

Bioraspoloživost fenolnih spojeva i bioaktivnost klica kupusnjača u modelu ljudske probave in vitro

Gagić, Sanja

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:963567>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Sanja Gagić

**BIORASPOLOŽIVOST FENOLNIH SPOJEVA I
BIOAKTIVNOST KLICA KUPUSNJAČA U MODELU LJUDSKE
PROBAVE *IN VITRO***

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2021.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za fitokemiju na Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Ivane Šola i neposrednim vodstvom dr. sc. Valerije Vujčić Bok, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

BIORASPOLOŽIVOST FENOLNIH SPOJEVA I BIOAKTIVNOST KLICA KUPUSNJAČA U MODELU LJUDSKE PROBAVE *IN VITRO*

Sanja Gagić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Kupusnjače (Brassicaceae) su bogate flavonoidima, glukozinolatima i vitaminima te su zbog toga jedno od najčešće konzumiranog povrća. Cilj ovog rada bio je usporediti udjele fenolnih spojeva klica korabice (*Brassica oleracea* var. *acephala gongylodes*), kelja (*B. oleracea sabauda*), prokulice (*B. oleracea gemmifera*), cvjetače (*B. oleracea botrytis*), rotkvice (*Raphanus sativus*) i kreše (*Lepidium sativum*), te njihov antioksidacijski i hipoglikemijski potencijal nakon *in vitro* simulirane probave čovjeka kako bi se za svaki od parametara izdvojilo varijetet klica većeg potencijala. Najbogatije ukupnim (uk.) flavonoidima bile su klice cvjetače, a uk. hidroksicimetnim kiselinama kelja i rotkvice. Nakon probave u crijevu najveći udio uk. fenolnih spojeva imale su klice kelja, a uk. flavonoida klice cvjetače. Najbogatije vitaminom C prije probave bile su klice kreše, a nakon probave u želucu klice rotkvice. Feruličnom kiselinom najbogatije su bile klice prokulice, a sinapinskom klice kelja i prije i nakon probave. Najvišu koncentraciju kvercetina prije probave imale su klice cvjetače i kreše, a nakon probave u crijevima klice cvjetače. Najvišu koncentraciju kempferola i prije i nakon probave imale su klice rotkvice. Sve klice prije probave pokazale su antioksidacijski potencijal sličan ili čak i viši od standarda troloksa. Ekstrakti svih klica prije probave pokazali su isti ili veći stupanj inhibicije α -amilaze nego standardni antidijabetički lijek akarboza. Nakon probave u crijevu najveći stupanj inhibicije aktivnosti α -amilaze pokazale su korabice. Prije probave najveći stupanj inhibicije α -glukozidaze pokazale su klice rotkvice, a nakon probave u crijevu klice korabice. Klice rotkvice, kelja, prokulice i korabice prije probave snažnije su inhibirale aktivnost α -glukozidaze od akarboze. Zaključujem da klice kupusnjača predstavljaju biomaterijal velikog potencijala za ljudsku prehranu i zdravlje, te su daljnje analize njihova biopotencijala itekako potrebne i poželjne.

(62 stranice, 25 slika, 2 tablice, 108 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: α -amilaza, α -glukozidaza, antioksidansi, fenolne kiseline, flavonoidi, HPLC, specijalizirani metaboliti, spektrofotometrija, vitamin C

Voditelj: Dr. sc. Ivana Šola, doc.

Ocjenitelji:

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

BIOAVAILABILITY OF PHENOLIC COMPOUNDS AND BIOACTIVITY OF BRASSICACEAE SEEDLINGS IN *IN VITRO* MODEL OF HUMAN DIGESTION

Sanja Gagić

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Brassicaceae are rich in flavonoids, glucosinolates and vitamins, and are therefore one of the most commonly consumed vegetables. The aim of this study was to compare the proportions of phenolic compounds of kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *acephala gongylodes*), kale (*B. oleracea sabauda*), Brussels sprouts (*B. oleracea gemmifera*), cauliflower (*B. oleracea botrytis*), radish (*Raphanus sativus*) and cress (*Lepidium sativum*), and their antioxidant and hypoglycemic potential after *in vitro* simulated human digestion in order to single out a variety of seedlings of higher potential for each of the parameters. The richest in total flavonoids were cauliflower seedlings, and in hydroxycinnamic acids seedlings of kale and radish. After intestinal digestion the largest proportion of total phenolics had kale, and total flavonoids cauliflower seedlings. The richest in vitamin C before digestion were cress seedlings, and after gastric digestion radish seedlings. Brussels sprouts were the richest in ferulic acid, and kale seedlings were the richest in synapic acid before and after digestion. Cauliflower and cress seedlings had the highest concentration of quercetin before digestion, and cauliflower only after intestinal digestion. Radish seedlings had the highest concentration of kaempferol both before and after digestion. All pre-digestion seedlings' extracts showed antioxidant potential similar to or even higher than trolox standard. Extracts of all seedlings before digestion showed the same or higher degree of α -amylase inhibition than the standard antidiabetic drug acarbose. After intestinal digestion, the highest degree of inhibition of α -amylase activity was shown by kohlrabi. Before digestion, the highest degree of α -glucosidase inhibition was shown by radish seedlings, and after intestinal digestion by kohlrabi seedlings. Pre-digestion radish, kale, Brussels sprouts and kohlrabi seedlings' extracts inhibited α -glucosidase activity more strongly than acarbose. Therefore, Brassicaceae seedlings represent a biomaterial of great potential for human nutrition and health, and further analysis of their biopotential is very necessary and desirable.

(62 pages, 25 figures, 2 tables, 108 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: α -amilase, α -glucosidase, antioxidants, phenolic acids, flavonoids, HPLC, specialized metabolites, spectrophotometry, vitamin C

Main supervisor: Ivana Šola, PhD, Assist. Prof.

Reviewers:

Thesis accepted:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Kupusnjače	1
<i>Brassica oleracea</i> convar. <i>acephala</i> var. <i>gongylodes</i>	2
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>sabauda</i>	3
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	3
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	4
<i>Raphanus sativus</i>	5
<i>Lepidium sativum</i>	6
1.2. Specijalizirani biljni metaboliti	6
1.3. Fenolni spojevi	7
1.4. Slobodni radikali i antioksidansi	14
1.5. Cilj rada	15
2. MATERIJAL I METODE.....	16
2.1. Materijal.....	16
2.2. Priprema ekstrakata	16
2.3. <i>In vitro</i> model ljudske probave	16
2.4. Određivanje udjela ukupnih fenolnih spojeva	17
2.5. Određivanje udjela ukupnih flavonoida	18
2.6. Određivanje udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina	18
2.7. Određivanje udjela <i>L</i> -askorbinske kiseline i pojedinačnih fenolnih spojeva metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja	19
2.8. Antioksidacijski potencijal određen metodom ABTS	20
2.9. Antioksidacijski potencijal određen metodom DPPH	21
2.10. Antioksidacijski potencijal određen metodom FRAP	22
2.11. Određivanje stupnja inhibicije enzima α -amilaze	23
2.12. Određivanje stupnja inhibicije enzima α -glukozidaze	24
2.13. Statistička obrada podataka	24
3. REZULTATI.....	25
3.1. Udio ukupnih fenolnih spojeva u klicama kupusnjača u pojedinoj fazi <i>in vitro</i> modela ljudske probave.....	25
3.2 Udio ukupnih flavonoida u klicama kupusnjača tijekom pojedine faze <i>in vitro</i> modela probave	26

3.3. Udio ukupnih hidrokscimetnih kiselina u klicama kupusnjača u pojedinoj fazi <i>in vitro</i> modela ljudske probave	27
3.4. Udio <i>L</i> -askorbinske kiseline i pojedinačnih fenolnih spojeva u klicama kupusnjača u pojedinoj fazi <i>in vitro</i> modela ljudske probave	28
3.4.1. <i>L</i> -askorbinska kiselina	29
3.4.2. Ferulična kiselina.....	30
3.4.3. Sinapinska kiselina	31
3.4.4. Kvercetin	32
3.4.5. Kempferol	33
3.5. Antioksidacijski potencijal klica kupusnjača mjeran metodom ABTS u pojedinoj fazi <i>in vitro</i> modela ljudske probave	34
3.6. Antioksidacijski potencijal klica kupusnjača mjeran metodom DPPH u pojedinoj fazi <i>in vitro</i> modela ljudske probave	35
3.7. Antioksidacijski potencijal klica kupusnjača mjeran metodom FRAP u pojedinoj fazi <i>in vitro</i> modela ljudske probave	36
3.8. Stupanj inhibicije aktivnosti enzima α -amilaze ekstraktima klica kupusnjača u pojedinoj fazi <i>in vitro</i> modela ljudske probave	37
3.9. Stupanj inhibicije aktivnosti enzima α -glukozidaze ekstraktima klica kupusnjača u pojedinoj fazi <i>in vitro</i> modela ljudske probave	38
3.10. Raspored parametara najviših vrijednosti s obzirom na vrstu klica	39
4. RASPRAVA.....	41
5. ZAKLJUČAK	50
6. LITERATURA.....	52
7. ŽIVOTOPIS	61

1. UVOD

1.1. Kupusnjače

Porodica kupusnjača (Brassicaceae) jedna je od najvećih porodica u biljnom carstvu. Obuhvaća čak 338 rodova i 3700 vrsta (Al-Shehbaz i sur., 2006). Najranije vrste ove porodice nastale su u eocenu na području irano-turanske regije iz koje su se dalje proširile svijetom (Franzke i sur., 2011). Kupusnjače danas imaju veliku važnost za čovjeka; koriste se u prehrani kao lisnato i korijenasto povrće, kao začini ili kao biljke uljarice (Sharma i sur., 2014). Najviše se uzgajaju na području sjeverne hemisfere, od jugozapadne Azije do Sjeverne Amerike (Francisco i sur., 2017). Varijeteti iz roda *Brassica* (kao što su brokula, kelj, cvjetača, pekinški kupus) pripadaju u skupinu 10 ekonomski najvažnijih povrtnih biljaka (Francisco i sur., 2017). U prehranbene svrhe najviše se uzgajaju *B. napus* (uljana repica), *B. rapa* (repa), *B. oleracea* (kupus, brokula, cvjetača, brokulica, koraba, kelj), *Raphanus sativus* (radič), *Lepidium sativum* (sjetvena grbica) i *Nasturtium officinale* (potočarka). Vrste uzgajane kao začinske biljke uključuju *B. juncea* (smeđi gorušica), *Sinapis alba* (žuti gorušica), *B. nigra* (crni gorušica), *Armoracia rusticana* (hren) i *Eutrema japonica* (wasabi) (OECD 2016). Važno je napomenuti i da vrsta *Arabidopsis thaliana* (talijin uročnjak), koja je često korišten modelni organizam, pripada u ovu porodicu (Sharma i sur., 2014).

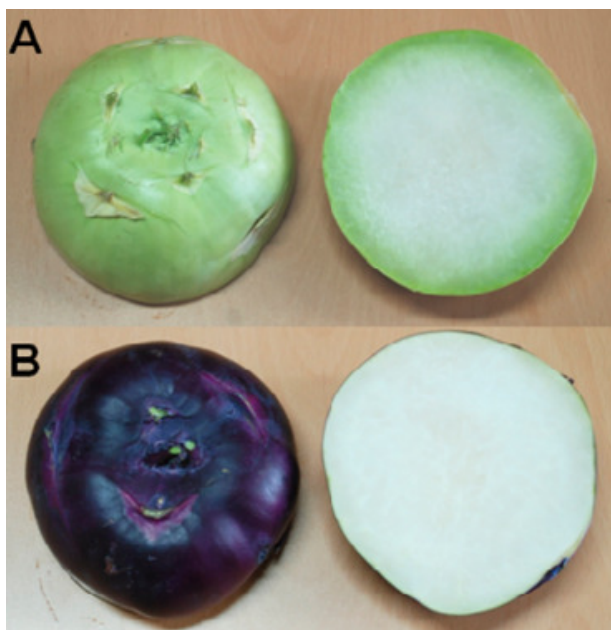
Korisni učinci kupusastog povrća na ljudsko zdravlje povezani su s djelatnim tvarima koje sadrže. U tom kontekstu posebno se ističu fenolni spojevi (najčešće flavonoli i hidrokscimetne kiseline) koji su izrazito efikasni u sprječavanju oksidativnog stresa, stimulaciji imunskog sustava, smanjuju proliferaciju stanica raka i inhibiraju kancerogene mutacije. Štite ljudsko tijelo od slobodnih radikala koji uzrokuju oštećenja DNA, utječu na ekspresiju gena, modifikaciju baza i oksidaciju lipida i proteina (Sanlier, 2018). Biljke iz porodice kupusnjača najpoznatiji su izvor glukozinolata (Francisco i sur., 2017). U njima također nalazimo i dosta vitamina (npr. A, B-6, C i K, β -karoten, lutein, zeaksantin i slične karotenoide, te vitamin E), koji svi zajedno doprinose ranije spomenutom antioksidacijskom, protuupalnom, antimikrobnom i antialergijskom djelovanju, sposobnosti inhibicije enzima, te antitumorskoj aktivnosti (Francisco i sur., 2017).

Kao što je spomenuto, varijeteti roda *Brassica* intenzivno se uzgajaju u cijelom svijetu. Konzumirani su na razne načine, a danas sve popularnija postaje konzumacija klica upravo zbog bogatstva fenolnim spojevima, vitaminima te drugim tvarima jakog antioksidacijskog potencijala. No, dakako da sadržaj tih tvari varira od varijeteta do varijeteta pa su potrebna

istraživanja kako bi se utvrdilo konzumacija klica kojih varijeteta ima najblagotvornije djelovanje na ljudski organizam.

Brassica oleracea convar. *acephala* var. *gongylodes*

Korabica (*B. oleracea* convar. *acephala* var. *gongylodes*) je dvogodišnja biljka koja se uzgaja zbog zadebljalog donjeg dijela stapke (Ćosić i sur., 2013). Varijetet je koji je srodstveno najbliži divljem kupusu (*B. oleracea* ssp. *oleracea*), ishodišnoj formi svih današnjih varijeteta (Park i sur., 2012). Raste uz obale Europe i Sjeverne Afrike, a posljednjih desetljeća potražnja za korabicom se višestruko povećala što je naravno dovelo i do povećanja same proizvodnje, posebno u nordijskim zemljama (Escalona i sur., 2007). Popularna je u ljudskoj, ali i životinjskoj prehrani iz razloga što sadrži vitamine, minerale, vlakna i mali udio masti (National Food Composition Database, Fineli, Finland, 2011). Postoje blijedozelene i ljubičaste sorte (slika 1.).



Slika 1. Fenotip blijedozelene (A) i ljubičaste sorte (B) korabice (*B. oleracea* convar. *acephala* var. *gongylodes*). Preuzeto i prilagođeno iz rada autora Park i sur. (2012).

Brassica oleracea var. *sabauda*

Kelj (*B. oleracea* var. *sabauda*) dvogodišnja je zeljasta biljka iz porodice Brassicaceae. Stabljika je u prvoj godini nerazgranata te naraste do visine od 40 cm s jednim kuglastim pupom na vrhu. Listovi, koji se koriste kao hrana, veliki su i naborani, tamnozeleno boje. Porijeklom je iz područja sjeveroistoka Europe (Sretenović-Rajičić i sur., 2004), a varijetet je dobiven iz vrste divljeg kupusa (*B. oleracea*). Istraživanje autora Quassinti i sur., (2016) potvrdilo je da vodeni i hidroalkoholni ekstrakti klica kelja imaju visoki antioksidacijski i prooksidacijski potencijal. Fenotip kelja prikazan je na slici 2.

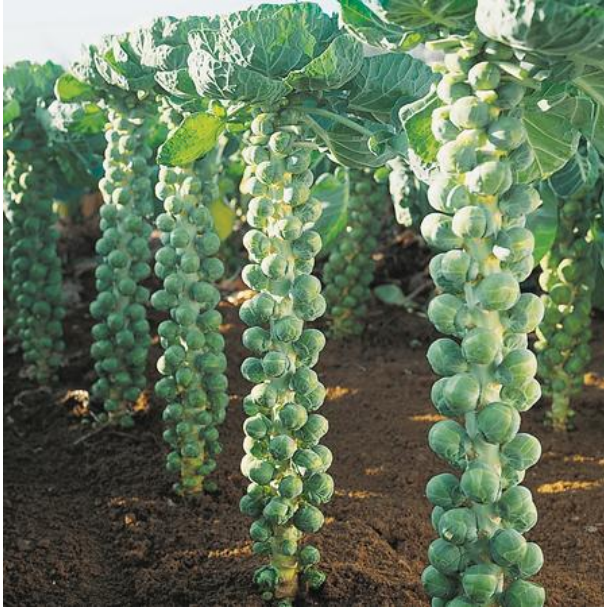


Slika 2. Fenotip zrelog kelja (*B. oleracea* var. *sabauda*). Preuzeto s <https://alchetron.com/Brassica-oleracea>.

Brassica oleracea var. *gemmifera*

Prokulica (*B. oleracea* var. *gemmifera*) dvogodišnja je zeljasta biljka iz porodice Brassicaceae. Stabljika je uspravna i uglavnom nerazgranata, visine do 100 cm. Listovi su jajstog oblika, malo naborani i tamnozeleni. Proizvodnja i potrošnja prokulice raširena je u zapadnoj i srednjoj Europi i u stalnom je porastu (Lisiewska i sur., 2009) To nije isključivo zbog prehrambenih blagodati, kao što su visok udio proteina, visok stupanj antioksidacijskog potencijala, visok udio nezasićenih masnih kiselina i mineralnih spojeva, a nizak sadržaj nitrata i teških metala, već i zbog lakog uzgoja i skladištenja (Kmiecik i sur., 2007; Martínez-Tomé i sur., 2001). Prokulica je dobra sirovina za zamrzavanje i kasnojesenska berba

produžuje poljodjelsku sezonu u pogonima prehrambene industrije (Lisiewska i sur., 2009). Fenotip zrele prokulice prikazan je na slici 3.



Slika 3. Fenotip zrele prokulice (*B. oleracea* var. *gemmifera*). Preuzeto s <https://territorialseed.com/products/brussels-sprout-igor?variant=12788997226595>.

Brassica oleracea var. *botrytis*

Cvjetača (*B. oleracea* var. *botrytis*) dvogodišnja je zeljasta biljka iz porodice Brassicaceae. Stabljika je nerazgranata, naraste do 50 cm visine. U prvoj godini biljka stvara zadebljali cvat bijele boje. Upravo je zbog spomenutog cvata cvjetača važna povrtna kultura jer se isti intenzivno koristi u prehrani. Uzgaja se po cijelom svijetu u tropskoj i umjerenoj klimi, a za konzumaciju je uglavnom dostupna tijekom cijele godine (Sharma i sur., 2004). Bogat je izvor fitonutrijenata koji djeluju kao antioksidansi, npr. glukozinolata, askorbinske kiseline i polifenola (Scalzo i sur., 2008). Fenotip zrele cvjetače prikazan je na slici 4.



Slika 4. Fenotip zrele cvjetače (*B. oleracea* var. *botrytis*). Preuzeto s <https://www.bbc.com/news/uk-49330210>.

Raphanus sativus

Rotkvice (*R. sativus*) korijenasto je povrće uzgajano u cijelom svijetu. Raste u umjerenj klimi na nadmorskim visinama između 190 i 1240 m. Biljka je visoka između 30–90 cm, a korijen je zadebljao i različitih veličina, oblika i boja. Poznata je po jedinstvenom, oštrom okusu (Gutiérrez & Perez, 2004). Rotkvice se obično jedu sirove kao hrskavi dodatak salatama. Na Bliskom Istoku pak preferiraju sok ovog korijenastog povrća zbog njegovih zdravstvenih blagodati (Banihani, 2017). Rotkvice imaju različite boje kore korijena (crvena, ljubičasta, crna, žuta) dok je na presjeku unutrašnjost tipično bijela (Banihani, 2017). Ova vrsta se popularno koristi za liječenje bolesti jetre i dišnih puteva. Antibiotička aktivnost ekstrakta korijena odavno je primjećena zbog čega rotkvice imaju dugu povijest primjene u tradicionalnoj medicini (Gutiérrez & Perez, 2004). Fenotip zrele rotkvice prikazan je na slici 5.



Slika 5. Fenotip nekoliko sorti zrele rotkvice (*R. sativus*). Preuzeto s web stranice <http://bioinfo.bti.cornell.edu/cgi-bin/radish/index.cgi>.

Lepidium sativum

Kreša (*L. sativum*) jestiva je biljka koja pripada porodici Brassicaceae. Ima uspravnu tanku stabljiku koja naraste do visine od 20-30 cm. Listovi su varijabilni, neparno perasto razdjeljeni na uske listiće, na stabljici raspoređeni naizmjenično. Uzgaja se kao kulinarsko povrće u cijeloj Aziji i dijelovima Europe. Od davnih vremena sjeme ove biljke koristi se u tradicionalnoj medicini (Diwakar i sur., 2010). Sjeme je gorkog okusa, termogeno, depurativno, djeluje kao rubefacijens, tonik, afrodisijak, antiskorbutik, antihistaminik i diuretik (Diwakar i sur., 2010). Klice se konzumiraju kao začini i bogat su izvor glukozinolata (Vaughn i Berhow, 2005). Fenotip zrele kreše prikazan je na slici 6.



Slika 6. Fenotip zrele kreše (*L. sativum*). Preuzeto iz rada Sruthi i sur. (2017).

