

# Fitokemijski sastav i antioksidacijski potencijal ploda američke borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.)

---

Mihoković, Domagoj

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:163:151249>

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](#)



**Domagoj Mihoković**

**Fitokemijski sastav i antioksidacijski potencijal  
ploda američke borovnice  
(*Vaccinium corymbosum* L.)**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakulteta i izrađen u Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Biljane Blažeković.

*Zahvaljujem se mentorici izv.prof. dr. sc. Biljani Blažeković na savjetima i stručnom vodstvu prilikom izrade diplomskog rada te zaposlenicima Zavoda za farmakognoziju koji su puno pomogli.*

*Hvala i mojim roditeljima te bratu i Luciji na neizmjernoj podršci tokom školovanja.*

# Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Američka borovnica ( <i>Vaccinium corymbosum</i> L., Ericaceae) iz botaničke perspektive	1
1.2. Fitokemijski sastav američke borovnice	2
1.3. Terapijski potencijal plodova američke borovnice	4
2. OBRAZLOŽENJE TEME	11
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. Biljni materijal i priprema ekstrakta	12
3.2. Aparatura i kemikalije	12
3.3. Određivanje gubitka sušenjem	13
3.4. Dokazivanje bioaktivnih sastavnica metodom tankoslojne kromatografije (TLC)	14
3.4.1. Dokazivanje flavonoida i fenolnih kiselina	14
3.4.2. Dokazivanje antocijana	14
3.5. Određivanje sadržaja bioaktivnih sastavnica UV-Vis spektrofotometrijskim metodama	14
3.5.1. Određivanje fenolnih kiselina	14
3.5.2. Određivanje antocijana	15
3.5.3. Određivanje trjeslovina	16
3.5.4. Određivanje flavonoida	17
3.6. Istraživanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta ploda američke borovnice	17
3.6.1. Određivanje sposobnosti hvatanja radikala dušikovog (II) oksida (NO)	17
3.6.2. Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala	18
3.7. Statistička analiza	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. Gubitak sušenjem	20
4.2. Dokazivanje bioaktivnih sastavnica ploda američke borovnice	20
4.2.1. Dokazivanje fenolnih kiselina i flavonoida u plodu američke borovnice	20
4.2.2. Dokazivanje antocijana u plodu američke borovnice	22
4.3. Sadržaj bioaktivnih sastavnica u plodu američke borovnice	22
4.3.1. Fenolne kiseline	23
4.3.2. Antocijani	23
4.3.3. Trjeslovine	24
4.3.4. Flavonoidi	24
4.4. Antioksidativna aktivnost vodeno-etanolnog ekstrakta ploda američke borovnice	25
4.4.1. Sposobnost hvatanja radikala dušikovog (II) oksida	25
4.4.2. Sposobnost hvatanja DPPH slobodnog radikala	27

5. ZAKLJUČCI	30
6. LITERATURA	31
7. SAŽETAK/SUMMARY	36
8. PRILOZI	37
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

# 1. UVOD

## 1.1. Američka borovnica (*Vaccinium corymbosum* L., Ericaceae) iz botaničke perspektive

Rod *Vaccinium* pripada porodici Ericaceae, a broji oko 450 vrsta grmova koji su rasprostranjeni širom sjeverne polutke te u planinama tropskog dijela Azije i Centralne te Južne Amerike. Osim vrste *Vaccinium corymbosum* L., rod obuhvaća i druge poznate, korisne biljke poput brusnice (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) i samonikle vrste borovnice, *Vaccinium myrtillus* L. *V. corymbosum* je česta kultivirana vrsta borovnica visokog grma koji seže 1,8-2,5 metara u visinu. U prirodi je nađena u močvarnim područjima, ali i na suhljim dijelovima kao što su šumovite padine. Pogoduju joj mjesta s optimalnom količinom hladovine, a podnosi temperature i do -40°C (Song i Hancock, 2010). Stabiljka američke borovnice je drvenasta te je, kao i korijen, razgranata. Listovi su joj cjeloviti, jajoliko duguljasti ili lancetasti. Dlakavi su na naličju, a ponekad i cijelom površinom. U jesen poprimaju grimizno crvenu boju. Plod je mesnata boba tamnoplave boje s ostacima čaške na vrhu. Cvjetovi su bijele boje i skupljeni su u male grozdove koji cvatu u proljeće, a od cvatnje do početka dozrijevanja boba treba proći 60-90 dana. Ova vrsta je jedna od 4 vrste roda *Vaccinium* prisutnih u Hrvatskoj, no samo kao kultivirana svojta koja je uvezena s američkog kontinenta (Dujmović-Purgar i sur., 2007).



**Slika 1.** Grm, cvjetovi i plodovi biljne vrste *V. corymbosum* (preuzeto s [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vaccinium\\_corymbosum\\_Duke.jpeg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vaccinium_corymbosum_Duke.jpeg); [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vaccinium\\_corymbosum0.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vaccinium_corymbosum0.jpg); [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vaccinium\\_corymbosum\\_6706-6710.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vaccinium_corymbosum_6706-6710.jpg))

Smatra se da je kultivacija borovnica započela u Sjevernoj Americi kada su američki domoroci spalili mjesta na kojima je bila prisutna samonikla borovnica niskog grma kako bi povećali njen urod. Početak uzgoja vrste *V. corymbosum* povezuje se s ranim 1900-tima također u Americi (Strik, 2006). U Europi je uzgoj borovnica visokog grma započeo u Nizozemskoj nakon 1920. godine, a kasnije se pojavio i u Poljskoj te Njemačkoj. Danas su najveće površine nasada u Njemačkoj, Poljskoj, Francuskoj, Nizozemskoj, Latviji, Rumunjskoj, Italiji i Španjolskoj (Pliszka, 1997).

## 1.2. Fitokemijski sastav američke borovnice

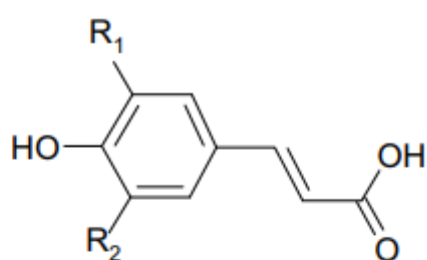
Fitokemijski sastav američke borovnice je vrlo promjenjiv jer na njega utječe niz čimbenika, od genetskih do okolišnih. Klima, sastav tla, količina svjetlosti i drugi faktori uvelike određuju udio pojedinih spojeva u biljci te njihovu raspodjelu unutar samih biljnih dijelova. Vrsta je bogata polifenolnim spojevima među kojima se najviše ističu flavonoidi. Antocijani su najzastupljenija flavonoidna skupina te čine i do 60 % ukupnih polifenola u zrelih plodovima borovnice, a od ostalih flavonoidnih skupina vrijedi izdvojiti i proantocijanidine te flavonole. Najzastupljeniji neflavonoidni polifenolni spoj je klorogenska kiselina koja je ester derivata hidroksicimetne kiseline (Kalt i sur., 2019).

Stefanescu i sur. (2019) u svom su se istraživanju bavili utvrđivanjem polifenolnog sastava i sadržaja listova nekoliko vrsta borovnice. Listovi borovnice bogati su polifenolima, no struktura polifenola razlikuje se u odnosu na plodove. Kao glavni polifenolni spojevi u listova američke borovnice ističu se klorogenska kiselina (ester kavene i kina kiseline), a u većim koncentracijama još su određeni i flavonoli kvercetin i kemferol te proantocijanidini. Udio antocijana znatno je manji nego u plodovima što je vidljivo i iz manjeg intenziteta boje listova u odnosu na boju zrelih plodova. Prema nekoliko istraživanja najzastupljeniji antocijani u listovima su cijanidin-3-O-glukozid, cijanidin-3-O-glukuronid i cijanidin-3-O-arabinozid. Količina polifenola u listovima ovisi i o dobu godine pa je tako sadržaj najviši tijekom rujna i listopada kada listovi poprimaju crvenkastu boju.

Istraživanje fitokemijskih sastavnica vrste *V. corymbosum* uzgojene u Francuskoj proveli su Kader i sur. (1996) utvrdili da plodovi ove vrste sadrže znatno širi spektar antocijana od listova. U istraživanju je detektirano 15 različitih antocijana, a najviše delfindin-3-monogalaktozida (13,6 %), malvidin-3-monogalaktozida (12,9 %), malvidin-3-monoglukozida (11,9 %) i malvidin-3-monoarabinozida (11,9 %). Prisutni su još bili i aglikoni peonidin, petunidin i cijanidin sa šećerima vezanim na OH- skupinu na C-3 atomu.

Od ostalih značajnijih spojeva detektirani su flavonoli kvercitrin, izokvercitrin i hiperozid te klorogenska kiselina.

Nutritivni sastav svježeg ploda vrste *V. corymbosum* karakterizira sadržaj 83,4 % vode, 0,6 g proteina, 0,6 g masti te 15,0 g ugljikohidrata/100 g. Prisutni su i vitamin B1 (0,02 mg), vitamin B2 (0,02 mg), vitamin C (16,0 mg), kalcij (16,0 mg), fosfor (13,0 mg) i željezo (0,8 mg). Zbog visokog sadržaja brojnih nutrijenata borovnica je prepoznata kao nutritivno vrlo vrijedno voće čija je konzumacija poželjna (Skupien, 2006).

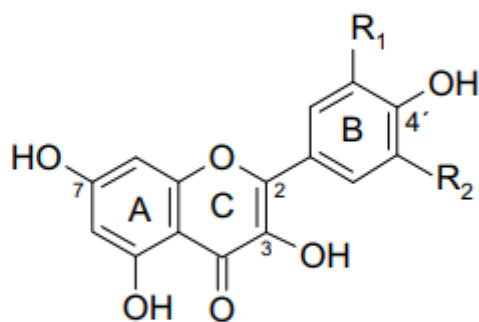


#### Hidroksicimetne kiseline:

*p*-kumana kiselina  $R_1 = R_2 = H$

kavena kiselina  $R_1 = OH, R_2 = H$

ferulična kiselina  $R_1 = OCH_3, R_2 = H$



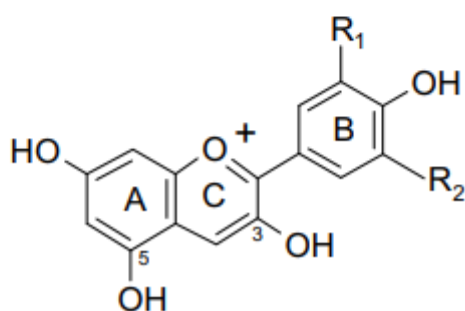
#### Flavonoidi:

kemferol  $R_1 = R_2 = H$

kvercetin  $R_1 = OH, R_2 = H$

miricetin  $R_1 = R_2 = OH$

izoramnetin  $R_1 = OCH_3, R_2 = H$



#### Antocijanidini:

cijanidin  $R_1 = OH, R_2 = H$

delfinidin  $R_1 = R_2 = OH$

peonidin  $R_1 = OCH_3, R_2 = H$

petunidin  $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$

malvidin  $R_1 = R_2 = OCH_3$

**Slika 2.** Prikaz kemijskih struktura hidroksicimetnih kiselina, flavonola i antocijanidina prisutnih u američkoj borovnici (preuzeto iz Riihinen i sur. (2008) uz dopuštenje izdavača (Elsevier)).



### 1.3. Terapijski potencijal plodova američke borovnice

Američka borovnica bogata je antioksidansima i drugim bioaktivnim sastavnicama, te vlaknima i mineralima zbog kojih pokazuje brojne povoljne učinke na ljudsko zdravlje. Posebno je važan pozitivan učinak na kronične bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, mentalne bolesti ili rak. Postoje mnogobrojne studije znanstvenika iz svih dijelova svijeta koji su se bavili ovom tematikom, a neke od njih su saželi i Miller i sur. (2019).

