

Biološki aktivni spojevi stevije (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

Bezuk, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:266000>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno - biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Iva Bezuk
6650/N

BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI STEVIJE
ZAVRŠNI RAD

Predmet: Začinsko i aromatsko bilje
Mentor: doc. dr. sc. *Danijela Bursać Kovačević*

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen je u okviru projekta “Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane” (IP-PE- FF) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za procese konzerviranja i preradu voća i povrća Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu uz mentorstvo doc. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević te uz pomoć dr. sc. Predraga Putnika, stručnog suradnika.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

**Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam**

BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI STEVIJE (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

Iva Bezuk, 0058202467

Sažetak: Cilj ovog rada je prikupljanje aktualnih saznanja o biološki aktivnim spojevima biljke *Stevia Rebaudiana* Bertoni te o njihovoj antioksidacijskoj aktivnosti iz objavljenih znanstvenih publikacija. Pretraživane su baze Nacionalne i Sveučilišne knjižnice u Zagrebu u području biotehničkih znanosti kao i službene stranice Hrvatske agencije za hranu i Europske agencije za sigurnost hrane.

Zbog prisutnosti steviozida i rebaudiozida A karakterizira je slatki okus, a zbog niske energetske vrijednosti predstavlja poželjnu zamjenu za saharozu, posebice kod dijabetičara i pretilih osoba. Sadrži i širok spektar biološki aktivnih spojeva poput diterpenskih glikozida, polifenola, karotenoida i klorofila koji imaju brojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. DPPH, FRAP, ABTS i ORAC metode dokazuju visoku antioksidacijsku aktivnost ekstrakta stevije, kao i veće vrijednosti AOA kod prehrambenih proizvoda u koje su dodani. Time se opravdava dosadašnje korištenje u prehrani te utvrđuje velik potencijal za još rašireniju upotrebu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

Ključne riječi: stevija, zaslađivač, biološki aktivni spojevi, antioksidacijska aktivnost

Rad sadrži: 28 stranica, 7 slika, 46 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević

Pomoć pri izradi: dr. sc. Predrag Putnik

Datum obrane: 17. srpanj 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Nutrition

Department of Food Engineering
Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

STEVIA (*Stevia rebaudiana* Bertoni) AS A SOURCE OF BIOACTIVE COMPOUNDS

Iva Bezuk, 0058202467

Abstract: The aim of this study is to obtain current discoveries about bioactive compounds of the *Stevia rebaudiana* Bertoni plant and their antioxidant activity from published scientific publications. Databases from National and University Library Zagreb were researched in the field of biotechnical sciences as well as the official pages of Croatian Food Agency and European Food Safety Authority.

The presence of stevioside and rebaudioside A gives it a sweet taste and due to its low energy value is desirable replacement for sucrose, particularly for people who suffer from diabetes and obesity. It also contains wide range of bioactive compound such as diterpene glycosides, polyphenols, carotenoids and chlorophyll which have many positive effects on human health. DPPH, FRAP, ABTS and ORAC methods confirm high antioxidant activity of extract of *Stevia Rebaudiana* as well as AOA of stevia supplemented food products. This approves its use and shows even bigger potential for wider use in pharmaceutical and food industry.

Keywords: stevia, sweetener, bioactive compounds, antioxidant activity

Thesis contains: 28 pages, 7 figures, 46 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Danijela Bursać Kovačević, Assistant professor

Technical support and assistance: PhD Predrag Putnik, Expert assistant

Thesis delivered: July 17th, 2017

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski dio	2
2.1. Pregled literature	2
2.2. Botanička taksonomija i karakteristike stevije	2
3. Nutritivna vrijednost stevije	4
3.1. Ugljikohidrati	4
3.2. Proteini	4
3.3. Masti	5
3.4. Minerali	6
3.5. Vitamini	7
4. Utjecaj stevije na zdravlje	7
5. Toksikološki aspekt biljke stevije	9
6. Biološki aktivni spojevi u ekstraktima stevije	9
6.1. Diterpenski glikozidi	10
6.2. Polifenoli	11
6.3. Karotenoidi i klorofili	13
6.4. Antioksidacijska aktivnost	14
6.4.1. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata stevije određivana DPPH metodom	14
6.4.2. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata stevije određivana FRAP metodom	17
6.4.3. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata stevije određivana ABTS metodom	18
6.4.4. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata stevije određivana ORAC metodom	20
7. Zaključak	22
8. Literatura	24

1. Uvod

Posljednjih godina zabilježen je porast uporabe nisko-kalorijskih zaslađivača kao adekvatne zamjene za šećere u nisko-kalorijskim proizvodima. Unatoč brojnim istraživanjima i studijama o nisko-kalorijskim zaslađivačima njihov utjecaj na zdravlje, a samim time i uporaba je i dalje poprilično kontroverzna. Jedan od takvih zaslađivača je i steviol glikozid (E-960), koji se dobiva iz biljke *Stevia rebaudiana* Bertoni, čija popularnost raste ponajviše zbog njenog prirodnog podrijetla.

Iako se biljka stotinama godina koristi kao prirodni zaslađivač među stanovnicima Južne Amerike, na području Europe i Sjeverne Amerike njena upotreba je postala raširenija tek posljednjih godina. Raširena je njena upotreba i u Japanu, posebice kao zaslađivač u morskim plodovima, gaziranim pićima i slatkišima. (Soejarto i sur. 1982). Biljka se u nekim područjima svijeta, kao što su Brazil i Paragvaj koristi i kao prirodni regulator glukoze u krvi (Jeppesen i sur., 2000), te u kontroli tjelesne težine kod pretilih osoba (Suttajit i sur. 1993).

Biljka *Stevia rebaudiana* Bertoni je prvi put detaljno opisana i botanički klasificirana 1899. godine od strane znanstvenika Moises Santiago Bertonija. 1905. godine je njen naziv *Eupatorium rebaudianum* promijenjen u *Stevia rebaudiana* Bertoni koji je zadržan i do danas. Različite vrste biljke sadrže i različite spojeve koji su odgovorni za njen sladak okus, te je upravo vrsta *Stevia rebaudiana* najslađa (Soejarto i sur., 1982; Kinghorn i sur., 1984). Izuzev prirodno slatkih diterpenskih glikozida, od kojih je najviše steviozida i rebaudiozida A, stevija sadrži i brojne druge biološki aktivne spojeve (BAS) poput klorofila, karotenoida i polifenola.

Prema dostupnim podacima u znanstvenoj literaturi koncentracije ovih spojeva značajno variraju ovisno o tipu izolacije i parametrima, primjenjenom otapalu, kao i različitim kultivarima te metodama određivanja, stoga je cilj ovog rada pretražiti rezultate znanstvenih publikacija s ciljem utvrđivanja nutritivne vrijednosti stevije s osvrtom na BAS, te utjecaj njezinih ekstrakata na zdravlje.

2. Teorijski dio

2.1. Pregled literature

Pregled literature u svrhu pisanja ovog rada je izvršen opsežnim pretraživanjem baza podataka Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu u području biotehničkih znanosti. Baza u kojoj je pronađeno najviše relevantnih podataka korištenih u ovom radu je Web of Science, a slijede ju PubMed, Science Direct i Scopus. Također su korišteni podaci iz radova objavljenih na stranicama Hrvatske agencije za hranu (HAH) i Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA). Prilikom pretraživanja preferirani su znanstveni radovi objavljeni unazad nekoliko godina. Neke od ključnih riječi na engleskom jeziku koje su korištene kod pretraživanja su: stevija, zaslađivač, biološki aktivne komponente, antioksidacijsko djelovanje, rast, ljekoviti, alergije, te brojne druge. Tijekom pretraživanja pregledano je oko 150 referenci, a u svrhu pisanja ovog rada su korišteni podaci iz 46 referenci.

Tablica 1. Primjer pretraživanja literature

Referenca	Ciljevi/Hipoteze	Dizajn eksperimenta/Hipoteze	Rezultati zaključci	Komentari
Goyal S. K., Samsher, Goyal R. K. (2009) Stevia (<i>Stevia rebaudiana</i>) a bio-sweetener: a review. International Journal of Food Sciences and Nutrition 61 : 1-10	Sumirati i kvantificirati prošle i sadašnje dokaze za steviju..	Prikupljena je pregledna literatura. Pretraženi su radovi od 2007. Nadalje u različitim bazama podataka..	Različite studije na životinjama i ljudima indiciraju da sigurnost stevije nije još u potpunosti određena. Status u SAD je trenutno „dodatak prehrani”. Blaga do umjerena konzumacija bi trebala biti sigurna.	Visoko citiran članak (više od 50 puta). Prikupljeni podaci iz različitih izvora.

