

# Kemijski i biološki profil odabranih biljaka roda Centaurea

---

**Kardum, Kristina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:346755>

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

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



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**I**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Kristina Kardum**

**KEMIJSKI I BIOLOŠKI PROFIL ODABRANIH BILJAKA RODA *CENTAUREA***

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2017/18.**

**Mentor**

**Izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo**

**Listopad 2018, Split**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

**Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet**  
**Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA**  
**Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska**

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti  
**Znanstveno polje:** Farmacija  
**Nastavni predmet:** Biokemija  
**Tema rada** je prihvaćena na 53. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na \_\_. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i \_\_. sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo  
**Pomoć pri izradi:** Petra Brzović, mag. kem

### KEMIJSKI I BIOLOŠKI PROFIL ODABRANIH BILJAKA RODA *CENTAUREA*

Kristina Kardum, broj indeksa 115

**Sažetak:** Istraživanje novih biološki aktivnih tvari prirodna podrijetla važno je i perspektivno područje istraživanja iz razloga sve većeg broja potvrda o nepovoljnim učincima sintetskih lijekova. Iz tog razloga, svako novo istraživanje iz prirode izoliranih spojeva može doprinijeti farmaceutskoj industriji, odnosno razvoju novih lijekova. Inhibicija važnih enzima jedan je od temeljnih terapija u liječenju bolesti, kao što su Alzheimerova demencija (AD) i *Diabetes mellitus* (DM). Rod *Centaurea* L. jedan je od najvažnijih rodova obitelji Asteraceae, s velikim brojem vrsta. U Hrvatskoj dolazi oko 80 vrsta ovog roda, od kojih je 27 endemskih. U ovom radu određen je kemijski i biološki profil hidrolata pet biljaka roda *Centaurea*. Kemijski profil hidrolata određen je kroz kvalitativno dokazivanje pojedinih sekundarnih metabolita te kroz kvantitativno određivanje sadržaja ukupnih fenolnih i flavonoidnih komponenti hidrolata. Biološki potencijal ispitan je u smislu inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE), butirilkolinesteraze (BChE) i  $\alpha$ -glukozidaze. Kvalitativno su u hidrolatima biljaka dokazani glikozidi i saponini, dok nisu dokazani alkaloidi, tanini, steroidi i terpenoidi. Rezultati su pokazali da svi uzorci hidrolata biljaka roda *Centaurea* sadrže relativno mali sadržaj fenolnih i flavonoidnih spojeva. Uzorci hidrolata *C. scabiosa* i *C. rhenana* srednje inhibiraju enzim AChE, *C. triumfettii* i *C. ragusina* slabo inhibiraju AChE, dok *C. alba* ne inhibira AChE. Uzorci hidrolata *C. alba*, *C. rhenana* i *C. scabiosa* slabo inhibiraju BChE, dok *C. triumfettii* i *C. ragusina* ne inhibiraju ovaj enzim. Uzorak hidrolata *C. scabiosa* zamjetnom sposobnosti inhibira enzim  $\alpha$ -glukozidazu, uzorak *C. rhenana* slabo inhibira enzim  $\alpha$ -glukozidazu, dok ostali hidrolati ne inhibiraju ovaj enzim.

**Ključne riječi:** Asteraceae, *Centaurea*, kemijski profil, AChE, BChE,  $\alpha$ -glukozidaza

**Rad sadrži:** 54 stranica, 15 slika, 7 tablica, 63 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun - predsjednik
2. doc. dr. sc. Franko Burčul - član
3. izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo - član - mentor

**Datum obrane:** 26. listopada 2018.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Teslina 10 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 1.**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine  
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy  
University of Split, Croatia

**Scientific area:** Biomedical sciences  
**Scientific field:** Pharmacy  
**Course title:** Biochemistry  
**Thesis subject** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 53 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. \_\_ and Faculty Council of School of Medicine, session no. \_\_  
**Mentor:** PhD Olivera Politeo, Assoc. Prof.  
**Technical assistance:** Petra Brzović, MSc.

### CHEMICAL AND BIOLOGICAL POTENTIAL OF SELECTED PLANTS OF *CENTAUREA* GENUS

Kristina Kardum, index number 115

**Summary:** Research of new biological active substances of natural origin is a significant field of research because of the growing number of adverse drug effects. For this reason, any new research of the from nature isolated compounds can contribute to the pharmaceutical industry, or the development of new drugs. Inhibition of important enzymes is one of the fundamental therapies for treating diseases such as Alzheimer's dementia (AD) and *Diabetes mellitus* (DM). Genus *Centaurea* L. is one of the most important genus of the Asteraceae family, with a large number of species. In Croatia there are around 80 species of this genus, of which 27 are endemic. In this study, the chemical and biological profile of the hydrolysates of five plants of the genus *Centaurea* was determined. The chemical profile of the hydrolysates was determined by qualitative demonstration of certain secondary metabolites and by quantitative determination of the content of the total phenol and flavonoid components of the hydrolates. Biological potential was investigated in terms of the inhibition of acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE) and  $\alpha$ -glucosidase enzymes. Glycosides and saponins have been shown to be potent in plant hydrolytes, while alkaloids, tannins, steroids and terpenoids have not been proven. The results showed that all *Centaurea* plant hydrolyte samples contain a relatively small content of phenolic and flavonoid compounds. *C. scabiosa* and *C. rhenana* hydrolytes inhibit AChE, *C. triumfetti* and *C. ragusina* show low inhibiting of AChE, whereas *C. alba* does not inhibit AChE. *C. alba*, *C. rhenana* and *C. scabiosa* samples are poorly inhibiting BChE, while *C. triumfetti* and *C. ragusina* do not inhibit this enzyme. *C. scabiosa* inhibits the enzyme  $\alpha$ -glucosidase noticeably, *C. rhenana* sample weakly inhibits the  $\alpha$ -glucosidase enzyme while the other hydrolysates do not inhibit this enzyme.

**Key words:** Asteraceae, *Centaurea*, chemical profile, AChE, BChE,  $\alpha$ -glucosidase

**Thesis contains:** 54 pages, 15 figures, 7 tables, 63 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. PhD Lea Kukoč Modun, assistant prof. - chair person
2. PhD Franko Burčul, assistant prof. - member
3. PhD Olivera Politeo, associate prof. - supervisor

**Defence date:** ( October 26 2015.)

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Teslina 10 and Library of School of Medicine, Šoltanska 1.

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Sekundarni biljni metaboliti .....	2
1.2. Fenoli i flavonoidi .....	4
1.3. Alzheimerova demencija .....	5
1.4. Kolinergična hipoteza Alzheimerove bolesti .....	6
1.5. Inzulinska rezistencija i inhibitori $\alpha$ -glukozidaze u Alzheimerovoj demenciji.....	8
1.6. Biljke roda <i>Centaurea</i> .....	8
1.7. Metode kvalitativnih određivanja .....	10
1.8. Metode kvantitativnih određivanja .....	10
1.8.1. Metoda određivanja sadržaja ukupnih fenola, Folin-Ciocalteu metoda .....	10
1.8.2. Metoda određivanja sadržaja ukupnih flavonoida, metoda s aluminijevim(III) kloridom .....	10
1.9. Metode ispitivanja bioloških potencijala biljnih ekstrakata .....	11
1.9.1. Metoda određivanja sposobnosti inhibicije enzima kolinesteraza, metoda po Ellmanu .....	11
1.9.2. Metoda određivanja sposobnosti inhibicije enzima $\alpha$ -glukozidaze, metoda po Sigma-Aldrichu .....	11
2.0. Spektrofotometrija .....	12
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	13
3. MATERIJALI I METODE .....	15
3.1. Biljni materijal .....	16
3.1.1. <i>Centaurea rhenana</i> .....	16
3.1.2. <i>Centaurea scabiosa</i> .....	17
3.1.3. <i>Centaurea triumfettii</i> .....	18
3.1.4. <i>Centaurea ragusina</i> .....	19
3.1.5. <i>Centaurea alba</i> .....	20
3.2. Priprema uzorka .....	21

3.3. Kvalitativno dokazivanje pojedinih klasa spojeva ekstrakata .....	22
3.3.1. Kvalitativno dokazivanje alkaloida u ekstraktu .....	22
3.3.2. Kvalitativno dokazivanje tanina u ekstraktu .....	22
3.3.3. Kvalitativno dokazivanje steroida u ekstraktu .....	22
3.3.4. Kvalitativno dokazivanje terpenoida u ekstraktu .....	22
3.3.5. Kvalitativno dokazivanje glikozida u ekstraktu .....	22
3.3.6. Kvalitativno dokazivanje saponina u ekstraktu .....	23
3.4. Kvantitativna određivanja pojedinih klasa spojeva ekstrakta .....	23
3.4.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola .....	23
3.4.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida .....	24
3.5. Ispitivanje bioloških potencijala uzoraka .....	24
3.5.1. Određivanje sposobnosti inhibicije kolinesteraza, acetilkolinesteraze (AChE), butirilkolinesteraze (BChE) .....	25
3.5.2. Sposobnost inhibicije enzima $\alpha$ -glukozidaze .....	26
4. REZULTATI .....	28
4.1. Kvalitativna određivanja pojedinih klasa spojeva u hidrolatima biljaka roda <i>Centaurea</i> .....	29
4.2. Kvantitativna određivanja .....	30
4.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola .....	30
4.2.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida .....	32
4.3. Ispitivanje biološkog potencijala hidrolata biljaka roda <i>Centaurea</i> .....	34
5. RASPRAVA .....	36
6. ZAKLJUČAK .....	40
7. POPIS CITIRANE LITERATURE .....	43
8. SAŽETAK .....	49
9. SUMMARY .....	51
10. ŽIVOTOPIS .....	53

Zahvale:

Ovim putem zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Oliveri Politeo na pomoći i susretljivosti oko izrade i pisanja diplomskog rada. Zahvaljujem se i asistentici mag. kem. Petri Brzović na pomoći kod eksperimentalnog dijela rada.

Velika zahvala obitelji kao najvećoj podršci kroz cijelo školovanje.

## **1. UVOD**



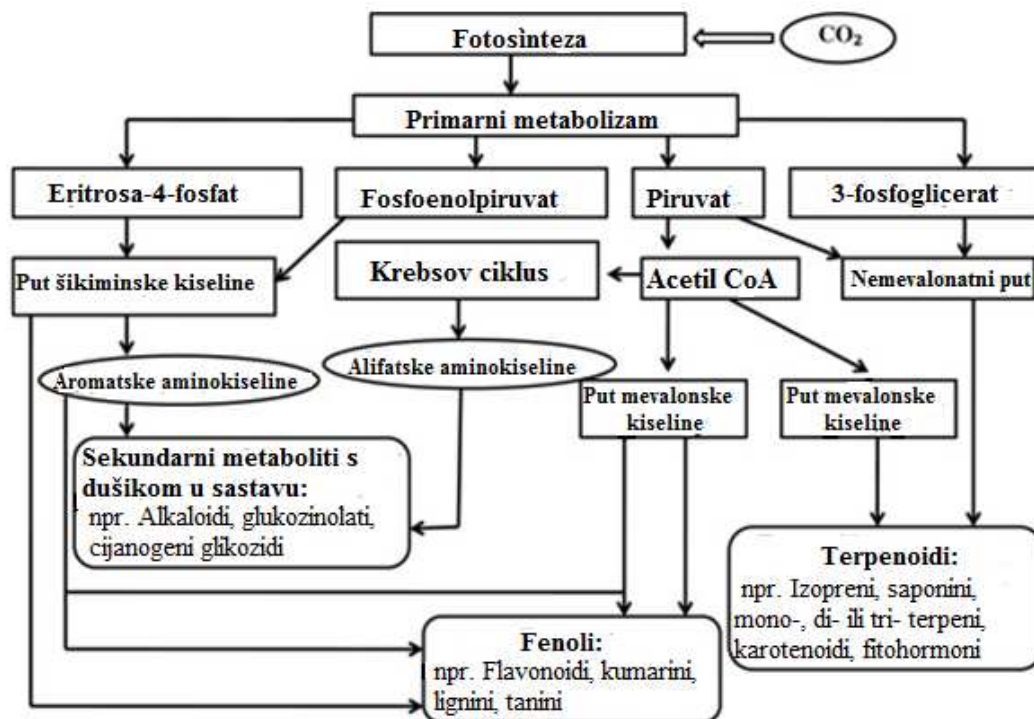
Istraživanje novih biološki aktivnih tvari prirodna podrijetla još uvijek predstavlja važno i perspektivno područje istraživanja, tim više što značajan broj suvremenih lijekova (oko 40%) potječe iz biljaka i njihove upotrebe u tradicionalnoj medicini (1). Nadalje, sve je više potvrda o nepovoljnim učincima sintetskih lijekova, u smislu kancerogenih, hepatoloških, gastrointestinalnih i drugih poremećaja (2). Iz tog razloga, svako novo istraživanje iz prirode izoliranih spojeva može doprinijeti farmaceutskoj industriji, odnosno razvoju novih lijekova (3, 4).

