

# USPOREDBA KEMIJSKOG I FIZIOLOŠKOG PRISTUPA U ODREĐIVANJU ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA BILJNIH INFUZIJA

---

Ćulah, Merima

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:615479>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Merima Ćulah

**USPOREDBA KEMIJSKOG I FIZIOLOŠKOG PRISTUPA U ODREĐIVANJU  
ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA BILJNIH INFUZIJA**  
Završni rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Merima Ćulah

**USPOREDBA KEMIJSKOG I FIZIOLOŠKOG PRISTUPA U ODREĐIVANJU  
ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA BILJNIH INFUZIJA**  
Završni rad

Rijeka, 2020.

*ZAHVALE:*

*Dugujem veliku zahvalnost svojoj mentorici doc.dr.sc. Jeleni Marinić na podršci, usmjeravanju, prenesenom znanju i pomoći pri izradi ovoga završnog rada. Hvala na ukazanom putu u radu, prihvaćanju mojih želja i savjetima.*

*Također se zahvaljujem svim profesorima i asistentima koji su nas tokom studiranja naučili mnogo toga što će nam koristiti u daljnjem školovanju i radu.*

*Na kraju se zahvaljujem svojim prijateljima, roditeljima i bratu koji su mi bili podrška i vjerovali u mene od samog početka studiranja pa sve do sada.*

*M.Č.*

Mentor rada: Jelena Marinić, doc.dr.sc. Jelena Marinić, dipl.ing.preh.teh.

Završni rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Rad ima 83 stranice, 12 slika, 4 tablice i 177 literaturnih navoda.

## SAŽETAK

### USPOREDBA KEMIJSKOG I FIZIOLOŠKOG PRISTUPA U ODREĐIVANJU ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA BILJNIH INFUZIJA

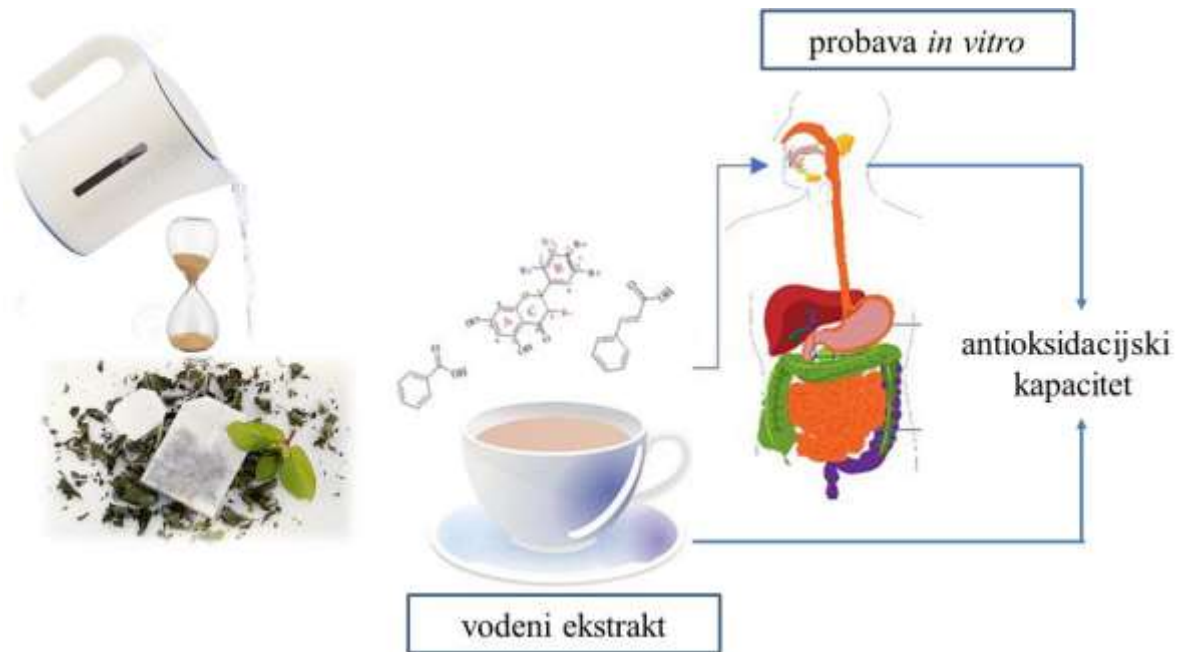
Biljne infuzije ubrajaju se u najčešće konzumirane napitke diljem svijeta. Njihova popularnost je u porastu, ponajprije zbog potencijalnih zdravstvenih dobrobiti koje se pripisuju fenolnim sastojcima u tim pripravcima i njihovim antioksidacijskim svojstvima.

Premda je u brojnim istraživanjima zabilježen visok antioksidacijski kapacitet biljnih infuzija primjenom metoda koje se oslanjaju na postupak vodene ekstrakcije biljnog materijala, većina ih zanemaruje fiziološke parametre, poput fizikalno-kemijskih uvjeta u probavnom sustavu koji značajno utječu na bioraspoloživost, a time i na biološku aktivnost fenolnih sastojaka. Stoga je u ovom radu usporedno prikazan i antioksidacijski kapacitet biljnih infuzija koji je određen nakon probave *in vitro*, u uvjetima koji oponašaju one u gastrointestinalnom traktu.

Dostupni literaturni podaci ukazuju da bi se procjeni antioksidacijskog kapaciteta biljnih infuzija trebalo dati prednost metodama utemeljenim na fiziološkom pristupu nad metodama koje ovaj parametar određuju u vodenim ekstraktima biljnog materijala, obzirom da promjene koje se događaju tijekom probave *in vitro* mogu doprinijeti poznavanju stvarne bioaktivne snage biljnih infuzija.

**Ključne riječi:** antioksidacijski kapacitet, biljne infuzije, fenolni sastojci, probava *in vitro*

Grafički sažetak:



Slika 1. Shematski prikaz kemijskog i fiziološkog pristupa pri određivanju antioksidacijskog kapaciteta biljnih infuzija.

## **SUMMARY**

### **COMPARISON OF CHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL APPROACH IN DETERMINING THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF HERBAL INFUSIONS**

Herbal infusions are among the most commonly consumed beverages around the world. Their popularity is rising, primarily due to the potential health benefits attributed to the phenolic compounds in these preparations and their antioxidant properties.

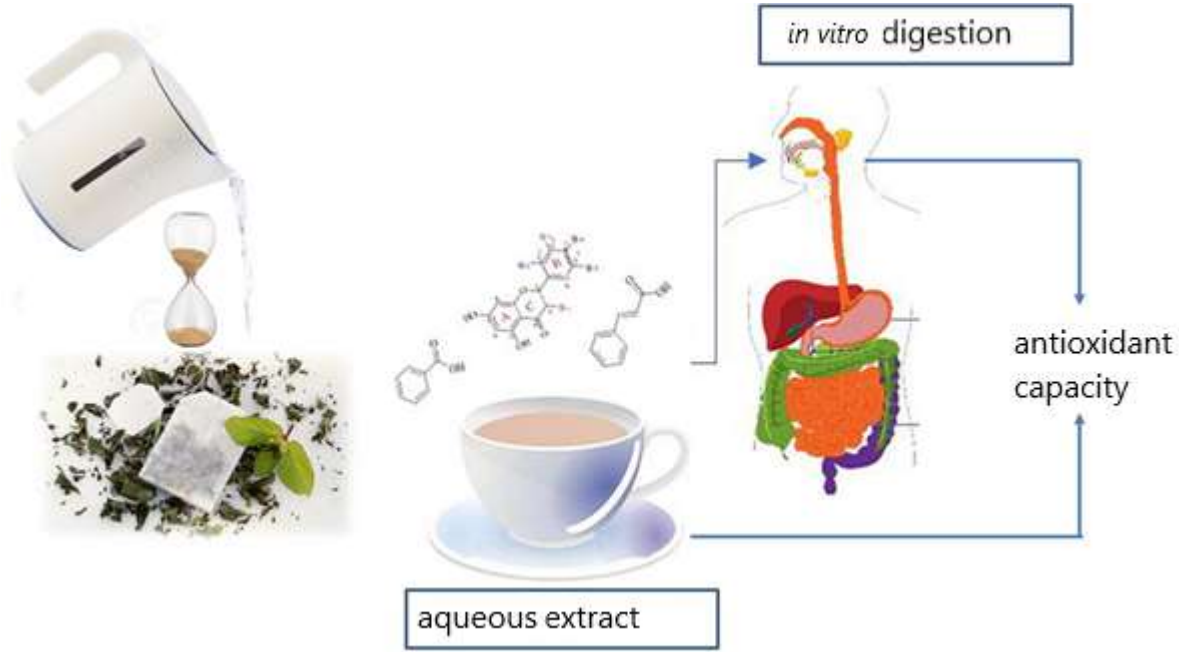
Although a number of studies have reported high antioxidant capacity of herbal infusions using methods that rely on the process of aqueous extraction of herbal material, most of them neglect physiological parameters, such as physicochemical conditions in the digestive system that significantly affect the bioavailability and thus the biological activity of phenolic compounds. Therefore, in this paper, the antioxidant capacity of herbal infusions, which was determined after *in vitro* digestion, in conditions that mimic those in the gastrointestinal tract, is presented in parallel.

Available literature data suggests that the assessment of antioxidant capacity of herbal infusions should be preferred to methods based on a physiological approach over methods that determine this parameter in aqueous extracts of herbal material, as changes occurring during *in vitro* digestion may contribute to knowledge of actual bioactive power of herbal infusions.

**Key words:** antioxidant capacity, herbal infusions, phenolic ingredients, *in vitro* digestion



**Graphical summary:**



**Fig. 1. Graphical representation of the chemical and physiological approach in determining the antioxidant capacity of herbal infusions.**

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. GLAVNI DIO .....	5
2.1. Tradicionalna biljna medicina .....	5
2.2. Biljne infuzije .....	6
2.2.1. Povijest uporabe biljnih infuzija .....	7
2.2.2. Zdravstvene dobrobiti biljnih infuzija .....	11
2.2.3. Kemijski sastav biljnih infuzija .....	16
2.2.3.1. Fenolni sastojci .....	19
2.2.3.2. Fenolni sastojci u biljnim infuzijama .....	26
2.2.3.3. Antioksidacijska aktivnost fenolnih sastojaka .....	31
2.3. METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA .....	33
2.3.1. Metode temeljene na prijenosu vodikovih atoma .....	34
2.3.2. Metode temeljene na prijenosu elektrona .....	36
2.4. Kemijski pristup određivanja antioksidacijskog kapaciteta biljnih infuzija .....	39
2.4.1. Prednost/nedostaci određivanja antioksidacijskog kapaciteta biljnih infuzija kemijskim pristupom .....	43
2.5. FENOLNI SASTOJCI U PROBAVNOM SUSTAVU .....	44
2.5.1. Probava i apsorpcija fenolnih sastojaka .....	44
2.5.2. Bioraspoloživost fenolnih sastojaka .....	46
2.5.2.1. Pristupi procjene bioraspoloživosti fenolnih sastojaka .....	47
2.5.2.2. Bioraspoloživosti fenolnih sastojaka u <i>in vitro</i> modelu .....	50
2.6. Fiziološki pristup ( <i>in vitro</i> model probave) određivanja antioksidacijskog kapaciteta biljnih infuzija .....	52
2.6.1. Prednosti/nedostaci fiziološkog pristupa ( <i>in vitro</i> model probave) u određivanju antioksidacijskog kapaciteta biljnih infuzija .....	61
3. ZAKLJUČCI .....	64
4. LITERATURA .....	66
5. ŽIVOTOPIS .....	81



## 1. UVOD

Kultura konzumacije biljnih infuzija dio je baštine populacija diljem svijeta i temelj tradicionalne medicine (Watchel-Galor i Benzie, 2011.). Njihova potrošnja pokazuje trend porasta na globalnoj razini, zbog poželjnih senzorskih svojstava i opće prihvaćenog poimanja da njihovo uživanje ima blagotvorne učinke na zdravlje. Mnoge zdravstvene dobrobiti biljka i biljnih pripravaka pripisuju se fenolnim sastojcima (Malongane i sur., 2017.), najvećoj skupini biljnih biološki aktivnih spojeva koja uključuje oko 8000 različitih struktura (Curin i sur., 2005.).

Ova skupina fitokemikalija prepoznata je po iznimnim antioksidacijskim svojstvima (Ortega- Jimenez-Garcia i sur., 2013 ., Manganaris, i sur., 2014.), pa se biljne infuzije, uz voće, povrće i začine, smatraju važnim izvorom antioksidanasa u prehrani (Farzaneh i sur., 2015.). Posljedično, rezultati sve većeg broja novih istraživanja otkrivaju izniman antioksidacijski kapacitet biljnih infuzija primjenom pristupa koji se temelji na izdvajanju fenolnih sastojaka sastojaka postupkom ekstrakcije s vodom (Jin l. i sur., 2016., Fu i sur., 2011., Atoui i sur., 2005.)

Međutim, u složenoj matrici hrane biološki aktivni sastojci dolaze kao slobodni/ili vezani s drugim sastojcima, a obje ove forme mogu biti prisutne u topljivom ili netopljivom obliku, ovisno o tome ulaze li u kemijskim i fizičkim interakcijama s drugim sastojcima hrane u matriksu (Huang i sur., 2002.; Wu i sur., 2004; Cömert i Gökmen, 2017.). Stoga, ne postoji jedinstveno otpalao ili smjesa otapala posredstvom kojih bi bilo moguće ekstrahirati sve sastojke s antioksidacijskim svojstvima iz matrice hrane, pa značajan dio potencijalno bioaktivnih sastojaka zaostaje u ostatku nakon ekstrakcije (Saura-Calixto i sur., 2007.). Posljedično, antioksidacijski kapacitet određen metodama koje se oslanjaju na primjenu vode

i/ili organskih otapala za ekstrakciju bioaktivnih sastojka nije stvaran odraz antioksidacijskog kapaciteta analizirane hrane.

Pored toga, na ovaj način određen antioksidacijski kapacitet zanemaruje fizikalno-kemijske uvjete s kojima se bioaktivne molekule moraju suočiti u probavnom sustavu. Proces probave složen je fiziološki proces koji utječe na strukturu, a time i na bioraspoloživost bioaktivnih sastojaka. Bioraspoloživost, odnosno udio spoja koji se oslobađa iz matrice hrane u probavnom sustavu i tako postaje dostupan za crijevnu apsorpciju, osnovni je preduvjet za postizanje specifičnih učinaka biološki aktivnih sastojaka (Tenore i sur., 2015.).

Štoviše, u matrici hrane fenolni sastojci mogu postojati u obliku glikozida, a neke skupine fenolnih sastojaka, poput katehina, mogu tvoriti oligomerne proantocijanidine (kondenzirani tanini). Jednostavniji katehini (poput monomernih, dimernih i trimernih katehina) lako se apsorbiraju u tankom crijevu, dok katehini velike molekulske mase (oligomera od više od tri jedinice) imaju lošu bioraspoloživost, kao i netopljivi vezani fenoli. U debelom crijevu neapsorbirani fenolni sastojci mogu se hidrolizirati enzimima crijevne mikrobiote koji oslobađaju aglikone iz *O*-glukozida i cijepaju ugljik-ugljik veze u heterociklu i u aromatskim prstenovima, što dovodi do nekoliko modifikacija native kemijske strukture i stvaranje manjih metabolita s većom antioksidacijskom aktivnošću u odnosu na matičnu komponentu (Han i sur., 2007., Stevens i sur., 2016., Tomas-Barberan i sur., 2016.)

Fenolni sastojci, poput tearubigina i teaflavina u zelenom i crnom čaju, imaju visok afinitet za proteine mlijeka, što sugerira da na njihovu bioraspoloživost mogu utjecati sastojci hrane (Dubeau i sur., 2010., Ye i sur., 2013.)

Nadalje, pokazano je da probava smanjuje sadržaj fenola za najmanje 47% u voćnim napitcima (Tenore i sur., 2015.), a Tagliazucchi i sur. (2010.), pronašli su da je samo 62% polifenola prisutnih u grožđu bioraspoloživo nakon probave u gastrointestinalnom traktu.

Najčešći pristup kojim se procjenjuje bioraspoloživost bioaktivnih molekula je simulacija procesa probave u *in vitro* uvjetima koji su bliski onim fiziološkim (Alminger i sur., 2014., Pinto i sur., 2017.). Ovaj pristup smatra se alternativom kliničkim ispitivanjima ili *in vivo* modelima, iako ne uključuje sve korake probave u stvarnim, fiziološkim uvjetima, a pokazano je da bioraspoloživost procjenjena na taj način dobro korelira s rezultatima istraživanja na ispitanicima i pokusnim životinjama (Borges i sur., 2017.). Probava u *in vitro* modelu izvodi se uz podešavanje ispitivanog medija uvjetima duž probavnog trakta, oponašanjem mehaničkog djelovanja, enzimske aktivnosti i pH vrijednosti sredine. Može uključivati i dodatan korak, dijalizu, radi simulacije crijevne propusnosti (Celep i sur., 2017.), a neki se *in vitro* modeli izvode i uz simulaciju fermentacije u debelom crijevu (Annunziata i sur., 2018.).

U cilju potpunije procjene bioaktivnog potencijala biljnih infuzija, u ovom preglednom radu su prikazana i uspoređena dva pristupa određivanja antioksidacijskog kapaciteta ovih pripravaka:

- a) kemijski pristup, koji se temelji na karakterizaciji ekstrakata izdvojenih postupkom vodene ekstrakcije biljnog materijala, te
- b) fiziološki pristup, u čijoj podlozi je analiza frakcija koje zaostaju nakon procesa *in vitro* probave biljnih infuzija, u uvjetima koji oponašaju one u gastrointestinalnom traktu.

Treba napomenuti da se u ovom radu pojam biljnih infuzija odnosi na vodene infuzije biljaka, izuzev varijeteta biljne vrste *Camellia sinensis* L.

Pregledni rad započinje s osvrtom na tradicionalnu biljnu medicinu i biljne infuzije kao jednu od najuobičajenijih praksi ovog pristupa koja je usmjerena na očuvanje i unaprijeđenj zdravlja. Sagledava se povijest njihove uporabe, kultura konzumacije i potencijalni zdravstveni učinci koji se dovode u vezu s fenolnim sastojcima i njihovim antioksidacijskim svojstvima. Uz opći prikaza pojedinih skupina ovih fitokemikalija i glavnih metoda određivanja

antioksidacijskog kapaciteta, dokumentira se fenolni profil i antioksidacijski potencijal biljnih infuzija određen u vodenim ekstraktima biljaka i fiziološkim pristupom koji se oslanja na *in vitro* model simulacije procesa probave.

## **2. GLAVNI DIO**

### **2.1. Tradicionalna biljna medicina**

Od početaka civilizacije ljudi su uzgajali, brali i sušili razne biljke od kojih su se radili čajevi, oblozi ili kreme. Znalo se da pojedine biljke i njihovi pripravci pomažu kod određenih patoloških stanja. Termin fitoterapije, čije značenje leži između klasične medicine i travarstvar narodne medicine, čija su se znanja prenosila generacijama, prvi je uveo francuski liječnik Henry Leclerc u svom djelu „*Precis de Phytotherapie*“. Ono pokriva područje ublažavanja simptoma, iako je glavni cilj izlječenje. Tijekom posljednjih 100 godina razvoj i masovna proizvodnja kemijski sintetiziranih lijekova revolucionirali su zdravstvenu zaštitu u većem dijelu svijeta. Međutim, veliki dio stanovništva u zemljama u razvoju i dalje se za svoju primarnu zaštitu oslanja na tradicionalne liječnike i biljne lijekove. U Africi do 90%, a u Indiji 70% stanovništva ovisi o tradicionalnoj medicini dok u Kini tradicionalna medicina čini oko 40% cjelokupno pružene zdravstvene zaštite, a više od 90% općih bolnica u Kini ima jedinice za tradicionalnu medicinu (World Health Organization (WHO), 2005.). Međutim, tijekom posljednja dva desetljeća javni se interes za prirodnim terapijama uvelike povećao i u industrijskim zemljama, što prati sve veća primjena etnobotaničkih sredstava. Najčešći razlozi korištenja tradicionalne medicine su da je pristupačnija, usko odgovara pacijentovoj ideologiji, ublažava zabrinutost zbog štetnih učinaka kemijskih (sintetičkih) lijekova, zadovoljava želju za personaliziranijom zdravstvenom zaštitom i omogućuje veći pristup javnosti do zdravstvenih podataka. Biljni lijekovi najviše se koriste za promicanje zdravlja i liječenje kroničnih, za razliku od po život opasnih stanja. Međutim, upotreba tradicionalnih lijekova povećava se kada je konvencionalna medicina neučinkovita u liječenju bolesti, poput uznapredovalog karcinoma i novih zaraznih bolesti. Nadalje, tradicionalni se lijekovi široko doživljavaju kao prirodni i sigurni. To nije nužno točno, pogotovo kad se bilje uzima s lijekovima na recept i/ili bez recepta



(Canter i Ernst 2004 ; Qato i sur. 2008 ; Loya, Gonzalez-Stuart i Rivera 2009 ; Cohen i Ernst 2010 ).

Trenutno se biljke primjenjuju u terapiji raznih stanja, kao što su kardiovaskularne bolesti, problemi s prostatom, depresija, upale i kao podrška imunološkom sustava. U Kini su 2003. godine tradicionalni biljni lijekovi imali istaknutu ulogu u strategiji suzbijanja i liječenja teškog akutnog respiratornog sindroma (SARS), a u Africi se tradicionalni biljni lijek afrički cvijet već desetljećima koristi za liječenje nekih simptoma povezan s HIV-om ( De Smet 2005 ; Tilburt i Kaptchuk 2008). Biljni lijekovi također su vrlo česti u Europi, a Njemačka i Francuska prednjače u prodaji pripravaka bez recepta među europskim zemljama, i u većini razvijenih zemalja eterična ulja, biljni ekstrakti ili biljni čajevi mogu se prodavati u ljekarnama. S ciljem unapređenja znanstvenog statusa i usklađivanja fitomedicine na europskoj razini. 1989. godine osnovana je Europska znanstvena udruga za fitoterapiju (ESCOP). Iste godine američki Kongres osniva Ured za alternativnu medicinu u okviru Nacionalnih zdravstvenih instituta kako bi se potaknula znanstvena istraživanja u području tradicionalne medicine (Wachtel-Galor i Benzie, 2011.). Doprinos tradicionalne medicine u pružanju osnovne skrbi prepoznala je i Svjetska zdravstvena organizacija te u svojoj strategiji za razdoblje 2014.-2023. stavlja naglasak na primjenu tradicionalne biljne medicine i biljnih pripravaka u svakodnevnom životu kao alternativnoj strategiji praksama službene medicine koja bi bila učinkovita, povoljnija i u skladu s kulturnim običajima određene populacije (Chandrasekara i Shahidi, 2017.).

Biljni pripravci dolaze u različitim oblicima, što uključuje cijelu biljku, sirup, esencijalna ulja, masti, meleme, kapsule i tablete koje sadrže mljeveni ili praškasti oblik izvorne biljke ili njen osušeni ekstrakt, a jedan od oblika biljnih pripravaka su i biljne infuzije (Wachtel-Galor i Benzie, 2011.).

## **2.2. Biljne infuzije**

Biljne infuzije su vodene infuzije svježih ili suhih morfoloških dijelova različitih vrsta biljaka, kao što su korijenje, sjemenke, lišće, cvijeće ili plodovi. Sadrže jednu ili više biljaka koji su nositelji njihova okusa i okrepljujućih svojstava, a pojedine biljne vrste povezuju se i s ljekovitim učincima, zbog čega se biljne infuzije koriste se u cilju očuvanja i poboljšanja zdravlja tisućama godina u mnogim zemljama (Ravikumar, 2014., Rahmani i sur., 2019). Komercijalno su dostupni u raznim oblicima-prah, osušeni dijelovi biljke u ili bez čajnih vrećica, cijele osušene biljke, granule itd., a često se pripremaju neposredno prije same konzumacije u vrućoj do kipućoj ili hladnoj vodi (Chandrasekara i Shahidi, 2017., Poswal i sur., 2019.).

Biljne infuzije nazivaju se još i biljni čajevi, biljni napici, tisan i botaničke infuzije kako bi se izbjegla zabuna s čajem. "Čaj" je napitak pripremljen od lisnih pupoljaka i mladih izdanaka varijeteta biljne vrste *Camellia sinensis* L. (sinonim *Thea sinensis* L), obitelj Theaceae. Prema stupnju fermentacije razlikuju se crni (fermentirani) čaj, zeleni (nefermentirani) čaj, i Oolog (polufermentirani) čaj. Sljedeća kategorija čaja, bijeli čaj, prerađuje se slično kao i zeleni, od kojega se razlikuje prema vremenu berbe listova čaja (Serafini i sur., 2011.). S druge strane, pojam koji se odnosi na "biljni čaj/pripravak/infuziju" označava infuzije bilja ili voća koje ne sadrži biljku *Camellia sinensis* (Chandrasekara i Shahidi, 2017.). Ovo je vrlo bitna značajka koja razlikuje pojam "čaj" od "biljnih infuzija/pripravaka", iako se danas uvriježeno u razgovornom jeziku čajevima nazivaju i čajevi i biljni pripravci lokalno uzgajanog bilja koje se koriste u različitim regijama svijeta. Uz to, biljne infuzije, za razliku od čaja, ne sadrže kofein (Chandrasekara i Shahidi, 2017.).

### **2.2.1. Povijest uporabe biljnih infuzija**

Biljne infuzije dio su kulturnih običaja u zemljama koje se uvelike oslanjaju na tradicionalnu medicinu. Na primjer, druženje uz biljni čaj pripremljen od *Aegle marmelosa* (Bael), *Cassia auriculata* (Ranawara), *Aerva lanata* (Polpala) i *Hemidesmus indicus* (Iramusu) uvriježeno je u svakodnevici populacije Indije i Šri Lanke (Chandrasekara i Shahidi, 2017.). U Kini, povijest uporabe biljnog čaja duga je kao i tradicionalna kineska medicina (TCM), a i mnogi pripravnici tradicionalne medicine također se konzumiraju u obliku kao i čaj, pa se u Kini biljni čajevi piju svakodnevno radi promicanja zdravlja i smanjenja rizika od zdravstvenih problema različite težine, od prehlade do bolesti jetre i drugih organa (Zhao i sur., 2013.).

