

# Optimizacija izrade i biološki učinci kumestrolom bogatih glicerolnih ekstrakata zeleni hmeljaste vije (Medicago lupulina L.)

---

Poljak, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:359647>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-07**



Repository / Repozitorij:

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



**Valentina Poljak**

**Optimizacija izrade i biološki učinci  
kumestrolom bogatih glicerolnih ekstrakta zeleni  
hmeljaste vije (*Medicago lupulina* L.)**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmakognozija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmakognoziiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Marijane Zovko Končić. Istraživanja provedena u ovom radu sufinancirala je Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2018-01-6504.

*Od srca zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Marijani Zovko Končić na korisnim savjetima, velikoj pomoći, strpljenju i iznimnoj susretljivosti tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Hvala i svim prijateljima i kolegama koji su uljepšali moje studentske dane i ispunili ih vedrinom.*

*Veliku zahvalu dugujem i članovima moje obitelji koji su od početka puni razumijevanja te su me svojom podrškom uvijek gurali naprijed.*

*Zahvaljujem i Matiji na ljubavi, podršci i što je uz mene u svakom trenutku.*

# Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Hmeljasta vija .....	1
1.2. Kumestrol .....	2
1.3. Dizajn eksperimenta.....	3
1.4. Ultrazvučna ekstrakcija .....	4
1.5. Lipoksigenaze .....	5
1.6. Tirozinaza .....	6
1.7. Elastaza .....	7
1.8. Oksidativni stres.....	7
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME .....</b>	<b>9</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>10</b>
3.1. MATERIJALI ZA ISPITIVANJE.....	10
3.1.1. Biljni materijal .....	10
3.1.2. Kemikalije.....	10
3.1.3. Uređaji .....	10
3.2. METODE ISPITIVANJA .....	11
3.2.1. Ultrazvučna ekstrakcija .....	11
3.2.2. Eksperimentalni dizajn.....	11
3.2.3. Određivanje kumestrola .....	12
3.2.4. Određivanje aktivnosti inhibicije lipoksigenaze .....	12
3.2.5. Određivanje aktivnosti inhibicije tirozinaze .....	12
3.2.6. Određivanje aktivnosti inhibicije elastaze .....	13
3.2.7. $\beta$ -karoten linoleatna analiza .....	13
3.2.8. Statistička obrada podataka .....	14
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>15</b>
4.1. ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA .....	15
4.1.1. Procesni parametri.....	15
4.1.2. Koncentracija kumestrola.....	18
4.1.3. Optimizacija ekstrakcije .....	20
4.2. BIOLOŠKI UČINCI .....	20
4.2.1. Inhibicija lipoksigenaze.....	20
4.2.2. Inhibicija tirozinaze.....	22
4.2.3. Inhibicija elastaze.....	23
4.2.4. $\beta$ -karoten linoleatna analiza .....	24
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>27</b>

<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>28</b>
<b>7. SAŽETAK/SUMMARY .....</b>	<b>34</b>
7.1. SAŽETAK .....	34
7.2. SUMMARY.....	35
<b>8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

# 1. UVOD

## 1.1. Hmeljasta vija

Hmeljasta vija (*Medicago lupulina* L., Fabaceae; Slika 1) jednogodišnja je ili višegodišnja zeljasta biljka visine do 60 cm. Listovi su sastavljeni od tri liske koje su na naličju dlakave. Cvjetovi su maleni, žuti, skupljeni po 10-50 u guste okruglaste cvatove. Cvate u svibnju i lipnju. Plod je sitna, slabo dlakava mahuna crne boje koja sadrži jednu izduženo jajastu sjemenku. Raste na poljima od nizinskog do planinskog područja većinom na tlu bogatom dušikom (<https://www.plantea.com.hr/hmeljasta-vija/>).

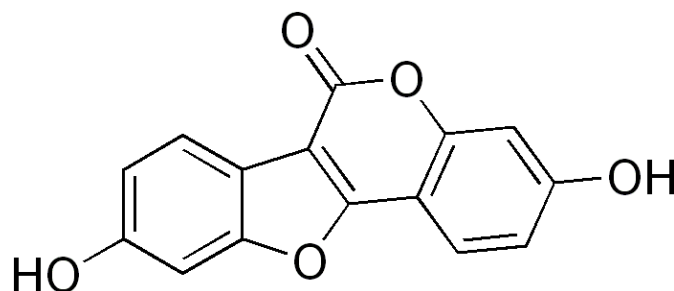


Slika 1. Hmeljasta vija (*Medicago lupulina* L., Fabaceae)  
([https://en.wikipedia.org/wiki/Medicago\\_lupulina](https://en.wikipedia.org/wiki/Medicago_lupulina))

Fitokemijski sastav hmeljaste vije obuhvaća alkaloide, flavonoide, fenolne spojeve, tanine, saponine i diterpene. Od navedenih sastavnica najviše ima flavonoida koji obuhvaćaju flavonole i flavone. Flavonoli u hmeljastoj viji su kemferol, kvercetin i miricetin, a flavoni apigenin i luteolin. Također sadrži i izoflavonoide kumestrol, formononetin i biokanin A kojima se pripisuje fitoestrogeno djelovanje. Hmeljasta vija ima antibakterijsku aktivnost koja se očituje u inhibiciji rasta mnogih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija osim vrste *Escherichia coli*, a pripisuju joj se i antifungalna i antitumorska aktivnost. Hmeljasta vija ima i antioksidativni učinak koji se pripisuje fenolnim sastavnicama (Butkutė i sur., 2017; Kicel i Olszewska, 2015; Baloch i sur., 2013).

## 1.2. Kumestrol

Kumestrol je izoflavonoid široko rasprostranjen u biljkama iz porodice *Leguminosae* kao što su *Glycine max* L., *Trifolium pratense* L., *Medicago sativa* L. i ostale, a prvi je puta izoliran iz bijele djeteline (*Trifolium repens* L.) 1956. godine. Potentan je fitoestrogen iz skupine kumestana koji nastaje iz prekursora daidzeina. Kemijska struktura kumestrola (Slika 2) obuhvaća kondenzirani prstenasti sustav koji se sastoji od kumarina i benzofurana i dvije hidroksilne skupine (Lee i sur., 2019; Montero i sur., 2019; Koirala i sur., 2018).



Slika 2. Kemijska struktura kumestrola  
(<https://en.wikipedia.org/wiki/Coumestrol>)

Hidroksilne skupine na benzenskim prstenovima odgovorne su za hvatanje slobodnih radikala to jest antioksidativnu aktivnost kumestrola. Prstenasti sustav daje kumestrolu visok afinitet za ER $\alpha$ , a posebno za ER $\beta$  receptor što je analogno prirodnim hormonima i njihovim aktivnim metabolitima. Na taj način ispoljava estrogenu odnosno anti-estrogenu aktivnost, ovisno o razini estrogena u organizmu. Estrogeni receptori prisutni su i u koži gdje moduliraju razinu kolagena te je u tom pogledu kumestrol obećavajući agens u zaštiti kože od fotostarenja. Zaštita od fotostarenja očituje se i u smanjenju sinteze melanina posredovanoj ovim izoflavonoidom. Kumestrol također poboljšava elastičnost i debljinu kože u žena u postmenopauzi te sudjeluje u zacjeljivanju rana (Montero i sur., 2019; Bianchi i sur., 2018; Hwand i sur., 2017). Kumestrol ima antivirusnu aktivnost koja se očituje u inhibiciji replikacije *Herpes simplex* virusa tip 1 i 2 (Argenta i sur., 2018). Nadalje, kumestrol zahvaljujući maloj molekulskoj masi lako prolazi kroz stanične membrane te stoga pokazuje neuroprotektivni učinak prevenirajući cerebralnu ishemiju (Castro i sur., 2012). Konzumacija kumestrolom bogatih namirnica dovodi do povoljnih učinaka u menopauzi, osteoporozi, aterosklerozi i kardiovaskularnim bolestima, a također ima i antiadipozni učinak (Koirala i sur., 2018).

### 1.3. Dizajn eksperimenta

Eksperimentalni dizajn najprikladnija je metoda za identifikaciju učinka pojedine varijable, niza varijabli ili interakcija varijabli na promatrani sustav. Pri tome se simultano prate uvjeti za svaku varijablu s ciljem postizanja uvjeta pomoću kojih se ostvaruje produkt ili proces željenih, često optimalnih, karakteristika. Dizajn eksperimenta omogućava dobivanje željenog produkta ili procesa uz što manji broj eksperimenata što podrazumijeva i financijsku uštedu. Ključno je definirati minimalnu i maksimalnu vrijednost svake varijable zbog toga što neodgovarajuće vrijednosti mogu producirati neupotrebljive informacije. Stoga se svaka varijabla smješta u kodiranu ljestvicu koja ima raspon od -1 do +1 (Sertić, 2015; Ebrahimi-Najafabadi i sur., 2014).

Metodologija površine odgovora (eng. *Response surface methodology*, RSM) skup je statističkih i matematičkih tehnika koristan u optimizaciji utjecaja nekoliko faktora (nezavisne varijable) na promatrani odgovor (zavisna varijabla) kroz analizu odgovarajućih jednadžbi. Primjena RSM posebno je korisna kada nekoliko varijabli ima potencijalan utjecaj na određena mjerenja ili kvalitetu procesa. RSM se stoga, kao brza, precizna i osjetljiva metodologija, široko primjenjuje u analizi hrane i optimizaciji uvjeta kromatografije kao i ekstrakcije. RSM se često koristi za optimizaciju izolacije ili ekstrakcije bioaktivnih sastavnica iz biljnog materijala na koju utječu brojni parametri kao što su snaga ultrazvuka, vrijeme ekstrakcije i temperatura. Ovi parametri utječu na ekstrakciju pojedinačno, ali i u interakciji i trebaju se fino podesiti kako bi se dobio maksimalni odgovor uz minimalnu razgradnju. Korištenjem RSM učinkovito se smanjuje broj eksperimentalnih ispitivanja potrebnih za procjenu ovih parametara. Box-Behnken dizajn najbolji je tip RSM zbog visoke učinkovitosti i jednostavnosti rada, a primjenjuje se u optimizaciji tehničkih parametara ekstrakcije (Yin i sur., 2020; Chen i sur., 2018; Sertić, 2015).

RSM se danas primjenjuje u optimizaciji ekstrakcije mnogih biološki aktivnih spojeva iz različitih biljaka. Primjeri uključuju optimizaciju ekstrakcije saponina, polisaharida, antioksidansa, flavonoida i mnogih drugih biološki aktivnih spojeva (Hadidi i sur., 2020; Yin i sur., 2020; Chen i sur., 2018; Zhou i sur., 2018).



## 1.4. Ultrazvučna ekstrakcija

Ekstrakcija je proces izdvajanja neke tvari iz krute ili tekuće smjese korištenjem prikladnog otapala u kojem je ta tvar topljiva ili ima bolju topljivost od ostalih sastojaka smjese. Cilj je svakog ekstrakcijskog postupka dobivanje ekstrakta s najvećom koncentracijom željenih bioaktivnih tvari uz minimalnu kontaminaciju neželjenim tvarima. Ekstrakcijski sustav čvrsto/tekuće često se koristi za ekstrakciju različitih biljnih sastavnica pri čemu otapalo prodire kroz pore krutog materijala te topiva tvar difundira u otapalo. Na učinkovitost ekstrakcije utječu brojni parametri kao što su vrsta biljnog materijala, veličina čestica, otapalo, pH, temperatura, vrijeme i dodatak određenih enzima (Putnik i sur., 2018; Lovrić, 2003).

