

# Rod Veronica - izvor fenolnih spojeva, njihova biološka aktivnost i primjena

---

**Brčić, Anabela**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:593561>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-24**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno – matematički fakultet  
Odjel za biologiju

Anabela Brčić

**Rod *Veronica* – izvor fenolnih spojeva, njihova  
biološka aktivnost i primjena**

Završni rad

Split, rujan, 2024.



Ovaj rad izrađen je u Splitu 2024. godine u sklopu HrZZ projekta „Hrvatske vrste roda *Veronica*: fitotaksonomija i biološka aktivnost“ (CROVeS-PhyBA), pod mentorstvom prof. dr. sc. Valerije Dunkić i komentorstvom dr. sc. Ivane Vrca. Završni rad je predan na ocjenu Odjelu za biologiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnik biologije (univ. bacc. biol.).

## Izjava

Izjava kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam završni rad s naslovom „Rod *Veronica* – izvor fenolni spojeva, njihova biološka aktivnost i primjena“ izradila samostalno pod mentorstvom prof. dr. sc. Valerije Dunkić i komentorstvom dr. sc. Ivane Vrca. U radu sam primijenila metodologiju znanstvenog rada i koristila literaturu koja je navedena na kraju završnog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući navela u završnome radu na uobičajen, standardan način citirala i povezala fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.

Studentica Anabela Brčić

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Splitu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Odjel za biologiju

Ruđera Boškovića 33, 21 000 Split, Hrvatska

Završni rad

Rod *Veronica* – izvor fenolnih spojeva, njihova biološka aktivnost i primjena

**Sažetak:** Biljni rod *Veronica*, dio porodice Plantaginaceae, obuhvaća brojne vrste koje su poznate po visokom udjelu fenolnih spojeva, skupine specijaliziranih metabolita koje biljke akumuliraju kao odgovor na stres. Provode se brojne studije u kojima se ovi spojevi koncentriraju u obliku ekstrakata putem različitih ekstrakcijskih tehnika, pročišćavaju i determiniraju naprednim analitičkim metodama. Biološka aktivnost fenolnih spojeva proučavana je u različitim kontekstima, uključujući njihovu upotrebu u farmaciji, kozmetičkoj industriji i prirodnom konzerviranju u prehrambenim proizvodima. Fenolni spojevi roda *Veronica* imaju značajan potencijal u borbi protiv štetnih bakterija te u prevenciji oksidativnog stresa i upalnih procesa, čineći ih zanimljivim kandidatom za daljnje farmakološke i biotehnoške studije.

**Ključne riječi:** rod *Veronica*, fenolni spojevi, ekstrakcijske tehnike, analitičke metode, biološka aktivnost

**Rad sadrži:** 31 stranicu, 17 slika i 85 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

**Mentor:** prof. dr. sc. Valerija Dunkić

**Komentor:** dr. sc. Ivana Vrca

**Ocjenjivači:** prof. dr. sc. Valerija Dunkić

dr. sc. Ivana Vrca

dr. sc. Marija Nazlić

**Rad prihvaćen:** Rujan, 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Split  
Faculty of Science  
Department of Biology  
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

Bachelor thesis

Genus *Veronica* – source of phenolic compounds, their biological activity and application

**Summary:** The plant genus *Veronica*, part of the Plantaginaceae family, includes numerous species known for their high content of phenolic compounds, a group of specialized metabolites that plants accumulate in response to stress. Numerous studies are carried out in which these compounds are concentrated in the form of extracts through various extraction techniques, purified and determined by advanced analytical methods. The biological activity of phenolic compounds has been studied in various contexts, including their use in the pharmaceutical industry, cosmetic industry, and natural preservation in food products. Phenolic compounds of the genus *Veronica* have significant potential in the fight against harmful bacteria and in the prevention of oxidative stress and inflammatory processes, making them an interesting candidate for further pharmacological and biotechnological studies.

**Keywords:** genus *Veronica*, phenolic compounds, extraction techniques, analytical methods, biological activity

**Thesis consists of:** 31 pages, 17 pictures and 85 literature references. Original language: Croatian.

**Mentor:** prof. Valerija Dunkić, PhD

**Assistant supervisor:** Ivana Vrca, PhD. Senior assistant

**Reviewers:** Valerija Dunkić, PhD. Full professor

Ivana Vrca, PhD. Senior assistant

Marija Nazlić, PhD. Senior assistant

**Thesis accepted:** September, 2024.

# SADRŽAJ

1. Uvod .....	1
2. Opći dio .....	2
<b>2.1. Porodica <i>Plantaginaceae</i></b> .....	2
<b>2.1.1. Rod <i>Veronica</i></b> .....	4
<b>2.2. Specijalizirani metaboliti</b> .....	7
3. Fenolni spojevi, izolacija, kemijska analiza i biološka aktivnost .....	9
<b>3.1. Biosinteza fenolnih spojeva</b> .....	9
<b>3.2. Klasifikacija fenolnih spojeva</b> .....	10
3.2.1. Jednostavni fenolni spojevi .....	10
3.2.2. Polifenoli .....	12
3.2.3. Stilbeni .....	16
<b>3.3. Ekstrakcija fenolnih spojeva</b> .....	16
3.3.1. Pojedine metode ekstrakcije fenolnih spojeva .....	17
3.3.2. Tehnike uparavanja .....	19
<b>3.4. Analiza fenolnih spojeva</b> .....	19
3.4.1. UV/Vis spektrofotometrija i Folin – Ciocalteu test .....	20
3.4.2. Visokoučinkovita tekućinska kromatografija, HPLC .....	20
<b>3.5. Biološka aktivnost i primjena fenolnih spojeva</b> .....	21
3.5.1. Antioksidativno djelovanje .....	21
3.5.2. Kardioprotektivno djelovanje .....	23
3.5.3. Protuupalno djelovanje .....	23
3.5.4. Antibakterijsko djelovanje .....	24
3.5.5. Antikancerogena i citotoksična svojstva fenolnih spojeva .....	24
4. Zaključak .....	25
5. Literatura .....	26

## 1. Uvod

Početak industrijske revolucije, znanstvenici su stekli mogućnost analize aktivnih produkata biljaka, što je rezultiralo sintezi kemijskih varijanti izoliranih biljnih spojeva i stvaranju sintetskih lijekova. Unatoč tome, u posljednjih nekoliko desetljeća moderna farmacija i ljudski skepticizam prema „umjetnim“ lijekovima polako se razilaze zbog sve većeg interesa za uporabu ljekovitog bilja u svrhu polaganog „vraćanja prirodi“. Ljekovite biljke poznate su po svom značajnom utjecaju na ljudsko zdravlje, zahvaljujući farmakološki djelotvornim tvarima (Web 1). Kao sesilni kopneni organizmi, biljke su kroz prošlost bile najizložnije stresu, bilo biotičkom ili abiotičkom te su razvile niz prilagodbi potrebnih za opstanak i interakciju s okolinom. Jedna od njih proizvodnja je posebnih tvari koje nisu uključene u primarni metabolizam, ali se tumače kao proizvodi istog (Web 2). Sintaza specijaliziranih spojeva poput glikozida, lignina, alkaloida i flavonoida osigurala je biljkama potrebnu zaštitu i rasprostranjenost što opisuje činjenica da je carstvo *Plantae* dominantno na Zemlji. Prevladavajuća skupina specijaliziranih metabolita u biljnom tkivu su fenolni spojevi. Znanstvenike privlače upravo zbog utvrđenih bioloških aktivnosti, poput protuupalnih, antioksidativnih i antibakterijskih (1) te omogućuju daljnja istraživanja u borbi i protiv težih oblika bolesti kao što su tumori (2) i kardiovaskularne bolesti (3). Kako bi se fenolni spojevi proučavali, istraživači slijede točno razrađeni postupak ekstrakcijskih metoda pogodnih za određeni biljni materijal. Nakon ekstrakcije, slijedi identifikacija naprednim analitičkim tehnikama baziranim na preciznom određivanju prisutnosti i koncentracije ovih spojeva.

Za potrebe rada izabran je rod *Veronica*, čije su vrste bogate fenolnim spojevima, a poznate su po upotrebi u svim dijelovima svijeta, uključujući medicinske, fitofarmaceutske, prehrambene i dekorativne svrhe. Cilj ovog završnog rada bio je predočiti važnost ljekovitosti fenolnih tvari koje posjeduju vrste roda *Veronica*, upoznavajući čitatelja o taksonomiji i morfologiji ove skupine, specijaliziranim biljnim metabolitima sa naglaskom na fenolne spojeve, metodama izolacije i identifikacije fenolnih spojeva te njihovoj biološkoj aktivnosti i primjeni.



## 2. Opći dio

### 2.1. Porodica *Plantaginaceae*

Široko rasprostranjena porodica Plantaginaceae, hrv. "trpučevke", skupina je zeljastih trajnica i grmova s 6 potporodica, približno 100 rodova i 1900 vrsta (Web 3). Takva podjela tek je nedavno dogovorena zahvaljujući sekvenciranju genoma porodica i rodova za koje se dotad smatralo da su srodni i monofiletski. Jedna od takvih je porodica Scrophulariaceae za koju su znanstvenici promatrali uz genetičke još i morfološke karakteristike, poput estivacije vjenčića (4), izgleda prašnika (5) i nektarija (6), kako bi joj ograničili rodove. Tako su skupine *Antirrhinum* (zijevalica), *Digitalis* (naprstak), *Veronica* (čestoslavica), *Plantago* (trputac), *Hippuris* (borak), *Callitriche* (žabovlaka), *Penstemon* (janotine) i drugi svrstani u Plantaginaceae, a red Scropulariales sada je pod nazivom Lamiales (7). Neki su isključeni iz Plantaginaceae poput *Limosella* i svrstani u Schropulariaceae (8). Ova porodica biljaka pokazuje izuzetnu prilagodljivost na različite ekološke uvjete, što im omogućava široku rasprostranjenost i raznolikost staništa. Može ih se naći na mjestima od vodenih staništa do suhe stepe te od područja razine mora do visokih planinskih vrhova, na što se nadovezuje veliki raspon tradicionalnog liječenja ovom biljnom skupinom unutar kultura tih područja svijeta (Web 4). Plantaginaceae su rasprostranjene preko sjeverne hemisfere do australoazijske regije (Australija, Novi Zeland, Nova Gvineja). Međutim, ako se uključi skupina Hebe koju su joj pridružili znanstvenici na početku 21. stoljeća, brojnost se povećava s Novim Zelandom i središnjom Azijom ( Slika 1) (9).



