

ПРОИЗВОДИ ИНТЕРАКЦИЈЕ ПОЛИФЕНОЛА ДОМАЋИХ ЧАЈЕВА СА ПРОТЕИНИМА
МОГУ ДА ИМАЈУ ПРОДУЖЕНО АНТИОКСИДАТИВНО ДЕЈСТВОМирослава Вујчић,¹ Александра Маргетић,¹ Милан Мишић,² Зоран Вујчић²¹ Универзитет у Београду, Институт за хемију, технологију и металургију
– Институт од националног значаја за Републику Србију, Београд, Србија² Универзитет у Београду, Хемијски факултет, Београд, СрбијаPRODUCTS OF INTERACTIONS OF DOMESTIC TEA POLYPHENOLS WITH PROTEINS
MAY HAVE A PROLONGED ANTIOXIDANT EFFECTMiroslava Vujčić,¹ Aleksandra Margetić,¹ Milan Mišić,² Zoran Vujčić²¹ University of Belgrade, Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy
– National Institute of the Republic of Serbia, Belgrade, Serbia² University of Belgrade, Faculty of Chemistry, Belgrade, Serbia

Сажетак

Доказано је да биљни чајеви који се традиционално користе у исхрани позитивно утичу на здравље људи. Тема овог рада је истраживање екстракта три биљке из породице *Lamiaceae* пореклом из Србије: *Satureja montana* L. (ртањски чај), *Salvia officinalis* L. (жалфија), *Mentha spicata* L. (дивља нана), чији је терапеутски потенцијал познат како у народу тако и у медицини. Припремљени су 10% (м/м) водени екстракти биљака. Одређен је укупни садржај полифенола, танина и флавоноида коришћењем Фолин-Чиокалтеовог реагенса и Баговог протокола. Добијени резултати су показали да укупан садржај полифенола значајно варира у испитиваним биљкама, а највећа количина је пронађена у екстракту *Satureja montana* L. За одређивање антиоксидативне активности водених екстракта биљака коришћен је DPPH тест. Садржај полифенола, танина и флавоноида у екстрактима у позитивној је корелацији са њиховом антиоксидативном активношћу. Резултати UV/VIS апсорпционе спектрофотометријске анализе су показали постојање интеракција између полифенола водених биљних екстракта са говеђим серумским албумином, што потенцијално може обезбедити продужено антиоксидативно дејство полифенола.

Кључне речи: домаћи чај, антиоксидативност, интеракције полифенола са протеинима

Abstract

It has been proven that herbal teas traditionally used for nutrition have a positive effect on human health. The aim of this study was to examine the extracts of three plants in the family *Lamiaceae* originating from Serbia: *Satureja montana* L. (Rtanj tea), *Salvia officinalis* L. (sage), *Mentha spicata* L. (spearmint), whose therapeutic potential is known both in traditional and modern medicine. 10% (m/m) aqueous extracts of plants were prepared. The total content of polyphenols, tannins and flavonoids was determined using the Folin-Ciocalteu's reagent and Bag's protocol i.e. aluminum-chloride method. The results obtained showed that the total content of polyphenols varied significantly in the examined plants, and the highest amount was found in the extract of *Satureja montana* L. The DPPH assay was used to determine the antioxidant activity of aqueous plant extracts. The content of polyphenols, tannins and flavonoids in the extracts is positively correlated with their antioxidant activity. The results of UV/VIS absorption spectrophotometry showed the presence of interactions of polyphenols in aqueous plant extracts with bovine serum albumin, which could potentially provide a prolonged antioxidant effect of polyphenols.

Key words: domestic tea, antioxidant activity, polyphenols-proteins interactions

Увод

Постоји велики диверзитет биљних врста које се користе за исхрану људи и у медицини. Иако је употреба дијететских суплемената, који представљају концентроване изворе састојака са нутритивним или физиолошким дејством, веома распрострањена [1], чајеви су најчешћи облик додатка исхрани који се користи у превенцији и лечењу болести и имају вишеструке намене. Употреба биљних екстракта је од великог значаја у традиционалној медицини и практикује се широм света стотинама година. Током времена развијено је велико искуство и направљен значајан напредак у идентифи-

Introduction

There is a great diversity of plant species used for human nutrition and in medicine. Although the use of dietary supplements, which are concentrated sources of ingredients with nutritional or physiological effects, is widespread [1], teas are the most common form of dietary supplements used for the prevention and treatment of diseases for multiple purposes. The application of plant extracts is of great importance in traditional medicine and has been practiced worldwide for hundreds of years. Over time, a great deal of experience has been developed and significant progress has been made in the identification of medicinal substances.

кацији лековитих материја, одабира биља, метода припреме, одговарајуће обраде биља и прописивања дозе [2]. Појам чај се углавном односи на пиће намењено уживању или за лечење болести као једна од алтернативних опција која се користи у лечењу болести и представља водени екстракт лековитог биља, обично ниске концентрације. Треба јасно нагласити да се у свету под термином „прави чај” подразумева само екстракт биљке *Camellia sinensis* (црни, зелени, бели). Све остало су *herbal* или *fruit tea*. У овом раду, термин чај ће се односити на екстракте биљака коришћених у истраживању.

Три најпознатије биљке из породице *Lamiaceae* пореклом из Србије, за које је показано да имају терапеутски потенцијал, су: *Satureja montana* L. (ртањски чај), *Salvia officinalis* L. (жалфија) и *Menta spicata* L. (дивља мента).

Satureja montana L. је полузимзелена грмљика биљка, која је аутохтона у регионима Јужне Европе и Медитерана [3]. Станиште ове биљке у Србији је планина Ртањ. Листове ове веома ароматичне биљке народ је од давнина користио као зачин или за припрему чајева. *Satureja montana* има велику варијабилност у хемијском саставу, чак и унутар исте популације, која расте на истом подручју [4, 5]. Најзаступљеније супстанце су различита биолошки активна једињења као што су терпени [6] и полифенолна једињења [5, 7]. Екстракти и етарска уља ове биљке имају антиоксидативна [7–10], антимикробна [11], диуретичка [12], антиинфламаторна [13] и антихолинестеразна својства [14].

