

# Fenolni spojevi u biljkama

---

Galić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:*

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek /  
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:151:320230>

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

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



Sveučilište Josipa Jurja  
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet  
agrobiotehničkih  
znanosti Osijek**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical  
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of  
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Lucija Galić, studentica

Diplomski studij Ishrana bilja i tloznanstvo

**FENOLNI SPOJEVI U BILJKAMA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2020.**

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Lucija Galić, studentica

Diplomski studij Ishrana bilja i tloznanstvo

**FENOLNI SPOJEVI U BILJKAMA**

**Diplomski rad**

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. prof.dr.sc. Tihana Teklić, predsjednik
2. izv.prof.dr.sc Miroslav Lisjak, mentor
3. izv.prof.dr.sc. Andrijana Rebekić, član

**Osijek, 2020.**

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Fenolni spojevi .....	1
1.2. Sinteza fenolnih spojeva.....	2
1.3. Vrste fenolnih spojeva i uloga u biljkama .....	4
1.3.1. Lignin .....	4
1.3.2. Flavonoidi.....	6
1.3.3. Tanini.....	10
1.4. Put razgradnje i fenil-propanoidni put.....	11
2. INTERAKCIJA IZMEĐU BILJAKA I DRUGIH ORGANIZAMA POMOĆU FENOLNIH SPOJEVA .....	19
2.1. Značaj fenolnih spojeva za ljudsku prehranu .....	22
3. METODE I ANALIZE DOKAZIVANJA FENOLNIH SPOJEVA U BILJKAMA .....	35
3.1. Vrste ekstrakcija fenolnih spojeva iz biljaka.....	37
3.2. Metode detekcije fenolnih spojeva i njihove aktivnosti u biljkama .....	49
3.2.1. Spektrometrijske tehnike .....	50
3.2.2. Elektrokemijske tehnike .....	54
3.2.3. Metoda biosenzora.....	55
3.2.4. Kromatografske metode .....	56
3.2.5. Komparacije različitih metoda .....	59
4. UKUPAN SADRŽAJ FENOLA I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST U PŠENICI ( <i>Triticum aestivum L.</i> ) I SOJI ( <i>Glycine max L. Merill.</i> ).....	63
5. ZAKLJUČAK.....	70
6. POPIS LITERATURE.....	71
7. SAŽETAK .....	77
7. SUMMARY .....	78
8. POPIS SLIKA .....	79
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	
BASIC DOCUMENTATION CARD	

# 1. UVOD

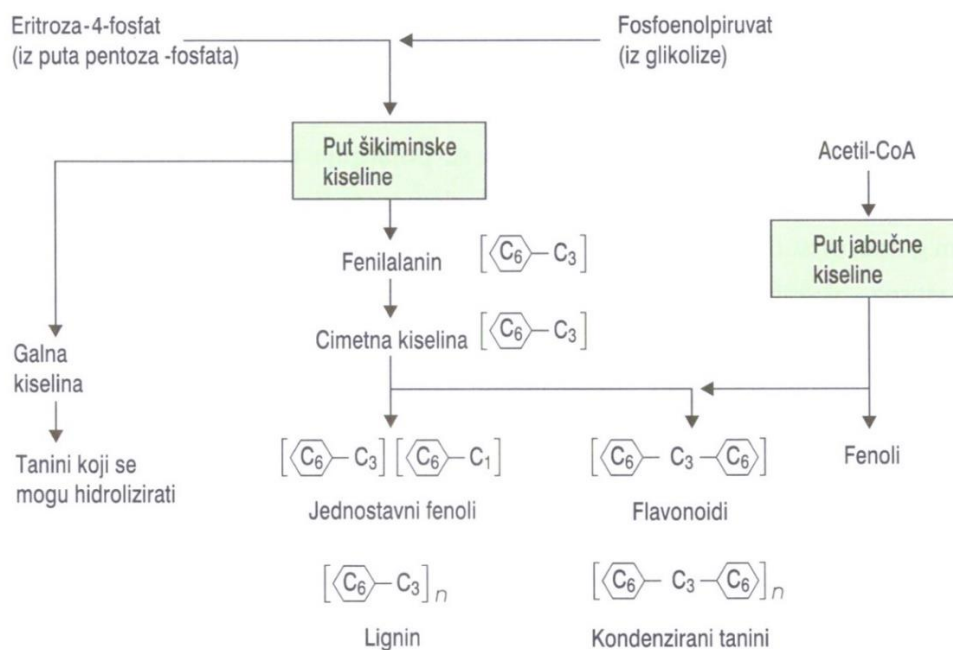
## 1.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi u biljkama su mnogobrojni i pripadaju sekundarnim tvarima u biljnom metabolizmu. To je grupa spojeva koja ima fenolnu odnosno hidroksilnu skupinu na aromatskom prstenu. Nalazimo ih u obliku glikozida ili estera šećera otopljene u vakuoli. Biljke proizvode brojne sekundarne metabolite koji sadrže fenolnu skupinu. Biljni fenoli su *kemijski raznovrsna* skupina spojeva, neki od kojih su topivi samo u organskim otapalima, neki u vodi, a neki su veliki, netopivi polimeri. Uloge biljnih fenola su razne, kao na primjer obrana biljke od herbivornih organizama, dok drugi sudjeluju u mehaničkoj potpori, privlačenju oprašivača i rasprostranjivača plodova ili redukciji rasta susjednih biljaka (Pevalek-Kozlina, 2003.). Fenolni spojevi su sveprisutni u biljkama, biljnim namirnicama i pićima. Fenoli također pokazuju veliku raznolikost struktura, od prilično jednostavnih molekula (npr. vanilin, galnu kiselinu, kofeinsku kiselinu) do polifenola poput stilbena, avonoida i polimera izvedenih iz različitih skupina. Do sada je otkriveno preko 8000 molekula samo iz skupine flavonoida, a popis se i dalje širi. Iako se izraz polifenol često upotrebljava kao sinonim fenolnog spoja, treba ga ograničiti na molekule koje nose barem dva fenolna prstena. Polifenole su prvi utvrdili Swain i Bate-Smith (1962.) i definirali ih kao vodotopljive fenolne spojeve koji imaju molarnu masu između 500 i 3000 Daltona (Da) i uobičajene fenolne reakcije, te specifična svojstva poput sposobnosti taloženja alkaloida, želatine i drugih proteina iz otopine. Definicija se proširuje tako da polifenoli posjeduju 12-16 fenolnih hidroksilnih skupina na pet do sedam aromatskih prstenova na 1.000 Da relativne molekulske mase. Nedavno je predložena sveobuhvatnija definicija, da izraz 'polifenol' treba koristiti za određivanje biljnih sekundarnih metabolita koji potječu isključivo iz fenilpropanoida sintetiziranih od šikimata i / ili poliketidnih putova koji sadrže više od jednog fenolnog prstena lišenih bilo koje funkcionalne skupine koja se temelji na dušiku u njihovom najosnovnijem strukturnom izrazu (Cheynier, 2012.). Nedavno provedena istraživanja tržišta predviđala su snažan porast potražnje na tržištu polifenola zbog sve većih zahtjeva i veličine tržišta. Ovo istraživanje pokazalo je da je globalna potražnja za polifenolima sve veća. Bilo je očekivano da će tržište polifenola 2018. godine doseći 873,7 milijuna USD. Procijenjena

potražnja se temelji na prihodu (u milijunima USD) za razdoblje 2012. - 2018., s godišnjom stopom rasta od 6,1 % (Ameer i sur., 2017.).

## 1.2. Sinteza fenolnih spojeva

Postoje različiti načini sinteze fenolnih spojeva. Najvažnija dva puta biosinteze uključuju put šikiminske kiseline i put jabučne kiseline (*Slika 1*). Put šikiminske kiseline sudjeluje u biosintezi većine biljnih fenola, dok put jabučne kiseline ima malo značaja u sintezi biljnih fenolnih spojeva, ali je značajan kod gljiva i bakterija. Kod viših biljaka većina sekundarnih fenolnih spojeva nastaje barem dijelom iz fenilalanina, produkta puta šikiminske kiseline. U putu šikiminske kiseline aromatske aminokiseline se sintetiziraju iz ugljikohidratnih prekursora iz ciklusa pentoza-fosfata ( $\alpha$ -eritroza-4-fosfat) i glikolize (fosfoenolpiruvatna kiselina). Put šikiminske kiseline prisutan je u biljkama, gljivama i bakterijama, no nije pronađen kod životinja jer životinje ne posjeduju put za sintezu tri aromatske aminokiseline, fenilalanina, tirozina i triptofana (Pevalek-Kozlina, 2003.).

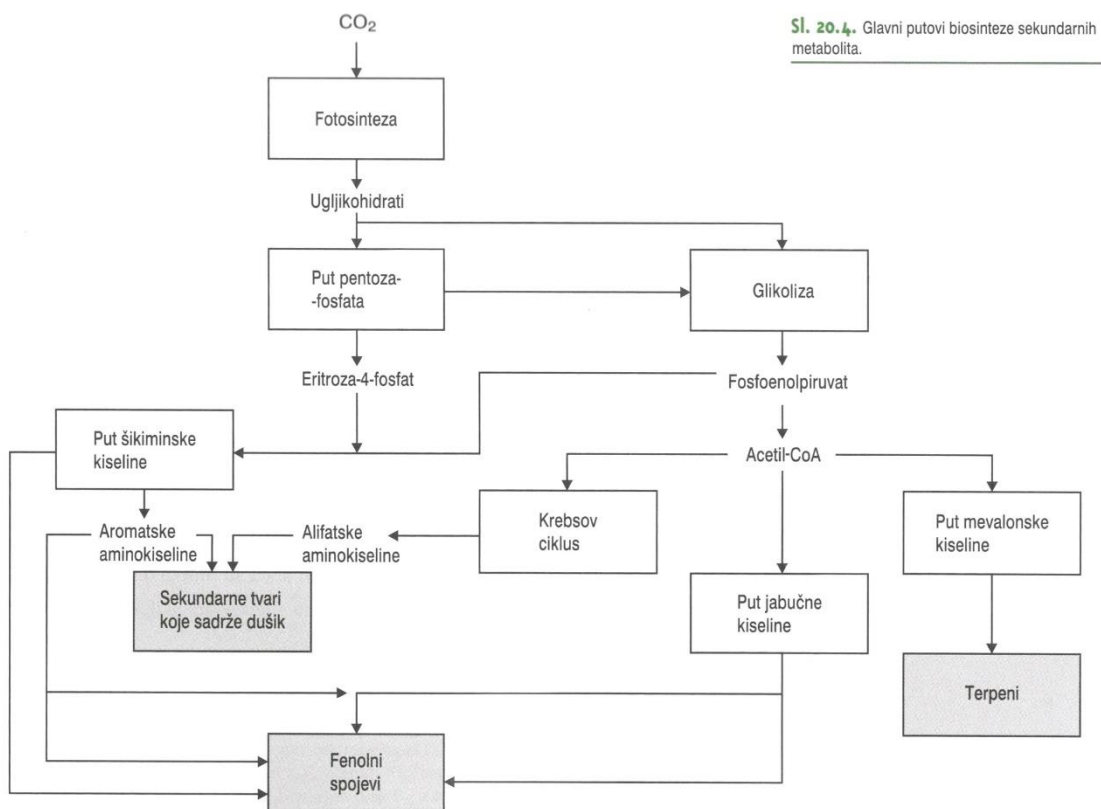


**Slika 1:** Put šikiminske i jabučne kiseline

Izvor: (Pevalek-Kozlina, 2003.)

Većina sekundarnih fenolnih tvari nastaje iz fenilalanina i tirozina, a u većine biljaka ključni korak sinteze je konverzija fenilalanina u cimetnu kiselinu eliminiranjem jedne molekule

amonijaka. (Slika 2) Tu reakciju katalizira enzim fenilalanin-amonij-lijaza (PAL), čija je aktivnost pod kontrolom brojnih okolišnih i unutrašnjih čimbenika, na primjer regulatora rasta, opskrbe hranjivim tvarima, svjetlosti, gljivične infekcije i ranjavanja. Kontrolna točka je najvjerojatnije na razini poticanja transkripcije. Gljivična infekcija na primjer potiče sintezu mRNA koja kodira fenilalanin-amonij-lijazu, povećavajući tako njezin sadržaj u biljci, što onda stimulira sintezu fenolnih spojeva. Produkt fenilalanin-amonij-lijaze je *trans*-cimetna kiselina, jednostavan C<sub>9</sub> fenolni produkt poznat kao fenilpropan jer sadrži benzenski prsten i bočni lanac s tri C-atoma. U jednostavne biljne fenole ubrajaju se: (1) jednostavni fenilpropani, na primjer *trans*-cimetna, kavina i ferulniska kiselina, (2) fenilpropanski laktoni (ciklički esteri) ili kumarini, na primjer umbeliferon i psoralen i (3) derivati benzojeve kiseline koji nastaju iz fenilpropanoida otkidanjem fragmenata s dva C-atoma od bočnog lanca.



**Slika 2:** Osnovni putovi dobivanja sekundarnih metabolita u biljkama

Izvor: (Pevalek-Kozlina, 2003.)

Mnogi od ovih spojeva imaju važnu ulogu u biljkama u vidu obrane od herbivornih kukaca i gljiva. Osobito su zanimljivi fototoksični furanokumarini. Oni nisu otrovni sve dok ih ne aktivira svjetlost valne duljine 320-400 nm (UV-A regija) koja ih dovodi u visokoenergizirano stanje. Aktivirani furanokumarini se mogu ugrađivati u dvostruku zavojnicu DNA, gdje se vežu na pirimidinske baze citozin i timin, te tako blokiraju transkripciju i popravak, što može uzrokovati smrt stanice. Česti su u vrstama iz porodice *Apiaceae*, uključujući celer, peršin i pastinak, no neke vrste kukaca mogu živjeti u smotanim listovima koji nisu izloženi aktivirajućoj valnoj duljini svjetlosti. Iz listova, korijena i otpalog lišća koje trune u okoliš dospijevaju brojni biljni primarni i sekundarni metaboliti. Te tvari mogu utjecati na susjedne biljke tako da reduciraju rast (alelopatija), što im omogućava bolju izloženost svjetlosti i veću dostupnost vode i mineralnih tvari. Jednostavni fenolni spojevi često pokazuju alelopatsku aktivnost. Kavina i ferulinska kiselina, koje su u tlu prisutne u zamjetnim količinama, u laboratorijskim uvjetima inhibiraju klijanje i rast mnogih vrsta biljaka. O važnosti alelopatije u prirodnim ekosustavima još uvijek postoje brojne nedoumice (Pevalek-Kozlina, 2003.).

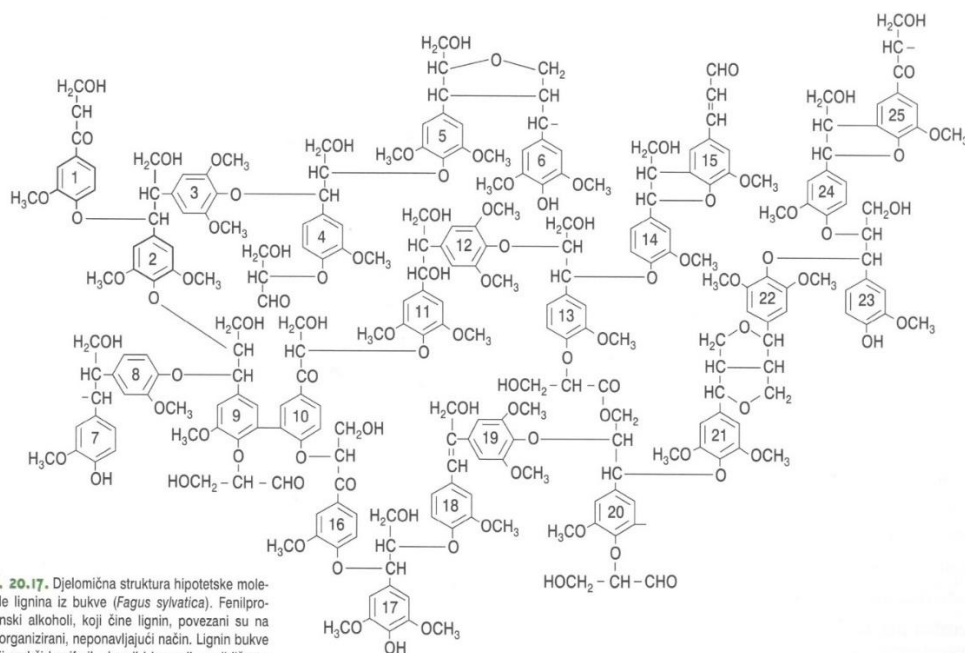
### **1.3. Vrste fenolnih spojeva i uloga u biljkama**

#### *1.3.1. Lignin*

Lignin je visoko razgranat polimer fenilpropanskih skupina. Nakon celuloze, to je najobilnija organska tvar prisutna u biljkama. Precizna struktura lignina još uvijek nije poznata. Budući da je kovalentno vezan na celulozu i druge polisaharide stanične stijenke, vrlo ga je teško ekstrahirati iz biljnog materijala. Lignin nastaje dehidratacijskom polimerizacijom triju fenilpropanskih alkohola – koniferila, kumarila i sinapila, koji se sintetiziraju iz fenilalanina preko derivata cimetine kiseline. Građevne jedinice lignina prenose se na mjesta njegove biosinteze u obliku  $\beta$ -glikozida glukokumaril alkohola, koniferina i siringina, koji su lakše topivi u vodi i ne polimeriziraju spontano. Na mjestima sinteze lignina alkoholi se oslobađaju djelovanjem enzima  $\beta$ -glukozidaze i enzimatski se dehidriraju u radikale koji se na različite načine spajaju u tri dimenzije i ulažu između celuloznih mikrofibrila u staničnoj stijenci. Spajanje fenilpropanskih alkohola u polimer kataliziraju enzimi peroksidaze. Peroksidaze kataliziraju oksidaciju fenilpropanskih alkohola, stvarajući međuspojeve sa slobodnim radikalima koji se neenzimski kombiniraju tvoreći lignin. U molekuli lignina često postoje



višestruke veze na svaku jedinicu fenilpropanskog alkohola, što rezultira kompleksnom strukturom koja se grana u tri dimenzije. (Slika 3) U ligninu golosjemenjača prevladava koniferilni alkohol, dok su u ligninu dvosupnica koniferilni i sinapilni alkohol zastupljeni u približno jednakim količinama, a kumarilni samo u tragovima. U ligninu jednosupnica, prvenstveno trava, u većoj je količini prisutan  $\rho$ -kumarilni alkohol. Lignin je prisutan u staničnim stijenkama različitih vrsta mehaničkih i provodnih tkiva, osobito u trahejama i traheidama. Odlaze se u zadebljanja sekundarne stijenke, ali može biti prisutan i u primarnoj stijenci i središnjoj lameli u bliskom kontaktu s celulozom i hemicelulozom. Mehanička čvrstoća lignina učvršćuje stabljiku i provodna tkiva, omogućavajući uspravan rast, te provođenje vode i mineralnih tvari kroz ksilem pod negativnim tlakom, a da tkivo pritom ne kolabira. Osim toga, lignin ima i zaštitnu ulogu. Njegova tvrdoća djeluje odvratajuće na životinje, a kemijska struktura uzrokuje neprobavljivost. Lignifikacija također sprječava rast patogena i čest je odgovor biljaka na infekcije ili oštećenja (Pevalek-Kozlina, 2003.).



**Sl. 20.17.** Djelomična struktura hipotetske molekule lignina iz bukve (*Fagus sylvatica*). Fenilpropanski alkoholi, koji čine lignin, povezani su na neorganizirani, neponavljajući način. Lignin bukve koji sadrži koniferil, sinapil i kumaril u približnom odnosu 100:70:7 tipičan je za kritosjemenjače. Lignin golosjemenjača sadrži manje jedinica sinapila.

**Slika 3:** Prikaz strukture lignina iz bukve (*Fagus sylvatica*)

Izvor: (Pevalek-Kozlina, 2003.)

### 1.3.2. Flavonoidi

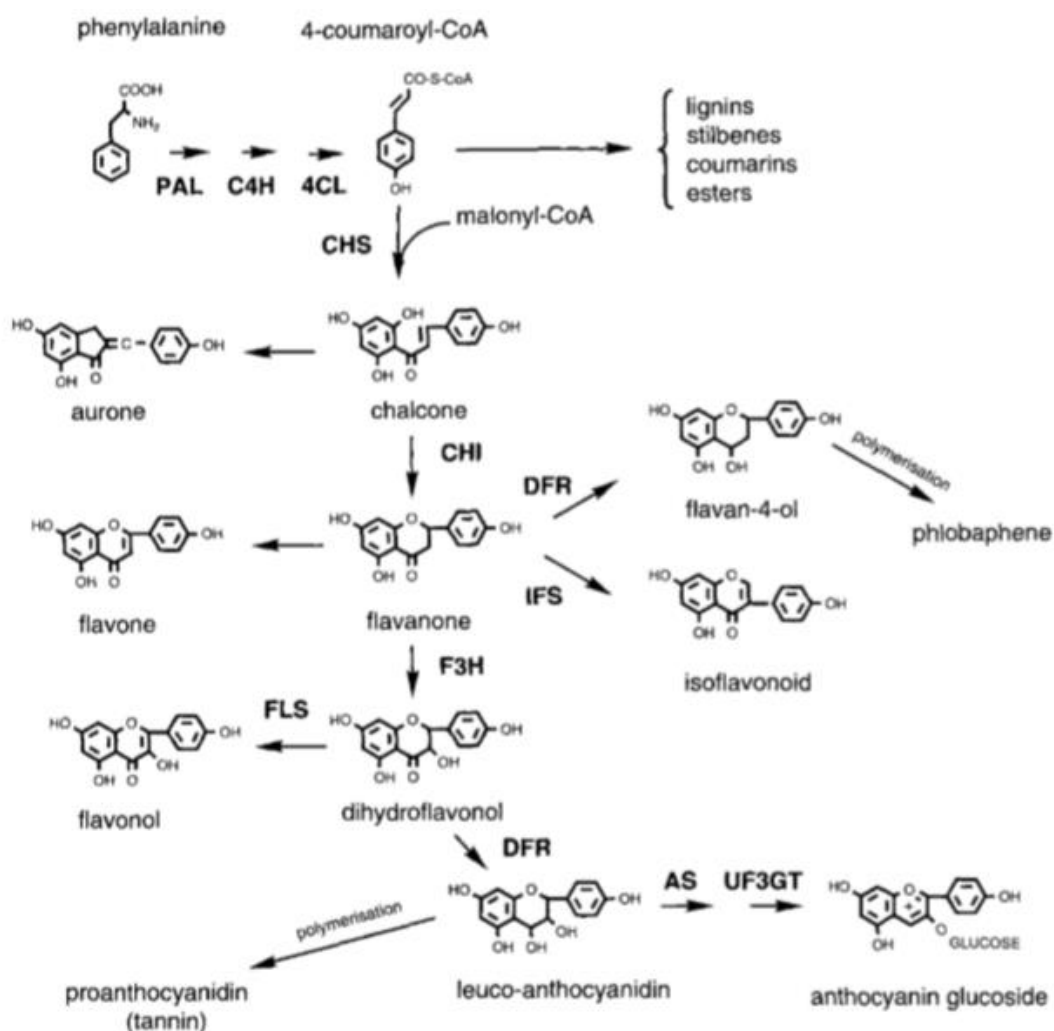
Flavonoidi su široko rasprostranjeni, jedni od najčešćih fenola u biljnim tkivima. Flavonoidi su često uz karotenoide i klorofil odgovorni za plavu, ljubičastu, žutu, narančastu i crvenu boju biljaka. Skupina flavonoida uključuje flavone, flavonole, izoflavonole, antocijane, antocijanidine, proantocijanidine i katehine. Svi flavonoidi su izvedeni iz aromatskih aminokiselina, fenilalanina i tirozina, a imaju strukture s tri prstena. Varijacije u flavonoidnoj strukturi proizlaze iz reakcija hidroksilacije, prenilacije, alkalinizacije i glikozilacije koje mijenjaju osnovnu molekulu (Khoddami i sur., 2013.). Skelet flavonoida sadrži 15 C-atoma raspoređenih u dva aromatska prstena međusobno povezana mostom od tri C-atoma. Takva struktura rezultat je dva različita biosintetska puta. Most i aromatski prsten B se sintetiziraju iz fenilalanina u putu šikiminske kiseline, dok šest C-atoma prstena A potječe od 3 acetatne jedinice iz puta jabučne kiseline. Spajanje ova dva dijela katalizira enzim halkon-sintetaza koja je, kao i fenilalanin-amonij-lijaza, važan regulatorni enzim u sekundarnom metabolizmu. Na njezinu aktivnost djeluju različiti okolišni čimbenici, a kontrola se iskazuje na razini transkripcije. Flavonoidi se klasificiraju prvenstveno na osnovi stupnja oksidacije mosta od tri C-atoma na antocijanine, flavone, flavonole i izoflavone. Osnovni skelet flavonoida može imati brojne supstituente: hidroksilne skupine – obično prisutne na položajima 4,5 i 7, iako mogu biti i na drugim položajima, te šećere (većina flavonoida prirodno postoje kao glikozidi). Dok hidroksilne skupine i šećeri povećavaju topivost flavonoida u vodi, drugi supstituent, na primjer metil eter ili modificirane izopentenilne jedinice čine flavonoide lipofilnima. U biljkama flavonoidi imaju različite uloge, na primjer u pigmentaciji i obrani. Antocijanini su obojeni flavonoidi – prisutni u cvjetovima i plodovima, koji pomažu primamljivanju životinja za oprašivanje i rasprostranjivanje sjemenaka. Odgovorni su za većinu crvene, ružičaste i plave boje u biljkama. To su glikozidi sa šećerom na položaju 3, a ponekad i drugdje. Bez šećera, ovi spojevi poznati su i kao antocijanidini. Na boju antocijanina utječu brojni čimbenici, uključujući broj hidroksilnih i metoksilnih skupina u prstenu B antocijanidina, prisutnost kelatirajućih metala (Fe i Al), prisutnost flavona i flavonskih kopigmenata, te pH vrijednost vakuole u kojoj su pohranjeni. Flavoni i flavonoli – dvije glavne skupine biljnih flavonoida – apsorbiraju svjetlost kraćih valnih duljina nego antocijanini i zato nisu vidljivi ljudskom oku, ali ih kukci poput pčela mogu vidjeti. Flavonoli često u cvjetovima tvore simetrične uzorke pruga, točaka ili koncentričnih krugova. Flavoni i flavonoli nisu ograničeni samo na cvjetove, nego su prisutni

i u listovima svih zelenih biljaka. Ove dvije skupine flavonoida nakupljaju se u epidermi listova i stabljike i štite biljke od UV-B zračenja. Oni apsorbiraju svjetlost iz UV-B područja spektra, a propuštaju fotosintetski aktivne valne duljine. Flavoni i flavonoli koje u tlo luči korijenje mahunarki, posreduju u interakciji mahunarki i dušik fiksirajućih simbionata, regulirajući ekspresiju gena simbionata. Flavonol kvercetin i flavon apigenin su endogeni regulatori polarnog prijenosa auksina. Izoflavonoidi su skupina flavonoida s izmijenjenim položajem prstena B. Većinom su prisutni u mahunarkama, a imaju više uloga. Neki od njih, na primjer rotenoidi, imaju snažnu insekticidnu aktivnost, dok drugi imaju antiestrogeni učinak koji uzrokuje neplodnost sisavaca. Posljednjih godina postali su poznati zbog toga što djeluju kao fitoaleksini – antimikrobni spojevi koji se sintetiziraju i nakupljaju u većim količinama nakon bakterijske ili gljivične infekcije i ograničavaju širenje patogena (Pevalek-Kozlina, 2003.). Flavonoidi pokazuju raznovrstan spektar bioloških funkcija i igraju važnu ulogu u interakciji između biljaka i njihovog okoliša. Flavonoidi ne samo da štite biljku od štetnih učinaka UV zračenja, već također igraju presudnu ulogu u procesu spolne reprodukcije. Posebna klasa flavonoidnih polimera, tanina, igra strukturnu ulogu u biljci. Ipak, druge klase flavonoida, flavonola i antocijana uključene su u privlačenje oprašivača. Određeni flavonoidi sudjeluju u interakciji između biljaka i drugih organizama poput simbiotskih bakterija i parazita. To postavlja intrigantno pitanje kako su nastali i razvijali se ti različiti spojevi. Na temelju taksonomije i molekularne analize obrazaca ekspresije gena moguće je utvrditi pretpostavljeni slijed stjecanja različitih grana biosintetskog puta i njihovih regulatora. Biljke koje se oprašuju insektima obično imaju velike, često jarko obojene latice, dok biljke koje se oprašuju vjetrom obično imaju male, tamne boje latica ili uopće nemaju latice (npr. petunija naspram kukuruza). Većina ovih cvjetnih pigmenata su flavonoidi koji pripadaju skupini antocijana crvene ili ljubičaste boje ili aurona žute boje. Osim antocijanina, mnoge biljne vrste akumuliraju flavonole ili flavanone u laticama. Iako su ti spojevi bezbojni, oni mijenjaju boju cvijeta stvaranjem kompleksa s antocijaninima i metalnim ionima, fenomen nazvan ko-pigmentacija. Primjerice, snažne plave boje cvijeta posljedica su ko-pigmentacije. Kod većine vrsta cvjetni pigmenti djeluju kao vizualni signal kako bi privukli oprašivajuće životinje (insekte ili ptice), signalizirajući da ih čeka nagrada, na primjer nektar. Prostorna i vremenska kontrola biosinteze antocijana u skladu je s ulogom vizualnog signala. Antocijanini se akumuliraju uglavnom u unutarnjoj epidermi laticе. Aktivnost transkripcije strukturnih gena i brzina biosinteze

antocijanina dostižu maksimum neposredno prije otvaranja cvijeta. Obično uklanjanje latica rezultira velikim smanjenjem broja posjeta insekata cvijetu, iako ih to uglavnom ne uklanja u potpunosti. Postoje dodatni čimbenici (miris) koji su uključeni u privlačenje oprašivača.