**Slika 1.** Rasprostranjenost Plantaginaceae (zeleno - nativne vrste, ljubičasto - uvedene vrste, bijelo - na tom području nisu zabilježene takve vrste) (Web 5)

Morfološki gledano, pripadnici ove porodice su raznoliki. Stabljike su im okrugle ili rjeđe, četverobridne, a kod nekih vrsta, mogu biti krilate (Web 6). Obično su čvrste, dok kod određenih mogu biti šuplje, primjerice kod vrste *Russelia campechiana*. Cvijet raste u nizu u obliku klasova i grozdova (Slika 2) ili pojedinačno, a po simetriji može biti zigomorfan ili aktinomorfan.



**Slika 2.** Grozdasti cvat naprstka, *Digitalis sp.* (Web 7)

Najčešće je vjenčić cjevastog oblika kojeg čine dvije gornje i tri donje usne, ukupno pet obojenih latica, dok ih negdje ima po četiri, npr. kod *Veronica chamaedrys* (Slika 3). Četvero do peterodijelna čaška uz vjenčić štiti plodnicu uz dva do četiri fertilna prašnika.



**Slika 3.** *Veronica chamaedrys* (Web 8)

Proizvode plodove kapsule koji se mogu otvoriti na različite načine (*Antirrhunum*), tvrde orašaste plodove (*Littorella*) ili koštunice (*Hippuris sp.*) (Web 9). Listovi su jednostavni ili

složeni i često zavojito ili nasuprotno raspoređeni duž stabljike, oštri ili streličasti na bazi s dlanastim žilicama, a nekad linearni do lancetasti s perastim žilicama, cjelovitog ili nazubljenog ruba, goli ili žljezdano-dlakavi (Web 9).

### 2.1.1. Rod *Veronica*

Najveći rod u porodici Plantaginaceae je rod *Veronica*, a prema sistematskim istraživanjima opisano mu je 13 podrodova i 464 vrste (Web 5). Čine ih zeljaste jednogodišnje ili višegodišnje biljke. Naziv „*Veronica*“ odabrao je Carl Linne na temelju uobičajene upotrebe ovog imena u mnogim europskim jezicima za biljke u ovoj skupini, a ime je povezano sa čudima svete Veronike, grč. Berenica, koje se odnosi na „brz povratak zdravlja“, ozdravljenje – eng. speedwell, hrv. čestoslavica (10). Najpoznatije vrste su *Veronica officinalis*, *V. arvensis*, *V. becabunga*, *V. persica*, *V. spicata*, *V. urticifolia*, *V. jacquini* i *V. teucrium* uz mnoge druge te one koje još nisu istražene. Sve one autohtone su na različitim staništima, kao što su vlažne livade i travnjaci, stjenoviti obronci, sunčane livade i otvorene šume. Biljke iz roda *Veronica* imaju zanimljivu morfologiju. Stabljika je obično polegnuta, puzava i može biti obrasla dlačicama (Slika 4). Međutim, kod nekih vrsta, stabljika je uzdignuta i može doseći visinu do 40 centimetara, primjerice kod *V. chamaedrys*. Plitko korijenje pridonosi im sposobnosti uspijevanju u različitim uvjetima tla. Listovi su najčešće jajasti, smješteni nasuprotno na stabljici (11). Mogu biti cjelovitog ili pilastog ruba i ponekad skupljeni u rozetu pri dnu stabljike. Neki imaju dlačice. Cvjetovi veronika su mali i nježni, čini ih dvostruko ocvijeće, po četiri lapa i četiri latice bijele do svijetloplave ili blijedoljubičaste boje, a rastu iz pazušca listova. Skupljeni su u grozdaste ili klasaste cvatove, što omogućuje produljivanje oprašivanja. Plodnicu grade dva plodna lista međusobno srasla i nadrasla na cvjetištu, a dva prašnika su nasuprotna (Web 6). Simetrija cvijeta ovdje je zigomorfna te se sve navedeno može potkrijepiti cvjetnom formulom tipičnom za *Veronica sp.*,  $\uparrow K_{(4)}C_{(4)}A_{(2)}G_{(-2)}$ . Cvjetanje traje od svibnja do kolovoza (11).



**Slika 4.** Polegnuta stabljika *Veronica arvensis* (Web 10)

#### 2.1.1.2. Primjena nekih vrsta roda *Veronica*

Implementacija raznih dobrobiti kojima raspolažu biljke ovog roda poznate su u tradicionalnim medicinama širom svijeta. Različiti pripravci ovih vrsta ublažavali su svakodnevni život u povijesnim civilizacijama, uključujući infuze, dekokte, naljeve, tinkture i macerate. Tako su američki domorodci koristili vrste veronike oralno kao čajeve za iskašljavanje i ublažavanje bronhijalne kongestije povezane sa alergijama i astmom (Web 11). *Veronica sp.* koristila se u tradicionalnoj austrijskoj medicini kao čaj za liječenje poremećaja živčanog, respiratornog i kardiovaskularnog sustava te metaboličkih poremećaja (Web 11). U Republici Hrvatskoj poznato je oko tridesetak vrsta, a najljekovitija je *Veronica officinalis* (ljekovita čestoslavica), poznata po svojim adstrigentnim, stežućim svojstvima na kožnom tkivu i smanjenju upala (Web 12). Još se koristi kod plućnih tegoba. U kineskoj medicini, *Veronica peregrina* koristi se za liječenje hemoragije, čira na želucu, poremećaja upalnih procesa makrofazima i raznih infekcija (12). Danas su se imena vrsta *Veronica* pronašle i na listi sastojaka noćnih krema protiv bora, a tinkture se koriste oralno, po propisanoj dozi, primjerice kao pročišćivači krvi (Slika 5).



**Slika 5.** Tinktura od *Veronica officinalis* (Web 13) i pripravljeni koncentrat protiv bora (Web 14)

Osim u ljekovite i kozmetičke, pojedine se vrste iz ove skupine koriste u prehrambene svrhe i to stabljike i lišće koji su relativno sigurni (13). Tako *V. beccabunga* i *V. officinalis* imaju jestive mlade izdanke i listove (Slika 6) koji se mogu jesti sirovi u salatama ili kuhani. Ovi listovi sadrže značajne količine vitamina C i karotina (14).



**Slika 6.** Listovi *Veronica beccabunga* pogodni za salate (Web 15)



## 2.2. Specijalizirani metaboliti

Sekundarni ili specijalizirani metaboliti male su organske specije molekulske mase manje od 3 000 Da (15), često prisutni u samo jednoj biljnoj vrsti ili skupini taksonomski srodnih vrsta. Nastali preko spojeva primarnog metabolizma – ugljikohidrata, aminokiselina i lipida, neophodnih za život i razvoj stanica, specijalizirani metaboliti ne sudjeluju izravno u fotosintezi i metabolizmu disanja (16). Sadržaj takvih tvari u pojedinim organima, tkivima i stanicama različit je i mijenja se tijekom razvitka i starenja. Na koncentraciju ovih tvari utječe opskrbljenost hranjivim tvarima i razni okolišni uvjeti, ponajprije stres. Izgledni pokazatelj evolucije i njenih čimbenika, poput mutacija i međuvrskih odnosa jest sinteza pigmenta za bojenje organa koje potječu od antocijanina, koje privlače kukce. Biljke stvaraju signalne tvari za sintezu steroida od triterpena skvalena. Neki kukci metaboliziraju pojedine steroide iz epidermskih tkiva i na taj način osiguravaju hormone rasta i feromone (17). Oslobođanje aromatičnih mirisa može pomoći pri oprašivanju cvijeta, ali i obrnuto, obranu od predatora. S obzirom na različite biosintetske puteve kojima nastaju, dijele se na terpenene, tvari koje sadrže dušik i fenolne spojeve, a kao smjese ovakvih metabolita, najčešće nastaju eterična ulja, smole i razni drugi produkti (16).

Terpeni se nakupljaju na različitim mjestima izvan stanice kao što su žljezdaste dlake, smolni kanali i epidermski voskovi (16). Osnovnu strukturu čini izoprenska jedinica, a glavni put biosinteze je put mevalonske kiseline iz acetyl-CoA. Monoterpeneske derivate poput iridoidnih glikozida znanstvenici pronalaze u porodici Plantaginaceae (18). Imaju zaštitnu ulogu u biljci. Aukubin je najpoznatiji i najrasprostranjeniji od njih. Katalpol, epoksidni derivat aukubina, pokazuje protuupalno i antioksidativno djelovanje tako što povećava aktivnost superoksid dismutaze (SOD), enzima uključenog u obranu stanica od oksidativnog stresa (19). Tri estera katalpola i sedam estera aukubina i izolirana su iz *Veronice hookeri* (20).

Mnogi specijalizirani metaboliti koji posjeduju dušik u heterocikličkom prstenu ugljika npr. alkaloidi i cijanogeni glikozidi u većim količinama otrovni su za čovjeka, ali se u malim koncentracijama koriste u medicini. Većina ih se sintetizira iz aromatskih aminokiselina, tirozina i triptofana te alifatskih aminokiselina, lizina, ornitina i aspartata (16) preko puta mevalonske kiseline. Iako su malena skupina metabolita, alkaloidi čine 50% lijekova biljnog podrijetla, a prisutni su u analgeticima (morfin), antimalaricima (kinin), lokalni anestheticima (kokain), sredstvima za širenje zjenica (atropin) itd. Cijanogeni glikozidi bioaktivnih biljnih proizvoda karakteriziraju se kao  $\alpha$ -hidroksinitrili (cijanohidrini) koji su stabilizirani glukozilacijom što znači da nisu otrovni u izvornom obliku. Njihovom razgradnjom npr.

gnječenjem ili žvakanjem biljke, nastaju nepostojani hlapljivi otrovi poput cijanovodika i tako štete herbivoru, što opisuje cijanogenezu (21).

