

Marko Parlov

**Određivanje količine flavonoida i fenolnih
kiselina te antiagregacijskog učinka u vrstama
Calamintha nepeta L., *Lavandula angustifolia* L. i
Ocimum basilicum L.**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj rad prijavljen je na predmetu Farmaceutska botanika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku botaniku pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Željana Maleša i suvoditeljstvom doc. dr. sc. Mirze Bojića.

Zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Željenu Malešu na strpljenju prilikom pisanja ovog rada te komentoru doc. dr. sc. Mirzi Bojiću na ukazanom povjerenju i stručnim savjetima za vrijeme izrade diplomskog rada. Također veliko hvala i kolegici univ.mag.pharm Andrei Antolić koja je ozračila laboratorijsku atmosferu i ustupila mi uvid u mnoga znanja.

Zahvaljujem i cijelom Zavodu za farmaceutsku kemiju te posebno tehničkoj suradnici Ljiljani Jurkin kojima sam oteo cjelokupni asortiman odmjernih tikvica. Kolegi Franji Josipu hvala na druženju pri izradi diplomskog rada, uz pozdrav!

Zahvaljujem svojim 'Tulipanima', ekipi s kvarta i asevimama s faksama!

I za kraj, hvala mojoj obitelji koja se jedva čeka počastiti!

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. BOTANIČKI PREGLED	2
1.1.1. Stanište, morfološka obilježja i općeniti podaci porodice Lamiaceae (Labiatae).....	2
1.1.2. Morfološka obilježja i rasprostranjenost vrsta: <i>Calamintha nepeta</i> (L.) Savi, <i>Lavandula angustifolia</i> Mill. i <i>Ocimum basilicum</i> L.	3
1.1.2.1. <i>Calamintha nepeta</i> (L.) Savi	3
1.1.2.2. <i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	4
1.1.2.3. <i>Ocimum basilicum</i> L.	5
1.2. KEMIJSKI SASTAV BILJNIH VRSTA	6
1.2.1. <i>Calamintha nepeta</i> (L.) Savi	6
1.2.2. <i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	7
1.2.3. <i>Ocimum basilicum</i> L.	8
1.3. FARMAKOLOŠKI UČINCI I UPORABA BILJNIH VRSTA	9
1.3.1. <i>Calamintha nepeta</i> (L.) Savi	9
1.3.2. <i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	11
1.3.3. <i>Ocimum basilicum</i> L.	12
1.4. FENOLNI SPOJEVI	14
1.4.1. FLAVONOIDI	15
1.4.1.1. Kemijska svojstva i rasprostranjenost	15
1.4.1.2. Biosinteza	17
1.4.1.3. Biološki učinci	19
1.4.2. FENOLNE KISELINE	21
1.4.2.1. Kemijska svojstva i rasprostranjenost	21
1.4.2.2. Biosinteza	26
1.4.2.3. Biološki učinci	29
1.5. AGREGACIJA TROMBOCITA I ANTIAGREGACIJSKI UČINAK	31
2. OBRAZLOŽENJE TEME	33
3. MATERIJALI I METODE	34
3.1. BILJNI MATERIJALI	34
3.2. APARATURA I KEMIKALIJE	36

3.3. PRIPREMA RADNIH OTOPINA	37
3.4. UZORCI KRVI	38
3.5. METODE ISTRAŽIVANJA	38
3.5.1. Identifikacija biljnog materijala	38
3.5.2. Određivanje količine flavonoida	39
3.5.3. Određivanje količine fenolnih kiselina	40
3.5.4. Impedancijska agregometrija	41
3.5.5. Određivanje statistički značajne antiagregacijske koncentracije	42
4. REZULTATI I RASPRAVA	45
4.1. REZULTATI KVANTITATIVNE ANALIZE FLAVONOIDA I FENOLNIH KISELINA	45
4.2. REZULTATI ISPITIVANJA ANTIAGREGACIJSKOG UČINKA BILJNIH EKSTRAKATA	47
5. ZAKLJUČCI	50
6. LITERATURA	51
7. SAŽETAK/SUMMARY	55
 TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

Čovjek je od svog samog postanka okružen biljkama i s njima je u suživotu. Osim što biljke prije svega omogućuju postojanje stabilne atmosfere za život ljudi, one su čovjeku poslužile kao hrana, odjeća te građevinski materijal, dok ih je on kroz svoj intelektualni napredak istraživao i te spoznaje usmjerio ka liječenju brojnih bolesti i stanja.

Iako su na sadašnjoj farmaceutskoj sceni sintetski i moderni lijekovi uvelike potisnuli one biljne, ne smije se zaboraviti da su upravo biljke i njihove sastavnice bile temelj za stvaranje svih lijekova. Stoga se treba očuvati veza između čovjeka i biljaka i tragati za onim neotkrivenim, jer povijest primjene biljaka u ljevakovite svrhe potvrđuje njihovu učinkovitost.

Biljke koje će se obraditi u ovom radu, laiku mogu izgledati samo kao obični začini, mirisne i aromatične biljke koje osvježavaju prostor i ukrašavaju vrtove, no druga perspektiva, ona znanstvena, otkriva i izolira konkretne sastavnice, u ovom slučaju, u svrhu ispitivanja njihovih antiagregacijskih svojstava.

Upravo takva saznanja bi otkrila antiagregacijski potencijal samih biljaka i njihovih sastavnica te ih približila antiagregacijskoj terapiji, terapiji koja je danas vrlo često propisivana i od velikog je značaja.

1.1. BOTANIČKI PREGLED

1.1.1. Stanište, morfološka obilježja i općeniti podaci porodice Lamiaceae (Labiatae)

Stanište porodice Lamiaceae je cijeli svijet no ipak je najkoncentriranija u području Mediterana s prisutnom istoimenom klimom te vegetacijom koju karakterizira krš i makija.

Sama porodica obuhvaća oko 3200 vrsta te dvjestotinjak rodova, a ime je dobila zbog karakterističnog izgleda cvjetova kojima se latice spajaju na takav način da izgledom podsjećaju na usne (*lat. labia*).

Biljke ove porodice su zeljaste biljke, trajnice ili grmovi s križasto nasuprotnim listovima bez palistića. Cvjetovi je jednosimetrični, dvospolni, rijetko kad poligamni. Čaška je cjevasta ili zvonolika s 4 do 5 zubaca. Vjenčić ima valjkastu ili ljevkastu cijev te 4-5-krpasti višemanje dvousnati rub. Gornja usna sastoji se od 2, a donja od 3 režnja. Prašnika, koji su dvomoćni, je 4, a ponekad 2. Plodnica je nadrasla, četverogradna s jednim sjemenim zametkom u svakom pretincu. Plod je kalavac koji se raspada na 4 suha, ponekad mesnata plodića.

Većina biljaka ove porodice bogata je eteričnim uljima koji im daju osobit miris te imaju antimikrobni učinak. Eterično ulje se izlučuje iz žljezdastih dlaka te žlijezda koje prekrivaju listove, stabljiku i cvjetove. Usnatice su našle primjenu u narodnoj medicini, kulinarstvu te industriji parfema (Domac, 2002; Grlić, 1990; www.theplantprofiler.com).

1.1.2. Morfološka obilježja i rasprostranjenost vrsta: *Calamintha nepeta* (L.) Savi, *Lavandula angustifolia* Mill. i *Ocimum basilicum* L.

1.1.2.1. *Calamintha nepeta* (L.) Savi

Vrsta *C. nepeta* (gustocvjetna gorska metvica) je trajna biljka s puzećim podankom. Stabljika joj je 30-60 cm visoka, često razgranata i dlakava. Listovi su sitni, skoro sjedeći ili s do 5 mm dugom peteljkom, široko jajasti, okruglasti ili jajasto-rombični, tupo nazubljeni ili čitava ruba, pri bazi zaokruženi ili produženi u peteljku, s obje strane prorijeđeno dlakavi. Cvjetovi imaju bjelkasti vjenčić i zelenu ili ljubičastu dlakavu čašku, dugi su oko 1 cm, a razvijaju se u gustim pršljenovima od srpnja do rujna (Slika 1.).

Za vrstu *C. nepeta* može se reći da je tipična mediteranska i submediteranska vrsta, stoga i raste po šikarama, kamenitim, pjeskovitim te općenito suhim mjestima. Također je raširena i u Hrvatskoj (Domac, 2002; Grlić, 1990).



Slika 1. *Calamintha nepeta* (L.) Savi (www.hirc.botanic.hr)

1.1.2.2. *Lavandula angustifolia* Mill.

L. angustifolia (lavanda, despik) je višegodišnji niski polugrm, visok 20-60 cm, s mnogo uspravnih izdanaka. Listovi su uski, linealno duguljasti, slični listovima ružmarina. Mladi su listovi savinuta ruba i dlakavi, a kasnije su plosnati i bez dlaka. Izdanci su u svom donjem djelu više obrasli listovima, dok se u gornjem dijelu izdanka razvijaju cvjetovi u cvatovima koji se sastoje od nekoliko prividnih pršljenova. Cvjetovi imaju vrlo kratku i cilindričnu peteljku i do 5 mm dugu, uzduž prugastu, dlakavu čašku modroljubičaste boje. Vjenčić je svjetloplavkast, cjevast, 10-12 mm dug i nadvisuje čašku. Čaška, vjenčić i prašnici obrasli su dlačicama (Slika 2.).

Osobitost peludnih zrnaca vrste *L. angustifolia* je ta da su išarani s po 6 svjetlijih pukotinica. Lavanda najbolje uspjeva u toploj sredozemnoj klimi. Raste na suhim i toplim obroncima, kršu i kamenitu tlu. Samonikla je biljka, ali je za današnje potrebe i proizvodnju eteričnog ulja nema dovoljno te se kultivira prije svega u Francuskoj (Provansa) te u Grčkoj, sjevernoj Africi, Iranu, Španjolskoj i Hrvatskoj (Dalmacija) (Galle Toplak, 2016; Kuštrak, 2005).



Slika 2. *Lavandula angustifolia* Mill. (www.hirc.botanic.hr)

1.1.2.3. *Ocimum basilicum* L.

Vrsta *O. basilicum* (bosiljak, murtila) je jednogodišnja zeljasta biljka koja može narasti i do 50 cm visine. Stabljika je uglavnom grmoliko razgranjena. Listovi su križasto nasuprotni na dugim peteljka, široko eliptični, zašiljeni, pilasto nazubljeni ili čitavog ruba. Cvjetovi rastu u pazušcima listova na vrhu stabljike te su bijeli ili crvenkasti i nalazi ih se po 6 u pršljenovima, koji su međusobno udaljeni 2 cm (Slika 3.). Plodići su jajasti, do 2 mm dugi, tamnosmeđi do crni. Bosiljak ima jak i aromatičan miris.

Bosiljak potječe iz Indije, odakle se uzgajanjem preko Bliskog istoka prenio do Europe. Osjetljiv je na niže temperature, a samonikao se nalazi vrlo rijetko i to samo u toplijim krajevima (Grlić, 1990; Pahlow 1989; Gursky 1978).



Slika 3. *Ocimum basilicum* L. (www.starrenvironmental.com)

1.2. KEMIJSKI SASTAV BILJNIH VRSTA

1.2.1. *Calamintha nepeta* (L.) Savi

U svrhu karakterizacije kemijskog sastava vrste *C. nepeta* napravljena je analiza plinskom kromatografijom te posebno HPLC-om (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti) za analizu fenolnih kiselina (Araniti i sur., 2013; Mastelić i sur., 1998).

Terpenski ugljikovodici

Monoterpeni: linalool, kamfor, mentol, izomenton, pulegon, piperiton, piperitenon.

Seskviterpeni: *trans*-kariofilen, (*Z*)- β -farnezen, β -selinen, β -kubenen, δ -kadinen

Ostali dokazani ugljikovodici su diterpen neofitadien te triterpen viminalol (Araniti i sur., 2013).

Fenolne kiseline

Galna kiselina, vanilinska kiselina, siringična kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulična kiselina (Araniti i sur., 2013).

Masne kiseline

Pentadekanoična, heksadekanoična, tetradekanoična kiselina i njihovi esteri (uglavnom metilni) (Araniti i sur., 2013).

Eterično ulje

Eterično ulje, očekivano, sadrži najviše terpenskih ugljikovodika (seskviterpena, monoterpena te terpenskih oksida). Najveći udio u sastavu imaju monoterpenski oksidi (piperiton oksid te piperitenon oksid) i monoterpen limonen.

Ostali spojevi identificirani u eteričnom ulju su: timol, kariofilen, menton, α -pinen i dr. (Mastelić i sur., 1998).

Ostali spojevi

Vitamin E (tokoferol) te sterolni spoj stigmast-5-en-3-ol (Araniti i sur., 2013).

1.2.2. *Lavandula angustifolia* Mill.

Trjeslovine

Iako se definiraju kao fenolni spojevi, točnije fenolne kiseline, klorogenska i ružmarinska kiselina mogu se shvatiti kao trjeslovine u širem smislu. Navedene kiseline čine 12% suhe droge vrste *L. angustifolia*. Budući da su klorogenska, a posebice ružmarinska kiselina karakteristične za porodicu usnatica (Lamiaceae), nazivaju se i *Lamiaceae trjeslovinama* (Galle Toplak, 2016).

Eterično ulje

U osušenim cvjetovima ima 1-3% eteričnog ulja čije su glavne sastavnice ester linalil acetat (35-62%) te terpeniski alkohol linalol (do 40%). Ostali terpeni koji se nalaze u eteričnom ulju su: geraniol, cimen, ocimen, borneol te cineol. Također, u eteričnom ulju se nalaze još i kumarini herniarin i umbeliferon u udjelu od 0,25% te razne ketoni, propionati i valerionati. Valja naglasiti kako količina ketona kamfora u eteričnom ulju može biti pokazatelj patvorenja. Naime, u eteričnom ulju vrste *L. angustifolia* količina kamfora je u tragovima, dok se u patvorenim eteričnim uljima dobivenim od križanaca drugih vrsta roda *Lavandula* tzv. lavandin, kamfor nalazi u većim količinama i pridonosi prepoznatljivom 'bockavom' mirisu (Galle Toplak, 2016; Marković, 2005; Gursky, 1978).

Ostali spojevi

U suhim cvjetovima lavande nalaze se i kumarini, fitosteroli te flavonoidi (Kuštrak, 2005).

1.2.3. *Ocimum basilicum* L.

U svrhu kemijske karakterizacije vrste *O. basilicum*, korištena je analitička metoda plinske kromatografije konjugirana sa masenim spektrometrom (GC/MS). Cilj je bio identificirati kemijske sastavnice eteričnog ulja te slobodne isparljive aglikone u vrsti *O. basilicum* (Politeo i sur., 2006).

Lako isparljivi aglikoni

Identificirani su: alifatski alkoholi, kiseline, terpenški spojevi, derivati fenilpropana te derivati norizoprenoidea.

Najznačajnije sastavnice su bile: fenilpropanoidi eugenol (44%) i kavikol (29,5%), benzilni alkohol (5,7%), vanilin (2,9%) te 2-fenil etanol (2,7%) (Politeo i sur., 2006).