Ultrazvučna ekstrakcija (eng. *Ultrasound-assisted extraction*, UAE) prepoznata je kao vrlo učinkovita, ekološki prihvatljiva, sigurna i relativno jeftina tehnologija. Najčešće se koristi u ekstrakcijskim sustavima čvrsto/tekuće. UAE se temelji na ultrazvučnoj kavitaciji i popratnim fizičkim i kemijskim učincima. Mehanički učinak ultrazvuka, odnosno djelovanje kavitacija dovodi do stvaranja mikrostrujanja u otapalu. Mikrostrujanje uzrokuje titranje molekula oko njihovog ravnotežnog položaja, a u biljnom materijalu to se djelovanje odražava na staničnu stijenku, to jest dovodi do oštećenja stijenke. Time se poboljšava prijenos bioaktivnih tvari i olakšava pristup otapala staničnom sadržaju tako rezultirajući većom učinkovitošću ekstrakcije (Tao i sur., 2014; Drmić i Režek Jambrak, 2010).

UAE se svrstava u “zelene” koncepte kemije zato što osigurava ekstrakciju uz optimalnu potrošnju energije i otapala, a također omogućuje primjenu alternativnih otapala. Primjena ultrazvuka omogućuje ekstrakciju pri nižim temperaturama i značajno smanjuje vrijeme ekstrakcije. Uvjeti ultrazvučne ekstrakcije mogu značajno utjecati na prinos i sastav pripremljenog ekstrakta, pogotovo ako su ciljni spojevi osjetljivi na oksidaciju i druge vrste degradacije. Temperatura utječe na fizička i kemijska svojstva bioaktivnih sastavnica te se stoga smatra ključnim parametrom u UAE. Generalno, povećanje temperature ekstrakcije povećava prinos ekstrakcije. Snaga ultrazvuka ne samo da povećava prinos ekstrakcije u kraćem vremenskom razdoblju, već može i modificirati sastav konačnih ekstrahiranih sastavnica. No, u rijetkim slučajevima kombinacija ultrazvuka i visoke temperature može rezultirati degradacijom biljnog materijala. Bitan čimbenik u UAE je i izbor otapala kao i interakcija otapala s uzorkom. Izbor otapala temelji se na visokoj molekularnoj interakciji između otapala i uzorka te vrsti i svojstvima komponente koja se želi ekstrahirati. Također,

usitanjavanje i homogeniziranje uzorka utječe na brzinu prijenosa mase. Varijacije spomenutih parametara neizbježno se odražavaju ne samo na sastav, već i na biološku aktivnost biljnog ekstrakta. Stoga uvjeti ekstrakcije moraju biti pažljivo odabrani kako bi se osigurao ekstrakt s željenim značajkama (Chemat i sur., 2017; García Pérez i sur., 2011; Drmić i Režek Jambrak, 2010).

## 1.5. Lipoksigenaze

Lipoksigenaze su sveprisutni enzimi koji sadrže nehemsko željezo, a kataliziraju deoksigenaciju polinezasićenih masnih kiselina. Produkti deoksigenacije su hidroperoksilni derivati uključujući hidroperoksi-eikozatetraenske kiseline (HPETE). Daljnjim metaboličkim reakcijama iz HPETE nastaju hidroeikozatetraenska kiselina, leukotrieni i lipoksini (Miranda-Bautista i sur., 2017). Sve su lipoksigenaze uključene u regulaciju metabolizma arahidonske kiseline koja se ističe kao glavni supstrat ovih enzima. Arahidonska kiselina nalazi se esterificirana u fosfolipidima stanične membrane, a različiti vanjski stimulansi potiču njezino oslobađanje iz membrane posredovano fosfolipazom A2. Oslobođena masna kiselina podliježe metabolizmu ciklooksigenaza i lipoksigenaza (Viita i Ylä-Herttuala, 2020).

Različita tkiva i stanice u organizmu sadrže različite vrste lipoksigenaza, ali je biološki najvažnija 5-lipoksigenaza. 5-lipoksigenaza nalazi se u mijeloidnim stanicama kao što su neutrofili, eozinofili, bazofili, monociti, makrofagi i mastociti. Djelovanje lipoksigenaze bitno je zbog toga što u njenom putu nastaju leukotrieni, jaki biološki agensi. 5-lipoksigenaza iz arahidonske kiseline katalizira stvaranje nestabilnog hidroperoksida, 5-HPETE, koji dehidracijom prelazi u nestabilni 5,6-epoksid poznat kao leukotrien A4 (LTA4). LTA4 je ishodišni spoj u sintezi ostalih leukotriena, ukupno 4 serije (Smith i sur., 1991).

Visoke razine leukotriena povezane su s različitim upalnim bolestima kao što su astma, reumatoidni artritis, alergije, ali i tumori. Također se povezuju s upalnim stanjima kože kao što su psorijaza i atopijski dermatitis. Osim leukotriena, i druge signalne molekule koje nastaju djelovanjem lipoksigenaze imaju ulogu u upali kože i zacjeljivanju rana. Stvaranje leukotriena i drugih medijatora upale može se prevenirati inhibicijom lipoksigenaze, što se smatra obećavajućom terapijskom metom za široki spektar bolesti (Eshwarappa i sur., 2016; Krieg i Fürstenberger, 2014).

## 1.6. Tirozinaza

Tirozinaza, poznata i kao polifenol oksidaza, multifunkcionalni je enzim koji u aktivnom mjestu sadrži bakar. Široko je rasprostranjena te se može naći u gotovo svim oblicima života, od bakterija do sisavaca. Ključni je enzim u melanogenezi uključen u inicijalne korake biosinteze melanina gdje djeluje kao monooksigenaza i difenolaza. U biljkama i gljivama sudjeluje u primarnom imunom odgovoru i zacjeljivanju rana, a odgovorna je i za tamnjenje voća i povrća što rezultira gubitkom hranjive vrijednosti. Tirozinaza katalizira *o*-mono-hidroksilaciju monofenola u njihove pripadajuće *o*-difenole te njihovu naknadnu oksidaciju u reaktivne *o*-kinone. Nakon toga *o*-kinoni sudjeluju u neenzimatskim oksidoredukcijskim reakcijama gdje nastaju inetermedijeri koji spontano polimeriziraju u smeđe pigmente velike molekulske mase, to jest melanin. Tirozinaza se u organizmu razgrađuje na dva načina, preko ubikvitin-proteasom sustava ili endosomskom, odnosno lizosomskom razgradnjom (Agarwal i sur., 2019; Mukherjee i sur., 2018).

Melanin je najbitniji čimbenik koji određuje boju kože i kose. Sintetiziraju ga melanociti u bazalnom sloju epidermisa na poticaj ultraljubičastog zračenja (UV-zračenja) ili upale. Apsorbira UV-zračenje i štiti kožu od mogućeg oštećenja koje ono uzrokuje i od slobodnih radikala koji nastaju uslijed izlaganja UV-zračenju. Regulacija melanogeneze složen je proces kojeg na staničnoj razini regulira stvaranje i razgradnja organela melanosoma, a na substaničnoj razini ekspresija tirozinaze. Izlaganje UV-zračenju i okolišni čimbenici također imaju bitnu ulogu u sintezi melanina. Usprkos blagotvornom učinku melanina na zaštitu kože, prekomjerno stvaranje i akumulacija melanina dovode do raznih poremećaja kože koji su povezani s regulacijom melanogeneze preko hormona, interleukina i prostaglandina. Ti poremećaji uključuju solarni lentigo, lineu nigrum, melazmu i postupalnu hiperpigmentaciju. Sinteza melanina može biti zaustavljena inhibicijom tirozinaze. Arbutin i kojična kiselina već se dugo koriste kao depigmentirajući agensi u kozmetičkim preparatima, no kojična kiselina uzrokuje pretjeranu osjetljivost kože, a arbutin ima potencijalna citotoksična svojstva. Stoga su istraživanja usmjerena na sigurnije i učinkovitije inhibitore tirozinaze iz redova različitih biljnih vrsta. Tako su se *Glycyrrhiza glabra* L., Fabaceae, *G. max* i ekstrakti različitih vrsta duda pokazali korisnima u kliničkim ispitivanjima inhibicije tirozinaze (Mukherjee i sur., 2018; Hwang i sur.; 2017).

## 1.7. Elastaza

Elastaza je proteaza iz kimotripsinske porodice enzima. Povećana aktivnost elastaze okidač je za različite upalne bolesti kao što su reumatoidni artritis, cistična fibroza i kronična opstruktivna plućna bolest. Nadalje, uzrokuje i različite kožne probleme i bolesti koji uključuju psorijazu, odgođeno zacjeljivanje rana i prerano starenje kože s nastankom bora (Azmi i sur., 2014; Jabs, 2012).

Svoju aktivnost vrši u izvanstaničnom matriksu gdje cijepa proteine matriksa među kojima se ističu elastin, kolagen i fibronektin. Pri cijepanju proteina elastaza preferira aminokiselinske ostatke koji sadrže aminokiselinu valin, a takvi su ostatci posebno zastupljeni u vlaknima elastina i kolagena. Najvažnija uloga elastaze je da, uz metaloproteinaze matriksa, vrši zacjeljivanje rana nakon ozljede. Ti enzimi odlažu strane proteine u izvanstanični matriks tijekom neutrofilne fagocitoze i omogućuju oporavak tkiva. No, kroničnim izlaganjem UV-zračenju dolazi do značajnog povećanja aktivnosti elastaze uslijed denaturacije kolagena i elastina. Elastičnost kože je također bitno umanjena što rezultira pojavom bora i fotostarenjem kože. Uz to, elastaza se ističe kao jedan od glavnih faktora u kontroli upalnih procesa. Stoga se inhibicija elastaze smatra potencijalnom zaštitom od fotostarenja i strukturnih oštećenja ekstracelularnog matriksa, što potvrđuju i klinička istraživanja. U tu je svrhu istražen potencijal biljnih vrsta *Malaxis acuminata* D., Orchidaceae, *G. glabra* i mnogih drugih, a otkrivaju se i novi potencijalni inhibitori (Ciganović i sur., 2019; Biswajit i sur., 2017; Azmi i sur., 2014; Jabs, 2012).

## 1.8. Oksidativni stres

Oksidativni stres definira se kao poremećaj ravnoteže između stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *Reactive oxygen species*, ROS) i djelovanja endogenog antioksidativnog sustava. Najzastupljeniji ROS jesu superoksidni anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksilni radikal ( $HO^{\cdot}$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i jednostavni singletni kisik ( $^1O_2$ ). Nastaju u mnogim enzimskim i neenzimskim biokemijskim reakcijama kao nezaobilazni nusprodukt. Tako mogu nastati tijekom intenzivnog vježbanja, mentalnog stresa i raznih infekcija, ali i na poticaj egzogenih faktora kao što su pušenje, različiti zagađivači okoliša i kemijska otapala. ROS su, kada im je koncentracija niska ili umjerena, ključni za zdravlje organizma. Neophodni su u proteinskoj fosforilaciji, aktivaciji nekih transkripcijskih faktora, apoptozi, imunom odgovoru i diferencijaciji. No, ukoliko se poveća stvaranje ROS, tada počinju ispoljavati štetne učinke

koji se očituju na bitnim staničnim strukturama kao što su proteini, lipidi i nukleinske kiseline. Proteini podliježu oštećenjima uzrokovanim oksidativnim stresom tako da dolazi do konformacijskih promjena koje mogu biti uzrokom oštećenja njihove enzimske aktivnosti. Oštećenje lipida ostvaruje se lipidnom peroksidacijom i posljedičnim oštećenjem staničnih membrana i lipoproteina, dok oštećenje DNA dovodi do mutageneze. Dakle, ukoliko oksidativni stres nije kontroliran, može rezultirati različitim bolestima, kroničnima i degenerativnima (npr. karcinom, kardiovaskularne bolesti, multipla skleroza), kao i ubrzanim starenjem i akutnim patološkim stanjima (npr. srčani udar) (Pizzino i sur., 2017; Betteridge, 2000).

