

# Polifenolni profil kadulje u simuliranom ljudskom probavnom sustavu

---

**Bogović, Marija Gabrijela**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:256094>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-05-01**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Nutricionizam**

**Marija Gabriјela Bogović**

6994/N

**POLIFENOLNI PROFIL KADULJE U SIMULIRANOM**  
**LJUDSKOM PROBAVNOM SUSTAVU**  
**ZAVRŠNI RAD**

**Modul: Modeliranje i optimiranje u nutricionizmu**

**Mentor: doc.dr.sc. *Davor Valinger***

**Zagreb, 2017.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

**Završni rad**

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Nutricionizam**

**Zavod za procesno inženjerstvo**

**Laboratorij za mjerenja, regulaciju i automatizaciju**

**Polifenolni profil kadulje u simuliranom ljudskom probavnom sustavu**

***Marija Gabrijela Bogović, 58206125***

**Sažetak:** Kadulja je ljekovita biljka, koja se zbog svojeg bogatog sastava biološki aktivnih spojeva često koristi u prehrani. Dokazani su njezini antiupalni, antioksidativni i antivirusni učinci. Na vodenim ekstraktima kadulje istraživani su ukupni polifenoli spektrofotometrijskom metodom i antioksidativna sposobnost ABTS metodom. Istraživanje se je provodilo u uvjetima *in vitro* simulirane probave te se je proučavala ovisnost promatranih parametara o vremenu i djelovanju probavnih enzima. Rezultati vodenih ekstrakata pokazuju očekivanu vrijednosti ukupnih polifenola u ishodišnoj otopini koja nije tretirana enzimima. Nakon 5 minuta ta vrijednost se smanjila za 40% djelovanjem enzima  $\alpha$ -amilaze. Kasnijim djelovanjem enzima probavnog sustava pepsina i pankreatina koncentracije ukupnih polifenola pala je na 29,5%. Rezultati dobiveni ABTS metodom pokazuju da je nakon 5 minuta došlo do pada od 32% te na kraju probavnog sustava do 31.92 % antioksidativne sposobnosti.

**Ključne riječi:** kadulja, fenolni spojevi, antioksidativna aktivnost, probavni sustav, probavni enzimi

**Rad sadrži:** 31 stranica, 8 slika, 4 tablica, 54 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *doc.dr.sc. Davor Valinger*

**Pomoć pri izradi:** *prof. dr.sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić*

**Datum obrane:** 7.srpnja, 2017

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Final work**

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**Undergraduate studies Nutrition**

**Department of Process engineering**

**Laboratory for Measurement, Regulation and Automatisation**

**Polyphenol profile of sage in a simulated human digestive system**

***Marija Gabrijela Bogović, 58206125***

**Abstract:** Sage is a medicinal herb that is often used in diet because of its rich source of biologically active compounds. Its anti-inflammatory, anti-oxidative and antiviral effect have been well documented. On water extracts of sage total polyphenols were studied using the spectrophotometric method and the antioxidant capacity ABTS method. The study was conducted *in vitro* digestive stimulation and the effects of digestive enzymes on these parameters in time was studied. The results of water extracts show the expected values of total polyphenols in the initial solution prior to enzyme exposure. After 5 minutes total polyphenols decreased by 40%, affected by  $\alpha$ -amylase enzyme. At the end of digestive stimulation concentration of total polyphenols decreased to 29,5% due to subsequent effects of the digestive system enzymes pepsin and pancreatin. The results obtained by the ABTS method show decrease of antioxidant capacity after 5 minutes to 32% and 31,92% at the end of digestive stimulation

**Keywords:** Sage, phenolic compounds, antioxidant activity, digestive system, digestive enzymes

**Thesis contains:** 31 pages, 8 figures, 4 tables, 54 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

**Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *doc.dr.sc. Davor Valinger*

**Technical support and assistance:** *PhD Jasenka Gajdoš Kljusurić, full prof.*

**Thesis delivered:** July 7<sup>th</sup>, 2017



# Sadržaj

|                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Uvod.....</b>                                          | <b>1</b>  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>                                | <b>2</b>  |
| 2.1. MORFOLOŠKA OBILJEŽJA                                    | 2         |
| 2.2. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST I POLIFENOLI                  | 4         |
| 2.2.1 SLOBODNI RADIKALI I ANTIOKSIDANSI                      | 4         |
| 2.2.2. POLIFENOLI KADULJE                                    | 5         |
| 2.3. MEDICINSKA UPOTREBA KADULJE                             | 9         |
| 2.3.1. KADULJA I KOGNITIVNI PAD                              | 9         |
| 2.3.2. KADULJA I DIJABETES                                   | 10        |
| 2.3.3. KADULJA I RAK                                         | 10        |
| 2.3.4. KADULJA I KARDIOVASKULARNE BOLESTI                    | 10        |
| 2.3.5. KADULJA I ANTI-OSTEOPOROTSKI EFEKT                    | 11        |
| 2.3.6. KADULJA U PREHRANI                                    | 11        |
| 2.5. PROBAVNI SUSTAV                                         | 12        |
| 2.5.1. METABOLIZAM POLIFENOLA                                | 13        |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>                          | <b>15</b> |
| 3.1. MATERIJALI                                              | 15        |
| 3.2. METODE                                                  | 15        |
| 3.2.1. EKSTRAKCIJA AKTIVNIH SPOJEVA                          | 15        |
| 3.2.2. ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNIH POLIFENOLA                 | 16        |
| 3.2.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA ABTS METODOM | 18        |
| 3.2.4. IN VITRO MODEL SIMULACIJE PROBAVNOG SUSTAVA           | 20        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>                          | <b>22</b> |
| 4.1. UDIO UKUPNIH POLIFENOLA                                 | 22        |
| 4.2. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST ABTS METODOM                  | 23        |
| <b>5. ZAKLJUČAK .....</b>                                    | <b>25</b> |
| <b>6. POPIS LITERATURE .....</b>                             | <b>26</b> |

# 1. Uvod

Čovjek od pamtivijeka traga za lijekom protiv različitih bolesti u prirodi te o tome postoje brojni zapisi koji dokazuju raširenu upotrebu ljekovitog bilja u tu svrhu. Koristi se oko 20 000 ljekovitih biljaka od kojih je samo 1100 istraženo. Hrvatska, kao mediteranska zemlja, iznimno je pogodna upravo za uzgoj mnogih ljekovitih biljaka. Kadulja je jedna od važnijih predstavnica ljekovitog bilja te se koristi više od 4000 godina (Gerovac, 2013a). Drevni Egipćani su je koristili kao lijek za neplodnost i teške epidemije kao što je kuga (Gerovac, 2013b). U faraonskim grobnicama koristila se je kao jedan od glavnih sastojaka za balzamiranje (Gerovac, 2013c). Poznato je da je Karlo veliki, jedan od najvećih europskih srednjovjekovnih vladara, zakonima naredio sadnju mnogih ljekovitih biljaka, a ponajviše kadulje (Gerovac, 2013d).

Kadulja je biljka iznimno ljekovitih svojstava i širokog spektra djelovanja, a to najbolje dokazuje njezin latinski naziv *Salvia officinalis* koji potječe od riječi *salous* što znači zdrav (Toplak Galle, 2001). Brojne studije dokazuju njezino antiupalno, antibakterijsko i antiinfekcijsko djelovanje (Hamidpour i sur., 2014a). Upravo zbog široke upotrebe i djelovanja provedena je analiza polifenola u kadulji te sustavno proučavan njihov učinak na zdravlje.

Cilj ovog rada je bio odrediti koncentraciju ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom i njihovu antioksidativnu sposobnost ABTS metodom na uzorcima vodenih ekstrakata kadulje te njihovu kasniju promjenu prilikom prolaska kroz *in vitro* simulirani probavni sustav.

## 2. Teorijski dio

Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), u ljekovito bilje ubrajaju se one biljke čiji jedan ili više dijelova sadrže biološki aktivnu tvar koja se može koristiti u terapijske svrhe. Kadulja se kao ljekovita biljka uzgaja prema principima ekološke proizvodnje. Ekološka proizvodnja ljekovitog i aromatičnog bilja, pa tako i kadulje, podliježe Zakonu o provedbi Uredbe Vijeća (EZ) br. 834/2007 o ekološkoj proizvodnji i označavanju ekoloških proizvoda („Narodne novine“ br. 80/13, 14/14) i Pravilniku o ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji („Narodne novine“ br. 19/16). *Salvia officinalis* poznata je po mnogo imena, neka od najpoznatijih su vrtna kadulja, zlatna kadulja, kućna kadulja, kulinarska kadulja i dalmatinska kadulja (Hamidpour i sur., 2014b).

### 2.1. Morfološka obilježja

Kadulja (*Salvia officinalis*) pripada porodici *Lamiaceae* ili usnače, reda *Lamiales*. Porijeklom je s Balkanskog poluotoka, a rasprostranjena je na širokom području koje obuhvaća Sjevernu Ameriku, Europu te Republiku Hrvatsku, tj. ponajviše njezino primorje, Dalmaciju i dalmatinsko zaleđe (Židovec i sur., 2005a) (Slika 1.).