Eterično ulje

Udio eteričnog ulja u vrsti *O. basilicum* iznosi 0,4-0,8%. Kao sastavnice eteričnog ulja, identificirani su: monoterpeni, seskviterpeni te fenilpropanoidni derivati.

Najzastupljeniji spojevi su terpenški alkohol linalol u udjelu od 28,6% te fenilpropanoidni derivat estragol (metilkavikol) u udjelu od 21,7%. Nadalje, značajni su i: metilni ester cimetne kiseline (14,3%), monoterpeni 1,8-cineol (4%) i eugenol (5,9%) te seskviterpeni α -kadinol (7,1%) i α -bergamoten (2,2%). Ovisno o kemotipu vrste *O. basilicum*, količina monoterpenskog ketona kamfora je promjenjiva. Upravo su kemotipovi bosiljka *O. basilicum* var. *basilicum* te *O. basilicum* var. "Laitue" poželjni zbog ljekovitih svojstava koja proizlaze iz već navedenih najzastupljenijih sastavnica eteričnog ulja bosiljka – estragol, linalol te 1,8- cineol (Politeo i sur., 2006; Marković, 2005; Gursky, 1978).

Ostali spojevi

Od ostalih sastavnica u vrsti *O. basilicum* nalaze se trjeslovine (5%), saponini te gorke tvari (Gursky, 1978).

1.3. FARMAKOLOŠKI UČINCI I UPORABA BILJNIH VRSTA

1.3.1. *Calamintha nepeta* (L.) Savi

Vrsta *C. nepeta* posjeduje mnoge učinke te se na različite načine upotrebljava kod različitih naroda i kultura. Biljka se primjenjuje prije svega kao stimulans, tonik, antiseptik te spazmolitik. U narodnoj medicini diljem svijeta korištena je protiv nesаницe, depresije, konvulzija, grčeva te respiratornih i gastrointestinalnih oboljenja. Oparak pripremljen od listova gorske metvice koristi se kod tretmana neurovegetativne distonije i epilepsije, dok njegova eupeptična i karminativna svojstva pospješuju probavu. Osim navedenog, zabilježena je uporaba ove biljke kod gihta, produktivnog kašlja i obrade rana. Zanimljivo je da se listovi vrste *C. nepeta* eksterno primjenjuju kod bolova u području zdjelice (kuka).

Eterično ulje posjeduje antioksidativna, antimikrobna te protuupalna svojstva.

Antimikrobna svojstva

Ispitivanje antimikrobnih svojstava eteričnog ulja vrste *C. nepeta* pokazalo je dobre rezultate protiv šireg spektra bakterija (Gram – i Gram +), posebice protiv vrste *Staphylococcus aureus*. Osim antibakterijskog, pokazan je i antifungalni učinak na rodovima *Fusarium* i *Aspergillus*. Dermatofiti među kojima se nalaze i bakterije i gljivice su također pokazali susceptibilnost pod utjecajem eteričnog ulja gorske metvice i na taj način pokazali mogućnost njihovog smještanja u terapiju dermatofitoza. *In vitro* ispitivanjima utvrđena je inhibicija metanogeneze te redukcija amonijaka mehanizmom inhibicije deaminacije spojeva u probavnom sustavu. Spojevi koji najviše pridonose navedenim svojstvima su terpeni: menton, pulegon i piperiton oksid. Najvjerojatniji mehanizam antimikrobnog učinka terpenkih spojeva je narušavanje cjelovitosti stanične stijenke i staničnih struktura povećanjem njihove permeabilnosti, što uzrokuje gubitak važnih molekula i iona za preživljavanje bakterija. Hidrofobnost terpenkih spojeva utječe na interakcije lipida i proteina te na taj način narušava enzimske sustave i proteine bakterije. Osim toga, eterično ulje se pokazalo kao dobar konzervans u kozmetičkim proizvodima inhibirajući rast širokog spektra bakterija, no bitno je naglasiti da je kod svih ispitivanja najotpornija bila bakterija *Pseudomonas aeruginosa* za čiju je inhibiciju bila potrebna visoka koncentracija eteričnog ulja.

Antioksidativna svojstva

Pod antioksidativnim svojstvima primarno se podrazumijeva "hvatanje" slobodnih radikala koji potiču oksidaciju spojeva. U biljkama se to svojstvo uvelike pripisuje fenolnim spojevima, posebice flavonoidima, iako sam antioksidativni učinak ne mora ovisiti isključivo o njima, nego može biti i rezultat manje zastupljenih spojeva primjerice karotenoida. Kako bi antioksidativni učinak bio zadovoljavajući, fenolni spoj mora biti aktivan prema peroksi-radikalima te novonastali fenoksi-radikal mora pokazivati visoku stabilnost. Ispitivanja se provode DPPH testom te praćenjem aktivnosti enzima i spojeva uključenih u oksidacijske procese (superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, malonaldehid). U vrsti *C. nepeta*, osim fenolnih spojeva, antioksidativna svojstva se pripisuju i terpenima: piperiton epoksidu, piperitenon oksidu te limonenu.

Protuupalna, antidiijabetička te antiproliferativna svojstva

Pulegon kao jedna od glavnih sastavnica eteričnog ulja vrste *C. nepeta*, sprječava nastajane proupalnih agenasa: leukotriena i prostaglandina, iako ne pokazuje učinak na enzim lipooksigenazu koja sudjeluje u njihovom nastanku.

Ružmarinska i kavena kiselina (fenolne kiseline), pokazale su veću antidiijabetičku aktivnost od pozitivne kontrole glibenklamida.

Ekstrakt je također proučavan na staničnoj liniji raka dojke te je pokazao primjetna antiproliferativna svojstva i samim time potvrdio da je kandidat za dizajniranje farmaceutskih pripravaka kod karcinoma.

Toksičnost

Toksična svojstva se pripisuju također pulegonu, koji hepatskim metabolizmom prelazi u toksične metabolite i uzrokuje nekrozu staničja, primarno u jetri te u bubrezima. Istraživanjem na štakorima, utvrđeno je da oralna administracija eteričnih ulja bogatih pulegonom rezultira abnormalnim lokomotornim pokretima, ubrzanom respiracijom, smanjenom aktivnosti i paralizom udova (Božović i Ragno, 2017).

1.3.2. *Lavandula angustifolia* Mill.

Farmakološko djelovanje biljne vrste *L. angustifolia* karakterizira spazmolitički, hipotenzivni te blago sedativni i hipnotički učinak. Osim toga, lavanda djeluje blago analgetički, protuupalno te ubrzava epitelizaciju kože, dok je njen antimikrobni učinak relativno slab. Lavanda te njeni pripravci indicirani su kod:

- ❖ nervoza, nesanice, tjeskobe (dermalno, oralno, inhalacijski)
- ❖ alergijskih i infektivnih upala kože (dermalno)
- ❖ opekline (dermalno)
- ❖ grčeva mišića (dermalno, oralno)
- ❖ grčeva u probavnom sustavu (oralno)

Hidrolat lavande nastao kao nusprodukt destilacije eteričnog ulja, koristi se često u tretmanu akni i upalnih bolesti kože te kod bakterijskog konjuktivitisa.

Većina svojstava se pripisuje sastavnicama linalilacetatu i linalolu, dok primjerice trjeslovine imaju antidijaroički učinak.

Osim eteričnog ulja, često se koriste i ostali pripravci lavande sa svojim karakterističnim svojstvima. Tako postoje: čajevi koji se koriste kod ispiranja rana, masaže vlasišta i svrbeži kože; tinkture koje pomažu kod reumatičnih bolova u mišićima i zglobovima te kod uboda insekata i na kraju, najčešće korištene kupelji lavande koje se primjenjuju kod vegetativnih distonija, klimakteričkih tegoba i ozeblina (Galle Toplak, 2016; Kuštrak, 2005; Marković, 2005).

Antimutagena svojstva eteričnog ulja lavande

Ispitivanjem mutagenosti i antimutagenosti, utvrđeno je da eterično ulje lavande ne pokazuje mutageni učinak, nego čak antimutageni. Ispitivanje je provedeno na 2-nitrofluorenu koji inducira mutacije stvaranjem adukata. Lavandino eterično ulje je direktnom deaktivacijom značajno smanjilo aktivnost 2-nitrofluorena (Evandri i sur., 2005).

1.3.3. *Ocimum basilicum* L.

Djelovanje biljne droge vrste *O. basilicum* primarno je spazmolitičko, protuupalno i analgetsko. Osim toga, bosiljak djeluje stimulirajuće na cijeli organizam te potiče probavu i funkciju jetre. Budući da su za ljekovite učinke odgovorni mnogi spojevi (metilkavikol, linalol, 1,8-cineol, aldehidi), bosiljak i njegovi pripravci su indicirani kod raznih medicinskih stanja:

- ❖ nadutosti i loše probave
- ❖ gastritisa, čira na želucu i duodenumu
- ❖ svih oblika gastroenteričkih spazama
- ❖ mišićnih spazama
- ❖ poremećaja u cirkulaciji izazvanih spazmom krvnih žila
- ❖ kroničnog umora izazvanog infektivnim bolestima
- ❖ infekcija gastrointestinalnog sustava
- ❖ terapije cistitisa kao dodaci

Pripravci bogati metilkavikolom su kontraindicirani kod trudnica, dojilja i hormon ovisnih tumora dojke i jajnika te se ne smiju koristiti duže od mjesec dana. Još je bitno napomenuti kako pripravci bosiljka bogati aldehydima mogu djelovati kao iritansi te stoga treba prilagoditi njihovu dozu (Marković, 2005).

U narodnoj medicini je poznat čaj od bosiljka koji se može koristiti u razne ljekovite svrhe. Osim što je spazmolitik, kao što je već navedeno, čaj povećava tek, raspoloženje te olakšava mokrenje i djeluje kao antiflatulans. Osim toga, čaj olakšava bolesti grla i usta, ukoliko se grglja i njime ispire usna šupljina. Ružina voda u kojoj su močene sjemenke bosiljka zacjeljuje rane na bradavicama dojki (Gursky, 1978).

Antioksidativna i antimikrobna svojstva eteričnog ulja bosiljka

DPPH testom je potvrđen antioksidativni učinak eteričnog ulja bosiljka, no bitno je još i nadodati da je eterično ulje bosiljka pokazalo veći antioksidativni učinak naspram sintetskog antioksidansa butilhidroksitoluena (BHT).

Antimikrobni učinak je širokog spektra. Gram+ bakterije su nešto osjetljivije od Gram-bakterija, a intenzitet antimikrobnog djelovanja eteričnog ulja je usporediv s antibiotikom amoksicilinom (Hussain i sur., 2008).

Antivirusni učinci nekih izoliranih sastavnica i ekstrakta bosiljka

Vodeni i metanolni ekstrakt bosiljka, zajedno ili u kombinaciji s nekim od izoliranih sastavnica biljne vrste *O. basilicum* (linalol, apigenin i ursolna kiselina), pokazali su antivirusna svojstva protiv slijedećih virusa: enterovirusa, adenovirusa, herpes simplex virusa (HSV) te virusa hepatitisa tip B (HBV) (Lien-Chai i sur., 2005).

***O. basilicum* kao insekticid**

Insekticidni potencijal eteričnog ulja i aromatiziranog praška bosiljka ispitan je na nametniku *Callosobruchus maculatus*. Fumigacijom nametnika eteričnim uljem (25 µL) postignut je 80%-tni mortalitet. Aromatizirani pulvis je korišten u količini od 1 g te je njegov insekticidni potencijal izražen kao toksikološki parameter 50%-tne letalne doze (LD₅₀) i iznosi 65 µL/g (Sékou i sur., 2001).

1.4. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi su široko rasprostranjeni i raznoliki sekundarni metaboliti biljnog svijeta. Osim što su esencijalni elementi čovjekove prehrane, istražuju se zbog mnogih ljekovitih svojstava. Dosad ih je poznato više od 8000 te svaki od njih u svojoj strukturi posjeduje jedan ili više aromatskih prstena supstituiranih jednom ili više hidroksilnih skupina. Iako su fenolni spojevi zorni prikaz fitokemijske raznolikosti, a budući da uglavnom posjeduju više od jedne hidroksilne skupine, zajednički se nazivaju i polifenoli.

Složenost strukture varira od najjednostavnijih fenolnih molekula do visoko kondenziranih polimera (Tablica 1.).

Uz primarna antioksidativna svojstva, polifenolima se pripisuju i sljedeći učinci: antiarterogeni, antialergijski, antitrombotski, protuupalni, antimikrobni, kardioprotektivni te vazodilatacijski (Balasundran i sur., 2006).

Tablica 1. Pojednostavljena shematsko-strukturna podjela tipova fenolnih spojeva u biljkama

TIP FENOLNOG SPOJA	POJEDNOSTAVLJENA STRUKTURA
Jednostavni fenoli, benzokinoni	C_6
Hidroksibenzoati	C_6-C_1
Acetofenoni, fenilaceteti	C_6-C_2
Hidroksicinamati, fenilpropanoidi	C_6-C_3
Naftokinoni	C_6-C_4
Ksantoni	$C_6-C_1-C_6$
Stilbeni, antrakinoni	$C_6-C_2-C_6$
Flavonoidi, izoflavonoidi	$C_6-C_3-C_6$
Lignani, neolignani	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonoidi	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Lignini	$(C_6-C_3)_n$
Kondenzirane trjeslovine	$(C_6-C_3-C_6)_n$

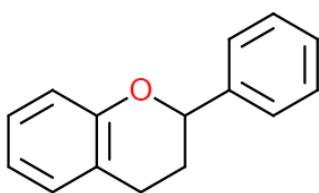
1.4.1. FLAVONOIDI

1.4.1.1. Kemijska svojstva i rasprostranjenost

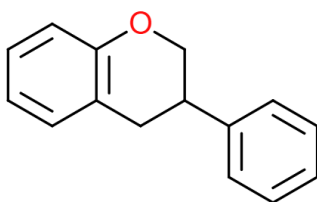
Flavonoidi su jedna od najvećih skupina fenolnih spojeva te ih je do sada izolirano preko 3000. Kao što vrijedi za sve fenolne spojeve, flavonoidi su široko rasprostranjeni u biljnom svijetu. Ime su dobili zbog svoje karakteristične žute boje (lat. *flavus* = žut), a jedna od uloga u biljkama je da kao pigment i kopigmenti stvaraju nijanse boja koje privlače kukce i druge životinje. Flavonoidni heterozidi su smješteni u staničnoj citoplazmi te u vakuolama epidermalnih stanica i u stanicama mezofila, dok je za flavonoidne aglikone karakterističan smještaj u obliku eksudata na površini listova i cvjetova u obliku praškastog sloja, ili su izmješani s kutikulom (Kovačević, 2004).

Temelj kemijske strukture flavonoida je benzopiran koji s vezanom benzenskom jezgrom čini fenilbenzopiransku strukturu koja je osnovna struktura flavonoida. Obzirom na položaj benzenske jezgre na benzopiranu, flavonoidi se mogu podijeliti na:

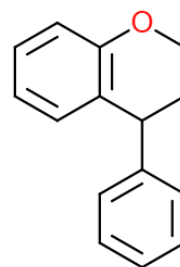
- 2-fenilbenzopirane
- 3-fenilbenzopirane (izoflavonoide)
- 4-fenilbenzopirane (neoflavonoidi) (Slika 4.)