1.2. Specijalizirani biljni metaboliti

Biljni metabolizam dijelimo na primarni i sekundarni. Metaboliti neophodni za život biljke (proteini, nukleinske kiseline, ugljikohidrati, lipidi) sintetiziraju se putevima primarnog metabolizma. Spojevi koji nisu neophodni za metabolizam biljke, ali doprinose boljoj prilagođenosti i preživljavanju u okolišu rezultat su sekundarnog tj. specijaliziranog biljnog metabolizma (Giada, 2013). Specijalizirani metaboliti klasificiraju se prema kemijskoj strukturi; fenolni spojevi, terpeni, steroidi i alkaloidi. Fenolni spojevi su široko rasprostranjeni

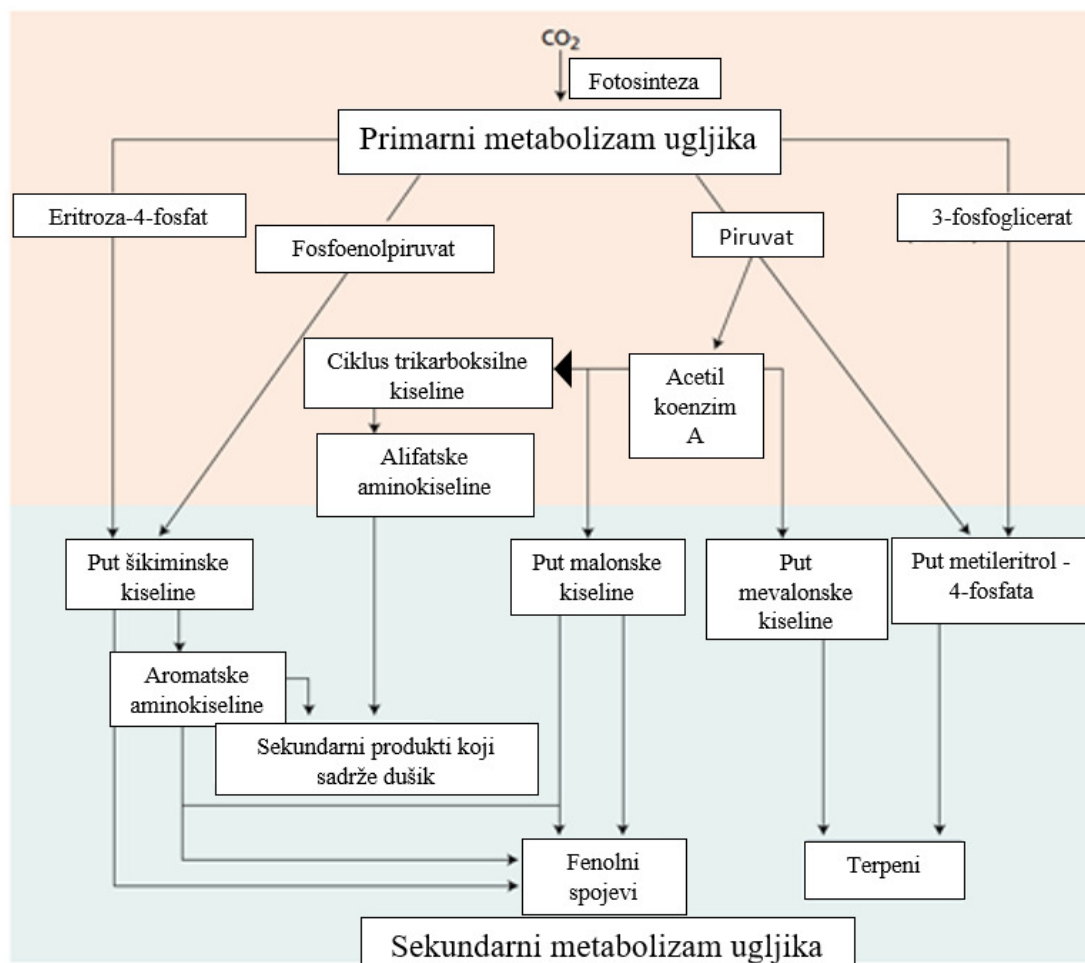
u biljnom carstvu, uključeni su u sintezu lignina te su zbog toga prisutni u svim višim biljkama. Među četiri spomenute skupine spojeva terpeni su najraznolikija (Boncan i sur., 2020). Važni su medijatori u odnosima biljaka s okolišem i insektima (Boncan i sur., 2020). Biljni steroidi su grupa specijaliziranih biljnih metabolita koja se ističe po svojim ljekovitim svojstvima i blagotvornom utjecaju na ljudsko zdravlje (Gunaherath i Gunatilaka, 2014). U alkaloidne uglavnom spadaju spojevi koji su specifični za određeni biljni rod i samim time rjeđe distribuirani u biljnom carstvu (Bourgaud i sur. 2001).

Velika raznolikost specijaliziranih metabolita proizlazi iz njihove uloge u prilagodbi na različite stresne uvjete te općenito njihove uloge u interakciji biljke s okolišem. Djeluju kao zaštita od herbivora, bakterija, gljiva, virusa, drugih biljnih vrsta, ali i abiotičkih stresnih čimbenika. Neki od primjera zaštitnog djelovanja specijaliziranih metabolita su zaštita biljke od toksina koje ispuštaju susjedne biljke (alelopatija), apsorpcija UV zračenja i na taj način sprječavanje oštećenja fotosintetskog aparata, te repelentni učinak na herbivore (od insekata do goveda) (A. Hussein i A. El-Anssary, 2019). Neke biljke ih koriste kao signale u komunikaciji s drugim biljkama te drugim korisnim organizmima poput simbiotskih mikroorganizmima, oprašivača i raspršivača sjemenki (Yang i sur., 2018).

Zbog blagotvornog djelovanja na zdravlje ljudi, specijalizirani biljni metaboliti stoljećima se koriste u tradicionalnoj medicini. U moderno doba vrijedna su sirovina industrijama kao što su farmaceutska, kozmetička i kemijska (Bourgaud i sur. 2001, Yang i sur. 2018), koriste za dobivanje aroma, raznih lijekova, esencijalnih ulja, kozmetičkih preparata i sl. (Kabera i sur., 2014).

1.3. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su, zbog svoje uloge u biljnom organizmu, najzastupljenija i najbrojnija skupina specijaliziranih metabolita, a zbog bioloških učinaka koje pokazuju također su i jedna od najistraživanijih skupina (Giada, 2013). Fenolni spojevi su veoma heterogena skupina u koju spada oko čak 8000 spojeva pronađenih u biljkama. Premda se, dakle, radi o vrlo raznolikoj skupini, svi spojevi imaju zajedničko obilježje koje ih stvrstava u istu skupinu, a to je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova, uključujući i derivate poput estera, metil etera, glikozida i dr. (Cartea i sur., 2011).



Slika 7. Shematski prikaz metaboličkog puta sinteze fenolnih spojeva putem šikiminske kiseline (preuzeto iz Taiz i Zeiger (2002)).

U skupini fenolnih spojeva najraširenija i najraznolikija skupina spojeva kod kupusnjača su flavonoidi i hidroksicimetne kiseline (Cartea i sur., 2011). U biljkama se najčešće nalaze u konjugiranom obliku, tj. u obliku glikozida, za čije su hidroksilne skupine vezane jedna ili više molekula šećera. Vezani šećeri mogu biti monosaharidi, disaharidi pa čak i oligosaharidi, ali najzastupljeniji vezani šećer je monosaharid glukoza. Fenolni spojevi mogu biti konjugirani i s drugim spojevima, primjerice karboksilnim ili organskim kiselinama, lipidima, aminima kao i s drugim fenolnim spojevima (Bravo, 1998). Fenolni spojevi se rijetko nalaze u slobodnom, nekonjugiranom obliku, jer je taj oblik izrazito toksičan, dok se postupkom konjugacije s drugim spojevima to svojstvo gubi (Giada, 2013).

U biljnim organizmima fenolni spojevi imaju raznolike uloge. Djeluju kao signalne molekule, hormoni koji reguliraju rast, štite od mikroorganizama (baktericidno djelovanje),

štite od UV zračenja, privlače oprašivače, pridonose pigmentaciji biljaka, okusu (gorčini, oštini), mirisu i oksidativnoj stabilnosti (Berend i Grabarić, 2008).

Fenolni spojevi nastaju u dva metabolička puta, putem šikiminske kiseline u kojem su glavni proizvodi fenilpropanoidi i putem octene kiseline u kojem nastaju jednostavni fenoli (slika 7.). Većina biljnih fenolnih spojeva sintetizira se iz fenilpropanoida, dakle putem šikiminske kiseline, ali najbrojnija skupina fenolnih spojeva, flavonoidi, sintetizira se kombinacijom oba spomenuta puta (Cartea i sur., 2011; Giada, 2013)

Dokazana su protuupalna, antialergijska, antioksidacijska i antikancerogena svojstva fenolnih spojeva, kao i namirnica koje ih sadržavaju (Rice-Evans i sur., 1997). Iz tog razloga interes za namirnicama bogatim fenolnim spojevima posljednjih godina vrtoglavo raste (Giada, 2013). Od fenolnih spojeva, fenolne kiseline, flavonoidi i tanini su najčešći u ljudskoj prehrani.

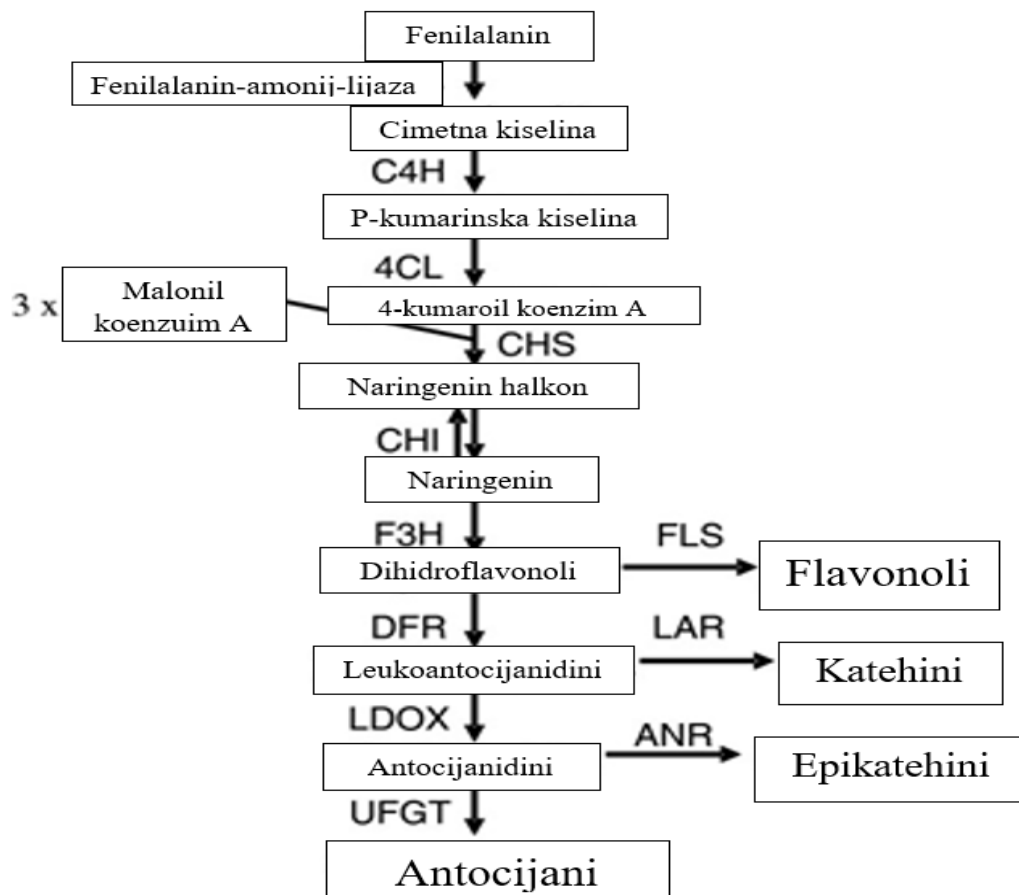
Tablica 1. Sadržaj polifenola te flavonoida i fenolnih kiselina u najpoznatijim vrstama kupusnjača izražen u miligramima po gramu suhe mase. (Preuzeto iz Heimler i sur. (2006))

Uzorak	Flavonoidi	Fenolne kiseline	Ukupni polifenoli
Kupus (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> f. <i>alba</i>)	2,70	0,7	2,77
Brokula (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>)	3,04	8,69	11,73
Kelj (<i>Brassica oleracea sabauda</i>)	1,02	0,23	1,25
Cvjetača (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>)	0,29	0,09	0,38
Prokulica (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>)	1,12	0,35	1,47

1.3.1. Flavonoidi

Flavonoidi su izrazito raznolika skupina spojeva koju pronalazimo u svim kritosjemenjačama. Razlikuju se po kemijskoj strukturi, boji i biološkoj funkciji, ali osnovni princip građe im je zajednički. Osnovna struktura je fenilpropanoidna jezgra s 15 ugljikovih

atoma (C₆-C₃-C₆) raspoređena u dva aromatska prstena (A i B) koji su povezani heterocikličkim piranskim prstenom. Flavonoidi se međusobno razlikuju prema oksidacijskom stanju i zasićenosti heterocikličkog prstena pa razlikujemo flavone, flavanone, izoflavone, flavonole, 3-deoksiflavonoide i antocijane (Jiang i sur., 2016).



Slika 8. Shematski prikaz metaboličkog puta sinteze flavonoida (preuzeto iz Ravaglia i sur. (2013))

Flavonoidi se sintetiziraju iz aromatske aminokiseline fenilalanina (slika 8.). Raznolikih su struktura, ovisno o stupnju i mjestu hidroksilacije, prenilacije, alkalizacije ili glikolizacije primarne molekule. Ove modifikacije utječu na fizikalna svojstva flavonoida, kao na primjer na topivost flavonoida u vodi, što zatim utječe na biodostupnost (Gutiérrez-Grijalva i sur., 2018). U biljnom tkivu se najčešće nalaze u obliku glikozida jer, kao i svi fenolni spojevi, imaju sposobnost vezanja raznih šećernih molekula u raznim pozicijama (Mageney i sur., 2017).

Prije se mislilo da su flavonoidi otpadni produkti biljnog metabolizma koji se skladište u vakuoli, no novija istraživanja su otkrila da imaju razne uloge u biljnom organizmu; djeluju

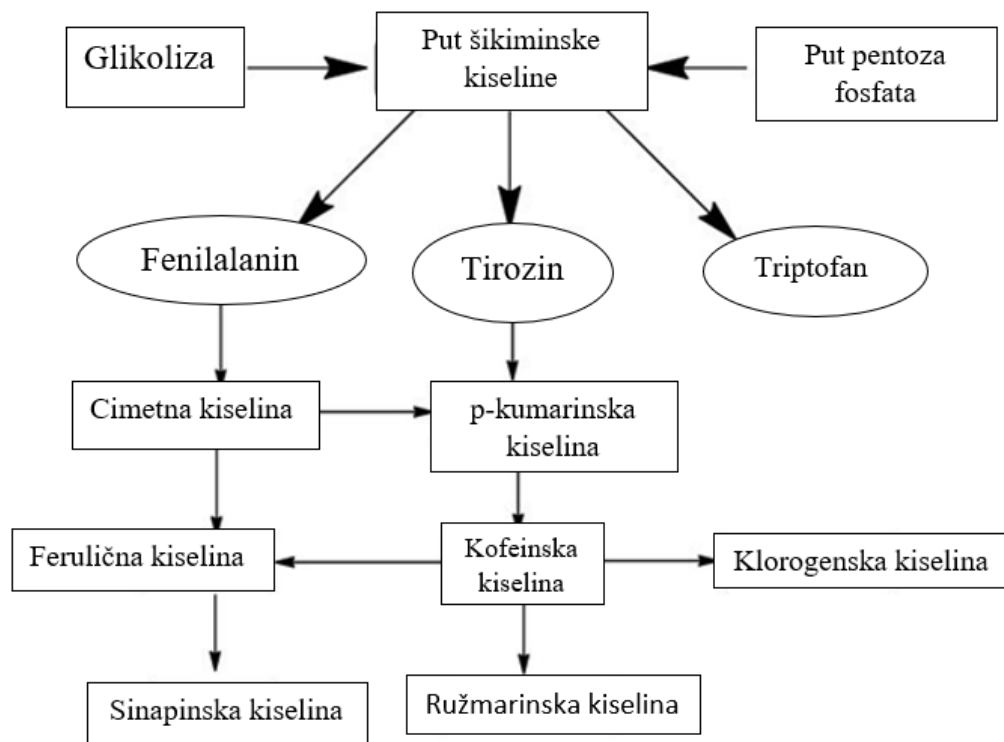
kao fitoaleksini, štite od UV zračenja, sudjeluju u prijenosu biljnih hormona auksina te time utječu na rast biljke (Nix i sur., 2017). U skupinu flavonoida također pripadaju i antocijanidini i njihovi glikozidi antocijani koji su pigmenti u cvijeću i povrću te na taj način pospješuju oprašivanje i raspršivanje sjemenki.

Osim široke lepeze korisnih djelovanja u biljnom organizmu, flavonoidi imaju mnoge pozitivne učinke i na ljudski organizam. Zbog toga su danas nezamjenjiva komponenta mnogih prehrambenih, farmaceutskih, medicinskih i kozmetičkih proizvoda. Kao i većina fenolnih spojeva, flavonoidi pokazuju antioksidativna, protuupalna, antimutagena i antikancerogena svojstva. Također imaju i sposobnost regulacije funkcija mnogih staničnih enzima, a poznati su i kao snažni inhibitori enzima kao što su npr. ksantin oksidaza, ciklo-oksigenaza, lipoksigenaza i fosfoinozimid-3-kinaza (Panche i sur., 2016).

1.3.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su, također, specijalizirani aromatski metaboliti široko rasprostranjeni u biljnom carstvu. „Fenolne kiseline“ je naziv za fenolne spojeve koji sadrže karboksilnu skupinu. U biljkama se pojavljuju u 2 karakteristična oblika: kao derivati hidroksicimetne i kao derivati hidroksibenzojeve kiseline (Tsao, 2010). Predmet su mnogih istraživanja zbog antioksidacijskih svojstava kojima ublažavaju simptome raznih degenerativnih bolesti, primjerice kardiovaskularnih, upalnih i raka (Saxena i sur. 2012).

U voću i povrću fenolne kiseline nalazimo u slobodnom obliku, dok u žitaricama i sjemenkama dolaze u vezanom obliku. Fenolne kiseline sintetiziraju se u putu šikiminske kiseline koji uključuje nekoliko enzimatskih reakcija kojima se intermedijera pentoza fostatnog puta i glikolize prevode u tri esencijalne aminokiseline: fenilalanin, tirozin i triptofan (slika 9.). Fenilalanin i tirozin su ishodišne molekule za sintezu dvije glavne skupine fenolnih kiselina: hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline. Hidroksicimetne kiseline su najveća grupa fenolnih kiselina. U prirodi su najčešća kavena, ferulična, *p*-kumarinska, te sinapinska kiselina. Najviše zastupljenje hidroksibenzojeve kiseline su: galna, *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska i siringična. (Taofiq i sur., 2017).



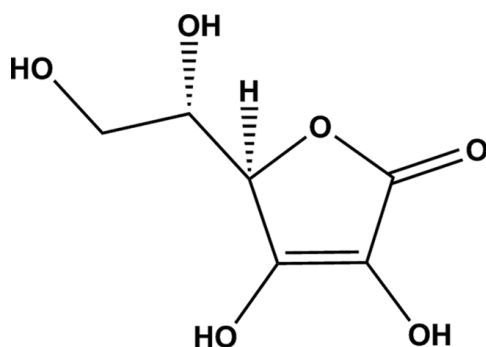
Slika 9. Shematski prikaz metaboličkog puta sinteze fenolnih kiselina (preuzeto iz Taofiq i sur. (2017))

Struktura hidroksicimetnih kiselina varira ovisno o broju i položaju hidroksilnih skupina na aromatskom prstenu, a mogu se naći i u obliku derivata poput amida ili estera (Vinholeis i sur. 2015).

1.3.3. *L*-askorbinska kiselina

L-askorbinska kiselina jedan je od oblika vitamina C, najzastupljenijeg antioksidansa topivog u vodenom mediju zbog čega je ključan mikronutrijent za metabolizam gotovo svih živih bića (Paciolla i sur., 2019). Većina sisavaca ga može sintetizirati, ali ljudi su zajedno s drugim primatima, šišmišima i zamorcima iznimka od tog pravila te nisu u mogućnosti samostalno sintetizirati ovaj vitamin (Gallie, 2013). U životinjskom organizmu vitamin C se može sintetizirati samo u jednom metaboličkom putu, dok kod biljaka može nastajati u čak četiri metabolička puta, što je direktan pokazatelj važnosti askorbinske kiseline za održavanje homeostaze u biljnom organizmu (Gallie, 2013). Primarni put biosinteze askorbata u višim biljkama naziva se Smirnov-Wheelerov put i poznato je da se odvija u mitohondrijima. Ponekad se također naziva i D-manoza/L-galaktoza put. (Akram i sur., 2017).

Strukturu ovog vitamina otkrio je i opisao Norman Haworth 1933. godine, a samo ime molekule potiče od njezine upotrebe u liječenju skorbuta (Paciolla i sur., 2019). Vitamin C ima izrazito jednostavnu strukturu s nekoliko strukturnih elemenata koji određuju kemijska svojstva molekule (slika 10.): struktura laktona, dvije enolne hidroksilne skupine (položaji 2 i 3) i primarna i sekundarna hidroksilna skupina (položaji 5 i 6) (Barrita i Sanchez, 2013).



Slika 10. Kemijska struktura *L*-askorbinske kiseline (preuzeto iz Chen i sur. (2015)).

