

# **Antimikrobni učinak medvjetskina lista (Uvae ursi folium) na kliničke izolate urogenitalnih patogena**

---

**Kosalec, Ivan; Zovko, Marijana; Poljanšek, Irena; Peplnjak, Stjepan; Kalodera, Zdenka; Šešok, Tatjana; Matica, Biserka**

*Source / Izvornik:* **Farmaceutski glasnik, 2008, 64, 357 - 364**

**Journal article, Published version**

**Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:420155>

*Rights / Prava:* [In copyright/Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-25**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



# Antimikrobní učinak medvjetkina lista (*Uvae ursi folium*) na kliničke izolate urogenitalnih patogena

IVAN KOSALEC<sup>1</sup>, MARIJANA ZOVKO<sup>1</sup>, IRENA POLJANŠEK<sup>1</sup>, STJEPAN PEPELJNJAK<sup>1</sup>,  
ZDENKA KALOĐERA<sup>1</sup>, TATJANA ŠEŠOK<sup>2</sup>, BISERKA MATICA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 10000 Zagreb,

<sup>2</sup>BELUPO d.d., 48000 Koprivnica,

<sup>3</sup>Zavod za javno zdravstvo grada Zagreba, 10000 Zagreb

## Antimicrobial activity of bearberry leaf (*Uvae ursi folium*) on clinical isolates of urogenital pathogens

**S um m a r y –** Bearberry leaf is an important ingredient of urological preparations because it contains phenolic glycosides arbutin and methylarbutin. Those glycosides undergo hydrolytic degradation in basic urine thus releasing strong antiseptic, hydrochinon. This paper describes preparation, composition and antimicrobial activity of bearberry leaf extract on clinical isolates of urogenital pathogens. The activity against grampositive bacterial species *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*, gram-negative bacterial species *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa*, as well as strains of the yeast *Candida albicans* was investigated. Results indicate that ethanolic extract of bearberry leaf is an effective antiseptic with particularly strong activity against investigated clinical isolates of gram-negative bacterial species.

(<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia, <sup>2</sup> BELUPO d.d., 48000 Koprivnica, Croatia, <sup>3</sup> Institute of Public Health Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia)

## UVOD

Medvjetka (*Arctostaphylos uva ursi* (L.) Spreng., *Ericaceae*) niski je, polegnuti grm kratke stabljike i tankih grančica koje pužu po zemlji poput tepiha ili se lagano uzdižu. Listovi su naizmjenični, na licu tamnozeleni, na naličju svijetlijie zeleni, kožasti, duguljasto jajoliki, tupog ili urezanog vrha, bez točkastih žlijezda. Rub je lista cjevorovit, blago savijen prema dolje, a peteljka kratka. Dvospolni cvjetići nalaze se na kratkoj stupici, formirajući obješene grozdove. Čaška se sastoji od pet zubaca, a vjenčić je vrčast, bijel ili ružičast. Cvjeta od travnja do lipnja. Plod je sjajna, crvena kuglasta koštuničava boba s pet do sedam koštice. Potpuno zreli plodovi su brašnasti i slatkog okusa (1–3).



Slika 1. Medvjetka – *Arctostaphylos uva ursi* (L.) Spreng., Ericaceae, slika grančica s plodovima i listovima (preuzeto s <http://commons.wikimedia.org>)

Medvjetka raste u svijetlim i suhim borovim šumama, među grmljem, osobito u planinskim područjima. Česta je i na staništima izloženima vjetru. Na sjeveru se medvjetka spušta u nizine i vrištine, na jugu se penje na visoke planine. Može se naći od sjeverne Europe i Azije pa sve do Sjeverne Amerike te na visokim planinama južnih dijelova tih kontinenta. Česta je biljka i na našim vapnenačkim planinama (2, 3).