2-fenilbenzopiran



3-fenilbenzopiran



4-fenilbenzopiran

Slika 4. Podjela flavonoida obzirom na položaj benzenske jezgre na benzopiranu

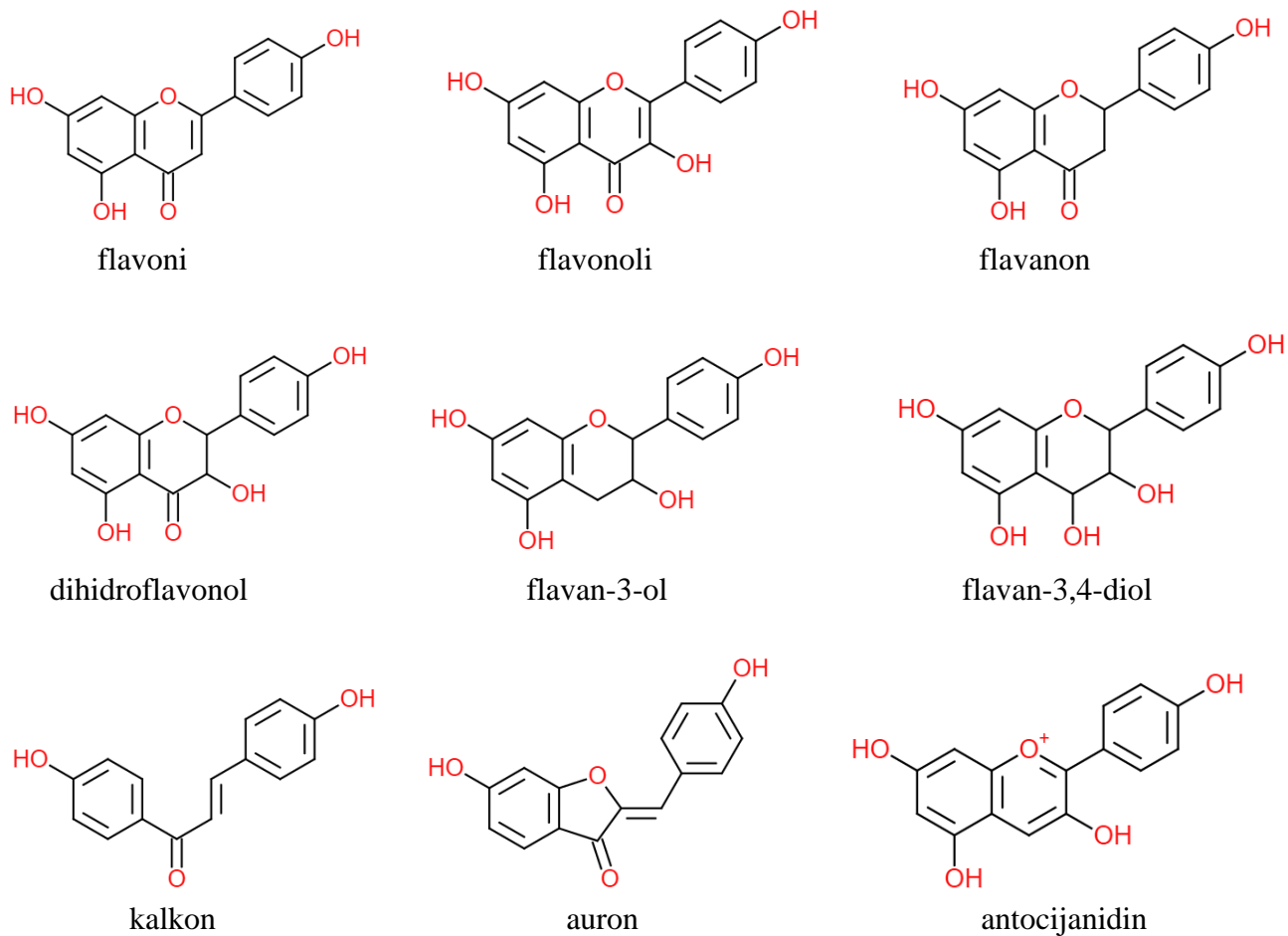
Velik broj derivata osnovnih tipova aglikona flavonoida, međusobno se razlikuju po broju, vrsti i položaju supstituenata aromatičnih prstenova. Najčešći supstituenti su hidroksilne i metoksi skupine. Najčešća supstitucija flavonoida je hidroksilna skupina na položaju C5 i C7, dok se kod 80% flavonoida ona nalazi na C4' položaju. Česta je i prisustnost *orto* supstitucije na C3' i C4' položaju, dok su položaji C6 i C8 flavonoidnih aglikona vrlo reaktivni i pri tome dolazi do stvaranja dimernih struktura-biflavonoida.

Na temelju stupnja oksidacije centralnog piranskog prstena, aglikoni flavonoida mogu se podijeliti na:

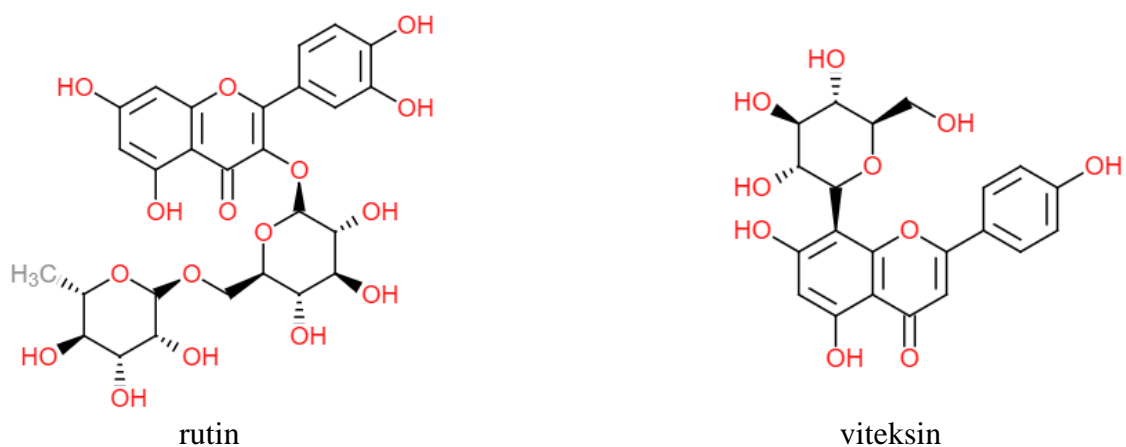
- prave flavonoide (flavoni, flavonoli, flavanoni, dihidroflavonoli, izoflavoni te izoflavanoni)
- gradivne jedinice trjeslovina (flavani, flavan-3-oli te flavan-3,4-dioli)
- flavonoide u širem smislu (kalkoni, auron i antocijani) (Slika 5.)

Što se tiče flavonoidnih heterozida, šećerni ostatak može sadržavati 1, 2 ili 3 šećera koji su međusobno linearno ili razgranato povezani. Glukozidna veza je najčešće ostvarena preko fenolnih skupina aglikona te se može reći da je pravilo da flavoni grade 7-O-heterozide, a flavonoli 3-O-heterozide. C-heterozide grade flavoni, flavonoli i kalkoni povezivanjem asimetričnog C atoma šećera s C6 ili C8 atomima aglikona (Slika 6.).

Šećeri koji su najzastupljeniji u građi flavonoidnih heterozida su: D-glukoza, D-galaktoza, D-glukuronska kiselina, D-galakturonska kiselina, D-ksiloza, L-arabinoza, L-ramnoza te disaharid rutinoza (Kovačević, 2004; Maleš, 1995).



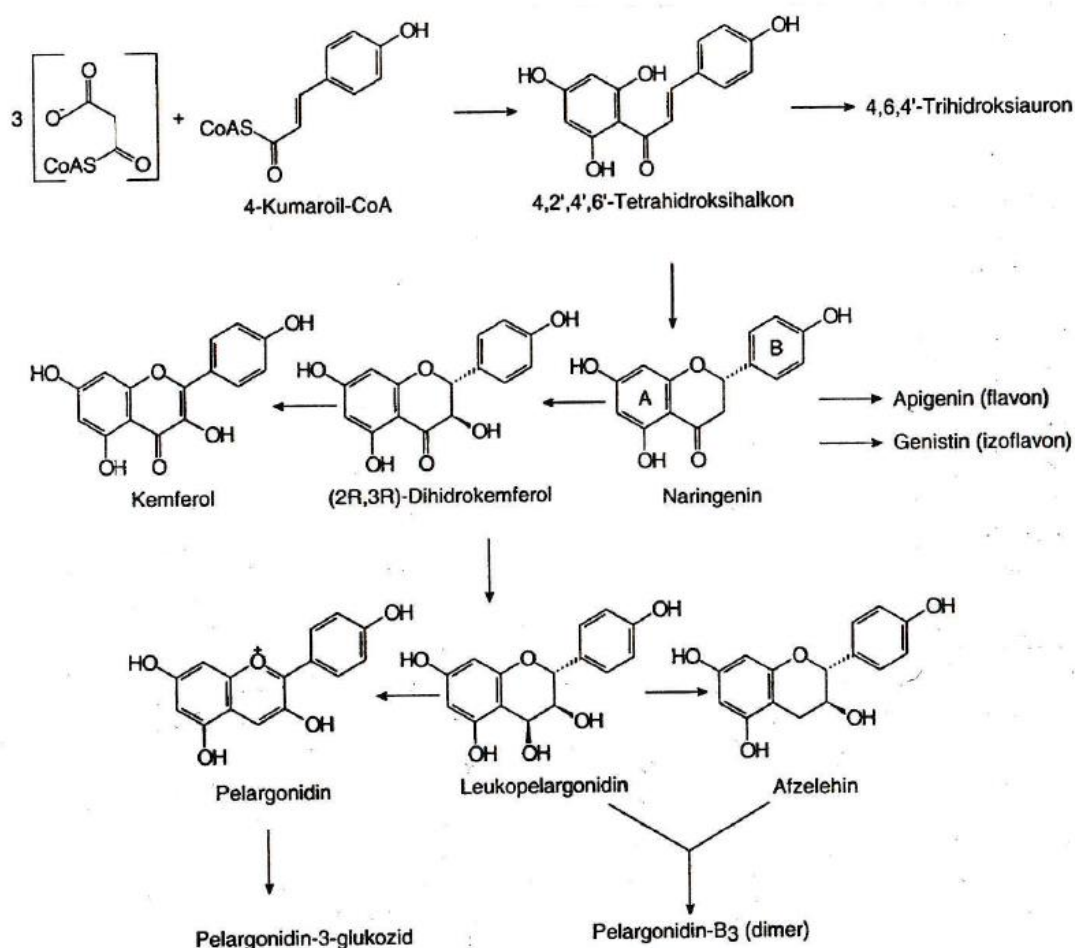
Slika 5. Osnovni tipovi flavonoidnih aglikona



Slika 6. Najzastupljeniji flavonoidni glikozidi

1.4.1.2. Biosinteza

Kao i za fenolne kiseline, put šikiminske kiseline je bitan i za biosintezu flavonoida, budući da je za sintezu prekursora tetrahidroksikalkona potrebna molekula 4-kumaroil CoA (derivat cimetine kiseline). Nastajanje tetrahidroksikalkona, omogućeno je reakcijom već spomenute molekule 4-kumaroil CoA i 3 molekule acetil CoA, nakon čega slijedi reakcija ciklizacije uz stvaranje prepoznatljivog C₆-C₃-C₆ skeleta. Prvo nastaju flavanoni (naringenin), a zatim uz reakcije hidroksilacije, redukcije i O-metil transferizacije ostale skupine flavonoidnih aglikona (Slika 7.) (Kovačević, 2004).



Slika 7. Pojednostavljena shema biosinteze flavonoida (Kovačević, 2004)

1.4.1.3. Biološki učinci

Antioksidativni učinak

In vitro istraživanjem, utvrđeno je da flavonoidi inhibiraju lipidnu peroksidaciju u fazi inicijacije djelujući kao čistači superoksidnih aniona i hidroksilnih radikala. Pretpostavljeni mehanizam je donacija vodikovih atoma peroksi radikalima čime nastaje radikal flavonoida koji reagira s ostalim slobodnim radikalima prekidajući tako oksidacijski lanac u fazi inicijacije.

Osim navedenog, neki flavonoidi djeluju kao kelatori metala i inhibiraju Fentonovu reakciju koja stvara aktivne kisikove radikale. Sama kemijska struktura flavonoida utječe na potentnost antioksidacijskog učinka, primjerice: hidroksilacija C3 atoma, veći broj hidroksilnih supstituenata, dehidrogenacija C2-C3 veze te karbonilna skupina na C4 atomu povećavaju antioksidacijski učinak, dok ga prisutnost šećera i metoksi supstituenta u strukturi zbog steričkih smetnji smanjuju.

Antiinflamatorni učinak

Smatra se da flavonoidi inhibiraju stanje upale u organizmu na više načina. Prije svega, smanjuju broj imobiliziranih leukocita i time sprečavaju adheziju na endotel krvne žile, čime je onemogućeno njihovo dospjeće do mjesta nastanka upale. Uz navedeno, flavonoidi imaju sposobnost inhibicije degranulacije neutrofila i mast stanica modulacijom kalcijevih kanala u membrani stanice. Osim toga, flavonoidi inhibiraju sintezu arahidonske kiseline, prekursora u nastanku proinflamatornih molekula, djelovanjem na enzime ciklooksigenazu (COX) i lipooksigenazu (LOX).

Ostali učinci flavonoida

- Antitumorski učinak- iako nije potvrđen u potpunosti, smatra se da flavonoidi inhibiraju staničnu proliferaciju, angiogenezu te antioksidativnim učinkom smanjuju mogućnost nastanka staničnih oštećenja i oštećenja DNA koja mogu imati prokarcinogeni učinak.
- Antiaterosklerotski učinak- inhibicijom oksidacije lipoproteina niske gustoće (LDL), reducira se stvaranje aterosklerotskog plaka na stijenci krvne žile
- Antiviralni učinak- *in vitro* istraživanjem utvrđen je antiviralni učinak naspram virusa: herpes simplex virusa (HSV), respiratornog sincicijskog virusa (RSV), virusa parainfluenze te adenovirusa. Kvercetin posjeduje i antiinfektivna i antireplikativna svojstva naspram virusa. Također je pokazan utjecaj na reverznu transkriptazu i DNA-polimerazu HIV-a, ali samo *in vitro*.

- Uz navedeno, flavonoidi se u terapijske svrhe koriste kao:
 - diuretici
 - hepatoprotektivi
 - spazmolitici
 - antialergici

(Kovačević, 2004; Nijveldt i sur., 2001; Cook i Samman, 1996).

Antiagregacijski učinak flavonoida je od posebnog interesa te će kao takav biti obrađen u sljedećem poglavlju, budući da je u središtu teme ovog diplomskog rada.