Vitamin C djeluje kao elektron donor i antioksidans iz čega proizlaze sve njegove fiziološke i biokemijske uloge (Barrita i Snchez, 2013). U biljkama je ovaj vitamin glavni antioksidans i u suradnji s drugim komponentama antioksidacijskog sustava štiti biljke od oksidativnih oštećenja koja nastaju djelovanjem aerobnog metabolizma, fotosinteze ili niza stresnih čimbenika poput ozona, teških metala i povišenog saliniteta (Mazid i sur., 2011). Djeluje i kao modulator provođenja signala u stanici tijekom procesa staničnog rasta (diobu stanica, širenje stanica i rast stanične stijenke) (Gallie, 2013). Kofaktor je i mnogih enzima koji su uključeni u već spomenute razvojne procese ili obranu od stresnih čimbenika (Mazid i sur., 2011). Pri odgovoru na oksidacijski stres često djeluje u kombinaciji s drugim neenzimskim antioksidansima kao što su glutation i α -tokoferol. Nedavna istraživanja pokazuju da bi askorbat mogao biti alternativni donor elektrona u fotosustavu II pri abiotičkom stresu, kao i da ima glavnu ulogu u zaštiti fotosintetskog aparata u kloroplastu neutralizirajući djelovanje reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (Venkatesh i Park, 2014).

Askorbat je fiziološki aktivni oblik askorbinske kiseline koji nastaje deprotoniranjem hidroksilne skupine na C₃ atomu. Najviše askorbata nalazi se u citoplazmi biljne stanice, a mali dio prenosi se transporterima u apoplast. Pretpostavlja se da je količina askorbata u

apoplastu bitna za procese percepcije, signalizacije i odgovora biljke na stres (Akram i sur., 2017). Istraživanja pokazuju da je stopa sinteze askorbata u biljci direktno proporcionalna osjetljivosti biljke na stresne čimbenike u okolišu. Dokazano je da askorbat sudjeluje u zaštiti od abiotičkih stresova kao što su suša, povećani salinitet, ozon, niske/visoke temperature i visok intenzitet svjetlosti (Venkatesh i Park, 2014). Također, neka istraživanja pokazuju da je endogeni askorbat uključen u signalizacijske puteve u kojima sudjeluju i fitohormoni (Mazid i sur., 2011).

1.4. Slobodni radikali i antioksidansi

Oksidativni procesi dio su staničnog metabolizma kojim stanica osigurava energiju za rast i razvoj. Tijekom ovih procesa, a posebice u stresnim uvjetima, dolazi do stvaranja ROS-ova. Reaktivne vrste su najčešće kisikovi ili dušikovi slobodni radikali. Definirani su kao kemijske vrste koje imaju nesparesni elektron u valentnoj ljusci (superoksidni anionski radikal $O_2^{\cdot -}$, hidroksil HO^{\cdot} , hidroperoksid HO_2^{\cdot} , peroksid ROO^{\cdot} , alkoksil RO^{\cdot} , dušikov oksid NO^{\cdot} , peroksinitrit $ONOO^{\cdot}$ i dušikov dioksid NO_2) ili su neutralne molekule (H_2O_2 ili $HClO$) (Bhalodia i sur. 2013, Lobo i sur. 2010, Pisoschi i sur. 2016). Nesparesni elektron u valentnoj ljusci određuje glavna svojstva slobodnih radikala, a to su nestabilnost i visoka reaktivnost. U reakcijama s drugim molekulama slobodni radikali se mogu ponašati i kao reducenski (doniraju elektron) i kao oksidansi (prihvaćaju elektron). Zbog visoke reaktivnosti izrazito su štetni za biološke molekule poput nukleinskih kiselina, proteina, ugljikohidrata i lipida (Lobo i sur. 2010)

Slobodni radikali su obavezni sudionici staničnih procesa. Sudjeluju u regulaciji stanične proliferacije, apoptoze i ekspresije gena. Do problema dolazi kada se nakupi višak slobodnih radikala (najčešće kao posljedica izloženosti biljke stresu), te ih antioksidacijski sustav ne može dovoljno brzo neutralizirati. Tada dolazi do oštećenja biološki važnih molekula; lipidna peroksidacija, oksidacija proteina, nukleinskih kiselina i ugljikohidrata. Oksidativni stres također rezultira nakupljanjem spojeva toksičnih za stanicu kao što su: malonil dialdehid, 4-hidroksinonenal i narušava ravnotežu između oksidansa i antioksidanasa (redoks homeostaza) koja nužna za normalno funkcioniranje stanica (Pisoschi i sur. 2016). Nekontrolirano generiranje slobodnih radikala u stanici može dovesti do mnogih bolesti poput raka, reumatoidnog artritisa, kao i do degenerativnih procesa povezanih sa starenjem (Almeida i sur. 2011).

Mnoga novija istraživanja su pokazala da konzumacija voća, povrća i napitaka bogatih prirodnim antioksidansima značajno povećava zaštitu organizma i smanjuje rizik od navedenih oboljenja. Ulogu antioksidansa u ovim namirnicama imaju vitamini, flavonoidi, antocijani i drugi fenolni spojevi koji, jednom unešeni u organizam, pročišćavaju isti od slobodnih radikala te na taj način olakšavaju djelovanje i poboljšavaju efikasnost antioksidacijskog sustava (Almeida i sur. 2011, Bhalodia i sur. 2013). Antioksidacijska aktivnost ovih tvari rezultat je njihovih redoks svojstava redoks kojima inaktiviraju reaktivne oblike kisika, tj. djeluju kao reducensi i donori vodika (Minatel i sur. 2017). Sposobnost uklanjanja slobodnih radikala pokazatelj je antioksidativne aktivnosti i povezana je s prisutnošću bioaktivnih spojeva (Kowitcharoen i sur. 2018).

Prirodni antioksidansi se dijele na endogene i egzogene. Endogeni su oni sintetizirani u organizmu te oni mogu biti neenzimatski (glutation, bilirubin, albumin i dr.) i enzimatski (superoksid dismutaza, katalaza, peroksidaza i dr.). Egzogeni antioksidansi se unose prehranom. To su primjerice karotenoidi, tokoferoli, vitamin D, fenolne kiseline, flavonoidi, tanini ili askorbinska kiselina. Kao što je već spomenuto, egzogeni antioksidansi su važna pomoć endogenom antioksidacijskom sustavu stanice jer neutraliziraju slobodne radikale nakupljene u suvišku (Pisoschi i sur. 2016).

1.5. Cilj rada

Cilj ovog rada bio je usporediti udjele fenolnih spojeva klica korabice (*Brassica oleracea* var. *acephala gongylodes*), kelja (*Brassica oleracea sabauda*), prokulice (*Brassica oleracea gemmifera*), cvjetače (*Brassica oleracea botrytis*), rotkvice (*Raphanus sativus*) i kreše (*Lepidium sativum*), te njihov antioksidacijski i hipoglikemijski potencijal u pojedinoj fazi *in vitro* modela ljudske probave kako bi se za svaki od navedenih parametara moglo izdvojiti klice većeg potencijala.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. Materijal

Sjemenke korabice (*Brassica oleracea* var. *acephala gongylodes*), kelja (*B. oleracea sabauda*), prokulice (*B. oleracea gemmifera*), cvjetače (*B. oleracea botrytis*), rotkvice (*Raphanus sativus*) i kreše (*Lepidium sativum*) naklijavane su u klima komori na vlažnom filter papiru u mraku pri 23°C, a nakon što su proklijale nastavljen je uzgoj pri 23°C i osvjetljenju 16h dan/8 h mrak. Kada su dosegle stadij s dva prava lista, sakupljene su, smrznute pod tekućim dušikom i liofilizirane. Klice su uzgojene u 3 biološke replike i od svake biološke replike pripremljene su 3 tehničke replike.

2.2. Priprema ekstrakata

Masu od 50 mg liofiliziranog biljnog materijala odvagala sam na analitičkoj vagi te dodala 1 mL 70% etanola (EtOH) koji je korišten kao otapalo. Uzorci su potom podvrgnuti miješanju na vrtložnoj mješalici te potom trešnji na rotacijskom homogenizatoru 1 h pri 50 okretaja/min na sobnoj temperaturi. Dobiveni ekstrakti su nadalje centrifugirani 5 min pri 10 000 okretaja/min u centrifugi Eppendorf Centrifuge 5804R na +4°C. Supernatante sam prenijela u čiste epruvete i pohranila na -20°C do daljnjih analiza.

2.3. *In vitro* model ljudske probave

In vitro model ljudske probave korišten za analizu biorasploživosti fenolnih spojeva, sadržanih u etanolnom ekstraktu klica, napravljen je prema radu autora Shim i sur., (2012.), s minimalnim izmjenama. Volumen od 75 µL ekstrakta pomiješala sam s istim volumenom 20 mM fosfatnog pufera (pH 7,0) i to je inicijalna faza. Za simulaciju probave u ustima ekstraktima sam dodala 2,5 µL enzima slin (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) i potom ih inkubirala u vodenoj kupelji 1 h pri 37°C i 150 okretaja/min. Za simulaciju želučane faze ekstraktima sam dodala 100 µL zakiseljene otopine pepsina (3 mg/ml u 0,1 M HCl, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) i inkubirala ih u vodenoj kupelji 1 h pri 37°C i 150 okretaja/min. Crijevna faza probave simulirana je dodavanjem natrijevog bikarbonata (1 M

NaHCO₃) ekstraktima do konačne pH vrijednosti od 7,0. Nakon prilagodbe pH, dodala sam 225 µL pankreasnog soka (2,4 mg žučnih kiselina/mL, 0,2 mg lipaze/mL i 0,4 mg pankreatina/mL u 20 mM fosfatnom puferu pH 7,0, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka). Ukupni volumen svakog uzorka namješten je na 500 µL dodavanjem 20 mM fosfatnog pufera (pH 7,0), čiji sam pH podesila na 7,0 koristeći 1 M NaOH. Uzorci su inkubirani 2 sata pri 37° C i 150 okretaja/min, nakon čega sam ih centrifugirala 5 min pri 15000 okretaja/min na +4°C u centrifugi Eppendorf Centrifuge 5804R. Supernatante sam prenijela u čiste epruvete i pohranila na -20°C do daljnjih analiza.

2.4. Određivanje udjela ukupnih fenolnih spojeva

Udio ukupnih fenola u etanolnom ekstraktu klica kupusnjača određen je spektrofotometrijski mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri valnoj duljini od 765 nm (Zhishen i sur., 1999). Ova kolorimetrijska metoda temelji se na reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom (smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline). U reakciji ovih kiselina s fenolnim spojevima dolazi do njihove redukcije te nastaju volfram- i molibden-oksidi koji daju plavo obojenje. U Eppendorf plastične epruvete volumena 2 mL ispipetirala sam 158 µL deionizirane vode, 2 µL 20 mg/mL biljnog ekstrakta i 10 µL Folin-Ciocalteu reagensa. Dobivenu otopinu promiješala sam na vrtložnoj mješalici. Nakon miješanja dodala sam 30 µL 1,88 M otopine Na₂CO₃, smjesu još jednom promiješala na vrtložnoj mješalici i inkubirala 30 min na 45°C. Nakon inkubacije smjesu sam centrifugirala 5 min pri 15 000 okretaja/min na +4°C. Po 200 µL svake otopine ispipetirala sam na mikrotitarsku pločicu u triplikatu. Kao kontrolu umjesto ekstrakta koristila sam 70%-tni EtOH. Apsorbanciju sam očitavala spektrofotometrom FLUOstar Optima na već spomenutoj valnoj duljini.

Koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva u uzorcima odredila sam pomoću baždarnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancije etanolnih otopina galne kiseline poznatih koncentracija (0,1 - 1 mg/mL) te izrazila u miligramima ekvivalenta galne kiseline po gramu suhe mase uzorka (mg GAE/ g sm).

Jednadžba baždarnog pravca za galnu kiselinu: $y = 0,6218x + 0,0255$; $R^2 = 0,9943$
pri čemu je:

y – apsorbancija pri 765 nm

x – masena koncentracija galne kiseline

2.5. Određivanje udjela ukupnih flavonoida

Udio ukupnih flavonoida u etanolnom ekstraktu klica kupusnjača određen je spektrofotometrijski mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 510 nm (Zhishen i sur., 1999). Kvantifikacija flavonoida ovom metodom temelji se na svojstvu flavonoida da s aluminijevim kloridom (AlCl_3) tvore komplekse koji daju karakteristično obojenje pri čemu je intenzitet obojenja proporcionalan količini flavonoida u uzorku. U Eppendorf plastične epruvete volumena 1 mL ispipetirala sam 80 μL deionizirane H_2O , 20 μL 20 mg/mL etanolnog biljnog ekstrakta i 6 μL 5% otopine NaNO_3 . Dobivenu smjesu sam promiješala na vrtložnoj mješalici te inkubirala 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon prve inkubacije dodala sam 6 μL 10% otopine AlCl_3 te sam smjesu još jednom promiješala na vrtložnoj mješalici i inkubirala 6 min na sobnoj temperaturi. Nakon druge inkubacije u smjesu sam dodala još 40 μL 1M NaOH i 48 μL deionizirane H_2O . Smjesu sam potom centrifugirala 5 min pri 15000 okretaja/min na $+4^\circ\text{C}$. Volumen od 200 μL svake otopine ispipetirala sam na mikrotitarsku pločicu u triplikatu. Kao kontrolu sam umjesto ekstrakta koristila 70%-tni EtOH . Apsorbanciju sam očitavala spektrofotometrom FLUOstar Optima na već spomenutoj valnoj duljini.

Koncentraciju ukupnih flavonoida u uzorcima odredila sam pomoću baždarnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancije etanolnih otopina kvercetina različitih koncentracija (0,05 – 1 mg/mL) pri 517 nm spektrofotometrom FLUOstar Optima.

Jednadžba baždarnog pravca za kvercetin: $y = 0,1694x + 0,0741$; $R^2 = 0,9857$

pri čemu je:

y – apsorbancija pri 517 nm

x – masena koncentracija kvercetina

2.6. Određivanje udjela ukupnih hidroksicimetnih kiselina

Koncentraciju ukupnih hidroksicimetnih kiselina izmjerila sam na spektrofotometru Thermo Scientific Nanodrop 2000c modificiranom metodom prema Howard i sur., (2003). U epruvetu sam ispipetirala 25 μL uzorka koncentracije 3.9 mg/mL, 25 μL otopine klorovodične kiseline (HCl) u 96%-tnom EtOH masene koncentracije 1 g/L i 455 μL vodene otopine HCl

masene koncentracije 2 g/L. Otopine sam 5 s miješala na vrtložnoj miješalici nakon čega sam 500 μ L ispipetirala u kivete. Ukupne hidroksicimetne kiseline mjerila sam na valnoj duljini 320 nm spektrofotometrom FLUOstar Optima .

Za izradu baždarnog pravca za hidroksicimetne kiseline koristila sam otopine cimetne kiseline (0,01 – 1 mg/mL) u 96%-tnom EtOH. Koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina izražena je kao miligram ekvivalenata cimetne kiseline po gramu suhe mase uzorka (mg ECK/g sm).

Jednadžba baždarnog pravca za cimetnu kiselinu: $y = 3,9073x + 0,0113$; $R^2 = 0,9999$
pri čemu je:

y – apsorbanacija pri 320 nm (za hidroksicimetne kiseline) i 360 nm (za flavonole)

x – masena koncentracija cimetne kiseline

2.7. Određivanje udjela *L*-askorbinske kiseline i pojedinačnih fenolnih spojeva metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja

Tekućinska kromatografija visoke moći razlučivanja (eng. *High-Performance Liquid Chromatography* – HPLC) koristi se za razdvajanje komponenti iz smjese na osnovi kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze u stupcu. U ovom radu provela sam je u svrhu kvalitativne i kvantitativne analize aglikona fenolnih spojeva i *L*-askorbinske kiseline klica odabranih vrsta kupusnjača. Uzorke sam prvo hidrolizirala: na 200 μ L ekstrakta dodala sam koncentriranu klorovodičnu kiselinu (HCl) tako da je njena konačna koncentracija iznosila 1,2 M. Uzorke sam zatim 2 h inkubirala na termostatiranoj tresilici pri temperaturi od 80°C i 300 okretaja/min. Nakon završetka hidrolize ekstrakte sam do daljnje upotrebe skladištila na -20°C.

Za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju fenolnih spojeva koristila sam uređaj Agilent 1100 Series s UV/VIS detektorom. Razdvajanje sam provela na nepolarnoj koloni Poroshell 120 SB-C18 dimenzija 4,6 x 75 mm s veličinom čestica 2,7 μ m uz upotrebu pretkolone Zorbax Rx-C18 dimenzija 4,6 x 12,5 mm s veličinom čestica 5 μ m. Metodu razdvajanja, identifikacije i kvantifikacije radila sam prema radu Šola i sur.,(2020).

Flavonoide sam analizirala pri valnoj duljini od 360 nm, fenolne kiseline pri 310 nm, a *L*-askorbinsku kiselinu pri 254 nm. Spojeve sam identificirala usporedbom retencijskih vremena pikova dobivenih analizom ekstrakata s retencijskim vremenima pikova dobivenih

analizom standarda. Kvantifikaciju spojeva provela sam upotrebom baždarnih pravaca odgovarajućih standarda (Tab. 2) prema formuli:

$$x = \frac{y-b}{a} \quad (\text{mg/kg})$$

pri čemu je:

x = masa spoja

y = apsorbancija

Baždarne pravce za svaki spoj definirala sam analizom otopina različitih koncentracija (0,01-0,25 mg/mL) standarda istom metodom kao i za ekstrakte.

Tablica 2. Jednadžbe baždarnih pravaca i R^2 vrijednosti standarda odabranih fenolnih spojeva

Spoj	Jednadžba baždarnog pravca	R^2
Sinapinska kiselina	$y = 1842,1x + 25,56$	0,9982
Ferulična kiselina	$y = 2815,8x - 36,454$	0,9985
Kempferol	$y = 1076,9x - 36,287$	0,9954
Kvercetin	$y = 944,51x - 39,118$	0,9991
Vitamin C	$y = 649,31x - 42,759$	0,9987

2.8. Antioksidacijski potencijal određen metodom ABTS

Metoda ABTS u literaturi se naziva i TEAC metoda (engl. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*). Temelji se na neutraliziranju plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS radikal-kationa) koji se formira kemijskom ili enzimskom oksidacijom ABTS otopine. Za oksidaciju spomenute otopine korištena je otopina kalijeveg persulfata ($K_2S_2O_8$). Dodatkom antioksidansa dolazi do redukcije prethodno generiranog ABTS radikala što je direktno ovisno o antioksidacijskom aktivnosti ispitivanog antioksidansa, njegovoj koncentraciji i trajanju reakcije. Udjel ABTS radikala kojeg neutraliziraju različiti antioksidansi izražava se kao funkcija koncentracije i vremena, i mjeri praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine antioksidansa 6-hidroksi-

2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox), analoga vitamina E topivog u vodi, pri istim uvjetima (Re i sur., 1999). Ova je metoda primjenjiva za procjenu lipofilnih i hidrofilnih antioksidansa uključujući fenole, hidroksicinamate, karotenoide i plazmatske antioksidanse.

Za izvođenje ove metode prvo sam pripremila otopinu ABTS⁺ radikala.. Za pripremu ove otopine ispipetirala sam 88 µL 140 mM otopine K₂S₂O₈ te do volumena od 5 mL smjesu nadopunila sa 7 mM otopinom ABTS reagensa. Konačna koncentracija otopine kalijevog peroksodisulfata iznosila je 2,45 mM. S obzirom da je stehiometrijski omjer ABTS-a i K₂S₂O₈ 1:0,5, nije došlo do potpune oksidacije te sam zbog toga otopinu omotala folijom kako bi simulirala uvjete tame i time spriječila fotooksidaciju. Otopinu sam ostavila stajati preko noći tj. minimalno 12-16h na sobnoj temperaturi. Na dan analize otopinu sam razrijedila etanolom (96%) do konačne koncentracije ABTS⁺ radikala od 1% tako da je apsorbancija otopine iznosila 0,7 ± 0,02 (199 mL 96% EtOH + 2mL ABTS reagensa). Alikvot od 5 µL etanolnih ekstrakta klica pomiješala sam s 1 mL otopine ABTS⁺ radikala u Eppendorf epruveti te sam apsorbanciju izmjerila na 734 nm nakon točno 6 min inkubacije spektrofotometrom FLUOstar Optima. Postotak inhibicije radikala ABTS⁺ izračunala sam prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} * 100$$

pri čemu je:

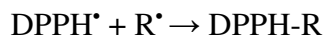
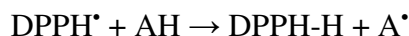
A_0 – apsorbancija kontrole (bez ekstrakta)

A_t – apsorbancija uzorka.

2.9. Antioksidacijski potencijal određen metodom DPPH

DPPH metoda (metoda hvatanja slobodnih DPPH radikala) koristi relativno stabilni 2,2-difenil-pikrilhidrazil radikal (DPPH^{*}) koji se reducira u alkoholnoj otopini u prisutnosti antioksidansa (AH) ili radikala (R^{*}) pri čemu nastaje neradikalni oblik DPPH-H. Ovu kemijsku reakciju prati promjena boje od intenzivno ljubičaste na početku do žute, što se detektira spektrofotometrijski. DPPH radikal apsorbira na valnoj duljini od 520 nm te se

smanjenje količine radikala prati preko smanjenja apsorbancije otopine. Smanjenje apsorbancije otopine uzorka direktno je proporcionalno količini antioksidansa u uzorku. Metoda je izvedena kako je opisano u radu Brkanac i sur., (2015).