2.2. Botanička taksonomija i karakteristike stevije

Stevia rebaudiana Bertoni (Slika 1.) samo je jedna od 154 vrste porodice *Astraceae*, roda *Eupatorieae*, višegodišnjih biljaka koje rastu na polusuhim planinskim terenima. Neke vrste mogu rasti i na livadnim područjima, rubnim šumskim područjima, te u subalpskim područjima. *Stevia rebaudiana* Bertoni je višegodišnja grmolika suptropska biljka visine do 1 metar. Njeno podrijetlo je iz Južne Amerike, točnije Paragvaja i Brazila, gdje se njeno lišće koristilo kao zaslađivač čaja. Poznata je pod sinonimom slatki list, medeni list i slatka biljka. Sačinjena je od dugačkog razgranatog korijena, te drvenaste stabljike. Listovi su eliptičnog

oblika i zelene boje, a prilikom cvata, cvjetovi su bijele boje. Idealne vrste tla za njen rast su crvenica i ilovača, te pH vrijednosti između 6,5 i 7,5. Ne podnosi zimu, već raste na temperaturama između 15 i 30 °C, stoga se u Europi uzgaja u stakleničkim uvjetima. Također se komercijalno proizvodi i u Paragvaju, Brazilu, Kini, Jugoistočnoj Aziji, Koreji i Tajlandu. Biljka se bere nakon 3 do 4 mjeseca uzgoja. Za proizvodnju zaslađivača se koriste gornji dijelovi biljke koji su svježiji, te suhi listovi samljeveni u prah. Kod komercijalno osušenih listova mogući su tragovi cvijeta, stabljike te sjemenki. Iako je u listu stevije identificirano preko 30 različitih steviol glikozida, steviozid je najzastupljeniji, a njegova slatkoća je u usporedbi sa saharozom 300 puta veća, dok se za rebaudiozid A procjenjuje da je slađi od saharoze 200-400 puta. Za njih je dokazano da nisu toksični, mutagani niti kancerogeni (EFSA, 2010) te se koriste u prehrambenoj industriji – u pićima, slasticama, mljekarskoj industriji, konditorskim proizvodima, pekarstvu i slično.

Na slatkoću lišća stevije utječe i koncentracija glikozida, koja je regulirana s nekoliko faktora - metodom razmnožavanja, duljinom dana i metodom uzgoja. Akumulacija glikozida je veća ako je cvjetanje biljke odgođeno (tijekom duljih dana). Također kod organskog uzgoja je veća koncentracija glikozida, osobito rebaudiozida, čime se povećava slatkoća (Liu i sur., 2011). Sukladno navodima USDA (United States Department of Agriculture) botanička klasifikacija stevije (*Stevia rebaudiana* Bertoni) daje slijedeću kategorizaciju (USDA, 2017):

Kraljevstvo: *Plantae*

Podkraljevstvo: *Tracheobionta*

Odjeljak: *Spermatophyta*

Odjel: *Magnoliophyta*

Razred: *Magnoliopsida*

Podrazred: *Asteridae*

Red: *Asterales*

Porodica: *Asteraceae / Compositae*

Rod: *Stevia* Cav.

Vrsta: *Stevia rebaudiana* Bertoni



Slika 1. Listovi biljke *Stevia Rebaudiana* Bertoni (Lemus-Mondaca i sur., 2012)

3. Nutritivna vrijednost stevije

Analizom suhih listova stevije utvrđena je njena niska energetska vrijednost od 2.7 kcal/g (Savita i sur., 2004) koja ju, uz intenzivan slatki okus, svrstava u skupinu nisko-kalorijskih zaslađivača zajedno s aspartamom, saharinom, sukralozom i acesulfamom-K. Isto tako, ona je i dobar izvor ugljikohidrata, proteina i prehrambenih vlakana (Tablica 2).

Tablica 2. Rezultati analiza sušenih listova stevije (g/100 g suhe mase)

Komponenta	Referenca						
	Mishra i sur. (2010)	Goyal i sur. (2010)	Serio (2010)	Savita i sur. (2004)	Abou-Arab i sur. (2010)	Tadhani i Subhash (2006)	Kaushik i sur. (2010)
Proteini	10	11.2	11.2	9.8	11.40	20.4	12
Masti	3	1.9	5.6	2.5	3.73	4.34	2.7
Ugljikohidrati	52	/	53	52	61.9	35.2	/
Prehrambena vlakna	18	15.2	15	18.5	15.5	/	/
Pepeo	11	6.3	/	10.5	7.41	13.1	8.4

*/ - nema podataka

3.1. Ugljikohidrati

U prehrani ljudi ugljikohidrati imaju različite uloge. Dok monosaharidi imaju bitnu ulogu kao izvor energije, polisaharidi, osim pohrambenog oblika, se često povezuju i s pozitivnim učincima na zdravlje. Braz de Oliveira i suradnici su tako 2011. godine iz korijena i lišća biljke stevije izolirali neprobavljivi fruktooligosaharid inulin koji ima pozitivne učinke na crijevnu mikrobiotu djelujući kao prebiotik. Analize su pokazale da korijen biljke sadrži 4.6%, a lišće 0.46% inulina. Također, prehrambena vlakna koja sadrži se povezuju s boljom kontrolom glukoze u krvi i metabolizmom masti kod osoba koje boluju od dijabetesa, te uz već navedenu prebiotičku ulogu i protupalna svojstva je moguća potencijalna upotreba ekstrakta stevije kao prehrambenog suplementa.

3.2. Proteini

Proteini su još jedan od važnih makronutrijenata u prehrani ljudi te sadrže veliki broj aminokiselina koje su, između ostalog, potrebne za rast i popravak oštećenja tkiva. Kako bi se odredila kvaliteta proteina neke namirnice, potrebno je odrediti njihov ukupan udio, ali i udio svake pojedine aminokiseline, posebice esencijalnih aminokiselina koje naše tijelo ne

može sintetizirati. U lišću stevije najprije je identificirano 9 aminokiselina: glutaminska kiselina, asparaginska kiselina, lizin, serin, izoleucin, alanin, prolin, tirozin i metionin (Mohammad i sur., 2007). Daljnim istraživanjima je otkriveno da lišće stevije sadrži ukupno 17 aminokiselina, od čega od esencijalnih aminokiselina nedostaje jedino triptofan (Abou-Arab i sur., 2010). To znači da se nakon ekstrakcije steviozida iz lišća, ostatak može koristiti kao vrijedan izvor aminokiselina u različitim dodacima prehrani.

Tablica 3. Aminokiselinski sastav listova biljke *Stevia rebaudiana* (Abou-Arab i sur., 2010)

Esencijalne aminokiseline g/100 g suhe mase		Neesencijalne aminokiseline g/100 g suhe mase	
Arginin	0.45	Aspartat	0.37
Lizin	0.70	Serin	0.46
Histidin	1.13	Glutamat	0.43
Fenilalanin	0.77	Prolin	0.17
Leucin	0.98	Glicin	0.25
Metionin	1.45	Alanin	0.56
Valin	0.64	Cistein	0.40
Treonin	1.13	Tirozin	1.08
Izoleucin	0.42		
Ukupno:	7.67	Ukupno	3.72

3.3. Masti

Glavna uloga masti u ljudskom tijelu je pohrana energije te funkcija strukturalne komponente stanične membrane i signalnih molekula. Masti su također bitne i kod apsorpcije vitamina A, D, E i K, koji se mogu apsorbirati isključivo otopljeni u njima. Iako postoje brojni metabolički putevi za sintezu i razgradnju lipida, neke masne kiseline naše tijelo ne može sintetizirati, već se dobivaju isključivo iz hrane. One se nazivaju esencijalnim masnim kiselinama, te imaju brojne uloge u prevencijama bolesti - posebice koronarnih srčanih bolesti, hipertenzije, upalnih i autoimunih bolesti (Bernal i sur., 2011). U lišću stevije identificirano je 6 masnih kiselina – palmitinska, palmitoleinska, stearinska, oleinska, te linolna i linolenska kiselina koje svrstavaju u esencijalne (Tadhani i Subhash, 2006). Najveći udio se odnosi na palmitinsku kiselinu, dok je udio stearinske kiselina najmanji. Također visok

udio linolenske kiseline može doprinjeti idealnom omjeru masnih kiselina u ljudskoj prehrani.

Tablica 4. Udio masnih kiselina biljke Stevia Rebaudiana (Tadhani i Subhash, 2006)

Masna kiselina	g/ 100g
Palmitinska kiselina	27.51
Palmitoleinska kiselina	1.27
Stearinska kiselina	1.18
Oleinska kiselina	4.36
Linolna kiselina	12.40
Linolenska kiselina	21.59

3.4. Minerali

Minerali pripadaju skupini mikronutrijenata i imaju važne funkcije u tijelu čovjeka. Dije se na makromineralne, one čije dnevne potrebe iznose više od 100mg, te na mikromineralne ili minerale u tragovima čije su potrebe manje od 15mg. Neki od njih su potrebni u izrazito malim količinama, no od iznimne su važnosti za metaboličke reakcije koje se bez njih ne bi mogle odvijati. Prisutnost minerala u prehrani je nužna zbog razvitka i održavanje vitalnih tjelesnih funkcija, za sve aspekte rasta, reprodukcije, te formiranja stanica, tkiva i organa (Szefer i Nriagu, 2007). Iz biljke stevije su izolirane znatne količine minerala – od čega najviše kalija, kalcija, magnezija i natrija, što je prikazano u tablici 5.