Antioksidansi se definiraju kao tvari koje odgađaju, sprječavaju ili uklanjaju oksidacijsko oštećenje ciljanih molekula. Dije se na endogene, koji su proizvedeni u tijelu i egzogene, koji se unose u organizam hranom. Endogeni antioksidansi obuhvaćaju enzime kao što su superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza, izvanstanične proteine (albumin i transferin) i neke stanične komponente (glutacion i bilirubin). Oni djeluju sinergistički s različitim egzogenim antioksidansima kao što su vitamini A, C i E,  $\beta$ -karoten i koenzim Q 10. Od antioksidansa prisutnih u biljkama posljednjih desetljeća posebnu pažnju privlače flavonoidi i fenolne kiseline. Od flavonoida se najviše ističe kvercetin koji prevenira oksidativni stres i smrt stanica, a od fenolnih kiselina galna kiselina koja kelira ROS. Važnost prirodnih antioksidansa u hrani i ljekovitom bilju danas je prepoznata, što se osobito odnosi na njihovu ulogu u prevenciji bolesti poput raka i kardiovaskularnih bolesti (Sotler i sur., 2019; Petruk i sur., 2018).

Medicago vrste pokazuju dobru antioksidativnu aktivnost. Najviše istraživanja provedeno je na biljnoj vrsti *M. sativa* čiji je fitokemijski sastav dobro poznat. Rezultati sugeriraju da su etanolni ekstrakti cvjetova i lišća *M. sativa* potencijalni jaki prirodni antioksidansi. Za biljnu vrstu *M. lupulina* dokazano je da antioksidativna aktivnost ovisi o primjenjenom ekstrakcijskom otapalu i snažno ovisi o sadržaju flavonoida (Krakowska i sur., 2017; Kicel i Olszewska, 2015).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Biljni se ekstrakti sve češće koriste u izradi dermatoloških pripravaka s različitim biološkim učincima u stanicama kože i ekstracelularnom matriksu. Pri izradi takvih pripravaka, osim prirodnog podrijetla sastavnica, bitno je i prirodno podrijetlo pomoćnih tvari. Kao otapalo u ekstrakcijskim postupcima najčešće se koristi etanol. Iako učinkovito otapa mnogo aktivnih biljnih sastavnica, relativno je toksičan te je njegova primjena neprikladna za primjenu kod djece ili određenih religijskih skupina. Za razliku od etanola, glicerol je netoksično i biorazgradivo otapalo, koje i samo može pridonijeti hidratacijskom učinku ovakvih pripravaka. Stoga je u ovom radu, za ultrazvučnu ekstrakciju kumestrola iz zeleni hmeljaste vije, korišten glicerol. Cilj je rada istražiti utjecaj ekstrakcijskih uvjeta: temperature, masenog udjela glicerola i trajanja ekstrakcije na sadržaj kumestrola te, korištenjem RSM, odrediti uvjete koji će rezultirati najvećom koncentracijom kumestrola u ekstraktu. Također su, u vidu potencijalne primjene ekstrakta zeleni hmeljaste vije u dermatološkim pripravcima, ispitani biološki učinci istog. Tako su ispitane aktivnosti inhibicije lipoksigenaze, tirozinaze, elastaze i antioksidativna aktivnost ekstrakta dobivenog optimizacijom ekstrakcijskih uvjeta na sadržaj kumestrola.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI ZA ISPITIVANJE

##### 3.1.1. Biljni materijal

Ispitivana je osušena i usitnjena zelen biljne vrste *Medicago lupulina* L., Fabaceae ubrana na livadnim područjima grada Zagreba.

##### 3.1.2. Kemikalije

Glicerol (Kemig, Hrvatska), standard kumestrola, fosfatni pufer, nordihidrogvajaretska kiselina (NDGA), lipoksigenaza (Sigma-Aldrich; St.Louis, MO, USA), natrijev linoleat, kojična kiselina (Sigma-Aldrich; St.Louis, MO, USA), tirozinaza (Sigma-Aldrich; St.Louis, MO, USA), L-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) (Cayman Chemical Company, USA), metanol HPLC čistoće, Tris-HCl pufer, ursolna kiselina, N-sukcinil-(Ala)<sub>3</sub>-nitroanilid (SANA), elastaza, Tween 40, kloroform, metanol, butil-hidroksianisol (BHA > 98.5%)

##### 3.1.3. Uređaji

U ispitivanjima su korišteni sljedeći uređaji: mlin za usitnjavanje biljnog materijala, precizna vaga (Mettler Toledo, Švicarska), ultrazvučna kupelj (Sonorex digital, Bandelin electronic, Njemačka), HPLC uređaj (Agilent 1200 serija, Agilent Technologies, USA opremljen s diode array detektorom (DAD) i Zorbax Eclipse XDB C18 kolonom (5 μm, 250 mm × 4,6 mm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), rotavapor (Büchi, Njemačka) i UV/Vis spektrofotometar (BMG Labtech, Njemačka).

## 3.2. METODE ISPITIVANJA

### 3.2.1. Ultrazvučna ekstrakcija

U Erlenmeyerovoj tikvici od 50 ml suspendirano je 0,1 g usitnjenog biljnog materijala u 10 g odgovarajućeg otapala. Ekstrakcije su provedene u ultrazvučnoj kupelji pri 50 % snage ultrazvuka, prikladnoj temperaturi i odgovarajućem vremenu (Tablica 1). Ekstrakcijski uvjeti bili su odabrani u skladu s Box-Behnken dizajnom.

Tablica 1. Neovisne varijable i njihove vrijednosti u Box-Behnken-ovom dizajnu.

Neovisne varijable	Kod	Razine		
		-1	0	1
Maseni udio glicerola (%, m/m)	X <sub>1</sub>	10	50	90
Temperatura (°C)	X <sub>2</sub>	20	50	80
Trajanje ekstrakcije (min)	X <sub>3</sub>	20	40	60

### 3.2.2. Eksperimentalni dizajn

Za regresijsku analizu i optimizaciju korišten je program Design Expert 8.0.6. (Stat-Ease, Minneapolis USA). Za određivanje najbolje kombinacije nezavisnih ekstrakcijskih varijabli za odabranu zavisnu varijablu, upotrijebljen je Box-Behnken dizajn (BBD). Tri nezavisne varijable odabrane za optimizaciju bile su maseni udio glicerola u vodi (X<sub>1</sub>, % m/m), temperatura ekstrakcije (X<sub>2</sub>, °C) i vrijeme ekstrakcije (X<sub>3</sub>, min) prikazane u Tablici 1. Koncentracija kumestrola (Y<sub>1</sub>) odabrana je kao odgovor odnosno zavisna varijabla (Tablica 2). Eksperimentalni podaci ukopljeni su u kvadratni polinomni model prema kvadratnoj jednadžbi:

$$Y=A_0+\sum_{i=1}^k A_i X_i + \sum_{i=1}^k A_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \times \sum_{j=i+1}^k A_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

gdje je Y zavisna varijabla; A<sub>0</sub>, A<sub>i</sub>, A<sub>ii</sub> i A<sub>ij</sub> su regresijski koeficijenti za odsječak, linearni, kvadratni faktor te interakciju; X<sub>i</sub> i X<sub>j</sub> su nezavisne varijable (Dulić i sur, 2019).



### 3.2.3. Određivanje kumestrola

Kumestrol je kvantificiran korištenjem HPLC uređaja. Dobiveni ekstrakti najprije su filtrirani kroz filter papir, a potom kroz PFTE filter veličine pora 45 µm. Standard kumestrola filtriran je kroz PFTE filter veličine pora 45 µm. Volumen injiciranja iznosio je 100 µL. Smjesa vode, metanola i mravlje kiseline u omjeru 93 : 5 : 2 (V/V/V) i 3 : 95 : 2 (V/V/V) korišteni su kao pokretna faza A, odnosno B. Razdvajanje je provedeno pri 40 °C prema sljedećem protokolu: 0 minuta 20 % B, 10 minuta 40 % B i 35 minuta 50 % B. Protok je bio 1,2 mL/min. Pikovi su bili promatrani i kvantificirani na 343 nm. Identifikacija se temeljila na usporedbi vremena zadržavanja i spektra pika u kromatogramu uzorka i kromatogramu standarda. Napravljena je kalibracijska krivulja koja se sastojala od površine ispod krivulje (AUC) pika kumestrola (y, arbitrarne jedinice) u odnosu na težinu berberina u uzorku (x, µg). Granica detekcije (LOD) iznosila je 0,0038 µg, granica kvantifikacije (LOQ) 0,0115 µg, a kalibracijska krivulja bila je  $y = 2398,6087x$  ( $r^2 = 0,9999$ ).

### 3.2.4. Određivanje aktivnosti inhibicije lipoksigenaze

Aktivnost inhibicije lipoksigenaze određena je spektrofotometrijski. U jažicu je dodano 200 µL otopine ekstrakta ili NDGA (1 mg/mL, pozitivna kontrola) u fosfatnom puferu (pH 8, 100 mM). U jažice s ekstraktom i pozitivnom kontrolom dodano je 30 µL otopine lipoksigenaze u puferu (0,03 mg/mL) te je reakcija inicirana dodatkom 60 µL otopine natrijevog linoleata. Kao negativna kontrola korištena je smjesa koja je umjesto ekstrakta sadržavala pufer. Konačni volumen svake jažice iznosio je 290 µL. Nakon 10 min pri 25 °C izmjerena je apsorbancija na 234 nm. Aktivnost inhibicije lipoksigenaze izračunata je prema jednadžbi:

$$\text{Aktivnost inhibicije lipoksigenaze (\%)} = (A_N - A_U) / A_N \times 100 \quad (2)$$

gdje je  $A_N$  apsorbancija negativne kontrole, a  $A_U$  apsorbancija otopine ekstrakta. Rezultati su izraženi kao  $IC_{50}$ , odnosno koncentracija koja pokazuje sposobnost inhibicije lipoksigenaze = 50%.

### 3.2.5. Određivanje aktivnosti inhibicije tirozinaze

Aktivnost inhibicije tirozinaze određena je spektrofotometrijski koristeći mikrotitarsku ploču. U jažicu je dodano 120 µL otopine ekstrakta ili kojične kiseline (1 mg/mL, pozitivna kontrola) u fosfatnom puferu (pH 6,8; 16 mM). Dodano je 40 µL otopine tirozinaze u puferu (53,74 U/mL) i inkubirano je na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi.

Nakon 10 min dodano je 40  $\mu\text{L}$  otopine L-DOPA. Kao negativna kontrola korištena je smjesa koja je umjesto ekstrakta sadržavala pufer. Konačni volumen svake jažice iznosio je 200  $\mu\text{L}$ . Nakon 17 min pri sobnoj temperaturi izmjerena je apsorbancija na 492 nm. Aktivnost inhibicije tirozinaze izračunata je prema jednadžbi:

$$\text{Aktivnost inhibicije tirozinaze (\%)} = (A_N - A_U) / A_N \times 100 \quad (3)$$

gdje je  $A_N$  apsorbancija negativne kontrole, a  $A_U$  apsorbancija otopine ekstrakta. Rezultati su izraženi kao  $\text{IC}_{50}$ , odnosno koncentracija koja inhibira 50% aktivnosti tirozinaze.

### 3.2.6. Određivanje aktivnosti inhibicije elastaze

Aktivnost inhibicije elastaze određena je spektrofotometrijski koristeći mikrotitarsku ploču. U 100  $\mu\text{L}$  otopine ekstrakta ili ursolne kiseline (0,6 mg/mL, pozitivna kontrola) u Tris-HCl puferu (pH 8; 0,1 M). Dodano je 100  $\mu\text{L}$  otopine SANA (0,28 mg/mL). Nakon 10 min pri sobnoj temperaturi dodano je 25  $\mu\text{L}$  otopine elastaze u puferu (0,01 mg/mL). Smjesa je inkubirana još 10 min pri sobnoj temperaturi te je izmjerena apsorbancija na 410 nm. Aktivnost inhibicije elastaze izračunata je prema jednadžbi:

$$\text{Aktivnost inhibicije elastaze (\%)} = (A_N - A_U) / A_N \times 100 \quad (4)$$

gdje je  $A_N$  apsorbancija negativne kontrole, a  $A_U$  apsorbancija otopine ekstrakta. Rezultati su izraženi kao  $\text{IC}_{50}$ , odnosno koncentracija koja inhibira 50% aktivnosti elastaze.