Biljke se izlažu suncu kako bi potaknule fotosintezu. Međutim, ultraljubičasta (UV) komponenta sunčeve svjetlosti potencijalna je opasnost jer može oštetiti DNK i narušiti nekoliko fizioloških procesa. Kao i svi drugi organizmi, biljke poduzimaju protumjere kako bi se zaštitile od UV oštećenja. Jedan od najčešćih odgovora biljaka na UV svjetlo je transkripcijska aktivacija flavonoidnog biosintetskog gena. Flavonoidi snažno apsorbiraju UV i akumuliraju se uglavnom u epidermalnim stanicama nakon UV indukcije, što sugerira da djeluju kao zaštitni štiti. Ovo može objasniti zašto je UV-inducirana ekspresija flavonoidnih gena obično prolazna čak i pod uvjetima kontinuiranog UV svjetla. Jednom kada se nakupi dovoljno flavonoida, biljka postaje zaštićena i biosinteza prestaje. Fiziološka i genetička ispitivanja pokazala su značaj zaštite od UV zračenja za zdravstveno stanje biljaka. Mnoge biljne vrste akumuliraju flavonoide u prašnike i plodnicu, odnosno muškim i ženskim reproduktivnim organima. Najčešći flavonoidi u prašnicima su antocijanini, flavonoli i halkoni. U mladim prašnicima, u tapetumu i konektivusu aktivni su flavonoidni biosintetski geni i enzimi koji su njegujuća tkiva za razvijanje zrna peludi. Tijekom kasnijih stupnjeva razvoja prašnika, tapetum i konektivus se raspadaju i stanični sadržaj oslobađa se u polena mjesta. Bakterije iz rodova *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* i *Azorhizobium* imaju jedinstvenu sposobnost da žive u simbiozi sa leguminoznim biljkama. Te bakterije mogu zaraziti korijenje određene biljke domaćina i izazvati stvaranje visoko specijaliziranog organa, korijenskog nodula, koji bakterije naseljavaju kako bi fiksirale atmosferski dušik. Formiranje korijenskih nodula specifično je za domaćina i svaka vrsta soja bakterija može zaraziti samo ograničeni skup biljnih domaćina. Formiranje korijenskih nodula složen je razvojni proces koji zahtijeva djelovanje bakterijskih i biljnih gena. U mahunarkama su flavonoidni biosintetski geni aktivni u mladim stanicama korijena i u zonama gdje nastaju korijenove dlačice. To rezultira sintezom smjese flavonoida (Slika 4), pri čemu sastav varira između različitih biljnih vrsta. Po nepoznatom mehanizmu, flavonoidi se ispuštaju u tlo. Genetski dokazi govore da protein NodD djeluje kao receptor za flavonoidni signal. NodD proteini različitih bakterija razlikuju se po njihovom odgovoru na različite flavonoide i obično optimalno reagiraju na flavonoide koje izlučuju odgovarajući domaćini. Stoga je spektar izlučenih flavonoida prva, ali sigurno ne jedina razina na kojoj se određuje

specifičnost domaćina. Nekoliko vrsta biljaka sposobno je rasti kao paraziti na drugim biljkama. Većina tih vrsta također može rasti i razmnožavati se u nedostatku domaćina (hemiparaziti), dok je za nekoliko vrsta apsolutno potrebna odgovarajuća biljka domaćin (obavezni paraziti). U vrstama striga (*Striga hermonthica*), obaveznim parazitima trava, klijanje sjemena i naknadni razvoj haustorija, organa za pričvršćivanje domaćina ovise o spojevima koji se oslobađaju iz biljke domaćina. Općenito ovi spojevi dobiveni od domaćina su izvedeni fenilpropanoidi, poput stilbena, flavonoida i  $\rho$ -hidroksi kiseline. Međutim, nijedan od ovih spojeva nije aktivan kao takav, već su aktivni njihovi produkti oksidacije kinona koji se sintetiziraju preko oksidativnih enzima koji su prisutni i u parazitu i u površinskom tkivu domaćina (Koes i sur., 1994.).



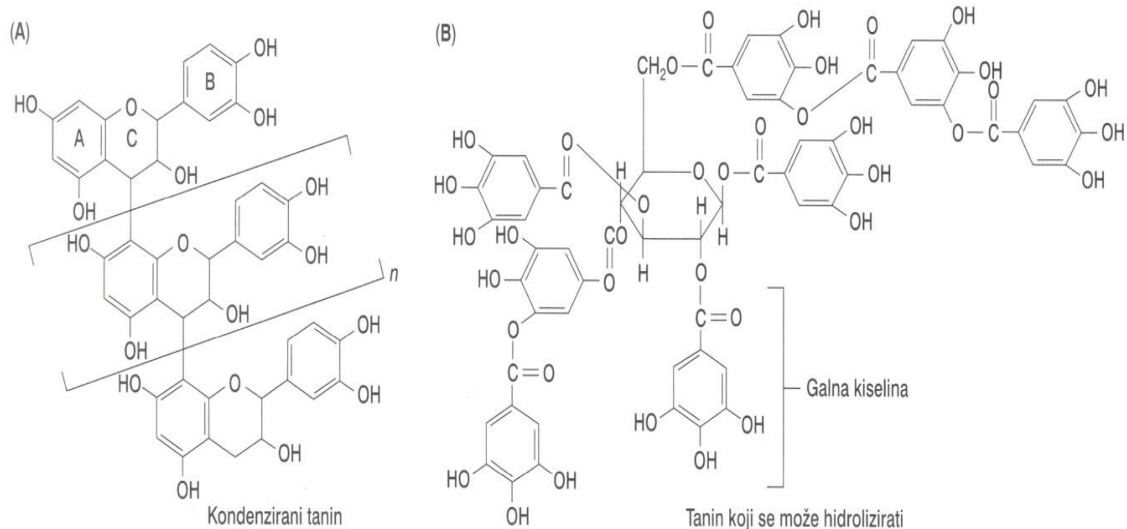
**Slika 4:** Pojednostavljeni dijagram biosintetičkog puta flavonoida

Izvor: (Koes i sur., 1994.)

Biološke funkcije flavonoida povezane su s njihovom potencijalnom citotoksičnošću i njihovom sposobnošću da komuniciraju s enzimima putem kompleksiranja proteina. Neki flavonoidi pružaju zaštitu od stresa, na primjer, djelujući kao sredstvo za uklanjanje slobodnih radikala poput reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), kao i kelatnih metala koji stvaraju ROS. Flavonoidi su također uključeni u otpornost na toksičnost aluminijske soli u kukuruzu (*Zea mays*). Korijeni biljaka kukuruza koji su bili izloženi aluminijskoj soli ispuštali su visoke razine fenolnih spojeva poput katehina i kvercetina što ukazuje da njihova sposobnost kelatiranja metala može biti *in vivo* mehanizam za ublažavanje toksičnosti aluminijske soli (Falcone Ferreyra i sur., 2012.).

### 1.3.3. Tanini

Tanini su biljni fenolni polimeri koji imaju obrambena svojstva. Oni vežu kolagene proteine životinjske kože, povećavaju otpornost na toplinu, vodu i mikrobe (štavljenje kože). Postoje dvije kategorije tanina, kondenzirani tanini i tanini koji se mogu hidrolizirati. Većina tanina ima molekularnu masu između 600 i 3000 Da. Kondenzirani tanini su spojevi koji nastaju vezanjem flavonoidnih jedinica i čest su sastojak drvenastih biljaka. Mogu se hidrolizirati do antocijanidina djelovanjem jakih kiselina. Tanini koji se mogu hidrolizirati su heterogeni polimeri koji sadrže fenolne kiseline, osobito galnu kiselinu i jednostavne šećere. Manji su od kondenziranih tanina i mogu se hidrolizirati već u razrijeđenim kiselinama. (Slika 5) Tanini su općenito otrovi koji značajno reduciraju rast i preživljavanje mnogih herbivora kada se dodaju u njihovu hranu. Tako na primjer, kada ciganski moljac (*Lymanthria dispar*) napadne hrast i pojede listove, na hrastu se razvijaju novi – žilaviji, koji sadrže više tanina i fenolnih tvari te manje količine vode. Ličinke moljca slabije napreduju hraneći se takvim listovima i to smanjuje napad na hrast (*Quercus robur* L.). Tanini većinu životinja odvrću od hranjenja biljkama koje ih sadrže. U ljudi uzrokuju oštar, stežući osjećaj u ustima jer vežu proteine sline. Nezreli plodovi mnogih biljnih vrsta često imaju visoki sadržaj tanina. Obrambeni učinak tanina pripisuje se njihovoj sposobnosti da vežu proteine. Pretpostavlja se da ne djeluju samo na probavne enzime, reducirajući probavljivost, nego i na druge enzime. Herbivori koji se hrane biljkama bogatima taninom imaju zanimljive prilagodbe za uklanjanje tanina iz probavnog sustava. Zečevi i drugi glodavci, primjerice, proizvode proteine s visokim sadržajem prolina (25-45 %) koji imaju visok afinitet za tanin. Na taj način znatno smanjuju toksičan učinak tanina. Biljni tanini također služe i kao obrana protiv mikroorganizama jer neživo drvo mnogih vrsta sadrži puno tanina koji sprječava propadanje uslijed djelovanja bakterija i gljiva (Pevalek-Kozlina, 2003.).



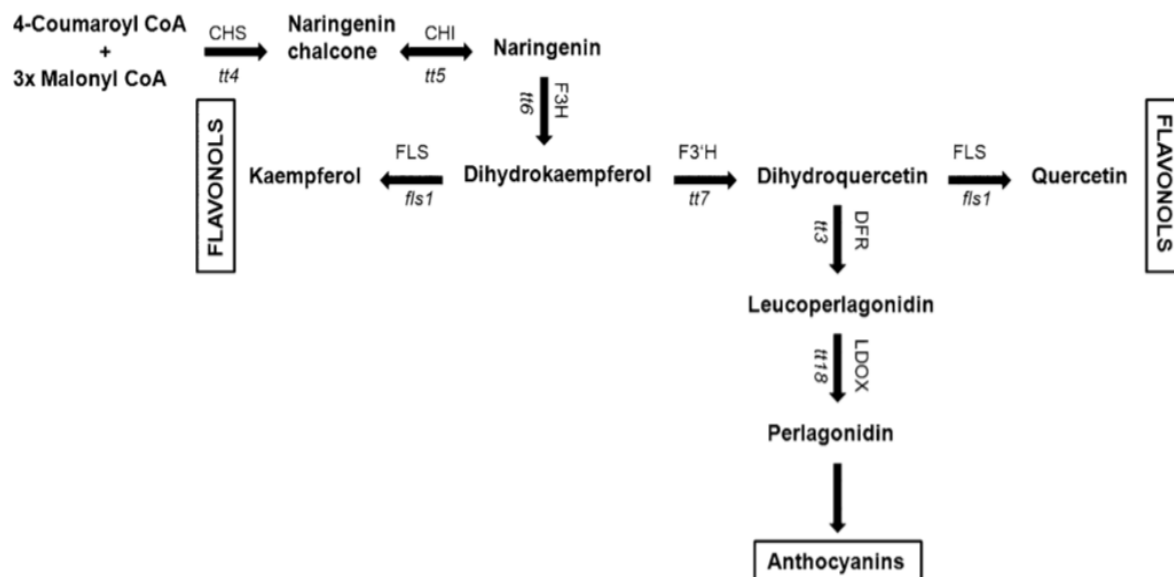
**Slika 5:** Strukture tanina nastalih iz fenolnih kiselina ili flavonoidnih podjedinica, (A)

Osnovna struktura kondenziranog tanina (B) Tanin koji se može hidrolizirati

Izvor: (Pevalek-Kozlina, 2003.)

#### 1.4. Put razgradnje i fenil-propanoidni put

Biljke proizvode širok spektar sekundarnih metabolita koji obavljaju različite funkcije. Flavonoidi se sintetiziraju putem fenilpropanoide i služe kao UV zaštitnici u obrani patogena, za komunikaciju biljaka i mikroorganizama i regulaciju reaktivnih vrsta kisika. Biljke proizvode veliki broj flavonoida. Flavonoli predstavljaju podskupinu flavonoida. Biosinteza flavonoida i flavonola je opsežno okarakterizirana (*Slika 6*) i identificirani su brojni mutanti (Kuhn i sur., 2011.).



**Slika 6:** Biosinteza flavonoida i flavonola

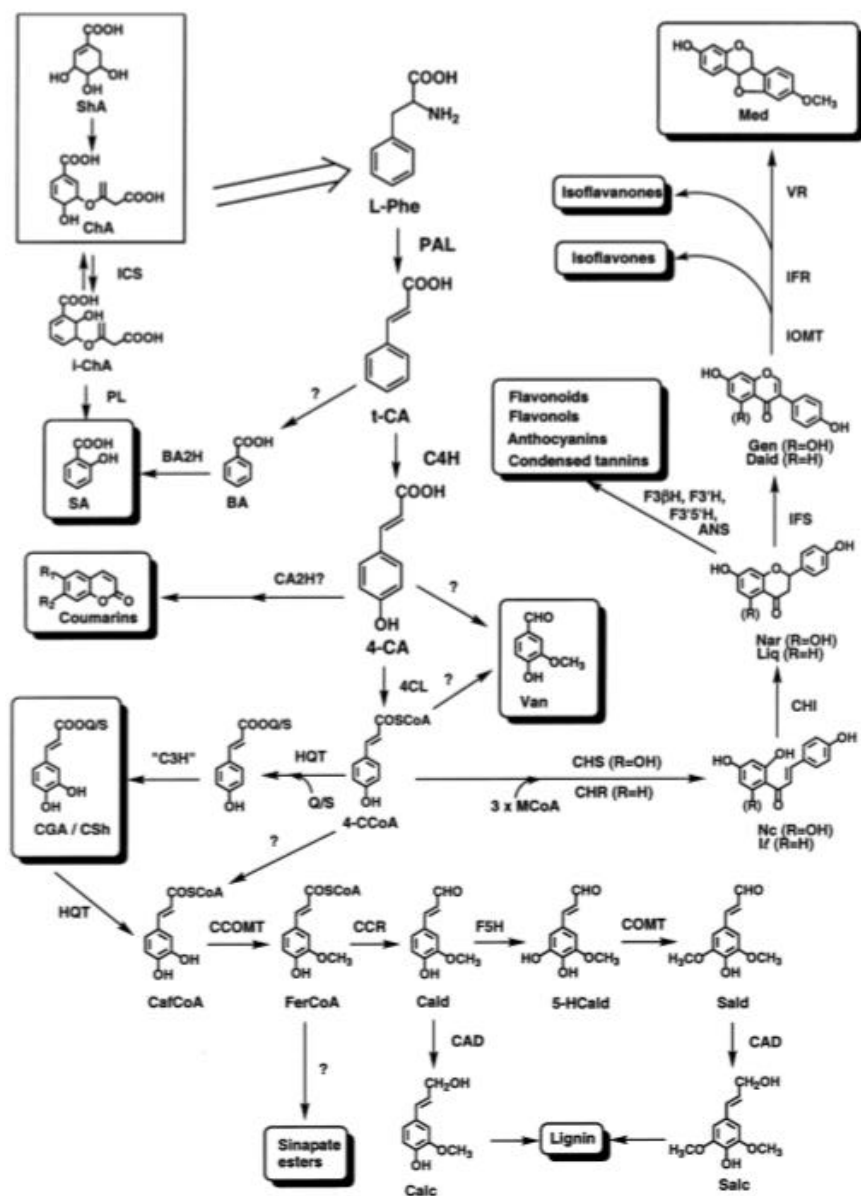
Izvor: (Kuhn i sur., 2011.)

Velike količine aromatičnih spojeva koje biljke biosintetski proizvode moraju se na kraju razgraditi. To može biti od strane samih biljaka ili od drugih organizama u biosferi. Iako većinu ove degradacije rade mikroorganizmi tla, značajna količina aromatskih spojeva dospijeva u sustave potoka i oceane. (Ellis, 1977.) Promet biljnih fenolnih metabolita može uključivati tri vrste reakcija: (a) interkonverzije koje su uključene u biosintetske sekvence; (b) katabolizam pri čemu se produkti pretvaraju u primarne metaboličke sastojke i (c) reakcije oksidativne polimerizacije što rezultira stvaranjem netopljivih struktura velike molekulske mase. Ta tri metabolička puta mogu se istovremeno pojaviti u biljci i njihov omjer će ovisiti o različitim parametrima koji reguliraju stanični metabolizam. Metabolizam fenola, dakle, predstavlja složenu metaboličku mrežu koja zahtijeva detaljnu biokemijsku analizu kako bi se utvrdio puni spektar mogućih krajnjih rezultata (Barz i Hoesel, 1979.). Schink i suradnici (2000.) proveli su istraživanje u kojem su pokazali da razgradnja aromatskih spojeva anaerobnim bakterijama ne prati samo jednu strategiju za svaki supstrat. Usporedba bakterija fermentacije, redukcije sulfata i nitrata pokazuje da su moguće brojne strategije u nedostatku kisika za razgradnju aromatskih spojeva, a čini se da poduzeta strategija uvelike ovisi o energetske statusu uključenog organizma i redoks potencijalu prihvatitelja elektrona koje on može koristiti. U slučaju puta benzoil-CoA postoje indicije da fermentirajuće bakterije i sulfatni reduktori koriste drugu



varijantu puta za reducirajući nitrat koji zahtijeva manje energije za benzoil-CoA dearomatizaciju. Bakterije koje fermentiraju imaju vrlo malo energije na raspolaganju. Fenilpropanoidi su prirodni proizvodi dobiveni iz aminokiseline L-fenilalanina deaminacijom L-fenilalanin amonijalijazom (PAL - L-phenylalanine ammonialyase). Najjednostavniji primjeri koji sadrže samo kostur C<sub>6</sub>C<sub>3</sub> fenilpropana su hidroksicinaminske kiseline, kao što je sinapinska kiselina, i monolignoli, poput koniferilnog alkohola. Složeniji fenilpropanoidi nastaju kondenzacijom fenilpropanske jedinice s jedinicom izvedenom iz acetata preko malonil koenzima A. Tu se ubrajaju flavonoidi, izoflavonoidi i stilbeni. Benzojeve kiseline C<sub>6</sub>C<sub>1</sub>, od kojih je salicilna kiselina važan primjer u odnosu na biljne bolesti, uključeni su u rasprave o fenilpropanoidnim prirodnim proizvodima zbog njihovog pretpostavljenog biosintetskog podrijetla preko bočnog lančanog skraćivanja hidroksicinaminskih kiseline. Glavni biosintetski putevi različitih razreda fenilpropanoidnih spojeva sažeti su na slici (*Slika 7*), koja također pokazuje primarne metaboličke puteve sinteze prekursora za biosintezu fenilpropanoida. Organiziranje puteva u srži fenilpropanoidnog puta ide od fenilalanina do aktiviranog (hidroksi) derivata cimetne kiseline djelovanjem PAL-a, cinamat 4-hidroksilaze (C4H) i 4-kumarata i sastoji se od koenzim A ligaze (4CL) i specifične grane za stvaranje monolignola / lignina, kumarina, benzojeve kiseline, stilbena i flavonoida / izoflavonoida. Sve klase fenilpropanoidnih spojeva nisu prisutne u svim biljnim vrstama. Iako su klase hidroksicinaminske kiseline i flavonoida sveprisutne u višim biljkama, pripadnici tih klasa sa specifičnim uzorcima supstitucije mogu biti karakteristični za određene rodove ili vrste. Ostale klase fenilpropanoida, poput izoflavonoida i stilbena, ograničene su na posebne biljne porodice. Izoflavonoidi su uglavnom ograničeni na potporodicu *Papilionoideae* (*Leguminosae*). Njihova strukturna varijacija je velika, što uključuje broj i složenost supstituenata na 3-fenilkromanskom okviru, različite razine oksidacije heterocikla i prisutnost dodatnih heterocikličkih prstenova. Stilbenske vrste se javljaju sporadično kod široko divergentnih vrsta, uključujući kikiriki (*Arachis hypogaea*), vinovu lozu (*Vitis vinifera*) i bor (*Pinaceae*). Nedavne studije o trodimenzionalnim strukturama stilben sintetaze su pokazale kako njihovi geni mogu evoluirati neovisno od usko povezanih gena halkonske sintaze koji su sveprisutni u biljkama. Prirodni produkti aktivni u obrani biljaka mogu se razvrstati u tri široke skupine: fitoaleksini, fitoacijenti i signalne molekule. Mnogi fenilpropanoidi pokazuju antimikrobno djelovanje širokog spektra, pa se vjeruje da pomažu biljnom organizmu u borbi s patogenim mikroorganizmima. Takvi spojevi

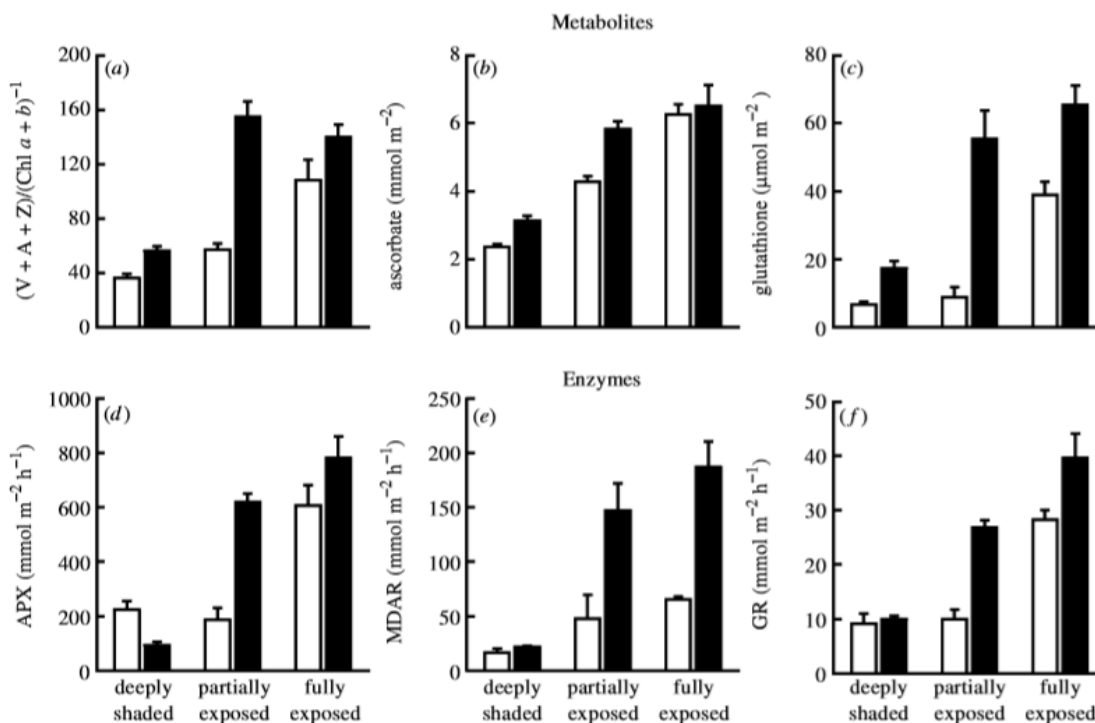
mogu se klasificirati kao preoblikovani „fitoautributi“ ili inducibilni „fitoaleksini“. Najbolje okarakterizirani fitoaleksini koji se dobivaju fenilpropanoidima su pterokarpani, izoflavani i izoflavanoni mahunarki, uključujući grah (*Phaseolus vulgaris*), lucernu (*Medicago sativa*), grašak (*Pisum sativum*) i soju (*Glycine max*). Prenilirani izoflavoni lupine (*Lupinus spp.*), koji se sintetiziraju tijekom razvoja sadnica, dobar su primjer fitoanticipina. (Dixon i sur., 2002.)



**Slika 7:** Glavni biosintetski putevi različitih razreda fenilpropanoidnih spojeva koji pokazuju primarne metaboličke puteve koji pružaju prekursore za biosintezu fenilpropanoida.

Izvor: (Dixon i sur., 2002.)

Ekološki stresovi poput intenzivne svjetlosti, niskih temperatura, infekcije patogenima i nedostatka hranjivih tvari mogu dovesti do povećane proizvodnje slobodnih radikala i drugih oksidacijski aktivnih tvari u biljkama. Sve veći broj dokaza upućuje na to da biljke reagiraju na biotske i abiotske faktore stresa povećavajući svoju sposobnost uklanjanja ROS. Napori da se razumije ovaj postupak, usredotočili su se na komponente klasičnog antioksidativnog sustava, tj. superoksid dismutazu, askorbat peroksidazu, katalazu, monoodehidroaskorbat reduktazu, glutation-reduktazu i antioksidanse male molekulske težine - askorbat i glutation. Međutim, relativno malo studija istraživalo je ulogu sekundarnih metaboličkih putova u odgovoru biljaka na oksidativni stres. Fenilpropanoidni put je odgovoran za sintezu različitog niza fenolnih metabolita kao što su flavonoidi, tanini, hidroksicinamatni esteri i strukturni polimer lignin. Sinteza ovih spojeva često je izazvana stresom, te oni služe određenim ulogama u zaštiti biljaka, tj. patogenezi, zaštiti od ultraljubičastog zračenja ili strukturnim komponentama stanične stijenke. Navedeni spojevi čine najbrojniju skupinu biljnih sekundarnih metabolita i imaju zajedničko podrijetlo u biosintetskom fenilpropanoidnom putu. Sezonske promjene u fotoprotektivnom sustavu i antioksidansima lišća mahonije (*Mahonia repens*) ponavlja se u odnosu na svjetlosnu okolinu. Grace i sur. (2000.) sakupljali su lišće iz tri populacije mahonije ljeti (*Slika 8*, bijeli stupci) i zimi (*Slika 8*, crni stupci). Fenilpropanoidni put stvara proizvode koji povećavaju toleranciju na široki spektar stresnih uvjeta i može također pružiti alternativni put za upotrebu fotona u uvjetima akumulacije ugljikohidrata i / ili prekomjerne apsorpcije svjetlosti. Postoje jasne indikacije da klorogena kiselina (CGA – chlorogenic acid), jedan od glavnih proizvoda ovog puta, igra opću ulogu u reakcijama na stres djelujući kao moćan antioksidans koji donira vodik i, što je još važnije, kao reduktivni supstrat gvajakol peroksidaze. Čak i sinteza CGA reciklira ortofosfat i troši se redukcijski, omogućujući fotosintetsku uporabu apsorbiranih fotona i tako nadalje štiti od oksidativnog stresa.

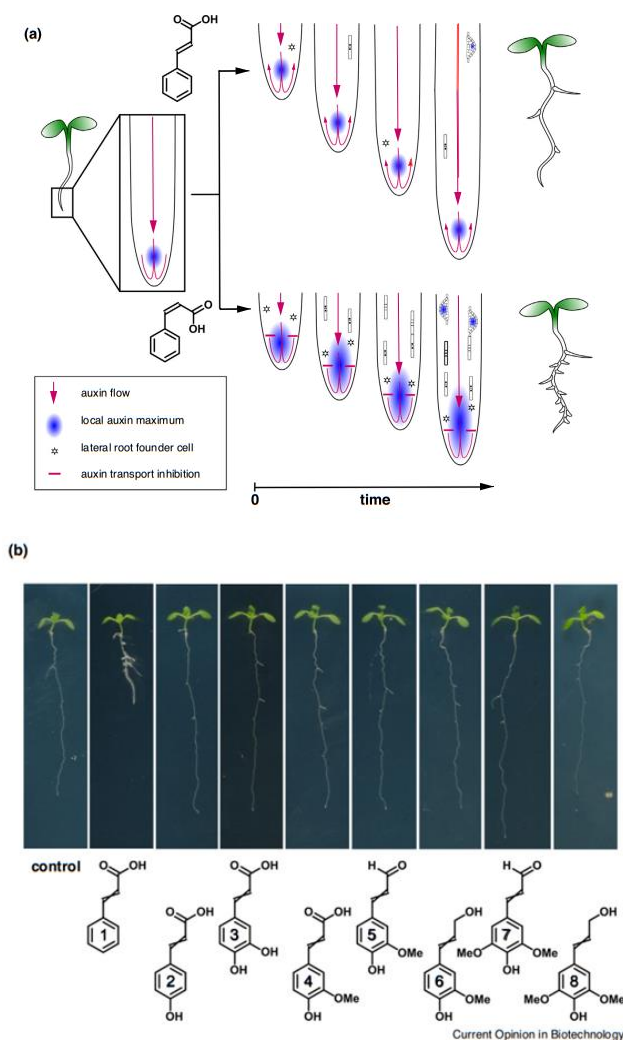


**Slika 8:** Sezonske promjene u fotoprotektivnom sustavu i antioksidansima lišća mahonije (*Mahonia repens*). (a) veličine pigmenta iz ciklusa ksantofila (izraženih po ukupnom klorofilu), (b) sadržaj ukupnog askorbata i (c) ukupnog glutaciona. Aktivnosti za antioksidantenzime (d) APX, (e) MDAR i (f) GR.

Izvor: (Grace i sur., 2000.)

Prekomjerno ekspresioniranje ključnih enzima biosintetskih putova za prekomjernu proizvodnju proizvoda s dodanom vrijednosti obično nameće metabolička opterećenja na stanice, što se može zaobići poboljšanjem ključnih aktivnosti enzima p-kumarata. CoA ligaza (4CL) je kritični enzim u fenilpropanoidnom putu koji sintetizira različite prirodne produkte. Da bi se provjerila hipoteza da je moguće sintetizirati 4CL s poboljšanom aktivnošću, dizajniran je biosenzor resveratrola, čiji biosintetski put uključuje 4CL, inženjeringom regulatornog proteina TtgR (Xiong i sur., 2017.). Biosenzor je pokazao dobru specifičnost i čvrstinu, omogućujući brz i osjetljiv odabir hiperproduktora resveratrola. Varijanta 4CL s poboljšanom aktivnošću odabrana je iz biblioteke 4CL mutageneze izgrađene u biosintetskom putu resveratrola kod *Escherichia coli*. Ovaj mutant doveo je do povećane proizvodnje ne samo resveratrola, već i flavonoidnog naringenina, prilikom unosa u njegove odgovarajuće biosintetske putove. Dobiveni rezultati pokazali su izvedivost poboljšanja ključnih aktivnosti

enzima u važnim biosintetskim putovima uz pomoć dizajniranih biosenzora  $\rho$ -kumarat. CoA ligaza (4CL) je kritični enzim u fenilpropanoidnom putu koji katalizira sintezu CoA tioestera  $\rho$ -kumarata, kaveinske kiseline, ferulinske kiseline i sinapične kiseline, koji su prekursori za različite biljne sekundarne metabolite.