Жалфија (*Salvia officinalis* L.) је једна од најважнијих ароматичних лековитих биљака, која се гаји широм света због свог богатог укуса и биолошких карактеристика – као добар извор секундарних метаболита као што су полифеноли и терпени, који имају и економски значај [15]. Жалфија је аутохтона биљка и распрострањена је на целом Медитерану. Расте и на територији Балкана, посебно у Србији, Босни и Херцеговини, Северној Македонији и Хрватској [16–18]. Полифеноли из жалфије су природни антиоксиданси и користе се у прехранбеној и козметичкој индустрији, а сматра се да имају значајне предности у односу на синтетичке полифеноле, управо због свог природног порекла. Управо су бројна полифенолна једињења разлог интензивне биолошке активности ове биљке [19, 20]. У листовима жалфије утврђено је присуство кофеинске, галне, р-хидроксibenзојеве, р-кумаринске, ванилинске и хлорогенске киселине, као и присуство флавоноида (апигенин, лутеонин и њихови гликозиди) [15, 21]. Жалфија има значајна антифунгална, антиалергена, антибиотска и хипогликемијска својства [15, 16, 19]. Чајеви од жал-

es, selection of plants, methods of preparation, appropriate processing of plants and dosage prescription [2]. The term tea generally refers to a beverage intended for enjoyment or as one of the alternative options for the treatment of diseases, being an aqueous extract of medicinal herbs, usually of low concentrations. It should be clearly emphasized that the term “true tea” globally refers only to the extract of the *Camellia sinensis* plant (black, green, white). All others are called *herbal* or *fruit* teas. In this paper, the term tea will refer to the extracts of plants used in the study.

The three most famous plants in the *Lamiaceae* family, native to Serbia, which have been shown to have therapeutic potential, are: *Satureja montana* L. (Rtanj tea), *Salvia officinalis* L. (sage) and *Menta spicata* L. (spearmint).

Satureja montana L. is a semi-evergreen shrub, native to the regions of southern Europe and the Mediterranean [3]. The habitat of this plant in Serbia is Rtanj Mountain. The leaves of this highly aromatic plant have been used since ancient times as a spice or for preparing teas. *Satureja montana* shows high variability in its chemical composition, even within the same population growing in the same area [4, 5]. The abundant substances are various biologically active compounds such as terpenes [6] and polyphenolic compounds [5, 7]. Extracts and essential oils of this plant have antioxidant [7–10], antimicrobial [11], diuretic [12], anti-inflammatory [13] and anticholinesterase properties [14].

Sage (*Salvia officinalis* L.) is one of the most important aromatic medicinal plants, grown worldwide for its rich flavor and biological characteristics – as a good source of secondary metabolites such as polyphenols and terpenes, which also have economic importance [15]. Sage is an indigenous plant which is widespread throughout the Mediterranean. It also grows in the Balkans, especially in Serbia, Bosnia and Herzegovina, North Macedonia and Croatia [16–18]. Sage polyphenols are natural antioxidants used in the food and cosmetic industries, which are considered to have significant advantages over synthetic polyphenols due to their natural origin. Numerous polyphenolic compounds are precisely the cause of this plant's intense biological activity [19, 20]. The presence of caffeic, gallic, p-hydroxybenzoic, p-coumaric, vanillic and chlorogenic acids, as well as the presence of flavonoids (apigenin, lutein and their glycosides) has been determined in sage leaves [15, 21]. Sage has significant antifungal, antiallergenic, antibiotic and hypoglycemic properties [15, 16, 19]. Sage teas are mainly used externally, while internal consumption is recommended in small quantities due to the presence of some potentially toxic compounds.

фије се углавном користе за спољну употребу, док се конзумација препоручује у малим количинама због присуства одређених потенцијално токсичних једињења.

Најпознатија и најпопуларнија биљка из породице *Lamiaceae* је дивља нана (*Menta spicata* L.). Она је једна од најкултивисанијих ароматичних биљака [22]. Дивља нана се углавном узгаја у Европи и Азији. Користи се као зачин у припреми хране, а традиционално и као чај, где се употребљавају њени осушени листови. Поред својих органолептичких карактеристика, због високог садржаја полифенола и терпена, дивља нана се користи и као антимикробно средство у заштити хране и против оксидативне деградације [15, 22]. Етарско уље нане се састоји од карвона (22–37%) и лимонена (8–31%), а у мањим концентрацијама се састоји од ментона, ментола и еукалиптола [23], а поседује и антимикробно својство [24]. Најзаступљенија хемијска једињења која се налазе у воденом екстракту нане су полифенолна једињења, као што су рузмаринска киселина, деривати лутеолина и апигенина, за које је показано да имају антиоксидативну активност [25–27].

Полифеноли су одговорни за горчину и опорост биљка, а такође и за њихова антиоксидативна својства. Управо ова особина биљака је корисна у борби против болести које карактерише стање оксидативног стреса, као што су рак, кардиоваскуларне болести и старење. Студије су показале да полифеноли у биљкама „хватају“ активне врсте кисеоника и ефикасно спречавају оксидативна оштећења ћелија, а редовно узимање чаја може смањити могућност настајања неких болести [28]. Здравствени ефекти полифенола зависе од њихове биолошке расположивости, на коју утичу хемијска структура и ефикасност апсорпције, а и ензими јетре, као и састав цревне микрофлоре у људском телу [29, 30]. Такође је познато да полифенолна једињења, посебно танини, ступају у интеракцију са протеинима на различите начине [31].

Говеђи серумски албумин по структури одговара хуманом серумском албумину који је један од најзаступљенијих циркулаторних протеина у крви. Говеђи серумски албумин (BSA, енгл. *Bovine serum albumin*) се уобичајено користи као протеински модел због своје високе стабилности, добро познатих физичко-хемијских особина и високе структурне хомологије са хуманим серумским албумином. BSA је мултифункционални протеин са великим капацитетом везивања лиганда, што га чини транспортним молекулом за различите метаболите, лекове, хранљиве материје, метале и друге молекуле.

Ова студија је била усмерена на испитивање каракте-

The best-known and most popular plant in the *Lamiaceae* family is spearmint (*Menta spicata* L.). It is one of the most widely cultivated aromatic plants [22]. Spearmint is mainly grown in Europe and Asia. It is used as a spice for food preparation, and its dried leaves are traditionally brewed as a tea. In addition to its organoleptic properties, and due to its high content of polyphenols and terpenes, spearmint is also used as an antimicrobial agent to preserve food and natural antioxidant to combat oxidative degradation [15, 22]. Spearmint essential oils are primarily composed of carvone (22–37%) and limonene (8–31%), with lesser amounts of menthone, menthol and eucalyptol [23], and they also have antimicrobial properties [24]. The most abundant chemical compounds in the aqueous extract of spearmint are polyphenolic compounds, such as rosmarinic acid, luteolin and apigenin derivatives, which demonstrate potent antioxidant activity [25–27].

Polyphenols are responsible for the bitterness and astringency in plants, but they also possess powerful antioxidant properties that help combat oxidative stress and reduce the risk of diseases such as cancer, cardiovascular disease, and aging-related disorders. Studies have shown that polyphenols in plants “neutralize” reactive oxygen species and effectively prevent oxidative damage to cells, and regular tea consumption may reduce the risk of developing some diseases [28]. The health benefits of polyphenols depend on their bioavailability, which is heavily influenced by the absorption and chemical structure of these plant compounds, as well as by the action of liver enzymes and the composition of the intestinal microflora in the human body [29, 30]. Polyphenolic compounds, especially tannins, are also known to have interactions with proteins in various ways [31].

