Biljke porodice Asteraceae: Biološka aktivnost i potencijalna primjena

Gluhak, Kristina

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:093024

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET SPLIT

BILJKE PORODICE ASTERACEAE: BIOLOŠKA AKTIVNOST I POTENCIJALNA PRIMJENA

ZAVRŠNI RAD

KRISTINA GLUHAK
Matični broj: 299

Split, rujan 2016.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET SPLIT
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

BILJKE PORODICE ASTERACEAE: BIOLOŠKA AKTIVNOST I POTENCIJALNA PRIMJENA

ZAVRŠNI RAD

KRISTINA GLUHAK
Matični broj: 299

Split, rujan 2016.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

ASTERACEAE PLANTS: BIOACTIVITY AND POTENTIAL APPLICATIONS

BACHELOR THESIS

KRISTINA GLUHAK

Parent number: 299

Split, September 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na 4. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta

Mentor:dr. sc. Franko Burčul, znanstveni suradnik
Pomoć pri izradi:

BILJKE PORODICE ASTERACEAE: BIOLOŠKA AKTIVNOST I POTENCIJALNA PRIMJENA

Kristina Gluhak, 299

Sažetak: Oksidacijski stres ima važnu ulogu u etiologiji nekih bolesti i metaboličkih poremećaja, stoga je razumno očekivati da antioksidacijski spojevi imaju koristan učinak u održavanju zdravlja i prevenciji bolesti. Antioksidacijski spojevi mogu biti izolirani i identificirani u različitim dijelovima biljke, poput korijena, stabljike, kore, lišća, cvjetova, plodova i sjemenki koristeći odgovarajuće metode ekstrakcije.

Porodica Asteraceae je rasprostranjena u cijelom svijetu, a posebno na Sredozemlju, u Istočnoj Europi i Maloj Aziji. Poznato je oko 25 000 vrsta kroz 1000 rodova. Uz antioksidacijsko djelovanje biljaka porodice Asteraceae koje je dokazano u istraživanjima s ekstraktima (korijena, stabiljke, kore, lišća, cvjetova, plodova i sjemenki) treba istaknuti i protuupalno, analgetsko i antipiretsko djelovanje.

Identificirane su vrste Asteraceae s najvećim antioksidacijskim potencijalom, te s mogućom primjenom u medicini, te farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Vrste su izabrane na temelju njihove botaničke reprezentativnosti. Identificiralo se je 9 najznačajnijih vrsta: *Achillea millefolium* L., *Acmella oleraceae* Murr., *Artemisia absinthium* L., *Bidens pilosa* L., *Carthamus tinctorius* L., *Inula crithmoides* L., *Matricaria recutita* L., *Otanthus maritimus* L. i *Parthenium hysterophorus* L. Prema dobivenim informacijama, moglo bi se zaključiti da biološka aktivnost odabranih vrsta Asteraceae nema potpunu karakterizaciju, te je potrebno nastaviti s istraživanjima sa ciljem razvoja prehrambenih proizvoda, bioaktivnih sastojaka hrane ili farmaceutskih pripravaka s primjenom u prehrambenoj industriji, dermatokozmetici i medicini.

Ključne riječi: Antioksidacija, biološki aktivni spojevi, hrana, farmakoterapija, sekundarni metaboliti
Rad sadrži: 31 stranice, 17 slika, 1 tablica, 105 literaturnih referenci
Jezik izvornika: hrvatski
Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Mila Radan - predsjednik
2. Doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun - član
3. Dr. sc. Franko Burčul, znan. sur. - član - mentor

Datum obrane: 21. rujna 2016.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjenu Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Undergraduate study of chemistry

Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 4.

Mentor: PhD, Franko Burčul, research associate
Technical assistance:

ASTERACEAE PLANTS: BIOACTIVITY AND POTENTIAL APPLICATIONS

Kristina Gluhak, 299

Abstract: Oxidative stress has a relevant part in the etiology of several diseases and metabolic disorders, which is reasonable to expect that antioxidant compounds might have beneficial effects in health maintenance or disease prevention. Antioxidant compounds might be isolated and characterized from different plant constituents, such as roots, stems, bark, leaves, flowers, fruits and seeds, using proper extraction methods.

The Asteraceae family has a worldwide distribution, with special relevance in the Mediterranean, Eastern Europe and Asia Minor, being acknowledged about 25 000 species integrated in approximately 1000 genera. In addition to the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic potential of some of these species, their high antioxidant power, as proven in research works with extracts (of roots, stems, bark, leaves, flowers, fruits and seeds) should be highlighted.

Herein, the Asteraceae species with highest potential as sources of natural antioxidants with potential uses in medicine and in pharmaceutical, cosmetic and food industries were identified. The species were selected based on their botanical representativeness, being identified the 9 most relevant species: *Achillea millefolium* L., *Acmella oleraceae* Murr., *Artemisia absinthium* L., *Bidens pilosa* L., *Carthamus tinctorius* L., *Inula crithmoides* L., *Matricaria recutita* L., *Otanthus maritimus* L. and *Parthenium hysterophorus* L. With the obtained information, it could be concluded that the bioactivity of the selected Asteraceae species lacks a complete characterization, constituting a research scope with great potential to be exploited in the development of dietary supplements, bioactive food ingredients or pharmaceutical based products with application in food industry, dermocosmetics or medicine.

Keywords: Antioxidant activity, bioactive compounds, food, pharmacotherpay, secondary metabolites.
Thesis contains: 31 pages, 17 figures, 1 table, 105 literary references
Original in: Croatian
Defence committee:

1. Mila Radan, PhD, assistant prof. - chair person
2. Lea Kukoč Modun, PhD, assistant prof. - member
3. Franko Burčul, PhD - supervisor

Defence date: September 21st, 2016

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom znanstvenog suradnika dr. sc. Franka Burčula, u razdoblju od srpnja do rujna 2016. godine

Rad je financiran od Hrvatske zaklade za znanost projektom IP-2014-09-6897.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojem mentoru dr. sc. Franku Burčulu na pomoći, uputama i savjetima tijekom pisanja završnog rada.

Također se zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Oliveri Politeo na pomoći, savjetima i posvećenom vremenu tijekom izrade završnog rada.

Zahvalu izražavam i svojoj obitelji na velikoj podršci i razumijevanju.

Kristina Gluhak

SAŽETAK

Oksidacijski stres ima važnu ulogu u etiologiji nekih bolesti i metaboličkih poremećaja, stoga je razumno očekivati da antioksidacijski spojevi imaju koristan učinak u održavanju zdravlja i prevenciji bolesti. Antioksidacijski spojevi mogu biti izolirani i identificirani u različitim dijelovima biljke, poput korijena, stabljike, kore, lišća, cvjetova, plodova i sjemenki koristeći odgovarajuće metode ekstrakcije.

Porodica Asteraceae je rasprostranjena u cijelom svijetu, a posebno na Sredozemlju, u Istočnoj Europi i Maloj Aziji. Poznato je oko 25 000 vrsta kroz 1000 rodova. Uz antioksidacijsko djelovanje biljaka porodice Asteraceae koje je dokazano u istraživanjima s ekstraktima (korijena, stabiljke, kore, lišća, cvjetova, plodova i sjemenki) treba istaknuti i protuupalno, analgetsko i antipiretsko djelovanje.

Identificirane su vrste Asteraceae s najvećim antioksidacijskim potencijalom, te s mogućom primjenom u medicini, te farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Vrste su izabrane na temelju njihove botaničke reprezentativnosti. Identificiralo se je 9 najznačajnijih vrsta: *Achillea millefolium* L., *Acmella oleraceae* Murr., *Artemisia absinthium* L., *Bidens pilosa* L., *Carthamus tinctorius* L., *Inula crithmoides* L., *Matricaria recutita* L., *Otanthus maritimus* L. i *Parthenium hysterophorus* L. Prema dobivenim informacijama, moglo bi se zaključiti da biološka aktivnost odabranih vrsta Asteraceae nema potpunu karakterizaciju, te je potrebno nastaviti s istraživanjima s ciljem razvoja prehrambenih proizvoda, bioaktivnih sastojaka hrane ili farmaceutskih proizvoda sa primjenom u prehrambenoj industriji, dermatokozmetici ili medicini.

Ključne riječi: Antioksidacija, biološki aktivni spojevi, hrana, farmakoterapija, sekundarni metaboliti

SUMMARY

Oxidative stress has a relevant part in the etiology of several diseases and metabolic disorders, which is reasonable to expect that antioxidant compounds might have beneficial effects in health maintenance or disease prevention. Antioxidant compounds might be isolated and characterized from different plant constituents, such as roots, stems, bark, leaves, flowers, fruits and seeds, using proper extraction methods. The Asteraceae family has a worldwide distribution, with special relevance in the Mediterranean, Eastern Europe and Asia Minor, being acknowledged about 25 000 species integrated in approximately 1000 genera. In addition to the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic potential of some of these species, their high antioxidant power, as proven in research works with extracts (of roots, stems, bark, leaves, flowers, fruits and seeds) should be highlighted. Herein, the Asteraceae species with highest potential as sources of natural antioxidants with potential uses in medicine and in pharmaceutical, cosmetic and food industries were identified. The species were selected based on their botanical representativeness, being identified the 9 most relevant species: *Achillea millefolium* L., *Acmella oleraceae* Murr., *Artemisia absinthium* L., *Bidens pilosa* L., *Carthamus tinctorius* L., *Inula crithmoides* L., *Matricaria recutita* L., *Otanthus maritimus* L. and *Parthenium hysterophorus* L. With the obtained information, it could be concluded that the bioactivity of the selected Asteraceae species lacks a complete characterization, constituting a research scope with great potential to be exploited in the development of dietary supplements, bioactive food ingredients or pharmaceutical based products with application in food industry, dermocosmetics or medicine.

Keywords: Antioxidant activity, bioactive compounds, food, pharmacotherapy, secondary metabolites

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. PREGLED METODOLOGIJE 2
3. PREGLED METODA ISPITIVANJA ZA PROCJENU ANTIOKSIDATIVNOG SADRŽAJA 2
3.1. Ispitivanje kapaciteta vezanja protiv stabilnih, ne bioloških, slobodnih radikala 3
3.1.1. DPPH metoda 4
3.1.2. ABTS metoda 4
3.1.3. Metoda određivanja inhibicije ROS/RNS vrsta 5
3.1.4. Metoda određivanja kapaciteta vezanja superoksid aniona 5
3.1.5. Aktivnost vezanja hidroksilnog radikala 6
3.1.6. Metoda redukcije vodikova peroksida 7
3.1.7. Određivanje sposobnosti redukcije dušikovog oksida 7
3.1.8. Ispitivanje kapaciteta vezanja peroksinitrita 7
3.2. Kapacitet antioksidansa za redukciju metalnih iona (FRAP i CUPRAC testovi) 8
3.3. Testovi peroksidacijske inhibicije 8
3.3.1. Metoda obezbojenja β-karotena 9
3.3.2. Određivanje reaktivnih supstanca tiobarbiturne kiseline 10
3.3.3. Analiza inhibicije hemolize 10
3.4. Kompetitivne metode (ORAC i TRAP metoda) 11
3.5. Određivanje ukupnog sadržaja fenola i flavonoida 12
3.6. Usporedba različitih metoda za procjenu antioksidacijskih kapaciteta tvari 14
4. ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL PORODICE ASTERACEAE SA BOTANIČKE RELEVANTNOSTI 16
4.1. *Achillea millefolium* L. 18
4.2. *Acmella oleraceae* Murr. 19
4.3. *Artemisia absinthium* L. 20
4.5. *Carthamus tinctorius* L. 22
4.7. *Matricaria recutita* L. 23
4.8. *Otanthus maritimus* L. 24
4.9. *Parthenium hysterophorus* L. 25
5. ZAKLJUČAK 27
6. LITERATURA 28

