, Prado-Barragán A, Rodriguez-Herrera R, Aguilar CN. Ellagitannins: Biosynthesis, biodegradation and biological properties. *J Med Plant Res*, 2011, 5, 4696-4703.

Ašić S. Ljekovito bilje. Rijeka, Dušević i Kršovnik d.o.o., 1999, str. 75.

Basak SS, Candan F. Effect of *Laurus nobilis* L. essential oil and its main components on alfa-glucosidase and reactive oxygen species scavenging activity. *Iran J Pharm Res*, 2013, 12(2), 367-379.

Berend S, Grabarić Z. Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2008, 59, 205-212.

Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance. *Nutr Rev*, 1998, 56, 317-333.

Castañer O, Fitó M, López-Sabater MC, Poulsen HE, Nyyssonen K, Schroeder H, Salonen JT, De la Torre-Carbot K, Zunft HF, De la Torre R, Baeumler H, Gaddi AV, Saez GT, Tomás M, Covas MI. The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial. *Clin Nutr*, 2011, 30, 490-493.

Conforti F, Statti G, Uzunov D, Menichini F. Comparative Chemical Composition and Antioxidant Activities of Wild and Cultivated Laurus nobilis L. Leaves and Foeniculum vulgare subsp. piperitum (Ucria) Coutinho Seeds. *Biol. Pharm. Bull.,* 2006, 29(10), 2056-2064.

Dammak, I., Hamdi, Z., Kammoun El Euch, S., Zemni, H., Mliki, A., Hassouna, M. and Lasram, S. (2019). Evaluation of antifungal and anti-ochratoxigenic activities of Salvia officinalis, Lavandula dentata and Laurus nobilis essential oils and a major monoterpene constituent 1,8-cineole against Aspergillus carbonarius. *Industrial Crops and Products*, 128, pp.85-93.

D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. Ann Ist Super Sanita. 2007, 43(4), 348-361.

D'Auria M., Racioppi R. The Effect of Drying of the Composition of Volatile Organic Compounds in *Rosmarinus officinalis*, *Laurus nobilis*, *Salvia officinalis* and *Thymus serpyllum*. *Journal of essential oil-bearing plants* JEOP, 2015, 18(5):1209-1223.

de Jesus NZT, Falcão HS, Gomes IF, Leite TJA, Lima GRM, Barbosa-Filho JM, Tavares JF, Silva MS, Athayde-Filho PF, Batista LM. Tannins, Peptic Ulcers and Related Mechanisms. *Int J Mol Sci*, 2012, 13, 3203-3228.

DHMZ,http://meteo.hr/klima.php?section=klima_pracenje&param=ocjena&MjesecSezona=2&Godina=2016, pristupljeno 06.03.2019.

Domac R. Mala flora Hrvatske i susjednih područja. Zagreb, Školska knjiga Zagreb, 1994, str. 90.

Emam AM, Mohamed MA, Diab YM, Megally NY. Isolation and structure elucidation of antioxidant compounds from leaves of Laurus nobilis and Emex spinosus. Drug Discov Ther, 2010, 4(3), 202-207

Fernández NJ, Damiani N, Podaza EA, Martucci JF, Fasce D, Quiroz F, Meretta PE, Quintana S, Eguras JM, Gende LB. *Laurus nobilis* L. Extracts against *Paenibacillus larvae*: Antimicrobial activity, antioxidant capacity, hygienic behavior and colony strength. *Saudi J Biol Sci*, 2018, u tisku, https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.04.008

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

Grlić Lj. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. Ex libris, Rijeka, 2005, 106/dvosupnice/lovorke/lovor.

Guido L. F, Vinha A. F, Costa A. S. G, Alvesa R. C, Oliveira B. Monomeric and oligomeric flavan-3-ols and antioxidant activity of leaves from different Laurus sp. *Food Funct*., 2015,6, 1944-1949.

Hagerman AE. The Tannin Handbook, Biological Activity of Tannins. Miami University, Oxford, Ohio, USA, 2002.

Haslam E, Cai Y. Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Nat Prod Rep*, 1994, 11, 41-66.

Kalođera Z. Farmakognozija II, interna skripta. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2010, str. 75-79.

Karimi A, Majlesi M, Rafieian-Kopaei M.Herbal versus synthetic drugs; beliefs and facts. J Nephropharmacol 2015; 4(1): 27-30.