### 3. Fenolni spojevi, izolacija, kemijska analiza i biološka aktivnost

Kao što je već prije spomenuto, raznolika i najzastupljenija skupina specijaliziranih tvari u biljkama jesu fenolni spojevi. Uz široku paletu korisnih funkcija za biljku, kemijska svojstva poput kiselosti i stvaranja radikala izravno su povezana s njihovim važnim i ključnim biološkim aktivnostima poput antioksidativnih svojstava (22). Također je važno naglasiti da u procesu regulacije rasta biljaka djeluju kao kemijski glasnici ili unutarnji fiziološki regulatori (23). Najčešće ih se nalazi otopljene u vakuoli kao estere šećera kako ne bi bili u izravnom doticaju s biljnim metabolizmom (16).

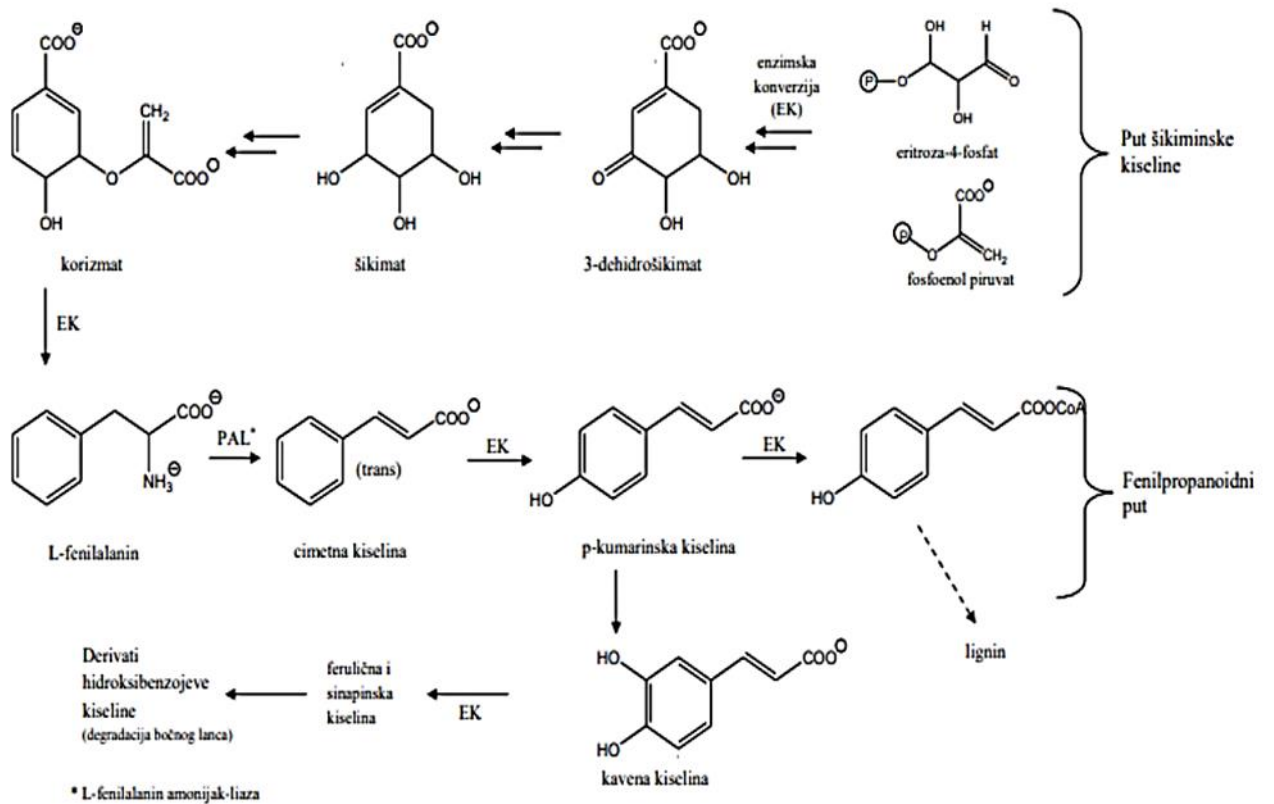
#### 3.1. Biosinteza fenolnih spojeva

Biosinteza fenolnih spojeva potaknuta je biotičkim i abiotičkim stresovima (npr. napadima biljojeda, patogenima, nepovoljnim temperaturama i pH vrijednostima), stresom slanom otopinom, izlaganjem ozonu, CO<sub>2</sub>, teškim metalima te UVB i UVA zračenjem (24). Dva opća biosintetska puta fenolnih spojeva su put šikiminske kiseline i put jabučne kiseline. Put jabučne kiseline kod sinteze fenola u biljkama nema veliki značaj, dok je kod carstava Eubacteria i Funghi neophodan (16). U viših biljaka, većina sekundarnih fenola nastaje najvećim dijelom iz fenilalanina, produkta puta šikiminske kiseline. U putu šikiminske kiseline, aromatske aminokiseline potrebne za dobivanje fenola, sintetiziraju se iz ugljikohidratnih prekursora iz ciklusa pentoza-fosfata i glikolize. Put započinje molekulom glukoze koja se razgrađuje preko dva metabolička puta koja nisu međusobno ovisna, a to su glikoliza i ciklus pentoza fosfata (22). Brojevima 1-6 opisani su koraci sinteze fenolnih spojeva:

1. Glikolizom nastaje fosfoenolpiruvat (PEP), a ciklusom pentoza – fosfata, D- eritroza-4- fosfat.
2. Aldolnom kondenzacijom nastalih metabolita i djelovanjem enzima 3-deoksi-D-arabinoheptulozamat- 7- fosfat (DAMP) – sintaze, nastaje DAMP i ortofosfat.
3. Na nastali DAMP djeluje 3-dehidrokinat-sintaza i NADP<sup>+</sup>, što daje 3-dehidrokinat i ortofosfat.
4. Dehidratacijom 3- dehidrokinata nastaje 3-dehidrošikimat i voda. Šikiminska kiselina nastaje redukcijom 3-dehidrošikimata pomoću NADPH i šikimat-dehidrogenaze.
5. Fosforilacija šikimata odvija se uz potrošnju ATP-a i djelovanjem kinaze te nastaje šikimat-3- fosfat. PEP u reakciji sa nastalim šikimat-3- fosfatom i enzimom 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat-sintazom (EPSP –sintazom) daje EPSP (25).



6. Posljednji korak je pretvorba EPSP u korizmat, nakon čega slijedi grananje na putu prema aromatskim aminokiselinama, posebno L-fenilalaninu (L-Phe) i L-tirozinu (L-Tyr) iz kojih pomoću enzima fenilalanin amonijske lijaze (PAL) nastaju od fenolne kiseline i njihovi derivati, kao što je prikazano na Slici 7.



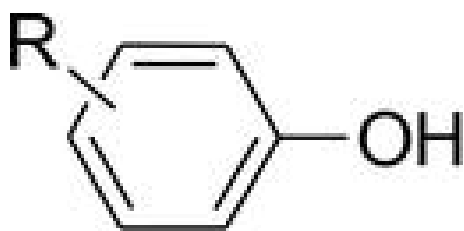
Slika 7. Biosinteza fenolnih spojeva (26)

### 3.2. Klasifikacija fenolnih spojeva

Po kemijskim karakteristikama, fenolni spojevi dijele se na jednostavne fenole, polifenole i stilbene.

#### 3.2.1. Jednostavni fenolni spojevi

Jednostavne fenolne spojeve (ili njihove derivate), čini benzenski prsten sa hidroksidnom (OH) skupinom prikazan na Slici 8.



**Slika 8.** Opći kostur fenolnih spojeva (Web 16)

Slovo „R“ označava organsku skupinu koja može biti u orto [1,2], meta [1,3] ili para [1,4], položajima aromatskog prstena. U jednostavne fenole prisutne u biljkama ubrajaju se (22):

a) Jednostavni fenolni spojevi koji mogu biti hidroksil- i dihidroksil- supstituirani fenoli. Primjeri hidroksifenola su katehol (1,2- dihidroksibenzen), resorcinol (1,3- dihidroksibenzen i hidrokinon (1,4- dihidroksibenzen). Dihidroksifenoli su trisupstituirani hidroksibenzeni kao što je pirogalol, hidroksikinol i floroglucinol.

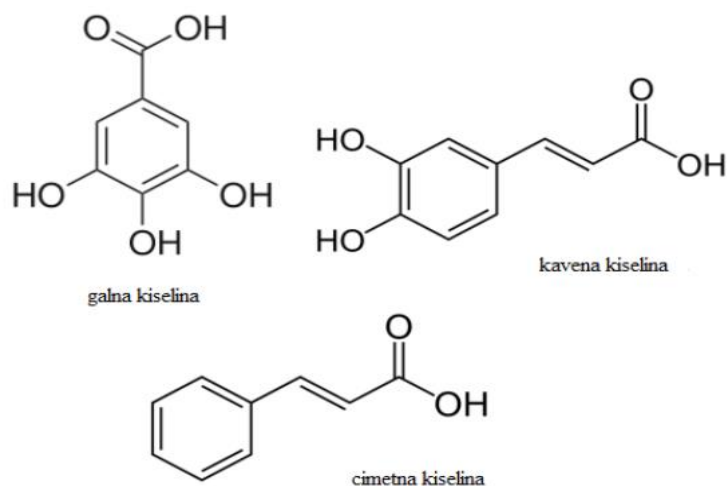
b) Fenolne kiseline sa karboksilnom (-COOH) skupinom kao glavna skupina fenolnih spojeva u biljaka, gdje su prisutne u slobodnom i vezanom obliku. Izvedene su iz nefenolnih molekula benzojeve i cimetine kiseline (27). Nomenklatura ovih specija ovisit će o mjestu vezanja COOH skupine u spoju. Ako je ta skupina vezana izravno na aromatski prsten tada govorimo o hidroksibenzojevim kiselinama, dok hidroksicimetine kiseline opisuje odvojenost fenolnog prstena i karboksilne skupine dvostrukom vezom dva ugljika (Slika 9).