U Europi, biljni napici bili su poznati mnogo prije nego što je nizozemska istočnoindijska tvrtka upoznala ovaj kontinent s orijentalnim čajem 1606. godine (Albayarak i sur., 2011.), a kasnije su služili kao jeftina lokalna zamjena za skupo uvezeno dobro. Međutim, već tada, pojedinci su preferirali biljni čaj iako su si mogli priuštiti "pravu stvar". Prisjetimo se samo izmišljenog lika Agathe Christie, Herculea Poirota, koji je pio biljni čaj u trenutcima opuštanja. Autor poljskog rječnika ekonomskih biljaka iz 18. stoljeća, *Dykcyonarz Roślinny* "Rječnik biljaka", svećenik Jan Krzysztof Kluk (1739. - 1796.) sastavio je dugačak popis nadomjestaka za čaj i njegovo se pisanje snažno protivilo upotrebi orijentalnih čajeva, objašnjavajući da je kineski čaj "pakiran u gajbe radničkim, bosim nogama", a bolje je piti lokalne biljne infuzije od ručno ubranog bilja (Sõukand i sur., 2013.)

Početkom 20. stoljeća, kada je orijentalni čaj postao široko dostupan u Estoniji, mnogi novinski članci i knjige sugeriraju negativan utjecaj orijentalnog čaja na čovjekovo zdravlje i savjetuju čitatelje da umjesto njega koriste lokalne vrste. To je, zajedno s još uvijek visokom cijenom uvoznog orijentalnog čaja, rezultiralo širokom primjenom lokalnih vrsta u službenim institucijama (vojne institucije i bolnice) i relativno niskom razinom potrošnje orijentalnog čaja i kave u regiji (Ippolitova, 2008.).

Danas, u eri ukidanja regionalnih i etničkih barijera specifične biljne infuzije univerzalno su dostupne, a povećana potrošnja biljnih čajeva postaje svjetski trend, zbog praktičnosti konzumacije, jednostavnosti pripreme, ugodnog okusa i mirisa i niske cijene, ali i stoga što su biljni čajevi nadopuna prehrani spojevima koji mogu imati blagotvorne učinke na zdravlje (Dian-Nashiela i sur., 2015). Tako u Ujedinjenom Kraljevstvu biljne infuzije čine približno 36% konzumacije svih biljnih napitaka (Etheridge i sur., 2019.). U 2013. potrošnja biljnih infuzija (uključujući voćne čajeve) u Njemačkoj daleko je premašila upotrebu čaja (potrošnja po glavi stanovnika 40 L nasuprot 28 L), a vodeći čajevi od pojedinačnih biljaka bili su oni pripremljeni od lišća mente, ploda komorača i cvijeta kamilice (Habs i sur., 2017.)

Biljne infuzije općenito se percipiraju da su blagog djelovanja i bez nuspojava zbog duge povijesti uporabe raznolikih vrsta koje se koriste za svakodnevnu pripremu biljnih čajeva. Unatoč tome, ne mogu se zanemariti sigurnosna pitanja vezana uz dugotrajnu konzumaciju određenog lokalnog taksona. Primjerice, sigurnost svakodnevne upotrebe esencijalnih ulja i vodenih infuzija *Origanum vulgare* L. (mravinac) i *Thymus serpyllum* L. (poljski timijan) još uvijek nije znanstveno dokazana (Kulišić i sur., 2007., Santoro i sur. 2007.) Prema pregledu Singha i suradnika (2012.), biljka *C. asiatica* mogla bi uzrokovati oštećenje jetre, želučane tegobe, mučninu i pospanost. Osim toga, aktivni spojevi nekih biljaka mogu inhibirati enzime faze I i faze II reakcija biotransformacije i tako utjecati na metabolizam ksenobiotika, kao što su lijekovi (Chandrasekara i Shahidi, 2017.).

Konzumacija biljnog čaja ovisi o dostupnim prirodnim resursima, kulturnom i društvenom kontekstu, navici njegove upotrebe i osobnim preferencijama potrošača. Obično se biljni čaj uživa kao dodatak obroku, radi promicanja društvenih kontakata, za uživanje i opuštanje ili zbog njihovog općeg poimanja kao “zdravih” napitaka, a često, ovisno o tegobama, posežemo za specifičnim biljnim čajem (Sōukand i sur., 2013.).

Popis ljekovitih biljaka “Tea & Herbal Infusions Europe” sažetak je različitih biljnih materijala koji se konzumiraju kao sastojci hrane u biljnim čajevima i voćnim čajevima u Europi. Navodi nekoliko stotina biljaka i morfoloških dijelova biljaka koje se trenutno koriste u biljnim infuzijama (Habs i sur., 2017.). Biljke prikazane u tablici 1. koriste se u uobičajenom biljnim infuzijama, te kao biljni lijekovi.

**Tablica 1. Biljni čajevi i njihova primjena.** *Habs i sur., 2017.*

Biljka	Zdravstvene tegobe koje se liječe
Kamilica ( <i>Matricaria chamomilla</i> )	Probavne tegobe, nadutost, umor, nesanica
Cimet ( <i>Cinnamomum verum</i> )	Probavne tegobe, dijareja
Komorač ( <i>Foeniculum vulgare</i> )	Dispepsija, grčevi
Đumbir ( <i>Zingiber officinale</i> )	Dispepsija, nadutost, vrtoglavice, povraćanje, mučnine
Limunska trava ( <i>Melissa officinalis</i> )	Simptomi stresa, anksioznost, nesanica
Kopriva ( <i>Urtica dioica</i> )	Tegobe mokraćnog sustava
Paprena metvica ( <i>Mentha piperita</i> )	Probavne tegobe, bol u trbuhu, mučnine
Ružmarin ( <i>Rosmarinus officinalis</i> )	Dispepsija, grčevi u trbuhu
Valerijana ( <i>Valeriana officinalis</i> )	Nervoza, nesanica

U europskoj baštini, najvažnije biljke za spravljanje biljnog čaja koji se koristi u nemedicinske svrhe su iz porodice Lamiaceae i Asteraceae, dok su Rosaceae popularne samo u istočnoj i središnjoj Europi. Što se tiče botaničkih rodova, dominantni su *Mentha*, *Origanum* i *Thymus*, te *Tilia*, *Rubus* i *Matricaria*. Na razini vrsta, u većini europskih regija osobito se favorizira *Origanum vulgare* L. (mravinac) zatim *Rubus idaeus* L. (malina) i *Thymus serpyllum* L. (poljski timijan) u istočnoj Europi, *Rosa canina* L. (šipak) i *Hypericum*

*perforatum* L. (kantaron) u srednjoj Europi, te *Chamaemelum nobile* L. (rimska kamilica) u južnoj Europi (Sõukand i sur., 2012., Carvalho i sur., 2010.).

Većina biljaka, koje se koriste u lokalnoj narodnoj medicine, doživljavaju se kao ljekovito bilje. Popularne biljne infuzije koje se koriste u medicinske svrhe izrađuju se, između ostalog, od kamilice, cimeta, komorača, đumbira, matičnjaka, koprive, paprene metvice, ružmarina i valerijane (Habs i sur., 2017.) U modernoj praksi nije uvijek lako razlikovati biljni čaj koji se pije radi užitka od onoga koji ima ljekovitu vrijednost, a među europskim zemljama ne postoji niti usklađeni okvir koji bi razlikovao hranu u odnosu na medicinski proizvod. Općenito se može reći kako se čajeви obično svakodnevno konzumiraju u kontekstu hrane, dok se ljekovite infuzije uzimaju u određene medicinske svrhe (Sõukand i sur., 2013.). Stoga, se biljni napici pripremaju kako bi se održale poželjne karakteristike društvenog napitka, pa su slabijeg okusa, a zbog razrijeđivanja tijekom njihove pripreme sadrže bioaktivne spojeve u manjim količinama u odnosu na infuzije biljnih pripravaka namijenjenih upotrebi kao lijek. Za primjer, u tradicionalnom i ayurvedskom medicinskom sustavu Šri Lanke dekocije koje se koriste kao lijek pripremaju se kuhanjem osušenog ili svježeg bilja u 8 šalica vode dok se volumen ne smanji na jednu šalicu (Chandrasekara i Shahidi, 2017.). Osim toga, ljekoviti biljni čajeви konzumiraju se ograničen broj dana za liječenje određenog stanja (kašlja, crijevnih tegoba itd.), dok za biljne čajeve koji se konzumiraju u kontekstu hrane nema ograničenja u trajanju konzumacije (Sõukand i sur., 2013.).

### **2.2.2. Zdravstvene dobrobiti biljnih infuzija**

Topli medij vodenih infuzija olakšava otpuštanje isparljivih ulja, pa se tako tijekom konzumiranja biljnih čajeva olakšava inhaliranje komponenti koje mogu prijeći u krvotok kroz nazalnu anatomsku strukturu, kao što je primjer 1,8-cineola iz biljne infuzije ružmarina. Osim toga, tople vodene biljne infuzije su idealan nosač sastojaka topljivih u vodi, kao što su to neki mikronutrijenti i biološki aktivni sastojci i predstavljaju njihov dobar izvor u prehrani, što je

osobito značajno u područjima gdje je prehrana manje raznolika ili su voće i povrće nedostupni. Budući da se uobičajeno konzumiraju bez dodanog šećera ili mljeka, biljne infuzije ujedno su i dobar su način opskrbe organizma ovim vrijednim sastojcima bez unosa dodatnih kalorija. (Poswal i sur., 2019.).

Poimanje biljnih infuzija kao zdravih napitaka predstavlja sjecište prehranbenih i ljekovitih svojstava, koje su Pieroni i Quave (2006.) definirali kao „narodnu funkcionalnu hranu“. Ispijanje takvih čajeva se u nekim zemljama, kao što je Italija, doživljava kao prevencija ili liječenje, a ne kao aktivnost koja se upražnjuje radi druženja, opuštanja ili kao nadopuna obroku. Ipak, *Tilia* spp., jedan od najpopularnijih rodova za spravljenje biljnog čaja koji se od 1930-ih konzumira u prehranbenom, ne medicinskom kontekstu u Estoniji (Sõukand i sur., 2012.), ujedno je i najkorišteniji biljni takson za komplementarno liječenje prehlade i gripe u modernoj Estoniji (Raal i sur., 2013.). Tablica 2. prikazuje odabrane biljne napitke koji populacije diljem svijeta uobičajeno konzumiraju za postizanje optimalnog zdravlja kao i za smanjenje rizika od bolesti kao što su hiperglikemija, dislipidemija (Chandrasekara i Shahidi, 2017.).

**Tablica 2.** Odabrani biljni napici i vezane zdravstvene dobrobiti. Chandrasekara i Shahidi, 2017.

Lokalni naziv	Latinski naziv	Porodica lat. naziv	Zdravstvene dobrobiti
<b>Bilva, bengalska dunja</b>	<i>Aegle marmelos</i>	Rutaceae	Antikancerogena, antidislipidemija, antihiperglikemija, antidijabetska, antiupalna
<b>Matura čajevca, ranawara, avaram</b>	<i>Cassia auriculata</i>	Leguminosae	Antihiperglikemijska
<b>Planinska travnata trava</b>	<i>Aerva lanata</i>	Amaranthaceae	Antihiperglikemijska, antiupalna, ,
<b>Indijski sarsaparilla</b>	<i>Hemidesmus indicus</i>	Asclepiadaceae	Antioksidacijska, antitromboza
<b>Indijski ili azijski penivort</b>	<i>Centella asiatica</i>	Apiaceae	Antikancerogena, pojačava aktivnost antioksidacijskih enzima
<b>Kamilica</b>	<i>Matricaria chamomilla</i> , <i>Chamaemelum nobile</i>	Compositae	Antioksidacijska, hipokolesterolemična, antikancerogena, antiupalna
<b>Mjesečina ili guduči u obliku srca</b>	<i>Tinospora cordifolia</i>	Menispermaceae	Antidijabetska, antiupalna
<b>Sjetveni korijandar</b>	<i>Coriandrum sativum</i>	Apiaceae	Antioksidacijska, antibakterijska, hipokolesterolemična, antikancerogena, antiupalna

<b>Planinski čaj ili pastirski čaj</b>	<i>Sideritis condensate</i>	Lamiaceae	Antioksidacijska, antibakterijska
<b>Paprena metvica</b>	<i>Mentha piperita</i>	Lamiaceae	Antioksidacijska, antitumorna
<b>Mate</b>	<i>Ilex paraguariensis</i>	Aquifoliaceae	Hipokolesterolemična, zaštita jetre i krvožilnog sustava
<b>Ljekovita žalfija</b>	<i>Salvia officinalis</i>	Lamiaceae	Pojačava antioksidacijsku aktivnost jetre
<b>Pasja ruža, šipak</b>	<i>Rosa canina</i>		Antiupalna
<b>Engl. Rooibos, crveni grm</b>	<i>Aspalathus linearis</i>		Antioksidacijska, antikancerogena
<b>Afr. Borotutu</b>	<i>Cochlospermum angolensis</i>		Antikancerogena u području jetre, antioksidacijska
<b>Đumbir</b>	<i>Zingiber officinale</i>		Antiupalna, hipoglikemijska

Unatoč popularnosti i činjenici što je tradicija ispijanja biljnih čajeva ostavila saznanja o ljekovitosti, mali je broj znanstvenih radova koji istražuju kliničku učinkovitost i sigurnost tih napitaka.

Čaj od kamilice, jedan od najpoznatijih i najkonzumiranijih biljnih čajeva u Europi koji se priprema se od *Matricaria chamomilla* L. Asteraceae, u uporabi je još od davnina za ublažavanje simptoma peludne groznice, upala, menstrualnih tegoba, grčeva u mišićima, nesаницe, gastrointestinalnih poremećaja, reumatskih bolova, čireva i hemorioda (Srivastava i sur., 2010.). Istraživanja su pokazala da kod roditelja u šestom tjednu nakon poroda jedna šalica (300 ml) njemačke kamilice (*Matricaria chamomilla* L. Asteraceae) infuzirane do 15 minuta ima sedativno-hipnotički učinak poboljšavajući kvalitetu sna i simptome depresije nakon 2 tjedna potrošnje. Konzumacija 150 ml ove biljne infuzije tri puta dnevno tijekom 8 tjedana značajno smanjuje razinu serumskog inzulina, ukupnog kolesterola, triglicerida, LDL kolesterola i glikoziliranog hemoglobina (HbA1c) u odraslih s dijabetesom tipa 2 (Rafrat i sur., 2015.) McCay i Blumberg (2006) potvrđuju učinak snižavanja kolesterola čaja od kamilice i dodatno izvješćuju o anksiolitičkom djelovanju ove infuzije, dok su Zemestani i sur. (2015.), zabilježili povećanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta te aktivnosti antioksidacijskih enzima, superoksid-dizmutaze, glutation-peroksidaze i katalaze nakon 8 tjedana konzumacije čaja od njemačke kamilice. Uz čaj od kamilice veže se i moguć utjecaj na apsorpciju i metabolizam ugljikohidrata obzirom je pokazano da inhibira neke hidrolitičke probavne enzime



i prijenosnike monosahirida, GLUT2 i GLUT5 (Villa-Rodriguez i sur., 2017.), a istraživanja na grčkoj populaciji pokazala su da redovita konzumacija čaja od kamilice smanjuje rizik od karcinoma i bolesti štitnjače (Riza i sur., 2015.).

Svakodnevna konzumacija 200 ml čaja od matičnjaka (*Melissa officinalis* L. Lamiaceae) više od 6 tjedana značajno smanjuje krutost arterija i poboljšava elastičnost kože lica (Yui i sur., 2017.). Infuzija matičnjaka (100 ml) konzumirana dva puta dnevno tijekom više od 30 dana kod radioloških djelatnika povećava plazmatsku aktivnost katalaze, superoksid-dizmutaze i glutation-peroksidaze, štiteći od oksidacijskog stresa, a istovremno smanje aktivnost mijeloperoksidaze, i opseg lipidne peroksidacije i oštećenja DNA (Zeraatpishe i sur., 2011.).

Pored kamilice, čaj od metvice jedan od često konzumiranih biljni čajeva. Njegova konzumacija (dvije šalice dnevno tijekom 30 dana) značajno smanjuje razinu ukupnog i slobodnog testosterona, a povećava onu luteinizirajućeg hormona i folikul-stimulirajućeg hormona kod žena s razvijenom prekomjernom dlakavošću (Grant, 2010). O sličnim učincima izvješćuju (Akdogan i sur., 2007.), što implicira da čaj od metvice ima antiandrogena svojstva. Svakodnevna konzumacija čaja od sorti metvice s visokim udjelom ružmarinske kiseline i komercijalnog čaja od metvica tijekom 16 tjedana značajno je poboljšala simptome ukočenosti i tjelesnog invaliditeta kod ispitanika s osteoartritisom koljena, ali samo je čaj s visokim udjelom ružmarinske kiseline značajno je smanjio bol (Connelly i sur., 2014.). U laboratorijskim istraživanjima utvrđeno je da je čaj od metvice učinkovit inhibitor upale posredovane lipopolisaharidom u eksplantatima hrskavice (Pearson i sur., 2010), što sugerira potencijalne protuupalne učinke (Arumugam i sur., 2008).

Osim za liječenje prehlade i gripe, primjena čaja od šipka (*Rosa canina* L. *Rosaceae*) za ublažavanje menstrualnih bolova dio je tradicionalnih narodnih znanja (Tseng i sur., 2005.). U šestomjesečnom istraživanju adolescentica s primarnom dismenorejom (menstrualni grčevi),

ustanovljeno je da 2 šalice čaja od šipka dnevno (svaka 300 ml), koje su konzumirane 1 tjedan prije i 5 dana nakon početka menstruacije smanjuje percepciju menstrualne boli i tjeskobe i doprinose psihofiziološkoj dobrobiti u usporedbi s placebo (Tseng i sur., 2005.), što sugerira da bi čaj od šipka mogao biti učinkovita nefarmakološka strategija za žene sa spomenutim tegobama. U bolesnika s hipertenzijom i dijabetičara s hipertenzijom pokazalo se da čaj od hibiskusa smanjuje krvni tlak (Mckay i sur., 2009., Mozaffari-Khosravi i sur., 2009.).

Učinci konzumiranja biljnog čaja na zdravlje su bili predmet istraživanja koja su promatrala povezanost s rizikom tijekom trudnoće. U kanadskom istraživanju, konzumacija biljnog čaja nije bila povezana s povišenjem razine teških metala i pesticida u majčinoj krvi. Usto, primijećena je blago povišena razina olova kod osoba koje piju biljni čaj u usporedbi s onima koji ne piju, ali su te vrijednosti bile unutar prihvatljivih nacionalnih standarda. (Colapinto i sur., 2016., Colapinto i sur., 2015.)

U ostalim područjima ženskog zdravlja čajevi od koprive i piskavice poboljšali su proizvodnju majčinog mlijeka, a čaj od piskavice dodatno je pokazao učinak poboljšanja porasta na težini novorođenčadi. (Turkyilmaz i sur., 2011., Kavurt i sur., 2013.).

Potencijalne dobrobiti konzumacije biljnih infuzija na mentalno zdravlje zabilježene su kod kineskih učenika osjetljivi na stres kada su, u stresnom periodu, bili posebno emocionalno povučeni (Chio i sur., 2015.). Pokazano je da je u usporedbi sa zelenim ili crnim čajem konzumacija biljnog čaja povezana s manjim rizikom od krutosti tkiva jetre koja je klinički pokazatelj fibroze ili masne bolesti jetre (Alferink i sur., 2017.). U jednom istraživanju razmatrana je primjena čaja za ublažavanje simptoma zaraznih bolesti, izvještavajući o prednostima čaja od ehinacee kod prehlade i gripe (Lindenmuth GF. i Lindenmuth EB., 2000.).

U istraživanju učinaka temperature pića na fiziološke reakcije, hladni čaj od yerba maté (južnoamirečki napitak) promijenilo osjetljivost srčanog barorefleksa, oksidaciju masti i

potrošnju energije, ali nisu zabilježene razlike između toplog ili hladnog čaja u pogledu utjecaja na krvni tlaka i minutni volumen srca (Maufrais i sur., 2018.).

Primijećeno je i smanjenje tjelesne težine u grupi dobrovoljaca koji su pili čaj priređen od mješavine biljaka *Garcinia cambogia* (kambodžanska garcinija), *Commiphora mukul* (indijski bdelij) i *Cyperus scariosus* (kasni oštrik) (Vidya i sur., 2002.).

### **2.2.3. Kemijski sastav biljnih infuzija**

Biljne infuzije su nutritivno vrijedni i nisko kalorični napici koji su izvor su makronutrijenata, slobodnih šećera (fruktoza, glukoza, saharoza), organskih kiselina, aminokiselina, vitamina i minerala (Olennikov i sur., 2019., Pereira i sur., 2015).

Farmakološka i nutritivna svojstva biljaka koje se koriste za pripremu biljnih infuzija određuje jedna ili više aktivnih tvari koje sadrži (Sõukand i sur., 2013). Utjecaj biljnih infuzija na pojedine aspekte zdravlja dijelom se pripisuje liposolubilnim vitaminima A i E, u vodi topljivom vitaminu C te širokom rasponu biološki aktivnih sastojaka (Ivanova i sur., 2004.).

Biološki aktivni biljni sastojci, poznati i kao fitokemikalije, su sekundarni biljni metaboliti koji nisu neophodni za rast, razvoj i li razmnožavanje biljke, već sudjeluju u interakciji biljke s okolišem. Za neke od njih se došlo do saznanja da biljkama služe kao obrambeni mehanizam protiv bolesti, predatora, ultraljubičastog zračenja, parazita i oksidansa, a pojedini spojevi služe i kao privlačni mirisi i daju određenu boju biljci, što doprinosi razmnožavanju biljke njenom prživljavanju putem prirodne selekcije (Zhao i sur., 2015.). U biljkama, kemijski sastav bioaktivnih spojeva ovisi o načinu uzgoja i vremenu berbe biljke, dijelovima biljke koji se koriste, te o načinu njihova skladištenja (Rogić Renata, 2014.). U organizmu ljudi biološki aktivni sastojci nemaju nutritivnu vrijednost, ali-ukoliko su prisutni u odgovarajućoj količini-mogu povoljno utjecati na jednu ili više funkcija organizma na način koji doprinosi dobrom zdravlju. Stoga se u brojnim prehrambenim vodičima ukazuje na značaj

njihove konzumacije, premda za ove sastojke još nisu određene RDA i DRI vrijednosti (Jašić, 2010.).

Konzumacija biljnih napitaka dobiva na popularnosti upravo vođena činjenicom da su izvori bioaktivnih spojeva s raznovrsnim spektrom bioloških učinaka, u opsegu od antibakterijskog, antioksidacijskog, protuupalnog, antialergijskog, antitrombotičkog i vazodilacijskog djelovanje do antimutagenih i antikancerogenih učinaka, a ovi sastojci povezuju se i spriječavanjem ili umanjivanjem učinaka starenja (Chandrasekara i Shahidi, 2018).

Među mnoštvom bioaktivnih sastojak u biljnom infuzijama izdvajaju se saponini, alkaloidi i heterogena skupina sastojaka s antioksidacijskim djelovanjem u koje se ubrajaju karotenoidi, poliacetileni i fenolni sastojci

**Karotenoidi** su biljni pigmente žute, narančaste i crvene boje. Jedni od predstavnika iz ove skupine su karoteni - izoprenoidi čija je osnova 40 ugljikovih atoma u 8 izoprenskih jedinica, a takva struktura može biti ciklizirana na oba kraja. Karotenoidi koji strukturi dodatno sadržavaju funkcionalne grupe s kisikom nazivaju se ksantofili. U ljudskoj prehrani bitni su  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten i likopen a iz podskupine ksantofila lutein, zeaksantin, kriptoksantin, kantaksantin, astaksantin i fukoksantin. Od navedenih,  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten i  $\beta$ -kriptoksantin su provitamin vitamina A jer sadržavaju u svojoj strukturi  $\beta$ -iononski prsten (Chandrasekara i Shahidi, 2017.). Zbog konjugiranog sustava dvostrukih veza u molekuli,  $\beta$ -karoten i likopen odlikuju se antioksidacijskim djelovanjem. Mogu ukloniti slobodne radikale u izravnoj reakciji i odlikuju se sposobnošću „gašenja“ singletnog kisika (Mandić Vedrana, 2017.)

**Alkaloidi** broje više od 5000 spojeva u skupini (*Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje.*), Osnova alkaloidne strukture jesu dva šesteročlana ugljikova prstena koji dijele jedan atom dušika (Šatović, 1993.). U biljkama se mogu naći u formi estera gdje je esterska grupa benzojeva, cinamična, *p*-hidroksicinamična i ferulična kiselina (Šatović, 1993.). Jedni od

poznatih biljnih alkaloida jesu morfin iz opijuma, atropin iz velebilja i kofein iz kave i čaja pripremljenog iz biljke *Camellia sinensis*.

**Terpenoidi** su sekundarni metaboliti koji nastaju polimerizacijom izoprenskih jedinica. Dijele se po broju izoprenskih jedinica na hemiterpene s jednom izoprenskom jedinicom (C5), na monoterpene (C10), seskviterpene (C15), diterpene (C20), sesterpene (C25), triterpene (C30), karotenoide (C40) i politerpene dugim izoprenskim lancima (Chandrasekara i Shahidi, 2017.).

**Saponini** su posebna skupina glikozida koji u svojoj kemijskoj strukturi uz lanac šećera sadrže i policikličke terpeneske, steroidne ili steroid-alkaloidne jedinice. Osnovu strukture čini aglikon koji je na trećem ugljikovom atomu povezan s lancem šećera. Sadrže lipofilni i hidrofilni dio te kao takvi imaju osobine emulgatora. Topljivi su u vodi i nakon hidrolize nastupa membranaska aktivnost koja označava da imaju sposobnost razaranja stanične membrane. U biljkama saponini dolaze najčešće u obliku fiziološki inertnih furostanol-glikozida odnosno triterpenskih saponina (Šošević, 2012.)