1. UVOD

U uvjetima stresa, ljudsko tijelo proizvodi više reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta (ROS/RNS) nego li enzimskih i neenzimskih antioksidansa, što može dovesti do oštećenja stanica i određenih zdravstvenih poteškoća.[1,2] Takva fiziološka neravnoteža (oksidacijski stres) je ključni faktor za početak nekoliko patoloških stanja poput neurodegenerativnih (npr. Alzheimerova bolest) i kardiovaskularnih bolesti, upalnih procesa, nekih oblika raka, pa čak i starenja.[3,4,5]

Oksidacijski stres je vrlo složen proces i njegov fiziološki učinak ovisi o različitim faktorima, kao što je vrsta oksidacijskog sredstva, mjesto i intenzitet proizvodnje, sastav i uloga antioksidansa, odnosno učinkovitost obrambenog sustava.[6] Pri određenim patološkim stanjima, obrana endogenim antioksidansima nije dovoljna za obranu od povećane razine staničnih oksidacijskih vrsta.[7] Prema tome, primjena egzogenih antioksidansa (oni koji se dobivaju iz hrane) može poboljšati oksidacijsko stanje, zbog njihovog dvostrukog djelovanja; nadoknađuje se nedjelotvornost endogenih obrambenih sustava i dolazi do unapređenja sveukupne antioksidacijske reakcije.[8,9] Dakle, antioksidansi mogu spriječiti različita oksidacijska oštećenja, dajući koristan terapijski učinak. Na taj način, egzogeni antioksidansi dobiveni iz hrane imati će bitne funkcije u staničnoj homeostazi, upravljanju funkcije stanica i u sprečavanju bolesti.[10] Dakle, prehrana bogata antioksidansima, prirodno prisutnih u biljkama, djeluju blagotvorno na ljudsko zdravlje. Iz tog razloga antioksidansi izolirani iz prirode predstavljaju značajno polje istraživanja.

Porodica Asteraceae uključuje velik broj cvjetnica, grupiranih u približno 1600 rodova što prelazi 23 000 vrsta. Neke od tih vrsta, kao što je kamilica (*Matricaria recutita* L.), stolisnik (*Achillea millefolium* L.), ili pelin (*Artemisia absinthium* L.), su aromatične vrste i od prije je poznata njihova medicinska primjena.[11,12]

U ovom radu prikazati će se antioksidacijski kapacitet biljaka porodice Asteraceae, te dati smjernice o njihovoj primjenji kao izvor prirodnih antioksidansa s potencijalnom medicinskom i farmaceutskom primjenom te za korištenje u kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Dakle, pažnja je posvećena antioksidacijskom kapacitetu prirodnih spojeva, s naglaskom na one koji se često konzumiraju.

2. PREGLED METODOLOGIJE

Relevantna literatura je skupljena provjeravanjem glavne znanstvene baze podataka, uključujući SciFinder, Sciencedirect, Medline i Google Scholar. Među prikazanim publikacijama, radovi su odabrani s obzirom na:

a) *in vitro* i *in vivo* ispitivanja biološke aktivnosti testovima i razjašnjavanju strukture bioaktivnih spojeva izoliranih iz ove obitelji,
b) identifikaciju vrste i informaciji o uvjetima prikupljanja.

3. PREGLED METODA ISPITIVANJA ZA PROCJENU ANTIOKSIDATIVNOG SADRŽAJA

Korisna uloga antioksidansa u tretmanu nekih poremećaja i bolesti nastalih kao posljedica oksidacijskog stresa, bila je intenzivno proučavana, osobito *in vivo*. Fenolni spojevi (npr. fenolna kiseline i flavonoidi) su moćni protuupalni, antikancerogeni ili antiaterosklerotični agensi (među ostalim biološkim značajkama), kao rezultat njihovog antioksidativnog djelovanja.[2,13]

Procjena antioksidacijskog djelovanja i identifikacija specifičnih antioksidacijskih spojeva može se provesti različitim metodama. Ne postoji najbolja univerzalna metoda kojom se antioksidacijski kapacitet može procijeniti točno, pružajući nesumnjive rezultate. U stvari, nekoliko metoda je razvijeno i primijenjeno u različitim sustavima, ali ponekad su dobiveni rezultati nekonzistentni, pa se savjetuje korištenje više različitih metoda umjesto samo jedne.[1,13]

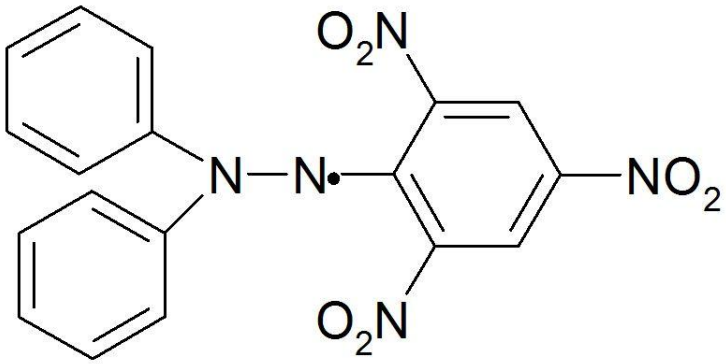
Neke od metoda koje se koriste za istraživanje antioksidacijskog potencijala uzorka (hrana, biljni ekstrakti, komercijalni antioksidansi, itd.) se baziraju na sintetskim antioksidansima ili slobodnim radikalima, dok druge trebaju životinjske ili biljne stanice. Ove metode mogu biti široko primjenjive ili su posebno dizajnirane za specifične ciljeve, kao što je u slučaju testiranja inhibicije lipidne peroksidacije. Potrebna znanja i tehničke vještine se također razlikuju za različite metode. Uglavnom, ove metode se razlikuju obzirom na reagense, supstrate, eksperimentalne uvjete, reakcijski medij i metodu evaluacije.[14,15]

S obzirom na najnovije studije,[13,14,15] najčešće *in vitro* metode koje se koriste za određivanje antioksidativnog kapaciteta su:

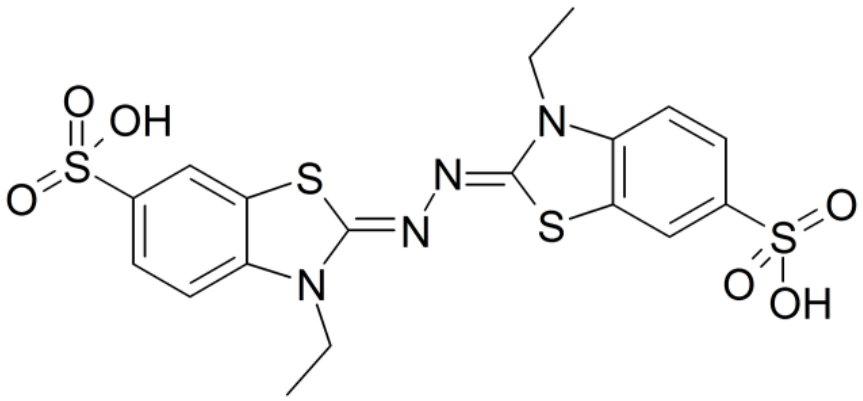
a) gašenje slobodnih radikala antioksidansima (testovi hvatanja stabilnih, slobodnih radikala ili reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), reaktivnih dušikovih vrsta (RNS))
b) sposobnost antioksidansa za redukciju metalnih iona (sposobnost redukcije željezovih iona (FRAP metoda) i sposobnost redukcije bakrovih iona (CUPRAC metoda)
c) kompetitivne metode (kapacitet apsorpcije kisikovih radikala (ORAC metoda), i kapacitet apsorpcije ukupnih radikala (TRAP metoda))
d) određivanje ukupnih fenola i ukupnog sadržaja flavonoida
e) redukcijski potencijal (RP).

3.1. Ispitivanje kapaciteta vezanja protiv stabilnih, ne bioloških, slobodnih radikala

Najznačajnija metoda vezanja slobodnih radikala je 2,2-difenil-1- pikrilhidrazil (DPPH), koja je brza, jednostavna (tj. nije ograničena mnogim koracima i reagensima) i dostupna u odnosu na druge metode (Slika 1.). 2,2' -azinobis(3- etilbenztiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS) je metoda koja se koristi za hidrofilne i lipofilne antioksidanse (Slika 2.).[14,15]



Slika 1: *Kemijska struktura DPPH*[16]



Slika 2: *Kemijska struktura ABTS*[17]

3.1.1. DPPH metoda

DPPH metoda se temelji na načelu da se donor vodika može smatrati antioksidansom. Taj široko primjenljiv kolorimetrijski test koristi DPPH stabilni slobodni radikal, čija alkoholna otopina ima jaku ljubičastu boju koja prelazi u žutu (reducirani oblik) u prisutnosti antioksidansa. $DPPH^{\bullet}$ je topljiv u organskim otapalima i ima maksimalnu apsorbtivnost pri valnoj duljini od 517 nm. Antioksidativna aktivnost se mjeri smanjenjem apsorpcije u rasponu do 515-528 nm, što je rezultat redukcije antioksidansa u otopini. Protokoli koji se koriste za izvođenje metode se razlikuju u koncentraciji DPPH, vremenu inkubacije, otapalu i o pH-vrijednosti reakcijske smjese. Općenito, reakcijska smjesa treba se pripraviti koristeći omjer od 5 μl ispitivanog uzorka i 95 μl DPPH (300 μM) u metanolu.[18]

Reakcija vezanja DPPH radikala se obično provodi pri 37 °C u mraku tijekom 30 minuta, a apsorbancija se zabilježi pri 517 nm. Veliki pad apsorbancije na krajnjoj točki reakcije pokazuje snažnu sposobnost vezanja slobodnih radikala s obzirom na ispitivani uzorak.[2,14,19,20]

3.1.2. ABTS metoda

ABTS metoda je kolorimetrijsko određivanje u kojem dolazi do gubitka boje otopine ABTS radikala u prisustvu antioksidansa. Obično se ABTS radikalni kation ($ABTS^{\bullet +}$) priprema u otopini s kalijem, a smjesa se dalje inkubira na sobnoj temperaturi u tami 12 sati. $ABTS^{\bullet +}$ nastaje oksidacijom ABTS s kalij persulfatom, a njegova

redukcija vodikom doniranim od antioksidansa se mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 734 nm. Dobivena otopina je često razrijeđena sa metanolom kako bi se postigla odgovarajuća apsorbancija. Zbog topljivosti $ABTS^{\bullet+}$ u vodenim ili organskim otapalima, ovaj test obezbojenja mjeri ukupni kapacitet lipofilnih i hidrofilnih antioksidansa. U određivanju antioksidativnog djelovanja, učinak koncentracije antioksidansa i vrijeme potrebno za inhibiciju radikala kationa treba uzeti u obzir.[2,13,18,19]