U epruvetu sam ispipetirala 950 μL 0,1 mM DPPH^{\bullet} u 96%-tnom etanolu i 10 μL ekstrakta, a zatim sam otopinu promiješala na vrtložnoj miješalici te inkubirala 30 min u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije smjese, otopinu sam prenijela na mikrotitarsku pločicu (svaku otopinu sam prenijela u triplikatu). Za kontrolu sam u 3 jažice mikrotitarske pločice ispipetirala 190 μL 0,1 mM otopine DPPH^{\bullet} reagensa u 96%-tnom etanolu i 10 μL 70 %-tnog EtOH. Smjese sam također inkubirala 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije apsorbanciju sam očitala spektrofotometrom FLUOstar Optima na 520 nm. Postotak inhibicije radikala DPPH^{\bullet} izračunala sam prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} * 100$$

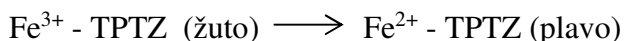
pri čemu je:

A_0 – apsorbancija kontrole (bez ekstrakta)

A_t – apsorbancija uzorka.

2.10. Antioksidacijski potencijal određen metodom FRAP

FRAP (eng. *Ferric reducing/Antioxidant power*) jednostavni je direktni test antioksidacijskog kapaciteta u kojem se antioksidacijsku aktivnost opisuje kao sposobnost reduciranja. Oksidans se reducira pomoću reducensa u redoks – kolorimetrijskoj reakciji:



Pri niskim pH vrijednostima, ioni Fe^{3+} se reduciraju do iona Fe^{2+} , što je vidljivo kao pojava plavog obojenja. Fe^{2+} ioni pokazuju maksimalnu apsorbanciju pri 593 nm. Intenzitet boje proporcionalan je redukcijskoj sposobnosti antioksidansa (Benzie i Strain, 1999). Neenzimski antioksidansi (npr. vitamin C i bioflavonoidi) mogu se smatrati reducensima koji uzrokuju redukciju oksidansa.

Za provedbu ove metode alikvot od 50 μL 20 mg/mL etanolnog ekstrakta klica pomiješala sam s 950 μL FRAP reagensa u Eppendorf epruveti. Kao kontrolu koristila sam smjesu FRAP reagensa i 70% EtOH. Nakon točno 4 min inkubacije na sobnoj temperaturi nanosila sam po 200 μL smjese na mikrotitarsku pločicu. Izmjerala sam apsorbanciju na valnoj duljini od 593 nm spektrofotometrom FLUOstar Optima. Postotak redukcije kompleksa Fe^{3+} -TPTZ izračunala sam prema formuli:

$$\% \text{ redukcije} = \frac{A_t - A_0}{A_t} * 100$$

pri čemu je:

A_0 – apsorbancija kontrole (bez ekstrakta)

A_t – apsorbancija uzorka.

2.11. Određivanje stupnja inhibicije enzima α -amilaze

Antidijabetička svojstva ekstrakata klica kupusnjača analizirana su kao mogućnost inhibicije enzima α -amilaze. Korištena je metoda opisana u radu autora Perera i sur., (2016) uz određene modifikacije: 10 μL uzorka pomiješala sam s 10 μL enzima α -amilaze (enzim pripremljen u koncentraciji 5 U/mL u hladnoj deioniziranoj vodi, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka), 20 μL 20 mM fosfatnog pufera (pH 6,9) te 10 μL škroba (1% u 20 mM puferu). Smjesu sam inkubirala 15 min na 37°C. Nakon toga smjesi sam dodala 25 μL DNSA reagensa (3,5-dinitrosalicilna kiselina), promiješala je i zatim inkubirala 15 min na 85°C. Nakon toga smjesi sam dodala 225 μL deionizirane H_2O i sve dobro promiješala. Na mikrotitarsku pločicu u svaku jažicu nanosila sam volumen od 100 μL . Apsorbanciju sam mjerila pri valnoj duljini od 540 nm spektrofotometrom FLUOstar Optima. Inhibitornu aktivnost izračunala sam prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \left(100 - \frac{(A_t - A_{tb})}{(A_c - A_{cb})} \right) \times 100$$

pri čemu je:

A_t – apsorbancija uzorka s amilazom

A_{tb} – apsorbancija uzorka bez amilaze

A_c – apsorbancija kontrole s amilazom

A_{cb} – apsorbancija kontrole bez amilaze.

2.12. Određivanje stupnja inhibicije enzima α -glukozidaze

Uz metodu mjerenja inhibicije α -amilaze, za procjenu antidijabetičkog učinka ekstrakata koristi se i metoda temeljena na mjerenju stupnja inhibicije enzima α -glukozidaze. Ova metoda opisana je u radu autora Xiancui i sur., (2005), a ja sam je koristila uz određene modifikacije: volumen od 10 μL uzorka pomiješala sam sa 130 μL fosfatnog pufera koncentracije 50 mM (pH 6,5), te 10 μL otopine enzima α -glukozidaze (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) koncentracije 15 U/mL pripremljene u 50 mM fosfatnom puferu. Smjesu sam inkubirala 15 min na 37°C pri 50 okretaja/min. Potom sam u smjesu dodala 50 μL 1 mM PNPG (*p*-nitrofenil- α -D-glukopiranozid) pripremljenog također u 50 mM fosfatnom puferu. Uslijedila je druga inkubacija 5 min na 37°C i pri 50 okretaja/min. Nakon toga smjesi sam dodala još 50 μL Na_2CO_3 koncentracije 0,1 M (pH 10). Na mikrotitarsku pločicu u svaku jažicu nanosila sam volumen od 70 μL . Apsorbanciju sam izmjerila spektrofotometrom FLUOstar Optima pri 405 nm valne duljine a postotak inhibicije izračunala sam prema istoj formuli kao i postotak inhibicije α -amilaze.

2.13. Statistička obrada podataka

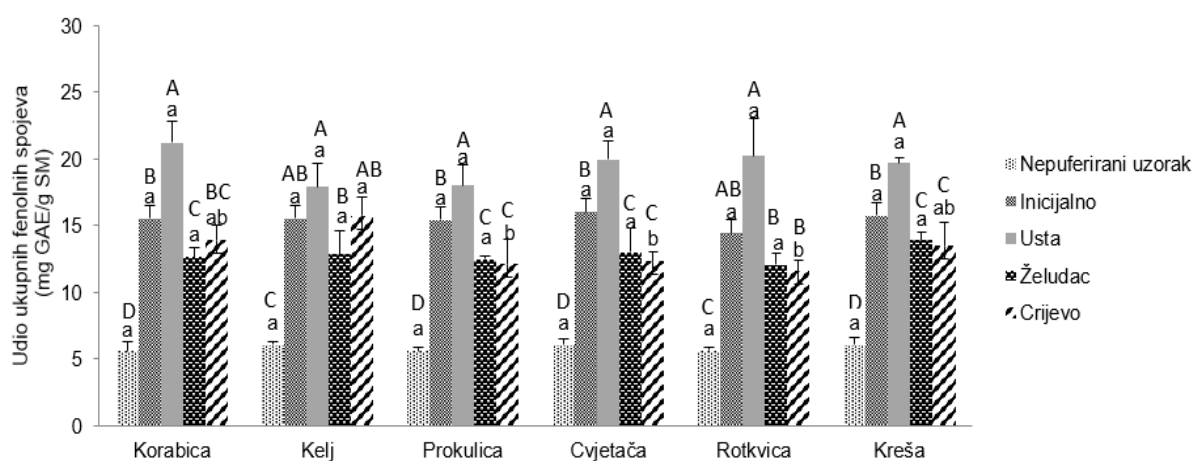
Dobivene podatke statistički sam obradila u programu Statistica 13,1 (Stat Soft Inc., SAD). Usporedbu uzoraka provela sam pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA) te primjenom testa „Duncan’s New Multiple Range Test“ (DNMRT), tj. *post hoc* testa višestrukih usporedbi. Vrijednosti označene različitim slovima smatraju se međusobno statistički značajno različitima (jednosmjerna ANOVA, Duncan test, $p \leq 0,05$).

3. REZULTATI

3.1. Udio ukupnih fenolnih spojeva u klicama kupusnjača u pojedinoj fazi *in vitro* modela ljudske probave

Rezultati na slici 11 prikazuju udio ukupnih fenolnih spojeva u mg ekvivalenata galne kiseline GAE/g suhe mase (SM) u originalnim (nepuferiranim) ekstraktima klica prije *in vitro* probave i u puferiranim ekstraktima klica u pojedinoj fazi *in vitro* modela probave (inicijalnoj, fazi probave u ustima, probave u želucu i probave u crijevu). Uočeno je da nema razlike u udjelu ukupnih fenolnih spojeva između originalnih ekstrakata navedenih vrsta klica. Razlika između klica nije uočena niti u inicijalnoj, te fazama probave u ustima i želucu. Međutim, u fazi crijeva uočene su razlike; klice kelja imale su značajno veći udio ukupnih fenolnih spojeva (15,75 mg GAE/g SM) nego klice prokulice, cvjetače i rotkvice (12,11 mg GAE/g SM, 12,34 mg GAE/g SM i 11,59 mg GAE/g SM).

Što se tiče odnosa udjela fenolnih spojeva jedne vrste klica između različitih faza probave, kod svake vrste klica najveći udio zabilježen je u fazi usta, s tim da se kod klica kelja i rotkvice udio ovih spojeva između inicijalne i faze usta nije značajno razlikovao. Razlike u udjelima fenolnih spojeva između faze želuca i crijeva nisu bile značajne. Najmanja razlika u udjelu ovih spojeva između faze usta i crijeva zabilježena je kod klica kelja (u crijevnoj fazi sadržaj ukupnih fenola je 1,14 puta manji u odnosu na sadržaj ukupnih fenola u fazi probave u ustima).



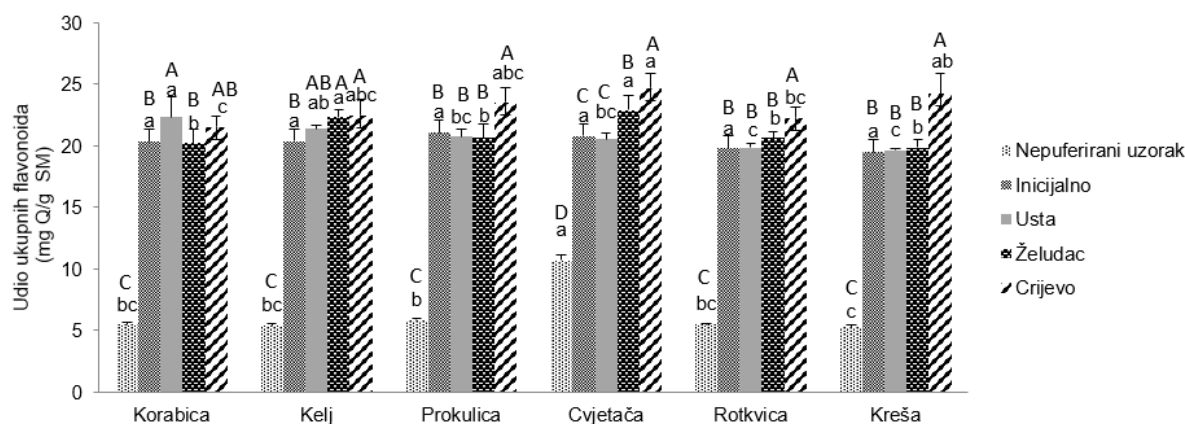
Slika 11. Udio ukupnih fenolnih spojeva izražen u miligramima ekvivalenata galne kiseline mg GAE/g suhe mase (SM) u uzorcima klica prije *in vitro* probave (nepuferirani uzorak) i uzorcima tijekom pojedine faze *in vitro* probave (inicijalno, usta, želudac, crijevo). Statistički značajno različite vrijednosti ($p \leq 0,05$) prikazane su

različitim slovima; malim slovima prikazan je odnos između pojedinih vrsta klica u istoj fazi, dok je velikim slovima prikazan odnos između različitih faza za svaku pojedinu vrstu klica. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm statistička pogreška.

3.2 Udio ukupnih flavonoida u klicama kupusnjača tijekom pojedine faze *in vitro* modela probave

Rezultati na slici 12 prikazuju udio ukupnih flavonoida izražen u mg ekvivalenata kvercetina QE/g suhe mase (SM) u nepuferiranim uzorcima klica prije *in vitro* probave i u puferiranim ekstraktima klica u pojedinoj fazi *in vitro* modela probave (inicijalnoj, fazi probave u ustima, probave u želucu i probave u crijevu). Originalni ekstrakti klica cvjetače sadrže značajno više (10,69 mg QE/g SM) ukupnih flavonoida od ostalih originalnih uzoraka. U inicijalnoj fazi probave nije zabilježena statistički značajna razlika između uzoraka. U fazi usta klice korabice imale su značajno veći udio ukupnih flavonoida nego klice prokulice, cvjetače, rotkvice i kreše. U fazi želuca klice cvjetače i kelja imale su značajno više ukupnih flavonoida od ostalih uzoraka. U fazi crijeva najveći udio ukupnih flavonoida zabilježen je u klicama cvjetače (24,70 mg QE/g SM).

Što se tiče odnosa udjela ukupnih flavonoida jedne vrste klica između različitih faza probave, klice prokulice, cvjetače, rotkvice i kreše imale su značajno veći udio ukupnih flavonoida u fazi crijeva nego u bilo kojoj od prethodnih faza. Klice korabice najveći udio ove skupine spojeva imale su u fazi usta i crijeva, dok se udio ukupnih flavonoida klica kelja nije značajno mijenjao od faze usta do konačne faze crijeva. Konstantan značajan porast udjela ukupnih flavonoida od faze usta do faze crijeva zabilježen je kod klica cvjetače.

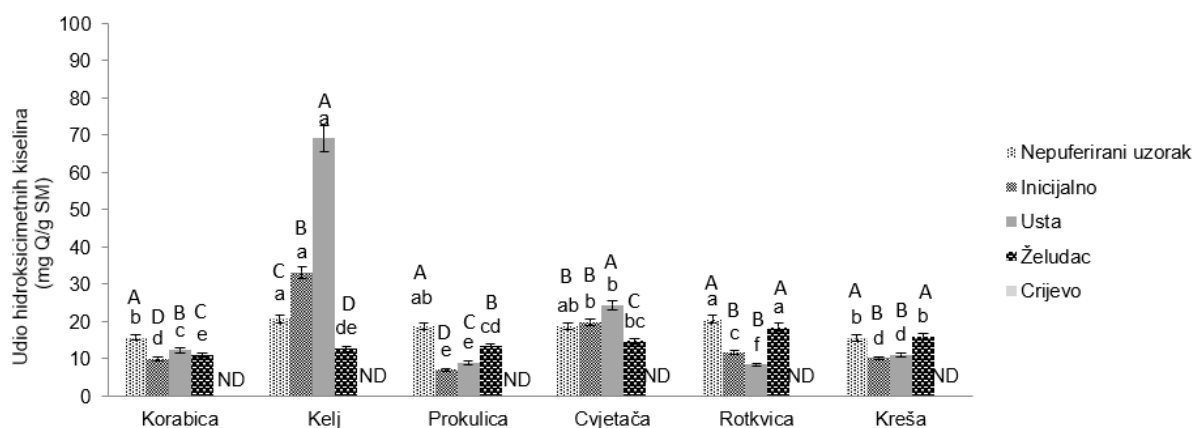


Slika 12. Udio ukupnih flavonoida izražen u miligramima ekvivalenta kvercetina mg QE/g suhe mase (SM) u uzorcima klica prije *in vitro* probave (nepuferirani uzorak) i uzorcima tijekom pojedine faze *in vitro* probave (inicijalno, usta, želudac, crijevo). Statistički značajno različite vrijednosti ($p \leq 0,05$) prikazane su različitim slovima; malim slovima prikazan je odnos između pojedinih vrsta klica u istoj fazi, dok je velikim slovima prikazan odnos između različitih faza za svaku pojedinu vrstu klica. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm statistička pogreška.

3.3. Udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina u klicama kupusnjača u pojedinoj fazi *in vitro* modela ljudske probave

Rezultati na slici 13 prikazuju udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina izražen u mg ekvivalenta cimetine kiseline CAE/g suhe mase (SM) u nepuferiranim uzorcima klica prije *in vitro* probave i u puferiranim ekstraktima klica u pojedinoj fazi *in vitro* modela probave (inicijalnoj, fazi probave u ustima, probave u želucu i probave u crijevu). Prije probave najveći udio hidroksicimetnih kiselina zabilježen je u klicama kelja (20,70 mg CAE/g SM) i rotkvice (20,54 mg CAE/g SM), dok su klice korabice i kreše imale značajno niži udio. Na kraju probave, u fazi crijeva, niti u jednoj vrsti klica ove kiseline nisu detektirane. U fazi želuca, najviši udio hidroksicimetnih kiselina imale su klice rotkvice (18,53 mg CAE/g SM). Najveće promjene udjela ovih kiselina tijekom probave zabilježila sam kod klica kelja, u fazi usta imale su značajno veći udio od bilo koje druge faze i bilo koje druge vrste klica, 69,16 mg CAE/g SM.

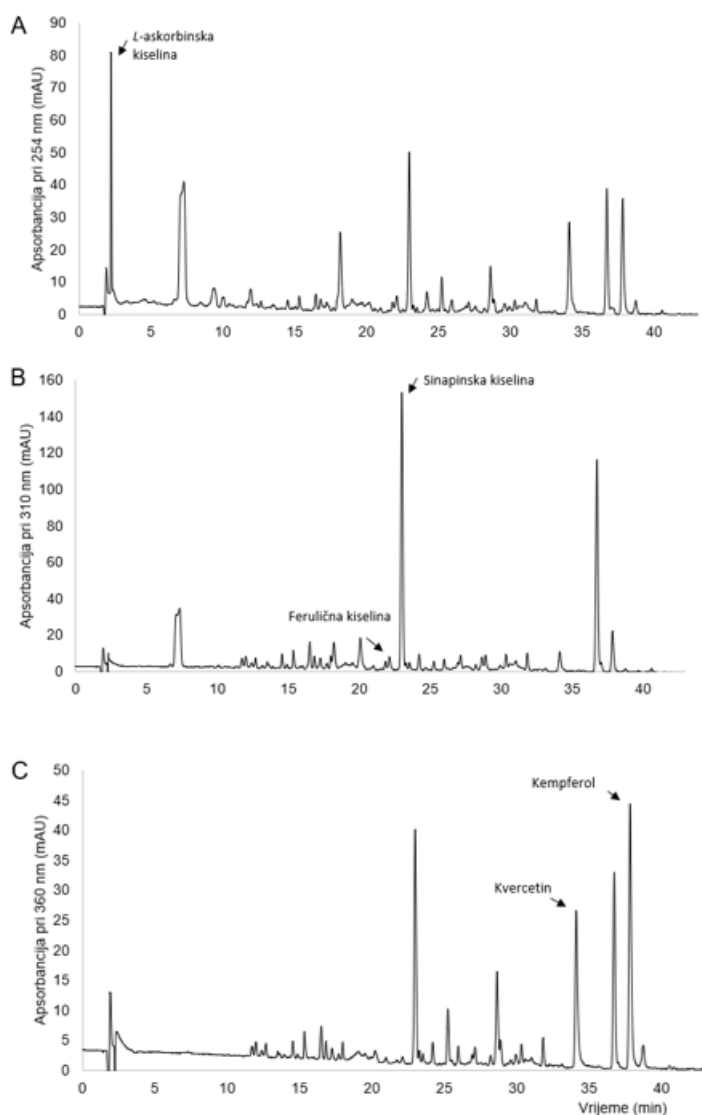
Sve faze probave pojedine vrste statistički se značajno razlikuju, osim inicijalne i faze usta kod klica kreše i rotkvice. Najveći udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina zabilježen je u nepuferiranim uzorcima, osim kod kelja i cvjetače gdje je najveća koncentracija zabilježena u fazi usta.



Slika 13. Udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina izražen u miligramima ekvivalenta cimetne kiseline/g suhe mase (SM) u uzorcima klica prije *in vitro* probave (nepuferirani uzorak) i uzorcima tijekom pojedine faze *in vitro* probave (inicijalno, usta, želudac, crijevo). Statistički značajno različite vrijednosti ($p \leq 0,05$) prikazane su različitim slovima; malim slovima prikazan je odnos između pojedinih vrsta klica u istoj fazi, dok je velikim slovima prikazan odnos između različitih faza za svaku pojedinu vrstu klica. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm statistička pogreška.

3.4. Udio *L*-askorbinske kiseline i pojedinačnih fenolnih spojeva u klicama kupusnjača u pojedinoj fazi *in vitro* modela ljudske probave

Metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) razdvojeni su, identificirani i kvantificirani sljedeći spojevi iz uzoraka klica kupusnjača: *L*-askorbinska kiselina, ferulična kiselina, sinapinska kiselina, kempferol i kvercetin. Na slici 14 prikazani su kromatogrami ekstrakta cvjetače analiziranog pri valnim duljinama od 254 nm, 310 nm i 360 nm i apsorpcijski maksimumi spojeva od interesa.