**Poliacetileni** sadrže trostruke ugljikove veze ili alkinilnu funkcionalnu grupu. Alifatski C17-poliacetileni kao što su falkarinol i falkarindiol su široko rasprostranjeni u porodicama štitarki i bršljana. Falkarinoli su formirani iz oleinske kiseline dehidrogenacijom koja je dovela do formiranja C18 acetilen-krepenične kiseline i dehidrokrepenične kiseline, koje su potom transformirane u C17 acetilene putem  $\beta$ -oksidacije. Sve više se istražuju zdravstvene dobrobiti poliacetilena te je pokazano da biljke kao *Panax quinquefolium* (američki ginseng), *Peucedanum praeruptorum* (pukovica), *Echinacea pallida* (svijetlocvjetna rudbekija), *Bupleurum spinosum* i *Atractylodes lancea* sadrže poliacetilene (Chandrasekara i Shahidi, 2017.).

U većini istraživanja, antioksidacijski kapacitet biljnih infuzija koreliran je s udjelom fenolnih sastojaka te će se u nastavku pobliže opisati njihova kemijska struktura, izvori i antioksidacijska svojstva.

### **2.2.3.1. Fenolni sastojci**

Fenolni sastojci su velika skupina spojeva čija je osnova benzenski prsten na koji je vezana hidroksilna skupina (-OH) (Petreski, Novosel, 2010.). Prema biogenetskom putu sinteze mogu se definirati kao sastojci s jednom (jednostavni fenoli) ili više hidroksilnih (polifenoli) skupina na aromatskoj jezgri koji se sintetiziraju sekundarnim metabolizmom, na fenilpropaidnom putu šikimata ili poliketidnom acetat/malonatnom putu, prikazano na slici 2. (Visioli i sur., 2000.).

Hidroksilne skupine fenolnih sastojaka mogu biti metoksilirane i glikozidirane s monosaharidima, oligosaharidima, često sadržavaju acilne skupine te su sklone umrežavanju i polimerizaciji. Po broju hidroksilnih skupine dijele se na mono-, di-, tri- i polifenole. Kako se vidi na slici 3., prema kemijskoj strukturi dijele se na flavonoide i neflavonoide (Whale i sur., 2010.).

Fenolni sastojci su podijeljeni i s obzirom na broj fenolnih prstena u strukturi. Glavna je podjela na fenolne kiseline, flavonoide, stilbene lignane i kumarine (slika 4. i slika 5.).

#### **Fenolne kiseline**

U hrani su najznačajnije C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> fenolne kiseline od kojih galna kiselina kao prekursor u sintezi hidrolizirajućih tanina, C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> hidroksicinamata i njihovih deriviranih konjugata, i polifenolnih C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> stilbena. (Crozier i sur., 2009.). Razlikuju se dvije vrste fenolnih kiselina- derivati benzojeve kiseline i derivati cinamične kiseline. Đumbir obiluje fenolnim kiselinama (Manach i sur., 2004.).

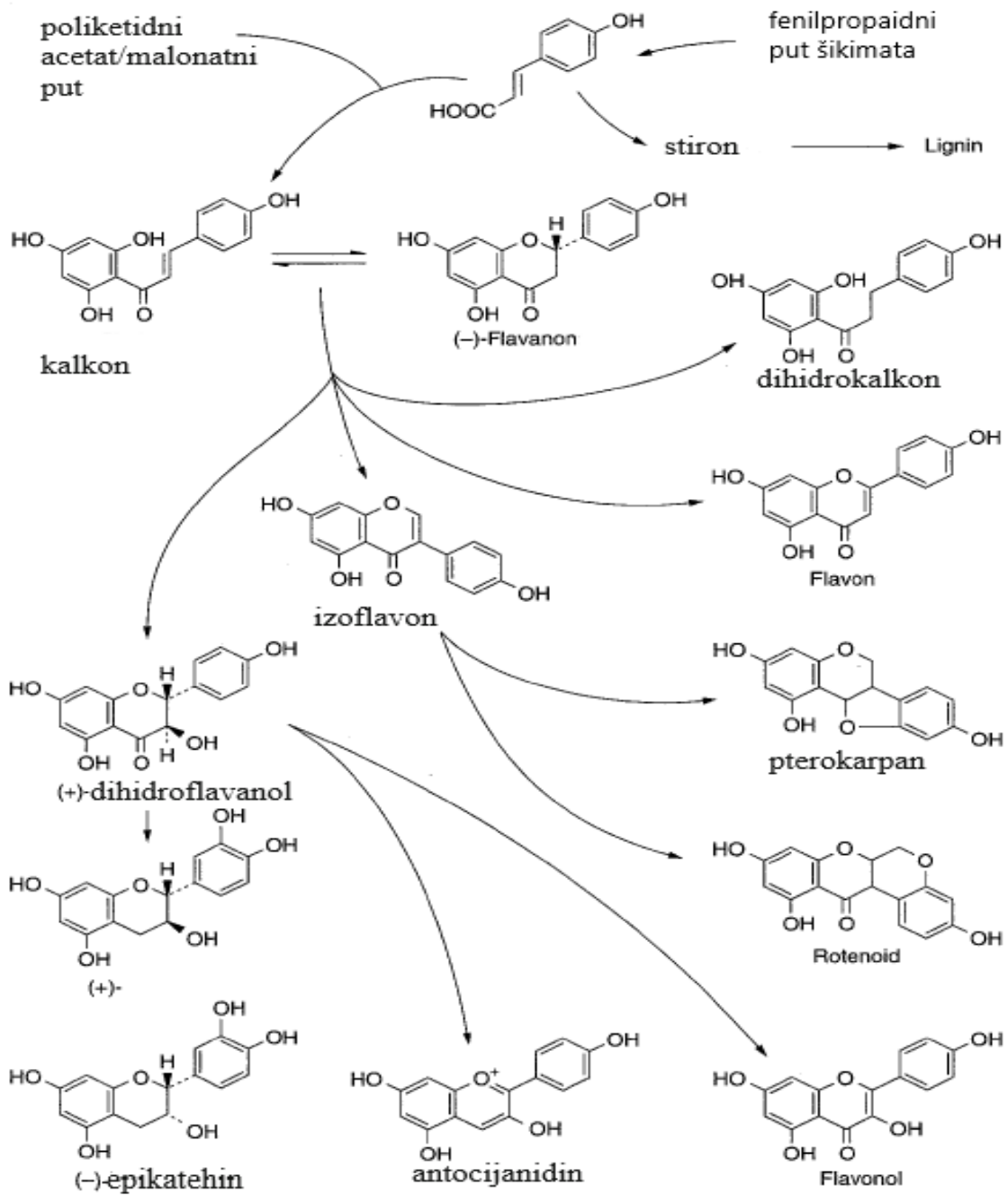
#### *Hidroksibenzojeve kiseline*

Za jestivo bilje, najistaknutije su galna kiselina, koja se pojavljuje kao ester šećera u galotanimima kao npr. 2-O-digaloiltetra-O-galoil-glukoza, p-hidroksibenzojeva, vanilinska i

siringinska kiselina. Najznačajniji izvor galne kiseline su svježi listovi čaja (Crozier i sur., 2009., Mandić Vedrana, 2017.). Hidroksibenzojeve kiseline su komponente kompleksnih struktura kao što su tanini. U hrani mogu biti u slobodnom ili esterificiranom obliku. (Manach i sur., 2004.)

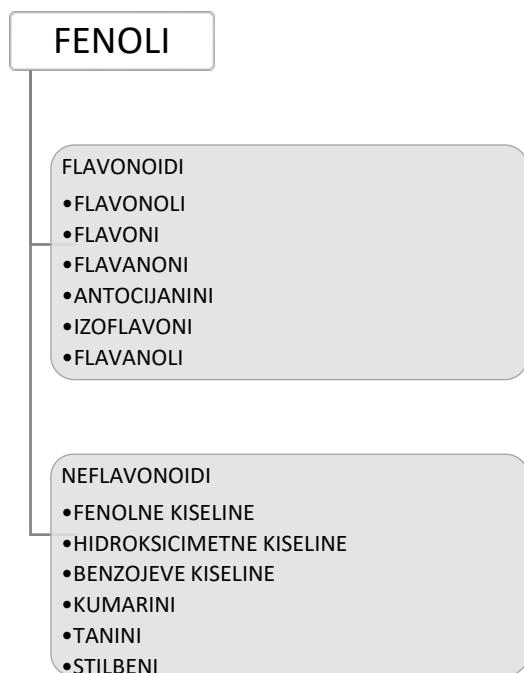
#### *Hidroksicinamične kiseline*

Hidroksicinamične kiseline su zastupljenije od hidroksibenzojevih kiselina. Dije se na *p*-kumarinske kiseline, kafeinske, ferulne i sinapinske kiseline. Ove se kiseline rijetko pronalaze u slobodnoj formi, osim u prerađenoj hrani koja je bila podvrgnuta zamrzavanju, sterilizaciji i fermentaciji. Glavni predstavnik je kavena kiselina koja u kavi dolazi kao ester s kinskom kiselinom, poznata kao oklorogenska kiselina (Manach i sur.,2004.).

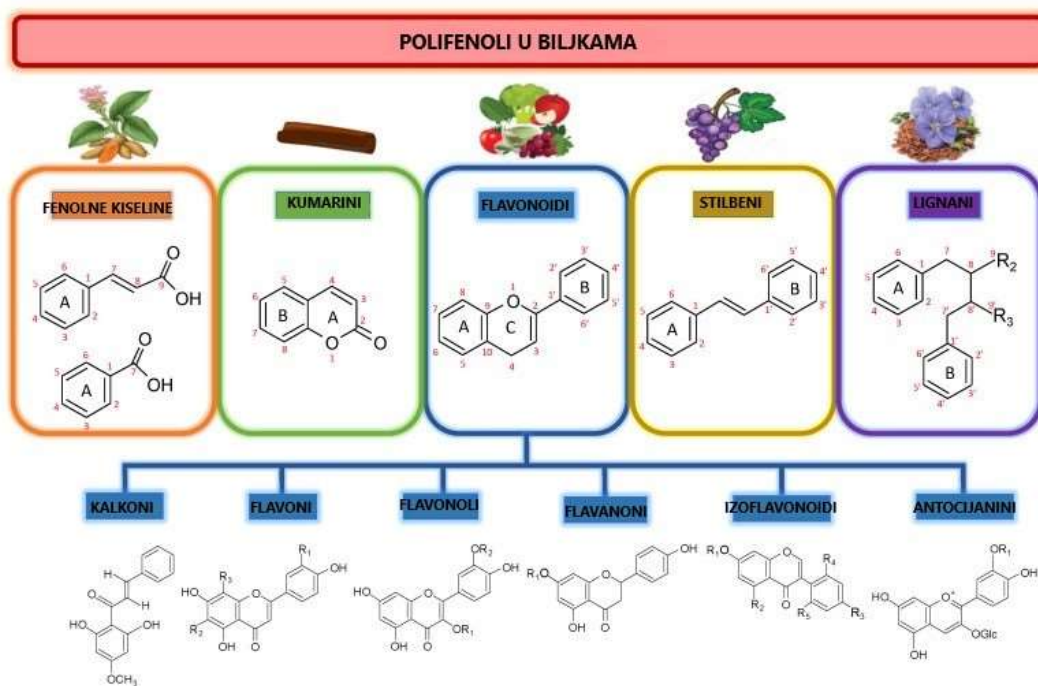


Slika 2. Princip biosinteze flavonoida. *Rice-Evans i sur., 1997.*





Slika 3. Podjela fenola prema kemijskoj strukturi. *Whale i sur., 2010.*



Slika 4. Klasifikacija fenolnih sastojaka. *Hano i Tungmannithum, 2020.*

**Kumarini** su po svojoj kemijskoj strukturi laktoni derivata cis-*O*-hidroksicinamične kiseline, a dolaze kao glikozidi ili u aglikonskom, slobodnom obliku (Chandrasekara i Shahidi, 2017.). Zbog postojanja 6 položaja na prstenastoj strukturi na kojima se može vršiti supstitucija postoje mnogi derivati (Molnar i sur., 2011.). Kumarini imaju ugodan miris vanilije (Molnar i sur., 2011.), a u hrani su pronađeni jednostavni kumarini, furanokumarini i piranokumarini (Chandrasekara i Shahidi, 2017.).

### **Lignani**

Osnovu strukture lignana čine 2 fenilpropanske jedinice. Najbogatiji izvor lignana su lanene sjemenke (Manach i sur, 2004.).

### **Stilbeni**

Stilbeni imaju C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> strukturu, te spadaju u fitoaleksine koje biljke produciraju kao odgovor na bolesti ili oštećenja (Crozier i sur., 2009.). Najpoznatiji predstavnik stilbena je *trans*-resveratrol (ima ga u crvenom grožđu), koji je poznat po tome što ga se povezuje s „francuskim paradoksom“ (Manach i sur,2004.).

**Flavonoidi**, čije glavno strukturno obilježje čine 2 aromatska prstena koja su povezana sa 3 ugljikova atoma, međusobno su podijeljeni u 6 podvrsta, ovisno o heterociklu kojeg sadrže kako slijedi: flavonoli, flavoni, izoflavoni, flavanoni, antocijanini i flavanoli (katehini i proantocijanidi) (Manach i sur., 2004.).

### **Flavonoli**

Od flavonoida, flavonoli su najčešći u hrani i glavni predstavnici te skupine su kvercetin i kaempferol. Zastupljeni su u glikoziliranom obliku (često sa glukozom, ramnozom, galaktozom, arabinozom, glukuronskom kiselinom). Relativno su zastupljeni u manjim udjelima, od 15 do 30 mg po kg. Najbogatiji izvor je luk, koji može sadržavati do 1.2 g po kg. Sinteza flavonola ovisi o sunčevom svjetlu, zato je njihova koncentracija veća u vanjskim

dijelovima biljke i lišću. Istraživanja su pokazala da koncentracija flavonola u voću iste vrste može varirati ovisno o izloženosti sunčevom svjetlu, uz to, veća je koncentracija u povrću koje je uzgajano na vanjskim poljima nego u onima pod umjetnim svjetlom (Manach i sur., 2004.).

### **Flavoni**

Najčešći su glikozidi luteolina i apigenina. Najznačajniji izvor u prehrane je celer i peršin (Manach i sur.,2004.).

### **Flavanoni**

U citrusnome voću ih ima najviše. Glikozilirani su disaharidima i daju biljkama gorki okus, kao oni u grejpfrutu (Manach i sur., 2004.).

### **Izoflavoni**

Strukturno slični estrogenom hormonu, iako nisu steroidi imaju hidroksilnu grupu na položajima 7 i 4' slično kao u estradiolnoj molekuli. Ovo svojstvo im omogućuje ponašanje slično hormonima i vezivanje na estrogene receptore u stanici te od tuda i naziv fitoestrogeni. Izvor su mahumarke poput soje (Manach i sur.,2004.).

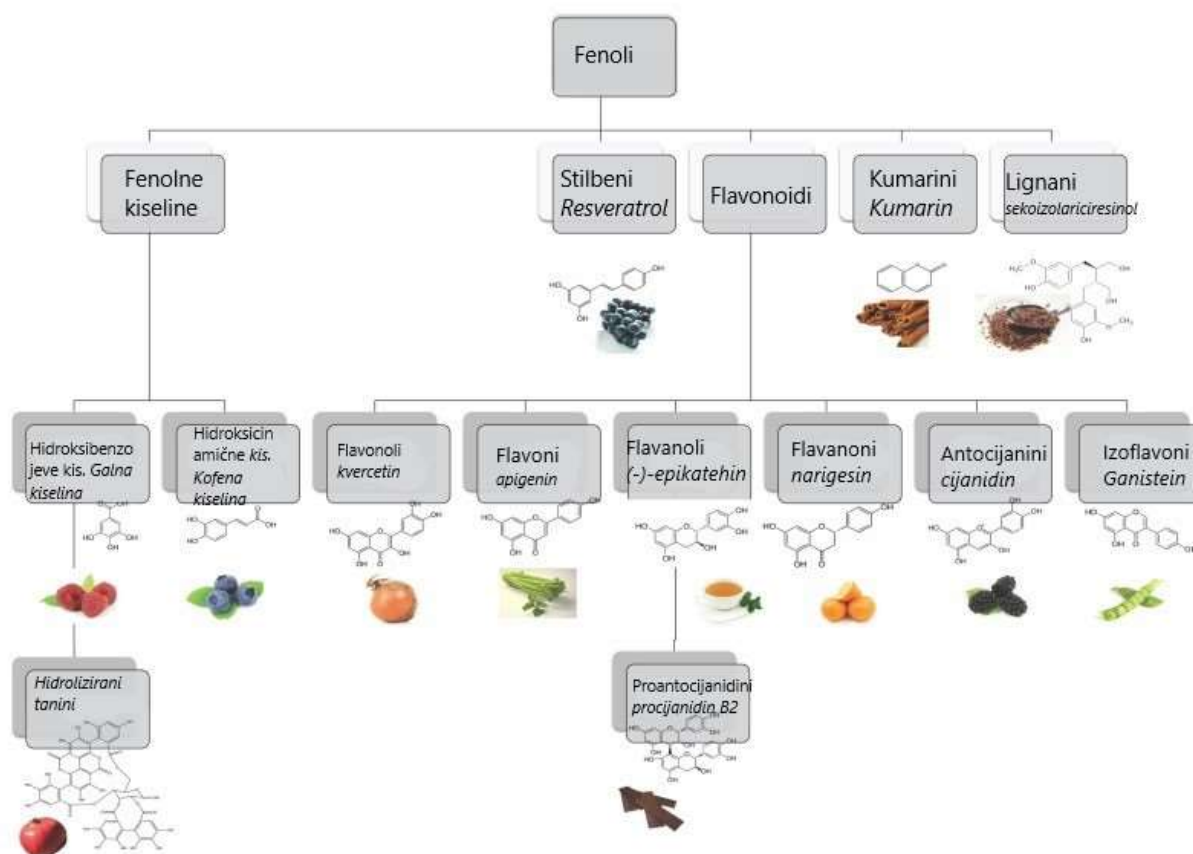
### **Flavanoli (flavan-3-oli)**

Flavanoli se nalaze najviše u lišću biljaka. (Mandić Vedrana, 2017.) Dolaze u monomernome obliku, kao što je to (+)- katehin i njegov izomer (-)-epikatehin, te u polimernom obliku-proantocijanidi.

Katehini su pronađeni u mnogim vrstama voća, crnom vinu, ali najviše u zelenom čaju, pogotovo epigalokatehini ( 200 mg/L). Za razliku od ostalih flavonoida, flavanoli nisu u hrani u glikoziliranom obliku, i takva struktura olakšava održavanje stabilnosti i pri višim temperaturama dok god je pH u kiselom području (Manach i sur.,2004.).

Proantocijanidi –poznati kao kondenzirani tanini, jesu dimeri, oligomeri i polimeri flavan-3-ola (popu katehina i epikatehina) i flavan-3,4-diola koji su međusobno povezani između četvrtog i šestog, ili četvrtog i osmog ugljikova atoma.

Glikozidni oblici antocijanidina - antocijanini su pigmenti u epidermalnom tkivu cvijeća i voća koji daju biljkama ružičastu, crvenu, plavu i ljubičastu boju. Vrlo su osjetljivi na promjene pH, svjetlost i oksidirajuće uvjete (Manach i sur,2004.).



**Slika 5. Glavne skupine polifenola, njihova struktura i spojevi koji predstavljaju skupinu i primjeri izvora hrane. Figuera i sur., 2015.**

### 2.2.3.2. Fenolni sastojci u biljnim infuzijama

Kao što je i sama skupina fenola raznolika tako je i udio i sadržaj vrsta fenola različit od jedne biljne vrste do druge. No, bitna karakteristika biljka koje se koriste u pripremi biljnih čajeva/infuzija, je ta da udio fenolnih komponenti nije zanemariv.

Osnovni koraci u analizi fenolnih sastojaka u biljnim infuzijama su ekstrakcija iz matriksa, kromatografsko razdvajanje i kvantitativno određivanje.

Kako bi biljne infuzije u što većoj mjeri odgovarale pripremi u domaćinstvu, najčešće se pripremaju postupkom vodene ekstrakcije biljnog materijala pa stoga nekoliko čimbenika može utjecati na sadržaj fenolnih spojeva u infuzijama, kao što je način pripreme (prerada biljka, koncentracija infuzija, vrijeme i temperatura infuziranja), sama biljka (vrsta, korišteni dio, stadij razvoja), karakteristike uzgoja (tlo, klima, abiotski stres) i metoda analize (Moraes-de-Souza i sur., 2008.).

Premda je kromatografsko razdvajanje u sprezi s detektorima visoke selektivnosti, kao što je maseni detektor, jedan od najboljih pristupa za odjeljivanje i određivanje pojedinih fenolnih sastojaka izdvojenih ekstrakcijom, za kvantitativno vrednovanje sadržaja ukupnih fenolnih sastojaka, kako u znanstvenom kontekstu, tako i u industrijskoj praksi (u okviru kontrole hrane i pića, dodataka hrani i biljnih pripravaka) koristi se Folin–Ciocalteu-ova kolorimetrijska metoda (Carrasco-Pancorbo i sur. 2005). Metodu se izvorno razvili Singleton i Rossi (1965.), a temelji se na redukciji fosfotungstata ( $H_3P [W_3O_{10}]_4$ ) u alkalnoj otopini u što prati pojava plavog obojenja otopine. Apsorbancija ove otopine proporcionalna je broju aromatskih fenolnih skupina i koristi se za njihovu kvantifikaciju, uz različite standarde. Obzirom se metoda temelji na određivanju kapacitetu redukcije ovih sastojaka u odnosu na neki standard, određivanje razine ukupnih fenola u infuzijama prema Folin–Ciocalteuovoj metodi nije apsolutna mjera njihove koncentracije u materijalu (Katalinić i sur., 2004). Osim toga, kapacitet redukcije fenolnih spojeva ovisi o broju i položaju fenolnih hidroksilnih skupina i veći je kada su dvije

fenolne hidroksilne skupine orijentirane u *ortho*- ili *para*- položaju. Neke molekule, međutim, ne reagiraju s Folin-Ciocalteu-ovim reagensom. jer ne posjeduju odgovarajuće funkcionalne skupine, uključujući kateholne ostatke, pa je Folin-Ciocalteu-ova metoda korisna za približno određivanje sadržaj ukupnih fenola (Annunziata i sur., 2018.).

Značajan doprinos na području istraživanja fenolnog profila biljnih infuzija dali su Katalinić i sur. (2004.) koji su Folin–Ciocalteu-ovom metodom uz (+)-katehin kao standard odredili ukupan sadržaj fenola u 70 infuzija ljekovitih biljaka tržišno dostupnih u ljekarnama u Hrvatskoj, a dobivene vrijednosti bile su u rasponu od 9 mg katehin ekvivalenata / L infuzije do 2218 mg katehin ekvivalenata / L infuzije. Između ispitivanih infuzija, najveći udjel fenolnih sastojaka (> 2000 mg katehin ekvivalenata / L), zabilježen je u infuzijama *Melissae folium*. U nekoliko je biljnih infuzija sadržaj ukupnih fenola iznosio manje od 1000 mg katehin ekvivalenata / L, kako slijedi *Spirae herba* (suručiva) > *Uvae ursi folium* (crveno medvjede grožđe) > *Rubi fructose folium* (kupina). Infuzije biljaka u navednom slijedu: *Althaeae radix* (pitomi sljez) < *Cetrariae lichen* (islandski lišaj) < *Foeniculi fructus* (obični komorač) < *Pheseoli pericarpum* (divlji grah) < *Visci albi herbe* (bijela imela), odlikovale su se najnižim udjelom fenolnih sastojaka, manjim od 100 mg katehin ekvivalenata / L.

Promatrajući utjecaj temperature i vremena infuzije na sadržaj fenolnih sastojaka u infuziji *Melissae folium*, isti autori ustanovili su da se fenolni sastojci brzo oslobađaju iz biljnog materijala u infuzijama pripremljenim kako u vrućoj (90 °C), tako i u hladnoj (20 °C) vodi, premda je u vrućim infuzijama određen veći udjel fenola. Tako se 94% u vodi topljivih fenolnih sastojaka oslobađa se iz biljnog materijala približno 10 minuta nakon pripreme infuzije u vrućoj vodi (u uvjetima određivanja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom).

Slično, Horžić i sur.(2009) izvješćuju da se iz biljnog materijala lipe i kamilice, kupljenih na lokalnoj tržnici u Hrvatskoj i infuziranih 3 minute na 60° C, 80° C i 100° C, pri višoj temperaturi vode ekstrahira više ukupnih fenolnih sastojaka i ukupnih flavonoida iz

biljnog materijala, a njihova vrijednost u infuzijama je najviša pri temperaturi vode od 100 °C. Pri tome, sadržaj ukupnih fenolnih sastojaka i ukupnih flavonoida u bilnim infuzijama kamilice i posebno lipe bio je značajno niži u usporedbi s vrijednostima zabilježenim za bijeli, Oolong i zeleni čaj, među kojima je ovaj posljednji prepoznat kao njihov najznačajniji izvor. Za usporedbu, u zelenom čaju sadržaj ukupnih fenolnih sastojka iznosi je 1380 mg ekvivalenata galne kiseline / L pri 60° C i 1830 mg ekvivalenata galne kiseline / L na 100° C), a sadržaj flavonoida bio je 1070 mg ekvivalenata galne kiseline / L na 60° C i 1280 mg ekvivalenata galne kiseline / na 100° C, dok je u infuzijama lipe na 80° C sadržaj ukupnih fenola iznosio 230 mg ekvivalenata galne kiseline / L, a sadržaj ukupnih flavonoida 65 mg ekvivalenata galne kiseline / L. Pored toga, ustanovljeno je da se višestrukom ekstrakcijom biljni materijal iscrpljuje na ovim sastojcima, pa je posljedično sadržaj fenolnih sastojaka i flavonoida, a ponajviše flavan-3-ola, u biljnim infuzijama nakon treće ekstrakcije zanemariv. U biljnoj infuziji lipe na 80° C u najvišem udjelu detektirani su pojedinačni katehini (-)-galokatehin, (-)-epigalokatehin, (-)-epigalokatehin-galat, a na 60° C (-)-epikatehin (EC). S druge strane, u biljnoj infuziji kamilice pri istoj temperaturi u najvišem udjelu detektirani su i (-)-epigalokatehin-galat i (-)-epikatehin-galat. U obje infuzije sadržaj ovih sastojaka bio je niži u odnosu na čaj. Među ostalim pojedinačnim flavonoidima, detektirani su flavan-3-ol i fenolne kiseline, iako u nižem udjelu u odnosu na flavan-3-ol, a na njihov udjel jednako tako značajno je utjecala temperatura vode i višestruka ekstrakcija. Od fenolnih kiselina, U infuziji lipe određeni su vanilijska kiselina i kavena kiselina te klorogena, *p*-kumarna, ferulinska i kavena kiselina u infuziji kamilice.