**Slika 1.** Rasprostranjenost kadulje u Republici Hrvatskoj

Pretežito raste na nepovoljnim mjestima, ali se može uzgajati i u vrtu. Nalazi se u područjima s prosječnom temperaturom 5 do 26 °C, s godišnjom količinom oborina 0,3 do 2,6 mm i na



tlu pH 4,2 do 8,3 (Židovec i sur., 2005b).

Porodica usnjača dobila je ime prema vjenčiću koji je građen u obliku donje i gornje usne. Kadulja je višegodišnja biljka, drvenastog korijena koji ju čini vrlo otpornom na sušu zbog dubokog prodiranja u zemlju (Židovec i sur., 2005c). Mlada kadulja u početku ima zeljastu stabljiku, a kasnije tijekom rasta pri dnu odrveni. Mladi izdanci su svijetlozeleni do ljubičasti, prekriveni dlačicama sivo bijele boje koji mogu biti rjeđe ili gušće poredani (Židovec i sur., 2005d). Listovi su svijetli, s obje strane obrasli dlačicama, jajastog do izduženo kopljastog oblika (Židovec i sur., 2005e). (Slika 2.). Cvat ja klasast, a sastoji se od 2 – 8 cvjetova koji mogu biti plave, ružičaste ili bijele boje, specifičnog su mirisa koji privlači pčele (Židovec i sur., 2005f). Plodić je kalavac, okruglast, malo izdužen, širok 2 mm, a dug 2 – 2,5 mm. Nakon sazrijevanja sjemena opna postane tvrda, kestenaste do tamnosmeđe boje (Židovec i sur., 2005g). (Slika 2.).

Sjeme je klijavo 3 – 4 godine, a prosječna masa 1000 sjemenki iznosi 7,8 grama. Eterično ulje se nalazi u cijelom nadzemnom dijelu biljke, a najviše u listovima koji se i najviše koriste u prehrani. U osušenoj biljci ga ima od 1,6 do 2,7%. Životni vijek kadulje prosječno je 5 – 7 godina, u slučaju loše tehnologija uzgoja, urod će se postepeno smanjivati već nakon četiri godine. Također, kadulja je osjetljiva na prisutnost soli koja značajno usporava rast biljke za 61% (Taarit i sur., 2009). Početni razvoj je vrlo spor, rijetko cvate u prvoj godini, a u drugoj procvate vrlo rano (Židovec i sur., 2005h). U uvjetima kontinentalne klime cvjetanje započinje početkom svibnja i traje do kraja lipnja. Plodovi sazrijevaju vrlo sporo, najčešće tek u kolovozu, pri čemu berba može biti otežana zbog osipanja sjemena



**Slika 2.** Kadulja (Mijatović, 2016.)

Biljke roda *Salvia* L. razlikuju se i po izgledu i po svojstvima. Osim najpoznatije i najkorištenije ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.), poznate u narodu i kao žalfija, ističu se i stepska kadulja (*Salvia nemorosa* L.), livadna kadulja (*Salvia pratensis* L.) te pršljenasta kadulja (*Salvia verticillata* L.).

## **2.2. Antioksidativna aktivnost i polifenoli**

Brzi način života pokazuje sve veći utjecaj na zdravlje ljudi i pojavu nezaraznih bolesti. Prvenstveno se to odnosi na bolesti kao što su ateroskleroza, dijabetes i kardiovaskularne bolesti koje su posljedica nepravilne prehrane. Zbog toga se sve više traga za komponentama hrane koje bi pospješile liječenje pa čak i prevenirale ovakva stanja. Razvojem znanosti sve je veći naglasak na pravilnoj prehrani, koja uključuje hranu biljnog porijekla bogatu antioksidansima (Urquiaga i Leighton, 2000). Također, pravilna prehrana uključuje ljekovito bilje, kao dodatke prehrani, koji imaju pozitivan učinak na smanjenje oksidativnog stresa.

### **2.2.1 Slobodni radikali i antioksidansi**

Slobodni radikali definiraju se kao molekule koje u svojoj orbitali imaju nespareni elektron. Upravo ga to svojstvo čini vrlo reaktivnim i uzrokuje lančanu reakciju nastajanja radikala u organizmu. Normalne metaboličke reakcije ili posljedica izloženosti vanjskim faktorima kao što su X-zrake, ozon, dim cigarete, zagađeni zrak, kemikalije korištene u industriji, lijekovi, uzrokuju nastajanje slobodnih radikala (Valko i sur., 2007a). Produkti normalnog metabolizma su kisikovi (ROS) i dušikovi radikali (RNS) (Valko i sur., 2007b). Često se pojave bolesti kao što su rak, dijabetes, ateroskleroza kao i starenje, objašnjavaju nastankom slobodnih radikala (Moskovitz i sur., 2002). Kisikovi radikali su vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), superoksid radikal ( $O_2^-$ ), lipidi peroksil radikal ( $LOO^*$ ) i hidroksil radikal ( $OH^*$ ) te  $NO^*$  kao dušikov radikal (Valko i sur., 2007c). Slobodni radikali u organizmu dovode do oksidativnog oštećenja, prvenstveno DNA, koja za posljedicu imaju mutagene, kancerogene promjene i starenje (Valko i sur., 2007d). Takve oksidativne promjene, koje u konačnici rezultiraju bolestima, djelomično su u organizmu umanjene procesom antioksidacije. Antioksidansi su molekule koje doniraju elektron ili proton slobodnom radikalu i na taj način ga gase (Rice- Evans i sur, 1995). Osim

što gasi radikale, bitni su i u popravku nastalog oštećenja te u sprječavanju mogućeg nastajanja novog radikala.

Struktura polifenola je ključ njihova djelovanja, a odnosi se na doniraju atoma, elektrona ili kelat-kationa te je to poznato kao struktura-aktivnost veza (Balasundram i sur., 2006a). Njihova antioksidativna aktivnost raste porastom hidroksilacije (Balasundram i sur., 2006b). U prvom redu to se odnosi na enzime, no tu vrlo bitnu ulogu igraju mikronutijenti hrane kao što su vitamini i nenutritivne komponente u koje se ubrajaju polifenoli. Hrana bogata antioksidansima ima bitnu ulogu u prevenciji bolesti te je mnogo pažnje posvećeno prirodnim antioksidansima.

### **2.2.2. Polifenoli kadulje**

Ljekovito bilje poznato je kao dobar izvor biološki aktivnih supstanci koje značajno povećavaju unos antioksidansa putem hrane (Dragland i sur., 2003). Ono je korišteno u različite svrhe tijekom stoljeća uključujući medicinu, nutricionizam, proizvodnju kozmetike te u procesima pripreme, konzerviranja, ali i poboljšavanja okusa hrane. Glavni izvori polifenola u prehrani su voće te u manjoj mjeri povrće, suhe mahunarke i žitarice (Scalbert i Williamson, 2000a). Osim hrane, i pića (vino, čaj, kava, pivo) koja su uključena u prehranu, obiluju polifenolima (Scalbert i Williamson, 2000b). Polifenoli spadaju u skupinu spojeva koji su jedni od glavnih nositelja senzorskih osobina hrane, a sve se više istraživanja bavi njihovim brojnim pozitivnim učincima na ukupan organizam. Brojna istraživanja, kao što je istraživanje Pandeya i Rizvia, 2009., dokazuju da dugotrajna konzumacija hrane i pića bogatih polifenolima smanjuje rizik od razvoja tumora, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, osteoporoze i neurodegenerativnih bolesti.

Rast i razvoj biljke popraćen je proizvodnjom brojnih primarnih i sekundarnih biljnih metabolita koji omogućavaju njezin opstanak i komunikaciju s okolinom (Kliebenstein i Osbourn, 2012). U primarne metabolite ubrajaju se tvari koje nastaju neposrednom pretvorbom kao što su šećeri. Kadulja je bogata takvim biološki aktivnim komponentama posebice sekundarnim metabolitima od kojih su najbrojniji polifenoli (Tablica 1.). Sekundarni biljni metaboliti su podijeljeni u tri velike skupine: fenoli, terpeni te spojevi s dušikom (alkaloide, gluozinolaze i cijanohidrate) (Bourgaud i sur., 2001). Udio polifenola razlikuje se ovisno o dijelu godine u kojem je berba (Generalić I., 2012). Prosječan udio polifenola u kadulji u svibnju iznosi 41% ekstrakta, dok u ostalom dijelu godine iznosi 22-30% (Generalić i sur., 2011).