3.1.3. Metoda određivanja inhibicije ROS/RNS vrsta

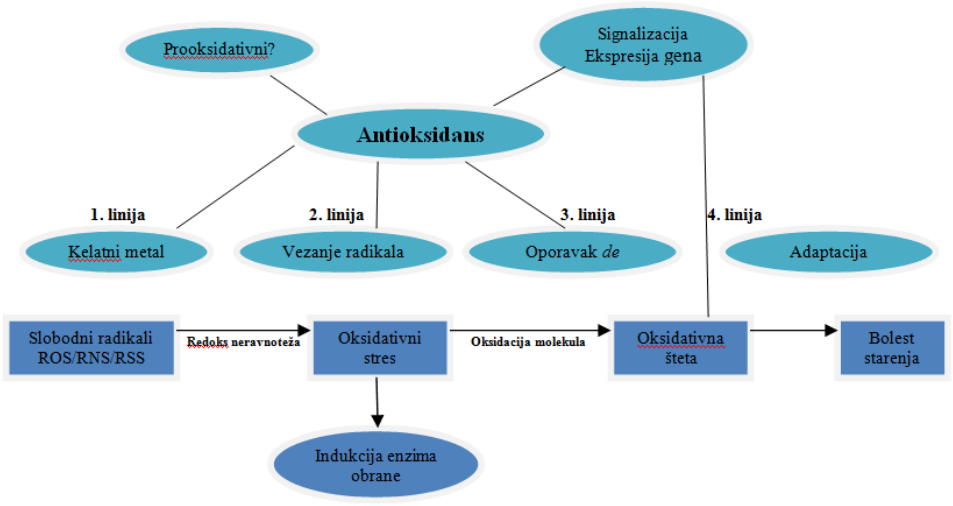
Slobodni radikali su atomi, molekule ili ioni koji sadrže nesparene elektrone, koji su jako aktivni u kemijskim reakcijama. U biološkom sustavu, slobodni radikali su često derivati kisika, dušika i sumpora. Svi se oni zajedno nazivaju ROS, RNS i reaktivne sumporove vrste (RSS). ROS uključuju slobodne radikale, kao što su superoksidni anion ($O_2^{-\bullet}$), hidroperoksidni radikal (HO_2), hidroksilni radikal ($HO^{\bullet}$), dušikov oksid (NO) i druge vrste, kao što je vodikov peroksid (H_2O_2), singlet kisik ($^1O_2$) i hipokloritna kiselina (HOCl).[1] RNS se stvaraju kod životinja, dobivene su reakcijom NO sa $O_2^{-\bullet}$ u peroksinitrit ($ONOO^-$). Osim toga, $ONOO^-$ može reagirati sa drugim molekulama i tvoriti druge vrste RNS, uključujući dušikov-dioksid ($^{\bullet}NO_2$) i didušikov-trioksid (N_2O_3).[21] RSS, s druge strane, se dobivaju iz tiola koji prelaze u disulfate koji se pak mogu dalje oksidirati u disulfid-S-monoksid ili disulfid-S-dioksid. Ti međuprodukti mogu reagirati sa reduciranim tiolom i proizvesti sulfensku ili sulfinsku kiselinu.[22]

3.1.4. Metoda određivanja kapaciteta vezanja superoksid aniona

Iako je superoksidni anion slabi oksidans, on je početna točka za dobivanje jakog i reaktivnog hidroksil radikala HO• i singlet kisika, koji oboje dovode do oksidacijskog stresa. Aktivnost vezanja superoksidnog aniona može se mjeriti nakon miješanja sa Tris-HCl puferom, koji sadrži NBT (eng. *nitroblue tetrazolium*), 0,5 ml otopine NADH i uzorak. Reakcija se inicira dodatkom otopine fenazin-metosulfata (PMS), i dalje inkubacijom na 25 °C/5 min, te mjerenjem apsorbancije pri λ = 560 nm.[23,24,25]

3.1.5. Aktivnost vezanja hidroksilnog radikala

Hidroksilni radikal ($HO^{\bullet}$) je jedan od najmoćnijih i najreaktivniji ROS u biološkom sustavu, posebno kad su u pitanju polinezasićene masne kiseline, kao molekule koje ulaze u sastav membrana. Jedna od standardnih metodologija[26] koja se koristi kod testiranja sposobnosti hvatanja hidroksil radikala sastoji se od otopine ekstrakta i 2-deoksi-D-riboze (u KH_2PO_4-KOH puferu), etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA), $FeCl_3$, H_2O_2 i askorbinske kiseline. Otopina se inkubira (37 °C, 1h). Reakcija je potaknuta dodatkom tiobarbituratne kiseline (TBA) i trikloroacetatne kiseline nadalje inkubirana 100 °C, 20 min. Nakon hlađenja apsorbancija se mjeri pri λ = 532 nm, te uspoređuje sa slijepom probom. S obzirom na veliku reaktivnost $HO^{\bullet}$, gotovo sve kemijske vrste u biološkim sustavima mogu se poništiti reducensom $HO^{\bullet}$. Zapravo, to ne rade neke specifične molekule ili enzimi, što što nam može dati krivu procjenu u smislu vezanja $HO^{\bullet}$. Puno je korisnije odrediti potencijal antioksidansa da ukloni prekursore ili veže ione metala, važnih kod nastanka HO•. Ti se antioksidansi označavaju kao preventivni.[14,23]



Slika 3:*Obrambena mreža in vivo nasuprot oksidacijskog stresa. Nekoliko antioksidansa ima različite uloge prema nivou obrane i mehanizmu*[13]

3.1.6. Metoda redukcije vodikova peroksida

Ljudska bića su indirektno izložena djelovanju H_2O_2 iz okoliša podrijeklom iz biljaka (blizu 0,28 mg $kg^{-1}dan^{-1}$). H_2O_2 može ući u ljudsko tijelo inhalacijom i putem očiju i kože. H_2O_2 se odmah razgrađuje na kisik i vodu, a u prisutnosti iona metala može proizvesti $HO^{\bullet}$ koji obzirom na reaktivnost može pokrenuti peroksidaciju lipida te uzrokovati oštećenja DNA. Sposobnost biljnih ekstrakata da reduciraju H_2O_2 se obično testira koristeći puferiranu otopinu H_2O_2 (fosfatni pufer) u smjesi sa ekstraktom i pri apsorbanciji od 230 nm.[14,15,27]

3.1.7. Određivanje sposobnosti redukcije dušikovog oksida

Radikal dušikova oksida ($NO^{\bullet}$) prozvan kao "molekula godine" 1992. godine u časopisu Science Magazine,[28] ima ključnu ulogu u regulaciji različitih fizioloških procesa. Poznato je da dušikov oksid proizveden iz nitroprusida, u vodenoj otopini i fiziološkom pH reagira sa kisikom i nastaju nitritni ioni, koji se mogu kvantificirati koristeći Griessov reagens, natrijev-nitroprusid u fosfatnom puferu, testirani ekstrakt i referentni uzorak. Slijepa proba se također priprema sa metanolom i zatim se inkubira (25 °C, 60 min), i dalje određuje spektrofotometrijski (λ = 540 nm). Određivanje sposobnosti redukcije proizvedenog dušikova oksida je kvantificirana usporedbom vrijednosti apsorbancije kontrolnog i testnog uzorka. Kurkumin, kava, natrijev-nitrat, butilirani hidroksianisol (BHA), askorbinska kiselina i rutin se koriste kao pozitivna kontrola.[15,23,29]

3.1.8. Ispitivanje kapaciteta vezanja peroksinitrita

Peroksinitrit ($ONOO^-$) i dušična kiselina (ONOOH) uzrokuju nitriranje ili hidroksilaciju aromatskih spojeva, posebice tirozina. Pri fiziološkim uvjetima, peroksinitrit može reagirati sa CO_2 otopljenim u tjelesnim tekućinama. Te reaktivne vrste mogu izazvati oštećenja u makromolekulama. Suvremene metode mjerenja $ONOO^-$ su inhibicija nitriranja tirozina i inhibicija oksidacije dihidrorodamina-123. Spektrometrijski test elektronske spinske rezonancije (ESR) je jedini postupak koji omogućuje detekciju specifičnih slobodnih radikala uključenih u autooksidacijski proces.[30,31]

3.2. Kapacitet antioksidansa za redukciju metalnih iona (FRAP i CUPRAC testovi)

Ove metode procjenjuju kapacitet uzorka za redukciju željezovih i bakrovih iona u vodenom mediju. FRAP test, izvorno razvijen za procjenu antioksidacijskog kapaciteta ljudske plazme, temelji se na redukciji željezova iona u kompleksu sa TPTZ-om 2,4,6-tri-(2-piridil)-1,3,5-triazina (Fe^{3+}-TPTZ) pri niskoj pH vrijednosti. FRAP vrijednosti dobiju se usporedbom vrijednosti apsorbancije pri λ = 593 nm za test uzorak i vrijednosti dobivenih mjerenjem apsorbancije uzoraka poznatih Fe^{3+} koncentracija, a izražava se kao mM eq Fe^{2+}/kg (L).[15,32]

CUPRAC metoda određuje potencijal uzorka za redukciju bakar-neokuproin kompleksa (Nc-Cu^{2+}). U tom slučaj, kompleks Nc s reduciranim oblikom metala predstavlja karakteristično apsorpcijsko područje s maksimalnom apsorpcijom pri λ = 450 nm. Tako, sposobnost za redukciju metalnih iona (kod specifičnih valnih dužina) uz potrebno vrijeme inkubacije omogućuje određivanje FRAP ili CUPRAC vrijednosti. Ipak, FRAP zahtjeva kiseli pH (3,6), što je daleko od fiziološke pH vrijednosti, dok se CUPRAC analiza provodi pri pH (7,0) što bolje simulira fiziološke uvjete. Osim toga, CUPRAC testovi razlikuju redukcijski potencijal tiolnih antioksidansa.[33,34]

3.3. Testovi peroksidacijske inhibicije

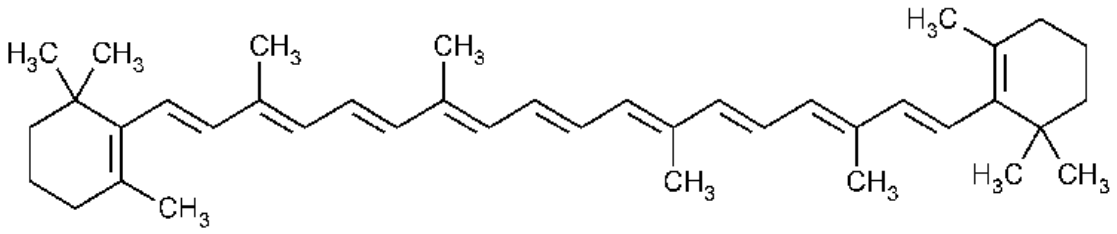
Neke lipidne molekule, na primjer, polinezasićene masne kiseline (PUFA), ili njihovi esteri, te kolesterol su osjetljivi na utjecaj slobodnih radikala. Lipidna peroksidacija uzrokuje promjene na biološkim membranama i proizvodi potencijalno toksične spojeve. α,β-nezasićeni karbonilni spojevi (4-hidroksinonenal i akrolein) koji nastaju kao posljedica oksidacije lipida napadaju makromolekule (proteini, DNA) što može dovesti do patoloških stanja. Antioksidansi mogu usporiti taj proces u hrani i biološkim sustavima.[35]

Postoje vrlo specifične tehnike dostupne za procjenu sposobnosti oksidacije membranskih lipida, lipida prisutnih u hrani, lipoproteina i masnih kiselina. Antioksidacijski efekt tijekom lipidne peroksidacije se mjeri smanjenjem koncentracije supstrata, testovima peroksidacije ili detekcijom nastanka produkta.[13] Kao lipidni supstrati mogu se koristiti emulzije ili liposomi dobiveni od masnih kiselina ili njihovi esterificirani oblici. Kao biološki sustav mogu biti eritrociti ili izolirani lipoproteini.[30]

3.3.1. Metoda obezbojenja β-karotena

Oksidacijom karotenoida (svjetlom, toplinom, ROO•) mogu nastati bezbojni produkti.[36] β-karoten se brzo obezboji u prisutstvu linoleatnog radikala (Slika 4.). Prilikom oksidacije, H atom se uklanja iz aktivne metilen bis-alilne skupine koja se nalazi u C_{11} položaju linolne kiseline, između dvije dvostruke veze. Novo formirani ciklopentadienilni radikal napada nezasićene molekule β-karotena kao bi ponovno stekao H atome. Kada molekule β-karotena izgube njihovu konjugaciju, nestanak narančaste boje može se pratiti spektrofotometrijski pri λ = 470 nm.[37,38] Određivanje potpunog inhibicijskog učinka moguće je pratiti i kinetički, a to omogućuje bolju procjenu učinkovitosti antioksidacijske obrane.[36]

