

# Određivanje sadržaja arbutina i trjeslovina u listu brusnice, *Vaccinium vitis idaea* L.

---

Radman, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:035724>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



**Iva Radman**

**Određivanje sadržaja arbutina i trjeslovina u  
listu brusnice, *Vaccinium vitis-idaea* L.**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmakognozija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Maje Bival Štefan.

## Sadržaj

<b>1.UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Osnovne karakteristike brusnice .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Antioksidativno djelovanje .....	2
1.1.2. Antitumorsko djelovanje .....	3
1.1.3 Utjecaj na tjelesnu težinu.....	5
1.1.4. Utjecaj na razinu glukoze u krvi.....	6
1.1.5. Kardiovaskularno zaštitno djelovanje .....	6
1.1.6. Ostala djelovanja .....	7
1.1.7. Utjecaj na infekcije urinarnog trakta .....	8
<b>1.2. Bioaktivne sastavnice lista brusnice .....</b>	<b>9</b>
1.2.1. Arbutin.....	9
1.2.2.Trjeslovine .....	11
<b>1.3. Usporedba brusnice, američke brusnice i medvjjetke .....</b>	<b>13</b>
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME .....</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1. Uzorci.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2. Aparatura i kemikalije.....</b>	<b>16</b>
<b>3.3. Metode .....</b>	<b>17</b>
3.3.1. Spektrofotometrijsko određivanje derivata hidrokinona .....	17
3.3.2. Određivanje arbutina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti .....	18
3.3.3. Spektrofotometrijsko određivanje trjeslovina .....	19
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1. Rezultati .....</b>	<b>21</b>
4.1.1 Arbutin određen UV-Vis spektrofotometrijom .....	21
4.1.2. Arbutin određen tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.....	22
4.1.3. Trjeslovine određene UV-Vis spektrofotometrijom.....	23
<b>4.2. Rasprava .....</b>	<b>23</b>
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>26</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>27</b>

**7. SAŽETAK..... 36**

**8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION  
CARD**

# 1.UVOD

## 1.1. Osnovne karakteristike brusnice

Brusnica (*Vaccinium vitis-idaea*) je višegodišnji zimzeleni patuljasti grm. Spada u porodicu *Ericaceae* i u rod *Vaccinium* koji sadržava otprilike 150 različitih vrsta kao što su europske borovnice, sjevernoameričke borovnice, američke brusnice i dr. Kultivirane su sjevernoameričke borovnice, američke brusnice i brusnice iako se brusnice većinom skupljaju kao divlje (Padmanabhan i sur., 2016). Brusnice u prosjeku dosegnu visinu od 30 cm. Stabljika je uspravna, rijetko razgranata, drvenasta i dlakava. Listovi su naizmjenični, ovalni i obrnuto jajoliki, kratke peteljke, dugi 0.9 – 2.5 cm, kožasti i na vrhu su često zarežani. Lice lista je sjajno i tamno zeleno dok je naličje svijetlozelene boje i ima crne ili smeđe žlijezde koje izgledaju kao točkice. Rubovi su nazubljeni i pilasti, a nervatura se jasno očituje. Cvjetovi su sitni i zvonasti, bijele do ružičaste boje. Latice su pri dnu spojene, duge 5 – 8 mm i ima ih 4 u vjenčiću. Čaška se sastoji od 4 lapa. Jedan tučak je izbočen iz cvijeta, a prašnika ima 4 ili 8. Cvat je grozdasti. Cvatnja se događa u svibnju i lipnju, a sjeme dozrijeva od kolovoza do listopada. Plod je tamno crvene boje, okrugao, sjajan, sočan, jestiv i kiselog okusa ([www.luontoportti.com](http://www.luontoportti.com), [www.landscapeplants.oregonstate.edu](http://www.landscapeplants.oregonstate.edu)).



**Slika 1.** List i plod brusnice (preuzeto iz: [www.gardeningknowhow.com](http://www.gardeningknowhow.com))

Vrsta je hermafrodit, odnosno sadrži i muške i ženske spolne organe i oprašuju je pčele kojima je privlačna zbog velike količine nektara u cvjetovima. Najčešće raste na pjeskovitom tlu i ilovači te preferira kisela i vlažna tla. Pogodan pH za rast brusnice je 4.5 – 6. Raste i u sjenovitom i u osunčanom području s tim da na sunčanom području daje više plodova (Huxley, 1992). To je biljka koja lako izdržava hladnoću, ali ne može podnijeti toplinu. Komercijalno je kultivirana na području Europe, najviše u Skandinaviji i odnedavno u Sjedinjenim Američkim Državama. Države koje najviše izvoze brusnicu su Švedska, Finska i Ruska Federacija. Okus joj je opor, ali je jestiva nakon kuhanja ili nekog drugog načina pripreme (Padmanabhan i sur., 2016). Jedu se plodovi, a čaj se priprema od listova. Također se od plodova može praviti i sok koji se tradicionalno koristi grgljanjem kod upale grla (Moerman, 1998). U listovima je prisutan arbutin koji u većim količinama djeluje toksično pa se čaj ne smije koristiti kontinuirano. Najveći broj dosadašnjih istraživanja o medicinskim učincima na vrstama roda *Vaccinium* odnosio se na vrstu *Vaccinium macrocarpum* (američka brusnica) i *Vaccinium myrtillus* (europska borovnica) (Bujor i sur., 2018) koji za razliku od brusnice pripadaju podrodu *Oxycoccus* (Nowack i Schmitt, 2008), no u zadnje vrijeme sve se više istražuje i *Vaccinium vitis-idaea* (brusnica). Brusnica ne sadrži samo vlakna i minerale nego pripada i skupini voća koje je bogato antioksidansima kao što su vitamin C, A i E (tokoferol), a posebno polifenolima. Sadržava složeni sastav (poli)fenolnih spojeva koji primarno čine flavan-3-oli i pronatocijanidini, zajedno s flavanolima, flavonolima, fenolnim kiselinama i antocijaninima (Sari i sur., 2008). Najviše ima flavanola (5.8%), potom flavonola (2.9%), fenolnih kiselina (1.9%) i konačno 1.5% antocijanina. Posebnost ove vrste boba je da sadrži više fenolnih spojeva u listovima, nego u plodovima za razliku od ostalih vrsta roda *Vaccinium* (Manolescu i sur., 2019). Ona se zbog visokog sadržaja polifenolnih spojeva tradicionalno koristi za liječenje upalnih bolesti, rana, želučanih tegoba i reumatizma (Padmanabhan i sur., 2016). Istraživanja pokazuju i mnogo drugih različitih djelovanja koja bi mogla utjecati na zdravlje.

### **1.1.1. Antioksidativno djelovanje**

Brusnica zbog svog fitokemijskog sastava pokazuje visoki antioksidativni kapacitet (Zheng i Wang, 2003) i smanjuje ukupni oksidativni status za 25% na modelu štakora koji je imao prehranu koja potiče oksidativni stres (PPOS). Ta prehrana uključuje visoke razine masti i kolesterola. Brusnica korištena u kombinaciji s tom prehranom, povoljno djeluje na

antioksidativne enzime (superoksid dismutaza, glutation reduktaza i katalaza) povećavajući njihovu aktivnost u crvenim krvnim stanicama i jetri te sprječava pad razine glutationa u serumu, odnosno povećava razinu glutationa kod normalne prehrane. Osim toga, održava također i fiziološku razinu mokraćne kiseline kod PPOS koja se bi se kod takve prehrane povećala za 32% što sve potvrđuje sposobnost antioksidativnog djelovanja ekstrakta brusnice (5% proantocijanidina) u dozi od 23 mg/kg tjelesne težine (Mane i sur., 2011). Uzrok antioksidativnog djelovanja su brojni fenolni spojevi koji se nalaze u brusnici i to djelovanje je usporedivo s europskom borovnicom i američkom brusnicom (Grace i sur., 2014; Mane i sur., 2011) koje su se više istraživale zbog češće upotrebe u sokovima, džemovima i dodacima prehrani. Neke studije pokazuju da brusnica ima čak 4.5 puta više proantocijanidina od europske borovnice (Maatta Riihinen i sur., 2004). Upravo se zadnjih godina često istražuju biljne vrste koje sadrže fenolne spojeve koji imaju antioksidativno djelovanje kako bi se razvila funkcionalna hrana koja bi mogla pomoći u brojnim stanjima koja su obilježena oksidativnim stresom.

### **1.1.2. Antitumorsko djelovanje**

Epidemiološka istraživanja se slažu u tvrdnji da redovna konzumacija voća i povrća smanjuju rizik i učestalost nastanka karcinoma (Kris-Etherton i sur., 2002; Steinmetz i sur., 1996). Bobičasto voće i različiti spojevi koji su iz njega izolirani blokiraju metabolizam tumorskih stanica, eliminiraju ih i inhibiraju mutagenezu (Katsube i sur., 2003; Surh i sur., 2001). Bioaktivne sastavnice iz bobičastog voća mogu interferirati i sa signalnim putevima preko estrogenskih i tirozin-kinaznih receptora (Shi i sur., 2017). Osim navedenih mehanizama, za učinak na tumore posebno je zanimljivo voće koje sadrži spojeve s antioksidativnom aktivnošću, odnosno antioksidanse. Antioksidansi su molekule koje su sposobne inhibirati oksidaciju drugih molekula. Sposobni su inhibirati oksidaciju za organizam posebno opasnih reaktivnih kisikovih spojeva koje imaju potencijal da oštete neke stanične komponente kao što su DNA, bjelančevine i lipidi. Oksidativna oštećenja tih molekula u stanici mogu biti okidači koji će uzrokovati početne korake u razvoju tumora (Mates i Sanchez-Jimenez, 2000). Osim inhibicije oksidacije slobodnih radikala, antioksidansi mogu smanjiti rizik za nastanak tumora djelovanjem na ciklooksigenazu-2 ili inhibirajući ekspresiju onkogeno (Fosslien, 2000; Ranelletti i sur., 2000).



Smanjenje oksidativnog stresa u tumorskim stanicama moglo bi ponuditi objašnjenje za antikancerogeno djelovanje (poli)fenola mnogog bobičastog voća, među kojima brusnica pokazuje najjaču antiproliferativnu aktivnost (Fan, 2011). Proliferacija tumorskih stanica jedan je od najvažnijih dijelova tumorske progresije i promjene u regulaciji ključnih signalnih puteva koji kontroliraju proliferaciju kao i puteva koji kontroliraju apoptozu nužni su uvjeti za nastanak tumora i njegov razvoj (Evan i Vousden, 2001). Ekstrakt brusnice inhibira proliferaciju tumorskih stanica debelog crijeva HT-29, ali nije pokazana korelacija sa sadržajem antocijanidina i flavonoida (Olsson i sur., 2004). Drugi mehanizam kojim uzrokuje smrt tumorske stanice je apoptozom koja je dokazana na humanim stanicama s leukemijom HL-60 pri čemu je razina apoptoze neovisna o dozi (Wang i sur., 2005). Osim toga, ekstrakt brusnice koji je primijenjen na mišje epidermalne stanice JB6 P+ koje se koriste za proučavanje tumorske promocije (Hsu i sur., 2000), ovisno o dozi inhibirao je aktivaciju aktivatorskog proteina AP-1 i nuklearnog faktora  $\kappa$ B (Wang i sur., 2005) koji su transkripcijski faktori povezani s karcinogenezom (Bode i Dong, 2000). Ekstrakt brusnice blokira i TPA ili UVB induciranu MAPK aktivaciju s kojom je povezana aktivacija proteina AP-1 (Wang i sur., 2005). Enzim kinon-reduktazu u fazi 2 detoksifikacije ksenobiotika induciraju etil-acetatni ekstrakti brusnice dok je indukcija ornitin dekarboksilaze tumorskim promotorom forbol 12-miristat 13-acetatom inhibirana proantocijanidinskom frakcijom sirovog ekstrakta brusnice čime je in vitro pokazana potencijalna antikancerogena aktivnost (Bomser i sur., 1996). Antocijanini, proantocijanidini i elagna kiselina u brusnici značajno smanjuju učestalost intestinalnih tumora kod miševa. Oni također primjetno inhibiraju rast adenoma i akumulaciju nuklearnih  $\beta$ -katenina i ciklina D1 u mukozni (Misikangas i sur., 2007). Antocijanini prisutni u brusnici u najvećoj količini su cijanidin-3-O-sambubiozid, delfinidin-3-O-galaktozid i peonidin-3-O-galaktozid (Brown i sur., 2014; Ogawa i sur., 2014). Iako postoje brojne studije koje in vitro pokazuju antikancerogenu aktivnost fitokemikalija u bobičastom voću, većina studija je napravljena s koncentracijama aktivnih tvari koje nisu relevantne jer su mnogostruko veće od stvarne koncentracije u plazmi koja je određena bioraspoloživost, odnosno koja se dobije nakon apsorpcije i opsežnog metabolizma (Milbury, 2009).