**Tablica 1.** Podjela sekundarnih biljnih metabolita na skupine i podskupine (Crozier i sur., 2006)

|                     |                                                                                                                                                                      |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Polifenoli          | Flavonoidi, flavonoli, flavoni, flavan-3-oli, antocijani, flavanoni, izoflavoni;<br>neflavonoidi: fenolne kiseline, hidroksicinamati, stilbeni                       |
| Spojevi sa sumporom | Glukozinolati, izocijanati                                                                                                                                           |
| Terpeni             | Monoterpeni, diterpeni, seskviterpeni, triterpeni, karotenoidi                                                                                                       |
| Alkaloidi           | Benzilizokvinolini, tropan alkaaloid, nikotin, terpenoid indol alakaloid, purinski alkaloidi, kvinolizidinski alkaloidi, steroidni glikoalkaloid, konini, betalanini |

Fenolni spojevi su najveća skupina metabolita, a razvrstani su u dvije osnovne skupine: fenolne kiseline i flavonoidi. Razlog velike ekstrakcije upravo ovih spojeva je njihova primjena u prehrambenoj industriji prilikom proizvodnje funkcionalne hrane. Ovi biološki aktivni spojevi, prisutni u višim biljkama, pokazuju značajan antioksidativni kapacitet. Fenoli se sastoje od aromatskog prstena koji sadrži jednu ili više hidroksilnih skupina i prema strukturi se mogu poredati od najjednostavnijih struktura do kompleksa polimera visokomolekularne mase (Balasundram i sur., 2006c). Bez obzira na strukturu, često se nazivaju polifenolima. Osim hidroksilne skupine, na aromatskom prstenu mogu se nalaziti funkcionalne grupe kao što su esteri ili metil-estri. Pozitivni učinci na organizam vjerojatno leže u njihovoj apsorpciji i metabolizmu koji je uvjetovan njihovom strukturom, uključujući konjugaciju s drugim polifenolima, stupnjem glikoliziranja/acetiliranja, molekularnom veličinom i topljivošću (Bravo, 1998).

*Salvia officinalis* je vrsta kadulje sa najviše eteričnog ulja (Rami i sur., 2011) koje se proučava radi antikancerogenog, antimikrobnog i antioksidativnog djelovanja (Hussain i sur., 2011,a). Kadulja se najčešće konzumira kao vodena otopina pa u zanimljiva istraživanja koja proučavaju udio polifenola ovisno o uzorku kadulje (svježa, vodena otopina ili sušena). Iz Tablice 2. može se zaključiti da je najveća koncentracija ukupnih polifenola u sušenoj kadulji

(Rothwell i sur., 2013a). Podaci o polifenolima u hrani nalaze se na stranicama Phenol-Explorer iz kojih su i podaci u Tablici 2. i 3.

**Tablica 2.** Ukupni polifenoli kadulje (Rothwell i sur., 2013b)

| Uzorak                                              | Srednja vrijednost | Minimum (mg/100 g) | Maksimum (mg/100 g) | Standardna devijacija (mg/100 g) |
|-----------------------------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|----------------------------------|
| <b>Kadulja – čaj,</b><br>vodena otopina (mg/100 mL) | 43,2               | 43,2               | 43,2                | 0,0                              |
| <b>Kadulja, svježa</b><br>(mg/100 g)                | 185,0              | 134,0              | 198,0               | 45,3                             |
| <b>Kadulja, sušena</b><br>(mg/100 g)                | 2919,7             | 1360,0             | 4767,0              | 1701,6                           |

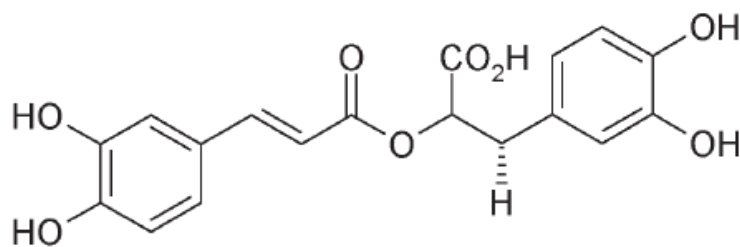
Kadulja je bogata spojevima di- i triterpenima, fenolnim kiselinama i flavonoidima (Lu i sur., 2002). Glavna antioksidativna sposobnost u eteričnom ulju najviše se prepisuje  $\alpha$ -tujon i  $\beta$ -tujonu, bornil acetatu i 1,8-cineolu (Hussain i sur., 2011,b) te ružmarinskoj i karnoskoj kiselini (Cuvelier i sur., 1996) (Tablica 3.). Udio tih kiselina u suhom pripravku kadulje značajno ovisi o genetičkim faktorima i okolišnim čimbenicima (Baskan i sur., 2006). Glavnina fenolnih kiselina odnosi se na kafeinsku kiselinu i njezine derivate koji sudjeluju u metabolizmu biljke (Kametou i sur., 2010).

**Tablica 3.** Polifenoli u svježoj i sušenoj kadulji (Rothwell I sur., 2013c)

| Polifenoli                     | kiseline            | Srednja<br>vrijednost<br>(mg/100<br>g) | Minimum<br>(mg/100 g) | Maksimum<br>(mg/100 g) | Standardna<br>devijacija<br>(mg/100 g) |
|--------------------------------|---------------------|----------------------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------------------|
| <b>Svježa kadulja</b>          |                     |                                        |                       |                        |                                        |
| Flavoni                        | Apigenin            | 2,40                                   | 2,40                  | 2,40                   | 0,00                                   |
|                                | Cirsimaritin        | 14,30                                  | 14,30                 | 14,30                  | 0,00                                   |
|                                | Hisoidulin          | 16,30                                  | 16,30                 | 16,30                  | 0,00                                   |
|                                | Luteolin            | 33,40                                  | 33,40                 | 33,40                  | 0,00                                   |
| Hidroksibenzojeva<br>kiselina  | Vanilinska          | 2,27                                   | 2,27                  | 2,27                   | 0,00                                   |
| Hidroksicinaminska<br>kiselina | Kafeinska           | 7,42                                   | 7,42                  | 7,42                   | 0,00                                   |
|                                | Ružmarinska         | 117,80                                 | 117,80                | 117,80                 | 0,00                                   |
| <b>Sušena kadulja</b>          |                     |                                        |                       |                        |                                        |
| Hidroksibenzojeve<br>kiseline  | Galna               | 5,25                                   | 0,00                  | 10,50                  | 7,42                                   |
|                                | Siriginska          | 3,35                                   | 0,00                  | 6,70                   | 4,74                                   |
|                                | Vanilinska          | 5,85                                   | 0,00                  | 11,70                  | 8,27                                   |
|                                | 5-<br>Kafeoilkvična | 19,85                                  | 16,70                 | 23,00                  | 4,45                                   |
|                                | Kafeinska           | 26,40                                  | 11,00                 | 40,00                  | 10,92                                  |
|                                | Ferulična           | 5,80                                   | 0,00                  | 11,60                  | 8,20                                   |
|                                | p- Kumarinska       | 4,95                                   | 0,00                  | 9,90                   | 7,00                                   |
|                                | Ružmarinska         | 610,25                                 | 250,00                | 1410,00                | 393,31                                 |
| Terpeni                        | Karnonska           | 525,86                                 | 299,00                | 716,00                 | 162,88                                 |

Ružmarinska kiselina pripada skupini fenolnih kiselina s obzirom na osnovnu podjelu (Dent i sur.,2015). Struktura se sastoji od dva polifenolna prstena koja imaju hidroksilnu grupu u orto položaju (Bektas i sur., 2005,a). Ona je ester kafeinske kiseline i 3,4-dihidroksifenillaktične kiseline. Između dva prstena nalazi se karboksilna i karbonilna grupa

povezane nezasićenom dvostrukom vezom (Slika 3.). Struktura se razlikuje od flavonoida što je i česta tema znanstvenih radova.



**Slika 3.** Ružmarinska kiselina (Bandoniene i sur., 2005)

Ima brojne biološke funkcije kao što je inhibicija HIV-1, antitumornu, antihepatitičku i protektivnu ulogu (Bektas i sur., 2005, b). Neka istraživanja pokazuju veliki antioksidativni kapacitet i sposobnost gašenja radikala (Petersen i Simmonds, 2003,a). Poznati su brojni derivati ružmarinske kiseline kao i produkti koji sadrže jednu ili više ružmarinskih kiselina uz dodatak druge aromatske kiseline (Petersen i Simmons, 2003,b). Najpoznatiji ružmarinski derivati su litospermična kiselina, konjugat ružmarinske i kafeinske kiseline, litospermična kiselina B, dimer ružmarinske kiseline (Kelley i sur., 1975). Osim u kadulji, ružmarinska kiselina je značajno prisutna i u drugim aromatkism biljkama pa nije pogodna za upotrebu kao kemotaksonomični marker (Petersen i Simmens, 2003,c).

## 2.3. Medicinska upotreba kadulje

Upotreba kadulje u medicinske svrhe, je vrlo duga. Nekoliko studija predlaže upotrebu jer je zabilježena farmakološka kao i terapijska aktivnost kao što je antioksidativna, antupalna i antivirusna sposobnost (Hamidpour i sur., 2014c). U studiji Abdelkader i sur., 2014 dokazali su antibakterijsku funkciju eteričnih ulja kadulje posebno prema *E. coli*, *B. cereus* i *Candida albicans*. U daljnjem tekstu naveden je utjecaj kadulje na neke od bolesti.

### 2.3.1. Kadulja i kognitivni pad

Pored brojnih ljekovitih bilja kadulja je poznata po svojem benefitu na poremećaje memorije, depresiju i cerebralnu ishemiju (Imanshadi i Hosseinzadeh, 2006). *Salvia lavandulaefolia*, *Salvia officinalis* i *Salvia miltiorrhiza* stoljećima se koristi kod smanjenje mentalne funkcije kao što je demencija (Alzheimerova bolest) (Perry i sur., 2003). Demencija je vrlo česta kod starije populacije koja se manifestira na kvalitetu i dužinu života, a ovisi i o stupnju bolesti. Ona je posljedica nedostatka vitamina B skupine, posebice folata te n-3-masnih kiselina.