Inhibicija važnih enzima jedna je od temeljnih terapija u liječenju bolesti, kao što su Alzheimerova demencija (AD) i *Diabetes mellitus* (DM, šećerna bolest). Primjerice, inhibitori kolinesteraza podižu razinu acetilkolina, a time dolazi do poboljšanja kognitivnih sposobnosti u pacijenata s AD (5). Inhibitori probavnih enzima, kao  $\alpha$ -glukozidaze, su važni u reguliranju sadržaja glukoze u krvi u pacijenata s DM (6). Neki sintetski inhibitori se koriste u kliničkom liječenju, no pokazuju ograničenu učinkovitost i nuspojave (7,8,9). Iz tih razloga se ulaže veliki napor kako bi se otkrili i razvili novi, iz prirode izolirani, inhibitori koji će biti visoko učinkoviti i bez štetnih nuspojava.

Rod *Centaurea* L. jedan je od najvažnijih i široko rasprostranjenih rodova obitelji Asteraceae, s velikim brojem vrsta, čak više od 400. U Hrvatskoj postoji oko 80 vrsta ovog roda, od kojih je 27 endemskih (10). Kemijske studije pokazale su prisutnost velikog broja spojeva kod ovih vrsta, uglavnom seskviterpenskih laktona, flavonoida i lignana kojima se mogu pripisati ljekovita svojstva pojedinih vrsta roda *Centaurea*. U ovom radu je istražen kemijski i biološki profil hidrolata pet biljnih vrsta roda *Centaurea*: *Centaurea rhenana* L., *Centaurea scabiosa* L., *Centaurea triumfettii* All., *Centaurea ragusina* L., *Centaurea alba* L.

## 1.1. Sekundarni biljni metaboliti

Sekundarni biljni metaboliti su tvari koje biljke sintetiziraju modificiranim sintetskim putovima primarnih metabolita ili dijele supstrat u reakciji koji dijeli porijeklo s primarnim metabolitom (Slika 1.).



**Slika 1.** Shema sinteze sekundarnih metabolita (11)

Sekundarni metaboliti nisu esencijalni za život biljke, jer ne sudjeluju u procesima rasta, razvoja i reprodukcije biljke, već sudjeluju u interakciji biljke i okoliša. Utječu na adaptaciju biljke na okoliš s obzirom na opasnost koja vlada. Glavna im je uloga obrana od predatora i patogena (otrovne ili neukusne tvari, tvar s antifungalnim djelovanjem), ali mogu služiti i kao mehanička potpora, za privlačenje životinja koje oprašuju biljke i onih koje rasprostranjuju sjemenke te u redukciji rasta susjednih biljaka. Povezuju se nadalje s povećanom tolerancijom na niske temperature, teške metale i mogu poboljšati antioksidacijsko djelovanje. Neki imaju fotoprotektivno djelovanje, a neki biljke štite od UV-zračenja. Sekundarni metaboliti se dijele, s obzirom na biosintetske puteve kojima nastaju, u tri skupine: terpeni, fenolni spojevi i alkaloidi. Tanini, glikozidi i saponini su manje podskupine sekundarnih metabolita koji se razlikuju po strukturi.

Terpeni su nepolarne molekule čiji su prekursori izopentenil-difosfat ili dimetil-alil-difosfat koji nastaju u dva biosintetska puta: u citosolu mevalonatnim putem (prekursor je acetil-CoA), te metil-eritriol-fosfatnim putem u plastidima (prekursori su piruvat ili gliceraldehid-3-fosfat). Terpeni su velika obitelj sekundarnih metabolita koji imaju malo funkcionalnih i strukturnih sličnosti. Predstavnici su steroidi, karotenoidi, giberelinska kiselina i mnogi drugi spojevi.

Fenolni spojevi u strukturi sadrže jednu ili više hidroksilnih skupina na aromatskom prstenu, a nastaju najčešće u putu šikimata (šikiminski biosintetski put) pretvorbom jednostavnih ugljikohidrata u aromatske aminokiseline, koje se dalje derivatiziraju do fenolnih spojeva.

Alkaloidi nastaju iz aromatskih ili nekih alifatskih aminokiselina. Sadrže jedan ili više atoma dušika kao dio heterocikličkog prstena. Sintetizirani su iz aminokiselina, primjerice tirozina.

Tanini su fenolni spojevi koji talože bjelančevine. Sintetizirani su putem šikiminske kiseline (fenilpropanoidni put) kojim su sintetizirani i drugi spojevi: izoflavoni, kumarini, lignini i aromatske aminokiseline.

Glikozidi su spojevi koje sadrže aglikon (ne-šećerni dio) i glikon (šećerni dio). Dije se s obzirom na vrstu aglikona i stoga mogu biti: fenoli, alkoholi ili spojevi sumpora. Aglikon i glikon su povezani glikozidnim vezama kojima su monosaharidi povezani u oligosaharide ili polisaharide koje biljke obično skladište, a aktiviraju se djelovanjem hidrolaza koje cijepaju glikozidne veze.

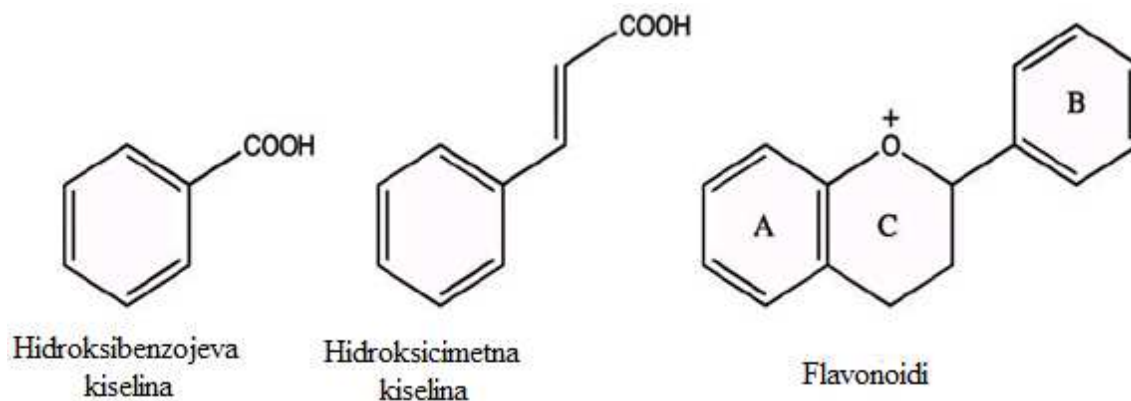
Tanini su glikozidi čiji je aglikon terpenoidne ili steroidne strukture. Na kraju šećernog dijela molekule se nalaze lipofilni šećeri koji im daju sposobnost smanjivanja napetosti površine. Zbog toga se na membranama i koži stvara, za detergente karakterističan, efekt pjene (11, 12).

## 1.2. Fenoli i flavonoidi

Fenoli su vjerojatno najveća grupa sekundarnih metabolita biljaka. Po strukturi se kreću od najjednostavnijih s jednim aromatskim prstenom do složenih policikličkih spojeva. Stoga fenoli uključuju jednostavne fenole (hidroksibenzojeve kiseline), fenolne kiseline, hidroksicimetne kiseline i flavonoide (Slika 2.). Svi navedeni spojevi su biološki aktivne tvari s antioksidacijskim, protuupalnim, antidijabetičkim, antivirusnim, antioksidacijskim, citotoksičnim i drugim svojstvima.

Flavonoidi imaju zajedničku  $C_6 - C_3 - C_6$  strukturu sačinjenu od 3 prstena. Prsten A i B su aromatski, a C je heterociklični prsten koji posjeduje kisikov atom (Slika 2.). Flavonoidi se dijele u 6 podskupina: flavoni, flavanoli, flavanoni, izoflavoni, flavan-3-oli i flavanoli.

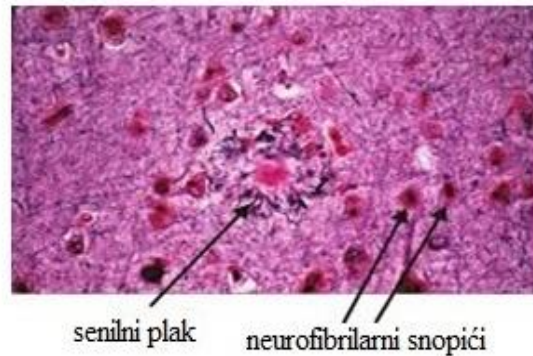
Kapacitet antioksidacijskog djelovanja flavonoida ovisi o njihovoj strukturi, primarno položaju slobodnih hidroksilnih skupina i ostalih supstituenata na molekuli (13, 14).



**Slika 2.** Prikaz strukturnih oblika fenolnih spojeva i flavonoida (15)

### 1.3. Alzheimerova demencija

Alzheimerova demencija (AD) je progresivna neurodegenerativna bolest ujedno i najčešći uzrok demencije. Prema izvješću iz 2016. broj oboljelih diljem svijeta je viši od 46 milijuna ljudi. Starenje populacije će dalje povećavati ovaj problem i dovesti do znatnog povećanja broja oboljelih od AD. Predviđeno je da će se broj oboljelih udvostručiti gotovo svakih 20 godina, što bi značilo da će 2030. biti više od 74 milijuna oboljelih, a 2050. godine više od 131 milijuna oboljelih. AD je postala treći uzrok invaliditeta i smrtnosti u zreloj životnoj dobi iza kardiovaskularnih ili cerebrovaskularnih bolesti i malignih tumora (16). Bolest je klinički karakterizirana pogoršanjem kognitivnih i funkcionalnih sposobnosti praćenih različitim stupnjevima pogoršanja psihijatrijskih i bihevioralnih simptoma pacijenata. Pogoršanje je povezano s značajnim gubitkom neurona i sinapsi, kojima prethode neurokemijske promjene u mozgu kod oboljelih. Mikroskopski gledano dvije patološke promjene su zapažene u mozgu: ekstracelularni neuritički plak i intracelularni neurofibrilarni snopići (Slika 3.).