Brusnica posjeduje i epigenetičke mehanizme kojima može utjecati na razvoj tumora. Epigenetika se definira kao nasljedna promjena u ekspresiji gena bez promjene u slijedu DNA (Wolffe and Matzke, 1999). Metilacija DNA, kovalentna modifikacija histona i promjena u miRNA ekspresiju su trenutno najpoznatiji epigenetski mehanizmi koji su uključeni u ekspresiju gena (Winter et al., 2009; Yoo and Jones, 2006). Promjene u tim putevima mogu

značajno doprinijeti razvoju karcinoma (Esteller, 2008). Pokazalo se da bi antocijanini iz bobičastog voća mogli utjecati na kemoprevenciju tumora. Brusnica kod miševa C57BL/6JBom Tac koji su imali prehranu bogatu mastima inducira hipermetilaciju korepresor 2 nuklearnog receptora (NCoR) koji kodira NCoR/utišavajući medijator za retinoid (SMRT – silencing mediator for retinoid) koji regulira metaboličku homeostazu i upalne putove. NCoR (poznat kao SMRT) uključen je u regulaciju lipida, upale i oksidativnog stresa čime utječe na karcinogenezu. Dolazi do smanjene STAT3, mTOR i NF-κB signalizacije, smanjuje se translokacija NF-κB u jezgru, smanjena je sinteza lipida zbog smanjene transkripcijske aktivnosti SREBP1c te je smanjena intestinalna apsorpcija lipida (Heyman-Linden i sur., 2016a). Bolje razumijevanje mehanizama kojima antocijanini iz bobičastog voća utječu na epigenetsku regulaciju olakšalo bi dizajn preliminarnih protokola u kojima bi se bobičasto voće koristilo kao kemopreventivni agens.

### 1.1.3 Utjecaj na tjelesnu težinu

Pretilost je kronični metabolički poremećaj i brzorastući globalni zdravstveni problem. Prema izvješću Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), preko 1.9 milijardi (39%) odraslih ljudi ima prekomjernu tjelesnu masu i 650 milijuna od njih je bilo pretilo u 2016. (www.who.int). Pretilost je povezana s nekoliko bolesti kao što su diabetes mellitus, kardiovaskularne bolesti i karcinomi te zbog toga predstavlja i veliki ekonomski teret za društvo (Mokdad i sur., 2003). Prema tome, upravljanje i smanjenje učestalosti pretilosti povećava interes istraživača. Tijekom zadnjih godina, utjecaj crijevne mikrobiote na pretilost postao je važna tema i pokazalo se da je to potencijalno učinkovita meta za liječenje pretilosti. Posebno su pod povećalo stavljene jestive prehrambene biljke koje imaju utjecaj na mikrobiotu (Cao i sur., 2019). Nekoliko bobičastih vrsta, među kojima se nalazi i brusnica, pokazalo je da posjeduju sposobnost moduliranja mikrobiote što posljedično dovodi do smanjenja pretilosti (Lee i sur., 2018; Pan i sur., 2017; Heyman-Linden i sur., 2016b). Brusnica pokazuje protuupalnu aktivnost i smanjuje debljanje tako što povećava količine mikroorganizama *Akkermansia* i *Faecalibacterium* u miševima C57BL/6J koje blagotvorno djeluju na sluznicu crijeva (Heyman-Linden i sur., 2016b). Na istim miševima ispitivana je suplementacija brusnicom pri prehrani s visokim udjelom masti i pokazano je da smanjuje negativne promjene u koncentraciji kolesterola i glukoze u krvi te da smanjuje povećanje mase i visceralne masti za

26 odnosno 25 % u odnosu na kontrolnu grupu koja je primala samo prehranu bogatu mastima bez suplementacije brusnicom. Smanjila je i povećanje koncentracije proinflatarnog citokina leptina za 36% (Ryyti i sur., 2020).

Na razvoj pretilosti ponajprije utječe neravnoteža između unosa kalorija prehranom i metaboličke potrošnje te je redukcija u unosu masti korisna u gubljenju kilograma (Mulvihill i Quigley, 2003). Smanjenje unosa energije inhibicijom aktivnosti pankreatične lipaze koja hidrolizira trigliceride na glicerol i masne kiseline, koji se mogu apsorbirati (Lowe, 1997), koristi se u liječenju pretilosti. Jedan od primjera je lijek orlistat (Sjöström i sur., 1998). Pokazano je da polifenoli iz brusnice također inhibiraju aktivnost pankreatične lipaze. Pretpostavka je da su za to djelovanje odgovorni proantocijanidini (McDougall i sur., 2009).

#### **1.1.4. Utjecaj na razinu glukoze u krvi**

Brusnica ima i potencijalni učinak na diabetes mellitus tipa 2. Etanolni ekstrakt brusnice povećava sposobnost C2C12 mišićnih stanica za uzimanje glukoze preko signalnog puta AMP aktivirane protein kinaze (Harbilas i sur., 2009). Ocjenjivao se i utjecaj ekstrakta brusnice na modelu miša koji je imao prehranu koja dovodi do razvoja pretilosti. Takav model imitira ljudski metabolički sindrom i rani stadij dijabetesa tipa 2 povezanog s nezdravim načinom života jer miš pod utjecajem takve prehrane razvija pretilost, inzulinsku rezistenciju i hiperglikemiju (Bullen i sur., 2004). Doze od 125, 250 i 500 mg ekstrakta brusnice/kg su nakon osmotjednog tretmana snizile GUK za 28%, 25% i 17% na spomenutom mišjem modelu. Brusnica to čini bez utjecaja na tjelesnu težinu i apetit. Snizila se i razina inzulina što je u vezi s povišenjem razine GLUT4 i aktivacijom AMPK signalnog puta. Brusnica je utjecala i na steatozu jetre jer je snizila razine jetrenih triglicerida (Eid i sur., 2014). Osim utjecaja na unos glukoze u stanice, ekstrakt brusnice inhibira  $\alpha$ -amilazu,  $\alpha$ -glukozidazu i to čini jače od antidijabetika akarboze (Ho i sur., 2017).

#### **1.1.5. Kardiovaskularno zaštitno djelovanje**

Brusnica posjeduje i kardiovaskularni zaštitni učinak. Istraživanje je provedeno s različitim bobičastim voćem na zdravim pojedincima s kardiovaskularnim rizičnim

čimbenicima. Najznačajniji ishodi ovog kliničkog istraživanja pokazuju povećanje plazmatskog ili urinarnog antioksidativnog kapaciteta tijekom gladovanja i postprandijalno, smanjenje LDL oksidacije i lipidne peroksidacije tijekom gladovanja i postprandijalno, smanjenje glukoze u plazmi, smanjenje ukupnog kolesterola te povećanje HDL-a (Habauzit i sur., 2014). Ovi rezultati upućuju na pozitivan učinak konzumacije bobičastog voća, pa i brusnice, na ublažavanje čimbenika kardiovaskularnog rizika i smanjenje postprandijalnog i metaboličkog stresa za koje se zna da utječu na razvoj ateroskleroze (O'Keefe i sur., 2008). Što se tiče snižavanja tlaka, tu imamo ograničene rezultate. Jedna studija je uključivala 72 ljudi srednje dobi koji ne primaju terapiju i imaju kardiovaskularne rizike i u njoj se ispitivao hipotenzivni učinak. 8 tjedana davalo im se 160g/dan kombinacije različitog bobičastog voća (među kojima je i brusnica) što je sadržavalo 837 mg/dan polifenola od kojih su 60% bili antocijanini. Autori su zabilježili značajan pad u sistoličkom krvnom tlaku i taj pad se uglavnom događao kod pojedinaca s visokim tlakom dok se normalne vrijednosti tlaka nisu snižavale (Erlund i sur., 2008). Dugotrajna konzumacija (8 tjedana) hladno prešanog soka brusnice u niskim koncentracijama (1:5) uzrokuje snižavanje sistoličkog krvnog tlaka kod spontano hipertenzivnih štakora i ima težnju poboljšati vaskularnu relaksaciju ovisnu o endotelu (Kivimäki i sur., 2013). Iako su ograničeni, rezultati epidemioloških i randomiziranih kontroliranih studija zajedno s eksperimentalnim podacima o vaskularnoj bioaktivnosti ipak pokazuju da voće koje je bogato antocijaninima, flavonolima i procijanidinima, među koje spada i brusnica, posjeduje učinak smanjenja kardiovaskularnih rizika, posebno antihipertenzivni učinak, učinak povećanja o endotelu ovisne vazodilatacije te učinak inhibicije agregacije trombocita (Habauzit i sur., 2014; Neveu i sur., 2010).

### **1.1.6. Ostala djelovanja**

Polifenoli koji se nalaze u brusnici mogu zaštititi živčani sustav od traumatskih ozljeda, tj. djelovati neuroprotektivno (Kelly i sur., 2018; Hossain i sur., 2016). Što se tiče imunskog sustava, pokazano je da 14-dnevnim tretmanom miševa antocijaninima iz brusnice dolazi do poboljšanja funkcije timusa i većeg preživljavanja stanica slezene nakon zračenja. To znači da antocijanini iz brusnice potencijalno djeluju imunostimulatorno na radijacijom uzrokovanu imunosupresiju (Fan i sur., 2012). Regulacijom aktivacije NF- $\kappa$ B, p36 MAPK, autofagije i kaspaze 3/7, pretežito zbog sprečavanja stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta, brusnica koja

sadrži antocijanide, procijanidin i resveratrol pokazuje zaštitni učinak na retinalni fotoreceptor koji koje je oštećen plavim visokoenergetskim LED svjetlom (Ogawa i sur., 2014). Fermentirani sok brusnice smanjuje količinu štetnih mikroorganizama, zubni plak, krvarenje desni i ima protuupalni i antioksidativni učinak što ukazuje na to da bi se mogao koristiti kao sigurna pomoć u oralnoj higijeni (Pärnänen i sur., 2019).