Proučavanjem utjecaja kadulje na kognitivni pad, brojni radovi zaključuju da je enzim acetil-kolinesteraza odgovoran za smanjenje i inaktivaciju acetil kolina (Ferreira i sur., 2006) koji je neurotransmitter u prijenosu impulsa. Upravo u tom koraku „leži“ pozitivan učinak kadulje. Sastojci kadulje inhibiraju aktivnost enzima za 46% uz koncentraciju eteričnog ulja 0,5 mg/ml (Ferreira i sur., 2006). Citoprotektivni efekt kadulje protiv toksičnih tvari u živčanim stanicama također utječe na manju pojavnost Alzheimerove bolesti (Hamidpour i sur., 2014d). Velika koncentracija rosmarinične kiseline u kadulji pokazuje i neuroprotektivnu funkciju (Hamidpour i sur., 2014e) pa postoji mogućnost da se koristi kao tretman kod demencije.

### **2.3.2. Kadulja i dijabetes**

Šećerna bolest ili *diabetes mellitus* metabolički je poremećaj višestruke etiologije obilježen stanjem kronične hiperglikemije s poremećajem metabolizma ugljikohidrata, masti i proteina zbog oštećene sekrecije inzulina i/ili djelovanja inzulina. To je kronična neizlječiva bolest koja se liječi dobrom regulacijom razine glukoze što značajno poboljšava kvalitetu i duljinu života. Kadulja se dulje vrijeme koristi za normalizaciju razine glukoze što su pokazali životinjski modeli (Christenesi sur., 2010,a). Studije pokazuju da konzumacija čaja od kadulje (300 ml, dva puta dnevno) značajno poboljšava antioksidacijsku sposobnost, poboljšani lipidni profil bez hepatoksičnih posljedica ili promjena krvnog tlaka i tjelesne mase koje bi pogoršale dijabetes (Sa i sur., 2009). Čaj od kadulje pokazuje rezultate kod liječenja dijabetesa kao i lijek metformin (Christenes i sur., 2010,b).

### **2.3.3. Kadulja i rak**

Rak je bolest koju karakterizira hiperproliferacija stanica bez kontrole koje mogu metastazirati po cijelom organizmu. Bitan faktor u proliferaciji stanica je mogućnost proizvodnje velikog broja krvnih stanica što je poznato kao anigogeneza (Carmelitet, 2003). Ekstrakt *S. officinalis* u farmakološkim koncentracijama inhibira angiogenezu *in vivo* (Keshavarz i sur., 2011), što bi mogao biti novi korak u istraživanju raka. Urosalna kiselina značajno inhibira angiogenezu, rast i metastazu tumorskih stanica (Jedinak i sur., 2006).

### **2.3.4. Kadulja i kardiovaskularne bolesti**

Kardiovaskularne bolesti su bolesti srca i krvnih žila, a u svojoj podlozi imaju aterosklerozu. Na oštećenim dijelovima arterija dolazi do nakupljanja oksidiranog LDL-a što dovodi do



aktivacije imunskog sustava. Takve promijene na stijenci žila uzrokuju proliferaciju glatkog mišićja, a to dovodi do smanjenja presjeka žile. Prehrana i njezini sastojci bitno utječu na serumske lipoproteine, a time i na prevenciju i liječenje dislipidemije. Brojna istraživanja dokazuju da ekstrakt kadulje može sniziti LDL i ukupne trigliceride, a povećati razinu HDL kolesterola (Christenes i sur., 2010,c). Djeluje na način da aktivira peroksisom proliferaciju koji je gama receptor za gen koji je uključen u energetske potrošnju i metabolizam, reducirajući adipozno tkivo i inzulinsku rezistenciju (Christenes i sur., 2010,d).

### **2.3.5. Kadulja i anti-osteoporotski efekt**

Manjak estrogena i kalcija u menopauzi dovodi do manje mineralne gustoće kostiju. Osteoporoza je bolest koju je moguće spriječiti adekvatnim unosom kalcija tijekom života kako bi se postigla veća vršna koštana masa. Dosadašnja istraživanja pokazuju pozitivan efekt suplementacije prehrane na povećanu koštanu masu (Muhlauber i sur., 2003,a). Monoterpeni i eterična ulja utječu direktno na koštane stanice na način da potiču resorpciju kostiju te su najbolji rezultati zabilježeni nadopunom prehrane kalcijem i kaduljom (Muhlauber i sur., 2003,b). Polifenoli pripadaju fitoestrogenima (Zhou i sur., 2003) koji su biljne komponente strukturno slične estrogenu, a djeluju kao zaštita od gubitka koštane mase. Točan mehanizam još nije do kraja otkriven i objašnjen.

Svi ovi pozitivni učinci kadulje pokazuju njezino blagotvorno djelovanje na organizam. Upravo zbog toga kadulja se može svrstati u funkcionalnu hranu koja se prema IFIC (International Food Information Council) definira kao ona hrana koja pruža veću dobrobit za zdravlje nego osnovna hrana.

### **2.3.6. Kadulja u prehrani**

Kadulja ima veliki utjecaj na ljudski organizam kao što je već ranije spomenuto. Upravo zbog toga postoje brojni recepti s kaduljom od kojih je vjerojatno najpoznatiji čaj od kadulje. U Tablici 2. prikazani su samo neki od njih. Brojni radovi proučavali su udio polifenola u vodenim otopinama kadulje. Jedan od njih je i rad Walch G. S. i sur, 2011 koji pokazuje raspon polifenola, ovisno o brendu. Posebna odstupanja su vidljiva u najzastupljenijoj ružmarinskoj kiselini.

**Tablica 4.** Upotreba kadulje u prehrani (Gerovac,2013)

| Pripravak            | Način pripreme                                                                               | Utjecaj na zdravlje                                             |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Čaj od kadulje       | Jedna čajna žličica kadulje stavi se u proključalu vodu i nastavi se lagano kuhati 3 minute. | Bolesti dišnih puteva                                           |
| Kaduljin oparak      | Osušeni listovi preliju se ključalom vodom                                                   | Bolesti usne šupljine                                           |
| Kadulja u mlijeku    | Osušeni listovi preliju se toplim mlijekom i zasladi medom.                                  | Problemi sa kašljem.                                            |
| Tinektura od kadulje | Usitnjeni list prelije se 70% etanolom                                                       | Kod svih zdravstvenih problema u ljekovitom djelovanju kadulje. |
| Oblozi               | Svježu kadulju staviti u zavoj.                                                              | Za rane.                                                        |
| Kaduljino vino       | Usitnjene listove prelitati kvalitetnim crnim vinom                                          |                                                                 |

## 2.5. Probavni sustav

Probavni sustav čovjeka može se zamisliti kao povezana cijev, koja ovisno o dijelu, vrši razgradnju, apsorpciju te izlučivanje tvari. Sastoji se od usta, ždrijela, jednjaka, želuca, tankog i debelog crijeva. Uz te organe, u probavi sudjeluju i dvije žlijezde gušterača i jetra (Guyton i Arthour, 1994a).

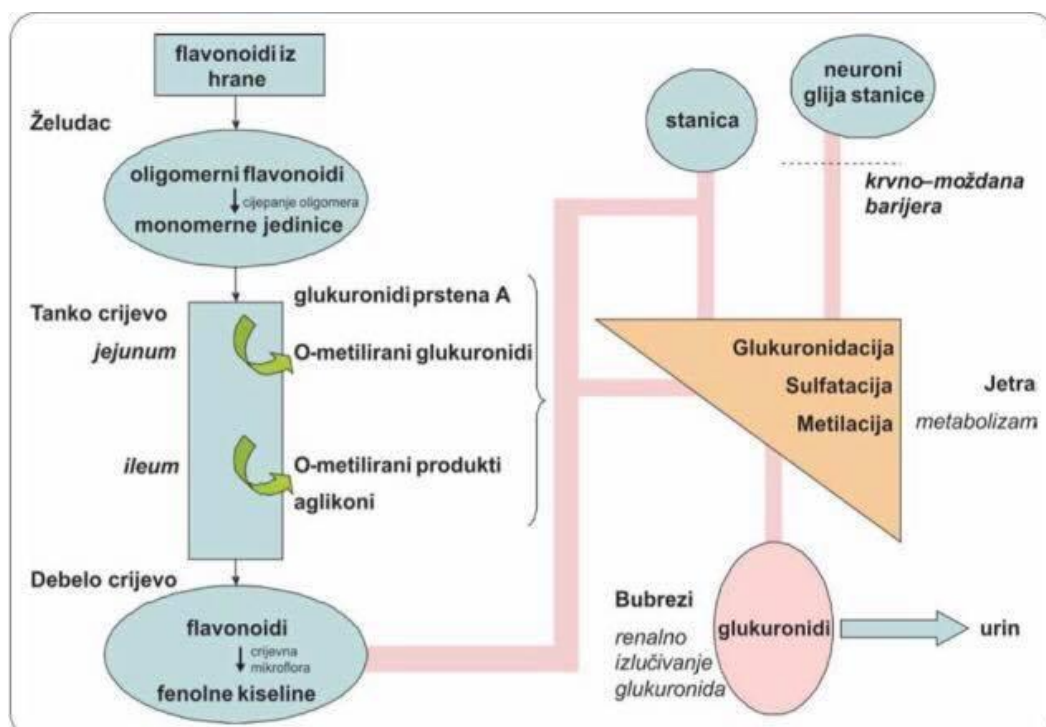
Usta su početni dio probave koja imaju puno funkcija. To se prvenstveno odnosi na žvakanje pomoću zubi koji usitnjavaju hranu zbog kasnije lakše razgradnje. Također, u ustima se nalaze i žlijezde slinovnice. Slina služi za oblikovanje zalogaja, lakše gutanje hrane i najbitnije, sadrži  $\alpha$ -amilazu.  $\alpha$ -amilaza je enzim zaslužan za razgradnju oligo- i polisaharida. Nakon što hrana dospije u želudac, potiče lučenje želučane kiseline koja se sastoji od HCl (Guyton i Arthour, 1994b). Ona je vrlo bitna u razgradnji proteina jer potiče aktivaciju pepsinogena u pepsin koji samo u takvom obliku vrši razgradnju. Također, HCl stvara nepovoljne uvjete koji uništavaju mikroorganizme u hrani, ali i inaktivira enzime iz usta. U tankom crijevu slijedi završna razgradnja ugljikohidrata i proteina te započinje razgradnja masti u kojoj dodatno potpomažu jetra i gušterača. Žučne soli omogućavaju razbijanje masnih kapljica što poboljšava razgradnju. Gušterača proizvodi razne probavne enzime