Bovine serum albumin is structurally similar to human serum albumin, which is one of the most abundant circulating proteins in human blood. Bovine serum albumin (BSA) is commonly used as a model protein due to its high stability, well-known physicochemical properties, and high structural homology similar to human serum albumin. BSA is a multifunctional protein with a high ligand-binding capacity, making it a transport molecule for various metabolites, drugs, nutrients, metals, and other molecules.

This study was focused on investigating the characteristics of aqueous extracts of herbal teas of local origin (freshly harvested *Satureja montana* L., *Mentha spicata* L. and *Salvia officinalis* L.), which are known to have different amounts and types of polyphenolic compounds. The aim of this paper was to determine the total concentration of polyphenolic compounds, tannins and flavonoids, their antioxidant activity and to examine their interactions with BSA protein.

ристика водених екстраката биљних чајева локалног порекла (свеже убране *Satureja montana* L, *Mentha spicata* L. and *Salvia officinalis* L.), за које се зна да имају различите количине и врсте полифенолних једињења. Циљ рада је био да се утврди укупна концентрација полифенолних једињења, танина и флавоноида, њихова антиоксидативна активност и да се испита њихова интеракција са BSA протеином.

Материјал и методе

Материјал и инструменти

Све хемикалије и реагенси коришћени у овом раду су били аналитичког квалитета и производ су компаније Мерк (Дармштат, Немачка). Биљке су производ Института за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић”, осим *Satureja montana* L која је сакупљена на обронцима планине Ртањ (Србија).

UV/VIS спектрофотометрија је урађена на UV-1800 Shimadzu спектрофотометру који покрива опсег таласних дужина 200 до 800 nm у кварцим ћелијама, дужине оптичког пута 1,0 cm. За одређивање антиоксидативне активности коришћен је читач микротитар плоча Appliskan (Thermo Fisher Scientific) са софтверским пакетом Thermo Scientific ScanIt Software 2.3.

Добијање биљних екстраката

Измерен је 1,00 g листова биљака, осушених и уситњених до праха у које је додато 10,00 mL кључале воде. Након екстракције од 15 мин. на 60 °C уз повремено мешање узорци су центрифугирани на 10000 rpm. Одвојени супернатанти су означени као екстракти чаја. Добијени екстракти су подељени на аликвоте и чувани на -20 °C до испитивања и разблаживани у складу са захтевима сваког експеримента.

Одређивање садржаја укупних полифенола и танина

Садржај укупних полифенола у екстрактима биљака одређен је колориметријском методом по Фолин-Чиокалтеу [32]. Коришћен је комерцијално доступан Фолин-Чиокалтеов реагенс. У епрувете са 100 µL стандардног раствора или екстракта чаја додато је 0,5 mL реагенса (претходно разблаженог водом у односу 1:10) и 400 µL 7,5% раствора натријум-бикарбоната. Реакционе смеше су инкубиране 1 h у мраку. Апсорбанца добијеног раствора плаве боје је мерена на спектрофотометру на 765 nm. Као стандард коришћен је водени раствор галне киселине (концентрација 12,5; 25; 50; 75; 100 и 150 mg/L). Количина полифенолних једињења

Material and methods

Material and instruments

All chemicals and reagents used in this study were of analytical grade and manufactured by Merck Company (Darmstadt, Germany). The plants were obtained from the Institute for the Study of Medicinal Plants “Dr. Josif Pančić”, except for *Satureja montana* L., which was collected on the slopes of Rtanj Mountain (Serbia).

UV/VIS spectrophotometry was performed using a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer covering a wavelength range from 200 nm to 800 nm and employing quartz cells, with a 1.0 cm optical path length. An Appliskan (Thermo Fisher Scientific) microplate reader with the Thermo Scientific ScanIt Software 2.3 software package was used to measure antioxidant activity.

Obtaining herbal extracts

Dried and powdered plant leaves were weighed ($m = 1.00$ g) and then 10.00 mL of boiling water was added to the leaves. After 15 min-extraction at 60°C with occasional stirring, the samples were centrifuged at 10,000 rpm. The separated supernatants were labeled as tea extracts. The obtained extracts were divided into aliquots and stored at -20°C until testing and were diluted in accordance with the requirements of each experiment.

Determining total phenolic and total tannin content

The total phenolic content in plant extracts was determined using the Folin-Ciocalteu colorimetric method [32]. A commercially available Folin-Ciocalteu's reagent was used. 0.5 mL of reagent (previously diluted with water in a ratio of 1:10) and 400 µL of 7.5% sodium bicarbonate solution were added to test tubes containing 100 µL of standard solution or tea extract. The reaction mixtures were incubated for 1 h in the dark. The absorbance of the resulting blue-colored solution was measured at 765 nm using a spectrophotometer. An aqueous solution of Gallic acid (of the following concentrations 12.5; 25; 50; 75; 100 and 150 mg/L) was used as a standard. The amount of polyphenolic compounds (g/L) was calculated in gram equivalents of Gallic acid. To determine the amount of tannins in plant extracts, tannic acid was used as a standard substance of the concentrations of 20, 40, 60, 80 and 100 mg/L, and the tannin content was expressed as gram equivalents of tannic acid (g/L).

Determining flavonoid content

(g/L) израчуната је као грам еквиваленти галне киселине. За одређивање количине танина у екстрактима биљака као стандардна супстанција коришћена је танинска киселина у концентрацијама од 20, 40, 60, 80 и 100 mg/L, а садржај танина је изражен као грам еквивалент танинске киселине (g/L).

Одређивање садржаја флавоноида

Садржај флавоноида одређиван је према Баговом протоколу [33]. Рутин је коришћен као стандард, а резултати су изражени као еквиваленти рутина (μM). За припрему калибрационе криве, 100 μL рутина концентрација 4, 8, 10, 20, 40, 60, 80 и 100 $\mu\text{g/mL}$ у 80% етанолу (V/V) је помешано са 300 μL 95% етанола (V/V), 20 μL 10% алуминијум-хлорида (V/V), 20 μL 1 M калијум-ацетата и 560 μL воде. За одређивање флавоноида у узорцима коришћено је 100 μL ртањског чаја (екстракт је 200 пута разблажен водом), жалфије (екстракт је 100 пута разблажен водом) или нане (екстракт је 100 пута разблажен водом). После инкубације на собној температури током 30 минута, мерена је апсорбанца реакције смеше у односу на слепу пробу на 415 nm.