**Slika 9.** Osnovna struktura hidroksibenzojeve kiseline i hidroksicimetine kiseline (22)

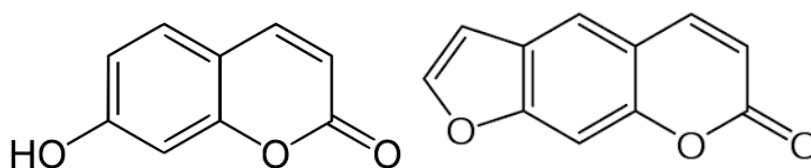
Derivati hidroksibenzenske kiseline su salicilna (o- hidroksibenzojeva kiselina), gentistična (2,5- dihidroksibenzojeva kiselina) i galna kiselina (trihidroksibenzojeva kiselina) (28), dok su derivati hidroksicimetine kiseline ferulinska, kumarična, kavena i sinapinska (29) (Slika 10).

Klorogenska kiselina ester je kavene i kininske kiseline, koji djeluje kao intermedijer u biosintezi lignina (30). Akumulacija ovih metabolita najčešće se događa posljedično nakon odgovora na stres u trenucima slabije osvjetljenosti i smrzavanja.



**Slika 10.** Primjeri fenolnih kiselina (Web 17)

c) fenilpropanski laktoni koji su ciklički esteri pod nazivom kumarini, a u prirodi se javljaju kao derivati kumarina i uključuju umbeliferon (7-hidroksikumarin) prikazan na Slici 11. sa antikancerogenim djelovanjem, furanokumarin, eskuletin (6,7-dihidroksikumarin), herniarin (7-metoksikumarin), psoralen i imperatorin (31).



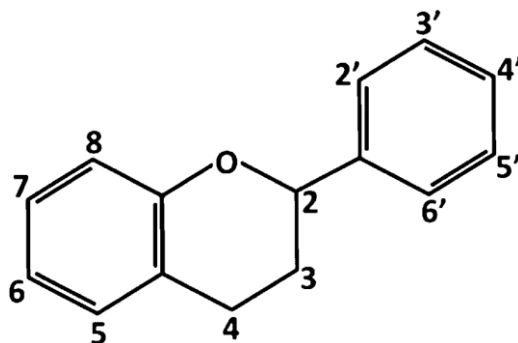
**Slika 11.** Kemijska struktura umbeliferona – lijevo (Web 18) i kumarina – desno (Web 19)

### 3.2.2. Polifenoli

#### 3.2.2.1. Flavonoidi

Flavonoidi su najvažniji biljni pigmenti za bojanje cvijeća po čemu su neophodni za privlačenje oprašivača i biološku raznolikost. Kod viših biljaka uključeni su u UV filtraciju i

simbiotsku fiksaciju dušika (npr. Fabaceae). Oni također mogu djelovati kao kemijski glasnici, fiziološki regulatori i inhibitori staničnog ciklusa, a odlikuju se nizom antioksidativnih bioloških učinaka za stanicu. Osnovni kostur flavonoida čini petnaest ugljikovih atoma raspoređenih u dva aromatska prstena povezana mostom od tri ugljikova atoma (Slika 12). Na kostur se mogu vezati brojni supstituenti poput hidroksilne skupine i šećera koji čine flavonoide topljivijim u vodi ili metil- eteri koje ih čine lipofilnijima (16).



**Slika 12.** Osnovna struktura svih flavonoida (Web 20 )

Flavonoidi se klasificiraju na osnovu stupnja oksidacije mosta od tri C- atoma – na flavone i flavonole i antocijanine.

#### 3.2.2.1.1. Flavoni i flavonoli

Flavoni i njegovi derivati flavonoli (3-hidroksiflavoni) su glavne skupine biljnih flavonoida (16). Nakupljaju se u cvjetovima kao pigmenti koji nisu vidljivi ljudskome oku, ali su vidljivi kukcima. U epidermi listova i stabljike štite biljke od UVB zračenja jer apsorbiraju u tom području spektra (280 – 315 nm), a propuštaju fotosintetski aktivne valne duljine. Flavonol kvercetin i flavon apigenin endogeni poznati su kao regulatori polarnog prijenosa auksina, hormona rasta biljnog tkiva (32). Uz njih, poznati su još flavoni luteolin i tangeritin, a flavonoli mircetin, galangin, ramnazin, kampeferol i drugi (33).

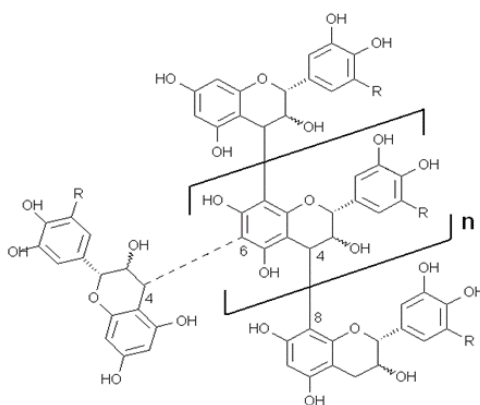
#### 3.2.2.1.2. Antocijanini

Polarni flavonoidi poznati kao antocijanini, odgovorni su za većinu crvenog, ružičastog i plavog pigmenta kod plodova i ocvijeća biljaka. Porast broja hidroksilnih grupa supstituiranih na prstenu, rezultira apsorpcijom većih valnih duljina i daje plavije tonove. Zamjena OH skupine metoksilnom skupinom uzrokuje apsorpciju kraćih valnih duljina i daje crvenu boju

latica. Nomenklaturno, broje šest skupina, cijanidin, pelargonidin, delfinidin, peonidin, petunidin i malvidin. To su glikozidi sa šećernom skupinom, dok su bez nje poznati kao antocijanidini (16).

### 3.2.2.2. Tanini

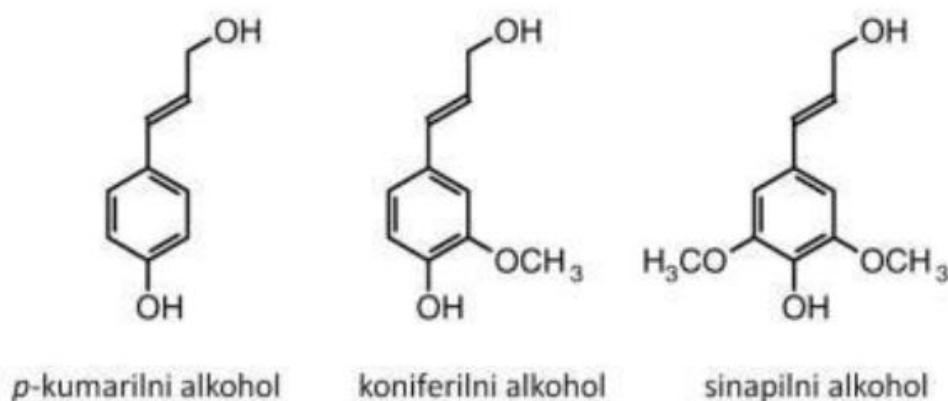
Prisutni u citosolu parenhimskih stanica biljnih organa, tanini ili trjeslovine su fenolni polimeri sa obrambenim svojstvima jer štite jedinku od insekata i ostalih predatora. Općenito, jednom konzumirani ponašaju se kao toksini koji reduciraju rast i preživljavanje herbivora. Obrambeni učinak pripisuje se tome što tanini vežu proteine u onoga koji jede biljku. Pretpostavlja se da djeluju na mnoge enzime i njihove katalitičke procese, međutim mnogi su se biljojedi prilagodili takvim tvarima, poput zečeva. Zahvaljujući proizvodnji proteina sa visokim sadržajem prolina, njihovi enzimi imaju visok afinitet za tanin. (16) Konzumacija plodova bogatih taninima, vezajući proteine sline, kod ljudi uzrokuje trpki, stežući osjećaj u ustima (npr. aronija). Na temelju kemijske građe, postoje dvije osnovne vrste tanina: kondenzirani tanini (katehinski) i tanini koji se mogu hidrolizirati (pirogalni). Kondenzirani tanini nastaju spajanjem flavonoidnih jedinica (Slika 13). Oni su polimeri flavan-3-ola, poput katehina i epikatehina (Web 21). Za razliku od hidrolizirajućih tanina, kondenzirani tanini se ne razgrađuju lako hidrolizom pa su to najzastupljeniji polifenoli, što potkrjepljuje činjenica da se nalaze u gotovo svim porodicama biljaka čineći 50% suhe težine lišća (34). Hidrolizirajući tanini su heterogeni polimeri sa fenolnim kiselinama. Manji su od kondenzirajućih i mogu se hidrolizirati već u razrijeđenim kiselinama. Većina tanina ima molekularnu masu između 600 i 3000 Da.



**Slika 13.** Kondenzirajući tanin (16)

### 3.2.2.3. Lignin

Sekundarna stijenka provodnih elemenata i stabljike sadrži više celuloze i manje pektina nego primarna, pa zbog toga veže manje vode i gušća je. U matriksu sekundarne stijenke odlaže se lignin, druga najobilnija organska tvar u biljkama. Lignin je visoko razgranati fenilpropanski polimer, ali precizna struktura nije poznata. Nastaje polimerizacijom triju fenilpropanskih alkohola – koniferila, kumarila i sinapila (Slika 14). Vrlo ga je teško ekstrahirati iz biljnog materijala, budući da je kovalentno vezan na celulozu i druge polisaharide stanične stijenke. Kod zeljastih trajnica, poput *Veronica sp.*, lignifikacija je ograničena samo na ksilemske elemente. Mehanička čvrstoća koju osigurava stabljici, omogućuje uspravan rast i provođenje vode i mineralnih tvari kroz ksilem pod negativnim tlakom. Osim toga, tvrdi dijelovi izdanka odvrću životinje zbog neprobavljivosti i tako lignin ima zaštitnu ulogu. Kao odgovor na oštećenja, lignifikacija sprječava rast patogena (16).



**Slika 14.** Tri fenilpropanska alkohola: kumaril, koniferil i sinapil (Web 22)

### 3.2.2.4. Lignani

Lignani su za razliku od polimerskih lignina manje molekule topljive u vodi. Identificiraju se iz različitih dijelova kao što su cvijeće, sjeme, lišće, korijenje, voće i drveni dijelovi, stvarajući različite funkcije za biljku. Prvenstveno djeluju kao obrambene tvari. (35) Lignanska tvar pinorezinol nakuplja se na oštećenom tkivu usred ranjavanja, dok malognol inhibira rast gljivica i bakterija (36).