(lipaze, amilaze, peptidaze) i hidrogenkarbonatne ione koji neutraliziraju hranu pristiglu iz želuca. U debelom crijevu apsorbiraju se nutrijenti i voda, a ostatak hrane u obliku fecesa izlazi iz organizma.

### **2.5.1. Metabolizam polifenola**

Kako bi se razumjela biodostupnost polifenola potrebno je istražiti kakav je njihov metabolički put u probavilu. Polifenoli su nakon unosa izloženi uvjetima i enzimima probavnog sustava pa je to i razlog pada njihove koncentracije u krvi.

Reakcije kojima su najčešće izloženi polifenoli su hidroliza, dehidroksilacija, demetilacija, cijepanje prstena i brza dekonjugacija (Spencer, 2003a). Za razliku od enzima čovjeka, enzimi mikroflore kataliziraju razgradnju flavonoida u jednostavnije molekule poput fenolnih kiselina (Spencer, 2003b). Nakon unosa polifenola, već u usnoj šupljini dolazi do hidrolize flavonoidnih glikozida s glukoznim šećernim jedinicama (Walle i sur., 2005.). Nakon toga uneseni polifenoli dopijevaju do želuca gdje se događa vrlo slaba apsorpcija jednostavnih fenolnih kiselina. U želucu se odvija cijepanje oligomernih polifenolnih struktura u monomerne jedinice (Spencer, 2003c). Sve vrste flavonoidina podliježu intenzivnom metabolizmu u tankom crijevu, a njihovi metaboliti jetrenom portalnom venom dolaze u jetru gdje se dalje metaboliziraju (Spencer, 2003d). Promjene u početnom dijelu gastrointestinalnog trakta nisu toliko značajne te polifenoli u tanko crijevo uglavnom dopijevaju u nepromijenjenom obliku (Spencer, 2003e). U debelom crijevu događa se razgradnja polifenola u jednostavne fenolne kiseline koje se apsorbiraju, dok se neapsorbirane izlučuju putem bubrega (Slika 4.) (Spencer, 2003f).



**Slika 4.** Prikaz razgradnje flavonoida u probavnom sustavu čovjeka (Spencer, 2003g)

Brojni čimbenici utječu na apsorpciju polifenolnih spojeva i njihovih metabolita. Pri tom najveći utjecaj na intestinalnu apsorpciju pokazuju parametri kao što su molekulska masa, glikozilacija i esterifikacija (Spencer, 2003h). Molekulska masa i apsorpcija su obrnut proporcionalne veličine, tj. povećanjem mase smanjuje se apsorpcija.

### **3. Eksperimentalni dio**

Zadatak eksperimentalnog rada je bio odrediti početni udio ukupnih polifenola u kadulji ABTS metodom te njihovu promjenu u vremenu pri imitiranim uvjetima probave.

#### **3.1. Materijali**

Kao materijal u ovom radu korištena je kadulja u osušenom obliku i vodeni ekstrakt kadulje. Kadulja, kupljena u specijaliziranoj biljnoj trgovini (Suban d.o.o., Strmec, Hrvatska), prikupljena je u sjeverozapadnom dijelu Hrvatske za vrijeme cvatnje 2015. godine, osušena i prikladno skladištena.

#### **3.2. Metode**

##### **3.2.1. Ekstrakcija aktivnih spojeva**

###### Princip metode

Ekstrakcija biološki aktivnih spojeva temelji se na denaturaciji stanične membrane i otpuštanju molekula s biološkom aktivnošću (Kaushik i sur., 2010).

###### Reagensi

Destilirana voda

Osušeni uzorak kadulje

###### Aparatura i pribor

Uljna kupelj s inegriranom mješalicom (IKA HBR, Njemačka)

Staklena čaša volumena 200 mL

Termometar

Stakleni ljevak

celulozni filter papir

###### Postupak rada

U staklenu čašu od 200 ml dodaje se izvagani uzorak osušene kadulje od 2 g nakon čega se prelije s 100 ml deionizirane vode prethodno zagrijane na specifičnu temperaturu. Temperatura se održavala pomoću Ika HBR4 digitalne uljane kupelji pri određenoj brzini

miješanja. Optimalni uvjeti za ekstrakciju uzeti su prema radu Jurinjak Tušek i sur., 2016 što je rezultiralo ekstraktima s najvećim ukupnim udjelom fenolnih komponenata i antioksidativnom sposobnošću. Ekstrakcija se provodila pri 80° C kroz 90 min uz brzinu miješanja od 500 o/min. Filtracijom dobivenih ekstrakata kroz celulozni filter papir nakon isteka vremena, odvajaju se tekući dio od krutog koji bi mogao smetati u kasnijoj analizi ili oštetiti aparaturu. Nakon provedene ekstrakcije određuje se udio ukupnih polifenola i njihov antioksidativni kapacitet.

### **3.2.2. Određivanje udjela ukupnih polifenola**

#### Princip rada

U vodenim ekstraktima kadulja određivan je udio biološki aktivnih spojeva, antioksidativna aktivnost i udio polifenola. Udio polifenola određen je upotrebom Folin-Ciocalteu reagensa. Reagens stvara plavo obojani kompleks sa polifenolima, a obojenje je proporcionalno koncentraciji fenola. Reagens se sastoji od fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline koje se reduciraju u reakciji dok se fenoli oksidiraju.

#### Reagensi

Folin-Ciocalteu reagens(pomiješan u omjeru s vodom 1:2)

20% otopina natrijeva karbonata

#### Aparatura i pribor

Staklene epruvete

Stalak za epruvete

Staklene pipete volumena 10 mL

Mikropipeta volumena 100 µL i 500 µL

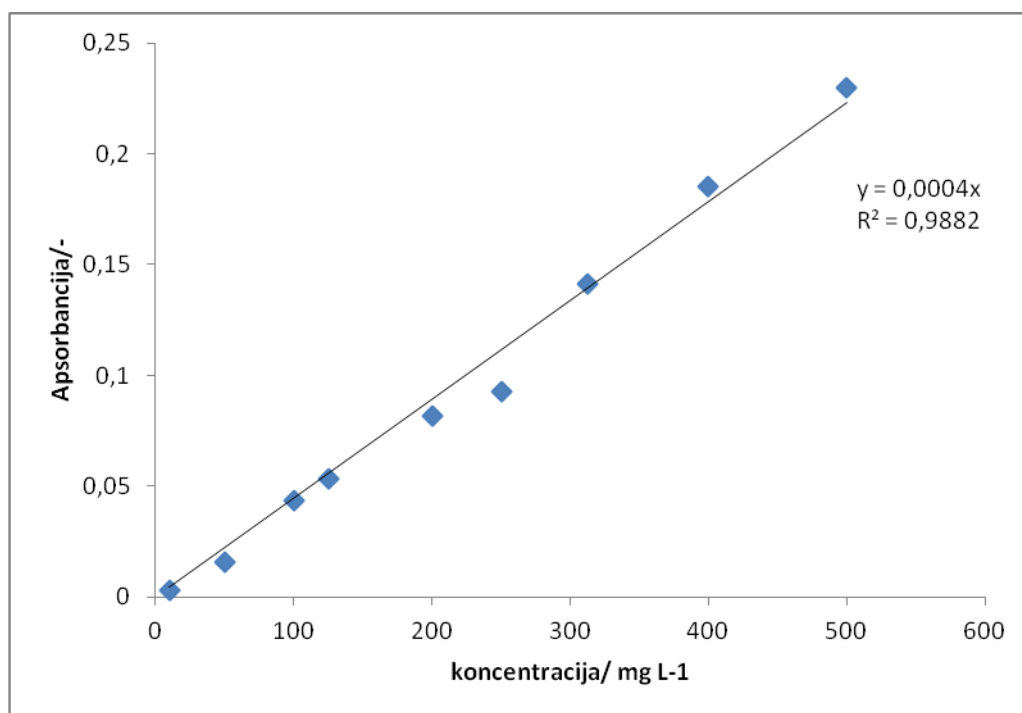
Kiveta za spektrofotometrijsko mjerenje

Spektrofotometar

#### Postupak rada

U epruvetu se dodaje redom 7,9 ml destilirane vode, 100 µl uzorka, 500 µl Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>. Uzorak stoji 2 sata na sobnoj temperaturi tijekom čega se odvija reakcija. Nakon toga mjeri se apsorbancija na spektrofotometru pri 765nm. Također,potrebno je pripremiti i slijepu probu u koju umjesto uzorka ide destilirana voda dok su svi ostali

sastojci isti. Analiza određivanja ukupnih fenola je provedena dva puta te su rezultati izraženi kao mg galne kiseline (GAE) po 10 mL vodene otopine uzorka. Udio ukupnih polifenola računa se prema baždarnom dijagramu koji se dobiva pripremom otopina galne kiseline različitih koncentracija.



