

**Antonio Boroš**

**Kvalitativna i kvantitativna analiza ukupnih  
polifenola i trjeslovina vrste *Arbutus unedo* L.  
(Ericaceae), populacije Lošinj i Koločep**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

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

*Iskrena zahvala dr. sc. Karlu Jurici na ustupljenom biljnom materijalu za provedena istraživanja.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Botanički podatci</b> .....	2
1.1.1. Porodica Ericaceae Juss. 1789. (vriješovke, vriješovi) .....	2
1.1.2. Rod <i>Arbutus</i> L. (planika).....	3
1.1.3. Vrsta <i>Arbutus unedo</i> L. – obična planika, maginja.....	4
<b>1.2. Pregled istraživanja vrste <i>Arbutus unedo</i> L.</b> .....	6
<b>1.3. Ispitivane biološki aktivne tvari vrste <i>Arbutus unedo</i> L.</b> .....	8
1.3.1. Polifenoli .....	8
1.3.2. Trjeslovine.....	11
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	16
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	17
<b>3.1. Biljni materijal</b> .....	17
<b>3.2. Aparatura i kemikalije</b> .....	17
<b>3.3. Metode i postupci istraživanja</b> .....	18
3.3.1. Kvalitativna analiza trjeslovina.....	18
3.3.1. Kvantitativna analiza polifenola i trjeslovina.....	19
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	21
<b>4.1. Rezultati kvalitativne analize trjeslovina vrste <i>A. unedo</i> L.</b> .....	21
<b>4.2. Rezultati kvantitativne analize ukupnih polifenola i trjeslovina vrste <i>A. unedo</i> L.</b> ....	22
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	27
<b>6. LITERATURA</b> .....	29
<b>7. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	33
<b>8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

# 1. UVOD

Čovjek je u davnini živio nomadskim načinom života u prirodnom okruženju kojemu se morao što bolje prilagoditi kako bi preživio. U takvim surovim uvjetima preživjeti su mogli samo oni najvjешitiji i najotporniji pripadnici vrste, pa su ljudi morali naučiti kako te okolišne uvjete iskoristiti i preokrenuti u svoju korist. Primjena bilja kao pomoć, npr. pri zacjeljivanju rana, predstavlja same početke fitoterapije, koja je kroz godine prošla brojne korake istraživanja da bi dostigla današnju razinu u modernom društvu.

Pod pojmom fitoterapije podrazumijeva se korištenje cjelovitih ljekovitih biljaka, njihovih pojedinih dijelova (list, cvijet, korijen), pripravaka koji potječu od istih (suhi ekstrakti, tinkture, uvarci i sl.) ili posebnih biljnih sastojaka (poput eteričnih ulja), u terapijske svrhe, s ciljem prevencije, ublažavanja ili liječenja raznih oboljenja. Suvremena fitoterapija temeljena je na mnogobrojnim kemijskim istraživanjima sastava biljnih spojeva, dokazima kliničkih studija kojima su ti spojevi podvrgnuti te u konačnici dugogodišnjom praksom primjene (Kuštrak, 2005). Uzevši u obzir sve navedeno, ne može se smatrati alternativnom medicinom, kako je neki nazivaju, već dijelom znanstvene i na dokazima utemeljene medicine, jer se samo na takav interdisciplinarni način može i mora pristupiti racionalnom liječenju bolesti kako zdravlje pacijenta ne bi bilo dodatno ugroženo. Činjenica je da fitokemijski sastav ovisi o mnogim čimbenicima, poput biljne vrste, lokaliteta i vremenskih uvjeta u kojima je jedinka dozrijevala pa je proizvođač dužan standardizirati svoje pripravke kako bi u gotovom proizvodu jamčio odgovarajuću količinu aktivnih komponenata. Samo takvi pripravci mogu zadovoljiti sve preduvjete koje pred njih stavlja Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) (<http://www.halmed.hr/>), kako bi na tržištu mogli biti registrirani kao biljni lijekovi. Za razliku od njih, biljni dodaci prehrani ne moraju proći tako zahtjevnu proceduru jer su pod ingerencijom Ministarstva zdravstva RH temeljem Direktive 2002/46/EZ pravilnika o dodacima prehrani, pa kao takvi ne moraju imati dozu standardiziranu na sastavnice odgovorne za terapijski učinak jer služe za obogaćivanje prehrane radi održavanja zdravlja.

U okviru ovog diplomskog rada provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza biološki aktivnih polifenola iz listova i plodova različitih populacija vrste *Arbutus unedo* L. (*Ericaceae*) s područja sjevernog i južnog Jadrana, što omogućuje bolju fitokemijsku karakterizaciju s ciljem ostvarenja punog potencijala primjene navedene biljne vrste u terapijske svrhe.

## 1.1. Botanički podatci

### 1.1.1 Porodica Ericaceae Juss. 1789. (vrijesovke, vrijesovi)

Porodici Ericaceae ime je prvi nadjenio francuski botaničar Antoine Laurent de Jussieu, temeljem sličnosti više različitih rodova biljaka. Ona obuhvaća oko 120 različitih rodova koji zajedno broje preko 4000 vrsta, čime spada među najbrojnije biljne porodice. Rasprostranjene su po svim kontinentima, izuzev određenih područja u Australiji i Antarktici, što govori u prilog njihovoj prilagodljivosti staništu. Još jedan primjer toga njihova je sposobnost rasta na kiselim i neplodnim tlima. Važniji rodovi ove porodice su: *Arbutus* (npr. planika – *Arbutus unedo*), *Arctostaphylos* (npr. medvjетка – *Arctostaphylos uva-ursi*), *Calluna* (npr. obični vrijes – *Calluna vulgaris*), *Erica* (npr. proljetna crnjuša – *Erica carnea*), *Rhododendron* (npr. indijska azaleja – *Rhododendron indicum*), *Vaccinium* (npr. borovnica – *Vaccinium myrtillus*, brusnica – *Vaccinium vitis-idaea*).

Vrijesovke su trajnice, uglavnom trajnozeleni grmovi, polugrmovi i drveća, te kao takvi mogu rasti samostalno, no određene vrste žive epifitskim načinom života (npr. *Cavendishia grandifolia*) (Ludeyn). Listovi su im većinom vazdazeleni, izgledom su cjeloviti (iznimka je primjerice crnjuša, *Erica carnea*, čiji su listovi igličasti), jednostavni i linearni, poredani naizmjenično, a imaju obilježja tvrdolisnih biljaka, pa su kožnati i siromašni sokom (Nikolić, 2013).

Zbog svojih brojnih korisnih svojstava i prirodnih produkata, biljke vrijesovke imaju široku upotrebu i ekonomski značaj. Tako, primjerice, čovjek koristi plodove borovnice za jelo, a plod brusnice, osim prehrambene, ima i medicinsku primjenu kod ispiranja mokraćnih puteva. List medvjette poznat je još iz narodne medicine Sjeverne Amerike i Europe po svom diuretičkom i uroantiseptičkom učinku, isti izvori govore i o blagotvornim učincima planike po zdravlje pojedinca, a još neke biljke te porodice mogu se koristiti i u dekorativne svrhe, poput crnjuše i azaleje.

U Republici Hrvatskoj rasprostranjeni su razni rodovi porodice Ericaceae, poput roda *Arbutus*, *Erica*, *Rhododendron* i *Vaccinium*, a u okviru ovoga diplomskog rada fokus je upravo bio na rodu *Arbutus* koji je zastupljen s više biljnih vrsta, većinom u priobalnom dijelu RH.



Slika 1. Prikaz rasprostranjenosti vrste *Arbutus unedo* L. u Republici Hrvatskoj, Nikolić T. ur. (2015): Flora Croatica baza podataka.

### 1.1.2. Rod *Arbutus* L. (planika)

Biljke iz roda planika su drvenasti, vazdazeleni grmovi, rjeđe manja stabla. Listovi su im jednostavni, cjeloviti i kožasti, poredani izmjenično, nasuprotno ili u prividnim pršljenima. Biljke su jednodomne, cvjetovi su dvospolni s dvostrukim ocvijećem, čaške sastavljene od 4-5 pri osnovici sraslih lapova, a vjenčića redovito zvonastog i sulatičnog, sastavljenog od 4-5 latica. Plodnica tučka je dominantno nadrasla te sadrži 3-5 pretinaca s jednim ili više sjemenih zametaka u svakom od pretinaca. Stoga njihova cvjetna formula glasi:  $*K_{(5)} C_{(5)} A_{5+5} G_{(5)}$ . Plodovi su u obliku tobolca ili bobice, crvenkastonarančaste boje te su slatki i jestivi (Nikolić, 2013).

Rod obuhvaća 12 vazdazelenih vrsta biljaka, a prisutni su još i hibridi nastali križanjem tih istih vrsta. Vrste *Arbutus andrachne* L., *A. canariensis* (Duhamel), *A. pavarii* (Pampan) te *A. unedo* L. obitavaju na području zapadne Europe, Sredozemlja, Male Azije i sjeverne Afrike, dok je preostalih 8 vrsta rasprostranjeno na sjevernoameričkom kontinentu, točnije u SAD-u i Meksiku.

### 1.1.3. *Arbutus unedo* L. (obična planika, maginja)

Planika je višegodišnja vazdazelena vrsta koja raste u obliku niskog drveta ili grma, visoka od 1,5 do 3 metra (može narasti i do 12 m). U Hrvatskoj raste duž cijele obale, od Istre do Južnog Primorja, i to na rubnim dijelovima šuma, na nepristupačnim predjelima te stjenovitim padinama. To joj omogućava njen razgranati korijenski sustav, odlično prilagođen vapnenačkim kamenjarima i pukotinama stijena. Kora je u starijih grana crveno smeđa, a na deblu sivo smeđa do crvenkasta, te se ljušti u uzdužnim uskim ljuskama (Maleš i sur., 2006; Šilić, 2005). Listovi su naizmjenično raspoređeni, cjeloviti, eliptični do izduženi, nazubljena ruba, tamno zeleni, kožasti, dugi 5-10 cm i široki 2-3 cm s kratkom crvenkastom peteljkom dugom 3-10 mm. Biljke su jednodomne (na istoj jedinci pojavljuju se i muški i ženski cvjetovi), a cvjetovi su oblika zvona ili vrča, s unatrag povijenim režnjevima oboda. Dugi su 8-9 mm, bijele boje, no mogu biti prožeti ružičastim ili zelenim tonovima. Aktinomorfni i dvospolni cvjetovi imaju dvostruko ocvijeće, čija je čaška sastavljena od 4-5, pri osnovici obično sraslih lapova, dok je vjenčić sulatičan i sastavljen od 4-5 latica. Skupljeni su u grozdaste cvatove te mirišu na med, a vrijeme cvatnje im je od listopada do prosinca. U cvijetu se nalazi jedan tučak nadržale plodnice (ponekad podrasle), s 3-5 pretinaca koji sadrže 1 ili više sjemenih zametaka, dok je broj prašnika većinom dvostruko veći od broja latica ili 5, a prirasli su za cvjetišta ili disk. Budući da se plodovi pojavljuju tek 5 mjeseci nakon oprašivanja, cvjetovi se pojavljuju u vrijeme dok prošlogodišnji plodovi još uvijek sazrijevaju. Ti plodovi maginje su višesjemene okrugle bobice promjera 20-30 mm, zelene, žute do svijetlocrvene boje, ovisno o stupnju zrelosti. Maginja je u unutrašnjosti mesnato brašnjava i sočna, a na površini bradavičasto točkasta. Sjeme je sitno i izduženo, smeđe boje. Plod je u sirovom stanju jestiv i ukusan, no konzumacija većih količina može izazvati probavne smetnje i stanje slično omaglici ili pijanstvu (Lim, 2012; Grdinić i Kremer, 2009; Domac, 2002).