Medvjetka se susreće pod različitim nazivima: medvjede grožđe, medvjede uho, jabučar, gornik opirnik, mlivnjak, (hrv.) (1), bearberry, Bear's grape, Mountain box, Ptarmigan berry (engl.), Bärentraube, Wolfsbeere, Wilderbuchs (njem.), busserole, raisin d'ours (fr.) (4).

U ljekovite svrhe upotrebljavaju se osušeni listovi medvjetke (*Uvae ursi folium*). Medvjetkin je list kao droga officinalan u Hrvatskoj i Europskoj farmakopeji (5, 6). Dobro osušena droga je tamnozelene boje, bez mirisa i gorka okusa (2).



Slika 2. Droga medvjetkin list (*Uvae ursi folium*)  
(preuzeto s <http://www.azuregreen.com/>)

Terapijski su najvažnije sastavnice medvjjetkina lista fenolni glikozidi, u prvom redu  $\beta$ -Oglukozid hidrokinona, arbutin, dok je  $\beta$ -Oglukozid metilhidrokinona, metilarbutin, prisutan u znatnoj mjeri. Njihov udio u drogi varira od 5 do 10%. Medusobni omjer arbutina i metilarbutina ovisi o podrijetlu biljnoga materijala. Primjerice, droga podrijetlom sa Sredozemlja, iz Poljske i Skandinavije saržava samo arbutin, dok su u nekim drogama podrijetlom iz Španjolske arbutin i metilarbuin prisutni u omjeru 1:1. Medvjjetkin list sadržava i trjeslovine (10-15%), koje uglavnom pripadaju skupini galotanina, kao i flavonoide (1-2%), među kojima su najzastupljeniji hiperozid te glikozidi kvercetina i miricetina. Među triterpenima (0,4-0,8%) prevladavaju ursolna kiselina i alkohol uvaol, a prisutan je i iridoid monotropein (2).

Antimikrobní učinak droge zasniva se na prisutnosti arbutina, odnosno produkta nje gove hidrolize, hidrokinona, koji djeluje antiseptički u lužnatom urinu (2, 7). Stoga je medvjjetkin list važan sastojak brojnih uroloških čajeva. Ovim smo radom željeli ispitati antimikrobní učinak medvjjetkina lista na kliničke izolate urogenitalnih patogena.

## EKSPERIMENTALNI DIO

### Ispitivaní materijal

Mevjetkin list darovala je tvrtka Belupo d.d. Hrvatska. Za izradu ekstrakta, 20 g medvjjetkina lista ekstrahirano je sa 100 mL 96%-tnog etanola, 1 h na ultrazvučnoj kupelji pri 45°C. Ekstrakt je profiltirian i uparen. Za antimikrobná ispitivanja otopljen je u 80%-tnom etanolu te je rabljena otopina koncentracije suhe tvari 100 mg/mL.

### Određivanje ukupnih fenola i trjeslovina

Za ispitivanje ukupne količine fenolnih spojeva i trjeslovina u ekstraktu priređena je otopina masene koncentracije 0,7  $\mu$ g/mL u 30%tnom etanolu (m/V). Određivanje je provedeno metodom prema Schneideru (8). U 2 mL ispitivane otopine ekstrakta dodano je 8 mL vode i 10 mL puferske otopine natrijeva acetata (pH=5) (otopina 1). U 10 mL otopine 1 dodano je 50 mg kazeina. Smjesa je ostavljena na sobnoj temperaturi uz konstantno miješanje 45 min (otopina 2) te filtrirana. U dvije odmjerne tikvice od 10 mL otpipetirano je po 1 mL otopine 1 i otopine 2. Zatim je dodano po 0,5 mL Folin-Ciocalteauova reagensa i dopunjeno do oznake s 12%-tnom otopinom (m/V) natrijeva karbonata. Absorbancije dobivenih plavih otopina mjerene su na 720 nm uz vodu kao poredbenu otopinu (Spectronic Unicam, Velika Britanija). Maseni udio ukupnih polifenola i trjeslovina izračunan je iz baždarnoga pravca taninske kiseline. Vrijednost koju daje otopina 1 odgovara ukupnoj količini fenola, dok razlika među vrijednostima dobivenim za otopinu 1 i otopinu 2 upućuje na količinu trjeslovina. Određivanje je provedeno u triplikatu, a rezultat je izražen kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