Od 21 ljekovite biljne vrste koja se tradicionalno koristi u Bugarskoj za pripremanje biljnih infuzija, identificirano je sedam vrsta koje se odlikuju značajnim sadržajem fenolnih sastojaka, značajno višim u odnosu na onaj izmjereno za mate, zeleni i crni čaj. Dobivene vrijednosti bile su u rasponu  $40.49 \pm 0.74 \mu\text{M}$  kvercetin ekvivalenata (*Cetraria islandica* (L.)

Ach.) do  $1653.61 \pm 11.52 \mu\text{M}$  kvercetin ekvivalenata). U skladu s rezultatima Katalinić i sur. (2004.), između tih vrsta izdvaja se *Melissa officinalis* L. ( $1370,09 \pm 41,38 \mu\text{M}$  kvercetin ekvivalenata), a preostalih šest su: *Pulmonaria officinalis* L. ( $673,39 \pm 9,92 \mu\text{M}$  kvercetin ekvivalenata), *Hypericum perforatum* L. ( $881,93 \pm 6,68 \mu\text{M}$  kvercetin ekvivalenata), *Agrimonia eupatoria* L. ( $702,29 \pm 6,82 \mu\text{M}$  kvercetin ekvivalenata), *Origanum vulgare* L. ( $1653,61 \pm 11,52 \mu\text{M}$  kvercetin ekvivalenata), *Rubus sp. diversa* ( $608,95 \pm 5,95 \mu\text{M}$  kvercetin ekvivalenata), *Cotinus coggygria* Scop. ( $923,33 \pm 14,19 \mu\text{M}$  kvercetin ekvivalenata) (Ivanova i sur., 2005.).

Na tragu ovih rezultata su istraživanja 13 biljnih vrsta komercijalno dostupnih u specijaliziranim trgovinama čaja. Sadržaj ukupnih fenolnih sastojaka bio je u rasponu od  $105 \pm 4$  mg ekvivalenata galne kiseline/L (lišće masline) do  $962 \pm 6$  mg ekvivalenata galne kiseline/L. Istraživanja su potvrdila da je vodena infuzija majčine dušice (*Melissae folium*;  $962 \pm 6$  mg ekvivalenata galne kiseline/L) jedan od najistaknutijih izora fenolnih sastojaka, a slijede paprena metvica (*Menthae piperitae folium*;  $591 \pm 25$  mg ekvivalenata galne kiseline/L), lišće kupine (*Rubi fruticosi folium*;  $559 \pm 12$  mg ekvivalenata galne kiseline/L) te lipa (*Tiliae flos*;  $409 \pm 1$  mg ekvivalenata galne kiseline/L) (Gorjanović i sur., 2012.).

Analizom ukupnih fenolnih sastojaka u infuzijama pripremljenim sa svježim biljaka i prerađeni čajem koje konzumira brazilsko stanovništvo ustanovljen je njihov najveći sadržaj u infuzijama iz prerađenih čajeva u odnosu na one sa svježim biljkama, izuzev infuzije od matičnjaka za koju među svježim biljem karakterizira najveći sadržaj ukupnih fenolna ( $> 10$  mg/g), a potom ju slijedi infuzija paprene metvice, metvice i komorača, dok u limunskoj travi fenolni sastojci nisu detektirani. Među infuzijama pripremljenim korištenjem prerađenih čajeva (kamilica, komorač, anis, limunska trava, matičnjak paprena metvica i metvica), samo su komorač i anis imali vrijednosti ispod 10 mg/g. HPLC analizom identificirani su mircetin i kvercetin u svim infuzijama, osim u onoj od anisa, u kojoj nije detektiran niti kempferol, flavonoid koji je pored kvercetina zastupljen i u crnom i zelenom čaju i čaju od kamilice i to u



opadajućem slijedu, od prvog prema trećem čaju. U analiziranim infuzijama, kvercetin je pronađen u najvišem udjelu, osim u infuziji od komorača (Moraes-de-Souza i sur., 2008.).

Prema Atoui i sur. (2005.) sadržaj ukupnih fenolnih sastojaka (iskazan u ekvivalentima galne kiseline po šalici (240 mL) infuzije) u infuzijama pripremljenih od suhih vrsta mediteranskog bilja dostupnih na Kreti opada slijedom lipa (*Tilia sp.*;  $184 \pm 1.72$ ) > kadulja (*Salvia fruticosa*;  $124 \pm 1.57$ ) > eukaliptus (*Eucalyptus globules*;  $113 \pm 1.33$ ) > grčki origano (*Origanum dictamnus*;  $109 \pm 3.20$ ) > paprena metvica (*Mentha piperita*;  $106 \pm 0.18$ ) = kamilica (*Matricaria recutita*;  $106 \pm 0.37$ ) > grčki planinski čaj (*Sideritis syriaca*;  $88 \pm 0.42$ ).

LC-DAD-MS analizom otkriveno je oko 60 različitih fenolnih spojeva u istraživanim infuzijama. Fenolne kiseline (benzojeve i cimetne kiseline) i njihovi derivati su detektirani u svim biljnim infuzijama, dok je prisutnost flavonoida bila različita. Većina flavonoida bili su glikozidi, a detektirani su i acilirani flavonol glikozidi s alifatskim (octena, jabučna) ili aromatskim kiselinama (kumarna, ferulinska, galna), kao što je apigenin-acetil-glikozid u infuziji kamilice. U infuziji lipa identificirani su katehini, ali ne i flavanoni, izoflavoni i flavoni, koji su pronađeni u infuziji metvice i dictamnusa, a u potonjoj su detektirani i flavonoli. Infuzija kadulje sadrži uglavnom flavone, a čaj od eukaliptusa samo flavonoli. Jedini flavon otkriven u grčkom planinskom čaju bio je apigenin 7-glikozid.

Istraživanje na biljnom čaju kamilice koje su proveli Kogiannou i sur. (2013.) pokazala su da u svom sastavu, između ostalog, sadrži fenolne kiseline–hidroksibenzojevu, vanilijisku kiselinu, protokatehinsku kiselinu, singričnu i galnu kiselinu, flavonoide-krizin, epikatehin, katehin, genistein, kaempferol i kvercetin. Od cjelokupnog sastava najveći udio zauzimaju jednostavni fenolni sastojci.

Biljke *Mentha pulegium* L. (barska metvica) i *Mentha spicata* L. (metvica) u svome sastavu sadrže fenolne i flavonoidne komponente (kavna kiselina, isokvercetin, ružmarinska kiselina, eriocitrin, ferična kiselina) (Fotakis i sur., 2016.). Čaj od paprene metvice *Mentha*

*piperita* L. sadrži fenolnu rosmarnu kiselinu i flavonoide (eriocitrin, hesperidin i luteolin) (Etheridge, Derbyshire 2019.).

U biljci *Lippia citriodora* sp. (limunovac, verbena) koja se u Grčkoj rabi za pripravu infuzija kod tegoba gastrointestinalnog i dišnog sustava, najveći udio fenolnog sastava zauzimaju luteolin 7-*O*-glukozid, 4-hidroksicimetna kiselina i dihidrokavena kiselina (Fotakis i sur., 2016.).

### **2.2.3.3. Antioksidacijska aktivnost fenolnih sastojaka**

Kako bi neki fenolni sastojak zavrijedio pojam antioksidansa mora udovoljiti dva uvjeta:

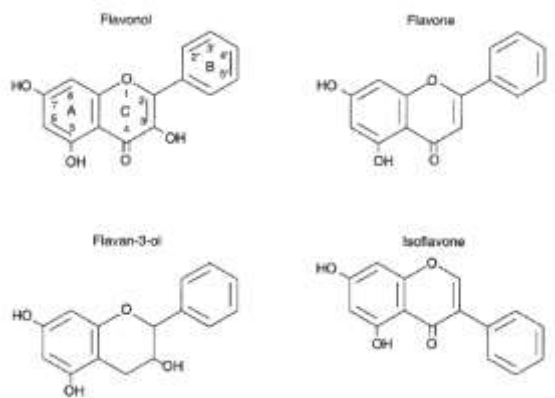
- Prvo, prisutan u malim koncentracijama u usporedbi s substratom koji biva oksidiran, može spriječiti, odgoditi ili usporiti autooksidaciju ili oksidaciju posredovanu slobodnim radikalima.
- Drugo, radikal koji ostane nakon djelovanja antioksidansa mora ostati u stabiliziranom obliku zbog nastajanja intramolekularne vodikove veze (Rice-Evans i sur., 1996. ).

Glavne kemijske karakteristike fenolnih sastojaka koje omogućuju antioksidacijsku aktivnost jesu:

- Afinitet hidroksilnih skupina da se ponašaju kao donori vodika ili elektron donori
- Radikal koji nastane nakon djelovanja fenola je stabilan
- Mogu djelovati u sinergiji s drugim antioksidansima

Prema Rice-Evansu i sur.(1996.) fenolni sastojci udovoljavaju tri kriterija za efektivno uklanjanje slobodnih radikala, koji su jasno vidljivi na strukturi flavonoida prikazanim na slici 6. :

- *O*-dihidroksi struktura u B prstenu koja pridodaje većoj stabilnosti strukturi radikala i sudjeluje u delokalizaciji elektrona
- 2,3 dvostruka veza u konjugaciji s 4-okso funkcijom prstena C je odgovorna za delokalizaciju iz B prstena- antioksidacijska moć je povezana sa strukturom u smislu elektronske delokalizacije aromatske jezgre. Kada kao takvi reagiraju sa slobodnim radikalima, nastali fenoksilni radikali su stabilniji zbog efekte elektronske rezonancije same aromatske jezgre..
- Treća i peta –OH skupina sa četvrtom okso funkcijom u A i C prstenu potrebne su zbog maksimalnog antioksidacijskog učinka. (Rice-Evans i sur., 1996. ).



**Slika 6. Struktura flavonoida.** *Rice-Evans i sur., 1997.*

Kvercetin zadovoljava sve navedene uvjete i učinkovitiji je od flavanola, kojim svojom strukturom ne zadovoljavaju sve kriterije. Zaključno, flavonoli su bolji antioksidansi od flavanola (Rice-Evans i sur., 1996.). Također, istraživanje na mišjim enterocitnim membranama i jetrenim mikrosomima pokazalo je da epigalokatehin i epikatehin galat sprječavaju lipidnu oksidaciju deset puta učinkovitije od vitamina E (Rice-Evans i sur., 1996..

Općenito, antioksidacijsko djelovanje pokazale su sljedeće skupine fenolnih spojeva:

Lignani, flavonoidi, fenolne kiseline- svoje antioksidacijsko djelovanje izražavaju sposobnošću uklanjanja slobodnih radikala predajom vodika čime se stvara stabilni radikal s niskim

standardnim redukcijskim potencijalom. Učinkovitost reakcije tog tipa određuje energija disocijacije veze između kisika i fenolnog vodika tj. konstanta disocijacija ako se antioksidans ponaša kao kiselina (Litwinienco i Ingold, 2003). Time, bolja učinkovitost će se očitovati u nepolarnim otapalima (npr. heksan) jer će energija disocijacije veze biti manja i termodinamički povoljnija. Još jedno svojstvo fenola koje utječe na njihovu zdravstvenu dobrobit je ta da su fenolne kiseline učinkoviti antioksidansi pri fiziološkom pH (između vrijednosti 7 i 8) (Mandić Vedrana, 2017.). Osim toga, učinkoviti su u keliranju metalnih iona koji u hrani djeluju kao prooksidansi jer smanjuju energiju aktivacije oksidacije ili se njihov štetni učinak očituje njihovom sposobnošću reagiranja s prirodno prisutnim antioksidansima i tako umanjuju njihov učinak (Jadhav i sur., 1996.).

Mehanizmi antioksidacije su složeni procesi koji ovise o više faktora, kako bi mogli biti mjereni i okarakterizirani nekom mjernom jedinicom razvile su se razne metode.

### **2.3. METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA**

Razlikuju se dva termina- „antioksidacijska aktivnost“ i „antioksidacijski kapacitet“. Antioksidacijska aktivnost označava kinetiku reakcije između antioksidansa i prooksidansa ili radikala kojega se smanjuje ili uklanja, dok antioksidacijski kapacitet označava učinkovitost termodinamičke promjene probe koja djeluje kao oksidans u reakciji s antioksidansom (Apak i sur., 2013.). „Aktivnost“ kemijske reakcije označava posebne uvjete u kojima se reakcija odvija kao što su tlak, temperatura, medij, reaktanti, produkti, međuprodukti itd.. (Huang i sur., 2005.)

Razvijene su mnoge metode za određivanje antioksidacijskog kapaciteta namirnica (tablica 3.), ali većina njih nije validirana za rad u fiziološkim uvjetima. Preporuka je koristiti više različitih metoda temeljenih na različitim kemijskim mehanizmima, kako bi se potpunije opisao antioksidacijski kapacitet analiziranog uzorka ( Pérez-Burillo, 2017.).

**Tablica 3. Podjela metoda mjerenja antioksidativnog kapaciteta. Pisoschi i Negulescu, 2011.**

Metoda	Princip rada	Određivanje završne točke
Spektrofotometrija		
<b>DPPH</b>	Reakcija antioksidansa s organskim radikalom	Kolorimetrija
<b>ABTS</b>	Reakcija antioksidansa s organskim kationskim radikalom	Kolorimetrija
<b>CUPRAC</b>	Redukcija Cu(II) u Cu(I) pomoću antioksidansa	Kolorimetrija
<b>FRAP</b>	Reakcija antioksidansa s Fe(III) kompleksom	Kolorimetrija
<b>PFRAP</b>	Reakcija kalijeva fericijanida s antioksidansom i Fe <sup>2+</sup> ionom	Kolorimetrija
<b>ORAC</b>	Reakcija antioksidansa s peroksidnim radikalom	Gubitak fluorescencije fluoresceina
<b>HORAC</b>	Vežanje antioksidansa na OH radikale dobivene iz Co (Fentonova reakcija)	Gubitak fluorescencije fluoresceina
<b>TRAP</b>	Izbacivanje luminol-deriviranih radikala pomoću antioksidansa	Kemiluminiscencijski signal
Elektrokemija		
<b>Ciklička voltometrija</b>	Potencijal radne elektrode pokazuje linearnost od početne do konačne vrijednosti, bilježi se trenutni intenzitet struje	Mjerenje intenziteta katodnog/ anodnog pika
<b>Amperometrija</b>	Potencijal radne elektrode ima fiksnu vrijednost u odnosu na referentnu elektrodu	Mjerenje intenziteta struje
<b>Biamperometrija</b>	Reakcija analita s oksidiranim oblikom redoks para	Mjerenje struje između dvije iste radne elektrode
Kromatografija		
<b>GC</b>	Razdvajanje spojeva iz smjese temeljeno na podjeli između stacionarne faze i plinovite mobilne faze	Detekcija toplinske vodljivosti
<b>HPLC</b>	Razdvajanje spojeva iz smjese temeljeno na podjeli između čvrste stacionarne i mobilne faze, pri velikoj brzini i visokom tlaku mobilne faze	UV-VIS detekcija, fluorescencija, masena spektrometrija ili elektrokemijska reakcija

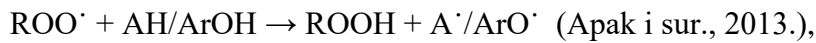
Glavna podjela metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta je na one koje se temelje na prijenosu elektrona ili na prijenosu vodikova atoma.

### 2.3.1. Metode temeljene na prijenosu vodikovih atoma

Metode koje se temelje na prijenosu vodikova atoma relevantne su za procjenu antioksidacijske sposobnosti antioksidansa (Apak i sur., 2013.). Glavni mehanizam u podlozi ovih metoda je sposobnost doniranja vodikova atoma molekula antioksidansa nekom slobodnom radikalom i

rezonancijska stabilizacija nastalog radikala antioksidansa koja smanjuje njegovu reaktivnost (Apak i sur., 2013.).

Ovaj mehanizam se može sažeti u jednu reakciju:

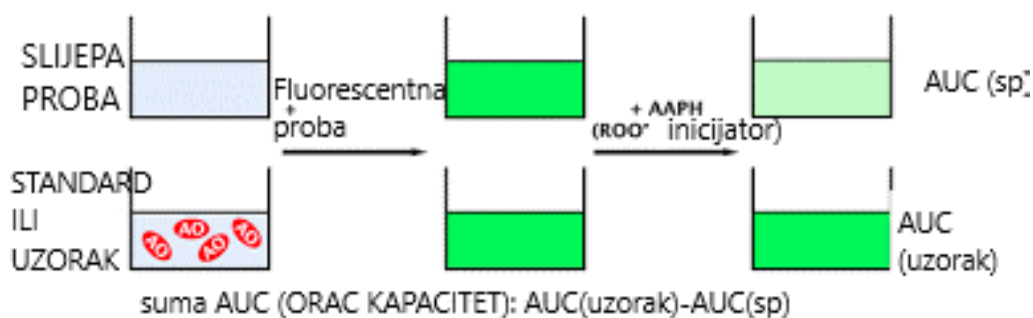


gdje je  $\text{ROO}^\bullet$  slobodni radikal, AH neki antioksidans, a ArOH aromatska jezgra s hidroskilnom skupinom.

**Najčešće korištene metode temeljene na prijenosu vodika su:** ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*), TRAP (engl. *Total Radical Trapping Antioxidant Parametar*) i metoda izbjeljivanja krocina (engl. *Crocin Bleaching Assay*) (Mandić Vedrana, 2017.).

### ORAC metoda

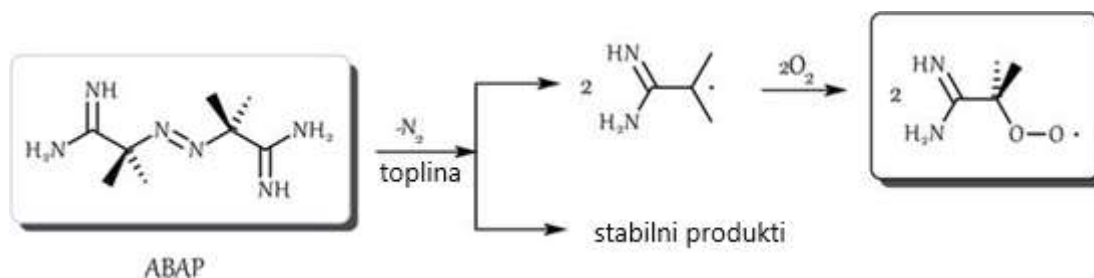
Metoda se temelji na reakcijskoj smjesi koja sadrži izvor peroksilnih radikala (2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid, AAPH), fluorescentnu probu i standard ili uzorak kojemu se određuje antioksidacijski kapacitet. U reakciji proba se oksidira i prelazi u nefluorescentni oblik što se očituje kao pad fluorescencije. U prisustvu antioksidansa reakcija se usporava. Kao standard uglavnom se koristi Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), sintetski analog vitamina E. Rezultati se iskazuju kao ekvivalenti Troloxa u  $\mu\text{mol}$  po 100g uzorka (Prior i sur., 2003).



**Slika 7. Prikaz principa ORAC metode.** <https://www.cellbiolabs.com/orac-oxygen-radical-antioxidant-capacity-assay>

### TRAP metoda

Metoda se temelji na sposobnosti antioksidansa u prekidanju reakcije između radikala i fluorescentne probe. Radikal nastaje djelovanjem topline na (2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid) - AAPH, ili iz (2,2'-azobis(2-amidopropan) dihidroklorid) - ABAP, a proba je R-fikoeritrin. Detekcija fluorescencijskog signala se odvija pri 495-575 nm, a pad signala označava prisutnost antioksidansa (Schlesier i sur., 2002.)



### Slika 8. Formiranje peroksilnog radikala iz ABAP.

[https://www.researchgate.net/profile/Raul\\_SalasCoronado/publication/332114729/figure/fig12/AS:742962438893570@1554147457094/Formation-of-peroxyl-radical-from-ABAP.ppm](https://www.researchgate.net/profile/Raul_SalasCoronado/publication/332114729/figure/fig12/AS:742962438893570@1554147457094/Formation-of-peroxyl-radical-from-ABAP.ppm)

### Metoda izbjeljivanja krocina

Ova metoda se bazira na obezbojenju narančasto-crvenog pigmenta  $\beta$ -karotena ili krocina.

Djelovanjem radikala pigment gubi boju, a prisustvo antioksidansa smanjuje gubitak boje.

Prati se smanjenje brzine raspada  $\beta$ -karotena ili krocina a gubitak boje se bilježi

spektrometrijski pri 443 nm u fosfatnom puferu pri pH 7 (Laguerre i sur., 2007).

### 2.3.2. Metode temeljene na prijenosu elektrona

Kod metoda koje se temelje na prijenosu elektrona, antioksidativna aktivnost je potaknuta odgovarajućom redoks probom, najčešće fluorescentnom ili obojenom, s kojom antioksidans reagira. Reakcija antioksidansa uzrokuje promjenu boje probe koja se mjeri

spektrofotometrijski, a izmjerena apsorbancija se povezuje s koncentracijom antioksidanta u uzorku koji je reagirao (Apak i sur., 2013.).

### Najčešće korištene metode temeljene na prijenosu elektrona su:

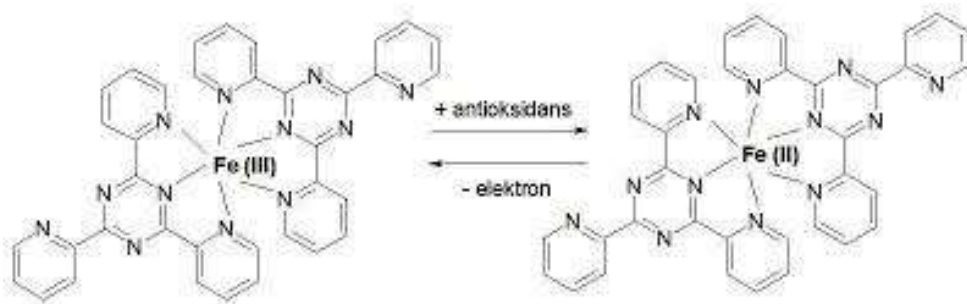
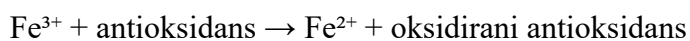
FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*), DPPH (redukcija 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala) i TEAC (engl. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) metoda (Prior i sur., 2005). Pri izvedbi potrebno je imati na umu da reakcije temeljene na prijenosu elektrona ovise o pH reakcijske smjese, jer vrijednosti standardnog potencijala opadaju s porastom pH, pa su ove reakcije osjetljive na prisutnost organskih kiselina i metala (Mandić Vedrana, 2017.).

### FRAP metoda

Princip ove metode se temelji na sposobnosti uzorka da reducira željezo, odnosno na redukciji Fe (III)-tripiridiltriazin kompleksa koji je žuto obojen u Fe(II) oblik koji je plavo obojen.

Redukcija se mjeri porastom apsorbancije na 593 nm.

Osnovna kemijska reakcija FRAP testova je (Berker i sur.,2007.):



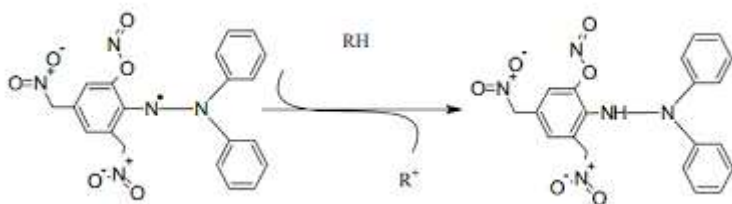
**Slika 9. Mehanizam FRAP reakcije.**

<https://repositorij.ktfsplit.hr/islandora/object/ktfst%3A473/datastream/PDF/view>

### DPPH metoda



Temelj ove metode je radikal DPPH• (difenilpikrilhidrazil radikal) koji sadrži slobodni elektron koji kruži oko molekule i daje ljubičasto obojenje. To ljubičasto obojenje karakterizira apsorpcijska grupa na 520 nm valne duljine u otopini etanola. Kada otopina slobodnog radikala DPPH• dođe u doticaj s antioksidansom, radikal prelazi u reducirani oblik i gubi se ljubičasto obojenje (Molyneux,2004,, Ashgar i sur.,2008).

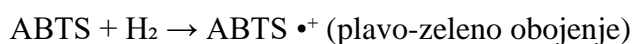
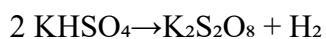


**Slika 10. mehanizam reakcije DPPH radikala s antioksidansom.**

<https://repositorij.pmf.unizg.hr/islandora/object/pmf%3A726/datastream/PDF/view>

### TEAC metoda

Činjenica da je ABTS stabilan monokation pri PH između 3,6 i 6,5 je omogućilo razvijanje testa obezbojenja. (Miller i sur.,1997.) Princip metode je mjerenje obezbojenja otopine koje nastaje redukcijom radikal-kationa ABTS•<sup>+</sup> [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)] s antioksidansom koji je davatelj vodika (kalij persulfat- K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>).



ABTS•<sup>+</sup> ima apsorpcijski maksimum pri 645 nm, 734 nm i 815 nm valne duljine. Dodavanjem tvari koja ima antioksidacijska svojstva dolazi do redukcije ABTS u opsegu koji ovisi o vremenu djelovanja ispitivane tvari. Vrijeme trajanje reakcije ovisi o koncentraciji antioksidansa što se vidi kao obezbojenje pri apsorpcijskom maksimumu na 415 nm valne

duljine. Antioksidacijska sposobnost ispitivane tvari mjeri se u Trolox ekvivalentima (Re i sur. 1999.).