Korist primjene planike uvidjela su još i stara indijanska plemena koja su upotrebljavala listove i koru pri liječenju raznih stanja, poput prehlade, želučanih problema, pa čak i tuberkuloze. Samo deblo bilo im je korisno za ogrjev jer zbog visoke kalorimetrijske vrijednosti gori dugo i polako, proizvodeći pritom veću količinu topline (Alaback, 1994). Iz plodova se širi slatkasti miris, zbog čega biljka ima nadimak „drvo jagoda“ pa je kao takva izvor hrane brojnim životinjama, primjerice medvjedima. Maginje se koriste i za izradu alkoholnih likera koji u narodu imaju različita imena, pa ga tako Portugalci zovu „medronho“, Grci „koumaro“, Talijani „corbezzolo“ itd. (Soufleros i sur., 2005).



Slika 2. *Arbutus unedo* L., Ericaceae (foto: S. Maslo, Flora Croatica baza podataka).

### **Kemijski sastav**

Kemijski sastojci, poput eteričnog ulja, karotenoida, flavonoida (kvercitrin, izokvercitrin, hiperozid, rutin), fenolne kiseline (klorogenska, kavena i p-kumarinska kiselina), vitamina C i E, biljnih vlakana pektina, terpenoida, masnih i organskih kiselina, koji su prisutni u različitim dijelovima biljke, povezani su sa zdravstvenim potencijalom. Navedeni spojevi nalaze se u lišću, plodovima, korijenu i kori biljke, pri čemu je najveći udio polifenola zastupljen u listovima, a trjeslovina u kori i korijenu jedinki (Maleš i sur., 2015; Jurica i sur., 2013).

### **Farmakološko djelovanje i uporaba lista planike**

Od bioloških učinaka planike najviše je istraženo njezino antioksidativno i antimikrobno djelovanje. U kontekstu narodne medicine, planika se primjenjuje kod liječenja prehlade, povišenog krvnog tlaka, oboljenja srca, dijabetesa, kao pomoć kod upalnih procesa kože i sluznice, za smirivanje manjih krvarenja, ali najčešće prilikom rješavanja gastrointestinalnih i uroloških problema kao blagi lasksans, diuretik i uroantiseptik (Jurica i sur., 2013). Većina navedenih učinaka odnosi se na primjenu lista planike u obliku čajeva ili uvaraka jer je u njima najviše aktivnih polifenola zaslužnih za djelovanje. Stanovnici mediteranskih zemalja implementirali su plodove maginje u svoju gastronomiju, pa tako od njih priređuju džemove te alkoholna pića (Nikolić, 2013).



## 1.2. Pregled istraživanja vrste *Arbutus unedo* L.

Premda ona u Hrvatskoj još nije u potpunosti iskorištena, čak ni u prehrambene svrhe, proveden je značajan broj znanstvenih istraživanja o mogućoj primjeni planike u obliku farmaceutskih pripravaka, prvenstveno zbog antioksidativnih svojstava njezinih flavonoidnih spojeva.

Polifenoli su poznati po svom antioksidativnom učinku, pa su mnoga istraživanja bila usmjerena prema ispitivanju njihovih udjela i aktivnosti u ekstraktima biljnih vrsta koje ih sadrže. Skupina portugalskih znanstvenika radila je *in vitro* ispitivanje antioksidativnog potencijala polifenola iz plodova planike, usporedbom s vrijednostima plodova maline *Rubus idaeus* L. Također su provodili istraživanje i na modelu neurodegenerativnih stanica, a rezultati su pokazali da je u obje vrste prisutna slična količina polifenola koji imaju i sličan *in vitro* kapacitet antioksidativnog djelovanja (kod planike je bio nešto manji nego kod maline). Usprkos tome, planika nije uspjela smanjiti razvoj degenerativnih stanica neuroblastoma, za razliku od maline, koja je pokazala stopu smanjenja od 36,6%, čime se dokazalo da kemijski određene razine antioksidansa nemaju uvijek i popratni biološki značaj (Fortalezas i sur., 2010).

Temeljem antineoplastičnog učinka lektina, dokazanog u raznim *in vitro*, *in vivo* i pretkliničkim ispitivanjima antitumorskih lijekova, provedena je studija koja je pratila vezanje lektina iz listova raznih vrsta mediteranskih biljaka za specifični tumorski marker HT29. Zbog selektivnosti vezanja proteina na HT29 glikozilirane stanične receptore, vrste *Juniperus oxycedrus* subs. *badia* i *Arbutus unedo* predložene su za daljnji nastavak ispitivanja njihova antitumorskog potencijala (Oliveira i sur., 2019).

Marokanska studija pokazala je da vodeno-etanolni ekstrakt listova planike *Arbutus unedo* L. može biti koristan u prevenciji nastanka kamenaca u bubrežima i ostatku urinarnog trakta, jer unutar koncentracijskog niza smanjuje kristalizaciju kalcijeva oksalata do 69,41%, a njihovu agregaciju čak do 93,92% (Kachkoul i sur., 2018).

Potencijalna nefrotoksičnost vodenog ekstrakta lista planike i njegovog glavnog sastojka arbutina ispitivana je na Lewisovim štakorima u dozi od 200 mg/kg tjelesne težine dnevno tijekom 28 dana. Studija je pokazala da ekstrakt planike nije utjecao na integritet DNA renalnih stanica, za razliku od izoliranog arbutina koji je uzrokovao primarna oštećenja DNA zbog svoje metaboličke pretvorbe u hidrokinon (Jurica i sur., 2018).

Ispitani su antimikrobni učinci lista vrste *A. unedo* na 15 uropatogenih mikroba i utvrđeno je u kojoj je mjeri arbutin, kao najzastupljeniji bioaktivni spoj u listovima,

odgovoran za njihovu antimikrobnu aktivnost. Antimikrobno djelovanje ekstrakta lista planike protiv urinarnih patogenih mikroorganizama ispitano je pomoću difuzijske i mikrodilucijske metode. Određen je sadržaj ukupnih polifenola, trjeslovina, flavonoida i fenolnih kiselina upotrebom spektrofotometrijskih metoda, potom arbutin i hidrokinonske masene frakcije primjenom HPLC-DAD metode te antioksidativna aktivnost pomoću FRAP, ABTS i DPPH testa. Iako se pokazalo da je metanol učinkovitije otapalo za ekstrakciju polifenola iz listova, vodeni ekstrakt koji se može koristiti u kliničkoj praksi pokazao je slična antimikrobna svojstva. Dok arbutin nije pokazao izravnu antimikrobnu aktivnost, njegov je hidrokinonski metabolit imao snažno antimikrobno djelovanje na testirane uropatogene organizme. Najznačajnija antimikrobna aktivnost ekstrakta lista planike zabilježena je za uropatogene sojeve vrste *Enterococcus faecalis* (Jurica i sur., 2017).

Vazdazeleno lišće planike ne sadrži tijekom cijele godine jednake količine svojih aktivnih sastavnica, što ovisi i o vanjskim uvjetima kojima je biljka izložena. Na tom je tragu grčka skupina znanstvenika, promjenama količine UV-A i UV-B zračenja te količine vode, pokazala prateće promjene u razinama i sastavu polifenolnih spojeva izoliranih iz listova. Na temelju tih rezultata zaljučili su kako najveći antioksidativni potencijal imaju listovi ubrani u jesen ili u zimi, jer su tada prisutne najveće koncentracije ukupnih polifenolnih spojeva (Nenadis i sur., 2015).

Antimikrobni učinak ispitan je u više različitih studija, pa je tako dokazano da nesaponificirana frakcija ekstrakta listova i stabljike planike inhibira rast bakterija *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* i *Candida albicans* (Diba i sur., 2010). Antioksidativna sposobnost polifenola iz ekstrakta lista planike iskorištena je u jednoj studiji za redukciju metalnih iona srebra, njihovu pretvorbu u nanočestice te za stabilizaciju istih, jer je takav način redukcije jeftiniji i ekološki ispravniji od teških, klasičnih kemijskih postupaka. U konačnici su takve čestice srebra predstavljale minimalan rizik od nastanka bakterijske rezistencije ili toksičnosti po ljudske stanice nakupljanjem čestica srebra, a pokazale su se učinkovitima protiv vrsta *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus epidermidis* (Skandalis i sur., 2017).

Antidijabetički učinak planike ispitan je na primjeru vodenog ekstrakta kore korijena, pri čemu se koncentracija od 1 mg/mL pokazala najučinkovitijom u inhibiciji natrij-ovisnog transporta glukoze u izoliranom jejunumu miševa. Ingestija tijekom perioda od 6 tjedana pridonijela je toleranciji na glukozu jednako učinkovito kao i metformin (300 mg/kg dnevno) te je kao i on pridonijela smanjenju tjelesne težine (Mrabti i sur., 2019).