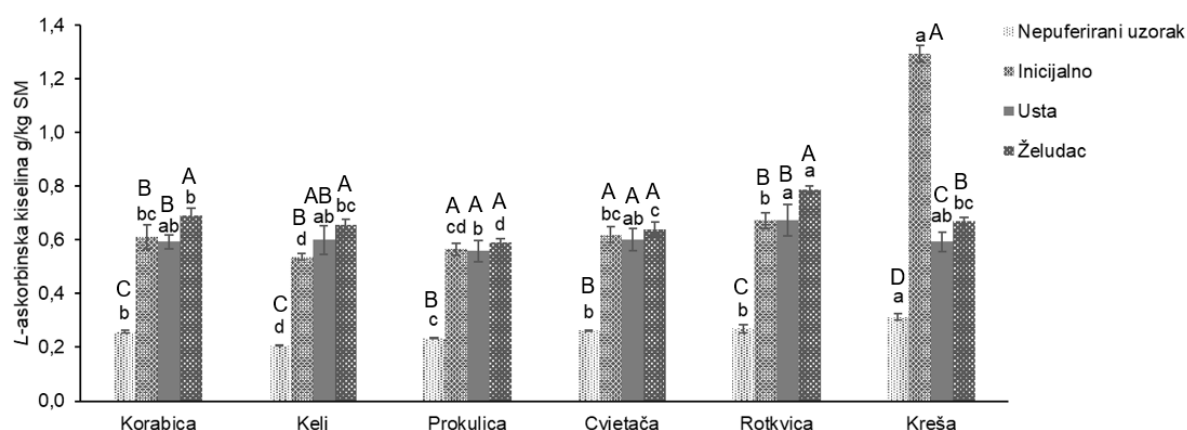


Slika 14. Kromatogrami ekstrakta cvjetače analiziranog pri valnim duljinama od 254 nm (A), 310 nm (B) i 360 nm (C). Na svakom kromatogramu strelicama su označeni apsorpcijski maksimumi spojeva od interesa (A – *L*-askorbinska kiselina, B – ferulična i sinapinska kiselina, C – kempferol i kvercetin).

3.4.1. *L*-askorbinska kiselina

Rezultati na slici 15 prikazuju udio *L*-askorbinske kiseline izražen u g/kg suhe mase (SM) u nepuferiranim uzorcima klica prije *in vitro* probave i u puferiranim ekstraktima klica u pojedinoj fazi *in vitro* modela probave (inicijalnoj, fazi probave u ustiman i probave u želucu). Rezultati faze probave u crijevima su neobični pa ih nisam prikazala jer bi ih svakako trebalo ponoviti i provjeriti. U originalnim (nepuferiranim) uzorcima najveći udio *L*-

askorbinske kiseline zabilježen je u klicama kreše (0,31 g/kg SM), dok je najmanji udio zabilježen u klicama kelja (0,21 g/kg SM). S druge strane, nakon probave u ustima i želucu najviše *L*-askorbinske kiseline sadržavale su klice rotkvice (redom 0,67 g/kg SM i 0,78 g/kg SM). Udio ovog vitamina tijekom probave najstabilniji je bio u klicama prokulice i cvjetače pa kelja, dok je kod korabice, rotkvice i kreše narastao u fazi želuca u odnosu na prethodnu fazu usta. Rezultat analize u fazi crijeva je upitan i svakako bi trebalo ponoviti pokus pa ne prikazujem podatke.

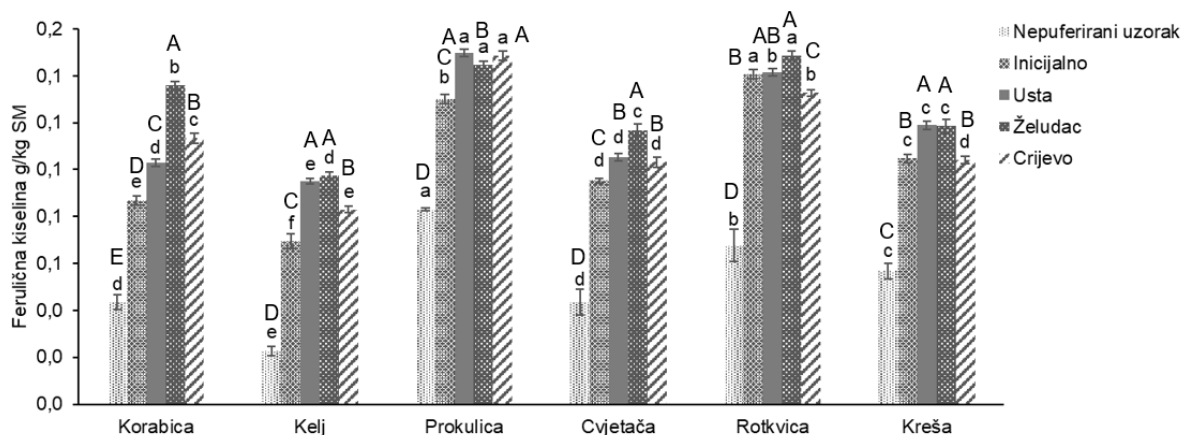


Slika 15. Udio *L*-askorbinske kiseline izražen u g/kg suhe mase (SM) u uzorcima klica prije *in vitro* probave (nepuferirani uzorak) i uzorcima tijekom pojedine faze *in vitro* probave (inicijalno, usta, želudac). Statistički značajno različite vrijednosti ($p \leq 0,05$) prikazane su različitim slovima; malim slovima prikazan je odnos između pojedinih vrsta klica u istoj fazi, dok je velikim slovima prikazan odnos između različitih faza za svaku pojedinu vrstu klica. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm statistička pogreška.

3.4.2. Ferulična kiselina

Rezultati na slici 16 prikazuju udio ferulične kiseline izražen u g/kg suhe mase (SM) u nepuferiranim uzorcima klica prije *in vitro* probave i u puferiranim ekstraktima klica u pojedinoj fazi *in vitro* modela probave (inicijalnoj, fazi probave u ustima, probave u želucu i probave u crijevu). Među originalnim uzorcima, najbogatiji feruličnom kiselinom je onaj klica prokulice (0,08 g/kg SM), dok klice kelja imaju najmanji udio ove kiseline. Tijekom faze probave u želucu najveći udio ovog spoja imale su klice rotkvice (0,15 g/kg SM) i prokulice (0,14 g/kg SM), dok su u fazi crijeva to bile klice prokulice (0,15 g/kg SM). Generalno, kod svih vrsta klica najveći udio ove kiseline zabilježen je nakon faze probave u želucu, s tim da

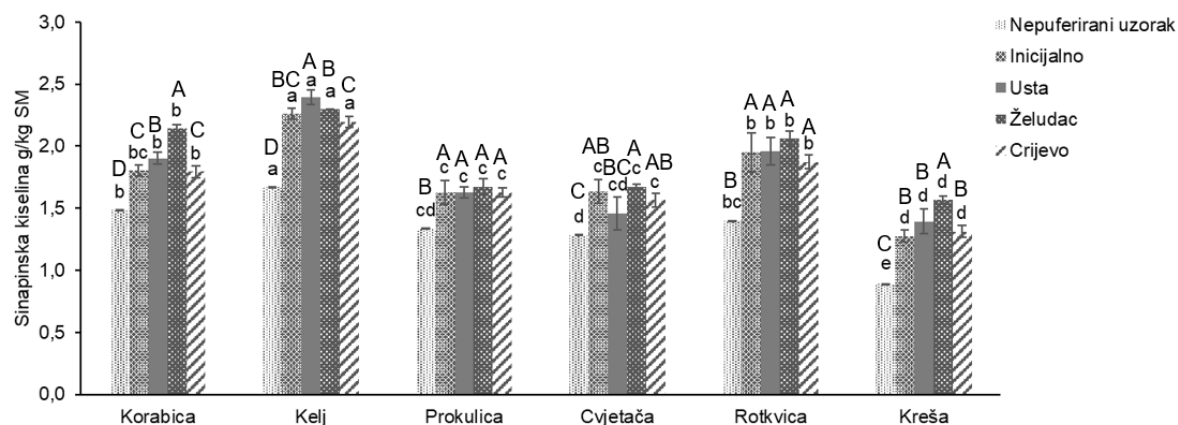
je kod klica prokulice vrlo sličan udio bio i u ostalih faza, a kod kreše faza usta imala je gotovo identičan udio kao i faza želuca.



Slika 16. Udio ferulične kiseline izražen u g/kg suhe mase (SM) u uzorcima klica prije *in vitro* probave (nepuferirani uzorak) i uzorcima tijekom pojedine faze *in vitro* probave (inicijalno, usta, želudac, crijevo). Statistički značajno različite vrijednosti ($p \leq 0,05$) prikazane su različitim slovima; malim slovima prikazan je odnos između pojedinih vrsta klica u istoj fazi, dok je velikim slovima prikazan odnos između različitih faza za svaku pojedinu vrstu klica. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm statistička pogreška.

3.4.3. Sinapinska kiselina

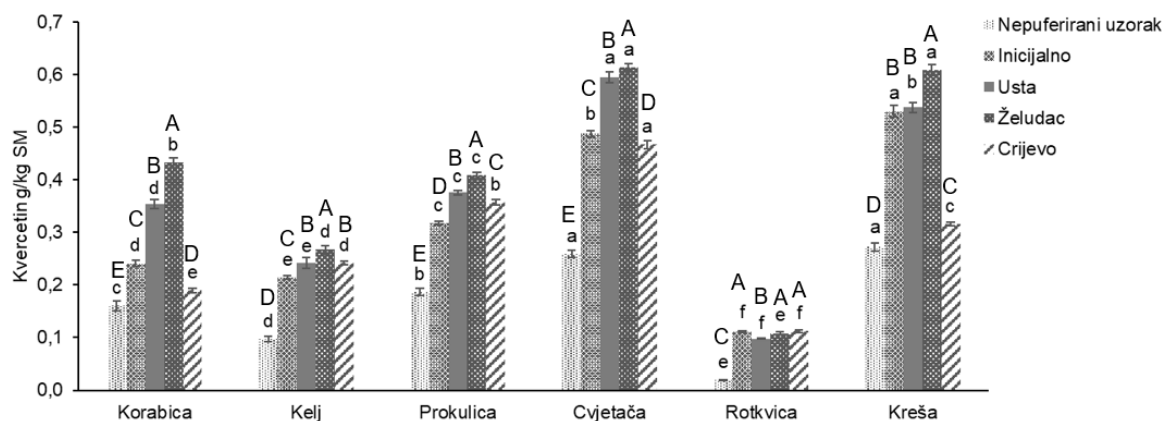
Rezultati na slici 17 prikazuju udio sinapinske kiseline izražen u g/kg suhe mase (SM) u originalnim (nepuferiranim) uzorcima klica prije *in vitro* probave i u puferiranim ekstraktima klica u pojedinoj fazi *in vitro* modela probave (inicijalnoj, fazi probave u ustima, probave u želucu i probave u crijevu). Među originalnim uzorcima, najveći udio sinapinske kiseline zabilježen je kod klica kelja (1,74 g/kg SM), a najmanji kod klica kreše (0,9 g/kg SM). Isti slučaj je i nakon bilo koje od faza probave, najbogatije ovom kiselinom su klice kelja. Uvjeti probave najmanje su utjecali na udio sinapinske kiseline kod klica prokulice i rotkvice, nije se značajno mijenjao.



Slika 17. Udio sinapinske kiseline izražen u g/kg suhe mase (SM) u uzorcima klica prije *in vitro* probave (nepuferirani uzorak) i uzorcima tijekom pojedine faze *in vitro* probave (inicijalno, usta, želudac, crijevo). Statistički značajno različite vrijednosti ($p \leq 0,05$) prikazane su različitim slovima; malim slovima prikazan je odnos između pojedinih vrsta klica u istoj fazi, dok je velikim slovima prikazan odnos između različitih faza za svaku pojedinu vrstu klica. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm statistička pogreška.

3.4.4. Kvercetin

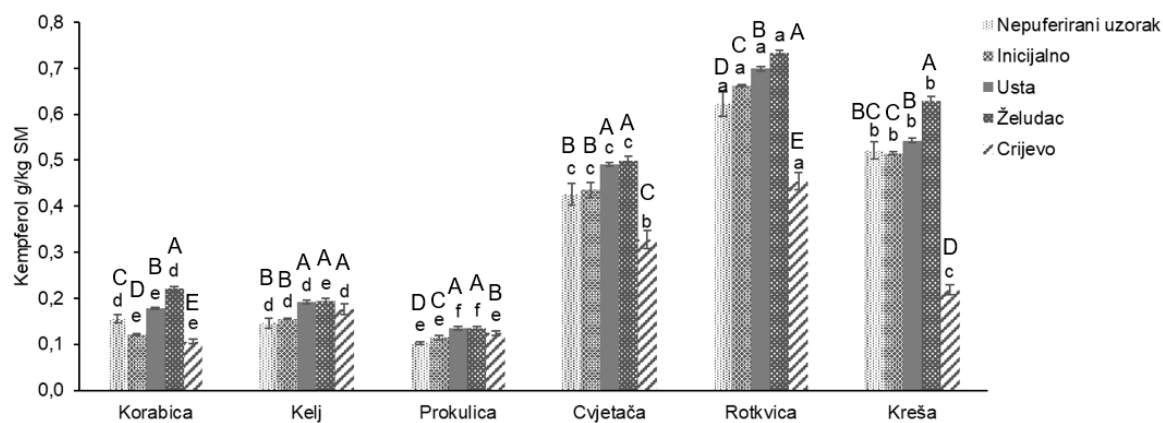
Rezultati na slici 18 prikazuju udio kvercetina izražen u g/kg suhe mase (SM) u originalnim (nepuferiranim) uzorcima klica prije *in vitro* probave i u puferiranim ekstraktima klica u pojedinoj fazi *in vitro* modela probave (inicijalnoj, fazi probave u ustima, probave u želucu i probave u crijevu). Među originalnim uzorcima, najveći udio kvercetina zabilježen je kod klica cvjetače (0,26 g/kg SM) i kreše (0,27 g/kg SM), a najmanji kod rotkvice (0,02 g/kg SM). U odnosu na ostale uzorke, klice cvjetače imale su najveći udio kvercetina tijekom faze probave u ustima (0,6 g/kg SM) i crijevima (0,47 g/kg SM). U fazi probave u želucu, uz klice cvjetače, i klice kreše su sadržavale najveći udio ove kiseline. Klice rotkvice imale su najniži kvercetin u bilo kojoj od faza probave. Generalno, kod svih vrsta klica udio kvercetina tijekom probave najveći je bio u fazi želuca, izuzev rotkvice kod koje se nije razlikovao između faze želuca i crijeva.



Slika 18. Udio kvercetina izražen u g/kg suhe mase u uzorcima klica prije *in vitro* probave (nepuferirani uzorak) i uzorcima tijekom pojedine faze *in vitro* probave (inicijalno, usta, želudac, crijevo). Statistički značajno različite vrijednosti ($p \leq 0,05$) prikazane su različitim slovima; malim slovima prikazan je odnos između pojedinih vrsta klica u istoj fazi, dok je velikim slovima prikazan odnos između različitih faza za svaku pojedinu vrstu klica. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm statistička pogreška.

3.4.5. Kempferol

Rezultati na slici 19 prikazuju udio kempferola izražen u g/kg suhe mase (SM) u originalnim (nepuferiranim) uzorcima klica prije *in vitro* probave i u puferiranim ekstraktima klica u pojedinoj fazi *in vitro* modela probave (inicijalnoj, fazi probave u ustima, probave u želucu i probave u crijevu). Najveći udio kempferola imaju klice rotkvice i prije (0,62 g/kg SM) i poslije probave (od faze usta do faze crijeva redom 0,7 g/kg SM, 0,73 g/kg SM, 0,45 g/kg SM). Najsiromašnije kempferolom su klice prokulice, također i prije i nakon bilo koje faze probave. Nakon faze probave u crijevima, uz prokulicu, najnižu koncentraciju ovog flavonoida imale su i klice korabice.

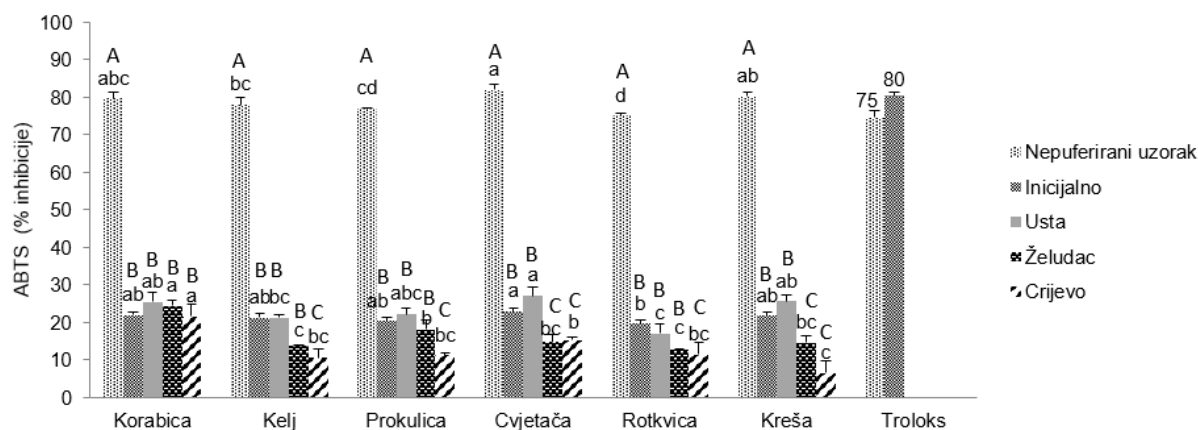


Slika 19. Udio kempferola izražen u g/kg suhe mase (SM) u uzorcima klica prije *in vitro* probave (nepuferirani uzorak) i uzorcima tijekom pojedine faze *in vitro* probave (inicijalno, usta, želudac, crijevo). Statistički značajno različite vrijednosti ($p \leq 0,05$) prikazane su različitim slovima; malim slovima prikazan je odnos između pojedinih vrsta klica u istoj fazi, dok je velikim slovima prikazan odnos između različitih faza za svaku pojedinu vrstu klica. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm statistička pogreška.

3.5. Antioksidacijski potencijal klica kupusnjača mjereno metodom ABTS u pojedinoj fazi *in vitro* modela ljudske probave

Rezultati na slici 20 prikazuju antioksidacijski potencijal mjereno metodom ABTS izražen kao postotak inhibicije u nepuferiranim uzorcima klica prije *in vitro* probave i u puferiranim ekstraktima klica u pojedinoj fazi *in vitro* modela probave (inicijalnoj, fazi probave u ustima, probave u želucu i probave u crijevu). Kod svih vrsta klica, najveći antioksidacijski potencijal pokazali su originalni ekstrakti, dakle oni prije probave. Štoviše, svi originalni ekstrakti klica imali su jači antioksidacijski potencijal od standarda troloksa. Najjači antioksidacijski potencijal pokazao je originalni ekstrakt klica cvjetače (81,95%).

Tijekom probave, antioksidacijski potencijal statistički značajno je pao u fazi crijeva u uzorcima kelja i prokulice, a već u fazi želuca u uzorcima cvjetače i kreše. Kod klica korabice, antioksidacijski potencijal nije se mijenjao tijekom *in vitro* probave.

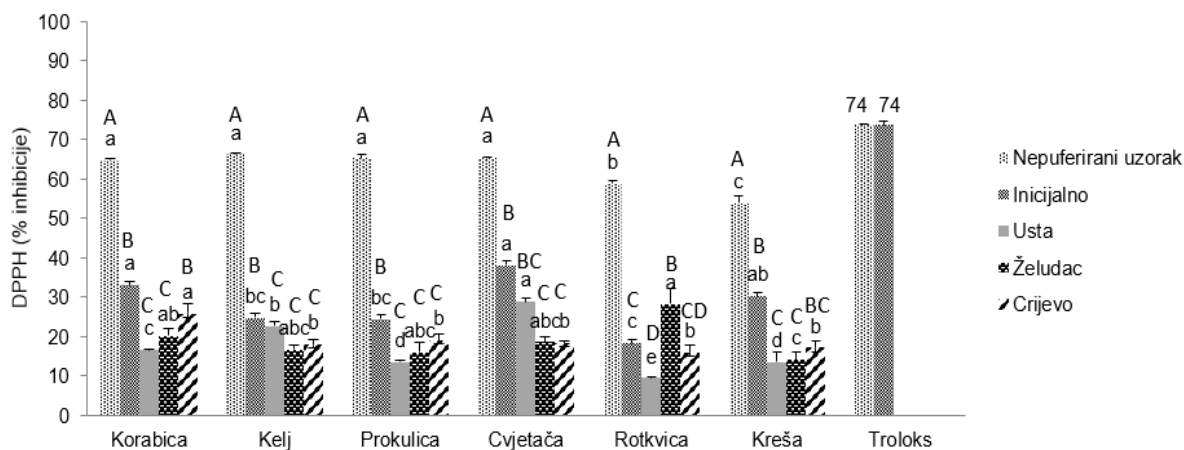


Slika 20. Antioksidacijska aktivnost mjerena metodom ABTS izražena kao postotak inhibicije u nepuferiranim uzorcima klica prije *in vitro* probave i puferiranim uzorcima klica u *in vitro* probavi (probava inicijalno, probava u ustima, probava u želucu i probava u crijevu). Statistički značajno različite vrijednosti ($p \leq 0,05$) prikazane su različitim slovima; malim slovima prikazan je odnos između pojedinih vrsta klica u istoj fazi, dok je velikim slovima prikazan odnos između različitih faza za svaku pojedinu vrstu klica. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm statistička pogreška. Koncentracija korištenog troloksa je 7,5 g/L te 50 g/L.