### 3.2.3. Stilbeni

Nedavno je ova klasa spojeva privukla veliku pozornost zbog svog širokog raspona zdravstvenih učinaka kao što su protuupalna, antikarcinogena, antidijabetička i antidislipidemijska svojstva (37). Stilbene, ukratko, čine dvije fenolne jedinice povezane preko dvaju ugljika povezanih dvostrukom vezom, odnosno 1,2- difeniletlen. Reprezentativni spoj je resveratrol, koji pokazuje antioksidativne učinke u kardiovaskularnom sustavu (38).

Među najčešće izoliranim spojevima iz vrsta *Veronica* ističu se vanilinska kiselina, kavena kiselina, gentisinska kiselina, *p*- hidroksibenzojeva kiselina i apigenin (39).

### 3.3. Ekstrakcija fenolnih spojeva

Ranije je navedeno da su specijalizirani metaboliti u biljkama odraz evolucijskih promjena i prilagodbe na različite ekološke uvjete. Svaka biljna skupina posjeduje određene specijalizirane tvari koje ju predstavljaju, neke u većoj, a neke u manjoj mjeri (16). Konkretno, kod vrsta roda *Veronica* najzastupljeniji su fenolni spojevi, pa se govori o fenolnom profilu koji je karakterističan za svaku vrstu i poput „otiska prsta“ može pomoći pri determinaciji biljke. Sastav fenolnih spojeva određuje se kvalitativnom kemijskom analizom nakon ekstrakcije. Ekstrakcija je metoda odjeljivanja smjese tvari koje imaju različitu topljivost u različitim otapalima. Cilj same ekstrakcije je koncentriranje aktivnih tvari i odvajanje od onih koje su manje važne za ljekovito djelovanje. Za izolaciju bioaktivnih fenolnih spojeva iz biljnih materijala, prvi je korak (za postizanje optimalne koncentracije i stabilnosti tvari) odabir metode odgovarajuće selektivnosti (Web 23). Međutim, razlika u korištenju tradicionalnijih i naprednijih aparatura svakako se odražava na rezultatima (11). Metode ekstrakcije se dijele na klasične (konvencionalne) i napredne, a danas se koriste jedne i druge. Odabir tehnike ekstrakcije ovisi o različitim čimbenicima, uključujući ciljane koncentracije bioaktivnih spojeva od interesa, radne uvjete i stabilnost molekula, troškove proizvodnje, raspoloživu opremu i utjecaj na okoliš. Klasične tehnike ne zahtijevaju sofisticiranu aparaturu i koriste jednostavan pristup radu, međutim puno traju i koriste veliku količinu otapala i energije (40). To su najčešće maceracija, hidrodestilacija i Soxhlet ekstrakcija. Napredne pak omogućuju ekstrakciju tvari koje nije moguće izdvojiti preko klasičnih, neusporedivo su brže i efikasnije. Još se nazivaju zelenim metodama jer je smanjena potrošnja energije i otpada pretvaranjem u koproizvode i osiguravaju siguran i kvalitetan konačni proizvod (Web 23). Najčešće se koriste ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (Microwave Assisted Extraction – MAE), ekstrakcija

superkritičnim fluidom (Supercritic Fluid Extraction – SFE) i ultrazvučna ekstrakcija (Ultrasound Assisted Extraction – UAE). Pojedina tehnika prije same ekstrakcije zahtijeva obradu suhog ili svježeg biljnog materijala, bilo trganjem, usitnjavanjem ili mljevenjem kako bi se postigla što veća učinkovitost ekstrahiranja (39).

### 3.3.1. Pojedine metode ekstrakcije fenolnih spojeva

#### 3.3.1.1. Klasična metoda ekstrakcije

##### 3.3.1.1.1. Maceracija

Maceracija je jedna od najstarijih i najjednostavnijih ekstrakcijskih tehnika koja se provodi na sobnoj temperaturi. Prema prošlim istraživanjima, nakon prikupljanja, biljni materijal se stavlja sušiti, zaštićen od direktnog sunčevog svjetla nakon čega se osušen mlje u fini prah (39, Web 24) (Slika 15). Karakterizira ju postupak crpljenja fenolnih i drugih spojeva iz usitnjenog materijala otopljenom u prethodno pripremljenom otapalu, tijekom najčešće 72 sata uz miješanje (39). Dugo vrijeme ekstrakcije omogućuje lomljenje staničnih stijenki i prodiranje bioaktivnih tvari u otapalo. Za otapalo se najčešće koristi voda, akohol, otopina octa ili neki eter, ili smjesa tih tekućina. Nakon maceracije, dobiveni ekstrakt se filtrira za analizu. Ova relativno pristupačna i lako izvodljiva metoda dobra je za ekstrahiranje termolabilnih komponenti, međutim dugotrajna je i prinos ukupnih polifenola je nizak u usporedbi s naprednijim tehnikama poput UAE. Osim toga, otapalo koje se koristi u maceraciji ne utječe na proces ekstrakcije, dok kod ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, i vrijeme otapanja i ultrazvuk mogu utjecati na oksidativnu aktivnost ekstrakata (41).



**Slika 15.** Postupak maceracije (Web 25)



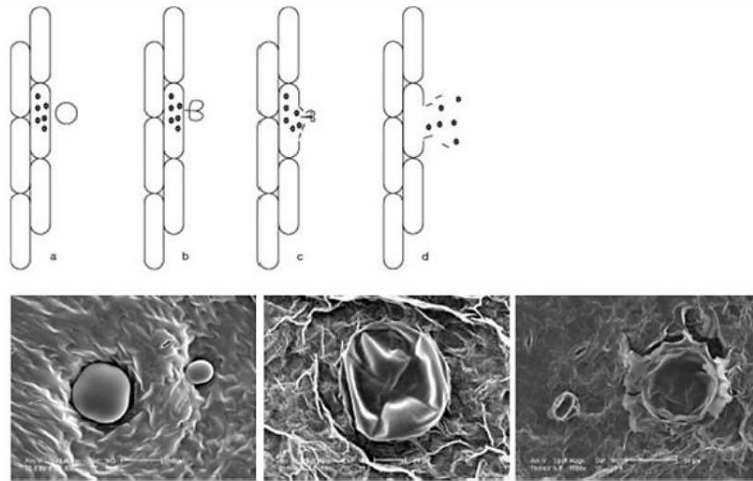
### 3.3.1.2. Napredne tehnike ekstrakcije

#### 3.3.1.2.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Još jedna visokoučinkovita metoda za izolaciju fenolnih kiselina i njihovih estera poput 3-kafeoilkininske i ferulinske kiseline, odlikuje se brzim djelovanjem, a znanstvenici su već dobro upoznati s njome. To je mikrovalna ekstrakcija koja koristi izravno zagrijavanje otapala zračenjem mikrovalova (frekvencija 300 MHz do 300 GHz) koji je u kontaktu sa čvrstim uzorkom. Pojačava se vibrantnost molekula analita, brži je prijenos mase te je povećana sposobnost prodiranja u pore matrice uzorka (29). Ovom metodom ekstrahirane su fenolne kiseline poput 3-kafeoilkininske, 5-kafeoilkininske, elaginske i ferulinske kiseline (42). Ključni fizikalni parametri važni za mikrovalnu ekstrakciju uključuju snagu mikrovalova, vrijeme trajanja ekstrakcije, topljivost, dielektrična konstanta i svojstva otapala (28).

#### 3.3.1.2.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, UAE

Ultrazvučna ekstrakcija poželjna je tehnika za izolaciju polifenolnih spojeva koja radi na mehanizmu ultrazvučne kavitacije. Ultrazvuk čine zvučni valovi čija je frekvencija veća od gornje granice osjetljivosti ljudskog uha (veća od 20 000 Hz). Konkretno, u ovoj ekstrakciji, tijekom prolaska ultrazvučnih valova kroz tekući medij, nastaju longitudinalni valovi pri čemu se stvaraju izmjenični ciklusi visokog i niskog tlaka. U tekućini se stvara negativan tlak zbog djelovanja ekspanzijskih vrtloga te nastaju mjehurići, proces poznat kao kavitacija, izazivajući pomicanje molekula s njihovih izvornih položaja (43). Pri uvjetima pozitivnog tlaka, narušavaju se kavitacijski mjehurići i stvaraju udarni valovi, a ubrzani međumolekulski kontakti uzrokuju fragmentaciju stanične strukture (Slika 16). Brza fragmentacija dovodi do otapanja bioaktivnih komponenti u otapalo zbog smanjenja veličina čestica, povećane površine i velike brzine prijenosa mase (44). Varijable povezane s UAE kao što su frekvencija, snaga, radni ciklus, temperatura, vrijeme, vrsta otapala, omjer tekuće - krutog materijala zahtijevaju preciznu kontrolu za optimalnu ekstrakciju (45).



**Slika 16.** Učinak kavitacije na površini čvrsto – tekuće (45)

### 3.3.2. Tehnike uparavanja

Nakon provedene ekstrakcije, dobiveni proizvod se ne može još analizirati zbog prisutnog otapala (polarnog ili nepolarnog), stoga ga je potrebno prethodno ukloniti. Za tu svrhu, u biotehnološkim i prehrambenim industrijama, koriste se najčešće liofilizator i rotacijski uparivač otapala/rotavapor.

## 3.4. Analiza fenolnih spojeva

Dobiveni ekstrakt podvrgava se različitim analitičkim metodama kako bi se pročistili i determinirali prisutni bioaktivni spojevi i njihove koncentracije (22). Nakon toga, mogu se koristiti kemijske metode za različita farmakološka i toksikološka ispitivanja ciljnih spojeva. Masena spektrometrija (MS), tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC), kalorimetrija, ultraljubičasta (UV), ultraljubičasto-vidljiva (UV/Vis) spektrofotometrija i druge spektrofotometrijske tehnike koriste se za identifikaciju i/ili kvantifikaciju pojedinih i ukupnih fenolnih spojeva što ovisi o različitim parametrima. Kemijska priroda spojeva, korištena metoda ekstrakcije, veličina čestica, odabir standarda te nečistoće u uzorku znatno utječu na izbor optimalne tehnike. Ukupni sadržaj fenola (TPC) u biljkama obično se mjeri spektrofotometrijskim tehnikama kao što je metoda Folin - Ciocalteu (22).