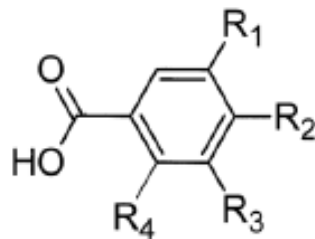
1.4.2. FENOLNE KISELINE

1.4.2.1. Kemijska svojstva i rasprostranjenost

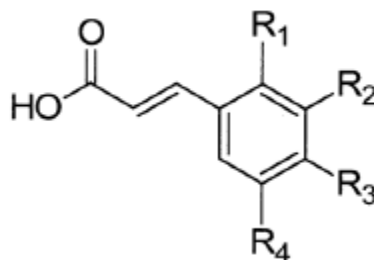
Fenolne kiseline su prirodni biljni spojevi i njihovi sekundarni metaboliti koji u svojoj strukturi imaju najmanje jednu karboksilnu i jednu fenolnu hidroksilnu skupinu. U biljkama su izrazito zastupljene i raspodijeljene u različitim koncentracijama po različitim biljnim organima. Rijetko dolaze kao slobodne kiseline u biljkama te su uglavnom vezane za druge spojeve, primjerice:

- esterska veza s ostalim kiselinama
- esterska veza s alkoholima ili aldehidima
- esterska ili glikozidna veza sa šećerima
- acetilna veza s flavonoidima

Strukturno-kemijski, fenolne kiseline se dijele u 2 skupine: derivati benzojeve kiseline opće formule C₆-C₁ (Slika 8.) te derivati cimetine kiseline opće formule C₆-C₃ (Slika 9.) (Balasundram i sur., 2006; Kovačević, 2004).



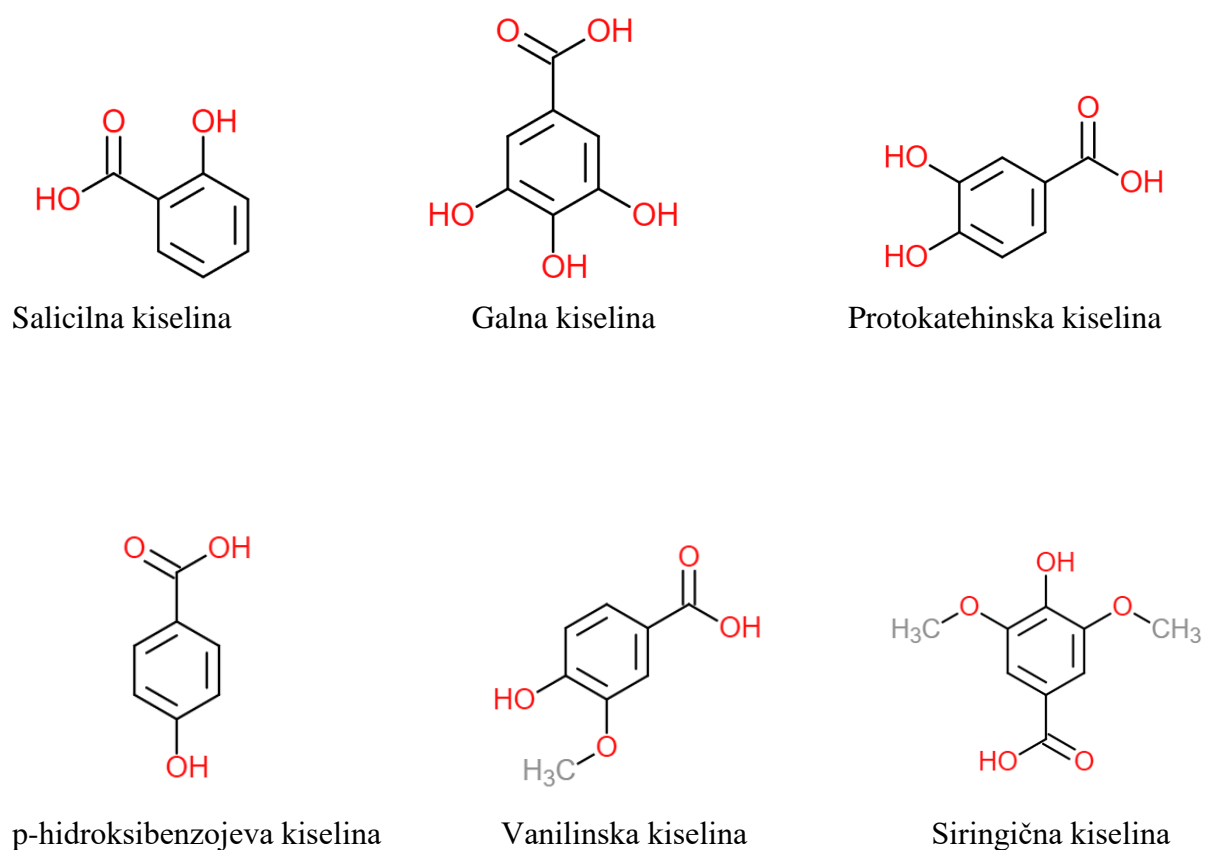
Slika 8. Osnovna struktura derivata benzojeve kiseline



Slika 9. Osnovna struktura derivata cimetine kiseline

Derivati benzojeve kiseline

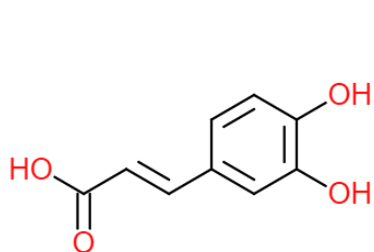
Najzastupljeniji derivati su: salicilna, galna, protokatehinska, *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska te siringična kiselina (Slika 10.). Najpoznatija, salicilna kiselina, nalazi se u kori bijele vrbe (*Salix alba* L.) koju čovjek od davnina koristi u liječenju. Galna kiselina je karakteristična za list medvjete (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.), koru hamamelisa (*Hamamelis virginiana* L.) te za sjemenke pupoljke (*Oenothera biennis* L.) (Balasundram i sur., 2006; Kovačević, 2004; Steinegger i Hänsel, 1992).



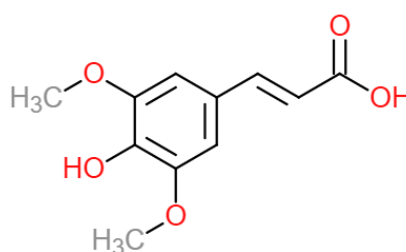
Slika 10. Derivati benzojeve kiseline

Derivati cimetine kiseline

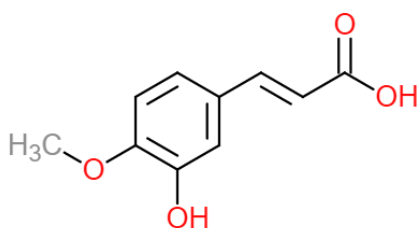
U najzastupljenije spojeve ove skupine ubrajaju se: kavena, sinapinska, izoferulična, ferulična, te *p*- i *o*-kumarinska kiselina (Slika 11.). Navedeni derivati su zastupljeniji od derivata benzojeve kiseline i također češće dolaze u obliku estera. Kavena, najrasprostranjenija fenolna kiselina, nalazi se u većim količinama u rimskoj kamilici (*Chamamelum nobile* L.), cvijetu ranog gloga (*Crataegus oxyacantha* L.) i cvijetu bazge (*Sambucus nigra* L.), a zajedno s feruličnom kiselinom nalazi se u kičici (*Centaureum erythraea* Rafn.) i rabarbari (*Rheum palmatum* L.) (Balasundram i sur., 2006; Kovačević, 2004; Steinegger i Hänsel, 1992).



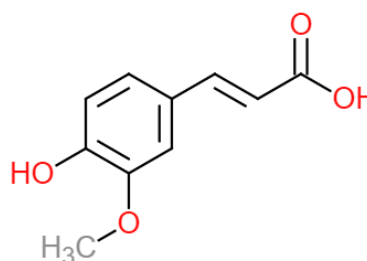
Kavena kiselina



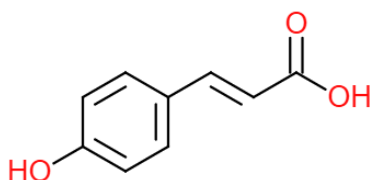
Sinapinska kiselina



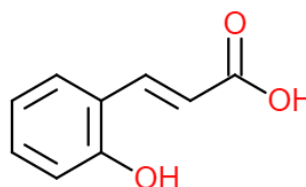
Izoferulična kiselina



Ferulična kiselina



p-kumarinska kiselina



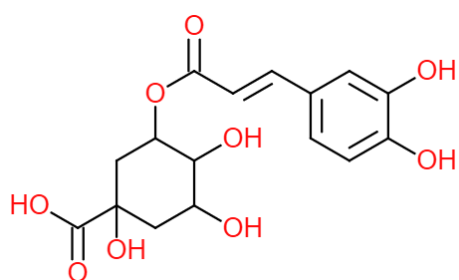
o-kumarinska kiselina

Slika 11. Derivati cimetine kiseline

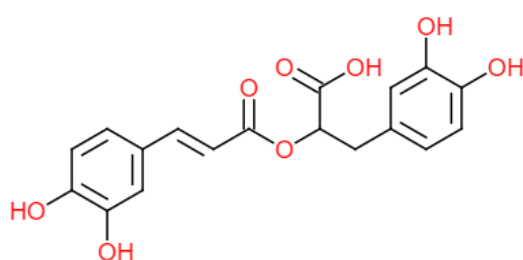
Derivati cimetine kiseline također se često nalaze u obliku posebnih estera-depsida. Depsidi su esteri kod kojih je karboksilna skupina derivata cimetine kiseline vezana za hidroksilnu skupinu druge kiseline, koja je najčešće kina kiselina. U prirodi najzastupljenija, klorogenska kiselina, ester je kavene i kina kiseline te se u velikim količinama nalazi u zelenim zrnima kave (*Coffea* sp.).

Za porodicu Lamiaceae karakteristična ružmarinska kiselina, ester je kavene i 3,4-dihidroksifenilmlječne kiseline koji nastaje kondenzacijom dviju kavenih kiselina.

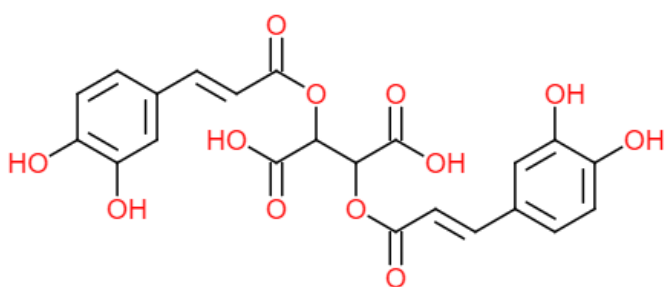
Osim navedenih depsida, zastupljena je i cikorija kiselina koja je strukturno gledano dvostruki ester vinske kiseline na čije su hidroksilne skupine vezane dvije kavene kiseline. Cikorija kiselina, zastupljena je u vodopiji (*Cichorium intybus* L.), a depsid koji također u svojoj strukturi sadrži dvije kavene kiseline je cinarin, zastupljen u listu artičoke (*Cynara scolymus* L.) te je dvostruki ester kina kiseline (Slika 12.) (Steinegger i Hänsel, 1992).



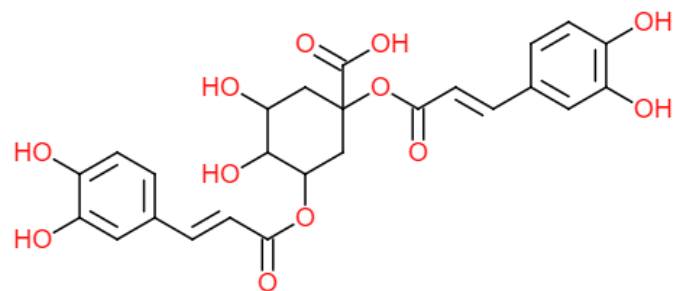
Klorogenska kiselina



Ružmarinska kiselina



Cikorija kiselina



Cinarin

Slika 12. Najzastupljeniji depsiidi

1.4.2.2. Biosinteza

Fenolne kiseline biljka ne može proizvesti bez puta šikiminske kiseline. To je u mnogim slučajevima perkursorski biosintetski put kojim nastaju strukturni međuproducti iz kojih u daljnim reakcijama nastaju sekundarni metaboliti biljaka.

Put šikiminske kiseline započinje aldolnom kondenzacijom fosfoenolpiruvata (PEP) i eritroze-4-fosfata (E4P) uz enzim 3-deoksi-D-arabino-heptulozonat-7-fosfat sintazu (DAHP sintaza) pri čemu nastaje 3-deoksi-D-arabino-heptulozonat-7-fosfat (DAHP).

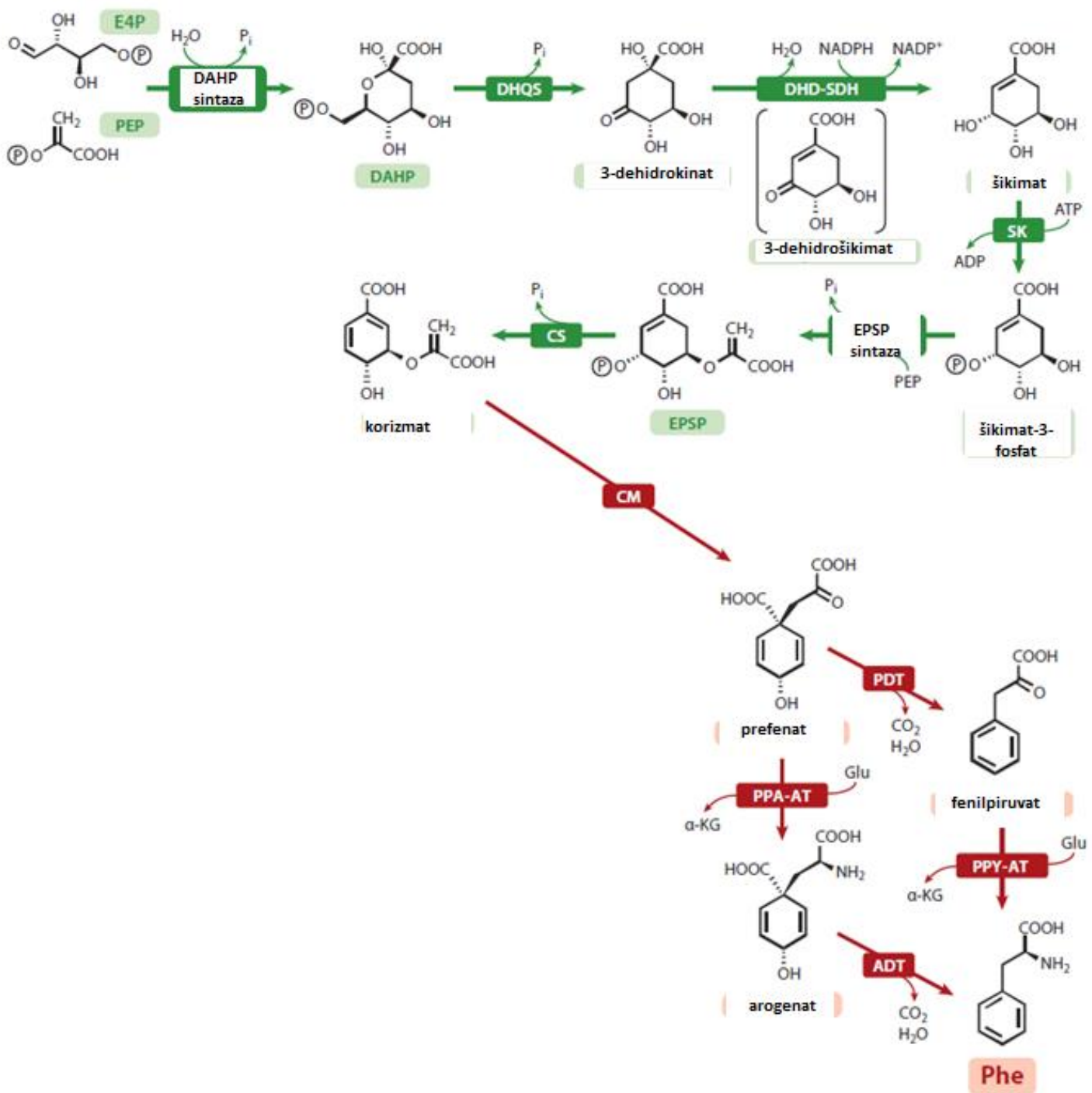
Zatim enzim 3-dehidrokinat sintaza (DHQS) pretvara DAHP u 3-dehidrokinat (DHQ) uzastopnim reakcijama alkoholne oksidacije, β -eliminacije anorganskog fosfata, redukcije karbonila, otvaranja prstena te intramolekularne aldolne kondenzacije.