### **1.1.7. Utjecaj na infekcije urinarnog trakta**

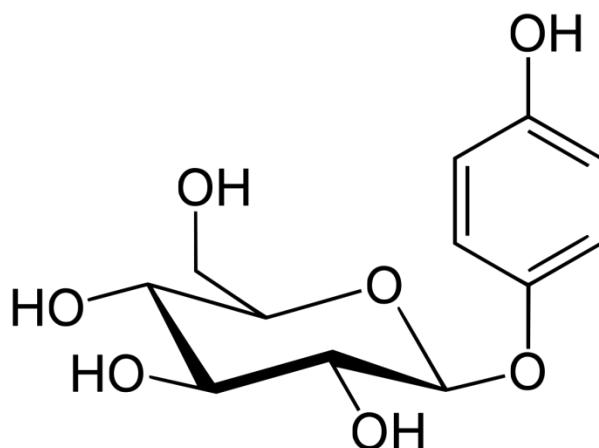
Terapijsko područje po kojem su brusnice ipak najpoznatije su uroinfekcije. Uroinfekcije zauzimaju prvo mjesto na listi najčešćih infekcija kod žena. Više od jedne trećine žena, čak njih 40%, u svom će životu doživjeti bar jednu pojavu uroinfekcije (Sheerin i Glover, 2019). Prema osobinama urinarne infekcije, može ih se podijeliti na pet vrsta: asimptomatska bakteriurija, akutni uretralni sindrom, cistitis, akutni pijelonefritis i rekurentna uroinfekcija (Salvatore i sur., 2011). Prevalencija uroinfekcija je veća kod žena nego kod muškaraca i čak se u 81% slučajeva javlja kod žena. Dob u kojoj se najčešće javljaju je između 16 i 35 godina. 27% žena doživi ponovnu infekciju u roku od 6 mjeseci, a 48% u roku od jedne godine (Salvatore i sur., 2011). Pojavu infekcije najčešće, posebno kod zdravih pojedinaca, uzrokuju bakterije iz crijevne flore koje koloniziraju vaginu. *Escherichia coli* je bakterija koja to najčešće čini (Ronald, 2003). Uropatogena *E. coli* (UPEC) potom se uspinje i kolonizira distalnu uretru što posljedično može dovesti i do infekcije mjehura. Kolonizacija i infekcija mjehura počinje nakon što se bakterija veže za epitelno tkivo mjehura i tad se ispoljavaju prvi simptomi. Važno je znati da infekcija može biti asimptomatska – bakterija je samo prisutna u urinu i ne izaziva simptome. Da bi se razvili simptomi, bakterija se mora vezati na mjehur. Zbog toga ona ima različite adhezivne dijelove koji olakšavaju vezanje i invaziju. Konačno, bakterije mogu formirati biofilmove koji štite zajednicu povezanih bakterija od promjena u okolišu i tako dovode do otpornosti na obrambene mehanizme stanice domaćina jer su zaštićene u matriksu biofilma. Nakon toga, bakterija se može odvojiti i vezati za drugo mjesto na mjehuru i stvoriti novo spremište bakterija. To je način kako, unatoč antibiotskoj terapiji, infekcija može ostati prisutna duži period (Franco, 2006). Upravo zbog toga, a i zbog široke upotrebe antibiotika, dolazi do porasta rezistencije na antibiotike (Ng i sur., 2018). To je jedan od važnih razloga zašto bi biljni pripravci, koji nisu specifični za određenu bakterijsku vrstu, bili poželjni ako bi se pokazalo da su učinkoviti (Bennett i Brown, 2000). Brusnica sadrži proantocijanidin A

(PCA) (Mane i sur., 2011; Krenn i sur., 2007; Cheng i sur., 2005) koji inhibira vezanje adhezivnog proteina p-fimbrija *E. coli* što je početni korak u infekciji i na taj način djeluje preventivno i sprječava razvoj bolesti (Vilkickyte i sur., 2019; Cheng i sur., 2005). Sadržaj proantocijanidina A u brusnici u uzorku dva različita proizvođača iznosi  $130 \pm 1.5$  i  $188.6 \pm 5.5$  mg PCA/100g sušenog voća (Liu i sur., 2020). Američka brusnica ima različit sadržaj proantocijanidina A ovisno o kultivaru koji se uzgaja. Sadržaj im se kreće između 18 i 92 g proantocijanidina A po kilogramu sušenog voća (Carpenter i sur., 2014). Druga studija pokazuje da je sadržaj proantocijanidina A i procijanidina u američkoj brusnici  $418.8 \pm 75.3$  mg/100 g svježeg voća (Gu i sur., 2004). Randomizirana klinička studija pokazala je da je potreban minimalni dnevni unos 36 mg proantocijanidina A kako bi korištenje pokazalo benefite (Howell i sur., 2010). P-fimbrije na koje djeluju proantocijanidini A su manozarezistentni. *E. coli* ima i drugu vrstu adhezivnih proteina koji se zovu tip 1 fimbrije i oni su manozosjetljivi pa se smatra da se antiadhezivna svojstva mogu pripisati i prisustvu fruktoze (Vilkickyte i sur., 2019). Analizom tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (UPLC) spregnutom s masenom spektroskopijom pokazalo se da je arbutin najprisutniji u listu, a proantocijanidini i drugi flavanolni monomeri i oligomeri u stabljici i to u svibnju, srpnju i rujnu pa bi se stoga listovi i stabljike trebali skupljati između svibnja i rujna. Listovi se skupljaju ako je potrebno djelovanje određeno arbutinom (liječenje infekcije urinarnog trakta), a stabljike i plodovi ako je potrebno djelovanje određeno A (liječenje infekcije urinarnog trakta) i B proantocijanidinima (kardiovaskularna zaštita) (Bujor i sur., 2018).

## **1.2. Bioaktivne sastavnice lista brusnice**

### **1.2.1. Arbutin**

Antibakterijsku aktivnost prema gram negativnim bakterijama, kao što je *E. coli*, brusnica posjeduje i zbog prisustva fenolnih glikozida arbutina i metilarbutina (Nile i Park, 2014). Arbutin je monosaharidni derivat koji se sastoji od hidrokinona koji je povezan O-beta glikozidnom vezom na D-glukozu na poziciji 4.



**Slika 2.** Struktura arbutina

Sam arbutin/metilarbutin ne posjeduje antimikrobnu aktivnost, nego to ispoljava tek nakon hidrolize u hidrokinon (Jurica i sur., 2017). Hidrokinon, osim antimikrobnog, ima i adstringentni i antioksidativni učinak (Garcia de Arriba i sur., 2013; Halberstein, 2012; Garcia de Arriba i sur., 2011; Geetha i sur., 2011). Arbutin, primijenjen topikalno, inhibira tirozinazu i sprječava nastanak melanina zbog čega se koristi kao sredstvo za izbjeljivanje kože. Nakon oralne primjene ekstrakta s arbutinom, on dolazi u tanko crijevo i tamo se hidrolizira djelovanjem crijevnih bakterija u hidrokinon i glukozu. No većina se arbutina apsorbira u nepromijenjenom obliku i tek se u jetri hidrolizira beta-glukozidazom. Hidrokinon se potom konjugira s glukuronskom ili sulfatnom kiselinom i izlučuje urinom (Garcia de Arriba i sur., 2013; Garcia de Arriba i sur., 2011). U urinu je prisutna mala količina slobodnog hidrokinona (Quintus i sur., 2005) koja se povećava kad je prisutna infekcija zbog aktivnosti patogenih bakterija. Naime, one povećavaju pH urina što dovodi do povećanog oslobađanja hidrokinona iz konjugata. Udio arbutina u listu brusnice varira između  $4,80 \pm 0,10 \%$  i  $4,97 \pm 0,11 \%$  (Kurkin i sur., 2017). Sadržaj arbutina u listu brusnice mijenja se ovisno o vremenskim uvjetima svake godine i 2005. godine iznosio je 35 mg, a 2006. 47 mg u 1 g droge (Pyka i sur., 2007). Sadržaj arbutina u listu brusnice ovisi i o kultivaru i iznosio je između  $7070.25 \pm 288.64 \mu\text{g/g}$  sušenog usitnjenog lista (kultivar Sanna) i  $56,968.56 \pm 2325.73 \mu\text{g/g}$  sušenog usitnjenog lista (kultivar Kostromskaja rozovaja) (Raudone i sur., 2019). Za liječenje urinarnih infekcija učinkovito je primijeniti 200-840 mg/dan arbutina podijeljeno u 2 - 4 doze. Upravo zbog prisutnosti arbutina, za tu namjenu se uobičajeno koristi infuz 1.5 - 4 g usitnjenog lista medvjeteke do 4 puta na dan ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)). Hidrokinon je ovisno o dozi hepatotoksičan, uzrokuje oštećenja DNA, inhibira topoizomerazu II i mijenja hematopoezu (McDonald i sur.,

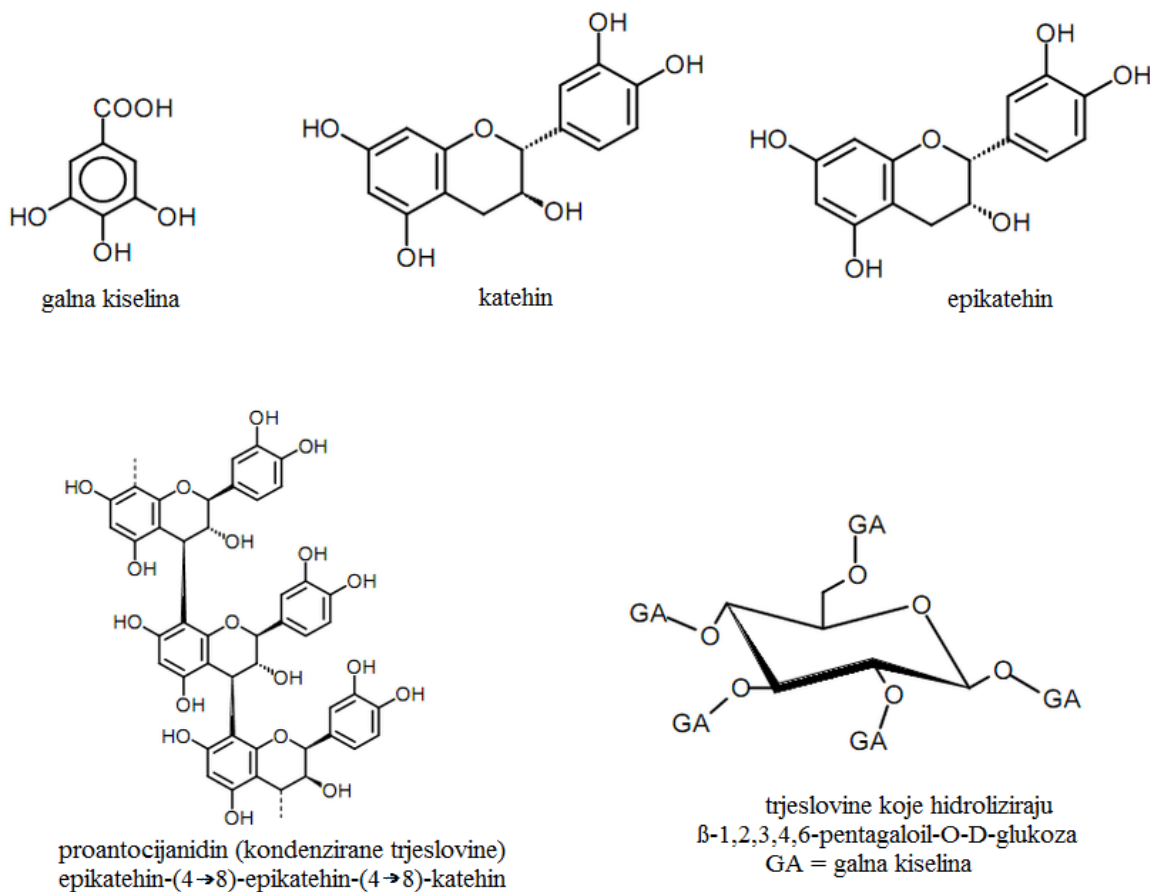
2001). Pripravci s arbutinom dostavljaju malu količinu hidrokinona koja je ispod toksične granice (Garcia de Arriba i sur., 2013), no ipak se zbog mogućih nuspojava preporučuje da se list medvjete koristi samo kad je potrebno liječenje (Yarnell, 2002; Blumethal i sur., 1999), ali ne i u slučaju prevencije. Preporuka je ograničiti korištenje na 1 tjedan i maksimalno 5 puta godišnje osim ako liječnik ne preporuči drugačije. Ako se poboljšanje ne javi nakon 4 dana korištenja, potrebno je kontaktirati liječnika ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)). U brusnici, arbutin je sastavnica koja se s najviše udjela nalazi u listovima čineći 31 – 50% ukupnih polifenola. U manjim količinama nalazi se u stabljici (5-7%) dok ga u plodovima uopće nema (Bujor i sur., 2018). Osim arbutina pronađen je i njegov derivat, 2-kafeoilarbutin, no njegov je sadržaj 4-14 puta manji od arbutina (Liu i sur, 2014).