### 3.4.1. UV/Vis spektrofotometrija i Folin – Ciocalteu test

UV/Vis spektrometrija se koristi za određivanje koncentracija onih tvari koje apsorbiraju ultraljubičasto (UV) ili vidljivo (Vis) elektromagnetsko zračenje na valnim duljinama od 100–430 nm za UV te 430–800 nm za Vis. Općenito, sadržaj flavonoida (posebice antocijanina) često se mjeri UV spektrofotometrijom (22). Princip rada je jednostavan, brz i relativno jeftin. Metoda se temelji na propuštanju zrake svjetlosti kroz uzorak i mjerenju intenziteta svjetla koje je prošlo kroz uzorak te uspoređivanju tog intenziteta s onim od ulaznog svjetla. Funkcijski odnos apsorbancije uzorka i njegove koncentracije opisan je Beer-Lambertovim zakonom iz čega se matematički može izračunati množinska koncentracija uzorka (Web 26):

$$A = \log (I_0 / I) = \epsilon \times b \times c$$

gdje je A apsorbancija,  $I_0$  intenzitet ulaznog svjetla, I intenzitet svjetla propušten kroz uzorak,  $\epsilon$  molarni apsorpcijski koeficijent, c množinska koncentracija i b debljina kivete u kojoj je uzorak. Iako se spektrofotometrija najčešće primjenjuje na ultraljubičasto, vidljivo i infracrveno zračenje, moderni spektrofotometri mogu ispitivati druge dijelove elektromagnetskog spektra poput rendgenskog i mikrovalnog zračenja (Web 26).

Folin-Ciocalteu test se mnogo godina koristi za otkrivanje fenolnih spojeva u biljkama. Ovakva se tehnika temelji na kemijskoj redukciji fenolnih spojeva, a uključuje reagense koji sadrže volfram i molibden (28).

### 3.4.2. Visokoučinkovita tekućinska kromatografija, HPLC

HPLC glasi kao jedan od najvažnijih alata u modernim laboratorijima zbog svoje univerzalnosti i djelotvornosti. To je analitička tehnika koja se koristi za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju spojeva prisutnih u otopini. Bazirana je na principima klasične tekućinske kromatografije, ali bitna je razlika u korištenju visokog tlaka za ubrzavanje protoka otopine kroz kolonu (Web 27). Osnovne komponente HPLC sustava su: mobilna faza - otopina koja prenosi uzorak kroz kolonu (najčešće organsko otapalo ili voda), stacionarna faza – polarni ili nepolarni adsorbens za razdvajanje komponenti smjese, kolona, pumpa, injektor uzorka i detektor koji mjeri koncentraciju razdvojenih spojeva nakon izlaska iz kolone. Najčešći detektori koji se kombiniraju sa HPLC su UV/Vis detektori i maseni spektrometri. Ova metoda funkcionira na principu selektivnog razdvajanja molekula u smjesi, koji se temelji na njihovoj

različitoj interakciji sa stacionarnom i mobilnom fazom. Pumpa osigurava kontinuiran i stabilan protok mobilne faze kroz kolonu pod visokim tlakom, obično između 50 i 1400 bara (Web 28). Komponente smjese razdvajaju se ovisno o njihovim fizikalno – kemijskim svojstvima, poput polarosti, molekulske mase i topljivosti. Na ovaj način, izoliraju se fenolni spojevi - antocijani, hidrolizabilni tanini, fenolne kiseline (vanilinska, kavena, ferulinska i *p*- kumarinska kiselina) te flavon kvercetin. Najčešće korištena HPLC tehnika jest HPLC „obrnutih faza“, gdje je stacionarna faza nepolarna (C – 18), dok je mobilna faza polarno otapalo (voda, metanol, acetonitril). Unatoč manjkavostima koje se mogu prikazati kao skupocjena oprema i potreba za visokokvalificiranim osobljem, HPLC nudi mogućnost brze analize širokog raspona spojeva te kvantifikacije vrlo malih količina uzoraka, za npr. razvoj i ispitivanje potencijalnih lijekova (28).

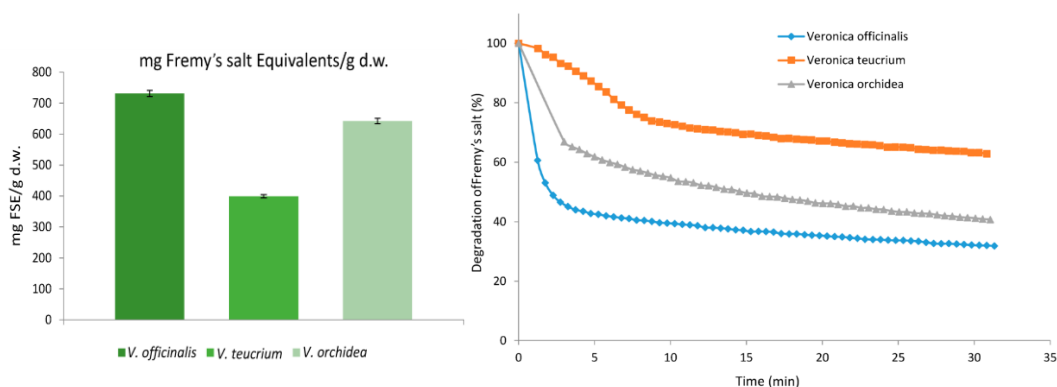
### **3.5. Biološka aktivnost i primjena fenolnih spojeva**

Učinci koje neka tvar, spoj ili molekula ima na živi organizam definira se kao biološka aktivnost. To može uključivati interakcije na različitim biološkim razinama, kao što su stanična membrana, receptori, enzimi ili čak genetski materijal. Kao što je već navedeno, fenolni spojevi predstavljaju veliku skupinu specijaliziranih metabolita s različitim biološkim djelovanjima. Njihova složena struktura i široka rasprostranjenost u biljkama čine ih važnima za ljudsku prehranu i zdravlje (28). Biološka aktivnost fenolnih spojeva obično ima pozitivne, terapijske učinke na organizam, međutim postoje različite indikacije koje se mogu dogoditi uslijed intoksikacije spojevima koji su se našli u visokoj koncentraciji ili su nepovoljni za organizam i u najmanjim dozama (46).

#### **3.5.1. Antioksidativno djelovanje**

U živim organizmima, raznim metaboličkim procesima i utjecajima okoliša, stvaraju se raznoliki reaktivni slobodni radikali. Oksidativni stres nastaje kao posljedica neravnoteže između stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i sposobnosti stanica da ih neutraliziraju, a povezan je s razvojem takozvanih "civilizacijskih bolesti", poput raka i moždanog udara ili nekih degenerativnih procesa (47). Fenolni spojevi su dokazani antioksidansi što znači da mogu neutralizirati slobodne radikale, ROS i druge oksidativne molekule. To je posljedica njihovih redoks svojstava koji im omogućuju da djeluju kao reducirajuća sredstva, doniranjem vodika iz svojih hidroksilnih skupina ili elektrona, čime sprječavaju njihovu štetnu aktivnost u organizmu

(oštećenje stanica, proteina i DNA). Antioksidativni potencijal izravno je povezan za otapalom korištenim u ekstrakciji, biljnim podrijetlom, uvjetima uzgoja, vremenom berbe i uvjetima skladištenja (28). U jednom istraživanju, dokazano je antioksidativno djelovanje u trima vrstama *Veronica* (*V. officinalis*, *V. teucrium* i *V. orchidea*) korištenjem elektron okretajuće rezonancijske spektrometrije, za procjenjivanje njihove učinkovitosti u redukciji sintetskih vrsta slobodnih radikala – npr. polustabilnog kalijevog nitrosodisulfonata ili Fremijeve soli (48). Sadržaj ukupnih fenola i ukupnih flavonoida snažno je povezan s antioksidativnom aktivnošću. Slika 17 prikazuje najveću antioksidativnu moć kod *V. officinalis*, iako je u prethodnom dijelu dokazano da sadrži najmanje flavonoida (TFC- total flavonoid content), dok je *V.teucrium* prednjačila sa 6.60 +/- 0.26 ekvivalenata kvercetina, ali *V. officinalis* je imala najveći TPC- ukupni fenolni sastav (48).



**Slika 17.** Antioksidativna aktivnost triju *Veronica* mjerena EPR spektroskopijom- lijevo i degradacijska kinetika slobodnih radikala Fremijeve soli (%) – desno (48)

U drugom istraživanju, Vrca i sur. ispitivali su antioksidativnu učinkovitost fenolnih spojeva iz tri ekstrakta (metanolni, 80% etanolni i vodeni) dobivenih meceracijom za tri *Veronica* vrste: *V. anagallis-aquatica*, *V. persica*, i *V. polita*. Korištene su metode ORAC (kapacitet apsorbancije kisikovih radikala) i DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (39). Najveća aktivnost zabilježena je za metanolni ekstrakt *V. polita*, s rezultatom od  $4505,60 \pm 255,34$   $\mu\text{mol TE/g DW}$ . Od ispitivanih ekstrakata najveću aktivnost pokazale su fenolne kiseline - kavena i vanilinska kiselina (39). Ostala otkrića za antioksidativno djelovanje vrsta *Veronica* pokazala su različite rezultate zbog korištenja različitih otapala i metoda ekstrakcije. Antioksidativna učinkovitost flavonoida i drugih fenolnih spojeva uočena je kod drugih biljnih vrsta i njihovih dijelova poput listova masline, *Olea europaea* i plodova tršlje, *Pistacia Lentiscus*. Glavni spojevi odgovorni za antioksidativno djelovanje iz drugih istraživanja i navedenih su uvijek

flavonoidi (antocijanini i flavoni) te fenolne kiseline poput galne, vanilinske, ferulične i klorogene. Ovi spojevi prisutni su i u hrani i biljnim proizvodima gdje sprječavaju oksidaciju lipida (49), a zahvaljujući antioksidativnosti nerijetko se koriste kao prirodni konzervansi i u kozmetičkim proizvodima za njegu kože (49).