3.6. Antioksidacijski potencijal klica kupusnjača mjereno metodom DPPH u pojedinoj fazi *in vitro* modela ljudske probave

Rezultati na slici 21 prikazuju antioksidacijski potencijal mjereno metodom DPPH izražen kao postotak inhibicije DPPH• radikala u nepuferiranim uzorcima klica prije *in vitro* probave i u puferiranim ekstraktima klica u pojedinoj fazi *in vitro* modela probave (inicijalnoj, fazi probave u ustima, probave u želucu i probave u crijevu). Kod svih vrsta klica, najveći antioksidacijski potencijal pokazali su originalni ekstrakti, dakle oni prije probave. Antioksidacijski potencijal originalnih ekstrakata klica korabice, kelja, prokulice i cvjetače značajno je viši od onoga klica rotkvice i kreše. Štoviše, originalni ekstrakti klica korabice, kelja, prokulice i cvjetače pokazuju antioksidacijski potencijal gotovo identičan onome troloksa, standardnog antioksidansa čiji se antioksidacijski potencijal koristi kao referentna vrijednost u testovima antioksidacijskog učinka. U fazi usta najveći antioksidacijski potencijal pokazao je ekstrakt cvjetače, u fazi želuca ekstrakt rotkvice, dok je u fazi crijeva najučinkovitiji bio ekstrakt korabice.

Kod klica korabice antioksidacijski potencijal je rastao od faze usta do faze crijeva, kod klica rotkvice je najviši bio u fazi želuca, a kod ostalih klica nije se značajno mijenjao tijekom probave.



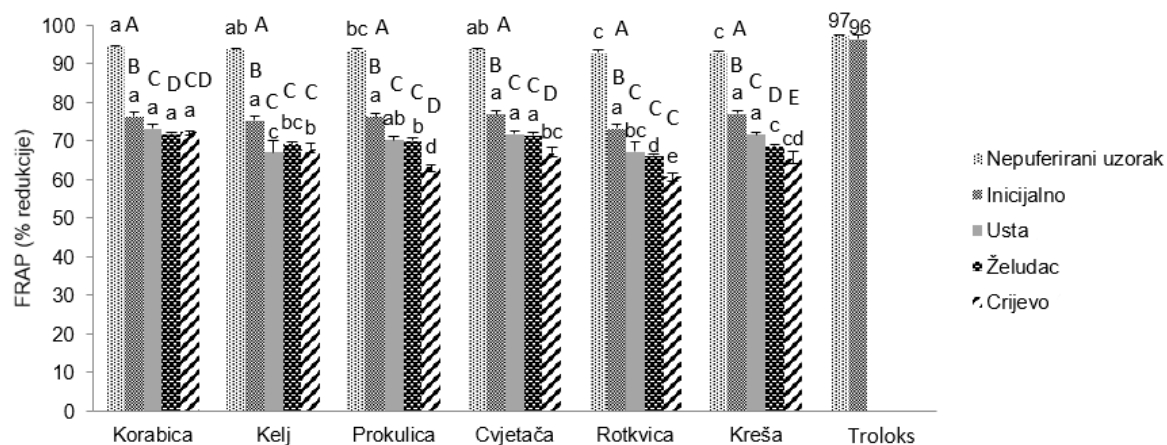
Slika 21. Antioksidacijska aktivnost mjerena metodom DPPH izražena kao postotak inhibicije radikala DPPH^{*} u nepuferiranim uzorcima klica prije *in vitro* probave i uzorcima tijekom pojedine faze *in vitro* probave (inicijalno, usta, želudac, crijevo). Statistički značajno različite vrijednosti ($p \leq 0,05$) prikazane su različitim slovima; malim slovima prikazan je odnos između pojedinih vrsta klica u istoj fazi, dok je velikim slovima prikazan odnos između različitih faza za svaku pojedinu vrstu klica. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm statistička pogreška. Koncentracija korištenog troloksa je 7,5 g/L te 50 g/L.

3.7. Antioksidacijski potencijal klica kupusnjača mjereno metodom FRAP u pojedinoj fazi *in vitro* modela ljudske probave

Rezultati na slici 22 prikazuju antioksidacijsku aktivnost mjerenu metodom FRAP izraženu kao postotak redukcije Fe^{3+} u nepuferiranim uzorcima klica prije *in vitro* probave i u puferiranim ekstraktima klica u pojedinoj fazi *in vitro* modela probave (inicijalnoj, fazi probave u ustima, probave u želucu i probave u crijevu). Najveću antioksidacijsku aktivnost pokazuju nepuferirani uzorci kod svih vrsta. Nakon probave u fazi želuca najveći antioksidacijski potencijal imale su klice korabice i cvjetače, a nakon faze crijeva klice korabice.

U uzorcima klica kelja i rotkvice nije zabilježena statistički značajna promjena antioksidacijskog potencijala tijekom faza usta, želuca i crijeva. Antioksidacijski potencijal

klica prokulice i cvjetače značajno se smanjio u fazi crijeva, dok se kod klica kreše potencijal značajno smanjio.

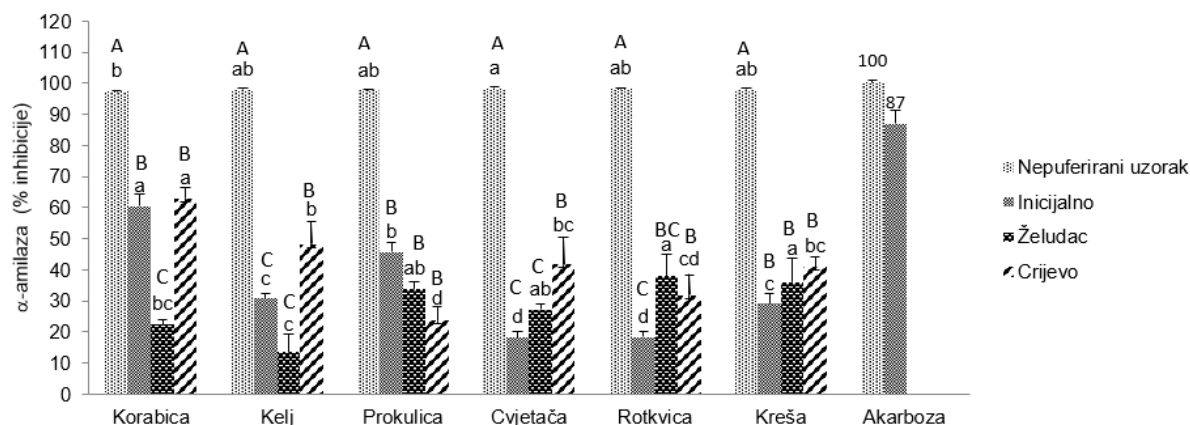


Slika 22. Antioksidacijska aktivnost mjerena metodom FRAP izražena kao postotak redukcije Fe^{3+} u nepuferiranim uzorcima klica prije *in vitro* probave i puferiranim uzorcima klica u *in vitro* probavi (probava inicijalno, probava u ustima, probava u želucu i probava u crijevu). Statistički značajno različite vrijednosti ($p \leq 0,05$) prikazane su različitim slovima; malim slovima prikazan je odnos između pojedinih vrsta klica u istoj fazi, dok je velikim slovima prikazan odnos između različitih faza za svaku pojedinu vrstu klica. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm statistička pogreška. Koncentracija korištenog trolaksa je 7,5 g/L te 50 g/L.

3.8. Stupanj inhibicije aktivnosti enzima α -amilaze ekstraktima klica kupusnjača u pojedinoj fazi *in vitro* modela ljudske probave

Rezultati na slici 23 prikazuju postotak inhibicije enzima α -amilaze u nepuferiranim uzorcima klica prije *in vitro* probave i u puferiranim ekstraktima klica u pojedinoj fazi *in vitro* modela probave (inicijalnoj, fazi probave u želucu i probave u crijevu). Najveću inhibicijsku aktivnost pokazali su nepuferirani uzorci kod svih vrsta. Štoviše, postotak inhibicije bio je veći nego onaj akarboze, standardnog antidijabetičkog lijeka. Jedina statistički značajna razlika kod originalnih uzoraka uočena je između cvjetače i korabice; klice cvjetače značajnije su inhibirale aktivnost enzima α -amilaze. U fazi crijeva klice korabice značajno su jače inhibirale ovaj enzim od ostalih klica, dok su klice prokulice bile najslabijeg učinka.

Tijekom probave, klice korabice, kelja i cvjetače značajnije su inhibirale aktivnost α -amilaze u fazi crijeva nego u fazi želuca, dok kod prokulice, rotkvice i kreše nije uočena značajna razlika.

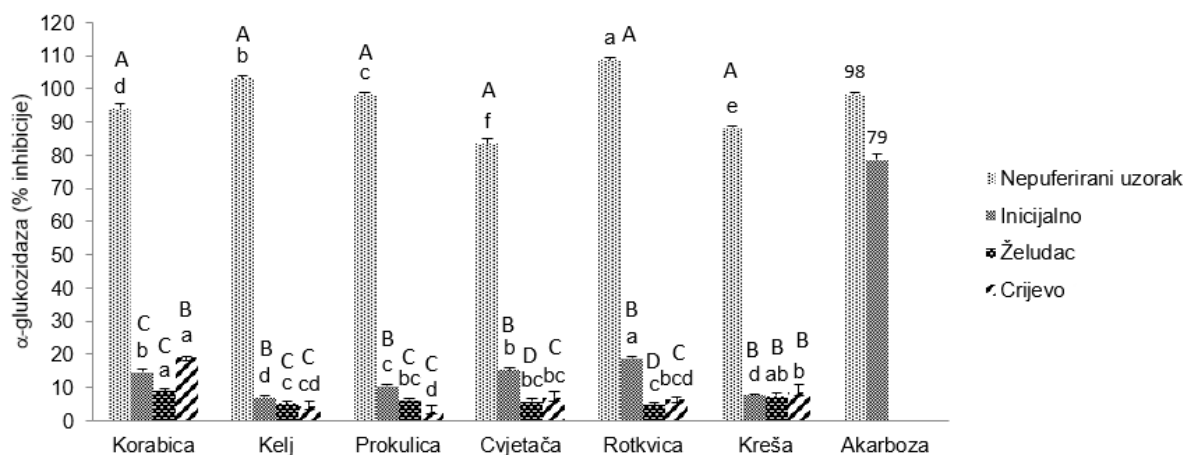


Slika 23. Postotak inhibicije enzima α -amilaze u nepuferiranim uzorcima klica prije *in vitro* probave i puferiranim uzorcima klica u *in vitro* probavi (probava inicijalno, probava u ustima, probava u želucu i probava u crijevu). Statistički značajno različite vrijednosti ($p \leq 0,05$) prikazane su različitim slovima; malim slovima prikazan je odnos između pojedinih vrsta klica u istoj fazi, dok je velikim slovima prikazan odnos između različitih faza za svaku pojedinu vrstu klica. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm statistička pogreška. Koncentracija korištene akarboze je 7,5 g/L.

3.9. Stupanj inhibicije aktivnosti enzima α -glukozidaze ekstraktima klica kupusnjača u pojedinoj fazi *in vitro* modela ljudske probave

Rezultati na slici 24 prikazuju postotak inhibicije enzima α -glukozidaze u nepuferiranim uzorcima klica prije *in vitro* probave i u puferiranim ekstraktima klica u pojedinoj fazi *in vitro* modela probave (inicijalnoj, fazi probave u želucu i probave u crijevu). Najveću inhibicijsku aktivnost pokazali su nepuferirani uzorci kod svih vrsta. Štoviše, postotak inhibicije bio je veći nego onaj akarboze, standardnog antidijabetičkog lijeka.

Postotak inhibicije snižava se po fazama probave u uzorcima kelja i prokulice, dok su klice korabice, cvjetače, i rotkvice značajnije inhibirale enzim α -glukozidazu nakon faze probave u crijevima nego u želucu.



Slika 24. Postotak inhibicije enzima α -glukozidaze u nepuferiranim uzorcima klica prije *in vitro* probave i puferiranim uzorcima klica u *in vitro* probavi (probava inicijalno, probava u ustima, probava u želucu i probava u crijevu). Statistički značajno različite vrijednosti ($p \leq 0,05$) prikazane su različitim slovima; malim slovima prikazan je odnos između pojedinih vrsta klica u istoj fazi, dok je velikim slovima prikazan odnos između različitih faza za svaku pojedinu vrstu klica. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri biološke replike \pm statistička pogreška. Koncentracija korištene akarboze je 7,5 g/L.

3.10. Raspored parametara najviših vrijednosti s obzirom na vrstu klica

Shema na slici 25 prikazuje raspored parametara s najvišim vrijednostima između analiziranih klica prije probave, te nakon probave u *in vitro* simuliranim uvjetima želuca i crijeva. Vidljivo je da su klice korabice imale najviši antioksidacijski potencijal mjereno bilo kojom od tri metode, kao i da su najučinkovitije inhibirale enzim α -glukozidazu i prije i nakon probave u fazi želuca i crijeva. Klice kelja imale su najvišu koncentraciju sinapinske, klice prokulice ferulične kiseline, klice rotkvice kempferola, a klice cvjetače ukupnih flavonoida i kvercetina prije i nakon probave. Klice kreše jedine nisu imale niti jedan parametar dominantan nakon probave u crijevima.

Vrsta klice	Prije probave	Probava u želucu	Probava u crijevu
Korabica	ABTS, DPPH, FRAP, α -glukozidaza	ABTS, DPPH, FRAP, α -glukozidaza	ABTS, DPPH, FRAP, α -amilaza, α -glukozidaza
Kelj	THCA, sinapinska kis., FRAP, DPPH, α -amilaza, α -glukozidaza	sinapinska kis., DPPH	TP, sinapinska kis.
Prokulica	ferulična kis., DPPH, α -amilaza, α -glukozidaza	ferulična kis., DPPH	ferulična kis.
Cvjetača	TF, Q, ABTS, DPPH, α -amilaza	TF, Q, DPPH, FRAP	TF, Q
Rotkvica	THCA, K, α -amilaza, α -glukozidaza	THCA, vitamin C, ferulična kis., K, α -amilaza	K
Kreša	ABTS, vitamin C, Q, α -amilaza	α -amilaza, Q	/

Slika 25. Raspored parametara s najvišim vrijednostima između analiziranih klica prije probave, te nakon probave u *in vitro* simuliranim uvjetima želuca i crijeva. ABTS - % inhibicije ABTS radikala, DPPH -% inhibicije DPPH radikala, FRAP - % redukcije Fe³⁺, TP – ukupni fenoli, TF – ukupni flavonoidi, THCA – ukupne hidroksicimne kiseline, Q – kvercetin, K – kempferol.

4. RASPRAVA

Zbog povećane težnje zdravijoj prehrani, interes za svježju, funkcionalnu biljnu hranu raste. Klice su mlado tkivo koje je biokemijski vrlo aktivno i u mnogo slučajeva su bogatije bioaktivnim spojevima od zrelih jedinki (Wojdyło i sur., 2020). Tako je primjerice koncentracija fenolnih spojeva i glukozinolata deseterostruko veća u klicama u usporedbi sa zrelim biljkama kupusnjača (Cevallos-Casals i Cisneros-Zevallos, 2010). Također, klice pekinškog kupusa (*Brassica pekinensis* Rupr.) sadrže više salicilne kiseline i vitamina C nego odrasle biljke (Šola i sur., 2020). Klice nekih žitarica bogatije su bioaktivnim spojevima i pokazuju značajnije pozitivne biološke učinke na ljudski organizam nego neproklijane sjemenke (Nelson i sur., 2013). Poznato je da kupusnjače, ponajviše njihove klice, sadrže velike količine antioksidansa poput flavonoida i glukozinolata, te su zbog toga jedno od popularnijih mikropovrća (eng. *microgreens*) koje ljudi konzumiraju. Antioksidansi poput već spomenutih flavonoida i glukozinolata mogu interferirati s različitim sustavima koji proizvode slobodne radikale u ljudskom organizmu ili povećati produkciju endogenih antioksidansa (Nijveldt i sur., 2012). Nadalje, biljni flavonoidi koje sadrže kupusnjače također su prepoznati i kao moćni inhibitori α -amilaze i α -glukozidaze, enzima koji sudjeluju u probavi ugljikohidrata, što je poželjno u terapiji dijabetesa tipa II (Tadera i sur., 2006). S obzirom da je dostupno vrlo malo informacija o biorasploživosti spojeva i antioksidacijskom potencijalu klica tijekom procesa probave (de la Fuente i sur., 2019), a o njihovom hipoglikemijskom učinku tijekom probave ih uopće nema, cilj ovog rada bio je analizirati iste i time doprinijeti razumijevanju biopotencijala klica kupusnjača.

Fitokemijski profil ekstrakata biljaka mijenja se tijekom prolaska kroz simulirani probavni sustav čovjeka (Vallejo i sur., 2004; Šola i sur., 2020). Kemijski sastav ekstrakta neke biljne vrste u epruveti znatno je drugačiji od sastava tog ekstrakta tijekom pojedine faze probave istoga. Naime, bioaktivni spojevi biljaka dolaze u interakciju s različitim spojevima i mikroorganizmima prisutnima u probavnom sustavu, što posljedično utječe na njihovu biorasploživost, a samim time i bioaktivnost, u organizmu čovjeka. Prema Cardoso i sur. (2015), pojam biorasploživosti podrazumijeva onaj dio komponente koji se otpušta iz biljnog materijala u gastrointestinalni trakt i tako postaje dostupan za intestinalnu apsorpciju. Podaci dobiveni na temelju *in vivo* analiza predstavljaju referentni standard i predstavljaju najpreciznije znanstvene dokaze o biorasploživosti nekog nutrijenta ili bioaktivnog spoja. Međutim, brojni nedostaci poput ograničenja u dizajnu eksperimenta, poteškoća u tumačenju podataka, visokih troškova opreme, etičkih pitanja i sl. ograničavaju korisnost *in vivo* metoda za istraživanje biorasploživosti bioaktivnih spojeva iz velikog broja različitih vrsta biljnog, ili nekog drugog, materijala koji se koristi kao hrana (Van Buggenhout i sur., 2010). S druge

strane, *in vitro* modeli su isplativi, reproducibilni i općenito brze metode koje se mogu koristiti za utvrđivanje učinaka matriksa hrane i metoda prerade na bioraspoloživost bioaktivnih spojeva u hrani te se koriste kao simulacije u svrhu predviđanja (Guerra i sur., 2012). Ipak, unatoč njihovom potencijalu i širokoj primjeni, ne oponašaju u potpunosti sveukupne procese koji se događaju *in vivo*, osobito hormonsku i kontrolu na razini živčanog sustava, mehanizme povratnih informacija, aktivnost stanica sluznice, složenost peristaltičkih pokreta i uključenost lokalnog imunskog sustava (Guerra i sur., 2012) pa to svakako treba imati na umu prilikom interpretacije rezultata. U ovom radu sve korištene metode analiza provedene su u *in vitro* uvjetima.

In vitro model ljudske probave omogućuje procjenu kemijske stabilnosti spojeva u simuliranim fiziološkim uvjetima. U sklopu ovog rada uspoređeni su udjeli fenolnih spojeva klica korabice (*Brassica oleracea* var. *acephala gongylodes*), kelja (*B. oleracea sabauda*), prokulice (*B. oleracea gemmifera*), cvjetače (*B. oleracea botrytis*), rotkvice (*Raphanus sativus*) i kreše (*Lepidium sativum*), te njihov antioksidacijski i hipoglikemijski potencijal nakon *in vitro* simulirane probave čovjeka kako bi se za svaki od parametara izdvojilo vrstu klica većeg potencijala. Uočeno je da prije probave (originalni ekstrakti) nema razlike u udjelu ukupnih fenolnih spojeva između klica korabice, kelja, prokulice, cvjetače, rotkvice i kreše (sl. 11), iznosio je između 5,58 mg GAE/SM (klice korabice) i 6,09 mg GAE/SM (klice kelja). Razlog tome mogao bi biti taj što svih šest vrsta klica pripada istoj porodici. Slični udjeli zabilježeni su i kod klica pekinškog kupusa (Šola i sur., 2020), različitih kultivara brokule (Pérez-Balibrea i sur., 2011), kultivara rotkvice Aoush (Yadav i sur., 2019), te ostalih varijeteta kupusnjača (Šamec i sur., 2018; Xiao i sur., 2019). Razlika između klica nije uočena niti u inicijalnoj, te fazama probave u ustima i želucu. Međutim, u fazi crijeva klice kelja imale su značajno veći udio ukupnih fenolnih spojeva (15,75 mg GAE/g SM) nego klice prokulice, cvjetače i rotkvice. Ovo pokazuje da stabilnost fenolnih spojeva tijekom probave u crijevu ovisi o matriksu, tj. preostalim spojevima prisutnima u ekstraktu. U ovom slučaju, matriks klica kelja bolje je „očuvao“ koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva nego matriks ostalih vrsta klica. Uočeno je i da razlike u udjelima fenolnih spojeva između faze želuca i crijeva nisu bile značajne, što sugerira stabilnost ukupnih fenolnih spojeva tijekom probave ovih vrsta klica u crijevima. Štoviše, najmanja razlika u udjelu ovih spojeva između faze usta i crijeva zabilježena je kod klica kelja (u fazi crijeva sadržaj ukupnih fenolnih spojeva bio je tek je 1,14 puta manji u odnosu na udio ovih spojeva u fazi probave u ustima), što govori o stabilnosti ukupnih fenolnih spojeva klica kelja tijekom probave. Također, uočeno je da je udio ukupnih fenolnih spojeva značajno veći tijekom probave nego u originalnim uzorcima.

Pretpostavljam da se u uvjetima probave fenolni spojevi oslobađaju iz derivatiziranih (vezanih) oblika. Jedan od razloga tome mogao biti pH u želučanoj fazi, naime pri nižoj pH vrijednosti okoline, viša je koncentracija ukupnih fenolnih spojeva (Sani i sur., 2021). Istu tendenciju primijetila sam i kod ukupnih flavonoida (sl. 12).