**Slika 3.** Prikaz patoloških lezija karakterističnih za Alzheimerovu demenciju: senilni plakovi - izvanstaničnih nakupina amiloid- $\beta$  peptida ( $A\beta$ ) i neurofibrilarnih snopića - unutarstaničnih nakupina hiperfosforiliranog proteina  $\tau$  (17)

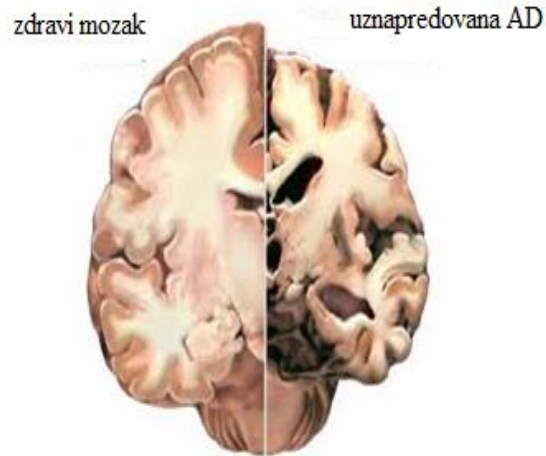
Objekti svojstvene neuropatologije se smatraju obilježjem Alzheimerove bolesti, a rezultat su abnormalnog nakupljanja bjelančevina. Neuritički plak je najvećim dijelom nastao nakupljanjem  $\beta$ -amiloida, koji se oslobađa u ekstracelularni prostor zbog metaboličkih promjena na prekursoru bjelančevine  $\beta$ -amiloida. Neurofibrilarni snopići, koji nastaju unutar neurona, uglavnom su sastavljeni od  $\tau$  bjelančevine koja je dio citoskeleta. Proces nakupljanja je vjerojatno pokrenut abnormalnom fosforilacijom bjelančevine  $\tau$ . Uglavnom prevladava mišljenje da je poremećeni metabolizam prekursorske bjelančevine  $\beta$ -amiloida i nepravilno nastajanje bjelančevine  $\beta$ -amiloida središnji događaj u patogenezi Alzheimerove demencije, te da određenim putem vodi do  $\tau$  i neurofibrilarne patologije. Hipoteza koja objedinjuje ove zaključke je amiloidna kaskadna hipoteza (18).

#### 1.4. Kolinergična hipoteza Alzheimerove bolesti

Acetilholin (ACh) je važan neuroprijenosnik koji utječe na kolinergične neurone i uključen je u kritične psihološke procese kao što su: pažnja, učenje, pamćenje, odgovor na stres, izmjena sna i budnosti, te informacije percipirane osjetilima (19).

Kolinergičnoj teoriji postavljeni su temelji 70-ih i 80-ih godina 20. stoljeća kad su neuropatolozi istraživali tkiva mozga preminulih osoba oboljelih od AD (Slika 4.). Pronađen je specifičan nedostatak kolinergične transmisije od prednjih bazalnih ganglija do Meyertovih bazalnih jegara, korteksa i hipokampusu. U korteksu i hipokampusu je također pronađen manjak acetilholin transferaze, enzima odgovorna za sintezu acetilkolina i pouzdanog markera

kolinergičnih neurona i sinapsi. Nadalje, pronađeno je i smanjenje depolarizacijom inducirano otpuštanja acetilkolina i unos samog prijenosnika u živčane završetke u tkivima oboljelih (20).



**Slika 4.** Prikaz propadanja moždane mase kod oboljelih od Alzheimerove demencije u uznapredovaloj fazi bolesti (21)

Kolinergična hipoteza je osigurala temelje za traženje terapijske učinkovitosti putem kolinergika. Do sada su prema znanstvenim istraživanjima jedini uvjerljivi dokazi o zadovoljavajućoj razini učinkovitosti i pouzdanosti zajedno s prihvatljivim nuspojavama pokazali inhibitori enzima acetilkolinesteraze (takrin, donepezil, rivastigmin i galantamin) (22).

Druga kolinesteraza koja se nalazi u središnjem žičanom sustavu je butirilkolinesteraza (BChE) koja čini 20% ukupne kolinesterazne aktivnosti u mozgu pod normalnim uvjetima. Butirilkolinesteraza (BChE) se naziva i pseudokolinesteraza. U organizmu djeluje kao zaštita AChE od inhibicijskih utjecaja. BChE može hidrolizirati acetilkolin u sinapsi, a osim toga ima ulogu u metabolizmu lipida, lipoproteina, te u diferencijaciji i rastu živčanog tkiva. U većim količinama prisutna je u centralnom i perifernom živčanom sustavu, cerebralnoj tekućini, crijevima, plućima, gušterači i jetri. Primijećeno je da se progresijom AD povećava aktivnost BChE, što vodi do hipoteze da je BChE korisna meta u kasnoj fazi AD. Još jedna prednost BChE nad AChE je činjenica da nema utjecaj na periferiji i parasimpatičkom autonomnom živčanom sustavu (23, 24).

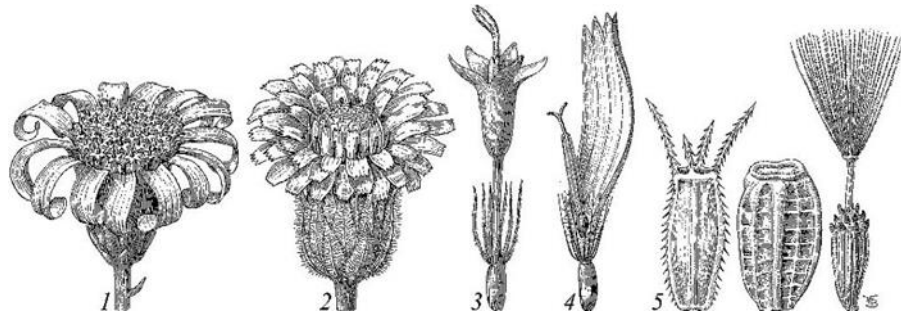
## 1.5. Inzulinska rezistencija i inhibitori $\alpha$ -glukozidaze u Alzheimerovoj demenciji

Još jedan degenerativni mehanizam koji postoji u mozgu je dijabetes i inzulinska rezistencija koji također dovode do veće izloženosti oksidacijskom stresu te neurodegenerativnih promjena. Oksidacijski stres je definiran kao neravnoteža u proizvodnji visoko reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) ili dušikovih spojeva (NOS) i sposobnosti stanice da ih neutralizira antioksidacijskom obranom (25). Mozak je znatno izložen oksidacijskom stresu zbog velikih energetskehtkih zahtjeva, velikog iskorištavanja kisika, velikoj količini polinezasićenih masnih kiselina i relativno malog broja enzima s antioksidacijskim djelovanjem (26). Inzulin kontrolira sinapse i neurone u mozgu te njegov manjak često dovodi do istodobnog obolijevanja od AD i dijabetesa. Ovu tvrdnju dodatno potkrjepljuje činjenica da je hipometabolizam glukoze rani patološki proces u prodormalnoj fazi AD. Neurotoksični  $A\beta$  se nakuplja u dijelovima mozga u kojima se nakuplja i inzulin. Sam  $A\beta$  pridonosi inzulinskoj rezistenciji i tako čini začarani krug oksidacijskog stresa i upalnog procesa u moždanom tkivu (27, 28). Jedan od mehanizama liječenja dijabetesa je usporavanje apsorpcije glukoze preko inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze u probavnom sustavu.  $\alpha$ -Glukozidaza je enzim koji katalizira hidrolizu  $\alpha$ -glikozidne veze i time je ključan za katalizu završnog koraka katabolizma ugljikohidrata u crijevima. Supstrati enzimu su, ovisno o specifičnosti, oligosaharidi i polisaharidi. Hidrolizom  $\alpha$ -glikozidne veze u supstratima dolazi do oslobađanja *D*-glukoze iz hrane i njene apsorpcije u krvotok. Sam enzim je široko rasprostranjen u mikroorganizmima, biljkama i životinjskim tkivima. Inhibicijom enzima dolazi do smanjenja postprandijalnih razina glukoze u krvi nakon obroka bogatog ugljikohidratima (29, 30, 31).

## 1.6. Biljke roda *Centaurea*

*Centaurea* (zečina ili rasličak) je rod koji pripada najrasprostranjenijoj porodici Asteraceae (glavočike). Glavočike su jedina porodica reda Asterales i broje više od 1000 rodova i preko 20000 pretežito zeljastih vrsta, rjeđe polugrmova i drveta. Cvjetovi su im najčešće sakupljeni u glavičaste cvatove koji često izgledaju kao pojedinačni cvijet, pa se stoga nazivaju lažnim cvjetovima. Cvjetovi glavočika u jednoj glavici su svi međusobno jednaki ili se razlikuju, a po obliku sulatičnog vjenčića su cjevasti ili jezičasti. Cvat može imati samo jezičaste, samo cjevaste ili i jezičaste i cjevaste cvjetove (Slika 5.). Porodici glavočika

pripadaju mnoge jestive, ljekovite, industrijske i ukrasne biljke (npr. kamilica, stolisnik, moravka, podbjel, pelin, cikorija, suncokret, obična salata, krizanteme) (32, 33).



**Slika 5.** Porodica Asteraceae (glavočike), 1. glavica s cjevastim i jezičastim cvjetovima, 2. glavica sa samim jezičastim cvjetovima, 3. cjevasti cvijet, 4. jezičasti cvijet, 5. različite roške (34)

Rod zečina (*Centaurea*) jedan je od najvećih i najkompleksnijih rodova porodice Asteraceae koji obuhvaća oko 400 vrsta diljem svijeta. Vrste roda zečina uglavnom su jednogodišnje ili višegodišnje trave, rjeđe patuljasti grmovi. Listovi su im cjeloviti ili perasto razdijeljeni. Na stabljici je prisutna jedna ili više cvjetnih glavica u skupinama od dvije do tri smještene na vršnim ograncima stabljike i čine cvat. Ovoj je cvjetnih glavica cilindričan ili okrugao, a pricvjetni listići često imaju resasti ili trnovit privjesak. Unutarnji cvjetovi glavice su dvospolni, a rubni neplodni. Plodovi zečine najčešće imaju papus koji u većine vrsta ostane na biljci, dok u manjeg broja vrsta otpadne. Papus čine dva ili više redova grubih do perastih dlaka ili ljusaka koje mogu biti ovalne do linearne. Red koji se nalazi u samoj unutrašnjosti najkraći je, te su ljuške ili dlake koje ga tvore često donjim dijelom međusobno srasle i obično se razlikuju oblikom i teksturom od onih koje se nalaze u vanjskim redovima. Vanjski redovi dlaka (ljusaka) preklapaju jedan drugog (35).

Farmakološka i fitokemijska ispitivanja velikog broja vrsta roda *Centaurea* su pokazala njihovo antioksidacijsko, anitimikrobno i antipiretičko djelovanje. Fenoli, flavonoidi i drugi spojevi prisutni u biljkama su otkriveni kao potencijalni antioksidansi, antikarcinogeni i protuupalni spojevi (36, 37).



## 1.7. Metode kvalitativnih određivanja

Fitokemijski pregled kojim se detektira prisutnost pojedinih klasa spojeva u ekstraktima biljnih vrsta koristi se jednostavnim taložnim ili obojenim reakcijama. Reakcijama se kvalitativno mogu dokazati sekundarni biljni metaboliti: fenolni spojevi, flavonoidi, alkaloidi, tanini, steroidi, terpenoidi, glikozidi i saponini (38).

## 1.8. Metode kvantitativnih određivanja

Za određivanje sadržaja pojedinih sekundarnih metabolita biljaka, kao fenola, flavonoida, tanina i dr. koriste se spektrofotometrijske tehnike.

### 1.8.1. Metoda određivanja sadržaja ukupnih fenola, Folin-Ciocalteu metoda

Folin- Ciocalteu metoda je najčešće korištena *in vitro* kolorimetrijska metoda određivanja koncentracije ukupnih fenola u različitim uzorcima. Reakcijom Folin- Ciocalteu reagensa i fenola dolazi do stvaranja relativno stabilnog plavo obojenog kompleksa čija se apsorbanacija mjeri spektrofotometrijski pri  $\lambda = 760$  nm. Sam reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline koja u blago alkalnom mediju s fenolima tvori plavo obojeni kompleks (39).