## 1.3. Ispitivane biološki aktivne tvari vrste *Arbutus unedo* L.

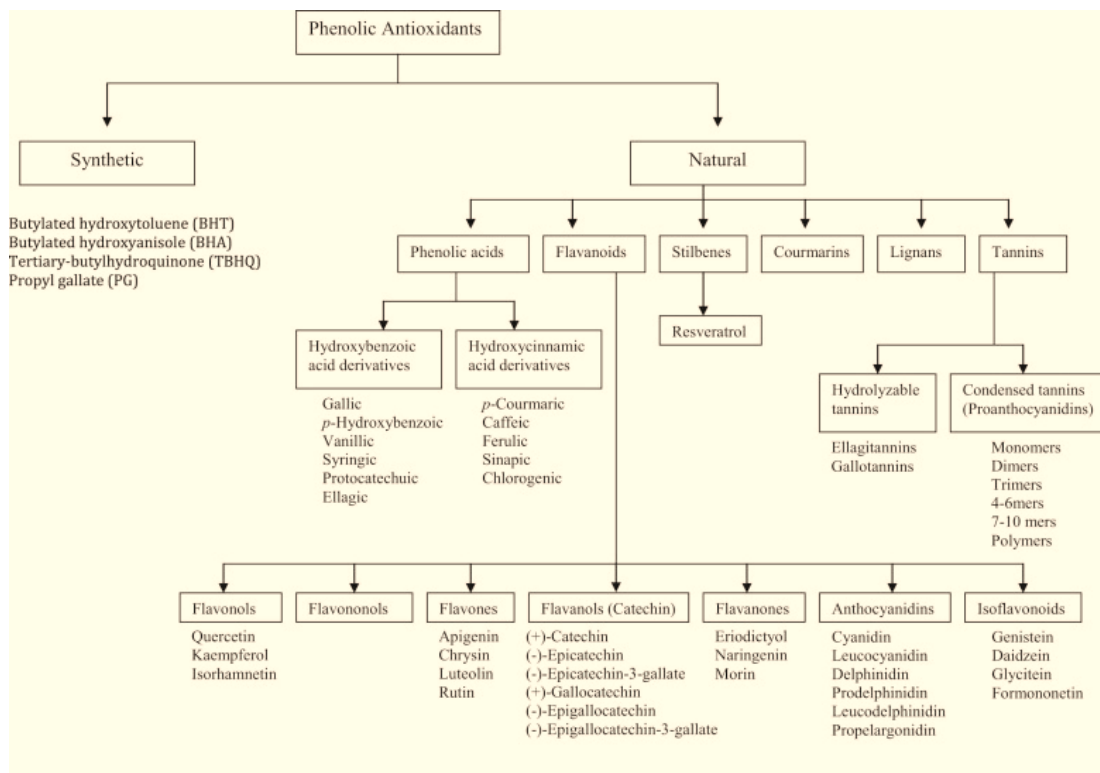
### 1.3.1. Polifenoli

#### *Struktura i značajke*

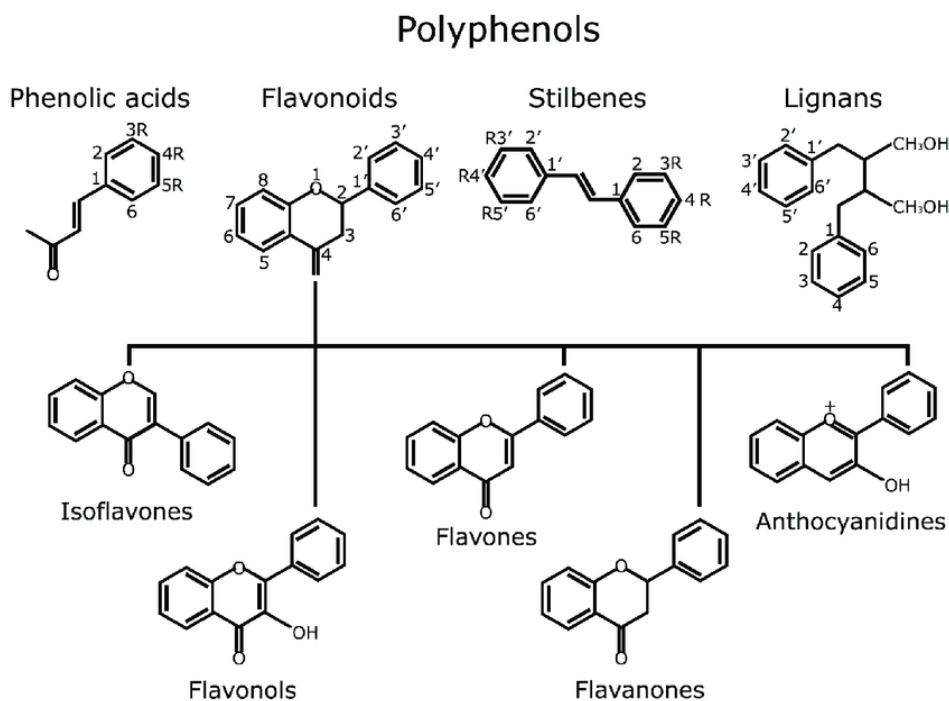
Polifenoli predstavljaju jednu od najvećih i najrasprostranjenijih skupina spojeva u biljnom svijetu, s više od 8000 različitih kemijskih struktura (Bravo, 1998). Nastaju sekundarnim metabolizmom, a imaju protektivnu ulogu u biljaka, braneći ih od vanjskih čimbenika poput UV zračenja ili nekih kemijskih agenasa. Budući da je kod svih pripadnika prisutan jedan ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova, dijele se u skupine, ovisno o broju fenolnih prstenova te o strukturnim elementima koji te prstenove povezuju, pa stoga razlikujemo fenolne kiseline, flavonoide i ostale (lignani, kumarini, stilbeni itd.). Skupinu fenolnih kiselina čine derivati hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline. Nepromjenjivi dio strukture flavonoida sastavljen je od dva benzenska prstena međusobno povezana propanskim lancem, koji može reagirati sa supstituentima na benzenu i tako stvoriti novi prsten. Stilbeni su polifenoli koji nemaju osnovnu građu flavonoida, a sadrže 1,2-difeniletan kao funkcionalnu skupinu, dok su lignani produkti oksidativne dimerizacije dviju fenilpropanolnih jedinica te djeluju kao fitoestrogeni (Rastija i Medić-Šarić, 2009; Vladimir-Knežević, 2008).

Polifenoli se stvaraju dvama glavnim biosintetskim putevima: put šikiminske kiseline i acetatni put (acilpolimalonatni put). Šikiminska kiselina je ključna tvar u onom u kojem nastaju aromatski prirodni spojevi. Univerzalni je prekursor u biosintezi aromatskih aminokiselina u mikroorganizmima (bakterije, gljivice) i višim biljkama, no ne i u životinjskim organizmima (Vladimir-Knežević, 2008; Bravo, 1998).

Prirodni polifenoli primarno dolaze u konjugiranom obliku, s jednom ili više šećernih jedinica vezanih na hidroksilnu skupinu (premda postoje i oblici u kojima su šećerne jedinice izravno vezane na aromatski ugljikov atom). Vezani šećeri mogu biti monosaharidi, disaharidi ili čak oligosaharidi. Najčešća šećerna komponenta je glukoza, iako su nađene i galaktoza, ramnoza, ksiloza i arabinoza, te glukuronska i galakturonska kiselina. Moguće su i konjugacije polifenola s drugim tvarima, kao što su karboksilne i organske kiseline, amini i lipidi, a česte su i konjugacije s drugim fenolnim spojevima (Bravo, 1998).



Slika 3. Podjela polifenola prema njihovoj kemijskoj strukturi (Shahidi i sur., 2015).



Slika 4. Kemijske strukture odabranih polifenola (Losada-Echeberria i sur., 2017).

### *Rasprostranjenost*

Polifenoli su glavni antioksidansi u našoj prehrani koje dnevno hranom unesemo oko jednog grama, što je mnogo više od unosa ostalih poznatih antioksidansa (ti podatci variraju među različitim nacijama i njihovom načinu života, pa tako stanovnici zemalja Dalekog Istoka uzimaju i do 2 grama flavonoida dnevno zbog visokog unosa mahunarki, soje i čaja) (Wilczyńska i sur., 2011). Primjerice, ta je količina 10 puta veća od unosa vitamina C te 100 puta veća od unosa vitamina E i karotenoida. Glavni prehrambeni izvori polifenola su voće, voćni sokovi, čaj, kava i crno vino. Povrće, žitarice, crna čokolada, kakao i suhe mahunarke također pridonose ukupnom unosu polifenola (sušeno začinsko bilje, poput peršina i origana, sadrži velike količine gotovo svih skupina flavonoida) (Kozłowska i sur., 2014; Scalbert i sur., 2005).

S obzirom na to da su u većini namirnica smjese polifenola mnogobrojne i kompleksne, za puno biljnih produkata sastav polifenola je slabo poznat, a čimbenici koji utječu na njihov sastav su različiti. Okolišni čimbenici imaju možda najveći utjecaj, a mogu biti pedoklimatski (tip tla, izloženost sunčevoj svjetlosti, količina padalina) ili agronomski (uzgoj u stakleniku ili na otvorenom, ukupni urod po jednoj biljci i dr.). Skladištenjem također dolazi do promjena sastava onih polifenola podložnih oksidaciji, jer te reakcije oksidacije uzrokuju nastanak jedne ili više polimernih molekula, što dovodi do promjena u kakvoći namirnice, napose u boji i organoleptičkim svojstvima. Takve promjene mogu biti poželjne, primjerice u slučaju crnog čaja, ili nepoželjne, kao smeđa boja narezanog voća. Priprema hrane također ima značajan utjecaj na sadržaj polifenola u namirnicama, pa tako guljenje voća i povrća može ukloniti znatnu količinu polifenola, jer su oni više prisutni u vanjskim nego u unutarnjim dijelovima voća i povrća kako bi ih zaštitili od atmosferilija. Termička obrada isto tako umanjuje sadržaj ukupnih polifenola u biljci, zbog čega bi bilo bolje kuhati povrće na pari kako ne bi znatno izgubilo svoju nutritivnu vrijednost (Manach i sur., 2004).

### *Biološki učinci*

Ispitivanja bioloških učinaka flavonoida i ostalih polifenola, njihovih antioksidativnih svojstava i eventualne prevencije bolesti počela su tek 1995. godine, jer su do tada najproučavaniji antioksidansi bili vitamini, minerali i karotenoidi. Glavni razlog odgode početka istraživanja bila je različitost i složenost kemijskih struktura flavonoida (Scalbert i sur., 2005).

Pozitivna djelovanja polifenola navedena u znanstvenim istraživanjima obuhvaćaju: analgetsko, antialergijsko, antiaritmično, antifungalno, antihepatotoksično, antihipertenzivno,

antiinflamatorno, antikoagulativno, antimalarijsko, antimikrobno, antioksidativno, antiulkusno, diuretičko, hipoglikemijsko, kardiotonično i spazmolitičko djelovanje (Petrik, 2008).

Temeljem svog kelirajućeg i antioksidativnog djelovanja te smanjenja aktivnosti ksantin oksidaze, NADPH oksidaze i lipooksigenaze, flavonoidi inaktiviraju reaktivne kisikove i dušikove spojeve (ROS i RNS), sprječavajući tako oksidaciju plazmatskog LDL-kolesterola, što ima pozitivne učinke na epitel krvnih žila i prevenciju razvoja bolesti. Isto tako, umanjivanjem učinka ciklooksigenaze (posebice COX-2), reducira se sinteza proupalnih modulatora prostaglandina i leukotriena te agregacija trombocita pa su uočeni povoljni učinci na upale i neregulirano stvaranje krvnih ugrušaka kod ateroskleroze. Djelovanjem na navedene enzime, flavonoidi mogu stupati u interakcije s različitim signalnim putevima te tako utjecati na provođenje njihovih signala (Kozłowska i sur., 2014; Manach i sur., 2004).

Primjena polifenola kod neurodegenerativnih i kancerogenih stanja uvelike se ispituje zbog toga što su u pozadini i jednih i drugih stanja reaktivni radikali, čiji nastanak polifenoli mogu spriječiti. Tako je, primjerice, studija provedena na miševima pokazala da flavon tangeretin, prisutan u citrusima, može pomoći u liječenju Parkinsonove bolesti jer može prijeći krvno-moždanu barijeru i poništiti negativne učinke 6-hidroksidopamina na nigrostrijatalni put u mozgu (Datla i sur., 2001). Problem s provedenim studijama u tom području leži u samom postavljanju ispitivanja, jer su se provodila *in vitro* te pokusi na životinjama, uz primjene doza puno većih od onih koje ljudi unose prehranom. Usprkos svim pozitivnim efektima koji su zapaženi, nisu u potpunosti objašnjeni mehanizmi odvijanja, a negativne aspekte uzimanja velikih doza polifenola treba dodatno ispitati (Scalbert i sur., 2005).

### **1.3.2. Trjeslovine**

#### *Struktura i značajke*

Trjeslovine su raznolika skupina fenolnih spojeva nastalih kao produkti sekundarnog metabolizma biljaka. Ime im potječe iz 1796. kada je opisana njihova sposobnost da reagiraju sa životinjskom kožom pri njenoj obradi („tanning“), dovodeći do stvaranja unakrsnih veza među kolagenskim lancima. Nalaze se u gotovo svim biljnim dijelovima u relativno velikim količinama, a dodatno povećanje njihove produkcije ukazuje na bolest biljke, jer oni inače štite biljku od infekcija, kukaca i biljojeda. Karakteristike koje razlikuju trjeslovine od ostalih vrsta biljnih polifenola općenito jesu: vezivanje na proteine, baze, pigmente, velike molekule i



### Trjeslovine koje hidroliziraju

Trjeslovine koje hidroliziraju su spojevi topljivi u vodi djelovanjem mineralnih kiselina ili enzima kao što je tanaza. Njihova strukutra sadrži nekoliko molekula fenolnih kiselina, kao što su galna, heksahidrohidrofenolna ili elagna kiselina, povezanih esterskim vezama na središnju molekulu šećera, najčešće glukoze. Ovisno o fenolnim kiselinama nastalim nakon hidrolize, dalje se dijele na galotanine (sastavljene od galne kiseline) i elagtanine (sadrže heksahidrohidrofenolnu kiselinu koja nakon intraesterifikacije daje elagnu kiselinu) (Vladimir-Knežević, 2008; Rangari, 2007).

