

# Biološka aktivnost polipropilenglikolnih ekstrakata zeleni hmeljaste vije (*Medicago lupulina* L.)

---

**Blažević, Anamaria**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*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:163:130121>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-29**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Anamaria Blažević**

**Biološka aktivnost polipropilenglikolnih  
ekstrakata zeleni hmeljaste vije (*Medicago  
lupulina* L.)**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmakognozija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Marijane Zovko Končić.

*Srdačno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Marijani Zovko Končić i asistentici Lejsi Jakupović na pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada te Luciji Halusek na tehničkoj podršci.*

*Zahvaljujem i članovima obitelji na iskazanom razumijevanju i podršci tijekom dosadašnjeg obrazovanja.*

*Hvala i kolegicama Sari i Karli uz čije je ugodno društvo razdoblje na fakultetu proletjelo.*

# SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
1.1.	Biljna vrsta <i>Medicago lupulina</i> L.....	1
1.2.	Polifenoli .....	2
1.2.1.	Flavonoidi.....	3
1.2.2.	Fenolne kiseline.....	3
1.2.3.	Kumestrol .....	4
1.3.	Oksidativni stres i slobodni radikali .....	5
1.3.1.	Antioksidansi.....	6
1.4.	Tirozinaza .....	7
2.	OBRAZLOŽENJE TEME .....	8
3.	MATERIJALI I METODE .....	9
3.1.	Materijali .....	9
3.1.1.	Biljni materijal.....	9
3.1.2.	Kemikalije .....	9
3.1.3.	Uređaji .....	9
3.2.	Metode.....	10
3.2.1.	Ultrazvučna ekstrakcija .....	10
3.2.2.	Određivanje ukupnih polifenola .....	10
3.2.3.	Određivanje ukupnih flavonoida .....	11
3.2.4.	Određivanje ukupnih fenolnih kiselina .....	11
3.2.5.	Ispitivanje antiradikalne aktivnosti.....	12
3.2.6.	Ispitivanje kelirajuće aktivnosti.....	13
3.2.7.	Ispitivanje sposobnosti inhibicije tirozinaze .....	13
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	15
4.1.	Određivanje ukupnih polifenola .....	15
4.2.	Određivanje ukupnih flavonoida .....	16
4.3.	Određivanje ukupnih fenolnih kiselina .....	17
4.4.	Ispitivanje antiradikalne aktivnosti.....	18
4.5.	Ispitivanje kelirajuće aktivnosti.....	20
4.6.	Ispitivanje sposobnosti inhibicije tirozinaze .....	22
5.	ZAKLJUČAK .....	24
	LITERATURA .....	25
	SAŽETAK.....	29
	SUMMARY .....	30
	Temeljna dokumentacijska kartica	
	Basic documentation card	

# 1. UVOD

## 1.1. Biljna vrsta *Medicago lupulina* L.

Hmeljasta vija (*Medicago lupulina* L., Fabaceae) je jednogodišnja, višegodišnja ili trajna biljka iz porodice Fabaceae u Hrvatskoj poznata i pod imenima dunjica, gunjica te crna ili pužasta vija (Slika 1). Zeljasta je biljka polegnute ili pridignute, dlakave stabljike visine od 10 do 60 cm. Listovi su joj sastavljeni od tri listića dlakava s donje strane. Cvatovi su žute boje, sastavljeni od 10 do 50 cvjetova te izgledom podsjećaju na cvatove hmelja (*Humulus lupulus* L., Cannabaceae). Plodovi su male, bubrežaste mahune koje sazrijevanjem poprimaju crnu boju te sadrže jednu do 2 mm dugu sjemenku. Kao samonikla biljka rasprostranjena je u umjerenom i subtropskom području Europe, Azije i Sjeverne Afrike dok je u ostale dijelove svijeta prenesena. Raste na livadama, pašnjacima i poljima te uz puteve (Yan i sur., 2009; Grlić 1990).

Podaci o tradicionalnoj medicinskoj upotrebi biljne vrste *M. lupulina* su oskudni. Etnobotanička studija provedena na području središnje Italije govori o primjeni infuza, pripremljenog od listova i cvjetova, na kožu, kao emolijensa i sredstva s umirujućim učinkom. Iako se ova biljka ne kultivira, najčešće se koristi kao stočna hrana (Lucchetti i sur., 2019; Yan i sur., 2009).

Nadzemni dijelovi *M. lupulina* sadrže triterpenske saponine te polifenolne spojeve, kao npr. izoflavonoide i kumestrol. Kumestrol je najzastupljeniji u listovima, dok su najniže koncentracije pronađene u cvjetovima. Sadržaj kumestrola, triterpenskih saponina, proteina i vlakana veći je u proklijalim nego u sirovim sjemenkama (Butkutė i sur., 2019; Butkutė i sur., 2018).

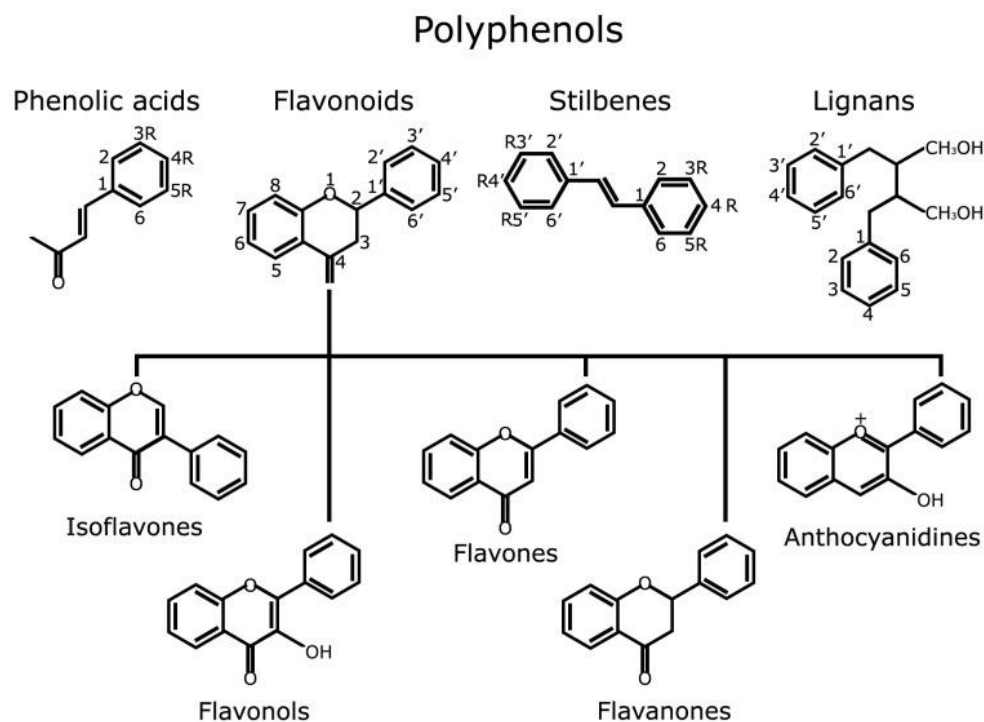


Slika 1. *Medicago lupulina* L., Fabaceae (Izvor: [www.feedipedia.org](http://www.feedipedia.org)).

## 1.2. Polifenoli

Polifenoli su s više od 8000 sastavnica vrlo zastupljeni sekundarni metaboliti biljaka. Njihova primarna uloga kao sekundarnih metabolita je zaštita biljaka od UV zračenja, virusa, bakterija i insekata. Također, daju biljkama karakterističnu boju, okus i miris. Na temelju razlike u broju fenolnih prstenova i strukturnih komponenti koje povezuju prstenove dijele se u četiri osnovne skupine: flavonoide, fenolne kiseline, stilbene i lignane (Slika 2). Brojne prehrabene namirnice bogate su polifenolima, a kao najbogatiji izvori navode se bobičasto voće, grožđe, jabuke, kruške, višnje, kava, čaj, crno vino i mahunarke. Epidemiološke studije povezuju dugotrajnu primjenu hrane bogate polifenolima s nižim rizikom od razvoja kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti, dijabetesa, osteoporoze i karcinoma (Pandey i Rizvi, 2009).

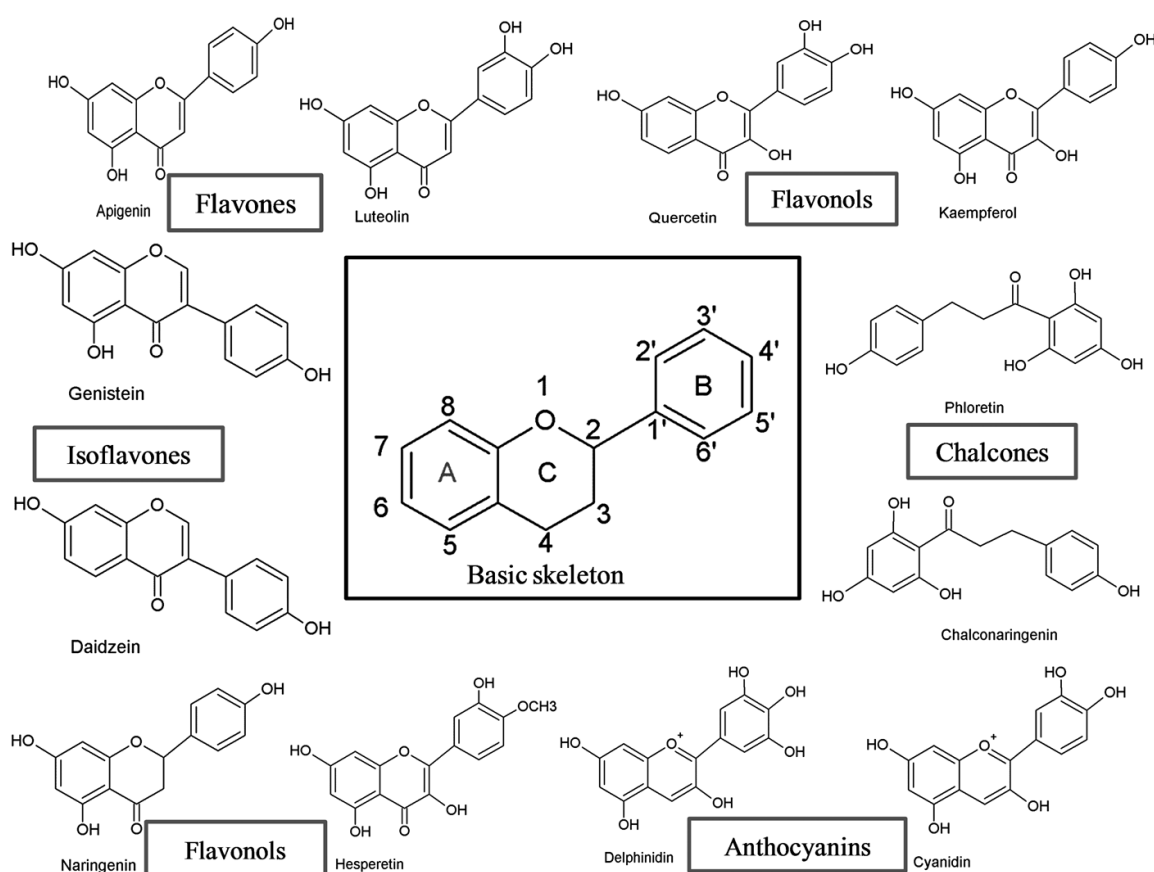
Polifenoli su potentni egzogeni antioksidansi. Zbog prisutnosti fenolnih skupina stupaju u izravnu reakciju sa slobodni radikalima, reduciraju ih u manje reaktivne komponente i zaustavljaju lančane reakcije koje uzrokuju oštećenja biomolekula. Također, nastanak slobodnih radikala inhibiraju keliranjem iona prijelaznih metala (npr.  $\text{Cu}^+$  i  $\text{Fe}^{2+}$ ) i smanjenjem aktivnosti enzima uključenih u njihovu proizvodnju (Michalak i sur., 2021; Pandey i Rizvi, 2009).