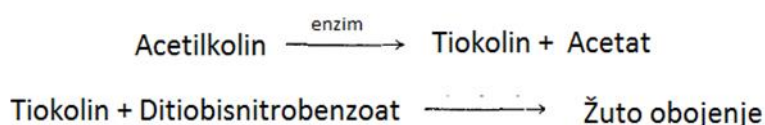
### 1.8.2. Metoda određivanja sadržaja ukupnih flavonoida, metoda s aluminiјevim(III) kloridom

Metoda određivanja ukupnog sadržaja flavonoida aluminiјevim(III) kloridom je kolorimetrijska metoda određivanja. Aluminiјev(III) klorid tvori kompleks s flavonoidima ukoliko su prisutni.  $\text{AlCl}_3$  u kiselom mediju tvori stabilne komplekse s C-4 keto skupinom, C-3 ili C-5 hidroksilnom skupinom flavona ili flavanola. Nadalje,  $\text{AlCl}_3$  može, u kiselom mediju, tvoriti labilne komplekse s hidroksilnim skupinama A ili B pstena flavonoida. Ukoliko se stvori kompleks reakcijska smjesa poprima žutu boju i mjeri se apsorbanacija pri  $\lambda = 415$  nm (40).

## 1.9. Metode ispitivanja bioloških potencijala biljnih ekstrakata

### 1.9.1. Metoda određivanja sposobnosti inhibicije enzima kolinesteraza, metoda po Ellmanu

Sposobnost neke čiste tvari ili smjese da inhibira kolinesteraze, acetilkolinesterazu (AChE) i butirilkolinesterazu (BChE), najčešće se ispituje spektrofotometrijski, metodom po Ellmanu. Enzimsku aktivnost mjeri se prateći povećanje koncentracije žutog obojenja nastalog tiokolina koji stupa u reakciju s tionitrobenzoat ionom (DTNB).



Ellmanov reagens 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina (DTNB) se koristi za određivanje broja ili koncentracije tiolnih skupina u uzorku. Tioli reagiraju s DTNB-om i nastaje 2-nitro-5 merkaptobenzojeva kiselina (TNB), koja zatim u vodi ionizira u TNB- ion kod neutralnog ili alkalnog pH. Oslobođeni TNB- ion je intenzivno žute boje. Količina oslobođenog TNB- se mjeri pri  $\lambda = 412 \text{ nm}$ .

Sposobnost inhibicije iskazuje se:

$$\% \text{ inhibicije} = \left( \frac{A_k - A_u}{A_k} \right) \times 100 ,$$

Gdje je  $A_k$  – apsorbancija kontrolnog uzorka;  $A_u$  – apsorbancija ispitivanog uzorka (41).

### 1.9.2. Metoda određivanja sposobnosti inhibicije enzima $\alpha$ -glukozidaze, metoda po Sigma-Aldrichu

Sigma-Aldrich je biološka metoda određivanja inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze. Enzim koji se koristi je  $\alpha$ -glukozidaza koja hidrolizira supstrat (4-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranozid ( $p$ NGP)) i prilikom te reakcije se oslobađa  $p$ -nitrofenol. Količina oslobođenog  $p$ -nitrofenola se detektira pri  $\lambda = 412 \text{ nm}$  (42).

## 2.0. Spektrofotometrijske metode

Spektrometrijske metode su one kojima se mjeri sposobnost tvari da apsorbira, reflektira i emitira zračenje. Prilikom prolaska elektromagnetskog zračenja kroz uzorak dolazi do apsorpcije ili emisije zračenja, ovisno o samoj strukturi tvari kroz koju zračenje prolazi kao i o njegovoj frekvenciji. Iz toga proizlazi da energija elektromagnetskog zračenja apsorpcijom može dati energiju molekuli koja je apsorbira. Jedan od najčešće korištenih spektrofotometrijskih instrumenata je spektrofotometar. Spektrofotometar mjeri količinu svjetla koju molekula apsorbira, mjereći intenzitet svjetla koje prolazi kroz uzorak smjese. Uz pomoć ovog uređaja moguće je odrediti koncentraciju proučavanih tvari (41).

Kod spektrofotometrijskih mjerenja važna su dva pojma kojima se opisuju svojstva tvari, a to su transmitacija (T) i apsorbancija (A). Transmitacija otopine (T) definira se kao dio upadnog zračenja koji je prošao kroz otopinu:

$$T = P / P_0$$

gdje je  $P_0$  - ulazna snaga zračenja,

$P$  - snaga zračenja nakon apsorpcije.

Apsorbancija otopine (A) definira se kao logaritamski odnos zračenja koje je prošlo kroz otopinu ( $P_0$ ) i upadnog zračenja (P):

$$A = \log (P_0 / P)$$

Lambert-Beerov zakon predstavlja funkcijski odnos kvantiteta apsorbcije i koncentracije vrste koja apsorbira elektromagnetsko zračenje:

$$A = abc$$

gdje je  $a$  - apsorptivnost (apsorpcijski koeficijent),  $b$  - duljina puta zračenja kroz uzorak,  $c$  - koncentracija apsorbirajuće vrste (43).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti kemijski i biološki profil hidrolata biljaka roda *Centaurea*: *C. rhenana*, *C. scabiosa*, *C. triumfetti*, *C. ragusina* i *C. alba*. Kemijski profil hidrolata odrediti će se kvalitativnim dokazivanjem prisutnosti pojedinih sekundarnih metabolita te kvantitativnim određivanjem sadržaja ukupnih fenolnih i ukupnih flavonoidnih komponenti hidrolata. Kvalitativno dokazivanje sekundarnih metabolita odrediti će se prema protokolu Guettafa i suradnika, sadržaj ukupnih fenola odrediti će se metodom po Folin-Ciocalteu, dok će se sadržaj ukupnih flavonoidnih spojeva odrediti metodom s aluminijevim(III) kloridom. Biološki potencijal hidrolata biljaka roda *Centaurea* ispitati će se u smislu inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE), butirilkolinesteraze (BChE) i  $\alpha$ -glukozidaze, enzima važnih u tretmanu Alzheimerove demencije i šećerne bolesti. Sposobnost hidrolata da inhibiraju enzim AChE i BChE ispitati će se metodom po Ellmanu, dok će se njihova sposobnost da inhibiraju enzim  $\alpha$ -glukozidazu ispitati metodom po Sigma-Aldrichu.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Biljni materijal

#### 3.1.1. *Centaurea rhenana* L.

*C. Rhenana* (rajnska zečina) je kratkotrajna višegodišnja vrsta jako čvrstog korijena, dlakave stabljike ili paučinstih dlaka dok je mlada. Stabljika naraste od 20 do 150 cm (Slika 6.). Raste uz rijeke, jezera, na ravnicama ili uz ceste.

Porijeklom je iz jugoistočne Europe, ali zbog spomenutog jakog korijena se lako rasprostranila na sjever. Brzo zauzme novo stanište i istiskuje druge vrste na barem tri načina:

- 1) njen korijen upija vodu brže od ostalih biljaka;
- 2) brzo se rasprostranjuje zbog brze proizvodnje sjemena;
- 3) manja je vjerojatnost da će biti hrana za biljojede pored ostalih vrsta.

Također se predviđa da istiskuje druge vrste na staništu, jer ispušta toksine iz korijena koji zaustavljaju rast susjednih biljaka (44).



**Slika 6.** *Centaurea rhenana* (45)

### 3.1.2. *Centaurea scabiosa* L.

*C. scabiosa* (velika zečina) je trajna zeljasta biljka. Stabljika je uspravna, uglasta, izbrazdano hrapava, u gornjem dijelu razgranata. Raste u visinu od 30 do 150 cm. Podanak je snažan i skoro odrvenio. Listovi su s obje strane, perasto razdijeljeni na lancetaste režnjeve (Slika 7.). Cvjetovi su purpurni i skupljeni u glavice na vrhu stabljika u promjeru od 3 do 5 cm. Cvate u srpnju i kolovozu.

Rasprostranjena je u Europi, a raste na suhim livadama i pašnjacima na rahlom tlu do pretplaninskog pojasa (46).



**Slika 7.** *Centaurea scabiosa* (47)



### 3.1.3. *Centaurea triumfettii* All.

*C. triumfettii* (gorska zečina) je zeljasta višegodišnja biljka. Stabljika naraste od 30 do 60 cm. Listovi su nepodijeljeni i lancelasti. Cvjetovi su ljubičaste boje u unutrašnjosti i azurno plave do svjetlo ljubičaste izvana (Slika 8.). *C. triumfettii* cvate u razdoblju od svibnja do kolovoza.

Rasprostranjena je u južnoj i srednjoj Europi. Stanište koje preferira su osunčana područja u listopadnim grmovima na subalpskim travnjacima i livadama. Vrsta uspijeva na staništima i do 2000 m nadmorske visine (48).



**Slika 8.** *Centaurea triumfettii* (49)

### 3.1.4. *Centaurea ragusina* L.

*C. ragusina* (dubrovačka zečina) je od 1969. godine zaštićena kao endemska vrsta na svim staništima. Stabljika je upravna ili pridignuta i uglata. Naraste od 30 do 60 cm u visinu, te pri vrhu stabljike ima jednu do tri cvjetne glavice koje su pri dnu odrvenjele i bijelo vunaste. Cvjetovi su žute boje, a listovi su perasto razdijeljeni. Glavice su okruglaste i promjera od 20 do 25 mm. Plod je roška duga 4-5 mm i oko 1,5 mm široka. Valjkasta je, sivkasta, prekrivena poleglim, svilenkastim dlačicama (Slika 9.).

Raste u pukotinama karbonatnih stijena koje se okomito izdižu iznad mora (50).



**Slika 9.** *Centaurea ragusina* (51)

### 3.1.5. *Centaurea alba* L.

*C. alba* (bijela zečina) je dvogodišnja zeljasta biljka. Stabljika se metličasto grana od sredine i raste do 60 cm u visinu. Listovi su zeleni s malo dlaka i perasto podijeljeni u lancetaste režnjeve. Cvjetovi su cjevasti bijele i ružičaste boje. Središnji cvjetovi su dvospolni, dok su rubni sterilni. Cvat je promjera od 11 do 12 mm i jajastog je oblika (Slika 10.). Vrijeme cvatnje je od lipnja do kolovoza.

Stanište na koje *C. alba* zauzima je sušno, kamenjarsko područje, te područja uz ceste diljem Europe (52).



**Slika 10.** *Centaurea alba* (53)

### 3.2. Priprema uzorka

U ovom radu korišteni su hidrolati biljaka roda *Centaurea*: *C. rhenana* (Pasjača, Konavli), *C. scabiosa* (Biokovo, Vošac), *C. triumphettii* (Tijarica, Doci), *C. ragusina* (Marjan, Split) i *C. alba* (Međugorje) koje su sabrane na području Splitsko-dalmatinske županije i Bosne i Hercegovine u proljeće 2018. godine.

Hidrolati su dobiveni kao ekstrakti zaostali nakon hidrodestilacije (metoda po Clevengeru, slika 10.) eteričnih ulja navedenih biljnih vrsta. Hidrolati su profiltrirani i liofilizirani u aparturi za liofilizaciju. Iz liofiliziranih hidrolata su pripremljene vodene otopine uzoraka biljaka roda *Centaurea* koncentracije 1 mg/mL.



**Slika 11.** Hidrodestilacija uzorka, aparatura po Clevengeru

### **3.3. Kvalitativno dokazivanje pojedinih klasa spojeva ekstrakata**

Izolirani hidrolati biljaka roda *Centaurea* kvalitativno su ispitani na prisutnost alkaloidnih, taninskih, steroidnih, terpenoidnih, glikozidnih i saponinskih sastojaka smjese.

#### **3.3.1. Kvalitativno dokazivanje alkaloida u ekstraktu**

Za određivanje sadržaja alkaloidnih komponenti ispitanih hidrolata, u epruvetu u koju je dodano 3 mL heksana dodaje se 0,2 g uzorka. Smjesa je dobro promućkana i filtrirana. Zatim je dodano 5 mL 2% HCl. Nakon zagrijavanja epruvete dodano je par kapi pikrinske kiseline. Na dnu epruvete se stvorio žuti talog koji dokazuje prisutnost alkaloida.

#### **3.3.2. Kvalitativno dokazivanje tanina u ekstraktu**

Za određivanje prisutnosti tanina u smjesi pomiješan je 1 mL uzorka s 10 mL destilirane vode. Dodane su nadalje 3 kapljice reagensa željezova(III) klorida. Pojava tamnoplavog do crnog ili zelenog taloga ukazuje na prisutnost tanina u smjesi.