Tablica 5. Sastav minerala (mg/100g) sušenih listova biljke stevije

Mineral	Referenca					
	Mishra i sur.(2010)	Goyal i sur. (2010)	Serio i sur. (2010)	Tadhani i sur. (2006)	Kaushik i sur. (2010)	Abou-Arab i sur. (2010)
Kalcij	464.4	544	600	1550	722	17.7
Fosfor	11.4	318	318	350	NU*	NU*
Natrij	190	89.2	NU*	160	32.7	14.93
Kalij	1800	1780	1800	2510	839	21.15
Željezo	55.3	3.9	3.9	36.3	31.1	5.89
Magnezij	349	349	500	NU*	NU*	3.26
Cink	1.5	1.5	NU*	6.39	NU*	1.26

NU* - nije utvrđeno

Rezultati svih studija potvrđuju iznimno visok udio kalija, osim kod rezultata studije Abou Arab i suradnika iz 2010. godine, gdje se navodi nizak udio, ne samo kalija, već svih minerala, što se može pripisati drugačijim uvjetima uzgoja biljke. Prisutan cink je mineral koji djeluje kao neenzimski antioksidans, te čija konzumacija može djelovati preventivno na oksidativna oštećenja stanica. Željezo djeluje kao prenosioc kisika u tijelu, te njegov nedostatak uzrokuje anemiju, stoga visok udio željeza u steviji može biti učinkovit kod održavanja normalne razine hemoglobina u krvi, ali i kod različitih suplemenata koji se koriste kod anemije. Visoki udjeli minerala ukazuju na moguće potencijalno korištenje ekstrakata biljke kod različitih dodataka prehrani i suplemenata.

3.5. Vitamini

Vitamini također pripadaju skupini mikronutrijenata, te imaju važnu ulogu u metabolizmu čovjeka. Dijele se u 2 velike skupine – topljive u vodi i topljive u mastima. Vitamini koji su topljivi u mastima su A, D, E i K, dok oni koji su topljivi u vodi su vitamini B skupine i vitamin C. Svi su otkriveni povezano s bolestima koje njihova deficijencija izaziva. Različiti vitamini imaju i različite biokemijske uloge. Neki djeluju na rast i diferencijaciju stanica i tkiva (npr. vitamin A), neki imaju ulogu hormona (npr. vitamin D), dok drugi djeluju kao antioksidansi – vitamin E, B i C. Velik broj vitamina djeluje kao prekursor kofaktora enzima (Bernal i sur., 2011). Analizom ekstrakata listova i kalusa biljke stevije, utvrđeno je da je količina folne kiseline, vitamina C i vitamina B2 značajno viša kod ekstrakta listova biljke. (Kim, Yang, Lee i Kang, 2011).

Tablica 6. Udio vitamina topljivih u vodi u ekstraktu listova i kalusa
(mg/100g suhe tvari) (Kim i sur., 2011)

Vitamin	Listovi	Kalus
Vitamin C	14.98	1.64
Vitamin B2	0.43	0.23
Vitamin B6	0.00	0.00
Folna kiselina	52.18	0.09
Niacin	0.00	0.00
Tiamin	0.00	0.00

4. Utjecaj stevije na zdravlje

Stevija kao zamjena za šećere može biti izuzetno korisna osobama koje boluju od dijabetesa, ali i u prevenciji i liječenju pretilosti, te brojnih kroničnih bolesti. Prekliničke studije pokazuju da steviozidi iz biljke stevije povećavaju sekreciju inzulina, ali i osjetljivost na inzulin. Povećanje u osjetljivosti na inzulin se povezuje s inhibicijom ekspresije fosfoenolpiruvat karboksikinaze u jetri, te udruživanjem glukoneogeneze sa sintezom glikogena u jetri (Chen i sur., 2005).

Uloga steviozida na povećanje inzulinske osjetljivosti je istraživana na štakorima čija je prehrana sadržavala 60% fruktoze. Oralno su dobivali steviozid u dozi od 5,0 mg/kg TM, čime se poboljšala njihova inzulinska osjetljivost (Elliott i sur., 2002). Provedeno je još jedno istraživanje na štakorima gdje je proučavana sekrecija inzulina te se ustvrdilo da injekcija steviozida u dozi od 0,2g/kg TM zajedno s glukozom u dozi 2,0g/kg TM potiče sekreciju inzulina, suprimira se razina glukagona, te se smanjuje odgovor glukoze u krvi (Jeppesen i sur., 2000). Iako uporaba steviozida dovodi do smanjenja glukoze u krvi, utvrđeno je da nema razloga za brigu na moguću pojavu hipoglikemije jer je blagotvorni učinak zabilježen samo kod povišene razine glukoze u krvi, odnosno kod dijabetičara.

Stevija također ima povoljan utjecaj na regulaciju krvnog tlaka što je dokazano u studiji u trajanju od godine dana na 106 ljudi koji boluju od hipertenzije. Oni su svakodnevno konzumirali 750mg steviozida ili placebo. Po završetku studije pojedinci koji su uzimali svakodnevno steviozid su imali značajno smanjene vrijednosti sistoličnog i distoličnog krvnog tlaka, bez zabilježenih negativnih posljedica (Chan i sur., 2000). Nakon toga je provedena i duža studija u trajanju od 2 godine, s povećanjem konzumirane količine steviozida na 1500mg, te su također zabilježeni rezultati kao i kod prethodne studije (Hsieh i sur. 2003). Lišće stevije povoljno djeluje na prevenciju karijesa zbog steviozida i rebaudiozida A koji su nekariogeni. Studije pokazuju da se u mediju koji sadrži steviozid inhibira rast bakterije *Streptococcus mutans*, te ona proizvodi manje kiseline za razliku od kada se nalazi u mediju koji sadrži glukozu, fruktozu ili saharozu. (Grenby i sur., 1991).

Lišće stevije ima i pozitivan učinak na imunosni sustav čovjeka. Provedena je studija gdje su fermentirani vodeni ekstrakti lišća stevije pokazali snažnu antimikrobnu, antibakterijsku i antigljivičnu aktivnost protiv širokog spektra patogenih bakterija, uključujući i bakteriju *Escherichia coli*, te pritom nisu imali štetan utjecaj na crijevnu mikrobiotu (Tomita i sur., 1997). Provedena je i in vitro studija s vrućim vodenim ekstraktima lišća stevije gdje je

došlo do inhibicije vezanja humanog rotavirusa na stanice (Takahashi i sur., 2001). Postoje još brojne studije koje ukazuju na imunostimulirajući efekt ekstrakta lišća stevije.

5. Toksikološki aspekt biljke stevije

Sama sigurnost uporabe ekstrakata stevije je ispitivana u velikom broju raznih studija. Glavne bioaktivne komponente steviol i steviozid su podvrgnute mnoštvu opsežnih genetičkih testiranja te je dokazano da ne uzrokuju genotoksične učinke niti reagiraju s DNA. Također dokazana je i njihova nemutagenost. Na štakorima su provedena akutna i toksična istraživanja, te nisu zabilježeni nikakvi negativni učinci. Također, još jedna važna komponenta stevije, rebaudiozid A, je proglašena netoksičnom i negenotoksičnom. Provedeni su i testovi na životinjama gdje se proučavao utjecaj ekstrakata stevije na reproduktivnost i posljedice na potomstvo, te nisu zabilježene nikakvi negativni učinci. Zaključak svih studija je da se upotreba ekstrakta lišća stevije smatra sigurnim, te da ne izaziva negativne učinke na zdravlje čovjeka (Midmore i sur., 2002). Vrijednost NOAEL, odnosno doza koja ne izaziva nikakav štetan učinak je zabilježena između 2,048 i 2,273 mg rebaudiozida A/ kg TM (Curry i sur., 2008). Rebaudiozid A ima GRAS status, što znači da je sigurna za primjenu. Također, siguran dnevni unos za čovjeka je procijenjen na vrijednosti između 5 i 6 mg ekstrakta lišća stevije/ kg TM (Carakostas i sur., 2008).