Slika 2. Klasifikacija polifenola (Losada-Echeberría i sur., 2017).

## 1.2.1. Flavonoidi

Flavonoidi su najzastupljeniji polifenoli u ljudskoj prehrani. Zajednička karakteristika svih flavonoida je struktura sastavljena od dva aromatska prstena povezana s propanskim lancem. Propanski lanac najčešće se povezuje s kisikom i tvori središnji šesteročlani heterociklički prsten. Ovisno o stupnju oksidacije i razlici u supstituciji središnjeg heterocikličkog prstena dijele se u šest podskupina: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli, antocijanidini i izoflavonoidi (Slika 3). U prirodi su uglavnom prisutni u obliku glikozida i štite biljke od nepovoljnih okolišnih čimbenika. Pripisuje im se antioksidativno djelovanje zbog čega se intenzivno istražuje njihova primjena u liječenju brojnih bolesti te u kozmetičkoj industriji s ciljem prevencije prijevremenog starenja kože. Uz antioksidativno djelovanje, uzrokom povoljnog utjecaja polifenola na ljudsko zdravlje smatra se i njihovo inhibitorno djelovanje na pojedine enzime, kao npr. ksantin-oksidadu, ciklooksigenazu i lipooksigenazu (Panche i sur., 2016; Pandey i Rizvi, 2009).



Slika 3. Strukture šest osnovnih podskupina flavonoida (Panche i sur., 2016).

### 1.2.2. Fenolne kiseline

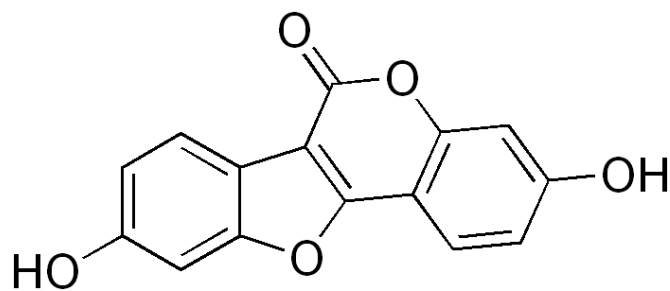
Trećinu ukupnih polifenola zastupljenih u ljudskoj prehrani čine fenolne kiseline. Najveće količine fenolnih kiselina nalaze se u sjemenkama, kori voća i listovima lisnatog povrća. Na temelju osnovne strukture podijeljene su u dvije podskupine: hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Najzastupljenije hidroksibenzojeve kiseline su: protokatehinska, vanilinska, siringinska, galna i elaginska. Međusobno se razlikuju po stupnju hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena. U biljkama su uglavnom prisutne u konjugiranom obliku sa strukturnim komponentama biljke (ligninom), jednostavnim šećerima i organskim kiselinama. Slabije su zastupljene u ljudskoj prehrani od hidroksicimetnih kiselina. Hidroksicimetne kiseline rijetko nalazimo u slobodnom obliku. Uglavnom su prisutne kao esteri hidroksikiselina (npr. šikiminske, kininske i tartarne kiseline) ili glikozilirani derivati. Najzastupljenije hidroksicimetne kiseline su: kavena, kumarinska, ferulična i sinapinska kiselina (Kumar i Goel, 2019; Pandey i Rizvi, 2009).

Fenolne kiseline u *in vitro* istraživanjima pokazuju snažno antioksidativno djelovanje. Zahvaljujući antioksidativnom učinku, štite kožu od štetnog utjecaja UV zračenja. Zbog navedenih učinaka, intenzivno se istražuje njihov potencijal u liječenju bolesti povezanih s oksidativnim stresom, kao i njihova primjena u kozmetičkim pripravcima za sprječavanje prijevremenog starenja kože (Kumar i Goel, 2019; Svobodová i sur., 2003).

### 1.2.3. Kumestrol

Kumestrol je polifenolni spoj koji pripada skupini kumestana, a najzastupljeniji je u biljkama porodice Fabaceae. U strukturi posjeduje kondenzirani prstenasti sustav sastavljen od benzofurana i kumarina te dvije hidroksilne skupine (Slika 4). Prisutnost hidroksilnih skupina u strukturi, kao i njihov položaj koji je analogan položaju hidroksilnih skupina u molekuli estrogena, smatraju se odgovornim za njegov antioksidativni i fitoestrogenski učinak. Također, ispitivanjima je dokazan i negativan utjecaj kumestrola na pigmentaciju. Posljedično, zahvaljujući dokazanom antioksidativnom i fitoestrogenskom učinku, istražuje se njegov potencijal u zaštiti kože od fotostarenja, dok se zbog negativnog utjecaja kumestrola na melanogenezu, istražuje njegova primjena u proizvodima za ublažavanje hiperpigmentacijskih stanja kože (Montero i sur., 2019; Hwang i sur., 2017).





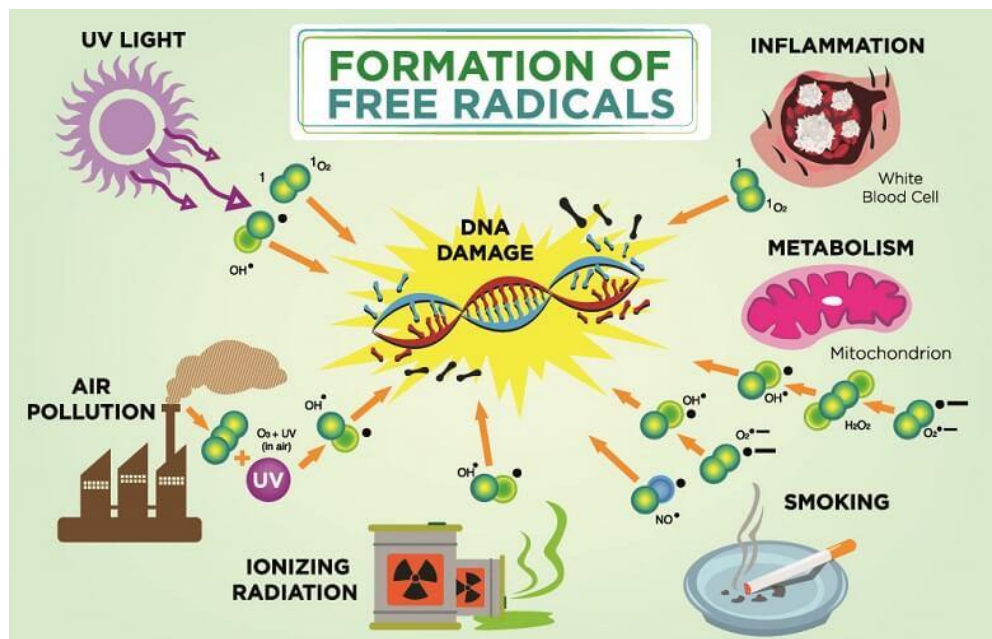
Slika 4. Struktura kumestrola (Izvor: [www.en.wikipedia.org](http://www.en.wikipedia.org)).

### 1.3. Oksidativni stres i slobodni radikali

Oksidativni stres je stanje neravnoteže između stvaranja i nakupljanja ROS-a (eng. *reactive oxygen species*) u organizmu i antioksidativnog obrambenog mehanizma što rezultira oštećenjem stanica i tkiva. ROS je zajednički naziv za kisikove slobodne radikale (npr. superoksidni radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ) i hidroksilni radikal ( $\cdot OH$ )) te njegove reaktivne neradikalne derivate (vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i hipokloritnu kiselinu ( $HClO$ )). Važnost reaktivnih kisikovih derivata u kontekstu oksidativnog stresa vidljiva je na primjeru vodikova peroksida. Vodikov peroksid, iako nije slobodan radikal, u prisutnosti prijelaznih metalnih iona ( $Fe^{2+}$  i  $Cu^+$ ) generira najreaktivniji slobodni radikal, hidroksilni radikal (Pizzino i sur., 2017; Parčetić-Kostelac i sur., 2016).

Slobodni radikali u vanjskom elektronskom omotaču imaju jedan ili više nesparenih elektrona, a karakterizira ih kratak poluživot, niska specifičnost za reaktante i velika reaktivnost. Velika reaktivnost posljedica je težnje za postizanjem elektronske stabilnosti zbog čega reagiraju sa susjednim molekulama uzimajući im elektron. Na taj način pokreću neenzimske lančane reakcije koje generiraju nove radikale koji reagiraju s lipidima, proteinima i nukleinskim kiselinama te mijenjaju njihova svojstva (Parčetić-Kostelac i sur., 2016). Izvori slobodnih radikala dijele se na egzogene i endogene (Slika 5). Endogeni izvori slobodnih radikala mogu biti fiziološki i patofiziološki kao npr. aktivacija imunskog sustava, upala, ishemija, infekcija, intenzivna fizička aktivnost te psihički stres. Egzogeni izvori slobodnih radikala su zagađivači okoliša, alkohol, cigarete, zračenje, organska otapala, teški metali i neki lijekovi. Glavno mjesto nastanka slobodnih radikala u stanici su mitohondriji u procesu koje se zove oksidativna fosforilacija. U nižim koncentracijama sinteza i prisutnost ROS-a unutar stanice nužni su za procese diferencijacije, fosforilacije proteina, imunski odgovor organizma i apoptozu. Međutim, najčešće se prekomjerno nakupljaju u organizmu, što rezultira

oksidativnim stresom koji se smatra uzročnikom nekih degenerativnih i kroničnih bolesti, a povezuje ga se i sa starenjem organizma i kože (Pizzino i sur., 2017).