### Kondenzirane trjeslovine

Katehinske trjeslovine neće hidrolizirati na jednostavnije molekule dodatkom mineralnih kiselina ili enzima. Ukoliko se na njih svejedno djeluje kiselinama ili enzimima, ili prilikom sušenja i skladištenja biljnog materijala, najčešće će doći do njihove polimerizacije i nastanka netopljivih crvenih do smeđecrnih produkata – flobafena (npr. kod kininovca) (Hagerman, 2002). Mogu se dodatno podijeliti na oligomerne i polimerne proantocijanidine koji se razlikuju po broju i vrsti monomernih jedinica od kojih su sastavljeni, a obje vrste zagrijavanjem s mineralnim kiselinama daju obojene produkte, antocijanidine. Pritom ne dolazi do hidrolize, već do oksidativnog cijepanja, primjerice u vrućem alkoholu (Kuštrak, 2005). Osnovni strukturni element kondenziranih trjeslovina kao polimernih spojeva je flavan-3-ol: katehin i epikatehin (OH 3- $\alpha$ ), galokatehin i epigalokatehin (OH 3- $\alpha$ ) te fisetidin (s 4 OH-skupine). Ti polifenoli su često dalje povezani na ugljikohidrate ili proteine kako bi stvorili još složenije strukture (Vladimir-Knežević, 2008).

### *Rasprostranjenost*

Trjeslovine ili tanini vrlo su rasprostranjeni spojevi u biljnom svijetu. Sadrže ih već zelene alge, a u gljivama su rijetke. Jednosupnice su siromašne trjeslovinama, uz iznimku porodica Najadaceae i Typhaceae. Dvosupnice su pak bogatije taninima, posebice porodice Aceraceae, Actinidaceae, Anacardiaceae, Bixaceae, Burseraceae i Ericaceae. Pojedine biljne porodice uopće ne sadrže proantocijanidine, kao što je to slučaj za Brassicaceae i Papaveraceae (Kuštrak, 2005; Mole, 1993).

Trjeslovine su neravnomjerno raspoređene u biljci, pri čemu ih najviše sadrži kora stabljike, zatim kora korijena, ksilemski dijelovi, listovi i, konačno, plodovi. Trjeslovinama su najbogatije patološke tvorevine, *Gallae* ili šiške. Radi se o patološkim izraslinama na listu azijskog hrasta i na listovima ruja koje su nastale razvojem ličinke ose ili jedne vrste biljnih



uši, a mogu sadržavati do 75% elagtanina. Razvija se larva, a biljka zbog podražaja stvara trjeslovine koje oblažu ličinku i služe joj kao hrana. S obzirom na starost pojedinih biljnih organa, utvrđeno je da se trjeslovine javljaju u većoj količini u mlađim dijelovima biljke (lisnim pupoljcima, mladim listovima i cvjetovima), što se objašnjava time da biljka gomila trjeslovine u onim dijelovima koji su joj najvrjedniji. Količina tanina u biljci varira ovisno o različitim okolišnim i sezonskim čimbenicima. Suša, visoka temperatura, velika izloženost svjetlu i slaba kvaliteta zemlje stvaraju uvjete koji potiču porast sadržaja trjeslovina u biljci. Sezonska varijabilnost sadržaja ovisi o fazi rasta biljke. Stoga je sinteza tanina najintenzivnija u fazi cvatnje biljke, kada je smanjen njezin rast, pa su tada brojni prekursori na raspolaganju za sintezu fenolnih spojeva (Kalođera, 2010; Vladimir-Knežević, 2008).

### *Biološki učinci*

Usprkos njihovoj velikoj zastupljenosti u svijetu flore, fiziološko značenje trjeslovina još uvijek je prilično nejasno. Smatralo se da njihov gorak okus štiti biljku od štetočina, što se kasnije pokazalo netočnim. Niti pretpostavka da su trjeslovine pričuvne tvari nije se pokazala ispravnom jer se rijetko nalaze u biljnim dijelovima koji služe kao spremnici pričuvnih tvari. No, sa sigurnošću se može potvrditi da kod nekih biljaka trjeslovine sudjeluju u procesu izmjene tvari stvaranjem redoks sustava. Naime, zahvaljujući brojnim hidroksilnim skupinama u strukturi, trjeslovine djeluju kao snažni antioksidansi, pri čemu one s većom molekulskom masom djeluju kao jači hvatači slobodnih radikala (Hagerman, 2002). Zanimljivo je da primjerice u insekata trjeslovine neće djelovati protektivno, već će, zbog njihovog lužnatog pH u crijevima, oksidirati i stvarati kinone i semikinonske radikale, koji će potom oštećivati stanice kukca (Barbehenn, 2011). Također je poznato da su trjeslovine kelatori metala i da talože proteine pa radi toga mogu kod kralježnjaka usporiti probavu tih proteina. Trjeslovine mogu same po sebi biti i djelatne tvari, a može ih se promatrati i kao pratiocice drugih aktivnih tvari, pri čemu utječu na terapijski učinak glavne aktivne komponente (Primorac, 2012). Glavna upotreba trjeslovina odnosi se na njihov adstrigentni učinak. Djeluju protiv dijareje i antiseptički, štiteći izložene membrane sluznice koagulacijom, stvarajući vodonepropusni sloj. Taloženjem proteina, trjeslovine djeluju antimikrobno i antifungalno, imaju i hemostatsko djelovanje, a mogu djelovati kao antidoti kod nekih slučajeva trovanja (teškim metalima, alkaloidima itd.). Interno se još mogu koristiti i kod želučanog i crijevnog katara te hiperaciditetnog gastritisa. U procesu zacjeljivanja rana, opekline, ozeblina i upala, trjeslovine pomažu stvaranjem zaštitnog sloja preko ozlijeđenog tkiva, omogućujući da se ispod njega slobodno odvija zarastanje rane i obnova tkiva (de Jesus i sur., 2012).

Studija koja je proučavala nove i alternativne metode liječenja pulmonarne fibroze otkrila je da tanini mogu djelovati na genomskoj razini, utječući na samu ekspresiju gena preko staničnih citokina. Na mišjem su modelu znanstvenici pokazali da trjeslovine smanjuju ekspresiju TGF- $\beta$ -induciranog kolagena-1 te  $\alpha$ -aktina stanica glatkog mišićja, čime se sprječava nastanak fibroznog tkiva (Reed i sur., 2019). Istraživanja su pokazala da mnoge trjeslovine neutraliziraju slobodne radikale, a poznato je da su mnoge degenerativne bolesti (rak, multipla skleroza, ateroskleroza, proces starenja) povezane s visokim koncentracijama slobodnih radikala između stanica. Također, pojedini tipovi trimernih proantocijanidina mogu pružiti zaštitu od bolesti urinarnog trakta. No, trjeslovine su raznoliki spojevi s velikom varijacijom strukture i koncentracije u biljnom svijetu, zbog čega su biomedicinska istraživanja učinaka na zdravlje pri povećanom unosu trjeslovina značajno ograničena nedostatkom metoda za brzu karakterizaciju i standardizaciju (Kalođera, 2010; Rangari, 2007).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj je ovog diplomskog rada kvalitativna i kvantitativna analiza polifenolnih tvari listova i plodova obične planike (*Arbutus unedo* L., Ericaceae) iz hrvatskih populacija sabranih 2013. godine s područja sjevernog Jadrana (populacija Mali Lošinj) i južnog Jadrana (populacija Koločep).

Kvalitativnom analizom obuhvaćeno je dokazivanje polifenola i trjeslovina u ekstraktima listova i plodova planike primjenom reakcija stvaranja obojenih produkata i taloga, dok je kvantitativna analiza, tj. sadržaj ukupnih polifenola i trjeslovina, određen spektrofotometrijski.

Svrha fitokemijske karakterizacije provedene u okviru ovoga diplomskog rada jest doprinos znanstvenim istraživanjima hrvatskih populacija vrste *A. unedo*, s naglaskom na njihov polifenolni sastav i sadržaj, a rezultati provedenih istraživanja mogu poslužiti kao osnova daljnjih istraživanja biološke aktivnosti te fitoterapijskog potencijala pripravaka obične planike.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Biljni materijal

Biljni materijal vrste *Arbutus unedo* L. prikupljen je 2013. godine, na lokalitetima otoka Lošinja (populacija Mali Lošinj) te na različitim lokalitetima otoka Koločepa.

Identifikacija biljnog materijala provedena je u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (prema: Domac, 1994). Analizirani su pulverizirani listovi i plodovi obične planike (*Arbutus unedo* L.).



Slika 6. Listovi i plodovi planike, *Arbutus unedo* L., Ericaceae  
(foto: N. Jasprica, Flora Croatica baza podataka).

### 3.2. Aparatura i kemikalije

#### Aparatura i pribor:

- UV-Vis spektrofotometar Agilent 8453 E (Hewlett Packard, Njemačka)
- kiveta za spektrofotometar (1 cm)
- epruvete, čaše, kapaljke, pipete, propipete, menzure, lijevci za odjeljivanje, satna stakalca, filter papir
- odmjerne tikvice, Erlenmeyerove tikvice
- povratna hladila

## **Kemikalije:**

- Folin-Ciocalteuov reagens (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- formaldehid (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedelja, Hrvatska)
- kalijev hidroksid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kazein (Merck, Darmstadt)
- klorovodična kiselina, konc. (Panreac Quimica S.A.V., Barcelona, Španjolska)
- metanol (Carlo Erba, Rodano, Italija)
- natrijev acetat trihidrat (Alkaloid, Skopje, Makedonija)
- natrijev karbonat dekahidrat (Poch, Gliwice, Poljska)
- octena kiselina, led. (Kemika, Zagreb)
- olovov(II) acetat (Kemika, Zagreb)
- vanilin (Kemika, Zagreb)
- želatina (Sigma, St. Louis, Sjedinjene Američke Države)
- željezov(III) klorid (Sigma-Aldrich, St. Louis)
- željezov(III) amonijev sulfat (Alkaloid, Skopje)

## **3.3. Metode i postupci istraživanja**

### **3.3.1. Kvalitativna analiza trjeslovina**

*Dokazivanje trjeslovina kemijskim reakcijama stvaranja boje i taloga*

#### Priprava ekstrakta

0,2 g pulveriziranog biljnog materijala pojedinačno se ekstrahira 10 minuta s 20 mL destilirane vode, u tikvici s povratnim hladilom, u kipućoj vodenoj kupelji. Ohlađeni ekstrakt se profiltrira.

#### Opće reakcije

1. U 2 mL filtrata dodaju se 2 kapi 5%-tne otopine željezova(III) klorida.
2. U 2 mL filtrata dodaju se 2-3 kapi 1%-tne otopine željezova(III) amonijeva sulfata.
3. U 5 mL filtrata doda se 0,5 mL 10%-tne otopine olovova acetata.
4. U 2 mL filtrata doda se 2 mL 1%-tne otopine želatine.
5. U 1 mL filtrata doda se 2 mL 1%-tne otopine vanilina u konc. klorovodičnoj kiselini.