#### **Određivanje antioksidacijskog kapaciteta korištenjem bakrovih iona (*engl.* CUPRAC)**

CUPRAC metoda se temelji na redukciji bakrovih iona. U ovoj metodi proba su bakrovi ioni (Cu(II) ioni) koji se preuzimanjem elektrona, koje donira antioksidans, reduciraju u Cu(I) ione što uzrokuje promjenu boje probe. Obezbojenje probe ukazuje na krajnju točku reakcije.. Kromogena proba (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-penantrolin) formira 2:1 kompleks s Cu(I) ionima koji ima maksimum apsorbancije na 490 nm. Stupanj promjene boje proporcionalan je koncentraciji antioksidansa. (Huang i sur., 2005.).

#### **2.4. Kemijski pristup određivanja antioksidacijskog kapaciteta biljnih infuzija**

Pouzdan protokol za procjenu antioksidanasa u uzorku zahtijeva provođenje različitih metoda za procjenu antioksidacijskog kapaciteta kako bi se uzeli u obzir različiti mehanizmi antioksidacijskog djelovanja (Fu i sur., 2011.). U kontekstu biljnih infuzija, antioksidacijski kapacitet najčešće se procjenjuje u vodenim ekstraktima biljnog materijala, a glavne metode koje se pri tome koriste su FRAP metoda i CUPRAC metoda, za određivanje redukcijske sposobnosti uzorka, dok se sposobnost uklanjanja slobodnih radikala najčešće temelji na reakciji antioksidansa s ABTS<sup>+</sup> radikal-kationom i DPPH radikalom.

Određivanjem antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom ustanovljene su velike razlike između 70 odabranih infuzija ljekovitih biljaka komercijalno dostupnih u Hrvatskoj, s vrijednostima FRAP koje su bile u rasponu od od 0,06 do 25 mM / L . Devet infuzija imalo je vrlo niski FRAP (<1 mM / L), za najveći broj, njih 37 zabilježen je niski FRAP (1–5 mM / L), dobre dobar FRAP vrijednosti (5–10 mM / L) pokazalo je 15 infuzija, za njih osam zabilježen je visoki FRAP (10–20 mM / L), dok se samo jedna biljna infuzija odlikovala vrlo visokom vrijednosti FRAP (> 20 mM / L). Najizraženija antioksidacijska svojstva u pogledu njihove

redukcijske sposobnosti u FRAP testu imale su infuzije *Melissae folium*, koje karakterizira i najveći sadržaj ukupnih fenolnih sastojaka, a uslijedile su infuzije *Spirae herba* > *Uvae ursi folium* > *Rubi fruktoza folium* > *Fragariae herba foliu* > *Salicis cortex* > *Serpyllii herba* > *Gerani robertiani herba* i *Rubi idaei folium*.

Antioksidacijska učinkovitost infuzija *Melissae folium* u pogledu redukcije  $Fe^{2+}$  bila je viša u odnosu na onu dobro poznatih, sintetskih antioksidanasa, vitamina C, Trolox-a i (+) – katehina, a u odnosu na vitamin C i Trolox, infuzija *Melissae folium* pokazala je i značajniju sposobnost uklanjanja slobodnih radikala u ABTS i DPPH testu. Ovi rezultati ukazuju kako se *Melissa officinalis* L. može smatrati „antioksidacijskom“ kraljicom između 70 odabranih ljekovitih biljaka. Priprema infuzije *Melissae folium* s vrućom (98 °C) i hladnom (20°C) vodom otkrili su da iako su se fenolni sastojci oslobađali iz lišća u vodi na obje ispitivane temperature, infuzije pripremljene na višoj temperaturi imale su više nego dvostruko veći antioksidacijski kapacitet određen kao FRAP. Jednako tako, rezultati ABTS i DPPH testa su pokazali da se s porastom temperature infuzije povećava i sposobnost uklanjanja slobodnih radikala za tri do četiri puta.

Temperatura vode i ponovljena ekstrakcija pokazali značajan utjecaj ( $p < 0,05$ ) na antioksidacijski kapacitet infuzija lipe i kamilice pripremljenih od lišća biljaka dostupnih na lokalnim tržnicama u Hrvatskoj. Infuzije kamilice i lipe pokazale su podjednak antioksidacijski kapacitet određen uklanjanjem DPPH radikala (izražen kao % inhibicije DPPH) u odnosu na infuzije kamilice pri svim temperaturama (60 °C, 80 °C i 100 °C), dok su infuzije lipe pokazale višu vrijednost antioksidacijskog kapaciteta u ABTS radikal-kationa testu (izražen u mmol/L Trolox-a) nego infuzije kamilice pri 60 °C i slične vrijednosti pri 80 °C i 100 °C. Prema tim rezultatima, antioksidacijski kapacitet infuzija povećava se temperaturom vode i smanjuje se s brojem ponovljenih ekstrakcija (1. ekstrakcija > 2. ekstrakcija > 3. ekstrakcija). Dodavanje mlijeka nije utjecalo na antioksidacijski kapacitet infuzija, dok je nakon dodatka iscijeđenog

limunovog soka opažen mali porast antiradikalske aktivnosti u oba testa, sa sličnim vrijednostim u obje infuzije.

Postojala je značajna linearna korelacija između sadržaja ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta biljnih infuzija pripremljenih pri svim temperaturama vode ( $r_{ABTS} = 0,91$ ;  $r_{DPPH} = 0,71$ ) kao i između sadržaja ukupnih flavonoida i antioksidacijskog kapaciteta ( $r_{ABTS} = 0,89$ ;  $r_{DPPH} = 0,66$ ). Rezultati ove studije pokazali su da antioksidacijski kapacitet infuzija određenih ABTS testom i DPPH testom, odgovara njihovom sadržaju epigalokatehin-galata (EGCG) koji je najzastupljeniji fenolni sastojak u infuziji kamilice-slično kao i u zelenom čaju, dok je galokatehin (GC) najzastupljeniji u infuziji lipe. Visoka korelacija između sadržaja EGCG i antioksidacijskog kapaciteta u infuzijama lipe i kamilice pripremljenima na 100 °C ( $r_{ABTS} = 0,900$  i  $r_{DPPH} = 0,750$ ) ukazuje da ovaj katehin najviše doprinosi antioksidacijskom kapacitetu ispitivanih infuzija (Horžić i sur., 2009.).

Rezultati ovog istraživanja zanimljivi su jer ukazuju da bi osobne preferencije potrošača prilikom odabira temperature pripreme biljnih infuzija i sklonost prema ulijevanju vode u isti biljni materijal nekoliko puta (višestruka ekstrakcija) ili dodatak limunovog soka mogle utjecati na profil i antioksidacijski kapacitet fenolnih sastojaka u biljnim infuzijama.

Između 21 proučavane vrste biljaka koje se tradicionalno koriste za pripremu infuzija u Bugarskoj ABTS testom identificirano je sedam biljaka s visokim udjelom fenolnih sastojaka i izraženim antioksidacijskim kapacitetom: *Pulmonaria officinalis* (TEAC  $2.02 \pm 0.14$  mM/QE  $673.39 \pm 9.92_M$ ), *Hypericum perforatum* (TEAC  $3.75 \pm 0.14$  mM/QE  $881.93 \pm 6.68_M$ ), *Agrimonia eupatoria* (TEAC  $3.76 \pm 0.5$  mM/QE  $702.29 \pm 6.82_M$ ), *Origanum vulgare* (TEAC  $5.87 \pm 0.2$  mM/QE  $1653.61 \pm 11.52_M$ ), *Melissa officinalis* (TEAC  $4.06 \pm 0.31$  mM/QE  $1370.09 \pm 41.38_M$ ), *Rubus sp. diversa* (TEAC  $4.23 \pm 0,12$  mM/QE  $608.95 \pm 5.95_M$ ), *Cotinus coggygria* (TEAC  $7.05 \pm 0.19$  mM/QE  $923.33 \pm 14.19_M$ ). Biljne infuzije s niskim antioksidacijskim kapacitetom imale su nizak sadržaj ukupnih fenolnih sastojaka (do 400 M

ekvivalenta kvercetina). Šest infuzija bugarskog ljekovitog bilja (*Hypericum perforatum*, *Agrimonia eupatoria*, *Melissa officinalis*, *Rubus* sp., *Origanum vulgare* i *Cotinus coggygia*) inale su dva do tri puta veći antioksidacijski kapacitet u odnosu na rooibos čaj, čaj medonosnog grma i mate čaj, a za četiri infuzije ustanovljen je visok antioksidacijski kapacitet, usporediv s kapacitetom crnog i zelenog čaja: *Origanum vulgare*, *Melissa officinalis*, *Rubus* sp., *Cotinus coggygia* (Ivanova i sur., 2005.).

Antiradikalska aktivnost prema DDPH radikalnu određena je u infuzijama suhih vrsta mediteranskog bilja, a rezultati su izraženi kao vrijednost  $EC_{50}$ , odnosno kao ona koncentracija antioksidansa koja je potrebna da bi se početna koncentracija DPPH smanjila za 50%, te kao antiradikalna učinkovitost ( $AE=1/EC_{50}$ ) ili antiradikalna moć (ARP). Što je niži  $EC_{50}$  ili što je veća AE, to je veća antioksidacijska aktivnost. Među ispitivanim infuzijama najveća sposobnost doniranja vodika zabilježena je za infuzije grčkog origana ( $4.29 \pm 0.21$ ) i eukaliptusa ( $4.14 \pm 0.18$ ), potom slijede infuzije kadulje ( $2.87 \pm 0.33$ ), lipe ( $2.82 \pm 0.06$ ) i paprene metvice ( $2.16 \pm 0.04$ ), a najslabiju antiradikalnu učinkovitost pokazale su infuzije grčkog planinskog čaja ( $1.30 \pm 0.02$ g) i kamilice ( $1.01 \pm 0.22$ ) (Atoui i sur., 2005).

DPPH metodom određen je viši antioksidacijski kapacitet infuzija pripremljenim sa svježim biljkama (metvica, komorač, limunska trava, paprena metvica, matičnjak) u odnosu na kapacitet infuzija od prerađenog bilja (kamilica, komorač, anis, limunska trava, matičnjak paprena metvica i metvica) koje konzumira brazilsko staništvo. Pri tome, antiradikalska aktivnost opada slijedom: svježe lišće mente (88.61%) > svježi plod komorača > prerađeni zelenog čaja = prerađeni crni čaj > prerađeno lišće limunske trave > prerađeno lišće peprene metvice > prerađeno lišće metvice. Zanimljivo je da je antiradikalska aktivnost infuzija od prerađenog bilja niža obzirom na njihov sadržaj ukupnih fenolnih sastojaka koji je bio viši nego onaj određen u infuzijama svježeg bilja. Osim toga, autori nisu pronašli korelaciju između sadržaja ukupnih fenolnih sastojaka i antiradikalne aktivnosti infuzija. Tako infuzije matičnjaka, koje

su se u obje skupine bilja izdvajale najvišim sadržajem ukupnih fenolnih sastojaka, nisu svrstane među infuzije koje su pokazale najviši antioksidacijski kapacitet. Ovakvi rezultati mogli bi biti posljedica različitog profila fenolnih sastojaka u tim infuzijama (Moraes-de-Souza i sur., 2008.).

#### **2.4.1. Prednost/nedostaci određivanja antioksidacijskog kapaciteta biljnih infuzija kemijskim pristupom**

U brojnim istraživanjima ustanovljen izražen antioksidacijski kapacitet biljnih infuzija, koji je u nekim slučajevima reda veličine zelenog čaja ili veći, pa iako određivanje ovog parametra u vodenim ekstraktima biljaka može biti korisno za kategoriziranje hrane i pića prema njihovoj antioksidacijskoj moći, ipak ima određena ograničenja.

Fenolni sastojci su amfipatske molekule, hidrofilne i lipofilne, a zbog hidrofilne prirode vode kao ekstrakcijskog otapala većina lipofilnih sastojaka se ne može izdvojiti postupkom ekstrakcije i zaostaju u talogu koji ne uzima se u obzir pri određivanju antioksidacijskog kapaciteta (Olennikov i sur., 2019.)

Osim toga, određivanje antioksidacijskog kapaciteta u vodenim, ili vodeno-organskim ekstraktima hrane nije dovoljno za predviđanje potencijalnih *in vivo* učinaka, jer zanemaruje bioraspoloživost, odnosno udio određenog spoja ili njegovog metabolita koji doseže sistemsku cirkulaciju (Holst i Williamson, 2008. ). Stoga, prije nego što postanu bioraspoloživi, bioaktivni sastojci hrane moraju se osloboditi iz matriksa hrane i apsorbirati u sistemsku cirkulaciju. To uključuje fizikalno-kemijske procese u gastrointestinalnom traktu kojim se sastojci hrane tijekom procesa probave prevode u sastojke dostupne za asimilaciju u stanice crijevnog epitela nekim mehanizmom apsorpcije, a kao rezultat toga metaboliti koji dospijevaju u krvni sustav mogu se razlikovati od izvornih spojeva koji se nalaze u hrani.

Stoga je važno prije nego što zaključimo o bilo kojem potencijalnom zdravstvenom učinku, analizirati utječe li proces probave na bioaktivne spojeve i njihovu stabilnost, jer će to zauzvrat utjecati na njihovu bioraspoloživost i njihove moguće korisne učinke.

## **2.5. FENOLNI SASTOJCI U PROBAVNOM SUSTAVU**

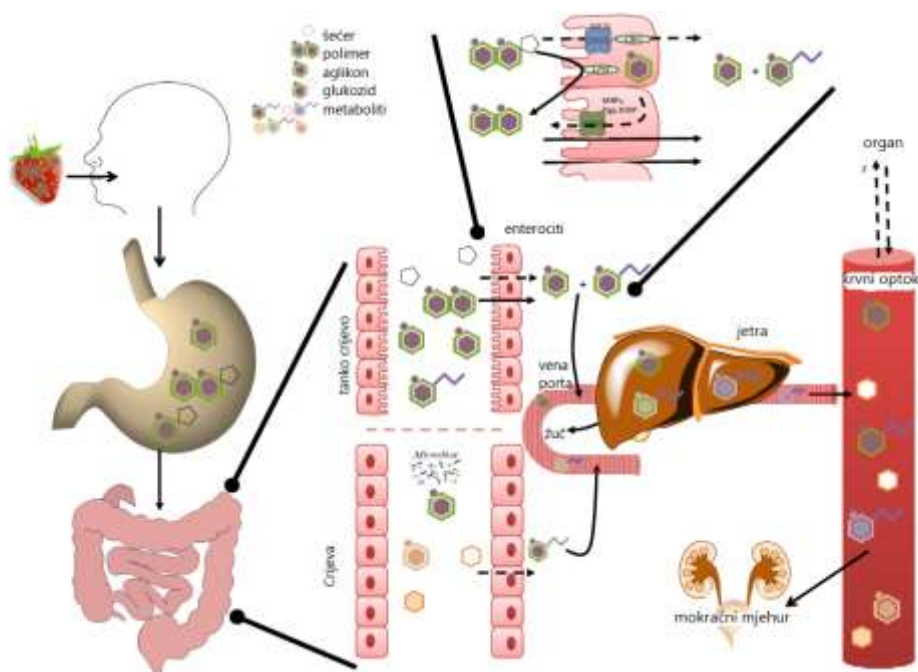
### **2.5.1. Probava i apsorpcija fenolnih sastojaka**

Fenolni sastojci u hrani često su povezani s vlaknima ili složenim ugljikohidratima u matrici hrane, pa se dostupnost fenolnih sastojaka može povećati već u usnoj šupljini djelovanjem  $\alpha$ -amilaze i smanjenjem veličine čestica. Oslobođanje fenolnih sastojaka iz matriksa hrane nastavlja se u želucu, a o učinkovitosti procesa ovisi i potencijal apsorpcije u tankom crijevu. Apсорpcija se uglavnom odvija u dvanaesniku i u proksimalnm jejunumu. Budući da su lipofilni spojevi, većina flavonoidnih aglikona i fenolnih kiselina prenosi se u stanice crijeva pasivnom difuzijom.

Fenolne kiseline niske molekulske mase, poput galne kiseline, izoflavoni, flavoni, katehini i kvercetin-glukozidi lako se apsorbiraju, a kako su lipofilni, apсорpcija se odvija pretežito pasivnom difuzijom. Međutim, većina fenolnih sastojaka u biljkama nalazi se u glikoziliranom obliku, ili kao esteri i polimeri te se kao takvi ne mogu se izravno apсорbiratii, a vjerojatno se opiru i kiseloj hidrolizi u želucu, pa i netaknuti dospijevaju dvanaesnik.

Apsorpciji glikoziliranih spojeva prethodi hidroliza glikozida i oslobođanje aglikona, enzimom laktaza floridzin hidrolaza (LPH) u u četkastoj prevlaci enterocita. Nakon hidrolize, slobodni aglikon može se prenijeti epitelne stanice pasivnom difuzijom. U suprotnom, glikozilirani spojevi prenose se u epitelne stanice transporterom glukoze ovisnim o natriju, SGLT1, a potom se hidroliziraju citosolnom  $\beta$ -glikozidazom (CBG). Većina proantocijanidina hidrolizira se u monomerne ili dimerne jedinice dok se antocijani mogu apсорbirati kao glikozidi i kao takvi pojavljuju se u krvotoku. Nasuprot tome, visokostabilni oligomerni i

polimerni flavanoli slabo se apsorbiraju. Neapsorbirani sastojci dospijevaju u debelo crijevo gdje se dio njih apsorbira, a dio se, djelovanjem crijevne mikrobiote može razgraditi do fenolnih molekula niske molekulske mase aromatskih kiselina, oksaloacetata i CO<sub>2</sub>. Nakon apsorpcije fenolni sastojci, kao i svi ksenobiotici, prolaze kroz biotransformaciju te se enzimskim reakcijama faze I i faze II većinom prevode u *O*-sulfatirane, *O*-glukuronidirane i *O*-metilirane derivate. Iznimak su antocijanini i galirani monomerni flavonoli kao što su epigalokatehin i epikatehin-galat, koji ne prolaze opsežan metabolizam. Nastali metaboliti su često manje lipofilni pa se lako izlučuju. Transporteri iz faze III reakcija biotransformacije odgovorni su za posljednji korak eliminacije i/ili detoksikacije ksenobiotika, jer uklanjaju neželjene spojeve u fecesu i žuči, dok se većina konjugiranih derivata izlučuje urinom. Derivati koji se izlučuju u žuč dospijevaju u dvanaesnik. Obično se ne apsorbiraju tankom crijevu i pristižu do debelog crijeva, gdje se mogu se ili izlučiti u stolicu ili razgraditi mikrobiotom debelog crijeva i na kraju se ponovno apsorbirati (Carbonell-Capella i sur., 2014., Figueira i sur., 2015., Shahidi i sur. 2018.) Shematski prikaz opisanog procesa probave i apsorpcije fenolnih sastojaka može se vidjeti na slici 11.





**Slika 11. Shematski prikaz apsorpcije, biotransformacije i izlučivanja polifenola u ljudskom tijelu. *Figueira i sur., 2015.***

### **2.5.2. Bioraspoloživost fenolnih sastojaka**

Apsorpcija i metabolizam fenolnih sastojaka uvelike ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi, molekulskoj masi, stupnju polimerizacije ili glikozilacije, topljivost i konjugacija s drugim fenolima (Carbonell-Capella i sur., 2014.). Jedna od glavnih poteškoća u proučavanju bioraspoloživosti su različite strukturne karakteristike fenolnih sastojaka zbog čega se odlikuju različitom topljivošću te se apsorbiraju i metaboliziraju putovima koji su specifični za pojedine fenolne skupine. Stoga se bioraspoloživost pojedinih skupina fenolnih sastojaka razlikuje u velikoj mjeri, pa one skupine koje su u najzastupljenije u hrani i svakodnevnoj prehrani ili pokazuju najvišu *in vitro* aktivnosti ne moraju nužno biti i one skupinama koje imaju najbolji profil bioraspoloživosti (Shahidi i sur., 2018.).

U cilju boljeg razumijevanja bioraspoloživosti korisno je fenolne sastojke podijeliti na slobodne, konjugirane i netopljive fenole (Madhujith i Shahidi, 2009.). Slobodni fenoli prisutni su kao fenolni aglikoni, a konjugirani fenoli uglavnom se pojavljuju kao fenolni glikozidi, od kojih se većina lako otpušta u probavnom soku i apsorbira nakon njihovog oslobađanja iz stanica biljnog materijala tijekom mehaničke ili kemijske probave. Netopljivi fenoli kovalentno se vežu na neprobavljive sastojke u matriksa hrane, kao što su polisaharidi (pektin, hemiceluloza, celuloza i arabinoksilani), strukturni proteini i visoko-polimerizirani fenoli (kondenzirani tanin i lignin) (Acosta-Estrada i sur., 2014., Shahidi i Ambigaipalan, 2016). Ti fenoli se djelomično oslobađaju, i malobrojni među njima prolaze crijevni epitel te dopijevaju u krvotok, što dovodi do niske bioraspoloživosti ove skupine fenola u gornjem dijelu gastrointestinalnog trakta (Peng i sur., 2017., Shahidi i Yeo, 2016.). Ovisno o vrsti i dijelu biljke, udio netopljivih fenola varira od 20 do 90% (Acosta-Estrada i sur., 2014.), a samo ih se manje od 10% može apsorbirati u krvotok, dok preostali dio, zajedno s

neprobavljivim sastojcima dospijeva u debelo crijevo. Taj dio fenolnih tvari u debelom crijevu podliježe fermentaciji djelovanjem crijevne mikrobiote pri čemu nastaju metaboliti koji se potom apsorbiraju i nastavljaju se dalje metabolizirati (Shahidi i Yeo, 2016.). Tako se samo 2,6% od ukupno oslobođenih ferulnih kiselina u pšenici može osloboditi tijekom probave u želucu i tankom crijevu, a preko 95% ferulinskih kiselina oslobođeno je tijekom fermentacije u debelom crijevu ( Kroon i sur., 1997.).

#### **2.5.2.1. Pristupi procjene bioraspoloživosti fenolnih sastojaka**

Kako se može vidjeti na slici 12., razvijeni su različiti pristupi za proučavanje bioraspoloživosti, svaki sa svojim prednostima i nedostacima (tablica 4.), a mogu se podijeliti na *in vitro*, *in vivo* i *in situ* metode.

##### ***In vitro:***

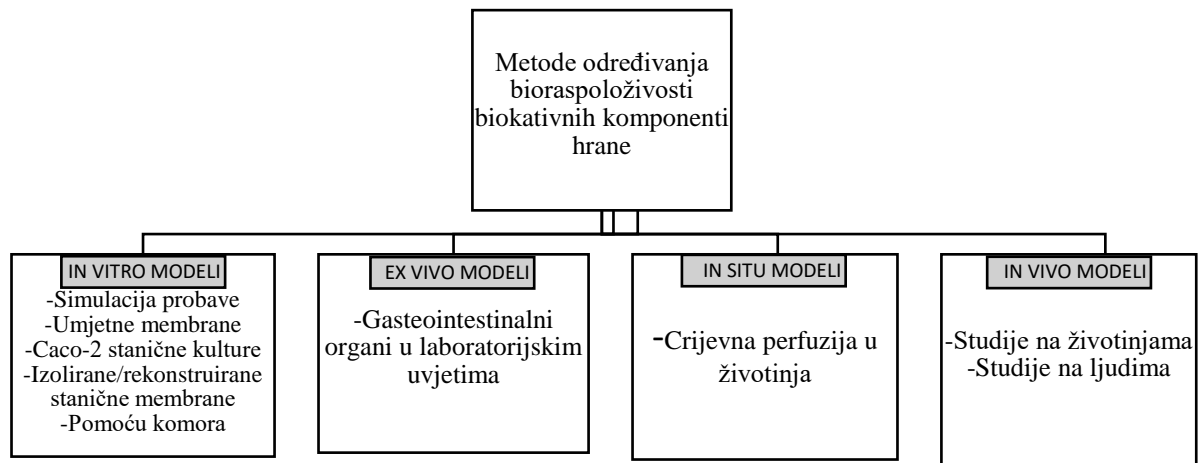
- Simulacija procesa probave u gastrointestinalnom traktu
- Umjetne/kultivirane/izolirane semipermeabilne membrane
- Metoda pomoću komora

##### ***In situ:***

- Životinjski modeli crijevne perfuzije

##### ***In vivo:***

- Istraživanjima farmakokinetike na ispitanicima i animalnim modelima (Shahidi i sur. 2018.)



**Slika 12.** Metodologije korištene u procjeni biorasploživosti i biodostupnosti bioaktivnih spojeva. *Carbonell-Capella i sur., 2014.*

**Tablica 4.** Prednosti i nedostaci *in vivo* i *in vitro* postupaka koji se koriste za procjenu biorasploživosti bioaktivnih spojeva. *Carbonell-Capella i sur., 2014.*

	Prednosti	Nedostaci
<b><i>In vitro</i> probava</b> <b>Simulirana gastrointestinalna probava</b>	Jeftina i tehnički jednostavna Moguće izvesti s više uzoraka Fokus na manjem broju komponenti Specifični mehanizmi mogu biti ispitivani Validacija s referentnim materijalima Efektivnost svakog dijela probave, apsorpcije i transporta mogu biti ispitivani	Ekstrapolacija u <i>in vivo</i> Homeostatski mehanizmi nisu prisutni Dinamični uvjeti gastrointestinalnog trakta nisu upotpunjeni s biokemijskim i staničnim kulturnim modelima Nisu uvijek uzete u obzir crijevne bakterije i jetreni metabolizam Probava u usnoj šupljini i debelom crijevu se često ne uzima u obzir Zatvoreni sustav ne reagira na sastav i količinu hrane
<b>Caco-2 stanične kulture</b>	Fenotip sličan normalnim apsorpcijskim epitelnim stanicama Moguć rast na laboratorijskim diskovima i membranskim umetcima Moguća sekrecija kilomikrona	Izolirana iz humanog raka debelog crijeva Mucini, biofilm i drugi tipovi epitelnih stanica nisu prisutni
<b><i>In vivo</i> probava</b>	<i>In vivo</i> uvjeti Visoka selektivnost Farmakokinetika se može razmatrati	Vrlo kompleksni funkcionalni sustav Manji protok Utjecaj različitih faktora prisutan Ekstrapolacija iz istraživanja na životinjama na humani sustav Nedostaju certificirani referentni standardi Visoki troškovi opreme i rada Etička ograničenja

U cilju razumijevanja probave i apsorpcije fenolnih sastojaka korišteni su različiti *in vitro* i *in vivo* modeli, kao što je probava *in vitro* u uvjetima koji oponašaju one u gastrointestinalnom traktu, simulirana fermentacija u debelom crijevu, sustav sa sintetskim/kultiviranim/izoliranim polupropusnim membranama, Ussingove komore, animalni modeli perfuzije crijeva i farmakokinetička istraživanja na pokusnim životinjama i ispitanicima (Carbonell-Capella i sur., 2014.). Među njima je postupak simulacije probave u *in vitro* uvjetima najčešće korišteni pristup za predviđanje probavljivosti zbog niske cijene, visoke učinkovitosti i jednostavnog rada. HPLC-MS analiza produkata razgradnje fenolnih sastojaka brusnice probave potvrdila je da se slični metabolički obrasci susreću nakon *in vitro* i *in vivo* probave, što ukazuje na pouzdanost primjene *in vitro* pristupa za predviđanje bioraspoloživosti biljnih fenola (Brown i sur., 2014.). Do sada, različiti *in vitro* pristupi korišteni su za proučavanje bioraspoloživosti fenolnih sastojaka čajeva (Chen i sur., 2013.), prosa (Chandrasekara i sur., 2012.), borovnice (Correa-Betanzo i sur., 2014.), ogrozda (Chiang i sur., 2013.), flavonoida u ekstraktima sjemenki grožđa (Laurent i sur., 2007.) i pšeničnog kruha (Gawlik-Dziki i sur., 2009.), izoflavon sojinog kruha (Walsh i sur., 2003.) i antocijanina iz kupine (McDougall i sur., 2005.).