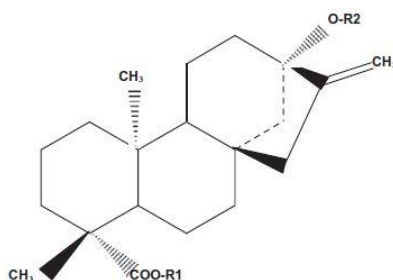
Iako alergijske reakcije nisu zabilježene kod konzumacije stevije kao zaslađivača (Abou-Arab i sur., 2010), ipak se savjetuje oprez kod ljudi koji su osjetljivi na biljke iz porodice krizantema (*Asteraceae*), te se ne preporučuje konzumacija tijekom trudnoće (Serio, 2010).

6. Biološki aktivni spojevi u ekstraktima stevije

Stevija se prvotno najviše istraživala zbog značaja steviozida, u novije vrijeme sve se više istražuju i ostale biološki vrijedne sastavnice poput diterpena, triterpena, sterola, pigmenata i dr. koji predstavljaju 80- 90% suhe tvari lista. Također, u ekstraktima lišća stevije otkriveni su i karvakrol (izomer monoterpenskih fenola), kariofilen (biciklični seskviterpen), kariofilen oksid te aromatske tvari poput spatulenola, kardinola, α -pinena, limonena i izo-pinokarveola koji pokazuju antioksidacijsku, antiupalnu i antimikrobnu aktivnost (Singh i sur., 2012).

6.1. Diterpenski glikozidi

Glikozidi su spojevi koje nalazimo pretežno kod biljaka, a sastoje se od ugljikohidratne molekule - šećera vezane na neugljikohidratni dio molekule. Hidrolitičkim cijepanjem se mogu konvertirati u šećer i nešećernu komponentu aglikon. Svi diterpenski glikozidi izolirani iz listova biljke *Stevia Rebaudiana* sadrže jednaku okosnicu steviola, razlikuju se jedino u strukturi ugljikohidratnih supstituenata (R1 i R2) - mono-, di- i trisaharida koji sadrže glukozu i/ili ramnozu na pozicijama C13 i C19 (Slika 2.).



Slika 2. Struktura diterpenskih glikozida listova biljke *Stevia rebaudiana* (Geuns i sur., 2003)

U listovima je identificirano i izolirano nekoliko steviol glikozida: steviozid, steviolbiozid, rebaudiozid A,B,C,D,E i F i dulkozid A (Geuns, 2003). Međutim, postoje neki dokazi da steviolbiozid i rebaudiozid B nisu prirodne komponente biljke stevije, već da nastaju prilikom ekstrakcije (Kennelly, 2002). Najzastupljeniji steviol glikozid je steviozid čiji maseni udio iznosi od 4-13%, slijedi ga rebaudiozid A udjelom 2-4%, zatim rebaudiozid C udjelom 1-2%, te dulkozid A čiji je udio 0.4 – 0.7% (Makapugay i sur., 1984.), dok su ostali glikozidi znatno manje zastupljeni (Geuns, 2003). Pokazalo se da udio glikozida uveliko ovisi o uvjetima uzgoja (Pól i sur., 2007), kao i o primjenjeni modernih uzgojnih tehnika (Geuns, 2003) što pokazuju i rezultati nekoliko istraživanja prikazani u tablici 7.

Tablica 7. Udio pojedinih glikozida u listovima biljke stevije

Glikozid	Udio, % u suhoj masi listova		
	Gardana i sur., 2010	Goyal i sur., 2010	Kinghorn i Soejarto.,1985
Steviozid	5.8±1.3	9.1	5-10
Rebaudiozid A	1.8±1.2	3.8	2-4
Rebaudiozid C	1.3±1.4	0.6	1-2
Dulkozid A	NU	0.3	0.4-0.7

*NU – nije utvrđeno

Okus slatkoće koji potječe od glikozida izrazito ovisi o vrsti glikozida i njegovoj strukturi. Slatkoća rebaudiozida A se povećava što je više vezanih molekula šećera na aglikonski dio steviola, no s tim povećanjem dolazi do smanjenja njihovog udjela u samoj biljci (Kovylyaeva i sur., 2007). Kada se dodaje hrani, daje poželjan slatki okus, za razliku od steviozida, koji kada se koristi samostalno, ostavlja gorak okus u ustima nakon konzumiranja (de Oliveira i sur., 2007). Ekstrakti listova stevije koji se nalaze na tržištu sadrže uglavnom steviozid, čiji je udio viši od 80% ili rebaudiozid A, udjela višeg od 90% (Gardana i sur., 2010).

Tablica 8. Usporedba intenziteta slatkoće pojedinih glikozida sa saharozom (saharoza = 1)

Glikozid	Intenzitet slatkoće
Rebaudiozid A	250-450
Rebaudiozid B	300-350
Rebaudiozid C	50-120
Rebaudiozid D	250-450
Rebaudiozid E	150-300
Dulkozid A	50-120
Steviolbiozid	100-125
Steviozid	250-300

Steviozide karakterizira visoka stabilnost u vodenim otopinama širokog raspona pH i temperature (Abou-Arab i sur., 2010) što je dokazano i u istraživanju o stabilnosti steviozida u pH rasponu od 1 do 10 u trajanju od preko 2 sata na temperaturi od 60°C te su zabilježeni neznatni gubitci razgradnjom, manji od 5%. Razgradnja steviozida je zabilježena tek pri izrazito kiselim uvjetima (pH=1) pri temperaturi od 80°C u trajanju od 2h (Abou-Arab i sur., 2010). Slični rezultati su dobiveni u istraživanju Buckenhuskera i suradnika iz 1997. gdje je razgradnja zabilježena tek pri pH > 9, kod temperature od 100°C u trajanju od 1h.

6.2. Polifenoli

Polifenoli su aromatski spojevi s više hidroksilnih supstituenata. Pripadaju skupini biološki aktivnih tvari koje su prisutne u namirnicama biljnog podrijetla kao što su voće, povrće, žitarice, različitim napitcima poput kave i čaja, ali i u steviji. Kim i suradnici u istraživanju su HPLC- analizom utvrdili glavne fenolne komponente u vodenim ekstraktima

stevije od kojih je najviše zastupljen pirogalol (951.27 mg/100g suhe tvari), zatim 4-metoksibenzoična kiselina (33.80 mg/100g st), p-kumarna kiselina (30.47 mg/100g st), 4-metilkatehol (25.61 mg/100g st), te sinapična i cimetna kiselina.

Spektrofotometrijskim metodama, LC MS/MS i dvodimenzionalnom HPLC-DAD metodom identificirani je sadržaj flavonoida, odnosno njihovih podskupina flavona i flavonola što je prikazano u tablici 9.

Tablica 9. Flavonoidi detektirani u lišću biljke stevije

	Naziv	Referenca
Flavonoli	Kvercetin	Li i sur., (2009)
	Kvercetin-3-O- β -D-arabinozid	Ghanta i sur., (2007) Li i sur., (2009), Cacciola i sur., (2011)
	Kvercetin-3-O- β -D-ramnozid	Ghanta i sur., (2007), Li i sur., (2009)
	Kvercetin-3-O-glukozid	Cacciola i sur., (2011)
	Kvercetin-3-O-rutinozid	Cacciola i sur., (2011)
	Kvercetin-3-O-(4-O-trans-kafeoil)- α -ramno-piranozil(1-6)- β -D-galaktopiranozid	Li i sur., (2009)
	Kaempferol-3-O-ramnozid	Ghanta i sur., (2007),
Flavoni	Apigenin	Ghanta i sur., (2007),
	Apigenin-4'-O- β -D-glikozid	Ghanta i sur., (2007),
	Apigenin-7'-O- β -D-glikozid	Li i sur., (2009), Cacciola i sur., (2011)
	Luteolin	Ghanta i sur., (2007), Li i sur., (2009)
	Luteolin-7'-O- β -D-glikozid	Li i sur., (2009), Cacciola i sur., (2011)

U studiji Galla Narsing i suradnika iz 2014. godine, proučavan je ukupan sadržaj polifenola i antioksidacijska aktivnost praha listića stevija u usporedbi s komercijalnim prahom steviozida. Prah listića stevije je ekstrahiran u otopini metanola, a komercijalni prah stevije je dispergirao, također u otopini metanola. Rezultati analize su pokazali da je udio ukupnih polifenola u prahu listića stevije 5.6%, dok je u komercijalnom prahu steviozida 2.26%. Provedene su još brojne analize čiji se rezultati poprilično razlikuju. Jahan i suradnici

su 2010. godine analizom listića stevije dobili ukupan udio polifenola 4.2%. Adedapo i suradnici su 2009. godine analizom suhih listića biljke utvrdili veoma visok udio polifenola od čak 14%.