Slika 5. Izvori slobodnih radikala (Izvor: [www.biologydictionary.net](http://www.biologydictionary.net)).

### 1.3.1. Antioksidansi

Antioksidansi su tvari koje u kratkom vremenskom periodu neutraliziraju višak slobodnih radikala te na taj način štite organizam od posljedica oksidativnog stresa. Dijele se na endogene (sintetiziraju se u stanici) i egzogene (unose se hranom ili suplementima) antioksidanse. Djelovanje ostvaruju na nekoliko načina: onemogućavaju stvaranje novih slobodnih radikala u organizmu, uništavaju već stvorene slobodne radikale (eng. scavengers – „čistači“) ili popravljaju oštećenja nastala djelovanjem slobodnih radikala. Osim na endogene i egzogene, antioksidansi se mogu podijeliti i na antioksidacijske enzime i neenzimske antioksidanse. Antioksidacijski enzimi djeluju kao „čistači“ slobodnih radikala (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza) ili popravljaju oštećenja makromolekula uzrokovana slobodnim radikalima. Neenzimskim antioksidansima pripadaju proteini (npr. transportni protein i protein odgovoran za deponiranje iona željeza, transferin i feritin) i male molekule (vitamin C, vitamin E, flavonoidi, karotenoidi i dr.). Proteini sudjeluju u sprječavanju nastanka slobodnih radikala, dok male molekule uklanjaju nastale slobodne radikale (Parčetić-Kostelac i sur., 2016; Pham-Huy i sur., 2008).

## 1.4. Tirozinaza

Tirozinaza je ključan enzim složenog procesa melanogeneze, tijekom kojeg, kao posljedica izloženosti UVB zračenju, nastaje pigment melanin. Dvije vrste melanina, smeđe-crni (eumelanin) i crveno-žuti (feomelanin), apsorbiraju štetno UVB zračenje i daju koži, kosi i očima boju (Pillaiyar i sur., 2017).

Tirozinaza (polifenol oksidaza) je glikoprotein smješten u membrani melanosoma, melanocitnog organela u kojem se odvija proces melanogeneze. U aktivnom mjestu sadrži dva iona bakra i tri histidinska ostatka. Njezina katalitička aktivnost u procesu melanogeneze vezana je uz hidroksilaciju L-tirozina pri čemu nastaje L-DOPA te oksidaciju L-DOPA-e u dopakinon iz kojeg kroz nekoliko reakcijskih koraka nastaje melanin. Također, tirozinaza katalizira i prevođenje dopamina u dopakinone te na taj način sudjeluje u proizvodnji neuromelanina. Povećanja aktivnost tirozinaze u mozgu rezultira povećanim koncentracijama neuromelanina što se povezuje s neurodegenerativnim bolestima kao npr. Parkinsonovom i Huntingtonovom bolesti. Tirozinaza je odgovorna i za enzimatско tamnjenje voća, povrća i gljiva (Pillaiyar i sur., 2017).

Iako pigmentacija ima zaštitnu ulogu, povećana proizvodnja melanina rezultira hiperpigmentacijskim stanjima kao što su melazma, solarni lentigo i pjege. Obzirom na ključnu ulogu tirozinaze u sintezi melanina, inhibitori tirozinaze (sintetski i prirodni) danas se često koriste u proizvodima za liječenje hiperpigmentacija. Osim što se primjenjuju u medicinske svrhe, česti su sastojci kozmetičkih proizvoda kojima je cilj postizanja svjetlije puti. Danas se najviše istražuju inhibitori tirozinaze iz prirodnih izvora (biljke, bakterije i gljive) obzirom da su manje toksični i imaju bolju bioraspoloživost od sintetskih. U *in vitro* studijama, za ispitivanje djelotvornosti inhibitora tirozinaze, najviše se koristi tirozinaza izolirana iz gljive *Agaricus bisporus*. Osim što je navedena gljiva relativno jeftini izvor tirozinaze, njezina tirozinaza pokazuje veliku sličnost s humanom tirozinazom (Zolghadri i sur., 2019).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Starenje kože složen je biološki proces koji se odvija pod utjecajem intrinzičnih (genetika, hormoni, metabolički procesi) i ekstrinzičnih (UV zračenje, toksini, polutanti) faktora. Ekstrinzično starenje naziva se i fotostarenjem, obzirom da je u najvećoj mjeri potaknuto oksidativnim stresom koji je posljedica pretjeranog izlaganja UV zračenju. Karakteriziraju ga suha koža smanjene elastičnosti, hiperpigmentacije i bore (Binic i sur., 2013). Navedeno, osim što nagrđuje vanjski izgled pojedinca, ima i negativne utjecaje na samopouzdanje i samozadovoljstvo zbog čega postoji velika potražnja za proizvodima koji mogu prevenirati fotostarenje ili ublažiti njegove posljedice. Osim djelotvornosti, velika se pažnja posvećuje i netoksičnosti navedenih proizvoda zbog čega raste potražnja za prirodnom kozmetikom.

Cilj ovog rada bio je spektrofotometrijski odrediti sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina u ekstraktima zeleni biljne vrste *M. lupulina* te im ispitati biološke učinke radi njihove potencijalne primjene u kozmetičkim proizvodima protiv starenja kože. Od bioloških učinaka ispitana je antioksidativna aktivnost i inhibitorni učinak na enzim tirozinazu. Kao ekstrakcijsko otapalo korišten je polipropilenglikol zbog odličnih ekstrakcijskih svojstava, niske toksičnosti i niskog potencijala iritacije kože (Jakupović i sur., 2021).

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Biljni materijal**

U ispitivanju je korištena zelen biljne vrste *M. lupulina* koja je ubrana u vrijeme cvatnje na livadama uz zagrebačko jezero Jarun. Zelen je nakon sušenja i usitnjavanja zapakirana u papirnatu vrećicu te pohranjena na suho i tamno mjesto.

##### **3.1.2. Kemikalije**

U svrhu ispitivanja korištene su sljedeće kemikalije:  $AlCl_3$ , butilhidroksianisol (BHA), destilirana voda, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), ferozin, željezov (II) sulfat heptahidrat, Folin-Ciocalteu reagens, galna kiselina, kavena kiselina, kojična kiselina, kvercetin dihidrat, tirozinaza izolirana iz šampinjona (*Agaricus bisporus* L.) (Sigma Aldrich, SAD), L-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) (Cayman Chemical Company, SAD) i polipropilenglikol (A&C, Irska).

##### **3.1.3. Uređaji**

U ispitivanjima su korišteni sljedeći uređaji: precizna vaga (Mettler Toledo, Švicarska), ultrazvučna kupelj (Sonorex digital, Bandelin electronic, Njemačka) i UV/Vis spektrofotometar (BMG Labtech, Njemačka).

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Ultrazvučna ekstrakcija

U dvije Erlenmeyerove tikvice od 50 mL odvađeno je 0,2 g usitnjenog biljnog materijala. Neposredno prije početka ultrazvučne ekstrakcije, biljnom materijalu u tikvicama dodano je 20 g odgovarajućeg ekstrakcijskog sredstva te su tikvice zatvorene parafilmom. Ekstrakcije su provedene pri 50 % snage ultrazvuka, a temperatura i vrijeme ekstrakcije prikazani su u Tablici 1. Neposredno nakon ekstrakcije, vrući ekstrakti filtrirani su kroz naborani filter papir u vijale i pohranjeni na 4 °C. Ekstrakcijski uvjeti odabrani su u skladu s rezultatima prethodnih istraživanja (Kalvarešin, 2020.) koja su pokazala da su pri navedenim uvjetima ekstrakcije, ekstrakti najbogatiji aktivnim sastavnicama (ukupnim polifenolima i kumestrolom).

Tablica 1. Prikaz ekstrakcijskih uvjeta.

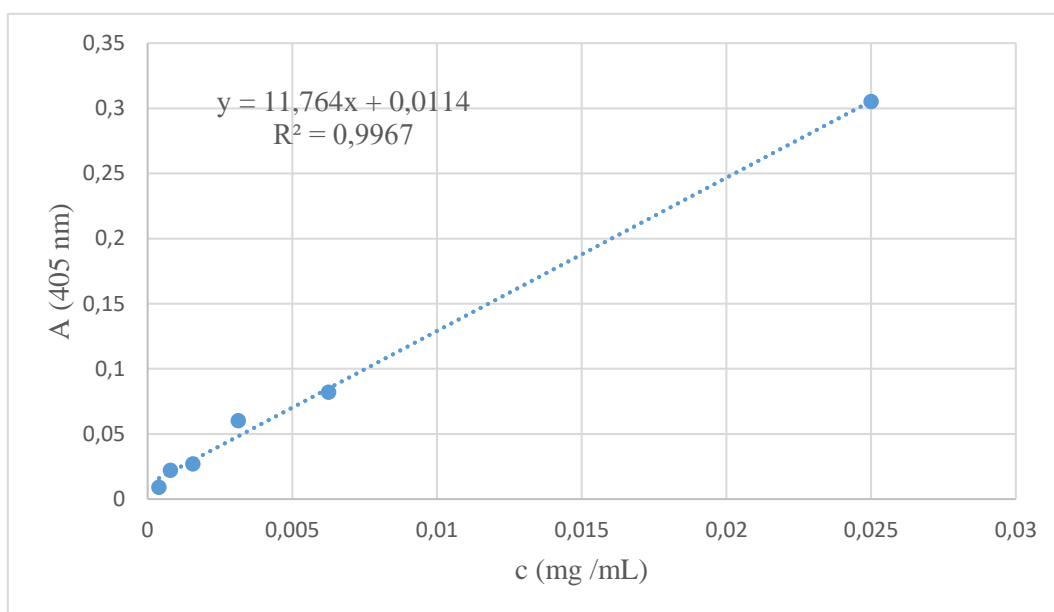
Naziv uzroka	Masa droge (g)	Otapalo (20 g)	Temperatura (°C)	Vrijeme ekstrakcije (min)	Snaga ultrazvuka (%)
U1	0,200	10 % PPG	70	20	50
U2	0,200	50 % PPG	80	35	50

### 3.2.2. Određivanje ukupnih polifenola

Sadržaj ukupnih polifenola određen je korištenjem modificirane Folin-Ciocalteu kolorimetrijske metode na mikrotitarskoj pločici (Singleton i sur., 1999). Folin-Ciocalteu reagens razrijeđen je s vodom u omjeru 1:3. U jažice je otpipetirano 80 µL otopine ekstrakta kojem je dodano 80 µL 10 %-tne otopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i 80 µL Folin-Ciocalteu reagensa. Smjesa je inkubirana u tamnoj komori na sobnoj temperaturi sat vremena. Nakon sat vremena, mjerenje apsorbancije provedeno je na 700 nm pomoću UV/Vis spektrofotometra. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima određen je na temelju vrijednosti apsorbancija otopina uzoraka te baždarnog pravca galne kiseline. Rezultati su iskazani kao ekvivalenti galne kiseline u miligramima po gramu suhe tvari ekstrakta (mg GE/g). Mjerenje je provedeno u triplikatu, a rezultati su izraženi kao aritmetička sredina.