#### **3.3.3. Kvalitativno dokazivanje steroida u ekstraktu**

Za određivanje prisutnosti steroida u smjesi količini od 0,5 g hidrolata je dodano 1 M anhidrid octane kiseline u dva obroka i zatim H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ukoliko su prisutni steroidi boja otopine se mijenja iz ljubičaste u plavu ili zelenu.

#### **3.3.4. Kvalitativno dokazivanje terpenoida u ekstraktu**

Za određivanje prisutnosti terpenoida u smjesi otopini uzorka (5 mL) doda se 2 mL kloroforma te pažljivo 3 mL koncentrirane H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> da nastane sloj na površini. Pojava crvenkasto- smeđeg obojenja među slojevima dokazuje prisutnost terpenoida.

#### **3.3.5. Kvalitativno dokazivanje glikozida u ekstraktu**

Za dokazivanje prisutnosti glikozida u smjesi pomiješa se 4 mL vodene otopine uzorka i 5 mL otopine Fehlingovog reagensa. Epruveta s otopinom se stavi u vruću vodenu kupelj i ostavi 5 minuta. Pojava crvenog taloga zbog nastalog bakrovog oksida dokazuje prisutnost šećera.

### **3.3.6. Kvalitativno dokazivanje saponina u ekstraktu**

Za dokazivanje prisutnosti saponina u smjesi 5 mL vodene otopine uzorka se snažno tresu 2 minuta. Nastala pjena na vrhu otopine uzorka mora biti postojana barem 15 minuta da bi mogli potvrditi postojanje saponina u smjesi.

### **3.4. Kvantitativna određivanja pojedinih klasa spojeva ekstrakta**

U izoliranim hidrolatima biljaka roda *Centaurea* kvantitativno je određen sadržaj ukupnih fenolnih te sadržaj ukupnih flavanoidnih komponenti.

#### **3.4.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola**

Sadržaj ukupnih fenolnih komponenti u hidrolatima je određen metodom po Folin-Ciocalteu. U odmjerne tikvice od 25 mL otpipetirano je po 0,25 mL ekstrakta, te je dodano po 15 mL destilirane vode i 1,25 mL Folin-Ciocalteu reagensa prethodno razrijeđenog s vodom u omjeru 1:2. Pripravljene otopine su dobro promiješane, a potom je u vremenskom intervalu od 3-8 minuta dodano po 3,75 mL 20% otopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Odmjerne tikvice su dopunjene do oznake s destiliranom vodom i inkubirane na sobnoj temperaturi 2 sata. Nakon toga je očitana apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm.

Za izradu krivulje umjeravanja pripravljene su otopine galne kiseline kao standarda u sljedećim koncentracijama: 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Na temelju krivulje umjeravanja očitane su vrijednosti ukupnih fenola u uzorcima, izražene kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po 1 g ekstrakta.



**Slika 12.** Pripremljeni uzorci galne kiseline (gorni red) i uzoraka (donji red)

### **3.4.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida**

Ukupni flavonoidi određeni su metodom s aluminijevim kloridom. U odmjernu tikvicu od 5 mL stavljeno je 0,5 mL otopine uzorka. Dodano je 1,5 mL etanola, 0,1 mL 10%  $\text{AlCl}_3$  i 0,1 mL 1 M  $\text{CH}_3\text{COOK}$ . Smjesi je dodano destilirane vode do 5 mL. Usporedno s pripremom otopina uzorka, pripremljene su i kontrole. Postupak pripreme kontrole je isti osim dodavanja vode umjesto 0,1 mL 10%  $\text{AlCl}_3$ . Nakon inkubacije otopina (30 minuta na sobnoj temperaturi) izmjerene su apsorbancije otopina pri valnoj duljini od 415 nm na spektrofotometru. Kao standard za izradu krivulje umjeravanja korišten je kvercetin u koncentracijama: 50, 75, 100 i 200 mg/L. Na temelju krivulje umjeravanja su očitane vrijednosti ukupnih flavonoida u uzorcima, koje su izražene kao mg ekvivalenta kvercetina (QE) po 1 g ekstrakta.

### **3.5. Ispitivanje bioloških potencijala uzoraka**

Izolirani hidrolati biljaka roda *Centaurea* ispitani su na sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE), butirilkolinesteraze (BChE) te  $\alpha$ -glukozidaze.

### 3.5.1. Određivanje sposobnosti inhibicije kolinesteraza, acetilkolinesteraze (AChE), butirilkolinesteraze (BChE)

Za ispitivanje sposobnosti inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE) hidrolatima biljaka roda *Centaurea* korišten je enzim izoliran iz elektrofora električne jegulje (Tip V-S). Supstrat enzimu je acetiltiolkolin jodid (ATChI).

Za ispitivanje sposobnosti inhibicije enzima butirilkolinesteraza (BChE) hidrolatima biljaka roda *Centaurea* korišten je enzim izoliran iz seruma konja, a kao supstrat je korišten butiriltiokolin jodid (BTChI).

Za mjerenje sposobnosti inhibicije AChE / BChE pripremljene su sljedeće otopine:

- DTNB konačne koncentracije 0,3 mM otapanjem 13,079 mg DTNB u 5 mL pufera pH=7 s 0,12 M NaHCO<sub>3</sub>
- ATChI konačne koncentracije 0,5 mM otapanjem 15,9 mg ATChI u 5 mL pufera pH=8.
- AChE konačne koncentracije 0,03 U/mL 6,6 µL početne otopine enzima (500 U/mL AChE u puferu pH=8) u 5 mL pufera, pH=8.
- BuTChI konačne koncentracije 0,5 mM otapanjem 17,45 mg BuTChI u 5 mL pufera pH=8.
- BChE konačne koncentracije 0,03 U/mL 14 µL početne otopine enzima (240 U/mL BChE u puferu pH=8) u 5 mL pufera pH=8.

**Tablica 1.** Shema eksperimenta

	Kontrola	BL1	BL2	Uzorak	Uzorak BL
Pufer	180	190	190	180	190
DTNB	10	10	10	10	10
Uzorak	10 H <sub>2</sub> O	10 H <sub>2</sub> O	10 H <sub>2</sub> O	10	10
AChE / BChE	10	/	10	10	/
ATChI / BuTChI	10	10	/	10	10

Kontrola = umjesto uzorka dodana je voda u istom volumenu; BL1 BL2 = slijepa proba s obzirom na kontrolu, Uzorak BL = slijepa proba s obzirom na uzorak



Sposobnost inhibicije iskazana je kao:

$$\% \text{ inhibicije} = \left( \frac{A_k - A_u}{A_k} \right) \times 100 ,$$

Gdje je  $A_k$  – apsorbancija kontrolnog uzorka;  $A_u$  – apsorbancija ispitivanog uzorka

### 3.5.2. Sposobnost inhibicije enzima $\alpha$ -glukozidaze

Za ispitivanje sposobnosti hidrolata biljaka roda *Centaurea* da inhibiraju enzim  $\alpha$ -glukozidazu korišten je enzim izoliran iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* tipa I. Za supstrat je korišten 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranozid (*p*NGP).

Za mjerenje sposobnosti inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze korištene su sljedeće otopine:

- Fosfatni pufer; pH = 7 (0,1 i 0,01 M)
- Enzim  $\alpha$ -glukozidaza; 0,1 U/mL (Pripremljena je otopina konc. 1 mg/mL (10 U/mL) u fosfatnom puferu (0,01 M), te razrijeđena u istom puferu na 0, 1 U/mL (uz dodatak BSA konc. 1 mg/mL)
- 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranozid (*p*NGP); 0,5 mM (Otopljeno je 0,1506 g u 100 mL 0,1 M fosfatnog pufera)
- Natrijev karbonat; 0,2 M (Otopljeno je 2,12 g bezvodnog natrijevog karbonata u 100 mL dest. vode)
- 1,2,3,4,6,-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose; 0,5 mg/mL (Otopljeno je 0,5 mg krutine u 1 mL 0,1 M fosfatnog pufera)

Eksperiment je vođen na način da su sve otopine u potrebnom volumenu pomiješane, inkubirane 30 min/37°C, dodana je otopina Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i mjerena je promjena apsorbancije. Enzimatska hidroliza supstrata praćena je količinom *p*-nitrofenola koji se oslobađa i detektira pri valnoj duljini od 412 nm. Za mjerenje je korišten čitač mikrotitarskih pločica (engl. multiplate reader).

**Tablica 2.** Shema eksperimenta

	Kontrola	BL	Uzorak	Uzorak BL
Pufer	60 $\mu$ L	85 $\mu$ L	50 $\mu$ L	75 $\mu$ L
Uzorak	/	/	10 $\mu$ L	25 $\mu$ L
$\alpha$ -glikozidaza	25 $\mu$ L	/	25 $\mu$ L	/
<i>p</i> NGP	25 $\mu$ L	25 $\mu$ L	25 $\mu$ L	10 $\mu$ L
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (nakon 30 min!)	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L

kontrola = umjesto uzorka dodana je voda u istom volumenu; BL= slijepa proba s obzirom na kontrolu; uzorak BL = slijepa proba s obzirom na uzorak

Sposobnost inhibicije iskazana je kao:

$$\% \text{ inhibicije} = \left( \frac{A_k - A_u}{A_k} \right) \times 100 ,$$

Gdje je  $A_k$  – apsorbancija kontrolnog uzorka;  $A_u$  – apsorbancija ispitivanog uzorka

#### **4. REZULTATI**

Kemijski i biološki profil biljaka roda *Centaurea* (*C. rhenana*, *C. scabiosa*, *C. triumfettii*, *C. ragusina*, *C. alba*) određen je na način da su u prethodno izoliranim hidrolatima navedenih biljaka kvalitativno i kvantitativno dokazane pojedine klase spojeva, te je ispitana sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE), butirilkolinesteraze (BChE) te  $\alpha$ -glukozidaze navedenim hidrolatima. Kvalitativno dokazivanje pojedinih klasa spojeva u hidrolatima biljaka provedeno je prema protokolu Guettafa i suradnika (54). Kvantitativno je u hidrolatima dokazan ukupni sadržaj fenolnih spojeva, metodom po Folin-Ciocalteu (55) te flavonoidnih komponenti, metodom s aluminijskim(III) kloridom (56). Sposobnost inhibicije enzima kolinesteraza, AChE i BChE, ispitana je metodom po Ellmanu (57), dok je sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze ispitana Sigma-Aldrich metodom (58).

#### 4.1. Kvalitativna određivanja pojedinih klasa spojeva u hidrolatima biljaka roda *Centaurea*

U hidrolatima biljaka roda *Centaurea* kvalitativno je dokazana prisutnost sljedećih klasa spojeva: alkaloida, tanina, steroida, terpenoida, glikozida i saponina. Rezultati su prikazani Tablicom 3.