**Slika 9:** Učinak fenilpropanoida na rast i razvoj biljaka. (a) Model koji objašnjava radni mehanizam c-CA, (b) Šireći maksimeri auksina stanice koje postaju bočne utemeljiteljske stanice, koje su naknadno pokrenute da se razmnožavaju i formiraju bočno korijenje

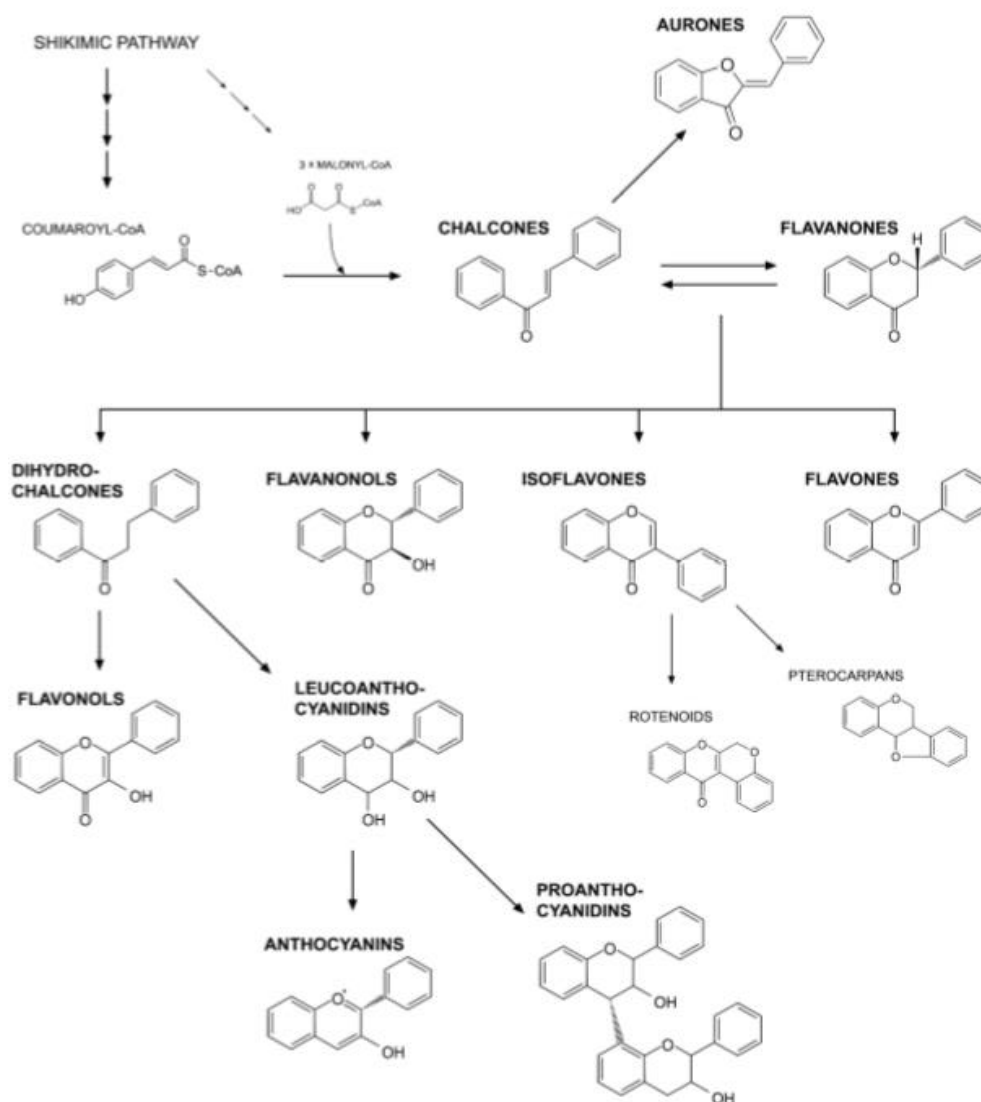
Izvor: (Vanholme i sur., 2019.)

Iako se studija o bioaktivnosti fenilpropanoida može datirati od početka prethodnog stoljeća, polje je ostalo nedovoljno istraženo. Nedavno otkriveni molekularni mehanizam koji objašnjava aktivnost c-CA mogao bi biti potreban pokazatelj. Inhibirajući lučenje auksina, c-CA utječe na

čvrsto reguliranu preraspodjelu auksina u korijenu meristema. Korijenski akropetalni transport auksina ne utječe i kontinuirana opskrba auksinom koja nije preraspodijeljena u meristemu rezultira njegovom akumulacijom u primarnom korijenu (Slika 9) (Vanholme i sur., 2019.).

## 2. INTERAKCIJA IZMEĐU BILJAKA I DRUGIH ORGANIZAMA POMOĆU FENOLNIH SPOJEVA

Biokemijska interakcija između biljaka u kojoj biljka donor oslobađa sekundarne alelokemijske metabolite, koji utječu na rast njenih susjeda naziva se alelopatija. Alelopatijom se smatra bilateralna interakcija dviju biljaka. Alepatija je proces između carstava živog svijeta koji može utjecati i biti moduliran od strane ostalih organizama u biljnom okruženju.



**Slika 10:** Različite klase flavonoida

Izvor: (Mierziak i sur., 2014.)

Alelokemijski produkti biljke utječu ne samo na svoje biljne susjede, već i na insekte, gljivice i bakterije koje žive na njima ili oko njih (Schandry i Becker, 2020.). U tu svrhu, biljke sintetiziraju fenolne spojeve kako bi se zaštitile ili „komunicirale“ s drugim vrstama organizama tla u svom prirodnom okruženju. Flavonoidi su spojevi koji im uvelike pomažu u toj interakciji. Njihov put biosinteze (dio fenilpropanoidnog puta) započinje kondenzacijom jedne p-kumaroil-CoA molekule s tri molekule malonil-CoA da bi se dobio halkon (4', 2', 4', 6'-tetrahidroksihalkon) i katalizirao halkonsku sintazu (CHS - chalcone synthase). Idući korak je izomerizacija halkona u flavanone pomoću halkonske izomeraze (CHI - chalcone isomerase). Od ovog koraka nadalje, put se grana u nekoliko različitih klasa flavonoida, uključujući aurone, dihidrokalikone, flavanonole (dihidroflavonole), izoflavone, flavone, flavonole, leukoanthocijanidine, antocijane i proantocijanidine (*Slika 10*).

Flavonoidi su podvrgnuti daljnjim modifikacijama, na primjer, metilacijom metiltransferazama i glikozilacijom specifičnim glikoziltransferazama. Ove modifikacije često mijenjaju njihovu topljivost, reaktivnost i stabilnost. Većina flavonoida prisutna je u obliku glikozida u prirodnim uvjetima. Zbog svoje raznolike kemijske strukture i raznolikosti koja nastaje kao rezultat vezanog supstituenta, oni imaju niz važnih funkcija u biljkama. Sudjeluju u zaštiti biljaka od biotskih (biljojeda, patogena) i abiotskih stresova (UV zračenja, topline), a zbog svojih antioksidativnih svojstava održavaju i redoks potencijal u stanicama. Antioksidativna aktivnost flavonoida povezana je sa strukturom molekule: prisutnošću konjugiranih dvostrukih veza i pojavom funkcionalnih skupina u prstenima. Flavonoidi smanjuju proizvodnju i suzbijaju reaktivne kisikove vrste (ROS - reactive oxygen species) na slijedeće načine (Mierziak i sur., 2014.):

1. suzbijanjem singletnog kisika;
2. inhibicijom enzima koji stvaraju ROS (ciklooksigenaza, lipoksigenaza, monooksigenaza, ksantin oksidaza);
3. vezanjem kelatirajućih ione prijelaznih metala, koji mogu katalizirati proizvodnju ROS-a;
4. gašenjem kaskada reakcija slobodnih radikala u lipidnoj peroksidaciji;
5. "recikliranjem" ostalih antioksidanasa;



Tlo je složeni sustav koji je rezultat interakcije mnogih čimbenika: klime, organizama tla, substrata i topografije. Tla pružaju supstrat prirodi i poljoprivredi, u oba slučaja tlo predstavlja ekosustav. Ovaj ekosustav tla nije samo mješavina žive i nežive materije, već obuhvaća i složene interakcije tih komponenata. Bolje razumijevanje odnosa žive i nežive materije ključno je za shvatiti posljedice promjena u nekim vremenskim periodima i ravnoteže agroekosustava. Taj sustav je posebno važan za uzgoj poljoprivrednih kultura, jer doprinosi razgradnji organske tvari i otpada, što igra značajnu ulogu u recikliranju resursa, zadržavanju i unosu hranjivih tvari biljkama i regulacijom vode i biogeokemijskim aktivnostima. Svi ti procesi zajedno potencijalno obogaćuju tlo mineralnim hranjivim tvarima i redistribuiraju organsku tvar koja dolazi iz biljnih ostataka povećavajući zdravlje tla i plodnost i na taj način poboljšavajući prinos usjeva. Osim toga, organizmi u tlu utječu na mnoge aspekte biljaka, od podzemnog dijela do nadzemnog. Na primjer, mikroorganizmi korijena mogu pomoći biljkama u preuzimanju mikro i makronutrijenata potrebnih za njihov rast. Korijenje povezano s mikroorganizama, ima veću otpornost na patogene, a mikroorganizmi ih aktiviraju ili inhibiraju. Organizmi u tlu mogu predstavljati snažan resurs za poboljšanje ekosustava poljoprivrednog tla i prinosa usjeva. Poljoprivredne prakse poput obrade tla, rotacije usjeva, primjene gnojiva i pesticida i monokultura snažno utječu na faunu tla i sastav mikrobnih zajednica, što obično rezultira smanjenjem bioraznolikosti. Korijenje izlučuje organske spojeve u tlo u procesu zvanom rizodepozicija, a spojevi izlučeni u tom procesu nazvani su rizodepoziti. Tu ubrajamo enzime, aminokiseline, organske kiseline, šećere, proteine, sluz i sekundarne metabolite kao što su fenoli (uglavnom benzenoidi, flavonoli, lignini i antocijani), izoprenoidi (steroli i terpenoidi), alkaloidi i spojevi koji sadrže sumpor poput glukozinolata. Fenoli i terpenoidi često imaju snažna antimikrobna i antiherbivorna svojstva. Na primjer, rosmarinska kiselina, koju luče korijeni slatkog bosiljka (*Ocimum basilicum*), izazvana patogenom gljivicom *Pythium ultimum*, pokazala je antimikrobno djelovanje protiv mikroorganizama rizosfere. Nadalje, ječam (*Hordeum Vulgare*), kada ga napadnu gljivice roda *Fusarium* stvara antifungalnu cimetnu kiselinu, koja je biosintezirana i oslobođena od strane korijena biljke. Fenolne kiseline i flavonoidi koje su prethodno biljke ispuštale u tlo mogu ograničiti širenje i uzgoj sjemena za sljedeće generacije. Međutim, autoalelopatija i autotoksičnost također mogu uzrokovati probleme za ponovnu sjetvu ili sadnju. Fenolni spojevi imaju nekoliko korisnih uloga u tlu, ali mogu također izazvati autotoksičnost kod višegodišnjih vrsta poput lucerne (*Medicago Sativa*)

i djeteline (*Trifolium Repens*) koje se uglavnom koriste kao hrana za stoku. Općenito, fenolni spojevi ometaju aktivnost hormona, propusnost membrane, fotosintezu i sintezu organskih spojeva, a proizvode se uglavnom u nedostatku dušika (Guerrieri i sur., 2019.). Poznate su mnogobrojne funkcije flavonoida za kontrolu razvoja biljaka, interakcije biljka-mikrobi i interakcije biljka-životinja. Jedna od uočljivih funkcija flavonoida je u pigmentaciji cvijeta i s tim u vezi, u privlačenju oprašivača i zaštite od UV svjetlosti. Funkcije flavonoida su razne, kao što su na primjer flavonoidi u cvijetu maka (*Papaver spp.*), koji predstavljaju prekrasan model zbog njihove široke varijacije u boji cvijeta. Također je važna uloga flavonoida u pamuku, u proizvodnji pamučnih vlakana, kao i obrani biljke pamuka protiv patogena i biljojeda. Daljnji primjer korisnosti flavonoida i srodnih metabolita, fenilfenalenona, u obrani biljaka banana od napada žiškoma, najznačajnijim štetčinom banane. Jedna od najbolje proučenih uloga flavonoida u interakcijama biljaka i bakterija je njihova strukturna uloga u kontroli nodulacijske ekspresije gena i infekciji dušičnim bakterijama koje usvajaju dušik i pretvaraju ga u biljci pristupačan oblik. Takve vrste bakterija žive u simbiozi s mahunarkama. Vezivanje flavonoida na transkripcijske regulatore unutar rizobija je nužno za njihovo aktiviranje transkripcijom modulacijskih gena nizvodno u putu ekspresije. Mnoge bakterije koriste flavonoide kao izvore hrane. (Mathesius 2018.)

## **2.1. Značaj fenolnih spojeva za ljudsku prehranu**

U svijetu postoji veliko zanimanje za fitokemikalije kao bioaktivne komponente hrane. Uloge voća, povrća i crnog vina u prevenciji bolesti dijelom su pripisane antioksidacijskim svojstvima njihovih sastavnih polifenola (vitamina E i C i karotenoida). Istraživanja su pokazala da mnogi dijetni polifenolni sastojci dobiveni od biljaka bivaju djelotvorniji antioksidanti *in vitro* od vitamina E ili C i tako mogu značajno pridonijeti zaštitnim učincima *in vivo*. Moguće je utvrditi antioksidacijske aktivnosti biljnih flavonoida u vodenoj i lipofilnoj fazi te procijeniti u kojoj se mjeri antioksidacijski potencijali vina i čaja mogu računati djelovanjem pojedinih polifenola (Rice–Evans i sur., 1997.). Prevencija i liječenje raka korištenjem tradicionalnih kineskih lijekova privlače sve veći interes javnosti. Studija Cai i sur. (2004.) karakterizira antioksidacijsku aktivnost i fenolne spojeve tradicionalnih kineskih ljekovitih biljaka s antikancerogenim svojstvima, koji obuhvaća 112 vrsta iz 50 biljnih obitelji. Poboljšani ABTS + metoda je korištena za ocjenjivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (Trolox ekvivalentni antioksidativni kapacitet, TEAC) ljekovitih ekstrakata. TEAC vrijednosti i ukupni

fenolni udio metanolnih ekstrakata biljaka kretao se u rasponu od 46,7 do 17.323 ekvivalenta Amol Trolox / 100 g suhe težine (DW) i od 0.22 do 50.3 g ekvivalenta galne kiseline / 100 g suhe tvari (Slika 11). U studiji je utvrđen pozitivan, značajan linearni odnos između antioksidacijske aktivnosti i ukupnog fenolnog sadržaja. Glavne vrste fenolnih spojeva iz većine ispitivanih biljaka prethodno su identificirane i analizirane, a uglavnom su uključivale fenolne kiseline, flavonoide, tanine, kumarine, lignane, kinone, stilbene i kurkuminoide. Ispitivano ljekovito bilje pokazalo je znatno jače antioksidacijsko djelovanje i sadržavalo je značajno veće razine fenolnih kiselina od uobičajenog povrća i voća. Tradicionalne kineske ljekovite biljke u borbi protiv raka predstavljaju potencijalni izvor snažnih prirodnih antioksidansa i korisnih kemopreventivnih sredstava (Cai i sur., 2004.).

Antioxidant activity and total phenolic content of methanolic extracts from common vegetables and fruits (dietary plants) <sup>a</sup>		
Scientific and common name	TEAC ( $\mu$ mol trolox/100 g DW) <sup>b</sup>	Total phenolic content (g GAE/100g DW) <sup>c</sup>
<i>Actinida chinensis</i> (kiwifruit)	48.9	0.22
<i>Allium fistulosum</i> (spring onion)	43.4	0.42
<i>Allium sativum</i> (garlic)	55.0	0.20
<i>Brassica oleracea</i> (broccoli)	101.4	0.63
<i>Citrus sinensis</i> (orange)	67.2	0.51
<i>Curcumis sativus</i> (cucumber)	28.7	0.16
<i>Daucus carota</i> (carrot)	38.7	0.22
<i>Lactuca sativa</i> (Chinese lettuce)	128.4	0.78
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomato)	149.4	0.42
<i>Malus pumila</i> (Fuji apple)	92.7	0.48
<i>Malus pumila</i> (Washington red apple)	133.2	0.75
<i>Pyrus communis</i> (pear)	21.5	0.12
<i>Solanum melongena</i> (eggplant)	166.9	1.08
<i>Spinacia oleracea</i> (spinach)	167.1	0.90
Mean	88.9	0.49

<sup>a</sup> All values were mean of triplicates.

<sup>b</sup> TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity. Data expressed as micromoles of Trolox equivalents per 100 g dry weight (DW).

<sup>c</sup> Data expressed as grams of gallic acid (GAE) equivalents per 100 g dry weight (DW).

**Slika 11:** Antioksidacijsko djelovanje i ukupni fenolni sadržaj metanolnih ekstrakata iz povrća i voća

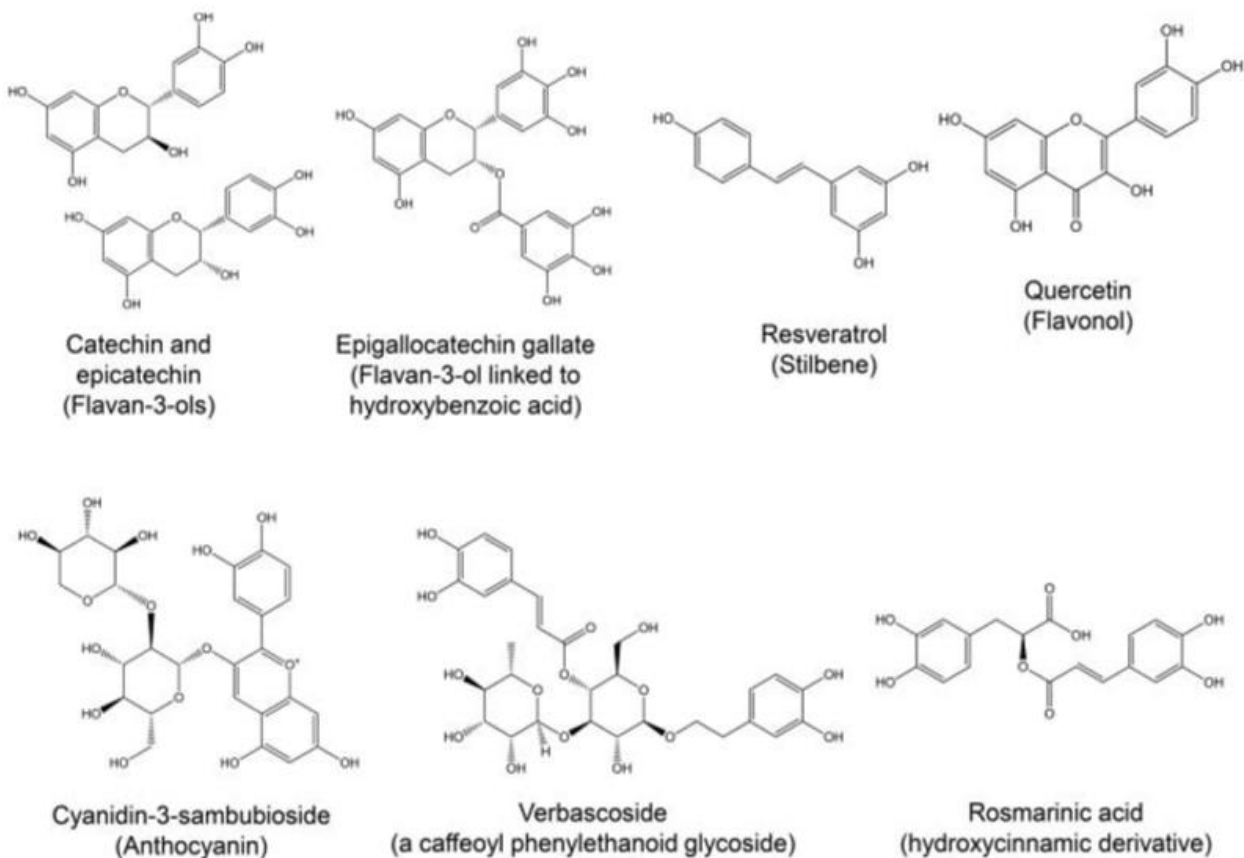
Izvor: (Cai i sur., 2004.)

Flavonoidi i drugi biljni fenoli, poput fenolnih kiselina, stilbena, tanina, lignana i lignina osobito su uobičajeni u lišću, cvjetnom tkivu i drvenim dijelovima kao što su stabljika i kora.

Antioksidacijsko djelovanje fenolnih kiselina uglavnom je posljedica njihovih redoks svojstava, koja im omogućuju da djeluju kao reducirajuća sredstva, donatori vodika i u suzbijanju singletnog kisika. Uz to, imaju potencijal keliranja metala. Voće, a posebno bobičasto voće sadrži širok spektar flavonoida i fenolnih kiselina koje pokazuju antioksidacijsko djelovanje. Glavne flavonoidne podskupine u bobicama i plodovima su antocijanini, proantocijanini, flavonoli i katehini. Fenolne kiseline prisutne u bobicama i plodovima su hidroksilirani derivati benzojeve kiseline i cimetine kiseline. Studije o antioksidacijskim aktivnostima voćnih ekstrakata usredotočene su uglavnom na grožđe za koje se navodi da inhibira oksidaciju humanog lipoproteina niske gustoće (LDL) na razini koja je usporediva s vinom. Ekstrakti kupine, crne i crvene ribizle, borovnice, crne i crvene maline imali su izuzetno veliku antioksidacijsku aktivnost. Pokazalo se da hidroksicinaminske kiseline koje su obično prisutne u plodu inhibiraju LDL oksidaciju *in vitro*. Također je pokazano da fenolni ekstrakti bobica (kupine, crvene maline, slatke trešnje, borovnice i jagode) inhibiraju humani lipoprotein niske gustoće (LDL) i oksidaciju liposoma. Grah (*Phaseolus vulgaris*) (obični i pinto), zatim repa (*Brassica rapa subsp. rapa*), kukuruz (*Zea mays*) i brokula (*Brassica oleracea var. italica*) pokazali su najveći ukupni udio fenola po svježoj težini između 22 analiziranih vrsta povrća. Korištenjem LDL metode oksidacije i kombiniranim mjerenjem kvalitete i količine fenolnih antioksidanata prisutnih u povrću (po svježoj masi), obični i pinto grah su svrstani na vrh ljestvice s obzirom na antioksidacijsku aktivnost. Češnjak (*Allium sativum*), žuti i crveni luk (*Allium cepa*), šparoge (*Asparagus officinalis*), grah (*Phaseolus vulgaris*), repa (*Brassica rapa subsp. rapa*), krumpir (*Solanum tuberosum*) i brokula (*Brassica oleracea var. italica*) također su ocijenjeni među 10 antioksidativno najmoćnijih povrća. Antioksidativna aktivnost analiziranog povrća smanjivala se sljedećim redoslijedom: brokula (*Brassica oleracea var. italica*)> krumpir (*Solanum tuberosum*)> mrkva (*Daucus carota subsp. sativus*)> luk (*Allium cepa*)> paprika (*Capsicum annuum*). Osim što se koriste za aromatiziranje, začini i bilje koriste se i zbog njihovih medicinskih ili antiseptičkih svojstava. Konzervirajući učinak mnogih začina i ljekovitog bilja sugerira prisutnost antioksidacijskih i antimikrobnih sastojaka. Ružmarin (*Salvia rosmarinus*) i kadulja (*Salvia officinalis*) bili su vrlo učinkoviti, a origano (*Origanum vulgare*), timijan (*Thymus vulgaris*), kurkuma (*Curcuma longa*) i muškati oraščić (*Myristica fragrans*) također su pokazali visoku antioksidacijsku aktivnost u tlu i kao ekstrakti u obliku začina. Mnogi lisnati začini pokazuju snažno antioksidacijsko djelovanje. Žitarice sadrže širok

spektar fenolnih spojeva. Značajna količina fenolnih kiselina kao što su ferulinska, kofeinska,  $\rho$ -hidroksibenzojeva, protokatekujnska,  $\rho$ -kumarinska, vanilična i špricna kiselina tipične su za žitarice. Ti se spojevi pojavljuju u zrnju prvenstveno u vezanom obliku, najčešće u obliku konjugata sa šećerima, masnim kiselinama ili proteinima. Fenolni antioksidanti u zobu (*Avena sativa*) detaljno su proučavani od 1930-ih, ali manje se pozornosti pridaje drugim uobičajenim žitaricama. Otkriveno je da metanski ekstrakti zobu (*Avena sativa*) imaju značajni antioksidacijski učinak. Poznato je da su razni drveni materijali izvanredni izvori fenolnih spojeva. Iz crnogoričnih iglica je izolirano i identificirano nekoliko fenola, također i od kore breze (*Betula pendula*), smreke (*Picea abies*), bora (*Pinus spp.*) i od lišća bijele i srebrne breze (*Betula pendula*). Pknogenol (ekstrakt procijanidina kore *Pinus maritima*) vjerojatno je najproučavaniji ekstrakt fenolnog drveta. Pokazano je da pročišćava slobodne radikale, uključujući hidroksilne i superoksidne anione, a može imati korisne učinke u sprječavanju arterioskleroze i drugih bolesti povezanih sa starosnom dobi. (Kähkönen I sur., 1999.) Jedan od trenutnih problema u svijetu je pretilost koja je dosegla velike razmjere. Dostupna ispitivanja *in vitro* i *in vivo* pokazala su implikaciju fenolnih spojeva u smanjenju unosa hrane, smanjenju lipogeneze, povećanju lipolize, poticanju  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina, inhibiranju diferencijacije i rasta adipocita, prigušivanju reakcija i suzbijanju oksidacijskog stresa. Provjera ovih svojstava fokusirana je na popularne biljne proizvode koji se danas jako konzumiraju, poput kakaa (*Theobroma cacao*), cimeta (*Cinnamomum ceylonicum*), maslinovog ulja, napitke poput crnog vina, čaja (zeleni, bijeli i crni čaj) i čaja *Hibiscus sabdariffa L.* i drugih. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) smatra pretilost globalnom epidemijom razvijenog svijeta. Pretilost je multifaktorijalna bolest na koju utječu bihevioralni, genetski i okolišni čimbenici, a posljednji su povezani s ekonomskim i socijalnim statusom i načinom života. Pretilost karakterizira višak kalorijskog unosa, zajedno s niskim utroškom energije, što se često događa u sjedilačkom načinu života. Unatoč tome što liječenje i sprječavanje pretilosti moraju biti višedisciplinarni, među čimbenicima je načina života odnosno prehrana jedna od najvažnijih. Prehrambene navike neprestano se mijenjaju. U stvari, evolucija unosa hrane od 1964. do gotovo današnjeg vremena svjedočila je manjem unosu povrća, mahunarki, žitarice, vina i maslinovog ulja, dok je u porastu unos mesa, sira, piva i voća. Globalno, ove prehrambene promjene praćene su nižim unosom fenolnih spojeva. Fenolni spojevi postali su popularna tema istraživanja od 1990-ih zbog epidemioloških studija koje su ukazivale na obrnutu povezanost

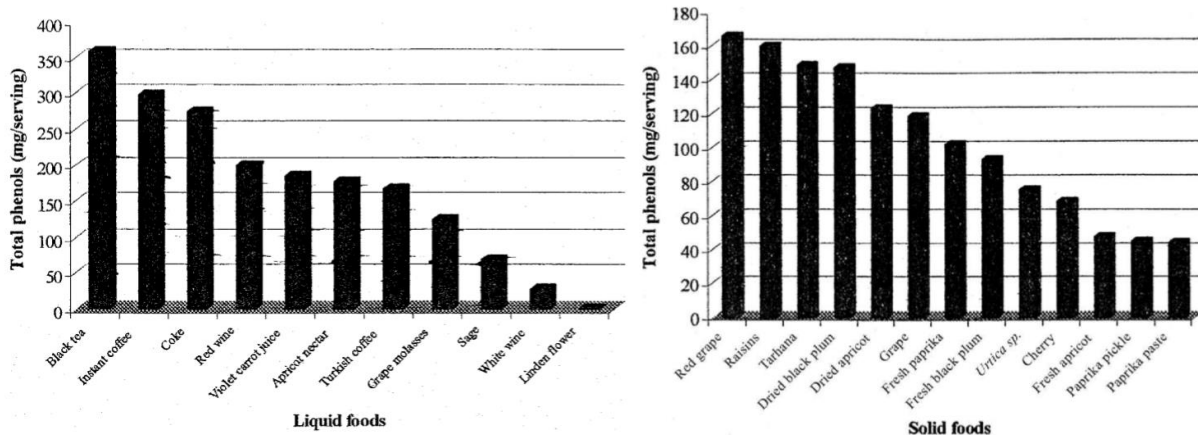
između unosa hrane bogate fenolnim spojevima i učestalosti nekih bolesti poput kardiovaskularnih bolesti ili raka. Tradicionalno, prehrambena terapija bila je usmjerena na smanjenje zasićenih masti ili ugljikohidrata. Međutim, novo svjetlo je bačeno na unos fenolnih spojeva kao ciljnih spojeva protiv pretilosti. U tom kontekstu, razvoj hranjivih i funkcionalnih namirnica pojavio se kao obećavajući alat za sprečavanje bolesti povezanih s prehranom i poboljšanje fizičke i mentalne dobrobiti potrošača. Trenutno je zanimanje za prirodu kao izvor potencijalnih terapijskih sredstava sve veće. Zapravo, neki autori izvijestili su da prirodni proizvodi i njihovi derivati predstavljaju više od 50 % svih lijekova u kliničkoj uporabi u svijetu uglavnom zbog sadržaja fenolnih spojeva. Fenolni spojevi tradicionalno se koriste kao bojila za hranu no oni postaju sve popularniji za širu primjenu. Među fenolnim spojevima su epigalokatehin galat, resveratrol, katehin, kvercetin, procijanidini i antocijanini koji stvaraju veći interes za svoja svojstva protiv pretilosti. (Slika 12) Neke biljke pokazale su ne samo aktivnost *in vitro*, već su i njihova svojstva protiv pretilosti dokazana na životinjskim modelima: sjemenke grožđa, vino, čaj, lišće limunske verbene, lišće od šipka, plodovi, sok i sjemensko ulje, kakao i maslinovo ulje. Ostali ekstrakti protiv pretilosti dobiveni su od kornelijanske trešnje (*Cornus mas*), cimeta (*Cinnamomum zeylanicum*) i obične smokve (*Ficus carica*). (Rodríguez-Pérez i sur., 2017.).



**Slika 12:** Struktura najproučavanijih fenolnih spojeva u borbi protiv pretilosti

Izvor: (Rodríguez-Pérez i sur., 2017.)