Prema standardiziranim uvjetima probave, primarna simulacija probave *in vitro* uključuje tri faze procesa (Minekus i sur., 2014.):

1. simulirana probava u usnoj šupljini- s konačnom aktivnošću  $\alpha$ -amilaze od 75 U/mL, pH 7, tijekom 2 minute (omjer volumena uzorka i probavne tekućine je 1:1); Često se zbog zanemarivog utjecaja probave u usnoj šupljini na cjelokupnu probavu zanemaruje prvi korak i metoda svodi na dva sljedeća koraka.
2. simulirana probava u želucu- s konačnom aktivnošću pepsina od 2,000 U/mL, pH 2, tijekom 2 sata (omjer volumena uzorka i probavne tekućine je 1:1);

3. simulirana crijevna probava- s prepratom pankreatina čija se koncentracija podešava konačnoj aktivnosti tripsina od 100 U/mL, pH 7, tijekom 6 sata (omjer volumena uzorka i probavne tekućine je 1:1).

Uz navedeno, uvjetima u probavnom sustavu potrebno je prilagoditi i koncentraciju žučnih soli (10 mM), temperaturu i redoks-potencijal (dostupnost kisika) pojedinog područja probavnog trakta. Neki modeli uključuju i parametre kao što su veličina čestica hrane, vrijeme prolaska sadržaja duž gastrointestinalni trak, dodatak emulgatora, elektrolita specifičnih enzima. Uvjete izvedbe *in vitro* procesa probave potrebno je prilagoditi vrsti ispitivane hrane, prije svega korištene enzime i vrijeme probave (Shahidi i sur., 2018.).

#### **2.5.2.2. Bioraspoloživosti fenolnih sastojaka u *in vitro* modelu**

Jedni od pionira na području istraživanja bioraspoloživosti fenolnih sastojaka su Gil-Izquierdo i sur. (2001.) koji su prilagodili izvornu metodu Millera i sur. (1981.), osmišljenu za simulaciju probave i apsorpcije željeza iz obroka, za pručavanje *in vitro* bioraspoloživosti flavonoida iz narančinog soka. Ovaj prilagođeni postupak omogućuje procjenu apsorpcije *in vitro* uvođenjem postupka dijalize. U tu se svrhu koriste polupropusne celulozne membrane koje, slično sloju epitelnih stanica crijeva razdvajaju apsorbirane frakcije od probavnog soka. Membrane su jednoličnih pora i omogućuju prijenos molekula slobodnom difuzijom koja je glavni mehanizam apsorpcije fenolnih sastojaka, prije svega onih niske molekulske mase.

Sljedeća preinaka koju su uveli Gil-Izquierdo i sur. (2002.) bila je postavljanje celulozne cijevi za dijalizu s hranom u polietilensku cijev kako bi se osigurao bliski kontakt između hrane i membrane, što vodi ka bržoj uspostavi pH ravnoteže i bržoj izmjeni tekućina. Ispitivanja fenolnog sastava soka od naranče ovom metodom pokazala su da se fenolni sastav nije promijenio u doticaju s pepsinom u probavi. Uočili su da fenolni sastav ne utječe na probavu pepsina u bilo kojem ispitivanom prehrambenom proizvodu. Ovom metodom istražen je i fenolni sastav drugih namirnica, poput soka od nara, brokule, sojinog mlijeka i kopriva među

ostalim namirnicama, a rezultati su ukazali da koncentracija fenolnih sastojaka povećava u gastričnoj fazi i smanjuje u intestinalnoj fazi probave, prije svega u dijaliziranoj frakciji (Carbonella-Capella i sur., 2014.). Villanueva-Carvajal i sur. (2013.) su počeli koristiti i smrvljeni led između faza radi inaktivacije enzimske aktivnosti, a ujedno su i opazili kako je oslobađanje fenolnih sastojaka iz matriksa hrane obrnuto proporcionalno veličini čestica hrane, što nalaže odgovarajuću pripremu uzorka kako bi se povećala dodirna površina između probavnog soka i digesta, a time i učinkovitost probave i apsorpcije fenolnih sastojaka. Neka od daljnjih istraživanja dodatno uvode manje preinake kao što su simulacija probave u usnoj šupljini, dok se probava u crijevima izvodi sa ili bez koraka dijalize, a često pokazuju oprečan trend promijene sadržaja ukupnih fenola i pojedinih fenolnih sastojaka u gastričnoj i intestinalnoj fazi probave (Bermúdez - Soto i sur. (2007. ), Tagliazucchi i sur. (2010), Bouayed i sur., 2011).

Međutim, ova istraživanja nisa uključila utjecaj crijevne mikrobiote na metabolizam fenolnih sastojaka. Iz tog razloga, Saura-Calixto i sur. (2007.) model probave *in vitro* proširuju uvođenjem koraka fermentacije u debelom crijevu i procijenjuju bioraspoloživost fenolnih sastojaka iz neprobavljive frakcije koja zaostaje nakon intestinalne faze. Rezultati na ovom modelu pokazali su da je 48% polifenola bioraspoloživo tankom crijevu, dok je 42% postalo bioraspoloživo u debelom crijevu. Samo 10% nije bilo dostupno i ostalo je u matrici hrane nakon cijelokupnog procesa probave.

Sljedeći napredak području istraživanja su dinamički GI model (TIM®) u koje se može uključiti i korak fermentacije u debelom crijevu, a oponašaju biološku sredinu u dvanaesniku, jejunumu i ileumu. Kako bi se uzeli u obzir i transportni mehanizmi koriste se Caco-2 stanične linije za istraživanje stupnja apsorpcije fenolnih sastojaka, a ove stanice ujedno su korisne i za proučavanje glukuronizacije, sulfoniranja i metilacije fenola do kojih može doći tijekom njihove apsorpcije. Metode koje koriste Ussingove komore, gdje je mali dio crijevne sluznice

smješten između dvije komore s puferskom otopinom kako bi se očuvao polaritet epitela, omogućuju proćavanje crijevnog transporta pasivnom difuzijom, prijenos posredovan transporterima te transcelularni, paracelularni i endocitozni prijenos (Carbonella-Capella i sur., 2014.).

## **2.6. Fiziološki pristup (*in vitro* model probave) određivanja antioksidacijskog kapaciteta biljnih infuzija**

Premda su brojna istraživanja izvijestila o utjecaju probave *in vitro* na antioksidacijski kapacitet zelenog, crnog, Oolong i bijelog ćaja (Annunziata i sur., 2018., Tenore i sur., 2013., Jilani i sur., 2015.), ogranićen je broj studija koji istražuje antioksidacijski potencijal biljnih infuzija u *in vitro* eksperimentalnom modelu probavnog sustava. Pretraživanjem literature pomoću tražilica Google znalalac (<http://scholar.google.hr/>), PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), i Science Direct (<http://www.sciencedirect.com/>) pronađeno je pet znanstvenih ćlanaka. Pretraživanje je bilo ogranićeno na sažetak i naslov na engleskom jeziku koji su sadržavali pojam „herbal infusions ili „herbal tea“ ili „tisane , pojam „antioxidant capacity“, te „*in vitro* gastrointestinal digestion, i „simulated gastrointestinal conditions“, a podaci su prikupljeni izravnim pregledom. Sva pretraživanja provedena su do 17. kolovoza 2020. godine.

Celep i sur. (2017.) određili su sadržaj ukupnih fenolnih sastojaka i antioksidacijski kapacitet sedam biljnih infuzija (bazge, borovnice, maline, jagode, šipka, rooibos i nara) koje se ućestalo konumiraju na području Turske te zelenog ćaja prije i nakon *in vitro* probave. Procijenjen je ukupni antioksidacijski kapacitet metodom s fosfomolibdatom, antiradikalska aktivnost prema DPPH radikalu i sposobnost redukcije iona bakra (CUPRAC metoda). Simulacija probave izvedena je u modelu koji je uključivao želućanu i intestinalnu fazu, uz primjenu cijevi za dijalizu s celuloznom membranom velićine pora 12 kDa. U usporedbi s neprobavljenim uzorcima, zabilježeno je znaćajno smanjenje sadržaja ukupnih fenolnih

sastojak i flavonoida ( $p < 0.05$ ) u svim uzorcima kao i nakon želučane i intestinalne faze probave. Najmanji sadržaj ukupnih fenolnih sastojaka i flavonoida zabilježen je intestinalnoj fazi, i to u frakcijama koje ne prolaze membranu za dijalizu, a predstavljaju one skupine ovih sastojaka koje su dostupne za apsorpciju u tankom crijevu. Statistički značajno viši ( $p < 0,05$ ) udjel ukupnih fenola i flavonoida u frakciji koja zaostaje na membrani za dijalizu u odnosu onaj u frakcijama koje se mogu apsorbirati sugerira da se značajan dio fenola potencijalno može metabolizirati crijevnom mikrobiotom u debelom crijevu osobito fenolnih sastojak iz infuzije kore nara. Premda je sadržaj ukupnih fenola u neprobavljenoj infuziji kore nara ( $89.65 \pm 2.59$  mg ekvivalenata galne kiseline/g) značajno niži u usporedbi sa zelenim čajem ( $174.16 \pm 2.44$  mg ekvivalenata galne kiseline/g), infuzija kore nara imala je gotovo istu količinu ukupnih fenolnih sastojaka u frakcijama dostupnim za apsorpciju ( $34.52 \pm 1.38$  mg ekvivalenata galne kiseline/g prema  $36.14 \pm 0.88$  mg ekvivalenata galne kiseline/g u zelenom čaju), i značajno više u frakcijam koje zaostaju na membrani za dijalizu ( $53.79 \pm 0.91$  mg ekvivalenata galne kiseline/g prema  $44.28 \pm 1.85$  mg ekvivalenata galne kiseline/g u zelenom čaju). Osim toga, u odnosu na zeleni čaj ( $42.71 \pm 0.86$  mg ekvivalenata galne kiseline/g) zabilježen je i značajno viši sadržaj ukupnih flavonoida u neprobavljivim infuzijama nara ( $99.62 \pm 3.18$  mg ekvivalenata galne kiseline/g), te u svim frakcijam nakon probave *in vitro* (za približno tri puta viši nakon gastrične faze probave, za oko dva puta viši u frakciji koja prolazi mebranu za dijalizu te za približno 1,6 puta viši u frakciji koja zaostaje na membrani).

Slično kao i za sadržaj bioaktivnih sastojaka, primjećeno je smanjenje antioksidacijskog kapaciteta, u svim infuzijam i u svim fazama *in vitro* probave u usporedbi izvornim uzorcima, a to je smanjenje bilo izraženije u intestinalnoj fazi u odnosu na želučanu fazu ( $p < 0,05$ ). Osim toga, značajan dio antioksidacijskog kapaciteta svih analiziranih intestinalnih digesta zaostaje u frakcijama koje se ne mogu apsorbirati. Ukupan antioksidacijski kapacitet neprobavljenog zelenog čaja ( $107.43 \pm 2.16$  mg ekvivalenata askorbinske kiseline/g) bio je najizraženiji u



usporedbi s onima preostalih infuzija i sličan onom infuzije kore nara ( $100.97 \pm 2.72$  mg ekvivalenata askorbinske kiseline/g), premda je antioksidacijski kapacitet u frakciji infuzije kore nara koja se može apsorbirati bio je približno dva puta viši nego kapacitet u istoj frakciji zelenog čaja. Unatoč tome, u infuzijama kore nara vjerojatno je manji udio sastojaka sa sposobnošću uklanjanja slobodnih radikala i redukcije metalnih iona, jer je za zeleni čaj pronađen veća antiradikalska aktivnost kako u želučanoj fazi ( $513.44 \pm 3.3$  mg ekvivalenata askorbinske kiseline/g), tako i u koraku koji simulira probavu i apsorpciju u tankom crijevu ( $251.52 \pm 2.72$  mg ekvivalenata askorbinske kiseline/g u frakcijama koje prolaze i  $419.42 \pm 7.15$  mg ekvivalenata askorbinske kiseline/g u frakcijama koje zaostaje na membrani za dijalizu). Intestinalne frakcije zelenog čaja odlikovale su i najvišom vrijednosti sposobnosti redukcije bakra u odnosu na sve ostale ispitivane infuzije ( $337.93 \pm 3.71$  mg ekvivalenata askorbinske kiseline/g u frakciji koja prolazi membranu i  $530.79 \pm 1.62$  mg ekvivalenata askorbinske kiseline/g u frakciji koja zaostaje na membrani za dijalizu). Nadalje, infuzije borovnice odlikovale su se boljom antiradikalnom aktivnošću prije i nakon probave u odnosu na infuzije kore nara, unatoč nižem sadržaju ukupnih fenola i flavonoida, što ukazuje da proces probave može doprinijeti povećanom oslobađanju sastojaka sa sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala iz matrice borovnice. Međutim, potencijal prema redukciji metalnih iona bio viši u infuzijama kore nara nego u infuzijama borovnice. Stoga, ovi rezultati ukazuju naglašavaju različite mehanizme u podlozi antioksidacijskog djelovanja bioaktivnih sastojaka i, posljedično nalažu primjenu više različitih metoda za procjenu antioksidacijskog kapaciteta.

Promjene u antioksidacijskom kapacitetu tijekom pojedinih faza probave *in vitro* bilježe Lima i sur. (2019.). Autori su su istraživali infuzije pripremljene od biljaka *Artemisia gorgonum Cabo Verdea Webb* i *Hyptis pectinata* (L.) Poit. koje se se koriste u tradicionalnoj medicini na otočju Cabo Verde. Probava *in vitro* ovih infuzija provedena je u dva slijedna koraka kojima

se simulira probava u želucu i tankom crijevu, ali bez uporabe membrana za dijalizu. Prije i nakon probave određen je antioksidacijski kapacitet metodom CUPRAC, FRAP i DPPH.

Kako se fenolni sastojci povezuju s antioksidacijskim svojstvima biljnih infuzija, određen je njihov ukupni sadržaj čije su vrijednosti u neprobavljenim infuzijama *A. gorgonum* i *H. pectinata* nalazile u rasponu vrijednosti zabilježenih u istraživanjima drugih autora (vidjeti poglavlje 2.4.). U odnosu na te rezultate, sadržaj fenola u infuziji *A. gorgonum* bio je značajno viši, osim u usporedbi s čajem lipe, crnog cejlonskog čaj i kineskog zelenog čaja, dok je fenolni sadržaj infuzije *H. pectinata* bio sličan *Mentha piperita*, *Matricaria recutita*, *Origanum dictamnus*, *Eucalyptus globules* (Atoui i sur., 2005) i *Satureja thymbra* infuzijama (Kogiannou i sur., 2013).

S druge strane, u infuziji *H. pectinata* sadržaj ukupnih fenola smanjio se se nakon želučane faze ( $\approx 24\%$ ) i porastao između želučane i crijevne faze, pa je ukupno smanjenje iznosilo oko 8%.

U obje infuzije zabilježeno je smanjenje sadržaja flavonoida koje je bilo izraženije nego ono uočeno za ukupne fenolne sastojke, što sugerira da su flavonodi posebno osjetljivi na fizikalne i kemijske uvjete probave. Smanjenje sadržaja flavonoida bilo je izraženije u *H. pectinata* nego u infuziji *A. gorgonum*, a bila je i izraženija nakon želučane faza (20% za infuzije *A. gorgonum* i 30 % za *H. pectinata*) nego na kraju cijelog postupka probave *in vitro* (približno 15% u obje infuzije). LC-UV/DAD detektirani su esteri fenolnih kiselina i glikozidi flavonoida s više različitih šećernih ostataka u molekuli, i to 3-*O*- kafeolkinska kiselina, klorogena kiselina, 3,5-dikafeolkinska kiselina, 4,5-dikafeolkinska kiselina i ostali derivati kafeolkinskih kiselina u infuziji *A. gorgonum* te derivati kafeolkinskih kiselina i derivati kvercetina u infuzijama *H. pectinata*. Većina ovih sastojaka bila je stabilna u gastričnoj fazi probave, premda se, u usporedbi s neprobavljenim uzorcima, koncentracija nekih smanjuje (od 68% do 91%), a neki od njih nisu detektirani nakon probave u *in vitro*. Osim toga, na kraju ovog procesa detektirani

sastojci koji nisu bili opaženi nakon probave u želucu, a vjerojatno su nastali razgradnjom matične komponente u kiselim uvjetima simulirane sredine želuca.

U CUPRAC i FRAP testu neprobavljivi uzorci obje infuzije pokazali su antioksidacijsku aktivnost. Pri tome, prema podjeli koju predlažu Katalinić i sur. (2006.) (vidjeti poglavlje 2.4.), infuzije *A. gorgonum* pripadaju skupini s niskom FRAP vrijednosti, dok se one *H. pectinata* mogu svrstati u skupinu s dobrim FRAP vrijednostima. Nakon probave *in vitro*, u oba testa zabilježena je smanjenje antioksidacijskog kapaciteta ovih infuzija u gastričnoj fazi te porast između želučane i crijevne faze probave. FRAP vrijednosti bile su osjetljivije na uvjete *in vitro* probave u odnosu na CUPRAC vrijednosti pa je konačno smanjenje antioksidacijskog kapaciteta iznosilo do 28% u FRAP testu i do 6% u CUPRAC testu. Obje infuzije imale su sposobnost uklanjanja DPPH radikala koju zadržavaju i nakon probave *in vitro*, unatoč opaženom smanjenju na kraju ovog procesa koje je iznosilo i do 75%. Ovo je smanjenje značajno više ( $p < 0.05$ ) u odnosu na smanjenje redukcijske sposobnosti infuzija što dodatno potvrđuje važnost određivanja antioksidacijskog kapaciteta metodama koje se temelje na različitim mehanizmima djelovanja antioksidanasa.

Olechnikov i sur. (2019.) odredili su antioksidacijski kapacitet metodom DPPH te metodom ORAC koja uzima u obzir antiradikalnu aktivnost lipofilnih (H-ORAC; antioksidansi koji se ekstrahiraju heksanom), i hidrofilnih antioksidanasa (L-ORAC; antioksidansi zaostali u talogu nakon ekstrakcije heksanom koji se izdvajaju smjesom acetona i vode) prema peroksilnom radikalu. Ovi su parametri ispitivani prije i nakon *in vitro* probave sagan aya čaja, infuzije koju od davnina rabi stanovništvo različitih regija Sibira u različite svrhe, a priprema se iz biljke *Artemisia frigida*. Model probave *in vitro* izveden je uz simulaciju procesa probave u gornjem dijelu gastrointestinalnog trakta (želudac i crijevo), uz primjenu membrane za dijalizu. Simulacija probave izvedena je u modelu koji je uključivao želučanu i intestinalnu fazu, uz primjenu vrećice za dijalizu. Kvantitativnom analizom fenolnog profila

korištenjem HPLC-DAD-ESI-QQQ-MS identificirani su derivati kafeola (kafeolkinske kiseline) i flavonoidni glikozidi i flavanoidni aglikoni (derivati apigenina, luteolina, krizoeriola, 6- hidroksiluteolina, nepetina). Dva dominantna fenola infuzije *A. frigida*, 5- *O*- kafeolkinska kiselina i 3,5-di- *O*- kafeolkinska kiselina, bila su prisutna u razinama od 16,09, odnosno 16,35 mg / 100 mL infuzije. Vrijednost IC<sub>50</sub> u testu DPPH iznosila je je  $12,63 \pm 0,51 \mu\text{g} / \text{mL}$  (u usporedbi s  $9,27 \pm 0,27 \mu\text{g}/\text{mL}$  za Troloxa kao referentni spoj), što je potvrdilo visok antioksidacijski kapacitet *A. frigida* infuzije. Veću antiradikalnu aktivnosti pokazale su kafeolkinske kiseline kafeolkinska kiselina, 3,4-di-*O*-kafeolkinska kiselina, 3,5-di-*O*-kafeolkinska kiselina, 4, 5-di-*O*- kafeolkinska kiselina i 3, 4, 5-tri-*O*- kafeolkinska kiselina) u odnosu na flavonoidne glikozide i aglikone koji su pokazali malu ili nikakvu antiradikalnu aktivnost prema DPPH radikalu.

Nakon probave *in vitro* zabilježeno je smanjenje ukupnog sadržaja kafeolkinskih kiselina za 10,6% u želučanoj fazi te za 35,2% u intestinalnoj fazi probave u odnosu na neprobavljene uzorke. Flavonoidni glikozidi bili su stabilniji, jer su se njihove koncentracije smanjile za 1,6–10,7%. Unatoč ovom smanjenju, međutim, ukupni sadržaj fenola u biljnom čaju *A. frigida* nakon crijevne faze probave i dalje je bio visok (27,04 mg / 100 mL). Ukupni antioksidacijski kapacitet (TAC) neprobavljenog biljnog čaja *A. frigida*, izračunat kao zbroj kapaciteta hidrofилnih (H-ORAC) i lipofilnih (L-ORAC) antioksidanasa, bio je 2918,77  $\mu\text{mol}$  Trolox ekvivalenata (TE) na 100 mL infuzije. Kapacitet hidrofилnih antioksidansa (2826,14  $\mu\text{mol}$  TE / 100 mL) bio je veći od kapaciteta lipofilnih antioksidansa (92,63  $\mu\text{mol}$  TE / 100 mL) zbog hidrofилne prirode vode kao ekstrakcijskog medija. Nakon probave *in vitro* opaženo smanjenje sadržaja hidrofилnih antioksidanasa u infuziji *A. frigida* odigralo je ključnu ulogu u smanjenju antioksidacijskog kapaciteta. Indeks TAC u želučanoj fazi probave *in vitro* bio je za 11% (2593,56  $\mu\text{mol}$  TE / 100 mL) niži od indeksa TAC neprobavljenog uzorka, te se u sljedećoj fazi probave u crijevima smanjio do 2090,14  $\mu\text{mol}$  TE / 100 mL.

Minekus i sur. (2000) pratili su antioksidacijska svojstva infuzija u prisutnosti željeza pod uvjetima koji simuliraju okoliš u gastrointestinalnom traktu. Antioksidacijski kapacitet određen je u testu s deokiribozom, kojim se procjenjuje reaktivnost antioksidanasa prema hidroksilnom radikalu, a *in vitro* probava izvedena je u dvije faze uz primjenu vrećice za dijalizu u drugoj fazi probave.

Biljne infuzije pripremljene su od lišća mediteranskog bilja prikupljenog na otoku Kreti. Među njima, infuzije majčine dušice odlikovale najnižim sadržajem fenolnih sastojaka i najnižim antioksidacijskim kapacitetom. Sadržaj ukupnih fenola u infuzijama kadulje i jasenka bio je sličan, premda je za infuzije kadulje zabilježen viši antioksidacijski kapacitet. Unatoč tome što se sadržaj fenolnih sastojaka u probavljenim uzorcima nije značajno mijenjao u odnosu na neprobavljene uzorke, nakon probave *in vitro* primjećen je porast antioksidacijskog kapaciteta u dijalizatu infuzije majčine dušice i jasenka, dok se antioksidacijski kapacitet u dijalizatu kadulje nije značajno mijenjao. Uz to, nakon *in vitro* probave primjećeno je i povećanje koncentracije željeza u dijalizatima, što ukazuje da bioaktivni sastojci ispitivanih infuzijama imaju potencijal vezanja ovog metalnog iona čime mogu ograničiti njegovo sudjelovanje u reakcijama Fentonovog tipa, a time i njegov prooksidacijski potencijal.

Chen, i sur. (2017.) su istražili stanično antioksidacijsko i antiproliferativno djelovanje fitokemikalija, nakon *in vitro* simulirane probave, dobivenih iz infuzije čaja *Adinandra nitida* (Shiyacha), koji je tradicionalni čaj s dugom poviješću na jugoistoku Azije.

Čaj *Adinandra nitida*, prevladava u jugoistočnoj Aziji stotinama godina i njegova se potrošnja još uvijek povećava. Izvješteno je da posjeduje mnoga bioaktivna svojstva- smanjuje krvni tlak i djeluje protuupalno, antibakterijsko, antitumorski, analgetički i antitoksično.

Za to zaslužan se smatra kamelijanin A, važan bioaktivni sastojak *A. nitida* koji se lako metabolizira u kamelijanin B, što je dokazano u istraživanjima na štakorima, te je za taj spoj

pokazano da inhibira proliferaciju HepG2 I MCF-7 stanica što ne samo da stopira rast G0/G1 stanične populacije, nego i dovodi do apoptoze.

Kako znamo da je enzimska probava efektivan način da se oslobode fenolne komponente iz matriksa hrane jer enzimi mogu hidrolizirati veze između fenolnih komponenti i drugih molekula ili degradirati polisaharidnu strukturu, u ovom radu istražena je transformacija fitokemikalija u čaju *A. nitida* *in vitro* modelom pod simuliranim fiziološkim uvjetima. Nakon toga, promjene u pet glavnih pojedinačnih flavonoidnih spojeva infuzije kao i stanična antioksidacijska aktivnost. HepG2 model stanice i Caco-2 stanice korištene su za proučavanje antioksidacijskog i antiproliferacijskog djelovanja fitokemikalija infuzije prije i nakon probave.