**Tablica 3.** Postojanje pojedinih klasa spojeva u hidrolatima biljaka roda *Centaurea*

	Alkaloidi	Tanini	Steroidi	Terpenoidi	Glikozidi	Saponini
<i>C. rhenana</i>	-	-	-	-	+	+
<i>C. scabiosa</i>	-	-	-	-	+	+
<i>C. triumfettii</i>	-	-	-	-	+	+
<i>C. ragusina</i>	-	-	-	-	+	+
<i>C. alba</i>	-	-	-	-	+	+

## 4.2. Kvantitativna određivanja

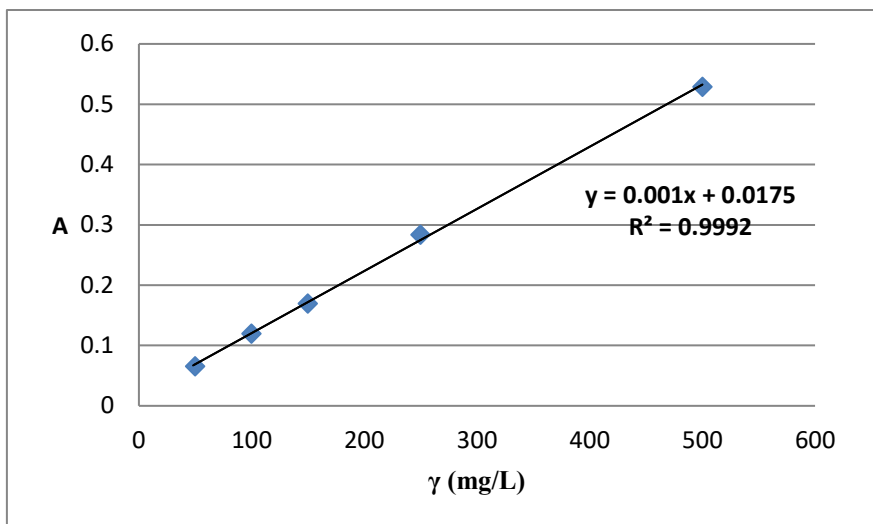
U hidrolatima biljaka roda *Centaurea* određen je ukupni sadržaj fenolnih i ukupni sadržaj flavonoidnih komponenti.

### 4.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Ukupan sadržaj fenola u hidrolatima biljaka roda *Centaurea* određen je Folin-Ciocalteu metodom. Početne koncentracije hidrolata bile su 1 mg/mL, a kao standard korištena je otopina galne kiseline (GA). Sadržaj ukupnih fenolnih komponenti u uzorcima hidrolata određen je spektrofotometrijski kod valne dužine  $\lambda = 765$  nm. Rezultati su iskazani kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po 1 g ekstrakta. Rezultati su prikazani u Tablicama 4 i 5. i Slikom 13..

**Tablica 4.** Vrijednosti apsorbancije za pripadajuće koncentracije galne kiseline (potrebno za izradu krivulje umjeravanja).

galna kiselina $\gamma$ ( mg/L)	Apsorbancija (A)
50	0,066
100	0,120
150	0,170
250	0,284
500	0,529



**Slika 13.** Krivulja umjeravanja za određivanje sadržaja ukupnih fenola u uzorku

**Tablica 5.** Ukupan sadržaj fenola u hidrolatima biljaka roda *Centaurea*

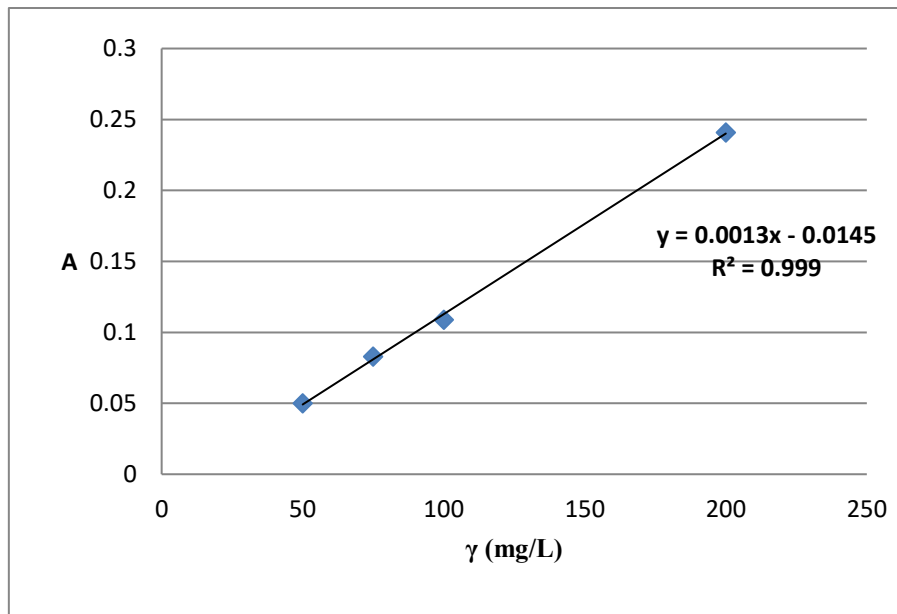
Uzorci	Apsorbancija (A)	mg GAE / g hidrolata
<i>C. rhenana</i>	0,052	34,5
<i>C. scabiosa</i>	0,063	45,5
<i>C. triumfettii</i>	0,078	60,5
<i>C. ragusina</i>	0,072	54,5
<i>C. alba</i>	0,101	83,5

#### 4.2.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Ukupan sadržaj flavonoida u hidrolatima biljaka roda *Centaurea* određen je metodom s aluminijevim(III) kloridom. Početne koncentracije hidrolata bile su 1 mg/mL, a kao standard korištena je otopina kvercetina. Sadržaj ukupnih flavonoidnih komponenti u uzorcima hidrolata određen je spektrofotometrijski kod valne dužine  $\lambda = 415$  nm. Rezultati su iskazani kao mg ekvivalenta kvercetina (QE) po 1 g ekstrakta. Rezultati su prikazani Tablicom 6. i 7. i Slikom 14..

**Tablica 6.** Vrijednosti apsorbancije za pripadajuće koncentracije kvercetina (potrebno za izradu krivulje umjeravanja).

Kvercetin $\gamma$ (mg/L)	Apsorbancija (A)
50	0,050
75	0,083
100	0,104
200	0,241



**Slika 14.** Krivulja umjeravanja za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u uzorku

**Tablica 7.** Ukupan sadržaj flavonoida u hidrolatima biljaka roda *Centaurea*

Uzorak	Apsorpcija (A)	mg QE / g hidrolata
<i>C. rhenana</i>	0,07	65,0
<i>C. scabiosa</i>	0,172	143,5
<i>C. triumfettii</i>	0,182	94,2
<i>C. ragusina</i>	0,095	84,2
<i>C. alba</i>	0,066	61,9



### 4.3. Ispitivanje biološkog potencijala hidrolata biljaka roda *Centaurea*

Izolirani hidrolati biljaka roda *Centaurea* ispitani su na sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE), butirilkolinesteraze (BChE) te  $\alpha$ -glukozidaze. Sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE) ispitana je metodom po Ellmanu, dok je sposobnost inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze ispitana Sigma-Aldrich metodom. Za ispitivanje su korišteni uzorci koncentracije osnovne otopine 1 mg/mL. Koncentracije uzoraka u reakcijskom sustavu bile su 22 (inhibicija AChE) ili 23 (inhibicija  $\alpha$ -glukozidaze) puta niže. Rezultati su prikazani Tablicom 8. i Slikom 15.

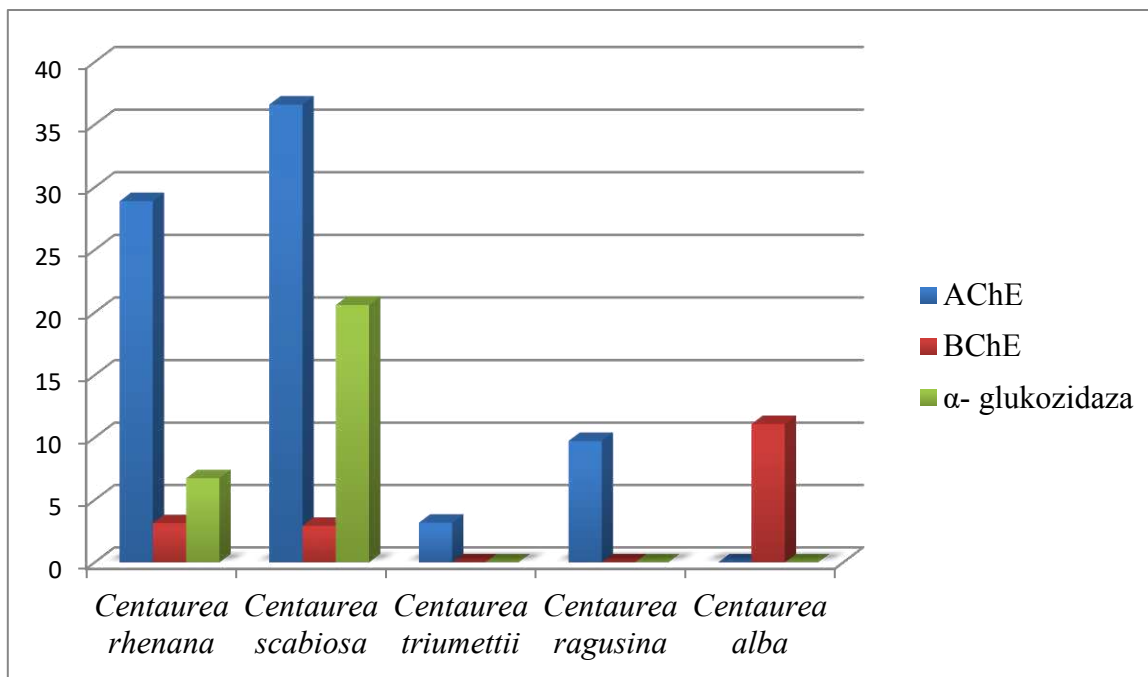
**Tablica 8.** Sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE), butirilkolinesteraze (BChE) i  $\alpha$ -glikozidaze hidrolatima biljaka roda *Centaurea*

	AChE % inh.	BChE % inh.	$\alpha$ -glukozidaza % inh.
<i>C. rhenana</i> *	28,9 %	3,1%	6,7%
<i>C. scabiosa</i> *	36,6 %	2,9%	20,6%
<i>C. triumfettii</i> *	3,2 %	-	-
<i>C. ragusina</i> *	9,7 %	-	-
<i>C. alba</i> *	-	11,1%	-
Galantamin**	78,56%,	40,87%.	/
Akarboza*	/	/	44,16 %

\*Ispitane koncentracije osnovnih otopina 1 mg/mL; ispitane koncentracije u reakcijskom sustavu 45,45  $\mu$ g/mL (inhibicija ChE) i 43,47  $\mu$ g/mL.

\*\*Koncentracija 5  $\mu$ g/mL

- = ne pokazuje inhibiciju



**Slika 15.** Histogramski prikaz sposobnosti inhibicije enzima AChE, BChE i  $\alpha$ -glukozidaze hidrolatima biljaka roda *Centaurea*.

## **5. RASPRAVA**

Sekundarni biljni metaboliti imaju važne funkcije, a osobito fenolni spojevi s dokazanim brojnim aktivnostima, kao antioksidacijska, antikancerogena i antiinflamatorna. (59). Iz razloga brojnih potencijalno terapijskih primjena biljaka veoma je važno istražiti njihov kemijski sastav te istražiti biološki potencijal. Osobito je važno kvantificirati sadržaj fenolnih komponenti pojedinih metabolita te procijeniti njihov doprinos inhibicijskom djelovanju enzima.

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti kemijski i biološki profil hidrolata biljaka roda *Centaurea*: *C. rhenana*, *C. scabiosa*, *C. triumfettii*, *C. ragusina* i *C. alba*. Kemijski profil hidrolata određen je kroz kvalitativno dokazivanje prisutnosti pojedinih sekundarnih metabolita te kroz kvantitativno određivanje sadržaja ukupni fenolnih i ukupnih flavonoidnih komponenti hidrolata. Biološki potencijal hidrolata biljaka roda *Centaurea* ispitan je u smislu inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE), butirilkolinesteraze (BChE) i  $\alpha$ -glukozidaze.

U hidrolatima biljaka roda *Centaurea*: *C. rhenana*, *C. scabiosa*, *C. triumfettii*, *C. ragusina* i *C. alba* jednostavnim analitičkim metodama kvalitativno je dokazana prisutnost glikozida i saponina, dok nije dokazana prisutnost alkaloida, tanina, steroida i terpenoida. Rezultati su prikazani Tablicom 3.