DHQ uz enzime dehidrokinat dehidratazu (DHD) i šikimat dehidrogenazu (SDH) dehidracijom prvo prelazi u 3-dehidroksi šikimat, a zatim reverzibilnom redukcijom uz NADPH prelazi u šikimat tj. šikiminsku kiselinu.

Enzim šikimat kinaza (SK) omogućuje fosforilaciju šikiminske kiseline u šikimat-3-fosfat koristeći ATP.

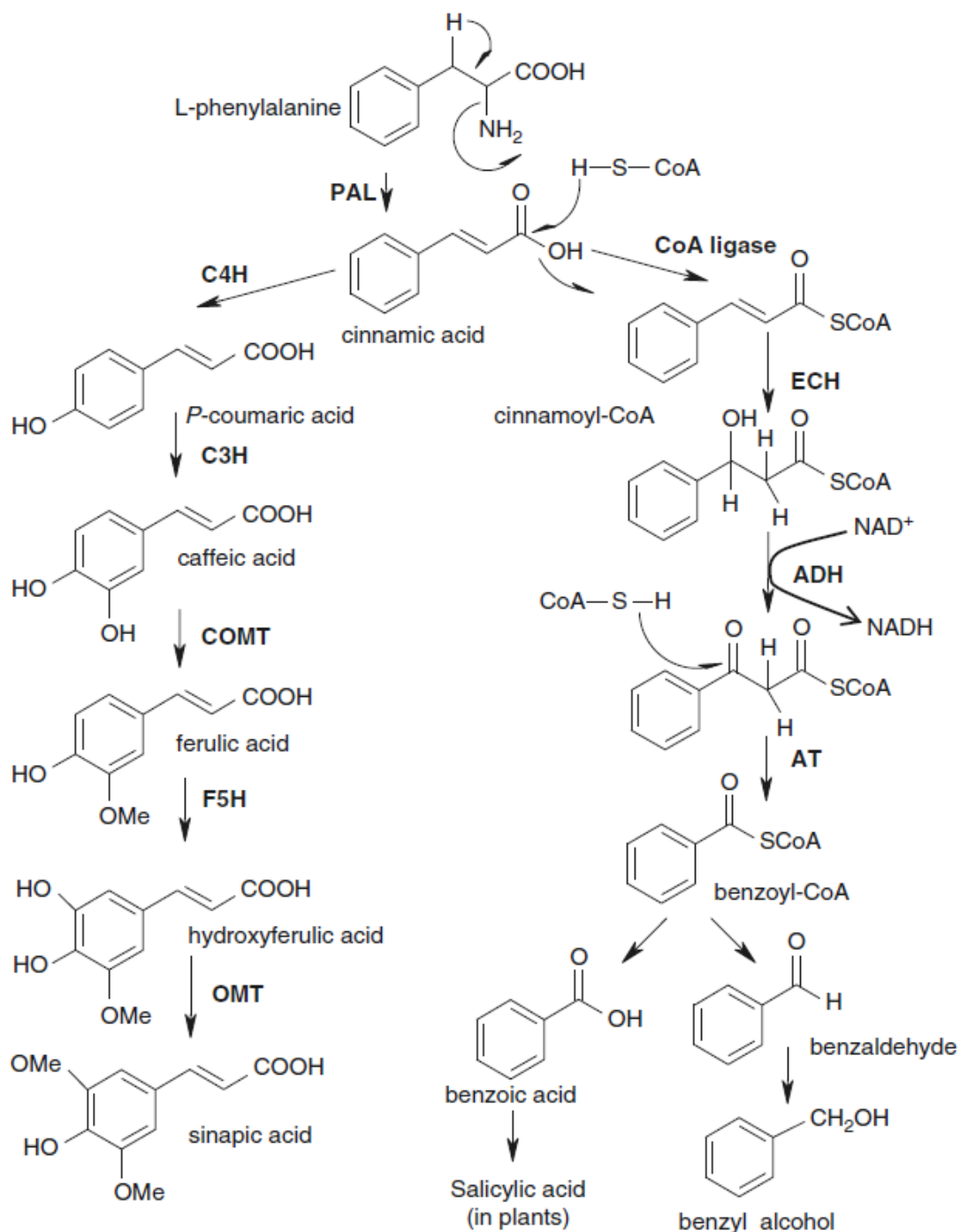
Nadalje, šikimat-3-fosfat uz 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat sintazu (EPSPS) prelazi u 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat (EPSP) koji u posljednjoj reakciji puta šikiminske kiseline uz enzim korizmat sintazu (CS) prelazi u korizmat.

Korizmat kao završni spoj puta šikiminske kiseline, uz korizmat mutazu (CM) prelazi u prefenat koji u reakcijama dekarboksilacije i dehidratacije prelazi u fenilalanin (Phe), aminokiselinu koja je ishodište nastanka fenolnih kiselina (Slika 13.) (Maeda i Dudareva, 2012).



Slika 13. Shema puta šikiminske kiseline i nastajanja fenilalanina (Maeda i Dudareva, 2012)

Biosintetske reakcije koje se događaju na fenilalaninu omogućuju nastanak fenolnih kiselina (Slika 14). Derivati hidroksicimetne kiseline nastaju reakcijama hidroksilacije i O-metilacije, dok derivati hidroksibenzojeve kiseline osim degradacijom hidroksicinamata uz nastanak hidroksicinamoil-CoA estera, mogu nastati i u samom putu šikiminske kiseline, npr. galna kiselina te degradacijom flavonoida (Goleniowski i sur., 2013).



Slika 14. Shematski prikaz reakcija nastajanja fenolnih kiselina iz fenilalanina (Goleniowski i sur., 2013)

1.4.2.3. Biološki učinci

Fenolne kiseline su prepoznate kao biološki aktivni spojevi te im se pripisuju brojni farmakološki i biološki učinci. Budući da su neizbježni spojevi u biljnom svijetu, sastavni su dio ljudske prehrane, a literaturni podaci pokazuju korelaciju između prehrane bogate fenolnim kiselinama i održavanja zdravlja te sprječavanja bolesti.

Antioksidativno djelovanje

Primarno djelovanje koje se pripisuje fenolnim kiselinama je antioksidacijsko. Osim što djeluju kao 'čistači' slobodnih radikala, djeluju kao kelatori metalnih iona te kao induktori ekspresije enzima koji u konačnici poništavaju učinak slobodnih radikala i oksidativnog stresa.

Učinkovitost antioksidacije ovisi o samoj kemijskoj strukturi fenolnih kiselina pri čemu se misli na broj hidroksilnih skupina vezanih na aromatsku jezgru, mjesto vezanja te međusobni odnos hidroksilnih skupina. Tako primjerice veći broj slobodnih hidroksilnih skupina te *orto* položaj hidroksilnog supstituenta na aromatskoj jezgri rezultiraju jačim antioksidacijskim učinkom.

Antioksidativnim učinkom se sprječava oštećenje staničja koje može rezultirati: kroničnim bolestima krvožilnog sustava, koronarnom bolesti srca, moždanim i srčanim udarom te karcinomom.

Antimikrobno djelovanje

Uz antioksidacijski, bitan je i antimikrobni učinak fenolnih kiselina. Spojevi koji uvelike pridonose antimikrobnom učinku su: vanilinska i izovanilinska kiselina, *p*-hidroksicimetna kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, siringična kiselina, kavena kiselina, gentizinska kiselina, ferulična kiselina te *p*-kumarinska kiselina. Za njih se može reći da djeluju nespecifično antimikrobno uz uzrokovanje degradacije stanične membrane mikroorganizama.

Kavena kiselina specifično inhibira stvaranje aflatoksina u plijesni *Aspergillus flavus* te posjeduje baktericidni učinak prema vrstama *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*. Uz navedeno, kavena kiselina i njeni derivati posjeduju selektivni inhibitorni učinak naspram integraze virusa HIV-1 onemogućujući mu time iskorištavanje DNA stanice domaćina za svoju replikaciju (Goleniowski i sur., 2013; Sroka i Cisowski, 2003).

Ostali učinci i uporaba značajnijih fenolnih kiselina

Kavena kiselina je pokazala antialergijski i imunomodulatorski učinak selektivno blokirajući sintezu leukotriena, a njen antitumorski učinak se pripisuje inhibicijom karcinogeneze u kolonu.

Galna kiselina djeluje kao antihistaminik te blokira djelovanje aktivacijskog proteina (AP-1) koji sudjeluje u reakcijama upale, stanične diferencijacije i proliferacije čime postiže protuupalni učinak. Njena antitumorska aktivnost u karcinomu prostate je posredovana inhibicijom reaktivnih kisikovih specija (ROS), dok proapoptotičkim djelovanjem uništava HeLa stanice karcinoma cerviksa. U farmaceutskoj industriji se koristi kao adstrigens i stiptik.

Ferulična kiselina posjeduje prouupalni, antitrombotski te antitumorski učinak. Uz navedeno, ferulična kiselina se istražuje za zaštitu od UV zraka, snižavanje LDL kolesterola te razine glukoze u krvi (GUK). Široko je korištena u industriji hrane kao konzervans te u kozmetici kao zaštitni agens od UV zraka.

Salicilnu kiselinu karakteriziraju keratolitička, protuupalna, antipiretička, analgetička te antiseptička svojstva. Budući da posjeduje i antifungalna svojstva, koristi se kod prhuti, seboreičnog dermatitisa, akni i dr. U farmaceutskoj industriji se koristi za izradu acetilsalicilne kiseline.

Sinapinska kiselina djeluje kao kelator metala te shodno tome pokazuje dobar protuučink kod trovanja arsenom. Uz to je pokazala dobar učinak na snižavanje razine glukoze u krvi (GUK).

Ružmarinska kiselina djeluje antiviralno, antitrombotski te antialergijski. Koristi se u liječenju peptičnog ulkusa, artritisa, katarakte i bronhalne astme. Smatra se da pozitivno djeluje na kognitivne funkcije i na prevenciju Alzheimerove bolesti. Inhibicijom lipooksigenaze i ciklooksigenaze postiže protuupalni učinak te se kao protuupalni lijek koristi lokalno (Goleniowski i sur., 2013).

1.5. AGREGACIJA TROMBOCITA I ANTIAGREGACIJSKI UČINAK

Hemostaza je jedan od preduvjeta za održavanje života. Ona podrazumijeva zaustavljanje gubitka krvi iz oštećenih krvnih žila na dva načina:

- adhezijom i aktivacijom trombocita (agregacija)
- stvaranjem fibrina putem koagulacijske kaskade

Rjeđe prisutni poremećaji hemostaze su oni kod kojih hemostazu treba pospješiti (hemofilija, hemoragije), dok su česti i terapijski značajni upravo poremećaji hemostaze kod kojih je koagulacija i stvaranje krvnog ugruška prekomjerno. Nastali ugrušak (tromb) predstavlja brojne rizike: izglednije nastajanje aterosklerotskog plaka koji otežava protok krvi ili u krajnjem slučaju potpuno začepljenje krvnih žila vitalnih organa novonastalim tromбом ili dijelom tromba koji se otkinuo. Na taj način smanjena je opskrba vitalnih organa kisikom i dolazi do ishemije koja nerijetko završava smrću.

Agregacija trombocita započinje njihovom adhezijom na endotel krvne žile preko koagulacijskih čimbenika i površinskih glikoproteina trombocita. Zatim slijedi promjena oblika trombocita iz glatkog u bodljikavi sa pseudopodijima, nakon čega se iz trombocitnih granula otpuštaju trombocitni agonisti (ADP, serotonin, koagulacijski i čimbenici rasta). Nakon toga dolazi do sinteze kratkoživućih medijatora čimbenika aktivacije trombocita i tromboksana A_2 . Agregacija potpomognuta kolagenom, trombinom, ADP-om i tromboksanom A_2 djeluje na specifične površinske receptore trombocita ($GP_{IIb/IIIa}$) koji vežu fibrinogen što u konačnici omogućuje povezivanje susjednih trombocita.

Na poremećaje hemostaze i trombozu lijekovi djeluju na 3 načina, zahvaćajući:

- koagulacijsku kaskadu (stvaranje fibrina)
- funkciju trombocita (agregaciju)
- uklanjanje novonastalog tromba (fibrinoliza/tromboliza)

Mehanizmi sprječavanja agregacije postojećih lijekova su: inhibicija ciklooksigenaze (COX-1) čime se smanjuje sinteza proagregacijskih molekula (tromboksan A_2 i ciklički endoperoksidi), inhibicija P2Y₁₂ receptora za ADP, antagonizam za $GP_{IIb/IIIa}$ receptore, inhibicija fosfodiesteraze te antagonizam PAR-1 receptora koji regulacijom gena pospješuju agregaciju (Rang i sur., 2006).

Antiagregacijski učinak flavonoida se ne može svesti na jedan mehanizam, već na više njih. Najpotentniji učinak je inhibicija prijanjanja trombocita povećanjem cikličkog AMP-a (cAMP) stimulacijom adenilat ciklaze ili inhibicijom cAMP fosfodiesteraze. Uz to, flavonoidi interferiraju u metabolizam arahidonske kiseline inhibirajući enzime ciklooksigenazu (COX-1) i lipooksigenazu (LOX). Na taj način onemogućuju stvaranje tromboksana A₂ koji ima značajnu ulogu u agregaciji. Dodatno, uz antiagregacijski učinak, flavonoidi uzrokuju vazodilataciju inhibicijom protein kinaze C, fosfodiesteraza te smanjenjem staničnog unosa kalcijevih iona (Cook i Samman, 1996).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Poremećaji prekomjernog zgrušavanja krvi su česti u sveopćoj populaciji. Posljedice neliječenja takvih stanja mogu biti: oštećenja krvožilnog sustava, ishemijske bolesti organa te naposljetku srčani i moždani udar.

Postojeća terapija, kao što je već navedeno, djeluje na agregaciju brojnim mehanizmima, no valja imati na umu da kod svake terapije sprečavanja agregacije postoji rizik od iskrvarenja. Biljni svijet, ma koliko god do sad bio istražen, i dalje skriva veliki terapijski potencijal kojeg treba neumorno istraživati i usmjeravati u korist čovjekovog zdravlja.