#### *Kardioprotektivno djelovanje*

Kardiovaskularne bolesti jedan su od vodećih uzroka smrti i smanjene kvalitete života u svijetu. Procjena je da samo u Americi ima 62 milijuna kardiovaskularnih bolesnika te 50 milijuna ljudi koji boluju od hipertenzije, a čak 37 % smrtnih slučajeva u 2000. godini bilo je povezano s kardiovaskularnim bolestima (Nabel, 2003). Mnoštvo je studija ukazalo na to da konzumacija voća smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti, a borovnica je među voćem koje pokazuje najveći kardioprotektivni potencijal. Jedno od istraživanja provedeno je u trajanju od 14 dana na štakorima s hiperkolesterolemijom. Istraživanje je pokazalo da je svakodnevna konzumacija ekstrakta borovnice kod tih štakora dovela do poboljšanja lipidne slike i smanjenja aortnih lezija. Smanjili su se ukupni kolesterol (TC), lipoproteini niske gustoće (LDL) i trigliceridi (TG), a pojačala se aktivnost antioksidativnih enzima: superoksid dismutaze (SOD), katalaze i glutation peroksidaze (Zhao i sur., 2017).

Antocijani su, kao glavna polifenolna frakcija borovnice, najodgovorniji za njene pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. Meta-analiza 3 kohortne studije pokazala je da se višim unosom antocijana smanjuje rizik koronarne arterijske bolesti za približno 25 % uključujući i infarkt miokarda. Zanimljiv je i pozitivan učinak antocijana na smanjenje krvnog tlaka jer je hipertenzija među glavnim faktorima rizika za ozbiljnije kardiovaskularne komplikacije. U jednoj kohortnoj studiji provedenoj na oko 87 000 sudionika primijećena je 10 % niža incidencija hipertenzije kod grupe koja je uzimala veće količine antocijana kroz period od 14 godina. Studije su pokazale i ovisnost smanjenja kardiovaskularnog rizika o količini konzumiranih borovnica pa je tako jedna studija pokazala da nije bilo smanjenja rizika kod skupine koja je unosila 75 g borovnica dnevno u odnosu na skupinu koja nije unosila borovnice. Ipak, skupina koja je konzumirala 150 g borovnica dnevno kroz 6 mjeseci imala je poboljšanja u vaskularnoj funkciji i lipidnom statusu (Kalt i sur., 2019).

### *Hipoglikemijsko djelovanje*

Dijabetes ili šećerna bolest česta je metabolička i endokrina bolest, a dijeli se na tip 1 i tip 2. Uzrokovana je nemogućnošću proizvodnje inzulina (tip 1) ili rezistencijom stanica na inzulin (tip 2), a karakterizira ju hiperglikemija te komplikacije koje iz nje proizlaze u vidu sljepoće, dijabetičkog stopala i drugih. *V. corymbosum* je vrsta bogata fenolnim kiselinama, antocijanima i organskim kiselinama, a dosadašnja brojna istraživanja govore o njezinim pozitivnim učincima na osobe koje boluju od dijabetesa tipa 1 i dijabetesa tipa 2 (Huang i sur., 2018).

Stefanescu i sur. (2018) ispitivali su pozitivne učinke ekstrakata lista i ploda vrsta *V. corymbosum* te *V. myrtillus* na štakorima s induciranim dijabetesom tipa 1. Štakori su bili nasumično podijeljeni u 7 grupa i praćeni su markeri da bi se utvrdilo ima li poboljšanja kod štakora kojima je davan ekstrakt borovnice u odnosu na netretirane štakore te štakore trenirane standardnom terapijom metforminom. Ispitivanje je trajalo 8 tjedana, a štakorima su svaki drugi tjedan mjerene razine glukoze i inzulina. Rezultati su pokazali da je kod štakora tretiranih ekstraktom lista i ploda *V. myrtillus* razina glukoze padala tijekom 8 tjedana, a razina inzulina se povećala. Za ekstrakt ploda *V. corymbosum* dobivene vrijednosti bile su nešto manje značajne, no također postoji potencijal da se budućim istraživanjima pokaže benefit u liječenju dijabetesa tipa 1.

Smatra se da bi mehanizam pozitivnog djelovanja borovnica na dijabetes tipa 1 mogao biti smanjenje oksidativnog stresa jer se upravo on smatra vrlo značajnim u etiologiji ove bolesti. To se pokušalo dokazati u istraživanju provedenom na djeci s dijabetesom kojima su mjerene aktivnost SOD, razine glikoziliranog hemoglobina i razine C- peptida te su rezultati dali poticaj razvijanju ove teze (Nemes-Nagy i sur., 2008.)

Hipoglikemijski učinak borovnice na dijabetes tipa 2 uglavnom se temelji na djelovanju spram enzima  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze. Tenuta i sur. (2020) proveli su opsežna ispitivanja različito izrađenih ekstrakata lista i ploda *V. corymbosum*. Ustanovili su da određeni ekstrakti posjeduju značajnu sposobnost inhibicije  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze. Isto tako, ispitanici koji su svakodnevno konzumirali 45 g praška borovnica pokazali su veću osjetljivost na inzulin nego što su imali prije konzumacije borovnice. Iz istraživanja se moglo zaključiti da borovnica posjeduje antidijabetičko djelovanje, štiti  $\beta$ -stanice od oksidativnog stresa i smanjuje razine glukoze u krvi.

### *Protuupalno djelovanje*

Kronični upalni procesi te upalni procesi koji su poremećeni povezani su s mnoštvom bolesti kao što su ateroskleroza ili rak. Ispitivanje protuupalnog djelovanja borovnice za koju znamo da je bogata sastavnicama visokog antioksidativnog potencijala stoga je jako važno. Mehanizam upalnog odgovora vrlo je složen, a najčešće je posredovan nuklearnim faktorom-kappa B (NF- $\kappa$ B). Proupalni citokini, među kojima je i faktor nekroze tumora-alfa (TNF- $\alpha$ ), aktiviraju transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B i onda dolazi do migracije mononuklearnih stanica te pojačane ekspresije citokina i adhezijskih molekula među kojima su vaskularni adhezijski protein-1 (VCAM-1) i intercelularni adhezijski protein-1 (ICAM-1) (Wu i sur., 2015).

Zato su Huang i sur. (2014) proveli istraživanje u kojem su endotelne stanice izložili djelovanju TNF- $\alpha$  i mjerili površinsku ekspresiju ICAM-1 i VCAM-1. Pritom su imali kontrolnu skupinu u kojoj stanice nisu bile stimulirane s TNF- $\alpha$ , skupinu gdje je stanicama dodan samo TNF- $\alpha$  i skupine u koje je dodan TNF- $\alpha$ , ali i malvidin-3-glukozid te malvidin-3-galaktozid u različitim koncentracijama da se vidi smanjuje li njihov dodatak ekspresiju adhezijskih molekula, a samim time i upalni proces. Pokazalo se da su malvidin-3-glukozid i malvidin-3-galaktozid pri višim koncentracijama značajno smanjili ekspresiju ICAM-1 i VCAM-1 molekula te se da zaključiti da borovnica posjeduje protuupalni potencijal jer su baš ti antocijani vrlo zastupljeni u plodu borovnice. Istraživanje je obuhvatilo i detaljnije pokuse vezane uz NF- $\kappa$ B te je pokazalo da gore navedeni antocijani smanjuju i odvajanje NF- $\kappa$ B od inhibitorne porodice proteina I $\kappa$ B s kojom je NF- $\kappa$ B u kompleksu kad je neaktiviran što također ukazuje na njihovo protuupalno djelovanje.

Još jedno ispitivanje protuupalnog potencijala ekstrakta borovnice provedeno je na štakorima u čijim se šapama inducirao edem injektiranjem karagena i histamina. Praćeno je smanjenje edema kod štakora koji su prethodno tretirani raznim količinama ekstrakta borovnice. Rezultati su pokazali da je edem znatno manji kod skupina štakora kojima su davani ekstrakti borovnice, a zanimljivo je da je razina smanjenja bila usporediva s grupom štakora koja je prije induciranja edema bila tretirana indometacinom koji je učestali protuupalni lijek. U istom ispitivanju indirektno se određivala i razina infiltracije neutrofila na mjesto induciranja upale mjerenjem aktivnosti mijeloperoksidaze (MPO). Ekstrakt borovnice i tu je pokazao svoj protuupalni potencijal jer je aktivnost MPO bila znatno manja kod štakora koji su bili tretirani njime (Torri i sur., 2007).

### *Antitumorsko djelovanje*

Borovnica pokazuje svoj antitumorski potencijal uglavnom kroz antioksidativno i protuupalno djelovanje jer je kancerogeneza direktno povezana s povišenjem razine reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), a polifenolne sastavnice borovnice povećavaju aktivnost antioksidativnih enzima SOD i katalaze (CAT). Istraživanjem provedenim na C6 glioma stanicama štakora pokazalo se da sastavnice borovnice utječu i na održivost te proliferaciju tumorskih stanica. U istraživanju se broj glioma stanica nakon primjene borovnice nije smanjio, no smanjila se njihova proliferacija (da Silveira i sur., 2021). Pozitivan utjecaj antocijanima i fenolnim kiselinama bogatih borovnica na smanjenje razvoja tumora vidljiv je kroz razne mehanizme. Konzumacija borovnice može smanjiti proliferaciju, angiogenezu te ekspresiju antiapoptoznih proteina na razini transkripcije i na taj način omesti kancerogenezu i rekurenciju tumora. Primijećena je i bolja kontrola terapije mijeloma bortezomibom uz uzimanje pterostilbena kojeg ima u borovnici, a proantocijanidini iz borovnice pojačavaju indukciju apoptoze kancerogenih stanica u debelom crijevu (Ma i sur., 2018). Sastavnica borovnice koja je jako bitna za antitumorsko djelovanje je resveratrol. Na njemu su provedena brojna istraživanja te su pronađeni razni mehanizmi kojima on pozitivno djeluje na prevenciju tumora. Dokazana je osjetljivost na resveratrol transkripcijskog faktora NF $\kappa$ B, peroksisomskim proliferatorom aktiviranog receptora (PPAR), tumorskog proteina p53 te drugih signalnih molekula i transkripcijskih faktora povezanih s tumorigenezom. Resveratrol interferira i s apoptotičkim signalnim putevima te raznim fazama staničnog ciklusa i jedna od najzanimljivijih izoliranih molekula iz borovnice (Vervandier- Fasseur i sur., 2019).

### *Antioksidativno djelovanje*

Oksidativni stres je stanje u kojem dolazi do oštećenja stanica kojeg uzrokuje neravnoteža antioksidacijskih i prooksidacijskih faktora u korist prooksidacijskih. Oksidativni stres uključen je u etiologiju većine poznatih bolesti pa je stoga visok antioksidacijski potencijal borovnice ključan za njene pozitivne učinke na razne bolesti ljudskog organizma i zato su antioksidacijska istraživanja borovnice vrlo česta. Antocijani su spojevi koji najviše doprinose antioksidativnom djelovanju i njihova antioksidacijska aktivnost često je u istraživanjima usporediva s onom  $\alpha$ -tokoferola, troloksa ili katehina koji se smatraju jednim od najjačih antioksidansa (Alappat i sur., 2020). Antocijani reduciraju oksidativni stres povezan sa starenjem i pomažu u održavanju integriteta DNA. Posljedica toga je usporeno propadanje kognitivnih funkcija do kojeg dolazi starenjem, omogućena bolja regulacija vaskularne permeabilnosti, kardioprotektivno djelovanje i smanjen rizik nastanka tumora. Sve vrste

bobičastog voća pokazuju antioksidativni potencijal, međutim borovnica je dala najbolje rezultate u radu koji je obuhvatio nekoliko vrsta bobičastog voća. Antioksidacijski potencijali brusnice, jagode, maline i bazge bili su nešto niži u odnosu na borovnicu (Bagchi i sur., 2004).

### *Neuroprotektivno djelovanje*

Mozak je organ koji je vrlo izložen kisiku i starenjem dolazi do neurodegenerativnih promjena kao što su Alzheimerova ili Parkinsonova bolest čija je etiologija također povezana s oksidativnim stresom. Pretpostavka da će unos borovnice, zbog njenog antioksidativnog potencijala, smanjiti znakove starenja na mozgu štakora pokazala se točnom u jednom istraživanju provedenom metodom mjerenja kapaciteta apsorpcije kisikovih radikala (ORAC metoda) (Giacalone i sur., 2011). Analizom djelovanja ekstrakta borovnice na mozak štakora bavila se i jedna kanadska studija koja se koncentrirala na ublažavanje posljedica moždanog udara kod štakora koji su pretrpjeli inducirani moždani udar. Do štete najvećim dijelom dolazi zbog velike proizvodnje ROS koji nisu adekvatno inaktivirani endogenim i egzogenim antioksidansima, a posljedica je povećana moždana stanična smrt. Pokazalo se da je skupina štakora tretirana ekstraktom borovnice u razdoblju od 6 tjedana imala značajno manju stopu neuronalne stanične smrti nakon indukcije moždanog udara (Neto i sur., 2007).