### 3.2.3. Određivanje ukupnih flavonoida

Određivanje ukupnih flavonoida provedeno je korištenjem kolorimetrijske metode s  $\text{AlCl}_3$ . U jažice na mikrotitarskoj pločici otpipetirano je  $120 \mu\text{L}$  ekstrakta i  $120 \mu\text{L}$  0,2 %-tne metanolne otopine  $\text{AlCl}_3$ . Kao standard korištena je metanolna otopina kvercetin dihidrata koncentracije  $0,2 \text{ mg/mL}$ . Smjesa je inkubirana u tamnoj komori na sobnoj temperaturi jedan sat. Nakon sat vremena, mjerenje apsorbancije provedeno je na  $405 \text{ nm}$  pomoću UV/Vis spektrofotometra. Ukupan sadržaj flavonoida u ekstraktima određen je pomoću baždarnog pravca kvercetin dihidrata (Slika 6), a rezultati su prikazani kao ekvivalenti kvercetin dihidrata (QE) u miligramima po gramu suhe tvari ekstrakta ( $\text{mg QE/g}$ ). Mjerenje je provedeno u triplicatu, a rezultati su izraženi kao aritmetička sredina.

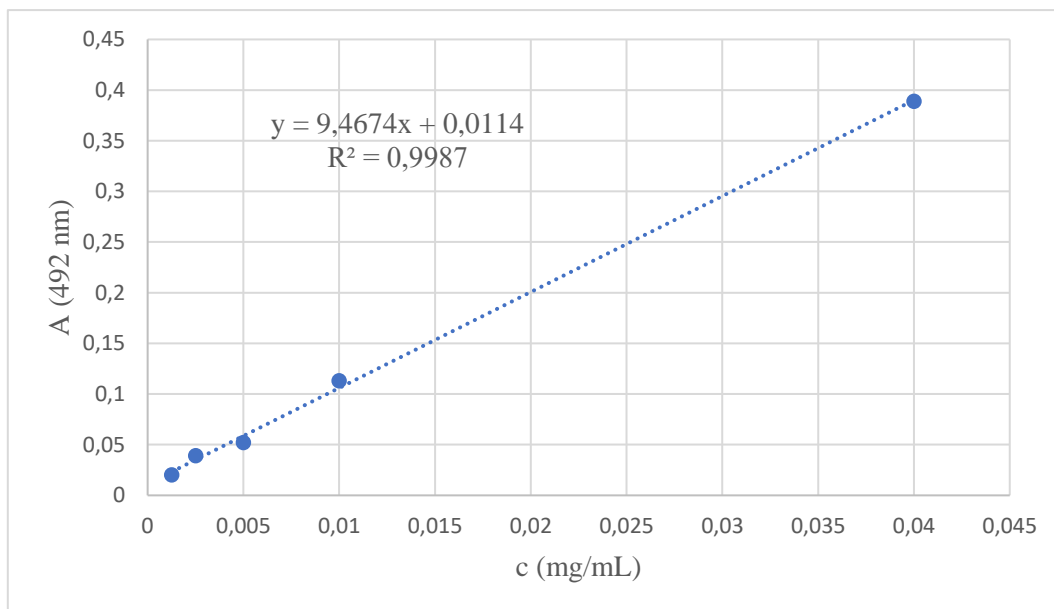


Slika 6. Baždarni pravac kvercetin dihidrata.

### 3.2.4. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina

Određivanje ukupnih fenolnih kiselina provedeno je korištenjem spektrofotometrijske metode s nitrit-molibdat reagensom. U jažice na mikrotitarskoj pločici otpipetirano je  $100 \mu\text{L}$  uzorka,  $50 \mu\text{L}$  otopine  $\text{HCl}$ -a ( $0,5 \text{ M}$ ),  $50 \mu\text{L}$  nitrit-molibdat reagensa i  $50 \mu\text{L}$  8,5 %-tne otopine  $\text{NaOH}$ . Kao standard korištena je metanolna otopina kavene kiseline ( $0,2 \text{ mg/mL}$ ). Smjesa je inkubirana u tamnoj komori na sobnoj temperaturi 10 minuta. Nakon 10 minuta mjerenje apsorbancije provedeno je na  $492 \text{ nm}$  pomoću UV/Vis spektrofotometra. Sadržaj

ukupnih fenolnih kiselina određen je pomoću baždarnog pravca kavene kiseline (Slika 7), a rezultati su prikazani kao ekvivalenti kavene kiseline (CAE) u miligramima po gramu suhe tvari ekstrakta (mg CAE/g). Mjerenje je provedeno u triplikatu, a rezultati su izraženi kao aritmetička sredina.



Slika 7. Baždarni pravac kavene kiseline.

### 3.2.5. Ispitivanje antiradikalne aktivnosti

Antiradikalna aktivnost ekstrakata ispitana je korištenjem DPPH metode. U jažice na mikrotitarskoj pločici otpipetirano je 130  $\mu\text{L}$  ekstrakta i 130  $\mu\text{L}$  metanolne otopine DPPH koncentracije 2,2 mg/mL. Za svaki uzorak napravljena je slijepa proba koja je sadržavala 130  $\mu\text{L}$  ekstrakta i 130  $\mu\text{L}$  metanola umjesto otopine DPPH. Negativna kontrola sadržavala je metanol umjesto uzorka. Kao pozitivna kontrola korištena je otopina antioksidansa BHA koncentracije 1 mg/mL. Smjesa je inkubirana u tamnoj komori na sobnoj temperaturi sat vremena. Nakon inkubacije, apsorbancija je izmjerena na 517 nm.

Sposobnost hvatanja slobodnih radikala (RSA, eng. *Radical scavenging activity*) izračunata je korištenjem formule (1):

$$RSA = \frac{A_{NK} - A_U}{A_{NK}} \times 100 \quad (1)$$



gdje je  $A_{NK}$  apsorbancija negativne kontrole, a  $A_U$  apsorbancija reakcijske smjese s uzorkom. Rezultati su iskazani kao  $EC_{50}$  što označava koncentraciju uzorka koja ima sposobnost hvatanja 50 % slobodnog radikala (DPPH) prisutnog u reakcijskoj smjesi. Mjerenje je provedeno u triplikatu, a rezultati su izraženi kao aritmetička sredina.

### 3.2.6. Ispitivanje kelirajuće aktivnosti

Kelirajuća aktivnost uzoraka ispitana je mjerenjem sposobnosti keliranja željezovih iona. U jažice na mikrotitarskoj pločici otpipetirano je 130  $\mu$ L ekstrakta i 50  $\mu$ L željezova (II) sulfata heptahidrata koncentracije 0,05 mg/mL. Nakon 5 minuta reakcijskoj smjesi dodano je 50  $\mu$ L otopine ferozina koncentracije 4,93 mg/mL. Kao pozitivna kontrola korištena je EDTA koncentracije 1 mg/mL. U negativnu kontrolu dodan je metanol umjesto uzorka. Smjesa je inkubirana u tamnoj komori na sobnoj temperaturi 10 min, nakon čega je apsorbancija izmjerena na 545 nm. Kelirajuća aktivnost izračunata je prema formuli (2):

$$KA = \frac{A_{NK} - A_U}{A_{Nk}} \times 100 \quad (2)$$

gdje je  $A_{NK}$  apsorbancija negativne kontrole, a  $A_U$  apsorbancija reakcijske smjese s uzorkom. Rezultati su iskazani kao  $EC_{50}$ , što označava koncentraciju ekstrakta koja ima sposobnost keliranja 50 %  $Fe^{2+}$  iona prisutnih u reakcijskoj smjesi. Mjerenje je provedeno u triplikatu, a rezultati su izraženi kao aritmetička sredina.

### 3.2.7. Ispitivanje sposobnosti inhibicije tirozinaze

Sposobnost ekstrakata da inhibiraju aktivnost tirozinaze ispitana je spektrofotometrijski na mikrotitarskoj pločici. U jažice je otpipetirano 120  $\mu$ L ekstrakta, 40  $\mu$ L otopine tirozinaze i 40  $\mu$ L otopine L-DOPA-e koncentracije 0,8 mg/mL. Pozitivna kontrola bila je kojična kiselina koncentracije 1 mg/mL. Negativna kontrola sadržavala je pufer umjesto uzorka. Apsorbancija je izmjerena nakon 20 min. Inhibicijska aktivnost biljnih ekstrakata na enzim tirozinazu (InhT) izračunata je korištenjem formule (3):

$$InhT = \frac{A_{NK} - A_U}{A_{NK}} \times 100 \quad (3)$$

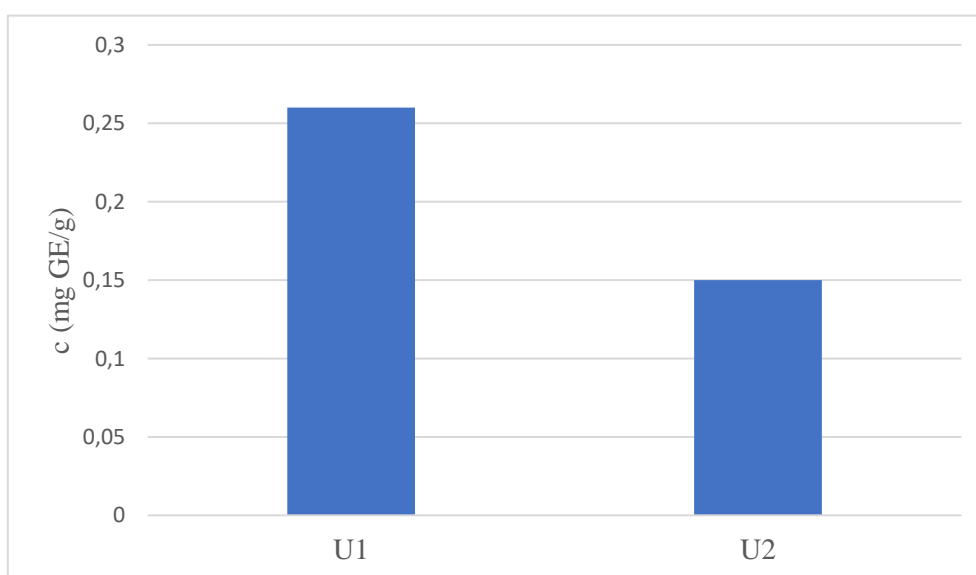
gdje je  $A_{NK}$  apsorbancija negativne kontrole, a  $A_U$  apsorbancija reakcijske smjese s uzorkom. Rezultati su izraženi kao  $EC_{50}$ , odnosno koncentracija biljnog ekstrakta koja inhibira 50 % aktivnosti tirozinaze. Mjerenje je provedeno u triplikatu, a rezultati su izraženi kao aritmetička sredina.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Određivanje ukupnih polifenola

Biljni ekstrakti bogati polifenolnim komponentama najčešće se istražuju zbog antioksidativnog učinka navedenih spojeva. Zahvaljujući antioksidativnom učinku i sposobnosti apsorbiranja UV zračenja, koje se smatra uzročnikom ekstrinzičnog starenja, koriste se kao aktivne sastavnice u proizvodima za prevenciju prijevremenog starenja kože, dok se zahvaljujući protuupalnom učinku ovih sekundarnih biljnih metabolita istražuje njihova primjena i u pripravcima za njegu nadražene kože. Osim kao djelatne komponente, mogu se koristiti i kao pomoćne sastavnice gotovih oblika jer sprječavaju oksidaciju lijeka i pomoćnih tvari te tako osiguravaju duži rok upotrebe pripravka (Soto i sur., 2015).