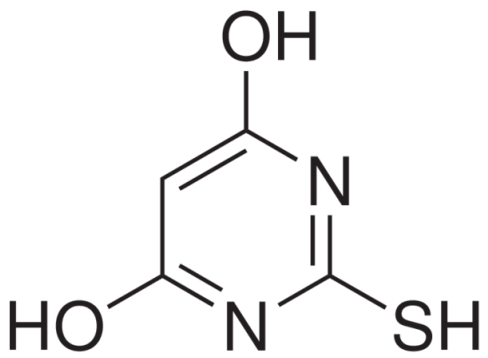
Dodatak uzorka koji sadrži antioksidacijsku komponentu ili ekstrakt biljke inhibira obezbojenje β-karotena. Do obezbojenja β-karoten može doći i zbog drugih razloga, što može prouzročiti poteškoće kod interpretacije rezultata.[39]



Slika 4: *Kemijska struktura β- karotena*[40]

3.3.2. Određivanje reaktivnih supstanca tiobarbiturne kiseline

TBARS analiza se široko koristi za određivanje oksidacije lipida. Ovom metodom određuje se malondialdehid (MDA) dobiven oksidacijom lipidnog supstrata. MDA nastaju iz masnih kiselina koje posjeduju jednu ili dvije dvostruke veze, oksidacijom karbonilnih skupina.[42] MDA reagira sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA), tvori ružičasti pigment (TBARS) koji se određuje spektrofotometrijski pri λ = 532 nm.[42] Reakcija se odvija u dva stupnja: oksidacija supstrata dodatkom iona metala (npr. željeza ili bakra) ili slobodnog radikala; poslije čega se opseg oksidacije određuje dodatkom TBA i spektrometrijski određuje nastali produkt (Slika 5.). Oksidacija je inhibirana dodatkom antioksidansa, što se mjeri padom apsorbancije. Rezultati se obično prikazuju kao postotak inhibicije oksidacije.[30]



Slika 5: *Kemijska struktura tiobarbituratne kiseline*[43]

3.3.3. Analiza inhibicije hemolize

Eritrociti su osjetljivi na lipidnu peroksidaciju zbog visokog sadržaja polinezasićenih lipida, velikog sadržaja kisika i prisutnosti prijelaznih metala.[44] Kada su eritrociti podvrgnuti oksidacijskom stresu, slobodni radikali dovode do stvaranja hemolitičkih pora u njihovoj staničnoj membrani. Ta pojava uzrokuje propuštanje kalija u izvanstanični prostor i prouzrokuje hemolizu.[45] Budući da je lipidna peroksidacija lančana reakcija slobodnih radikala, te s obzirom da slobodni radikal može prouzrokovati dvadeset reakcija propagacije, membrana eritrocita se lako ošteti. U prisutnosti antioksidansa, koji reagiraju sa $ROO^{\bullet}$, zaustavlja se peroksidacija, a time i inhibira hemoliza.[46]

Azo spoj, 2,2´- azobis(2-metilpropionamidin)-dihidroklorid (AAPH, ponekad označen i kao ABAP) kod fizioloških uvjeta stvara alkil radikale i inicira peroksidaciju lipida. Otapanjem AAPH u vodi stvaranje slobodnih radikala se može kontrolirati što se koristi kao inicijator stvaranja slobodnih radikala u biološkim istraživanjima.[13,46]

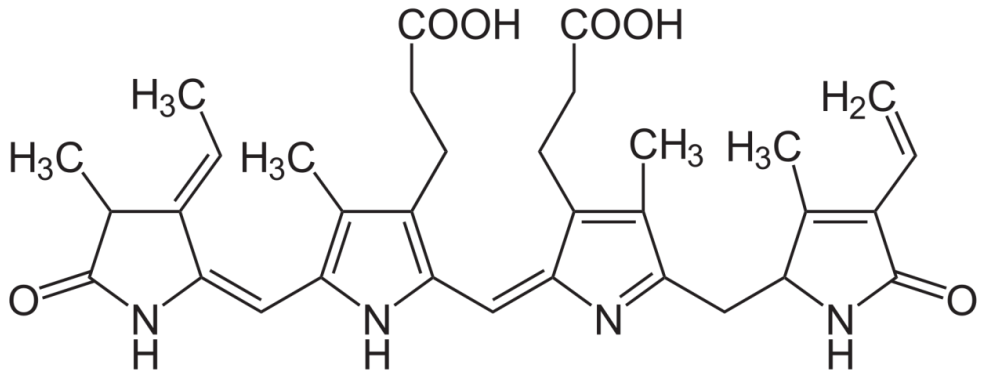
Upotreba eritrocita kao model sustava se opsežno primjenjuje u proučavanju oksidacijskih oštećenja bioloških membrana, a inhibicija hemolize se može pratiti spektrofotometrijski pri λ = 540 nm.[42]

3.4. Kompetitivne metode (ORAC i TRAP metoda)

Ove metode procjenjuju sposobnost inhibicije nestanka ciljne molekule (obično se određuje UV-vidljivom apsorpcijom ili fluorescentnom spektroskopijom) uzrokovane peroksilnim radikalima. Često, AAPH se ponaša kao izvor peroksilnih radikala ($ROO^{\bullet}$), generirajući ih poznatim brzinama u prvim satima inkubacije u vodenom mediju.[47]

ORAC metoda koristi beta-fikoeritrin (β-PE) ili fluorescein kao oksidabilni proteinski supstrat (ciljna molekula) i AAPH (2,2'-Azobis (2-amidinopropan)-dihidroklorid) kao generator peroksil radikala ili Cu^{2+}- H_2O_2 sustav kao generator hidroksil radikala. Ova metoda se temelji na mjerenju smanjenja fluorescencije u prisutnosti antioksidansa (Trolox se obično koristi kao kontrola). Do danas, ORAC je jedina metoda koja se temelji na kompletnoj reakciji slobodnih radikala koji koriste "područje ispod linije" (AUC, area-under-the-curve) tehnike za kvantifikaciju. Ovaj pristup dopušta kombinaciju postotka inhibicije i trajanje inhibicije slobodnih radikala istodobno. Metoda se koristila prilikom mnogo istraživanja antioksidacijskog potencijala biljaka.[2,14,15,39]

Posljednjih godina, TRAP je najšire korištena *in vivo* metoda za određivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta plazme ili seruma. Ova metoda koristi peroksilne radikale dobivene iz AAPH i peroksidabilne materijale prisutne u plazmi ili drugim biološkim tekućinama. Poslije dodatka AAPH plazmi, oksidacija se prati mjerenjem potrošnje kisika prilikom reakcije. Tijekom perioda indukcije, oksidacija je inhibirana antioksidansima u plazmi. U ovoj analizi, stopa peroksidacije inducirane AAPH-om se prati smanjenjem fluorescencije proteina R-fikoeritrina (R-PE) (Slika 6.).[13,31,48]



Slika 6: *Kemijska struktura β-fikoeritrina*[49]

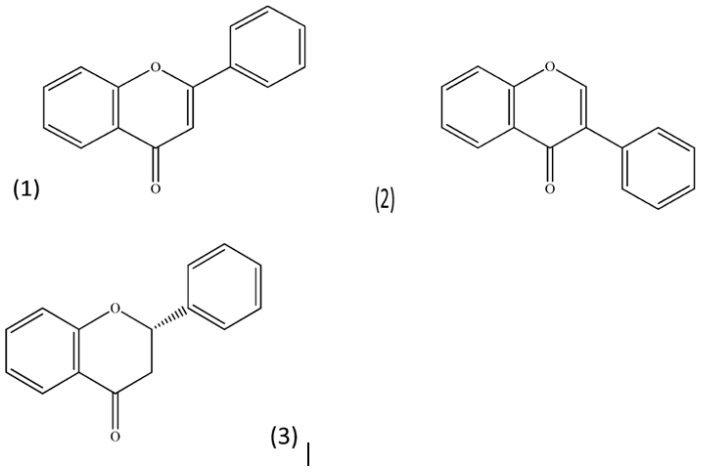
3.5. Određivanje ukupnog sadržaja fenola i flavonoida

Količina ukupnog sadržaja fenola se može odrediti metodom Folin-Ciocalteu (FCR). Točna kemijska priroda FCR nije poznata, no općenito je prihvaćeno da sadrži komplekse fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline. Kemijska reakcija se bazira na prijenosu elektrona u alkalnim uvjetima iz fenolnih komponenti i ostalih molibdenovih reduciranih vrsta, plavih kompleksa koji se mogu odrediti spektrofotometrijski.[23] Otopina uzorka se miješa sa FCR (koji je prethodno otopljen) i ostavi se stajati (3 min, 25 °C) prije dodatka nezasićene otopine natrijeva-karbonata. Otopina se čuva (120 min) u tami prije mjerenja apsorbancije (λ = 725 nm). Galna kiselina se koristi kao standard za izradu kalibracijske krivulje, a ukupni sadržaj fenola se izražava u ekvivalentima galne kiseline (eqGA).[15,50] Unatoč širokoj primjeni, FCR metoda ima neka ograničenja, kao što je mogućnost korištenja drugih standarda osim galne kiseline, činjenice da je konačna apsorpcija proporcionalna broju $HO^{\bullet}$ grupa (ovisno također o molekulskoj strukturi) i uglavnom zbog toga što reagens može biti reduciran i drugim molekulama koje nisu fenoli (npr. askorbinska kiselina, reducirani šećeri). Nadalje, ograničen je na hidrofilne antioksidanse. Obično, identifikacija i kvantifikacija fenolnih komponenti se vrši kromatografskim tehnikama povezanim sa masenim spektrometrom ili nuklearnom magnetskom rezonancijom.[36]

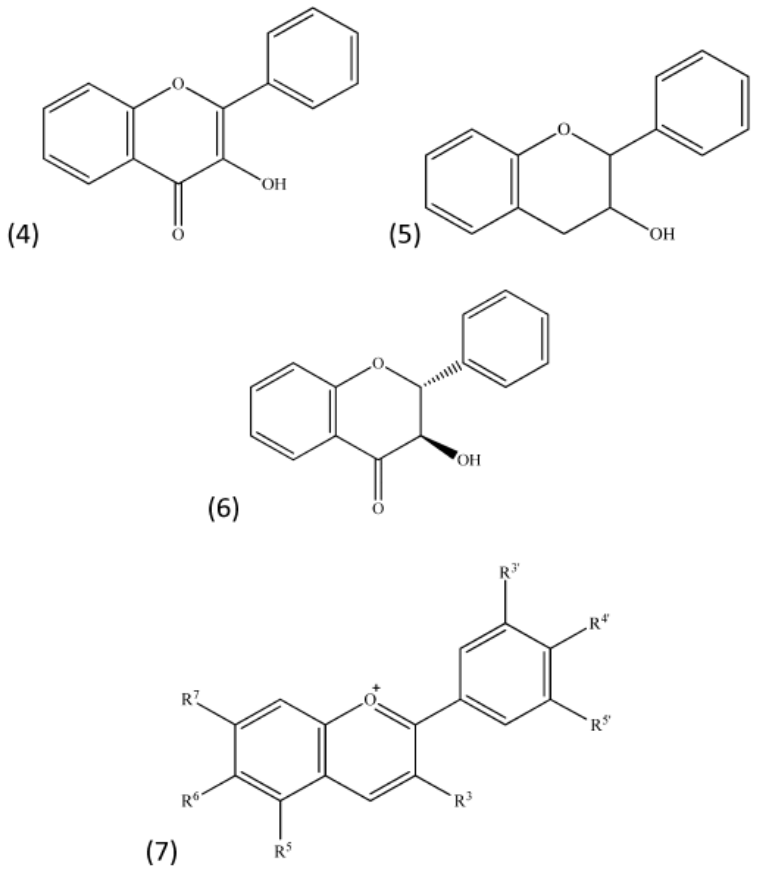
Flavonoidi su često prisutni u biljkama i doprinose senzornim kvalitetama hrane.[51] Ove fitokemikalije su obično klasificirane kao dijetetski antioksidansi zbog $HO^{\bullet}$ skupine u blizini π-konjugiranog elektrona, zbog čega lako doniraju vodik ROS-u i RNS-u.[54] Flavonoidi su podijeljeni u različite skupine kao što su flavoni, flavanoni, izoflavoni, flavonoli, flavanoli, flavanonoli i izoflavoni (Slika 2.), sa flavan-3-olima i

antocijanima kao glavnom skupinom kod biljaka.[52] Antioksidacijska aktivnost ovisi o njihovim kemijskim strukturama, posebice o položaju -OH skupina u molekuli. Pored njihove sposobnosti da doniraju vodik ili elektron slobodnim radikalima, keliraju metalne ione i inhibiraju enzime odgovorne za proizvodnju slobodnih radikala, flavonoidi (osobito izoflavoni) mogu svoje učinke pokazati na različite načine kao što je modulacija staničnih signalnih putova, mitohondrijske interakcije i promjene u ekspresiji gena.[53]