### Dokazivanje kondenziranih trjeslovina

U 3 mL ekstrakta dodaju se 2 kapi otopine formaldehida i 3 kapi 10%-tne klorovodične kiseline. Sadržaj se ugrije do vrenja, ohladi, a zatim profiltrira. Potom se filtar papir ispere s 1 mL tople vode. Dokaz kondenziranih trjeslovina predstavlja talog na filtar papiru, netopljiv u toploj 5%-tnoj otopini kalijeva hidroksida.

### Dokazivanje trjeslovina koje hidroliziraju

Filtratu koji se dobije u prethodnoj reakciji taloženja kondenziranih trjeslovina s formaldehidom i klorovodičnom kiselinom, doda se 1 g natrijeva acetata trihidrata (bez protresivanja epruvete), a zatim 1 mL 1%-tne otopine željezova(III) amonijeva sulfata. U prisutnosti trjeslovina koje hidroliziraju, javlja se ljubičasti prsten na mjestu prikladnog pH.

## **3.3.2. Kvantitativna analiza polifenola i trjeslovina**

Količina ukupnih polifenola i trjeslovina u listovima i plodovima vrste *Arbutus unedo* L. određena je spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom (FCR) (Vuković Rodríguez i sur., 2016; Schneider, 1976).

Fino ustinjeni nadzemni biljni dijelovi (0,25 g) ekstrahiraju se s 80 mL 30%-tnog metanola u tikvici s povratnim hladilom, zagrijavanjem na kipućoj vodenoj kupelji oko 15 minuta. Nakon hlađenja, iscrpina se profiltrira u odmjernu tikvicu od 100,0 mL te nadopuni do oznake 30%-tnim metanolom. 2,0 mL filtrata pomiješa se s 8 mL destilirane vode i 10 mL otopine natrijeva acetata (1,92 g natrijeva acetata trihidrata i 0,34 mL octene kiseline pomiješano je i nadopunjeno destiliranom vodom do 100,0 mL). Puferska otopina održava stalnu pH-vrijednost medija (pH = 5) koja je optimalna za taloženje trjeslovina. Otopina dobivena na opisani način označi se kao *otopina 1 (O1)*. 10,0 mL O1 mućka se s 50 mg kazeina na mućkalici 45 minuta te profiltrira, a dobiveni filtrat predstavlja *otopinu 2 (O2)*.

Po 1,0 mL O1 i O2 pomiješa se odvojeno u odmjernim tikvicama od 10,0 mL s po 0,5 mL Folin-Ciocalteuova reagensa (FCR) i nadopuni do oznake 33%-tnom otopinom natrijeva karbonata dekahidrata (FCR sadrži natrijev volframat, natrijev molibdat, destiliranu vodu, 85%-tnu fosfatnu kiselinu, 36%-tnu klorovodičnu kiselinu, litijev sulfat i brom). Apsorbancije dobivenih plavih otopina izmjere se na 720 nm, uz destiliranu vodu kao slijepi pokus. Vrijednost koju daje O1 odgovara količini ukupnih polifenola, dok razlika vrijednosti dobivenih za O1 i O2 predstavlja količinu trjeslovina vezanih na kazein.

Za izračunavanje koncentracije trjeslovina izrađen je baždarni pravac. U tu je svrhu 10 mg tanina (*Acidum tannicum*) osušeno na 80°C i otopljeno u 100,0 mL destilirane vode (osnovna otopina standarda). Radni standard pripremljen je miješanjem 5,0 mL osnovne otopine standarda i 5,0 mL puferske otopine. Koncentracijski niz, dobiven razrjeđivanjem volumena (raspona od 0,2 do 1,2 mL radnog standarda) do 10,0 mL puferskom otopinom (što odgovara koncentraciji trjeslovina od 0,001 do 0,006 mg/mL), daje linearni porast apsorbancije. Za izmjerene vrijednosti apsorbancija *O1* i *O2* očitaju se pripadajuće koncentracije iz baždarnog dijagrama te izraze kao maseni udio (%) ukupnih polifenola, odnosno trjeslovina.

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

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

*A* = izmjerena apsorbancija otopine 1, odnosno otopine 2

Razlika sadržaja (%) ukupnih polifenola, koji je dobiven spektrofotometrijskom analizom *O1*, i sadržaja određenog za *O2*, predstavlja sadržaj (%) trjeslovina koje su istaložene kazeinom.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati kvalitativne analize trjeslovina vrste *A. unedo* L.

#### *Rezultati općih reakcija dokazivanja trjeslovina stvaranjem boje i taloga*

##### 1. Reakcija taloženja dodatkom željezova(III) klorida u vodeni ekstrakt droge

Dodatkom 5%-tne otopine željezova(III) klorida u vodeni ekstrakt droge nastalo je zelenoplavo zamućenje.

##### 2. Reakcija promjene boje dodatkom željezova(III) amonijeva sulfata u vodeni ekstrakt droge

Reakcijom trjeslovina sa željezovim(III) amonijevim sulfatom nastalo je vrlo intenzivno zelenoplavo obojenje.

##### 3. Reakcija promjene boje dodatkom olovova acetata u vodeni ekstrakt droge

Reakcijom trjeslovina s olovovim acetatom nastalo je vrlo intenzivno žutozeleno obojenje.

##### 4. Reakcija taloženja dodatkom želatine u vodeni ekstrakt droge

Reakcijom trjeslovina sa želatinom nastalo je blijedožuto zamućenje.

##### 5. Reakcija promjene boje dodatkom otopine vanilina u vodeni ekstrakt droge

Dodatkom 1%-tne otopine vanilina u koncentriranoj klorovodičnoj kiselini u vodeni ekstrakt droge nastalo je intenzivno narančasto obojenje.

Intenzitet zamućenja/obojenja nije se bitno razlikovao između ispitanih populacija obične planike, ali moglo se primijetiti da je bio nešto izraženiji u uzorcima listova prikupljenih na otoku Lošinj, u odnosu na one s Koločepa. Također, uzorci plodova s oba lokaliteta dali su slabije rezultate, odnosno, slabije zamućenje/obojenje u usporedbi s uzorcima listova maginje.



### ***Rezultati reakcije dokazivanja kondenziranih trjeslovina***

Nakon dodatka formaldehida i 10%-tne klorovodične kiseline u vodeni ekstrakt droge, sadržaj se ugrijan do vrenja te potom ohlađen i profiltriran. Filtar papir je ispran toplom vodom, a kondenzirane trjeslovine dokazuju se talogom na filter papiru koji je netopljiv u 5%-tnoj otopini kalijeva hidroksida.

Svi testirani biljni ekstrakti vrste *A. unedo* dali su žućkasti netopljivi talog koji indicira prisutnost kondenziranih trjeslovina.

### ***Rezultati reakcije dokazivanja trjeslovina koje hidroliziraju***

Filtratu iz reakcije za dokazivanje kondenziranih trjeslovina dodan je 1 g natrijeva acetata trihidrata bez protresivanja, a zatim 1 mL 1%-tne otopine željezova(III) amonijeva sultata. U svim ekstraktima planike dokazana je prisutnost trjeslovina koje hidroliziraju nastankom vidljivog ljubičastog prstena na mjestu prikladnog pH.

## **4.2. Rezultati kvantitativne analize ukupnih polifenola i trjeslovina vrste *A. unedo* L.**

Kvantitativna analiza ukupnih polifenola i trjeslovina u nadzemnim dijelovima planike provedena je spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na reakciji polifenolnih spojeva s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom (FCR), a kojoj prethodi taloženje trjeslovina kazeinom. Nakon dodatka FCR, izmjerene su apsorbancije dobivenih plavih otopina na 720 nm (prema metodi) te na 752 nm (maksimum apsorpcije), uz destiliranu vodu kao slijepu probu.

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

Za izmjerene vrijednosti apsorbancija *otopine 1 (O1)* i *otopine 2 (O2)* odrede se, temeljem baždarnog dijagrama, koncentracije analiziranih polifenolnih tvari i izraze kao grami ukupnih polifenola, odnosno trjeslovina, na 100 g droge (%), pri čemu vrijedi izraz:

$$\% \text{ polifenola} = A / 0,025 = 40 A ; A = \text{izmjerena apsorbancija otopine 1, odnosno otopine 2}$$

Za svaku populaciju napravljena je jedna ekstrakcija droge, nakon čega su uzeta tri uzorka za spektrofotometrijsko određivanje polifenola i trjeslovina. Svi su uzorci izrađeni u duplikatima te je za svaki od uzoraka tri puta izvršeno mjerenje apsorbancija.

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

Tablica 1. Sadržaj ukupnih polifenola i trjeslovina u ekstraktima listova i plodova obične planike (populacije Lošinj i Koločep), mjereno na 720 nm (prema metodi).

Uzorak	masa uzorka/g	Ukupni polifenoli		Polifenoli nevezani na kazein		Trjeslovine vezane na kazein		Sadržaj ukupnih polifenola		Sadržaj trjeslovina vezanih na kazein	
		$A_{720\text{ nm}}$ otopina 1	Srednja vrijednost ot1 ± SD	$A_{720\text{ nm}}$ otopina 2	Srednja vrijednost ot2 ± SD	A1-A2	Srednja vrijednost (ot1 ot2) ± SD	%	Srednja vrijednost ± SD	%	Srednja vrijednost ± SD
List 1 (Koločep)	0,2504	0,31371	0,3149 ± 0,0011	0,15445	0,157 ± 0,0024	0,1593	0,1579 ± 0,0017	1,25484	1,2597 ± 0,0044	0,64	0,6318 ± 0,0068
		0,31589		0,15734		0,1586		1,26356		0,63	
		0,31517		0,15914		0,1560		1,26068		0,62	
List 1a (Koločep)	0,2504	0,33520	0,3361 ± 0,0018	0,15870	0,1569 ± 0,0018	0,1765	0,1792 ± 0,0035	1,34080	1,3443 ± 0,0073	0,71	0,7169 ± 0,0138
		0,33485		0,15680		0,1781		1,33940		0,71	
		0,33817		0,15506		0,1831		1,35268		0,73	
List 2 (Lošinj)	0,2504	0,34064	0,3408 ± 0,0022	0,17871	0,1794 ± 0,0012	0,1619	0,1614 ± 0,0032	1,36256	1,3633 ± 0,0087	0,65	0,6455 ± 0,0128
		0,34309		0,17881		0,1643		1,37236		0,66	
		0,33873		0,18079		0,1579		1,35492		0,63	
List 2a (Lošinj)	0,2504	0,33305	0,3351 ± 0,0018	0,15219	0,1535 ± 0,0021	0,1809	0,1817 ± 0,0019	1,33220	1,3405 ± 0,0072	0,72	0,7267 ± 0,0075
		0,33610		0,15229		0,1838		1,34440		0,74	
		0,33625		0,15590		0,1804		1,34500		0,72	
Plod 1 (Koločep)	0,2498	0,072451	0,0721 ± 0,0003	0,079857	0,0798 ± 0,0003	-0,007406	-0,0077 ± 0,0006	0,28980	0,2886 ± 0,0013	-0,03	-0,0308 ± 0,0022
		0,072141		0,079494		-0,007353		0,28856		-0,03	
		0,071824		0,080169		-0,008345		0,28730		-0,03	
Plod 1a (Koločep)	0,2498	0,073483	0,0737 ± 0,0002	0,079140	0,0794 ± 0,0006	-0,005657	-0,0057 ± 0,0005	0,29393	0,2948 ± 0,0008	-0,02	-0,0228 ± 0,002
		0,073695		0,078942		-0,005247		0,29478		-0,02	
		0,073906		0,080137		-0,006231		0,29562		-0,02	
Plod 2 (Lošinj)	0,2501	0,068470	0,0687 ± 0,0006	0,072766	0,0737 ± 0,0008	-0,004296	-0,005 ± 0,0008	0,27388	0,2747 ± 0,0022	-0,02	-0,0201 ± 0,0031
		0,068271		0,074133		-0,005862		0,27308		-0,02	
		0,069311		0,074257		-0,004946		0,27724		-0,02	
Plod 2a (Lošinj)	0,2501	0,067092	0,0685 ± 0,0013	0,081300	0,0808 ± 0,0006	-0,014208	-0,0123 ± 0,0016	0,26837	0,274 ± 0,0051	-0,06	-0,0493 ± 0,0065
		0,068826		0,080155		-0,011329		0,27530		-0,05	
		0,069566		0,080995		-0,011429		0,27826		-0,05	

Na 720 nm određen sadržaj ukupnih polifenola (UP) listova obične planike iz populacije Koločep kretao se od 1,26±0,00% do 1,34±0,01%, dok je sadržaj trjeslovina vezanih na kazein (T) u listovima iste populacije bio u rasponu od 0,63±0,01% do 0,72±0,01%. Udio UP u listovima populacije Lošinj bio je u granicama od 1,34±0,01% do 1,36±0,01%, dok je sadržaj T u listovima iste populacije iznosio od 0,65±0,01% do 0,73±0,01%.