Sadržaj ukupnih polifenola u polipropilenglikolnim ekstraktima vrste *M. lupulina* određen je pomoću Folin-Ciocalteu reagensa. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline žute boje. U prisutnosti polifenolnih spojeva dolazi do redukcije reagensa te nastaju molibdenov i volframov oksid plave boje. Intenzitet plavog obojenja linearno je proporcionalan koncentraciji polifenola u reakcijskom mediju, a određuje se spektrofotometrijski. Reakcija se odvija u alkalnom mediju koji se postiže dodatkom  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  jer u alkalnim uvjetima dolazi do disocijacije vodikovih iona pri čemu nastaje fenolatni ion koji stupa u redoks reakciju s Folin-Ciocalteu reagensom. Međutim, obzirom da je reagens nestabilan u alkalnom mediju dodaje se u suvišku u reakcijsku smjesu (Agbor i sur., 2014).



Slika 8. Ukupni polifenoli u ekstraktima *M. lupulina*.

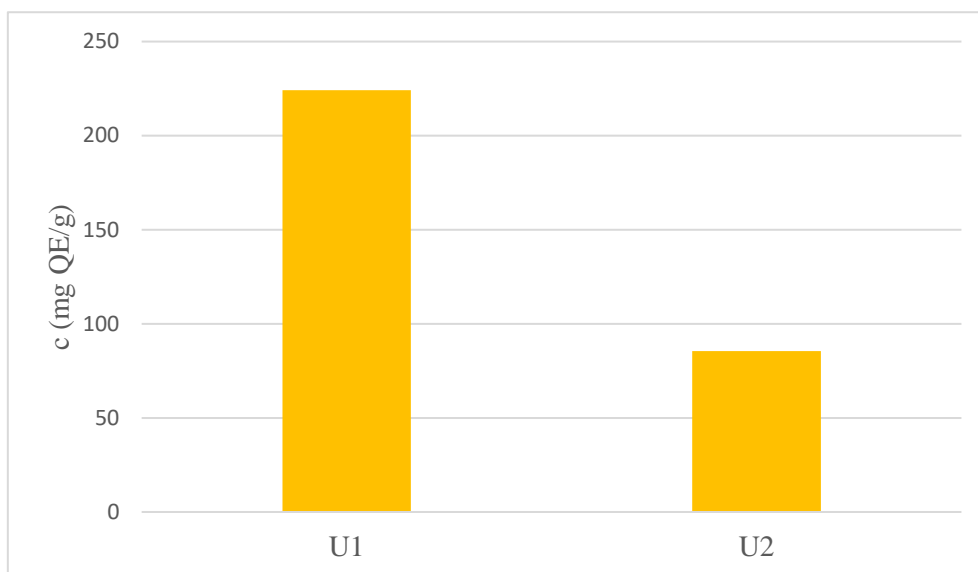
Rezultati određivanja ukupnih polifenola prikazani su na Slici 8. Ekstrakt dobiven korištenjem 10 %-tnog polipropilenglikola kao ekstrakcijskog otapala bio je bogatiji ukupnim polifenolima od ekstrakta dobivenog korištenjem 50 %-tnog polipropilenglikola. Količina ukupnih polifenola određena u ovom radu donekle odstupa od prethodno objavljenih vrijednosti (Kalvarešin, 2020). To se može objasniti činjenicom da je biljni materijal korišten u ovom istraživanju bio stariji, a poznato je da se pohranom biljnih droga smanjuje udio bioaktivnih sastavnica. Međutim, ovim radom potvrđeno je opažanje da niži maseni udio polipropilenglikola i kraće vrijeme ekstrakcije pogoduju većem prinosu polifenola. Navedeno se može objasniti činjenicom da su polifenoli prisutni u zeleni *M. lupulina* umjerene polarnosti, a polipropilenglikol je otapalo relativno visoke hidrofobnosti. Također, manji utrošak energije kao i manja količina utrošenog organskog otapala čine ovaj način ekstrakcije ekološki prihvatljivim (Jakupović i sur., 2021).

Dobiveni rezultati istraživanja uspoređeni su i s ostalim literaturnim podacima. Ispitivanjem metanolnog ekstrakta nadzemnih dijelova biljne vrste *M. lupulina* provedenim u Poljskoj (Kicel i Olszewska, 2015), određena je znatno viša koncentracija ukupnih polifenola (12,9 mg GAE/g) nego u ovom radu. Moguće je da metanol bolje ekstrahira polifenole iz zeleni od smjese polipropilenglikola i vode, međutim kako bi se to utvrdilo potrebno je provesti dodatna istraživanja. Također, kako sadržaj ukupnih polifenola u biljnom materijalu ovisi o brojnim okolišnim čimbenicima (vrsti tla, količini padalina i izloženosti biljke suncu), proizlazi da bi nizak sadržaj ukupnih polifenola u ispitivanim ekstraktima mogao biti posljedica i nepovoljnih okolišnih čimbenika tijekom rasta biljke.

## **4.2. Određivanje ukupnih flavonoida**

Biljni ekstrakti bogati flavonoidima istražuju se u kozmetičkoj industriji primarno zbog antioksidativnog djelovanja, inhibitornog učinka na nastanak teleangiektazija te umirujućeg djelovanja na kožu (Arct i Pytkowska, 2008).

Određivanje ukupnih flavonoida temelji se na spektrofotometrijskom mjerenju intenziteta boje žutog kompleksa nastalog između flavonoida i aluminijevih iona prisutnih u reakcijskoj smjesi (da Silva i sur., 2015). Rezultati određivanja ukupnih flavonoida prikazani su na Slici 9.



Slika 9. Ukupni flavonoidi u ekstraktima *M. lupulina*.

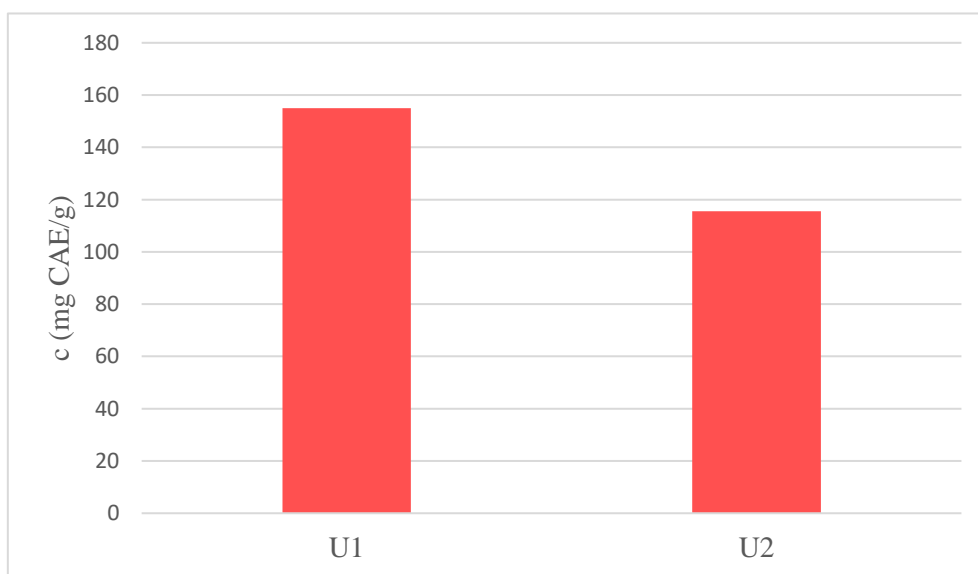
Kao i kod određivanju sadržaja ukupnih polifenola, ekstrakt dobiven korištenjem 10 %-tnog polipropilenglikola kao ekstrakcijskog otapala bio je bogatiji flavonoidima od ekstrakta dobivenog korištenjem 50 %-tnog polipropilenglikola. Na temelju ovih rezultata može se pretpostaviti da u biljci prevladavaju flavonoidi polarnije strukture. Također, u sklopu istraživanja u Poljskoj i Hrvatskoj (Jakupović i sur., 2021; Kicel i Olszewska, 2015) provedena je HPLC analiza kojoj je cilj bio identificirati i kvantificirati flavonoidne aglikone prisutne u različitim ekstraktima zeleni biljne vrste *M. lupulina*. Rezultati navedenih istraživanja ukazuju na prisutnost četiri flavonoidnih aglikona u istraživanim ekstraktima: apigenina, kemferola, luteolina i kvercetina. Opaženo je i da glicerolski ekstrakt sadrži veću količinu luteolina i apigenina nego ekstrakt dobiven korištenjem polipropilenglikola kao ekstrakcijskog otapala, dok se koncentracija kvercetina i kemferola podudarala u oba ekstrakta.

### 4.3. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina

Biljke sintetiziraju fenolne kiseline kao odgovor na oksidacijski stres, u svrhu zaštite od negativnih učinaka mikroorganizama i insekata. Zahvaljujući antioksidativnom učinku, koji se temelji na uklanjanju slobodnih radikala i keliranju metalnih iona koji potiču nastanak slobodnih radikala, sastavnice su kozmetičkih proizvoda kojim je cilj prevenirati prijevremeno starenje kože. Također, fenolne kiseline reguliraju aktivnost enzima tirozinaze zbog čega se koriste u proizvodima za ublažavanje hiperpigmentacija i postizanje ujednačene boje kože (Przybylska-Balcerek i Stuper-Szablewska, 2019).