### 1.2.2.Trjeslovine

Trjeslovine su vrlo rasprostranjena skupina polifenolnih spojeva i prisutne su u mnogim biljnim specijama kao produkt sekundarnog metabolizma. Molekule trjeslovina sadrže mnogo hidroksilnih skupina i stvaraju netopljive komplekse s proteinima i ugljikohidratima. Reakcija trjeslovina s proteinima iz sline uzrokuje spomenuti trpki okus koji je posljedica adstringentnog djelovanja trjeslovina. Stvaraju obojenja s feri solima te daju precipitate s teškim metalima, želatinom i većinom alkaloida osim morfina. Također posjeduju antioksidativno djelovanje. Navedena obilježja koriste se za kvalitativnu i kvantitativnu analizu i razlikovanje polifenola. Dijele se prema strukturi na trjeslovine koje hidroliziraju i kondenzirane trjeslovine (Okuda i Ito, 2011; Zhang i Lin, 2008; Rangari 2007; Bravo, 1998). Trjeslovine koje hidroliziraju su spojevi topljivi u vodi i hidroliziraju djelovanjem enzima ili mineralnih kiselina. Podijeljene su u dvije skupine: tanine i depside. Tanini su fenolne kiseline esterificirane šećerom (najčešće glukozom) pri čemu su najučestaliji esteri galne kiseline (galotanini), a javlja se i elagna i heksahidroksifenolna kiselina (elagtanini). Heksahidroksifenolna kiselina intraesterifikacijom daje elagnu kiselinu (Rangari 2007). Depsidi su esteri fenilkarbonske kiseline. Lako se hidroliziraju u vrućoj vodi, u kiselom i lužnatom mediju ili djelovanjem enzima pri čemu nastaju polialkoholi i fenilkarboksilna kiselina (Kuštrak, 2005; Jurišić, 2003; Bravo, 1998). Kondenzirane trjeslovine su polimerizirani flavonoidi čije su osnovne jedinice katehin, epikatehin (katehinske trjeslovine) ili leukoantocijanidin. Katehin i epikatehin su flavan-3-oli, a leukoantocijanidin je flavan-3,4-diol. Drugi naziv za ovu skupinu je i proantocijanidini jer nakon oksidativnog cijepanja u vrućem alkoholu stvaraju antocijanidinske pigmente.



Proantocijanidini se dijele na nekoliko vrsta ovisno o hidroksilaciji sastavnih dijelova i vrsti veze između njih. Proantocijanidini B stvaraju vezu između C4 i C8 ili C4 i C6. Ako u molekuli osim ovih veza postoji i eterska veza između C2 i O5 ili C2 i O7, spoj se naziva proantocijanidin A (Hellstrom i Mattila, 2008). Polimerizacija katehina ili leukoantocijanidina odvija se u kiselom mediju stanice, enzimatski ili neenzimatski pri čemu nastaju visokopolimerizirani spojevi topljivi u vodi. Kondenzirane trjeslovine ne hidroliziraju djelovanjem mineralnih kiselina ili enzima. Tijekom stajanja i skladištenja neke katehinske trjeslovine mogu i dalje polimerizirati i stvarati trjeslovinsko crvenilo odnosno flobafene koji su nedjelatni i netopljivi (Kuštrak, 2005; Jurišić, 2003). Biološka svrha trjeslovina nije do kraja dokučena. Zbog svog gorkog i trpkog okusa prevladavao je stav da one služe za zaštitu biljke od štetočina što se pokazalo netočnim. Budući da se rijetko nalaze u pričuvnim organima biljke, trjeslovine ne služe kao pričuvne tvari (Jurišić, 2003). Trjeslovine se najčešće koriste zbog svog adstringirajućeg učinka. Zbog toga se rabe za hemoroide, rane, opekline, ozeblina, ali i anginu, stomatitis i gingivitis jer stvaraju zaštitni sloj koji omogućuje da se ispod njega odvija zacjeljivanje. Posjeduju antidijaroičko, antisekretoričko, antibakterijsko i antivirusno, antiflogističko i antioksidativno djelovanje zbog čega se koriste kod hiperaciditetnog gastritisa i proljeva te kod želučanog i crijevnog katara. Trjeslovine također sprječavaju nastanak naslaga na zubima i smanjuju učestalost karijesa. Nekad se koriste kao antidot pri trovanju teškim metalima i alkaloidima (Kuštrak, 2005). Spomenuti antioksidativni učinak koji je posljedica prisutnosti mnogobrojnih hidroksilnih skupina očituje se hvatanjem slobodnih radikala, keliranjem metala, taloženjem proteina i gašenjem enzimске aktivnosti što može imati značajan utjecaj na degenerativne bolesti i stanja kao što su multipla skleroza, tumori ili staranje (de Jesus i sur., 2012; Kalodjera, 2010; Zhang i Lin, 2008; Rangari, 2007). Vyas i sur 2013. su pokazali da list i plod brusnice sadrže 5,30 % trjeslovina.



**Slika 3.** Vrste trjeslovina (preuzeto iz: Lamy i sur., 2011)

### 1.3. Usporedba brusnice, američke brusnice i medvjette

Upravo zbog prisutnosti arbutina, manjeg sadržaja trjeslovina koje uzrokuju gastrointestinalne nuspojave, ali i zbog istraživanja koja kažu da brusnica ima veću antimikrobnu aktivnost prema gram negativnim bakterijama od američke brusnice koja se ponajviše koristi kod urinarnih infekcija (Nile i Park, 2014; Nohynek i sur., 2006), bilo bi potrebno na brusnici provesti konkretne kliničke studije. Dosad postoji samo jedna studija koja je to ispitala, ali ona je koristila kombinaciju brusnice i američke brusnice pa se ti rezultati ne mogu koristiti za razlikovanje te dvije vrste. U toj studiji sudjelovalo je 150 žena s rekurentnim infekcijama urinarnog trakta. Prva je grupa 6 mjeseci pila svaki dan 50 mL soka od obične i američke brusnice, druga grupa je pila 100 mL *Lactobacillus* GG, a treća grupa je primala placebo. Rezultati su pokazali da se u prvoj grupi infekcija vratila bar jednom u 16% slučajeva, u drugoj u 39%, a u trećoj u 36% slučajeva. To nam govori da sok od američke i obične brusnice

smanjuje apsolutni rizik od rekurentne infekcije u usporedbi s kontrolnom grupom za 20% (Kontiokari i sur., 2001) što znači da bi se mogao koristiti u prevenciji. Što se tiče nuspojava kod korištenja obične brusnice, postoji samo jedan zabilježeni slučaj alergijske reakcije (Barrios i sur., 2004) za razliku od nuspojava medvjetke koje su dobro poznate i uzrokovane su visokim sadržajem trjeslovina. Infuz lista medvjetke zbog prisutnosti trjeslovina ima gorak i trpak okus koji često uzrokuje mučninu i povraćanje kod djece i pacijenata koji imaju osjetljiv želudac (Frohne, 2004). Također se mogu javiti grčevi i bolovi u trbuhu (Gruenwald i sur., ured., 2004). Taj okus i nuspojave posljedice su prisutnosti visokog sadržaja trjeslovina, između 10 i 20% . Nuspojave se mogu smanjiti ako se čaj priprema u hladnoj vodi jer se smanjuje topljivost trjeslovina i posljedično njihovo vezanje na stijenke crijeva. Konzumacija medvjetke može obojati urin u zeleno-smeđu boju. Trjeslovine mogu vezati željezo i smanjiti njegovu apsorpciju iz probavnog sustava što može biti štetno kod ljudi koji imaju deficijenciju željeza (Delimont i sur., 2017). Korištenje medvjetke kontraindicirano je kod bubrežnog zatajenja. Ako se medvjetka upotrebljava u visokim i učestalim dozama, može doći do trovanja koje se manifestira kroz iritabilnost, nesanicu, ubrzani puls, albuminuriju, hematuriju, povraćanje, makulopatiju, kronični poremećaj rada jetre i kolaps ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)). Iako nema klinčkih dokaza, medvjetka se ne preporučuje kod trudnica jer visoke doze dovode do stimulacije uterusa i moguće je da dođe do prijevremenih kontrakcija. Za hidrokinon, iako je mutagen, nema dokaza da uzrokuje mutacije i malformacije na fetusu.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Infekcije mokraćnog sustava jedne su od najčešćih infekcija kod osoba ženskog spola. Nekomplicirane infekcije urinarnog trakta često se liječe primjenom biljnih pripravaka dostupnih u obliku čajnih mješavina. Najčešće primjenjivana biljna droga je list medvjetke, *Uvae ursi folium*, koja pokazuje dobro uroantiseptičko djelovanje zahvaljujući visokom udjelu djelatne komponente arbutina. Uz visoki udio arbutina, list medvjetke ima visoki udio trjeslovina koje su odgovorne za neželjen učinke ove biljne droge. Pacijentice često ne ustraju u terapiji listom medvjetke zbog izražene mučnine uzrokovane trjeslovinama. Dobar alternativni izbor za liječenje uroinfekcija je list brusnice, *Vaccinium vitis-idaea*. List brusnice sadrži arbutin, ali se očekuju niže vrijednosti trjeslovina što bi trebalo uzrokovati manje neželjenih učinaka.

U okviru ovog diplomskog rada ispitani su komercijalno dostupni čajevi i čajne mješavine koje sadrže list brusnice sa ciljem :

1. Određivanja sadržaja fenolnih glikozida spektrofotometrijskom metodom
2. Određivanja sadržaja arbutina metodom tekućiske kromatografije visoke učinkovitosti
3. Određivanja sadržaja trjeslovina spektrofotometrijskom metodom

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Uzorci

1. Suban čaj od lista brusnice, *Vaccinium vitis idaeae folium*
2. Agristar čaj od lista brusnice, *Vaccinium vitis idaeae folium*
3. MB Natural čaj od lista brusnice, *Vaccinium vitis idaeae folium*
4. Farma čaj od lista i ploda brusnice, *Vaccinium vitis idaeae folium et fructus*

### 3.2. Aparatura i kemikalije

Aparatura i pribor:

- UV-Vis spektrofotometar Helios  $\gamma$  (Spectronic Unicam, Cambridge, Velika Britanija)
- tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (Perkin Elmer)
- ultrazvučna kupelj Sonorex Digital 10 P (Bandelin, Berlin, Njemačka)
- vodena kupelj (Inko, Zagreb, Hrvatska)
- laboratorijska tresilica (GFL, Hannover, Njemačka)

Kemikalije:

- aminopirazolon 2% (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- amonijev hidroksid 3,5% (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- arbutin (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- Folin – Ciocalteu reagens (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- hidrokinon (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kalijev heksacijanoferat (III) 8% (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kloroform (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kožni prašak (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- metanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev karbonat (290 g/L) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

- pirogalol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Spektrofotometrijsko određivanje derivata hidrokinona

Kvantitativna analiza derivata hidrokinona u uzorcima vrste *Vaccinium vitis-idaea* provedena je spektrofotometrijskom metodom, pri čemu je sadržaj izražen kao arbutin i metilarbutin.

Kvantitativna analiza arbutina i metilarbutina u uzorcima vrste *Vaccinium vitis-idaea* provedena je niže opisanim postupkom.

*Ekstrakt.* 0,400 g droge u prašku ili odgovarajuća količina čajne mješavine ekstrahira se s 50 mL destilirane vode u kipućoj vodenoj kupelji, uz vodeno hladilo 30 minuta. Ohlađeni sadržaj pažljivo se prenese u odmjernu tikvicu od 250 mL te dopuni destiliranom vodom do oznake. Ekstrakt se zatim profiltrira kroz naborani filter-papir.

*Ispitivana otopina.* 5,0 mL dobivenog ekstrakta pomiješa se u lijevku za odjeljivanje s 45 mL destilirane vode, a zatim redom dodaju sljedeći reagensi: 1,0 mL 2%-tnog aminopirazolona, 0,5 mL 3,5%-tnog amonijevog hidroksida te 1,0 mL 8%-tnog kalijevog heksacijanoferata(III). Nakon dodatka pojedinog reagensa, otopina se svaki put promućka. Nakon 5 minuta stajanja, sadržaj u lijevku izmućkava se tri puta s po 25 mL kloroforma. Kloroformski slojevi se filtriraju preko vate namočene kloroformom u odmjernu tikvicu od 100 mL, a sadržaj tikvice nadopuni kloroformom do oznake.