**Slika 5.** Baždarni pravac za galnu kiselinu

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0008x$$

gdje je:

y– apsorbancija pri 765 nm,

x – koncentracija galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

$R^2$ - koeficijent determinacije

### **3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom**

#### Princip rada

ABTS metoda temelji se na „gašenju“ radikala. Mjeri se smanjenje apsorbancija ABTS radikala dodatkom različitih antioksidansa te se uspoređuje smanjenje apsorbancija koju uzrokuje dodatak Troloxa, analoga vitamina E.

#### Reagensi

Etanol (96%)

140 mM otopina amonijeva peroksodisulfata

7mM otopina 2,2-azobis(3-etilbenzolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeve soli (ABTS)

6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox)

#### Aparatura i pribor

Odmjerna tikvica volumena 100 mL

Pipeta volumena 2 mL

Mikropipeta volumena 0-100  $\mu$ L

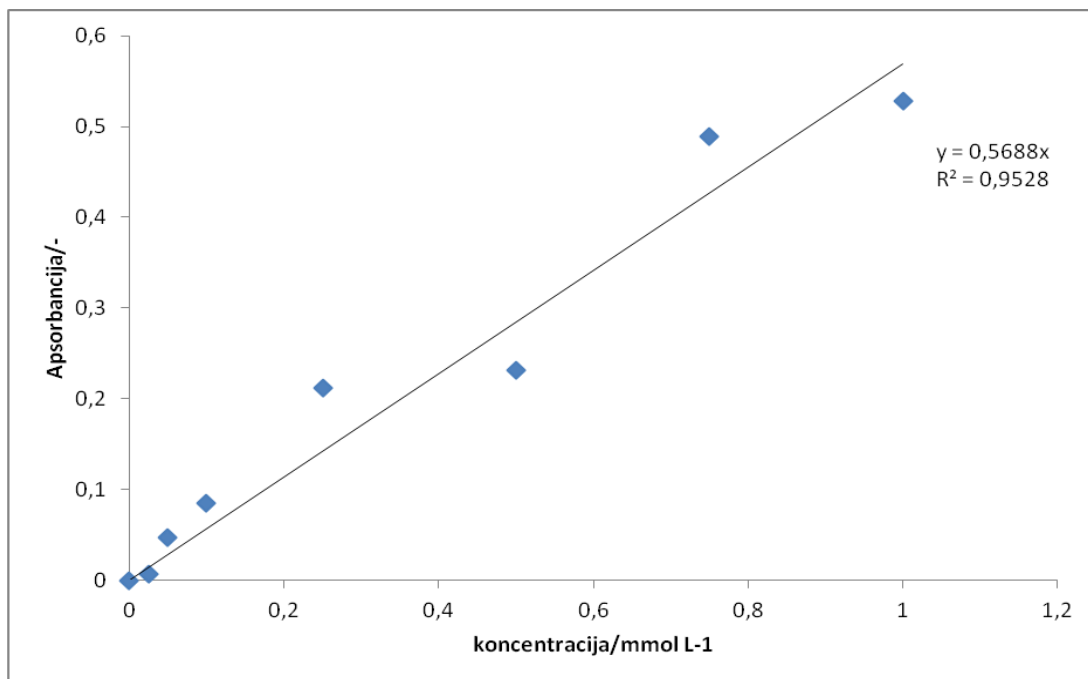
Kiveta za spektrofotometrijsko mjerenje

Spektrofotometar

#### Postupak rada

Pripremi se otopina ABTS na način da se u 7 mM vodene otopine ABTS dodaje 140 mM amonijeva peroksodisulfata. Pripremljena otopina se ostavi stajati preko noći, a zatim se razrijedi etanolom (96%) do koncentracije od 1% tako da apsorbancija otopine mjerene na spektrofotometru pri 734 nm iznosi  $0,7 \pm 0,02$ . U 4 ml pripremljene otopine ABTS radikala dodaje se u 40  $\mu$ l razrijeđenog uzorka te se mjeri apsorbancija na 734 nm uz etanol kao slijepu probu.





**Slika 6.** Baždarni dijagram za ABTS metodu

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,5688x$$

gdje je:

y– apsorbancija pri 734 nm,

x – koncentracija Trolox ( $\text{mm L}^{-1}$ ).

$R^2$ - koeficijent determinacije

#### Izračun i izražavanje rezultata

Oduzimanjem apsorbancija uzorka od apsorbancija slijepe probe dobiva se apsorbancija koja se prema baždarenom pravcu za Trolox preračunava u koncentraciju. Rezultati su prikazani kao mmol/g suhe tvari biljke.

### 3.2.4. In vitro model simulacije probavnog sustava

#### Princip rada

Vodeni ekstrakti kadulje izloženi su probavnim enzimima kako bi se vidio njihov utjecaj na koncentraciju polifenola prilikom prolaska kroz probavni sustav.

#### Reagensi

0,05 mol/L fosfatni pufer, pH = 6,9

0,01 mol/L HCl

Suspenzija pankreatina u fosfatnom puferu (8 g/L)

Suspenzija žučnih soli u fosfatnom puferu (50 g/L)

Enzimi:  $\alpha$ -amilaza iz *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich, Švicarska), pepsin (Fisher Scientific, Velika Britanija), pankreatin iz svinjske jetre (Sigma-Aldrich, Švicarska)

#### Aparatura i pribor

Uljna kupelj s integriranom mješalicom (IKA HBR, Njemačka)  
kivete

#### Postupak rada

Postupak rada baziran je na metodi Ortega i sur., 2011.

Priprema otopina: pripremi se 200 mL fosfatnog pufera i 20 mL 0,01M HCl otopine.

Usta

Otopi se 40 mg  $\alpha$ -amilaze u 40 mL fosfatnog pufera s 0,04 % masenog udjela NaCl i 0,004 %  $\text{CaCl}_2$ . Čaša u kojoj se nalazi amilaza i pufer stavi se u uljnu kupelj i zagrije na 37 °C. Kada je postignuta temperatura dodaje se 4 grama uzorka (vodeni ekstrakt kadulje) i inkubira 5 minuta nakon čega se uzima 500  $\mu\text{L}$  uzorka iz otopine i razrjeđuje u kivetu s 500  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Kiveta se odmah stavlja u smjesu vode i leda kako bi se ohladila.

Želudac

Nakon 5 minuta inkubacije podesi se pH vrijednost na 2 dodatkom koncentrirane HCl. Nakon što je pH vrijednost podešena dodaje se suspenzija pepsina (690 mg pepsina otopljeno u 4

mL 0,01 mol/L HCl) u reakcijsku smjesu i inkubira se 2 sata na 37 °C. Nakon inkubacije uzima se 500 µL uzorka iz reakcijske smjese i razrijedi se u kiveti s 500 µL destilirane vode. Kiveta se odmah stavlja u smjesu vode i leda kako bi se ohladila.

#### Tanko crijevo

Podesi se pH vrijednost reakcijske smjese na 6,5 dodatkom  $\text{NaHCO}_3$  i doda se 10 mL suspenzije pankreatina (0,08 grama pankreatina u 10 mL fosfatnog pufera) i 10 mL suspenzije žučnih soli (0,5 g žučnih soli u 10 mL fosfatnog pufera). Inkubira se 2 sata pri 37°C nakon čega se uzima 500 µL uzorka iz reakcijske smjese i razrijedi se u kiveti s 500 µL destilirane vode. Kiveta se odmah stavlja u smjesu vode i leda kako bi se ohladila.