Sadržaj fenola, flavonoida, flavonola i antocijanina pronađen u infuziji čaja *A. nitida* procijenjen je kolorimetrijskim metodama. Potom su glavni spojevi određeni HPLC metodom. Utvrđeno je da se u simuliranim uvjetima probave sadržaj ukupnih fenola i flavonola povećao, dok se sadržaj flavonoida i antocijanina smanjio. Sadržaj (-)-epigalokatehina i kamelianina B se povećao, a sadržaj L-epikatehina, kvercetina i kamelianina A se smanjio.

U početku je ukupan sadržaj fenola u čaju *A. nitida* iznosio je  $121,31 \pm 2,50$  mg GAE / g uzorka. Nasuprot tomu, nakon što su uzorci podvrgnuti simulaciji želučane probave *in vitro*, ukupni sadržaj fenola povećao se na  $137,41 \pm 1,98$  mg GAE/g uzoraka, povećavajući se za 16,10 mg GAE/g uzorka (porast od 13,27%). Uz to, postojalo je i značajno povećanje ukupnog sadržaja fenola na  $169,55 \pm 1,00$  mg GAE /g uzorka (porast od 39,76%) nakon 2 sata crijevne probave. To se može pripisati činjenici da se mogu osloboditi fenoli pod djelovanjem enzima u gastrointestinalnom okruženju.

Za razliku od rezultata za ukupne fenole, simulirana probava je dovela do smanjenja sadržaja flavonoida. Izvorno je ukupan sadržaj u čaju *A. nitida* bio  $88,51 \pm 0,88$  mg CE / g uzorka, ali nakon probave se ukupni sadržaj flavonoida smanjio na  $61,72 \pm 1,47$  mg CE / g uzorka (smanjenje od 26,79 mg CE / g uzorka). Slično tome, nakon 2 sata crijevne probave, ukupni

sadržaj se smanjio za 15,67% na  $74,64 \pm 1,46$  mg CE / g uzorka.

Pokazano je da se sadržaj flavanola rijetko mijenja u *in vitro* modelima probave u dijelovima želučane probave i dijelu tankog crijeva. No, Chen i sur. su pokazali da se sadržaj flavanola nakon crijevne probave povećao gotovo dvostruko, sa  $4,14 \pm 0,11$  na  $9,60 \pm 0,25$  mg RE / g uzorka. Želučana probava imala je blagi utjecaj na flavanolni sadržaj koji je pokazao povećanje od 0,02 mg RE / g uzorka. Razlika između želučanog i crijevnog stadija može biti pripisan raspadu polimerne mreže koju čine flavanoli vezani za polisaharide ili protein u crijevima što rezultira oslobađanjem flavanola.

Sadržaj antocijanina se smanjio sa  $42,08 \pm 4,42$  na  $32,90 \pm 2,06$  mg/g uzorka nakon želučane probave. A nakon crijevne probave došlo je do značajnijeg smanjenja od skoro četvrtine početnog sadržaja ( $9,50 \pm 3,57$  mg/g). To se može pripisati činjenici da su antocijanini osjetljivi na simulirane uvjete probave, posebno na alkalno okruženje crijevnog medija.

Sadržaj kamelijanina B povećan je u crijevnoj fazi do  $28,20 \pm 3,19$  mg/g (gotovo sedmerostruko povećanje). Kako je kamelijanin B glavni metabolit kamelijana A i lako se transformira iz kamelijanina A *in vitro*, sadržaj kamelijanina B raste. Zanimljivo je da su dvije vrste probave imale različite utjecaje na sadržaj kamelijanina A: primijećen je porast od 6,95 mg/ g nakon želučane probave, dok je smanjenje bilo 14,49 mg/ g nakon crijevne probave.

Antioksidacijsko djelovanje procijenjeno je na temelju sposobnosti uklanjanja peroksilnog radikala, a utvrđeno je da se smanjilo za polovinu nakon crijevne probave ( $277,17$  mmol VCE / g uzorka).

### **2.6.1. Prednosti/nedostaci fiziološkog pristupa (*in vitro* model probave) u određivanju antioksidacijskog kapaciteta biljnih infuzija**

Ukratko, prethodno navedeni literaturni podaci ukazuju da se antioksidacijski kapacitet biljnih infuzija smanjuje nakon procesa probave *in vitro* u odnosu na neprobavljene uzorke, a pripisuje se smanjenju udjela fenolnih sastojaka koje se opaža u gastričnoj i intestinalnoj fazi probave *in vitro*. Takvo smanjenje opisano je i u infuzijama zelenog čaja, u kojima se prosječno 44,4% katehina izvorno prisutnih u čaju ne može detektirati nakon želučane faze probave, a 91,8% nije prisutno nakon probave u tankom crijevu (Tenore i sur., 2015.). Smanjenje udjela fenolnih sastojaka smatra se da je posljedica strukturnih modifikacija fenolnih sastojaka do kojih dolazi u interakciji s probavnim enzimima, pri čemu mogu nastati metaboliti manje bioaktivnosti u odnosu na izvornu komponent. Uz to, reaktivnost antioksidanasa pod utjecajem je i pH vrijednosti sredine. Štoviše, fenolni sastojci, poput klorogene kiseline osobito su osjetljivi na blago alkalne uvjete, kakvi su u tankom crijevu, koji mogu potaknuti njihovu i racemizaciju, uz nastanak enantiomera različite reaktivnosti prema slobodnim radikalima (Siracusa i sur., 2011.).

Unatoč opaženom smanjenju antioksidacijskog kapaciteta, frakcije koje su dostupne za apsorpciju zadržavaju dio antioksidacijskog kapaciteta neprobavljenih infuzija. Usto, rezultati Celep i sur. (2017.) ukazuju da se značajan udio fenolnih sastojaka ne može se apsorbirati u sluznicu takvog crijeva. Ova frakcija neapsorbiranih fenola trebala bi se uzeti u obzir pri određivanju antioksidacijskog kapaciteta nakon probave *in vitro* jer pokazuje značajnu antiradikalnu aktivnost, a osim izravnog antioksidacijskog djelovanja fenolni sastojci iz ove frakcije mogu imati i neizravne učinke, kao što je inhibicija lipaza i proteaza gušterače koja smanjuje apsorpciju lipida i proteina (Chen i Yang, 2019.).

Također, treba istaknuti da se dio neapsorbiranih fenola može metabolizirati djelovanjem crijevne mikrobiote do derivata s višim antioksidacijskim kapacitetom nego matična



komponenta). Takvi metaboliti mogu pokazati svoje povoljne učinke *in situ*, a s obzirom da dio njih apsorbira u završnim segmentima debelog crijeva, ne smiju se zanemariti niti mogući sistemski učinci tih mikrobnih metabolita (Han i sur., 2007., Stevens i sur., 2016., Tomas-Barberan i sur., 2016.).

Međutim, u dosadašnjim istraživanjima model probave *in vitro* primjenjen je za simulaciju procesa probave u želucu i u tankom crijevu. Uzimajući u obzir potencijalnu ulogu crijevne mikrobiote u razgradnji neapsorbiranih sastojaka u debelom crijevu, valjalo bi u analizu uključiti i dodatan korak *in vitro* fermentacije kako bi se pouzdanije procijenio antioksidacijski potencijal biljnih infuzija, a takva djelovanja ujedno bi se trebala dolazati i *in vivo*. Ovaj aspekt procesa probave u debelom crijevu osobito je zanimljiv, s obzirom da je opisan dvosmjerni odnos između mikrobiote i fenolnih sastojaka (Nash i sur., 2018., Cardona i sur., 2013.). Tako, pored potencijalne uloge crijevne mikrobiote u metabolizmu fenolnih fitokemikalija, biljni fenoli mogu imati bakteriocidno i bakteriostatsko djelovanje i tako ograničiti rast i razmnožavanje neželjenih članova crijevne mikrobiote, ali mogu pokazati i prebiotski učinak, koji ukazuje na sposobnost fenolnih sastojaka da pogoduju rastu korisnih bakterijskih sojeva crijevnog mikrobioma (Van Duynhoven i sur., 2013., Filosa i sur., 2018.).

Zaključno, rezultati ovih istraživanjima ukazuju da je proces probave jedan od ključnih faktora za definiranje antioksidacijskog kapaciteta biljnih infuzija. Stoga bi se procjeni antioksidacijskog potencijala ovih pripravaka trebalo dati prednost metodama utemeljenim na fiziološkom pristupu nad metodama koje ovaj parametar određuju u vodenim ekstraktima biljnog materijala, obzirom da promjene koje se događaju tijekom probave *in vitro* mogu doprinijeti poznavanju stvarne bioaktivne snage biljnih infuzija, bitne za predviđenje zdravstvenog potencijala ovih pripravak *in vivo*.

Premda analiza fenolnih sastojaka nakon probave *in vitro* sugerira da antioksidacijski kapacitet biljnih infuzija može biti niži nego što se može očekivati od podataka istraživanja utemeljenih

na mjerenjima u vodenim ekstraktima biljnog materijala, ovakvi rezultati mogu poslužiti kao osnova za razvijanje strategija kojima bi se se mogli maksimizirati korisni učinci fenolnih sastojaka u biljnim infuzijama. Jedna od takvih je strategija koja se temelji se primjeni kvasca *S. cerevisiae* iz pivarske industrije kao biosorbenta fenolnih spojeva, a pokazala se uspješnom u poboljšanju bioraspoloživosti i očuvanju antioksidacijskih svojstava ketahina u zelenom i crnom čaju nakon *in vitro* probave (Jilani i sur., 2015.).

Također, podaci istraživanja bioaktivnih sastojaka u *in vitro modelima*, uz podatke o jedinici serviranja i prosječnoj konzumaciji u određenoj populaciji, mogu poslužiti i kao temelj za procjenu dnevnog unosa fenolnih antioksidanasa iz biljnih infuzija u svakodnevnoj prehrani. Time bi se i dostupne informacije o doprinosu fenolnih sastojaka iz biljnih infuzija antioksidacijskom kapacitetu cjelokupne prehrane trebale revidirati i prilagoditi fiziološkom pristupu s obzirom da su uglavnom temeljne na podacima dobivenim analizom ekstrakta kemijskim pristupom (Bouayed i sur., 2011.).

### 3. ZAKLJUČCI

Temljem pregleda dostupne literature o određivanju antioksidacijskog kapaciteta biljnih infuzija u vodenom ekstraktu biljnog materijala (kemijski pristup) te u frakcijama koje zaostaju nakon procesa probave biljnih infuzija *in vitro*, u uvjetima koji oponašaju one u gastrointestinalnom traktu (fiziološki pristup) može se zaključiti sljedeće:

- Biljne infuzije vrijedan su izvor fenolnih sastojaka s raznim spektrom bioloških učinaka koja se jednim dijelom pripisuju antioksidacijskim svojstvima osvih fitokemikalija.
- Antioksidacijski kapacitet biljnih infuzija potvrđen je u vodenim ekstraktima biljnih infuzija prije i nakon procesa probave *in vitro*. U oba pristupa uglavnom su korištene metode koje se temelje na procjeni antiradikalne aktivnosti i sposobnost redukcije fenolnih sastojaka.
- Značajana korelacija između sadržaja fenolnih sastojaka i antioksidacijskog kapaciteta prije i nakon probave *in vitro* podupire mišljenje da su fenolni sastojci glavni nositelji antioksidacijskog kapaciteta biljnih infuzija.
- Sadržaj fenolnih sastojaka i antioksidacijski kapacitet biljnih infuzija niži je nakon probave *in vitro* u odnosu na neprobavljene, vodene ekstrakte biljnih infuzija.
- Nakon *in vitro* probave, frakcije fenolnih sastojaka koje su dostupne za apsorpciju zadržavaju dio antioksidacijskog kapaciteta neprobavljenih infuzija.
- Značajan udio fenolnih sastojaka i antioksidacijskog kapaciteta biljnih infuzija zaostaje u frakcijama koje nisu dostupne za apsorpciju nakon *in vitro* probave,
- Fizikalno-kemijske promjene bioaktivnih sastojaka u probavnom sustavu koje se simuliraju u *in vitro* modelima fiziološkog pristupa određivanja antioksidacijskog

kapaciteta ključan su faktor koji treba uzeti u obzir pri procjenjivanju antioksidacijskog kapaciteta biljnih infuzija.

#### 4. LITERATURA

- Acosta-Estrada, B.A., Gutiérrez-Urbe, J.A., and Serna-Saldívar, S.O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chem.* 52: 46–55.
- Akdoğan M, Tamer MN, Cüre E, Cüre MC, Koroğlu BK, Delibaş N. Effect of spearmint (*Mentha spicata* Labiatae) teas on androgen levels in women with hirsutism. *Phytother Res.* 2007;21(5):444-447. doi:10.1002/ptr.2074
- Albayrak, S., Aksoy, A., Sağdıç, O., & Albayrak, S. (in press). Antioxidant and antimicrobial activities of different of some medicinal herbs consumed as tea and spices in Turkey. *Journal of Food Biochemistry*. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4514.2011.00568.x>.
- Alferink LJ, Fittipaldi J, Kieft-de Jong JC, Taimr P, Hansen BE, Metselaar HJ, Schoufour JD, Ikram MA, Janssen HL, Franco OH, Murad SD (2017) Coffee and herbal tea consumption is associated with lower liver stiffness in the general population: the Rotterdam study. *J Hepatol* 67(2):339–348. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.013>
- Annunziata, G., Maisto, M., Schisano, C., Ciampaglia, R., Daliu, P., Narciso, V., ... Novellino, E. (2018). *Colon Bioaccessibility and Antioxidant Activity of White, Green and Black Tea Polyphenols Extract after In Vitro Simulated Gastrointestinal Digestion*. *Nutrients*, 10(11), 1711. doi:10.3390/nu10111711
- Aoshima, H., Hirata, S., & Ayabe, S. (2007). *Antioxidative and anti-hydrogen peroxide activities of various herbal teas*. *Food Chemistry*, 103(2), 617–622. doi:10.1016/j.foodchem.2006.08.032
- Arumugam, P., Priya, N.G., Subathra, M. and Ramesh, A. (2008), “Anti-inflammatory activity of four solvent fractions of ethanol extract of *Mentha spicata* L. investigated on acute and chronic inflammation induced rats”, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Vol. 26 No. 1, pp. 92-95.
- Ashgar, S., Shohreh, F., Fatemeh, S.(2008.). Essential oil composition of *Valeriana officinalis* L. roots cultivated in Iran: Comparative analysis between supercritical CO<sub>2</sub> extraction and hydrodistillation. *Journal of Chromatography A* 1180(1-2) Pages 159-164.
- Apak R., Gorinstein S., Böhm V., Schaich M. K., Özyürek M., Güçlü K. (2013.). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 85, No. 5, pp. 957–998, 2013. <http://dx.doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15>.

- Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem* 2005;89:27–36.
- Benzie, I. F., & Wachtel-Galor, S. (Eds.). (2011). *Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects*. CRC press.
- Berger, R.G., Lunkenbein, S., Ströhle, A., Hahn, A., (2011.). Antioxidants in Food: Mere Myth or Magic Medicine? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* ;52(2)
- Berker, K. , Guclu, K. , Tor, I. , Apak,R.(2007). Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72, pp. 1157 -1165
- Bermúdez-Soto MJ, Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT. 2007. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chem* 102:865–74.
- Bodeker, G., & Ong, C. K. (2005). *WHO global atlas of traditional, complementary and alternative medicine* (Vol. 1). World Health Organization.
- Borges, T. H., Pereira, J. A., Cabrera-Vique, C., & Seiquer, I. (2017). Study of the antioxidant potential of Arbequina extra virgin olive oils from Brazil and Spain applying combined models of simulated digestion and cell culture markers. *Journal of Functional Foods*, 37, 209–218. doi:10.1016/j.jff.2017.07.05
- Bouayed J, Hoffmann L, Bohn T. 2011. Total phenolics, flavonoidsanthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: bioaccessibility and potential uptake.*Food Chem* 128(1):14–21.
- Brown, E.M., Nitecki, S., Pereira-Caro, G., McDougall, G.J., Stewart, D., Rowland, I., Crozier, A., and Gill, C.I. (2014). Comparison of *in vivo* and *in vitro* digestion on polyphenol composition in lingonberries: Potential impact on colonic health. *Biofactors* 40(6): 611–623.
- Butković Danijela,(2018.).Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti hrvatskih maslinovih ulja. Diplomski rad, Zagreb.
- Canter PH, Ernst E. Herbal supplement use by persons aged over 50 years in Britain: frequently used herbs, concomitant use of herbs, nutritional supplements and prescription drugs, rate of informing doctors and potential for negative interactions. *Drugs Aging*. 2004;21(9):597-605. doi:10.2165/00002512-200421090-00004

- Carrasco-Pancorbo A, Cerretani L, Bendini A, Segura-Carretero A, Gallina-Toschi T, Fernandez-Gutierrez A. Analytical determination of polyphenols in olive oils [Review]. *Journal of Separation Science*. 2005 Jun;28:837-58.
- Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2014). *Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 155–171. doi:10.1111/1541-4337.12049
- Cardona, F.; Andrés-Lacueva, C.; Tulipani, S.; Tinahones, F.J.; Queipo-Ortuño, M.I. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J. Nutr. Biochem*. 2013, 24, 1415–1422.
- Carrillo, C., Rey, R., Hendrickx, M., del Mar Cavia, M., & Alonso-Torre, S. (2017). *Antioxidant Capacity of Beetroot: Traditional vs Novel Approaches*. *Plant Foods for Human Nutrition*, 72(3), 266–273. doi:10.1007/s11130-017-0617-2
- Carvalho AM, Morales R. In: *Ethnobotany in the New Europe: people, health and wild plant resources*. Pardo de Santayana M, Pieroni A, Puri R, editor. New York, Oxford: Berghahn Press; 2010. Persistence of wild food and wild medicinal plant knowledge in a Northeastern Region of Portugal; pp. 147–171.
- Celep, E., Akyuz, S., İnan, Y., & Yesilada, E. (2017). *Stability of phenolic content of some herbal infusions and their antioxidant activity following in vitro digestion*. *Turkish Journal of Biochemistry*, 42(4). doi:10.1515/tjb-2017-0178
- Chandrasekara, A., and Shahidi, F. (2012). Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated *in vitro* digestion and microbial fermentation. *J. Funct. Food* 4(1): 226–237.
- Chandrasekara A, Shahidi F (2018). Herbal beverages: Bioactive compounds and their role in disease risk reduction – A review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*.  
<https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.08.006>
- Chen, G.-L., Hu, K., Zhong, N.-J., Guo, J., Gong, Y.-S., Deng, X.-T., Huang, Y.- S., Chu, D.-K., and Gao, Y.Q. (2013). Antioxidant capacities and total polyphenol content of nine commercially available tea juices measured by an *in vitro* digestion model. *Eur. Food Res. Technol.* 236(2):303–310.
- Chen, J.J., Ye, Z.Q., Koo, M.W.,(2004.). Growth inhibition and cell cycle arrest effects of epigallocatechin gallate in the NBT-II bladder tumour cell line. *BJU Int.* 93,1082–1086.

- Chen, Y., Ma, X., Fu, X., & Yan, R. (2017). Phytochemical content, cellular antioxidant activity and antiproliferative activity of *Adinandra nitida* tea (Shiyacha) infusion subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion. *RSC Adv.*, 7(80), 50430–50440. doi:10.1039/c7ra07429h
- Chiang, C.-J., Kadouh, H., and Zhou, K. (2013). Phenolic compounds and antioxidant properties of gooseberry as affected by *in vitro* digestion. *LWT-Food Sci. Technol.* 51(2): 417–422.
- Chio PH, Zaroff CM (2015) Traditional Chinese medicinal herbal tea consumption, self-reported somatization, and alexithymia. *Asia Pac Psychiatry* 7(2):127–134. <https://doi.org/10.1111/appy.12161>
- Coe, S.; Fraser, A.; Ryan, L. Polyphenol Bioaccessibility and Sugar Reducing Capacity of Black, Green, and White Teas. *Int. J. Food Sci.* **2013**, 2013, 238216.
- Cohen PA, Ernst E. Safety of herbal supplements: a guide for cardiologists. *Cardiovasc Ther.* 2010;28(4):246-253. doi:10.1111/j.1755-5922.2010.00193.x
- Colapinto CK, Arbuckle TE, Dubois L, Fraser W (2015) Tea consumption in pregnancy as a predictor of pesticide exposure and adverse birth outcomes: the MIREC study. *Environ Res* 142:77– 83. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.06.020>
- Cömert ED, Gökmen V. Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. *Food Res Int.* 2018;105:76-93. doi:10.1016/j.foodres.2017.10.056
- Connelly, A.E., Tucker, A.J., Tulk, H., Catapang, M., Chapman, L., Sheikh, N., Yurchenko, S., Fletcher, R., Kott, L.S., Duncan, A.M. and Wright, A.J. (2014), “High-rosmarinic acid spearmint tea in the management of knee osteoarthritis symptoms”, *Journal of Medicinal Food*, Vol. 17 No. 12, pp. 1361-1367.
- Correa-Betanzo, J., Allen-Vercoe, E., McDonald, J., Schroeter, K., Corredig, M., and Paliyath, G. (2014). Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chem.* 165: 522–531.
- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep.* 2009;26(8):1001-1043. doi:10.1039/b802662a
- Curin, Y.; Andriantsitohaina, R. Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. *Pharmacol. Rep.* **2005**, 52, 97–100.
- Dian-Nashiela, F. & Abdullah, Noriham & Hashim, Nooraain & Abdul Hamid, Azizah. (2015). Antioxidant activity of herbal tea prepared from *Cosmos caudatus* leaves at different maturity stages. *International Food Research Journal.* 22. 1189-1194.



- Dubeau, S.; Samson, G.; Tajmir-Riahi, H.A. Dual effect of milk on the antioxidant capacity of green, Darjeeling and English breakfast teas. *Food Chem.* **2010**, 122, 539–545.
- Etheridge Christopher John, Derbyshire Emma (2019.). Herbal infusions and health. A review of findings from human studies, mechanisms and future research directions. *Nutrition & Food Science*, Vol. 50 No. 5, 2020 pp. 969-985 Emerald Publishing Limited 0034-6659. DOI 10.1108/NFS-08-2019-0263.
- Farzaneh V, Carvalho IS. A review of the health benefit potentials of herbal plant infusions and their mechanism of actions. *Ind Crops Prod* 2015;65:247–58
- Figueira I., Menezes R., Macedo D., Costa I., Nunes dos Santos C. (2015.). Polyphenols Beyond Barriers: A Glimpse into the Brain. *Current Neuropharmacology*, 15, 562-594. DOI: 10.2174/1570159X14666161026151545
- Filosa, S.; Di Meo, F.; Crispi, S. Polyphenols-gut microbiota interplay and brain neuromodulation. *Neural Regen. Res.* 2018, 13, 2055–2059. [CrossRef] [PubMed]
- Fotakis, C., Tsigiriami, D., Tsiaka, T., Lantzouraki, D. Z., Strati, I. F., Makris, C., ... Zoumpoulakis, P. (2016). *Metabolic and antioxidant profiles of herbal infusions and decoctions.* *Food Chemistry*, 211, 963–971. doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.124
- Frankel, E.N., Finley, J.W. (2008.). How To Standardize the Multiplicity of Methods To Evaluate Natural Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(13):4901-8.
- Fu, L., Xu, B.-T., Gan, R.-Y., Zhang, Y., Xu, X.-R., Xia, E.-Q., & Li, H.-B. (2011). *Total Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Herbal and Tea Infusions.* *International Journal of Molecular Sciences*, 12(4), 2112–2124. doi:10.3390/ijms12042112
- Gawlik-Dziki, U., Dziki, D., Baraniak, B., and Lin, R. (2009). The effect of simulated digestion *in vitro* on bioactivity of wheat bread with Tartary buckwheat flavones addition. *LWT-Food Sci. Technol.* 42(1):137-143
- Gil-Izquierdo A, Gil MI, Ferreres F, Tom´as-Barber´an A. 2001. In vitro availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. *J Agricult Food Chem* 49:1035–41.
- Gorjanović, S., Komes, D., Pastor, F. T., Belščak-Cvitanović, A., Pezo, L., Hečimović, I., & Sužnjević, D. (2012). *Antioxidant Capacity of Teas and Herbal Infusions: Polarographic Assessment.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(38), 9573–9580. doi:10.1021/jf302375t
- Guo, S., Yan, J., Yang, T., Yang, X., Bezard, E., Zhao, B.,(2007.). Protective effects of green tea polyphenols in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease through inhibition of

ROS-NO pathway. *Biol. Psychiatry* 62,1353–1362.

- Grant P (2010) Spearmint herbal tea has significant anti-androgen effects in polycystic ovarian syndrome. A randomized controlled trial. *Phytother Res* 24(2):186–188. <https://doi.org/10.1002/ptr.2900>

- Habs, M., Binder, K., Krauss, S., Müller, K., Ernst, B., Valentini, L., & Koller, M. (2017). *A Balanced Risk–Benefit Analysis to Determine Human Risks Associated with Pyrrolizidine Alkaloids (PA)—The Case of Tea and Herbal Infusions*. *Nutrients*, 9(7), 717. doi:10.3390/nu9070717

- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(1), 125–126. doi:10.1016/0891-5849(95)91457-

- Han, X.; Shen, T.; Lou, H. Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.* **2007**, 8, 950–988. [CrossRef]

- Hano, C., & Tungmunnithum, D. (2020). Plant Polyphenols, More than Just Simple Natural Antioxidants: Oxidative Stress, Aging and Age-Related Diseases. *Medicines*, 7(5), 26. doi:10.3390/medicines7050026

- Holst B, Williamson G. 2008. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Curr Opin Biotechnol* 19:73–82.

-Horžić, D., Komes, D., Belščak, A., Ganić, K. K., Iveković, D., & Karlović, D. (2009). *The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions*. *Food Chemistry*, 115(2), 441–448. doi:10.1016/j.foodchem.2008.12.022

- Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J Agric Food Chem*. 2002;50(16):4437-4444. doi:10.1021/jf0201529

- Huang D., Ou B., Prior L. R. (2005.). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.