Одређивање антиоксидативне активности у екстрактима биљног чаја

За одређивање антиоксидативне активности коришћен је DPPH (α -дифенил- β -пикрилхидразил) тест [34]. Раствор DPPH у метанолу (360 μM) припремљен је свеж. Коришћене концентрације стандардних раствора аскорбинске киселине биле су 12,5; 25; 50, 75 и 100 μM . Екстракти ртањског чаја разблажени су 500 пута, а екстракти жалфије и нане 100 пута. Реакционе смеше у микротитар плочи са 96 бунара добијене су мешањем 10 μL узорка или стандарда и 190 μL DPPH реагенса. Ова смеша је инкубирана 15 мин. у мраку уз мешање, након чега је мерена апсорбанца на 520 nm на Appliskan читачу. Након мерења добијени резултати су изражени као μM еквиваленти аскорбинске киселине.

Интеракције чајева са протеинима

За спектрофотометријско мерење, раствору BSA (15 μM у 40 mM натријум-бикарбонатном пуферу pH 8,0) додато је 15 μL разблаженог екстракта ртањског чаја, жалфије или нане претходно разблажених 10, 4 или 2 пута, респективно. Реакционе смеше су инкубирани на собној температури уз повремено мешање на вортекс-мешалици током 1 сата и снимљени су спектри. Спектралне промене су одређене из једначине (1) [35]:

$$\left[(\epsilon_{\text{BSA}} + \epsilon_{\text{tp}}) - \epsilon_{\text{BSA}} / \epsilon_{\text{tp}} \right] / (\epsilon_{\text{BSA}} + \epsilon_{\text{tp}}) \times 100 \quad (1)$$

The flavonoid content was determined using Bag's protocol i.e. aluminum-chlorine method [33]. Rutin was used as a standard, and the results were expressed as rutin equivalents (μM). A calibration curve was prepared by mixing 100 μL of rutin of the concentrations of 4, 8, 10, 20, 40, 60, 80 and 100 $\mu\text{g/mL}$ in 80% ethanol (V/V) with 300 μL of 95% ethanol (V/V), 20 μL of 10% aluminum chloride (V/V), 20 μL of 1 M potassium acetate and 560 μL of water. To determine flavonoid content in the samples, 100 μL of Rtanj tea (extract diluted 200 times with water), sage (extract diluted 100 times with water) or spearmint (extract diluted 100 times with water) were used. After incubation at room temperature for 30 minutes, the absorbance of the reaction mixture was measured at 415 nm against the blank sample.

Determining the antioxidant activity in herbal tea extracts

The DPPH (α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) assay [34] was used to determine the antioxidant activity. A (360 μM) solution of DPPH in methanol was prepared fresh. The concentrations of standard ascorbic acid solutions used were 12.5; 25; 50, 75 and 100 μM . The Rtanj tea extracts were diluted 500 times, and the extracts of sage and spearmint were diluted 100 times. The reaction mixtures were formed by combining 10 μL of a sample or standard and 190 μL of a DPHP reagent in a 96-well microtiter plate. This mixture was incubated in the dark for 15 minutes with stirring, and afterwards the absorbance was measured at 520 nm using an Appliskan reader. After measurement, the obtained results were expressed as μM equivalents of ascorbic acid.

Tea-protein interactions

For spectrophotometric measurements, 15 μL of diluted extracts of Rtanj tea, sage, or spearmint previously diluted 10, 4, or 2 times, respectively, were added to a BSA solution (15 μM in 40 mM sodium bicarbonate buffer at pH 8.0). The reaction mixtures were incubated at room temperature for 1 hour, mixing occasionally with a vortex mixer, and then the spectra were recorded. The spectral changes were determined from the following equation (1) [35]:

$$\left[(\epsilon_{\text{BSA}} + \epsilon_{\text{tp}}) - \epsilon_{\text{BSA}} / \epsilon_{\text{tp}} \right] / (\epsilon_{\text{BSA}} + \epsilon_{\text{tp}}) \times 100 \quad (1)$$

where ϵ_{BSA} , ϵ_{tp} and $\epsilon_{\text{BSA}} / \epsilon_{\text{tp}}$ are the extinction coefficients for BSA, free tea polyphenols and tea polyphenols binding to BSA.

Statistical analysis of the results

Three extracts of each herbal tea sample were prepared and all analyses were performed in triplicate. Calibration

где су ϵ_{BSA} , ϵ_{tp} и $\epsilon_{BSA}/\epsilon_{tp}$ коефицијенти екстинкције BSA, слободних полифенола чаја и полифенола чаја везаних за BSA.

Статистичка обрада резултата

Припремљена су по три екстракта сваког узорка биљног чаја и све анализе урађене су у трипликату. Калибрационе криве за квантификацију су такође рађене у трипликату. Примарни спектри свих спектрофотометријских мерења су обрађени у софтверском пакету *OriginPro* 2018.

Резултати

Укупан садржај полифенола и флавоноида

Укупни садржај полифенола три домаћа чаја из породице *Lamiaceae* у Србији (*Satureja montana* L., *Salvia officinalis* L. и *Menta spicata* L.) у 10% (прерачунато на суву масу) воденом екстракту биљака одређен је из једначине калибрационе криве ($y = 0.0091x + 0.255$ ($R^2 = 0.9994$)). Добијени резултати изражени су као еквиваленти галне киселине, ЕГК (g/L), табела 1. Слично, укупни танини у екстрактима чаја одређени су коришћењем танинске киселине као стандарда ($y = 0.0125x + 0.0155$ ($R^2 = 0.9991$)). Резултати су изражени као еквиваленти танинске киселине, ЕТК (g/L). Добијени резултати су приказани су у табели 1. У табели 1 је такође дат и укупан садржај флавоноида у екстрактима, изражен као еквиваленти рутина, ЕР (μM). Садржај флавоноида је одређен употребом рутина (гликозида кверцетина) као стандарда из калибрационе криве ($y = 0.0049x + 0.0151$ ($R^2 = 0.9987$)).

Табела 1. Садржај укупних полифенола, танина и флавоноида у екстрактима домаћих чајева

Екстракт чаја <i>Tea extract</i>	ЕГК (g/L) <i>GAE (g/L)</i>	ЕТК (g/L) <i>TAE (g/L)</i>	ЕР (μM) <i>RE (μM)</i>
<i>Satureja montana</i> L.	11,74	8,55	2,24
<i>Salvia officinalis</i> L.	4,58	2,32	2,13
<i>Menta spicata</i> L.	3,97	2,90	1,50

ЕГК – еквивалент галне киселине
ЕТК – еквивалент танинске киселине
ЕР – еквивалент рутина

Антиоксидативна активност

Метода коришћена у овом раду за одређивање антиоксидативне активности је DPPH (α -дифенил- β -пикрилхидразил) тест [34]. У табели 2 приказани су ре-

curves for quantification were also performed in triplicate. Primary spectra of all spectrophotometric measurements were processed using the *OriginPro* 2018 software package.