Apsorbancija ispitivane otopine mjeri se na 455 nm, uz kloroform kao kompenzacijsku otopinu. Sadržaj hidrokinonskih derivata, izraženo kao arbutin, izračuna se prema izrazu:

$$\% \text{ arbutina i metilarbutina} = \frac{A \times 7,716}{m}$$

*A* – apsorbancija ispitivane otopine na 455 nm

*m* – masa droge (g)

### 3.3.2. Određivanje arbutina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Kvantitativna analiza arbutina u uzorcima vrste *Vaccinium vitis-idaea* provedena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti koju propisuje Europska farmakopeja (EDQM), pri čemu je sadržaj izražen kao arbutin.

Kvantitativna analiza arbutina u uzorcima vrste *Vaccinium vitis-idaea* provedena je niže opisanim postupkom.

*Ispitivana otopina.* U tikvicu od 100 mL s ubrušenim grlom stavi se 0,800 g praškasto usitnjene biljne droge. Doda se 20 mL vode i zagrijava u vodenoj kupelji pod povratnim hladilom 30 minuta. Ekstrakt se ohladi i filtrira preko pamuka. Pamuk se doda ostatku droge u tikvici od 100 mL, doda se 20 mL vode i ponovi ekstrakcija pod povratnim hladilom u vodenoj kupelji 30 minuta. Nakon hlađenja filtrira se preko filter-papira. Dobiveni filtrati se sjedine i razrijede do 50,0 mL vodom. Vodeni ekstrakt se filtrira preko filter-papira, a prvih 10 mL filtrata se odbaci.

*Poredbena otopina (a).* Otopi se 50,0 mg arbutina u pokretnoj fazi i razrijedi do 50,0 mL s istom.

*Poredbena otopina (b).* Otopi se 2,5 mg hidrokinona u pokretnoj fazi i razrijedi do 10,0 mL s istom. U 5,0 mL ove otopine doda se 2,5 mL poredbene otopine (a) i razrijedi do 10,0 mL s pokretnom fazom.

Ispitivana i poredbene otopine se filtriraju kroz membranski filter veličine pora 0,45 µm.

*Kolona:*

- *duljina:* 1 = 0,25 m, unutarnji promjer = 4 mm
- *nepokretna faza:* oktadecilsilil silikagel (5 µm)

*Pokretna faza:* metanol, voda(10:90 V/V)

*Brzina protoka:* 1,2 mL/min

*Detekcija:* spektrofotometar na 280 nm

*Injektiranje:* 20 µL

*Prikladnost sustava:* poredbena otopina (b):

- *razlučivanje:* najmanje 4,0 između pikova arbutina i hidrokinona

$$\text{razlučivanje} = 1,18 \times \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

$t_{R1}$  i  $t_{R2}$  – vremena zadržavanja pikova arbutina i hidrokinona

$w_{h1}$  i  $w_{h2}$  – širine pikova arbutina i hidrokinona na polovici visine pripadajućih pikova

Izračuna se udio arbutina u postocima koristeći sljedeći izraz:

$$\% \text{ arbutina} = \frac{A_1 \times m_2 \times p}{A_2 \times m_1}$$

$A_1$  – površina pika arbutina na kromatogramu ispitivane otopine

$A_2$  – površina pika arbutina na kromatogramu poredbene otopine (a)

$m_1$  – masa biljne droge (g) korištene za pripremu ispitivane otopine

$m_2$  – masa arbutina (g) korištenog za pripremu poredbene otopine (a)

$p$  – postotni udio arbutina u poredbenom arbutinu

### 3.3.3. Spektrofotometrijsko određivanje trjeslovina

Kvantitativna analiza trjeslovina u uzorcima vrste *Vaccinium vitis-idaea* provedena je spektrofotometrijskom metodom koju propisuje Europska farmakopeja (EDQM), pri čemu je sadržaj izražen kao pirogalol.

Kvantitativna analiza trjeslovina u uzorcima vrste *Vaccinium vitis-idaea* provedena je niže opisanim postupkom.

*Ekstrakt:* 1,000 g praškasto usitnjene droge pomiješa se u tikvici okruglog dna od 250 mL sa 150 mL vode. Sadržaj tikvice grije se 30 minuta na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Dobiveni ekstrakt ohladi se pod tekućom vodom, kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu, razrijedi destiliranom vodom do 250,0 mL te profiltrira. Prvih 50 mL filtrata se baci, a ostatak koristi za daljnju analizu.

*Ukupni polifenoli:* 5,0 mL filtrata se razrijedi vodom do 25,0 mL. Potom se 2,0 mL te otopine pomiješa s 1,0 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 10,0 mL vode u odmjernoj tikvici od 25 mL.



Sadržaj se nadopni otopinom natrijevog karbonata (290 g/L) do oznake. Nakon 30 minuta izmjeri se apsorbcija otopine na 760 nm ( $A_1$ ), uz vodu kao kompenzacijsku otopinu.

*Polifenoli neadsorbirani na kožni prašak:* U 10,0 mL filtrata doda se 0,10 g kožnog praška i sadržaj tikvice snažno se mućka tijekom 60 minuta na laboratorijskoj tresilici. Nakon filtriranja, 5,0 mL dobivenog filtrata razrijedi se vodom do 25,0 mL. Potom se 2,0 mL te otopine pomiješa u odmjernoj tikvici od 25 mL s 1,0 mL Folin-Ciocalteau reagensa i 10,0 mL vode. Sadržaj tikvice se zatim nadopuni do oznake otopinom natrijevog karbonata (290 g/L). Nakon 30 minuta izmjeri se apsorbcija otopine na 760 nm ( $A_2$ ), uz vodu kao kompenzacijsku otopinu.

*Standard:* Neposredno prije korištenja, 50,0 mg pirogalola se otopi u destiliranoj vodi u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopuni vodom do oznake. Zatim se 5,0 mL dobivene otopine razrijedi vodom do 100,0 mL. U odmjernoj tikvici od 25 mL, alikvot od 2,0 mL dobivene otopine pomiješa se s 1,0 mL Folin-Ciocalteau reagensa i 10,0 mL vode te se sadržaj tikvice nadopuni do oznake otopinom natrijevog karbonata (290 g/L). Nakon 30 minuta izmjeri se apsorbcija na 760 nm ( $A_3$ ), uz vodu kao kompenzacijsku otopinu.

Postotak trjeslovina, izraženo kao pirogalol, izračuna se prema izrazu:

$$\% \text{ trjeslovina} = 62,5 \times \frac{(A_1 - A_2) \times m_2}{A_3 \times m_1}$$

$A_1$ —apsorbancija ukupnih polifenola

$A_2$ —apsorbancija polifenola neadsorbiranih na kožni prašak

$A_3$ —apsorbancija pirogalola

$m_1$ —masa ispitivanog uzorka (g)

$m_2$ —masa pirogalola (g)

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

### **4.1. Rezultati**

#### **4.1.1 Arbutin određen UV-Vis spektrofotometrijom**

UV-Vis spektrofotometrijom određeno je da udio arbutina u prašku dobivenom od čaja od lista brusnice proizvođača Suban iznosi 5,94 %. Postotak arbutina određen istom metodom, ali ne u prašku, nego u čaju iznosi 3,72 %. Ukupni dnevni unos arbutina konzumacijom čaja izmjeren UV-Vis spektrofotometrijom iznosi 223,20 mg što iznosi 111,60 % minimalne preporučene tj. učinkovite dnevne doze (DD) arbutina.

Udio arbutina u prašku dobivenom od čaja od lista brusnice proizvođača Agristar iznosi 5,21 %. Postotak arbutina određen istom metodom u čaju iznosi 2,79 %. Ukupni dnevni unos arbutina konzumacijom čaja iznosi 251,10 mg što iznosi 125,55 % minimalne preporučene tj. učinkovite dnevne doze arbutina.

Udio arbutina u prašku dobivenom od čaja od lista brusnice proizvođača MB Natural iznosi 4,57 %. Postotak arbutina određen istom metodom u čaju iznosi 3,13 %. Ukupni dnevni unos arbutina konzumacijom čaja iznosi 125,89 mg što iznosi 62,95 % minimalne preporučene tj. učinkovite dnevne doze arbutina.

Udio arbutina u prašku dobivenom od čaja od lista i ploda brusnice proizvođača Farma iznosi 2,93 %. Postotak arbutina određen istom metodom u čaju iznosi 0,98 %. Unos arbutina konzumacijom jedne doze čaja iznosi 19,89 mg što iznosi 19,89 % minimalne preporučene tj. učinkovite pojedinačne doze arbutina. Nema rezultata za dnevnu dozu arbutina od proizvođača Farma jer proizvođač u uputi nije naveo koliko puta dnevno treba piti čaj.

**Tablica 1.** Udio arbutina u listu (i plodu kod proizvođača Farma) brusnice određen UV-Vis spektrofotometrijom, njegov dnevni unos i udio preporučene dnevne doze arbutina.

	<b>Suban</b>	<b>Agristar</b>	<b>MB Natural</b>	<b>Farma</b>
arbutin u prašku	5,94 %	5,21 %	4,57 %	2,93 %
arbutin u čaju	3,72 %	2,79 %	3,13 %	0,98 %
ukupni dnevni unos arbutina	223,20 mg	251,10 mg	125,89 mg	/
udio preporučene DD arbutina	111,60 %	125,55 %	62,95 %	/

#### **4.1.2. Arbutin određen tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti**

Određivanjem sadržaja arbutina u čaju proizvođača Suban tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) pokazano je da udio arbutina u čaju iznosi 2,75 %. HPLC je pokazao 26,08 % manji udio arbutina u čaju nego UV-Vis spektrofotometrija. Dnevni unos arbutina izmjeren HPLC-om iznosi 165,00 mg što čini 82,50 % minimalne preporučene i učinkovite dnevne doze (DD) arbutina.

Određivanjem sadržaja arbutina u čaju proizvođača Agristar pokazano je da udio arbutina u čaju iznosi 2,69 %. HPLC je pokazao 3,58 % manji udio arbutina u čaju nego UV-Vis spektrofotometrija. Dnevni unos arbutina iznosi 242,06 mg što čini 121,03 % minimalne preporučene i učinkovite dnevne doze arbutina.

Određivanjem sadržaja arbutina u čaju proizvođača MB Natural pokazano je da udio arbutina u čaju iznosi 2,16 %. HPLC je pokazao 29,31 % manji udio arbutina u čaju nego UV-Vis spektrofotometrija. Dnevni unos arbutina iznosi 86,41 mg što čini 43,21 % minimalne preporučene i učinkovite dnevne doze arbutina.

Određivanjem sadržaja arbutina u čaju proizvođača Farma pokazano je da udio arbutina u čaju iznosi 1,47 %. HPLC je pokazao 27,94 % manji udio arbutina u čaju nego UV-Vis spektrofotometrija. Unos arbutina iznosi 14,94 mg što čini 14,94 % minimalne preporučene i učinkovite pojedinačne doze arbutina. Nema rezultata za dnevnu dozu arbutina od proizvođača Farma jer proizvođač u uputi nije naveo koliko puta dnevno treba piti čaj.

**Tablica 2.** Udio arbutina u čaju lista (i ploda kod proizvođača Farma) brusnice određen tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, njegov dnevni unos i udio preporučene dnevne doze arbutina.

	<b>Suban</b>	<b>Agristar</b>	<b>MB Natural</b>	<b>Farma</b>
arbutin u čaju	2,75 %	2,69 %	2,16 %	1,47 %
ukupni dnevni unos arbutina	165,00 mg	242,06 mg	86,41 mg	/
udio preporučene DD arbutina	82,50 %	121,03 %	43,21 %	/

Kod mjerenja čajeva, HPLC je u prosjeku pokazivao za 21,73 % manji sadržaj arbutina od UV-Vis spektrofotometrije. Najmanje odstupanje je bilo 3,58 % kod mjerenja čaja proizvođača Agristar, dok je najveće odstupanje bilo 29,31 % kod mjerenja čaja proizvođača MB Natural.