- Hu, J., Webster, D., Cao, J., Shao, A., (2018). The safety of green tea and green tea extracts consumption in adults – Results of a systematic review, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. Dostupno na: doi: 10.1016/j.yrtph.2018.03.019.

- *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Alkaloidi Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2020. Pristupljeno 2. 9. 2020. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=1790>

- Ippolitova, A. (2008). = Bggokbnoda, A. 2008. Pycrbe pyrogbcyse npadybrb XVII–XVIII eerod. Mocrda: Bylpbr.

- Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T., & Yankova, T. (2005). *Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology*, 96(1-2), 145–150. doi:10.1016/j.jep.2004.08.033
- Jadhav, S.J., Nimbalkar, S. S., Kulkarni, A.D., Madhavi, D. L. (1996) Lipid oxidation in biological and food systems. U: Food antioxidants(ured. Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunkhe, D. K.) New York : Marcel Dekker Inc.,str. 5–64.
- Jašić Midhat Prof dr (2010.). *Biološki aktivni sastojci hrane. Biološki aktivni sastojci hrane, dodaci prehrani, funkcionalna hrana i fortifikacija hrane. Materijal uz predavanja. Univerzitet u Tuzli. Tehnološki fakultet Tuzla.*
- Jilani, Hanène & Cilla, Antonio & Barberá, Reyes & Hamdi, Moktar. (2015). Biosorption of green and black tea polyphenols into *Saccharomyces cerevisiae* improves their bioaccessibility. *Journal of Functional Foods*. 17. 10.1016/j.jff.2015.05.006.
- Jin L, Li XB, Tian DQ, Fang XP, Yu YM, Zhu HQ, et al. Antioxidant properties and color parameters of herbal teas in China. *Ind Crops Prod* 2016;87:198–209.
- Jurica Karlo,(2016.). *Fenolne tvari iz obične planike (Arbutus unedo L.) i njihovi biološki učinci. Sveučilište u Zagrebu, Doktorski rad.*
- Kadoić Antonija, 2015. *Biodostupnost i zaštitni učinci polifenola. Završni rad.*
- Kavurt S, Bas AY, Aydemir O, Yucel H, Isikoglu S, Demirel N (2013). The effect of galactagogue herbal tea on oxidant and antioxidant status of human milk. *JMatern Fetal NeonatalMed* 26(10): 1048–1051. <https://doi.org/10.3109/14767058.2013.766690>
- Kimura, K., Ozeki, M., Juneja, L.R., Ohira, H. (2007.). L-Theanine reduces psychological and physiological stress responses, *Biol Psychol* 74(1):39-45.
- Kogiannou, D. A. A., Kalogeropoulos, N., Kefalas, P., Polissiou, M. G., & Kaliora, A. C. (2013). Herbal infusions; their phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory effects in HT29 and PC3 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 61, 152–159. doi:10.1016/j.fct.2013.05.027
- Kroon, P.A., Faulds, C.B., Ryden, P., Robertson, J.A., and Williamson, G. (1997). Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon. *J. Agric. Food Chem.* 45(3): 661–667.
- Kulišić T, Kriško A, Dragović-Uzelac V, Miloš M, Pifat G. The effects of essential oils and aqueous tea infusions of oregano (*Origanum vulgare* L. spp. *hirtum*), thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) on the copper-induced oxidation of human low-density lipoproteins. *Int J Food Sci Nutr.* 2007;58(2):87–93. doi: 10.1080/09637480601108307.

- Katelene Lima, Olga Silva, Maria Eduardo Figueira, Carolina Pires, Daisy Cruz, Samuel Gomes, Elisabete Muchagato Maurício, Maria Paula Duarte, Influence of the *in vitro* gastrointestinal digestion on the antioxidant activity of *Artemisia gorgonum* Webb and *Hyptis pectinata* (L.) Poit. infusions from Cape Verde. *Food Research International* (2018), doi:10.1016/j.foodres.2018.08.029
- Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2007) Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Prog. Lipid Res.* **46**,244.
- Laurent, C., Besançon, P., and Caporiccio, B. (2007). Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. *Food Chem.* 100(4): 1704–1712.
- Lima, K., Silva, O., Figueira, M. E., Pires, C., Cruz, D., Gomes, S., ... Duarte, M. P. (2018). Influence of the *in vitro* gastrointestinal digestion on the antioxidant activity of *Artemisia gorgonum* Webb and *Hyptis pectinata* (L.) Poit. infusions from Cape Verde. *Food Research International*. doi:10.1016/j.foodres.2018.08.029
- Lindenmuth GF, Lindenmuth EB (2000) The efficacy of echinacea compound herbal tea preparation on the severity and duration of upper respiratory and flu symptoms: a randomized, double-blind placebo-controlled study. *J Altern Complement Med* 6(4):327–334. <https://doi.org/10.1089/10755530050120691>
- Litwinienko, G., Ingold, K. U.(2003) Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 1. The reactions of phenols with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH •) in alcohols. *J. Org.Chem.* **68**, 3433–8.
- Lisica Patricija (2016.). Utjecaj uvjeta ekstrakcije na izolaciju fenolnih spojeva iz organskog otpada u proizvodnji vina. Završni rad, Zagreb.
- Loya AM, González-Stuart A, Rivera JO. Prevalence of polypharmacy, polyherbacy, nutritional supplement use and potential product interactions among older adults living on the United States-Mexico border: a descriptive, questionnaire-based study. *Drugs Aging.* 2009;26(5):423-436. doi:10.2165/00002512-200926050-00006
- Madhujith, T., and Shahidi, F. (2009). Antioxidant potential of barley as affected by alkaline hydrolysis and release of insoluble-bound phenolics. *Food Chem.* 117(4): 615–620.
- Mađarić Josipa (2014.). Bioaktivne komponente čaja. Završni rad, Osijek.
- Malongane, F.; McGaw, L.J.; Mudau, F.N. The synergistic potential of various teas, herbs and therapeutic drugs in health improvement: A review. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, 97, 4679–4689
- Manach Claudine, Scalbert Augustin, Morand Christine, Rémésy Christian, and Jiménez Liliana,(2004.) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79:727–47. Printed in USA. © 2004 American Society for Clinical Nutrition

- Mancini Edele, Beglinger Christoph, Drewe Jürgen, Zanchi Davide, Lang, E U., Stefan Borgwardt (2017.) Green tea effects on cognition, mood and human brain function: A systematic review. *Phytomedicine* ;34:26-37. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2017.07.008>
- Manganaris GA, Goulas V, Vicente AR, Terry LA. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *J Sci Food Agric*. 2014;94(5):825-833. doi:10.1002/jsfa.6432
- Maufrais C, Sarafian D, Dulloo A, Montani JP (2018). Cardiovascular and metabolic responses to the ingestion of caffeinated herbal tea: drink it hot or cold? *Front Physiol* 9:315. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00315>
- McKay, Diane & Blumberg, Jeffrey. (2006). A Review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L). *Phytotherapy Research*. 20. 619-633. 10.1002/ptr.1936.
- McMurry John (2014.).Osnove organske kemije. Zrinski d.d.7.izdanje, str. 257-259.
- Mandić Vedrana (2017.). Razvoj i validacija novog tipa HPLC detektora za određivanje bioaktivnih sastojaka u hrani. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu.Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- McDougall, G.J., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., and Stewart, D. (2005). Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an *in vitro* digestion system. *J. Agric. Food Chem*. 53(15): 5896–5904.
- McMurry John (2014.).Osnove organske kemije. Zrinski d.d.7.izdanje, str. 257-259.
- Miller,N. J., Rice-Evans, C.A.(1997.).The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry* 60(3);3. Pages 331-337.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C.,Carriere, F., Boutrou, R., Corredig, M., and Dupont, D. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus. *Food Funct*. 5(6): 1113–1124.
- Molnar Maja i Čačić M. (2011.). Biološka aktivnost derivata kumarina – pregledni rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek. *Croat. J. Food Sci. Technol*. 3 (2) 55-64
- Molyneux, P. (2004). The Use of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 26, 211-219.
- Moraes de Souza, Rodrigo & Oldoni, Tatiane & D'Arce, Marisa & Alencar, Severino. (2008). ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHENOLIC COMPOSITION OF HERBAL INFUSIONS CONSUMED IN BRAZIL  
ACTIVIDAD AD ANTIOXIDANTE Y COMPUESTOS FENÓLICOS EN INFUSIONES HERBARIAS  
CONSUMIDAS EN BRASIL. *CYTA - Journal of Food*. 6. 41-47. 10.1080/11358120809487626.

- Mozaffari-Khosravi H, Jalali-Khanabadi BA, Afkhami- Ardekani M, Fatehi F, Noori-Shadkam M (2009) The effects of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on hypertension in patients with type II diabetes. *J Hum Hypertens* 23(1):48–54. <https://doi.org/10.1038/jhh.2008.100>
- Ohishi Tomokazu, Goto Shingo, Monira Pervin, Isemura Mamoru, Nakamura Yoriyuki (2016.) Anti-inflammatory Action of Green Tea. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*;15(2):74-90. Dostupno na: <https://doi.org/10.2174/1871523015666160915154443>
- Olennikov DN, Kashchenko NI, Chirikova NK, et al. Caffeoylquinic Acids and Flavonoids of Fringed Sagewort (*Artemisia frigida* Willd.): HPLC-DAD-ESI-QQQ-MS Profile, HPLC-DAD Quantification, in Vitro Digestion Stability, and Antioxidant Capacity. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(8):307. Published 2019 Aug 14. doi:10.3390/antiox8080307
- Ortega-Vidal, J., Ruiz-Riaguas, A., Fernández-de Córdova, M. L., Ortega-Barrales, P., & Llorent-Martínez, E. J. (2019). *Phenolic profile and antioxidant activity of Jasonia glutinosa herbal tea. Influence of simulated gastrointestinal in vitro digestion. Food Chemistry*. doi:10.1016/j.foodchem.2019.02.101
- Pastoriza S, Delgado AC, Haro A, Rufian HJ.(2011.). A physiologic approach to test the global antioxidant response of foods. The GAR method. *Food Chem*;129:1926-32.
- Pearson, W., Fletcher, R.S., Kott, L.S. and Hurtig, M.B. (2010), “Protection against LPS-induced cartilage inflammation and degradation provided by a biological extract of *Mentha spicata*”, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, Vol. 10 No. 1, p. 19.
- Peng, H., Li, W., Li, H., Deng, Z., and Zhang, B. (2017). Extractable and nonextractable bound phenolic compositions and their antioxidant properties in seed coat and cotyledon of black soybean (*Glycinemax* (L.) merr). *J. Funct. Food* 32: 296–312.
- Pereira, C., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). *A Comparison of the Nutritional Contribution of Thirty-nine Aromatic Plants used as Condiments and/or Herbal Infusions. Plant Foods for Human Nutrition*, 70(2), 176–183. doi:10.1007/s11130-015-0476-7
- Pérez-Burillo, S., Pastoriza, S., Rufián-Henares, J.A.,(2017.), Towards an improved Global Antioxidant Response method (GAR+): physiological-resembling in vitro antioxidant capacity methods, *Food Chemistry*. Dostupno na: doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.063>
- Petreski Antica, Novosel Frances, (2010.). *Repetitorij kemije za srednje škole. Školska knjiga,Zagreb*, 234-235. str.

- Pieroni A, Quave CL, Pieroni A, Quave CL. In: Eating and healing: traditional food as medicine. Pieroni A, Price LL, editor. Binghamton, NY, USA: Haworth Press; 2006. Functional foods or food-medicines? On the consumption of wild plants among Albanians and Southern Italians in Lucania; pp. 101–129.
- Pinto, J., Spínola, V., Llorent-Martínez, E. J., Fernández-de Córdova, M. L., Molina-García, L., & Castilho, P. C. (2017). Polyphenolic profile and antioxidant activities of Madeiran elderberry (*Sambucus lanceolata*) as affected by simulated in vitro digestion. *Food Research International*, 100, 404–410.
- Pisoschi Aurelia Magdalena, Pop Aneta, Cimpeanu Carmen, Predoi Gabriel (2016.). Antioxidant Capacity Determination in Plants and Plant-Derived Products: A Review. Dostupno na: <https://doi.org/10.1155/2016/9130976>
- Pokorný, J. (2007). Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(6), 629–642. doi:10.1002/ejlt.200700064
- Poswal, F. S., Russell Grace, Mackonochie Marion, MacLennan Euan, Adukwu, E.C., Rolfe Vivien, (2019.). Herbal Teas and their Health Benefits: A scoping Review. *Plant Foods for Human Nutrition*; <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00750-w>
- Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., Jacob, R. (2003) Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC FL) of plasma and other biological and food samples. *J, Agric, Food Chem* **51**, 3273.
- Raal A, Volmer D, Sõukand R, Suskevits S, Kalle R. Complementary treatment of the common cold and flu with medicinal plants - results from two samples of pharmacy customers in Estonia. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e58642. doi: 10.1371/journal.pone.0058642.
- Rafraf, M., Zemestani, M. and Asghari-Jafarabadi, M. (2015), “Effectiveness of chamomile tea on glycemic control and serum lipid profile in patients with type 2 diabetes”, *Journal of Endocrinological Investigation*, Vol. 38 No. 2, pp. 163-170.
- Ramu R, Shirahatti PS, Anilakumar KR, Nayakavadi S, Zameer F, Dhananjaya BL, *et al.* (2017.). Assessment of nutritional quality and global antioxidant response of banana (*Musa* sp. CV. Nanjangud Rasa Bale) pseudostem and flower. *Phcog Res* 2017;9:S74-83.
- Ravikumar, Chandini. (2014). Review on herbal teas. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 6. 236-238.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. , Rice-Evans, C. (1999.).\_Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9-10).Pages 1231-1237
- Rice-Evans Catherine A., Miller Nicholas J. i Paganga George (1996.). Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 20, No. 7, pp. 933-956. Elsevier Science Inc.
- Rice-Evans Catherine A., Miller Nicholas J. i Paganga George (1997.). Antioxidant Properties of henolic Compounds. *Trends in Plant Science*. Vol. 2, No. 4. page 152.-159.
- Riza E, Linos A, Petralias A, de Martinis L, Duntas L, Linos D (2015) The effect of Greek herbal tea consumption on thyroid cancer: a case-control study. *Euro J Public Health* 25(6):1001–1005.  
<https://doi.org/10.1093/eurpub/ckv063>
- Reygaert, C. W. (2018.). Green Tea Catechins: Their Use in Treating and Preventing Infectious Diseases. *Hindawi, BioMed Research International*, mArticle ID 9105261. Dostupno na: <https://doi.org/10.1155/2018/9105261>
- Rogić Renata (2014). Antioksidacijska svojstva nekih biljnih svojti s područja Blidinja (Bosna i Hercegovina).Diplomski rad,Zagreb.
- Santoro GF, das Graças Cardoso M, Guimaraes L, Salgado A, Menna-Barreto RFS, Soares MJ. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on Trypanosoma cruzi (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol Res.* 2007;100:783–790. doi: 10.1007/s00436-006-0326-5.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492-501.
- Santoro GF, das Graças Cardoso M, Guimaraes L, Salgado A, Menna-Barreto RFS, Soares MJ. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on Trypanosoma cruzi (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol Res.* 2007;100:783–790. doi: 10.1007/s00436-006-0326-5.
- Serafini, Mauro & Del Rio, Daniele & Yao, Denis & Bettuzzi, Saverio & Peluso, Ilaria. (2011). Health Benefits of Tea. 10.1201/b10787-13.



- Schlesier, K., Harwat ,M., Bohm, V., Bitsch, R. (2002) Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic. Res.* **36**, 177.
- Shahidi, F., and Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *J. Funct. Food* 18: 820–897.
- Shahidi, Fereidoon & Peng, Han. (2018). Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. *Journal of Food Bioactives*. 4. 10.31665/JFB.2018.4162.
- Shahidi, F., and Yeo, J. (2016). Insoluble-Bound Phenolics in Food. *Molecules* 21(9): 1216.
- Singh D, Gupta R, Saraf SA. Herbs-are they safe enough? An overview. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2012;52:876e898.
- Singleton V. L., Rossi Joseph A. *Am Vitic J Enol.* (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents
- Siracusa, L., Kulisic-Bilusic, T., Politeo, O., Krause, I., Dejanovic, B., & Ruberto, G. (2011). Phenolic composition and antioxidant activity of aqueous infusions from *Capparis spinosa* L. and *Crithmum maritimum* L. before and after submission to a two-step in vitro digestion model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23), 12453–12459.
- Srivastava, J.K., Shankar, E. and Gupta, S. (2010), “Chamomile: a herbal medicine of the past with bright future”, *Molecular Medicine Reports*, Vol. 3 No. 6, pp. 895-901.
- Stevens, J.K.; Maier, C.S. The chemistry of gut microbial metabolism of polyphenols. *Phytochem. Rev.* **2016**, 15, 425–444.
- Svanberg I, Łuczaj Ł, Pardo-de-Santayana M, Pieroni A. In: *Ethnobiology*. Anderson EN, Pearsall D, Hunn E, Turner N, editor. Chichester, UK: Wiley-Blackwell; 2011. History and current trends of Ethnobiological research in Europe; pp. 191–214.
- Šoukand R, Kalle R. The use of *teetaimed* in Estonia, 1880s-1990s. *Appetite.* 2012;59:523–530. doi: 10.1016/j.appet.2012.06.017.
- Šatović Zlatko (1993.). Biokemijske i genetske osobine alkaloida bijele lupine (*Lupinus Albus*). Pregledni znanstveni rad. *Sjemenarstvo* 10(13) 3-4.
- Šošević Selma (2012). BIOLOŠKA AKTIVNOST SAPONINA NA PRIMJERU ZLATICE. Pregledni rad. *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku* 1 (2) 48-51

- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). *In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols*. *Food Chemistry*, 120(2), 599–606. doi:10.1016/j.foodchem.2009.10.030
- Tenore, G.C.; Campiglia, P.; Giannetti, D.; Novellino, E. Simulated gastrointestinal digestion, intestinal permeation and plasma protein interaction of white, green, and black tea polyphenols. *Food Chem.* **2015**, 169, 320–326.
- Tenore, G.C.; Campiglia, P.; Ritieni, A.; Novellino, E. In vitro bioaccessibility, bioavailability and plasma protein interaction of polyphenols from Annurca apple (*M. pumila* Miller cv Annurca). *Food Chem.* **2013**, 141, 3519–3524.
- Tenore, G.C.; Daglia, M.; Ciampaglia, R.; Novellino, E. Exploring the nutraceutical potential of polyphenols from black, green and white tea infusion—An overview. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2015**, 16, 265–271.
- Tenore, G.C.; Stiuso, P.; Campiglia, P.; Novellino, E. In vitro hypoglycaemic and hypolipidemic potential of white tea polyphenols. *Food Chem.* **2013**, 141, 2379–2384.
- Tilburt JC, Kaptchuk TJ. Herbal medicine research and global health: an ethical analysis. *Bull World Health Organ.* 2008;86(8):594-599. doi:10.2471/blt.07.042820
- Tingting Chen & Chung S. Yang (2019): Biological fates of tea polyphenols and their interactions with microbiota in the gastrointestinal tract: implications on health effects, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, DOI: 10.1080/10408398.2019.1654430
- Tomás-Barberán, F.A.; Selma, M.V.; Espín, J.C. Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2016**, 19, 471–476.
- Tseng, Y.F., Chen, C.H. and Yang, Y.H. (2005), “Rose tea for relief of primary dysmenorrhea in adolescents: a randomized controlled trial in Taiwan”, *J Midwifery Womens Health*, Vol. 50, pp. 51-57.
- Turkyılmaz C, Onal E, Hirfanoglu IM, Turan O, Koç E, Ergenekon E, Atalay Y (2011) The effect of galactagogue herbal tea on breast milk production and short-term catch-up of birth weight in the first week of life. *J Altern ComplementMed* 17(2):139–142. <https://doi.org/10.1089/acm.2010.0090>
- Van Duynhoven, J.; Vaughan, E.E.; van Dorsten, F.; Gomez-Roldan, V.; de Vos, R.; Vervoort, J.; van der Hooft, J.J.; Roger, L.; Draijer, R.; Jacobs, D.M. Interactions of black tea polyphenols with human gut microbiota: Implications for gut and cardiovascular health. *Am. J. Clin. Nutr.* 2013, 98, 1631S–1641S.

- Vidović B., Bejatović B., Šobajić S., Kovačević N., Živković V. (2007.). Analiza kvaliteta nekoliko vrsta biljnih čajeva sa tržišta. Stručni rad. *Hrana i ishrana*: BIBLID: 0018-6872, 48 (2007), 1-4 P. 52-56
- Vidya TJ, Kulkarni KS (2002) Using herbal tea in the treatment modality: special reference to slimtea in overweight individuals. *Anc Sci Life* 21(3):202–204
- Villanueva-Carvajal A, Bernal-Martínez LR, García-Gasca MT. 2013. *In vitro* gastrointestinal digestion of *Hibiscus sabdariffa* L.: the use of its natural matrix to improve the concentration of phenolic compounds in gut. *LWT –Food Sci Technol* 51:260–5.
- Villa-Rodriguez, J. A., Aydin, E., Gauer, J. S., Pyner, A., Williamson, G., & Kerimi, A. (2017). Green and chamomile teas, but not acarbose, attenuate glucose and fructose transport via inhibition of GLUT2 and GLUT5. *Molecular nutrition & food research*, 61(12), 1700566.
- Visioli F, Borsani L, Galli C. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovascular Research*. 2000 Aug;47:419-25.
- Zemestani, Maryam & Rafrat, Maryam & Asghari Jafarabadi, Mohammad. (2015). Chamomile tea improves glycemic indices and antioxidants status in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif.). 32. 10.1016/j.nut.2015.07.011.
- Zeraatpishe, Akbar & Oryan, Shahrbanoo & Bagheri, Mohammad & Pilevarian, Ali & Malekirad, Ali & Baeeri, Maryam & Abdollahi, Mohammad. (2011). Effect of *Melissa officinalis* L. on oxidative status and DNA damage in subjects exposed to long-term low-dose ionizing radiation. *Toxicology and industrial health*. 27. 205-12. 10.1177/0748233710383889.
- Zhao i sur. (2015.). Cheung, P. C. K., & Mehta, B. M. (Eds.). (2015). *Handbook of Food Chemistry*. doi:10.1007/978-3-642-36605-5; str. 965.
- Zhang Haihua, Jiang Yulan, Pan Junxian, Lv Yangjun, Liu Jun, Zhang Shikang, Zhu Yuejin (2017.). Effect of tea products on the *in vitro* enzymatic digestibility of starch. *Elsevier. Food Chemistry*. Dostupno na ScinceDirect: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.138>
- Zheng, W.Z. and Wang, S.Y. (2001) Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5165-5170.
- Walsh, K.R., Zhang, Y.C., Vodovotz, Y., Schwartz, S.J., and Failla, M.L. (2003). Stability and bioaccessibility of isoflavones from soy bread during *in vitro* digestion. *J. Agric. Food Chem.* 51(16): 4603–4609.
- Weisburger JH, Comer J. In: *The Cambridge world history of food*. Kiple KF, Ornelas KC, editor. Cambridge: Cambridge University Press; 2000. Tea; pp. 712–720.

- World Health Organization (WHO). National Policy on Traditional Medicine and Regulation of Herbal Medicines. Geneva: 2005. Report of WHO global survey.
- Wu, C., Xu, H., Héritier, J., & Andlauer, W. (2012). Determination of catechins and flavonol glycosides in Chinese tea varieties. *Food Chemistry*, 132, 144–149.
- Yazdanpanah, B., Wiegmann, K., Tchikov, V. et al. (2009). Riboflavin kinase couples TNF receptor 1 to NADPH oxidase. *Nature* 460, 1159–1163 <https://doi.org/10.1038/nature08206>
- Ye, J.; Fan, F.; Xu, X.; Liang, Y. Interactions of black and green tea polyphenols with whole milk. *Food Res. Int.* **2013**, 53, 449–455.
- Yohei Shirakami, Masahito Shimizu (2018.). Possible Mechanisms of Green Tea and Its Constituents against Cancer. *Molecules* 23, 2284. Dostupno na: doi:10.3390/molecules23092284
- Yui, S., Fujiwara, S., Harada, K., Motoike-Hamura, M., Sakai, M., Matsubara, S. and Miyazaki, K. (2017), “Beneficial effects of lemon balm leaf extract on in vitro glycation of proteins, arterial stiffness, and skin elasticity in healthy adults”, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, Vol. 63 No. 1, pp. 59-68.
- Qi, Z. (2013). WHO Traditional Medicine Strategy. 2014-2023. *Geneva: World Health Organization*.
- <http://www.zzjzpgz.hr/nzl/86/fitoterapija.htm>

## **5. ŽIVOTOPIS:**

### **Osobni podaci:**

**Ime i prezime:** Merima Čulah

**Datum rođenja:** 6. travnja 1997.

**Mjesto rođenja:** Pula

**Državljanstvo:** hrvatsko

**E-mail:** merima.culah@hotmail.com

**Obrazovanje:**

**2004-2008** Područna škola „Ivo Lola Ribar, Vinež 65, 52220 Labin

**2008-2012** Osnovna škola „Ivo Lola Ribar“, Rudarska ul. 9, 52220 Labin

**2012-2016** Srednja škola „Mate Blažine“ ,smjer opća gimnazija, Rudarska ul. 4,52220 Labin

**2016-2020** Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Prediplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva, Ul. Braće Branchetta 20/1, 51000 Rijeka

**Radno iskustvo:**

**rujan 2013 –lipanj 2015** volonterski rad – vođenje školske radio-emisije, Radio Labin d.o.o.

**srpanj 2015 –rujan 2015** pomoćni konobar Restaurant/Konoba / Kavana „Velo kafe“, Labin, Istra

**srpanj 2016- rujan 2016** pomoćni konobar Restaurant/Konoba / Kavana „Velo kafe“, Labin, Istra

**lipanj 2017- rujan 2017** pomoćni konobar Restaurant/Konoba / Kavana „Velo kafe“, Labin, Istra

**srpanj 2018- rujan 2018** pomoćni konobar Restaurant/Konoba / Kavana „Velo kafe“, Labin, Istra

**srpanj 2019- rujan 2019** trgovac, Jedinstvo d.o.o. Labin

**studeni 2020 – ožujak 2020.-** pomoćni trgovac, Ghetaldus optika d.d. Zagreb