Grozeva i suradnici su 2015. godine utvrdili da i stupanj mljevenja ima veliku ulogu – udio ukupnih fenola u uzorku fino samljevenih listića je veći nego u uzorku gdje su grubo samljeveni. Također su zaključili i da je udio polifenola u prosjeku 4 puta veći u ekstraktima, nego u suhoj tvari. Iz studija proizlazi da je prah listića stevije vrijedan izvor polifenola te može biti od velike važnosti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

6.3. Karotenoidi i klorofili

Klorofili su pigmenti, topljivi u polarnim otapalima, odgovorni za zelenu boju listića stevije, a po kemijskom sastavu ubrajaju se u skupinu tetrapirola sa atomom magnezija u središtu molekule (Willows, 2004). Klorofili a i b najvažnije su skupine klorofila općenito u biljkama te se nalaze u kvantitativnom odnosu 3:1. Unatoč tome što su kemijski srodne molekule, različitog su obojenja te je klorofil a modrozelen, a klorofil b žutozelen. Drugi važni biljni pigmenti prisutni u listićima stevije su karotenoidi, nosioci crvenog, narančastog i žutog obojenja. Kemijski gledano, pripadaju skupini tetraterpena, derivata izoprena koji sadrže 8 izoprenskih jedinica smještenih simetrično u odnosu na centar molekule, a dijele se na karotene i ksantofile.

Pretraživanjem literature utvrđeno je da je iznimno mali broj publikacija sa istraživanjem ovih pigmenata u listićima stevije objavljen. U istraživanju Ruiz-Ruiz i sur. (2015) određen je sadržaj ukupnih karotenoida te klorofila a i b u dva različita meksička kultivara stevije (Criolla i Morita II). Rezultati ove studije potvrđuju da kultivar značajno ne utječe na sadržaj klorofila te prosječno iznosi 4 mg/g, dok je značaj utjecaj na sadržaj karotenoida (16,3 mg/g za Criollu vs. 10,7 mg/g za Moritu II).

U istraživanju Abau-Arab i sur. (2010) određen je sadržaj ovih pigmenata u svježem vs. suhom listu stevije. Interesantno je da se udio karotenoida tijekom sušenja smanjio za 74,8 % (3,9 g/g za svježi vs. 0,76 g/g za suhi list), dok je udio karotenoida nakon sušenja bio manji za 47,4 % (10,1 g/g za svježi vs. 4,7 g/g za suhi list) .

6.4. Antioksidacijska aktivnost

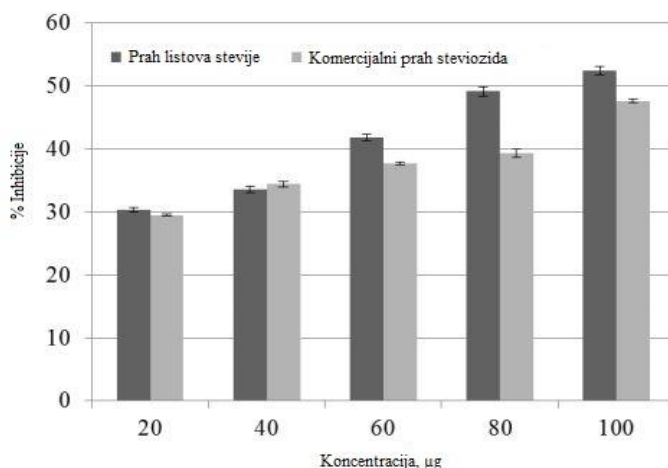
Zeleni listići stevije dobar su izvor različitih fitonutrijenata snažnoga antioksidacijskog i ostalih djelovanja, stoga se vrlo često dodaju različitim prehrambenim proizvodima s ciljem povećanja njihove nutritivne i biološke vrijednosti. Polifenoli su do sada najviše istraživana skupina sekundarnih biljnih metabolita zbog njihove dokazane biološke aktivnosti i pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje te se njihovi antioksidacijski učinci povezuju s njihovom sposobnošću vezanja slobodnih radikala, keliranja metala i inhibicije enzima uključenih u oksidacijske procese (Noorhajati i sur., 2012).

Danas postoji cijeli niz različitih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti, a međusobno se razlikuju prema mehanizmu djelovanja. Pregledom literature obuhvaćene su metode koje se najviše koriste za istraživanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata stevije.

6.4.1. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata stevije određivana DPPH metodom

DPPH metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta bazira se na mehanizmu prijenosa protona i elektrona. Zbog nesparenog elektrona, princip određivanja temelji se na sposobnosti redukcije DPPH radikala, pri čemu dolazi do sparivanja nesparenog elektrona (Brand-Williams i sur., 1995).

Kako bi odredili antioksidacijsku aktivnost stevije, Theodore i suradnici su 2008. godine proveli DPPH metodu određivanja s 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikalom. Ekstrakti pripremljeni iz različitih odvaga (20, 40, 60, 80 i 100 µg) praha listića stevije i komercijalnog praha steviozida su ispitivani. Rezultati DPPH metode su pokazali da je u ekstraktima sa nižim koncentracijama (20 µg) postotak inhibicije skoro pa jednak kod oba praha. U ekstraktima sa odvagama većim od 100 µg postotak inhibicije je znatno veći za prah listića stevije – 52.46%, dok je rezultat antioksidacijske aktivnosti za komercijalni prah steviozida iznosio 47.64%.



Slika 3. Rezultati DPPH metode određivanja antioksidacijske aktivnosti praha listova stevije i komercijalnog praha steviozida (Galla Narsing i sur., 2014)

Autori rada objašnjavaju da varijacije u sadržaju fenola mogu biti odgovorne za promjene u postotku inhibicije. Još veći postotak inhibicije od 77.7% zabilježen je kod ekstrakta stevije u koncentraciji od 250 µg/mL (Ahmad i sur., 2010).

Shukla i suradnici su u istraživanju 2009. godine proučavali ukupan udio polifenola i DPPH aktivnost u etanolnim ekstraktima, a 2012. sve isto u vodenim ekstraktima stevije, s ciljem utvrđivanja utjecaja ekstrakcijskog otapala na istraživane parametre. U etanolnim ekstraktima stevije utvrđen je prosječan udio polifenola od 6.15% te je antioksidacijska aktivnost mjerena u nekoliko ekstrakata različitih masenih koncentracija. U otopini najmanjeg masenog udjela od 20 µg/mL utvrđen je postotak inhibicije od 36.93%, dok je u otopini najvećeg masenog udjela od 200 µg/mL on iznosio 68.76%. Kod vodene otopine ekstrakta stevije prosječan udio polifenola bio je niži (5.67%), a postotak inhibicije mjeran u ekstraktu masene koncentracije 20 µg/mL iznosio je 40%, a za ekstrakt masene koncentracije 200 µg/mL 72.37%.

U istraživanju Grozeva i suradnika 2015. godine je također proučavana antioksidacijska aktivnost etanolnih i vodenih otopina stevije no kao dodatan faktor u obzir je uzeto da li je uzorak suhe biljke stevije fino ili grubo samljeven. DPPH analiza je pokazala da je antioksidacijska aktivnost veća kada se kao otapalo koristi voda (221.35 ± 6.55 mM TE/g ekstrakta) nego 95%-tni etanol (135.8 ± 8.35 mM TE/g ekstrakta). Također, veća antioksidacijska aktivnost je zabilježena kad je za analizu korišten uzorak fino samljevene biljke stevij. Najveća vrijednost je bila u kombinaciji s vodenim otapalom ($361,0 \pm 11,9$ mM TE/g ekstrakta), čak 3 puta veća nego kada se upotrijebio grubo samljeveni uzorak (85.15 ± 5.4 mM TE/g ekstrakta).

Ara Jahan i suradnici su 2010. godine proveli istraživanje u kojem su mjerili antioksidacijsku aktivnost pri različitim koncentracijama (1,5,10,50 i 100 µg/mL) ekstrakta stevije gdje su koristili različita otapala koja su bila vruća ili pri sobnoj temperaturi, te su rezultati zabilježeni kao postotak inhibicije. Prema vrijednostima IC₅₀ najveća antioksidacijska aktivnost je zabilježena kod 80%-tnog etanolnog ekstrakta sobne temperature (IC₅₀ = 8.02±0.874 µg/mL), potom kada su kao otapala korišteni 1-butanol i voda sobne temperature (IC₅₀ = 23.60±0.763 µg/mL), zatim kod vrućeg vodenog otapala (IC₅₀ = 23.7±0.711 µg/mL), slijedi vruće otapalo metanola (IC₅₀ = 44.61±0.821 µg/mL) te vodeno otapalo pri sobnoj temperaturi (IC₅₀ = 43.81±0.459 µg/mL). Vrijednosti inhibicije za otopine n-heksana i diklormetana pri sobnoj temperaturi, te vrućih ekstrakta n-heksana i diklormetana pri koncentracijama od 100µg/ml su bile niže od 50%, što upućuje na nisku antioksidacijsku aktivnost.

U tablici 10. je prikazan pregled rezultata nekoliko dodatnih istraživanja gdje je antioksidacijska aktivnost također određivana DPPH metodom u kalusu i lišću stevije.