Results

Total phenolic and total flavonoid content

The total phenolic content of three domestic teas in the *Lamiaceae* family in Serbia (*Satureja montana* L., *Salvia officinalis* L. and *Menta spicata* L.) in 10% aqueous plant extract (calculated on a dry weight basis) was determined from the calibration curve equation ($y = 0.0091x + 0.255$ ($R^2 = 0.9994$)). The obtained results were expressed as gallic acid equivalents, GAEs (g/L), Table 1. Similarly, total tannins in tea extracts were determined using tannic acid as a standard ($y = 0.0125x + 0.0155$ ($R^2 = 0.9991$)). The results were expressed as tannic acid equivalents, TAEs (g/L). The results obtained are presented in Table 1. Table 1 also shows the total flavonoid content in the extracts, expressed as rutin equivalents, REs (μM). To determine the flavonoid content, rutin (a quercetin glycoside) was used as a standard for the calibration curve ($y = 0.0049x + 0.0151$ ($R^2 = 0.9987$)).

Table 1. Content of total polyphenols, tannins and flavonoids in the domestic tea extracts

Antioxidant activity

The method used in this study to determine antioxidant activity is the DPPH (α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) assay [34]. Table 2 shows the results obtained for the extracts of the

зультати добијени за екстракте три испитивана домаћа чаја. three domestic teas examined.

Табела 2. Антиоксидативна активност у екстрактима домаћих чајева

Екстракт чаја <i>Tea extract</i>	Еквивалнет аскорбинске киселине (mM) <i>Ascorbic acid equivalent (mM)</i>
<i>Satureja montana</i> L.	11,50
<i>Salvia officinalis</i> L.	2,41
<i>Menta spicata</i> L.	2,02

Table 2. Antioxidant activity in the domestic tea extracts

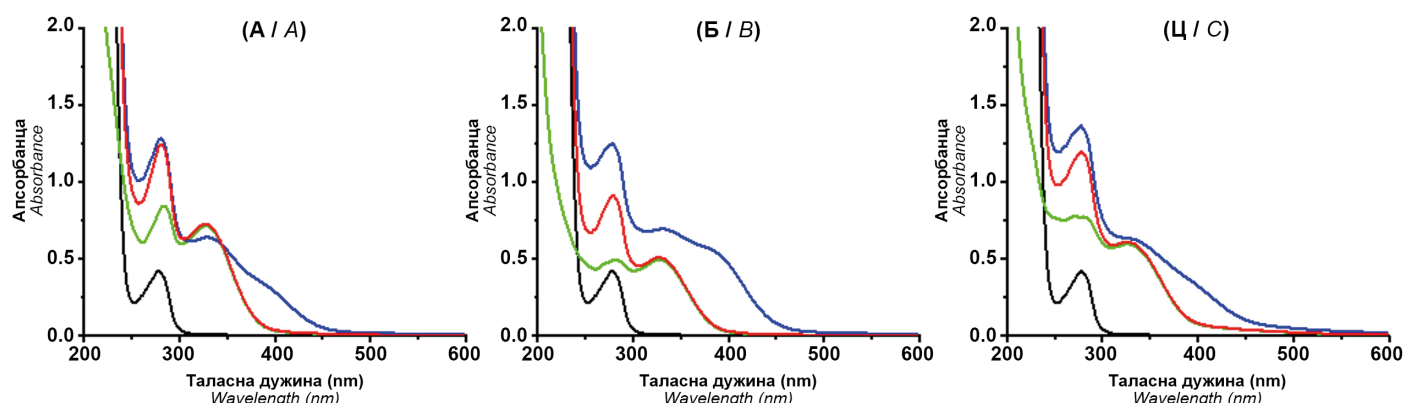
Интеракција екстракта чаја са BSA

Ултраљубичаста-видљива (енгл. UV/VIS) апсорпциона спектроскопска метода је коришћена за испитивање интеракција водених екстракта *Satureja montana* L., *Salvia officinalis* L. и *Menta spicata* L. са BSA. Снимани су апсорпциони спектри чаја пре и после инкубације са BSA. Као што је приказано на слици 1, UV/VIS спектар BSA (црне криве на слици), показао је максимум апсорбанце на таласној дужини 278 nm, чему су допринеле ароматичне аминокиселине (триптофан и тирозин). У примењеним експерименталним условима, у UV/VIS спектрима свих екстракта чаја уочене су две доминантне апсорпционе траке (зелене криве на слици 1). Први пик са апсорпционим максимумом на 283 nm у спектрима *Satureja montana* L. (слика 1А) и *Salvia officinalis* L. (слика 1Б) и на 280 nm у спектру *Menta spicata* L. (слика 1Ц) првенствено се приписује флавононима. Други пик који је у спектрима *Satureja montana* L. (слика 1А), *Salvia officinalis* L. (слика 1Б) и *Menta spicata* L. (слика 1Ц) детектован на 327 nm, 328 nm и 330 nm, респективно, потиче од фенолне киселине [36]. Такође, у спектрима екстракта нане и жалфије детектована је апсорпциона трака са максимумом апсорбанце на 270 nm, која потиче од галне киселине [18]. Након инкубације раствора BSA са екстрактима чајева, (плаве криве на слици 1), добијени UV/VIS спектри за *Satureja montana* L., *Salvia officinalis* L. и *Menta spicata* L. (слике 1А, 1Б и 1Ц, респективно) показују максимум апсорбанце на 278 nm и широке апсорпционе траке са апсорпционим максимумима на 330 nm. Такође, апсорпционе траке у облику рамена се примећују у видљивом делу на око 360–460 nm, а најизраженија је у спектру BSA/екстракт жалфије. Како BSA и екстракти чаја показују значајну апсорбанцу у опсегу од 200 до 300 nm и долази до преклапања, добијени UV/VIS спектри за BSA/чај су упоређени са израчунатим вредностима апсорбанци за BSA+чај (црвене криве, слика 1). Највеће смањење апсорбанце BSA на 278 nm (за 27%) добијено је након интеракције са екстрактом *Salvia officinalis* L., у