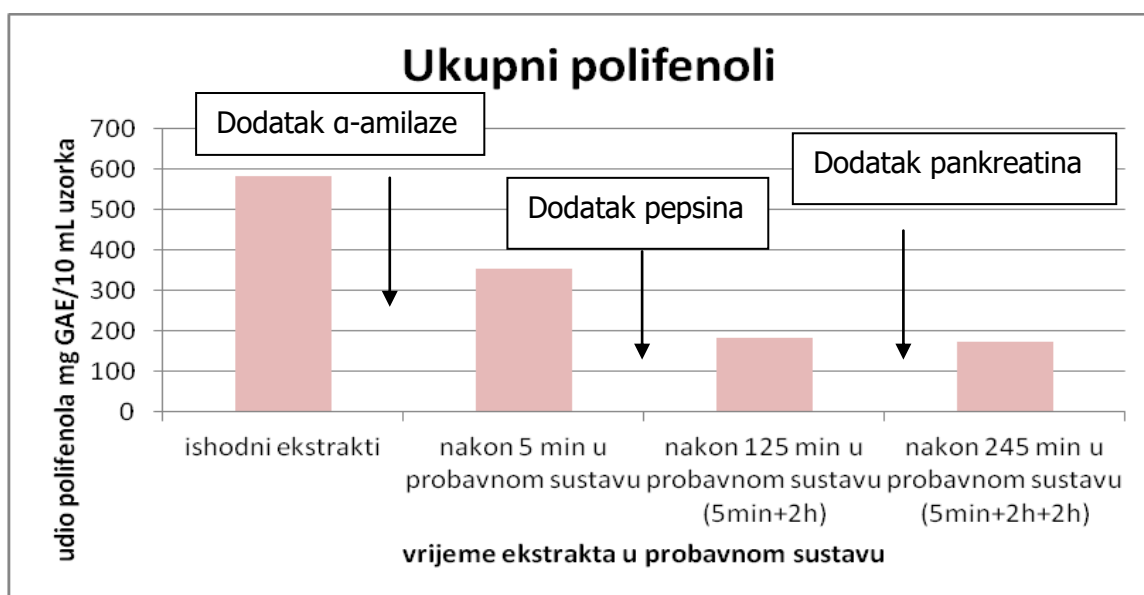
## 4. Rezultati i rasprava

U ovom radu istraživanja su provedena na kadulji sa područja RH. Kadulja je bila u sušenom obliku od kojeg su napravljeni vodeni ekstrakti. Istraživanja su se fokusirala na određivanje udjela ukupnih polifenola kojima se prepisuju medicinski učinci na organizam. Također, određivan je udio polifenola u uzorcima koji su određeno vrijeme proveli u uvjetima kakvi su u probavnom sustavu. Prilikom istraživanja koristila se je spektrofotometrijska metoda za određivanje ukupnih polifenola, a za dokazivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS metoda.

### 4.1. Udio ukupnih polifenola

Metoda se temelji na principu reakcije fenola s Folin-Ciocalteu reagensom, tj. na razvijanju boje koja je proporcionalna koncentraciji.

Rezultati dobiveni spektrofotometrijskom metodom prikazani su na Slici 4. Iz tih podataka se može zaključiti da je najveća koncentracija polifenola u ishodišnoj vodenoj otopini koja nije tretirana probavnim enzimima. Također, smanjenje udjela polifenola je proporcionalno vremenu zadržavanja u probavi. Nakon 5 minuta pri čemu je vodeni ekstrakt kadulje tretiran samo jednim enzimom ( $\alpha$ -amilaza) udio polifenola se smanjio za 39,5%. Takav pad je zabilježen i u daljnjem vremenu prilikom djelovanja enzima pepsina (nakon 125 min) te se ta koncentracija kasnijim djelovanjem pankreatina do kraja nije značajno promijenila.

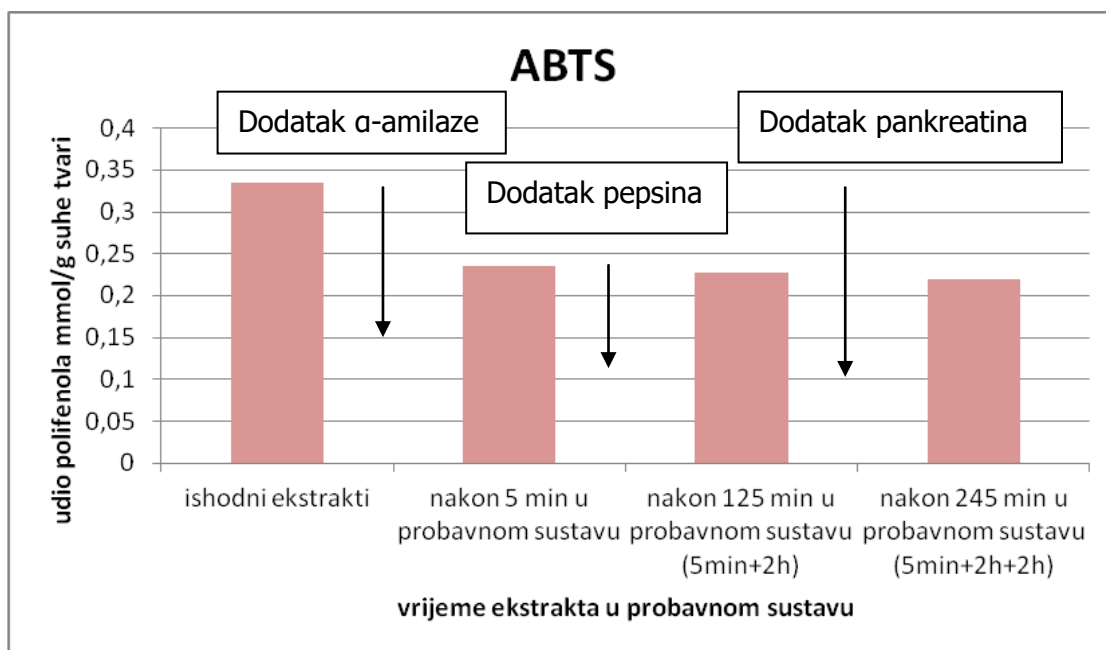


**Slika 7.** Promjena udjela polifenola u ovisnosti o vremenu u probavnom sustavu

Udio polifenola u ishodišnom uzorku iznosi 583 mg GAE/10 ml uzorka što je u usporedbi s literaturni podacima veća koncentracija ukupnih polifenola (Rothwell i sur., 2013). Nakon *in vitro* modela simulacije probavnog sustava koncentracija ukupnih polifenola pala je na 29,5%.

## 4.2. Antioksidativna aktivnost ABTS metodom

Najbitnije svojstvo polifenolnih molekula je sposobnost antioksidacije slobodnih radikala, tj. njihovo gašenje. To svojstvo mjerilo se ranije opisanom ABTS metodom te su rezultati prikazani na Slici 5., a izraženi su kao mmol Trolox-a/g biljnog materijala. Zabilježeno je smanjenje antiosidativne sposobnosti polifenola tijekom vremena u probavnom sustavu. Antioksidativna sposobnost uzorka nakon tretiranja enzimom  $\alpha$ -amilazom (nakon 5 minuta) smanjila se je za 32% u usporedbi sa ishodišnim uzorkom. Djelovanje ostalih enzima probavnog sustava pepsina i pankreatina nije imalo značajniji utjecaj na daljni pad antioksidacijske sposobnosti jer je konačno zabilježena razlika iznosila manje od 0,08% u odnosu na prvih 5 minuta.



**Slika 8.** Promjena antioksidativne sposobnosti polifenola u ovisnosti o vremenu u probavnom sustavu

Prema istraživanju Chen i sur.,2013 provedenom na nekoliko uzoraka čajeva, rezultati pokazuju značajniji pad antioksidativne sposobnosti koji se kreće od 26-42%, dok je najznačajnija razlika od 68% ishodišnog uzorka i uzorka nakon simulirane probave u čaju od jasmína. Prema rezultatima Mantle i suradnika, 2000 koji su mjerili antioksidativnu sposobnost kod 39 biljaka, dobivene vrijednosti za kadulju su se kretale  $0,32 \pm 0,07$  mmol Trolox-a/g biljnog materijala što odgovara rezultatima ove analize.

## 5. Zaključak

Kadulje je biljka široko rasprostranjena u svijetu pa i u RH te su brojne njezine upotrebe u prehrani. Upravo je i to razlog velikog broja istraživanja.

Kadulja se prema svojem sastavu može svrstati u funkcionalnu hranu zbog pozitivnog učinka na zdravlje.

Kadulja sadrži veliki broj fenolnih spojeva koji se svrstavaju u sekundarne metabolite biljke, no prema sadržaju se najviše ističe ružmarinska kiselina.

Utječe na prevenciju mnogih bolesti, a posebno se ističe prevencija raka, dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti. Novija istraživanja pokazuju i anti-osteoporotski efekt koji se također prepisuje polifenolima.

Biodostupnost polifenola se mijenja kako oni prolaze kroz probavni sustav te je vrlo bitno poznavanje mehanizama djelovanja na polifenolne komponente, ali i njihovu interakciju sa drugim sastojcima iz hrane.

$\alpha$ -amilaza, kao prvi od enzima *in vitro* simuliranog probavnog sustava, ima najveći utjecaj na koncentraciju ukupnih polifenola gdje je zabilježen pad od 39,5% te na antioksidacijsku aktivnost gdje je zabilježen pad od 32 %

Utjecaj ostalih enzima (pepsin i pankreatin) bio je puno niži te se na kraju *in vitro* simuliranog probavnog sustava koncentracija ukupnih polifenola snizila na 29.5 %, dok je antioksidacijska aktivnost ostala gotovo nepromijenjena 31,92 %.