Karakaya i sur. (2001.) za svoje istraživanje odabrali su 13 tekućih i 13 čvrstih namirnica iz tipične turske prehrane te su utvrdili ukupne sadržaje fenola (TP) i ukupnu antioksidacijsku aktivnost (TAA) (Slika 13). Ukupni fenoli analizirani su postupkom Folin-Ciocalte, a antioksidacijska aktivnost u vodenoj fazi procijenjena je mjerenjem pomoću ABTS-a (sulfonska kiselina). Prema sadržaju ukupnih fenola po obroku, tekuća hrana bila je opadajućim sadržajem crni čaj> instant kava> kokos> crno vino> sok od ljubičaste mrkve> nektar marelice> turska kava> groždana melasa> kadulja> bijelo vino> cvijet lipe, te kruta hrana redom crveno grožđe> grožđice> tarhana> suha crna šljiva> suha marelica> bijelo grožđe> svježa paprika> svježa crna šljiva> kopriva > trešnja> svježa marelica> paprika >kiseli krastavac> pašteta od paprike. (Slika 14)



**Slika 13:** Prikaz ukupnih fenola u tekućim i krutim namirnicama

Izvor: (Karakaya i sur., 2001.)

	Total antioxidant activity(TAA) mM	TAA/TP × 10 <sup>3</sup>
<i>Liquid foods</i>		
Violet carrot juice	2.67	3.5
Red wine	5.30	2.6
Turkish coffee	4.88	2.0
Instant coffee	3.31	2.7
Black tea	4.44	3.0
Apricot nectar	0.61	0.8
Grape molasses	6.78	1.6
<i>Solid foods</i>		
Fresh black plum	2.67	1.9
Dried black plum	8.08	2.2
Red grape	6.84	3.1
Grape	2.75	1.7
Raisins	8.62	2.2
Fresh apricot	0.63	0.9
Dried apricot	6.85	2.2
Cherry	1.65	1.6
Fresh paprika	3.67	1.8
Paprika paste	2.19	1.5
Paprika pickle	0.63	0.7
Tarhana	6.60	1.8

**Slika 14:** Ukupna antioksidativna aktivnost u tekućim i krutim namirnicama

Izvor: (Karakaya i sur., 2001.)

Utjecaj načina kuhanja u kućanstvu (kuhanje, mikrovalno kuhanje, kuhanje pod pritiskom, pečenje na rešetci, prženje i pečenje) na antioksidacijsku aktivnost povrća ocijenjeno je koristeći različite testove antioksidacijske aktivnosti (uklanjanje lipoperoksilnih i hidroksilnih radikala i TEAC). Artičoka (*Cynara scolymus*) je bila jedino povrće koje je zadržao vrlo visoku



spособnost uklanjanja lipoperoksilnih radikala u svim načinima kuhanja. Najveći gubici kapaciteta čišćenja radikala opažen je kod karfiola (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) nakon vrenja i mikrovalnog pečenja, graška (*Pisum sativum*) nakon vrenja i tikvica nakon vrenja i prženja. Cikla (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *conditiva*), mahune (*Phaseolus vulgaris* L.) i češnjak (*Allium sativum*) zadržali su antioksidacijsko djelovanje nakon većine tretmana kuhanja. Blitva (*Beta vulgaris* subsp. *cicla*) i paprika (*Capsicum annuum*) izgubili su kapacitet čišćenja hidroksilnih radikala u svim procesima termičke obrade. Celer (*Apium graveolens*) je povećao svoju antioksidacijsku sposobnost u svim metodama kuhanja, osim vrenja kada je izgubilo 14 % kapaciteta. Analiza kapaciteta ABTS radikalnog čišćenja različitih povrća pokazala je da su se najveći gubici dogodili kod češnjaka (*Allium sativum*) sa svim metodama, osim mikrovalnim. Među povrćem koje je povećalo svoje TEAC vrijednosti bili su mahune (*Phaseolus vulgaris* L.), celer (*Apium graveolens*) i mrkva (*Daucus carota* subsp. *sativus*) nakon svih metoda kuhanja (osim mahuna nakon vrenja). Ove 3 vrste povrća pokazale su nizak kapacitet ABTS čišćenja od radikala. Pečenje na mreži, mikrovalno kuhanje i pečenje naizmjenično stvaraju najmanje gubitke, dok kuhanje pod pritiskom i kuhanje u vode dovode do najvećih gubitaka dok prženje zauzima srednji položaj. Ukratko, ključala voda nije najbolji prijatelj kada je u pitanju priprema povrća (Jiménez – Monreal i sur., 2009.). Trešnja (*Prunus avium* L.) je drvo koje pripada porodici *Rosaceae*. Unos trešnje (*Prunus avium* L.) putem prehrane povezan je s blagotvornim učincima na zdravlje. Ovo je voće bogato hranjivim tvarima i antioksidacijskim spojevima, što je primjer hrane za koju se misli da sprječava kronične i degenerativne bolesti. Sadržaj fenola u trešnji (*Prunus avium* L.) doprinosi ovim blagotvornim zdravstvenim učincima. Unos polifenola povezan je s smanjenjem kardiovaskularnih bolesti i rizikom od raka. U tom pogledu, voćni ekstrakti pokazuju aktivnosti čišćenja slobodnih radikala, što posljedično pomaže u sprečavanju oksidacijskog oštećenja stanica, pokazujući protuupalna i antitumorska svojstva. Konzumiranje trešanja (*Prunus avium* L.) povezano je s manjim rizikom od napada gihta i artritisa, kao i smanjenjem boli u vezi s gihtom (Acero i sur., 2018.). Fenolni spojevi pokazuju širok spektar fizioloških svojstava, poput antialergijskih, anti-arterogenih, protuupalnih, antimikrobnih, antioksidativnih, antitrombotskih, kardioprotektivnih i vazodilatacijskih učinaka na ljudsko zdravlje. Fenolni spojevi imaju zdravstvene koristi koje proizlaze iz konzumiranja visoke razine voća i povrća. Blagotvorni učinci dobiveni od fenolnih spojeva pripisani su njihovom antioksidacijskom djelovanju. Velike su varijacije između

ukupnih fenola u različitom voću ili povrću ili čak za isto voće ili povrće o kojem izvještavaju različiti autori. Te razlike mogu biti posljedice do složenosti ovih skupina spojeva, i metode ekstrakcije i analize. Osim toga, ovisi o sadržaju fenola u biljnoj hrani na niz unutarnjih (rod, vrste, kultivari) i vanjskih (agronomski, okolišni, rukovanje i skladištenje) faktora. Razlike u vrstama također su izražene što sugerira da sadržaj fenola u nekim plodovima, tj. banani (*Musa spp.*), ličiju (*Litchi chinensis*), mango (*Mangifera indica, L.*) i kakiju (*Diospyros kaki*) znatno su niži nego od bobica i grožđa. Fenolni spojevi s antioksidacijskim djelovanjem imaju identificirani su u više poljoprivrednih nusproizvoda, kao što je ovojnica riže (*Oryza sativa*), ovojnica heljde (*Fagopyrum esculentum*) i ovojnica od badema (*Prunus dulcis*). Ukupni sadržaj cimetine kiseline u ovojnicama švedske zobi (*Avena sativa L*) bio je viši nego kod žitarica (23.6 u usporedbi s 3,6 mg / kg suhe tvari). Ovojnice pistacija (*Pistacia verasu*) također dragocjen izvor fenolnih antioksidanata. Industrija citrusa proizvodi velike količine ljusaka i ostataka sjemena koji mogu iznositi do 50% ukupne težine obrađenog voća. Nusproizvodi iz agruma, ako se optimalno koriste, mogli bi biti glavni izvori fenolnih spojeva jer je otkriveno da kora sadrži veće količine ukupnih fenola u odnosu na jestive dijelove. Ukupni sadržaj fenola u kore limuna (*Citrus x limon*), naranče (*Citrus X sinensis*) i grejpa (*Citrus xparadisi*) bio je 15 % veći od onih u oguljenim plodovima. Utvrđeno je i da kore još nekoliko plodova da sadrže veće količine fenolnih kiselina od jestivih mesnati dijelova. Na primjer, kore od jabuke (*Malus domestica*), breskve (*Prunus persica*) i kruške (*Pyrus communis*) sadrže dvostruko veću količinu fenolnih kiselina od oguljenih plodova. Kore nektarine (*Prunus persica var. nucipersica*) sadrže najmanje dva puta više fenola od mesnatog dijela. Breskvine koštice sadrže 2 – 2,5 puta veću količinu od ukupnog sadržaja fenolnih kiselina u toj istoj količini u jestivom mesu. Oguljeni dio nara (*Punica granatum*) sadrži 249,4 mg / g fenola u usporedbi s 24,4 mg / g fenola u pulpi. Nusproizvodi maslinarske industrije privukli su značajan interes za izvor fenolnih spojeva, s mnogo pozornosti usredotočen na otpad nastao mljevenjem maslina. Sjemenke grožđa i koža, nusprodukti soka od grožđa i proizvodnja bijelog vina također su izvori nekoliko fenolnih spojeva, posebno mono-, oligo- i polimernih proantocijanidina. Ukupni sadržaj fenola u sjemenu nekoliko plodova, tj. mango, longan (*Dimocarpus longan*), avokado (*Persea americana*) i nangka (*Artocarpus heterophyllus*) bili su viši od jestivog mesa, takvo bi sjeme moglo biti vrijedan izvor antioksidacijskih fenola. Sjeme rajčice bogatiji je izvor fenolnih spojeva nego mesnata pulpa. Također sadržaj fenola u kori bio je veći nego u pulpi. Neki

biološki procesi mogu poboljšati oporavak fenolnih spojeva iz poljoprivredno-industrijskog otpada. Jedan takav postupak je uporaba gljivice *Rhizopus oligosporus* za dobivanje fenolnih spojeva iz ananasovog otpada (*Ananas comosus*) (zaostala pulpa, kore i koža) i smjese sojinog brašna. Ostvareno je dvostruko ukupno povećanje sadržaja fenola u smjesi ananas - sojino brašno u omjeru 1:1, 12 dana nakon inkubacije s gljivicama. Toplinskom obradom na 150 ° C tijekom 40 minuta oslobođeni su vezani fenolni spojevi u agrumima, te se ukupni fenolni sadržaj značajno povećao sa 71,8 do 171,0 IM nakon tretmana. Ostali biološki procesi za proizvodnju fenolnih spojeva iz agroindustrijskih nusproizvoda, uključuju sekvencijalne tretmane otpadne vode od šećera, s vodom, lužinama i lužinama peroksida koji je rezultirao eterificiranom ferulinskom i kumarinskom kiselinom. Poljoprivredni nusproizvodi su dobri izvori fenolnih spojeva i istraženi su kao izvor prirodnih antioksidanata. Upotreba fenolnih spojeva iz hrane posebno je zanimljiva, iz praktičnih aspekata koje treba razmotriti uključuju učinkovitost ekstrakcije, dostupnost dostatnih sirovina, otrovnost i sigurnosna razmatranja. Složenost u profilu fenolnih spojeva ovih nusproizvoda mora biti smanjena kako bi se ostvarila optimalna antioksidacijska učinkovitost (Balasundram i sur., 2006.). Ukupni fenolni i flavonoidni sadržaji koji osam vrsta jestivih gljiva (*Agaricus bisporus*, *Boletus edulis*, *Calocybe gambosa*, *Cantharellus cibarius*, *Craterellus cornucopioides*, *Hygrophorus marzuolus*, *Lactarius deliciosus* i *Pleurotus ostreatus*) ispitivani su korištenjem Folin-Ciocalteu metode i kolorimetrijskom reakcijom s NaNO<sub>2</sub> i AlCl<sub>3</sub>. Ispitivane gljive sadrže između 1 i 6 mg fenolnih spojeva po gramu sušene gljive, ovisno o vrsti, dok su se koncentracije flavonoida kretale između 0,9 i 3,0 mg po gramu suhe tvari. Profil i koncentracija pojedinačnih fenola određene su visokim performansama tekuće kromatografije. Homogentisna kiselina bila je slobodna fenolna kiselina prisutna u svim gljivama, iako je njezin sadržaj bio znatno različit u analiziranim vrstama. U ispitivanim gljivama otkriveni su i flavonoidi poput miricetina i katehina. Antioksidacijska svojstva metanolnih ekstrakata iz gljiva ocijenjeni su nadgledanjem autooksidacije linoleinske kiseline i sve su vrste gljiva pokazale inhibiciju, a *C. cibarius* je bio najučinkovitiji protiv oksidacije lipida (74 % inhibicije), dok je *A. bisporus* pokazao najslabije antioksidacijsko djelovanje (10 % inhibicije) (Palacios i sur., 2011.). Antimikrobna aktivnost čistih fenolnih spojeva koji predstavljaju flavonoide i fenolne kiseline, te osam ekstrakata iz uobičajenih finskih bobica, mjerena je u odnosu na odabrane gram-pozitivne i gram-negativne bakterijske vrste, uključujući probiotske bakterije i crijevne patogene - salmonele.

Antimikrobna aktivnost prikazana je metodom difuzije agara, a rast bakterija mjereno je u tekućoj kulturi. Miricetin je inhibirao rast svih bakterija mliječne kiseline koje potječu iz ljudskog probavnog trakta, ali nije utjecao na soj salmonele. Općenito, ekstrakti bobica inhibiraju rast gram-negativnih, ali ne i gram-pozitivnih bakterija. Ove varijacije mogu otkriti razlike u staničnoj površinskoj strukturi između gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija. Ekstrakti nordijske kupine, maline i jagode bili su snažni inhibitori salmonele. Pasji trn i crni ribiz pokazali su najslabije djelovanje protiv gram-negativnih bakterija. Zaključno, različite bakterijske vrste pokazuju različitu osjetljivost prema fenolima. Značaj ove spoznaje o svojstvima može se iskoristiti u razvoju funkcionalne hrane i u svrhu konzerviranja hrane (Puupponen-Pimiä i sur., 2001.). Blagotvorna zdravstvena svojstva maslinovog ulja poznata su stoljećima, posebno u mediteranskoj regiji. Masline i maslinovo ulje sastavni su dio mediteranske kulture i prehrane, pa je stoga smanjena učestalost kardiovaskularnih bolesti na tim područjima pripisana učestaloj konzumaciji proizvoda od maslina. Ovi učinci pripisani su visokom sadržaju oleinske kiseline u maslinovom ulju, koji služi za usporavanje prodiranja masnih kiselina u arterijske stijenke. Preventivna superiornost maslinovog ulja pripisuje se i njegovom antioksidacijskom sastavu: tokoferoli i fenolni spojevi. Poznavanje varijacija fenolnih spojeva trebalo bi omogućiti prvo bolje razumijevanje odnosa koji mogu postojati između tih tvari i fizioloških i organoleptičkih kvaliteta ploda, a drugo pružiti čvrstu osnovu za tehnike obrade, što dovodi do poboljšane kvalitete (Ryan i Robards, 1998.). U posljednja tri desetljeća globalna proizvodnja maslinovog ulja povećala se s 1,4 milijuna tona na 3,3 milijuna tona. Uzroci povećanja su ne samo voćna i aromatična svojstva, nego i zbog veće razine potrošnje i popularnosti (posebno u sjevernoj Europi) no može se i pripisati promociji zdravstvenog učinka maslinovog ulja. Maslinovo ulje sastoji se od preko 98 % triacilglicerola, s oleinskom kiselinom kao dominantnom esterificiranom masnom kiselinom. Male komponente kao što su slobodne masne kiseline, mono- i diacilgliceroli, širok spektar lipida kao što su ugljikovodici, steroli, alifatski alkoholi, tokoferoli, pigmenti i fenolni spojevi predstavljaju oko 2 %. Neki od ovih spojeva doprinose jedinstvenim osjetljivim karakteristikama maslinovog ulja. Posebno su zanimljivi fenolni spojevi. Nisu odgovorni samo za antioksidacijsku aktivnost, već endogeno stabiliziraju proizvode za produženi rok trajanja, ali oni također daju osjetljiva svojstva kao što su gorčina i oštrina (Pedan i sur., 2019.). Provedeno je istraživanje u kojem se ispitaio utjecaj kuhanja na nekoliko vrsta povrća. Antioksidacijsko djelovanje svježeg povrća, kako je

određeno metodom čišćenja radikala DPPH smanjio se redom: brokula > paprika > špinat (*Spinacia oleracea*) > mahune > grašak > tikva (*Cucurbita pepo*) > poriluk (*Allium ampeloprasum*) (Slika 15). Među svim tim pokusnim povrćem pokazalo se da brokula ima aktivnost uklanjanja radikala sa inhibicijom od 78,17 %, dok je poriluk imao najmanju aktivnost sa 12,20 %. Ukupna antioksidacijska aktivnost paprike, graha, brokule i špinata značajno su se povećali ( $p < 0,05$ ) tijekom postupka kuhanja u usporedbi s vrijednostima za svježe povrće. Porast je bio isti tijekom kuhanja klasičnim kuhanjem, kuhanjem na pari i mikrovalnoj peći. Međutim, antioksidacijsko djelovanje tikve, graška i poriluka ostalo je isto kao i za svježe u svakoj vrsti kuhanja. Nema značajnih razlika u sadržaju antioksidacijskih sastojaka i antioksidacijske aktivnosti između konvencionalnog i mikrovalnog kuhanja. Konvencionalnim kuhanjem i mikrovalnom pećnicom nije uzrokovalo značajne gubitke antioksidacijskih aktivnosti topivih u vodi i lipidima koje je FRAP procijenio u zamrznutom grašku, dok je porast u smrznutom špinatu. Grašak je imao nižu ukupnu antioksidacijsku aktivnost od špinata. Slično tome, utvrđeno je da zamrznuti grašak ima malu količinu antioksidacijskog djelovanja. Svježa brokula imala je ukupnu antioksidacijsku aktivnost izmjerenu DPPH metodom sa 60,5 %, a nakon kuhanja 5 minuta kuhanjem i mikrovalnim kuhanjem, cvjetovi su zadržali 35 % i 34,7 % od ukupnog broja antioksidacijske aktivnosti (Turkmen i sur., 2005.). Fenolni spojevi iz piva proizvedeni iz slada i hmelja mogu izravno pridonijeti nekim karakteristikama piva, uglavnom okusu, astrigentnosti, mutnoći i punoći. Razgradnja takvih spojeva neminovno će dovesti do promjene svježeg piva. S druge strane, osim što su antioksidanti, ti spojevi mogu značajno zaštititi sirovine u pivu od oksidacijske razgradnje tijekom cijelog postupka skladištenja (Callemien i Collin, 2010.). Utvrđeno je postojanje značajnih varijacija fenolnih profila (ukupni i pojedinačni fenolni sadržaj) i antioksidacijske aktivnosti komercijalnog piva različitih marki. DPPH, aktivnost čišćenja kationa ABTS radikala i aktivnost čišćenja radikala superoksidnog aniona metode bile su korištene pri provjeri antioksidacijske aktivnosti u komercijalnim pivima. Metode su pokazale je značajne pozitivne korelacije za sadržaj katehinske, protokatekajske, kofeinske i špricevne kiseline. Iako su pojedinačni fenolni spojevi odgovorni za antioksidacijsku aktivnost piva, pokazali su različit, ukupan doprinos fenolnih spojeva u antioksidacijskoj aktivnosti piva između 55,0 % i 88,1 % (Zhao i sur., 2010.).

Vegetables	Fresh <sup>b</sup>	Boiling		Steaming		Microwaving	
	Inhibition	Inhibition	% <sup>c</sup>	Inhibition	%	Inhibition	%
Pepper	68.5 ± 2.97 a	94.4 ± 0.11 b	138	94.5 ± 0.11 b	138	94.3 ± 0.28 b	138
Squash	15.8 ± 1.68 a	19.7 ± 4.25 a	125	26.0 ± 3.61 a	164	16.8 ± 1.03 a	106
Green beans	43.8 ± 2.66 a	70.8 ± 2.41 b	162	81.0 ± 3.53 c	185	82.2 ± 2.41 c	188
Peas	21.3 ± 0.57 a	17.9 ± 0.54 a	84	20.3 ± 2.12 a	95	19.1 ± 1.37 a	90
Leek	12.2 ± 1.39 ab	9.8 ± 0.70 a	80	14.8 ± 1.98 b	121	14.0 ± 0.43 ab	115
Broccoli	78.2 ± 2.53 a	90.6 ± 0.54 b	116	91.3 ± 0.18 b	117	91.2 ± 0.32 b	117
Spinach	67.4 ± 7.82 a	87.1 ± 0.40 b	129	85.5 ± 0.17 b	127	85.8 ± 0.22 b	127

<sup>a</sup> The extracts for antioxidant activity were tested at concentration of 6 mg/ml on dry basis.  
<sup>b</sup> Data are expressed as means ± SE of triplicate experiments. Mean values in a row with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .  
<sup>c</sup> Fresh = 100.

**Slika 15:** Utjecaj različitih vrsta kuhanja povrća na razinu antioksidacijske aktivnosti

Izvor: (Turkmen i sur., 2005.)

### 3. METODE I ANALIZE DOKAZIVANJA FENOLNIH SPOJEVA U BILJKAMA

Važnost oksidacije u tijelu i u hrani široko je prepoznata. Oksidacijski metabolizam je ključan za opstanak stanica. Nuspojava ove ovisnosti je proizvodnja slobodnih radikala i drugih reaktivnih vrsta kisika koje uzrokuju oksidacijske promjene. Sve je više dokaza za uključenost takvih vrsta u različite vrste *in vivo* regulatornog sustava. Kad se stvori višak slobodnih radikala, mogu prevladati zaštitni enzimi kao što je superoksid dismutaza, katalaza i peroksidaza i uzrokovati destruktivne i smrtonosne stanične efekte (npr. apoptozu), oksidaciju membrane lipida, staničnih proteina, DNK i enzima, čime se isključuje stanično disanje. Reaktivne kisikove vrste utječu na stanične signalne putove na razne načine. Oksidacija također može utjecati na hranu, gdje je jedan od glavnih uzroka kemijskog kvarenja, što rezultira propadanjem i / ili pogoršanjem prehrambene kvalitete, boje, okusa, teksture i sigurnosti odnosno ispravnosti hrane. Procjenjuje se da je polovica svjetske voćne i povrtlarske kulture izgubljena zbog neadekvatnog skladištenja nakon žetve što uzrokuje kemijske promjene tj. kvarenje. Obrambeni mehanizmi protiv učinaka prekomjerne oksidacije osiguravaju se djelovanjem raznih antioksidanata i potreba za mjerenjem antioksidacijske aktivnosti je dobro istražena. Metode procjene antioksidacijskog ponašanja dijele se na dvije široke kategorije koje odražavaju fokus na aktivnost u hrani ili bioaktivnost u ljudi. U slučaju prehrambenih sustava, procjena učinkovitosti antioksidanata potrebna je za osiguravanje zaštite hrane od oksidacijskog kvarenja. Potkategorija uključuje mjerenje aktivnosti u hrani, posebice voća, povrća i pića, ali s ciljem predviđanja prehrambenih učinaka *in vivo*. Oksidacijski stres u ljudi nastaje zbog neravnoteže u antioksidacijskom statusu (reaktivne vrste kisika naspram obrambenih i popravkih mehanizama). Među endogenu obranu spadaju enzimi kao što superoksid dismutaza, katalaza i glutation- $\rho$ -eroksidaza, plus vitamin E, mokraćna kiselina i serumski albumini. Pored ovih vrsta obrana stanice od stresa, također je važna konzumacija prehrambenih antioksidanata. Postoje različite metode mjerenja antioksidacijske aktivnosti, posebice ako se odnosi na oksidaciju lipida. To treba razlikovati od povezanih procesa mjerenja koncentracije antioksidanata. Ipak, može se reći da su to dvije povezane metode s obzirom da antioksidanti uglavnom pokazuju pro-oksidacijske učinke u većoj koncentraciji. Izraz "aktivnost" koji se primjenjuje za antioksidante je potrebno pojasniti jer može imati mnoštvo značenja. Relevantni

aspekti uključuju: mehaničku intervenciju, npr. sredstvo za uklanjanje slobodnih radikala, katalitičku razgradnju, supresiju prooksidanata; brzinu čišćenja, npr., difuzija ili upravljana difuzija; selektivnost medija ili supstrata (npr. vodena, površinska ili lipidna faza); učinkovitost koncentracije (molekuli od slobodnih radikala uklonjeni po molu antioksidanta), te sinergistički učinak za ostale antioksidante. Čini se da se izraz slabo koristi za identificiranje "aktivnosti" koja se mjeri jednom ili više uobičajenih ili standardnih testova kao što je navedeno u tablici (Slika 16). U mnogim slučajevima, specifični supstrati niti specifični aditivi ne mogu biti analizirani, ali ekstrakti se mogu analizirati kako bi se identificirali oni koji pokazuju antioksidacijsko djelovanje prema primijenjenoj metodi ispitivanja. Na primjer, TLC probir može se koristiti za identifikaciju komponenata u ekstraktima koje pokazuju takvu aktivnost. Također je moguće koristiti metode probira za identificiranje klase antioksidanata (npr. fenol) ili čak njegovo djelovanje upotrebom sprejeva za prskanje (npr. sredstvo za kompleksiranje, inhibitor radikala, dekompozer hidroperoksida). U svakom slučaju, takve "aktivnosti" trebaju biti podržane ispitivanjem stvarnog supstrata i uvjeta od interesa. Ovo je posebno važno za *in vivo* testiranja gdje apsorpcija, metaboličke transformacije, izlučivanje, osim konkurentskih enzima i antioksidanata pro-oksidanata mogu duboko utjecati na *in vivo* aktivnost testiranih antioksidanata (Antolovich i sur., 2002.). Iako su provedena intenzivna ispitivanja fenolnih sastojaka u brojnim biljnim izvorima, podaci o sastavu još uvijek nisu dovoljni. Fenolni profili često su analizirani nakon hidrolize glikozidnih veza kako bi se pojednostavio postupak identifikacije, a na taj način se gube potrebne informacije o autentičnoj strukturi spojeva. Poznato je da stupanj glikozilacije značajno utječe na antioksidacijska svojstva spoja. Na primjer, aglikoni kvercetina i miricetina bili su aktivniji od svojih glikozida u rasutom metil-linoleatu. Također velika raznolikost oksidacijskih sustava i načina mjerenja aktivnosti korištenih u procjeni antioksidanata otežavaju usporedbu rezultata različitih studija (Kähkönen I sur., 1999.).



Test	Measurement	Units
Peroxide value	Peroxides and hydroperoxides	mequiv. kg <sup>-1</sup> of active oxygen
Diene conjugation	1,4-Dienes produced by early stages in lipid autoxidation	Absorbance/unit mass mg kg <sup>-1</sup> linoleic acid equivalents
Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)	Thiobarbituric acid derivatives of malondialdehyde absorbing at 532–535 nm	mg kg <sup>-1</sup> (ppm w/w) as malondialdehyde
Kreis test	Phloroglucinol derivatives of malondialdehyde and other aldehydes absorbing at 546 nm	Red colour on Lovibond scale (empirical); mg kg <sup>-1</sup> (ppm w/w) as malondialdehyde
Anisidine value	Aldehydes (mainly alkenals)	100 times the corrected absorbance in a 1 cm cell at 350 nm containing 1 g of oil or fat per 100 mL of isooctane–acetic acid solvent
Hexanal formation, pentane formation, hexane formation, etc.	Specific oxidation end-product formed	mg kg <sup>-1</sup> of product formed
ABTS• <sup>+</sup> assay	Absorbance of radical cation in aqueous medium at 734 nm or other suitable wavelength	Inhibition time for appearance of radical cation under specified conditions or decay rate once formed
Total radical trapping antioxidant parameter (TRAP)		
Phycocerythrin assay	Fluorescence intensity	Inhibition of fluorescence decay under specified conditions of autoxidation. Can be expressed as trolox equivalents?
Electron spin resonance (ESR) spin-trap test	Intensity/rates of change in concentration of antioxidant or spin-trap derivative radicals	mg L <sup>-1</sup> of radical species ( <i>cf.</i> stable standard such as di-tert-butyl nitroxide)
TG/DTA	Time required for development of autoxidation in a dynamic oxygen atmosphere at specified temperature	$\Delta T$ (°C), mass change (mg)

**Slika 16:** Testovi, ispitani entiteti i osnovne jedinice koje se koriste za mjerenje antioksidacijske aktivnosti

Izvor: (Antolovich i sur., 2002.)