Zanimljivo je i moguće djelovanje polifenolnih spojeva iz borovnice na pamćenje. Krikorian i sur. (2010) proveli su stoga istraživanje na malom uzorku ljudi koji su imali blagi poremećaj pamćenja. Jedna skupina ljudi nije uzimala ekstrakt borovnice, a druga je uzimala ekstrakt borovnice 11 tjedana nakon čega im je procijenjeno kognitivno stanje i sposobnost pamćenja na temelju njihove orijentacije, brzine rješavanja problema, samostalnosti, ponašanja u društvu i drugih parametara. Uočeni su bolji rezultati kod skupine koja je uzimala borovnicu pa se može zaključiti da potencijal postoji i treba ga potvrditi daljnjim istraživanjima u ovom području.

### *Antimikrobno djelovanje*

Danas je u svijetu prisutan širok spektar patogena koji svakim danom pokazuju sve veću rezistenciju na postojeće antimikrobne lijekove. Zato je važno kontinuirano vršiti antimikrobna istraživanja i pronalazati spojeve koji imaju antimikrobni potencijal. Borovnica je bila u središtu mnogih takvih istraživanja, a jedno od njih bavilo se antimikrobnim učinkom ekstrakta borovnice na rast bakterija *Listeria monocytogenes* i *Salmonella Enteritidis*. Mjerene su minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) i minimalna baktericidna

koncentracija (MBK) te je utvrđena antimikrobna aktivnost ekstrakta pri višim koncentracijama. Smatra se da tome najviše doprinose fenolni spojevi koji u kiselom okruženju mogu stvarati komplekse s proteinima iz vanjske membrane bakterija i na taj način narušiti strukturu membrane te ju učiniti manje tolerantnom na nizak osmotski tlak (Shen i sur., 2014). Eksperimenti ovog tipa nisu se provodili samo na bakterijama, već i na virusima. Joshi i sur. (2019) ispitivali su antivirusni potencijal proantocijanidina iz borovnice na Aichi virusu. Oni su proveli eksperiment *in vitro* i simulirali su uvjete iz organizma za razvoj virusne infekcije te su bilježili titar virusa u različitim vremenskim intervalima. U jednom dijelu eksperimenta sok od borovnice dodavan je stanicama domaćina prije dodatka virusa, a u drugom dijelu dodavan je nakon virusne infekcije. Titar virusa smanjio se u oba slučaja pa postoje indicacije da proantocijanidini iz borovnice djeluju na inhibiciju replikacije virusa, ali bi se mogli vezati i na određene dijelove virusa te spriječiti njihovu adheziju na stanice domaćina. Slični mehanizmi dobiveni su i u drugim studijama pa tako postoji potencijal da sastavnice borovnice sprječavaju vezanje herpes simplex virusa na stanice domaćina te da inhibiraju ekspresiju nestrukturnog proteina 3 (NS-3) u virusu hepatitisa C.

#### *Osteoprotektivno djelovanje*

Voće i povrće visokog antioksidativnog potencijala moglo bi imati važnu ulogu u prevenciji i/ili liječenju osteoporoze jer do gubitka koštane mase uvelike dolazi zbog oksidativnog stresa i apoptoze osteocita te abnormalne aktivacije osteoklasta. Mehanizam kojim bi konzumacija borovnice mogla smanjiti aktivnost osteoklasta i resorpciju kostiju je prevencija apoptoze inducirane oksidativnim stresom i utjecaj na smanjenje ekspresije receptorskog aktivatora za nuklearni faktor  $\kappa$ B ligand (RANKL) (Domazetovic i sur., 2019). Osteoporoza je najraširenija bolest kostiju i najčešće se javlja kod žena u postmenopauzalnom razdoblju. Tada dolazi do deficijencije spolnih hormona što je glavni faktor rizika osteoporoze. Devareddy i sur. (2008) ispitivali su kakav učinak na osteoporozu kod ženskih štakora kojima su uklonjeni jajnici ima konzumacija borovnice. Jednoj skupini štakora je nakon ovariectomije davan ekstrakt borovnice u razdoblju od 100 dana, drugoj nije davan ekstrakt borovnice nakon ovariectomije, a na trećoj skupini nije ni izvršena ovariectomija. Nakon 100 dana štakori su eutanizirani i mjerena im je gustoća minerala u kostima. Rezultati su bili takvi da je gubitak koštane mase kod neovariectomiziranih štakora bio najmanji, kod štakora kojima su odstranjeni jajnici očekivano je došlo do značajnog gubitka koštane mase, a kod ovariectomizirane skupine koja je uzimala borovnicu gubitak je bio manji nego kod skupine

koja ju nije uzimala. Ovakvi rezultati sugeriraju da bi se konzumacijom borovnice zaista mogao smanjiti rizik osteoporoze i pozitivno djelovati na koštani sustav.

#### *Djelovanje na vid i očne bolesti*

Etiologija očnih bolesti usko je povezana sa stvaranjem ROS-a te upalnim procesima i zato je borovnica biljka koja ima potencijal djelovanja na poremećaje oka. Bolest suhog oka jedan je od primjera čestog poremećaja oka u modernom svijetu, a uključuje neželjene promjene na površini oka i suznog filma. Dolazi do smanjene produkcije suza i/ili pretjerane evaporacije suznog filma što dovodi do hiperosmolarnosti, a ti procesi povezani su s oksidativnim stresom. U pokusu koji je proveden *in vitro* na kornealnim epitelnim stanicama dokazano je da dodatak pterostilbena smanjuje produkciju proupalnih citokina i ROS-a u hiperosmotskim uvjetima. Pterostilben se nalazi u plodu borovnice pa bi njihova konzumacija mogla imati pozitivne učinke na bolest suhog oka (Li i sur., 2016).

Ovom temom također su se bavili Kalt i sur. (2014) koji su ispitali efektivnost antocijana iz borovnice na noćni vid. Studiju su proveli na ljudima, a mjerili su utjecaj konzumacije borovnice na brzinu prilagodbe oka na tamu, kvalitetu noćnog vida i vrijeme oporavka vida nakon izlaganja oka jakom svjetlu. Ispitivanja prilagodbe oka na tamu i noćnog vida nisu dala rezultate koji bi pokazivali benefit uzimanja borovnice, no rezultati dobiveni kod mjerenja vremena potrebnog za potpuni povratak vida nakon iznenadnog izlaganja svjetlu pokazali su da borovnica smanjuje vrijeme potrebno za oporavak vida.

Djelovanje koje imaju polifenolne sastavnice borovnice na oko može biti usmjereno i na regeneraciju ksantofila luteina i zeaksantina. Lutein i zeaksantin akumuliraju se u retini i štite funkciju vida od plave svjetlosti i singletnog kisika. Ipak, njih oksidiraju lipidni i ostali radikali te prelaze u stanje u kojem ne mogu štititi oko. Polifenolni spojevi iz borovnice, prvenstveno antocijani, mogu prijenosom elektrona regenerirati lutein i zeaksantin iz njihovog oksidiranog stanja nazad u stanje u kojem štite oko od singletnog kisika (Skibsted, 2018).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Američka borovnica (*V. corymbosum*) vrsta je bobičastog voća koje sadrži antocijane, fenolne kiseline i flavonoide, fenolne sastavnice visokog antioksidativnog potencijala. Oksidativni stres okidač je za nastanak mnogih bolesti te se borovnicu odavno smatra korisnom biljkom u prevenciji i liječenju raznih bolesti. Zato je borovnica, od samonikle divlje biljke, postala česta kultivirana vrsta koja su uzgaja na širokom zemljopisnom području (Ma i sur., 2018). U Hrvatskoj je također sve popularniji uzgoj američke borovnice. Proizvodnja je u porastu, no mogla bi biti i veća s obzirom na relativno pogodne klimatske uvjete i količinu neobrađenog zemljišta. Proizvođači uglavnom na tržište plasiraju neobrađene svježe plodove ili izrađuju čajeve i sokove.

Uzimajući u obzir potencijalne benefite konzumacije borovnice na zdravlje ljudi i pogodne uvjete za sadnju nasada u Hrvatskoj, svrha ovog istraživanja je utvrditi sastav osušenih plodova američke borovnice (*V. corymbosum*) uzgajane u Hrvatskoj i primjenom spektrofotometrijskih metoda odrediti sadržaj najvažnijih bioaktivnih sastavnica. Također će se procijeniti antioksidativni potencijal etanolnovodenog ekstrakta osušenih plodova dvjema metodama: određivanjem sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala i radikala dušikovog (II) oksida.

Rezultati dobiveni u sklopu ovog diplomskog rada doprinijet će znanstvenim spoznajama o sadržaju bioaktivnih sastavnica plodova američke borovnice uzgajane u Hrvatskoj i njihovim antioksidativnim svojstvima te bi mogli poslužiti kao podloga za daljnja detaljnija istraživanja njihovog biomedicinskog potencijala .



## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Biljni materijal i priprema ekstrakta

Za izradu eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada korišteni su osušeni, zreli plodovi američke borovnice (*Vaccinium corymbosum* L., Ericaceae) koji potječu iz uzgoja u okolici Koprivnice i sakupljeni su u kolovozu 2021. Plodovi su sušeni tjedan dana na temperaturi 60 °C i usitnjeni.

Ekstrakt plodova američke borovnice pripremljen je tako da je 30,00 g suhog i usitnjenog biljnog materijala preliveno s 300 mL 70 %-tnog etanola i ekstrahirano u ultrazvučnoj kupelji tijekom 20 minuta. Nakon filtracije je biljnom materijalu opet dodano 300 mL istog otapala te je provedena još jedna ekstrakcija u trajanju 10 minuta. Dobiveni ekstrakti su sjedinjeni i pomoću rotacijskog vakuum-uparivača upareni do suha. Nakon sušenja u eksikatoru, ekstrakt je prebačen u staklene bočice i čuvan u hladnjaku na 4 °C. Iskorištenje ekstrakcije iznosilo je 79,49 %.

### 3.2. Aparatura i kemikalije

#### *Instrumenti i pribor*

- analitička vaga (Mettler-Toledo, Švicarska-SAD)
- automatske jednokanalne pipete podesivog volumena (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- laboratorijska tresilica (GFL, Hannover, Njemačka)
- UV/Vis spektrofotometar *Helios  $\gamma$*  (Spectronic Unicam, Cambridge, Velika Britanija)
- UV lampa (Camag, Muttenz, Švicarska)
- rotacijski vakuum-uparivač Büchi (Büchi labortechnik AG, Postfach, Švicarska)
- ultrazvučna kupelj Sonorex Digital 10 P (Bandelin, Berlin, Njemačka)
- vodena kupelj (Inko, Zagreb, Hrvatska)

#### *Standardi, reagensi i ostale kemikalije*

- aceton p.a. (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- aluminijev klorid heksahidrat p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

- askorbinska kiselina 99 % (Acros Organics, Geel, Belgija)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- etanol 96 % p.a. (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- etilacetat p.a. (POCH S.A., Gliwice, Poljska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Scharlau, Barcelona, Španjolska)
- fosfat-puferirana otopina soli (0,01 M, pH 7,4) (PBS, *eng.* phosphate buffered saline) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- 5 % fosforna kiselina (Carlo Erba, Milano, Italija)
- Heksametilentetramin (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kloridna kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kožni prašak (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- metanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- mravlja kiselina 98-100 % (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- naftiletilendiamin hidroklorid (NED) (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)
- natrijev hidroksid (Carlo Erba, Rodano, Italija)
- natrijev karbonat dekahidrat (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev molibdat (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- natrijev nitrit (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- natrijev nitroprusid (Fluka, Buchs, Švicarska)
- natrijev sulfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- pirogalol 99 % (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- sulfanilamid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

### 3.3. Određivanje gubitka sušenjem

Gubitak sušenjem određen je na način da je osušena posudica za vaganje izvagana i u nju je stavljeno 1,000 g biljnog materijala te je ponovo izvagana. Zatim je posudica s drogom prebačena u sušionik na sušenje 2 sata na 100-105 °C te je potom hlađena 30 minuta u eksikatoru i vagana. Gubitak sušenjem, izražen u postocima, izračunat je prema izrazu:

$$\text{gubitak sušenjem (\%)} = (m_1 - m_2) * 100 / m_1,$$

gdje je  $m_1$  – masa droge prije sušenja (g), a  $m_2$  – masa droge nakon sušenja (g) (Vladimir-Knežević i sur., 2019).