Sadržaj **UP** (720 nm) u plodovima obične planike iz populacije Koločep iznosio je  $0,29 \pm 0,00\%$ , dok je za populaciju Lošinj izmjeren udio **UP** od  $0,27 \pm 0,01\%$ . Količinu **T** u plodovima obiju populacije nije bilo moguće odrediti primijenjenom spektrofotometrijskom metodom (negativne vrijednosti, od  $-0,05\%$  do  $-0,02\%$ ).

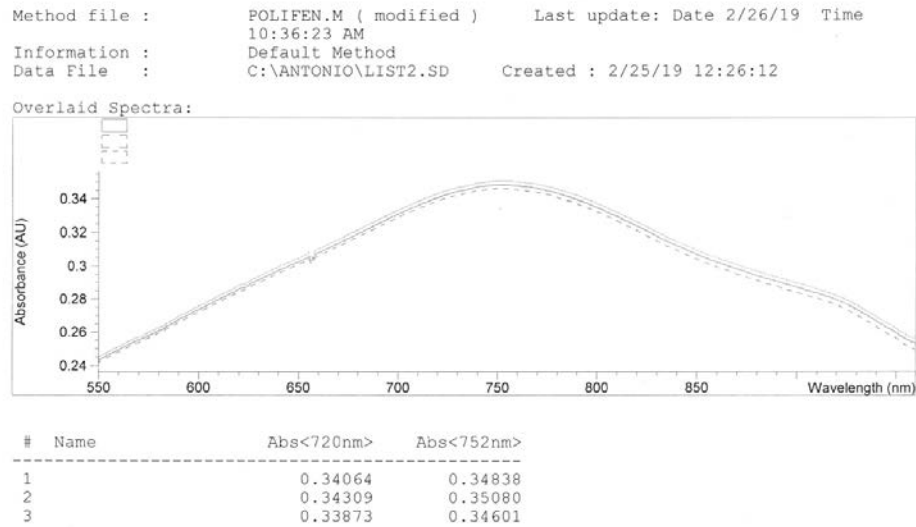
Tablica 2. Sadržaj ukupnih polifenola i trjeslovina u ekstraktima listova i plodova obične planike (populacije Lošinj i Koločep), mjereno na 752 nm (maksimum apsorpcije).

Uzorak	masa uzorka/g	Ukupni polifenoli		Polifenoli nevezani na kazein		Trjeslovine vezane na kazein		Sadržaj ukupnih polifenola		Sadržaj trjeslovina vezanih na kazein	
		$A_{752\text{nm}}$ otopina 1	Srednja vrijednost ot1 $\pm$ SD	$A_{752\text{nm}}$ otopina 2	Srednja vrijednost ot2 $\pm$ SD	A1-A2	Srednja vrijednost (ot1 ot2) $\pm$ SD	%	Srednja vrijednost $\pm$ SD	%	Srednja vrijednost $\pm$ SD
List 1 (Koločep)	0,2504	0,31919	$0,3206 \pm 0,0014$	0,15809	$0,1607 \pm 0,0024$	0,16110	$0,16 \pm 0,0017$	1,28	$1,2825 \pm 0,0054$	0,64	$0,6399 \pm 0,0067$
		0,32187		0,16110		0,16077		1,29		0,64	
		0,32083		0,16279		0,15804		1,28		0,63	
List 1a (Koločep)	0,2504	0,34203	$0,3425 \pm 0,0018$	0,16194	$0,1599 \pm 0,002$	0,18009	$0,1825 \pm 0,0034$	1,37	$1,3698 \pm 0,0072$	0,72	$0,7301 \pm 0,0136$
		0,34090		0,15985		0,18105		1,36		0,72	
		0,34443		0,15802		0,18641		1,38		0,75	
List 2 (Lošinj)	0,2504	0,34838	$0,3484 \pm 0,0024$	0,18348	$0,1839 \pm 0,0009$	0,16490	$0,1645 \pm 0,0033$	1,39	$1,3936 \pm 0,0096$	0,66	$0,6581 \pm 0,0131$
		0,35080		0,18320		0,16760		1,40		0,67	
		0,34601		0,18495		0,16106		1,38		0,64	
List 2a (Lošinj)	0,2504	0,33818	$0,3403 \pm 0,0019$	0,15713	$0,158 \pm 0,0019$	0,18105	$0,1824 \pm 0,0019$	1,35	$1,3613 \pm 0,0075$	0,72	$0,7294 \pm 0,0077$
		0,34115		0,15659		0,18456		1,36		0,74	
		0,34162		0,16015		0,18147		1,37		0,73	
Plod 1 (Koločep)	0,2498	0,073841	$0,0733 \pm 0,0005$	0,081448	$0,0815 \pm 0,0001$	-0,007607	$-0,0082 \pm 0,0006$	0,30	$0,2931 \pm 0,002$	-0,03	$-0,0328 \pm 0,0023$
		0,073143		0,081376		-0,008233		0,29		-0,03	
		0,072873		0,081651		-0,008778		0,29		-0,04	
Plod 1a (Koločep)	0,2498	0,075837	$0,076 \pm 0,0002$	0,080989	$0,0812 \pm 0,0007$	-0,005152	$-0,0052 \pm 0,0005$	0,30	$0,304 \pm 0,0008$	-0,02	$-0,0209 \pm 0,0021$
		0,075981		0,080727		-0,004746		0,30		-0,02	
		0,076218		0,082024		-0,005806		0,30		-0,02	
Plod 2 (Lošinj)	0,2501	0,070764	$0,0709 \pm 0,0005$	0,074114	$0,0751 \pm 0,0009$	-0,003350	$-0,0042 \pm 0,0008$	0,28	$0,2837 \pm 0,0019$	-0,01	$-0,0168 \pm 0,0031$
		0,070544		0,075431		-0,004887		0,28		-0,02	
		0,071473		0,075804		-0,004331		0,29		-0,02	
Plod 2a (Lošinj)	0,2501	0,069070	$0,0704 \pm 0,0012$	0,083009	$0,0825 \pm 0,0006$	-0,013939	$-0,012 \pm 0,0017$	0,28	$0,2817 \pm 0,0049$	-0,06	$-0,0481 \pm 0,0066$
		0,070828		0,081886		-0,011058		0,28		-0,04	
		0,071413		0,082506		-0,011093		0,29		-0,04	

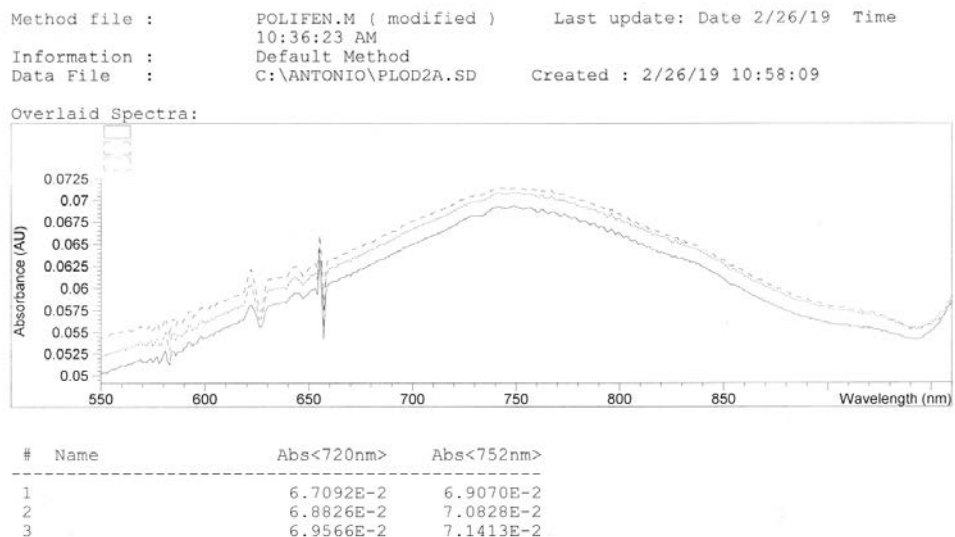
Na 752 nm određen **UP** sadržaj u listovima obične planike iz populacije Koločep kretao se od  $1,28 \pm 0,01\%$  do  $1,37 \pm 0,01\%$ , dok je sadržaj **T** u listovima iste populacije bio u rasponu od  $0,64 \pm 0,01\%$  do  $0,73 \pm 0,01\%$ . Udio **UP** u listovima populacije Mali Lošinj bio je u granicama od  $1,36 \pm 0,01\%$  do  $1,39 \pm 0,01\%$ , dok je sadržaj **T** u listovima iste populacije iznosio od  $0,66 \pm 0,01\%$  do  $0,73 \pm 0,01\%$ .

Sadržaj **UP** (752 nm) u plodovima obične planike iz populacije Koločep iznosio je od  $0,29 \pm 0,00\%$  do  $0,30 \pm 0,00\%$ , dok je za populaciju Mali Lošinj izmjereno  $0,28 \pm 0,00\%$  **UP**. Udio **T** nije bilo moguće odrediti primijenjenom spektrofotometrijskom metodom (negativne vrijednosti za obje populacije, od  $-0,04\%$  do  $-0,02\%$ ).

Dakle, najveći sadržaj **UP** zabilježen je u listovima obične planike s otoka Lošinja (Slika 7) i iznosio je  $1,36 \pm 0,01\%$  (720 nm), odnosno  $1,39 \pm 0,01\%$  (752 nm), dok je najmanji **UP** sadržaj zabilježen u plodovima iste biljne populacije (Slika 8), a iznosio je  $0,27 \pm 0,01\%$  (720 nm), odnosno  $0,28 \pm 0,01\%$  (752 nm).