Tablica 10. Rezultati DPPH metoda određivanja antioksidacijska aktivnosti listići i kalusa stevije

Dio biljke	Postotak(%) inhibicije	IC ₅₀ (µg / ml)	Otapalo	Referenca
Listići	64.26 ^a	83.45	Voda	Shukla i sur., 2011
Listići	62.76 ^a	93.46	Etanol	Shukla i sur., 2011
Listići	39.86 ^b	752.2	Voda	Tadhani i sur., 2007
Kalus	55.42 ^b	541.3	Voda	Tadhani i sur., 2007
Listići	33.17 ^b	904.4	Metanol	Tadhani i sur., 2007
Kalus	56.82 ^b	527.9	Metanol	Tadhani i sur., 2007
Listići	77.67	NU*	Metanol	Ahmad i sur., 2010
Listići	67.08	NU*	Etanol	Ahmad i sur., 2010
Listići	NU*	45.32	Voda	Ghanta i sur., 2007
Listići	NU*	47.66	Metanol	Ghanta i sur., 2007
Listići	82.86	5.00	Voda	Muanda i sur., 2010
Listići	96.91	2.90	Metanol/ voda	Muanda i sur., 2010
Listići	10.15 ^a	NU*	Voda	Kim i sur., 2011

Kalus	3.50 ^a	NU*	Voda	Kim i sur., 2011
-------	-------------------	-----	------	------------------

*NU - nije utvrđeno

^a 100 µg /mL

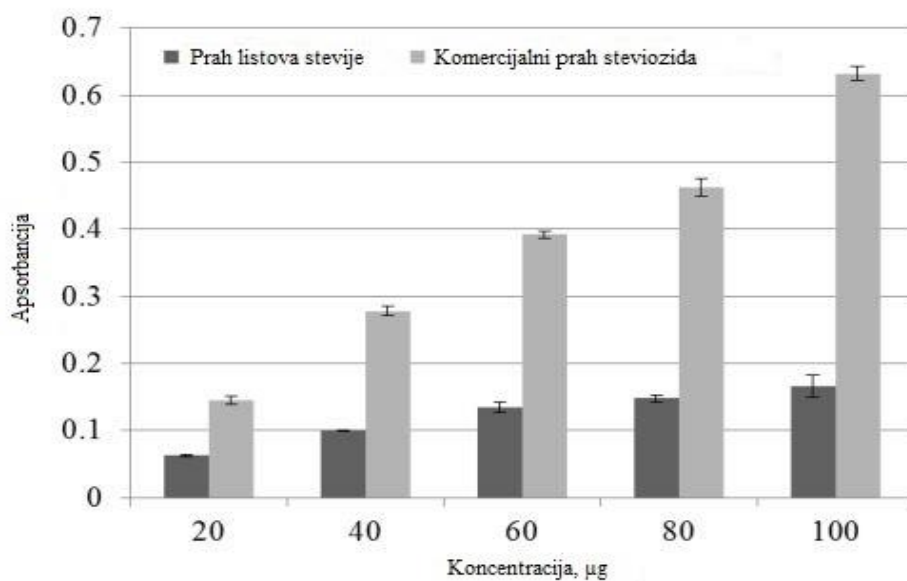
^b 600 µg /mL

6.4.2 Antioksidacijska aktivnost ekstrakata stevije određivana FRAP metodom

FRAP metoda (eng. Ferric Reducing Antioxidant Power method) je metoda koja se temelji na reakciji redukcije Fe^{3+} u Fe^{2+} u prisutstvu antioksidansa, pri čemu dolazi do obojenja produkta. Na taj način se mjeri sposobnost doniranja elektrona, što je važan mehanizam antioksidacijske aktivnosti polifenola (Yildirim i sur., 2001).

Grozev i suradnici su antioksidacijsku aktivnost vodenih i etanolnih otopina fino i grubo samljevene stevije proučavali i FRAP metodom. Rezultati pokazuju da je veća antioksidacijska aktivnost kada je uzorak fino samljeven te da je veći kod vodene otopine ($576,7 \pm 3,1$ mMTE/g ekstrakta), naspram 95%-tne etanolne otopine ($518,8 \pm 8,4$ mMTE/g ekstrakta).

Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata praha listova stevije i komercijalnog praha steviozida FRAP metodom pokazuju da prah listova stevije ima manju sposobnost redukcije, a time i manju antioksidativnu aktivnost, u usporedbi s komercijalnim prahom steviozida (GallaNarsingRao i sur., 2014). Pri masenoj koncentraciji ekstrakta od 20 µg, vrijednost apsorbancije za prah listova stevije iznosi 0.06, dok je za komercijalni prah steviozida ta vrijednost bila niža i iznosila je 0.145. Pri koncentraciji od 100 µg, apsorbancija za prah listova stevije iznosi 0.166, a komercijalnog prah steviozida 0.632, što u ovom slučaju pokazuje da su komercijalni prahovi neovisno o koncentraciji pokazivali veću apsorbanciju.



Slika 4. Redukcijska sposobnost ekstrakata praha listova stevije i komercijalnog praha steviozida određena FRAP metodom (Galla Narsing i sur., 2014)

Na antioksidacijsku aktivnost utječe i vrijeme berbe listova stevije. FRAP vrijednosti tijekom razdoblja vegetativnog rasta su bile značajno veće, nego tijekom početka cvata biljke (Tavarini i Angelini, 2010). Sukladno tome, najmanja količina ukupnih fenola iznosila je 37.26 mg GAE/g sm (početak rasta), dok je najveća izmjerena vrijednost iznosila 78.24 mg GAE/g suhe tvari (tijekom vegetativnog rasta). FRAP metoda je pokazala i da način sušenja utječe na antioksidacijsku aktivnost – ona je bila veća kada se biljka sušila u sjeni, te konvekcijskim sušenjem u usporedbi sa sušenjem na suncu te radijacijom, kada je antioksidacijska aktivnost bila manja. (Moguel-Ordóñez i sur., 2015)

6.4.3. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata stevije određivana ABTS metodom

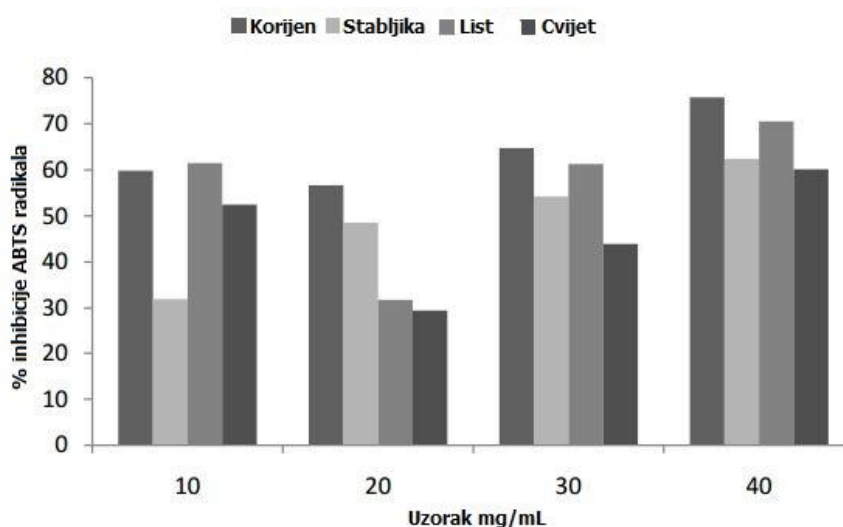
ABTS metoda se temelji na reakciji antioksidansa s radikal kationom 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) ABTS+, pri čemu dolazi do smanjenja intenziteta otopine.

Antioksidacijska aktivnost praha listova stevije i komercijalnog praha steviozida istražena je i primjenom ABTS metode, pri čemu je kao ekstrakcijsko otapalo korišten metanol. Komercijalni prah steviozida je pokazao niži postotak inhibicije ABTS radikala u odnosu na prah listova stevije što je prikazano i u tablici 11.

Tablica 11. Antioksidativna aktivnost metanolnog ekstrakta praha listova stevije i komercijalnog praha steviozida određena ABTS metodom (Galla Narsing i sur., 2014)

Prah listova stevije, µg	ABTS inhibicije %	Komercijalni steviozida, µg	ABTS inhibicije %
2	23.21±0.08	20	32.76 ±0.13
4	28.57 ±0.10	40	39.66 ±0.38
6	30.36 ±0.20	60	44.82 ±0.62
8	32.14 ±0.46	80	55.17 ±0.50
10	37.50 ±0.35	100	58.62 ±0.45

Uspoređujući međusobno različite dijelove biljke, utvrđeno je da se najveća koncentracija polifenola nalazi u korijenu stevije, zatim u listu, nakon toga u stabljici, a najmanje u cvijetu biljke. Rezultati ABTS analize su pokazali direktnu korelaciju koncentracije polifenola s njihovom antioksidacijskom aktivnošću (Singh i sur., 2012), stoga je najveći postotak inhibicije ABTS radikala je utvrđen kod korijena, a najmanji u cvijetu biljke stevije.