### 3.2.7. $\beta$ -karoten linoleatna analiza

Antioksidativna aktivnost određena je spektrofotometrijski koristeći mikrotitarsku ploču. Emulzija je pipremljena u tikvici s okruglim dnom gdje su otopljeni  $\beta$ -karoten i Tween 40 u kloroformu. Otapalo je uklonjeno pomoću rotavapora u hladnoj kupelji te je dodana linoleinska kiselina i aerirana destilirana voda u manjim obrocima uz snažno miješanje. U sve je jažice dodano 50  $\mu\text{L}$  metanola. Potom je u jažicu dodano 50  $\mu\text{L}$  ekstrakta odnosno 10  $\mu\text{L}$  BHA (20 mg/mL) koja je služila kao pozitivna kontrola i 40  $\mu\text{L}$  metanola. Kao negativna kontrola korišteno je samo inicijalnih 50  $\mu\text{L}$  metanola. Neposredno prije mjerenja dodano je 200  $\mu\text{L}$  prethodno priređene emulzije te je odmah izmjerena apsorbancija na 415 nm ( $t = 0$ ). Smjesa je inkubirana na 45  $^{\circ}\text{C}$ , a apsorbancija je mjerena nakon 119 minuta ( $t = 119$ ). Antioksidativna aktivnost izračunata je pomoću jednadžbe:

$$AA(\%) = \left( 1 - \frac{(A_{poč} - A_{kon})_{uzorak}}{(A_{poč} - A_{kon})_{negativna kontrola}} \right) * 100 \quad (5)$$

gdje je Apoč aporbancija u  $t = 0$ , a Akon aporbancija u  $t = 119$ . Rezultati su izraženi kao  $IC_{50}$ , odnosno koncentracija koja ima 50% antioksidativne aktivnosti.

### 3.2.8. Statistička obrada podataka

Sva ispitivanja provedena su u triplikatu. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD) (Microsoft Excel, Microsoft, Redmond, USA). Za usporedbu je korištena ANOVA s post-hoc Tukey testom (Prism, GraphPad San Diego, USA). Vrijednosti  $p < 0,05$  smatrane su statistički značajnima.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA

#### 4.1.1. Procesni parametri

Kako bi se kumestrol učinkovito ekstrahirao iz zeleni hmeljaste vije, u ovom radu korištena je ultrazvučna ekstrakcija. Budući da različiti parametri potencijalno utječu na proces ultrazvučne ekstrakcije, optimizacija eksperimentalnih parametara predstavlja ključni korak u razvoju metode. Eksperiment je izveden prema Box-Behnkenovom dizajnu koji se temelji na RSM, efikasnom matematičkom i statističkom alatu za optimizaciju ekstrakcija u kojima mnogo čimbenika i interakcija utječu na sam proces (Polat i sur., 2020). Tri nezavisne varijable odabrane za optimizaciju bile su maseni udio glicerola u vodi ( $X_1$ , % m/m), temperatura ekstrakcije ( $X_2$ , °C) i trajanje ekstrakcije ( $X_3$ , minute). Te su varijable bile zadane u relativno širokom rasponu uvjeta kako bi se dobio bolji pregled topljivosti kumestrola (Tablica 1).

Imajući u vidu da je rad bio usmjeren dobivanju neškodljivog ekstrakta pogodnog za dermalnu primjenu, kao ekstrakcijsko otapalo korištena je smjesa glicerola i vode u različitim volumnim udjelima. Glicerol se već dugo koristi u topikalnim pripravcima zbog svojstva hidratacije te se nalazi na listi GRAS (Generally Recognized as Safe) supstancija što potvrđuje njegovu sigurnost primjene (Fluhr i sur., 2008). On je netoksično i biorazgradivo otapalo, koje se može dobiti iz obnovljivih izvora te zbog toga ima potencijal kao “zeleno otapalo” za primjenu u industriji. Nadalje, glicerol je kompatibilan s većinom organskih i anorganskih spojeva te dobro otapa različite soli, kiseline, baze, različite kompleksne spojeve kao i organske supstancije (Wolfson i sur., 2007). Iako je glicerol viskozno otapalo, pokazao se kao dobar izbor za ultrazvučnu ekstrakciju zato što je u tekućoj fazi u rasponu temperatura od 17,8 do 290 °C. To je jedno od njegovih najboljih svojstava jer je u radu korišten širok raspon temperatura (Moran i sur., 2020). Povećanje temperature će u pravilu povećati učinkovitost ekstrakcije, no treba uzeti u obzir i moguće negativne posljedice povećanja temperature kao što su degradacija biljnog materijala te promjena viskoznosti otapala. Snaga ultrazvuka obično ne utječe na stabilnost sastavnica biljke, no u rijetkim slučajevima u kombinaciji s visokom temperaturom može dovesti do degradacije biljnog materijala (Chemat i sur., 2017). Uzevši u obzir sve uvjete koji utječu na učinkovitost ultrazvučne ekstrakcije, potrebno je odrediti najpovoljniju kombinaciju ekstrakcijskih uvjeta kako bi se dobila maksimalna koncentracija kumestrola kao odabran odgovor, a bez negativnih utjecaja

na otapalo ili biljni materijal. U Tablici 2 prikazane su zavisne eksperimentalne varijable 17 ekstrakata priredjenih prema Box-Behnken modelu te koncentracije kumestrola kao odgovor odnosno zavisna varijabla.

Tablica 2. Box-Behnken dizajn i rezultati pokusa.

Run	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Kumestrol (µg/mL)
1	90	80	40	0,723336
2	50	20	60	0,092971
3	50	80	60	0,373133
4	50	80	20	0,432751
5	10	20	40	0
6	10	50	60	0
7	50	50	40	0,167597
8	90	50	60	0,336862
9	50	50	40	0,130075
10	10	50	20	0
11	50	50	40	0,182189
12	50	20	20	0
13	90	20	40	0
14	10	80	40	0
15	50	50	40	0,134661
16	90	50	20	0,217209
17	50	50	40	0,152172

X<sub>1</sub> = maseni udio glicerola (% m/m), X<sub>2</sub> = temperatura (°C), X<sub>3</sub> = vrijeme (minute)

Kako bi se analizirao utjecaj nezavisnih varijabli na koncentraciju kumestrola korištena je višestruka regresijska analiza i analiza varijance (ANOVA) te je utvrđeno da se odnos između varijabli najbolje može izraziti kvadratnim polinomnim jednadžbama. *F-omjer* i *p-vrijednost* izračunate su da se utvrdi značaj svake varijable. Veći *F-omjer* uz nižu *p-vrijednost* dovodi do značajnijeg slaganja između različitih varijabli. Za naš model *F-omjer* iznosio je 75,041, uz  $p < 0,01$  što znači da je model značajan i da se može učinkovito koristiti za optimizaciju ekstrakcijskih varijabli. Prikladnost modela izračunata je pomoću koeficijenta determinacije ( $R^2$ ) i procijenjenog koeficijenta determinacije (Adjusted  $R^2$ ). Vrlo visoka vrijednost koeficijenta determinacije ( $R^2 = 0,9897$ ) modela pokazuje da 98,97% varijacije u koncentraciji kumestrola može biti objašnjeno generiranim modelom. Nadalje, vrijednost prikladnosti podudaranja („*lack of fit*“), koja određuje prikladnost odabranog modela u opisivanju varijacija u eksperimentalnim podacima za odabran model, u kombinaciji je s niskim *F-omjerom* = 3,131 i  $p = 0,1495$  koja nije značajna ( $p > 0,01$ ). Te vrijednosti govore nam da vrijednost prikladnosti podudaranja nije statistički značajna u odnosu na čistu pogrešku iz čega proizlazi da je model pogodan za opisivanje eksperimentalnih podataka (Hadidi i sur., 2020; Jibril i sur., 2019). Te su vrijednosti za odabrani model prikazane u Tablici 3.

Tablica 3. Analiza varijance (ANOVA) za kvadratni model optimizacije ekstrakcijskih parametara.

Kumestrol ( $\mu\text{g/mL}$ ), $R^2 = 0,9897$					
Izvor	SS	df	MS	<i>F-omjer</i>	<i>p-vrijednost</i>
Model	0,6226	9	0,0691	75,041	< 0,0001
Prikladnost podudaranja	0,0045	3	0,0015	3,131	0,1495
Čista pogreška	0,0019	4	0,0005		

SS = zbroj kvadrata; df = stupnjevi slobode; MS = aritmetična sredina kvadrata

U svrhu što bolje vizualizacije utjecaja nezavisnih varijabli na koncentraciju kumestrola rezultati su predstavljeni grafičkim prikazom površine odgovora. On podrazumijeva da se dvije varijable prikazane na x i z osima prikažu u istraživačkom eksperimentalnom rasponu, dok se treća varijabla drži fiksnom. Na taj način omogućuje se jednostavna vizualizacija utjecaja i interakcije parametara u dizajnu na odabrani odgovor. Slika 3 prikazuje površine odgovora koje pokazuju utjecaj ispitivanih ekstrakcijskih parametara na koncentraciju kumestrola. Osim grafički, rezultati su prikazani i kao

polinomna jednadžba koja pruža najtočniji opis odnosa između zavisnih i nezavisnih varijabli.

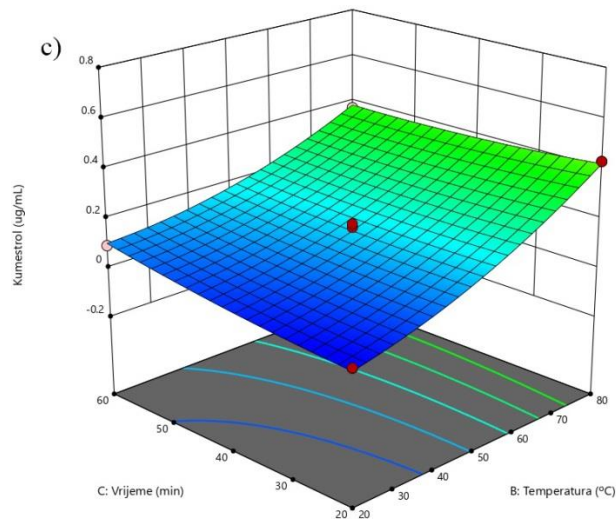
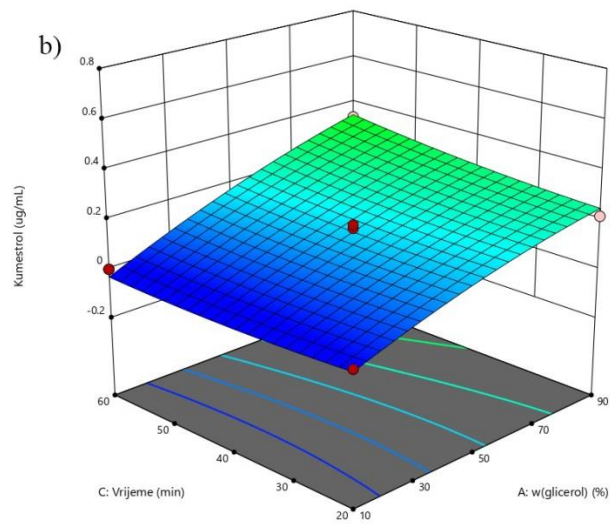
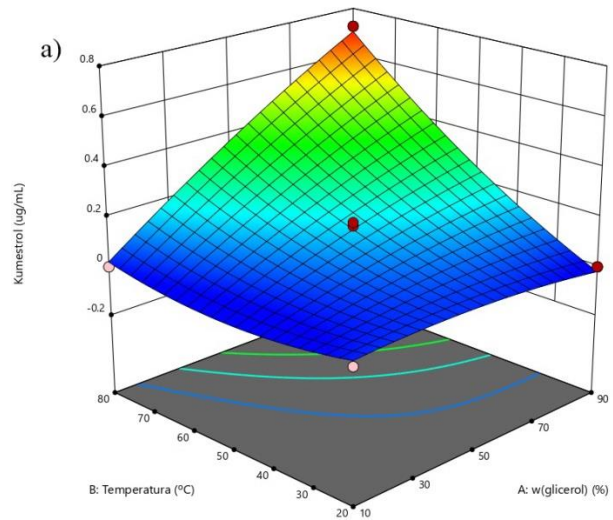
#### 4.1.2. Koncentracija kumestrola