Flavonoidi su jedna od skupina fenolnih spojeva kojoj se pripisuju mnogi pozitivni biološki učinci (Jucá i sur., 2018). Originalni ekstrakti klica cvjetače sadržavali su značajno više (10,69 mg QE/g SM) ukupnih flavonoida od ostalih originalnih uzoraka (sl. 13). U fazi želuca, uz klice cvjetače, klice kelja su također imale značajno više ukupnih flavonoida od ostalih uzoraka, dok je u fazi crijeva najveći udio ukupnih flavonoida ponovno zabilježen u klicama cvjetače (24,70 mg QE/g SM). S obzirom da je udio ukupnih flavonoida kod svih vrsta klica bio značajno veći tijekom probave nego u originalnom uzorku, pretpostavljam da se u uvjetima probave ova grupa spojeva, baš kao i ukupni fenolni spojevi kojima flavonoidi pripadaju, oslobađa iz derivatiziranih (vezanih) oblika. Sličan rezultat zabilježen je i na nizu drugih biljnih vrsta koje se koriste u prehrani (Koehnlein i sur., 2016). Što se tiče odnosa udjela ukupnih flavonoida jedne vrste klica između različitih faza probave, klice prokulice, cvjetače, rotkvice i kreše imale su značajno veći udio ukupnih flavonoida u fazi crijeva nego u bilo kojoj od prethodnih faza. Posebno je ovo interesantno kada udjele usporedimo s originalnim (neprobavljenim) ekstraktima, naime uvjeti probave značajno povećavaju bioraspoloživost ukupnih flavonoida i time biopotencijal klica raste. Ovo pokazuje zašto je, uz originalne ekstrakte, važno analizirati i fitokemijski sastav ekstrakata biljaka u simuliranim (*in vitro*) uvjetima probave. Naime, zbog interakcija sa sastavnicama probavnog sustava, bioraspoloživost spojeva tijekom probave može značajno varirati, a time i sam biopotencijal biljnog materijala. Zanimljivo je primijetiti da se udio ukupnih flavonoida klica kelja nije značajno mijenjao od faze usta do konačne faze crijeva, što ponovno sugerira stabilizirajući efekt matriksa ekstrakta klica kelja spram ukupnih flavonoida ove vrste klica. Dok je za ukupne fenolne spojeve to imalo pozitivan učinak (jer nije došlo do značajnog smanjivanja njihova udjela kao kod svih ostalih pet vrsta klica), u ovom slučaju to nije bilo od pozitivnog značaja jer, osim kod uzorka korabice, kod svih ostalih vrsta klica došlo je do značajnog povećanja udjela ukupnih flavonoida tijekom faze probave u crijevima. Interesantan je i značajan porast udjela ukupnih flavonoida od faze usta do faze crijeva zabilježen kod klica cvjetače, što sugerira sve veću bio raspoloživost flavonoida prolaskom ekstrakta kroz pojedine dijelove probavnog sustava.

Najveći udio hidroksicimetnih kiselina prije probave imale su klice kelja (20,70 mg CAE/g SM) i rotkvice (20,54 mg CAE/g SM), dok su klice korabice i kreše imale značajno

niži udio (sl. 14). Po završetku probave, u fazi crijeva, u svim vrstama klica ove kiseline bile su ispod razine detekcije, što znači da su u tim uvjetima probave nestabilne i razgrađuju se. U fazi želuca, najviši udio hidroksicimetnih kiselina imale su klice rotkvice (18,53 mg CA/g SM) pa bi se s aspekta njihove bioraspodivnosti savjetovalo odabrati klice rotkvice ispred klica kelja koje u originalnom ekstraktu imaju gotovo identičan udio ovih kiselina. Što se tiče stabilnosti ovih kiselina tijekom probave, najveće promjene udjela zabilježila sam kod klica kelja, što znači da uvjeti probave najznačajnije djeluju na hidroksicimetne kiseline ove vrste klica. Kada usporedimo originalne s uzorcima u pojedinoj fazi probave, najveći udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina imali su originalni uzorci, osim kod kelja i cvjetače gdje je u fazi usta došlo do značajnog povećanja udjela ovih kiselina u odnosu na originalni ekstrakt. Pretpostavljam da su enzimi faze usta uzrokovali značajnije oslobađanje hidroksicimetnih kiselina iz ekstrakata kelja i cvjetače, dok je kod ostalih vrsta klica matriks „stabilizirao“ ove kiseline u uvjetima probave u ustima.

Metodom tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja (HPLC) usporedila sam udjele pojedinačnih spojeva (*L*-askorbinske kiseline (oblik vitamina C), fenolnih kiselina i flavonoida) između različitih vrsta klica, te različitih faza *in vitro* probave. Vitamin C ima ulogu koenzima oksidacijskih enzima kao što su prolin hidroksilaza, lizin hidroksilaza, 4-hidroksifenilpiruvat dioksidgenaza, dopamin- β -hidroksilaza, triptofan hidroksilaza i γ -butirobetain hidroksilaza (Mandl i sur., 2009). Putevima ovih enzimatskih reakcija uključen je u metabolizam neurotransmitera, lipida i kolagena (Mandl et al., 2009) te je nužno održavanje njegove koncentracije optimalnom. Među originalnim (nepuferiranim) uzorcima, najveću koncentraciju *L*-askorbinske kiseline sadržavale su klice kreše (0,31 mg/kg SM), dok su najmanje imale klice kelja (0,21 mg/kg SM) (sl. 15). Ovakve vrijednosti u skladu su s već zabilježenima kod klica kreše (Sat i sur., 2013) i kelja (Fiutak i Michalczyk, 2020). Slično mom rezultatu, nižu koncentraciju ovog vitamina u klicama kelja, u odnosu na ostale analizirane, zabilježili su nedavno i Wojdyło i sur. (2020). S obzirom da sam biljni materijal liofilizirala prije analiza, pretpostavljam da bi u svježim klicama udio ovog vitamina bio veći. Naime, sušenjem biljnog materijala udio vitamina C se smanjuje (Santos i Silva, 2008). S druge strane, nakon probave u ustima i želucu najviše *L*-askorbinske kiseline sadržavale su klice rotkvice (redom 0,67 g/kg SM i 0,78 g/kg SM). Ovo ukazuje na činjenicu da stabilnost vitamina C ovisi o matriksu biljke u kojemu se nalazi. Očito matriks klica kreše ne može „sačuvati“ vitamin C u uvjetima probave, dok je matriks klica rotkvice daleko povoljniji za stabilizaciju ove molekule. Nakon *in vitro* probave u fazi crijeva, udio ovog vitamina bio je značajno veći nego u svih prethodnih faza, što je neočekivano s obzirom na dosadašnje

podatke iz literature (Rodríguez-Roque i sur., 2013; Vallejo i sur., 2004; Pérez-Vicente i sur., 2002), pa bi svakako trebalo ponoviti ovu fazu probave kako bi rezultat bio pouzdan. Iz ovog razloga rezultat u fazi crijeva nisam ni prikazala. Udio ovog vitamina tijekom probave najstabilniji je bio u klicama prokulice i cvjetače pa kelja, dok je kod korabice, rotkvice i kreše narastao u fazi želuca u odnosu na prethodnu fazu usta. Razlog porasta njegova udjela u fazi želuca mogao bi biti pH, naime u želucu je vrijednost niža, oko 2,5, što favorizira stabilizaciju ove molekule (Jeney-Nagymate i Fodor, 2008).

Ferulična kiselina u biljkama nastaje metabolizmom fenilalanina i tirozina (Barros i Dixon, 2020). Pojavljuje se prvenstveno u sjemenkama i listovima u slobodnom obliku i kovalentno povezana s ligninom i drugim biopolimerima (Kumar i Pruthi, 2014). Zbog svoje fenolne jezgre i produženog bočnog lanca koji se lako konjugira, često tvori fenoksi radikal koji ima izrazita antioksidativna svojstva (Graf, 1992). U živim organizmima ferulična kiselina može se apsorbirati u želucu, jejunumu i ileumu, a metabolizira se u jetri (Zhao i Moghadasian, 2008). Među originalnim uzorcima, najbogatiji feruličnom kiselinom je onaj klica prokulice (0,08 g/kg SM), dok klice kelja imaju najmanji udio ove kiseline. Tijekom faze probave u želucu najveći udio ovog spoja imale su klice rotkvice (0,15 g/kg SM) i prokulice (0,14 g/kg SM), dok su u fazi crijeva to bile klice prokulice (0,15 g/kg SM).. Generalno, kod svih vrsta klica najveći udio ove kiseline zabilježen je nakon faze probave u želucu, s tim da je kod klica prokulice vrlo sličan udio bio i u ostalih faza, a kod kreše faza usta imala je gotovo identičan udio kao i faza želuca. U sve tri faze probave, klice prokulice su najbogatije, a klice kelja najsiromašnije feruličnom kiselinom. U fazi crijeva kod svih klica, osim prokulice, dolazi do smanjenja udjela ferulične kiseline. Ovakav rezultat ukazuje na nestabilnost ferulične kiseline klica korabice, kelja, cvjetače, rotkvice i kreše u uvjetima probave u crijevu, te stabilnost iste u ekstraktu klica prokulice koji očigledno stabilizira ovu kiselinu u datim uvjetima. Stoga bi, između analiziranih klica, najbolji odabir za što veći unos ferulične kiseline u organizam bile definitivno klice prokulice.

Sinapinska kiselina pokazuje antioksidativno, antimikrobno, protuupalno, antikancerogeno i anti-anksiozno djelovanje (Nićiforović & Abramović, 2014). Među originalnim uzorcima, najveći udio sinapinske kiseline zabilježen je kod klica kelja (1,74 g/kg SM), a najmanji kod klica kreše (0,9 g/kg SM) (sl. 17). Kao i kod originalnog uzorka, klice kelja najbogatije su sinapinskom kiselinom i nakon bilo koje od faza probave pa bi one bile najbolji izbor za maksimalan unos ove kiseline u organizam. Zanimljivo je primijetiti da se udio sinapinske kiseline nije značajno mijenjao tijekom probave kod klica prokulice i

rotkvice, što ukazuje da matriks ovih klica na neki način štiti ovu kiselinu od razgradnje u simuliranom modelu ljudske probave.

U biljaka, kvercetin je obično u vezanom obliku sa šećerima, eterima ili fenolnim kiselinama, što utječe na efikasnost njegove apsorpcije u želucu i crijevu (Mullen i sur., 2008). Kemijska nestabilnost i niska bioraspoloživost uvelike ograničavaju njegovu iskoristivost (Wang i sur., 2016). Među originalnim uzorcima, najveći udio kvercetina zabilježen je kod klica cvjetače (0,26 g/kg SM) i kreše (0,27 g/kg SM), a najmanji kod rotkvice (0,02 g/kg SM). U odnosu na ostale uzorke, klice cvjetače imale su najveći udio kvercetina tijekom faze probave u ustima (0,6 g/kg SM) i crijevima (0,47 g/kg SM). U fazi probave u želucu, uz klice cvjetače, i klice kreše su sadržavale najveći udio ove kiseline. Klice rotkvice imale su najniži udio kvercetina u bilo kojoj od faza probave. Generalno, kod svih vrsta klica udio kvercetina tijekom probave najveći je bio u fazi želuca, izuzev rotkvice kod koje se nije razlikovao između faze želuca i crijeva. Klice cvjetače imale su najviše kvercetina i prije probave, kao i nakon svake od faza probave pa bi definitivno bile najbolji izbor za unos kvercetina u organizam. Kod svih vrsta klica, izuzev rotkvice, udio kvercetina tijekom probave najveći je bio u fazi želuca, a jedan od razloga može biti niski pH pri kojemu je došlo do oslobađanja slobodnog kvercetina iz derivatiziranih oblika. Uvjeti crijeva očigledno su manje povoljni za bioraspoloživost kvercetina od uvjeta želuca. Posebno je zanimljiva stabilnost kvercetina u klicama rotkvice, izuzev faze usta u kojoj je došlo do smanjivanja njegova udjela, u ostalim fazama probave njegov udio nije se značajno mijenjao. Pretpostavljam da je kvercetin u klicama rotkvice vezan s nekom drugom kemijskom komponentom koja otežava njegovu razgradnju.

Za flavonoid kempferol dokazano je antimikrobno, protuupalno, antioksidativno, kardioprotektivno, neuroprotektivno i antidijabetičko djelovanje (Calderón-Montaño i sur., 2011). Konzumacija hrane bogate kempferolom povezana je sa smanjenjem rizika od razvoja nekih vrsta raka, uključujući rak kože, jetre i debelog crijeva (Imran i sur., 2019). Najveći udio kempferola imaju klice rotkvice i prije (0,62 g/kg SM) i poslije probave (od faze usta do faze crijeva redom 0,7 g/kg SM, 0,73 g/kg SM, 0,45 g/kg SM), što znači da bi bile najbolji izbor za maksimalan unos ovog flavonoida u organizam (sl. 19). Najsiromašnije kempferolom su klice prokulice, također i prije i nakon bilo koje faze probave. Nakon faze probave u crijevima, uz prokulicu, najnižu koncentraciju ovog flavonoida imale su i klice korabice. Što se tiče probave, kod svih vrsta klica veći udio kempferola zabilježen je nakon faze želuca nego nakon faze crijeva, što sugerira da se kempferol u uvjetima probave u crijevu razgrađuje i bude ga manje raspoloživo za apsorpciju nego u želucu. Kod klica kelja udio kempferola

tijekom probave najmanje se mijenjao, što znači da je taj ekstrakt najbolje stabilizirao kempferol.

Reaktivne kisikove vrste (eng. *reactive oxygen species*, ROS) nastaju tijekom normalnog staničnog metabolizma, no kada su prisutne u suvišku postaju toksične jer uzrokuju oštećenja DNA, proteina, lipida, membrana (Ferreira i sur., 2007). Laboratorijske metode kojima se određuje sposobnost uklanjanja slobodnih radikala koriste se za procjenu antioksidacijskog kapaciteta uzorka. S obzirom da u biljkama nalazimo više antioksidansa raznih vrsta i djelovanja, potrebno je kombinirati više metoda mjerenja kako bi konačna procjena ukupnog antioksidacijskog kapaciteta bila što preciznija. U sklopu ovog istraživanja, antioksidacijsku aktivnost uzoraka klica kupusnjača izmjerila sam korištenjem sljedeće tri metode: ABTS, DPPH i FRAP. Metode se temelje na redukciji obojenog oksidansa (ABTS, DPPH, FRAP) što dovodi do promjene boje i međusobno se razlikuju s obzirom na mehanizam kemijskih reakcija koje se odvijaju (Floegel i sur., 2011). Sve se spomenute metode baziraju na prijenosu elektrona, no metode ABTS i DPPH uključuju slobodne radikale (ABTS^{•+} i DPPH[•]), a FRAP redukciju Fe³⁺ u Fe²⁺.

Rezultati sve tri primjenjene metode pokazali su da uvjerljivo najveći antioksidacijski kapacitet imaju originalni uzorci klica svih vrsta (sl. 20, 21 i 22). Metoda ABTS je osjetljivija od ostale dvije metode jer je ABTS radikal topiv i u vodenom i u organskom mediju, što znači da može reagirati i s lipofilnim i s hidrofilnim antioksidansima (Floegel i sur., 2011; Almeida i sur., 2011). S obzirom da metodom ABTS nisam zabilježila značajno drugačije rezultate nego s ostale dvije metode pretpostavljam da su klice kupusnjača bogate uglavnom hidrofilnim antioksidansima.

Prema rezultatima metode ABTS svi originalni ekstrakti klica imali su jači antioksidacijski potencijal od standarda troloksa, što ponovno naglašava biopotencijal ovih klica (sl. 20). Troloks je inače standardni antioksidans čiji se antioksidacijski potencijal koristi kao referentna vrijednost u testovima antioksidacijskog učinka. Najjači antioksidacijski potencijal pokazao je originalni ekstrakt klica cvjetače, 81,95% inhibicije, dok je za usporedbu standard troloks koncentracije 50 mg/mL pokazao 80,00% inhibicije. Antioksidacijski potencijal klica korabice nije se mijenjao tijekom *in vitro* probave i ostao je veći usporedno s drugim vrstama klica, stoga zaključujem da je ova vrsta klica najbolji odabir kada govorimo o antioksidacijskom potencijalu nakon probave.

Kao i kod prethodne, tako i kod metode DPPH, originalni ekstrakti klica korabice, kelja, prokulice i cvjetače pokazali su antioksidacijski potencijal vrlo sličan onome troloksa (sl. 21). Ovo pokazuje izuzetan potencijal za prehrambenu industriju, naime klice kupusnjača su biljni

materijal izuzetne antioksidacijske učinkovitosti. I kod antioksidacijske aktivnosti matriks klica utjecao je na konačan stupanj inhibicije radikala tijekom pojedine faze probave. Naime, u fazi želuca najveći antioksidacijski potencijal pokazao je ekstrakt rotkvice, dok je u fazi crijeva najučinkovitiji bio ekstrakt korabice. Ovo je zanimljivo s obzirom da originalni ekstrakt klica rotkvice nije bio među antioksidacijski najučinkovitijima, a onda je u fazi probave u želucu pokazao tendenciju veće učinkovitosti od ostalih vrsta klica. Pretpostavljam da ekstrakt rotkvice u uvjetima probave u želucu stabilizira antioksidacijske spojeve bolje nego ekstrakti ostalih vrsta klica.

Prema rezultatima metode FRAP, najveću antioksidacijsku aktivnost, očekivano, pokazali su originalni ekstrakti i to vrlo sličnu onoj standarda troloksa (sl. 22). Nakon probave u fazi želuca najveći antioksidacijski potencijal imale su klice korabice i cvjetače, a nakon faze crijeva klice korabice. Dakle, i ovom je metodom potvrđen izuzetan antioksidacijski kapacitet klica korabice kako prije, tako i nakon probave.

α -Amilaza i α -glukozidaza služe kao glavni probavni enzimi i pomažu u crijevnoj apsorpciji ugljikohidrata (Nair i sur., 2013). Jedan od prirodnih tipova inhibitora α -amilaze i α -glukozidaze su flavonoidi (Kim i sur., 2000). Od analiziranih 21 flavonoida, kao najbolji inhibitori spomenutih enzima prepoznati su luteolin, amentoflavon, luteolin-7-*O*-glukozid i daidzein (Kim i sur., 2000). Ovi spojevi dalje se istražuju kako bi ih se potencijalno moglo primijeniti u terapiji dijabetesa tipa II. U ovom radu najveću inhibicijsku aktivnost spram oba enzima pokazali su originalni uzorci kod svih vrsta klica (sl. 23 i 24). Štoviše, postotak inhibicije α -amilaze bio je veći nego onaj akarboze, standardnog antidijabetičkog lijeka, što je od izuzetne važnosti jer pokazuje da je prirodni biljni materijal jednako učinkovit ili čak i učinkovitiji od standardnog sintetskog spoja. U inhibiciji aktivnosti α -glukozidaze ekstrakti svih klica bili su izuzetno učinkoviti (stupanj inhibicije viši od 85%), dok su ekstrakti klica rotkvice, kelja i prokulice bili čak i bolji ili jednako učinkoviti kao akarboza koncentracije 7,5 mg/mL. S obzirom da konzumacija akarboze za posljedicu često ima gastrointestinalne nuspojave poput nadutosti, dijareje ili nelagode u truhu (Rosak i Mertes, 2012), identifikacija biljnog materijala čiji ekstrakt bi djelovao jednako učinkovito ili čak i bolje od akarboze u inhibiciji α -amilaze predstavlja izuzetan potencijal za prehrambenu i farmaceutsku industriju. Ovo je vrlo obećavajući rezultat i potiče daljnja istraživanja potencijala klica kupusnjača u inhibiciji aktivnosti enzima vezanih uz pojavu dijabetesa tipa II. U fazi crijeva klice korabice značajno su jače inhibirale ovaj enzim od ostalih klica pa bi ekstrakt tih klica valjalo dalje detaljnije istražiti s aspekta antidijabetičkog potencijala. S obzirom da su fenoli i flavonoidi prepoznati kao inhibitori ovih enzima (Ullah i sur., 2020), očekivala sam da će učinkovitija

inhibicija njihove aktivnosti biti u onim fazama u kojih je i veći udio ukupnih fenolnih spojeva i/ili flavonoida, međutim nije bilo tako. Iz ovoga zaključujem da je, umjesto udjela svih fenolnih spojeva i/ili flavonoida u nekom ekstraktu, očito ključna prisutnost točno određenog/ih pojedinačnog/ih spoja/eva koji značajno inhibira ove enzime. S obzirom da su originalni ekstrakti najučinkovitije inhibirali aktivnost α -amilaze i α -glukozidaze, zaključujem da su upravo u njima prisutne najveće koncentracije ključnih inhibitora. Također, činjenica da je stupanj inhibicije značajno smanjen nakon probave govori da uvjeti probave negativno djeluju na bioraspoloživost i/ili učinkovitost inhibitora prisutnih u ekstraktima ovih klica.

5. ZAKLJUČAK

Udio ukupnih fenolnih spojeva nije se značajno razlikovao između analiziranih vrsta klica. Kupusnjače najbogatije ukupnim flavonoidima bile su klice cvjetače. Najbogatije ukupnim hidroksicimetnim kiselinama bile su klice kelja i rotkvice.

U usporedbi s originalnim uzorkom, kod svih vrsta klica udio ukupnih fenolnih spojeva i flavonoida značajno je viši tijekom probave. Najveći udio ukupnih fenolnih spojeva kod svih vrsta klica prisutan je u fazi usta. U fazi želuca sve vrste klica imale su sličan udio ovih spojeva. Najveći udio ukupnih fenolnih spojeva nakon probave u fazi crijeva imale su klice kelja.

Najveći udio ukupnih flavonoida nakon probave u fazi želuca, kao i crijeva, imale su klice cvjetače.