U ovom diplomskom radu, namjera je ispitivanje antiagregacijskog učinka fenolnih spojeva u odabranim biljnim vrstama porodice Lamiaceae.

Kvantitativnom analizom flavonoida i fenolnih kiselina te metodom impedancijske agregometrije želi se kvantificirati učinak biljnih ekstrakata na agregaciju krvi, što će u konačnici pokazati antiagregacijski potencijal biljaka i dati uvid u njihove terapijske mogućnosti.

3. MATERIJALI I METODE

Ovo istraživanje odobreno je od strane Etičkog povjerenstva Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom u sklopu doktorske disertacije mag. pharm. Andree Antolić, univ. mag. pharm.. U ovom istraživanju sudjelovalo je ukupno 15 dobrovoljaca. Svi dobrovoljci su potpisali informirani pristanak.

3.1. BILJNI MATERIJALI

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su usitnjeni i osušeni nadzemni dijelovi biljnih vrsta:

- *Calamintha nepeta* (L.) Savi, skupljena 8.6.2017. u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta
- *Lavandula angustifolia* Mill., skupljena 9.6.2017. u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta
- *Lavandula angustifolia* Mill., skupljena 25.6.2017. u Orebiću na poluotoku Pelješcu
- *Lavandula sp.* Mill., križanac, skupljen 25.6.2017. u Orebiću na poluotoku Pelješcu
- *Ocimum basilicum* L., skupljen 14.7.2017. u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta (Slika 15.).



Slika 15. Biljni materijali korišteni u ovom radu

3.2. APARATURA I KEMIKALIJE

Za spektrofotometrijsko određivanje sadržaja flavonoida i fenolnih kiselina upotrijebljen je UV-VIS spektrofotometar Varian Cary 50 Bio (proizvod tvrtke Varian Inc., SAD) Zavoda za farmaceutsku kemiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Hrvatska.

Za određivanje količine flavonoida korištene su sljedeće kemikalije:

- aceton,
- 25%-tna kloridna kiselina,
- 0,5%-tna vodena otopina heksametilentetramina,
- etilacetat,
- 0,5%-tna vodena otopina natrijevog citrata,
- otopina aluminijevog klorida ($2\text{g AlCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ otopi se u 100 mL 5%-tne metanolne otopine octene kiseline),
- 5%-tna metanolna otopina octene kiseline,
- destilirana voda.

Za kvantitativnu analizu fenolnih kiselina upotrijebljeni su:

- 50%-tni etanol,
- $0,5 \text{ mol/dm}^3$ kloridna kiselina,
- otopina natrijevog nitrita s natrijevim molibdatom (10 g NaNO_2 i 10 g $\text{NaMoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ otopi se u 100 mL vode),
- otopina natrij hidroksida (8,5 g NaOH otopi se i dopuni vodom do 100 mL),
- destilirana voda.

Određivanje agregacije provedeno je mjerenjem impendancije u kivetama s dvostrukim parom srebrnih elektroda na Multiplate[®] uređaju (proizvod tvrtke F. Hoffmann-La Roche Ltd, Švicarska) Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu, Zagreb, Hrvatska (Slika 16.).

Za određivanje agregacije trombocita korišteni su:

- 100 µg/mL kolagen kao induktor agregacije (COLtest) (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Švicarska),
- fiziološka otopina natrijeva klorida (0,9% NaCl) (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska),
- fiziološka otopina s kalcijevim kloridom (0,003 M CaCl₂ u 0,9%-tnom NaCl) (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska).



Slika 16. Multiplate[®] uređaj za praćenje agregacije trombocita.

3.3. PRIPREMA RADNIH OTOPINA

Radne otopine flavonoida, odnosno flavonoidni ekstrakti korišteni za mjerene antiagregacijskog učinka priređeni su tako da se 0,3 g biljnog materijala ekstrahira s 20 mL acetona, 2 mL 25%-tne kloridne kiseline i 1 mL 0,5 %-tne vodene otopine heksametilentetramina zagrijavanjem do vrenja 30 minuta na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Dobiveni hidrolizat se zatim propušta kroz pamuk u odmjernu tikvicu, a ostaci biljnog materijala na pamuku ponovno se ekstrahiraju s 20 mL acetona grijanjem do vrenja 10 minuta. Nadalje, otopina se propušta kroz pamuk u odmjernu tikvicu te se ekstrakcija acetonom ponavlja još jedanput. Sjedinjeni filtrati razrjeđuju se acetonom do 100,0 mL. 50,0 mL acetonskog ekstrakta flavonoida precizno se prenese u okruglu tikvicu i upari do suha na vakuumskom uparivaču Rotavapor R-200 (Buchi, Švicarska) Zavoda za farmaceutsku kemiju

Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Uparenom ostatku, doda se 5 mL dimetilsulfoksida (DMSO; Sigma-Aldrich, Švicarska) te se u istom otapalu pripremi koncentracijski niz razrijeđenih otopina. Korišten je koncentracijski raspon od 10^{-1} do 10^{-5} (od 10 do 100 000 puta) za daljnja ispitivanja impedacijskom agregometrijom.

3.4. UZORCI KRVI

Puna krv zdravih dobrovoljaca izvađena venepunkcijom i skupljena u vakuum epruvete od 4,5 mL s citratnim antikoagulansom (Vacutainer BD, SAD) je korištena u ispitivanju antiagregacijskog učinka flavonoida. Dobrovoljci nisu uzimali lijekove koji bi utjecali na agregaciju trombocita najmanje sedam dana prije davanja uzorka krvi.

3.5. METODE ISTRAŽIVANJA

3.5.1. Identifikacija biljnog materijala

Identitet istraživane biljne vrste potvrđen je ispitivanjem vanjske i unutarnje građe skupljenih uzoraka (Domac, 2002).

3.5.2. Određivanje količine flavonoida

0,3 g biljnog materijala ekstrahira se s 20 mL acetona, 2 mL 25%-tne kloridne kiseline i 1 mL 0,5%-tne vodene otopine heksametilentetramina zagrijavanjem do vrenja 30 minuta na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Hidrolizat se propušta kroz pamuk u odmjernu tikvicu, a ostaci biljnog materijala na pamuku ponovno se ekstrahiraju s 20 mL acetona grijanjem do vrenja 10 minuta. Otopina se propušta kroz pamuk u odmjernu tikvicu te se ekstrakcija acetonom ponavlja još jedanput. Sjedinjeni filtrati razrjeđuju se acetonom do 100,0 mL. 20 mL hidrolizata pomiješa se s 20 mL vode i ekstrahira jednom s 15, mL te još tri puta s po 10 mL etilacetata. Sjedinjene etilacetatne faze ispiru se dva puta s 40 mL vode i propuštaju kroz pamuk. Razrjeđuju se etilacetatom do 50,0 mL. Po 10 mL ove otopine prenese se u četiri odmjerne tikvice od 25,0 mL. U sve četiri tikvice dodaje se 0,5 mL 0,5%-tne vodene otopine natrijevog citrata. U tri tikvice dodaje se 2 mL otopine AlCl_3 , a zatim se sve tikvice nadopunjuju do oznake 5%-tnom metanolnom otopinom octene kiseline. Nakon 45 minuta izmjerena je apsorbancija otopine s aluminijskim kloridom u sloju debljine 1 cm kod 425 nm u odnosu na otopinu bez aluminijskog klorida (Christ i Müller, 1960).

Ukupna količina flavonoida izračuna se kao kvercetin prema izrazu:

$$\% \text{ flavonoida} = \frac{A \times 0,772}{b}$$

gdje je A = apsorbancija; b = odvaga biljnog materijala (g).

3.5.3. Određivanje količine fenolnih kiselina

Sadržaj fenolnih kiselina određen je prema postupku iz Europske farmakopeje (Ph. Eur. 1990).

0,1 g usitnjenog biljnog materijala ekstrahira se sa 190 mL 50%-tnog etanola na vodenoj kupelji uz povratno hladilo tijekom 30 minuta. Hladni se ekstrakt filtrira u odmjernu tikvicu od 100,0 mL, filter papir se ispere s 5 mL etanola, a tikvica dopuni etanolom do oznake. U tri odmjerne tikvice od 10,0 mL stavi se po 1 mL etanolnog ekstrakta, 2 mL kloridne kiseline (0,5 mol/dm³), 2 mL otopine natrijevog nitrita s natrijevim molibdatom i 2 mL otopine natrijevog hidroksida. Tikvice se nadopune vodom do oznake pa se izmjeri apsorbancija na 505 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba se pripremi tako da se u odmjernu tikvicu od 10,0 mL stavi 1 mL etanolnog ekstrakta, 2 mL kloridne kiseline (0,5 mol/dm³) i 2,0 mL otopine natrijevog hidroksida te se nadopuni vodom do oznake.

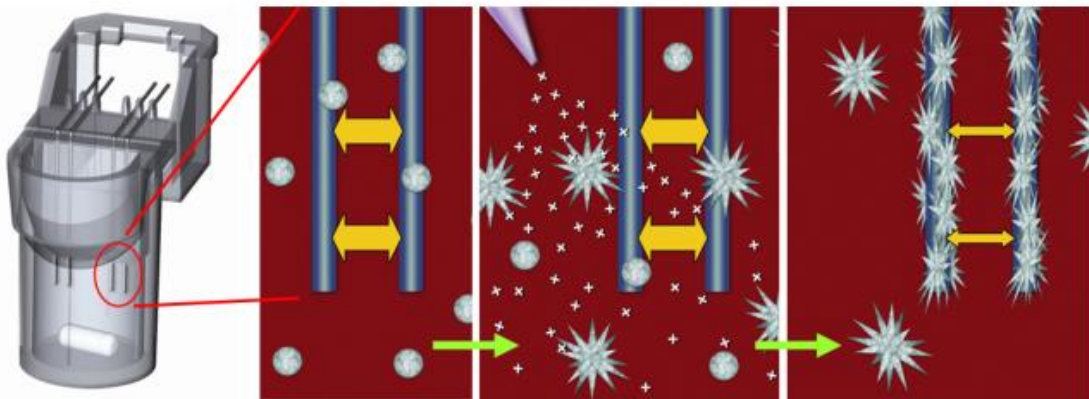
Sadržaj fenolnih kiselina izračuna se prema formuli:

$$\% \text{ fenolnih kiselina} = \frac{A \times 5}{m}$$

gdje je A = apsorbancija; m = masa biljnog materijala (g).

3.5.4. Impedancijska agregometrija

Određivanje agregacije trombocita provodi se impedancijskom metodom u punoj krvi. Mjeri se u kiveti s dva nezavisna para elektroda što osigurava kvalitetu mjerenja. Impedancijska agregometrija se zasniva na činjenici da trombociti u mirovanju nemaju sklonost stvaranja ugruška, no ukoliko dođe do aktivacije, trombociti se pričvršćuju u fiziološkim uvjetima na krvnu žilu, a u laboratorijskom testu na umjetnu površinu, odnosno elektrodu. Pri tome jača električni otpor koji se snima, a rezultat se iskazuje kao površina ispod krivulje (slika 17.).



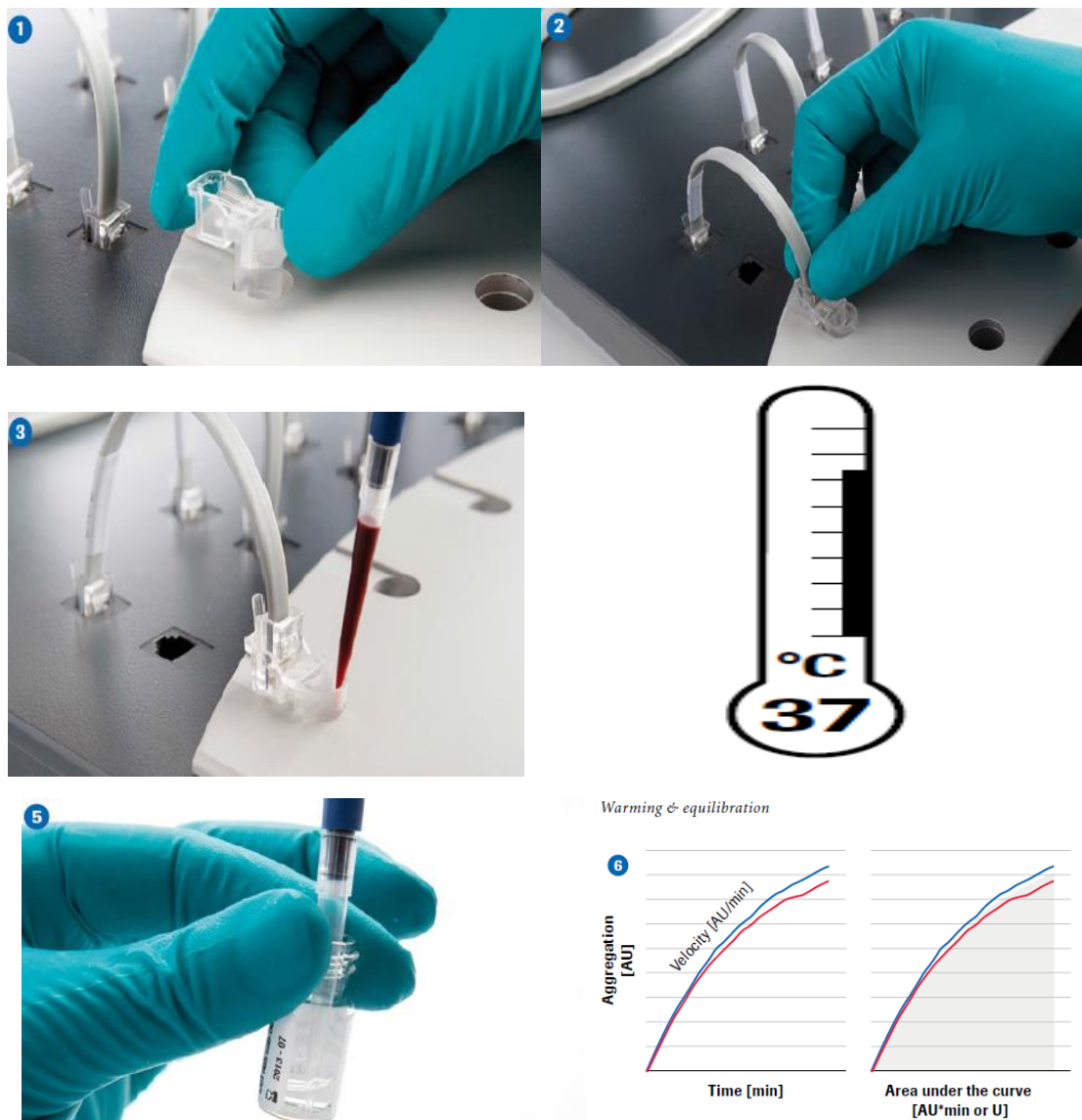
Slika 17. Princip impedancijske agregometrije

Prednost metode su brzina i jednostavnost. Kako nije potrebna dodatna obrada krvi, ne dolazi do promjene staničnog okruženja te se provjerava funkcija trombocita u fiziološkim uvjetima. Metoda se može provoditi s različitim induktorima agregacije (ADP, kolagen, ristocetin, TRAP-6, arahidonska kiselina) uz upotrebu malih volumena krvi (Paniccia i sur., 2015; Calatzis, 2007).