Zbog navedene biološke aktivnosti fenolnih kiselina, njihov sadržaj u polipropilenglikolnim ekstraktima zeleni biljne vrste *M. lupulina* određen je spektrofotometrijski pomoću nitrit-molibdat reagensa. Navedenom metodom određuje se sadržaj samo hidroksicimetnih kiselina, što ne predstavlja problem jer su one zastupljenije u biljnom materijalu od hidroksibenzojevih kiselina. Određivanje se temelji na stvaranju žuto obojenog kompleksa između o-dihidroksifenolne skupine u strukturi hidroksicimetnih derivata i nitrit-molibdat reagensa. Zaluživanjem reakcijske smjese, žuta boja prelazi u narančasto-crvenu s maksimumom apsorpcije na 492 nm (Eur. Ph. 5,0, 2004).

Rezultati određivanja ukupnih fenolnih kiselina prikazani su na Slici 10. Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina, kao i polifenola i flavonoida, bio je veći ukoliko se kao ekstrakcijsko otapalo koristio 10 %-tni polipropilenglikol umjesto 50 %-tnog polipropilenglikola. Zanimljivo je da *M. lupulina* kao sekundarne metabolite sadrži kavenu i feruličnu kiselinu. Naime, za feruličnu kiselinu se i prije provedenih istraživanja pretpostavljalo da bi mogla biti vrlo zastupljeni sekundarni metabolit u *M. lupulina*, obzirom da je navedena fenolna kiselina prisutna u srodnoj biljci *M. sativa* kao jedna od najzastupljenijih fenolnih komponenti.



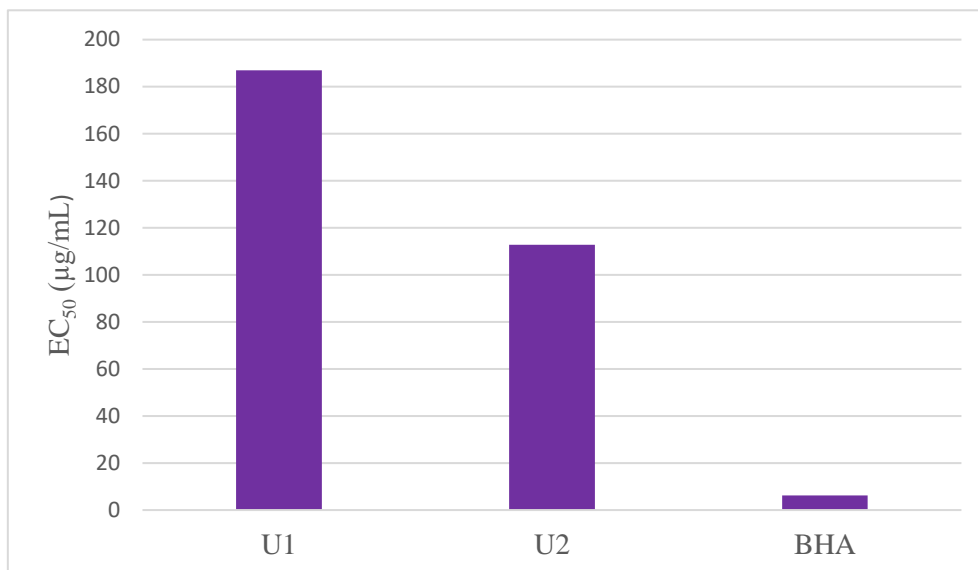
Slika 10. Ukupne fenolne kiseline u ekstraktima *M. lupulina*.

#### 4.4. Ispitivanje antiradikalne aktivnosti

Koža, kao najizloženiji ljudski organ, pod stalnim je utjecajem brojnih okolišnih čimbenika koji su odgovorni za njezino oštećenje i promjenu njezina izgleda. Pod utjecajem okolišnih zagađivača, UV zračenja, kemikalija i mehaničkih čimbenika, u koži dolazi do

povećane proizvodnje ROS-a. Od svih navedenih ekstrinzičnih faktora, na nakupljanje slobodnih radikala u koži najveći utjecaj ima UV zračenje (80 %) zbog čega se ono smatra glavnim uzročnikom njezina prijevremenog starenja. Ukoliko koncentracija ROS-a nadvlada antioksidativnu sposobnost stanice, nastaje oksidacijski stres koji povećava vjerojatnost nastanka karcinoma kože i ubrzava proces njezina starenja. Starenjem se također smanjuje aktivnost endogenog antioksidativnog sustava. Kako bi se nadoknadila smanjena aktivnost endogenog antioksidativnog sustava te smanjili negativni utjecaji oksidativnog stresa na izgled i zdravlje kože poželjno je kontinuirano i preventivno njegovati kožu proizvodima bogatim egzogenim antioksidansima. Oni svoj učinak iskazuju isključivo ukoliko su prisutni u odgovarajućoj koncentraciji na početku ili za vrijeme trajanja oksidacijskog stresa. Primjena proizvoda bogatih antioksidansima neposredno nakon oštećenja izazvanih egzogenim čimbenicima nije poželjna jer može rezultirati dodatnim negativnim učincima na regulaciju staničnog ciklusa i apoptozu (Poljšak i Dahmane, 2012).

DPPH metoda često se koristi za određivanje sposobnosti spojeva ili biljnih ekstrakata da djeluju kao „čistači“ slobodnih radikala na način da doniraju vodikov atom ili elektron. Metoda je brza, jednostavna i jeftina, može se koristiti za ispitivanje hidrofilnih i hidrofobnih antioksidansa, a obzirom da se odvija na sobnoj temperaturi, izbjegnuta je termička degradacija antioksidansa. DPPH je relativno stabilan radikal zbog čega se ne mora generirati u reakcijskoj smjesi neposredno prije ispitivanja antioksidativne aktivnosti. Otopina DPPH radikala ima intenzivnu ljubičastu boju s maksimumom apsorbancije na 517 nm. U prisutnosti antioksidansa koji doniraju elektron ili vodikov atom dolazi do njegove redukcije u difenilpikrilhidrazin i posljedičnog gubitka ljubičaste boje što mjerimo spektrofotometrijski. Pad apsorbancije na 517 nm proporcionalan je antiradikalnoj aktivnosti ispitivanog spoja ili biljnog ekstrakta (Kedare i Singh, 2011; Amarowicz i sur., 2004).



Slika 11. Antiradikalna aktivnost ekstrakata *M. lupulina*.

Kao što je prikazano na Slici 11 pozitivna kontrola BHA imala je znatno veću antiradikalnu aktivnost od ispitivanih ekstrakata. Iako je očekivana veća antiradikalna aktivnost ekstrakta koji sadrži veću koncentraciju polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina, navedena pozitivna korelacija je izostala. Na temelju ovih opažanja može se zaključiti da navedeni spojevi potencijalan antioksidativni učinak ispoljavaju nekim drugim mehanizmima. Također, obzirom da biljke sadrže velik broj sastavnica, moguće je da neke druge sastavnice koje nisu ispitivane u ovom radu djeluju kao „čistači slobodnih radikala“ zbog čega je potrebno provesti dodatna istraživanja.

Ispitivanjem provedenim u Poljskoj nad metanolnim ekstraktima zeleni *M. lupulina* zabilježena je znatno niža antiradikalna aktivnost korištenjem DPPH metode u usporedbi s aktivnošću ekstrakata ispitivanih u ovom radu (Kicel i Olszewska, 2015).

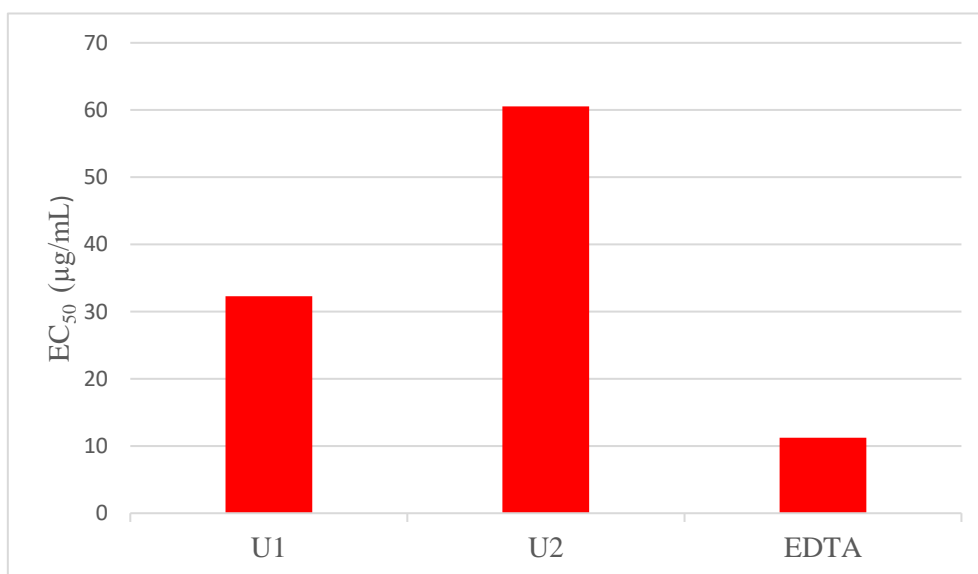
#### 4.5. Ispitivanje kelirajuće aktivnosti

Većina hidroksilnog radikala nastaje Fentonovom reakcijom iz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u prisutnosti iona prijelaznih metala (Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>+</sup>, Co<sup>2+</sup>). Hidroksilni radikal je vrlo reaktivan, s poluvremenom života u vodenom mediju od 1 ns. Zbog navedene reaktivnosti, često reagira s prvom makromolekulom na koju naiđe na mjestu nastanka zbog čega uzrokuje značajna oštećenja stanice i tkiva. Obzirom da povećana koncentracija iona prijelaznih metala u organizmu rezultira nastankom hidroksilnog radikala, u sklopu ispitivanja antioksidativne aktivnosti



polipropilenglikolnih ekstrakata *M. lupulina*, ispitana je njihova kelirajuća aktivnost (Valko i sur., 2006).

Ispitivanje se temelji na sposobnosti sastavnica polipropilenglikolnih ekstrakta da keliraju  $\text{Fe}^{2+}$  iz kompleksa s ferozinom.  $\text{Fe}^{2+}$  s ferozinom tvori kompleks crvene boje koji apsorbira na 545 nm. Intenzitet boje kompleksa smanjuje se proporcionalno kelirajućoj aktivnosti biljnih ekstrakata, odnosno razaranju  $\text{Fe}^{2+}$ -ferozin kompleksa, što se mjeri spektrofotometrijski.