### Određivanje fenolskih glikozida

Za određivanje fenolskih glikozida u ekstraktu medvjjetkina lista priređena je etanolna otopina ekstrakta masene koncentracije 1  $\mu$ g/mL. Količina arbutina i metilarbutina određena je prema literaturnom propisu (9). U lijevak za odjeljivanje dodano je redom

45 mL vode, 5 mL ispitivane otopine ekstrakta, 1 mL 2%-tnog aminopirazolona, 0,5 mL 3,5%-tnog amonijeva hidroksida i 1 mL 8%-tnog kalijeva heksacijanoferata (III). Nakon 5 minuta, sadržaj u lijevku ekstrahiran je 3 puta s po 25 mL kloroformom. Kloroformski slojevi su spojeni te razrijeđeni na volumen od 100 mL. Apsorbancije otopina izmjerene su na 455 nm uz kloroform kao poredbenu otopinu. Maseni udio fenolskih glikozida, izračunan je prema izrazu:

$$w (\%) = \frac{A \times 7,716}{m}$$

gdje je:  $w (\%)$  – maseni udio fenolnih glikozida izražen kao arbutin,  $A$  – apsorbancija ispitivane otopine na 455 nm, a  $m$  masa droge (g). Određivanje je provedeno u triplikatu, a rezultat je izražen kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

## Antimikrobní učinak

### Mikrobne vrste

Ispitivane su mikrobne vrste klinički izolati iz urina pacijenata s infekcijama urinarnoga sustava utvrđenim u Odjelu za mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo grada Zagreba. Po pet izolata sojeva mikrobnih vrsta koje su uzrokovale klinički vidljive infekcije mokraćnoga sustava upotrijebljene su u istraživanju. Od gram-pozitivnih bakterijskih vrsta uzete su: *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis* te gram-negativne bakterijske vrste: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* i *Pseudomonas aeruginosa*. U istraživanju su rabljeni i sojevi gljivične vrste *Candida albicans*.

### Utvrđivanje antimikrobnog učinka: metode difuzije i dilucije

Za utvrđivanje antimikrobnog učinka ekstrakata medvjjetkina lista primijenjene su metode difuzije i dilucije u uvjetima *in vitro*. Metoda difuzije s cilindrima provedena je prema smjernicama Europske farmakopeje (6), a metoda dilucije prema preporukama *Clinical and Laboratory Standards Institute* (prije *National Committee for Clinical Laboratory Standards*) za mikro-dilucijski postupak (serijalnog i dvostrukog razrjeđenja) (10, 11).

## REZULTATI I RASPRAVA

### Određivanje fenolnih spojeva u ekstraktu medvjjetkina lista

Ukupna količina fenolnih spojeva u etanolnom ekstraktu medvjjetkina lista prikazana je u tablici 1. I ekstrakt lista medvjjetke bogat je fenolnim spojevima koji čine oko 65,95% njegove ukupne mase. Fenolni glikozidi, izraženi kao arbutin, zastupljeni su s udjelom od 21,00%, a trjeslovine s 22,77%.

Tablica 1. Maseni udjeli i omjeri fenolnih spojeva u ekstraktu i drogi

|                      | w (%) $\pm$ S. D. |
|----------------------|-------------------|
| a) ukupni polifenoli | 65,95 $\pm$ 1,60  |
| b) arbutin           | 21,00 $\pm$ 0,08  |
| c) trjeslovine       | 22,77 $\pm$ 0,02  |

## Antimikrobní učinak

Antimikrobní učinak iscrpine medvjekina lista difuzijskom metodom prikazan je u tablici 2., a poredbenih tvari u tablici 3.

