

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

Kosalec, Ivan; Zovko, Marijana; Poljanšek, Irena; Pepljnjak, Stjepan; Kalodžera, Zdenka; Šešok, Tatjana; Matica, Biserka

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

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

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

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



Repository / Repozitorij:

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



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

IVAN KOSALEC¹, MARIJANA ZOVKO¹, IRENA POLJANŠEK¹, STJEPAN PEPELJNJAK¹, ZDENKA KALOĐERA¹, TATJANA ŠEŠOK², BISERKA MATICA³

¹Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 10000 Zagreb,

²BELUPO d.d., 48000 Koprivnica,

³Zavod za javno zdravstvo grada Zagreba, 10000 Zagreb

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

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

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

UVOD

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



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

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

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

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



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

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

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

EKSPERIMENTALNI DIO

Ispitivani materijal

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

Određivanje ukupnih fenola i trjeslovina

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

Određivanje fenolskih glikozida

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

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

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

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

Antimikrobni učinak

Mikrobne vrste

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

Utvrđivanje antimikrobnog učinka: metode difuzije i dilucije

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

REZULTATI I RASPRAVA

Određivanje fenolnih spojeva u ekstraktu medvjetkina lista

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

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

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

Antimikrobni učinak

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

Tablica 2. Antimikrobni učinak ekstrakta medvjetskina lista difuzijskom metodom

	zone inhibicije rasta s.v. ± S.D. (mm)						
	<i>S. aureus</i> (N=5)	<i>E. faecalis</i> (N=5)	<i>E. coli</i> (N=5)	<i>P. aeruginosa</i> (N=5)	<i>P. mirabilis</i> (N=5)	<i>K. pneumoniae</i> (N=5)	<i>C. albicans</i> (N=5)
Medvjetskin list (100 mg/ml)	20,5±1,3	19,0±0,9* [¶]	26,9±0,6	28,4±2,3*	28,1±1,0 [¶]	28,5±1,4	–

Legenda: s.v. = srednja vrijednost; S.D. = standardna devijacija; – = nema učinka; * i [¶] = parovi vrijednosti su statistički značajni (p<0,05; ANOVA)

Tablica 3. Antimikrobni učinak poredbenih tvari difuzijskom metodom

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

Legenda: – = nema učinka

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

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

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

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

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

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

Tablica 5. MIK i MMK vrijednosti poredbenih tvari

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

Legenda: – = nema učinka

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

ZAKLJUČAK

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

Literatura – References

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

Primljeno 26. svibnja 2008.