Za određivanje koncentracije kumestrola u ovom radu korišten je HPLC. Pomoću kalibracijske krivulje koja se sastojala od površine ispod krivulje (AUC) pika kumestrola ( $y$ , arbitrarne jedinice) u odnosu na težinu kumestrola u uzorku ( $x$ ,  $\mu\text{g}$ ), određena je najprije masa kumestrola u uzorku ( $\mu\text{g}$ ), a potom i njegova koncentracija ( $\mu\text{g/mL}$ ) prikazana u Tablici 2. Količina kumestrola varirala je od 0,09297  $\mu\text{g/mL}$  (Run 2) do 0,72333  $\mu\text{g/mL}$  (Run 1). Odnos između koncentracije kumestrola i kodiranih nezavisnih varijabli prikazan je u jednadžbi (jednadžba 6) u nastavku (značajni faktori označeni su zvjezdicom):

$$\begin{aligned} \text{Kumestrol } (\mu\text{g/mL}) = & - \\ & 0,02935 \times X_1^2 + 0,056845 \times X_2^2 (*) + 0,14529 \times X_3^2 + 0,180834 \times X_1 \times X_2 (*) + 0,029913 \times X_1 \times X_3 - \\ & 0,03815 \times X_2 \times X_3 (*) + 0,159676 \times X_1 (*) + 0,179531 \times X_2 (*) + 0,019126 \times X_3 + 0,153339 \end{aligned} \quad (6)$$

U uzorcima Run 5, Run 6, Run 10 i Run 14 kumestrol se nije ekstrahirao. Kumestrol je lipofilna molekula slabo topljiva u vodi, a dobro topljiva u nepolarnim otapalima (Goyal i sur., 2017). Kako su otapala u navedenim uzorcima sadržavala samo 10% glicerola (m/m), to može biti razlog zašto se kumestrol uopće nije ekstrahirao. Također, kumestrol se nije ekstrahirao ni u uzorcima Run 12 i Run 13. U ovom slučaju to se može objasniti ekstrakcijom pri samo 20 °C i kraćem vremenu ekstrakcije od 20, odnosno 40 minuta zato što vrijedi pravilo da je ekstrakcija učinkovitija pri višoj temperaturi (Chemat i sur., 2017).

Rezultati su pokazali da je sadržaj kumestrola statistički značajno ovisio o masenom udjelu glicerola i temperaturi ekstrakcije ( $p < 0,05$ ) u vidu linearnog faktora, s time da je o temperaturi ovisio i u vidu kvadratnog faktora. Tu ovisnost grafički prikazuje Slika 3 gdje je vidljivo da s porastom temperature i masenog udjela glicerola u vodi raste i koncentracija kumestrola. Takvi rezultati su očekivani pošto s povećanjem temperature raste i učinkovitost ekstrakcije. Štoviše, kumestrol je nepolarna molekula dobro topljiva u glicerolu što pridonosi povećanju učinkovitosti ekstrakcije. Također, temperatura ekstrakcije je u interakciji s trajanjem ekstrakcije ( $p > 0,05$ ) povoljno utjecala na koncentraciju kumestrola. Pogodan utjecaj trajanja ekstrakcije može se objasniti porastom učinka kavitacije pri duljoj ekstrakciji (Jibril i sur., 2019).



Slika 3. Površine odgovora za prinos kumestrola (a-c) prilikom ekstrakcije zeleni *M. lupulina* a) utjecaj temperature i udjela glicerola uz vrijeme ekstrakcije od 40 minuta; b) utjecaj vremena ekstrakcije i udjela glicerola pri temperaturi od 50 °C; c) utjecaj vremena ekstrakcije i temperature uz udio glicerola od 50 %. \*jedinice kao u Tablici 1.



### 4.1.3. Optimizacija ekstrakcije

Budući da mnogi eksperimentalni parametri utječu na proces ultrazvučne ekstrakcije, svrha ovog rada bila je odrediti koji su to parametri te ih optimizirati u svrhu dobivanja maksimalne koncentracije kumestrola kao odgovor. Na temelju eksperimentalnih rezultata i višestruke regresijske analize kao i analize varijance (ANOVA), provedene su numeričke optimizacije kako bi se ustanovile optimalne razine nezavisnih varijabli. Optimalni uvjeti nezavisnih varijabli ekstrakcije i predviđena vrijednost odgovora dobiveni su funkcijom poželjnosti ( $D$ ), koja je za koncentraciju kumestrola iznosila 1. Rješavanjem kvadratne jednadžbe i metodologijom površine odgovora utvrđeno je da su najbolji ekstrakcijski uvjeti ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ) za ekstrakciju kumestrola iz zeleni hmeljaste vije bili pri temperaturi od 80 °C, masenom udjelu glicerola od 90 % i pri trajanju ekstrakcije od 60 minuta. Predviđeni rezultati relativno su se dobro podudarali s eksperimentalnim, s odstupanjem od 9,1%. Time je potvrđena prikladnost odabranog modela (Tablica 4).

Tablica 4. Predviđene i izmjerene vrijednosti optimalnog iznosa koncentracije kumestrola

Optimizirani odgovor	Cilj optimizacije	$X_1$	$X_2$	$X_3$	Predviđeno	Određeno	Odstupanje
Kumestrol ( $\mu\text{g/mL}$ )	Maksimizirati	90	80	60	0,8233	0,9084	9,1

$X_1$  = udio glicerola (% m/m),  $X_2$  = temperatura (°C),  $X_3$  = vrijeme (minute)

## 4.2. BIOLOŠKI UČINCI

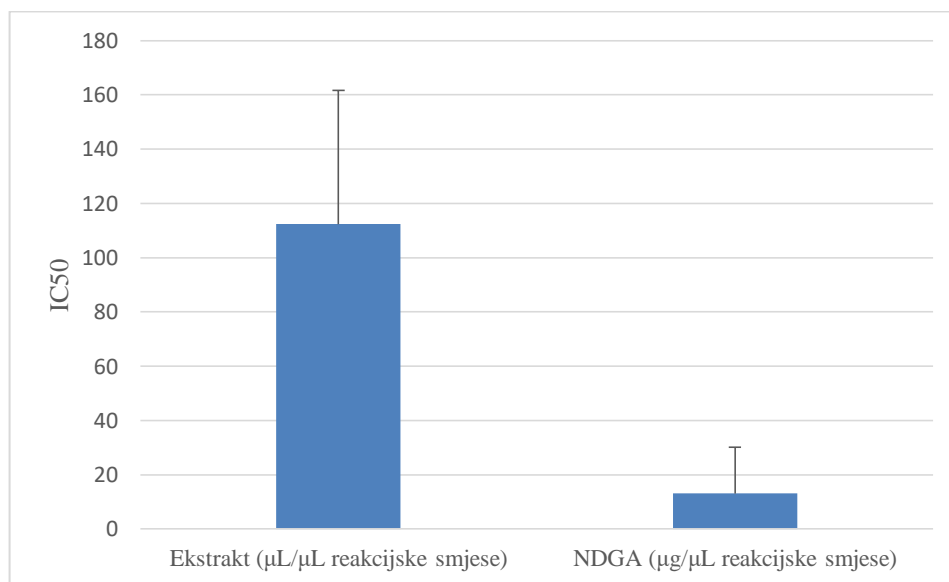
### 4.2.1. Inhibicija lipoksigenaze

Lipoksigenaze su bitni čimbenici u upalnim stanjima kože te posrednici u mnogim upalama izazvanima okolišnim čimbenicima kao što su UV-zračenje i alergeni. Mnogi kemijski agensi i biljni ekstrakti pokazuju sposobnost inhibicije lipoksigenaza i na taj način ispoljavaju svoj protuupalni učinak. Stoga je ispitana aktivnost inhibicije ovog enzima posredovana ekstraktom zeleni *M. lupulina* (Orafaie i sur., 2020; Dulić i sur., 2019).

Metoda ispitivanja aktivnosti inhibicije lipoksigenaze temelji se na reakciji u kojoj je kao supstrat korišten natrijev linoleat. Enzim lipoksigenaza katalizira reakciju peroksidacije natrijevog linoleata u hidroperoksid. Inkubacijom otopine ekstrakta s otopinom enzima na

sobnoj temperaturi dolazi do inhibicije enzima te se posljedično apsorbanacija smanjuje (Xanthopoulou i sur., 2009).

Rezultati ispitivanja prikazani su kao  $IC_{50}$ , odnosno vrijednost koja označava količinu ekstrakta koja inhibira 50% enzima prisutnog u otopini (Slika 4). Dakle, što je  $IC_{50}$  vrijednost manja, to je veća sposobnost inhibicije. Uzorci su uspoređeni s NDGA, poznatim jakim inhibitorom lipoksigenaze.



Slika 4. Sposobnost inhibicije lipoksigenaze (srednja vrijednost tri mjerenja  $\pm$  SD)

\*mjerne jedinice navedene su u zagradi uz naziv uzorka/pozitivne kontrole

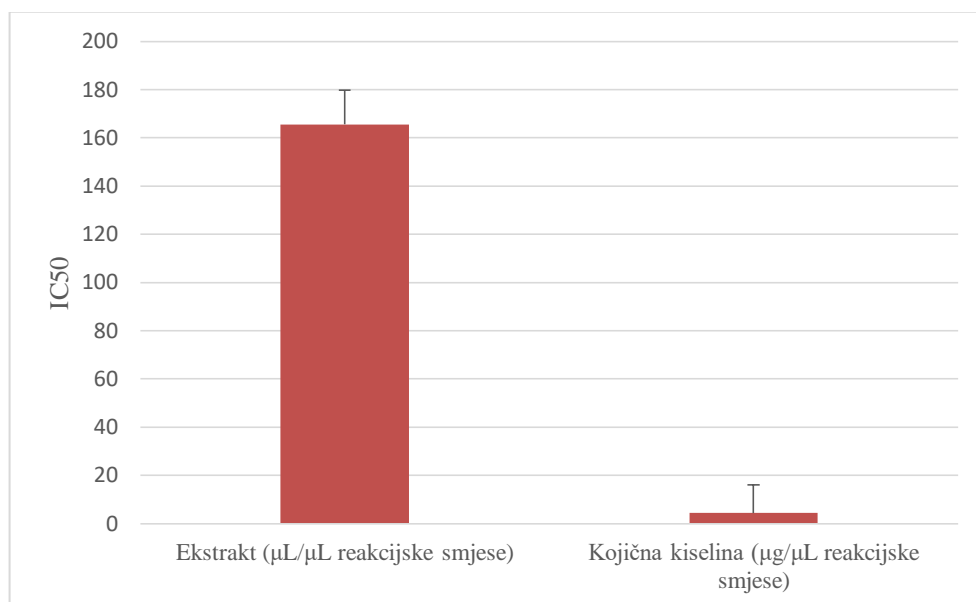
Sposobnost inhibicije lipoksigenaze ekstrakta izražena kao  $IC_{50}$  iznosila je 112,38  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , a NDGA 13,106  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Iako je ekstrakt pokazao određenu sposobnost inhibicije lipoksigenaze, ona je u usporedbi s NDGA gotovo 10 puta manja, no ipak je određeni učinak dokazan. U ispitivanju je korišten ekstrakt koji je dobiven optimizacijom ekstrakcije na maksimalnu količinu kumestrola, ali ne može se sa sigurnošću reći da je kumestrol odgovoran za ovu aktivnost pošto je on u ekstraktu prisutan u mikrogramskoj količini. S druge strane, dokazana je snažna korelacija između jake inhibicije lipoksigenaze i visoke koncentracije ukupnih polifenola i flavonoida iz metanolnog ekstrakta biljne vrste *Terminalia chebula* R., Combretaceae (Eshwarappa i sur., 2016). *M. lupulina* bogata je flavonoidima, među kojima je i kumestrol, te se dobivena aktivnost može pripisati ovim sastavnicama iako ekstrakt nije optimiziran na njih. Lipoksigenaza također može biti inhibirana drugim sastavnicama *M. lupulina*, no potrebna su daljnja istraživanja da bi se to zaključilo.