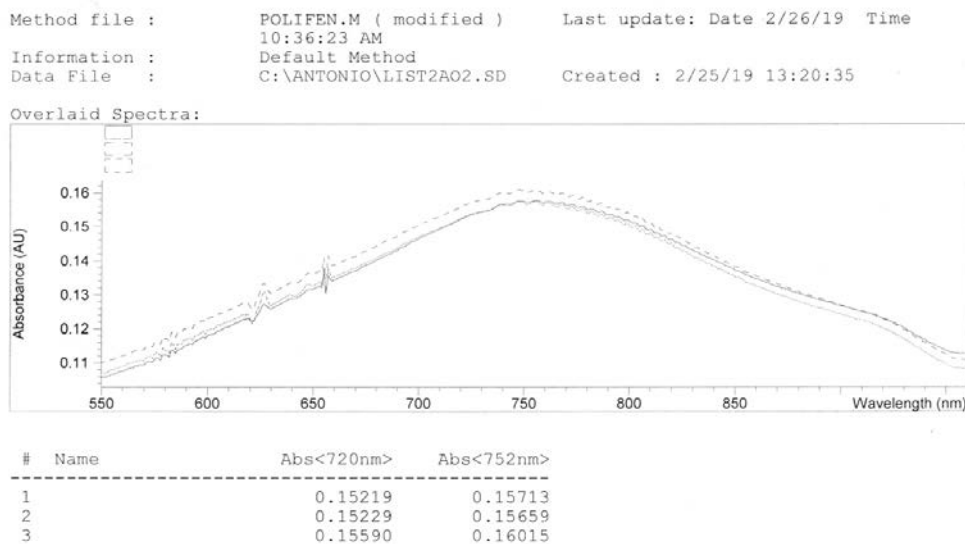


Slika 7. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije ukupnih polifenola u ekstraktu listova obične planike, populacija Mali Lošinj.

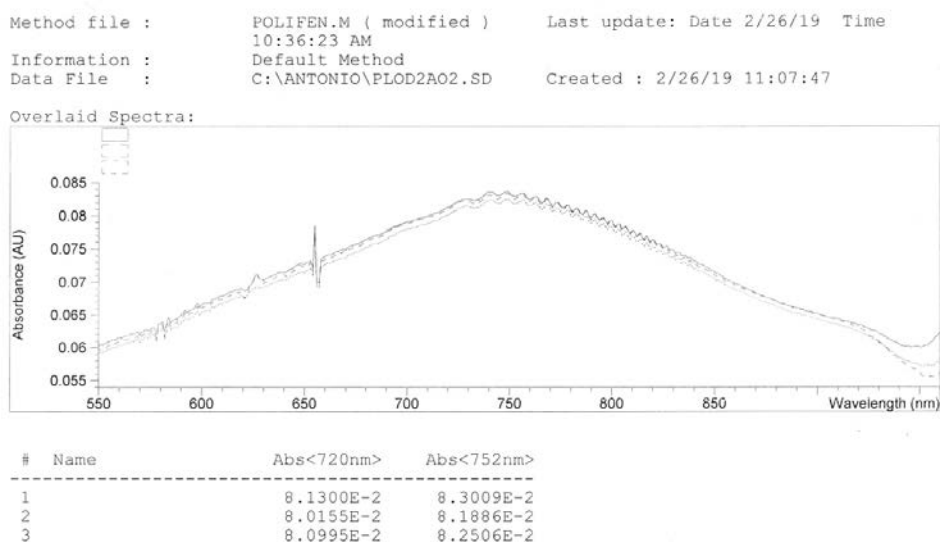


Slika 8. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije ukupnih polifenola u ekstraktu plodova obične planike, populacija Mali Lošinj.

Najveći udio **T** u ekstraktima listova izmjeren je u uzorku s Lošinja (Slika 9) i iznosio je  $0,73 \pm 0,01\%$  (720 nm i 752 nm), dok je najmanje trjeslovina koje se vežu na kazein određeno u uzorku lošinjskih plodova ( $-0,05 \pm 0,01\%$ , Slika 10). Dobivene negativne vrijednosti ukazuju na iznimno malu količinu ispitanih trjeslovina ili pak njihovu potpunu odsutnost.



Slika 9. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije polifenola bez trjeslovina koje se talože kazeinom u ekstraktu listova obične planike, populacija Mali Lošinj.



Slika 10. Spektar dobiven mjerenjem apsorbancije polifenola bez trjeslovina koje se talože kazeinom u ekstraktu plodova obične planike, populacija Mali Lošinj.

## 5. ZAKLJUČCI

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je djelomična fitokemijska karakterizacija vrste *Arbutus unedo* L. (obična planika, maginja), koja je uključivala kvalitativnu i kvantitativnu analizu ukupnih polifenola i trjeslovina iz listova i plodova maginje s područja Kvarnera (otok Lošinj, populacija Mali Lošinj) i južne Dalmacije (otok Koločep), sabranih 2013. godine.

- Kvalitativna analiza trjeslovina temeljena je na reakcijama stvaranja obojenih produkata i/ili taloga i dokazana je njihova prisutnost u svim ispitanim biljnim ekstraktima. Dodatno, kondenzirane trjeslovine dokazane su reakcijom s formaldehidom i 10%-tnom klorovodičnom kiselinom, dok je prisutnost trjeslovina koje hidroliziraju potvrđena reakcijom s natrijevim acetatom i željezovim(III) amonijevim sulfatom.
  - Intenzitet zamućenja/obojenja nije se znatno razlikovao između ispitanih populacija obične planike, no bio je nešto izraženiji u uzorcima listova skupljenih na otoku Lošinju, u odnosu na one s Koločepa. Također, uzorci plodova s oba lokaliteta dali su slabije intenzitete reakcija dokazivanja trjeslovina, odnosno, znatno slabije zamućenje/obojenje u usporedbi s uzorcima listova.
- Provedenom kvantitativnom analizom određen je sadržaj ukupnih polifenola (**UP**) i trjeslovina (**T**) u ekstraktima listova i plodova obične planike, primjenom spektrofotometrijske metode s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom, uz prethodno taloženje trjeslovina kazeinom.
  - Općenito je uočen nešto veći sadržaj **UP** i **T** u uzorcima listova obične planike s otoka Lošinja (**UP**:  $1,34 \pm 0,01\%$  do  $1,36 \pm 0,01\%$ ,  $A_{720\text{nm}}$ , odnosno od  $1,36 \pm 0,01\%$  do  $1,39 \pm 0,01\%$ ,  $A_{752\text{nm}}$ ; **T**:  $0,65 \pm 0,01\%$  do  $0,73 \pm 0,01\%$ ,  $A_{720\text{nm}}$ , odnosno od  $0,66 \pm 0,01\%$  do  $0,73 \pm 0,01\%$ ,  $A_{752\text{nm}}$ ), u odnosu na one s Koločepa (**UP**:  $1,26 \pm 0,00\%$  do  $1,34 \pm 0,01\%$ ,  $A_{720\text{nm}}$ , odnosno od  $1,28 \pm 0,01\%$  do  $1,37 \pm 0,01\%$ ,  $A_{752\text{nm}}$  **T**:  $0,63 \pm 0,01\%$  do  $0,72 \pm 0,01\%$ ,  $A_{720\text{nm}}$ , odnosno od  $0,64 \pm 0,01\%$  do  $0,73 \pm 0,01\%$ ,  $A_{752\text{nm}}$ ).
  - Nešto veći sadržaj **UP** zabilježen je u uzorcima plodova obične planike s otoka Koločepa (**UP**:  $0,29 \pm 0,00\%$ ,  $A_{720\text{nm}}$ , odnosno od  $0,29 \pm 0,00\%$  do  $0,30 \pm 0,00\%$ ,  $A_{752\text{nm}}$ ), u odnosu na one s Lošinja (**UP**:  $0,27 \pm 0,01\%$ ,  $A_{720\text{nm}}$ , odnosno  $0,28 \pm 0,00\%$ ,  $A_{752\text{nm}}$ ).

- Količinu **T** u plodovima obiju ispitanih populacija obične planike nije bilo moguće odrediti primijenjenom spektrofotometrijskom metodom (negativne vrijednosti sadržaja) zbog vrlo niskog udjela ili potpune odsutnosti trjeslovina koje se talože s kazeinom u analiziranim biljnim uzorcima.

Fitokemijska karakterizacija provedena u okviru ovoga diplomskog rada doprinosi znanstvenom istraživanju biološki aktivnih tvari roda *Arbutus* L. te je potvrda fitoterapijskog potencijala vrste *A. unedo* s obzirom na analizirani sadržaj bioaktivnih polifenolnih tvari.

## 6. LITERATURA

- Alaback P. Plants of the Pacific Northwest Coast: Washington, Oregon, British Columbia & Alaska, 1994.
- Arbutus*, <http://www.theplantlist.org/>, pristupljeno 02.08.2019.
- Arbutus unedo*, <https://hirc.botanic.hr/fcd/>, pristupljeno 29.07.2019.
- Barbehenn RV, Constabel CP. Tannins in plant–herbivore interactions, *Phytochemistry*, 2011, 72(13), 1551-1565.
- Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance. *Nutr Rev*, 1998, 56, 317-333.
- Biljni lijekovi, <http://www.halmed.hr/>, pristupljeno 29.07.2019.
- Datla KP, Christidou M, Widmer WW, Rooprai HK, Dexter DT. Tissue distribution and neuroprotective effects of citrus flavonoid tangeretin in a rat model of Parkinson’s disease. *Neuro Report* 2001, 12, 3871-3875.
- de Jesus NZT, Falcão HS, Gomes IF, Leite TJA, Lima GRM, Barbosa-Filho JM, Tavares JF, Silva MS, Athayde-Filho PF, Batista LM. Tannins, Peptic Ulcers and Related Mechanisms. *Int J Mol Sci*, 2012, 13, 3203-3228.
- Diba MA, Paolini J, Bendahou M, Varesi L, Allali H, Desjobert JM, Tabti B, Costa J. Chemical composition of fatty acid and unsaponifiable fractions of leaves, stems and roots of *Arbutus unedo* and *in vitro* antimicrobial activity of unsaponifiable extracts. *Nat Prod Commun*, 2010, 5(7), 1085-1090.
- Dodaci prehrani, <https://zdravstvo.gov.hr/>, pristupljeno 02.08.2019.
- Domac R. Mala flora Hrvatske i susjednih područja. Zagreb, Školska knjiga Zagreb, 1994, str. 251.
- Ericaceae, <https://hirc.botanic.hr/fcd/>, pristupljeno 29.07.2019.
- Fortalezas S, Tavares L, Pimpão R, Tyagi M, Pontes V, Alves VM, McDougall G, Stewart D, Ferreira RB, Santos CN. Antioxidant Properties and Neuroprotective Capacity of Strawberry Tree Fruit (*Arbutus unedo*). *Nutrients*, 2010, 2(2), 214-229.
- Grdinić V, Kremer D. Ljekovito bilje i ljekovite droge: farmakoterapijski, botanički i farmaceutski podaci. Zagreb, Hrvatska ljekarnička komora, 2009, str. 19, 178, 349-350.
- Hagerman AE. The Tannin Handbook, Biological Activity of Tannins. Miami University, Oxford, Ohio, USA, 2002.