### 3.1. Vrste ekstrakcija fenolnih spojeva iz biljaka

Priprema uzoraka je od najveće važnosti za svaku pouzdanu analizu. Mnoge metode pripreme uzoraka razvijene su za određivanje sadržaja polifenola i jednostavnih fenolnih spojeva u širokom spektru tipova uzoraka. Pojava tri glavna matriksa koji sadrže fenole, tj. biljke, hrana i tekući uzorci (uključujući biološke tekućine i pića), zahtijevaju detaljnu razradu pripreme uzorka. Postupci pripreme uzoraka za analizu fenolnih kiselina i flavonoida mogu se jako razlikovati, od jednostavnijih kao filtriranje u slučaju pića ili urina do složenijih načina dorade, poput hidrolize glikozida i ekstrakcije / čišćenja prije analize. Zbog širokog spektra fenolnih kiselina u odnosu na polaritet, kiselost, broj hidroksilnih skupina i aromatičnih prstenova, koncentraciju i složenost matrice, nema suglasja u izboru postupaka predobrade. Stoga je prikladno odabrati optimalnu metodu prethodne obrade prema kemijskim strukturama i svojstvima analiziranih spojeva. Najčešće se u metode ispitivanja uključuju dva ili više koraka pripreme uzorka. Odgovornost je analitičara da kontrolira cjelokupnu pripremu i da procijeni utjecaj učinaka na analitički rezultat (Stalikas 2007.). Priprema i ekstrakcija fenolnih spojeva iz

ovog širokog spektra uzoraka najviše ovisi o prirodi matriksa uzorka i kemijskim svojstvima fenola, uključujući molekularnu strukturu, polaritet, koncentraciju, broj aromatskih prstenova i hidroksilne skupine. Varijacija u kemiji fenola u uzorku povezana je s koncentracijom jednostavnih i složenih polifenolnih spojeva i različitim udjelima fenolnih spojeva, flavonoida, antocijanina i proantocijana. Stoga je teško odabrati jednu metodu pripreme i ekstrakcije fenola za mnoge biljne proizvode. Kompleksi s proteinima, ugljikohidratima ili drugim elementima sprečavaju potpunu ekstrakciju nekih fenola. Za neke tehnike pripreme, uzorke biljaka potrebno je sušiti smrzavanjem, sušenjem na zraku ili sušenjem u pećnici. Na primjer, veće količine fenolnih spojeva mogu se izdvojiti u uzorku osušenom u hladu nego iz uzoraka osušениh u pećnici. Osušeni uzorci se melju ili drobe kako bi se dobila određena veličina čestica, dok se tekući uzorci tretiraju centrifugiranjem, filtriranjem i pročišćavanjem upotrebom sustava za odvajanje. Veći prinosi ekstrakcije fenola postižu se mljevenjem uzorka u manje veličine čestica, poboljšavajući tako enzimsko djelovanje i ekstrakciju. Postupci odmašćivanja mogu se primijeniti za uklanjanje ulja iz uzoraka koji sadrže lipide kao na primjer, odmrznute mljevene sjemenke grožđa radi pojednostavljenja fenolne ekstrakcije heksanom. Općenito, savjetuje se mljevenje u male veličine čestica (u kombinaciji sa sušenjem i odmašćivanjem) za najcjelovitiju pripremu uzorka prije ekstrakcije. Kompletna ekstrakcija fenolnih spojeva sljedeći je kritični korak nakon pripreme uzorka. Najčešće tehnike ekstrakcije fenolnih kiselina koriste otapala, a ona mogu biti organska ili anorganska. Nekoliko parametara može utjecati na prinos fenolnih kiselina, uključujući vrijeme ekstrakcije, temperaturu, omjer otapalo-uzorak, broj ponovljenih ekstrakcija uzorka kao i vrstu otapala. Nadalje, optimalno iskorištavanje fenolnih kiselina razlikuje se od uzorka do uzorka i ovisi o vrsti biljke i njenim aktivnim spojevima. Odabir otapala za ekstrakciju poput vode, acetona, etil acetata, alkohola (metanol, etanol i propanol) i njihovih smjesa utjecati će na količinu ekstrahiranih fenola. Na primjer, visoki udio fenolnih kiselina može se ekstrahirati iz lišća pomoću vode, dok je za ekstrakciju fenola iz pšeničnih mekinja potrebna 80 % otopina etanola. U drugom primjeru, istraživanje utjecaja različitih otapala na ekstrakciju fenolnih spojeva iz zračnih dijelova petoprste (*Potentilla atrosanguinea*) pokazalo je da je 50 % etanol efikasniji od čistog ili 50 % razrijeđenog metanola i acetona. Suprotno tome, najviše razine fenolnih spojeva ekstrahiraju se iz otpada vinove loze tj. grožđa (*Vitis vinifera*) i suncokretovog brašna (*Helianthus annuus*) koristeći čisti metanol i 80 % aceton. Te razlike mogu biti posljedica svojstava fenolnih komponenti analiziranih biljaka.

Osim odabira optimalnog otapala za ekstrakciju, postoje još dva važna parametra koja utječu na količinu fenola izvađenih iz biljnog tkiva, a to su vrijeme i temperatura. Povećanje vremena i temperature potiču topljivost, međutim, biljni fenoli uglavnom se razgrađuju ili su podvrgnuti nepoželjnim reakcijama kao što je enzimska oksidacija produženim vremenima ekstrakcije i visokim temperaturama. Optimalno vrijeme i temperatura ekstrakcije za ekstrakciju fenolnih spojeva iz brašna s uljanom repicom (*Brassica napus*) je 2 minute (2 x 1 minuta) na sobnoj temperaturi. Omjer otapala / uzorka i broj ponovljenih ekstrakcija provedenih za svaki uzorak također utječu na ekstrahiranu količinu fenola. Povećavanje omjera otapalo-uzorak potiče ekstrakciju fenola iz biljnih uzoraka, ali je preporučljivo određivanje optimalnog omjera tako da se unos otapala i zasićenje efekata fenola minimiziraju. Omjer otapala 60:1 u uzorku u postupku dvije faze dovoljan je za ekstrakciju većine fenola iz biljnih tkiva. Matriks uzorka i veličina čestica također snažno utječu na ekstrakciju fenola iz biljnih materijala. Fenoli se mogu vezati za druge elemente uzorka, poput ugljikohidrata i proteina. Te se veze mogu hidrolizirati dodavanjem enzima, čime se potiče oslobađanje vezanih fenolnih spojeva. Kiselinska i alkalna hidroliza također se koriste u izolaciji fenola iz biljaka i biljnih proizvoda i važni su za stabilnost fenolnih kiselina u ekstraktu. Flavonoidni aglikoni identificirani su kiselom hidrolizom glikozidnih ostataka vezanih za jezgre flavonoida u 20 biljnih izvora. Reakcija pH 4–5 povezana je s većom stabilnošću katehina i njihovih izomera od alkalnih i kiselijih stanja. Ekstrakcija organskim otapalom glavna je metoda koja se koristi za ekstrakciju fenola. Kemijski postupci koriste se za otkrivanje prisutnosti ukupnih fenola, dok se spektrofotometrijske i kromatografske tehnike koriste za identificiranje i kvantificiranje pojedinih fenolnih spojeva. Fenolne kiseline općenito postoje u biljkama u slobodnom, esterificiranom ili glikoziliranom obliku. Ekstrahirani su slobodni fenolni spojevi u riži pomoću 70 % -tnog etanola na sobnoj temperaturi nakon čega je uslijedilo centrifugiranje. Ekstrakt je zatim obrađen sa 4 M HCl radi smanjenja pH na 2–3, a fenolna frakcija je odvojena etil acetatom i osušena s bezvodnim di-natrijevim sulfatom. Vezane ili esterificirane fenolne komponente riže ekstrahirane su uklanjanjem slobodnih fenolnih spojeva i lipida koristeći 70 %-tni etanol i heksan, respektivno. Osušene frakcije etil acetata obrađene su s 1 M NaOH koji sadrži 0,5 % natrijevog borhidrida ( $\text{NaBH}_4$ ) radi oslobađanja esterificiranih fenolnih spojeva u struji plina  $\text{N}_2$ , a zatim centrifugiranjem kako bi se dobio bistri supernatant. Razgradnja fenolnih kiselina tijekom alkalne hidrolize može se spriječiti dodavanjem EDTA ili askorbinske kiseline. Slobodne, esterificirane i glikozilirane fenolne

komponente izdvojene su iz pšenice (*Triticum aestivum*), raži (*Secale cereale*) i tritikala ( $\times$ *Triticosecale*). Fenolni spojevi ekstrahirani su korištenjem 80 % metanola tijekom 15 minuta na 80 °C, a ekstrakt je koncentriran uparavanjem organskog otapala. Zatim je pripravljena vodena suspenzija ekstrakta i podešana na pH 2 sa 6 M HCl i slobodnih fenolnih spojeva ekstrahirani dietil-eterom. Ostatak suspendiranog ekstrakta neutralizira se i otopi u 20 ml NaOH (2 M) 4 sata pod N<sub>2</sub>. Nakon alkalne hidrolize, ekstrakt se ponovno zakiseli do pH 2. Esterificirani fenolni spojevi, derivatizirani miješanjem ekstrakta s dietil-eterom, izolirani su pomoću lijevka za razdvajanje. Za oslobađanje fenolnih kiselina iz glikoziliranih oblika, preostaloj vodenoj frakciji dodano je 15 ml 6 M HCl i smjesa je držana 1 sat na 100 °C u atmosferi s dušikom. Konačno, oslobođeni fenolni spojevi su izolirani dietil-eterom. Osim etanola, mješavine vode s metanolom, acetonom i kloroformom mogu se koristiti za ekstrakciju fenolne kiseline iz biljnih proizvoda. Slobodni i vezani oblici fenolnih spojeva mogu se izdvojiti sekvencijalno iz biljnih uzoraka. Flavonoidi su visoko bioaktivni spojevi koji se nalaze i u jestivim i u nejestivim biljkama. Često se ekstrahiraju s metanolom, etanolom, acetonom, vodom ili mješavinama tih otapala upotrebom metoda ekstrakcije grijanim refluksom. Nakon ekstrakcije, flavonoidni glikozidi se često hidroliziraju u aglikonske oblike primjenom HCl u atmosferi s dušikom. Ekstrahirani su flavonoidi iz različitih vrsta biljaka s 50 % metanola zakiseljenog s 1,2 M HCl. Dodana je askorbinska kiselina radi sprečavanja oksidacije smjese. Hidroliza flavonoidnih glikozida provedena je 2 sata na 80 °C. Ekstrahirani flavonoidi iz osušenog i odmašćenog biljnog materijala u dietil-eteru i filtrirani objedinjeni uzorci za HPLC analizu. Flavonoidi se mogu ekstrahirati i iz biljnog materijala s 62,5 % metanola. Ekstrakt je zakiseljen sa 6 M HCl pod N<sub>2</sub> na 90 °C tijekom 2 sata, čime se dobivaju flavonoidni glikoni. Provedena je optimizacija enzimske ekstrakcije flavonoida iz stabljika celera korištenjem vodenog homogenata pomiješanog s 1 N HCl ili NaOH radi podešavanja pH i smjesa se inkubira na željenoj temperaturi. Složena mješavina enzima dodana je uzorku uz miješanje pri 150 o/min. Enzimi su zatim inaktivirani zagrijavanjem na 90 °C 10 min i supernatant je centrifugiran iz smjese i sakupljen za ukupno određivanje flavonoida. Flavonoidi u uzorcima kukuruza analizirani su primjenom zagrijanog refluksa, ekstrakcijom potpomognutom mikrovalnom pećnicom (MAE), ultrazvučno-potpomognutom ekstrakcijom (UAE) i maceracijom gdje je uspoređivana stabilnost ekstrahiranih spojeva. Najveća stabilnost ekstrahiranih flavonoida u metanol-vodi (60:40) bila je za spojeve ekstrahirane tradicionalnim grijanim refluksom u

vodenoj kupelji i MAE unutar 1 min ispod 160 W. Antocijanini su najčešći pigmenti u prirodi i mogu se ekstrahirati sa zakiseljenim otapalima poput vode, acetona, etanola, metanola ili mješavinama vodenih otapala. Kiselina u otapalima djeluje na rupturu staničnih membrana i oslobađanje antocijanina; međutim, ovo oštro kemijsko postupanje može razgraditi izvornu strukturu antocijana. Stoga je važno zakiseliti otapala organskim kiselinama (mravljom ili octenom kiselinom), a ne mineralnim kiselinama poput 0,1 % HCl. Ekstrakcija antocijana iz ljubičastog slatkog krumpira (*Dioscorea alata*) bila je učinkovitija sa zakiseljenim metanolom i etanolom nego bez zakiseljenih otapala (Bridgers i sur. 2010). Ekstrakcija antocijana iz sirka (*Sorghum spp.*) sa zakiseljenim metanolom bila je značajno veća nego u otopini acetona. Metanol je doista najčešće i najučinkovitije otapalo za ekstrakciju antocijana; međutim, zagađuje okoliš i toksičniji je od ostalih alkohola. Stoga se etanol preferira za ekstrakciju antocijanina iz biljnog materijala koja bi se koristio kao prirodna bojila ili lijekove. Osim ekstrakcije zakiseljenih otapala, sumporna voda (otopina SO<sub>2</sub>) također se koristi za ekstrakciju antocijana iz biljnih materijala, poput kože crvenog grožđa i crne ribizle. Proantocijanidini su skupina polimeriziranih polifenola koji se obično nazivaju kondenzirani tanini. Oni se prirodno nalaze u sjemenkama grožđa i kožici, sladu, jabučnom soku, u perikarpu mangostina (*Garcinia mangostana*), hmelju (*Humulus lupulus*), bobicama, borovoj kori, čokoladi, sirku i morskoj kori. Za ekstrakciju proantocijanidina obično se koriste organska otapala, uključujući etanol kao i metanol i aceton. Na primjer, etanol je najbolje otapalo za ekstrakciju proantocijanidina iz sjemenki grožđa. Ionske tekućine (rastopljene soli), kemijski stabilne, lako se recikliraju i nezapaljive su, novo su alternativno otapalo za ekstrakciju proantocijanidina. Korišteni su za ekstrakciju proantocijanidina iz kore dahurskog ariša (*Larix gmelini*) metodama ekstrakcije mikrovalnom pećnicom, što rezultira većim količinama proantocijanidina u usporedbi s konvencionalnim metodama ekstrakcije organskim otapalima. Priprema uzoraka i uklanjanje neželjenih tvari za precizno kvantificiranje fenolnih kiselina je važno, ali postupak ekstrakcije je glavna odrednica za odvajanje i obnavljanje fenolnih kiselina. Kao što je ranije spomenuto, na ekstrakciju općenito utječu priroda uzorka, veličina čestica, vrsta otapala kao i primijenjene tehnike ekstrakcije. Metoda Soxhlet; ekstrakcija sa grijanim refluksom i maceracija uobičajeni su postupci koji se često koriste za skupljanje fenolnih kiselina iz čvrstih uzoraka. Metode Soxhlet i grijanog refluksa normalno se izvode na 90 °C nekoliko sati, dok se maceracija izvodi danima na sobnoj temperaturi. Ove su metode jednostavne, zahtijevaju relativno jeftinu napravu

i rezultiraju primjereno visokim stopama ekstrakcije. Najveći ukupni fenolni sadržaj ekstrakta sjemena guave (*Psidium guajava*) je postignut korištenjem tehnike ekstrakcije Soxhlet. Fenolni spojevi iz sjemena divlje vinove loze uspješno su izdvojeni tehnikom Soxhlet. Iako postoji mnogo pozitivnih aspekata ove metode, postoje i značajni nedostaci, uključujući: (1) potrebu korištenja velike količine opasnih organskih otapala, koja zagađuju okoliš i štete po zdravlje; (2) dugo vrijeme ekstrakcije i (3) ometanje i propadanje ciljanih komponenata zbog unutarnjih i vanjskih čimbenika kao što su svjetlost, zrak, visoke temperature i enzimske reakcije. Soxtec je modificirana metoda ekstrakcije Soxhlet. Prednosti ove tehnike nad normalnim Soxhlet ili grijanim refluksnim sustavima su mala potrošnja organskih otapala i kraće vrijeme ekstrakcije, kao i sposobnost recikliranja otapala. Maceracija ima iste nedostatke kao i druge konvencionalne metode ekstrakcije, a karakterizira ih niska učinkovitost fenolnih ekstrakcija. Zbog problema povezanih s konvencionalnim postupcima ekstrakcije, pojavila se potražnja za alternativnim tehnikama za ekstrakciju fenolnih spojeva. Korištenje ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (UAE), ekstrakcije potpomognute mikrovalnom pećnicom (MAE), ultrazvučno-mikrovalne ekstrakcije (UMAE), ekstrakcije superkritične tekućine (SFE), ekstrakcije podkritične vode (SCWE) i obrade visokog hidrostatskog tlaka (HHPP) raste. Ove metode skraćuju vrijeme ekstrakcije, smanjuju otpuštanje toksičnih zagađivača smanjenjem potrošnje organskih otapala i relativno su jednostavne za izvođenje. Ultrazvučno zračenje, koje ima frekvencije veće od 20 kHz, olakšava ekstrakciju organskih i anorganskih spojeva iz čvrstih matrica pomoću tekućih otapala. Soniciranje je proizvodnja zvučnih valova koji stvaraju kavitacijske mjehuriće u blizini uzorka tkiva, koji se razgrađuju da bi poremetili stanične stijenke, te tako oslobađali stanični sadržaj. Odgovarajuće otapalo se pomiješa sa uzorkom i ultrazvučno tretira pod kontroliranom temperaturom određeno vrijeme. Na obnavljanje ekstrakta utječe ne samo vrijeme sonikacije, temperatura i odabir otapala, već i valna duljina i raspodjela valova ultrazvuka. Ultrazvuk se koristi kako u statičkom tako i u dinamičkom načinu da se ekstrahiraju fenolni biljni materijali. Statički sustav je ekstrakcija zatvorenih posuda u kojima ne dolazi do kontinuiranog prijenosa otapala. Kod dinamičke ekstrakcije neprekidno se isporučuje svježe otapalo koje omogućava efikasnu adsorpciju analita i njihov učinkovit prijenos iz ekstrakcijske posude. Neprekidni prijenos ekstrahiranih analita sprječava razgradnju bilo kojih termo-labilnih spojeva toplinom povezanih sa ultrazvukom. Sonde i kupelji dva su najčešća načina nanošenja ultrazvučnih valova na uzorak. Sonikatorske sonde stalno su u

kontakta s uzorkom i otežavaju ponovljivost rezultata. Osim toga, rizik od onečišćenja uzorka i stvaranja pjene je veći. Sonikatorske kupelji mogu istovremeno djelovati na različite uzorke i omogućiti veću obnovljivost. U usporedbi s konvencionalnim metodama, UAE je jedan od najjednostavnijih, jeftinih ekstrakcijskih sustava i može se njime brzo upravljati u širokom rasponu otapala za krupne pripravke pogodne za industrijske svrhe. Kao metoda za ekstrakciju fenolnih spojeva iz *Potentilla atrosanguinea* i *Pinus radiata*, UAE se pokazao učinkovitijim od maceracije, ali manje učinkovitim od metoda refluksa, MAE i UMAE (Khoddami i sur., 2013.). Mnoga su istraživanja uključivala ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz različitih vrsta uzoraka pomoću ovih tehnika (Slika 17).

Sample	Solvent	Extraction time (min)	Phenolic class	Yield (mg GAE <sup>b</sup> /g)	Reference
<i>Puerariae lobatae</i> radix	Ethanol 80%	55	Isoflavones	128	[53]
<i>Vitis vinifera</i>	Methanol	60	TPC <sup>a</sup> and flavonoid	55.90	[36]
<i>Galla chinensis</i>	Ethanol 70%	40	Tannin	491.2	[85]
Sunflower meal	Acetone 80%	30	TPC <sup>a</sup>	30.93	[37]
Orange peel	Ethanol 80%	30	TPC <sup>a</sup>	2.758	[86]
Satsuma mandarin peel	Methanol 80%	60	Hesperidine	1.446	[87]
Aerial parts of <i>Potentilla atrosanguinea</i>	Ethanol 50%	60	TPC <sup>a</sup>	27.80	[35]
Soy beans	Ethanol 40–60%	20	Isoflavones	1.353	[88]

<sup>a</sup> Total phenolic content; <sup>b</sup> Gallic acid equivalent.

**Slika 17:** Ekstrakcija biološki aktivnih spojeva pomoću UAE

Izvor: (Khoddami i sur., 2013.)

Mikrovalne metode ekstrakcije su se desetljećima široko primjenjivale u istraživanjima sekundarnih metabolita biljaka. Mikrovalovi su neionizirajuće zračenje valnih duljina od jednog metra do jednog milimetra (frekvencije između 300 MHz i 300 GHz). Mikrovalovi induciraju molekularno gibanje u materijalima ili otapalima s dipolima, što rezultira zagrijavanjem uzoraka. Zagrijavanjem biljne stanice gube vlagu isparavanjem, generirana para uzrokuje bubrenje, te na kraju dolazi do rasprsnuća stanice oslobađajući njezine aktivne komponente.

Osim dipola materijala biljne stanice, poput molekula vode, u MAE igra važnu ulogu dipolska rotacija molekula otapala pod brzom promjenom električnog polja. Tijekom zračenja, valni elektronički modul se mijenja  $4,9 \times 10^4$  puta/s, a molekule otapala potiču se da se u normalnoj fazi poravnaju s električnim poljem. Pri tako velikoj promjeni brzine električne faze, molekule otapala se ne usporavaju i počinju vibrirati, zagrijavajući uzorak zbog sile trenja. Prednosti MAE tehnika u odnosu na konvencionalne metode (kao što su maceracija i refluks topline) uključuju smanjenu upotrebu organskih otapala, skraćeno vrijeme ekstrakcije (uglavnom manje od 30 min) i povećane količine ekstrakcije. Vruća otapala stvorena u MAE lako prodiru u matriks i ekstrahiraju spojeve iz liziranih biljnih stanica. Za termolabilne uzorke, prozirna otapala poput heksana, kloroforma i toluena ili smjese s netransparentnim otapalima sprječavaju razgradnju. Važno je odabrati odgovarajuća otapala na temelju njihovih vrelišta, disipacije i dielektričnih svojstava. Najčešće primijenjena otapala u MAE prikazana su u tablici (*Slika 18*). Polarna otapala imaju veću dielektričnu konstantu od nepolarnih otapala i mogu apsorbirati više mikrovalne energije, što može rezultirati većim prinosom fenolnih spojeva.

Solvent	Formula	Boiling point (°C)	Dielectric constant <sup>a</sup>	Dissipation factor
Acetonitrile	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N	81.60	37.50	620
Water	H <sub>2</sub> O	100	78.30	1570
Ethanol	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	78.5	24.30	2500
Acetone	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	56.2	20.70	5555
Methanol	CH <sub>4</sub> O	64.6	32.60	6400
2-Propanol	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O	98	19.90	6700

<sup>a</sup> Determined at 20 °C [94,95].

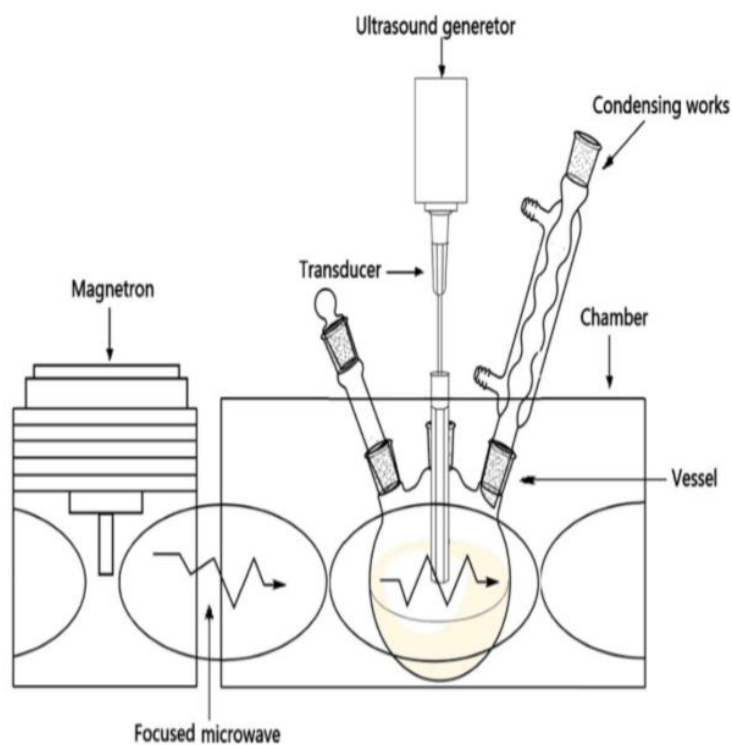
**Slika 18:** Važna svojstva nekih otapala koja se obično koriste u MAE

Izvor: (Khoddami i sur., 2013.)

Spajanje dviju moćnih tehnika zračenja (ultrazvučne i mikrovalne) je novi učinkovitiji pristup za ekstrakciju bioaktivnih spojeva. Kao što je spomenuto ranije, MAE je jednostavna i brza tehnika koja koristi dielektrične mehanizme za zagrijavanje uzoraka i ekstrakciju biljnih bioaktivnih spojeva, dok UAE formira kavitacije, koje povećavaju prijenos mase i poboljšavaju prodor otapala u uzorak. Stoga je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom / mikrovalnom pećnicom (UMAE) moćna tehnika koja može smanjiti vrijeme ekstrakcije, trošiti manje količine otapala i rezultirati većim prinosima ekstrakcije u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju, MAE



i UAE. Rezultati impliciraju da je UMAE efikasnija metoda ekstrakcije od ostalih ispitivanih tehnika ekstrakcije. Shematski dijagram uređaja za UMAE prikazan je na slici (Slika 19).



**Slika 19:** Shematski prikaz uređaja za ultrazvučno-mikrovalnom ekstrakciju (UMAE)

Izvor: (Khoddami i sur., 2013.)

Ekstrakcija superkritične tekućine (SFE) je druga ekološka tehnika ekstrakcije, koja može biti dobra alternativa uobičajenim metodama ekstrakcije s organskim otapalima. Može smanjiti potrebu za toksičnim organskim otapalima, povećati sigurnost i selektivnost, skratiti vrijeme ekstrakcije i olakšati odvajanje ekstrakta iz nadkritičnih tekućina (SCF). Nadalje, može se izbjeći razgradnja ekstrahiranih spojeva u nedostatku zraka i svjetla, a mogućnost onečišćenja uzorka nečistoćama otapala mnogo je manja nego kod drugih metoda. Visoka cijena investicija u opremu glavni je nedostatak SFE. Druga ekološki prihvatljiva tehnika ekstrakcije koja se koristi za učinkovitu izolaciju fenolnih spojeva je vađenje podkritične vode (SCWE), poznato i kao pregrijana voda, voda pod pritiskom ili ekstrakcija vruće tekuće vode. Glavne prednosti SCWE u odnosu na konvencionalne metode su njegova jednostavnost, visoka kvaliteta ekstrakcije, kratko vrijeme ekstrakcije i ekološka prihvatljivost zbog korištenja vode kao otapala. Sa SFE, iz biljnog materijala mogu se ekstrahirati samo nepolarni spojevi koristeći

organska otapala kao modifikatore, a biljna prerada je vjerojatno skuplja nego kod SCWE. Novija tehnika koja se može koristiti za ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljaka je HHPE. Ovom se metodom koristi netermalni previsoki hidraulički tlak (1.000–8.000 bara) i djeluje na temelju masovnih transportnih pojava. Primijenjeni tlak povećava propusnost stanica biljaka, što dovodi do difuznosti staničnih komponenata prema teorijama prijenosa mase i faznog ponašanja. Glavni nedostatak metoda poput HHPE, SCWE i SFE je u tome što je potrebna skupa oprema tj. pumpa za transport otapala, tlačna posuda i regulator sustava i uređaj za prikupljanje ekstrakta. Međutim, u slučaju ekstrakcije antioksidanata, za kojima su proizvodi velike potražnje i očekuje se velika čistoća ekstrakta i učinkovitosti prerade, cijena opreme možda neće igrati kritičnu ulogu u odabiru ovih metoda (Khoddami i sur., 2013.). Istraživanja koji se odnose na ekstrakciju fenolnih spojeva koji se javljaju u prirodnim proizvodima privukla su poseban interes zajednice. Ekstrakcija je vrlo važan korak u izolaciji, identifikaciji i korištenju fenolnih spojeva, te ne postoji jedinstvena i standardna metoda ekstrakcije. Ekstrakcija otapalima i ekstrakcija sa superkritičnom tekućinom su najčešće korištene tehnike izolacije fenolnih spojeva. Veliki broj članaka u literaturi fokusiran je na ekstrakciju i analizu polifenola iz biljnih materijala, uključujući voće, povrće, vina, kavu, čaj, bilje, žitarice i mahunarke. Fenolni spojevi ekstrahirani su mljevenjem, sušenjem ili liofiliziranjem voća, povrća i bilja ili samo natapanjem svježih biljaka uz naknadnu ekstrakciju otapala. Te metodologije podrazumijevaju koekstraciju nefenolnih tvari, poput šećera, organskih kiselina i proteina, koje zahtijevaju naknadne procese pročišćavanja (na primjer, ekstrakcija u čvrstoj fazi, SPE). Ekstrakcija otapala, u ovisnosti o statusu biomase, može biti ekstrakcija tekućina - tekućina ili krutina - tekućina. Ekstrakcija tekućina - tekućina je operacija prijenosa mase u kojoj tekuća otopina (hrana), koja u početku sadrži jednu ili više otopljenih tvari, temeljito pomiješana s nehomogenom tekućinom (otapalo). Otapalo pokazuje afinitet ili selektivnost prema jednoj ili više komponenti u sirovini i ima različitu gustoću. Iz ovog kontakta proizlaze dvije struje: ekstrakt, koji je otopina bogata otapalom koja sadrži željeni ekstrahirani rastvor, i rafinata, rezidualnu otopinu koja sadrži malo ciljane tvari. Ekstrakcija postaje vrlo koristan alat ako se odabere pogodno otapalo za ekstrakciju. Za odvajanje fenolnih spojeva često se koristi ekstrakcija tekućina-tekućina s industrijskim tekućim nusproizvodima, kao što su oni koji proizlaze iz industrije pića. Ekstrakcija krutina – tekućina ili ispiranje može se definirati kao fenomen masenog transporta u kojem krute tvari sadržane u čvrstoj matrici migriraju u otapalu dovedenom u kontakt s

matriksom. Fenomen masenog transporta može se poboljšati promjenama koncentracija gradijenata, koeficijenta difuzije ili graničnog sloja. To je jedinična operacija koja se naširoko koristi za ekstrakciju mnogih važnih sastojaka hrane: saharoze u trski (*Saccharum officinarum*) ili repi, lipida iz uljanih sjemenki, bjelančevina u uljanim sjemenkama, fitokemikalija iz biljaka, funkcionalnih hidrokoloida iz algi i polifenolni spojevi iz biljaka, voća, povrća, itd. Poznato je da je učinkovitost ekstrakcije pod utjecajem procesa. Nekoliko čimbenika utječe na koncentraciju željenih komponenti u ekstraktu: temperatura, omjer tekućina-krutina, brzina protoka i veličina čestica.