Flavonoidi se najčešće određuju kolorimetrijski, na način da se uzorak miješa sa reagensom koji sadrži aluminijev-klorid i natrijev-nitrit, pri čemu nastaje flavonoid-aluminijev kompleks koji je u alkalnom mediju ružičasto obojen. Aluminijev kation tvori stabilne komplekse sa flavonoidima, uzrokujući pomak prema višim valnim duljinama (crveni pomak). Čak i fenolne kiseline tvore komplekse sa aluminijevim-kloridom, apsorbiraju pri dosta nižim valnim dužinama, čime se izbjegava interferencija dobivenih apsorbancija. Kvercetin ili katehin se mogu koristiti kao pozitivna kontrola. Sadržaj flavonoida se obično izražava kao ekvivalent standarda (mg g^{-1} ekstrahirane komponente).[55,56]



Slika 7: *Osnovna kemijska struktura: (1) flavona, (2) flavanona, (3) izoflavona*



Slika 8: *Osnovna kemijska struktura: (4) flavonola, (5) flavanola, (6) flavanonola, (7) izoflavona*

3.6. Usporedba različitih metoda za procjenu antioksidacijskih kapaciteta tvari

Bilo koja opisana metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti treba uključivati inicijator oksidacije, adekvatni supstrat i način detekcije kraja reakcije. Inicijatori mogu biti povećana temperatura ili parcijalni tlak kisika, dodatak metalnih iona, izloženost svjetlu što potiče svjetlom-induciranu oksidaciju ili miješanje za bolji kontakt između reagensa.[36] Evaluacija antioksidativne aktivnosti u biološkim sustavima je pod utjecajem različitih čimbenika kao što su antioksidacijski koeficijenti raspodijele između vodene i lipidne faze, oksidacijsko stanje i stanje oksidabilnog supstrata.[57] U zaključku, standardna evaluacijska metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti treba:

a) mjeriti potencijal nastajanja kemijske transformacije;
b) upotrebljavati izvor slobodnih radikala s biološkim značajem;

c) uspješno koristiti jednostavne tehnološke metode;
d) imati dobro poznato reakcijsko vrijeme i mehanizam;
e) rezultirati izvršenjem zadatka sa opremom dostupnom u laboratoriju;
f) imati dobru ponovljivost prilikom testova;
g) biti prilagodljiva hidrofilnim i lipofilnim antioksidansima;
h) biti primjenjiva na različite tipove slobodnih radikala.[39]

4. ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL PORODICE ASTERACEAE SA BOTANIČKE RELEVANTNOSTI

Smatra se da dvije trećine biljnih vrsta na zemlji imaju ljekovita svojstva.[2] To se može pripisati njihovom antioksidacijskom kapacitetu. Stoga je sve veći interes za primjenu ljekovitog bilja, upotrebljavanog u narodnoj medicini, u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.To je i razlog zašto fitomedicina ima sve veću važnost za brigu o zdravlju. Uzimajući u obzir socijalne zahtjeve koji se odnose na zdravlje i prehranu, ljekovito bilje se pojavljuje kao snažna alternativa sintetskim proizvodima, koristi se kako u tradicionalnoj medicini tako i u prehrambenim i farmaceutskim proizvodima, zbog svojih nutritivnih svojstva i biološke aktivnosti. Zbog široke primjene, potrebno je objasniti njihov mehanizam djelovanja, u cilju razvoja ljekovitih proizvoda. Biljke sadrže velik broj različitih molekula koje mogu inhibirati slobodne radikale.Takvi su fenolni spojevi, spojevi s dušikom, vitamini, terpenoidi.[18,58]

Biljna porodica Asteraceae sadrži približno 1000 biljnih rodova s više od 25 000 vrsta cvjetnica, neke s medicinskom primjenom, kao kamilica (*M. recutita* L.), stolisnik (*A. millefolium* L.) ili pelin (*Artemisia absinthium* L.). Biljke porodice Asteraceae istraživane su diljem svijeta. U ovom radu predstavljeni su rezultati istraživanja bioloških potencijala nekih vrlo važnih pripadnika porodice Asteraceae, s naglaskom na antioksidacijski potencijal (Tabela 1).

***Tabela 1: Biološka** aktivnost porodice Asteraceae sa različitih geografskih područja*

Vrsta	Aktivnost	Podrijetlo	Autori
Achillea beibersteni	Sadržaj fenola; antioksidacijska aktivnost	Saudijska Arabija	Shahat et al. (2014)
Achillea fragrantissima	Sadržaj fenola; antioksidacijska aktivnost	Saudijska Arabija	Shahat et al. (2014)
Achillea millefolium	Antioksidacijska aktivnost	Brazil	Baretta et al. (2012)
	Antimikrobna i antioksidacijska aktivnost	Turska	Candan et al. (2003)
	Vazoprotektivna aktivnost	Italija	Dall'Acqua et al. (2011)
	Fitokemijska, antioksidacijska i antikancerogena aktivnost	Portugal	Dias et al. (2013)
	Sadržaj fenola; antioksidacijska aktivnost	Iran	Gharibi et al. (2013)
	Antiulcerogena i antioksidacijska aktivnost	Brazil	Potrich et al. (2010)
	Hipotenzijski efekt	Brazil	Souza et al. (2011)
	Sadržaj fenola; antioksidacijska aktivnost	Italija	Vitalini et al. (2011)
	Antioksidacijska aktivnost i regulacija mitohondrijskog disanja	Litvanija	Trumbeckaite et al. (2011)
Acmella oleraceae	Fitokemijska,i antioksidatcijsk aktivnost	Šri Lanka	Abeysiri et al. (2013)
Ageratum conyzoides	Analgetski potencija; antioksidacijska aktivnost	Bangladeš	Dewan et al. (2013)
Ageratum houstonianum	Antioksidacijska aktivnost	Indija	Tennyson et al. (2012)
Ambrosia artemisiifolia	Antioksidacijska aktivnost	Srbija	Maksimović (2008)
Anthemis deserti	Sadržaj fenola; antioksidacijska aktivnost	Saudijska Arabija	Shahat et al. (2014)
Arctium minus	Antimikrobna i antioksidacijska aktivnost	Irska	Kenny et al. (2014)
Artemisia absinthium	Hepatoprotektivna aktivnost	Kina	Amat et al. (2010)
	Fitokemijska, antifungalna i antiparazitska aktivnost	Španjolska	Bailen et al. (2013)
	Neuroprotektivna aktivnost	Indija	Bora and Sharma (2010)
	Antioksidacijska aktivnost	Srbija	Canadanovic-Brunet et al. (2005)
	Antiparazitska i antioksidacijska aktivnost	Španjolska	Gonzalez-Coloma et al. (2012)
	Sadržaj fenola; antioksidacijska aktivnost	Australija	Lee et al. (2013)
	Protuotrovna aktivnost	Turska	Nalbantsoy et al. (2013)
	Antikancerogena aktivnost	Indija	Shafi et al. (2012)
	Anthelmintska aktivnost	Indija	Tariq et al. (2009)
Artemisia monosperma	Sadržaj fenola; antioksidacijska aktivnost	Saudijska Arabija	Shahat et al. (2014)
Bidens pilosa	Antioksidacijska i imunomodulatorska aktivnost	Kuba	Abajo et al. (2004)
	Antidijabetska aktivnost	Tajvan	Chien et al. (2009)
	Antioksidacijska i antimikrobna aktivnost	Japan	Deba et al. (2008)
	Antihipertenzivna aktivnost	Kamerun	Dimo et al. (2002)
	Antihiperglikemijska aktivnost	Tajvan	Hsu et al. (2009)
	Antiulcerogena aktivnost	Brazil	Kviecinski et al. (2008)
	Imunosupresivno i antiinflamatorno svojstvo	Brazil	Pereira et al. (1999)
	Antimalarična aktivnost	Brazil	Oliveira et al. (2004)
	Antioksidacijska aktivnost	Tajvan	Yang et al. (2006)
Carthamus tinctorius	Nekoliko bioloških aktivnost	Nekoliko podrijetla	Zhou et al. (2014)
Centaurea nigra	Antimikrobna i antioksidcijska aktivnost	Irska	Kenny et al. (2014)
Centaurea paniculata	Fitokemijska,i antioksidacijska aktivnost	Portugal	Barros et al. (2010)
Centaurea scabiosa	Antimikrobna i antioksidacijska aktivnost	Irska	Kenny et al. (2014)
Chicorium intybus	Antioksidacijska aktivnost	Poljska	Rozpadek et al. (2014)
Cirisium arvense	Antimikrobna i antioksidacijska aktivnost	Irska	Kenny et al. (2014)
Cirisium palustre	Antimikrobna i antioksidacijska aktivnost	Irska	Kenny et al. (2014)
Cirisium vulgare	Antimikrobna i antioksidacijska aktivnost	Irska	Kenny et al. (2014)
Echinacea purpurea	Antimikrobno svojstvo	Portugal	Martins et al. (2015)
Eriocephalus spp.	Enzimska inhibicija; antioksidacijska aktivnost	Južna Afrika	Njenga and Viljoen (2006)
Helichrysum spp.	Antimikrobna i antioksidacijska aktivnost	Turska	Albayrak et al. (2010)
Helichrysum stoechas	Fitokemijska,i antioksidacijska aktivnost	Portugal	Barros et al. (2010)
Inula crithmoides	Antioksidacijska, antiklastogena i antimutagena aktivnost	Egipat	Abdel-Wahhab et al. (2008)
	Antimikrobna i antioksidacijska aktivnost	Tunis	Jallali et al. (2014)
	Herbicidna aktivnost	Tunis	Omezzine et al. (2011)
Lychnophora passerina	Sadržaj fenola; antioksidacijska aktivnost	Brazil	Chicaro et al. (2004)
Matricaria recutita	Fitokemijska,i antioksidacijska aktivnost	Portugal	Barros et al. (2010)
	Neuroprotektivna aktivnost	Indija	Chandrashekhar et al. (2010)
	Antialergijska aktivnost	Indija	Chandrashekhar et al. (2011)
	Fitokemijska, antioksidacijska i citotoksična aktivnost	Portugal	Guimarães et al. (2013)
	Antimikrobna aktivnost	Iran	Jamalian et al. (2012)
	Nekoliko bioloških aktivnost	Nekoliko država	McKay and Blumberg (2006)
	Antioksidacijska aktivnost	Portugal	Martins et al. (2015)
	Antidijaretska i antioksidacijska aktivnost	Tunis	Sebai et al. (2014)
Mikania cordifolia	Analgetski potencijal; antioksidacijska aktivnost	Bangladeš	Dewan et al. (2013)
Otanthus maritimus	Antimikrobna i citotoksična aktivnost	Portugal	Cabral et al. (2013)
	Repelent protiv insekata	Grčka	Tsoukatou et al. (2000)
Parthenius hysterophorus	Citotoksična aktivnost	Indija	Das et al. (2007)
	Antioksidacijska aktivnost	Indija	Krishnaveni (2013)
	Antioksidacijska aktivnost	Indija	Kumar et al. (2013)
	Antibakterijska, antioksidacijska i citotoksična aktivnost	Indija	Kumar et al. (2014)
	Antifungalna aktivnost	Indija	Rajiv et al. (2013)
	Antioksidacijska aktivnost	Pakistan	UdDin et al. (2015)
Picris cyanocarpa	Sadržaj fenola; antioksidacijska aktivnost	Saudijska Arabija	Shahat et al. (2014)
Pulicaria crispa	Sadržaj fenola; antioksidacijska aktivnost	Saudijska Arabija	Shahat et al. (2014)
Rhantarium epapposum	Sadržaj fenola; antioksidacijska aktivnost	Saudijska Arabija	Shahat et al. (2014)
Sonchus asper	Antimikrobna i antioksidacijska aktivnost	Irska	Kenny et al. (2014)
Taraxacum officinale	Antimikrobna i antioksidacijska aktivnost	Irska	Kenny et al. (2014)
Taraxacum sect. Ruderalia	Sadržaj fenola; antioksidacijska aktivnost	Portugal	Dias et al. (2014)
Vernonia spp.	Medicinske svrhe	Nekoliko država	Toyang and Verpoorte (2013)