Kemperman, R., Gross, G., Mondot, S., Possemiers, S., Marzorati, M., Van de Wiele, T., Doré, J. and Vaughan, E. (2013). Impact of polyphenols from black tea and red wine/grape juice on a gut model microbiome. Food Research International, 53(2), pp.659-669.

Khan I, Shah S, Ahmad J, Abdullah A, Johnson SK. Effect of Incorporating Bay Leaves in Cookies on Postprandial Glycemia, Appetite, Palatability, and Gastrointestinal Well-Being. *J Am Coll Nutr*, 2017, 36(7), 514-519.

Kirchbauer M, Sezonska varijabilnost sadržaja fenolnih kiselina vrste *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) s područja Lovrana. Diplomski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2018

Kore i grančice cimeta i list lovora, www.pfaf.org, pristupljeno 7.3.2019.

Kuštrak D. Farmakognozija fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing- Tehnička knjiga, 2005, str. 295-299, 408-409.

Lauraceae, https://www.britannica.com/plant/Laurales#ref594437, pristupljeno 19.02.2019.

Laurenoperoksilidi A i B, https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874390018306165, pristupljeno 08.03.2019.

Laurus, http://www.theplantlist.org/browse/A/Lauraceae/Laurus, pristupljeno 19.02.2019.

Laurus azorica, http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:464769-1, pristupljeno 08.03.2019.

Laurus nobilis, https://plants.ces.ncsu.edu/plants/all/lauris-noblis/m, pristupljeno 08.03.2019.

Lee T, Lee S, Kim K. H, Oh K. B, Shin J, Mar W. Effects of magnolialide isolated from the leaves of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) on immunoglobulin E-mediated type I hypersensitivity *in vitro*. *J Ethnopharmacol*, 2013, 149(2), 550-556.

Lesinger I. Liječenje začinskim biljem (L-Ž), Rijeka, Adamić, 2006., str. 211-216.

Mägdefrau K. Ehrendorfer F. Botanika sistematika, evolucija i geobotanika. Zagreb, Školska knjiga, 1997, 313-314.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79, 727-747.

Marković S. Fitoaromaterapija: monografije esencijalnih ulja i ljekovitih biljaka, temelji fitoaromaterapije. Zagreb, Centar Cedrus, 2005, str. 78, 286-287, 351-352.

Merghni A, Marzouki H, Hentati H, Aouni M, Mastouri M. Antibacterial and antibiofilm activities of Laurus nobilis L. essential oil against Staphylococcus aureus strains associated with oral infections. *Current Research in Translational Medicine*, 2016, 64, 29-34.

Mole S. The systematic distribution of tannins in the leaves of angiosperms: A tool for ecological studies. Biochemical Systematics and Ecology. 1993, 21. 833-846. 10.1016/0305-1978(93)90096-A.

Nikolić T. Sistemska botanika: raznolikost i evolucija biljnog svijeta. Zagreb, Alfa d.d., 2013, str. 107-108, 360-365, 371-375.

Okuda T, Ito H. Tannins of Constant Structurein Medicinal and Food Plants – Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Molecules*, 2011, 16, 2191-2217.

Pahlow, M. 1999.: Das grosse Buch der Heilpflanzen. Weltbildverlag, Augsburg, 395-397

Peixoto L. R, Rosalen P. L, Ferreira G. L. S, Freires I. A, de Carvalho F. G, Castellano L. R, de Castro R. D. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida spp*. *Arch Oral Biol.* 2017, 73, 179-185.

Pinheiro, Lílian Sousa, Abrahão Alves de Oliveira Filho, and Felipe Queiroga Sarmento Guerra. Antifungal activity of the essential oil isolated from Laurus nobilis L. against Cryptococcus neoformans strains. *Journal of Applied Pharmaceutical Science,* 2017*,* 7.05, 115-118.

Qnais EY, Abdulla FA, Kaddumi EG, Abdalla SS. Antidiarrheal activity of Laurus nobilis L. leaf extract in rats. J Med Food, 2012, 15(1), 51-57.

Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2009, 2, 270-278.

Petrik J. Polifenoli-antioksidansi, nastavni materijal. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008, str. 1-8.

Primorac I. Kvantitativna analiza polifenola hrvatskih populacija vrste *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb. Diplomski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2012.

Rangari VD. Pharmacognosy Tannin Containing Drugs, J. L. Chaturvedi College of Pharmacy 846, New Nandanvan, Nagpur, 2007.

Rasprostranjenost lovora u Europi, http://www.maltawildplants.com/LAUR/Laurus_nobilis.php, pristupljeno 08.03.2019.