Osim ekstrakcija etanolom i metanolom mnoštvo je drugih otapala za ekstrakciju zabilježeno u literaturi. Obično je postupak ekstrakcije sekvencijalan i sustavno oslobađa fenolne spojeve iz njihovih odgovarajućih oblika. Vezane fenolne kiseline obično se oslobađaju baznom hidrolizom, kiselinskom hidrolizom ili korištenjem oboje. Glavni korak u većini postupaka uključuje hidrolizu baze s NaOH u rasponu od 2 do 10 M, koristeći inkubaciju do 16 h, ponekad s dušikom. Nakon hidrolize baze, kiselina hidroliza ponekad se izvodi kako bi se oslobodili vezani fenoli koji nisu prethodno hidrolizirani. Hidroliza kiselinom oslobađa značajne količine galne kiseline iz crvenih malina i jagoda zajedno s značajnim količinama protokatehujične kiseline iz mrkve, svježeg kruha, crvene maline i jagode. Značajni iznosi galne i elaginske kiseline iz sjemena manga oslobađaju se kiselom hidrolizom. U drugim slučajevima (jabuka ili jabučni sok i krumpir), kiselina hidroliza bila je nepotrebna jer je hidroliza baze bila dovoljno učinkovita. Ekstrakcija superkritičnom tekućinom (SFE) mogla bi biti ekološki korisna alternativa konvencionalnoj ekstrakciji bioloških spojeva organskim otapalima. SFE metode su brze, automatizirane, selektivne su i izbjegavaju uporabu velike količine toksičnih otapala. Osim toga, nedostatak svjetla i zraka za vrijeme ekstrakcije ublažava procese razgradnje koji se mogu dogoditi tijekom tradicionalne ekstrakcijske tehnike. Ekstrakcija superkritičnom tekućinom (SFE) temelji se na činjenici da blizu kritične točke, otapalo mijenja svojstva brzo sa tek neznatnim varijacijama tlaka. Superkritične tekućine (SCFs) sve više zamjenjuju organska otapala poput n-heksana, diklorometana, kloroforma i drugih koji se konvencionalno koriste u industrijskim procesima ekstrakcije, pročišćavanja i prekrizacije zbog regulatornih i okolišnih pritisaka na ugljikovodike i tvari koje oštećuju ozon. SCF imaju otapajuće moći slične tekućim organskim otapalima, ali s većom difuznošću, nižim viskozitetom i nižom površinskom tenzijom. Kritična tekućina s najviše energije bila je nadkritični ugljični dioksid (SC – CO<sub>2</sub>),

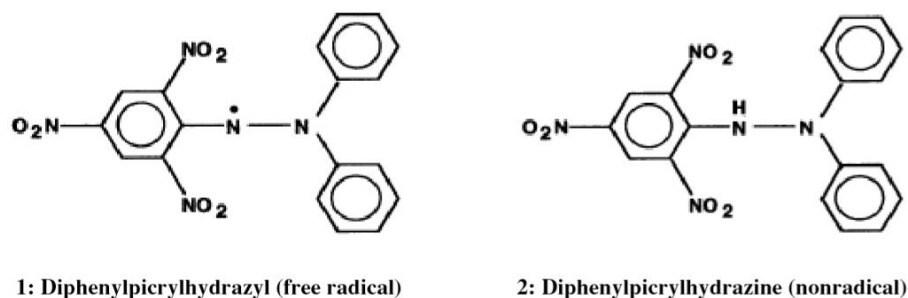
zbog svog dobroćudnog utjecaja na okoliš, male toksičnosti, nezapaljivost i kompatibilnost s obrađenim prehrambenim proizvodima. Nadalje, ima poželjne kritične uvjete, lako se odvaja od topljenih tvari i jeftin je. U prirodnim ekstrakcijama i izolacijama proizvoda, ekstrahiranje superkritične tekućine (SFE), posebno uporabom nadkritičnog CO<sub>2</sub> postaje metoda izbora. Sofisticirane moderne tehnologije to dopuštaju jer je moguća precizna regulacija promjene temperature i tlaka i na taj način manipuliranje otapajućim svojstvom SCF-a, što pomaže ekstrakciji prirodnih proizvoda širokog raspona polariteta. Dodavanjem modifikatora u SCF (poput metanola ili CO<sub>2</sub>) njegova polarnost može se mijenjati radi dobivanja selektivnijeg snažnijeg razdvajanja. Uobičajene ekstrakcije kao što su grijanje, ključanje ili refluks koriste se za ekstrakciju prirodnih fenolnih spojeva, međutim, nedostaci su gubitak polifenola uslijed ionizacije, hidrolize i oksidacije tijekom ekstrakcije, kao i dugo vrijeme ekstrakcije. Razvijene su nove tehnike za ekstrakciju hranjivih tvari iz biljaka, uključujući ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom, ekstrakciju potpomognutu mikrovalnom pećnicom, ekstrakciju nadkritične tekućine i ekstrakciju visokog hidrostatskog tlaka (HHP). Među njima je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom jeftina, jednostavna i učinkovita alternativa konvencionalnim tehnikama ekstrakcije. Ultrazvučni postupak osigurava intiman kontakt matriksa uzoraka s ekstrakcijskim otapalom. Ultrazvuk se često koristi za poboljšanje ekstrakcije lipida, proteina i fenolnih spojeva iz biljaka. Ekstrakcija fenolnih spojeva potpomognuta ultrazvukom čini se učinkovitija od ekstrakcije grijanjem, mikrovalnim potporama i enzimski potpomognute ekstrakcije. Enzimsko oslobađanje fenolnih spojeva je još jedna korisna tehnika za ekstrakciju prirodnih polifenola. Mjerene su sposobnosti tri komercijalna enzima - Ultraflo L, Viscozyme L, i  $\alpha$ -amilaza, da izazovu oslobađanje ferulinske kiseline iz stabljike batata (*Ipomoea batatas*). Brzina otpuštanja ferulinske kiseline bila je optimalna kada je korišten Ultraflo L (1,0 %) u odnosu na druge enzime, dok je Viscozyme L bio najučinkovitiji za oslobađanje vanilne kiseline i vanilina. Dakle, ti enzimi mogu biti korisni za veliku proizvodnju ferulinske kiseline i ostalih fenolnih spojeva iz stabljika batata. Visoki hidrostatski tlak (HHP) je nova metoda za poboljšanje fenomena masenog transporta. Pokazali su se veći prinosi kofeina iz kave (*Coffea arabica*) i veći udio karotenoida u pireu od rajčice kad su ekstrakciju potpomogli s visokim hidrostatskim tlakom (Ignat i sur., 2011.).

### 3.2. Metode detekcije fenolnih spojeva i njihove aktivnosti u biljkama

Oksidacija je jedan od najvažnijih procesa, koji stvara slobodne radikale u hrani, kemikalijama, pa čak i u živim sustavima, često putem Fentonovih reakcija. Fentonove reakcije predstavljaju reakcije vodik peroksida i metala u prisustvu protona gdje nastaju hidroksilni radikali i voda. U daljnjim reakcijama, hidroksilni radikal reagira s vodik peroksidom, te nastaju hidroperoksilni radikal i voda. Slobodni radikali imaju važnu ulogu u procesima kvarenja hrane, razgradnji kemijskih materijala i također doprinose nastanku više od stotinu poremećaja kod ljudi. Antioksidanti se određuju kao tvari koje čak i pri niskoj koncentraciji značajno odgađaju ili sprečavaju oksidaciju lako oksidirajućih supstrata. Primjena antioksidanata industrijski je široko rasprostranjena u svrhu sprječavanja oksidacijske razgradnje polimera, autooksidacije masti, promjene boje sintetskih i prirodnih pigmenata, itd. Posljednjih godina postoji povećan interes za upotrebu antioksidanta u medicinske svrhe (Szabo i sur., 2007.). Postoje mnoge metode detekcije fenolnih spojeva i izračuna ukupne antioksidacijske aktivnosti. U grubo su podijeljene u dvije skupine: *in vitro* metode i *in vivo* metode. Neke od *in vitro* metoda su: DPPH - aktivnost čišćenja radikala, analiza razgradnje vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ), aktivnost uklanjanja dušičnog oksida, aktivnost uklanjanja peroksnitritnih radikala, Trolox ekvivalentni antioksidativni kapacitet (TEAC) / ABTS radikalni test dekolorizacije kationa, metoda ukupnog antioksidacijskog parametra uhvaćenih radikala (TRAP), Analiza redukcije antioksidacijskih svojstava željeza (FRAP), aktivnost uklanjanja superoksidnih radikala (SOD), aktivnost uklanjanja hidroksilnih radikala, metoda sprječavanja kapaciteta hidroksilnih radikala (HORAC), metoda apsorpcije kisikovih radikala (ORAC), metoda smanjene snage (RP), metoda fosfomolibdena, metoda željeznog tiocijanata (FTC), metoda tiobarbiturne kiseline (TBA), DMPD (N, N-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorid) metoda, metoda  $\beta$ -karotenske linoleinske kiseline / ispitivanje konjugiranog diena, ksantinska oksidazna metoda, metoda bakrovog iona za smanjenje antioksidacijskih sposobnosti (CUPRAC) i aktivnost keliranja metala. Dok su *in vivo* metode slijedeće: sposobnost smanjenja sadržaja feri - željeza u plazmi, procjena smanjenog sadržaja glutathiona (GSH), procjena glutathion peroksidaze (GSHPx), glutathion-S-transferaza (GST), metoda superoksid dismutaze (SOD), Katalaza (CAT), ispitivanje aktivnosti  $\gamma$ -glutamil transpeptidaze (GGT), analiza glutathion-reduktaze (GR), analiza lipidne peroksidacije (LPO) i LDL test (Alam i sur., 2013.). U idućim poglavljima obraditi će se najkorištenije metode dokazivanja fenolnih spojeva i njihove antioksidacijske aktivnosti.

### 3.2.1. Spektrometrijske tehnike

Spektrometrijske tehnike oslanjaju se na reakciju radikala, radikalnog kationa ili kompleksa s molekulom antioksidanta koja je sposobna donirati atom vodika. DPPH metoda (2,2-difenil-1-piklorhidrazil) koristi slobodni radikal stabilan zbog delokalizacije rezervnog elektrona u cijeloj molekuli (*Slika 20*). Dakle, sadržaj DPPH se ne smanjuje spontano, kao što se događa s većinom slobodnih radikala. Delokalizacija na molekuli DPPH određuje pojavu ljubičaste boje, s apsorpcijskom trakom s maksimumom oko 520nm. Kada DPPH reagira s davateljem vodika, stvara se reducirani (molekularni) oblik DPPH, praćen nestankom ljubičaste boje. Stoga, smanjenje apsorpcije linearno ovisi o koncentraciji antioksidanata. Trolox se koristi kao standardni antioksidan (Pisoschi i Negulescu, 2012.). Rezultati dobiveni u jednoj studiji pokazuju kako interakcija potencijalnog antioksidanta s DPPH-a ovisi o njegovoj strukturnoj konformaciji. Određeni spojevi vrlo brzo reagiraju s DPPH i smanjuju broj DPPH molekula što odgovara broju dostupnih hidroksilnih skupina. Međutim, za većinu ispitivanih spojeva mehanizam je složeniji (Brand-Williams i sur., 1995.).

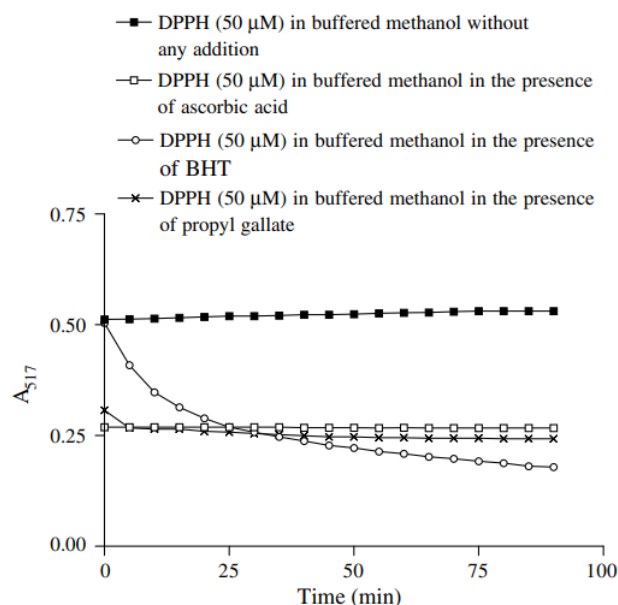


**Slika 20:** Prikaz molekule DPPH

Izvor: (Molyneux 2004.)

Provedeno je istraživanje na reakcije uklanjanja radikalne korekcije askorbinske kiseline s DPPH koja je u osnovi bila jako brza, a s druge strane, radikalna reakcija čišćenja BHT (Butilhidroksitoluen) s DPPH bila je prilično spora i apsorbanacija se nastavila smanjivati sve do razdoblja od 90 minuta promatranja. Reakcija DPPH sa propil galatom prilično je brza, ali sporija u odnosu na askorbinsku kiselinu (*Slika 21*). Radi ujednačavanja, odabran je vremenski interval od 30 minuta. Uklanjanje askorbinske kiseline, BHT i propilat galatnih radikala

rezultiralo prethodilo je mjerenju antioksidativnog kapaciteta. Važno je poštivati vremenski tijek aktivnosti uklanjanja radikala uz korištenje DPPH radikala kod ispitivanja antioksidacijskog djelovanja. Komparativna reakcija askorbinske kiseline, BHT i propil galata ukazuje da vremenski tijek inhibicije također mora biti određen. Protokol vodi računa o rasponu spektrofotometrijske osjetljivosti, osim osjetljivosti DPPH na svjetlost, pH i topljivost spoja (Sharma i Bhat, 2008.).



**Slika 21:** Vremenski tijek uklanjanja DPPH slobodnog radikala askorbinskom kiselinom, BHT i propil galatom

Izvor: (Sharma i Bhat, 2008.)

FRAP metoda je ispitivanja smanjene antioksidacijske snage željeza ili redukcije antioksidacijske moći. Princip ove metode temelji se na redukciji željezo-tripiridiltriazinskog kompleksa u njegov željezni obojeni oblik u prisutnosti antioksidanata. FRAP reagens sadržavao je 2,5 ml otopine 10 mmol / L TPTZ (2,4,6-tripirid-s-triazin, Sigma) u 40 mmol / L HCl plus 2,5 ml 20 mmol/L FeCl<sub>3</sub> i 25 ml 0,3 mol / L acetatnog pufera, pH 3,6, svježe je pripremljen i zagrijan na 37 °C. Alikvoti 40 µl supernatanta uzorka pomiješani su sa 0,2 ml destilirane vode i 1,8 ml FRAP reagensa, a apsorbancija reakcijske smjese na 593 nm izmjerena je spektrofotometrijski nakon inkubacije na 37 °C 10 min. Kao standardnu otopinu upotrijebljen je 1 mmol / L Fe<sub>5</sub>O<sub>4</sub>. Konačni rezultat izražen je koncentracijom antioksidanata koji imaju

sposobnost smanjenja fermenta jednaku koncentraciji od 1 mmol / L  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Odgovarajuća dilatacija bila je potrebna ako je izmjerena FRAP vrijednost izvan raspona standardne krivulje (Guo i sur., 2003.). FRAP metoda ovisi o smanjenju sadržaja složenih željeznih iona-TPTZ (2,4,6-tri (2-piridil) 1,3 5-triazin). Vezivanje  $\text{Fe}^{2+}$  na ligand stvara vrlo intenzivnu plavu boju. Apsorbancija se može mjeriti tako da se ispita količina smanjene koncentracije željeza i može se povezati s količinom antioksidanata. Trolox ili askorbinska kiselina korišteni su kao reference. Analiza ORAC (kapacitet apsorpcije kisikovih radikala) je metoda koja mjeri aktivnost uklanjanja antioksidanta prema peroksilnom radikalu, induciranu 2,2'-azobis-(2-amidino-propan) dihidrokloridom (AAPH), na 37 °C. Kao fluorescentna proba koristi se fluorescein. Gubitak fluorescencije je pokazatelj stupnja razgradnje, reakcije s peroksilnim radikalom. HORAC test (sposobnost sprječavanja nastanka hidroksilnih radikala) je tehnika koja se oslanja na mjerenje metal-kelirajuće aktivnosti antioksidanata, pod uvjetima reakcije slične Fentonovim reakcijama. Metoda koristi Co (II) kompleks i time se procjenjuje zaštitna sposobnost protiv stvaranja hidroksilnog radikala. Fluorescein se inkubira s uzorkom koji se analizira, zatim se dodaje Fentonova smjesa (stvarajući hidroksilne radikale). Izmjerena je početna fluorescencija, nakon čega su očitavanja izvršena svake minute nakon tresenja. Otopine galne kiseline korištene su za izradu standardne krivulje (Pisoschi i Negulescu, 2011.). Provedeno je istraživanje utjecaja ekstrakcijskog sustava na ekstraktabilnost polifenolnih spojeva i antioksidacijsko djelovanje različitih ljekovitih biljaka. Ispitani su i uspoređeni kapacitet apsorpcije radikala kisika (ORAC) i ukupni sadržaj polifenola u 25 bugarskih ljekovitih biljaka podvrgnutih ekstrakciji vodom ili 80% - noj otopini acetona. Vrsta ekstrakta značajno je utjecala na učinkovitost ekstrakcije polifenola i antioksidacijsku aktivnost. U svim slučajevima rezultati ORAC-a i ukupni sadržaj polifenola bili su viši za ekstrakciju acetonom nego za ekstrakciju vodom. Acetonski ekstrakt paprene metvice imao je najveću ORAC vrijednost - 2917  $\mu\text{mol}$  Trolox ekvivalent (TE) / g suhe mase (DW) i sadržaj polifenola - 20216 mg / 100 g DW. Za ekstrakciju vodom timijan je pokazao najveću ORAC antioksidacijsku aktivnost - 1434  $\mu\text{mol}$  TE / g DW. Utvrđena je značajna linearna povezanost između koncentracije ukupnih polifenola i ORAC u ispitivanim ljekovitim biljkama. Može se zaključiti da korišteno otapalo značajno utječe na sadržaj polifenola i antioksidacijsku aktivnost ekstrakta, pa se za bolju procjenu antioksidacijske aktivnosti prirodnih proizvoda preporučuje se uporaba više sustava ekstrakcije (Kratchanova i sur., 2010.). TRAP analiza (ukupnog antioksidacijskog



parametra za hvatanje ukupnog peroksil radikala) koristi kemiluminiscenciju koja je poboljšana luminolima kako bi se pratile reakcije peroksilnog radikala. CL signal se pokreće proizvodnjom radikala označenih luminolima, što je posljedica toplinskog raspada AAPH. TRAP vrijednost je određena na osnovu trajanja vremenskog razdoblja tijekom kojeg je uzorak ugasio signal kemiluminiscencije, zbog prisutnosti antioksidanata. Analiza inhibicije lipidne peroksidacije je postupak gdje se koristi sustav sličan Fentonovim reakcijama ( $\text{Co (II) + H}_2\text{O}_2$ ) za izazivanje peroksidacije lipida (npr. masne kiseline). PFRAP metoda (metoda smanjenja snage kalijevog ferrijanida) temelji se na povećanju apsorpcije koja se može povezati sa smanjenom sposobnošću antioksidanta / antioksidacijskih ekstrakata. Spojevi s antioksidacijskim kapacitetom reagiraju s kalijevim ferrijanidom, čime nastaje kalijev ferocijanid. Potonji reagira sa željeznim trikloridom, dajući željezni ferocijanid, kompleks plave boje, s maksimalnom apsorpcijom na 700 nm. Kod CUPRAC metode (umanjena antioksidacijska snaga bakrom) standardni antioksidanti ili ekstrakti su pomiješani s  $\text{CuSO}_4$  i neokuproinom. Nakon 30 minuta, izmjerena je apsorbanca na 450 nm. U ispitivanju se  $\text{Cu (II)}$  reducira na  $\text{Cu (I)}$  djelovanjem elektrondonacijskih antioksidansa. Rezultati su izraženi u miligramima Troloxa po litri ekstrakta. Dokazivanje fenolnih spojeva fluorimetrijom počiva na fluorescenciji. Fluorescencija je emisija svjetlost iz tvari koja je apsorbirala svjetlost ili drugo elektromagnetsko zračenje različite valne duljine. U većini slučajeva emitirana svjetlost ima veću valnu duljinu, a samim tim i nižu energiju od apsorbirane radijacije. Emisija fluorescencije nastaje kada se orbitalni elektron molekule spusti do svog osnovnog stanja, emitirajući foton svjetlosti nakon što ga neka vrsta energije pobuđuje u više kvantno stanje. Fluorescentna analiza korištena je za određivanje sadržaja antioksidanta. Za određivanje sadržaja fenolnih spojeva u uljima primijenjena je fluorescentna spektroskopija. Predlaže se metoda koja se temelji na fluorescenciji za kvantificiranje koncentracije antioksidanata butilhidroksianizola (BHA) i tert-butilhidrokinona (TBHQ) u biodizelu proizvedenom iz suncokretovih i sojinih ulja. Spektri fluorescencije i ekscitacija otopina zabilježeni su na sobnoj temperaturi pomoću spektrofluorimetra. Emisijski spektri dobiveni su pobuđenjem na oko 310 nm, a procijenjena je fluorescencija u rasponu 320-800nm. Uzorci biodizela bez BHA i TBHQ pokazali su raspon jakosti fluorescencije na oko 420 nm, što se može pripisati tokoferolima, svojstvenim biljnim uljima koja se koriste u proizvodnji biodizela. Dodavanje BHA i / ili TBHQ odgovorno je za pojavu fluorescentnog pojasa oko 330 nm. Potvrđeno je da se intenzitet fluorescencije oko 330 nm linearno povećava kao funkcija

koncentracije antioksidanata s koeficijentom korelacije oko 1, bez obzira na izvor ulja i antioksidante (Pisoschi i Negulescu, 2011.).

### 3.2.2. *Elektrokemijske tehnike*

Elektrokemijske tehnike primijenjene su i za utvrđivanje sadržaja antioksidanata i antioksidacijskog kapaciteta. Ciklička voltametrija i biamperometrija se najčešće koriste. Ciklička voltametrija je vrsta potenciodinamičkog elektrokemijskog mjerenja. U pokusima cikličke voltametrije, potencijal radne elektrode se povećava linearno u odnosu na vrijeme. U cikličkoj voltametriji, potencijal radne elektrode linearno se skenira od početne vrijednosti do krajnje vrijednosti i natrag, bilježeći odgovarajući intenzitet struje. Kada se dostigne zadana vrijednost, faza radne elektrode postaje obrnuta. Ova se inverzija može dogoditi više puta tijekom jednog eksperimenta. Struja na radnoj elektrodi je prikazana prema primijenjenom naponu dajući ciklični voltammogram. Važni parametri dobiveni iz cikličkog voltammograma su intenziteti katodnih i anodnih vrhova  $I_a$ ,  $I_c$ , potencijal anodne oksidacije ( $E_a$ ) i katodni oksidacijski potencijal ( $E_c$ ). Sve ove vrijednosti mogu se lako dobiti iz voltammograma. U slučaju reverzibilnog sustava, vrijednosti intenziteta katodnih i anodnih vrhova jednake su. Za nepovratni sustav, na voltammogramu je vidljivo samo prisustvo jednog vrha. Ciklička voltametrija (CV), koja se pokazala prikladnom metodologijom, potvrđena je za kvantitativnost antioksidacijskog kapaciteta niske molekulske mase u krvnoj plazmi, homogenatima tkiva i biljnim ekstraktima. Analizom praćenja CV-a dobivaju se vrijednosti (i) biološkog oksidacijskog potencijala,  $E$  i  $E_1 / 2$ , koje se odnose na prirodu specifičnih molekula; (ii) intenzitet ( $I_a$ ) anodne struje; i (iii) područje anodnog vala ( $S$ ). Osjetljivost metode, izražena nagibom kalibracijskog grafikona prema vitaminu C, bila je  $15.175 \mu\text{A} / \text{mM}$  askorbinske kiseline. Antioksidacijska sposobnost suhih biljnih ekstrakata (izražena u mg ekvivalenta askorbinske kiseline) određena je cikličkom voltametrijom izvedenom na staklenoj ugljičnoj radnoj elektrodi. Amperometrijska metoda uključuje mjerenje intenziteta struje koja struji između radne elektrode i referentne elektrode, uz fiksnu (primijenjenu) vrijednost potencijala. Struja nastaje oksidacijom / redukcijom elektroaktivnog analita. Vrijednost potencijala održava se na zadanoj vrijednosti u odnosu na referentnu elektrodu. Amperometrijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti temeljilo se na redukciji 2,2-difenil-1-piklorhidrazil (DPPH) na staklenoj ugljičnoj elektrodi. Svi su pokusi izvedeni u elektrohemijskoj ćeliji s tri elektrode pri 140 mV naspram  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2 \mid 3\text{M KCl}$  koristeći otopinu etanola (40 %) i 0,033 M KCl u 0,033 M

fosfatnom puferu, pH = 7,4. Linearni raspon dobiven za Trolox u 100  $\mu\text{M}$  otopini etanol vode DPPH bio je do 30  $\mu\text{M}$ , s granicom detekcije na 0,05  $\mu\text{M}$ . Razvijena metoda primjenjena je za procjenu antioksidacijske aktivnosti nekih čistih antioksidacijskih spojeva topivih u vodi ili etanolu te nekoliko uzoraka čaja, vina i nekih drugih napitaka. Jaka korelacija rezultata ( $R^2 = 0,9993$ ) izražena u ekvivalentima Troloxa dobivena je između predložene amperometrijske metode i klasične spektroskopske metode. Biamperometrijska metoda temelji se na mjerenju struje koja teče između dvije identične radne elektrode polarizirane na malu razliku potencijala i uronjene u otopinu koja sadrži reverzibilni redoks par. Indirektno biamperometrijsko mjerenje ovisi o reakciji analita s indikacijskim redoks-parom, njegovoj selektivnosti ovisno o specifičnosti reakcije koja uključuje oksidirani ili reducirani oblik redox para i analita.  $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{I}_2 / \text{I}^-$ ,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  su redox parovi koji se obično koriste u biamperometrijskim mjerenjima (Pisoschi i Negulescu, 2011.).

### 3.2.3. Metoda biosenzora

Oksidoreduktaze se najčešće koriste u biosenzorima zbog njihovih svojstava za prijenos elektrona tijekom katalize. Ovi enzimi nude prednost što su stabilniji, a u nekim situacijama ne zahtijevaju koenzime ili kofaktore. Potencijalne primjene biosenzora za procjenu antioksidacijskog statusa uključuju praćenje superoksidnog radikala ( $\text{O}_2^-$ ), nadzor dušičnog oksida (NO), nadzor glutaciona, mokraćne kiseline, askorbinske kiseline ili fenolnih spojeve. Izgrađen je biosenzor na bazi ugljikove paste za elektrokatalitičku procjenu ukupnog antioksidacijskog kapaciteta. Metoda se temeljila na djelomičnom oštećenju DNA sloja adsorbiranog na površini elektrode OH radikalima, generiranim Fentonovom reakcijom i naknadnom elektrokemijskom oksidacijom netaknutih adeninskih baza, da bi se stvorio produkt oksidacije koji je mogao katalizirati oksidaciju NADH. Prisutnost antioksidacijskih spojeva uklonila je hidroksilne radikale, ostavljajući više monoksida adeninskih molekula, na taj način povećavajući elektrokatalitičku struju NADH izmjerenu diferencijalnom pulsnom voltametrijom. Korištenjem askorbinske kiseline kao referentne antioksidacijske molekule, bilo je moguće otkrivanje količine na razini 50 nM askorbinske kiseline u vodenoj otopini (Pisoschi i Negulescu, 2011.).