Slika 5. Antioksidacijska aktivnost izmjerena ABTS metodom u metanolnim ekstraktima različitih dijelova biljke stevije (Singh i sur., 2012)

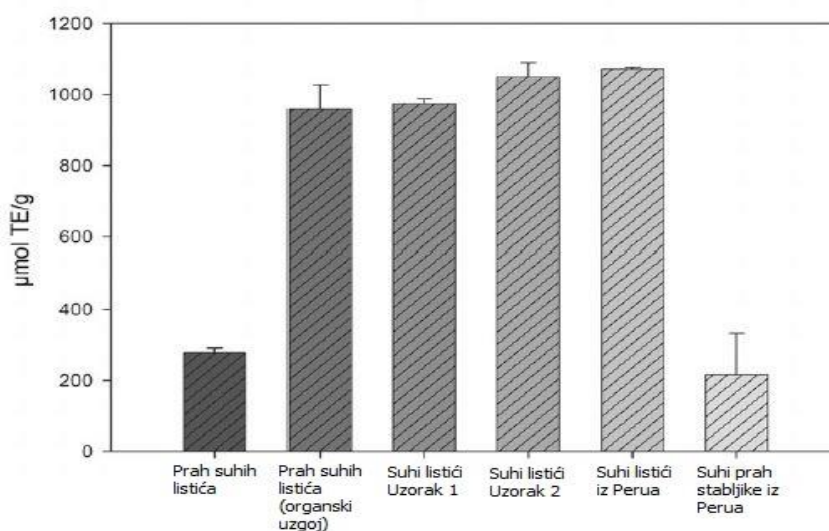
Ruiz Ruiz i suradnici su u svom istraživanju 2015. godine uspoređivali antioksidacijsku aktivnost 2 nove sorte *Stevije Rebaudiane* Bertonii – Moritu II s područja Meksika i Criollu s područja Paragvaja gdje su rezultati pokazali direktnu korelaciju koncentraciju ekstrakta s antioksidacijskom aktivnošću što je prikazano u tablici 12.

Tablica 12. TEAC u ekstraktima biljke *Stevije Rebaudiane* Bertoni (Ruiz Ruiz i sur., 2015)

Koncentracija ekstrakta (mg/mL)	TEAC (mM/mg uzorka)	
	Criolla	Morita II
0,5	248,7	253,3
1,0	311,2	316,6
1,5	389,1	395,8
2,0	498,9	494,8
3,0	623,7	618,5

6.4.4. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata stevije određivana ORAC metodom

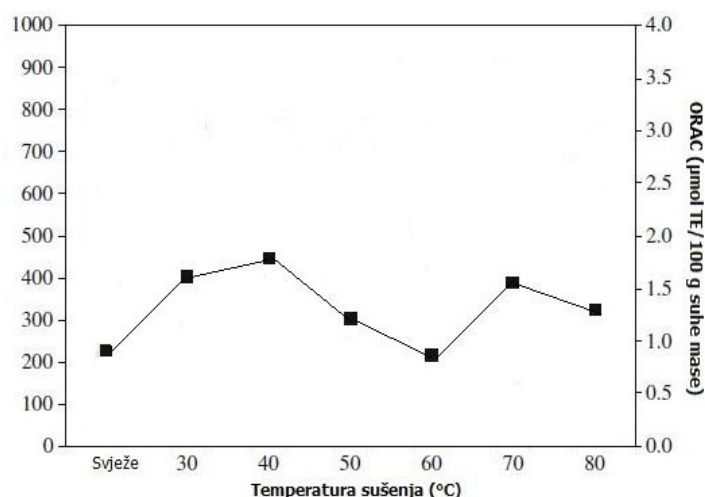
ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity) je metoda mjerenja ukupne sposobnosti vezanja radikala ispitivanog uzorka pri čemu se mjeri intenzitet fluorescencije (Zulueta i sur., 2009). Bender i suradnici su 2015. godine ORAC metodom analizirali različite uzorke stevije – suhe listiće, prah suhih listića te prah suhe stabljike. Najveću antioksidacijsku aktivnost su pokazali suhi listići, te prah suhih listića organskog uzgoja s vrijednostima od 958.8 do 1071.1 mmol TE/g. Najmanje ORAC vrijednosti su pokazali prah suhih listića (278 mmol TE/g) i suhi prah stabljike stevije iz Perua (215.7 mmol TE/g).



Slika 6. ORAC vrijednosti za različite ekstrakte stevije (Bender i sur., 2015.)

U istom istraživanju analizirani su i ekstrakti steviozida i rebaudiozida A, te je ORAC analiza pokazala nisku antioksidacijsku aktivnost 23,8 mmol TE/g za steviozid te 22,8 mmol TE/g za rebaudiozid A.

Lemus Mondaca i suradnici su 2015. godine u svojem istraživanju htjeli utvrditi kako proces sušenja listića stevije pri različitim temperaturama ima utjecaj na antioksidacijsku aktivnost. Tijekom procesa sušenja dolazi do varirajućih rezultata antioksidacijske aktivnosti zbog toga što nastaju brojni spojevi koji se akumuliraju, a mogu imati sinergističke i antagonističke učinke s ostalim spojevima u biljci. Vrijednost ORAC analize za svježe listiće stevije je iznosila 222.59 ± 7.96 . Najveća antioksidacijska aktivnost je zabilježena pri 40 °C, a najniža pri 60 °C, što ukazuje da sušenje listića ima pozitivan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost.



Slika 7. Rezultati ORAC analize pri različitim temperaturama sušenja (Lemus Mondaca i sur., 2015)

U studiji Criado i suradnika 2013. godine proučavana je antioksidacijska aktivnost vodenog ekstrakta stevije pri čemu mu je bila dodana mješavine voćnog soka (naranča, papaja i mango), te se antioksidacijska aktivnost mjerila ORAC metodom pri različitim koncentracijama ekstrakta stevije. Rezultati su prikazani u tablici 13.

Tablica 13. Antioksidacijska aktivnost mjerena ORAC metodom pri različitim koncentracijama stevije (Criado i sur., 2013)

Koncentracija ekstrakta stevije	ORAC (mM TE)
0	4.72±0.54
0,5	11.23±0.50
1,5	30.05±0.06
2,5	40.89±1.51

Nakon prvog mjerenja je slijedila inkubacija od 10 dana pri temperaturama 10 °C i 37 °C. Rezultati ORAC metode nakon inkubacije su pokazali veće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti za uzorke koji su bili inkubirani pri 37 °C. Uzorak koji nije sadržavao steviju nije pokazao veće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti nakon perioda inkubacije. Porast vrijednosti antioksidacijskih aktivnosti kod uzoraka koji su sadržavali steviju se može pripisati nastajanju novih antioksidativnih komponenti, poput melanoidina koji proizlaze iz Maillardovih reakcija, te mogu reagirati sa slobodnim radikalima (Zulueta i sur., 2012).

7. Zaključak

- *Stevia Rebaudiana* Bertoni je višegodišnja grmolika biljka čija popularnost upotrebe kao nisko-kaloričnog zaslađivača sve više raste, a u mnogim zemljama se već koristi niz godina bez ikakvih zabilježenih negativnih posljedica.
- Upravo to što ju je istaknulo od drugih 154 vrsti biljaka porodice *Astraceae* je njen sastav glikozida koji je zaslužan za slatki okus, ponajviše steviozida koji je 250-300 puta slađi od saharoze, te rebaudiozida A koji je 250-450 puta slađi od saharoze.
- Može biti veoma korisna kod osoba koje boluju od dijabetesa, kod liječenja i prevencije pretilosti. Pokazalo se i da ima povoljan učinak na regulaciju krvnog tlaka, osjetljivost na inzulin te na cijeli imunosni sustav čovjeka.
- Alergijske reakcije nisu zabilježene, no svejedno se preporuča oprez ljudima koji su osjetljivi na biljke iz porodice krizantema (*Asteraceae*), te nije preporučljiva njena konzumacija tijekom trudnoće.
- Također je izdvaja i njen bogat profil biološki aktivnih spojeva od čega su najznačajniji i najviše istraživani diterpenski glikozidi, polifenoli, karotenoidi i klorofili, ali i drugi brojni biološki vrijedni spojevi koji se još uvijek istražuju.
- Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti opisane u ovom radu (DPPH, ABTS, FRAP i ORAC) dokazuju visoku antioksidacijsku aktivnost spojeva stevije, a samim time pokazuju i njen potencijal za korištenje u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