#### 4.1.3. Trjeslovine određene UV-Vis spektrofotometrijom

**Tablica 3.** Udio trjeslovina u čaju lista (i ploda kod proizvođača Farma) brusnice u ispitivanim uzorcima.

	<b>Suban</b>	<b>Agristar</b>	<b>MB Natural</b>	<b>Farma</b>
trjeslovine	4,18 %	3,84 %	3,27 %	2,04 %

## 4.2. Rasprava

Naše istraživanje pokazalo je da različiti proizvođači čaja od listova brusnice koriste brusnicu različite kvalitete koja po svojem sastavu znatno varira. Najbolji rezultat pokazao je proizvođač Suban čiji je čaj sadržavao 5,94 % arbutina koji je djelatna tvar u liječenju urinarnih infekcija za koje se brusnica najviše i koristi. Međutim, proizvođač Agristar je ipak postigao najveći dnevni unos arbutina jer je na odgovarajući način prilagodio doziranje, premda njegov čaj sadržava manji udio arbutina. Dnevna doza koju se može unijeti konzumirajući Agristarov čaj po uputi za pripremu iznosi 251,10 mg. Gledajući rezultate dobivene UV-Vis

spektroskopijom, dnevna doza čajeva Suban i Agristar je tek nešto iznad minimalne dnevne doze koja se smatra učinkovitom, a to je 200 mg. Maksimalna dnevna doza se proteže sve do 840 mg (www.ema.europa.eu). Ostali proizvođači i oblici nisu bili ni blizu minimalnoj preporučenoj dnevnoj dozi koja bi bila učinkovita u liječenju urinarnih infekcija. Proizvođači nisu naveli na kojem području su skupljali brusnicu pa se ne može zaključiti kako njezina kvaliteta ovisi o geografskom položaju na kojem se uzgaja. Nije naveden niti kultivar niti razdoblje u kojem je droga sakupljana što također značajno utječe na kvalitetu i sadržaj aktivnih tvari u biljnoj drogi (Raudone i sur., 2019; Bujor i sur., 2018; Pyka i sur., 2007). Urinarne infekcije bakterijom *E. coli* zbog kojih se arbutin koristi, uglavnom su dugotrajne, ponavljajuće i često rezistente na terapiju pa je logična pretpostavka da će u takvim slučajevima biti potrebna viša doza djelatne tvari i da ovi čajevi neće biti najučinkovitije rješenje. Proizvođač Farma je u svoju formulaciju uključio i plodove brusnice što sa stajališta arbutina nema smisla jer plodovi ne sadrže arbutin (Bujor i sur., 2018). No, plodovi sadrže proantocijanidine A (Mane i sur., 2011; Krenn i sur., 2007; Cheng i sur., 2005) za koje se smatra da inhibiraju vezanje adhezivnog proteina *E. coli* i na taj način preveniraju infekciju (Vilkickyte i sur., 2019; Cheng i sur., 2005). Stoga bi se čaj proizvođača Farma, kada bi se popravila kvaliteta biljnog materijala i povisio sadržaj arbutina, mogao koristiti i u prevenciji i u liječenju urinarnih infekcija, dok ostali imaju djelovanje samo u liječenju. Rezultate dobiveni HPLC-om ukazuju na to da bi samo Agristarov čaj bio učinkovit i sadržavao arbutin u terapijskim dozama. Postoji dosta velika razlika između sadržaja arbutina izračunata koristeći UV-Vis spektrofotometriju i HPLC, u maksimalnom iznosu od 29,31%. Potrebno je utvrditi zašto nastaje tolika razlika kad se mjeri sadržaj arbutina tim dvjema metodama. Prema prethodno provedenim studijama, udio arbutina u listu brusnice varira između  $4,80 \pm 0,10$  % i  $4,97 \pm 0,11$  % (Kurkin i sur., 2017). Sadržaj arbutina u listu brusnice mijenja se ovisno o vremenskim uvjetima svake godine i 2005. godine iznosio je 35 mg, a 2006. 47 mg u 1 g droge (Pyka i sur., 2007). Postoji studija koja je ispitala udio arbutina u tekućim pripravcima brusnice. Koncentracija arbutina u uzorcima varirala je između 16 i 224 mg arbutina/L tekućeg pripravka što je činilo između 26,1 i 78,9% ukupnih fenolnih spojeva u tekućem pripravku brusnice (Ieri i sur., 2013).

Uspoređujući brusnicu s medvjerkom, dolazimo do zaključka da brusnica ima potencijal da se koristi u istim indikacijama kao i medvjетка. Po standardima Europske Farmakopeje, medvjетка bi morala imati više od 7% arbutina da bi bila farmakopejske kakvoće (EDQM). Naša brusnica, pokazala je najviši rezultat u čaju proizvođača Suban koji je iznosio 5,94%. Morao bi se utvrditi sadržaj arbutina u brusnici koji je potreban kako bi se moglo i za nju ocijeniti je li farmakopejske

kakvoće ili nije. Valjalo bi odrediti i druga ispitivanja koja je potrebno zadovoljiti da bi pripravci s brusnicom bili sigurni i djelotvorni.

Druga važna sastavnica koju smo gledali u našem istraživanju bile su trjeslovine. Infuz lista medvjete zbog prisutnosti trjeslovina ima gorak i trpak okus koji često uzrokuje mučninu i povraćanje kod djece i pacijenata koji imaju osjetljiv želudac (Frohne, 2004). Također se mogu javiti grčevi i bolovi u trbuhu (Gruenwald i sur., ured., 2004). Taj okus i nuspojave medvjete posljedice su prisutnosti visokog sadržaja trjeslovina, između 10 i 20 % ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)). Mjerenjem trjeslovina u brusnici došli smo do udjela koji je najviše iznosio 4,18% (proizvođač Suban) što pokazuje da brusnica sadrži manje trjeslovina od medvjete i da ima potencijal uzrokovati manje nuspojave koje su problematične kod primjene medvjete. Potrebno je daljnje istraživanje ove tematike kako bismo bili sigurni u tu tvrdnju. Vyas i sur 2013. su pokazali da list i plod brusnice imaju 5,30 % trjeslovina što je slično našim rezultatima.

## 5. ZAKLJUČCI

U okviru ovog diplomskog rada napravljena je kvantitativna analiza čajeva od listova brusnice (*Vaccinium vitis-idaea*, Ericaceae) dostupnih na hrvatskom tržištu i analiza je uključivala određivanje arbutina i trjeslovina u čaju i prašku koristeći metode UV-Vis spektroskopije i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.

- U našem istraživanju, pokazali smo da listovi vrste *Vaccinium vitis-idaea* sadrže arbutin koji se koristi u liječenju urinarnih infekcija.
- Maksimalni udio arbutina koji sadrže čajevi od lista brusnice na hrvatskom tržištu određen UV-Vis spektrofotometrijom iznosi 5,94 % (proizvođač Suban), dok maksimalni dnevni unos iznosi 251,10 mg arbutina (proizvođač Agristar). Jedino ta dva proizvođača zadovoljavaju minimalnu preporučenu i učinkovitu dnevnu dozu arbutina.
- Kako bi se postigla odgovarajuća učinkovitost svih proizvođača, trebao bi se prilagoditi režim doziranja povećavajući pojedinačnu dozu ili broj doza po danu.
- Ovi rezultati ukazuju na to da se osim lista medvjete i list brusnice može koristiti u liječenju urinarnih infekcija kao uroantiseptik, dok se američka brusnica koristi samo u prevenciji. Također, plod brusnice bi se mogao koristiti i u prevenciji zbog prisutnosti proantocijanida A koji su djelatna tvar u američkoj brusnici.
- Čajevi od lista brusnice na hrvatskom tržištu sadrže maksimalno 4,18 % trjeslovina (najveći iznos kod proizvođača Suban) što je znatno manje nego što sadrži list medvjete.
- Rezultati upućuju na to da brusnica ima potencijal za korištenje u liječenju urinarnih infekcija s lakšim i manje učestalim gastrointestinalnim nuspojavama u odnosu na list medvjete. Kako bi se to potvrdilo, potrebna su daljnja ispitivanja na tom području.

## 6. LITERATURA

- [1] Assessment report on *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., folium, 2018.,<http://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 22.7.2020.
- [2] Awang DVC. *Arctostaphylos uva-ursi*. U: PDR for herbal medicines. Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C, urednici, Montvale, Thomson PDR, 2004, str. 847–851.
- [3] Barrios Y, Matheu V, de la Parte B, Fernández M, Zubeldia JM, Baez ML. Lingonberry allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 2(1) 315.
- [4] Bennett J, Brown CM. Use of Herbal Remedies by Patients in a Health Maintenance Organization. *J Am Pharm Assoc*, 2000, 40(3) 353–358.
- [5] Blumethal M, Busse WR, Goldberg A i sur. The Complete German Commission E Monographs., Austin, American Botanical Council Integrative Medicine Communications, Boston, 1999.
- [6] Bode AM, Dong Z. Signal transduction pathways: Targets for chemoprevention of skin cancer. *Lancet Oncol*, 2000, 1, 181–188.
- [7] Bomser J, Madhavi DL, Singletary K, Smith MAL. In Vitro Anticancer Activity of Fruit Extracts from *Vaccinium* Species. *Planta Med*, 1996, 62(3) 212–216.
- [8] Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr Rev*, 1998, 56(11), 317–333.
- [9] Brown EM, Nitecki S, Pereira-Caro G, McDougall GJ, Stewart D, Rowland I, Crozier A, Gill CIR. Comparison of in vivo and in vitro digestion on polyphenol composition in lingonberries: Potential impact on colonic health. *Biofactors*, 2014, 21(2), 611–623.
- [10] Bullen JW Jr, Ziotopoulou M, Ungsunan L, Misra J, Alevizos I, Kokkotou E, Maratos-Flier E, Stephanopoulos G, Mantzoros CS. Short-term resistance to diet-induced obesity in A/J mice is not associated with regulation of hypothalamic neuropeptides. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 851, 662–670.
- [11] Bujor OC, Giniès C, Popa VI, Dufour C. Phenolic compounds and antioxidant activity of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) leaf, stem and fruit at different harvest periods. *Food Chem*, 2018, 252, 356–365.
- [12] Cao SY, Zhao CN, Xu XY, Tang GY, Corke H, Gan RY, Li HB. Dietary plants, gut microbiota, and obesity: Effects and mechanisms. *Trends Food Sci Tech*, 2019, 92, 194–204.



- [13] Carpenter JL, Caruso FL, Tata A, Vorsa N, Neto CC. Variation in proanthocyanidin content and composition among commonly grown North American cranberry cultivars (*Vaccinium macrocarpon*). *J Sci Food Agric*, 2014, 94(13), 2738–2745.
- [14] Cheng HY, Lin TC, Yang CM, Shieh DE, Lin CC. In vitro anti-HSV-2 activity and mechanism of action of proanthocyanidin A-1 from *Vaccinium vitis-idaea*. *J Sci Food Agric*, 2005, 77(12), 10–15.
- [15] Cowberry, 2007., <http://www.luontoportti.com>, pristupljeno 30.06.2020.
- [16] de Jesus NZT, Falcão HS, Gomes IF, Leite TJA, Lima GRM, Barbosa-Filho JM, Tavares JF, Silva MS, Athayde-Filho PF, Batista LM. Tannins, Peptic Ulcers and Related Mechanisms. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(3), 3203–3228.
- [17] Delimont NM, Haub MD, Lindshield BL. The Impact of Tannin Consumption on Iron Bioavailability and Status: A Narrative Review. *Curr Dev Nutr*, 2017, 1(2), 1–12.
- [18] EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care). European Pharmacopoeia, 10. izd., Strasbourg: Council of Europe, 2020, str. 310, 1333-1334.
- [19] Eid HM, Ouchfoun M, Brault A, Vallerand D, Musallam L, Arnason JT, Haddad PS. Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) Exhibits Antidiabetic Activities in a Mouse Model of Diet-Induced Obesity. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014, 645812.
- [20] Erlund I, Koli R, Alfthan G, Marniemi J, Puukka P, Mustonen P, Mattila P, Jul A. Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. *Am J Clin Nutr*, 2008, 87(2), 323–331.
- [21] Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*, 2008, 358(11), 1148–1159.
- [22] Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 2001, 411(6835), 342–348.
- [23] Fan ZL, Wang ZY, Liu JR. Cold-field fruit extracts exert different antioxidant and antiproliferative activities in vitro. *Food Chem*, 2011, 129, 402–407.
- [24] Fan ZL, Wang ZY, Zuo LL, Tian SQ. Protective Effect of Anthocyanins from Lingonberry on Radiation-induced Damages. *Int J Environ Res Public Health*, 2012, 9(12), 4732–4743.
- [25] Fosslie E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci*, 2000, 30(1), 3–21.
- [26] Franco AVM. Recurrent urinary tract infections. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2006, 19(6), 861–873.