### **3.4. Dokazivanje bioaktivnih sastavnica metodom tankoslojne kromatografije (TLC)**

#### **3.4.1. Dokazivanje flavonoida i fenolnih kiselina**

Ispitivanje prisutnosti flavonoida i fenolnih kiselina tankoslojnom kromatografijom provedeno je na ploči s tankim slojem silikagela 60 F<sub>254</sub>. Na startnu liniju je pomoću kapilare nanoseno po 10 µL ispitivane otopine i 10 µL poredbenih otopina. Poredbene otopine sadržavale su rutin, kvercitrin i izokvercitrin (p.o.1), odnosno klorogenu i kavenu kiselinu (p.o.2). Ispitivana otopina pripravljena je na način da je 1 g droge prelijevano s 10 mL metanola, grijano 5 minuta na vodenoj kupelji te filtrirano. Za odjeljivanje sastavnica korištena je pokretna faza etil-acetat-mravlja kiselina-voda 8:1:1 (V/V/V), a detekcija odijeljenih sastavnica provedena je prskanjem ploče 1 %-tnom metanolnom otopinom β-aminoetilestera difenilboratne kiseline i 5 %-tnom metanolnom otopinom polietilen glikola (NP/PEG). Ploča je osušena na zraku i ispitana pod UV svjetlom na 365 nm (Wagner i Bladt, 2009).

#### **3.4.2. Dokazivanje antocijana**

Prisutnost antocijana ispitana je metodom tankoslojne kromatografije, i to tako da je 10 µL ispitivane otopine nanoseno na ploču s tankim slojem silikagela. Ispitivana otopina pripravljena je tako da je 2 g biljnog materijala prelijevano s 20 mL metanola te je, nakon 15 minuta mućkanja, filtrirano. Kao pokretna faza kojom su odijeljene sastavnice korištena je bezvodna mravlja kiselina-voda-butanol 16:19:65 (V/V/V), a detekcija je provedena na danjem svjetlu (Wagner i Bladt, 2009).

### **3.5. Određivanje sadržaja bioaktivnih sastavnica UV-Vis spektrofotometrijskim metodama**

#### **3.5.1. Određivanje fenolnih kiselina**

Određivanje fenolnih kiselina u osušenim i usitnjenim plodovima američke borovnice provedeno je prema postupku opisanom u literaturi (EDQM, 2019). 0,200 g usitnjenog

biljnog materijala ekstrahirano je s 80 mL 50 %-tnog etanola 30 minuta na kipućoj vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Nakon hlađenja i filtracije, filtrat je razrijeđen u odmjernoj tikvici do 100,0 mL te je 1,0 mL tako dobivenog ekstrakta prebačen u odmjernu tikvicu od 10 mL. U odmjernu tikvicu dodano je redom i 2,0 mL 0,5 M kloridne kiseline, 2,0 mL nitrit-molibdat reagensa (pripremljenog otapanjem 10 g natrijeva nitrita i 10 g natrijeva molibdata u 100 mL vode) i 2,0 mL 8,5 %-tne otopine natrijevog hidroksida. Tikvica je nadopunjena do oznake destiliranom vodom i apsorbancija je izmjerena na valnoj duljini 505 nm u odnosu na poredbenu otopinu. Poredbena otopina pripremljena je tako da se 1,0 mL ekstrakta razrijedilo destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 10 mL. Maseni udio fenolnih kiselina (izražen kao ružmarinska kiselina) izračunat je prema izrazu:

$$\% \text{ fenolnih kiselina} = A * 2,5 / m,$$

gdje je A- apsorbancija ispitivane otopine na 505 nm, a m- masa droge u gramima.

Određivanje fenolnih kiselina provedeno je i u etanolno-vodenom ekstraktu prema istom postupku, osim što je u analizu uzeto 0,100 g ekstrakta.

### 3.5.2. Određivanje antocijana

Sadržaj antocijana određen je prema metodi opisanoj u literaturi (EDQM, 2019). 2,00 g usitnjenog biljnog materijala prebačeno je u Erlenmayerovu tikvicu i pomiješano s 95 mL metanola. Ekstrakcija je izvršena mehaničkim mućkanjem tijekom 30 minuta i 10 minuta u ultrazvučnoj kupelji. Nakon filtracije u odmjernu tikvicu od 100,0 mL, ista je (uz ispiranje filter papira) nadopunjena metanolom do oznake. Dobivena otopina razrijeđena je 20 puta s 0,1 %-tnom otopinom HCl u metanolu. Apsorbancija je izmjerena na valnoj duljini 528 nm, a kao poredbena otopina korištena je 0,1 %-tna otopina HCl u metanolu. Udio antocijana, izražen kao postotak, izračunat je prema izrazu:

$$\% \text{ antocijana} = A * 2000 / (718 * m),$$

gdje je A- apsorbancija ispitivane otopine na 528 nm, a m- masa droge u gramima.

Određivanje antocijana provedeno je i u etanolno-vodenom ekstraktu istom metodom, osim što je u analizu uzeto 0,500 g ekstrakta, a ispitivana otopina pripremljena razrjeđivanjem 10 puta, pa je u skladu s time i modificiran izraz za izračun.

### 3.5.3. Određivanje trjeslovina

Određivanje trjeslovina provedeno je prema postupku opisanom u Europskoj farmakopeji (EDQM, 2019). Usitnjeni suhi plodovi (1,000 g) preliveni su sa 150 mL vode i ekstrahirani 30 minuta na vodenoj kupelji, uz povratno hladilo. Dobiveni ekstrakt kvantitativno je prenesen u odmjernu tikvicu od 250,0 mL koja je nadopunjena vodom do oznake. Nakon što su se čestice istaložile, ekstrakt je profiltriran te je prvih 50 mL filtrata bačeno, a ostatak je iskorišten za sljedeće postupke.

Ukupni polifenoli određeni su tako da je 5 mL filtrata razrijeđeno vodom do 25,0 mL i 2,0 mL te otopine pomiješano je s 1,0 mL Folin-Ciocalteau reagensa i 10,0 mL vode u odmjernoj tikvici od 25,0 mL. Tikvica je nadopunjena otopinom natrijevog karbonata (290 g/L) do oznake i nakon 30 minuta izmjerena je apsorbancija ( $A_1$ ) na 760 nm, a kao poredbena otopina korištena je voda.

Polifenoli neadsorbirani na kožni prašak određeni su tako je u 10,0 mL filtrata dodano 0,10 g kožnog praška i sadržaj tikvice je snažno mućkan na laboratorijskoj tresilici 60 minuta. Nakon filtracije je 5,0 mL filtrata razrijeđeno vodom do 25,0 mL i 2,0 mL te otopine pomiješano je s 1,0 mL Folin-Ciocalteau reagensa i 10,0 mL vode u odmjernoj tikvici od 25 mL. Sadržaj tikvice nadopunjen je do oznake otopinom natrijevog karbonata (290 g/L) te je nakon 30 minuta izmjerena apsorbancija ( $A_2$ ) na 760 nm, uz vodu kao poredbenu otopinu.

Standardna otopina pirogalola pripravljena je otapanjem 50,0 mg pirogalola u 100 mL vode. 5,0 mL dobivene otopine razrijeđeno je vodom do 100,0 mL, a potom je 2 mL otopine pomiješano s 1,0 mL Folin-Ciocalteau reagensa i 10,0 mL vode u odmjernoj tikvici od 25 mL. Sadržaj tikvice nadopunjen je do oznake otopinom natrijevog karbonata (290 g/L) i nakon 30 minuta izmjerena je apsorbancija ( $A_3$ ) na 760 nm, uz vodu kao poredbenu otopinu. Postotni udio trjeslovina, izražen kao pirogalol, izračunat je prema izrazu:

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

gdje je  $m_1$ - masa ispitivanog uzorka u gramima, a  $m_2$ - masa pirogalola u gramima.

Određivanje trjeslovina provedeno je i u etanolno-vodenom ekstraktu prema istom postupku, jedino što je u analizu uzeto 0,500 g ekstrakta.

### 3.5.4. Određivanje flavonoida

Sadržaj flavonoida određen je prema postupku opisanom u literaturi (EDQM, 2019). U tikvicu je stavljeno 0,600 g biljnog materijala i dodano je 1 mL 5 g/L otopine heksametilentetramina, 20 mL acetona te 2 mL kloridne kiseline (250 g/L). Sadržaj tikvice je zatim zagrijavan na vodenoj kupelji 30 minuta, uz povratno hladilo. Filtriran je preko pamuka, a ostatak droge u tikvici i na pamuku opet je ekstrahiran dva puta s 20 mL acetona, zagrijavanjem tijekom 10 minuta. Nakon hlađenja, sjedinjeni filtrati su filtrirani preko filterpapira i otopina je razrijeđena acetonom do 100,0 mL. Nakon toga, 20 mL takvog acetonskog ekstrakta prebačeno je u lijevak za odjeljivanje i pomiješano s 20 mL vode. Sadržaj lijevka izmučkivan je s 15 mL etilacetata, a zatim tri puta s po 10 mL etilacetata. Etilacetatni ekstrakti su sjedinjeni i dodatno isprani u lijevku za odjeljivanje s dva puta po 50 mL vode. Zatim su filtrirani preko 10 g bezvodnog natrijevog sulfata i razrijeđeni etilacetatom do 50,0 mL. U odmjernu tikvicu od 25 mL prebačeno je 10,0 mL dobivenog ekstrakta i dodano je 1,0 mL reagensa aluminijskog klorida te 5 %-tna metanolna otopina octene kiseline do oznake. Nakon 30 minuta izmjerena je apsorbancija ispitivane otopine na 425 nm u odnosu na poredbenu otopinu. Poredbena otopina pripravljena je razrijeđenjem 10,0 mL etilacetatnog ekstrakta s 5 %-tnom metanolnom otopinom octene kiseline u odmjernoj tikvici od 25,0 mL. Maseni udio flavonoida, izražen kao izokvercetrozid, izračunat je prema izrazu:

$$\% \text{ flavonoida} = A * 1,25 / m,$$

gdje je A- apsorbancija ispitivane otopine na 425 nm, a m- masa droge u gramima.

Određivanje flavonoida provedeno je i u etanolno-vodenom ekstraktu prema istom postupku.

## 3.6. Istraživanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta ploda američke borovnice

### 3.6.1. Određivanje sposobnosti hvatanja radikala dušikovog (II) oksida (NO)

Sposobnost vodeno-etanolnog ekstrakta ploda američke borovnice da hvata radikale dušikovog (II) oksida ispitana je spektrofotometrijskom metodom opisanom u literaturi (Harput i sur., 2011). Na mikrotitarskoj pločici pripremljen je niz serijskih razrijeđenja u 80  $\mu$ L 70 %-tnog etanola. Određivanje je provedeno u duplikatu, a koncentracije uzorka u reakcijskoj smjesi bile su u rasponu 12,5-1600  $\mu$ g/ml te je u dvije kontrolne jažice umjesto

uzoraka stavljeno 80  $\mu\text{L}$  70 %-tnog etanola. Zatim je u svaku jažicu dodano 80  $\mu\text{L}$  otopine Na-nitroprusida (2 mM) u PBS-u (0,01 mM, pH 7,4) i sadržaj je promiješan te je reakcijska smjesa inkubirana na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije u jažice je dodano 80  $\mu\text{L}$  Griessovog reagensa (1 % sulfanilamid, 0,1 % NED i 5 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) na način da je prvo dodano 40  $\mu\text{L}$  1 %-tne otopine sulfanilamida u  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , a nakon 5 minuta dodano je i 40  $\mu\text{L}$  0,1 %-tne otopine NED-a te je sadržaj promiješan. Apsorbancija je izmjerena odmah nakon dodatka NED-a i to na 545 nm, u odnosu na slijepu probu. Sposobnost hvatanja NO radikala z apojedinu koncentraciju uzorka izračunata je prema sljedećem izrazu:

$$\% \text{ NO antiradikalne sposobnosti} = (A_0 - A_1) * 100 / A_0,$$

gdje je  $A_0$ - apsorbancija kontrolne otopine koja je umjesto testiranog uzorka sadržavala jednaku količinu otapala, a  $A_1$ - apsorbancija ispitivane otopine.