8. Literatura

- Abou-Arab, A.E., Abou-Arab, A.A., Abu-Salem, M.F. (2010) Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* bertonii plant. *African Journal of Food Science* **4**, 269- 281.
- Ahmad N., Fazal H., Abbasi B., Farooq S. (2010) Efficient free radical scavenging activity of Ginkgo biloba, *Stevia rebaudiana* and Parthenium hysterophorus leaves through DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). *International Journal of Phytomedicine* **2**: 231–239.
- Ara Jahan I., Mostafa M., Hossain H., Sattar A., Alim A., Moeiz S. M. I. (2010) Antioxidant activity of *Stevia rebaudiana* Bert. Leaves from Bangladesh. *Bangladesh Pharmaceutical Journal* **13**: 67-75.
- Bender C., Graziano S., Zimmermann B. F. (2015), Study of *Stevia rebaudiana* Bertoni antioxidant activities and cellular properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **66**: 553-558.
- Bernal J., Mendiola J., Ibáñez E., Cifuentes A. (2011). Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **55**: 758–774.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* **28**: 25-30.
- Braz de Oliveira A. J., Correia Gonçalves R. A., Cantuaria Chierrito T. P., Müller dos Santos M., Mera de Souza L., Gorin P. A. J. (2011). Structure and degree of polymerisation of fructooligosaccharides present in roots and leaves of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Food Chemistry* **129**: 305–311
- Cacciola F., Delmonte P., Jaworska K., Dugo P. (2011) Employing ultra high pressure liquid chromatography as the second dimension in a comprehensive two-dimensional system for analysis of *Stevia rebaudiana* extracts. *Journal of Chromatography A* **1218**: 2012–2018.
- Criado M. N., Barba F. J., Frígola A., Rodrigo D. (2013) Effect of *Stevia rebaudiana* on Oxidative Enzyme Activity and Its Correlation with Antioxidant Capacity and Bioactive Compounds. *Food Bioprocess Technology* **7**: 1518-1525.

EFSA – European Food Safety Authority (2010) Scientific Opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive
<<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1537>>

Galla Narsing R., Pamidighantam Prabhakar R., Karakala B., Akula S. (2014) Antioxidant Activity of Stevia (*Stevia rebaudiana* L.) Leaf Powder and A Commercial Stevioside Powder. *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences* **2**: 32-38.

Gardana C., Scaglianti M., Simonetti P. (2010) Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1217**:1463–1470

Geuns J. M. C. (2003) Molecules of Interest Stevioside. *Phytochemistry* **64**: 913–921

Ghanta S., Banerjee A., Poddar A., Chattopadhyay S. (2007) Oxidative DNA Damage Preventive Activity and Antioxidant Potential of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, a Natural Sweetener. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 10962–10967.

Goyal S. K., Samsher, Goyal R. K. (2009) *Stevia* (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **61**: 1-10

Grenby TH (1991). Update on low-calorie sweeteners to benefit dental health. *International Journal of Dentistry* **41**:217-24.

Grozeva N., Pavlov D., Petkova N., Ivanov I., Denev P., Pavlov A., Gerdzhikova M., Dimanova-Rudolf M. (2015) Characterisation of Extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni Leaves. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* **7**; 1236-1243.

HAH – Hrvatska agencija za hranu (2009) Znanstveno mišljenje – *Stevia Rebaudiana* Bertoni
<<https://www.hah.hr/znanstveno-misljenje-stevia-rebaudiana-bertoni/>>

Kaushik R., Pradeep N ., Vamshi V., Geetha M., Usha A., (2010) Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. *Journal of Food Science and Technology* **47**: 27–33.

Kim I. S., Yang M., Lee O. H., Kang S, N. (2011) The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *Food Science and Technology* **44**: 1328-1332.

Lemus-Mondaca R., Ah-Hen K., Vega-Gálvez A., Honores C., Moraga N. O. (2015) *Stevia rebaudiana* Leaves: Effect of Drying Process Temperature on Bioactive Components, Antioxidant Capacity and Natural Sweeteners. *Plant Foods for Human Nutrition* **71**: 49-56.

Lemus-Mondaca R., Vega-Gálvez A., Zura-Bravo L., Ah-Hen K. (2012) *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry* **132**: 1121–1132.

Li J., Jiang H., Shi R. (2009) A new acetylated quercetin glycoside from the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Natural Product Research* **23**: 1378–1383.

Makapugay H., Nanayakkara N., Kinghorn A. (1984) Improved high-performance liquid chromatographic separation of the *Stevia rebaudiana* sweet diterpene glycosides using linear gradient elution. *Journal of Chromatography* **283**: 390-395.

Moguel-Ordóñez Y. B., Cabrera-Amaro D. L., Segura-Campos M. R., Ruiz-Ruiz J.C. (2015) Studies on drying characteristic, nutritional composition, and antioxidant properties of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaves. *International Agrophysics* **29**: 323–331.

Mohammad M. R., Mohammad U. D., Sher M. M., Habib A. N., Iqbal A. Q. (2007). In vitro clonal propagation and biochemical analysis of field established *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Pakistan Journal of Botany* **39**: 2467–2474.

Muanda F., Soulimani R., Diop B., Dicko A. (2010) Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Science and Technology* **44**: 1865-1872.

Noorhajati H, Tanjung M, Aminah NS, Suwandi JSA. 2012. Antioxidant activities of extracts of trengguli stem bark (*Cassia fistula* L.). *International Journal of Basic & Applied Sciences* **12**: 85-89.

Pól J., Hohnová B., Hyötyläinen T. (2007) Characterization of Stevia rebaudiana by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1150**: 85–92

Ruiz-Ruiz J.C., Moguel-Ordóñez Y. B., Matus Basto A., Segura-Campos M. R. (2015) Antioxidant capacity of leaf extracts from two Stevia rebaudiana Bertoni varieties adapted to cultivation in Mexico. *Nutricion Hospitalaria* **31**: 1163-1170.

Savita M., Sheela K., Sunanda S., Shankar A.G., Ramakrishna P. (2004) Stevia rebaudiana – A Functional Component for Food Industry. *Journal of Human Ecology* **15**: 261-264

Shukla S, Mehta A, Bajpai VK, Shukla S. (2009) In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of Stevia rebaudiana Bert. *Food and Chemical Toxicology* **47**: 2338–2343.

Shukla S., Meht A., Mehta P., Bajpai V. K. (2012) Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of Stevia rebaudiana Bert. *Experimental and Toxicologic Pathology* **64**: 807–811.

Singh S., Garg V., Yadav D., Beg M. N., Sharma N. (2012) In vitro antioxidative and antibacterial activities of various parts of Stevia rebaudiana (Bertoni). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **4**: 468-473.

Soejarto D. D., Kinghorn A.D., Farnsworth N. R. (1982) Potential sweetening agents of plant origin. III. Organoleptic evaluation of Stevia leaf herbarium samples for sweetness. *Journal of Natural Products* **45**: 590-599.

Szefer P., Nriagu J. (2007). Mineral components in foods. New York: CRC Press.

Tadhani M., Patel V., Subhash R. (2007) In vitro antioxidant activities of Stevia rebaudiana leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis* **20**: 323–329.

Takahashi K., Matsuda M., Ohashi K., Taniguchi K., Nakagomi O., Abe Y., Mori S., Sato N., Okutani K., Shigeta S. (2001) Analysis of anti-rotavirus activity of extract from Stevia rebaudiana. *Antiviral Research* **49**:15–24

Tavarini S., Angelini L. G. (2013) *Stevia rebaudiana* Bertoni as a source of bioactive compounds: the effect of harvest time, experimental site and crop age on steviol glycoside

content and antioxidant properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **93**: 2121-2129

Thomas J. E., Glade M. J. (2010) Stevia: It's Not Just About Calories. *The Open Obesity Journal* **2**: 101-109

Urban J. D., Carakostas M. C., Taylor S. L. (2015) Steviol glycoside safety: Are highly purified steviol glycoside sweeteners food allergens? *Food and Chemical Toxicology* **75**: 71-78

USDA – United States Department of Agriculture – Plant profile

<<https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=STRE2>>

Wan Noranida W. M. N., Nordiana I., NurFadhlin Z.A. (2015) The Growth and Yield of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Grown on Organically Amended Sandy Medium. *International Journal of Science and Advanced Technology* **5**: 14-16.

Willows, R. D. (2004): Chlorophylls. U: Davies, K. (ur.) Plant Pigments and their Manipulation. Oxford, Blackwell Publishing, str. 23-56.

Wolwer-Rieck U. (2012) The Leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), Their Constituents and the Analyses Thereof: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**: 886–895.

Zulueta A., Barba F. J., Esteve M. J., Frígola A. (2013) Changes in quality and nutritional parameters during refrigerated storage of an orange juice-milk beverage treated by equivalent thermal and nonthermal processes for mild pasteurization. *Food and Bioprocess Technology* **6**: 2018–2030.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Iva Bezuk

Iva Bezuk