U hidrolatima biljaka roda *Centaurea* određen je ukupni sadržaj fenolnih i ukupni sadržaj flavonoidnih komponenti Tablicama 4.-7. te Slikama 13 i 14.. Rezultati su pokazali da svi uzorci sadrže relativno mali sadržaj fenolnih spojeva u hidrolatima; 34,5 - 83,5 mg GAE/g ekstrakta. Najveći sadržaj fenolnih spojeva sadržan je u hidrolatu biljke *C. alba*, dok je najmanji sadržaj sadržan u hidrolatu biljke *C. rhenana*. Jednako, rezultati su pokazali da ispitani hidrolati sadrže relativno mali sadržaj flavanoidnih komponenti, 61,9 - 143,5 mg QE/g ekstrakta. Najveći sadržaj flavonoida je sadržan u hidrolatu biljke *C. scabiosa*, dok je najmanji u onom biljke *C. alba*.

Ove vrijednosti su slične onim za prethodno objavljene vrijednosti ukupnih fenola za ekstrakte drugih vrsta roda *Centaurea*, kao *C. depressa*, *C. drabifolia subsp. detonsa*, *C. kotschyi var. persica*, *C. patula*, *C. pulchella*, *C. tchihacheffii*, *C. triumfettii* i *C. urvillei subsp. hayekiana* (60). Etil-acetatni ekstrakt biljke *C. triumfetti* sadrži 90,29 mg GAE/g ekstrakta, dok ostali etil-acetatni ekstrakti ovih biljaka sadrže 48,07 - 100,22 mg GAE/g ekstrakta. Kloroformni ekstrakt biljke *C. triumfetti* sadrži 49,19 mg GAE/g ekstrakta, dok ostali kloroformni ekstrakti ovih biljaka sadrže 27,36 - 119,23 mg GAE/g ekstrakta. Jednako, ove vrijednosti dobivene za sadržaj ukupnih flavonoidnih komponenti hidrolata ispitanih biljaka



*urvillei* subsp. *Hayekiana*) pokazuju dosta bolju sposobnost inhibicije ovih enzima kod ispitane koncentracije od 2 mg/mL (63). Etil-acetatni ekstrakt biljke *C. triumfettii* inhibira AChE s 70,15%, dok kloroformni ekstrakt iste biljke inhibira AChE s 60,04%. Etil-acetatni ekstrakti drugih vrsta *Centaurea* inhibiraju AChE s 66,53 do 76,08%, dok kloroformni ekstrakti inhibiraju AChE s 67,27 do 95,93%. Etil-acetatni ekstrakt biljke *C. triumfettii* inhibira pak BChE s 50,11 %, dok kloroformni ekstrakt iste biljke inhibira BChE s 63,37%. Etil-acetatni ekstrakti drugih vrsta *Centaurea* inhibiraju BChE s 46,70 do 85,23%, dok kloroformni ekstrakti inhibiraju BChE s 43,94 do 95,69%.

Uzorak hidrolata biljke *C. scabiosa*, ispitan ovim radom, zamjetnom sposobnosti inhibira enzim  $\alpha$ -glukozidazu (20,6%), uzorak hidrolata biljke *C. rhenana* slabo inhibira enzim  $\alpha$ -glukozidazu (6,7%), dok uzorci ostalih ispitanih hidrolata ne inhibiraju ovaj enzim, Tablica 8., Slika 15. Za procjenu sposobnosti inhibicije ovog enzima uzet je poznato dobar inhibitor  $\alpha$ -glukozidaze, akarboza, kao referentna tvar, koji u istoj ispitanoj koncentraciji od 1 mg/mL inhibira enzim s 44,16 % (63).

Etil-acetatni i kloroformni ekstrakti biljaka roda *Centaurea* rađeni od strane Zengina i sur. (63), pokazali su da etil-acetatni i kloroformni ekstrakti *Centaurea* (*C. depressa*, *C. drabifolia* subsp. *detonsa*, *C. kotschy* var. *persica*, *C. patula*, *C. pulchella*, *C. tchihacheffii*, *C. triumfettii* i *C. urvillei* subsp. *hayekiana*) pokazuju dosta bolju sposobnost inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze kod ispitane koncentracije od 2 mg/mL. Tako etil-acetatni ekstrakt biljke *C. triumfettii* inhibira  $\alpha$ -glukozidazu s 69,88%, dok kloroformni ekstrakt iste biljke inhibira  $\alpha$ -glukozidazu s 41,12%. Etil-acetatni ekstrakti drugih vrsta *Centaurea* inhibiraju  $\alpha$ -glukozidazu s 35,59 do 67,66%, dok kloroformni ekstrakti inhibiraju  $\alpha$ -glukozidazu s 36,03 do 60,31%.

## **6. ZAKLJUČAK**

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti kemijski i biološki profil hidrolata biljaka roda *Centaurea*: *C. rhenana*, *C. scabiosa*, *C. triumphettii*, *C. ragusina* i *C. alba*. Kemijski profil hidrolata određen je kroz kvalitativno dokazivanje prisutnosti pojedinih sekundarnih metabolita te kroz kvantitativno određivanje sadržaja ukupni fenolnih i ukupnih flavonoidnih komponenti hidrolata. Biološki potencijal hidrolata biljaka roda *Centaurea* ispitan je u smislu inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE), butirilkolinesteraze (BChE) i  $\alpha$ -glukozidaze.

1. U hidrolatima biljaka roda *Centaurea* kvalitativno je dokazana prisutnost glikozida i saponina, dok nije dokazana prisutnost alkaloida, tanina, steroida i terpenoida.
2. Svi uzorci hidrolata biljaka roda *Centaurea* sadrže relativno mali sadržaj fenolnih spojeva u hidrolatima; 34,5 - 83,5 mg GAE/g ekstrakta. Najveći sadržaj fenolnih spojeva sadržan je u hidrolatu biljke *C. alba*, dok je najmanji sadržaj sadržan u hidrolatu biljke *C. rhenana*.
3. Svi uzorci hidrolata sadrže i relativno mali sadržaj flavanoidnih komponenti, 61,9 - 143,5 mg QE/g ekstrakta. Najveći sadržaj flavonoida je sadržan u hidrolatu biljke *C. scabiosa*, dok je najmanji u onom biljke *C. alba*.
4. Ove vrijednosti su slične onim za prethodno objavljene vrijednosti ukupnih fenola i flavonoida za ekstrakte drugih vrsta roda *Centaurea*.
5. Uzorci hidrolata *C. scabiosa* i *C. rhenana* u koncentraciji osnovne otopine od 1 mg/mL srednje inhibiraju enzim AChE (36,6 i 28,9%), dok uzorak *C. alba* ne inhibira AChE. Hidrolati biljaka *C. triumphettii* i *C. ragusina* slabo inhibiraju AChE (3,2 i 9,7%). Za procjenu sposobnosti inhibicije ovog enzima uzet je poznato dobar inhibitor galantamin koji u koncentraciji od 5  $\mu$ g/mL AChE inhibira s 78,56%.
6. Uzorci hidrolata *C. alba*, *C. rhenana* i *C. scabiosa* u koncentraciji osnovne otopine od 1 mg/mL slabo inhibiraju BChE (11,1, 3,1 i 2,9%), dok uzorci hidrolata *C. triumphettii* i *C. ragusina* ne inhibiraju ovaj enzim. Za procjenu sposobnosti inhibicije ovog enzima uzet je poznato dobar inhibitor galantamin koji u koncentraciji od 5  $\mu$ g/mL BChE inhibira s 40,87%.
7. Uzorak hidrolata biljke *C. scabiosa* u koncentraciji osnovne otopine od 1 mg/mL zamjetnom sposobnosti inhibira enzim  $\alpha$ -glukozidazu (20,6%), uzorak hidrolata biljke *C. rhenana* slabo inhibira enzim  $\alpha$ -glukozidazu (6,7%), dok uzorci ostalih ispitanih hidrolata ne inhibiraju ovaj enzim. Za procjenu sposobnosti inhibicije ovog enzima



uzet je poznato dobar inhibitor  $\alpha$ -glukozidaze, akarboza, kao referentna tvar, koji u istoj ispitanoj koncentraciji inhibira enzim s 44,16 %.

## **7. POPIS CITIRANE LITERATURE**

1. Kabera JN, Semana E, Mussa AR, He X. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Classification, Function and Pharmacological Properties. *J Pharm Pharmacol.* 2014; 2(7): 377-392.
2. Pavlek-Kozlina B. *Fizilogija Biljaka.* Zagreb: Profil International; 2003.
3. De Monte C, Giadro MC, Carradori S, Mollica A, Luisi G, Granese AM, Alcaro S, Scaltrito MM, Masia C, Sisto F. Bioactive compounds of *Crocussativus* L. and their semisynthetic derivatives as promising anti-*Helicobacter pylori*, anti-Malarial and anti-Leishmanial agents. *J Enzyme Inhib Med.* 2015; 30: 1027-1033.
4. Pan SY, Zhou SF, Yu ZL, Zhang SF, Tang MK, Ko KM. New perspectives in how to discover drugs from herbal medicines: CAM's outstanding contribution to modern therapeutics. *Evid Based Complement Alternat. Med.* 2013; 1-25.
5. Locatelli M, Govematori L, Carlucci C, Genovese S, Mollica A, Epifano F. Represent application of analytical methods to phase I and phase II drug development: a review. *Biomed Chromatogr.* 2012; 26: 283-300.
6. Carradori S, D'Ascenzio M, Chimenti P, Secci D, Bolasco A. Selective MAO-B inhibitors. A lesson from natural products. *Mol Divers.* 2014; 18: 219-243.
7. Mukherjee PK, Kumar V, Mal V, Houghton PJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine.* 2007; 14: 289-300.
8. Kumar D, Gupta N, Ghosh R, Gaonkar RH, Pal BC.  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory constituent of *Carex baccans*. Bio assay guided isolation and qualification by validated RP-HPLP-DAD. *J Funct Foods.* 2013; 5: 211-218.
9. Orhan I, Sener B, Choudhary MI, Khalid A. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2014; 91: 57-60.
10. Tundis R, Menichini F, Loizzo MR, Bonesi M, Solimene U, Menichini F. Studies on the potential antioxidant properties of *Senecio tabarius* L. (Asteraceae) and its inhibitory activity against carbohydrate-hydrolysing enzymes. *Nat Prod Res.* 2012; 26: 393-404.
11. Giadro MC, Alcaro F, Carradori S, Costa G, Vullo D, Supuran CT, Alcaro S. Eriocitrin and apigenin as new carbonic anhydrase VA inhibitors from a visual screening of Calabrian products. *Planta Med.* 2015; 81: 533-540.
12. Nikolić T. *Sistemska botanika-raznolikost i evolucija biljnog svijeta.* Zagreb: Alfa d.d. 2013.
13. Ho CT. *Phenolic Compounds in Food. An Overview.* An Chem Society. 1992; 2-7.