Za usporedbu su testirani i standardni antioksidansi, askorbinska kiselina i kvercetin.

### 3.6.2. Određivanje sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala

Sposobnost etanolno-vodenog ekstrakta ploda američke borovnice da hvata DPPH slobodne radikale određena je spektrofotometrijskom metodom prema postupku opisanom u litetraturi (Kindl i sur., 2015). Određivanje je provedeno u duplikatu te je u epruvetama pripremljen niz serijskih razrijeđenja uzorka u 1,5 mL 70 %-tnog etanola. Raspon konačnih koncentracija uzorka u reakcijskoj smjesi bio je 3,13-1600  $\mu\text{g/mL}$ , a u dvije kontrolne epruvete umjesto uzorka stavljeno je 1,5 mL 70 %-tnog etanola. U svaku epruvetu je repetativnom pipetom dodano 0,5 mL svježe pripremljene 0,1 mM otopine DPPH radikala i sadržaj epruvete je promiješan. Zatim je reakcijska smjesa inkubirana 30 minuta pri sobnoj temperaturi na tamnom mjestu. Nakon inkubacije je izmjerena apsorbancija na 517 nm, uz 96 %-tni etanol kao slijepu probu. Sposobnost hvatanja DPPH radikala, izražena u postocima, izračunata je prema izrazu:

$$\% \text{ DPPH antiradikalne sposobnosti} = (A_0 - A_1) * 100 / A_0,$$

gdje je  $A_0$ - apsorbancija kontrolne otopine koja je umjesto uzorka sadržavala jednaku količinu otapala, a  $A_1$ - apsorbancija ispitivane otopine.

Za usporedbu je određena i antioksidativna aktivnost referentnih antioksidansa kvercetina i askorbinske kiseline, uz razliku da su testirane niže koncentracije standarda (0,2-100  $\mu\text{g/ml}$ ).

### **3.7. Statistička analiza**

Za statističku analizu podataka korišten je računalni program Excell 2016 programskog paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ukupnog broja mjerenja za pojedino određivanje. IC<sub>50</sub> (koncentracije uzoraka koje ostvaruju 50 %-tni učinak) dobivene su interpolacijom na temelju linearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka.



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Gubitak sušenjem

Gubitak sušenjem je metoda kojom se ispituje čistoća biljnih droga. Također je bitno odrediti sadržaj vlage u biljnoj drogi jer se na drogi s većim udjelom vode lakše razvijaju mikroorganizmi, a i voda može potaknuti razgradnju bioaktivnih tvari.

Prema radu Skupinen (2006) plodovi američke borovnice sadrže visok udio vode. Nakon sušenja plodova na 105 °C do konstantne mase suhi ostatak iznosio je oko 15 %, ovisno o sorti. Slični rezultati dobiveni su i u ostalim radovima navedenima u istraživanju.

Gubitak sušenjem za drogu - suhi plod američke borovnice (*V. corymbosum*) istraživan u ovom radu određen je gravimetrijski i iznosio je 8,05 %, što udovoljava farmakopejskom zahtjevu za vrijednost gubitka sušenjem kod srodne droge, suhih plodova borovnice (*V. myrtillus*) od najviše 12 %.

### 4.2. Dokazivanje bioaktivnih sastavnica ploda američke borovnice

Kvalitativna analiza plodova vrste *V. corymbosum* provedena je tankoslojnom kromatografijom. Ispitana je prisutnost fenolnih kiselina i flavonoida te antocijana, a prisutnost analiziranih spojeva utvrđena je na temelju usporedbe slijeda i boja fluorescencije te  $R_f$ -vrijednosti zona odijeljenih na kromatogramu ispitivane otopine s kromatogramima poredbenih otopina kao i literaturnim podacima.

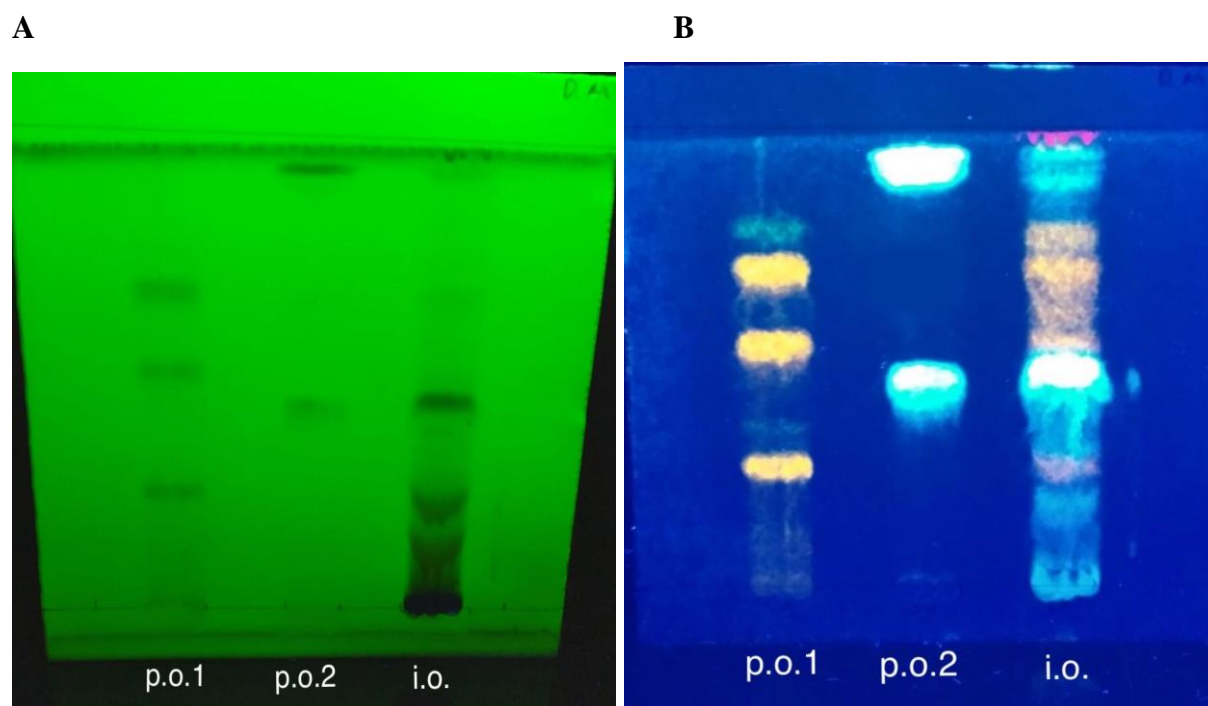
#### 4.2.1. Dokazivanje fenolnih kiselina i flavonoida u plodu američke borovnice

Kvalitativna analiza flavonoida i fenolnih kiselina provedena je na tankom sloju silikagela korištenjem smjese etilacetata, mravlje kiseline i vode u volumnim omjerima 8:1:1 (V/V/V) kao pokretne faze. Nakon razvijanja kromatograma, detekcija je provedena pod UV svjetlom na 245 nm. Zatim je ploča poprskana NP/PEG reagensom, osušena na zraku i promatrana pod UV svjetlom na 365 nm. Slika 3 prikazuje dobivene kromatograme.

Poredbena otopina 1 (p.o.1) sadrži flavonoide koji su, nakon prskanja s NP/PEG reagensom pod UV svjetlom vidljivi kao zone narančaste fluorescencije (slika 3).  $R_f$  vrijednost rutina na dobivenom kromatogramu iznosi 0,27, izokvercitrina 0,53, a kvercitrina 0,69. Na kromatogramu ispitivane otopine (i.o.) vidljive su zone fluorescencije koje su prema položaju

i boji odgovarale flavonoidima iz p.o.1. Najveći intenzitet fluorescencije u ispitivanoj otopini pokazala je zona koja odgovara kvercitrinu, nešto slabija je za zonu koja odgovara izokvercitrinu, dok je intenzitet fluorescencije zone koja odgovara rutinu najslabiji.

Poredbena otopina 2 (p.o.2) sadrži fenolne kiseline koje su, nakon prskanja s NP/PEG reagensom, pod UV zračenjem vidljive kao zone plave fluorescencije (slika 3).  $R_f$  vrijednost klorogenske kiseline na dobivenom kromatogramu iznosi 0,45, a  $R_f$  vrijednost kavene kiseline iznosi 0,91. Na kromatogramu ispitivane otopine vidljivo je najmanje 5 zona narančaste fluorescencije, od kojih 3 zone bojom i položajem odgovaraju referentnim flavonoidima, kao i zone koje odgovaraju poredbenim fenolnim kiselinama. Intenzitet i veličina zone fluorescencije koja odgovara klorogenskoj kiselini veći je od one koja odgovara kavenoj kiselini.



**Slika 3.** Kromatogram ploda američke borovnice i poredbenih fenolnih kiselina i flavonoida

Pokretna faza: etil-acetat, mravlja kiselina, voda (80:10:10 V/V/V)

Nepokretna faza: Silikagel 60 F254

**Detekcija:** A - UV-254 nm; B - NP/PEG, UV-365 nm

Poredbene supstancije: kvercetin, izokvercitrin, rutin, kavena kiselina, klorogenska kiselina

**Detekcija:** A - UV-254 nm; B - NP/PEG, UV-365 nm

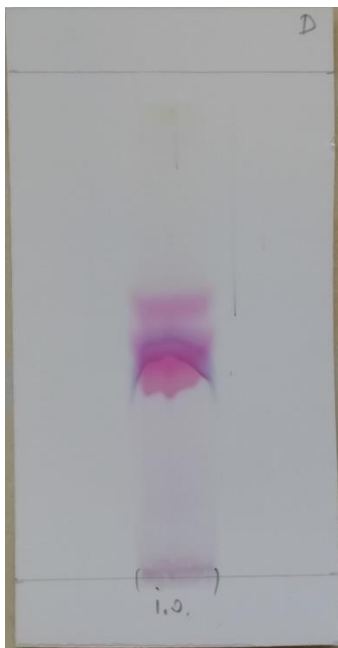
**p.o.1:** rutin ( $R_f=0,27$ ), izokvercitrin ( $R_f=0,53$ ), kvercitrin ( $R_f=0,69$ )

**p.o.2:** klorogenska kiselina ( $R_f=0,45$ ), kavena kiselina ( $R_f=0,91$ )

**i.o.:** metanolni ekstrakt ploda američke borovnice

#### 4.2.2. Dokazivanje antocijana u plodu američke borovnice

Metodom tankoslojne kromatografije, na tankom sloju silikagela uz primjenu smjese bezvodne metanske kiseline, vode i butanola u omjeru 16:19:65 kao mobilne faze, u plodu američke borovnice dokazana je prisutnost antocijana. Nakon detekcije na dnevnom svjetlu dobiven je kromatogram prikazan na slici 4.



**Slika 4.** Kromatogram analize antocijana  
**Detekcija:** na dnevnom svjetlu  
**i.o.:** metanolni ekstrakt plodova američke borovnice

Wagner i Bladt (2009) navode da plave do ljubičasto-roze zone,  $R_f$  vrijednosti u raponu 0,2-0,5, pripadaju antocijanima. Na dobivenom kromatogramu prisutne su zone navedenih boja. Zona koja ima najintenzivniju boju u referentnom je rasponu za antocijane, a prisutna je i jedna zona slabijeg intenziteta s nešto većim  $R_f$  faktorom. Može se zaključiti da su antocijani prisutni u analiziranom plodu američke borovnice.