Rastija V, Medić-Šarić M. Kromatografske metode analize polifenola u vinima. *Kem Ind*, 2009, 58, 121-128.

Rhizopoulou, S. (2004). Symbolic plant(s) of the Olympic Games. Journal of Experimental Botany, 55(403), pp.1601-1606.

Scalbert A, Johnson I, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*, 2005, 81, 2155-2175.

Schneider G. Zur Bestimmung der Gerbstoffe mit Casein. Arch Pharm, 1976, 309, 38-44.

Simić M, Kundaković T, Kovačević N. Preliminary assay on the antioxidative activity of Laurus nobilis extracts. Fitoterapia, 2003, 74(6), 613-616.

Sun AY, Simonyi A, Sun GY. The „French paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. Free Radic Bio Med, 2002, 32, 314-318.

Turk, A., Ahn, J., Jo, Y., Song, J., Khalife, H., Gali-Muhtasib, H., Kim, Y., Hwang, B. and Lee, M. (2019). NF-κB inhibitory sesquiterpene lactones from Lebanese Laurus nobilis. *Phytochemistry Letters*, 30, pp.120-123.

Tz-lovran.hr. (2019). Priča o Lovranu: www.tz-lovran.hr, pristupljeno 19.02.2019.

Vladimir-Knežević S. Farmakognozija I, nastavni materijal. Prirodni fenolni spojevi. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008, str. 9-14.

J. Vuković Rodríguez, R. Jurišić Grubešić, D. Kremer, V. Kokot, Quality assessment of two spectrophotometric procedures for polyphenol determination and application in *Moltkia petraea* species, *J. Chin. Chem. Soc.* **63**(8) (2016) 677-687. doi: 10.1002/jccs.201600024

Zakon o lijekovima, Narodne novine broj 100 (NN 76/13, 90/14; 100/18)

Zhang LL, Lin YM, Tannins from Canarium album with potent antioxidant activity. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008, 9, 407-415.

Živković R. Prirodno liječenje probavnih organa ljekovitim biljem i dijetom. Zagreb, Školska knjiga, 1997, str. 256.

7. SAŽETAK / SUMMARY

U ovom diplomskom radu provedena je kvantitativna analiza ukupnih polifenola i trjeslovina u ekstraktima listova vrste *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) s područja Lovrana, prikupljenih u razdoblju od svibnja 2015. do travnja 2016. godine, s ciljem praćenja godišnjih varijacija sadržaja spomenutih bioaktivnih tvari. Kvantitativna analiza ukupnih polifenola i trjeslovina provedena je UV-Vis spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom. Sadržaj ukupnih polifenola bio je najveći za uzorak lista lovora iz rujna 2015. godine i iznosio je 9,08% (na 720 nm, prema izvornoj metodi), odnosno 9,12% (na 748 nm, maksimum apsorpcije), dok je najmanja vrijednost zabilježena za uzorak iz svibnja 2015., i iznosila je 5,67% (720 nm) te 5,80% (748 nm). Analogno rezultatima dobivenim za ukupne polifenole, također je najveća količina trjeslovina u listovima lovora zabilježena u uzorcima iz rujna 2015., i iznosila je 4,91% (720 nm) te 4,87% (748 nm), dok je najmanja vrijednost sadržaja trjeslovina određena za uzorak iz svibnja 2015. (2,31% na 720 nm, odnosno 2,37% na 748 nm). Provedena kvantitativna analiza predstavlja prilog znanstvenom istraživanju polifenola i trjeslovina vrste *Laurus nobilis* L. i upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu lovora, posebice u odnosu na sadržaj bioaktivnih polifenolnih tvari.

SUMMARY

The quantitative analysis of polyphenols and tannins in the leaves of *Laurus nobilis* L., Lauraceae from Lovran was carried out in this graduate thesis. The samples of laurel leaves were collected during the one year period (from May 2015 to April 2016) and the main goal was to monitor the seasonal variations of contents for the substances previously mentioned. The quantitative analysis of total polyphenols and tannins was performed by UV-Vis spectrophotometric method with the Folin-Ciocalteu's phenol reagent. The highest content of total polyphenols was noticed in September 2015 with the value of 9.08% (720 nm) and 9.12% (748 nm), while the samples collected in May 2015, turned out to have the lowest content with the value of 5.67% (720 nm) and 5.80% (748 nm) in May 2015. Similar to polyphenols' values, the laurel samples collected in September 2015 also turned out to have the highest content of tannins with the level of 4.91% (720 nm) and 4.87% (748 nm), while the samples collected in May 2015 had the lowest content of tannins with the value of 2.31% (720 nm) and 2.37% (748 nm). This quantitative analysis represents a contribution to scientific study of polyphenols and tannins in the leaves of *Laurus nobilis* L. and completes the previous knowledge about laurel's phytotherapeutic potential, especially in relation to the content of bioactive phenolic substances.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