#### 4.2.2. Inhibicija tirozinaze

Tirozinaza je enzim koji ograničava brzinu stvaranja melanina te je prema tome najistaknutija meta u inhibiranju hiperpigmentacije. U vidu primjene ekstrakta zeleni *M. lupulina* u dermalnim pripravcima, istražena je sposobnost inhibicije tirozinaze kao jedno od bitnih svojstava takvih pripravaka (Mann i sur., 2018).

Metoda se temelji na enzimatskoj reakciji gdje kao supstrat služi otopina L-DOPA. Tirozinaza katalizira reakciju oksidacije supstrata L-DOPA u dopakinon. Nakon toga dopakinon prelazi u dopakrom koji je supstrat za sintezu melanina. Kada se inkubira otopina ekstrakta s otopinom enzima, ekstrakt inhibira enzim te posljedično dodatkom supstrata ne dolazi do reakcije. Ta se inhibicija očituje kao smanjenje apsorbancije (Khodaei i sur., 2019).

Rezultati su izraženi kao  $IC_{50}$ , odnosno koncentracija ekstrakta koja inhibira 50% aktivnosti tirozinaze prisutne u otopini (Slika 5). Uzorci su uspoređeni s kojičnom kiselinom, poznatim jakim inhibitorom tirozinaze.



Slika 5. Sposobnost inhibicije tirozinaze (srednja vrijednost tri mjerenja  $\pm$  SD)

\*mjerne jedinice navedene su u zagradi uz naziv uzorka/pozitivne kontrole

Sposobnost inhibicije tirozinaze ekstrakta izražena kao  $IC_{50}$  iznosila je 165,55  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , a kojične kiseline 4,43  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Vidljivo je da je sposobnost inhibicije tirozinaze ekstrakta mnogo manja od sposobnosti inhibicije tirozinaze kojične kiseline. Ipak, učinak postoji, no vrlo je malen. Pošto je u radu korišten ekstrakt dobiven optimizacijom ekstrakcije na

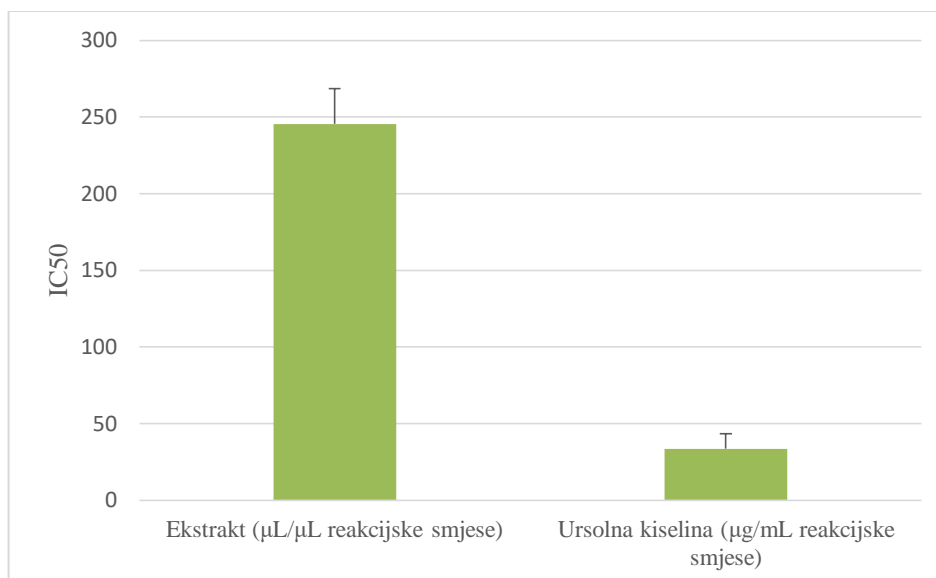
maksimalnu količinu kumestrola, najlogičnije bi bilo da je kumestrol inhibitor tirozinaze, no nije. Iako nisu provedena istraživanja inhibicije tirozinaze ekstrakta *M. lupulina*, provedeno je istraživanje inhibicije tirozinaze kumestrola u sklopu istraživanja učinka kumestrola na sintezu melanina u mišjim melanocitima. Kumestrol nema sposobnost inhibicije tirozinaze niti u koncentraciji od 50  $\mu\text{M}$ , no postoje drugi mehanizmi pomoću kojih inhibira sintezu melanina (Hwang i sur., 2017). No, pošto *M. lupulina*, osim kumestrola, sadrži i druge flavonoide, moguće da su oni pokazali svojstvo inhibicije tirozinaze. Naime, biljna vrsta *Senna alata* L., Fabaceae s visokim sadržajem flavonoida pokazala je svojstvo inhibicije tirozinaze (Chatatikun i Chiabchalard, 2017). Iako je moguće da su flavonoidi inhibirali tirozinazu, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se to potvrdilo.

#### 4.2.3. Inhibicija elastaze

Elastaza je, kao i lipoksigenaza, enzim uključen u upalu. Djeluje na način da razgrađuje elastin pri čemu oštećuje strukturu kože u vidu smanjenja njene elastičnosti (Yasin i sur., 2017). Zbog toga je potencijalna primjena inhibitora elastaze u dermatološkim pripravcima te je u ovom radu ispitana aktivnost inhibicije ovog enzima posredovana ekstraktom zeleni *M. lupulina*.

Sposobnost inhibicije elastaze ispitana je enzimskom reakcijom koristeći SANA-u kao supstrat. Inhibitorna aktivnost očitovale se promjenom intenziteta boje ispitivane otopine uslijed raspada SANA-e na *p*-nitroanilin u reakciji kataliziranoj elastazom (Biswajit i sur., 2017).

Rezultati su izraženi kao  $\text{IC}_{50}$ , odnosno koncentracija ekstrakta koja inhibira 50% aktivnosti elastaze prisutne u otopini (Slika 6). Uzorci su uspoređeni s ursolnom kiselinom, poznatim jakim inhibitorom elastaze.



Slika 6. Sposobnost inhibicije elastaze (srednja vrijednost tri mjerenja ± SD)

\*mjerne jedinice navedene su u zagradi uz naziv uzorka/pozitivne kontrole

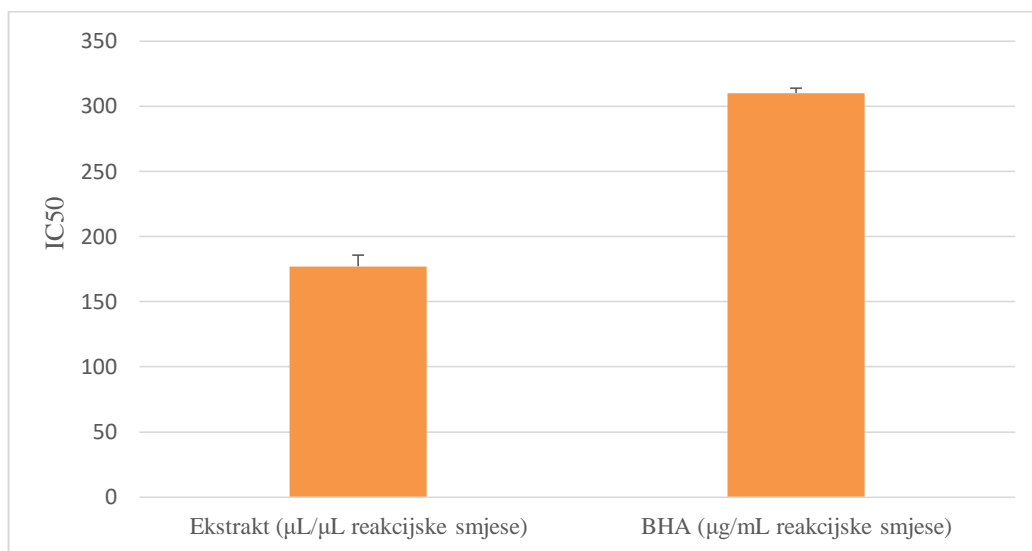
Sposobnost inhibicije elastaze ekstrakta izražena kao IC<sub>50</sub> iznosila je 245,47 µL/mL, a ursolne kiseline 33,61 µL/mL. Iz rezultata je vidljivo da je sposobnost ekstrakta da inhibira elastazu manja od ursolne kiseline, ali ipak je značajna. Premda je u radu korišten ekstrakt dobiven optimizacijom ekstrakcije na maksimalnu količinu kumestrola, ne postoje literaturni podaci koji govore o inhibiciji elastaze posredovane kumestrolom pa se ne može tvrditi da je on odgovoran za ovu aktivnost. No, u ispitivanju sposobnosti inhibicije elastaze silimarina, standardiziranog flavonoidnog ekstrakta soka sikavice, dokazana je poveznica između visokog sadržaja flavonoida i inhibicije elastaze (Pientaweeratch i sur., 2016). *M. lupulina* sadrži mnogo flavonoida te se dobivena aktivnost može pripisati ovim sastavnicama iako ekstrakt nije optimiziran na njih. No, potrebna su daljnja istraživanja da bi se izvodili konkretni zaključci.

#### 4.2.4. β-karoten linoleatna analiza

Antioksidativna aktivnost sastavnica u dermatološkim proizvodima ima značajnu važnost. Naime, u prisustvu slobodnih radikala i metalnih iona dolazi do peroksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina. Dobar antioksidans će štititi proizvod od peroksidacije tijekom skladištenja i korištenja, a također će usporiti fotostarenje kože (Ciganović i sur., 2019). Stoga je ispitana antioksidativna aktivnost ekstrakta *M. lupulina*.

Već je dugo poznato da  $\beta$ -karoten reagira s peroksilnim radikalima stvarajući pritom  $\beta$ -karoten epoksid te se stoga smatra dobrim hvatačem slobodnih radikala i antioksidansom (Kennedy i Liebler, 1991). Linolna kiselina u prisustvu reaktivnih kisikovih vrsta i kisika formira peroksilni radikal ( $\text{LOO}^\cdot$ ) koji reagira s visoko nezasićenim molekulama  $\beta$ -karotena pri čemu dolazi do stvaranja stabilnog  $\beta$ -karoten radikala. Kako bi se potaknula formacija peroksilnog radikala linolne kiseline, reakcijski sustav zagrijan je na 45 °C. Posljedično, količina  $\beta$ -karotena u ispitivanoj otopini se smanjuje što se očituje kao obezbojenje otopine koje se može pratiti spektrofotometrijski, a rezultat služi kao mjera antioksidativne aktivnosti. U prisustvu nekog jačeg antioksidansa u ispitivanoj otopini može se smanjiti obezbojenje  $\beta$ -karotena. To je posljedica kompeticije za vezanje na peroksilni radikal, u našem slučaju na peroksilni radikal linolne kiseline. Što je narančasta boja postojanija, antioksidativna aktivnost jače je izražena (Kosalec i sur., 2013; Moon i Shibamoto, 2009; Amarowicz i sur., 2004).

Rezultati određivanja antioksidativne aktivnosti prikazani su na Slici 7 kao  $\text{IC}_{50}$  vrijednost, odnosno koncentracija koja ima 50% antioksidativne aktivnosti. Uzorci su uspoređeni s BHA, poznatim jakim antioksidansom.