Tablica 2. Antimikrobní učinak ekstrakta medvjekina lista difuzijskom metodom

| Medvjekin<br>list (100 mg/ml) | zone inhibicije rasta s.v. ± S.D. (mm) |                         |                     |                           |                          |                                |                         |
|-------------------------------|--|-------------------------|---------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------------|-------------------------|
|                               | S.<br>aureus<br>(N=5)                  | E.<br>faecalis<br>(N=5) | E.<br>coli<br>(N=5) | P.<br>aeruginosa<br>(N=5) | P.<br>mirabilis<br>(N=5) | K.<br>pneu-<br>moniae<br>(N=5) | C.<br>albicans<br>(N=5) |
|                               | 20,5±1,3                               | 19,0±0,9*†              | 26,9±0,6            | 28,4±2,3*                 | 28,1±1,0*†               | 28,5±1,4                       | -                       |

Legenda: s.v. = srednja vrijednost; S.D. = standardna devijacija; - = nema učinka; \* i † = parovi vrijednosti su statistički značajni ( $p<0,05$ ; ANOVA).

Tablica 3. Antimikrobní učinak poredbenih tvari difuzijskom metodom

|                           | zone inhibicije rasta s.v. ± S.D. (mm) |                |            |                       |                 |                       |                |
|---------------------------|--|----------------|------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|----------------|
|                           | S.<br>aureus                           | E.<br>faecalis | E.<br>coli | P.<br>aeru-<br>ginosa | P.<br>mirabilis | K.<br>pneu-<br>moniae | C.<br>albicans |
| Norfloksacin<br>(4 mg/mL) | 23,0                                   | 21,7           | 27,7       | 14,0                  | 38,0            | 12,0                  | -              |
| Hidrokinon<br>(100 mg/mL) | 20,3                                   | 12,3           | 15,3       | 15,3                  | 16,7            | 13,3                  | -              |
| Arbutin<br>(50 mg/mL)     | -                                      | -              | -          | -                     | -               | -                     | -              |

Legenda: - = nema učinka

Ekstrakt medvjekina lista u koncentraciji od 100 mg/mL pokazuje zone inhibicije rasta na sve ispitivane gram-negativne i gram-pozitivne bakterijske vrste izolirane iz urina. Zone inhibicija rasta nastale djelovanjem aktivnih tvari iz etanolne iscrpine medvjekina lista najveće su u ispitivanih sojeva gram-negativnih vrsta: *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*, a iznose između 28,5±1,4 mm i 26,9±0,6 mm. Etanolni ekstrakt medvjekina lista pokazuje manje zone inhibicije rasta na ispitivane sojeve gram-pozitivnih bakterijskih vrsta *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis* 20,5±1,3 mm, odnosno 19,0±0,9 mm. Usporednom zona inhibicija rasta između vrsta, utvrđeno je da su zone u sojeva vrste *E. faecalis* statistički manje od zona u sojeva vrsta *P. aeruginosa* i *P. mirabilis* (ANOVA;  $p<0,05$ ). Takav rezultat upućuje na veću osjetljivost sojeva vrste *P. aeruginosa* i *P. mirabilis* od sojeva vrste *E. faecalis* u difuzijskom testu.

Usporedbom antimikrobnog učinka arbutina i hidrokinona, dokazano je da arbutin u koncentraciji 50 mg/mL nema antimikrobní učinak difuzijskom metodom, dok hidrokinon pokazuje zone inhibicije rasta od 12,3 mm do 20,3 mm za ispitivane bakterijske vrste. U koncentraciji od 100 mg/mL, hidrokinon nema fungicidni učinak na sojeve vrste *C. albicans* primjenom difuzijskog testa. Zanimljivo je da su difuzijskom metodom utvrđene veće zone inhibicija rasta etanolnog ekstrakta medvjekina lista nego hidrokinona u istoj koncentraciji. Svi ispitivani bakterijski klinički sojevi osjetljivi su na norfloksacin sa zonama inhibicija rasta od 12,0 mm do 27,7 mm (tablica 3.).

Minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne mikrobicidne koncentracije (MMK) medvjekina lista prikazane su u tablici 4., a poredbenih tvari u tablici 5. MIK vrijednosti, odnosno osjetljivost kliničkih izolata sojeva gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterijskih vrsta, kao i gljivične vrste *C. albicans* na ekstrakt medvjekina lista primjenom mikro-dilucijskog postupka iznosi između 12,5±0,00 mg/mL i 2,60±0,92 mg/mL. Antimikrobní učinak medvjekina lista najučinkovitiji je na sojeve vrste *E. faecalis* (MIK 2,60±0,92 mg/mL) i *P. aeruginosa* (MIK 3,13±0,00 mg/mL). Najviše vrijednosti MIK-a utvrđene su u ispitivanih sojeva gram-negativne bakterijske vrste *K. pneumoniae* (MIK 10,42±3,61 mg/mL) te gljivične vrste *C. albicans* (MIK 12,50±0,00 mg/mL). Usporedbom vrijednosti MIK-a ispitivanih kliničkih izolata mikroba uzročnika urinarnih infekcija između arbutina (tablica 5.) i ekstrakata medvjekina lista, može se zaključiti da arbutin ima od dva do osam puta veću vrijednost MIK-a od ekstrakta medvjekina lista. No, s obzirom da u lužnatom urinu biotransformacijom iz arbutina nastaje antimikrobro aktivan hidrokinon, utvrđene su i koncentracije MIK-a hidrokinona. Hidrokinon pokazuje niže vrijednosti MIK-ova na ispitivane kliničke izolate mikroba iz urina od ekstrakta medvjekina lista (tablica 5.). Vrijednosti MIK-a za ispitivane bakterijske vrste iznose između 0,78 mg/mL i 1,56 mg/mL, dok su sojevi gljivične vrste *C. albicans* otporniji od ispitivanih bakterijskih vrsta te im MIK

**Tablica 4.** Minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne mikrobicidne koncentracije (MMK) ekstrakta medvjekina lista mikro-dilucijskom metodom

| S.<br>aureus<br>(N=3)       | E.<br>faecalis<br>(N=3) | E.<br>coli<br>(N=3) | P. aeru-<br>ginosa<br>(N=3) | P. mirabilis<br>(N=3) | K. pneu-<br>moniae<br>(N=3) | C. albicans<br>(N=3) |            |
|-----------------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------|----------------------|------------|
| MIK s.v. ±<br>S.D. (mg/ml)* | 8,33±3,61               | 2,60±0,92           | 7,29±4,77                   | 3,13±0,00             | 5,21±1,80                   | 10,42±3,61           | 12,50±0,00 |
| MMK s.v. ±<br>S.D. (mg/ml)* | 16,67±7,22              | 5,21±1,80           | 14,58±9,55                  | 6,25±0,00             | 10,42±3,61                  | 20,83±7,22           | 25,00±0,00 |

Legenda: s.v. = srednja vrijednost; S:D. = standardna devijacija; \*. razlike u vrijednosti MIK i MMK između pojedinih mikrobnih vrsta nisu statistički značajne