### 3.5.2. Kardioprotektivno djelovanje

Kardiovaskularne bolesti, poput ateroskleroze, često su povezane s oksidativnim stresom i upalom. Fenolni spojevi štite srce i krvne žile smanjujući oksidaciju LDL kolesterola, poboljšavajući funkciju endotela i sprječavajući agregaciju trombocita. Na primjer, kavena kiselina i klorogenska kiselina važni su članovi hidroksicimetnih kiselina s prirodnim kardioprotektivnim svojstvima. Obje su pokazale svojstva snižavanja krvnog tlaka i smanjivanja aktivnosti ključnih enzima povezanih s patogeneom hipertenzije (visokog krvnog tlaka) u štakora izazvanih ciklosporinom (50). Redovita konzumacija hrane bogate fenolnim spojevima povezuje se s manjim rizikom od razvoja kardiovaskularnih bolesti. Resveratrol, stilben prisutan u grožđu i crnom vinu, jedan je od najpoznatijih fenolnih spojeva s raznolikim biološkim djelovanjima uključujući kardioprotektivni jer održava endotel krvnih žila i smanjuje rizik od stvaranja krvnih ugrušaka. Zbog ovih svojstava, resveratrol je na tržištu dostupan kao dodatak prehrani za zdravlje srca (51).

### 3.5.3. Protuupalno djelovanje

Upala ili inflamacija dio je složenog biološkog odgovora organizma na štetne čimbenike, poput patogenih bakterija, oštećenih stanica ili raznih iritansa. Za fenolne spojeve, poput kvercetina i resveratrola, poznato je da inhibiraju upalne procese (Web 29). Oni inhibiraju aktivnost enzima uključenih u takve procese, kao što su ciklooksigenaze 1 i 2 (COX) i lipooksigenaza (LOX) te inducibilne sintaze dušikova oksida. Time se smanjuje proizvodnja upalnih medijatora kao što su prostaglandini i citokini. Nedavno spomenuti kvercetin, flavonoid prisutan u jabukama i luku, pokazuje snažno protuupalno djelovanje. U jednom su eksperimentu znanstvenici dokazali inhibiciju aktivnosti enzima sintaze dušikova oksida u *in vivo* modelima upale, preko NF-kappaB puta, kvercetinom (52). Redovita konzumacija hrane bogate ovim spojevima može pomoći u smanjenju upala kroničnih stanja npr. reumatoidni artritis ili astmu. Zbog toga se koriste različiti pripravci za ublažavanje upala, posebno u biljnim lijekovima i dodacima prehrani (Web 30).

#### 3.5.4. Antibakterijsko djelovanje

Određeni fenoli prisutni u rodu *Veronica* djeluju protiv bakterija. U jednom radu, istraživanje provedeno na ekstraktima *V. montana*, pokazalo je značajnu aktivnost protiv *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Navedeno je da su tanini i flavonoidi bili ključni za destabilizaciju stanične membrane bakterija, smanjujući njihovu propusnost i uzrokujući staničnu smrt (Web 31). Ova antibakterijska svojstva ukazuju na potencijalnu primjenu fenolnih spojeva iz roda *Veronica* i drugih biljaka u razvoju prirodnih antibakterijskih sredstava, posebno u kontekstu rastuće otpornosti patogenih mikroorganizama na konvencionalne antibiotike (Web 31).

#### 3.5.5. Antikancerogena i citotoksična svojstva fenolnih spojeva

Zahvaljujući činjenici da fenolni spojevi mogu inducirati programiranu smrt stanica (apoptozu), znanstvenici ih primjenjuju na tumorskim stanicama da inhibiraju angiogenezu (formiranje novih krvnih žila potrebnih za rast tumora) i metastaziranje (2). Ovi spojevi djeluju na stanične mehanizme unutar stanica raka, uključujući regulaciju ekspresije gena povezanih s preživljavanjem stanica, popravkom DNA i zaustavljanje rasta onkocelula u različitim fazama (G1, S ili G2) staničnog ciklusa.

Osim kardioprotektivnih učinaka, stilben resveratrol pokazuje i antikancerogena svojstva, kao što sugerira njegova sposobnost suzbijanja proliferacije širokog spektra tumorskih stanica, uključujući limfne i mijeloidne karcinome. Tako su se u jednom istraživanju dokazali učinci resveratrola na inhibiciju rasta tumorskih stanica posredovani zaustavljanjem staničnog ciklusa (53). Pokazalo se da resveratrol potiskuje aktivaciju nekoliko faktora transkripcije za inhibiciju protein kinaza i za regulaciju produkata gena kao što su COX-2, 5-LOX i dr. Ove aktivnosti objašnjavaju potiskivanje angiogeneze ovim stilbenom. Također se pokazalo da resveratrol pojačava apoptotičke učinke citokina (npr. TRAIL), kemoterapijskih sredstava i gama-zračenja. Ograničeni podaci na ljudima otkrili su da je resveratrol farmakološki prilično siguran čime se otvara mogućnost daljnjih istraživanja u kontekstu razvoja prirodnih antikancerogenih terapija (54).

## 4. Zaključak

Zaključno, rod *Veronica* predstavlja značajan izvor fenolnih spojeva koji posjeduju značajnu biološku aktivnost, uključujući antioksidativna, protuupalna i antimikrobna svojstva. Fenolni spojevi imaju važnu ulogu u zaštiti biljaka, ali zajedno s drugim bioaktivnim komponentama, predstavljaju vrste roda *Veronica* važnim resursom za istraživanja u farmaceutskoj industriji i medicini. Primjena ovih biljaka u tradicionalnoj medicini te njihova potencijalna upotreba u modernim terapijama potvrđuju važnost daljnjih istraživanja kako bi se potpuno razumio mehanizam djelovanja i koja bi mogla dovesti do razvoja novih prirodnih lijekova.



## 5. Literatura

1. Xue H, Chen KX, Zhang LQ, Li YM. (2019) Review of the Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Pharmacology of the Genus *Veronica*. *Am J Chin Med.* 47(6):1193-1221.
2. Muller AG, Sarker SD, Saleem IY, Hutcheon GA. (2019) Delivery of natural phenolic compounds for the potential treatment of lung cancer. *Daru-J Pharm Sci.* 27(1):433-449.
3. Yasir M, Sultana B, Amicucci M. (2016) Biological activities of phenolic compounds extracted from Amaranthaceae plants and their LC/ESI-MS/MS profiling. *J Funct Foods*; 26(1756-4646):645-656.
4. Bentham, G. (1846) Scrophulariaceae. In A. de Candolle [ed.], *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*, 448–491. Victor Masson, Paris, France.
5. Van Tieghem, M. P. (1903) Structure de le'tamine chez les Scrophulariace'es. *Annales des Sciences Naturelles* 17: 363–371.
6. Bellini R. (1907) Criteri per una nuova classificazione delle Personatae. *Annali di Botanici* 6: 131–145; Rome, Italy.
7. Albach, Dirk & Meudt, Heidi & Oxelman, Bengt. (2005). Piecing together the "new" Plantaginaceae. *American journal of botany.* 92. 297-315. 10.3732/ajb.92.2.297.
8. Govaerts, R., Nic Lughadha, E., Black, N., Turner, R. & Paton, A. (2021). The World Checklist of Vascular Plants, a continuously updated resource for exploring global plant diversity. <https://doi.org/10.1038/s41597-021-00997-6>. *Scientific Data* 8: 215.
9. Vural C., Özcan S., Akbulut M. (2009) New combination in *Veronica* (Scrophulariaceae s.l.) based on morphological characters and the seed storage protein polymorphism. *J. Syst. Evol.* 47:168–172. doi: 10.1111/j.1759-6831.2009.00016.x.
10. Klein E. (1966) *A Comprehensive Etymological Dictionary of the English Language*, Elsevier, Amsterdam.
11. Nazlić, M. (2023). Identifikacija i biološka aktivnost slobodnih hlapljivih spojeva roda *Veronica* L. (Plantaginaceae) (Doktorska disertacija). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.
12. Jeon, H. (2012) Anti-inflammatory activity of *Veronica peregrina*. *Nat. Prod. Sci.*, 18, 141–146.
13. Stojkovic, D.S.; Zivkovic, J.; Sokovic, M.; Glamoclija, J.; Ferreira, I.C.F.R.; Jankovic, T.; Maksimovic Z. (2013) Antibacterial activity of *Veronica montana* L. Extract and of protocatechuic acid incorporated in a food system. *Food Chem. Toxicol.* 55, 209–21.

14. Ljubiša Grlić, (1990.), Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, Zagreb: August Cesarec  
Izvor: Potočna čestoslavica <https://www.plantea.com.hr/potocna-cestoslavica>
15. Sanchez S, Demain AL. (2000) Secondary Metabolites, American Society of Plant Physiologists; Derwood, MD, SAD.
16. Pevalek- Kozlina B. (2003) Udžbenik iz fiziologije bilja, Profil Klett 470. – 494.
17. Breimaier E. (2006) Terpenes- Flavors, Fragrances, Pharmacia , Pheromones. Wiley – VCH Verlag GnbH & Co.
18. Kroll-Møller P, Pedersen DK, Gousiadou C, Kokubun T, Albach D, Taskova R, Garnock-Jones P, Gotfredsen CH, Jensen S. (2017) Iridoid glucosides in the genus *Veronica* (Plantaginaceae) from New Zealand; *Phytochemistry*; Vol 140, 174 – 180.
19. Bhattamisra SK, Yap KH, Rao V, Choudhury H. (2019) Multiple Biological Effects of an Iridoid Glucoside, Catalpol and Its Underlying Molecular Mechanisms. *Biomolecules*;10(1):32. doi: 10.3390/biom10010032.
20. Haibing X. (2019) Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Pharmacology of the Genus *Veronica*, *The American Journal of Chinese Medicine* Vol. 47, No. 06, pp. 1193-1221.
21. Boter, M.; Diaz, I. (2021) Cyanogenesis, a Plant Defence Strategy against Herbivores. *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 6982. <https://doi.org/10.3390/ijms24086982>
22. H. Al Mamari H (2022) Phenolic Compounds: Classification, Chemistry, and Updated Techniques of Analysis and Synthesis. *Biochemistry*. IntechOpen. Available at: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.98958>.
23. Pažur A. (2017) Određivanje količine flavonoida i fenolnih kiselina te antioksidacijskog učinka vrstama *Salvia brachyodon* Vand. i *Salvia officinalis* L., Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, str. 11.
24. Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. (2001) Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. *Plant Science* ;161:839-851. doi: 10.1016/S0168-9452(01)00490.
25. Grgurić, D. (2020) (Bio)sinteza šikiminske kiseline, Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:770493>.
26. Robbins R.J. (2003) Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology J. *Agric. Food Chem* 51: 2866-2887.
27. Heleno SA, Martins A, Queiroz M, Isabel CFR. (2015). "Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds: a review" (PDF). *Food Chemistry*. 173: 501–513. doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.057