4.1. *Achillea millefolium* L.

Achillea millefolium L., poznatija kao stolisnik, je široko rasprostranjena biljka u planinskim livadama, putovima, poljima usjeva i kućnim vrtovima (Slika 9.). Njena infuzija i alkoholni ekstrakt se široko primjenjuju za liječenje probavnih tegoba, dijabetesa, jetreno žučnih bolesti i amenoreje, a također se koristi i zbog njenog antitumorskog, antimikrobnog, antiinflamatornog i antioksidativnog svojstva. Kada se konzumira u obliku dekokta uglavnom se koristi za probavne i crijevne bolesti, a kod vanjske uporabe se koristi za liječenje upale kože i sluznice.[59,60,61]

U nedavnom znanstvenom istraživanju,[62] divlji i komercijalni uzorci *A. millefolium* L. su kemijski karakterizirani prema njihovim makronutrijentima, šećerima, organskim kiselinama, masnim kiselinama i tokoferolima. Osim toga, *in vitro* antioksidativna svojstva (sposobnost vezanja slobodnih radikala, redukcijski potencijal i inhibicija lipidne peroksidacije) i antitumorski potencijal (na stanicama karcinoma dojke, pluća, grlića maternice, jetre) njegovih metanolnih ekstrakata, infuzija i dekokta su ocjenjeni u odnosu na njihov fenolni profil. U osnovi, komercijalni stolisnik pokazuje niže IC_{50} (koncentracija potrebna za 50%-tnu inhibiciju) vrijednosti (veća antioksidacijska aktivnost). Uzimajući u obzir tip ekstrakta, dekokti pokazuju najveću inhibiciju $DPPH^{\bullet}$ (0,25 ± 0,01 mg ml^{-1}), inhibiciju izbjeljivanja β-karotena (0,18 ± 0,03 mg ml^{-1}) i TBARS inhibiciju (0,04 ± 0,01 mg ml^{-1}), dok infuzija pokazuje najveću reducirajuću snagu (0,12 ± 0,01mg ml^{-1}).[62]

Glavne antioksidativne komponente pronađene u *A. millefolium* su flavonoidi, kao apigenin i kvarcetin, i fenolne kiseline (npr. kafeolikvinska kiselina), koji su poznati kao reducirajući agensi, donori vodika ili gasitelji singlet kisika. Fitokemijski profil *A. millefolium* pokazuje prisutnost organskih kiselina (uglavnom oksalne, kininske i limunske), masnih kiselina (sa linolenskom i palmitinskom kao glavnima) i tokoferola (posebno, γ-tokoferol).[60,62,63,64]



Slika 9: *Achillea millefolium L.*[65]

4.2. *Acmella oleraceae* Murr.

Acmella oleraceae Murr. (također poznata i kao Spilanthus acmella) je terapijski važna jednogodišnja ili kratkotrajno živuća medicinska biljka sa žutim, ne mirisnim cvjetovima (Slika 10.).[66] U narodnoj medicini se koristi kao anti-inflamatorni, antiseptički i anestetički lijek još od davne povijesti. U tradicionalnoj medicini, cvijeće se žvače za ublažavanje zubobolje i infekcije grla, te za paraliziranje jezika.[62,67]

Biološka svojstva *A. oleraceae* uglavnom ovise o N - alkilamidima, posebno o spilantolu, glavnom bioaktivnom spoju koji je pokazao značajnu biološku aktivnost poput antioksidacijskog, protuupalnog i diuretskog učinka, te se koristi za očuvanje oralnog zdravlja (tradicionalno se upotrebljava za liječenje zubobolja).[68] Ostale važne fitokemikalije u ovoj vrsti uključuju alkaloide, flavonoide, saponine, steroidne glikozide i tanine, koji su svi pronađeni u trima glavnim dijelovima biljke (list, stabiljka i cvijet). Sadržaj fenola je značajno veći u listovima i cvijetu, dok je niži sadržaj uočen u stabiljci (list: 7,59 ± 1,26; cvijet: 5,34 ± 0,75; stabiljka: 1,65 ± 0,35; rezultat je prikazan u mg eqGA g^{-1} suhe tvari). Ukupni antioksidativni kapacitet (TAC, u mg eq troloxa g^{-1} suhe tvari) je također različito zabilježen u listu (5,29 ± 0,85), stabiljci (3,42 ± 0,59) i cvijetu (1,42 ± 0,40). Objavljeni rezultati predstavljaju znanstvenu vrijednost potencijalne uporabe lišća i cvjetova u tradicionalnoj medicini.[66,69]



Slika 10: *Acmella oleraceae Murr.*[70]

4.3. *Artemisia absinthium* L.

Artemisia absinthium L., poznatija kao pelin, raste kao višegodišnja biljka s vlaknastim korijenjem na nekultiviranom, sušnom tlu ili stjenovitim padinama i na rubovima nogostupa i polja (Slika 11.). Biljka se može prepoznati po svom karakterističnom mirisu koji je čini prirodnom zaštitom od štetnika. Ovo svojstvo se koristi za sprječavanje rasta korova jer korijenje pelina izlučuje tvari koje inhibiraju rast okolnih biljaka, a ima i sposobnost odbijanja lavre kukaca. Obično se koristi kao sastojak žestokih pića i vina. *A. absinthium* se koristila u narodnoj medicini diljem Europe, Srednjeg Istoka, Sjevernoj Africi, i Aziji. Njen učinak na zdravlje uključuje antihelmintička, koleretička, antiseptička, balzamična, purgativna, digestivna, diuretička svojstva, te se koristila za ublažavanje menstrualnih tegoba.[71] Nedavno je nadzemnom dijelu *A. absinthium* dokazano djelovanje protiv zmijskog otrova, kao protuotrov, a ostale vrste roda Artemisia imaju antimalarična i antikancerogena djelovanja, između ostalih istaknutih bioloških učinaka.[71,72,73,74]

Osim testova za biološki potencijal, kod pelina su karakterizirane različite fitokemikalije.[75,76] U ekstraktu lišća su identificirani fenolni spojevi i utvrđeno je da je salicilna kiselina dominantna fenolna komponenta (≈14400,45 μg/g suhe tvari), slijede je miricetin (≈1086,55 μg/g suhe tvari), kava (≈80 μg/g suhe tvari), galna kiselina (≈64 μg/g suhe tvari) i ferulična kiselina (54 μg/g suhe tvari). Ostale detektirane komponente su kvercetin i kaempferol (flavonoli), ferulična kiselina i o-kumarinska kiselina (hidroksicinamična kiselina), galna kiselina, vanilinska kiselina, β-rezorcilna kiselina i protokatehna kiselina (hidroksibenzojeva kiselina). Stoga, sastav ukupnih fenolnih komponenti u ekstraktu može objasniti njihovo jako antioksidacijsko djelovanje, posebno u vodenom ekstraktu, što je dokazano metodama hvatanja DPPH• radikala, metodom određivanja redukcijskog potencijala i Folin- Ciocalteu testom.



Slika 11: *Artemisia* absinthium L.[77]

4.4. *Bidens pilosa* L.

Bidens pilosa, poznatija kao "dlakavi dvozub", je široko rasprostranjena u suptropskom i tropskom području i sadrži tipične žute cvjetove (Slika 12.). Biljka se upotrebljavala u narodnoj medicini zbog njenog antiinflamatornog, antiseptičkog, antihipoglikemičkog učinka, blagotvornog učinka na jetru i smanjenje krvnog tlaka. Široko se primjenjivala u tradicionalnoj medicini Tajvana, a također je bila glavni sastojak biljnih infuzija za koje se vjerovalo da služe u preventivi upalnih procesa i raka.[78,79]

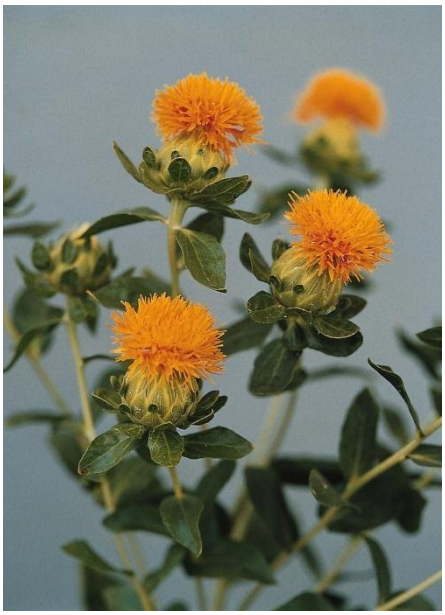
Glavne biološki aktivne komponente identificirane u *Bidens pilosa* koje pridonose antioksidacijskom djelovanju su fenilpropanoid glukozidi, poliacetileni, diterpeni, flavonoidi i flavonski glikozidi. Osim toga, 44 komponente, uključujući glavni terpen β-kariofilen (10,9 % u lišću i 5,1 % u cvijetu) i τ-kadinen (7,82 % u lišću i 6,13% u cvijetu) su identificirane u žućkasto obojenom eteričnom ulju dobivenom iz svježih listova i cvjetova.[2] To eterično ulje ima sposobnost redukcije stabilnog DPPH$^{\bullet}$ radikala u odgovarajući difenilpikrilhidrazin sa IC_{50} vrijednosti od 57 i 50 μg/ml, izvodi se zaključak da cvjetovi *B. pilosa* imaju antioksidacijski učinak koji je sličan onom kod sintetskih antioksidansa.[80]



Slika 12: *Bidens pilosa L.*[81]

4.5. *Carthamus tinctorius* L.