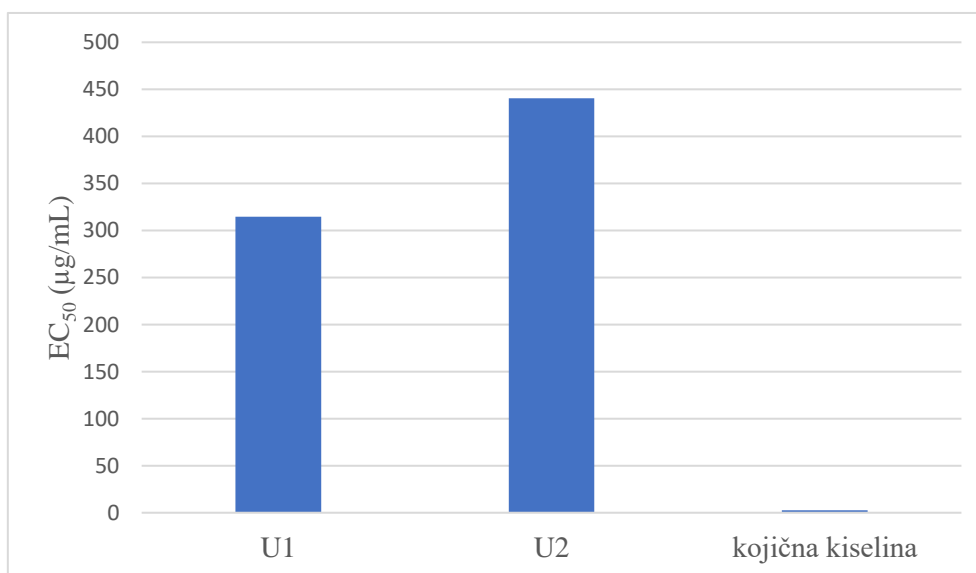
Slika 12. Kelirajuća aktivnost ekstrakata *M. lupulina*.

Rezultati su prikazani na Slici 12. Kelirajuća aktivnost pozitivne kontrole (EDTA) bila je znatno veća od aktivnosti ispitivanih ekstrakata. Ekstrakt dobiven korištenjem 10 %-tnog polipropilenglikola kao ekstrakcijskog otapala pokazao je dvostruko jaču kelirajuću aktivnost od ekstrakta dobivenog korištenjem 50 %-tnog polipropilenglikola. U1 u kojem je prisutna veća količina fenolnih spojeva određivanih u sklopu ovog rada pokazao je i jaču kelirajuću aktivnost. Navedeno opažanje upućuje na zaključak da polifenoli, flavonoidi i fenolne kiseline prisutni u ispitivanim ekstraktima doprinose njihovom antioksidativnom učinku keliranjem iona prijelaznih metala. Zanimljivo je da i sami polipropilenglikol pokazuje određenu kelirajuću aktivnost (Jakupović i sur., 2021) međutim, točan mehanizam navedenog djelovanja nije poznat. To bi mogao biti rezultat njegove mogućnosti keliranja  $\text{Fe}^{2+}$  iona ili interakcije s ferozinom, ali kako bi se donio valjan zaključak potrebno je provesti dodatna istraživanja.

## 4.6. Ispitivanje sposobnosti inhibicije tirozinaze

Melanin je heteropolimer sastavljen od monomernih jedinica nastalih enzimatskom oksidacijom tirozina. Iako je njegova primarna zadaća zaštita stanica kože od UV zračenja, povećana sinteza i nakupljanje melanina u keratinocitima rezultira hiperpigmentacijskim poremećajima. Obzirom da mogu smanjiti proizvodnju melanina u koži, inhibitori tirozinaze kao npr. arbutin, kojična kiselina i hidrokinon česti su sastojci proizvoda za liječenje hiperpigmentacija. Međutim, u kliničkim studijama pokazana je slaba učinkovitost arbutina i kojične kiseline, a za hidrokinon se smatra da imaju citotoksičan i mutagen učinak na melanocyte, zbog čega se intenzivno istražuju novi biljni ekstrakti s potencijalnim inhibitorynim djelovanjem na tirozinazu (Uchida i sur., 2014).

Tirozinaza ima monofenolaznu i difenolaznu aktivnost. Katalizira reakciju hidroksilacije L-tirozina u L-DOPA-u i oksidaciju L-DOPA-e u dopakinon koji se potom neenzimski polimerizira u pigment melanin. Ispitivanje inhibitornog djelovanja polipropilenglikolnih ekstrakta zeleni biljne vrste *M. lupulina* temelji se na inhibiciji oksidacije L-DOPA-e u dopakinon zbog čega se smanjuje količina produkta u reakcijskoj smjesi (Cui i sur., 2018). Navedeno se prati spektrofotometrijski kao smanjenje apsorbancije reakcijske smjese u odnosu na negativnu kontrolu. Što je smanjenje apsorbancije veće, ispitivani ekstrakt iskazuje jaču inhibitornu aktivnost.



Slika 13. Inhibitoryni učinak ekstrakata *M. lupulina* na tirozinazu.

Ranija istraživanja (Kalvarešin, 2020) pokazala su da polipropilenglikolni ekstrakti zeleni vrste *M. lupulina* imaju vrlo slabo inhibitorno djelovanje na aktivnost tirozinaze, što nije bilo očekivano, obzirom da biljka sadrži flavonoide i fenolne kiseline kojima se pripisuje dobar inhibitorni učinak na navedeni enzim. Kako bi se vidjelo što je uzrokovalo te neočekivane rezultate, istraživanje je ponovljeno u ovom radu. Uočeno je da je ekstrakt s većim sadržajem polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina pokazivao jače inhibitorno djelovanje na enzim tirozinazu na temelju čega se može zaključiti da se inhibitorna aktivnost ekstrakata na ovaj enzim može pripisati navedenim spojevima. Međutim, i ovim istraživanjem je potvrđeno da iako ekstrakti sadrže flavonoide i fenolne kiseline, za koje se smatralo da bi mogli iskazati značajnije inhibitorno djelovanje na tirozinazu, ono je mnogo manje u usporedbi s kojičnom kiselinom ( $EC_{50}=2,63 \pm 0,05 \mu\text{L/mL}$ ). Navedeno se može objasniti činjenicom da iako biljka sadrži sastavnice koje pokazuju inhibitorno djelovanje na tirozinazu, njihova koncentracija je premala da bi ostvarile snažnije djelovanje.

Međutim, biljni ekstrakti mogu iskazati inhibitorno djelovanje na proces melanogeneze različitim mehanizmima, a ne samo inhibitornim djelovanjem na tirozinazu. Istraživanja utjecaja kumestrola na melanogenezu pokazala su da navedeni spoj, iako ne inhibira aktivnost tirozinaze niti utječe na njezinu translaciju, može smanjiti nakupljanje melanina poticanjem njezine razgradnje (Hwang i sur., 2017). Obzirom da su prethodna istraživanja pokazala da ekstrakti vrste *M. lupulina* sadrže kumestrol, poželjno je provesti ispitivanja na modelu staničnih kultura kako bi se istražilo navedeno djelovanje.

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu spektrofotometrijski je određivan sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina u ekstraktima dobivenim ultrazvučnom ekstrakcijom. Ekstrakti su se međusobno razlikovali prema masenom udjelu polipropilenglikola, koji je korišten kao ekstrakcijsko otapalo, te trajanju ultrazvučne ekstrakcije. Utvrđeno je da je ekstrakt dobiven korištenjem 10 %-tnog polipropilenglikola kao ekstrakcijskog otapala nakon 30 minuta ultrazvučne ekstrakcije bio bogatiji sadržajem ukupnih flavonoida, polifenola i fenolnih kiselina od ekstrakta dobivenog korištenjem 50 %-tnog polipropilenglikola nakon 60 minuta ultrazvučne ekstrakcije. Na temelju ovih opažanja zaključeno je da u biljci prevladavaju polifenolni spojevi polarnije strukture koji se iz zeleni biljne vrste *M. lupulina* uspješnije ekstrahiraju korištenjem nižeg masenog udjela polipropilenglikola i kraćim trajanjem ekstrakcije. Navedenim ekstraktima određivana je i antioksidativna aktivnost korištenjem DPPH metode te ispitivanjem kelirajuće aktivnosti. Rezultati istraživanja pokazali su da ekstrakti imaju mnogo nižu antiradikalnu aktivnost od BHA (pozitivna kontrola). Kelirajuća aktivnost ekstrakata također je bila niža od pozitivne kontrole (EDTA). Ekstrakt bogatiji fenolnim sastavnicama bio je slabiji hvatač slobodnih radikala, ali je pokazao bolju kelirajuću aktivnost. Ekstrakti su pokazali slabo inhibitorno djelovanje na tirozinazu. Provedena istraživanja pokazala su stanoviti potencijal ove biljne vrste za primjenu u kozmetici, ali za donošenje konačnih zaključaka potrebno je provesti detaljnije studije.

## LITERATURA

Agbor GA, Vinson JA, Donnelly PE. Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *Int J Food Sci Nutr Diet*, 2014, 3, 147-156.

Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil JA. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem*, 2004, 84, 551-562.

Arct J, Pytkowska K. Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. *Clin Dermatol*, 2008, 26, 347-357.

Binic I, Lazarevic V, Ljubenovic M, Mojsa J, Sokolovic D. Skin ageing: natural weapons and strategies. *Evid-Based Compl Alt*, 2013, 2013, 827248.

Black medic (*Medicago lupulina*), 2018., <https://www.feedipedia.org>, pristupljeno 3.2.2021.

Butkutė B, Padarauskas A, Cesevičienė J, Taujenis L, Norkevičienė E. Phytochemical composition of temperate perennial legumes. *Crop Pasture Sci*, 2018, 69, 1020-1030.

Butkutė B, Taujenis L, Norkevičienė E. Small-Seeded Legumes as a Novel Food Source. Variation of Nutritional, Mineral and Phytochemical Profiles in the Chain: Raw Seeds-Sprouted Seeds-Microgreens. *Molecules*, 2019, 24, 133.

Coumestrol, <https://en.wikipedia.org>, pristupljeno 8.2.2021.

Cui HX, Duan FF, Jia SS, Cheng FR, Yuan K. Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Activities of Seed Oils from *Torreya grandis* Fort. ex Lindl. *Biomed Res Int*, 2018, 2018, 5314320.

da Silva LAL, Pezzini BR, Soares L. Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) leaves. *Pharmacogn Mag*, 2015, 11, 96-101.

European Pharmacopoeia, Fifth Edition (Eur.Ph. 5,0), Council of Europe, Strasbourg Cedex, 2004, Vol. 1, 222.

Grlić Lj. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. Rijeka, Ex Libris, 1990, str. 205-206

Hwang JA, Park NH, Na YJ, Lee HK, Lee JH, Kim YJ, Lee CS. Coumestrol Down-Regulates Melanin Production in Melan-a Murine Melanocytes through Degradation of Tyrosinase. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40, 535-539.