Interactions of tea extracts with BSA

Ultraviolet-visible (UV/VIS) absorption spectroscopy was used to investigate the interactions of aqueous extracts of *Satureja montana* L., *Salvia officinalis* L. and *Menta spicata* L. with BSA. The absorption spectra of tea were recorded before and after incubation with BSA. As shown in Figure 1, the UV/VIS spectrum of BSA (black curves in the Figure) showed an absorbance maximum at a wavelength of 278 nm, which was contributed by aromatic amino acids (tryptophan and tyrosine). Under the applied experimental conditions, two dominant absorption bands were observed in the UV/VIS spectra of all tea extracts (green curves in Figure 1). The first peak with an absorbance maximum at 283 nm in the spectra of *Satureja montana* L. (Figure 1A) and *Salvia officinalis* L. (Figure 1B) and an absorbance maximum at 280 nm in the spectrum of *Menta spicata* L. (Figure 1C) is primarily attributed to flavones. The second peak detected at 327 nm, 328 nm and 330 nm in the spectra of *Satureja montana* L. (Figure 1A), *Salvia officinalis* L. (Figure 1B) and *Menta spicata* L. (Figure 1C), respectively, arises from phenolic acid [36]. Also, an absorption band with an absorbance maximum at 270 nm was detected in the spectra of spearmint and sage extracts, which arises from gallic acid [18]. After incubation of BSA solutions with tea extracts (blue curves in Figure 1), the UV/VIS spectra obtained for *Satureja montana* L., *Salvia officinalis* L. and *Menta spicata* L. (Figures 1A, 1B and 1C, respectively) showed an absorbance maximum at 278 nm and broad absorption bands with an absorbance maximum at 330 nm. Also, shoulder-shaped absorption bands can be seen in the visible region at around 360–460 nm, and the most pronounced one is found in the spectrum of BSA/sage extract. Since BSA and tea extracts showed significant absorbance in the 200–300 nm range with overlapped absorption bands, the obtained UV/VIS spectra for BSA/tea were compared with the calculated absorbance values for BSA+tea (red curves, Figure 1). The largest decrease in BSA absorbance at 278 nm (by 27%) was obtained after interaction with the extract of *Salvia officinalis* L., compared

поређењу са вредностима смањења апсорбанце након интеракције са екстрактима *Menta spicata* L. (за 18%) и *Satureja montana* L. (за 3%). Ове промене у апсорбанцама праћене су хиперхромизмом, чија је вредност износила -37%, -14% и -3%, респективно.



Слика 1. Промене у UV/VIS спектрима BSA (црна крива) после интеракције екстракта *Satureja montana* L. (панел А), *Salvia officinalis* L. (панел Б) и *Menta spicata* L. (панел Ц). Зелене криве означавају спектре биљних чајева, црвене криве означавају израчунате спектре (BSA + чај), а плаве криве означавају снимљене спектре након интеракције BSA/чај.

Дискусија

Полифеноли су веома заступљени у храни биљног порекла, која представља основу савремене исхране. Имају велики значај у превенцији многих болести, због својих изражених антиоксидативних особина. Већина полифенола који се налазе у људској храни су фенолне киселине и флавоноиди [36], док су чајеви богати галном киселином [30]. У овом истраживању садржај укупних полифенола, танина и флавоноида у воденим екстрактима *Satureja montana* L., *Salvia officinalis* L. и *Menta spicata* L. одређен је методом по Фолин-Чиокалтеу [32] коришћењем галне киселине као стандарда. Као што се може закључити из добијених резултата приказаних у табели 1, *Satureja montana* L., односно ртањски чај, садржи значајно већу количину укупних полифенола, као и танина и флавоноида, у поређењу са друге две биљке из породице *Lamiaceae* пореклом из Србије. Такође, добијене вредности су у сагласности са резултатима Чутовић и аутора [37] који су недавно показали да су мацерати експериментално гајеног ртањског чаја веома богати фенолним једињењима и флавоноидима. Утврђена количина укупних полифенола у нани и жалфији упада у опсег вредности добијених анализом инфузија биљака из рода *Salvia*, односно *Menta* [38]. Садржај полифенола у чајевима изражен преко галне киселине није апсолутна количина полифенола који се могу наћи у чајевима и због тога је

to the values of absorbance decrease after interactions with the extracts of *Menta spicata* L. (by 18%) and *Satureja montana* L. (by 3%). These changes in absorbance were accompanied by hyperchromicity, the value of which was -37%, -14% and -3%, respectively.

Figure 1. Changes in UV/VIS spectra of BSA (black curve) after interaction with the extracts of *Satureja montana* L. (panel A), *Salvia officinalis* L. (panel B) and *Menta spicata* L. (panel C). Green curves indicate the spectra of herbal teas, red curves indicate the calculated spectra (BSA + tea), and blue curves indicate the spectra recorded after BSA-tea interactions.

Discussion

Polyphenols are abundant in many plant-based foods, which represent a foundation for modern nutrition. They play an important role in the prevention of various diseases, due to their pronounced antioxidant properties. Most polyphenols found in human diet are phenolic acids and flavonoids [36], while teas are rich in gallic acid [30]. In this study, the content of total polyphenols, tannins and flavonoids in aqueous extracts of *Satureja montana* L., *Salvia officinalis* L. and *Menta spicata* L. was determined by the Folin-Ciocalteu method [32] using gallic acid as a standard. As it can be concluded from the obtained results shown in Table 1, *Satureja montana* L., or Rtanj tea, contains a significantly higher amount of total polyphenols, as well as of tannins and flavonoids, compared to two other plants in the *Lamiaceae* family originating from Serbia. Also, the obtained values are in accordance with the findings of Čutović et al. [37] who has recently showed that the macerates of experimentally grown Rtanj tea are very rich in phenolic compounds and flavonoids. The amount of total polyphenols found in spearmint and sage falls within the range of values obtained by analyzing infusions of plants in the genus *Salvia* i.e., *Menta* [38]. The content of polyphenols in teas expressed as Gallic acid is not the absolute amount of polyphenols that can be found in teas, which is why their antioxidant activity was determined (Table 2). The content of polyphenols, tannins and flavonoids in the

одређивана њихова антиоксидативна активност (табела 2). Садржај полифенола, танина и флавоноида у испитиваним биљним екстрактима позитивно корелира са резултатима DPPH теста, што потврђује учешће екстракта биљака у уклањању радикала, а ртањски чај се показао као најбољи „хватач“ слободних радикала. Овде је значајно напоменути да су ранија истраживања показала корелацију између садржаја фенола у биљкама и њихове антиоксидативне моћи [36, 39].

Различите истраживачке групе бавиле су се интеракцијама природних полифенола са протеинима из усне дупље и њиховим утицајем на укус, као и ефектом чистих, хемијски синтетисаних полифенола на исте протеине [31, 40]. У овом раду акценат је био на испитивању интеракција свеже припремљених екстракта домаћих чајева из породице *Lamiaceae* пореклом из Србије са протеинима. Да би се испитале интеракције чајева са BSA, UV/VIS апсорпциона спектроскопска анализа екстракта чаја пре и после инкубације са BSA урађена је у 40 mM натријум бикарбонатном пуферу (pH 8). Бикарбонатни пуфер је један од најважнијих физиолошких пуфера, а његов пуферски капацитет покрива pH опсег од 5,4 до 7,4. Добијене промене у апсорпционим тракама на 278 nm праћене хиперхромизмима (слика 1) указују на структурне промене молекула BSA, услед формирања комплекса између присутних једињења у чајевима и протеина. Као што је од раније познато, главна група природних полифенолних једињења из биљака која ступају у интеракцију са протеинима су танини [41]. Иако је највећи садржај укупних полифенола утврђен у ртањском чају, екстракт жалфије је показао највећу интеракцију са BSA. Ово може бити последица интеракције са танинима, који у случају ртањског чаја, због своје велике количине, доводе до делимичног таложења молекула BSA. Промене у видљивом делу спектра указују на значајне интеракције полифенола и протеина.