- [27] Frohne D. Bearberry leaf. U: Herbal drug and Phytopharmaceuticals. Wichtl M, urednik. Stuttgart, MedPharm Scientific Publishers GmbH, 2004, str. 626–629.
- [28] Garcia de Arriba S, Naser B, Nolte KU. Risk assessment of free hydroquinone derived from *Arctostaphylos uva-ursi* folium herbal preparations. *Int J Toxicol*, 2013, 32(6), 442–453.
- [29] Garcia de Arriba S, Stammwitz U, Pickartz S, Goclik V, Bodinet C, Nolte KU. Änderungen des Urin-pH-Werts haben keinen Einfluss auf die Wirksamkeit von *Uvae ursi* folium. *Z Phytother*, 2010, 31(2), 95–97.
- [30] Geetha RV, Anitha R, Lakshmi T. Nature's weapon against urinary tract infections. *Int J Drug Dev Res*, 2011, 3(3), 85–100.
- [31] Grace MH, Esposito D, Dunlap KL, Lila, MA. Comparative analysis of phenolic content and profile, antioxidant capacity and anti-inflammatory bioactivity in wild Alaskan and commercial *Vaccinium* berries. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(18), 4007–4017.
- [32] Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Gebhardt S, Prior RL. Concentrations of Proanthocyanidins in Common Foods and Estimations of Normal Consumption. *J Nutr*, 2004, 134(3), 613–617.
- [33] Habauzit V, Milenkovic D, Morand C. Vascular Protective Effects of Fruit Polyphenols. U: Polyphenols in Human Health and Disease. Watson RR, Preedy VR, Zibadi S, urednici, Cambridge, Academic Press, 2014, 2, str. 875–893.
- [34] Halberstein RA. Botanical medicines for diuresis: cross-cultural comparisons. *Stud Nat Prod Chem*, 2012, 3(3), 1–41.
- [35] Harbilas D, Martineau L, Harris C, Adeyiwola-Spoor D, Saleem A, Lambert J, Caves D, Johns T, Prentki M, Cuerrier A, Arnason J, Bennett S, Haddad P. Evaluation of the antidiabetic potential of selected medicinal plant extracts from the Canadian boreal forest used to treat symptoms of diabetes: Part II. *Can J Physiol Pharmacol*, 2009, 87, 479–492.
- [36] Hellstrom JK, Mattila PH. HPLC Determination of Extractable and Unextractable Proanthocyanidins in Plant Materials. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(17), 7617–7624.
- [37] Heyman-Linden L, Kotowska D, Sand E, Bjursell M, Plaza M, Turner C, Holm C, Fåk F, Berger B. Lingonberries alter the gut microbiota and prevent low-grade inflammation in high-fat diet fed mice. *Food Nutr Res*, 2016, 60, 29993. (b)
- [38] Heyman-Linden L, Seki Y, Storm P, Jones HA, Charron MJ, Berger K, Holm C, Berry intake changes hepatic gene expression and DNA methylation patterns associated with high-fat diet. *J Nutr Biochem*, 2016, 27, 79–95. (a)

- [39] Ho GTT, Nguyen TKY, Tranheim Kase E, Tadesse M, Barsett H, Wangenstein. Enhanced Glucose Uptake in Human Liver Cells and Inhibition of Carbohydrate Hydrolyzing Enzymes by Nordic Berry Extracts. *Molecules*, 2017, 22(10), 1806.
- [40] Hossain MZ, Shea E, Daneshtalab M, Weber JT. Chemical Analysis of Extracts from Newfoundland Berries and Potential Neuroprotective Effects. *Antioxidants*, 2016, 5(4), 36.
- [41] Howell AB, Botto H, Combescure C, Blanc-Potard AB, Gausa L, Matsumoto T, Tenke P, Sotto A, Lavigne JP. Dosage effect on uropathogenic *Escherichia coli* anti-adhesion activity in urine following consumption of cranberry powder standardized for proanthocyanidin content: A multicentric randomized double blind study. *BMC Infect Dis*, 2010, 10, 94.
- [42] Hsu TC, Young MR, Cmarik J, Colburn NH. Activator protein 1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappaB) dependent transcriptional events in carcinogenesis. *Free Radical Biol Med*, 2000, 7(4), 1338–1348.
- [43] Huxley A. The New Royal Horticultural Society Dictionary of Gardening. London, MacMillan Press, 1992, str. 2443.
- [44] Ieri F, Martini S, Innocenti M, Mulinacci N. Phenolic distribution in liquid preparations of *Vaccinium myrtillus* L. and *Vaccinium vitis idaea* L. *Phytochem Anal*, 2013, 24(5), 467–475.
- [45] Jurica K, Gobin I, Kremer D, Vitali Čepo D, Jurišić Grubešić R, Brčić Karačonji I, Kosalec I. Arbutin and its metabolite hydroquinone as the main factors in the antimicrobial effect of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves. *J Herb Med*, 2017, 68, 17–23.
- [46] Jurišić R. Botanička i fitokemijska karakterizacija nekih vrsta roda *Plantago* L. Doktorski rad, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2003.
- [47] Katsube N, Iwashita K, Tsushida T, Yamaki K., Kobori M. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(1), 68–75.
- [48] Kelly E, Vyas P, Weber JT. Biochemical Properties and Neuroprotective Effects of Compounds in Various Species of Berries. *Molecules*, 2018, 23(1), 26.
- [49] Kivimäki AS, Siltari A, Ehlers PI, Korpela R, Vapaatalo H. Lingonberry juice lowers blood pressure of spontaneously hypertensive rats (SHR). *J Funct Foods*, 2013, 49, 1432–1440.

- [50] Kontiokari T, Sundqvist K, Nuutinen M, Pokka T, Koskela M, Uhari M. Randomised trial of cranberry-lingonberry juice and Lactobacillus GG drink for the prevention of urinary tract infections in women. *BMJ*, 2001, 322(7302), 1–5.
- [51] Krenn L, Steitz M, Schlicht C, Kurth H, Gaedcke F. Anthocyanin and proanthocyanidin-rich extracts of berries in food supplements – analysis with problems. *Pharmazie*, 2007, 62(11), 803–812.
- [52] Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med*, 2002, 75, 71–88.
- [53] Kurkin VA, Ryazanova TK, Platonov IA, Pavlova LV. Determination of Arbutin in *Vaccinium vitis-idaea* L. Leaves. *Pharm Chem J*, 2017, 51, 34–37.
- [54] Kuštrak D. Farmakognozija fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing-Tehnička knjiga, 2005, str. 295-299, 408–409.
- [55] Lamy E, Rawel H, Schweigert F, Capela SF, Ferreira AG, Costa A, Antunes C, Almeida A, Coelho A, Baptista E. The Effect of Tannins on Mediterranean Ruminant Ingestive Behavior: The Role of the Oral Cavity. *Molecules*, 2011, 16(4), 2766-2784.
- [56] Lee S, Keirsey KI, Kirkland R, Grunewald ZI, Fischer JG, de la Serre CB. Blueberry supplementation influences the gut microbiota, inflammation, and insulin resistance in high-fat-diet-fed rats. *J Nutr*, 2018, 148(2), 209–219.
- [57] Lingonberry, 2018., <https://www.gardeningknowhow.com>, pristupljeno 05.06.2020.
- [58] Liu J, Hefni ME, Withöft CM. Characterization of Flavonoid Compounds in Common Swedish Berry Species. *Foods*, 2020, 9(3), 358.
- [59] Liu P, Lindstedt A, Markkinen N, Sinkkonen J, Suomela JP, Yang B. Characterization of metabolite profiles of leaves of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). *J Agric Food Chem*, 2014, 62(49), 12015–12026.
- [60] Lowe ME. Structure and function of pancreatic lipase and colipase. *Annu Rev Nutr*, 1997, 17, 141–158.
- [61] Maatta Riihinen KR, Kamal Eldin A, Mattila PH, Gonzalez Paramas AM, Torronen AR. Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. *J Agric Food Chem*, 2004, 60 (38), 4477–4486.
- [62] Mane C, Loonis M, Juhel C, Dufour C, Malien-Aubert C. Food Grade Lingonberry Extract: Polyphenolic Composition and In Vivo Protective Effect against Oxidative Stress. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(7), 3330–3339.

- [63] Manolescu BN, Oprea E, Mititelu M, Ruta LL, Farcasanu IC. Dietary Anthocyanins and Stroke: A Review of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Studies. *Nutrients*, 2019, 11(7), 1479.
- [64] Mates JM, Sanchez-Jimenez FM. Role of oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem*, 2000, 32(2), 157–170.
- [65] McDonald TA, Holland NT, Skibola C, Duramad P, Smith MT. Hypothesis: phenol and hydroquinone derived mainly from diet and gastrointestinal flora activity are casual factors in leukemia. *Leukemia*, 2001, 7, 10–20.
- [66] McDougall GJ, Kulkarni NN, Stewart D. Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity in vitro. *Food Chem*, 2009, 55(4), 193–199.
- [67] Milbury P. Berries and Cancer. U: Complementary and Alternative Therapies and the Aging Population. Watson RR, urednik, Cambridge, Academic Press, 2009, str. 347–370.
- [68] Misikangas M, Tanayama H, Rajakangas J, Lindén J, Pajari AM, Mutanen M. Inulin results in increased levels of  $\beta$ -catenin and cyclin D1 as the adenomas increase in size from small to large in the Min/+ mouse. *Br J Nutr*, 2008, 99(5), 963-970.
- [69] Moerman D. Native American Ethnobotany. Oregon, Timber Press, 1998, str. 723.
- [70] Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, Marks JS. Prevalence of Obesity, Diabetes and Obesity-Related Health Risk Factors. *JAMA*, 2003, 289(1), 76–79.
- [71] Mulvihill C, Quigley R. The management of obesity and overweight: An analysis of reviews of diet, physical activity and behavioural approaches. Health Development Agency, London, 2003, 7-59.
- [72] Neveu V, Perez-Jimenez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L, Knox C, Eisner R, Cruz J, Wishart D, Scalbert A. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. Database (Oxford), 2010, bap024.
- [73] Ng QX, Peters C, Venkatanarayanan N, Goh YY, Ho CYX, Yeo WS. Use of *Lactobacillus* spp. to Prevent Recurrent Urinary Tract Infections in Females. *Med Hypotheses*, 2018, 114, 49–54.
- [74] Nile SH, Park SW. Edible berries: bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 2014, 30(2), 134–144.
- [75] Nohynek LJ, Alakomi HL, Kähkönen MP, Heinonen M, Helander IM, Oksman-Caldentey KM, Puupponen-Pimiä RH. Berry Phenolics: Antimicrobial Properties and Mechanisms of Action Against Severe Human Pathogens. *Nutr Cancer*, 2006, 138(9), 18–32.