Carthamus tinctorius L., poznatija kao šafranika, posebno raste na jugu Portugalu gdje se lišće koristi kao bojilo za primjenu u prehrani i industriji boja, dok se sjemenke koriste kod proizvodnje sira (Slika 13.). *C. tinctorius* je dosta ispitivana na biološki potencijal s obzirom na medicinski značaj. Ona ima i široku primjenu u tradicionalnoj kineskoj medicini. U osnovi, šafranike su se koristile u Koreji za liječenje osteoporoze i reume. Ova svojstva imaju i derivati serotonina, koji su identificirani kao glavni fenolni sastojci odmašćenih sjemenki šafranike. Ti sastojci su poznati po njihovoj antioksidacijskoj aktivnosti i biološkom efektu održivosti lipidnog statusa plazme i jetre, te učinka na rast tumorskih stanica ili fibroblasta, te staničnu proizvodnju citokina ili melanina.[82,83] Među identificiranim derivatima, serotoninski alkaloidi (npr., N-feruloilserotonin i N-p-kumaroilserotonin) su potencijalni inhibitori melaninske proizvodnje, sugerirajući njihovu potencijalnu upotrebu kao inhibitora melanogeneze. Ostale fenolne komponente uključuju kvinohalkone koji su odgovorni za žutu i crvenu pigmentiranost biljaka i različiti flavonoidni glikozidi, koji se povezuju sa antioksidacijskim djelovanjem. Kvinohalkoni i flavonoidi, su glavni antioksidansi prisutni u cvijetu C. tinctorius (vodeni ekstrakt) su testirani u nekoliko istraživanja na sposobnost hvatanja ROS ($O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$, $^1O_2$) i $DPPH^{\bullet}$.[84]



Slika 13: *Carthamus tinctorius L.*[85]

4.6. *Inula crithmoides* L.

Rod *Inula* uključuje više od 100 vrsta, koje se uglavnom nalaze u Europi, Africi i Aziji (Slika 14.). Na nekim mjestima *I. crithmoides* je važan sastojak ljudske prehrane. Mladi listovi se jedu sirovi ili kuhani, a svježi listovi i mladice se kisele i koriste kao salata. Grančice *Inula* vrsta, prema navodima iz literature, se koriste u tradicionalnoj medicini u tretmanu bronhitisa, tuberkuloze, anemije, malarije, bolesti urinarnog trakta, a isto tako i kao adstringent.[86,87]

Opisana biološka aktivnost može biti povezana s visokim udjelom fenolnih komponenti, karakterističnih za biljke porodice Asteraceae, kao one identificirane u acetonskim ekstraktima *I. crithmoides*. Što se tiče antioksidacijskog djelovanja, ova vrsta pokazuje visoki potencijal kao hvatač $DPPH^{\bullet}$ radikala (IC_{50} = 12,8 μg/ml) kao i reducirajući agens željeza (IC_{50} = 0,90 mg/ml kod FRAP analize).[88]



Slika 14: *Inula crithmoides L.*[89]

4.7. *Matricaria recutita* L.

Matricaria recutita L. je zeljasta biljka autohtona za Europu i Zapadnu Aziju (Slika 15.). Neki proizvodi od kamilice su komercijalno dostupni kao sapuni, deterdženti, mirisi, losioni, proizvodi za kosu, pekarski proizvodi, slastice, pića i infuzije. Konzumacija kamiličine infuzije se procjenjuje na više od jednog milijuna šalica dnevno.[90,91]

Glavni farmakološki učinci se pripisuju biološki aktivnim komponentama koje uključuju seskviterpene i fenolne spojeve. Seskviterpenske komponente (kao α-bisabolol, bisabolol-oksidi A i B, kamazulen i farnesen) i fenolne komponente (apigenin, kvarcetin, pataleutin i luteolin, te njihovi glukozidi), te kumatini (herniarin i umbeliferon), smatraju se glavnim bioaktivnim komponentama kamilice. Seskviterpenske komponente susveprisutne u eteričnim uljima biljaka i plodova, a odgovorne su za brojne arome.[91,92,93,96,97]

M. recutiti L. se u navedenoj literaturi pripisuju biološki učinci kao antimikrobni, antioksidans, antimalarik, antimutagenik, te antitrombocitni, antikancerogeni, antiinflamatorni, antigenotoksični, antispazmolitički i sedativni učinak, a koristi se i kao hipokolesterolemik. Nadalje, koristi se kod nadutosti, mučnina, nemira, gastrointestinalnih poremećaja povezanim sa živčanom razdražljivosti, hemoroida, mastitisa, čireva, bubrežnih kolika, zatvora, protiv parazita, želučanih tegoba i bolesti kože. Eterično ulje kamilice pokazuje protuupalna i antimikrobna svojstva te djelovanje na čir.[91,93,96] Antioksidativna aktivnost *M. recutita* se testirala različitim istraživanjima, bilo cijeli ekstrakt, ili pojedine komponente kao što su kamazulen, nerolidol i α-bisabolol, na sposobnost vezanja $DPPH^{\bullet}$ radikala i inhibicije formiranja TBARS.[96,97]



Slika 15: *Matricaria recutita L.*[98]

4.8. *Otanthus maritimus* L.

Otanthus maritimus L. je jedina vrsta roda Otanthus (Slika 16.). Ova vrsta živi na pomorskom pijesku duž obale južne i zapadne Europe, prema sjeveru do jugoistočne

Irske. *O. maritimus* se upotrebljava u tradicionalnoj medicini, posebice za liječenje zubobolje, astmatičnog bronhitisa, dizenterije i upale mjehura.[11,99]

Različitim istraživanjima su identificirane komponente iz nadzemnog dijela biljke: flavonoidi, seskviterpenski laktoni, monoterpeni, lignani i amidi. Korijen sadrži amide masnih kiselina, derivate acetilena i seskviterpene. Preko 30 komponenti je identificirano u eteričnim uljima, s naglaskom na krizantenon (40,4 - 57,2 %), filifolon (12,2 - 15.5 %), cis-krizantenil-acetat (10,1 - 11,2 %) i α-pinen (6,7 - 7,2 %) sa antifungalnim i antiinflamatornim učinkom. Krizantenon, glavna komponenta *O. maritimus* eteričnog ulja, je rijedak biciklički monoterpenski keton sa blago uljno cvjetnom aromom prikladnom za industriju aroma, te je jedino pronađen kod pripadnika porodice Asteraceae.[11,100,101]



Slika 16: *Otanthus maritimus L.*[102]

4.9. *Parthenium hysterophorus* L.

Parthenium hysterophorus, također poznat kao kongresivna trava, je invazivni korov jako rasprostranjen u Indiji, no može se pronaći diljem svijeta (Slika 17.). Svi dijelovi biljke se koriste, prema literaturi, u tradicionalnoj medicini kao gorak tonik, sredstvo protiv groznice, za menstrualne tegobe, antidizenterik i za liječenje mnogih infekcija i degenerativnih bolesti.[103,104]

Nedavna istraživanja su identificirala i kvantificirala glavne bioaktivne komponente prisutne u ekstraktu cvjetova i korijenja *P. hysterophorus*: flavonoide, terpenoide, alkaloide i srčane glikozide. Ukupni sadržaj fenola je također određen u navedenim ekstraktima, te pokazuje visoki kapacitet vezanja $HO^{\bullet}$ i sposobnost za zaštitu

lipidne membrane od peroksidacije. Nadalje, *P. hysterophorus* je značajna zbog njenog potencijala za neutralizaciju slobodnih radikala induciranih oksidativnim oštećenjima, antibakterijske aktivnosti i citotoksičnog potencijala.[103]



Slika 17: *Parthenium hysterophorus L.*[105]

5. ZAKLJUČAK

Porodica Asteraceae je rasprostranjena diljem svijeta. Poslijednjih godina, znanstvena udruženja, prehrambena, farmaceutska i kozmetička industrija su pokazale sve veći interes za istraživanje i primjenu biljnih ekstrakta, u razvoju novih i poboljšanih funkcionalnih, preventivnih ili kurativnih proizvoda, posebice onih u tretmanima specifičnih bolesti. Zajednički temeljni princip tih bolesti je proizvodnja reaktivnih vrsta u ljudskom tijelu, što je izravno ili neizravno povezano s kardiovaskularnim i neurodegenerativnim bolestima, rakom, starenjem, problemima s očima. Biološki aktivni spojevi iz biljaka, kao i onih porodice Asteraceae, te njihova primjena u tradicionalnoj medicini, potiču istraživanja bioloških učinaka ovih biljnih vrsta.

Iako je velik broj vrsta porodice Asteraceae istražen za različita svojstva, velik broj vrsta još je slabo istražen. Daljnjim istraživanjima doprinijelo bi se poboljšanju znanja o primjeni ekstrakta ovih vrsta u medicini, farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji.

6. LITERATURA

1. Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R., *Food Chem. Toxicol*. **51** (2013) 15–25
2. Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R., *Food Bioprod. Process* **89 (**2011) 217–233
3. Dasari, S., Wudayagiri, R., Valluru, L., *Free Rad. Antiox*. **3** (2013) 87–92
4. Jayasena, T., Poljak, A., Smythe, G., Braidy, N., Münch, G., Sachdev, P., *Ageing Res. Rev*. **12** (2013) 867–883
5. Ravishankar, D., Rajora, A.K., Greco, F., Osborn, H.M.I., *Int. J. Biochem. Cell Biol*. **45** (2013) 2821–2831
6. Duracková, Z., *Physiol. Res.* **59** (2010) 459–469
7. Benfeito, S., Oliveira, C., Soares, P., Fernandes, C., Silva, T., Teixeira, J., Borges, F., *Mitochondrion* **13 (**2013) 427–435
8. Berger, R.G., Lunkenbein, S., Ströhle, A., Hahn, A., *Cr. Rev. Food Sci.* **52** (2012) 162–171
9. Bouayed, J., Bohn, T., *Oxid. Med. Cell Longev.* **3** (2010) 228–237
10. Bagh, M.B., Thakurta, I.G., Biswas, M., Behera, P., Chakrabarti, S., *Biogerontology* **12** (2011) 119–131
11. Cabral, C., Cavaleiro, C., Gonc¸ alves, M.J., Cruz, M.T., Lopes, M.C., Salgueiro, L., *Ind. Crop Prod*. **43** (2013) 484–489
12. Kenny, O., Smyth, T.J., Walsh, D., Kelleher, C.T., Hewage, C.M., Brunton, N.P., *Food Chem.* **161** (2014) 79–86
13. Niki, E., *Free Radical Biol. Med*. **49** (2010) 503–515
14. Alam, M.N., Bristi, N.J., Rafiquzzaman, M., *Saudi Pharm. J*. **21** (2013) 143–152
15. Panda, S.K., 2012. *InTech*
16. URL: http://www.intechopen.com/books/ophthalmology-current-clinical-and-research-updates/application-of-electron-paramagnetic-resonance-spectroscopy-in-ophthalmology (5.09.2016)
17. URL:http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/10102946001?lang=en&region=US (5.09.2016.)
18. Chetan, J., Kumara, K.K.S., Sekhar, S., Prakash, H.S., *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **4** (2012) 257–261
19. Moon, J.K., Shibamoto, T., *J. Agric. Food. Chem*. **57** (2009) 1655–1666
20. Sharma, O.P., Bhat, T.K., *Food Chem*. **113** (2009) 1202–1205
21. Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L., *Physiol. Rev*. **87** (2007) 315–424
22. Giles, G.I., Tasker, K.M., Jacob, C., *Free Radical Biol. Med.* **31** (2001) 1279–1283
23. Magalhães, L.M., Marcela, A.S., Reis, S., Lima, J.L.F.C., *Anal. Chim. Acta* **613** (1) (2008) 1–19
24. Meyer, A.S., Isaksen, A., *Trends Food Sci. Technol.* **6** (1995) 300–304
25. Robak, J., Gryglewski, R.J., *Biochem. Pharmacol.* **37** (1988) 837–841
26. Kunchandy, E., Rao, M.N.A., *Int. J. Pharm*. **58** (1990) 237–240
27. Ruch, R.J., Cheng, S.J., Klaunig, J.E., *Carcinogenesis* **10** (1989) 1003–1008
28. Koshland Jr., D.E., *Science* **258** (1992) 1861
29. Dasgupta, N., De, B., *Food Chem*. **101** (2007) 471–474
30. Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K., *Analyst* **127** (2002) 183–198
31. Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., *J. Agr. Food. Chem*. **53** (2005) 1841–1856
32. Benzie, I.F.F., Strain, J.J., *Methods Enzymol*. **299** (1999) 15–27.B