Закључак

Чајеви који су вековима познати и у употреби у Србији доказано позитивно утичу на здравље људи, а не захтевају додатну прераду као нпр. црни чај (такође садржи и кофеин, који ограничава дозвољени унос овог чаја). У литератури има мало података који се односе на антиоксидативни потенцијал водених екстракта биљака *Satureja montana* L., *Salvia officinalis* L. и *Menta spicata* L., који су најпогоднији и најчешће коришћени као чајеви у исхрани и превенцији. Углавном се истраживања односе на екстракте ових биљака са различитим органским растварачима [4, 8, 16]. Поред познатих антиоксидативних предности, полифеноли из ових биљних

examined plant extracts positively correlates with the results of the DPPH assay, which confirms the participation of plant extracts in radical scavenging activity, and Rtanj tea proved to be the best “neutralizer” of free radicals. It is important to note here that earlier studies have shown a correlation between the phenolic content in plants and their antioxidant capacity [36, 39].

Various research groups have investigated the interactions of natural polyphenols with oral proteins and their influence on taste, as well as the effect of pure, chemically synthesized polyphenols on the same proteins [31, 40]. In this study, the emphasis was on examining the interactions of freshly prepared extracts of domestic teas in the *Lamiaceae* family originating from Serbia with proteins. To investigate the interactions of teas with BSA, UV/VIS absorption spectroscopy of tea extracts was performed before and after incubation with BSA in 40 mM sodium bicarbonate buffer (at pH 8). Bicarbonate buffer is one of the most important physiological buffers, and its buffer capacity covers the pH range from 5.4 to 7.4. The changes found in the absorption bands at 278 nm accompanied by hyperchromicity (Figure 1) indicate structural changes in the BSA molecule, due to the formation of complexes between the compounds present in teas and proteins. As previously known, tannins are a major group of naturally occurring polyphenolic compounds found in plants that interact with proteins [41]. Although the highest content of total polyphenols was determined in Rtanj tea, sage extract showed the highest interaction with BSA. This may be a result of the interaction with tannins, which in the case of Rtanj tea, and due to their large amount, lead to partial precipitation of BSA molecules. The changes seen in the visible region of the spectra indicate significant polyphenols-proteins interactions.

Conclusion

Teas, known and used in Serbia for centuries, have proven to have a positive effect on human health, and do not require additional processing, such as black tea (it also contains caffeine, which limits the permissible intake of black tea). In the literature, there is little data on the antioxidant potential of aqueous extracts of the plants *Satureja montana* L., *Salvia officinalis* L. and *Menta spicata* L., which are the most suitable and most commonly used as teas for nutrition and prevention. Most research deals with extracts of these plants with various organic solvents [4, 8, 16]. In addition to the well-known antioxidant benefits, polyphenols in these herbal teas interacting with bovine serum albumin indicate their capacity for a prolonged effect in the body. Therefore, studies on the interactions of tea polyphenols with BSA open up the field of future research on human

чајева у интеракцији са говеђим серумским албумином указују на њихову способност за продужено деловање у телу. Стога, истраживање интеракције полифенола чајева и BSA отвара поље будућих истраживања на хуманом серумском албумину. Ртањски чај је посебно занимљив јер је веома богат полифенолима. Он се може конзумирати у великим количинама, чак и као концентровани екстракт, јер нема штетних ефеката.

serum albumin. Rtanj tea is especially interesting since it is very rich in polyphenols and it can be consumed in large quantities, even as a concentrated extract, because there are no adverse effects.

Финансирање: Ово истраживање је финансирали Министарство за науку, технолошки развој и иновације Републике Србије, уговор број 451-03-136/2025-03/200168 и 451-03-136/2025-03/200026.

Funding: This study was funded by the Ministry of Science, Technological Development and Innovation of the Republic of Serbia, contract no. 451-03-136/2025-03/200168 and 451-03-136/2025-03/200026.

Литература / References

1. Dodevska M, Milenković M, Nedeljković T, Tripković B, Blagojević Z, Jovanović V. Determination of content of vitamins B1, B2, B3 and B6 in dietary supplements. *Glasnik javnog zdravlja*. 2022; 96(2):152–64. <https://doi.org/10.5937/serbjph2202152D>
2. Jamshidi-Kia F, Lorigooini Z, Amini-Khoei H. Medicinal plants: Past history and future perspective. *J Herbmed Pharmacol*. 2018; 7(1):1–7. <https://doi.org/10.15171/jhp.2018.01>
3. Slavkovska V, Jancic R, Bojovic S, Milosavljevic S, Djokovic D. Variability of essential oils of *Satureja montana* L. and *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff. from the central part of the Balkan peninsula. *Phytochemistry*. 2001; 57(1):71–6. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00458-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00458-1)
4. Mastelić J, Jerković I. Gas chromatography–mass spectrometry analysis of free and glycoconjugated aroma compounds of seasonally collected *Satureja montana* L. *Food Chem*. 2003; 80(1):135–40. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00346-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00346-1)
5. Ćetković GS, Mandić AI, Čanadanović–Brunet JM, Djilas SM, Tumbas VT. HPLC Screening of Phenolic Compounds in Winter Savory (*Satureja montana* L.) Extracts. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2007; 30(2):293–306. <https://doi.org/10.1080/10826070601063559>
6. Escudero J, López JC, Rabanal RM, Valverde S. Secondary Metabolites from *Satureja* Species. New Triterpenoid from *Satureja acinos*. *J Nat Prod*. 1985; 48(1):128–31. <https://doi.org/10.1021/np50037a025>
7. López-Cobo A, Gómez-Caravaca AM, Švarc-Gajić J, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity of a Mediterranean plant: The case of *Satureja montana* subsp. *kitaibelii*. *J Funct Foods*. 2015; 18:1167–78. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.023>
8. Radonic A, Milos M. Chemical Composition and In Vitro Evaluation of Antioxidant Effect of Free Volatile Compounds From *Satureja montana* L. *Free Radic Res*. 2003; 37(6):673–9.
9. Dilas SM, Canadanovic-Brunet JM, Cetkovic GS, Tumbas VT. Antioxidative activity of some herbs and spices - A review of ESR studies. In: Belton PS, Gill AM, Webb GA, Rutledge, D, editors. *Magnetic resonance in Food Science* [Internet]. London: RSC; 2007. p. 110–20. <https://doi.org/10.1039/9781847551269-00110>
10. Vladić J, Zeković Z, Cvejic A, Adamović D, Vidović SS. Optimization of *Satureja montana* Extraction Process Considering Phenolic Antioxidants and Antioxidant Activity. *Sep Sci Technol*. 2014; 49(13):2066–72. <https://doi.org/10.1080/01496395.2014.908218>
11. Pepeljnjak S, Stanić G, Potočki P. Antimikrobna djelotvornost etanolnog ekstrakta vrste *Satureja montana* ssp. *montana* [Antimicrobial activity of the ethanolic extract of *Satureja montana* ssp. *montana*]. *Acta Pharmaceutica*. 1999;49(1):65–9. Croatian