#### 4.3. Sadržaj bioaktivnih sastavnica u plodu američke borovnice

Kvantitativna analiza bioaktivnih sastavnica američke borovnice provedena je primjenom spektrofotometrijskih metoda. Određen je sadržaj fenolnih kiselina, antocijana, trjeslovina i flavonoida u suhim plodovima te pripremljenom etanolno-vodenom ekstraktu.

### 4.3.1. Fenolne kiseline

Ukupne fenolne kiseline u ovom diplomskom radu određene su spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na stvaranju kompleksa između *o*-dihidroksifenolne skupine i nitrit-molibdatova reagensa. Taj kompleks je žute boje, a zaluzivanjem boja otopine prelazi u narančastocrvenu. Maseni udio fenolnih kiselina u suhim usitnjenim plodovima, izražen kao ružmarinska kiselina, iznosi  $0,66 \pm 0,05$  %, a maseni udio u etanolnom ekstraktu iznosi  $0,72 \pm 0,10$  %.

Određivanje sadržaja fenolnih kiselina u plodovima američke borovnice tema je i mnogih drugih radova. Zorenc i sur. (2016) proveli su takvo istraživanje na više sorti američkih borovnica uzgajanih u Sloveniji. U njihovom istraživanju ekstrakcija je provedena nešto drukčijom metodom, a rezultati su iskazani kao maseni udio fenolnih kiselina u svježim plodovima. Sadržaj fenolnih kiselina bio je u rasponu 0,26-0,31 %. Dokazano je da plodovi američke borovnice sadrže visok udio vode te bi rezultati ovog istraživanja zasigurno bili puno viši da je ono provedeno na suhim plodovima.

### 4.3.2. Antocijani

Kvantitativna analiza antocijana u sklopu ovog diplomskog rada provedena je spektrofotometrijskom metodom u kojoj je apsorbancija mjerena na 528 nm. Pri toj valnoj duljini antocijani imaju svojstvo da povećavaju apsorbanciju u jako kiseljoj sredini (pH=1). Udio antocijana u suhim usitnjenim plodovima, izračunat kao cijanidin-3-glukozid klorid, iznosi  $0,41 \pm 0,02$  %. U etanolnom ekstraktu udio antocijana je neznatno veći te iznosi  $0,43 \pm 0,02$  %.

Antocijani su polifenolne sastavnice koje su najodgovornije za antioksidativno djelovanje američke borovnice, a u najvećoj koncentraciji nalaze se u plodovima. Na američkoj borovnici uzgajanoj u Hrvatskoj istraživanje su proveli i Dragović-Uzelac i sur. (2010) te su odredili sadržaj antocijana spektrofotometrijskom metodom u svježim plodovima. Maseni udio antocijana, izražen kao cijanidin-3,5-diglukozid, iznosio je oko 0,2 % ovisno o istraživanoj sorti biljke.

### 4.3.3. Trjeslovine

Kvantitativna analiza trjeslovina u plodu američke borovnice provedena je spektrofotometrijskom metodom koja se temelji se na adsorpciji trjeslovina na kožni prašak. Polifenolne sastavnice s Folin-Ciocalteuovim reagensom formiraju plavo obojene kompleksne spojeve, a apsorbancija otopina mjeri se na 760 nm. Odredi se sadržaj ukupnih polifenola i sadržaj polifenola neadsorbiranih na kožni prašak te se sadržaj trjeslovina dobije iz razlike ta dva sadržaja. Postotni udio trjeslovina u osušenim usitnjenim plodovima iznosi  $0,63 \pm 0,05$  %, a u etanolnom ekstraktu  $0,66 \pm 0,03$  %.

Rezultati dobiveni u drugim sličnim istraživanjima često pokazuju više vrijednosti trjeslovina u suhim plodovima američke borovnice. Tako su Varo i sur. (2021) u osušenim plodovima porijekolom iz Španjolske utvrdili da se udio trjeslovina kreće u rasponu 1,6-2,1 % što je značajno više u odnosu na analizirani hrvatski uzorak.

### 4.3.4. Flavonoidi

Kvantitativna analiza flavonoida provedena je spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na hidrolizi flavonoidnih glikozida i odjeljivanju aglikona izmućkavanjem s etilacetatom. Dodatkom aluminijskog klorida nastaju kompleksni spojevi žute boje s maksimumom apsorbancije na valnoj duljini 425 nm. Maseni udio flavonoida u suhim plodovima američke borovnice, izražen kao izokvercetrozid, iznosio je  $0,12 \pm 0,00$  %, a u etanolno-vodenom ekstraktu droge  $0,11 \pm 0,01$  %

Rezultat se može usporediti s rezultatima drugih istraživanja pa je tako u istraživanju Dragović-Uzelac i sur. (2010) udio flavonoida, izražen kao rutin, iznosio 0,27-0,43 %. Treba uzeti u obzir i da je istraživanje provedeno na uzorku svježih plodova, a ne na osušenim plodovima. U istraživanju Sarala i sur. (2015) udio flavonoida određivan je na suhim uzorcima borovnica i za plodove američke borovnice iznosio je 0,10-0,25 %, a izražen je kao kvercetin.

## **4.4. Antioksidativna aktivnost vodenog-etanološkog ekstrakta ploda američke borovnice**

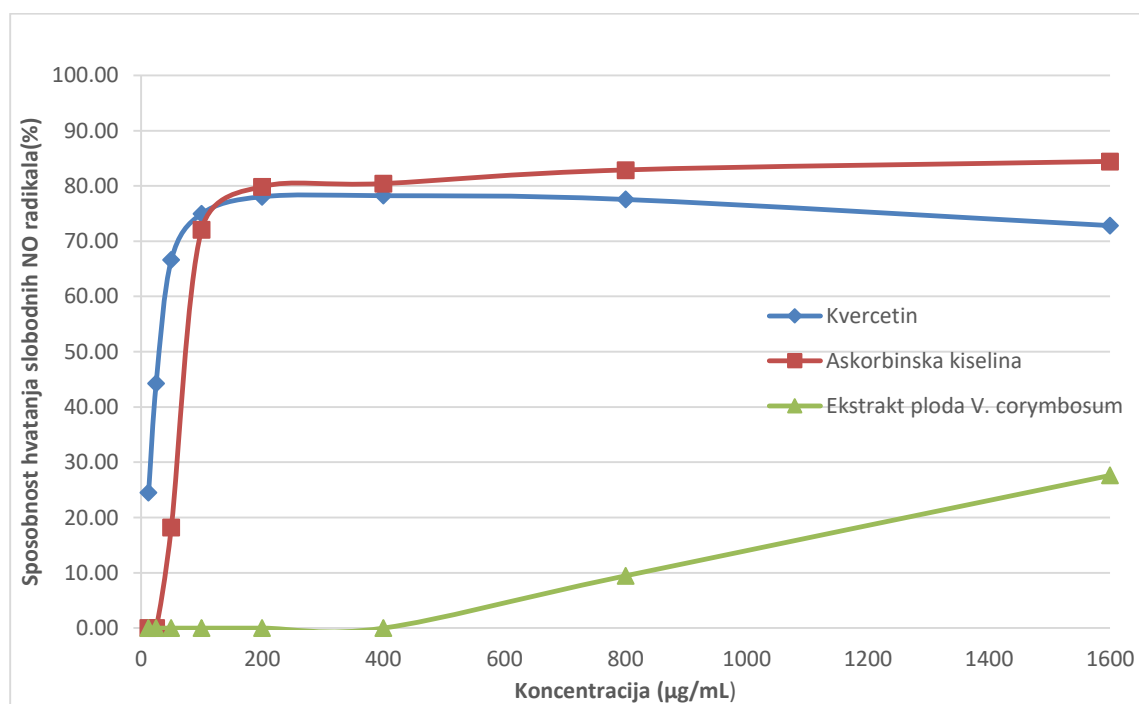
### **4.4.1. Sposobnost hvatanja radikala dušikovog (II) oksida**

Sposobnost etanolno-vodenog ekstrakta ploda američke borovnice da hvata NO radikale određena je primjenom spektrofotometrijske metode, korištenjem natrijevog nitroprusida kao izvora NO radikala. Ovaj reagens u vodenoj otopini pri fiziološkom pH spontano oslobađa NO, a nastali NO radikal reagira s kisikom i prelazi u nitrit ione koji reagiraju sa sulfanilamidom i NED-om pri kiselom pH te formiraju ljubičasti kompleks čija se apsorbanacija mjeri na 545 nm.

Usporedno sa ekstraktom, vrednovana je i antioksidativna aktivnost standardnih antioksidansa, askorbinske kiseline i kvercetina, te su u tu svrhu pripremljena serijska razrjeđenja uzoraka u rasponu koncentracija 12,5-1600 µg/mL. Sposobnost hvatanja NO radikala iskazana je u postocima za svaku koncentraciju uzoraka, a rezultati su prikazani u tablici 1. Iz rezultata je vidljivo da najveću antioksidativnu aktivnost pri nižim koncentracijama pokazuje kvercetin koji već kod 12,5 i 25 µg/mL neutralizira 25,52±0,68 %, odnosno 44,29±6,23 % slobodnih NO radikala. Askorbinska kiselina ne pokazuje antiradikalna svojstva pri koncentracijama 12,5 i 25 µg/mL te tek pri koncentraciji od 50 µg/mL ostvaruje značajniji neutralizacijski učinak od 18,22±5,66 %. Ipak, askorbinska kiselina pri najvišim ispitivanim koncentracijama pokazuje i najveću sposobnost hvatanja NO radikala pa tako pri koncentraciji od 1600 µg/mL dostiže postotak inhibicije 84,42±0,84 %. U odnosu na standarde, etanolno-vodeni ekstrakt ploda američke borovnice pokazao je znatno slabiji antioksidativni potencijal. Tek pri koncentraciji 800 µg/mL uočena je početna antioksidacijska aktivnost uz postotak inhibicije 9,47±0,26 %, a pri koncentraciji 1600 µg/mL postotak inhibicije iznosio je 27,64±3,33 %.

**Tablica 1.** Rezultati određivanja sposobnosti hvatanja NO radikala za etanolno-vodeni ekstrakt ploda američke borovnice i referentne antioksidanse

koncentracija ( $\mu\text{g/ml}$ )	Sposobnost hvatanja NO radikala (%)		
	ekstrakt ploda američke borovnice	kvercetin	askorbinska kiselina
1600	27,64 $\pm$ 3,33	72,84 $\pm$ 0,54	84,42 $\pm$ 0,84
800	9,47 $\pm$ 0,26	77,57 $\pm$ 1,92	82,87 $\pm$ 1,07
400	nd	78,26 $\pm$ 2,35	80,40 $\pm$ 1,14
200	nd	78,07 $\pm$ 2,62	79,85 $\pm$ 0,54
100	nd	74,98 $\pm$ 5,26	72,07 $\pm$ 0,94
50	nd	66,65 $\pm$ 8,85	18,22 $\pm$ 5,66
25	nd	44,29 $\pm$ 6,23	nd
12,5	nd	24,52 $\pm$ 0,68	nd



**Slika 5.** Grafički prikazana ovisnost sposobnosti hvatanja NO radikala o koncentraciji za ekstrakt ploda američke borovnice, kvercetin i askorbinsku kiselinu

U istraživanju je interpolacijom na temelju linearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka izračunata IC<sub>50</sub> koncentracija za čiste spojeve. Koncentracija kvercetina koja ostvaruje 50 %-tno smanjenje NO radikala iznosila 34,19±5,47 µg/mL, dok je askorbinska kiselina isti učinak pokazala pri IC<sub>50</sub> koncentraciji 78,68±1,00 µg/mL. U testiranom rasponu koncentracija ekstrakt plodova američke borovnice nije dostigao 50 %-tni učinak. Pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji (1600 µg/mL) sposobnost hvatanja NO radikala za ekstrakt iznosila je tek 27,64±3,33 % te nije bilo moguće odrediti IC<sub>50</sub> vrijednost.