Najveći udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina nakon probave u fazi želuca imale su klice rotkvice. U fazi crijeva, ukupne hidroksicimetne kiseline bile su ispod razine detekcije kod svih varijeteta klica.

Najbogatije vitaminom C prije probave bile su klice kreše. Nakon probave u ustima i želucu najviše ovog vitamina bilo je raspoloživo kod klica rotkvice.

Feruličnom kiselinom najbogatije su bile klice prokulice prije probave, nakon probave u želucu klice rotkvice i prokulice, a nakon probave u crijevu ponovno klice prokulice. Sinapinskom kiselinom su najbogatije klice kelja i prije i nakon bilo koje od faza probave. Najvišu koncentraciju kvercetina prije probave imale su klice cvjetače i kreše, a nakon faze probave u ustima i crijevima klice cvjetače. Najvišu koncentraciju kempferola i prije i nakon probave imale su klice rotkvice.

Originalni uzorci imaju značajno veći antioksidacijski potencijal u odnosu na uzorke nakon probave. Prema metodi ABTS, sve klice prije probave, osim onih rotkvice, imaju veći antioksidacijski potencijal od standardnog antioksidacijskog spoja, troloksa. Prema metodi DPPH, klice kelja, korabice, prokulice i cvjetače prije probave imaju antioksidacijski potencijal sličan onome standarda troloksa. Prema metodi FRAP, sve testirane klice prije probave imale su gotovo identičan antioksidacijski potencijal kao standard troloks.

Ekstrakti svih analiziranih klica prije probave pokazali su isti ili veći stupanj inhibicije α -amilaze nego standardni inhibitor akarboza. Uzorci nakon probave pokazuju manji stupanj inhibicije α -amilaze i α -glukozidaze nego originalni. Nakon probave u želucu najveći stupanj inhibicije aktivnosti α -amilaze pokazale su klice rotkvice i kreše, a nakon probave u crijevu klice korabice.

Prije probave najveći stupanj inhibicije α -glukozidaze pokazale su klice rotkvice. Nakon probave u želucu, kao i crijevu, najveći stupanj inhibicije aktivnosti α -glukozidaze pokazale

su klice korabice. Klice rotkvice, kelja, prokulice i korabice prije probave snažnije su inhibirale aktivnost α -glukozidaze od standardnog antidijabetičkog lijeka akarboze.

S obzirom na rezultate, zaključujem da klice kupusnjača predstavljaju vrijedan biomaterijal velikog potencijala za ljudsku prehranu i zdravlje, te su daljnje analize njihova biopotencijala itekako potrebne i poželjne.

6. LITERATURA

Akram, N. A., Shafiq, F., & Ashraf, M. (2017). Ascorbic acid - a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 8, 613.

Almeida, M. M. B., de Sousa, P. H. M., Arriaga, Â. M. C., do Prado, G. M., de Carvalho Magalhães, C. E., Maia, G. A., & de Lemos, T. L. G. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, 44(7), 2155-2159.

Al-Shehbaz, I. A., Beilstein, M. A., & Kellogg, E. A. (2006). Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview. *Plant Systematics and Evolution*, 259(2), 89-120.

Banihani, S. A. (2017). Radish (*Raphanus sativus*) and diabetes. *Nutrients*, 9(9), 1014.

Barrita, J. L. S., & Sánchez, M. D. S. S. (2013). Antioxidant role of ascorbic acid and his protective effects on chronic diseases. *Oxidative Stress Chronic Degener. Dis. Role Antioxid*, 449, 450-484.

Barros, J., & Dixon, R. A. (2020). Plant phenylalanine/tyrosine ammonia-lyases. *Trends in Plant Science*, 25(1), 66-79.

Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299, 15-27.

Berend, S., & Grabarić, Z. (2008). Determination of total polyphenol content in food with the flow-injection. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 59(3), 205-212.

Bhalodia, N. R., Nariya, P. B., Acharya, R. N., & Shukla, V. J. (2013). *In vitro* antioxidant activity of hydro alcoholic extract from the fruit pulp of *Cassia fistula* Linn. *Ayu*, 34(2), 209.

Boncan, D. A. T., Tsang, S. S., Li, C., Lee, I. H., Lam, H. M., Chan, T. F., & Hui, J. H. (2020). Terpenes and terpenoids in plants: interactions with environment and insects. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7382.

Bourgau, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161(5), 839-851.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333.

Brkanac, S. R., Gerić, M., Gajski, G., Vujčić, V., Garaj-Vrhovac, V., Kremer, D., & Domijan, A. M. (2015). Toxicity and antioxidant capacity of *Frangula alnus* Mill. bark and its active component emodin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(3), 923-929.

Calderon-Montano, J.M., Burgos-Morón, E., Pérez-Guerrero, C., & López-Lázaro, M. (2011). A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(4), 298-344.

Cardoso, C., Afonso, C., Lourenço, H., Costa, S., & Nunes, M. L. (2015). Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk–benefit evaluation of food. *Trends in Food Science & Technology*, 41(1), 5-23.

Cartea, M. E., Francisco, M., Soengas, P., & Velasco, P. (2011). Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules*, 16(1), 251-280.

Cevallos-Casals, B. A., & Cisneros-Zevallos, L. (2010). Impact of germination on phenolic content and antioxidant activity of 13 edible seed species. *Food Chemistry*, 119(4), 1485-1490.

Chen, Q., Polireddy, K., Chen, P., & Dong, R. (2015). The unpaved journey of vitamin C in cancer treatment. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 93(12), 1055-1063.

Ćosić, T., Vinterhalter, B., Vinterhalter, D., Mitić, N., Cingel, A., Savić, J., ... & Ninković, S. (2013). In vitro plant regeneration from immature zygotic embryos and repetitive somatic embryogenesis in kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(3), 294-303.

de la Fuente, B., López-García, G., Máñez, V., Alegría, A., Barberá, R., & Cilla, A. (2019). Evaluation of the bioaccessibility of antioxidant bioactive compounds and minerals of four genotypes of *Brassicaceae* microgreens. *Foods*, 8(7), 250.

Diwakar, B. T., Dutta, P. K., Lokesh, B. R., & Naidu, K. A. (2010). Physicochemical properties of garden cress (*Lepidium sativum* L.) seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(5), 539-548.

Escalona, V. H., Aguayo, E., & Artes, F. (2007). Extending the shelf life of kohlrabi stems by modified atmosphere packaging. *Journal of Food Science*, 72(5), S308-S313.

Ferreira, I. C., Baptista, P., Vilas-Boas, M., & Barros, L. (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, 100(4), 1511-1516.

Fiutak, G., & Michalczyk, M. (2020). Effect of artificial light source on pigments, thiocyanates and ascorbic acid content in kale sprouts (*Brassica oleracea* L. var. *sabellica* L.). *Food Chemistry*, 330, 127189.

Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043-1048.

Francisco, M., Tortosa, M., Martínez-Ballesta, M. D. C., Velasco, P., García-Viguera, C., & Moreno, D. A. (2017). Nutritional and phytochemical value of Brassica crops from the agri-food perspective. *Annals of Applied Biology*, 170(2), 273-285.

Franzke, A., Lysak, M. A., Al-Shehbaz, I. A., Koch, M. A., & Mummenhoff, K. (2011). Cabbage family affairs: the evolutionary history of *Brassicaceae*. *Trends in Plant Science*, 16(2), 108-116.

Gallie, D. R. (2013). *L*-Ascorbic acid: a multifunctional molecule supporting plant growth and development. *Scientifica*, 2013, 795–964.

Giada, M. D. L. R. (2013). Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. *Oxidative stress and chronic degenerative diseases-A role for antioxidants*, 2013, 87-112.

Graf, E. (1992). Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 13(4), 435-448.

Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, 30(11), 591-600.

Gunaherath, G. K. B., & Gunatilaka, A. L. (2006). Plant steroids: occurrence, biological significance, and their analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, 1-31.

Gutiérrez, R. M. P., & Perez, R. L. (2004). *Raphanus sativus* (Radish): their chemistry and biology. *The Scientific World Journal*, 4, 811.

Gutiérrez-Grijalva, E. P., Picos-Salas, M. A., Leyva-López, N., Criollo-Mendoza, M. S., Vazquez-Olivo, G., & Heredia, J. B. (2018). Flavonoids and phenolic acids from oregano: occurrence, biological activity and health benefits. *Plants*, 7(1), 2.

Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M. G., Vincieri, F. F., & Romani, A. (2006). Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chemistry*, 99(3), 464-469.

Howard, L. R., Clark, J. R., & Brownmiller, C. (2003). Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(12), 1238-1247.

Hussein, R. A., & El-Anssary, A. A. (2019). Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. *Herbal Medicine*, 1, 13.

Imran, M., Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Aslam Gondal, T., Saeed, F., Imran, A., ... & Estevinho, L. M. (2019). Kaempferol: A key emphasis to its anticancer potential. *Molecules*, 24(12), 2277.

Jeney-Nagymate, E., & Fodor, P. (2008). The stability of vitamin C in different beverages. *British Food Journal*, 110(3), 296-309.

Jiang, N., Doseff, A. I., & Grotewold, E. (2016). Flavones: from biosynthesis to health benefits. *Plants*, 5(2), 27.

Jucá, M. M., Cysne Filho, F. M. S., de Almeida, J. C., Mesquita, D. D. S., Barriga, J. R. D. M., Dias, K. C. F., ... & Vasconcelos, S. M. M. (2018). Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. *Natural Product Research*, 34(5), 692-705.

- Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., & He, X. (2014). Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(7), 377-392.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328-2375.
- Kim, J. S., Kwon, C. S., & Son, K. H. (2000). Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(11), 2458-2461.
- Kmiecik, W., Lisiewska, Z., & Korus, A. (2007). Retention of mineral constituents in frozen brassicas depending on the method of preliminary processing of the raw material and preparation of frozen products for consumption. *European Food Research and Technology*, 224(5), 573-579.
- Koehnlein, E. A., Koehnlein, É. M., Corrêa, R. C. G., Nishida, V. S., Correa, V. G., Bracht, A., & Peralta, R. M. (2016). Analysis of a whole diet in terms of phenolic content and antioxidant capacity: effects of a simulated gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67(6), 614-623.
- Kowitcharoen, L., Wongs-Aree, C., Setha, S., Komkhuntod, R., Kondo, S., & Srilaong, V. (2018). Pre-harvest drought stress treatment improves antioxidant activity and sugar accumulation of sugar apple at harvest and during storage. *Agriculture and Natural Resources*, 52(2), 146-154.
- Kumar, N., & Pruthi, V. (2014). Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*, 4, 86-93.
- Lisiewska, Z., Słupski, J., Skoczeń-Słupska, R., & Kmiecik, W. (2009). Content of amino acids and the quality of protein in Brussels sprouts, both raw and prepared for consumption. *International Journal of Refrigeration*, 32(2), 272-278.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118.
- Mageney, V., Neugart, S., & Albach, D. C. (2017). A guide to the variability of flavonoids in *Brassica oleracea*. *Molecules*, 22(2), 252.
- Mandl, J., Szarka, A., & Banhegyi, G. (2009). Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *British Journal of Pharmacology*, 157(7), 1097-1110.
- Martínez-Tomé, M., García-Carmona, F., & Murcia, M. A. (2001). Comparison of the antioxidant and pro-oxidant activities of broccoli amino acids with those of common food additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(10), 1019-1026.
- Mazid, M., Khan, T. A., Khan, Z. H., Quddusi, S., & Mohammad, F. (2011). Occurrence, biosynthesis and potentialities of ascorbic acid in plants. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 1(2), 167-84.

- Minatel, I. O., Borges, C. V., Ferreira, M. I., Gomez, H. A. G., Chen, C. Y. O., & Lima, G. P. P. (2017). Phenolic compounds: Functional properties, impact of processing and bioavailability. *Phenolic Compounds: Biological Activity. Act*, 8, 1-24.
- Mullen, W., Rouanet, J. M., Auger, C., Teissedre, P. L., Caldwell, S. T., Hartley, R. C., ... & Crozier, A. (2008). Bioavailability of [2-14C] quercetin-4'-glucoside in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), 12127-12137.
- Nair, S. S., Kavrekar, V., & Mishra, A. (2013). In vitro studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts. *European Journal of Experimental Biology*, 3(1), 128-132.
- National Institute for Health and Welfare, Nutrition Unit. Fineli®. Finnish Food Composition Database (2011) Release 14. Helsinki.
- Nelson, K., Stojanovska, L., Vasiljevic, T., & Mathai, M. (2013). Germinated grains: a superior whole grain functional food?. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 91(6), 429-441.
- Nićiforović, N., & Abramović, H. (2014). Sinapic acid and its derivatives: natural sources and bioactivity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(1), 34-51.
- Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., & Van Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74(4), 418-425.
- Nix, A., Paull, C., & Colgrave, M. (2017). Flavonoid profile of the cotton plant, *Gossypium hirsutum*: A review. *Plants*, 6(4), 43.
- OECD (2016): Brassica crops (Brassica species), U: Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment, Volume 5: OECD Consensus Documents, OECD Publishing, Paris.
- Paciolla, C., Fortunato, S., Dipierro, N., Paradiso, A., De Leonardis, S., Mastropasqua, L., & De Pinto, M. C. (2019). Vitamin C in plants: from functions to biofortification. *Antioxidants*, 8(11), 519.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5.
- Park, W. T., Kim, J. K., Park, S., Lee, S. W., Li, X., Kim, Y. B., ... & Park, S. U. (2012). Metabolic profiling of glucosinolates, anthocyanins, carotenoids, and other secondary metabolites in kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(33), 8111-8116.
- Perera, H. K. I., Premadasa, W. K. V. K., & Poongunran, J. (2015). α -glucosidase and glycation inhibitory effects of costus speciosus leaves. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 1-9.

- Pérez-Balibrea, S., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2011). Genotypic effects on the phytochemical quality of seeds and sprouts from commercial broccoli cultivars. *Food Chemistry*, 125(2), 348-354.
- Pérez-Vicente, A., Gil-Izquierdo, A., & García-Viguera, C. (2002). *In vitro* gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2308-2312.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Cimpeanu, C., & Predoi, G. (2016). Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.
- Quassinti, L., Gianfranceschi, G., Lupidi, G., Miano, A., & Bramucci, M. (2016). Antioxidant and pro-oxidant activities of savoy cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *sabauda*) sprout extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 40(4), 542-549.
- Ravaglia, D., Espley, R. V., Henry-Kirk, R. A., Andreotti, C., Ziosi, V., Hellens, R. P., ... & Allan, A. C. (2013). Transcriptional regulation of flavonoid biosynthesis in nectarine (*Prunus persica*) by a set of R2R3 MYB transcription factors. *BMC Plant Biology*, 13(1), 1-14.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159.
- Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2013). Changes in vitamin C, phenolic, and carotenoid profiles throughout *in vitro* gastrointestinal digestion of a blended fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), 1859-1867.
- Rosak, C., & Mertes, G. (2012). Critical evaluation of the role of acarbose in the treatment of diabetes: patient considerations. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 5, 357.
- Sani, I. M., Iqbal, S., Chan, K. W., & Ismail, M. (2021). Effect of acid and base catalyzed hydrolysis on the yield of phenolics and antioxidant activity of extracts from germinated brown rice (GBR). *Molecules*, 17(6), 7584-7594.
- Sanlier, N., & Guler, S. M. (2018). The benefits of Brassica vegetables on human health. *Journal of Human Health Research*, 1, 1-13.
- Santos, P. H. S., & Silva, M. A. (2008). Retention of vitamin C in drying processes of fruits and vegetables—A review. *Drying Technology*, 26(12), 1421-1437.
- Sat, I. G., Yildirim, E., Turan, M., & Demirbas, M. (2013). Antioxidant and nutritional characteristics of garden cress (*Lepidium sativum*). *Acta Sci. Polonorum-Hort. Cultus*, 12, 173-179.

- Saxena, M., Saxena, J., & Pradhan, A. (2012). Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 16(2), 130-134.
- Scalzo, R. L., Genna, A., Branca, F., Chedin, M., & Chassaing, H. (2008). Anthocyanin composition of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) and cabbage (*B. oleracea* L. var. *capitata*) and its stability in relation to thermal treatments. *Food Chemistry*, 107(1), 136-144.
- Sharma, A., Li, X., & Lim, Y. P. (2014). Comparative genomics of *Brassicaceae* crops. *Breeding Science*, 64(1), 3-13.
- Shim, S. M., Yoo, S. H., Ra, C. S., Kim, Y. K., Chung, J. O., & Lee, S. J. (2012). Digestive stability and absorption of green tea polyphenols: Influence of acid and xylitol addition. *Food Research International*, 45(1), 204-210.
- Sretenović-Rajičić, T., Ninković, S., Vinterhalter, B., Miljuš-Djukić, J., & Vinterhalter, D. (2004). Introduction of resistance to herbicide Basta® in Savoy cabbage. *Biologia Plantarum*, 48(3), 431-436.
- Sruthi, S., Majumder, S., Kumari, S., Kavya, T. S., & Padmaa, M. (2017). A review on medicinal plants used as diuretics from Karnataka state. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(8), 513-536.
- Šamec, D., Pavlović, I., Redovniković, I. R., & Salopek-Sondi, B. (2018). Comparative analysis of phytochemicals and activity of endogenous enzymes associated with their stability, bioavailability and food quality in five Brassicaceae sprouts. *Food Chemistry*, 269, 96-102.
- Šola, I., Bok, V. V., Dujmović, M., & Rusak, G. (2020). Developmentally-related changes in phenolic and L-ascorbic acid content and antioxidant capacity of Chinese cabbage sprouts. *Journal of Food Science and Technology*, 57(2), 702-712.
- Šola, I., Bok, V. V., Pinterić, M., Auer, S., Ludwig-Müller, J., & Rusak, G. (2020). Improving the phytochemical profile and bioactivity of Chinese cabbage sprouts by interspecific transfer of metabolites. *Food Research International*, 137.
- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., & Matsuoka, T. (2006). Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 52(2), 149-153.
- Taiz L, Zeiger E. (2002): *Plant physiology*, 3rd ed. Sinauer Associates Inc Publishers. Massachusetts.
- Taofiq, O., González-Paramás, A. M., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. (2017). Hydroxycinnamic acids and their derivatives: cosmeceutical significance, challenges and future perspectives, a review. *Molecules*, 22(2), 281.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.

- Ullah, A., Munir, S., Badshah, S. L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B. G., ... & Jaremko, M. (2020). Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. *Molecules*, 25(22), 5243.
- Vallejo, F., Gil-Izquierdo, A., Pérez-Vicente, A., & García-Viguera, C. (2004). *In vitro* gastrointestinal digestion study of broccoli inflorescence phenolic compounds, glucosinolates, and vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 135-138.
- Van Buggenhout, S., Almingier, M., Lemmens, L., Colle, I., Knockaert, G., Moelants, K., ... & Hendrickx, M. (2010). *In vitro* approaches to estimate the effect of food processing on carotenoid bioavailability need thorough understanding of process induced microstructural changes. *Trends in Food Science & Technology*, 21(12), 607-618.
- Vaughn, S. F., & Berhow, M. A. (2005). Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation, and purification. *Industrial Crops and Products*, 21(2), 193-202.
- Venkatesh, J., & Park, S. W. (2014). Role of L-ascorbate in alleviating abiotic stresses in crop plants. *Botanical Studies*, 55(1), 1-19.
- Vinholes, J., Silva, B. M., & Silva, L. R. (2015). Hydroxycinnamic acids (HCAS): structure, biological properties and health effects. *Advances in Medicine and Biology*, 88(8), 1-33.
- Wallace, T. C. (2015). Vitamin E: Defining status for optimal health. *Dietary Supplements in Health Promotion* (pp. 252-267). CRC Press.
- Wang, W., Sun, C., Mao, L., Ma, P., Liu, F., Yang, J., & Gao, Y. (2016). The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 56, 21-38.
- Wojdyło, A., Nowicka, P., Tkacz, K., & Turkiewicz, I. P. (2020). Sprouts vs. microgreens as novel functional foods: variation of nutritional and phytochemical profiles and their *in vitro* bioactive properties. *Molecules*, 25(20), 4648.
- Xiancui, L., Rongli, N., Xiao, F., Lijun, H., & Lixin, Z. (2005). Macroalage as a source of alpha-glucosidase inhibitors. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 23(3), 354-356.
- Xiao, Z., Rausch, S. R., Luo, Y., Sun, J., Yu, L., Wang, Q., ... & Stommel, J. R. (2019). Microgreens of Brassicaceae: genetic diversity of phytochemical concentrations and antioxidant capacity. *LWT*, 101, 731-737.
- Yadav, L. P., Koley, T. K., Tripathi, A., & Singh, S. (2019). Antioxidant potentiality and mineral content of summer season leafy greens: comparison at mature and microgreen stages using chemometric. *Agricultural Research*, 8(2), 165-175.
- Yang, L., Wen, K. S., Ruan, X., Zhao, Y. X., Wei, F., & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, 23(4), 762.
- Zhao, Z., & Moghadasian, M. H. (2008). Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry*, 109(4), 691-702.

Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559.

7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 17.08.1997. u Zrenjaninu. Osnovnu školu pohađala sam u Glini te je završila 2012. godine, a potom upisala Opću gimnaziju u Glini. Nakon završetka gimnazije, 2016. godine sam upisala Preddiplomski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu. Zvanje Sveučilišne prvostupnice biologije (univ. bacc. biol.) stekla sam 2019. godine. Iste godine sam upisala Diplomski studij eksperimentalne biologije, smjer Fiziologija i imunobiologija. Aktivno se služim engleskim jezikom, a slobodno vrijeme najradije provodim brinući se o brojnim ljekovitim biljkama koje uzgajam te također čitajući ili bavljenjem fizičkim aktivnostima, poput šetnje ili planinarenja.