## 6. Popis literature

1. Abdelkader, M., Ahcen, B., Rachid, D., & Hakim, H. (2014) Phytochemical Study and Biological Activity of Sage (*Salvia officinalis* L.). *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, **8**(11), 1231-1235
2. Arthur C., Guyton M.D.(1994)Fiziologija čovjeka i mehanizam bolesti. U: Medicinska naklada Zagreb,5. izd., Andreis I., Andreis A., ur.,str 452-477.
3. 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
4. Bandoniene, D., Murkovic, M., & Venskutonis, P. R. (2005) Determination of rosmarinic acid in sage and borage leaves by high-performance liquid chromatography with different detection methods. *Journal of chromatographic science* **43**(7): 372-376.
5. Baskan S., Oztekin N., Bedia Erim F. (2006) Determination of carnosic acid and rosmarinic acid in sage by capillary electrophoresis. *Food Chemistry* **101**:1748–1752.
6. Bektas T., Eminagaoglu O., Askin Akpulat H., Enes A.(2006) Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. *Food Chemistry* **100**:985–989.
7. Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science* **161**(5):839-851.
8. Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **56**:317–333
9. Carmeliet, P. (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine* **9**(6):653.
10. Chen, G. L., Hu, K., Zhong, N. J., Guo, J., Gong, Y. S., Deng, X. T., ... & Gao, Y. Q. (2013) Antioxidant capacities and total polyphenol content of nine commercially



available tea juices measured by an in vitro digestion model. *European Food Research and Technology* **236**(2):303-310.

11. Christensen, K. B., Jørgensen, M., Kotowska, D., Petersen, R. K., Kristiansen, K., & Christensen, L. P. (2010) Activation of the nuclear receptor PPAR $\gamma$  by metabolites isolated from sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of ethnopharmacology* **132**(1):127-133.
12. Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H.(2006) Plant Secondary Metabolites- Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Blackwell Publishing Ltd., Oxford- Velika Britanija
13. Cuvelier, M. E., Berset, H., Richard, H. (1996) Antioxidative activity of phenolic compounds of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of American Oil Chemical Society* **73**:645–652.
14. Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Elez Garofulić, I., Bosiljkov, T., Ježek, D., & Brnčić, M. (2015) Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction techniques on mass fraction of phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **29**(3):475-484.
15. Dragland, S., Senoo, H., Wake, K., Holte, K., & Blomhoff, R. (2003) Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *The Journal of nutrition* **133**(5):1286-1290.
16. Ferreira A., Proenca C., Serralheiro M., Araujo M. (2006) The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology* **108**:31-37.
17. Generalić, I., Skroza, D., Ljubenković, I., Katalinić, A., Burčul, F., & Katalinić, V. (2011) Influence of the phenophase on the phenolic profile and antioxidant properties of Dalmatian sage. *Food chemistry* **127**(2):427-433.
18. Generalić, I., Skroza, D., Šurjak, J., Možina, S. S., Ljubenković, I., Katalinić, A., Katalinić, V. (2012) Seasonal variations of phenolic compounds and biological properties in sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemistry and biodiversity* **9**(2):441-457.
19. Gerovac M. <<http://dobarzivot.net/zdravlje/ljekovito-bilje/kadulja-sto-lijeci-recepti-za-pripravu-od-caja-rakije-vina-do-umaka-sira-i-cipsa>> pristupljeno 23. Lipnja 2017.

20. Hamidpour, M., Hamidpour, R., Hamidpour, S., & Shahlari, M. (2014) Chemistry, pharmacology, and medicinal property of sage (salvia) to prevent and cure illnesses such as obesity, diabetes, depression, dementia, lupus, autism, heart disease, and cancer. *Journal of traditional and complementary medicine* **4**(2):82-88.
21. Hussain A, Anwar F, Iqbal T, Bhatti I. (2011) Antioxidant attributes of four Lamiaceae essential oils. *Pak J Bot.* **43**:1315-21
22. IFIS (2007) Food Science Central, IFIS- International Information Service, <<http://www.foodsciencecentral.com>> Pristupljeno 23. lipnja 2017.
23. Imanshahidi, M., & Hosseinzadeh, H. (2006) The pharmacological effects of Salvia species on the central nervous system. *Phytotherapy Research* **20**(6):427-437.
24. Jedinák, A., Mučková, M., Košťálová, D., Maliar, T., & Mašterová, I. (2006) Antiprotease and antimetastatic activity of ursolic acid isolated from Salvia officinalis. *Zeitschrift für Naturforschung C* **61**(11-12): 777-782.
25. Kamatou P, Viljoen A, Steenkamp P. (2010) Antioxidant, anti-inflammatory activities and HPLC analysis of South African Salvia species. *Food Chemistry* **119**:684-688.
26. Kaushik, R., Pradeeo, N., Vamshi, V., Geetha, M., Usha, A. (2010) Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. *Journal of Food Science and Tehcnology* **47**:27-33.
27. Kelley C. J., Mahajan J. R., Brooks L.C., Neubert L.A., Breneman W. R., Carmack M. (1975) Polyphenolic acids of Lithospermum ruderae Dougl. ex Lehm. (Boraginaceae). 1. Isolation and structure determination of lithospermic acid. *Chemischer Informationsdienst* **6**(40): 1804-1815.
28. Keshavarz M., Bidmeshkipour A., Mostafavi A., Mansouri K., Mohamadi-Motlagh H. (2011) Anti tumor activity of Salvia officinalis is due to its anti-angiogenic, anti-migratory and anti-proliferative effects. *Cell Journal* **12**: 477-482.
29. Kliebenstein D. J., Osbourn A. (2012) Making new molecules-evolution of pathway for novel metabolites in plants. *Current Option in Plant Biology* **15**:415-423.

30. Lu Y., Foo L. Y., (2000) Flavonoid and phenolics glycosides from *Salvia officinalis* L. *Phytochemistry* **55**:263-267.
31. Lu, Y., Foo, L. Y. (2002) Polyphenolics of *Salvia*. *Phytochemistry* **55**:263–267.
32. Mijatović E. <<http://www.gortanonline.org/medicina-i-zdravlje/cudotvorna-spasiteljica-kadulja>> Pristupljeno 23. Lipnja 2017.
33. Mühlbauer, R. C., Lozano, A., Palacio, S., Reinli, A., & Felix, R. (2003) Common herbs, essential oils, and monoterpenes potentially modulate bone metabolism. *Bone* **32**(4):372-380.
34. Ortega N., Macià A., Romero M-P., Reguant J., Motilva M.-J.(2011) Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an in-vitro digestion model. *Food Chemistry* **124**:65-71.
35. Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2**(5):270-278.
36. Perry N.S., Bollen C., Perry E. K., Ballard C. (2003) *Salvia* for dementia therapy: Review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **75**: 651-659.
37. Petersen, M., Simmonds, M. S. J. (2003) Rosmarinic acid. *Phytochemistry* **62**:121–125.
38. Rami K., Zheng-Guo L.(2011) Antimicrobial activity of essential oil of *Salvia officinalis* L. collected in Syria. *African Journal of Biotechnology* **10**:8397-8402.
39. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine* **20**(7):933-956.
40. Sa C., Ramos A., Azevedo M., Lima C., Fernandes-Ferreira M., Pereira-Wilson C.(2009) Sage tea drinking improves lipid profile and antioxidant defences in humans. *International journal of molecular sciences* **10**:3937-3950
41. Scalbert, A., Williamson, G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* **130**(8):2073-2085.

42. Spencer, J.P. (2003) Metabolism of Tea Flavonoids in the Gastrointestinal Tract. *Journal of Nutrition* **133**:3255-3261.
43. Taarit, M. B., Msaada, K., Hosni, K., Hammami, M., Kchouk, M. E., & Marzouk, B. (2009) Plant growth, essential oil yield and composition of sage (*Salvia officinalis* L.) fruits cultivated under salt stress conditions. *Industrial Crops and Products* **30(3)**:333-337.
44. Toplak Galle K. (2001) Hrvatsko ljekovito bilje, *Scribd*, 213-317.
45. Tušek, A. J., Benković, M., Cvitanović, A. B., Valinger, D., Jurina, T., & Kljusurić, J. G. (2016) Kinetics and thermodynamics of the solid-liquid extraction process of total polyphenols, antioxidants and extraction yield from Asteraceae plants. *Industrial Crops and Products*, **91**: 205-214.
46. Urquiaga, I., Leighton F. (2000) Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological research* **33(2)**:55-64.
47. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* **39(1)**:44-84.
48. Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D. (1998) Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of agricultural and food chemistry* **46(10)**:4113-4117.
49. Walch, S. G., Ngaba Tinzoh, L., Zimmermann, B. F., Stühlinger, W., & Lachenmeier, D. W. (2011) Antioxidant capacity and polyphenolic composition as quality indicators for aqueous infusions of *Salvia officinalis* L.(sage tea). *Frontiers in pharmacology*, **2**:79.
50. Walle, T., Browning, A.M., Steed, L.L., Reed, S.G., Walle, U.K. (2005) Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *Journal of Nutrition* **135**:48-52.
51. Zhou, S., Turgeman, G., Harris, S.E. (2003) Estrogens activate bone morphogenetic protein-2 gene transcription in mouse mesenchymal stem cells. *Molecular Endocrinology* **17**: 56–66.

52. Židovec, V., Vršek, I., Kolak, I., Liber, Z., & Šatović, Z. (2005). Mirisava kadulja- Potencijalna vrsta za uređenje krajobraza. *Sjemenarstvo*, **23(1)**:45-56.
53. Pravilnik o ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji (2016) Narodne novine 19 (NN 19/2016)
54. Zakon o provedbi Uredbe Vijeća (EZ) br. 834/2007 o ekološkoj proizvodnji i označavanju ekoloških proizvoda Narodne novine 80/13, 14/14