3.5.5. Određivanje statistički značajne antiagregacijske koncentracije

Provedba testa agregacije trombocita

Mjerenje agregacije trombocita provedeno je na Multiplate® uređaju. Korišten je generički postupak proizvođača instrumenta: 300 µL krvi inkubira se tijekom 3 minute s 20 µL ekstrakta i 300 µL fiziološke otopine s CaCl₂ na temperaturi od 37 °C. Kao negativna kontrola, umjesto ekstrakta korišteno je samo otapalo – DMSO konačne koncentracije 3%. Agregacijska kaskada potaknuta je dodatkom 20 µL reagensa koji sadrži induktor agregacije ADP. Agregacija je mjerena kroz 6 minuta i izražena kao površina ispod krivulje u arbitrarnim jedinicama (AU) (Slika 18.).



Slika 18. Provedba agregacijskog testa. 1 – postavljanje kiveta s magnetskim mješačem u inkubacijski blok Multiplate® analizatora, 2 – spajanje mjernih elektroda na instrument, 3 – dodavanje krvi i reagensa, 4 – inkubacija na 37 °C, 5 – inicijacija agregacije dodatkom induktora, 6 – iskazivanje rezultata kao površina ispod krivulje

Postupak određivanja statistički značajne antiagregacijske koncentracije

Mjeri se agregacija kontrolnog uzorka bez dodatka ekstrakta (AUC_0) i koncentracijskog niza ekstrakata (AUC) na dvije elektrode. Najmanje razrjeđenje, koje pokazuje razliku agregacije u odnosu na kontrolni uzorak veću od 5%, uzima se kao statistički značajna antiagregacijska koncentracija. Ukoliko ni kod jednog razrjeđenja ne postoji statistički značajna razlika, smatra se da flavonoidni ekstrakt ne pokazuje antiagregacijsko djelovanje. Statistička analiza provedena je primjenom Studentova t -testa (Bojić i sur., 2011).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. REZULTATI KVANTITATIVNE ANALIZE FLAVONOIDA I FENOLNIH KISELINA

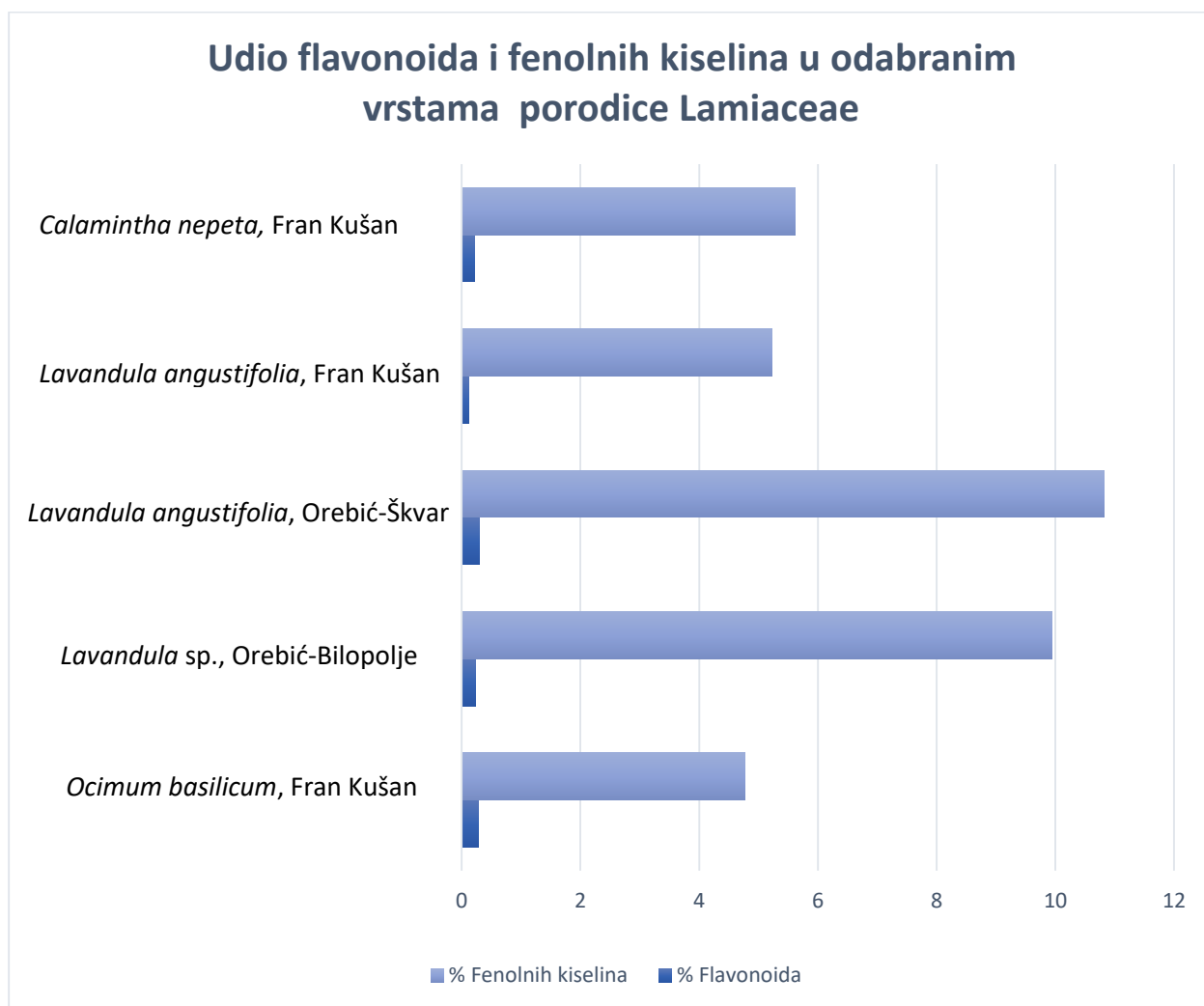
Količina flavonoida i fenolnih kiselina u svim uzorcima određena je 3 puta, a iz dobivenih rezultata izračunate su srednje vrijednosti i standardne devijacije (Tablica 2.),

Tablica 2. Udio (%) flavonoida i fenolnih kiselina u biljnim vrstama porodice Lamiaceae

Biljka, nalazište i datum skupljanja	$w_{flavonoida}(\% \pm SD, n = 3)$	$w_{fenolnih\ kiselina}(\% \pm SD, n = 3)$
<i>Calamintha nepeta</i> ("Fran Kušan", 8.6. 2017.)	0,22 ± 0,00	5,62 ± 0,21
<i>Lavandula angustifolia</i> ("Fran Kušan", 9.6. 2017.)	0,12 ± 0,00	5,22 ± 0,53
<i>Lavandula angustifolia</i> ("Orebić, Škvar", 25.6.2017.)	0,30 ± 0,01	10,82 ± 0,48
<i>Lavandula sp.</i> (križanac, "Orebić, Dugopolje", 25.6.2017.)	0,24 ± 0,00	9,95 ± 1,22
<i>Ocimum basilicum</i> ("Fran Kušan", 14.7. 2017.)	0,28 ± 0,00	4,78 ± 0,15

Udio flavonoida u istraživanim vrstama kretao se od 0,12% do 0,30%. Najveći udio flavonoida je zapažen kod vrste *L. angustifolia* skupljene u Orebiću na mjestu Škvar, dok je najmanja količina zapažena kod iste vrste skupljene u Farmaceutskom botaničkom vrtu Fran Kušan.

Udio fenolnih kiselina u istraživanim vrstama kretao se od 4,78% do 10,82%. Najveći udio fenolnih kiselina zapažen je kod vrste *L. angustifolia* skupljene u Orebiću na mjestu Škvar, dok je najmanji udio zapažen kod vrste *O. basilicum* skupljene u Farmaceutskom botaničkom vrtu Fran Kušan (Slika 19.)



Slika 19. Grafički prikaz kvantitativne analize flavonoida i fenolnih kiselina u odabranim vrstama porodice Lamiaceae

4.2. REZULTATI ISPITIVANJA ANTIAGREGACIJSKOG UČINKA BILJNIH EKSTRAKATA

Antiagregacijski učinak je mjereno metodom impedancijske agregometrije na pripadajućoj seriji razrijeđenja pojedinih flavonoidnih ekstrakata odabranih biljnih vrsta porodice Lamiaceae: *C. nepeta*, *L. angustifolia* te *O. basilicum* (Tablica 3.).

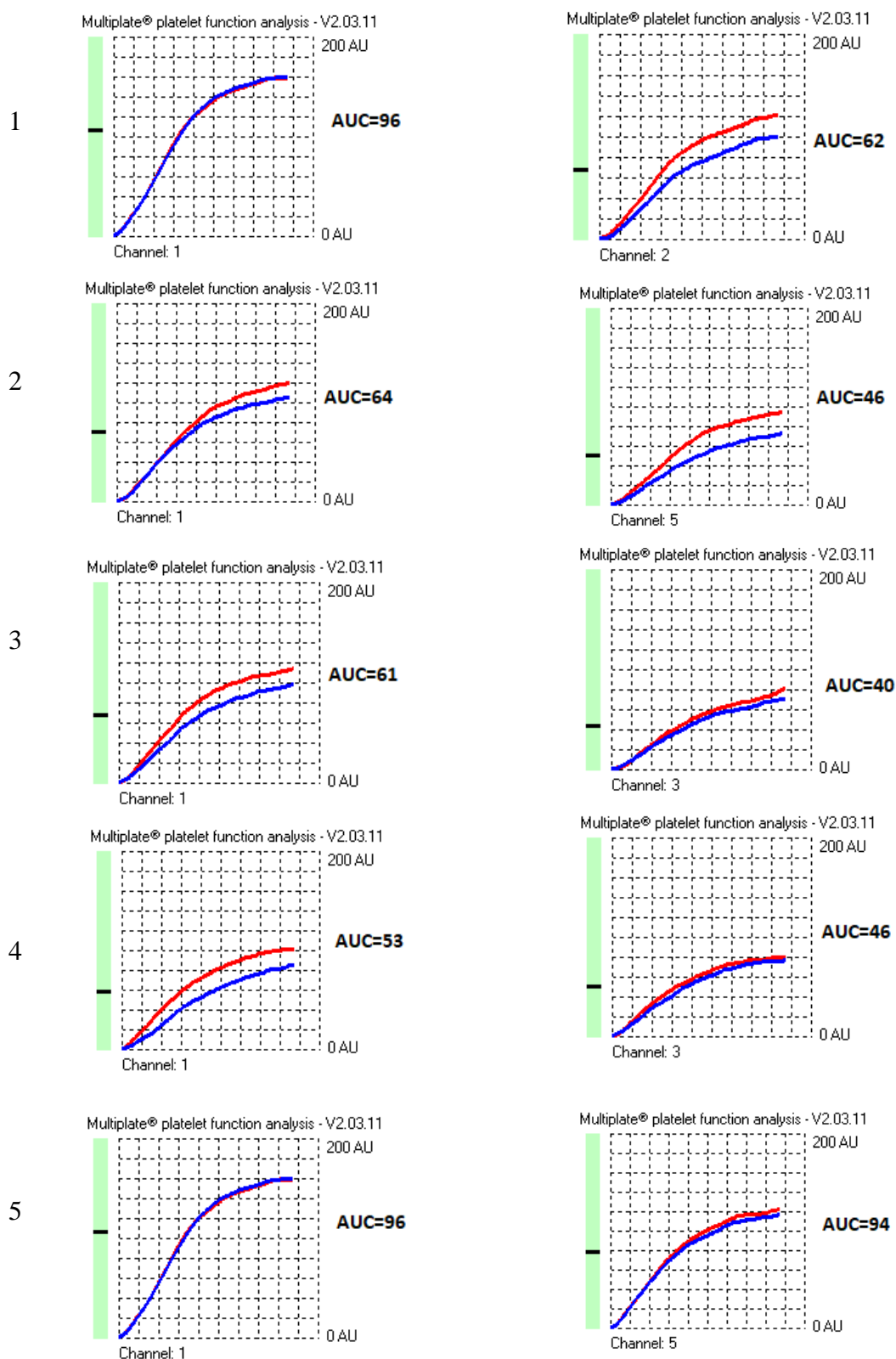
Tablica 3. Prikaz statistički značajne antiagregacijske koncentracije u odabranim biljnim vrstama porodice Lamiaceae

Biljka, nalazište i datum skupljanja	Statistički značajna antiagregacijska koncentracija ($\mu\text{mol/L}$)	p^*
<i>Calamintha nepeta</i> ("Fran Kušan", 8.6. 2017.)	2,07	0,0001
<i>Lavandula angustifolia</i> ("Fran Kušan", 9.6. 2017.)	2,07	0,0081
<i>Lavandula angustifolia</i> ("Orebić, Škvar", 25.6.2017.)	20,68	0,0031
<i>Lavandula</i> sp. (križanac, "Orebić, Dugopolje", 25.6.2017.)	206,79	0,0124
<i>Ocimum basilicum</i> ("Fran Kušan", 14.7. 2017.)	0,02	0,0445

* Rezultati ispitivanja su statistički obrađeni Studentovim t -testom. Kao statistički značajna antiagregacijska koncentracija odabrana je najmanja koncentracija flavonoidnog uzorka za koju je Studentov t -test pokazao p vrijednost manju od 0,05, što znači da se agregacija kod te koncentracija flavonoida statistički razlikuje od agregacije kontrole

KONTROLE BEZ UZORKA

UZORCI



Slika 20. Grafički prikaz agregacije: kontrole bez uzorka i flavonoidnog uzorka pojedine biljne vrste. 1- *C. nepeta*, "Fran Kušan", 2- *L. angustifolia*, "Fran Kušan", 3- *L. angustifolia*, "Orebić", 4- *Lavandula sp. (križanac)*, "Orebić", 5- *O. basilicum*, "Fran Kušan"

Grafički prikaz (Slika 20.) pokazuje učinak agregacije (vertikalna os) u ovisnosti o vremenu (horizontalna os). Uz agregaciju svakog biljnog ekstrakta mjerena je i agregacija kontrole bez uzorka.

AUC je vrijednost površine ispod krivulje agregacije čija je jedinica arbitrarno određena (AU = *arbitrary unit*). Ta vrijednost označava stupanj agregacije, što implicira da vrijednosti flavonoidnih uzoraka s pretpostavljenim antiagregacijskim učinkom imaju manje vrijednosti AUC u odnosu na njihove kontrole.

Antiagregacijski učinak je u konačnici definiran statistički značajnom antiagregacijskom koncentracijom. Rezultati ispitivanja su se kretali od 0,02 do 206,79 $\mu\text{mol/L}$.

Najznačajniju antiagregaciju, pokazao je uzorak flavonoidnog ekstrakta bosiljka (*O. basilicum*) s pripadajućom vrijednosti statistički značajne antiagregacijske koncentracije od 0,02 $\mu\text{mol/L}$, dok je najmanje antiagregacijski potentan uzorak bio flavonoidni ekstrakt križanca lavande (*Lavandula* sp.) uz pripadajuću vrijednost statistički značajne antiagregacijske koncentracije u iznosu od 206,79 $\mu\text{mol/L}$.