14. Sexena M, Sewena J, Pradhan A. Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *Int. J Pharm Sci Rev Res.* 2012; 16(2): 130-134.
15. [https://www.researchgate.net/figure/Basic-structures-of-phenolic-acids-and-flavonoids\\_fig1\\_235689961](https://www.researchgate.net/figure/Basic-structures-of-phenolic-acids-and-flavonoids_fig1_235689961)
16. Du X, Wang X, Geng M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Transl. Neurodegener.* Jan 2018; 7(2): 1-7.
17. Malnar M, Košiček M, Hećimović S. Alzheimerova bolest: od molekularnog mehanizma do rane dijagnoze. *Medicina.* 2009, 45(3); 234-243.
18. Yate D, McLaughlin DM. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Psychiatry.* 2008; 7(1): 1-5.
19. Du X, Wang X, Geng M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Transl. Neurodegener.* Jan 2018; 7(2): 1-7.
20. Constabile A. The history of the cholinergic hypothesis. *Behav Brain Res.* 2011; 334-340.
21. Terry Jr AV, Buccafusco JJ. The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 36(3): 821-827.
22. Čus J. Alzheimerova bolest- nezaustavljiva „pandemija“. Završni rad. Sveučilište sjever, Varaždin 2018.
23. Knez D, Coquelle N, Pišlar A, Žakelj S, Jukić M, Colletier JP et al. Multi-target-directed ligands for treating Alzheimer's disease: Butyrylcholinesterase inhibitors displaying antioxidant and neuroprotective activities. *Eur J Med Chem.* 2018; 156: 597-617.
24. Bosak A, Katalinić M, Kovarik Z. Kolinesteraze: struktura, uloga, inhibicija. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, 2011; 62: 175-190.
25. Persson T, Popescu BO, Cedazo-Minguez A. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Why Did Antioxidant Therapy Fail. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2014 Jan: 1-11.
26. Wang X, Wenzhang W, Li L, Perry G, Lee H, Zhu X. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Acta.* 2014; 1240-1247.
27. Corral SR, Tan DX, Manchester L, Reiter RJ. Diabetes and Alzheimer's Disease, Two Overlapping Pathologies with the same Background: Oxidative Stress. *Oxid. Med. Cell Longev.* Feb 2015; 1-15.
28. Riaz S, Khan IU, Bajda M, Asharf M, Shaukat A, Rehmana TU, Mutahir S, et al. Pyridine sulfonamide as a small key organic molecule for the potential treatment of Type-II diabetes mellitus and Alzheimer's disease: in vitro against yeast  $\alpha$ -glucosidase, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Bioorg. Chem.* Sept. 2015; 1-21.

29. Chibas S. Molecular Mechanism in  $\alpha$ -glucosidase and Glucoamylase. Biosci. Biotech. Biochem. 1997; 61(8): 1233-1239.
30. Fuscheit E, Frommer W, Junge B, Müller L, Schmidt DD, Wingender W. Chemistry and Biochemistry of Microbial  $\alpha$ -glucosidase Inhibitors. Angew. Chem. Int. Engl. 1981; 20(9): 744-761.
31. Kumar S, Narwal S, Kumar V, Praksah D.  $\alpha$ -glucosidase inhibition from plants: A natural approach to treat diabetes. Pharmacognos. Rev. 2011; 5(9): 19-29.
32. Domitrović I. Fitokemijska karakterizacija polifenola vrste *Centaurea ragusina* L., Asteraceae. Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb 2015.
33. <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=22240>
34. <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=22240>
35. Domitrović I. Fitokemijska karakterizacija polifenola vrste *Centaurea ragusina* L., Asteraceae. Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb 2015.
36. Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A. Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species. Food Chem. Toxicol. 2013; 55: 290-296.
37. Erel SB, Demir S, Nalbantsoy A, Ballar P, Khan S, Yavagoglu KU, Karaalp C. Bioactivity screening of five *Centaurea* species and in vivo anti-inflammatory activity of *C. aethoa*. Pharm. Biol. 2014;52(6): 775-781.
38. Guettaf S, Abidli N, Kariche S, Bellebcir L, Bouriche H. Phytochemical screening and antioxidant activity of aqueous extract of *Genista saharae* (Cross. & Dur.) Der Pharm Lett. 2016; 8(1): 50-60.
39. Brand W, Cuvelier ME, Berest C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Lenensm. Wiss. Technol. 1995; 28: 25-30.
40. Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. J. Food Drug Anal. 2002; 10(3): 178-182.
41. Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr. V, Faatherston RM. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Jul 1961; 7(2): 88-90.
42. Kapustka LA, Annala AE, Swanson WC. The peroxidase-glucose oxidase system: A new method of determine glucose liberrated by carbohydrate degrading soil enzymes. Plant Soil. 1981; 63(3): 487-490.
43. Skog DA, West DM, Holleer FJ. Osnove analitičke kemije. Zagreb: Školska knjiga; 1999.

44. <http://www.bioras.petnica.rs/vrsta.phd?id=36774>
45. [http://www.biopix.dk/mangegrenet-knopurt-centaurea-rhenana\\_photo-100014.aspx](http://www.biopix.dk/mangegrenet-knopurt-centaurea-rhenana_photo-100014.aspx)
46. Ljubiša Grliš. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. Rijeka: Ex libris; 2005.
47. <https://gobotany.newenglandwild.org/species/centaurea/scabiosa/>
48. Pignatti S. Flora d'Italia. Bologna: Edagricole; 1982.
49. [http://www.wikiwand.com/en/Centaurea\\_triumfettii](http://www.wikiwand.com/en/Centaurea_triumfettii)
50. Domitrović I. Fitokemijska karakterizacija polifenola vrste *Centaurea ragusina* L., Asteraceae. Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb 2015.
51. <https://davesgarden.com/guides/pf/showimage/430818/#b>
52. <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=22240>
53. [https://en.wikipedia.org/wiki/Centaurea\\_alba#/media/File:Centaurea\\_alba.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Centaurea_alba#/media/File:Centaurea_alba.jpg)
54. Guettaf S, Abidli N, Kariche S, Bellebcir L, Bouriche H. Phytochemical screening and antioxidant activity of aqueous extract of *Genista saharae* (Cross. & Dur.) Der Pharm Lett. 2016; 8(1): 50-60.
55. Brand W, Cuvelier ME, Berest C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Lenensm. Wiss. Technol. 1995; 28: 25-30.
56. Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. J. Food Drug Anal. 2002; 10(3): 178-182.
57. Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr. V, Faetherston RM. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Jul 1961; 7(2): 88-90.
58. Loizzo MR, Tundis R, Giancarlo FM, Merichini F. Influence of Ripening Stage on Health Benefits Properties of *Capsicum annum* Var. *acuminat.* L. *In Vitro* Studies. J Med. Food. 2008; 11(1): 184-189.
59. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. Nutrients. 2010; 2; 1231-1246.
60. Zengin G, Locatelli M, Carradori S, Mocan AM, Aktumstek A. Total Phenolics, Flavonoids, Condensed Tannins Content of Eight *Centaurea* Species and their Broad Inhibitory Activities against Cholinesterase, Tyrosinase,  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase. Not. Bot. Horti. Agrobi. 2001; 44(1): 195-200.
61. Alkam H, Boga M, Ertas AA, Oral EV, Yilman MA, Yesil Y, et. al. Phytochemical profile and some biological activities of three *Centaurea* species from Turkey. Trop J Pharm Res. 2016; 15(9); 1865-1875.

62. Uysal A, Zengin G, Durak Y, Aktumsek A. Screening for antioxidant and antimutagenic properties of extracts from *Centaurea pterocaula* as well as their enzyme inhibitory potentials. *Marmara Pharm J.* 2016; 20(3); 232-242.
63. Zengin G, Locatelli M, Carradori S, Mocan AM, Aktumstek A. Total Phenolics, Flavonoids, Condensed Tannins Content of Eight *Centaurea* Species and their Broad Inhibitory Activities against Cholesterolase, Tyrosinase,  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase. *Not. Bot. Horti. Agrob.* 2001; 44(1): 195-200.

## **8. SAŽETAK**



Istraživanje novih biološki aktivnih supstanci prirodna podrijetla važno je i perspektivno područje istraživanja iz razloga sve većeg broja potvrda o nepovoljnim učincima sintetskih lijekova. Iz tog razloga, svako novo istraživanje iz prirode izoliranih spojeva može doprinijeti farmaceutskoj industriji, odnosno razvoju novih lijekova. Inhibicija važnih enzima jedan je od temeljnih terapija u liječenju bolesti, kao što su Alzheimerova demencija (AD) i *Diabetes mellitus* (DM). Rod *Centaurea* L. jedan je od najvažnijih rodova obitelji Asteraceae, s velikim brojem vrsta. U Hrvatskoj dolazi oko 80 vrsta ovog roda, od kojih je 27 endemskih.

U ovom radu određen je kemijski i biološki profil hidrolata pet biljaka roda *Centaurea*. Kemijski profil hidrolata određen je kroz kvalitativno dokazivanje pojedinih sekundarnih metabolita te kroz kvantitativno određivanje sadržaja ukupnih fenolnih i flavonoidnih komponenti hidrolata. Biološki potencijal ispitan je u smislu inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE), butirilkolinesteraze (BChE) i  $\alpha$ -glukozidaze.

Kvalitativno su u hidrolatima biljaka dokazani glikozidi i saponini, dok nisu dokazani alkaloidi, tanini, steroidi i terpenoidi. Rezultati su pokazali da svi uzorci hidrolata biljaka roda *Centaurea* sadrže relativno mali sadržaj fenolnih i flavonoidnih spojeva. Uzorci hidrolata *C. scabiosa* i *C. rhenana* srednje inhibiraju enzim AChE, *C. triumfetti* i *C. ragusina* slabo inhibiraju AChE, dok *C. alba* ne inhibira AChE. Uzorci hidrolata *C. alba*, *C. rhenana* i *C. scabiosa* slabo inhibiraju BChE, dok *C. triumfetti* i *C. ragusina* ne inhibiraju ovaj enzim. Uzorak hidrolata *C. scabiosa* zamjetnom sposobnosti inhibira enzim  $\alpha$ -glukozidazu, uzorak *C. rhenana* slabo inhibira enzim  $\alpha$ -glukozidazu, dok ostali hidrolati ne inhibiraju ovaj enzim.

## **9. SUMMARY**

Research on new biological active substances of natural origin is also a significant field of research, due to the growing number of adverse effects of synthetic drugs. For this reason, any new research on the from nature isolated compounds can contribute to the pharmaceutical industry, or the development of new drugs. Inhibition of important enzymes is one of the fundamental therapies for treating diseases such as Alzheimer's dementia (AD) and *Diabetes mellitus* (DM). Genus *Centaurea* L. is one of the most important families of the Asteraceae family, with a large number of species. In Croatia there are around 80 species of this genus, of which 27 are endemic.

In this study, the chemical and biological profile of the hydrolysates of five plants of the genus *Centaurea* was determined. The chemical profile of the hydrolysates was determined by qualitatively proving some secondary metabolites and quantitatively determining the content of the total phenol and flavonoid components of the hydrolysates. Biological potential was investigated in terms of the inhibition of acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE) and  $\alpha$ -glucosidase enzymes.

Glycosides and saponins have been shown to be beneficial in plant hydrolytes, while alkaloids, tandines, steroids and terpenoids have not been proven. The results show that all samples of the *Centaurea* plant hydrolysates contain a relatively low content of phenolic and flavonoid compounds. *C. scabiosa* and *C. rhenana* hydrolytes inhibit AChE, *C. triumfetti* and *C. ragusina* show low inhibiting of AChE, whereas *C. alba* does not inhibit AChE. *C. alba*, *C. rhenana* and *C. scabiosa* samples are poorly inhibiting BChE, while *C. triumfetti* and *C. ragusina* do not inhibit this enzyme. *C. scabiosa* inhibits the enzyme  $\alpha$ -glucosidase noticeably, *C. rhenana* sample weakly inhibits the  $\alpha$ -glucosidase enzyme while the other hydrolysates do not inhibit this enzyme.

## **10. ŽIVOTOPIS**

**OSOBNI PODATCI:**

**Ime i prezime:** Kristina Kardum

**Datum rođenja:** 21.04.1994.

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Adresa:** Andrije Maurovića 5, 21000 Zadar

**e-mail:** [k5kristina21@gmail.com](mailto:k5kristina21@gmail.com)

**OBRAZOVANJE:**

**2001. – 2009.** Osnovna škola „Smiljevac“, Zadar, Republika Hrvatska

**2009. – 2013.** Gimnazija „Juraj Baraković“, Zadar, Republika Hrvatska

**2009. – 2013.** DSD program za jezičnu diplomu

**VI. – IX. 2010.** Gimnazija „sv. Klara“, Rottenburg, Savezna Republika Njemačka

**2013. – 2018.** Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet, studij Farmacije

**RADNO ISKUSTO:**

**III. 2018. – IX. 2018.** Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna „Blatine“

**POSEBNE VJEŠTINE:**

**Rad na računalu:** MS Office, Eskulap 2000

**Strani jezici:** engleski jezik (B2 razina), njemački jezik (C1 razina)

**Vozačka dozvola:** B kategorija