#### **4.4.2. Sposobnost hvatanja DPPH slobodnog radikala**

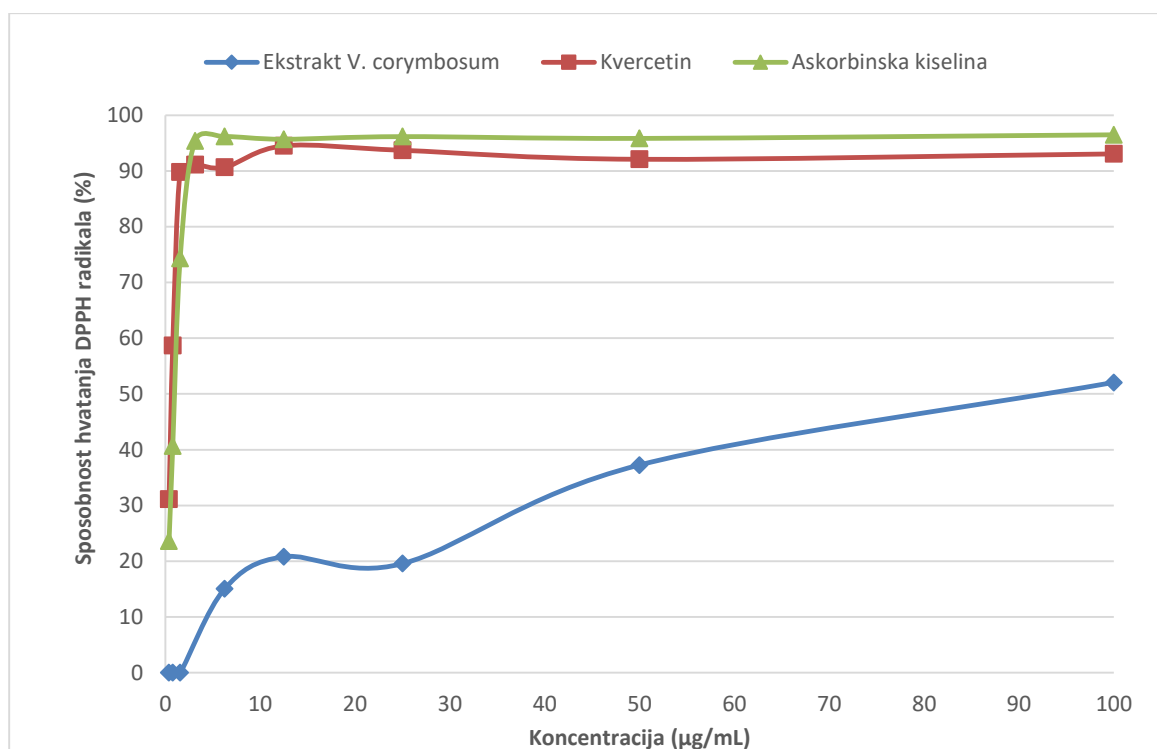
Sposobnost etanolno-vodenog ekstrakta ploda američke borovnice da hvata DPPH radikale određena je primjenom spektrofotometrijske metode, korištenjem komercijalno dostupnog stabilnog DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) slobodnog radikala koji zbog nesparenog elektrona apsorbira u vidljivom dijelu spektra (ljubičasta boja) pri 517 nm. Antioksidansi u reakciji s DPPH radikalima doniraju atom vodika ili elektron te nastaju molekule 1,1-difenil-2-pikrilhidrazina svijetlo žute boje. Antiradikalna aktivnost se, dakle, očituje u obezbojenju otopine DPPH radikala što je posljedica njegove redukcije.

Antioksidativna aktivnost etanolno-vodenog ekstrakta plodova američke borovnice ispitana je usporedno sa aktivnosti referentnih antioksidansa, askorbinske kiseline i kvercetina, te su testirani uzorci u rasponu koncentracija 3,13-1600 µg/mL, odnosno kiseline 0,2-100 µg/mL. Iz rezultata prikazanih u tablici 2 vidljivo je da standardi već pri najnižim ispitivanim koncentracijama pokazuju antioksidativni učinak, a 90 %-tnu inhibiciju DPPH radikala postižu pri koncentraciji 3,13 µg/mL. S druge strane, ekstrakt ploda američke borovnice pokazao je manju sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala, iako pri višim koncentracijama ostvaruje 85 %-tnu učinkovitost i približava se učinku standarda.



**Tablica 2.** Rezultati određivanja sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala za etanolno-vodeni ekstrakt ploda američke borovnice i referentne antioksidanse

koncentracija ( $\mu\text{g/ml}$ )	Sposobnost hvatanja DPPH radikala (%)		
	ekstrakt ploda američke borovnice	kvercetin	askorbinska kiselina
1600	71,76 $\pm$ 0,10	-	-
800	84,25 $\pm$ 1,18	-	-
400	88,12 $\pm$ 0,02	-	-
200	79,98 $\pm$ 4,41	-	-
100	52,04 $\pm$ 3,20	93,07 $\pm$ 1,57	96,49 $\pm$ 0,04
50	37,25 $\pm$ 5,53	92,10 $\pm$ 3,39	95,85 $\pm$ 0,95
25	19,57 $\pm$ 2,67	93,71 $\pm$ 1,11	96,17 $\pm$ 0,49
12,5	20,80 $\pm$ 3,08	94,52 $\pm$ 0,03	95,69 $\pm$ 0,18
6,25	15,05 $\pm$ 7,34	90,66 $\pm$ 4,98	96,17 $\pm$ 0,04
3,13	-	91,12 $\pm$ 3,46	95,37 $\pm$ 0,18
1,56	-	89,83 $\pm$ 1,64	74,32 $\pm$ 4,03
0,78	-	58,71 $\pm$ 0,72	40,64 $\pm$ 4,36
0,39	-	31,13 $\pm$ 1,45	23,63 $\pm$ 17,96
0,20	-	16,45 $\pm$ 1,29	9,18 $\pm$ 0,66



**Slika 6.** Grafički prikazana ovisnost sposobnosti hvatanja DPPH radikala o koncentraciji za ekstrakt ploda američke borovnice, kvercetin i askorbinsku kiselinu

IC<sub>50</sub> je dobivena interpolacijom i za kvercetin iznosi  $0,71 \pm 0,01$  µg/mL, a za askorbinsku kiselinu  $0,96 \pm 0,12$  µg/mL. Vrijednost IC<sub>50</sub> za ekstrakt u ovome istraživanju bila je unutar ispitivanog raspona koncentracija te se mogla odrediti i iznosila je  $97,41 \pm 10,97$  µg/mL.

Sposobnosti hvatanja slobodnog DPPH radikala za više vrsta borovnica u svom su radu istraživali i Saral i sur. (2015). Utvrdili su IC<sub>50</sub> vrijednosti u širokom rasponu 229-1178 µg/mL, a za ekstrakt američke borovnice vrijednosti su bile u gornjem dijelu ovog intervala.

**Tablica 3.** Usporedni prikaz koncentracija etanolno-vodenog ekstrakta ploda američke borovnice i referentnih antioksidansa koje uzrokuju 50 %-tnu inhibiciju slobodnih radikala (IC<sub>50</sub>)

	IC <sub>50</sub> (µg/mL)		
	Ekstrakt ploda američke borovnice	Kvercetin	Askorbinska kiselina
Sposobnost hvatanja NO radikala	-	$34,19 \pm 5,47$	$78,68 \pm 1,00$
Sposobnost hvatanja DPPH radikala	$97,41 \pm 10,97$	$0,71 \pm 0,01$	$0,96 \pm 0,12$

## 5. ZAKLJUČCI

U ovom diplomskom radu istražen je fitokemijski sastav ploda američke borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) te su provedena ispitivanja njegovih antioksidacijskih svojstava. Metodom tankoslojne kromatografije u istraživanom plodu dokazana prisutnost antocijana, flavonoida i fenolnih kiselina, kao najznačajnijih fitokemijskih sastavnica američke borovnice.

Određivanje sadržaja pojedinih polifenolnih sastavnica u suhim plodovima i u etanolno-vodenom ekstraktu ploda provedeno je primjenom spektrofotometrijskih metoda propisanih Europskom farmakopejom. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je plod američke borovnice bogat izvor polifenolnih spojeva. Utvrđeno je da etanolno-vodeni ekstrakt ploda sadrži  $0,72 \pm 0,10$  % fenolnih kiselina,  $0,43 \pm 0,02$  % antocijana,  $0,66 \pm 0,03$  % trjeslovina i  $0,11 \pm 0,01$  % flavonoida. Sadržaji određeni u suhim plodovima samo su neznatno niži u odnosu na one utvrđene u ekstraktu.

Istraživanja antioksidacijskog potencijala pokazala su da ekstrakt ploda američke borovnice posjeduje izraženu sposobnost hvatanja DPPH radikala te da ostvaruje 50 %-tnu učinkovitost pri koncentraciji  $97,41 \pm 10,97$   $\mu\text{g/mL}$ . Ekstrakt je pokazao antioksidacijska svojstva, iako znatno niža u odnosu na standarde askorbinsku kiselinu i kvercetin. Za hvatanje NO radikala  $\text{IC}_{50}$  se nije nalazio u rasponu koncentracija na kojem je provedeno istraživanje.

Može se zaključiti da *V. corymbosum* u svojim plodovima sadrži polifenolne spojeve koji su važni prirodni antioksidansi čiji se učinak ispoljava sposobnošću vezanja ROS. Stoga bi konzumacija borovnica mogla imati brojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje jer upravo antioksidansi preveniraju velik broj raznih bolesti.

## 6. LITERATURA

Alappat B, Alappat J. Anthocyanin pigments: beyond aesthetics. *Molecules*, 2020, 25, 5500.

Bagchi D, Sen C, Bagchi M, Atalay M. Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochem (Mosc)*, 2004, 69, 75-80.

da Silveira L, Pedra N, Bona N, Spohr L, da Silva dos Santos F, Saraiva J, Alvez F, de Moraes Meine B, Spanevello R, Stefanello F, Soares M. Selective in vitro anticancer effect of blueberry extract (*Vaccinium virgatum*) against C6 rat glioma: exploring their redox status. *Metab Brain Dis*, 2021, 37, 439-449.

Devareddy L, Hooshmand S, Collins J, Lucas E, Chai S, Arjmandi B. Blueberry prevents bone loss in ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Nutr Biochem*, 2008, 19, 694-699.

Domazetovic V, Marcucci G, Pierucci F, Bruno G, Di Cesare Mannelli L, Ghelardini C, Vincenzini M. T. Blueberry juice protects osteocytes and bone precursor cells against oxidative stress partly through SIRT 1. *FEBS Open Bio*, 2019, 1-15.

Dragović-Uzelac V, Savić Z, Brala A, Levaj B, Bursać Kovačević D, Biško A. Phenolics and antioxidant capacity of blueberry. *Food Technol Biotechnol*, 2010, 48, 214–221.

Dujmović Purgar D, Šindrak Z, Mihelj D, Voća S, Duralija B. Rasprostranjenost roda *Vaccinium* u Hrvatskoj. *Pomol Croat*, 2007, 13, 219-228.

EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care). European Pharmacopoeia, 10. izd., Strasbourg: Council of Europe, 2019, str. 288, 1257-1258, 1343-1344, 1521.

Giacalone M, Di Sacco F, Traupe I, Topini R, Forfori F, Giunta F. Antioxidant and neuroprotective properties of blueberry polyphenols: a critical review. *Nutr Neurosci*, 2011, 14, 119-125.

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vaccinium\\_corymbosum0.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vaccinium_corymbosum0.jpg), pristupljeno 10.05.2022

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vaccinium\\_corymbosum\\_6706-6710.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vaccinium_corymbosum_6706-6710.jpg), pristupljeno 04.05.2022.

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vaccinium\\_corymbosum\\_Duke.jpeg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vaccinium_corymbosum_Duke.jpeg), pristupljeno 09.07.2022.

Harput US, Genc Y, Khan N, Saracoglu I. Radical scavenging effects of different *Veronica* species. *Rec Nat Prod*, 2011, 5 (2), 100-107.

Huang W, Liu Y, Wang J, Wang X, Li C. Anti-inflammatory effect of the blueberry anthocyanins malvidin-3-glucoside and malvidin-3-galactoside in endothelial cells. *Molecules*, 2014, 19, 12827-12841.