#### 3.2.4. Kromatografske metode

Sadržaj fenolnih spojeva u biljnom materijalu može se odrediti korištenjem nekoliko metoda odvajanja: visoko učinkovita tekuća kromatografija (HPLC), plinska kromatografija (GC), elektroforeza kapilarne zone (CZE), itd., kao skup pojedinačnih spojeva ili pomoću specifičnih kemijskih reakcija kao skupina kemijski sličnih reaktivnih spojeva. Kromatografsko određivanje vrlo je precizno i točno s visokom informativnom vrijednošću, ali je vrlo problematično identificirati sve fenolne spojeve u određenom biljnom materijalu u prihvatljivim vremenskim i troškovnim okvirima. Određivanje antioksidacijske aktivnosti pomoću HPLC-a eksperimentalno je složenije u odnosu na druge metode. Općenito, potrebno je analizirati nekoliko uzoraka jer sadržaj fenolnih tvari može varirati u različitim sortama. Osim toga, na sadržaj fenolnih tvari utječe veliki broj vanjskih čimbenika poput agrotehničkih procesa, klimatskih uvjeta i zrelosti tijekom žetve, manipulacije nakon žetve i vrijeme konzumiranja. Trenutno se mogu dobiti dovoljni podaci za procjenu sadržaja ukupnih fenolnih spojeva i ukupne antioksidacijske aktivnosti kao kriterija hranjive vrijednosti biljnih namirnica pomoću spektrofotometrijskih mjerenja koja koriste posebne analitičke reagense. Precizno određivanje antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakata i dalje je neriješen problem. Koristi se oko 20 analitičkih metoda poput primjene različitih reagensa, sastava reakcijske smjese, standarda, analitičkih procjena i drugih. Točna usporedba rezultata i njihova opća interpretacija praktički su nemogući zbog varijabilnosti eksperimentalnih uvjeta i razlika u fizikalno-kemijskim svojstvima oksidirajućih supstanci. Nadalje, antioksidacijsko djelovanje tvari u namirnicama i drugim biološkim sustavima ovisi o primijenjenom ispitnom sustavu (metodi) i supstratu koji bi trebao biti zaštićen antioksidacijskom tvari (Stratil i sur., 2006.). Kromatografske metode često su primjenjivane za razdvajanje i otkrivanje antioksidanata, a prije su korištene spektrofotometrijske ili elektrokemijske procjene ukupnog antioksidacijskog kapaciteta. Plinska kromatografija (GC) uobičajena je vrsta kromatografije koja se koristi za odvajanje i analizu spojeva koji mogu ispariti bez raspadanja. Postupak razdvajanja spojeva u smjesi se izvodi između tekuće stacionarne faze i pokretne faze plina. Pokretna faza je obično inertni plin poput helija ili nereaktivnog plina, poput dušika. Stacionarna faza je mikroskopski sloj tekućine ili polimera na inertnom čvrstom nosaču. Usporedba retencijskih vremena je ono što GC-u daje analitičku korisnost. Najčešći detektori su plameni ionizacijski detektor i detektor toplinske vodljivosti. HPLC (tekućinska kromatografija visokih performansi) obično koristi različite vrste

stacionarnih faza, pumpu koja pomiče pokretne faze i analizira kroz kolonu, te detektor za osiguravanje karakterističnog vremena zadržavanja analita. Detektor (obično detektorski niz dioda) također može pružiti dodatne informacije koje se odnose na analit. Crpka osigurava povišen tlak potreban za pomicanje pokretne faze i analiziranje kroz gusto nabijenu kolonu. Povećana gustoća proizlazi iz manjih veličina čestica. To omogućava bolje odvajanje na kraćim kolonama i osigurava veću brzinu. Normalno-fazna HPLC koristi polarnu stacionarnu fazu i nepolarnu, nevodnu pokretnu fazu i djeluje učinkovito na odvajanje analita lako topljivih u nepolarnim otapalima. HPLC s reverznom fazom ima nepolarnu stacionarnu fazu i vodenu, umjereno polarnu pokretnu fazu. Jedna uobičajena stacionarna faza je silicij koji je tretiran s  $\text{RMe}_2\text{SiCl}$ , gdje je R ravnolančana alkilna grupa poput  $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$  ili  $\text{C}_8\text{H}_{17}$ . S ovim stacionarnim fazama, vrijeme zadržavanja je duže za molekule koje su manje polarne, dok polarne molekule lakše protječu. Antioksidacijska aktivnost određuje se pomoću HPLC sustava s on-line podkolonom za detekciju antioksidanata i zasnovana je na djelovanju uklanjanja radikala na 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonične kiseline. Metoda je primijenjena za određivanje sadržaja antioksidanata u kavi. Nakon odvajanja uzoraka kave na HPLC koloni, eluat se usmjeri na detektor PDA (fotodiodni niz), a zatim se pomiješa sa stabiliziranom otopinom kationskog radikala ABTS i otopina se usmjeri u detektor koji nadzire apsorbanciju na 720 nm. ABTS kationska otopina ima tamno plavu boju, a svako gašenje radikala rezultira gubitkom boje naznačenim negativnim vrhom krivulje na HPLC grafu. Dodani su antioksidacijski dodaci pojedinačnih HPLC pikova da bi se izračunala ukupna antioksidacijska aktivnost koja je dobivena preko HPLC-a. Ukupni antioksidacijski kapacitet zelene kave određen on-line sustavom HPLC bio je  $760 \pm 2,5 \mu\text{mol Trolox} / \text{l}$  i  $984 \pm 25,8 \mu\text{mol Trolox} / \text{l}$  za prženu kavu (Pisoschi i Negulescu, 2011.). Zaključno, čimbenici koji utječu na oksidacijske reakcije i antioksidacijske aktivnosti u hrani i *in vitro* metode se razlikuju. U *in vitro* testovima mogu se rangirati antioksidacijske aktivnosti samo u odnosu na njihov specifični sustav reakcija i njihovu relevantnost kod *in vivo* zdravstvene zaštite. Stoga je preporuka da se koristi više od jedne metode ispitivanja antioksidanta za mjerenje antioksidacijskih aktivnosti, te treba uključiti barem jedno ispitivanje koje ima biološki značaj (Badarinath i sur., 2014.). Identifikacija glikozidnih konjugata izoflavona iz nekoliko sojinih proizvoda provedena je HPLC-masenom spektrometrijom. Spektri pozitivnih ionskih masa dobiveni uporabom kemijske ionizacije atmosferskim nebulizatorom tlaka dali su najosjetljivije i strukturno korisne informacije o

svakoj konjugaciji izoflavona. Iako je ekstrakcija izoflavona iz sojinih proizvoda s 80 % otopinom metanola na sobnoj temperaturi bila jednako učinkovita kao i na 60-80 °C, ekstrakcija na višim temperaturama uzrokovala je promjene u sastavu izoflavona i treba ju izbjegavati (Barnes i sur., 1994.). Primjenjena je metoda HPLC-masene spektrometrije (HPLC-MSn) za brzu i rutinsku analizu više od 30 fenola u čaju. Infuzije zelenog i crnog čaja ubrizgavaju se direktno u HPLC kolonu reverzne faze, a fenoli eluiraju koristeći dva različita gradijenta pokretne faze, od kojih je jedan optimiziran za otapanje katehinskih derivata, a drugi, flavonola i teaflavina. Spojevi, identificirani na temelju njihovog vremena zadržavanja, apsorpcijskog spektra i MS fragmentacijskog obrasca, uključuju (+) - katehin, (-) - epikatehin, te flavin i njihove različite derivate galata, kvercetina i kaempferol mono-, di- i triglikozida, kvininske kiseline, galne kiseline i hidroksicinnamata te purinskih alkaloida, kofeina i teobromina (Del Rio i sur., 2004.). Istražena je ekstrakcija za krute faze (SPE) razvojem metode koja se temelji na predviđanju podataka o zadržavanju u HPLC-u ili parametara solvacije kako bi se odredili glavni parametri bilo kojeg niza (vrsta i količina sorbenta, količina uzorka koja se može primijeniti bez gubitka, sastava i volumena otopina za pročišćavanje, sastav i volumen otopine desorpcije). Dobivanje ekstrakata bez šuma u matriksu provodi se u nekoliko koraka: prvi korak (kada je to moguće) predstavlja razvoj SPE postupka. Preispituju se nove selektivne faze poput miješanih modusa s ograničenim modulom i sorbentima s ograničenim pristupom ili fazama u nastajanju, kao što su imunosorbenti ili molekularno utisnuti polimeri. Opisana je selektivnost kombinacijom dva sorbenata s upotrebom otopine s ionskim izmjenjivačem ili ionima. Posebna se pažnja posvećuje potpunoj automatizaciji SPE sekvence s on-line spajanjem s tekućom kromatografijom, a zatim s različitim načinima detekcije. Ovo predstavlja brz, moderan i pouzdan pristup analizi spojeva u tragovima (Hennion 1999.). U istraživanju, za analizu podataka HPLC korišten je BORWIN kromatografski sustav. Kromatografsko odvajanje izvedeno je korištenjem Phenomenex C18 kolone s reverznom fazom (Phenomenex, 4.6u250 mm, 5 µm) pri 25 °C, praćeno na 340 nm. Sustav linearnog gradijenta s otapalom sastojao se od 75 % otapala A i 25 % B otapala, izmjenjenog s 0 % otapala A i 100 % B otapala, s protočnim protokom od 0,5 ml / min, a trajanje je bilo 60 min [otapalo A: 0,5 % fosforne kiseline u vodi; otapalo B: 100 % metanol]. Za pripremu stok otopina, ekstrakti deset flavonoida i kaempferol kao unutarnji standard otopljeni su u 100 % MeOH u koncentraciji od 4 mg/mL,

odnosno 2 mg / mL, filtrirani kroz centrifugalni filterski uređaj (0,45 Pm, Millipore Co., Bedford, MA, SAD). Volumen ubrizgavanja bio je 10 µL (Jeong i sur., 2008.).

### 3.2.5. Komparacije različitih metoda

Istraživanjem su utvrđene razlike između ORAC i FRAP metoda. Istraživanje je provedeno na ukupno 927 uzoraka smrznutog povrća, uključujući 111 bijelog kupusa, 59 mrkve, 51 graha, 57 cvjetače, 33 bijelog luka, 48 ljubičastog luka, 130 brokule, 169 rajčice, 25 repe, 88 graška, 88 špinata, 18 crvenih paprika i 50 zelenih paprika analizirani su korištenjem metoda ORAC i FRAP. Podaci pokazuju da vrijednosti povrća ORAC i FRAP ne ovise samo o vrstama već i o zemljopisnom podrijetlu i vremenu berbe (*Slika 22*). Dvije metode ispitivanja antioksidanata, ORAC i FRAP, također daju različite trendove antioksidacijskih aktivnosti. Razlika se može objasniti na temelju načela kemije na kojima počivaju ove metode, a zaključeno je da je ORAC metoda kemijski relevantnija za aktivnost antioksidanta koji razbijaju lanac, dok FRAP ima neke nedostatke poput šuma, ujednačavanja kinetike reakcije i kvantifikacije. Na temelju rezultata ORAC-a, zeleni papar, špinat, ljubičasti luk, brokula, repa i karfiol vodeći su izvori antioksidacijskih djelovanja protiv peroksilnih radikala (Ou i sur., 2002.).

species	sample size	ORAC					FRAP				
		max	min	median	mean	SD	max	min	median	mean	SD
pea	88	29	12	18	19	3	10	4	5	6	1
carrot	59	99	25	57	60	15	48	18	25	31	7
white cabbage	111	146	23	60	61	21	125	13	38	39	17
tomato	169	112	33	66	67	13	83	40	54	56	8
snap bean	51	223	42	70	79	37	58	12	15	20	13
white onion	33	146	55	78	85	23	27	10	16	17	4
red pepper	18	161	73	86	97	43	261	123	183	185	49
cauliflower	57	152	62	91	102	28	83	36	59	61	12
beet	25	165	30	120	115	36	120	12	96	86	29
broccoli	130	208	23	132	126	42	71	16	42	41	11
purple onion	48	237	50	153	143	46	52	6	33	31	11
spinach	88	234	103	148	152	26	94	43	58	64	13
green pepper	50	300	54	160	154	60	251	161	53	157	58

**Slika 22:** ORAC i FRAP vrijednosti povrća (µmol TE / g)

Izvor: (Ou i sur., 2002.)

U istraživanju su analizirane infuzije čaja za mjerenje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (TAC) pomoću ORAC, DPPH, analize ukupnog polifenolnog sadržaja kolorimetrijskom metodom i pojedinačnog sadržaja katehina HPLC-om. Četiri glavna čajna katehina analizirana

su za TAC kako bi se utvrdilo različito antioksidativno djelovanje čajnih infuzija. Koeficijenti korelacije između DPPH-a i ukupnog sadržaja polifenola ili ukupnog sadržaja katehina u čajnim infuzijama bili su 1,0 i 0,99. Međutim, vrijednosti padaju na 0,73, odnosno 0,69, dok je ORAC aktivnost bila u korelaciji s ukupnim sadržajem polifenola i ukupnim sadržajem katehina. Utvrđivanjem TAC-a pojedinih čajnih katehina pokazalo se da je ORAC epikatehin u sedam puta većoj količini od epigalokatehin galata; dok je epigalokatehin galat pokazao je značajno ( $P < 0,05$ ) jaču DPPH aktivnost u odnosu na epikatehin. Procjenjujući odnos strukturne aktivnosti, ovo je istraživanje otkrilo da supstitucija OH na položaju 3 u pirogalološkim komponentama doprinosi nižoj ORAC vrijednosti epigalokatehina i epigalokatehin-galata u usporedbi s njihovim ne-3-OH srodnicima, kao što su epikatehin i epikatehin galat. Također je broj supstitucija OH bio slabo povezan s promatranom ORAC vrijednošću za razliku od DPPH. Sveukupno, rezultati ovog istraživanja pokazuju da tvari koje imaju nižu vrijednost TAC-a u ORAC testu u usporedbi s onim u DPPH ispitivanjima mogu imati učinak na pro-oksidaciju stvaranjem reaktivnih kisikovih vrsta u vodenom puferu, pri fiziološkom pH. Također, moguće je zaključiti da su tvari koje pokazuju nižu vrijednost TAC-a u testu ORAC u usporedbi s onim u DPPH ispitivanju snažni pro-oksidanti u usporedbi s tvarima koje pokazuju veću vrijednost TAC-a u ORAC testu od one u DPPH testu. U ovom istraživanju dokazano je da se često zanemaruje činjenice u istraživanju hranjivih sastojaka radi ispitivanja *in vitro* antioksidacijske aktivnosti, koja može značajno varirati ovisno o ispitivanju koje se koristi, jer različiti testovi mjere različite kemijske reakcije / aktivnosti. Također, testovi *in vitro* antioksidanata vrlo su različiti i ne mogu se međusobno uspoređivati, ali ih treba koristiti neovisno. Tijekom ispitivanja različitog antioksidacijskog ponašanja infuzije zelenog čaja i glavnih katehina, ova je studija potvrdila hipotezu da u biološkom okruženju vodotopljivi spoj koji ima veću ORAC vrijednost od DPPH može pokazati manji pro-oksidacijski učinak u usporedbi sa spojem koji ima nižu ORAC vrijednost od DPPH. Ovdje predlažemo da katehini koji imaju pirogalolsku strukturu u B prstenu stvaraju reaktivne intermedijente / radikale i reagiraju s AAPH. Nastali reaktivni intermedijenti reagiraju na fluorescenciju i smanjuju fluorescentni intenzitet diskretno s napadom peroksilnog radikala generiranog AAPH, što rezultira nižom vrijednosti TAC. S druge strane, smanjivanje sadržaja DPPH (DPPH-H) smatra se stabilnim, zbog čega je sposobnost uklanjanja radikala povezana sa omjerom TC (ukupni katehini) / TP (ukupni fenoli) (Roy i sur., 2010.). Analize ORAC i TEAC uspoređene su za procjenu ukupnog antioksidacijskog



kapaciteta (TAC) soka od naranče, mlijeka i miješavina narančinog soka i mlijeka. Kada se uz ovaj napitak koristila metoda TEAC, porast koncentracije soka od naranče odgovarao je porastu TAC-a, ali povećanje postotka mlijeka nije povećao vrijednosti TAC-a. Kad se primijenila metoda ORAC, vidjelo se da povećavanje koncentracije soka ili mlijeka odgovara većem antioksidacijskom kapacitetu. Također je napravljena procjena utjecaja određenih spojeva (askorbinske kiseline, galne kiseline,  $\beta$ -karotena, luteina, zeaksantina i albumina) koji su bili prisutni u ispitivanim uzorcima na antioksidacijski kapacitet. Iako je TEAC metoda jednostavnija i jeftinija od metode ORAC, daje rezultate manjeg antioksidacijskog kapaciteta hrane ili pića složenijeg kemijskog sastava (Zulueta i sur., 2009.). Antioksidacijske aktivnosti izmjerene u ekstraktu metanola dobivene korištenjem ABTS, DPPH, FRAP i ORAC analiza jednog ekstrakta izmjerene su tri puta radi utvrđivanja ponovljivosti ispitivanja. DPPH i FRAP testovi nisu pokazale razlike između određivanja, dok su se ABTS i ORAC testovi razlikovali u različitim ciklusima (*Slika 23*). Sva ispitivanja, međutim, nisu imala interakciju genotipa u vremenu, što ukazuje da su sve tehnike dale usporedni rang antioksidacijskog djelovanja među replikacijama unutar svakog vremena određivanja. Zbog toga se DPPH i FRAP testovi mogu koristiti za određivanje antioksidacijske aktivnosti u guavi jer su oboje metode pokazale veliku ponovljivost. Radni uzorci DPPH, FRAP i ORAC korišteni su odmah nakon priprema dok ABTS treba držati u tami 12 h da bi se stvorili slobodni radikali iz soli ABTS, te zatim koristiti unutar 4 h. Budući da radni uzorak ABTS nije uvijek iste dobi, aktivnost reakcijske smjese s guavinim ekstraktima mogao bi biti drugačiji u vremenu određivanja. ORAC ploča s 96 mjesta (KC4, Bio Tek, SAD) korištena je u jednom istraživanju. Vrijednost očitavanja bila je veća na vrhu od one na dnu i također s lijeve strane na desnu stranu. Manji koeficijent varijance (CV) dobiva se korištenjem ploče s 48 mjesta u odnosu na format od 96 mjesta. Format 48 ploče imale su CV oko 50 % CV-a podataka generiranih u pločici s 96 mjesta. Dakle povećan broj mjesta gdje su uzorci na ploči inducirao je povećanu stopu pogreške u testovima. U smislu troškova i vremena izvođenja ovih metoda, glavni nedostatak ORAC tehnike je taj što zahtijeva upotrebu skupe opreme, dok je za ostale tri metode potreban jednostavniji aparat i spektrofotometar koji je uobičajen u većini laboratorija. Još jedna prednost ABTS-a i FRAP metoda je u tome što su ekstrakti brzo reagirali s ABTS (2 h) ili željeznim ionom (30 min), dok je DPPH reakcija trajala mnogo duže (24 h) (Thaipong i sur., 2006.).

Source	df	MS	<i>P</i>
<b>ABTS</b>			
Guava	3	410.95	<0.01
Repeatability	2	82.69	<0.01
Guava × Repeatability	6	11.73	0.27
Error	24	8.68	
<b>DPPH</b>			
Guava	3	393.37	<0.01
Repeatability	2	13.76	0.32
Guava × Repeatability	6	8.95	0.65
Error	24	12.76	
<b>FRAP</b>			
Guava	3	554.81	<0.01
Repeatability	2	2.35	0.45
Guava × Repeatability	6	0.81	0.94
Error	24	2.87	
<b>ORAC</b>			
Guava	3	85.54	<0.01
Repeatability	2	75.67	<0.01
Guava × Repeatability	6	4.56	0.56
Error	24	5.52	

**Slika 23:** ANOVA za antioksidacijsko djelovanje kod četiri vrste guavinih genotipova u tri određivanja ekstrakta metanola pomoću ABTS, DPPH, FRAP i ORAC metoda

Izvor: (Thaipong i sur., 2006.)

#### **4. UKUPAN SADRŽAJ FENOLA I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST U PŠENICI (*Triticum aestivum L.*) I SOJI (*Glycine max L.*)**

Žitarice i mahunarke važne su u ljudskoj prehrani u cijelom svijetu. Bogate su različitim hranjivim tvarima i fitokemikalijama. Nedavna istraživanja pokazuju da klijanje može dodatno povećati hranjivu vrijednost zrna, povećanjem sadržaja slobodnih aminokiselina, jednostavnih šećera, organskih kiselina i bioaktivnih spojeva. Proklijala zrna pokazuju visoku bioaktivnost, poput antioksidacijskih, antidijabetskih i antikancerogenih aktivnosti. Stoga je klijanje izvrsna strategija inženjeringa hrane za poboljšanje prehrambene vrijednosti žitarica. Postoji značajna varijabilnost ukupnog fenolnog sadržaja (TPC) u različitim prokljalim zrnima, a klijanje značajno nakuplja TPC u prokljalim zrnima, u usporedbi sa sirovim zrnima. Općenito, klijanje povećava topljivi TPC u većini zrna. Međutim, nekoliko studija također je prijavilo pad topivog sadržaja TPC kod nekih prokljalih žitarica, kao što su prokljali mung, zrno soje, leća (*Lens culinaris*) i crni grah. To može biti dijelom posljedica izražavanja rezultata na osnovi vlažnog uzorka, budući da se sadržaj vode postupno povećava tijekom klijanja, značajno utječući na udio TPC-a u masi prokljalih zrna. Povezani fenoli nisu toliko temeljito istraženi kao topivi fenoli u prokljalim zrnima, iako neka prokljalia i sirova zrna sadrže visoku razinu vezanog TPC-a. Pored toga, nekoliko studija navodi da se vezani TPC nekih prokljalih zrna prvo smanjuje, a zatim povećava tijekom klijanja, međutim također je utvrđeno za vezani TPC, da se kontinuirano povećava u nekoliko drugih prokljalih žitarica, poput prokljale smeđe riže i prokljale smeđe pšenice. Pretpostavlja se da sadržaj vezanog TPC-a ovisi o brzini oslobađanja i konjugacije vezanih fenolnih spojeva. Tijekom rane faze klijanja, vezani fenolni spojevi mogu se osloboditi iz kompleksa stanične stijenke zbog degradacije njihovih konjugatora, poput ugljikohidrata i proteina. S porastom vremena klijanja, razmnožava se više novih biljnih stanica, formirajući više novih staničnih stijenki. Zbog toga je potrebno izlučiti i konjugirati više topljivih fenolnih spojeva da bi se uspostavile nove stanične stijenke, a vezani fenolni spojevi se na taj način povećavaju. Općenito, vezani fenoli sudjeluju u dinamičnom procesu, pa brzina njihovog otpuštanja i konjugacije može biti različita u različitim prokljalim zrnima. Štoviše, nedavna istraživanja sugeriraju da prokljale žitarice i mahunarke mogu imati različite uzorke topljivih i vezanih koncentracija TPC-a. Izgleda da prokljale žitarice sadrže veći postotak TPC-a u vezanim ekstraktima u usporedbi s topivim, dok je kod mahunarki suprotno. U prokljaljoj crnoj

pšenici TPC u vezanim ekstraktima veći je nego u topljivim ekstraktima nakon klijanja tijekom 6 do 8 dana, dok je u 12 naklijalih mahunarki općenito TPC u topljivim ekstraktima mnogo viši od onog u vezanim ekstraktima nakon klijanja tijekom 1 do 5 dana. Ovaj se fenomen može dijelom povezati s genetskom pozadinom različitih sjemenki žitarica i mahunarki, vremenom klijanja i metodama ekstrakcije polifenola (Gan i sur.,2019.). Sjeme žitarica je organ za skladištenje koji sadrži bjelančevine, ugljikohidrate, vitamine, minerale i ulja koja su potrebna za metaboličku aktivnost, rast i razvoj nove biljke. Proklijalo sjeme žitarica i mlada trava žitarica dobivaju sve veću pozornost kao funkcionalna hrana zbog čimbenika koji djeluju na zdravlje i povećanom udjelu hranjivih vrijednosti, uključujući aminokiseline, vlakna, elemente u tragovima, vitamine, flavonoide i fenolne kiseline. Žitarice (1–2 tjedna starosti), nazivaju se mikro zelenilom i sve se više koriste kao prirodni zdravstveni dodaci u obliku svježih proizvoda, tableta, smrznutog soka i praha (Niroula i sur., 2019.). Izbojci pšenice nazivaju se pšeničnom travom. Pšenična trava, mlada travnata biljka pšenice, konzumira se svježa kao sok i / ili osušena i smljevena u prah za životinjsku i ljudsku upotrebu. Različiti aspekti travnih žitarica koje se odnose na ishranu i rast su žitarice visoke kvalitete dobivene na specifičnim tlima, a njihov prehrambeni profil varira s fazama rasta. Smatra se da sok pšenične trave ima najveće terapijske kvalitete kada je svjež, pa se preporučuje konzumiranje odmah nakon ekstrakcije (Ghumman i sur., 2017.). Proizvodnja sekundarnih metabolita i obrambenih sustava protiv antioksidanata može se aktivirati kao odgovor na ultraljubičasto-B (UV-B). Istraženi su učinci UV-B zračenja na sadržaj fenolnih kiselina, antioksidacijsko djelovanje i fiziološke promjene u klijanjima pšenice. Rezultati su pokazali da se slobodni, vezani i ukupni fenolni sadržaji i antioksidativne aktivnosti značajno povećavaju u klijanjima pšenice nakon izlaganja UV-B zračenju od trećeg i četvrtog dana. UV-B zračenje  $20\mu\text{W}/\text{cm}^2$  dovelo je do najvećeg nakupljanja fenola. Ukupne fenolne DPPH i ABTS vrijednosti značajno su porasle za 26,3 %, 25,1 % i 12,0 %, na 4. dan u odnosu na neozračene sadnice pšenice. Učinak zračenja primijećen je i na respiratorno djelovanje i aktivnost fenilalanin-amonijak-liaze. Pojačano UV-B zračenje pojačalo je peroksidaciju lipida u klijanjima pšenice i promijenilo aktivnosti antioksidacijskih enzima koji su uključeni u uklanjanje reaktivnih kisikovih vrsta. Aktivnosti superoksid dismutaze, peroksidaze i katalaze smanjile su se, dok se aktivnost askorbat peroksidaze povećavala s pojačanim intenzitetom UV-B zračenja. Istraživanje pokazuje da bi se sadnice pšenice mogle koristiti kao sastojak funkcionalne hrane nakon umjerenog UV-B zračenja (Chen i sur., 2019.).

Antioksidacijsko djelovanje ekstrakta pšenične trave primijećeno je na različitim razinama zaštite, poput uklanjanja primarnih i sekundarnih radikala i inhibicije oštećenja membrane izazvane slobodnim radikalima. To se može objasniti na temelju kemijskog sastava ekstrakata. Pokazano je da ti ekstrakti sadrže značajne količine fenolnih spojeva, uključujući flavonoide. Dokazano je da su tijekom klijanja neki biološki aktivni spojevi sintetizirani u klici pšenice. Klice pšenice dostižu maksimalan antioksidativni potencijal nakon 7 dana rasta. Otkriveno je da pšenična trava ima terapijska svojstva kod bolesti kao što su ulcerozni kolitis i talasemija major. Utvrđeno je da su ekstrakti pšeničnih klica antimutageni u Ames testu i sposobni su inhibirati oksidativno oštećenje DNK, te su odgovorni za metaboličku deaktivaciju karcinogena. Vodeni ekstrakti pšenične trave dobar su izvor antioksidanata. Istraživanje pokazuje da nisu utvrđene velike razlike u ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti u različitim uvjetima rasta, te su pšenične klice pokazale približno sličnu količinu antioksidacijske aktivnosti (Kulkarni i sur., 2006.). Novo istraživanje provedeno je kako bi se procijenili učinci biofortifikacije selenom na bioaktivne spojeve i antioksidacijske aktivnosti ekstrakta pšenične trave koji se uzgaja u hidroponskom sustavu u kontroliranim uvjetima temperature, svjetlosti i vlage tijekom 10 dana. Dodavanje Se 0,125 mg Se/L rezultiralo je najvećim antioksidantom (DPPH i SOD) aktivnosti. Uz to, tretman Se 0,22 mg/L maksimizirao je sadržaj fenolnih kiselina i antocijana, što je rezultiralo najvišim sadržajem antioksidanata (ABTS). Najviši sadržaj flavonoida i vitamina C zabilježen je u skupini tretiranoj sa 0,50 mg/L Se. Se-biofortifikacija pšenične trave je prikladna i učinkovita metoda za povećanje unosa Se u prehrani kako bismo iskoristili povezane zdravstvene prednosti. Ova otkrića mogu biti korisna za industrijsku proizvodnju ekstrakata iz pšenične trave za razvoj novih proizvoda (Islam i sur., 2020.). Antioksidacijsko djelovanje soka od pšenične trave uspoređeno je sa standardnim lijekom - askorbinskom kiselinom. Sok pšenične trave ima značajno više antioksidacijsko djelovanje uspoređeno sa askorbinskom kiselinom. Korištene su dvije metode za procjenu antioksidacijskih svojstava soka pšenične trave (DPPH) i određivanje smanjene snage. Mjerenja uzoraka pšenične trave (praškastog sušenog soka) potvrdila su prisutnost klorofila za koji se vjeruje da je farmakološki aktivna komponenta pšenične trave kao i antidijabetskog sredstva (Ashok 2011.). Konzumiranje mahunarki potencijalno umanjuje rizik od kroničnih bolesti, poput moždanog udara, tip II dijabetesa, kardiovaskularnih i gastrointestinalnih karcinoma. Osim vlakana, zrna mahunarki također sadrže mnogo tvari za poboljšanje zdravlja, poput vitamina, minerala i drugih tvari,

uključujući fenolne spojeve. Fenolni spojevi otporni su na oksidaciju i štite stanice od oštećenja, te na taj način smanjuju rizik od degenerativnih bolesti zahvaljujući antioksidacijskim, protuupalnim, antialergijskim i antikancerogenim svojstvima. Razne studije dokazale su kako dolazi do dramatičnih promjena sadržaja korisnih tvari koje su prilikom klijanja zrna. U tom se procesu aktiviraju endoenzimi hidrolizirati, makro molekule uključujući škrob, proteini i lipidi kako bi se stvorili prehrambeni elementi biljnog razvoja. Ispitano je šest vrsta mahunarki kako bi se utvrdila ukupna količina fenolnih spojeva i njihova antioksidacijska aktivnost. Antioksidacijske aktivnosti klijavih mahunarki procijenjene su metodom DPPH i testom smanjene snage (Slika 24). Utvrđeno je da se šest ekstrakta mahunarki razlikovalo u razini antioksidacijske aktivnosti, kikiriki je imao najveći antioksidacijsku aktivnost sa 32,51 %, što se značajno razlikovalo od ostalih ispitivanih vrsta ( $p < 0,05$ ), dok je crni grah pokazao najnižu antioksidacijsku aktivnost (7,44 %). Maksimalna smanjujuća snaga utvrđena je kod naklijanog kikirikija (84,48 %) u usporedbi s ostalim ispitivanim mahunarkama, dok je najmanja antioksidacijska aktivnost bila u mung grahu (26,45 %). Iako je crveni grah imao veću aktivnost DPPH-a u odnosu na crni grah i bijeli mletački grah, test smanjenje snage crvenog graha pokazao je, nasuprot tome, značajno niže vrijednosti od crnog graha i bijelog mletačkog graha (Khang i sur., 2016.).

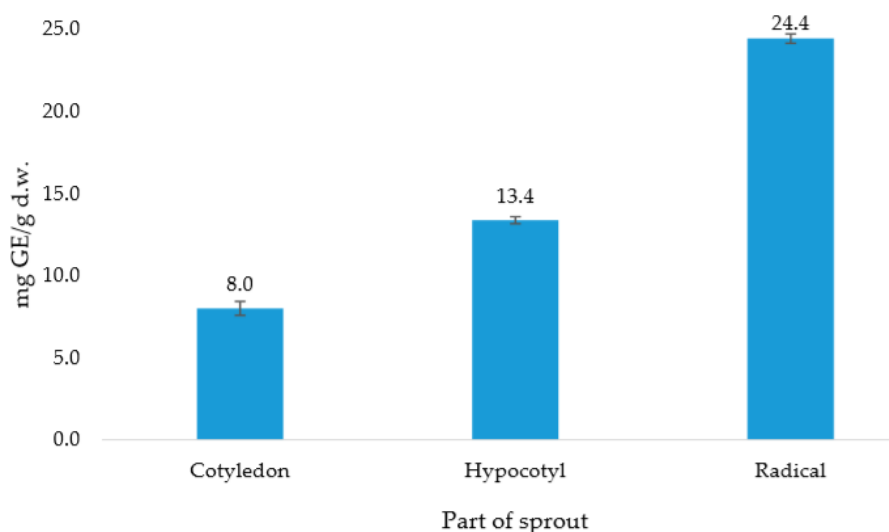
Sample	DPPH• Scavenging (%)	Reducing Power (%)
Black beans	7.44 ± 0.39 <sup>f</sup>	64.92 ± 0.57 <sup>c</sup>
Mung beans	17.46 ± 0.60 <sup>d</sup>	26.45 ± 0.95 <sup>f</sup>
Peanuts	32.51 ± 0.54 <sup>a</sup>	84.48 ± 1.24 <sup>a</sup>
Adzuki beans	20.80 ± 0.39 <sup>c</sup>	42.51 ± 1.24 <sup>e</sup>
Soybeans	26.94 ± 0.71 <sup>b</sup>	75.08 ± 1.18 <sup>b</sup>
White cowpeas	11.17 ± 0.63 <sup>e</sup>	61.53 ± 0.68 <sup>d</sup>

**Slika 24:** Antioksidacijsko djelovanje petodnevnih ekstrakata mahunarki

Izvor: (Khang i sur., 2016.)

Nedavno istraživanje imalo je za cilj optimizirati ukupni sadržaj polifenola (TPC) ekstrahiranog iz praha klice soje pod različitim eksperimentalnim parametrima, uključujući koncentraciju etanola (60–100 % v/v), temperaturu ekstrakcije (40–80 °C), vrijeme ekstrakcije (15 – 150 min), omjer analita : otapala (1: 4 – 1: 10 g/ml), broj ciklusa ekstrakcije (1, 2 i 3 puta), starost klice

(0–7 dana) i korišteni dio klice (kotiledon, hipokotil ili radikula). Dobiveni rezultati korišteni su u metodologiji površinske reakcije za modeliranje ukupnog sadržaja polifenola (TPC) s obzirom na tri varijable, uključujući koncentraciju etanola, temperaturu ekstrakcije i omjer materijala : otapala. Eksperimentalni uvjeti za optimalni prinos TPC-a sastojali su se od koncentracije etanola od 88 %, temperature ekstrakcije 59 °C, odnosa analit : otapalo 1: 6,5 g/ml, vrijeme ekstrakcije 60 min i 2 ciklusa maceracije. Pored toga, za maksimalni TPC, klijanci bi trebali klijati 5 dana i treba koristiti frakciju čestica. Na temelju predloženih optimalnih uvjeta, dobiveni TPC bio je 19,801 mg genisteina (GE)/g suhe tvari (DW). Dobiveni osušeni ekstrakt također je pokazao nisku antioksidacijsku aktivnost. Također je utvrđena velika razlika u sadržaju polifenola ovisno o djelu klice (*Slika 25*). Navedeno istraživanje ide u prilog tome da je sadržaj izoflavona u hipokotilu bio na višoj razini nego u kotiledonu neprokljalog sjemena soje, dok je radikula klijavih sjemenki pokazala najveći sadržaj izoflavona (Le i sur., 2019.).