33. Apak, R., Güclü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., *J.Agric. Food. Chem.* **52** (2004) 7970–7981
34. Güngör, N., Özyürek, M., Güc¸ lü, K., C¸ ekic, S.D., Apak, R., *Talanta* **83** (2011) 1650–1658
35. Blair, I.A., *J. Biol. Chem.* **283** (2008.) 15545–15549
36. Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, S., *Food Anal. Method* **2** (2009) 41–60
37. Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J.A., *Food Chem*. **84** (2004) 551–562
38. Burda, S., Oleszek, W., *J.Agric. Food Chem*. **49** (2001) 2774–2779
39. Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., *J. Agric.Food Chem*. **53** (2005) 4290–4302
40. URL:http://www.newdruginfo.com/pharmacopeia/usp28/v28230/usp28nf23s0_m8730.htm (5.09.2016)
41. Fernández, J., Perez-Alvarez, J.A., Fernández-Lopez, J.A., *Food Chem* **59** (1997) 345–353
42. Ng, T.B., Liu, F., Wang, Z., *Life Sci.* **66** (2000) 709–723
43. URL:http://www.mpbio.com/product.php?pid=02190284&country=53 (5.09.2016.)
44. Zhu, Q.Y., Holt, R.R., Lazarus, S.A., Orozco, T.J., Keen, C.L., *Exp. Biol. Med.* **227** (2002) 321–329
45. Bureau, A., Lahet, J.-J., Lenfant, F., Bouyer, F., Petitjean, M., Chaillot, B., Freysz, M., *Biomed.Pharmacother*. **59** (2005) 341–344
46. Dai, F., Miao, Q., Zhou, B., Yang, L., Liu, Z.-L., *Life Sci.* **78** (2006) 2488–2493.
47. López-Alarcón, C., Denicola, A., *Anal. Chim. Acta* **763** (2013) 1–10
48. Badarinath, A.V., Rao, K.M., Chetty, C.M.S., Ramkanth, S., Rajan, T.V.S., Gnanaprakash, K., *Int. J. Pharm. Tech. Res*. **2** (2010) 1276–1285
49. URL: http://www.jbc.org/content/274/24/16945/F5.expansion.html (5.09.2016.)
50. MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L., *J. Sci. FoodAgric.* **86** (2006) 2046–2056
51. Harborne, J.B., Williams, C.A., *Phytochemistry* **55** (2000) 481–504
52. Robards, K., Antolovich, M., *Areview. Anal.* **122** (1997) 11R–34R
53. Hernandez-Montes, E., Pollard, S.E., Vauzour, D., Jofre-Montseny, L., Rota, C.,Rimbach, G., Weinberg, P.D., Spencer, J.P.E., *Biochem. Bioph. Res. Co.* **346** (2006) 851–859
54. Milbury, P., Chen, C.-Y., Dolnikowski, G.G., Blumberg, J.B., *J. Agric. Food.Chem.* **54** (2006) 5027–5033
55. Denni, M., Mammen, D., *Food Chem.* **135** (2012) 1365–1368
56. Ordonez, A.A.L., Gomez, J.D., Vattuone, M.A., Isla, M.I., *Food Chem.* **97** (2006) 452–458
57. Frankel, E.N., Meyer, A.S., *J. Sci. Food Agric.* **80** (2000) 1925–1941
58. Phillipson, J.D., *Review.Phytochemistry* **68** (2007) 2960–2972
59. Baretta, I.P., Felizardo, R.A., Bimbato, V.F., Santos, M.G.J., Kassuya, C.A.L., Junior,A.G., Silva, C.R., Oliveira, S.M., Ferreira, J., Andreatini, R., *J.Ethnopharmacol.* **140** (2012) 46–54
60. Gharibi, S., Tabatabaei, B.E.S., Saeidi, G., Golic, S.A.H., Talebi, M., *Ind. Crop. Prod.* **50** (2013) 154–158
61. Potrich, F.B., Allemand, A., Silva, L.M., Santos, A.C., Baggio, C.H., Freitas, C.S.,Mendes, D.A.G.B., Andre, E., Werner, M.F.P., Marques, M.C.A., *J. Ethnopharmacol.* **130** (2010) 85–92

62. Dias, M.I., Barros, L., Due˜nas, M., Pereira, E., Carvalho, A.M., Alves, R.C., Oliveira,M.B.P.P., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., *Food Chem.* **141** (2013) 4152–4160
63. Benedek, B., Gjoncaj, N., Saukel, J., Kopp, B., *Chem. Biodivers.* **4** (2007) 849–857
64. Vitalini, S., Beretta, G., Iriti, M., Orsenigo, S., Basilico, N., Dall'Acqua, S., Iorizzi, M.,Fico, G., *Acta Biochim. Pol.* **58** (2011) 203–212
65. URL: http://michiganflora.net/species.aspx?id=207 (5.09.2016.)
66. Abeysiri, G.R.P.I., Dharmadasa, R.M., Abeysinghe, D.C., Samarasinghe, K., *Ind. Crops Prod.* **50** (2013) 852–856
67. Leng, T.C., Ping, N.S., Lim, B.P., Keng, C.L., *J.Med. Plant Res.* **5** (2011) 371–378
68. Boonen, J., Baert, B., Roche, N., Burvenich, C., Spiegeleer, B., *J. Ethnopharmacol.* **127** (2010) 77–84
69. Shanthi, P., Amudha, P., *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* **1** (2010) 308–314
70. URL: http://globalresearchonline.net/journalcontents/v25-1/26.pdf (5.09.2016.)
71. Canadanovic-Brunet, J.M., Djilas, S.M., Cetkovic, G.S., Tumbas, V.T., *J. Sci. Food Agric.* **85** (2005) 265–272
72. Nalbantsoy, A., Erel, S.B., Köksal, C., Göc men, B., Yıldız, M.Z., Yavasoglu, N.Ü.K., *Toxicon* **65** (2013) 34–40
73. Shafi, G., Hasan, T.N., Syed, N.A., Al-Hazzani, A.A., Alshatwi, A.A., Jyothi, A., Mun-shi, A., *Mol. Biol. Rep.* **39** (2012) 7373–7379
74. Sharopov, F.S., Sulaimonova, V.A., Setzer, W.N., *Rec. Nat. Prod.* **6** (2012) 127–134
75. Bailen, M., Julio, L.F., Diaz, C.E., Sanz, J., Martínez-Díaz, R.A., Cabrera, R., Burillo, J.,Gonzalez-Coloma, A., *Ind. Crops Prod*. **49** (2013) 102–107
76. Lee, Y.J., Thiruvengadam, M., Chung, I.M., Nagella, P., *Aust. J. Crop Sci.* **7** (2013) 1921–1926
77. URL:http://lijecenje-biljem.blogspot.hr/2012/10/pelin-artemisia-absinthium.html (5.09.2016.)
78. Dimo, T., Rakotonirina, S.V., Tan, P.V., Azay, J., Dongo, E., Cros, G., *J. Ethnopharmacol.* **83** (2002) 183–191
79. Yang, H.-L., Chen, S.-C., Chang, N.-W., Chang, J.-M., Lee, M.-L., Tsai, P.-C., Fu, H.-H.,Kao, W.-W., Chiang, H.-C., Wang, H.-H., Hseu, Y.-C., *Food Chem. Toxicol.* **44** (2006) 1513–1521
80. Deba, F., Xuan, T.D., Yasuda, M., Tawata, S., *Food Control* **19** (2008) 346–352
81. URL: https://www.flickr.com/photos/garcia_m_s/5640823565 (5.09.2016.)
82. Bae, S.-J., Shim, S.-M., Park, Y.-J., Lee, J.-Y., Chang, E.-J., Choi, S.-W., *Food Sci. Biotechnol.* **11** (2002) 140–146
83. Cho, S.-H., Lee, H.-R., Kim, T.-B., Choi, S.-W., Lee, W.-J., Choi, Y., *J. Nutr. Sci.Vitaminol.* **50** (2004) 32–37
84. Zhou, X., Tang, L., Xu, Y., Zhou, G., Wang, Z., *J. Ethnopharmacol.* **151** (2014) 27–43
85. URL:http://www.mullerseeds.com/carthamus-tinct-orange-grenade.html- (5.09.2016.)
86. Abdel-Wahhab, M.A., Abdel-Azim, S.H., El-Nekeety, A.A., *Toxicon* **52** (2008) 566–573
87. Fontana, G., Bruno, M., Senatore, F., Formisano, C., *Nat. Prod. Res.* **28** (2014) 984–993

88. Jallali, I., Zaouali, Y., Missaoui, I., Smeoui, A., Abdelly, C., Ksouri, R., *FoodChem* **145** (2014) 1031–1038
89. URL: http://www.alamy.com/stock-photo/inula-crithmoides.html (5.09.2016.)
90. Maschi, O., Cero, E.D., Galli, G.V., Caruso, D., Bosisio, E., Dell'Agli, M., *J. Agr. Food. Chem.* **56** (2008) 5015–5020
91. McKay, D.L., Blumberg, J.B., *Phytother. Res.* **20** (2006) 519–530
92. Barros, L., Oliveira, S., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R., *Ind. Crops Prod.* **32** (2010) 572–579
93. Guimarães, R., Barros, L., Due˜nas, M., Calhelha, R.C., Carvalho, A.M., Santos-Buelga,C., Queiroz, M.J.R.P., Ferreira, I.C.F.R., *Food Chem.* **136** (2013) 718–725
94. Salamon, I., *Acta Hortic.* **749** (2007) 45–64
95. Srivastava, J.K., Shankar, E., Gupta, S., *Mol. Med. Rep.* **3** (2010) 895–901
96. Petronilho, S., Maraschin, M., Coimbra, M.A., Rocha, S.M., *Ind. Crops Prod.* **40** (2012) 1–12
97. Roby, M.H.H., Sarhan, M.A., Selim, K.A.H., Khalel, I.K., *Ind. Crops Prod.* **44** (2013) 437–445
98. URL: https://tryonfarm.org/share/node/318 (5.09.2016.)
99. Tsoukatou, M., Vagias, C., Harvala, C., Roussis, V., *J. Essent. Oil Res.* **12** (2000) 360–364
100. Muselli, A., Rossi, P.G., Desjobert, J.M., Bernardini, A.F., Berti, L., Costa, J., *Flavour Frag. J.* **22** (2007) 217–223
101. Ruiu, S., Anzani, N., Orrù, A., Floris, C., Caboni, P., Maccioni, E., Distinto, S., Alcaro, S.,Cottiglia, F., *Bioorgan. Med. Chem.* **21** (2013) 7074–7082
102. URL: http://picssr.com/tags/otanthus (5.09.2016.)
103. Kumar, S., Pandey, S., Pandey, A.K., *BioMed. Res. Int.* **10** (2014) 495154
104. Reddy, D.M., Qazi, N.A., Sawant, S.D., Bandey, A.H., Srinivas, J., Shankar, M., Singh, S.K., Verma, M., Chashoo, G., Saxena, A., Mondhe, D., Saxena, A.K., Sethi, V.K.,Taneja, S.C., Qazi, G.N., Kumar, H.M.S., *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 3210–3217
105. URL:http://www.indianaturewatch.net/displayimage.php?id=294119 (5.06.2016.)