- [76] Nowack R, Schmitt W. Cranberry juice for prophylaxis of urinary tract infections- conclusions from clinical experience and research. *Phytomedicine*, 2008, 15(9), 653–667.
- [77] Obesity and overweight, 2020., <https://www.who.int>, pristupljeno 10.4.2020.
- [78] Ogawa K, Kuse Y, Tsuruma K, Kobayashi S, Shimazawa M, Hara H. Protective effects of bilberry and lingonberry extracts against blue light-emitting diode light-induced retinal photoreceptor cell damage in vitro. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14, 120.
- [79] O'Keefe JH, Gheewala NM, O'Keefe JO. Dietary strategies for improving post-prandial glucose, lipids, inflammation, and cardiovascular health. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 51(3), 249–255.
- [80] Okuda T, Ito H. Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants- Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Molecules*, 2011, 16, 2191–2217.
- [81] Olsson ME, Gustavsson KE, Andersson S, Nilsson K, Duan RD. Inhibition of Cancer Cell Proliferation in Vitro by Fruit and Berry Extracts and Correlations with Antioxidant Levels. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(24), 7264–7271.
- [82] Padmanabhan P, Correa-Betanzo J, Paliyath G. Berries and Related Fruits U: Encyclopedia of Food and Health. Caballero B, Finglas PM, Toldra F, urednici, Cambridge, Academic Press, Elsevier, 2016, str. 364–371.
- [83] Pan P, Lam V, Salzman N, Huang YW, Yu J, Zhang J, Wang LS. Black Raspberries and Their Anthocyanin and Fiber Fractions Alter the Composition and Diversity of Gut Microbiota in F-344 Rats. *Nutr Cancer*, 2017, 69(6), 943–951.
- [84] Pärnänen P, Nikula-Ijäs P, Sorsa T. Antimicrobial and Anti-inflammatory Lingonberry Mouthwash - A Clinical Pilot Study in the Oral Cavity. *Microorganisms*, 2019, 7(9), 331.
- [85] Pyka A, Bober K, Stolarczyk A. Densitometric determination of arbutin in cowberry leaves (*vaccinium vitis idaeae*). *Acta Pol Pharm*, 2007, 395–400.
- [86] Quintus J, Kovar KA, Link P, Hamacher H. Urinary excretion of arbutin metabolites after oral administration of bearberry leaf extracts. *Planta Med*, 2005, 64(5), 147 –152.
- [87] Ranelletti FO, Maggiano N, Serra FG, Ricci R, Larocca LM, Lanza P, Scambia G, Fattorossi A, Capelli A, Piantelli M. Quercetin inhibits p21-ras expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors. *Int J Cancer*, 2000, 15(2), 438–445.
- [88] Rangari VD. Pharmacognosy Tannin Containing Drugs, J. L. Chaturvedi College of Pharmacy 846, New Nandanvan, Nagpur, 2007.

- [89] Raudone L, Vilkickyte G, Pitkauskaitė L, Raudonis R, Vainoriene R, Motiekaityte V. Antioxidant Activities of *Vaccinium vitis-idaea* L. Leaves within Cultivars and Their Phenolic Compounds. *Molecules*, 2019, 24(5), 844.
- [90] Ronald A. The Etiology of Urinary Tract Infection: Traditional and Emerging Pathogens. *Dis Mon*, 2003, 49(2), 71–82.
- [91] Ryyti R, Hämäläinen M, Peltola R, Moilanen E. Beneficial effects of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) supplementation on metabolic and inflammatory adverse effects induced by high-fat diet in a mouse model of obesity. *PLoS One*, 2020, 15(5), e0232605.
- [92] Salvatore S, Salvatore S, Cattoni E, Siesto G, Serati M, Sorice P, Torella M. Urinary infections in women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2011, 156(2), 131–136.
- [93] Sari EK, Heikki K, Sampo M, Ari T. Characterization of Phenolic Compounds from Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*). *J Agric Food Chem*, 2006, 54(26), 9834–9842.
- [94] Sheerin NS, Glover EK. Urinary tract infection. *Medicine*, 2019, 57(9), 546–550.
- [95] Shi N, Chen F, Zhang X, Clinton SK, Tang X, Sun Z, Chen T. Suppression of oxidative stress and NFκB/MAPK signaling by lyophilized black raspberries for esophageal cancer prevention in rats. *Nutrients*, 2017, 9(4), 413.
- [96] Sjöström L, Rissanen A, Andersen T, Boldrin M. Randomised placebo-controlled trial of Orlistat for weight loss and prevention of weight regain in obese patients. *Lancet*, 1998, 352(9123), 167–172.
- [97] Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit and cancer prevention: A review. *J Am Diet Assoc*, 1996, 96(10), 1027–1039.
- [98] Surh YJ, Na HK, Lee JY, Keum YS. Molecular mechanisms underlying antitumor promoting activities of heat-processed *Panax ginseng* CA Meyer. *J Korean Med Sci*, 2001, 16, 38–41.
- [99] *Vaccinium vitis-idaea*, 2011., <http://www.landscapeplants.oregonstate.edu>, pristupljeno 30.06. 2020.
- [100] Vilkickyte G, Raudonis R, Motiekaityte V, Vainoriene R, Burdulis D, Viskelis J, Raudone L. Composition of Sugars in Wild and Cultivated Lingonberries (*Vaccinium vitis-idaea* L.). *Molecules*, 2019, 24, 4225.
- [101] Vyas P, Kalidindi S, Chibrikova L, Igamberdiev AU, Weber JT. Chemical analysis and effect of blueberry and lingonberry fruits and leaves against glutamate-mediated excitotoxicity. *J Agric Food Chem*, 2013, 61 (32), 7769–7776.

- [102] Wang SY, Feng R, Bowman L, Penhallegon R, Ding M, Lu Y. Antioxidant Activity in Lingonberries (*Vaccinium vitis-idaea* L.) and Its Inhibitory Effect on Activator Protein-1, Nuclear Factor-KB, and Mitogen-Activated Protein Kinases Activation. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(8), 3156–3166.
- [103] Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(3), 228–234.
- [104] Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science*, 1999, 286(5439), 481–486.
- [105] Yarnell E. Botanical medicines for the urinary tract. *World J Urol*, 2002, 20(5), 285–293.
- [106] Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(1), 37–50.
- [107] Zhang LL, Lin YM. Tannins from *Canarium album* with potent antioxidant activity. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008, 9(5), 407–415.
- [108] Zheng W, Wang SY. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries, and Lingonberries. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(2), 502–509.



## 7. SAŽETAK

U okviru ovog diplomskog rada provedena je analiza arbutina i trjeslovina u čajevima od listova vrste *Vaccinium vitis-idaea* (*Ericaceae*), tj. brusnice. Kvantifikacija arbutina provedena je koristeći farmakopejske metode, UV-Vis spektrofotometriju i tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, za određivanje derivata hidrokinona. Čaj od lista brusnice proizvođača Suban sadržava najveći udio hidrokinonskih derivata od svih uzoraka u iznosu od 5,94 % (na 455 nm prema metodi) izraženih kao arbutin, dok čaj proizvođača Agristar omogućuje unos najviše dnevne doze arbutina u iznosu od 251,10 mg. Kvantifikacija trjeslovina provedena je farmakopejskom metodom UV-Vis spektrofotometrije za određivanje trjeslovina. Čaj od lista brusnice proizvođača Suban sadržava najveći udio trjeslovina od svih uzoraka u iznosu od 4,18 % (na 760 nm prema metodi) izraženih kao pirogalol. Rezultati upućuju na to da brusnica ima potencijal za korištenje u liječenju urinarnih infekcija s lakšim i manje učestalim gastrointestinalnim nuspojavama u odnosu na list medvjette.

## SUMMARY

As part of this diploma thesis, an analysis of arbutin and tannins in teas made from the leaves of the species *Vaccinium vitis-idaea* (*Ericaceae*), ie lingonberries, was performed. Quantification of arbutin was performed using pharmacopoeial methods, UV-Vis spectrophotometry and high performance liquid chromatography, for the determination of hydroquinone derivatives. Suban's lingonberry leaf tea contains the highest proportion of hydroquinone derivatives of all samples in the amount of 5.94% (455 nm according to the method) expressed as arbutin, while Agristar's tea allows the intake of the highest daily dose of arbutin in the amount of 251.10 mg. Quantification of tannins was performed by pharmacopoeial method of UV-Vis spectrophotometry for the determination of tannins. Suban's lingonberry leaf tea contains the most tannins of all samples and this was 4.18 % (760 nm according to the method) expressed as pyrogallol. The results suggest that lingonberry has the potential for use in the treatment of urinary tract infections with milder and less frequent gastrointestinal side effects compared to bearberry leaf.

## **8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD**

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za Farmakognoziju  
Trg Marka Marulića 20, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### ODREĐIVANJE SADRŽAJA ARBUTINA I TRJESLOVINA U LISTU BRUSNICE, *VACCINIUM VITIS-IDAEA L.*

Iva Radman

#### SAŽETAK

U okviru ovog diplomskog rada provedena je analiza arbutina i trjeslovina u čajevima od listova vrste *Vaccinium vitis-idaea* (*Ericaceae*), tj. brusnice. Kvantifikacija arbutina provedena je koristeći farmakopejske metode, UV-Vis spektrofotometriju i tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, za određivanje derivata hidrokinona. Čaj od lista brusnice proizvođača Suban sadržava najveći udio hidrokinonskih derivata od svih uzoraka u iznosu od 5,94 % (na 455 nm prema metodi) izraženih kao arbutin, dok čaj proizvođača Agristar omogućuje unos najviše dnevne doze arbutina u iznosu od 251,10 mg. Kvantifikacija trjeslovina provedena je farmakopejskom metodom UV-Vis spektrofotometrije za određivanje trjeslovina. Čaj od lista brusnice proizvođača Suban sadržava najveći udio trjeslovina od svih uzoraka u iznosu od 4,18 % (na 760 nm prema metodi) izraženih kao pirogalol. Rezultati upućuju na to da brusnica ima potencijal za korištenje u liječenju urinarnih infekcija s lakšim i manje učestalim gastrointestinalnim nuspojavama u odnosu na list medvjetteke.

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

Rad sadrži: 37 stranica, 3 grafička prikaza, 3 tablice i 108 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Vaccinium vitis-idaea*, arbutin, trjeslovine

Mentor: **Dr. sc. Maja Bival Štefan**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Bival Štefan**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Jasna Jablan**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2020.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### **DETERMINATION OF ARBUTIN AND TANNIN CONTENT IN LINGONBERRY LEAF, *VACCINIUM VITIS-IDAEA* L.**

**Iva Radman**

#### **SUMMARY**

As part of this diploma thesis, an analysis of arbutin and tannins in teas made from the leaves of the species *Vaccinium vitis-idaea* (*Ericaceae*), ie lingonberries, was performed. Quantification of arbutin was performed using pharmacopoeial methods, UV-Vis spectrophotometry and high performance liquid chromatography, for the determination of hydroquinone derivatives. Suban's lingonberry leaf tea contains the highest proportion of hydroquinone derivatives of all samples in the amount of 5.94% (455 nm according to the method) expressed as arbutin, while Agristar's tea allows the intake of the highest daily dose of arbutin in the amount of 251.10 mg. Quantification of tannins was performed by pharmacopoeial method of UV-Vis spectrophotometry for the determination of tannins. Suban's lingonberry leaf tea contains the most tannins of all samples and this was 4.18 % (760 nm according to the method) expressed as pyrogallol. The results suggest that lingonberry has the potential for use in the treatment of urinary tract infections with milder and less frequent gastrointestinal side effects compared to bearberry leaf.

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

Thesis includes: 37 pages, 3 figures, 3 tables and 108 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Vaccinium vitis-idaea*, arbutin, tannins

Mentor: **Maja Bival Štefan, Ph.D.** AssistantProfessor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Maja Bival Štefan, Ph.D.** AssistantProfessor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Marijana Zovko Končić, Ph.D.** FullProfessor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Jasna Jablan, Ph.D.** AssistantProfessor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2020.