**Slika 25:** Sadržaj polifenola u različitim dijelovima soje

Izvor: (Le i sur., 2019.)

Soja se široko koristi u formulacijama hrane, međutim, mali broj studija istraživao je kontaminaciju gljivicama ili mikotoksinima. S tim u vezi, uz slobodne, konjugirane i vezane fenolne spojeve, kao i njihove antioksidacijske i antifungalne komponente, analizirana je i pojava aflatoksina B1 (AFB1) u soji. Konjugirani i vezani fenolni ekstrakti soje bili su učinkovitiji za inhibiciju DPPH radikala, enzima peroksidaza i gljivičnog enzima  $\alpha$ -amilaza.

AFB1, otkriven na niskim razinama (0,96 do 1,67 ng g<sup>-1</sup>), potvrdio je zaštitni učinak fenolnih spojeva soje protiv kontaminacije mikotoksinom. Analiza glavnih sastavnica potvrdila je da je ključna sinergija  $\rho$ -hidroksibenzojeve,  $\rho$ -kumarinske kiseline i vanilina za antioksidacijsko i antifungalno djelovanje (Silva i sur., 2020.). Istraživanjem se pokazalo da je cimetna kiselina (do 1,0 mM) smanjila rast korijena soje, svježiu i suhu masu. Poznato je da su biljni korijeni osjetljivi na alelokemikalije u ranom rastu sadnica. Od mnogih alelokemijskih tvari dokazano je da je cimetna kiselina odgovorna za snažne inhibitorne učinke na duljinu korijena, te na svježiu i suhu masu različitih biljnih vrsta. U soji, 0,05 do 0,25 mM cimetne kiseline smanjuje korijen i sadržaj suhe tvari klijanca. Štoviše, rast sadnica soje i stvaranje bočnih korijena inhibirani su ovom alelokemikalijom, a stupanj inhibicije bio je povezan s koncentracijom. Također u soji, cimetna kiselina u koncentraciji od 1,0 mM značajno smanjuje svježiu masu presadnica, duljinu sadnice i duljinu korijena (Salvador i sur., 2013.). Provedeno je istraživanje na koncentracije izoflavona, posebno daidzeina i genisteina, koje su određene HPLC-om u 4 kultivara soje i 26 proizvoda od soje. Ukupni sadržaj izoflavona u kultivarima soje bio je u rasponu od 525–986 mg po kg, a za sojine proizvode 32,9–795 mg po kg. Među sojinim proizvodima sadržaj izoflavona se smanjio slijedećim redoslijedom: klice soje > sjemenke soje > sojino brašno > sojino mlijeko > jela od soje > sojin umak. Uočene su značajne razlike u koncentraciji genisteina i daidzeina između komercijalnih sojinih proizvoda i također unutar sorte soje. Antioksidacijska aktivnost soje i sojinih proizvoda je povezana s ukupnim fenolnim sadržajem (TPC) i ukupnim izoflavonima (TI), dok je TPC pokazao veću povezanost s TI. Utvrđene su razlike u koncentraciji genisteina i daidzeina u analiziranim kultivarima soje i proizvodima od soje, a to može biti zbog činjenice da su indijski kultivari bogati sadržajem genisteina u usporedbi s europskim i američkim kultivarima. Rezultati su također sugerirali da proizvodi od soje trebaju biti bogati s genisteinom i daidzeinom za razvoj zdravstvenih proizvoda i prehrambenih proizvoda s višom razinom funkcionalnih svojstava (Devi i sur., 2009.). Sadržaj daidzeina i genisteina u slanutku usporediv je s koncentracijama u soji, što sugerira da sjeme ove mahunarke potencijalno može zamijeniti soju kao izvor izokonskih aglikona. Dokazano je da obje mahunarke pokazuju antioksidacijski i protuupalni potencijal. Stoga se može pokazati da je sposobnost da se spriječi kardiovaskularna bolest i određeni tip kancerogenih bolesti nepobitna. Suprotno tome, zbog nižeg sadržaja lipida, slanutak se čini boljom opcijom u liječenju pretilosti i prevenciji dijabetesa tipa 2 (De Camargo i sur., 2019.). Kao sekundarni biljni metaboliti,



fenolni spojevi su najobilnija klasa tvari s najmanje 10 000 različitih spojeva koji su postali žarište istraživanja posljednjih godina. Ovi spojevi su u osnovi netoksične i učinkovite fitokemikalije s različitim nizom korisnih bioloških aktivnosti koje se tiču biljaka i ljudi. Fenolni spojevi imaju zajednički molekularni mehanizam djelovanja i mogu inhibirati staničnu proliferaciju i angiogenezu, regulirati endogene antioksidante, modulirati faktore transkripcije i pridružene kinaze i zaustaviti mnoge signalne putove što ih dovodi na vrh prehrambene piramide u ljudi s velikim potencijalom u liječenju različitih bolesti (Rasouli i sur., 2017.).

## 5. ZAKLJUČAK

Fenolni spojevi imaju veliki značaj kako za biljke, tako i za ljude. Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti biljaka i uloge u njihovom organizmu su razne kao na primjer obrana od herbivornih organizama, sudjeluju u mehaničkoj potpori, privlačenju oprašivača i rasprostranjivača plodova ili redukciji rasta susjednih biljaka. Najvažnija uloga fenola u biljnom, pa i u ljudskom organizmu je obrambeni mehanizam protiv učinaka prekomjerne oksidacije izazvane reaktivnim kisikovim vrstama (ROS). Obrana se osigurava djelovanjem raznih antioksidanata. Metode za mjerenje antioksidacijske aktivnosti su dobro ispitane. Metode detekcije antioksidacijske aktivnosti su razne, a najčešće su korištene DPPH, ORAC, TEAC i FRAP. Mjerenja antioksidacijske aktivnosti se najčešće koriste u prehranbene svrhe, te za procjenu učinkovitosti antioksidanata u osiguravanju zaštite hrane od oksidacijskog kvarenja. Oksidacijski stres u ljudi nastaje zbog neravnoteže u antioksidacijskom statusu gdje fenolni spojevi imaju vrlo važnu ulogu. Nepobitna je činjenica kako su fenolni spojevi, u hrani koju konzumiramo, jaka karika o kojoj može ovisiti naše zdravlje ili čak oboljenje od različitih bolesti. Konzumacijom puno povrća i voća, posebno bobičastog, možemo pridonijeti boljitku zdravstvenog stanja u ljudi. Danas je odabir zdrave prehrane postao bitan dio zdravog života i kondicije. Mnoga su istraživanja pokazala da ljudi koji slijede određenu prehranu imaju smanjen rizik od niza kroničnih bolesti, poput pretilosti, dijabetesa, raka, srčanih bolesti itd. što je u skladu s drevnom izrekom „Neka hrana bude vaš lijek i lijek neka bude hrana vaša“ (Hipokrat).

## 6. POPIS LITERATURE

1. Acero, N., Gradillas, A., Beltran, M., García, A., Muñoz Mingarro, D. (2019.): Comparison of phenolic compounds profile and antioxidant properties of different sweet cherry (*Prunus avium* L.) varieties. *Food Chemistry* 279: 260-271.
2. Alam, M.N., Bristi, N.J., Rafiquzzaman, M. (2013.): Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal* 21: 143-152.
3. Ameer, K., Shahbaz, H.M., Kwon, J.H. (2017.): Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16: 215-395.
4. Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. (2002.): Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127: 183-198.
5. Ashok, S.A. (2011.): Phytochemical and pharmacological screening of wheatgrass juice (*Triticum aestivum* L.). *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 9: 159-164.
6. Badarinath, A. V, Rao, K.M., Chetty, C.M.S., Ramkanth, S., Rajan, T.V.S., Gnanaprakash, K. (2014.): Costing systems for use in public universities: the Brazilian and international context. *Int. J. Educ. Res* 2: 1276-1285.
7. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006.): Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99: 191-203.
8. Barnes, S., Kirk, M., Coward, L. (1994.): Isoflavones and Their Conjugates in Soy Foods: Extraction Conditions and Analysis by HPLC-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 2466-2474.
9. Barz, W., Hoesel, W. (1979.): Metabolism and Degradation of Phenolic Compounds in Plants. *Recent Advances in Phytochemistry: Biochemistry of Plant Phenolics*, 12. izdanje 339-369, Springer Boston, SAD.
10. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995.): Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28: 25-30.
11. Bridgers, E.N., Chinn, M.S., Truong, V. Den. (2010.): Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweetpotatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars. *Industrial Crops and Products* 32: 613-620.

12. Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. (2004.): Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences* 74: 2157-2184.
13. Callemien, D., Collin, S. (2010.): Structure, organoleptic properties, quantification methods, and stability of phenolic compounds in beer-A review. *Food Reviews International* 26: 1-84.
14. De Camargo, A.C., Favero, B.T., Morzelle, M.C., Franchin, M., Alvarez-Parrilla, E., De La Rosa, L.A., Geraldi, M.V. et al. (2019.): Is chickpea a potential substitute for soybean? Phenolic Bioactives and potential health benefits 12: E2644.
15. Chen, Z., Ma, Y., Weng, Y., Yang, R., Gu, Z., Wang, P. (2019.): Effects of UV-B radiation on phenolic accumulation, antioxidant activity and physiological changes in wheat (*Triticum aestivum* L.)seedlings. *Food Bioscience* 30: 100409.
16. Cheynier, V. (2012.): Phenolic compounds: From plants to foods. *Phytochemistry Reviews* 11: 153-177.
17. Devi, M.K.A., Gondi, M., Sakthivelu, G., Giridhar, P., Rajasekaran, T., Ravishankar, G.A. (2009.): Functional attributes of soybean seeds and products, with reference to isoflavone content and antioxidant activity. *Food Chemistry* 114: 771-776.
18. Dixon, R.A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C.J., Reddy, M.S.S., Wang, L. (2002.): The phenylpropanoid pathway and plant defence - A genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3: 371-390.
19. Ellis, B.E. (1977.): Degradation of phenolic compounds by fresh-water algae. *Plant Science Letters* 8: 213-216.
20. Falcone Ferreyra, M.L., Rius, S.P., Casati, P. (2012.): Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science* 3: 1-16.
21. Gan, R.-Y., Chan, C.-L., Yang, Q.-Q., Li, H.-B., Zhang, D., Ge, Y.-Y., Gunaratne, A. et al. (2019.): Bioactive compounds and beneficial functions of sprouted grains. Elsevier Inc.
22. Ghumman, A., Singh, N., Kaur, A. (2017.): Chemical, nutritional and phenolic composition of wheatgrass and pulse shoots. *International Journal of Food Science and Technology* 52: 2191-2200.

23. Grace, S.G., Logan, B.A. (2000.): Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 355: 1499-1510.
24. Guerrieri, A., Dong, L., Bouwmeester, H.J. (2019.): Role and exploitation of underground chemical signaling in plants. *Pest Management Science* 75: 2455-2463.
25. Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., Jiang, Y. (2003.): Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research* 23: 1719-1726.
26. Hennion, M.C. (1999.): Solid-phase extraction: Method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 856: 3-54.
27. Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. (2011.): A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 126: 1821-1835.
28. Islam, M.Z., Park, B.J., Kang, H.M., Lee, Y.T. (2020.): Influence of selenium biofortification on the bioactive compounds and antioxidant activity of wheat microgreen extract. *Food Chemistry* 309: 125763.
29. Jeong, D.M., Jung, H.A., Choi, J.S. (2008.): Comparative antioxidant activity and HPLC profiles of some selected Korean thistles. *Archives of Pharmacal Research* 31: 28-33.
30. Jiménez-Monreal, A.M., García-Diz, L., Martínez-Tomé, M., Mariscal, M., Murcia, M.A. (2009.): Influence of cooking methods on antioxidant activity of vegetables. *Journal of Food Science* 74: 97-103.
31. Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M. (1999.): Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 3954-3962.
32. Karakaya, S., El, S.N., Taş, A.A. (2001.): Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 52: 501-508.
33. Khang, D., Dung, T., Elzaawely, A., Xuan, T. (2016.): Phenolic Profiles and Antioxidant Activity of Germinated Legumes. *Foods* 5: 27.
34. Khoddami, A., Wilkes, M.A., Roberts, T.H. (2013.): Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* 18: 2328-2375.
35. Koes, R.E., Quattrocchio, F., Mol, J.N.M. (1994.): The flavonoid biosynthetic pathway in plants: Function and evolution. *BioEssays* 16: 123-132.

36. Kratchanova, M., Denev, P., Ciz, M., Lojek, A., Mihailov, A. (2010.): Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems. *Acta Biochimica Polonica* 57: 229-234.
37. Kuhn, B.M., Geisler, M., Bigler, L., Ringli, C. (2011.): Flavonols accumulate asymmetrically and affect auxin transport in arabidopsis. *Plant Physiology* 156: 585-595.
38. Kulkarni, S.D., Tilak, J.C., Acharya, R., Rajurkar, N.S., Devasagayam, T.P.A., Reddy, A.V.R. (2006.): Evaluation of the antioxidant activity of wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) as a function of growth under different conditions. *Phytotherapy Research* 20: 218-227.
39. Le, X.T., Lan Vi, V.L., Toan, T.Q., Bach, L.G., Truc, T.T., Hai Ha, P.T. (2019.): Extraction Process of Polyphenols from Soybean (*Glycine max* L.) Sprouts: Optimization and Evaluation of Antioxidant Activity. *Processes* 7: 489.
40. Mathesius, U. (2018.): Flavonoid functions in plants and their interactions with other organisms. *Plants* 7: 7-9.
41. Mierziak, J., Kostyn, K., Kulma, A. (2014.): Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules* 19: 16240-16265.
42. Molyneux, P. (2004.): The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 26: 211-219.
43. Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K. (2002.): Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3122-3128.
44. Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'Arrigo, M., Rostagno, M.A., Martínez, J.A., García-Lafuente, A. et al. (2011.): Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry* 128: 674-678.
45. Pedan, V., Popp, M., Rohn, S., Nyfeler, M., Bongartz, A. (2019.): Characterization of phenolic compounds and their contribution to sensory properties of olive oil. *Molecules* 24: E2041.
46. Pevalek-kozlina, B. (2003.): *Fiziologija bilja*. Profil International, Zagreb, 566 strana.

47. Pisoschi, A.M., Negulescu, G.P. (2012.): Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry* 1: 1000106.
48. Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C. (2001.): Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology* 90: 494-507.
49. Rasouli, H., Farzaei, M.H., Khodarahmi, R. (2017.): Polyphenols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties* 20: 1700-1741.
50. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1997.): Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2: 152-159.
51. Del Rio, D., Stewart, A.J., Mullen, W., Burns, J., Lean, M.E.J., Brighenti, F., Crozier, A. (2004.): HPLC-MSn Analysis of Phenolic Compounds and Purine Alkaloids in Green and Black Tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 2807-2815.
52. Rodríguez-Pérez, C., Segura-Carretero, A., del Mar Contreras, M. (2019.): Phenolic compounds as natural and multifunctional anti-obesity agents: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59: 1212-1229.
53. Roy, M.K., Koide, M., Rao, T.P., Okubo, T., Ogasawara, Y., Juneja, L.R. (2010.): ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions: Relationship between total polyphenol and individual catechin content. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 61: 109-124.
54. Ryan, D., Robards, K. (1998.): Phenolic compounds in olives. *Analyst* 123: 31-44.
55. Salvador, V.H., Lima, R.B., dos Santos, W.D., Soares, A.R., Böhm, P.A.F., Marchiosi, R., Ferrarese, M. de L.L., Ferrarese-Filho, O. (2013.): Cinnamic Acid Increases Lignin Production and Inhibits Soybean Root Growth. *PLoS ONE* 8: 1-10.
56. Schandry, N., Becker, C. (2020.): Allelopathic Plants: Models for Studying Plant–Interkingdom Interactions. *Trends in Plant Science* 25: 176-185.
57. Schink, B.Y., Philipp, B., Müller, J. (2000.): Anaerobic Degradation of Phenolic Compounds. *Naturwissenschaften* 23: 12-23.
58. Sharma, O.P., Bhat, T.K. (2009.): DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* 113: 1202-1205.
59. Silva, B., Souza, M.M., Badiale-Furlong, E. (2020.): Antioxidant and antifungal activity of phenolic compounds and their relation to aflatoxin B1 occurrence in soybeans (*Glycine max* L.). *Science of Food and Agriculture* 100: 1256 – 1264.

60. Stalikas, C.D. (2007.): Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* 30: 3268-3295.
61. Swain, T., Bate-Smith, E.C. (1962.): *Flavonoid Compounds*. Knjiga: Comparative Biochemistry, Academic Press, New York, SAD.
62. Szabo, M.R., Idițoiu, C., Chambre, D., Lupea, A.X. (2007.): Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. *Chemical Papers* 61: 214-216.
63. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins Byrne, D. (2006.): Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 669-675.
64. Turkmen, N., Sari, F., Velioglu, Y.S. (2005.): The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry* 93: 713-718.
65. Vanholme, B., El Houari, I., Boerjan, W. (2019.): Bioactivity: phenylpropanoids' best kept secret. *Current Opinion in Biotechnology* 56: 156-162.
66. Zhao, H., Chen, W., Lu, J., Zhao, M. (2010.): Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chemistry* 119: 1150-1158.
67. Zulueta, A., Esteve, M.J., Frígola, A. (2009.): ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry* 114: 310-316.



## 7. SAŽETAK

Fenolni spojevi u biljkama su mnogobrojni i pripadaju sekundarnim tvarima u biljnom organizmu. S kemijskog aspekta, to je grupa spojeva koja ima fenolnu odnosno hidroksilnu skupinu na aromatskom prstenu. Postoje različiti načini sinteze fenolnih spojeva. Najvažnija dva puta biosinteze su put šikiminske kiseline i put jabučne kiseline. Biljke proizvode širok spektar sekundarnih metabolita koji pokrivaju različite funkcije, kao na primjer obrana biljke od herbivornih organizama, mehanička potpora biljke, privlačenje oprašivača i rasprostranjivača plodova ili inhibiciji rasta susjednih biljaka. Najčešće zastupljena skupina fenolnih spojeva su flavonoidi. Flavonoidi se sintetiziraju putem fenilpropanoide i služe kao UV zaštitnici u obrani patogena, za komunikaciju biljaka i mikroorganizama i regulaciju reaktivnih vrsta kisika. U svijetu postoji veliko zanimanje za fitokemikalije kao bioaktivne komponente hrane. Konzumacija voća i povrća u prehrani ljudi može prevenirati neke bolesti zahvaljujući visokoj antioksidacijskoj aktivnosti istih. Slobodni radikali imaju važnu ulogu u procesima kvarenja hrane, razgradnji kemijskih materijala i također doprinose više od stotinu poremećaja kod ljudi. Posljednjih godina postoji povećan interes za upotrebu antioksidanta u medicinske svrhe, a veliku pozornost privlače klijanci žitarica i mahunarki zbog svojih jakih antioksidacijskih svojstava. Postoje mnoge metode detekcije fenolnih spojeva i izračuna ukupne antioksidacijske aktivnosti. U grubo su podijeljene u dvije skupine: *in vitro* metode i *in vivo* metode. Neke od *in vitro* metoda su DPPH, TEAC, FRAP, SOD, ORAC i mnoge druge, a od *in vivo* metoda to su GSH, GSHPx, CAT, GGT itd.

## 7. SUMMARY

Phenolic compounds in plants are numerous and belong to secondary substances in the plant organism. From a chemical point of view, it is a group of compounds having a phenolic or hydroxyl group on the aromatic ring. There are various ways to synthesize phenolic compounds. The most important two pathways of biosynthesis are the shikimic acid pathway and the malic acid pathway. Plants produce a wide range of secondary metabolites that cover a variety of functions, such as defending a plant against herbivorous organisms, mechanically supporting the plant, attracting pollinators and fruit spreaders, or inhibiting the growth of other plants. The most commonly represented group of phenolic compounds are flavonoids. Flavonoids are synthesized via phenylpropanoids pathway and serve as UV protectors in pathogen defense, for plant and microorganism communication and for the regulation of reactive oxygen species. There is great interest in the world for phytochemicals as bioactive food components. Consumption of fruits and vegetables in human diet can prevent some diseases due to their high antioxidant activity. Free radicals play an important role in the processes of food spoilage, the degradation of chemical materials and also contribute to more than one hundred disorders in humans. In recent years, there has been an increased interest in the use of antioxidants for medical purposes, and a great deal of attention has been paid to cereals and legumes because of their strong antioxidant properties. There are many methods of detecting phenolic compounds and calculating total antioxidant activity. They are roughly divided into two groups: *in vitro* methods and *in vivo* methods. Some of the *in vitro* methods are DPPH, TEAC, FRAP, SOD, ORAC and many others, and *in vivo* methods are GSH, GSHPx, CAT, GGT, etc.

## 8. POPIS SLIKA

**Slika 1:** Put šikiminske i jabučne kiseline (Pevalek-Kozlina, 2003.) (Stranica 2)

**Slika 2:** Osnovni putovi dobivanja sekundarnih metabolita u biljkama (Pevalek-Kozlina, 2003.) (Stranica 3)

**Slika 3:** Prikaz strukture lignina iz bukve (*Fagus sylvatica*) (Pevalek-Kozlina, 2003.) (Stranica 5)

**Slika 4:** Pojednostavljeni dijagram biosintetičkog puta flavonoida (Koes i sur., 1994.) (Stranica 9)

**Slika 5:** Strukture tanina nastalih iz fenolnih kiselina ili flavonoidnih podjedinica, (A) Osnovna struktura kondenziranog tanina (B) Tanin koji se može hidrolizirati (Pevalek-Kozlina, 2003.) (Stranica 11)

**Slika 6:** Biosinteza flavonoida i flavonola (Kuhn i sur., 2011.) (Stranica 12)

**Slika 7:** Glavni biosintetski putevi različitih razreda fenilpropanoidnih spojeva koji pokazuju primarne metaboličke puteve koji pružaju prekursore za biosintezu fenilpropanoida (Dixon i sur., 2002.) (Stranica 14)

**Slika 8:** Sezonske promjene u fotoprotektivnom sustavu i antioksidansima lišća mahonije (*Mahonia repens*) (Stephen i sur., 2000.) (Stranica 16)

**Slika 9:** Učinak fenilpropanoida na rast i razvoj biljaka (Vanholme i sur., 2019.) (Stranice 17)

**Slika 10:** Različite klase flavonoida (Mierziak i sur., 2014.) (Stranica 19)

**Slika 11:** Antioksidacijsko djelovanje i ukupni fenolni sadržaj metanolnih ekstrakata iz povrća i voća (Cai i sur., 2004.) (Stranica 23)

**Slika 12:** Struktura najproučavanijih fenolnih spojeva u borbi protiv pretilosti (Rodríguez-Pérez i sur., 2017.) (Stranica 27)

**Slika 13:** Prikaz ukupnih fenola u tekućim i krutim namirnicama (Karakaya i sur., 2001.) (Stranica 28)

**Slika 14:** Ukupna antioksidacijska aktivnost u tekućim i krutim namirnicama (Karakaya i sur., 2001.) (Stranica 28)

**Slika 15:** Utjecaj različitih vrsta kuhanja povrća na razinu antioksidacijske aktivnosti (Turkmen i sur., 2005.) (Stranica 34)

**Slika 16:** Testovi, ispitani entiteti i osnovne jedinice koje se koriste za mjerenje antioksidacijske aktivnosti (Antolovich i sur., 2002.) (Stranica 37)

**Slika 17:** Ekstrakcija biološki aktivnih spojeva pomoću UAE (Khoddami i sur., 2013.) (Stranica 43)

**Slika 18:** Važna svojstva nekih otapala koja se obično koriste u MAE (Khoddami i sur., 2013.) (Stranica 44)

**Slika 19:** Shematski prikaz uređaja za ultrazvučno-mikrovalnom ekstrakciju (UMAE) (Khoddami i sur., 2013.) (Stranica 45)

**Slika 20:** Prikaz molekule DPPH (Molyneux 2004.) (Stranica 50)

**Slika 21:** Vremenski tijek uklanjanja DPPH slobodnog radikala askorbinskom kiselinom, BHT i propil galatom (Sharma i Bhat, 2008.) (Stranica 51)

**Slika 22:** ORAC i FRAP vrijednosti povrća ( $\mu\text{mol TE / g}$ ) (Ou i sur., 2002.) (Stranica 59)

**Slika 23:** ANOVA za antioksidacijsko djelovanje kod četiri vrste guavinih genotipova u tri određivanja ekstrakta metanola pomoću ABTS, DPPH, FRAP i ORAC metoda (Thaipong i sur., 2006.) (Stranica 62)

**Slika 24:** Antioksidacijsko djelovanje petodnevnih ekstrakata mahunarki (Khang i sur., 2016.) (Stranica 66)

**Slika 25:** Sadržaj polifenola u različitim dijelovima soje (Le i sur., 2019.) (Stranica 67)

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek  
Sveučilišni diplomski studij, smjer Ishrana bilja i tloznanstvo

FENOLNI SPOJEVI U BILJKAMA

Lucija Galić

Sažetak:

Fenolni spojevi u biljkama su mnogobrojni i pripadaju sekundarnim tvarima u biljnom organizmu. S kemijskog aspekta, to je grupa spojeva koja ima fenolnu odnosno hidroksilnu skupinu na aromatskom prstenu. Postoje različiti načini sinteze fenolnih spojeva. Najvažnija dva puta biosinteze su put šikiminske kiseline i put jabučne kiseline. Biljke proizvode širok spektar sekundarnih metabolita koji pokrivaju različite funkcije, kao na primjer obrana biljke od herbivornih organizama, mehanička potpora biljke, privlačenje oprašivača i rasprostranjivača plodova ili inhibiciji rasta susjednih biljaka. Najčešće zastupljena skupina fenolnih spojeva su flavonoidi. Flavonoidi se sintetiziraju putem fenilpropanoida i služe kao UV zaštitnici u obrani patogena, za komunikaciju biljaka i mikroorganizama i regulaciju reaktivnih vrsta kisika. U svijetu postoji veliko zanimanje za fitokemikalije kao bioaktivne komponente hrane. Konzumacija voća i povrća u prehrani ljudi može prevenirati neke bolesti zahvaljujući visokoj antioksidacijskoj aktivnosti istih. Slobodni radikali imaju važnu ulogu u procesima kvarenja hrane, razgradnji kemijskih materijala i također doprinose više od stotinu poremećaja kod ljudi. Posljednjih godina postoji povećan interes za upotrebu antioksidanta u medicinske svrhe, a veliku pozornost privlače klijanci žitarica i mahunarki zbog svojih jakih antioksidacijskih svojstava. Postoje mnoge metode detekcije fenolnih spojeva i izračuna ukupne antioksidacijske aktivnosti. U grubo su podijeljene u dvije skupine: *in vitro* metode i *in vivo* metode. Neke od *in vitro* metoda su DPPH, TEAC, FRAP, SOD, ORAC i mnoge druge, a od *in vivo* metoda to su GSH, GSHPx, CAT, GGT itd.

**Rad je izrađen pri:** Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

**Mentor:** izv.prof.dr.sc. Miroslav Lisjak

**Broj stranica:** 80

**Broj slika i grafikona:** 25

**Broj tablica:** 0

**Broj literaturnih navoda:** 67

**Broj priloga:** 0

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** fenolni spojevi, antioksidacijska aktivnost, sinteza, metode detekcije, prehrana

**Datum obrane:**

**Stručno povjerenstvo za obranu**

**1. prof.dr.sc. Tihana Teklić, predsjednik**

**2. izv.prof.dr.sc Miroslav Lisjak, mentor**

**3. izv.prof.dr.sc. Andrijana Rebekić, član**

**Rad je pohranjen u:** Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište u Osijeku, Vladimira Preloga 1.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate thesis

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek  
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek  
University Graduate Studies, course Plant nutrition and soil science

### PHENOLIC COMPOUNDS IN PLANTS

Lucija Galić

#### Summary:

Phenolic compounds in plants are numerous and belong to secondary metabolites of the plant organism. From a chemical point of view, it is a group of compounds having a phenolic or hydroxyl group on the aromatic ring. There are various ways of synthesis of phenolic compounds. The most important two pathways of biosynthesis are the shikimic acid pathway and the malic acid pathway. Plants produce a wide range of secondary metabolites that cover a variety of functions, such as defending a plant against herbivorous organisms, mechanically supporting the plant, attracting pollinators and fruit spreaders, or inhibiting the growth of other plants. The most commonly represented group of phenolic compounds are flavonoids. Flavonoids are synthesized via phenylpropanoids pathway and serve as UV protectors and in pathogen defense, for plant and microorganism communication and for the regulation of reactive oxygen species. There is great interest in the world for phytochemicals as bioactive food components. Consumption of fruits and vegetables in human diet can prevent some diseases due to their high antioxidant activity. Free radicals play an important role in the processes of food deterioration, the degradation of chemical materials and also contribute to more than one hundred disorders in humans. In recent years, there has been an increased interest in the use of antioxidants for medical purposes, and a great deal of attention has been paid to cereals and legumes because of their strong antioxidant properties. There are many methods of detecting phenolic compounds and calculating total antioxidant activity. They are roughly divided into two groups: *in vitro* methods and *in vivo* methods. Some of the *in vitro* methods are DPPH, TEAC, FRAP, SOD, ORAC and many others, and *in vivo* methods are GSH, GSHPx, CAT, GGT, etc.

**Thesis performed at:** Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

**Mentor:** Miroslav Lisjak, PhD, associate professor

**Number of pages:** 80

**Number of figures:** 25

**Number of tables:** 0

**Number of references:** 67

**Number of appendices:** 0

**Original in:** Croatian

**Key words:** phenolic compounds, antioxidant activity, synthesis, detection methods, diet

**Thesis defended on date:**

#### Reviewers:

1. **Tihana Teklić, PhD, full professor**
2. **Miroslav Lisjak, PhD, associate professor**
3. **Andrijana Rebekić, PhD, associate professor**

**Thesis deposited at:** Library, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1.