Slika 7. Antioksidativna aktivnost ekstrakata (srednja vrijednost tri mjerenja  $\pm$  SD)

\*mjerne jedinice navedene su u zagradi uz naziv uzorka/pozitivne kontrole

Antioksidativna aktivnost ekstrakta izražena kao  $\text{IC}_{50}$  vrijednost iznosila je 177,01  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , a BHA 310,02  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Iz ovih rezultata vidljivo je da ekstrakt dobiven optimizacijom ekstrakcije na maksimalnu količinu kumestrola pokazuje izrazito dobar

antioksidativni učinak, gotovo dva puta veći od korištenog standarda, BHA. Ova se aktivnost može pripisati flavonoidnim sastavnicama *M. lupulina*, kvercetinu i kemferolu, ali i kumestrolu. U istraživanju antioksidativne aktivnosti flavonoida utvrđena je antioksidativna aktivnost kemferola i ona je iznosila 63,5 %, a kvercetina 63,6 %. Također je dokazana antioksidativna aktivnost kumestrola u iznosu od 38,7 % (Burda i Oleszek, 2001). Kvercetin, kemferol i kumestrol prisutni su i u *M. lupulina* te se izrazito dobar antioksidativni učinak ove biljke može pripisati navedenim flavonoidima. Zbog velikog potencijala u vidu antioksidativne aktivnosti, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se taj učinak potvrdio.

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom je istraživanju uspješno primjenjen RSM, odnosno Box-Behnkenov dizajn za optimizaciju uvjeta ekstrakcije kumestrola iz zeleni hmeljaste vije (*M. lupulina*). Određeni su optimalni uvjeti ekstrakcije (80 °C, maseni udio glicerola od 90 % i trajanje ekstrakcije 60 minuta) za postizanje maksimalne koncentracije kumestrola. Rezultati su pokazali da su unutar istraživanih raspona sve neovisne varijable utjecale na sadržaj kumestrola. Najveći utjecaj na ekstrakciju imali su temperatura ekstrakcije i maseni udio glicerola. Ekstrakt dobiven optimizacijom uvjeta ekstrakcije na maksimalnu koncentraciju kumestrola korišten je u ispitivanju bioloških učinaka zeleni hmeljaste vije. Ispitivanjem inhibicije lipoksigenaze pokazano je da ekstrakt ima umjerenu sposobnost inhibicije lipoksigenaze te se tome učinku može pripisati protuupalno djelovanje ekstrakta. Nadalje, ispitivanje inhibicije tirozinaze pokazalo je da ekstrakt ima blagu sposobnost inhibicije te bi se stoga mogao koristiti kod problema s hiperpigmentacijom. Također, pokazana je blaga sposobnost inhibicije elastaze što pridonosi zaštiti od strukturnih oštećenja ekstracelularnog matriksa i povećanju elastičnosti kože.  $\beta$ -karoten linoleatna analiza pokazala je iznimno dobar antioksidativni učinak ekstrakta što može naći primjenu i prevenciji i usporavanju fotostarenja. Iz svega navedenoga može se zaključiti da ekstrakt *M. lupulina* ima dobar potencijal kao sastavnica dermatoloških pripravaka.



## 6. LITERATURA

Agarwal P, Singh M, Singh J, Singh RP. Microbial Tyrosinases: A Novel Enzyme, Structural Features, and Applications. U: Applied Microbiology and Bioengineering, Shukla P, urednik, Academic Press, 2019, 3-19.

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.

Argenta DF, Bidone J, Koester LS, Bassani VL, Simões CMO, Teixeira HF. Topical Delivery of Coumestrol from Lipid Nanoemulsions Thickened with Hydroxyethylcellulose for Antiherpes Treatment. *AAPS PharmSciTech*, 2018, 19, 192-200.

Azmi N, Hashim P, Hashim DM, Halimoon N, Majid NM. Anti-elastase, anti-tyrosinase and matrix metalloproteinase-1 inhibitory activity of earthworm extracts as potential new anti-aging agent. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2014, 4, 348-352.

Baloch N, Nabi S, Al-Kahraman YMSA. In vitro Antimicrobial, Insecticidal, Antitumor Activities and Their Phytochemical Estimation of Methanolic Extract and its Fractions of *Medicago lupulina* Leaves. *World Appl Sci J*, 2013, 23, 500-506.

Betteridge DJ. What is oxidative stress?. *Metabolism*, 2000, 49, 3-8.

Bianchi SE, Machado BEK, da Silva MGC, da Silva MMA, Bosco LD, Marques MS, Horn AP, Persich L, Geller FC, Argenta D, Teixeira HF, Simões CMO, Dora CL, Bassani VL. Coumestrol/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin association incorporated in hydroxypropyl methylcellulose hydrogel exhibits wound healing effect: in vitro and in vivo study. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 119, 179-188.

Biswajit B, Hiranjit C, Pramod T, Suman K. Studies on secondary metabolite profiling, anti-inflammatory potential, in vitro photoprotective and skin-aging related enzyme inhibitory activities of *Malaxis accuminata*, a threatened orchid of nutraceutical importance. *J Photochem Photobiol B*, 2017, 173, 686-695.

Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem*, 2001, 49, 2774-2779.

Butkutė B, Padarauskas A, Cesevičienė J, Pavilionis A, Taujenis L, Lemežienė N. Perennial legumes as a source of ingredients for healthy food: proximate, mineral and phytoestrogen composition and antibacterial activity. *J Food Sci Technol*, 2017, 54, 2661-2669.

Castro CC, Pagnussat AS, Orlandi L, Worm P, Moura N, Etgen AM, Netto CA. Coumestrol has neuroprotective effects before and after global cerebral ischemia in female rats. *Brain Res*, 2012, 1474, 82-90.

Chatatikun M, Chiabchalard A. Thai plants with high antioxidant levels, free radical scavenging activity, anti-tyrosinase and anti-collagenase activity. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17, 3-9.

Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian M, Ultrasound Assisted Extraction of Food and Natural Products. Mechanisms, Techniques, Combinations, Protocols and Applications. A Review. *Ultrason Sonochem*, 2017, 34, 540-560.

Chen Y, Zhang J, Li Q, Wu JX, Sun F, Liu Z, Zhao C, Liang S. Response Surface Methodology for Optimizing the Ultrasound-Assisted Extraction of Polysaccharides from *Acanthopanax giraldii*. *Chem pharm bull*, 2018, 66, 785-793.

Ciganović P, Jakimiuk K, Tomczyk M, Zovko Končić M. Glycerolic Licorice Extracts as Active Cosmeceutical Ingredients: Extraction Optimization, Chemical Characterization, and Biological Activity. *Antioxidants (Basel)*, 2019, 8, 2-12.

Drmić H, Režek Jambrak A. Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol*, 2010, 2, 22-33.

Dulić M, Ciganović P, Vujić L, Zovko Končić M, Antidiabetic and Cosmeceutical Potential of Common Barbary (Berberis vulgaris L.) Root Bark Extracts Obtained by Optimization of 'Green' Ultrasound-Assisted Extraction. *Molecules*, 2019, 24, 2-14.

Ebrahimi-Najafabadi H, Leardi R, Jalali-Heravi M. Experimental design in analytical chemistry--part I: theory. *JAOAC Int*, 2014, 97, 3-11.

Jabs HU. Elastase - the target of a novel anti-aging strategy to defy skin aging, loss of skin elasticity and wrinkle formation. *Ästhetische Dermatologie*, 2012, 6, 38-40.

Eshwarappa RS, Ramachandra YL, Subaramaihha SR, Subbaiah SG, Austin RS, Dhananjaya BL. Anti-Lipoxygenase Activity of Leaf Gall Extracts of Terminalia chebula (Gaertn.) Retz. (Combretaceae). *Pharmacognosy Res*, 2016, 8, 78-82.

Fluhr JW, Darlenski R, Surber C. Glycerol and the Skin: Holistic Approach to Its Origin and Functions. *Br J Dermatol*, 2008, 159, 23-34.

García Pérez JV, Mulet Pons A, Carcel Carrión JA. Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Eng Rev*, 2011, 3, 108-120.

Goyal N, Bulasara VK, Barman S, Removal of emerging contaminants daidzein and coumestrol from water by nanozeolite beta modified with tetrasubstituted ammonium cation. *J Hazard Mater*, 2017, 344, 417-430.

Hadidi M, Ibarz A, Pagan J, Optimisation and kinetic study of the ultrasonic-assisted extraction of total saponins from alfalfa (*Medicago sativa*) and its bioaccessibility using the response surface methodology. *Food Chem*, 2020, 5, 67-71.

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.

Jibril S, Basar N, Sirat HM, Wahab RA, Mahat NA, Nahar L, Sarker SD, Application of Box–Behnken design for ultrasound-assisted extraction and recycling preparative HPLC for isolation of anthraquinones from *Cassia singueana*. *Phytochem Anal*, 2019, 30, 101-109.

Kennedy TA, Liebler DC. Peroxy radical oxidation of  $\beta$ -carotene: formation of  $\beta$ -carotene epoxides. *Chem Res Toxicol*, 1991, 4, 290-295.

Khodaei M, Amanzadeh Y, Faramarzi M, Pirali-Hamedani M, Adhami H, Cholinesterase Inhibitory, Anti-oxidant and Anti-tyrosinase Activities of Three Iranian Species of *Dracocephalum*, *Res J Pharmacogn*, 2019, 6, 25-31.

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.

Koirala P, Seong SH, Jung HA, Choi JS. Comparative Evaluation of the Antioxidant and Anti-Alzheimer's Disease Potential of Coumestrol and Puerarol Isolated from *Pueraria lobata* Using Molecular Modeling Studies. *Molecules*, 2018, 23, 1-12.

Kosalec I, Kremer D, Locatelli M, et al. Anthraquinone profile, antioxidant and antimicrobial activity of bark extracts of *Rhamnus alaternus*, *R. fallax*, *R. intermedia* and *R. pumila*. *Food Chem*, 2013, 136, 335-341.

Krakowska A, Rafińska K, Walczak J, Kowalkowski T, Buszewski B. Comparison of Various Extraction Techniques of *Medicago sativa*: Yield, Antioxidant Activity, and Content of Phytochemical Constituents. *JAOAC Int*, 2017, 100, 1681-1693.

Krieg P, G. Fürstenberger. The role of lipoxygenases in epidermis. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1841, 390-400.

Kumestrol, <https://en.wikipedia.org/wiki/Coumestrol>, pristupljeno 2.5.2020.

Lee EJ, Jiménez Z, Seo K, Nam GB, Kang Y, Lee TR, Kim D, Yang DC. Mass production of coumestrol from soybean (*Glycine max*) adventitious roots through bioreactor: effect on collagen production. *Plant Biotechnol Rep*, 2019, 14, 110-99.

Lovrić T. Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva Zagreb, HINUS Miramarska, 2013. 13b, 299-300.

Mann T, Gerwat W, Batzer J, Eggers K, Scherner C, Wenck H, Stäb F, Hearing VJ, Röhm KH, Kolbe L. Inhibition of Human Tyrosinase Requires Molecular Motifs Distinctively Different from Mushroom Tyrosinase. *J Invest Dermatol*, 2018, 138, 1601-1608.

*Medicago lupulina*, [https://en.wikipedia.org/wiki/Medicago\\_lupulina](https://en.wikipedia.org/wiki/Medicago_lupulina), pristupljeno 29.4.2020.

Miranda-Bautista J, Bañares, R, Vaquero J. Chapter 1 – The gastrointestinal system: Anatomy and sources of oxidative stress A2. U: Gastrointestinal tissue. Gracia-Sancho J, Salvadó J, urednici, Cambridge, MA: Academic Press. 2017, 3-20.

Montero G, Arriagada F, Günther G, et al. Phytoestrogen coumestrol: Antioxidant capacity and its loading in albumin nanoparticles. *Int J Pharm*, 2019, 562, 86-95.

Moon JK, Shibamoto T. Antioxidant assays for plant and food components. *J Agric Food Chem*, 2009, 57, 1655-66.

Moran MJ, Martina K, Stefanidis GD, Jordens J, Van Gerven T, Goovaerts V, Manzoli M, Groffils C, Cravotto G. Glycerol: An Optimal Hydrogen Source for Microwave-Promoted Cu-Catalyzed Transfer Hydrogenation of Nitrobenzene to Aniline. *Front Chem*, 2020, 8, 1-10.