SEZONSKA VARIJABILNOST SADRŽAJA UKUPNIH POLIFENOLA I TRJESLOVINA VRSTE *LAURUS NOBILIS* L. (LAURACEAE) S PODRUČJA LOVRANA

Helena Rastija

SAŽETAK

U ovom diplomskom radu provedena je kvantitativna analiza ukupnih polifenola i trjeslovina u ekstraktima listova vrste *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) s područja Lovrana, prikupljenih u razdoblju od svibnja 2015. do travnja 2016. godine, s ciljem praćenja godišnjih varijacija sadržaja spomenutih bioaktivnih tvari. Kvantitativna analiza ukupnih polifenola i trjeslovina provedena je UV-Vis spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom. Sadržaj ukupnih polifenola bio je najveći za uzorak lista lovora iz rujna 2015. godine i iznosio je 9,08% (na 720 nm, prema izvornoj metodi), odnosno 9,12% (na 748 nm, maksimum apsorpcije), dok je najmanja vrijednost zabilježena za uzorak iz svibnja 2015., i iznosila je 5,67% (720 nm) te 5,80% (748 nm). Analogno rezultatima dobivenim za ukupne polifenole, također je najveća količina trjeslovina u listovima lovora zabilježena u uzorcima iz rujna 2015., i iznosila je 4,91% (720 nm) te 4,87% (748 nm), dok je najmanja vrijednost sadržaja trjeslovina određena za uzorak iz svibnja 2015. (2,31% na 720 nm, odnosno 2,37% na 748 nm). Provedena kvantitativna analiza predstavlja prilog znanstvenom istraživanju polifenola i trjeslovina vrste *Laurus nobilis* L. i upotpunjuje dosadašnje spoznaje o fitoterapijskom potencijalu lovora, posebice u odnosu na sadržaj bioaktivnih polifenolnih tvari.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 42 stranice, 15 slika, 2 grafička prikaza, 3 tablice i 64 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Laurus nobilis* L., polifenoli, trjeslovine, kvantitativna analiza, UV-Vis spektrofotometrija, godišnje varijacije polifenolnog sadržaja

Mentor: **Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Živka Juričić, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Željka Vanić, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Analysis
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

SEASONAL VARIABILITY OF TOTAL POLYPHENOLS AND TANNINS CONTENTS OF *LAURUS NOBILIS* L. (LAURACEAE) FROM LOVRAN

Helena Rastija

SUMMARY

The quantitative analysis of polyphenols and tannins in the leaves of *Laurus nobilis* L., Lauraceae from Lovran was carried out in this graduate thesis. The samples of laurel leaves were collected during the one year period (from May 2015 to April 2016) and the main goal was to monitor the seasonal variations of contents for the substances previously mentioned. The quantitative analysis of total polyphenols and tannins was performed by UV-Vis spectrophotometric method with the Folin-Ciocalteu's phenol reagent. The highest content of total polyphenols was noticed in September 2015 with the value of 9.08% (720 nm) and 9.12% (748 nm), while the samples collected in May 2015, turned out to have the lowest content with the value of 5.67% (720 nm) and 5.80% (748 nm) in May 2015. Similar to polyphenols' values, the laurel samples collected in September 2015 also turned out to have the highest content of tannins with the level of 4.91% (720 nm) and 4.87% (748 nm), while the samples collected in May 2015 had the lowest content of tannins with the value of 2.31% (720 nm) and 2.37% (748 nm). This quantitative analysis represents a contribution to scientific study of polyphenols and tannins in the leaves of *Laurus nobilis* L. and completes the previous knowledge about laurel's phytotherapeutic potential, especially in relation to the content of bioactive phenolic substances.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 42 pages, 15 figures, 2 charts, 3 tables, and 64 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Laurus nobilis* L., polyphenols, tannins, quantitative analysis, UV-Vis spectrophotometry, seasonal polyphenol variations

Mentor: **Renata Jurišić Grubešić, Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Renata Jurišić Grubešić**, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Živka Juričić, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željka Vanić, **Ph.D.** *Associated Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2019