5. ZAKLJUČCI

Biljni lijekovi te pripravci i dodaci prehrani na biljnoj bazi danas predstavljaju velik interes među svekolikom populacijom koja objeručke prihvaća ono "biljno", "na biljnoj bazi" i "bez umjetnih i sintetiziranih molekula". Veliki prodor takvih lijekova i pripravaka na tržište stavlja farmaceuta pred ozbiljan zadatak i daje mu odgovornost, jer je on jedan od rijetkih stručnjaka, ako ne i jedini, koji u potpunosti razumije učinak prirodnih i sintetiziranih supstancija na ljudski organizam. Budući da same biljke i njeni pripravci mogu značiti i veliku opasnost za čovjekovo zdravlje, javlja se potreba za konstatnim istraživanjem i preispitivanjem istih.

U ovom radu se upravo pridonijelo upotpunjavanju znanja o biljnim sastavnicama, konkretno o fenolnim spojevima s naglaskom na antiagregacijski učinak flavonoida.

Što se tiče same kvantitativne analize fenolnih spojeva, ovaj rad potvrđuje činjenicu o sveprisutnosti flavonoida i fenolnih kiselina u biljkama te daje na znanje da se ta količina razlikuje ovisno o biljnoj vrsti, ali i o geografskom području na kojem je biljni uzorak skupljen.

Antiagregacijska svojstva pokazuju veliku varijabilnost među vrstama što se lako da zaključiti iz obrađenih rezultata gdje je antiagregacijski učinak najpotentnijeg uzorka (*O. basilicum*) čak 10000 puta veći od uzorka koji je pokazao najslabiji antiagregacijski učinak (*Lavandula sp.*, križanac). Također valja naglasiti da udio fenolnih spojeva u uzorku ne korelira izravno s njegovim antiagregacijskim učinkom. Tako na primjer, uzorak (*L. angustifolia* "Fran Kušan") pokazuje 100 puta jači antiagregacijski učinak od uzorka (*Lavandula sp.*, križanac), a ima dvostruko manji udio fenolnih spojeva.

Iz svega navedenog može se zaključiti da antiagregacijski potencijal ne ovisi samo o količini fenolnih spojeva, konkretnije flavonoida, već i o vrsti fenolnog spoja koji je u biljci prisutan. Budući da vrste fenolnih spojeva nisu identificirane u ovom radu, on može biti podloga za one radove koji će nastaviti istraživanja u tom smjeru i u konačnici definirati, izolirati i standardizirati fenolne spojeve, između kojih će biti odabrani oni terapijski najučinkovitiji i najprihvatljiviji.

6. LITERATURA

Araniti F, Lupini A, Mercati F, Statti GA, Abenavoli MR. *Calamintha nepeta* L. (Savi) as source of phytotoxic compounds: bio-guided fractionation in identifying biological active molecules. *Acta Physiol Plant*, 2013, 35, 1979-1988.

Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*, 2006, 99, 191-203.

Bojić M, Debeljak T, Tomičić M, Medić-Šarić M, Tomić S. Evaluation of antiaggregatory activity of flavonoid aglycone series. *J Nutr*, 2011, 10, 73-81.

Božović M, Ragno R. *Calamintha nepeta* (L.) Savi and its main essential oil constituent pulegone: biological activities and chemistry. *Molecules*, 2017, 22, 290.

Calatzis A, Loreth RM, Spannagl M. Multiplate® platelet function analysis – application and interpretation. Munich: Dynabyte GmbH, 2007.

Christ B, Müller KH. Zur serienmäßigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol Derivaten in Drogen. *Arch Pharm*, 1960, 293, 1033-1042.

Cook NC, Samman S. Flavonoids- Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J Nutr Biochem*, 1996, 7, 66-76.

Domac R. Flora Hrvatske - Priručnik za određivanje bilja, II izdanje. Zagreb, Školska knjiga, 2002, str. 286.

Evandri MG, Battinelli L, Daniele C, Mastrangelo S, Bolle P, Mazzanti G. The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay. *Food Chem Toxicol*, 2005, 43, 1381-1387.

Galle Toplak K. Domaće ljekovito bilje. Zagreb, Mozaik, 2016, str. 21, 144, 145.

Goleniowski M, Bonfill M, Cusido R, Palazón J. Phenolic acids. U: Natural products. Ramawat KG, Mérillon JM, urednici, Berlin Heidelberg Springer-Verlag, 2013, str. 1951-1973.

Grlić Lj. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, drugo izdanje. Zagreb, August Cesarec, 1990, str. 263, 269, 280.

Gursky Z. Zlatna knjiga ljekovitog bilja. Zagreb, Matica hrvatska, 1978, str. 80-81, 313.

Hussain AI, Farooq A, Hussain Sherazi ST, Przybylski R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chem*, 2008, 108, 986-995.

Kovačević N. Osnovi farmakognozijske. Beograd, Srpska školska knjiga, 2004, str. 126-128., 146-151.

Kuštrak D. Farmakognozija fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing-Tehnička knjiga, 2005, str. 289-291.

Lien-Chai C, Lean-Teik N, Pei-Win C, Win C, Chun-Ching L. Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum* L. *Clin Exp Pharmacol P*, 2005, 32, 811-816.

Maeda H, Dudareva N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2012, 63, 73-105.

Maleš Ž. Strukturna karakterizacija izoliranih flavonoida drače - *Paliurus spinachristi* Mill. Doktorska disertacija. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 1995, str. 21-23.

Marković S. Fitoaromaterapija. Zagreb, Centar Cedrus, 2005, str. 258, 259, 260, 290, 291.

Mastelić J, Miloš M, Kuštrak D, Radonić A. The essential oil and glycosidically bound volatile compounds of *Calamintha nepeta* (L.) Savi. *Croat Chem Acta*, 1998, 71, 147-154.

Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PAM. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 2001, 74, 418-425.

Pahlow M. Velika knjiga ljekovitog bilja. Ljubljana-Zagreb, Cankarijeva založba, 1989, str. 65, 66.

Paniccia R, Priora R, Alessandrello Liotta A, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vascular Health Risk Management*, 2015, 11, str. 133-148.

Politeo O, Jukić M, Miloš M. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chem*, 2006, 101, 379-385.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmakologija. Zagreb, Golden marketing-Tehnička knjiga, 2006, str. 314-326.

Sékou MK, Vincent C, Schmit JP, Arnason JT, Bélanger A. Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) [Coleoptera: Bruchidae]. *J Stored Prod Res*, 2001, 37, 339-349.

Slika bosiljka, 2009.,

<http://www.starrenvironmental.com/images/image/?q=24588096799>, pristupljeno 4. 2. 2018.

Slika gorske metvice, 2015.,

<http://hirc.botanic.hr/fcd/Galerija/ShowResults.aspx?hash=765837458>, pristupljeno 4. 2. 2018.

Slika lavande, 2010., <http://hirc.botanic.hr/fcd/Galerija/Slika.aspx?IdPicture=14527>, pristupljeno 4. 2. 2018.

Sroka Z, Cisowski W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem Toxicol*, 2003, 41, 753-758.

Steinegger E, Hänsel R. *Pharmakognosie. 5 Auflage.* Berlin-Heidelberg-New York-London-Paris-Tokyo-Hong Kong-Barcelona-Budapest, Springer-Verlag, 1992, str. 372, 390.

The Lamiaceae or mint family, 2017., <http://www.theplantprofiler.com/lamiaceae-mint-family/>, pristupljeno 2. 2. 2018.

7. SAŽETAK

Ovo istraživanje provedeno je na odabranim biljnim vrstama porodice Lamiaceae: *Calamintha nepeta* (L.) Savi, *Lavandula angustifolia* Mill. te *Ocimum basilicum* L.

Biljke su skupljene u Farmaceutskom botaničkom vrtu "Fran Kušan" Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u Orebiću na poluotoku Pelješcu.

Sadržaj flavonoida i fenolnih kiselina određen je Uv-Vis spektrofotometrijskom metodom, dok je antiagregacijski učinak određen metodom impedancijske agregometrije.

Dobiveni rezultati pokazuju varijacije i u sastavu fenolnih spojeva i u antiagregacijskom učinku ovisno o biljnoj vrsti i geografskom nalazištu na kojem su biljke prikupljene.

Udio flavonoida u biljkama kretao se od 0,12% do 0,30%. Najveći udio flavonoida (0,30%) je zapažen kod vrste *L. angustifolia* ubrane u Orebiću na mjestu Škvar.

Udio fenolnih kiselina u biljkama kretao se od 4,78% do 10,82%. Najveći udio fenolnih kiselina također je zapažen kod vrste *L. angustifolia* ubrane u Orebiću na mjestu Škvar. Najpotentniji antiagregacijski učinak definiran statistički značajnom antiagregacijskom koncentracijom, pokazao je uzorak flavonoidnog ekstrakta bosiljka (*O. basilicum*) s pripadajućom vrijednosti statistički značajne antiagregacijske koncentracije od 0,02 $\mu\text{mol/L}$.

Budući da ne postoji direktna korelacija udjela fenolnih spojeva u biljkama s antiagregacijskim učinkom istih, pretpostavlja se da antiagregacijskom učinku prvenstveno pridonosi vrsta fenolnog spoja sadržanog u biljkama, a zatim njegov udio.

7. SUMMARY

This research was conducted to assess the effect of chosen plant species of Lamiaceae family: *Calamintha nepeta* (L.) Savi, *Lavandula angustifolia* Mill. and *Ocimum basilicum* L. on platelet aggregation.

Plants were collected in "Fran Kušan" Pharmaceutical botanical garden of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry of Zagreb University, and in Orebić on the Pelješac peninsula.

Quantities of flavonoids and phenolic acids were determined by UV-Vis spectrophotometric method, and anti-aggregation effect was determined by using impedance aggregometry.

Results obtained in this research show variations in both, amount of phenolic compounds and anti-aggregation effect, depended on plant species and geographic location where they were collected.

Amount of flavonoids in plants was between 0.12% and 0.30%. The highest content of flavonoids (0.30%) was measured in *L. angustifolia* species, collected in Orebić, Škvar.

Quantity of phenolic acids in plants was between 4.78% and 10.82%. The highest content of phenolic acids was also measured in *L. angustifolia* species, collected in Orebić, Škvar. The most potent anti-aggregation effect defined by statistically significant anti-aggregation concentration was determined in flavonoid basil extract (*O. basilicum*) with corresponding statistically significant anti-aggregation concentration value of 0.02 $\mu\text{mol/L}$.

As small number of plant species has been analysed, direct correlation between amount of phenolic compounds in plant species and anti-aggregation effect can't be defined, but it can be presumed that class of phenolic compound contributes to anti-aggregation more than the amount due to difference in potency of flavonoids and phenolic acids.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku botaniku
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Određivanje količine flavonoida i fenolnih kiselina te antiagregacijskog učinka u vrstama *Calamintha nepeta* L., *Lavandula angustifolia* L. i *Ocimum basilicum* L.

Marko Parlov

SAŽETAK

Ovo istraživanje provedeno je na odabranim biljnim vrstama porodice Lamiaceae: *Calamintha nepeta* (L.) Savi, *Lavandula angustifolia* Mill. te *Ocimum basilicum* L.

Biljke su skupljene u Farmaceutskom botaničkom vrtu "Fran Kušan" Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u Orebiću na poluotoku Pelješcu.

Sadržaj flavonoida i fenolnih kiselina određen je Uv-Vis spektrofotometrijskom metodom, dok je antiagregacijski učinak određen metodom impedancijske agregometrije.

Dobiveni rezultati pokazuju varijacije i u sastavu fenolnih spojeva i u antiagregacijskom učinku ovisno o biljnoj vrsti i geografskom nalazištu na kojem su biljke prikupljene.

Udio flavonoida u biljkama kretao se od 0,12% do 0,30%. Najveći udio flavonoida (0,30%) je zapažen kod vrste *L. angustifolia* ubrane u Orebiću na mjestu Škvar.

Udio fenolnih kiselina u biljkama kretao se od 4,78% do 10,82%. Najveći udio fenolnih kiselina također je zapažen kod vrste *L. angustifolia* ubrane u Orebiću na mjestu Škvar. Najpotentniji antiagregacijski učinak definiran statistički značajnom antiagregacijskom koncentracijom, pokazao je uzorak flavonoidnog ekstrakta bosiljka (*O. basilicum*) s pripadajućom vrijednosti statistički značajne antiagregacijske koncentracije od 0,02 $\mu\text{mol/L}$.

Budući da ne postoji direktna korelacija udjela fenolnih spojeva u biljkama s antiagregacijskim učinkom istih, pretpostavlja se da antiagregacijskom učinku prvenstveno pridonosi vrsta fenolnog spoja sadržanog u biljkama, a zatim njegov udio.

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

Rad sadrži: 56 stranica, 20 grafičkih prikaza, 3 tablice i 33 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: flavonoidi, fenolne kiseline, spektrofotometrija, antiagregacija, *O. basilicum*, *L. angustifolia*, *C. nepeta*

Mentor: **Dr. sc. Željko Maleš**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Željko Maleš**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Biljana Nigović, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Mirza Bojić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: svibanj 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Botany
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids and determination of anti-aggregation effect in species *Calamintha nepeta* L., *Lavandula angustifolia* L. and *Ocimum basilicum* L.

Marko Parlov

SUMMARY

This research was conducted to assess the effect of chosen plant species of Lamiaceae family: *Calamintha nepeta* (L.) Savi, *Lavandula angustifolia* Mill. and *Ocimum basilicum* L. on platelet aggregation.

Plants were collected in "Fran Kušan" Pharmaceutical botanical garden of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry of Zagreb University, and in Orebić on the Pelješac peninsula.

Quantities of flavonoids and phenolic acids were determined by UV-Vis spectrophotometric method, and anti-aggregation effect was determined by using impedance aggregometry.

Results obtained in this research show variations in both, amount of phenolic compounds and anti-aggregation effect, depended on plant species and geographic location where they were collected.

Amount of flavonoids in plants was between 0.12% and 0.30 %. The highest content of flavonoids (0.30%) was measured in *L. angustifolia* species, collected in Orebić, Škvar. Quantity of phenolic acids in plants was between 4.78% and 10.8%. The highest content of phenolic acids was also measured in *L. angustifolia* species, collected in Orebić, Škvar. The most potent anti-aggregation effect defined by statistically significant anti-aggregation concentration was determined in flavonoid basil extract (*O. basilicum*) with corresponding statistically significant anti-aggregation concentration value of 0.02 $\mu\text{mol/L}$.

As small number of plant species has been analysed, direct correlation between amount of phenolic compounds in plant species and anti-aggregation effect can't be defined, but it can be presumed that class of phenolic compound contributes to anti-aggregation more than the amount due to difference in potency of flavonoids and phenolic acids.

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

Thesis includes: 56 pages, 20 figures, 3 tables and 33 references. Original is in Croatian language.

Keywords: flavonoids, phenolic acids, spectrophotometry, anti-aggregation effect, *O. basilicum*, *L. angustifolia*, *C. nepeta*

Mentor: **Željko Maleš, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Željko Maleš, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Biljana Nigović, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Mirza Bojić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2018.