Mukherjee PK, Biswas R, Sharma A, Banerjee S, Biswas S, Katiyar CK. Validation of medicinal herbs for anti-tyrosinase potential. *J Herb Med*, 2018, 14, 1-16.

Orafaie A, Mousavian M, Orafaie H, Sadeghian H. An overview of lipoxygenase inhibitors with approach of *in vivo* studies. *Prostaglandins Other Lipid Mediators*, 2020, 148, 2-3.

Petruk G, Del Giudice R, Rigano MM, Monti DM. Antioxidants from Plants Protect against Skin Photoaging. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018, 1-7.

Pientaweeratch S, Panapisal V, Tansirikongkol A. Antioxidant, anti-collagenase and anti-elastase activities of *Phyllanthus emblica*, *Manilkara zapota* and silymarin: an in vitro comparative study for anti-aging applications. *Pharm Biol*, 2016, 54, 1865-1872.

Polat H, Dursun Capar T, Inanir C, Ekici L, Yalcin H. Formulation of functional crackers enriched with germinated lentil extract: A Response Surface Methodology Box-Behnken Design. *LWT*, 2020, 123, 3-20.

Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017, 1-6.

Priroda i biljke, Hmeljasta vija, <https://www.plantea.com.hr/hmeljasta-vija/>, pristupljeno 29.4.2020.

Putnik P, Lorenzo JM, Barba FJ, Roohinejad S, Režek Jambrak A, Granato D, et al. Novel Food Processing and Extraction Technologies of High-Added Value Compounds from Plant Materials. *Foods*, 2018, 7, 2-9.

Sertić A. Metode dizajniranja eksperimentalnog postupka. Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2015, 3-22.

Smith WL, Borgeatb P, Fitzpatrick FA. The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways. U: *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, Vance DE, Vance JE, urednici, Elsevier, 1991, 297-325.

Sotler R, Poljšak B, Dahmane R, Jukić T, Pavan Jukić D, Rotim C, Trebše P, Starc A. Prooxidant activities of antioxidants and their impact on health. *Acta Clin Croat*, 2019, 58, 726-736.

Tao Y, Zhang Z, Sun DW. Kinetic modeling of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grape marc: influence of acoustic energy density and temperature. *Ultrason Sonochem*, 2014, 21, 1461-1469.

Viita H, Ylä-Herttuala S. Chapter 15 – Effects of Lipoxygenases on Gene Expression in Mammalian Cells. U: *Antioxidant and Redox Regulation of Genes*. Sen CK, Sies H, Baeuerle PA, urednici, Academic Press. 2000, 339-358.

Wolfson A, Dlugy C, Shotland Y. Glycerol as a green solvent for high product yields and selectivities, *Environ Chem Lett*, 2007, 5, 67-71.

Xanthopoulou MN, Nomikos T, Fragopoulou E, Antonopoulou S. Antioxidant and lipoxygenase inhibitory activities of pumpkin seed extracts, *Food Res Int*, 2009, 42, 641-646.

Yasin ZAM, Ibrahim F, Rashid NN, Razif MFM, Yusof R. The Importance of Some Plant Extracts as Skin Anti-aging Resources: A Review. *Curr Pharm Biotechnol*, 2017, 18, 864-876.

Yin X, Zhang X, Li D. Simultaneous optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidants and tyrosinase inhibitory activities of Semen Oroxyli flavonoids using response surface methodology. *Food Measure*, 2020, 14, 694-707.

Zhou J, Zhang L, Li Q, et al. Simultaneous Optimization for Ultrasound-Assisted Extraction and Antioxidant Activity of Flavonoids from *Sophora flavescens* Using Response Surface Methodology. *Molecules*, 2018, 24, 1-14.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

### 7.1. SAŽETAK

Biljni ekstrakti intenzivno se istražuju zbog svojih mnogobrojnih učinaka na kožu te njihove potencijalne primjene u izradi dermatoloških pripravaka. U ovom diplomskom radu cilj je bio razviti metodu za ultrazvučnu ekstrakciju kumestrola iz zeleni hmeljaste vije koristeći glicerol, netoksično i biorazgradivo otapalo dostupno iz obnovljivih izvora. Također, imajući u vidu potencijalnu primjenu kumestrolom bogatih ekstrakata zeleni hmeljaste vije u dermatološkim pripravcima, ispitani su njihovi biološki učinci. Ekstrakcijski pokusi planirani su pomoću Box-Behnkenovog dizajna sa sljedećim rasponom ispitivanih parametara: maseni udio glicerola: 10-90%, temperatura: 20-80 °C i trajanje ekstrakcije: 20-60 minuta. Sadržaj kumestrola u ekstraktima određen je RP-HPLC-DAD metodom. Višestrukom regresijskom analizom i analizom varijance (ANOVA) utvrđeno je da se odnos između varijabli najbolje može izraziti kvadratnom jednačbom, a njeno rješenje daje optimalne uvjete za ekstrakciju kumestrola: temperatura od 80 °C, maseni udio glicerola od 90 % i trajanje ekstrakcije od 60 minuta. Statistički najznačajnije varijable za ekstrakciju bile su temperatura i maseni udio glicerola čije je povećanje rezultiralo povećanom koncentracijom kumestrola. Nadalje, biološki učinci inhibicije lipoksigenaze, tirozinaze, i elastaze ispitani su enzimskim testovima, a antioksidativna aktivnost  $\beta$ -karoten linoleatnom analizom. Ekstrakt je pokazao umjerenu sposobnost inhibicije lipoksigenaze te blagu inhibiciju tirozinaze i kolagenaze. Pokazan je iznimno dobar antioksidativni potencijal ekstrakta.

## 7.2. SUMMARY

Herbal extracts are intensively researched due to their numerous effects on the skin and their potential application in the production of dermatological preparations. The aim of this thesis was to develop a method for ultrasonic extraction of cumestrol from black medick using glycerol, a non-toxic and biodegradable solvent available from renewable sources. Having in mind the potential application of cumestrol-rich extracts of black medick in dermatological preparations, their biological effects were investigated. Extraction experiments were planned using the Box-Behnken design with the following range of test parameters: glycerol content: 10-90% (w/w), temperature: 20-80 °C and extraction duration: 20-60 minutes. The content of cumestrol in the extracts was determined by RP-HPLC-DAD method. Multiple regression analysis and analysis of variance (ANOVA) found that the relationship between the variables can best be expressed by a quadratic equation, and its solution provides optimal conditions for cumestrol extraction: temperature of 80 °C, 90% glycerol and extraction duration of 60 minutes. Statistically, the most significant variables for extraction were temperature and glycerol content whose increase resulted in increased cumestrol concentration. Furthermore, the biological effects of lipoxygenase, tyrosinase, and elastase inhibition were examined by enzymatic assays, and the antioxidant activity by  $\beta$ -carotene linoleate analysis. The extract showed moderate ability to inhibit lipoxygenase and mild inhibition of tyrosinase and collagenase, with notable antioxidant potential.



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

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### OPTIMIZACIJA IZRADE I BIOLOŠKI UČINCI KUMESTROLOM BOGATIH GLICEROLNIH EKSTRAKTA ZELENIM HMEJASTE VIJE (*Medicago lupulina* L.)

Valentina Poljak

#### SAŽETAK

Biljni ekstrakti intenzivno se istražuju zbog svojih mnogobrojnih učinaka na kožu te njihove potencijalne primjene u izradi dermatoloških pripravaka. U ovom diplomskom radu cilj je bio razviti metodu za ultrazvučnu ekstrakciju kumestrola iz zeleni hmeljaste vije koristeći glicerol, netoksično i biorazgradivo otapalo dostupno iz obnovljivih izvora. Također, imajući u vidu potencijalnu primjenu kumestrolom bogatih ekstrakata zeleni hmeljaste vije u dermatološkim pripravcima, ispitani su njihovi biološki učinci. Ekstrakcijski pokusi planirani su pomoću Box-Behnkenovog dizajna sa sljedećim rasponom ispitivanih parametara: maseni udio glicerola: 10-90%, temperatura: 20-80 °C i trajanje ekstrakcije: 20-60 minuta. Sadržaj kumestrola u ekstraktima određen je RP-HPLC-DAD metodom. Višestrukom regresijskom analizom i analizom varijance (ANOVA) utvrđeno je da se odnos između varijabli najbolje može izraziti kvadratnom jednadžbom, a njeno rješenje daje optimalne uvjete za ekstrakciju kumestrola: temperatura od 80 °C, maseni udio glicerola od 90 % i trajanje ekstrakcije od 60 minuta. Statistički najznačajnije varijable za ekstrakciju bile su temperatura i maseni udio glicerola čije je povećanje rezultiralo povećanom koncentracijom kumestrola. Nadalje, biološki učinci inhibicije lipoksigenaze, tirozinaze, i elastaze ispitani su enzimskim testovima, a antioksidativna aktivnost  $\beta$ -karoten linoleatnom analizom. Ekstrakt je pokazao umjerenu sposobnost inhibicije lipoksigenaze te blagu inhibiciju tirozinaze i kolagenaze. Pokazan je iznimno dobar antioksidativni potencijal ekstrakta.

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

- Rad sadrži: 35 stranica, 7 grafičkih prikaza, 4 tablice, 60 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
- Ključne riječi: Hmeljasta vija, Kumestrol, Ultrazvučna ekstrakcija, Glicerol, Box-Behnken dizajn, Lipoksigenaza, Tirozinaza, Elastaza,  $\beta$ -karoten linoleatna analiza, Antioksidativna aktivnost
- Mentor: **dr. sc. Marijana Zovko Končić**, redovni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
- Ocjenjivači: **dr. sc. Marijana Zovko Končić**, redovni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**dr. sc. Sanda Vladimir Knežević**, redovni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**dr. sc. Renata Jurišić Grubešić**, redovni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj, 2020.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### OPTIMIZATION OF PREPARATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF COUMESTROL-RICH GLYCEROL EXTRACTS OF BLACK MEDICK (*Medicago lupulina* L.)

Valentina Poljak

#### SUMMARY

Herbal extracts are intensively researched due to their numerous effects on the skin and their potential application in the production of dermatological preparations. The aim of this thesis was to develop a method for ultrasonic extraction of coumestrol from black medick using glycerol, a non-toxic and biodegradable solvent available from renewable sources. Having in mind the potential application of coumestrol-rich extracts of black medick in dermatological preparations, their biological effects were investigated. Extraction experiments were planned using the Box-Behnken design with the following range of test parameters: glycerol content: 10-90% (w/w), temperature: 20-80 °C and extraction duration: 20-60 minutes. The content of coumestrol in the extracts was determined by RP-HPLC-DAD method. Multiple regression analysis and analysis of variance (ANOVA) found that the relationship between the variables can best be expressed by a quadratic equation, and its solution provides optimal conditions for coumestrol extraction: temperature of 80 °C, 90% glycerol and extraction duration of 60 minutes. Statistically, the most significant variables for extraction were temperature and glycerol content whose increase resulted in increased coumestrol concentration. Furthermore, the biological effects of lipoxygenase, tyrosinase, and elastase inhibition were examined by enzymatic assays, and the antioxidant activity by  $\beta$ -carotene linoleate analysis. The extract showed moderate ability to inhibit lipoxygenase and mild inhibition of tyrosinase and collagenase, with notable antioxidant potential.

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

Thesis includes: 35 pages, 7 figures, 4 tables and 60 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Black medick, Coumestrol, Ultrasound-assisted extraction, Glycerol, Box-Behnken design, Lipoxygenase, Tyrosinase, Elastase,  $\beta$ -carotene linoleate analysis, Antioxidant activity

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

Ocjenjivači: **dr. sc. Marijana Zovko Končić**, *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**dr. sc. Sanda Vladimir Knežević**, *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**dr. sc. Renata Jurišić Grubešić**, *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July, 2020.