**Tablica 5.** MIK i MMK vrijednosti poredbenih tvari

| Tvar                                       | S. aureus<br>(N=3) | E. faecalis<br>(N=3) | E. coli<br>(N=3) | P. aeruginosa<br>(N=3) | P. mirabilis<br>(N=3) | K. pneumoniae<br>(N=3) | C. albicans<br>(N=3) |
|--|--------------------|----------------------|------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|
| Norfloksacin<br>MIK (MMK)<br>( $\mu$ g/mL) | 1,56<br>(3,13)     | 3,13<br>(6,25)       | 1,56<br>(3,13)   | 3,13<br>(6,25)         | 3,13<br>(6,25)        | 1,56<br>(3,13)         |                      |
| Hidrokinon<br>MIK (MMK)<br>(mg/mL)         | 1,56<br>(3,13)     | 0,78<br>(1,56)       | 1,56<br>(3,13)   | 1,56<br>(3,13)         | 1,56<br>(3,13)        | 1,56<br>(3,13)         | 6,25<br>(12,50)      |
| Arbutin<br>MIK (MMK)<br>(mg/mL)            | 25,00<br>(50,00)   | 12,5<br>(25,0)       | 25,00<br>(50,00) | 25,00<br>(50,00)       | 25,00<br>(50,00)      | 25,00<br>(50,00)       | 25,00<br>(50,00)     |

Legenda: – = nema učinka

iznosi 6,25 mg/mL. Za norfloksacincu utvrđene su 1000 puta niže vrijednosti MIK-a za sve ispitivane sojeve bakterijskih vrsta (MIK između 1,56  $\mu$ g/mL i 3,12  $\mu$ g/mL).

## ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih istraživanja analize sastava i antimikrobne učinkovitosti medvjjetkina lista u uvjetima *in vitro* može se zaključiti da etanolna iscrpina medvjjetkina lista s 21% fenolnih glikozida, 22,77% trjeslovina i 65,95% ukupnih fenolnih spojeva pokazuje antimikrobni učinak na kliničke izolate sojeva bakterijskih vrsta: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* (p-fimbrija pozitivni sojevi), *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* te *Klebsiella pneumoniae* kao najčešćalijih uzročnika urinarnih infekcija. Difuzijskom metodom utvrđeno je da su sojevi gram-negativnih bakterijskih vrsta osjetljiviji na baktericidni učinak medvjjetkina lista (zone inhibicija rasta od 26,9 mm od 28,5 mm) od gram-positivnih vrsta (zone inhibicija rasta od 19,0 mm do 20,5 mm). Utvrđene vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) ekstrakta medvjjetkina lista kreću se između 2,6 mg/mL i 10,42 mg/mL za ispitivane sojeve bakterijskih vrsta te 12,5 mg/mL za sojeve gljivične vrste *C. albicans*. MIK vrijednosti ekstrakta medvjjetkina lista niže su od MIK vrijednosti arbutina, ali veće od hidrokinona. Rezultati upućuju na zaključak da je etanolni ekstrakt medvjjetkina lista bogat fenolnim spojevima koji snažno djeluju na urogenitalne patogene.

### Literatura – References

1. Lj. Grlić, Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, August Cesarec, Zagreb 1990, 248.
2. D. Kuštrak, Farmakognosija i fitofarmacija, Golden marketing - Tehnička knjiga, Zagreb 2005, 396.
3. J. Gelenčir, J. Gelenčir, Atlas ljekovitog bilja, Prosvjeta, Zagreb 1991, 179.
4. M. Wichtl, Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart 1994, 510.
5. Hrvatska farmakopeja 2007 s komentarima, Hrvatsko farmaceutsko društvo, Zagreb 2007, 301.
6. European Pharmacopoeia, Ed. 5, Vol. 2, Council of Europe, Strasbourg, 2006, 1054.
7. V. Schultz, R. Hänsel, V. E. Tyler, Rational Phytotherapy, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 2001, 293.
8. G. Schneider, Arch. Pharm. 309 (1976) 38.
9. Deutsches Arzneibuch 9 Ed. 9, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, Govi-Verlag GmbH Frankfurt, 1986.
10. National Committee For Clinical Laboratory Standards... Method for dilution antimicrobial Susceptibility test for bacteria that grow aerobically: Approved standard M7-A44th edition. NCCLS, Wayne, PA, 1997.
11. National Committee For Clinical Laboratory Standards, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27-A2. NCCLS, Wayne, PA, 2002.

Primljeno 26. svibnja 2008.