Jakupović L, Kalvarešin M, Bukovina K, Poljak V, Vujić L, Zovko Končić M. Optimization of Two Eco-Friendly Extractions of Black Medick (*Medicago lupulina* L.) Phenols and Their Antioxidant, Cosmeceutical,  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase Inhibitory Properties. *Molecules*, 2021, 26, 1610.

Kalvarešin M. Optimizacija ekstrakcije i biološka aktivnost ekstrakata zeleni hmeljaste vije (*Medicago lupulina* L.) u polipropilenglikolu. Diplomski rad. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2020, str. 14-26.

Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*, 2011, 48, 412-422.

Kicel A, Olszewska MA. Evaluation of antioxidant activity, and quantitative estimation of flavonoids, saponins and phenols in crude extract and dry fractions of *Medicago lupulina* aerial parts. *Nat Prod Commun*, 2015, 10, 483-486.

Kumar N, Goel N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol Rep (Amst)*, 2019, 24, 00370.

Losada-Echeberría M, Herranz-López M, Micol V, Barrajon-Catalán E. Polyphenols as Promising Drugs against Main Breast Cancer Signatures. *Antioxidants (Basel)*, 2017, 6, 88.

Lucchetti L, Zitti S, Taffetani F. Ethnobotanical uses in the Ancona district (Marche region, Central Italy). *J Ethnobiol Ethnomed*, 2019, 15, 9.

Michalak M, Pierzak M, Kręcis B, Suliga E. Bioactive Compounds for Skin Health: A Review. *Nutrients*, 2021, 13, 203.

Montero G, Arriagada F, Günther G, Bollo S, Mura F, Berríos E, Morales J. Phytoestrogen coumestrol: Antioxidant capacity and its loading in albumin nanoparticles. *Int J Pharm*, 2019, 562, 86-95.

Oxidative stress - The Definitive Guide, 2020., <https://www.biologydictionary.net>, pristupljeno 18.2.2021.

Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*, 2016, 5, 47.

Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2009, 2, 270-278.

Parčetić-Kostelac I, Bešlo D, Šperanda M, Jović T, Đidara M, Kopačin T, Jozinović A. Oksidacijski stres u uvjetima intenzivnog fizičkog napora u ljudi i životinja. *Stočarstvo*, 2016, 70, 71-92.

Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*, 2008, 4, 89-96.

Pillaiyar T, Manickam M, Namasivayam V. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2017, 32, 403-425.

Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017, 8416763.

Poljšak B, Dahmane R. Free radicals and extrinsic skin aging. *Dermatol Res Pract*, 2012, 2012, 135206.

Przybylska-Balcerek A, Stuper-Szablewska K. Phenolic acids used in the cosmetics industry as natural antioxidants. *Eur J Med Technol*, 2019, 4, 24-32.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol*, 1999, 299, 152-178.

Soto ML, Falqué E, Domínguez H. Relevance of Natural Phenolics from Grape and Derivative Products in the Formulation of Cosmetics. *Cosmetics*, 2015, 2, 259-276.

Svobodová A, Psotová J, Walterová D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacký Olomouc Czech Repub*, 2003, 147, 137-145.

Uchida R, Ishikawa S, Tomoda H. Inhibition of tyrosinase activity and melanine pigmentation by 2-hydroxytyrosol. *Acta Pharm Sin B*, 2014, 4, 141-145.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 2006, 160, 1-40.

Yan J, Chu HJ, Wang HC, Li JQ, Sang T. Population genetic structure of two *Medicago* species shaped by distinct life form, mating system and seed dispersal. *Ann Bot*, 2009, 103, 825-834.

Zolghadri S, Bahrami A, Hassan Khan MT, Munoz-Munoz J, Garcia-Molina F, Garcia-Canovas F, Saboury AA. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2019, 34, 279-309.



## SAŽETAK

Starenje kože složen je biološki proces koji se ubrzava pod utjecajem oksidativnog stresa uzrokovanog različitim nepovoljnim okolišnim čimbenicima. Kako bi se umanjio utjecaj oksidativnog stresa na starenje kože, savjetuje se primjena kozmetičkih proizvoda bogatih antioksidansima. Obzirom da sintetski antioksidansi često uzrokuju neželjene reakcije, poput iritacijskog kontaktnog dermatitisa, sve se više istražuju antioksidativni učinci biljnih ekstrakata. Cilj ovog istraživanja bio je spektrofotometrijski odrediti sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina u polipropilenglikolnim ekstraktima zeleni vrste *M. lupulina*. U svrhu potencijalne primjene navedenih ekstrakata u kozmetičkim proizvodima, ispitana je njihova antiradikalna aktivnost korištenjem DPPH metode, sposobnost keliranja  $Fe^{2+}$  iona te inhibitorni učinak na tirozinazu. Istraživanje je pokazalo da je ekstrakt dobiven korištenjem 10 %-tnog polipropilenglikola kao ekstrakcijskog otapala bogatiji ispitivanim spojevima te pokazuje bolju kelirajuću aktivnost od ekstrakta dobivenog korištenjem 50 %-tnog polipropilenglikola. Ekstrakti su pokazali relativno slab antiradikalni i kelirajući učinak. Ekstrakt bogatiji fenolnim sastavnicama bio je slabiji hvatač slobodnih radikala, ali je pokazao bolju kelirajuću aktivnost. Ekstrakti su pokazali slabo inhibitorno djelovanje na tirozinazu. Provedena istraživanja pokazala su stanoviti potencijal ove biljne vrste za primjenu u kozmetici, ali za donošenje konačnih zaključaka potrebno je provesti detaljnije studije.

## SUMMARY

Skin aging is a complex biological process that is accelerated under the influence of oxidative stress caused by different unfavourable environmental factors. To reduce the influence of oxidative stress on skin aging, cosmetic products rich in antioxidants are recommended to be used. Bearing in mind that synthetic antioxidants often cause adverse reactions such as irritible contact dermatitis, newer research is based on exploring antioxidative effects of different plant extracts. The aim of this study was to spectrophotometrically determine the total phenolic, flavonoid and phenolic acids content in polypropylene glycol extracts of *M. lupulina* aerial parts. Furthermore, to determine the potential use of these extracts in cosmetic products, their antiradical activity was investigated using DPPH method, as well as Fe<sup>2+</sup>-chelating activity and tyrosinase inhibitory activity. The tested extracts showed a rather low antiradical and chelating activity. The extract richer in phenolic components was a weaker scavenger of free radicals but showed better chelating activity. Extracts have shown poor inhibitory effects on tyrosinase. Research has shown a certain potential of this plant species for use in cosmetics, but more detailed studies need to be carried out to draw definitive conclusions.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmakognoziju  
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### BIOLOŠKA AKTIVNOST POLIPROPILENGLIKOLNIH EKSTRAKATA ZELENH HMELJASTE VIJE (*Medicago lupulina* L.)

Anamaria Blažević

#### SAŽETAK

Starenje kože složen je biološki proces koji se ubrzava pod utjecajem oksidativnog stresa uzrokovano različitim nepovoljnim okolišnim čimbenicima. Kako bi se umanjio utjecaj oksidativnog stresa na starenje kože, savjetuje se primjena kozmetičkih proizvoda bogatih antioksidansima. Obzirom da sintetski antioksidansi često uzrokuju neželjene reakcije, poput iritacijskog kontaktnog dermatitisa, sve se više istražuju antioksidativni učinci raznih biljnih ekstrakata. Cilj ovog istraživanja bio je spektrofotometrijski odrediti sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i fenolnih kiselina u polipropilenglikolnim ekstraktima zeleni vrste *M. lupulina*. U svrhu potencijalne primjene navedenih ekstrakata u kozmetičkim proizvodima, ispitana je njihova antiradikalna aktivnost korištenjem DPPH metode, sposobnost keliranja  $Fe^{2+}$  iona te inhibitorni učinak na tirozinazu. Istraživanje je pokazalo da je ekstrakt dobiven korištenjem 10 %-tnog polipropilenglikola kao ekstrakcijskog otapala bogatiji ispitivanim spojevima te pokazuje bolju kelirajuću aktivnost od ekstrakta dobivenog korištenjem 50 %-tnog polipropilenglikola. Ekstrakti su pokazali relativno slab antiradikalni i kelirajući učinak. Ekstrakt bogatiji fenolnim sastavnicama bio je slabiji hvatač slobodnih radikala, ali je pokazao bolju kelirajuću aktivnost. Ekstrakti su pokazali slabo inhibitorno djelovanje na tirozinazu. Provedena istraživanja pokazala su stanoviti potencijal ove biljne vrste za primjenu u kozmetici, ali za donošenje konačnih zaključaka potrebno je provesti detaljnije studije.

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

Rad sadrži: 30 stranica, 13 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 38 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: hmeljasta vija, polipropilenglikol, ukupni polifenoli, flavonoidi, fenolne kiseline, antioksidativna aktivnost, tirozinaza

Mentor: **Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Ivan Pepić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Marijan Marijan**, poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj, 2021.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmacognosy  
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### **BIOLOGICAL ACTIVITIES OF BLACK MEDIC (*Medicago lupulina* L.) AERIAL PARTS EXTRACTS IN POLYPROPYLENE GLYCOL**

**Anamaria Blažević**

#### **SUMMARY**

Skin aging is a complex biological process that is accelerated under the influence of oxidative stress caused by different unfavourable environmental factors. To reduce the influence of oxidative stress on skin aging, cosmetic products rich in antioxidants are recommended to be used. Bearing in mind that synthetic antioxidants often cause adverse reactions such as irritable contact dermatitis, newer research is based on exploring antioxidative effects of different plant extracts. The aim of this study was to spectrophotometrically determine the total phenolic, flavonoid and phenolic acids content in polypropylene glycol extracts of *M. lupulina* aerial parts. Furthermore, to determine the potential use of these extracts in cosmetic products, their antiradical activity was investigated using DPPH method, as well as Fe<sup>2+</sup>-chelating activity and tyrosinase inhibitory activity. The tested extracts showed a rather low antiradical and chelating activity. The extract richer in phenolic components was a weaker scavenger of free radicals but showed better chelating activity. Extracts have shown poor inhibitory effects on tyrosinase. Research has shown a certain potential of this plant species for use in cosmetics, but more detailed studies need to be carried out to draw definitive conclusions.

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

Thesis includes: 30 pages, 13 figures, 1 table and 38 references. Original is in Croatian language.

Keywords: black medic, polypropylene glycol, total phenols, flavonoids, phenolic acids, antioxidative activity, tyrosinase

Mentor: **Marijana Zovko Končić, Ph.D. Full Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Marijana Zovko Končić, Ph.D. Full Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ivan Pepić, Ph.D. Associate Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Marijan Marijan, Ph.D. Postdoktorand**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June, 2021.