- Jurica K, Benković V, Sikirić S, Brčić Karačonji I, Kopjar N. The effects of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) water leaf extract and arbutin upon kidney function and primary DNA damage in renal cells of rats. *Nat Prod Res*, 2018, Nov 10:1-4. doi: 10.1080/14786419.2018.1534106. [Epub ahead of print]
- 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, 8, 17-23.
- Jurica K, Uršulin-Trstenjak N, Anić Jurica S. Obična planika - zdravstveni potencijal. Znanstveni skup. Talasoterapija, kineziterapija, aromaterapija u Hrvatskoj / Ivanišević, Goran (ur.). Zagreb, Hrvatski liječnički zbor, 2013, 93-104.
- Kachkoul R, Sqalli Houssaini T, El Habbani R, Miyah Y, Mohim M, Lahrichi A. Phytochemical screening and inhibitory activity of oxalocalcic crystallization of *Arbutus unedo* L. leaves. *Heliyon*, 2018, 4(12), e01011, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01011>
- Kalodera Z. Farmakognozija II. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2010, str. 75-79.
- Khanbabaee K, van Ree T. Tannins Classification and Definition, *Nat Prod Rep*, 2002, 18(6), 641-649.
- Kozłowska A, Szostak-Węgierek D. Flavonoids - food sources and health benefits. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 2014, 65(2),79-85.
- Kuštrak D. Farmakognozija fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing- Tehnička knjiga, 2005, str. 69-71, 408-409.
- Lim TK. *Arbutus unedo*. *Edible Med Non-Medicinal Plants*, 2012, 2, 444-451.
- Liu Z, Wang Z, Zhou J, Peng H (2010). Phylogeny of Pyroleae (Ericaceae): implications for character evolution. *J Plant Res*, 2010, 124(3), 325-337.
- Losada-Echeberria M, Herranz-Lopez M, Micol V, Barajón-Catalán E. Polyphenols as Promising Drugs against Main Breast Cancer Signatures. *Antioxidants* (Basel), 2017, 6(4), pii: E88. doi: 10.3390/antiox6040088
- Luteyn JL. Diversity, Adaptation, and Endemism in Neotropical Ericaceae: Biogeographical Patterns in the Vaccinieae. *Bot Rev*, 2002, 68, No. 1, Plant Evolution and Endemism in Andean South America, 55-87.
- Maleš Ž, Fabijančić P, Barman A, Gregov I, Bojić M. Antioksidacijski učinak i HPLC analiza listova planike - *Arbutus unedo* L. *Farm Glas*, 2015, 71(19), 523-528.

- Maleš Ž, Plazibat M, Vundać VB, Žuntar I. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree - *Arbutus unedo* L. (Ericaceae). *Acta Pharm*, 2006, 56, 245-250.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79, 727-747.
- Mole S. The systematic distribution of tannins in the leaves of angiosperms: A tool for ecological studies. *Biochem Syst and Ecol*, 1993, 21, 833-846. 10.1016/0305-1978(93)90096-A.
- Mrabti HN, El Abbes Faouzi M, Mayuk FM, Makrane H, Limas-Nzouzi N, Dibong SD, Cherrah Y, Elombo FK, Gressier B, Desjeux JF, Eto B. *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) inhibits intestinal glucose absorption and improves glucose tolerance in rodents. *J Ethnopharmacol*, 2019, 235, 385-391. doi: 10.1016/j.jep.2019.02.013.
- Nenadis N, Llorens L, Koufogianni A, Díaz L, Font J, Gonzalez JA, Verdaguer D. Interactive effects of UV radiation and reduced precipitation on the seasonal leaf phenolic content/composition and the antioxidant activity of naturally growing *Arbutus unedo* plants. *J Photochem Photobiol B*, 2015, 153, 435-444. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.10.016. 2015
- Nikolić T. Sistemska botanika: raznolikost i evolucija biljnog svijeta. Zagreb, Alfa d.d., 2013, str. 705-710.
- Oliveira I, Nunes A, Lima A, Borralho P, Rodrigues C, Ferreira RB, Ribeiro AC. New Lectins from Mediterranean Flora. Activity against HT29 Colon Cancer Cells. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(12), pii: E3059. doi: 10.3390/ijms20123059.
- 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.
- Petrik J. Polifenoli-antioksidansi, nastavni materijal. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008, str. 1-8.
- Primorac I. Kvantitativna analiza polifenola hrvatskih populacija vrste *Moltkia petraea* (Tratt.) Griseb. Diplomski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2012.
- Rangari VD. Tannin Containing Drugs. U: Pharmacognosy. J. L. Chaturvedi College of Pharmacy 846, New Nandanvan, Nagpur, 2007.
- Rastija V, Medić-Šarić M. Kromatografske metode analize polifenola u vinima. *Kem Ind*, 2009, 58, 121-128.
- Reed EB, Ard S, La J, Park CY, Culligan L, Fredberg JJ, Smolyaninova LV, Orlov SN, Chen B, Guzy R, Mutlu GM, Dulin NO. Anti-fibrotic effects of tannic acid through regulation of a sustained TGF-beta receptor signaling. *Respir Res*, 2019, 20(1), 168. doi: 10.1186/s12931-019-1141-8.

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

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

Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *J Funct Foods*, 2015, 18, 820-897.

Skandalis N, Dimopoulou A, Georgopoulou A, Gallios N, Papadopoulos D, Tsiapas D, Theologidis I, Michailidis N, Chatzinikolaïdou M. The Effect of Silver Nanoparticles Size, Produced Using Plant Extract from *Arbutus unedo*, on Their Antibacterial Efficacy. *Nanoparticles* (Basel), 2017, 7(7). pii: E178. doi: 10.3390/nano7070178.

Stevens, PF. (2001 onwards). "Ericaceae". *Angiosperm Phylogeny Website*. Version 14, July 2017, <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>, pristupljeno 02.08.2019.

Soufleros EH, Mygdalia SA, Natskoulis P. Production process and characterization of the traditional Greek fruit distillate “Koumaro” by aromatic and mineral composition. *J Food Compos Anal*, 2005, 18, 699-716.

Šilić Č. Atlas dendroflora (drveće i grmlje) Bosne i Hercegovine. Matica Hrvatska, Čitluk, 2005.

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

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

Wilczyńska A, Retel M. Evaluation of polyphenol dietary intake considering participation of honey. *Probl Hig Epidemiol*, 2011, 92(4), 709-712.

## 7. SAŽETAK / SUMMARY

### Sažetak

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza ukupnih polifenola i trjeslovina iz listova i plodova vrste *Arbutus unedo* L. prikupljenih 2013. godine na području Malog Lošinja i Koločepa. Prisutnost trjeslovina dokazana je u svim ispitanim uzorcima kemijskim reakcijama stvaranja obojenih produkata i taloga. Kvantitativna analiza ukupnih polifenola (**UP**) i trjeslovina (**T**) provedena je spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom. Najveći sadržaj **UP** zabilježen je u listovima obične planike s otoka Lošinja i iznosio je  $1,36 \pm 0,01\%$  (720 nm), odnosno  $1,39 \pm 0,01\%$  (752 nm), dok je najmanji **UP** sadržaj zabilježen u plodovima iste biljne populacije i iznosio je  $0,27 \pm 0,01\%$  (720 nm), odnosno  $0,28 \pm 0,01\%$  (752 nm). Najveći udio **T** u ekstraktima listova izmjeren je u uzorku s Lošinja ( $0,73 \pm 0,01\%$ ), dok koncentraciju **T** u plodovima ispitanih populacija obične planike nije bilo moguće odrediti primijenjenom spektrofotometrijskom metodom.

## Summary

This diploma thesis elaborates qualitative and quantitative analysis of total polyphenols and tannins extracted from leaves and fruits of the species *Arbutus unedo* L. collected during 2013 in the area of Mali Lošinj and Koločep. Presence of tannins had been proven in all tested samples using chemical reactions of precipitation and forming of colored products. The quantitative analysis of total polyphenols (**TP**) and tannins (**T**) was performed by spectrophotometric method with usage of Folin-Ciocalteu's phenol reagent. The highest content of **TP** was found in the leaves of strawberry tree from the island of Lošinj and it amounted  $1.36 \pm 0.01\%$  (720 nm), i.e.  $1.39 \pm 0.01\%$  (752 nm), while the lowest **TP** content was found in fruits of the same herbal population and it totaled  $0.27 \pm 0.01\%$  (720 nm), i.e.  $0.28 \pm 0.01\%$  (752 nm). The highest concentration of **T** in the extracts of leaves was also found in the sample from Mali Lošinj ( $0.73 \pm 0.01\%$ ), while the used spectrophotometric method wasn't succesfull in measuring **T** concentration in the fruits of tested populations of strawberry tree.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### KVALITATIVNA I KVANTITATIVNA ANALIZA UKUPNIH POLIFENOLA I TRJESLOVINA VRSTE *ARBUTUS UNEDO* L. (ERICACEAE), POPULACIJE LOŠINJ I KOLOČEP

Antonio Boroš

#### SAŽETAK

U okviru ovoga diplomskog rada provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza ukupnih polifenola i trjeslovina iz listova i plodova vrste *Arbutus unedo* L. prikupljenih 2013. godine na području Malog Lošinja i Koločepa. Prisutnost trjeslovina dokazana je u svim ispitanim uzorcima kemijskim reakcijama stvaranja obojenih produkata i taloga. Kvantitativna analiza ukupnih polifenola (**UP**) i trjeslovina (**T**) provedena je spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom. Najveći sadržaj **UP** zabilježen je u listovima obične planike s otoka Lošinja i iznosio je  $1,36 \pm 0,01\%$  (720 nm), odnosno  $1,39 \pm 0,01\%$  (752 nm), dok je najmanji **UP** sadržaj zabilježen u plodovima iste biljne populacije i iznosio je  $0,27 \pm 0,01\%$  (720 nm), odnosno  $0,28 \pm 0,01\%$  (752 nm). Najveći udio **T** u ekstraktima listova izmjeren je u uzorku s Lošinja ( $0,73 \pm 0,01\%$ ), dok koncentraciju **T** u plodovima ispitanih populacija obične planike nije bilo moguće odrediti primijenjenom spektrofotometrijskom metodom.

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

Rad sadrži: 34 stranice, 10 slika, 2 tablice i 51 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Arbutus unedo* L., polifenoli, trjeslovine, kvalitativna analiza, kvantitativna analiza, UV-Vis spektrofotometrija

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

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

**Dr. sc. Živka Juričić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Željka Vanić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2019.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF TOTAL POLYPHENOLS AND TANNINS OF *ARBUTUS UNEDO* L. (ERICACEAE), POPULATIONS LOŠINJ AND KOLOČEP

Antonio Boroš

#### SUMMARY

This diploma thesis elaborates qualitative and quantitative analysis of total polyphenols and tannins extracted from leaves and fruits of the species *Arbutus unedo* L. collected during 2013 in the area of Mali Lošinj and Koločep. Presence of tannins had been proven in all tested samples using chemical reactions of precipitation and forming of colored products. The quantitative analysis of total polyphenols (TP) and tannins (T) was performed by spectrophotometric method with usage of Folin-Ciocalteu's phenol reagent. The highest content of TP was found in the leaves of strawberry tree from the island of Lošinj and it amounted  $1.36 \pm 0.01\%$  (720 nm), i.e.  $1.39 \pm 0.01\%$  (752 nm), while the lowest TP content was found in fruits of the same herbal population and it totaled  $0.27 \pm 0.01\%$  (720 nm), i.e.  $0.28 \pm 0.01\%$  (752 nm). The highest concentration of T in the extracts of leaves was also found in the sample from Mali Lošinj ( $0.73 \pm 0.01\%$ ), while the used spectrophotometric method wasn't successful in measuring T concentration in the fruits of tested populations of strawberry tree.

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

Thesis includes: 34 pages, 10 figures, 2 tables, and 51 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Arbutus unedo* L., polyphenols, tannins, qualitative analysis, quantitative analysis, UV-Vis spectrophotometry

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

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

The thesis was accepted: September 2019