Huang W, Yao L, He X, Wang L, Li M, Yang Y, Wan C. Hypoglycemic activity and constituents analysis of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) fruit extracts. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2018, 11, 357-366.

Joshi S, Howell A, D'Souza D. Antiviral effects of blueberry proanthocyanidins against Aichi virus. *Food Microbiol*, 2019, 82, 202-208.

Kader F, Rovel B, Girardin M, Metche M. Fractionation and identification of the phenolic compounds of Highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*, L.). *Food Chem*, 1996, 55, 35-40.

Kalt W, McDonald J, Fillmore S, Tremblay F. Blueberry effects on dark vision and recovery after photobleaching: placebo-controlled crossover studies. *J Agric Food Chem*, 2014, 62, 11180-11189.

Kalt, W, Cassidy A, Howard L, Krikorian R, Stull A, Tremblay F, Zamora-Ros R. Recent research on the health benefits of blueberries and their anthocyanins. *Adv Nutr*, 2019, 1-13.

Kindl M, Blažeković B, Bucar F, Vladimir-Knežević S. Antioxidant and anticholinesterase potential of six *Thymus* species. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015, ID 403950, 1-10.

Krikorian R, Shidler M, Nash T, Kalt W, Vinqvist-Tymchuk M, Shukitt-Hale B, Joseph J. Blueberry supplementation improves memory in older adults. *J Agric Food Chem*, 2010, 58, 3996-4000.

Li J, Deng R, Hua X, Zhang L, Lu F, Coursey T, Pflugfelder S, Li D. Blueberry component pterostilbene protects corneal epithelial cells from inflammation via anti-oxidative pathway. *Sci Rep*, 2016, 6.

Ma L, Sun Z, Zeng Y, Luo M, Yang J. Molecular mechanism and health role of functional ingredients in blueberry for chronic disease in human beings. *Int J Mol Sci*, 2018, 19, 2785.

Miller K, Feucht W, Schmid M. Bioactive compounds of strawberry and blueberry and their potential health effects based on human intervention studies: a brief overview. *Nutrients*, 2019, 11, 1510.

Nabel E. Cardiovascular disease. *N Engl J Med*, 2003, 349, 60-72.

Nemes-Nagy E, Szócs-Molnár T, Dunca I, Balogh-Sămărghișan V, Hobai Ș, Morar R, Pusta D, Crăciun E. Effect of a dietary supplement containing blueberry and sea buckthorn concentrate on antioxidant capacity in type 1 diabetic children. *Hung Acta Physiol*, 2008, 95, 383-393.

Neto C. Cranberry and blueberry: Evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Mol Nutr Food Res*, 2007, 51, 652-664.

Pliszka, K. Overview on *Vaccinium* production in Europe. *Acta Hortic*, 1997, 446, 49-52.

Riihinen K, Jaakola L, Kärenlampi S, Hohtola A. Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). *Food Chem*, 2008, 110, 156-160.

Saral Ö, Ölmez Z, Şahin H. Comparison of antioxidant properties of wild blueberries (*Vaccinium arctostaphylos* L. and *Vaccinium myrtillus* L.) with cultivated blueberry varieties (*Vaccinium corymbosum* L.) in Artvin region of Turkey. *Tur J Agricult Food Sci Technol*, 2014, 3, 40.

Shen X, Sun X, Xie Q, Liu H, Zhao Y, Pan Y, Hwang C, Wu V. Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. *Food Control*, 2014, 35, 59-165.

Skibsted L. Anthocyanidins regenerating xanthophylls: a quantum mechanical approach to eye health. *Curr Opin Food Sci*, 2018, 20, 24-29.

Skupień K. Chemical composition of selected cultivars of highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.). *Folia Horti*, 2006, 18, 47-56.

Song G, Hancock J. *Vaccinium*. *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*, 2010, 197-221.

Ştefănescu B, Szabo K, Mocan A, Crişan G. Phenolic compounds from five *Ericaceae* species leaves and their related bioavailability and health benefits. *Molecules*, 2019, 24, 2046.

Ştefănescu (Braic) R, Vari C, Imre S, Huţanu A, Fogarasi E, Todea T, Dogaru M. *Vaccinium* extracts as modulators in experimental type 1 diabetes. *J Med Food*, 2018, 1-7.

Strik, B. Blueberry production and research trends in North America. *Acta Horti*, 2006, 715, 173-184.

Tenuta M, Malfa G, Bonesi M, Acquaviva R, Loizzo M, Dugay A, Bouzidi C, Tomasello B, Tundis R, Deguin B. LC-ESI-QTOF-MS profiling, protective effects on oxidative damage, and inhibitory activity of enzymes linked to type 2 diabetes and nitric oxide production of *Vaccinium corymbosum* L. (*Ericaceae*) extracts. *J Berry Res*, 2020, 10, 603-622.

Torri E, Lemos M, Caliarì V, Kassuya C, Bastos J, Andrade S. Anti-inflammatory and antinociceptive properties of blueberry extract (*Vaccinium corymbosum*). *J Pharm Pharmacol*, 2007, 59, 591–596.

Varo M, Martín-Gómez J, Mérida J, Serratosa M. Bioactive compounds and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) grown in southern Spain. *Eur Food Res Technol*, 2021, 247, 1199-1208.

Vervandier-Fasseur D, Latruffe N. The potential use of resveratrol for cancer prevention. *Molecules*, 2019, 24, 4506.

Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Bival Štefan M, Kindl M. Praktikum iz farmakognozije 1. Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2019, str. 1.

Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas, 2. izd., Berlin-Heidelberg: Springer, 2009, str. 195-197, 362.

Wu S, Xu H, Peng J, Wang C, Jin Y, Liu K, Sun H, Qin J. Potent anti-inflammatory effect of dioscin mediated by suppression of TNF- $\alpha$ -induced VCAM-1, ICAM-1 and EL expression via the NF- $\kappa$ B pathway. *Biochimie*, 2015, 110, 62-72.

Zhao C, Meng X, Li Y, Li S, Liu Q, Tang G, Li H. Fruits for prevention and treatment of cardiovascular diseases. *Nutrients*, 2017, 9, 598.

Zorenc Z, Veberic R, Stampar F, Koron D, Mikulic-Petkovsek M. Changes in berry quality of northern highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during the harvest season. *Turk J Agric*, 2016, 40, 855-864.



## 7. SAŽETAK/SUMMARY

U okviru ovog diplomskog rada provedena su istraživanja fitokemijskog sastava i antioksidacijske učinkovitosti plodova američke borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) Prisutnost fenolnih kiselina, flavonoida i antocijana u plodu je dokazana metodom tankoslojne kromatografije. Spektrofotometrijskim određivanjima ustanovljeno je da etanolno-vodeni ekstrakt ploda sadrži  $0,72 \pm 0,10$  % fenolnih kiselina,  $0,43 \pm 0,02$  % antocijana,  $0,66 \pm 0,03$  % trjeslovina i  $0,11 \pm 0,01$  % flavonoida. S obzirom da su ove polifenolne sastavnice poznate kao prirodni antioksidansi u radu je ispitan antioksidativni potencijal ploda. Utvrđeno je da ekstrakt ploda američke borovnice ima izraženu sposobnost hvatanja DPPH radikala i pokazuje 50 %-tnu učinkovitost pri koncentraciji  $97,41 \mu\text{g/mL}$ , dok je djelovanje na NO radikale slabo izraženo. Dobiveni rezultati doprinose dosadašnjim znanstvenim spoznajama o bioaktivnim sastavnicama i antioksidativnoj aktivnosti ploda američke borovnice uzgojene u Hrvatskoj.

Within the framework of this thesis, it was carried out the study of phytochemical composition and antioxidant activity of the fruits of the american blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). The presence of phenolic acids, flavonoids and anthocyanins in the fruit was confirmed by the thin-layer chromatography. Spectrophotometric determinations showed that the ethanol-water extract of the fruit contains  $0.72 \pm 0.10\%$  phenolic acids,  $0.43 \pm 0.02\%$  anthocyanins,  $0.66 \pm 0.03\%$  tannins and  $0.11 \pm 0.01\%$  flavonoids, respectively. Given that polyphenol compounds are known as natural antioxidants, the antioxidant potential of the fruit was also evaluated. It was found that the american blueberry fruit extract has a pronounced ability to scavenge DPPH radicals and shows 50% efficiency at a concentration of  $97.41 \mu\text{g/mL}$ , while the effect on NO radicals is weak. The obtained results contribute to the current scientific knowledge on the bioactive compounds and antioxidant activity of the american blueberry fruit grown in Croatia.

## 8. PRILOZI

Privole izdavača za objavljivanje slika u diplomskom radu nalaze se na sljedećim poveznicama:

<https://s100.copyright.com/CustomAdmin/PLF.jsp?ref=0a0f66f1-39eb-4571-8c8c-77f8a9f38328>

R. A. Nonenmacher, CC BY-SA 4.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>>, via Wikimedia Commons

Kurt Stüber [1], CC BY-SA 3.0 <<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>>, via Wikimedia Commons

# Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

## Fitokemijski sastav i antioksidacijski potencijal ploda američke borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.)

Domagoj Mihoković

### SAŽETAK

U okviru ovog diplomskog rada provedena su istraživanja fitokemijskog sastava i antioksidacijske učinkovitosti plodova američke borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) Prisutnost fenolnih kiselina, flavonoida i antocijana u plodu je dokazana metodom tankoslojne kromatografije. Spektrofotometrijskim određivanjima ustanovljeno je da etanolno-vodeni ekstrakt ploda sadrži  $0,72 \pm 0,10$  %, fenolnih kiselina,  $0,43 \pm 0,02$  %, antocijana,  $0,66 \pm 0,03$  % trjeslovina i  $0,11 \pm 0,01$  % flavonoida. S obzirom da su ove polifenolne sastavnice poznate kao prirodni antioksidansi u radu je ispitan antioksidativni potencijal ploda. Utvrđeno je da ekstrakt ploda američke borovnice ima izraženu sposobnost hvatanja DPPH radikala i pokazuje 50 %-tnu učinkovitost pri koncentraciji  $97,41 \mu\text{g/mL}$ , dok je djelovanje na NO radikale slabo izraženo. Dobiveni rezultati doprinose dosadašnjim znanstvenim spoznajama o bioaktivnim sastavnicama i antioksidativnoj aktivnosti ploda američke borovnice uzgojene u Hrvatskoj.

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

Rad sadrži: 37 stranica, 6 grafičkih prikaza, 3 tablice i 45 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Vaccinium corymbosum*, plod američke borovnice, antioksidativni potencijal, antocijani, polifenoli

Mentor: **Dr. sc. Biljana Blažeković**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biljana Blažeković**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Hrvoje Rimac**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Marijan Marijan**, poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: 21. srpnja 2022.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### Phytochemical composition and antioxidant potential of the american blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.)

Domagoj Mihoković

#### SUMMARY

Within the framework of this thesis, it was carried out the study of phytochemical composition and antioxidant activity of the fruits of the american blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). The presence of phenolic acids, flavonoids and anthocyanins in the fruit was confirmed by the thin-layer chromatography. Spectrophotometric determinations showed that the ethanol-water extract of the fruit contains  $0.72 \pm 0.10\%$  phenolic acids,  $0.43 \pm 0.02\%$  anthocyanins,  $0.66 \pm 0.03\%$  tannins and  $0.11 \pm 0.01\%$  flavonoids, respectively. Given that polyphenol compounds are known as natural antioxidants, the antioxidant potential of the fruit was also evaluated. It was found that the american blueberry fruit extract has a pronounced ability to scavenge DPPH radicals and shows 50% efficiency at a concentration of  $97.41 \mu\text{g/mL}$ , while the effect on NO radicals is weak. The obtained results contribute to the current scientific knowledge on the bioactive compounds and antioxidant activity of the american blueberry fruit grown in Croatia.

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

Thesis includes: 37 pages, 6 figures, 3 tables and 45 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Vaccinium corymbosum*, american blueberry fruit, antioxidant potential, anthocyanins, polyphenols

Mentor: **Biljana Blažeković, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Biljana Blažeković, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Hrvoje Rimac, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Marijan Marijan, Ph.D.** Postdoctoral, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: 21 July 2022.