28. Zhang Y, Cai P, Cheng G, Zhang Y. (2022) A Brief Review of Phenolic Compounds Identified from Plants: Their Extraction, Analysis, and Biological Activity. *Natural Product Communications*. 17(1). doi:10.1177/1934578X211069721
29. Zhang Z, Wu XY, Cao SY, et al. (2016) Caffeic acid ameliorates colitis in association with increased Akkermansia population in the gut microbiota of mice. *Oncotarget*. 7(22):31790-31799.
30. Boerjan, W.; Ralph, J.; Baucher, M. (2003) "Lignin biosynthesis". *Annual Review of Plant Biology*. 54: 519–546
31. Venugopala KN, Rashmi V, Odhav B. (2013). "Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity". *BioMed Res Int*. 2013: 1–14. doi:10.1155/2013/963248
32. Murphy A, Peer WA, Taiz L. (2000) Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids Biology Department, Sinsheimer Laboratories, University of California, Santa Cruz, CA 95064, USA
33. Spencer JP ( 2008). "Flavonoids: modulators of brain function?". *The British Journal of Nutrition*. 99 (E Suppl 1): ES60–ES77. doi:10.1017/S0007114508965776.
34. Doat J Bois. (1978) Tannin in Tropical Woods ; For Tmp., volume 182, pp. 34–37.
35. Willför, S.M., Smeds, A.I., and Holmboma, B.R. (2006). Chromatographic analysis of lignans. *Journal of Chromatography A*, 1112(1–2), 64–77. doi:10.1016/j.chroma.2005.11.054
36. Heldt, H.W. and Heldt, F. (2013). *Plant Biochemistry*. Elsevier Academic Press: USA, 3 rd edition, 2005, 630 p. ISBN 0-12-088391-033
37. Fraga CG, Croft KD, Kennedy DO, Tomas-Barberan FA. (2019) The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct*. 10(2):514-528.
38. Xia N, Daiber A, Forstermann U, Li HG. (2017) Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol*.;174(12):1633-1646.
39. Vrca I, Orhanović S, Pezelj I, Sušić K, Dunkić V, Kremer D, Nazlić M. (2024) Identification of Phenolic Compounds Present in Three Speedwell (*Veronica L.*) Species and Their Antioxidant Potential. *Antioxidants (Basel)*.;13(6):738. doi: 10.3390/antiox13060738.
40. Vrca I, Čikeš Čulić V, Lozić M, Dunkić, N, Kremer D, Ruščić M, Nazlić Marija, Dunkić V. (2023). Isolation of Volatile Compounds by Microwave-Assisted Extraction from Six *Veronica* Species and Testing of Their Antiproliferative and Apoptotic Activities. *Plants (Basel, Switzerland)*.

41. Apostol LC, Ghinea C, Prisacaru AE, Albu E. (2022) Extraction of Active Compounds from *Armoracia rusticana* Using Maceration and Ultrasound Assisted Extraction. doi: 10.1109/ehb55594.2022.9991577
42. Dahmoune F, Nayak B, Moussi K, Remini H, Madani K. (2015) Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. Leaves. Food Chem. ;166(0308-8146):585-595.
43. Drmić H, Jambrak A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, J. Food Sci. Technol. 2 (2) 22-33.
44. Kumar K, Srivastav S, Sharanagat VS. (2021) Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. Ultrason Sonochem.:105325. doi: 10.1016/j.ultsonch.2020.105325.
45. Šimić, I. (2015). Ultrazvučna ekstrakcija pesticida iz uzorka čaja (Diplomski rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:073328>
46. Atanasov, A. G., et al. (2015) Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. Biotechnology Advances, 33(8), 1582-1614
47. Stadtman, ER. Protein oxidation and aging. Free Radic. Res. 2006, 40, 1250–1258.
48. Mocan A; Vodnar DC, Vlase L, Crişan O, Gheldiu AM, Crişan G. (2015) Phytochemical Characterization of *Veronica officinalis* L., *V. teucrium* L. and *V. orchidea* Crantz from Romania and Their Antioxidant and Antimicrobial Properties. Int. J. Mol. Sci. 16, 21109-21127.
49. Huang D, Ou B, Prior RL. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. J Agric Food Chem.;1841-56.
50. Agunloye OM, Oboh G, et al. (2019) Cardio-protective and antioxidant properties of caffeic acid and chlorogenic acid: mechanistic role of angiotensin converting enzyme, cholinesterase and arginase activities in cyclosporine induced hypertensive rats. Biomed Pharmacother 109(0753-3322):450-458.
51. Gal R, Deres L, Toth K, Halmosi R, Habon T. (2021) The Effect of Resveratrol on the Cardiovascular System from Molecular Mechanisms to Clinical Results. Int J Mol Sci.;22(18):10152. doi: 10.3390/ijms221810152.
52. Comalada M, Camuesco D, Sierra S, Ballester I, Xaus J, Gálvez J, Zarzuelo A. (2005) In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway. Eur J Immunol.;35(2):584-92. doi: 10.1002/eji.200425778.

53. Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. (2004) Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.*;24(5A):2783-840. PMID: 15517885.
54. Kursvietiene L, Kopustinskiene DM, Staneviciene I, Mongirdiene A, Kubová K, Masteikova R, Bernatoniene J. (2023) Anti-Cancer Properties of Resveratrol: A Focus on Its Impact on Mitochondrial Functions. *Antioxidants (Basel).*;12(12):2056. doi: 10.3390/antiox12122056.

#### Web stranice

- Web 1. <https://enciklopedija.hr/clanak/ljekovito-bilje> Pristupljeno 4.9.2024.
- Web 2. [https://www.biologyreference.com/knowledge/Secondary\\_metabolites.html](https://www.biologyreference.com/knowledge/Secondary_metabolites.html) Pristupljeno 4.9.2024.
- Web3. <https://plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/cgi-bin/NSWfl.pl?page=nswfl&lvl=fm&name=Plantaginaceae> Pristupljeno 4.9.2024.
- Web 4. <https://www.finegardening.com/genus/veronica> Pristupljeno 4.9.2024.
- Web 5. <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30005997-2> Pristupljeno 4.9.2024.
- Web 6. [https://naturalhistory.si.edu/sites/default/files/media/file/plantaginaceae\\_0.pdf](https://naturalhistory.si.edu/sites/default/files/media/file/plantaginaceae_0.pdf) Pristupljeno 4.9.2024.
- Web 7. <https://www.britannica.com/plant/Plantaginaceae> Pristupljeno 4.9.2024.
- Web 8. [https://en.wikipedia.org/wiki/Veronica\\_chamaedrys](https://en.wikipedia.org/wiki/Veronica_chamaedrys) Pristupljeno 2.9. 2024.
- Web 9. <http://beta.floranorthamerica.org/Plantaginaceae> Pristupljeno 2.9.2024.
- Web 10. <https://bs.plantnet.org/image/o/505d2b7b7f4622f7ede0f3093230d156aef10e64> Pristupljeno 4.9.2024.
- Web 11. [https://en.wikipedia.org/wiki/Veronica\\_\(plant\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Veronica_(plant)) Pristupljeno 30.8. 2024.
- Web 12. <https://www.plantea.com.hr/ljekovita-cestoslavica/> Pristupljeno 30.8.2024.
- Web 13. <https://www.hanuman-herbs.com/product/germander-speedwell-tincture-veronica-officinalis-100-ml-organic/> Pristupljeno 2.9.2024.
- Web 14. <https://ionia-azure.ch/active-serums/swiss-veronica-actives-serum-against-age-dark-pigment-sun-spots.aspx> Pristupljeno 2.9.2024.
- Web 15. <https://www.plantea.com.hr/potocna-cestoslavica/#referenca-3> Pristupljeno 2.9.24.
- Web 16. <https://www.intechopen.com/chapters/77604> Pristupljeno 4.9.2024.

Web 17. <https://zir.nsk.hr/islandora/object/pharma:2356/datastream/PDF/view> Pristupljeno 4.9.2024.

Web 18. <https://thereaderwiki.com/en/Furanocoumarin> Pristupljeno 5.9.2024.

Web 19. <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/aldrich/h24003> Pristupljeno 5.9.2024.

Web 20. <https://www.researchgate.net/publication/274727551> Pristupljeno 5.9.2024.

Web 21. <https://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Creslovina> Pristupljeno 5.9.2024.

Web 22. <https://repozitorij.unizg.hr/islandora/object/fkit%3A398/datastream/PDF/view> Pristupljeno 5.9.2024.

Web 23. <https://www.mdpi.com/2227-9717/11/8/2255> Pristupljeno 5.9.2024.

Web 24. <https://www.enciklopedija.hr/clanak/maceracija> Pristupljeno 5.9.2024.

Web 25. <https://histogene.co/wp-content/uploads/2022/03/maceration-extraction.jpg> Pristupljeno 5.9.2024.

Web26. [https://www.mt.com/hr/hr/home/applications/Application\\_Browse\\_Laboratory\\_Analytics/uv-vis-spectroscopy/uvvis-spectroscopy-explained.html](https://www.mt.com/hr/hr/home/applications/Application_Browse_Laboratory_Analytics/uv-vis-spectroscopy/uvvis-spectroscopy-explained.html) Pristupljeno 10.9.2024.

Web27. [https://hr.wikipedia.org/wiki/Teku%C4%87inska\\_kromatografija\\_visoke\\_djelotvornosti](https://hr.wikipedia.org/wiki/Teku%C4%87inska_kromatografija_visoke_djelotvornosti) Pristupljeno 11.9.2024.

Web28. [https://en.wikipedia.org/wiki/Highperformance\\_liquid\\_chromatography#cite\\_note-29](https://en.wikipedia.org/wiki/Highperformance_liquid_chromatography#cite_note-29) Pristupljeno 11.9.2024.

Web 29. <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2289288> Pristupljeno 11.9.2024.

Web 30. <https://www.webmd.com/vitamins/ai/ingredientmono-294/querctetin> Pristupljeno 14.9.2024.

Web31. <https://pdfs.semanticscholar.org/0c19/79dbadd8cec715d3b4c150aadb73cfbf550e.pdf> Pristupljeno 12.9.2024.