12. Stanic G, Samaržija I. Diuretic activity of *Satureja montana* subsp. *Montana* extracts and oil in rats. *Phytother Res.* 1993; 7(5):363–6. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650070508>
13. Jafari F, Ghavidel F, Zarshenas MM. A Critical Overview on the Pharmacological and Clinical Aspects of Popular *Satureja* Species. *J Acupunct Meridian Stud.* 2016; 9(3):118–27. <https://doi.org/10.1016/j.jams.2016.04.003>
14. Jukic M, Politeo O, Maksimovic M, Milos M, Milos M. In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytother Res.* 2007; 21(3):259–6. <https://doi.org/10.1002/ptr.2063>
15. Martins N, Barros L, Santos-Buelga C, Henriques M, Silva S, Ferreira ICFR. Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chem.* 2015; 170:378–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.096>
16. Russo A, Formisano C, Rigano D, Senatore F, Delfino S, Cardile V, Rosselli S, Bruno M. Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. *Food Chem Toxicol.* 2013; 55:42–7. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.12.036>
17. Dent M, Dragović-Uzelac V, Penić M, Brnčić M, Bosiljkov T, Levaj B. The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technol Biotechnol.* 2013 [cited 2022]; 51(1). 84–91. Available from: <https://www.ftb.com.hr/archives/1076-the-effect-of-extraction-solvents-temperature-and-time-on-the-composition-and-mass-fraction-of-polyphenols-in-dalmatian-wild-sage-salvia-officinalis-l-extracts>
18. Generalić I, Skroza D, Ljubenković I, Katalinić A, Burčul F, Katalinić V. Influence of the phenophase on the phenolic profile and antioxidant properties of Dalmatian sage. *Food Chem.* 2011; 127(2):427–. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.013>
19. Kivilompolo M, Hyötyläinen T. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: Characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. *J Chromatogr A.* 2007; 1145(1–2):155–64. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.090>
20. Lu Y, Foo LY. Polyphenolics of *Salvia* - A review. *Phytochemistry.* 2002; 59(2):117–40. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(01\)00415-0](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(01)00415-0)
21. Lu Y, Foo LY. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry.* 2000; 55(3):263–7. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00309-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00309-5)
22. Kanatt SR, Chander R, Sharma A. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chem.* 2007; 100(2):451–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.066>
23. Telci I, Demirtas I, Bayram E, Arabaci O, Kacar O. Environmental variation on aroma components of pulegone/piperitone rich spearmint (*Mentha spicata* L.). *Ind Crops Prod.* 2010; 32(3):588–92. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.07.009>
24. Silva CL, Câmara JS. Profiling of volatiles in the leaves of Lamiaceae species based on headspace solid phase microextraction and mass spectrometry. *Food Res Int.* 2013; 51(1):378–87. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.040>
25. Caboni P, Saba M, Tocco G, Casu L, Murgia A, Maxia A, et al. Nematicidal Activity of Mint Aqueous Extracts against the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*. *J Agric Food Chem.* 2013; 61(41):9784–8. <https://doi.org/10.1021/jf403684h>
26. Dorman HJD, Koşar M, Kahlos K, Holm Y, Hiltunen R. Antioxidant Properties and Composition of Aqueous Extracts from *Mentha* Species, Hybrids, Varieties, and Cultivars. *J Agric Food Chem.* 2003; 51(16):4563–9. <https://doi.org/10.1021/jf034108k>
27. Wang H, Provan GJ, Helliwell K. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chem.* 2004; 87(2):307–11. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.12.029>
28. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia.* 2011; 82(4):513–23. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>
29. Gupta A, Kagliwal LD, Singhal RS. Biotransformation of Polyphenols for Improved Bioavailability and Processing Stability. *Adv Food Nutr Res.* 2013; 69:183–217. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410540-9.00004-1>

30. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79(5):727–47. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
31. Bandyopadhyay P, Ghosh AK, Ghosh C. Recent developments on polyphenol–protein interactions: effects on tea and coffee taste, antioxidant properties and the digestive system. *Food Funct*. 2012; 3(6):592–605. <https://doi.org/10.1039/c2fo00006g>
32. Haile M, Kang WH. Antioxidant Activity, Total Polyphenol, Flavonoid and Tannin Contents of Fermented Green Coffee Beans with Selected Yeasts. *Fermentation*. 2019; 5(1):29. <https://doi.org/10.3390/fermentation5010029>
33. Bag GC, Grihanjali Devi P, Bhaigya T. Assessment of total flavonoid content and antioxidant activity of methanolic rhizome extract of three *Hedychium* species of Manipur valley. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2015 [cited 2022]; 30(1):154–9. Available from: <https://www.globalresearchonline.net/pharmajournal/vol30iss1.aspx>
34. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*. 2011;48(4):412–22. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>
35. Vujčić MT, Tufegdžić S, Novaković I, Djikanović D, Gašić MJ, Sladić D. Studies on the interactions of bioactive quinone avarone and its methylamino derivatives with calf thymus DNA. *Int J Biol Macromol*. 2013; 62:405–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.09.013>
36. Viacava GE, Roura SI, López-Márquez DM, Berrueta LA, Gallo B, Alonso-Salces RM. Polyphenolic profile of butterhead lettuce cultivar by ultrahigh performance liquid chromatography coupled online to UV–visible spectrophotometry and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Chem*. 2018; 260:239–73. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.151>
37. Čutović N, Batinić B, Marković T, Radanović D, Marinković A, Bugarski B, et al. Optimization of the extraction process from *Satureja montana* L.: physicochemical characterization of the extracts. *Hem. Ind*. 2023; 77(4): 251–63. <https://doi.org/10.2298/HEMIND221213020C>
38. Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem*. 2006; 94(4):550–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.004>
39. Lall RK, Syed DN, Adhami VM, Khan MI, Mukhtar H. Dietary Polyphenols in Prevention and Treatment of Prostate Cancer. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(2):3350–76. <https://doi.org/10.3390/ijms16023350>
40. Nozaki A, Hori M, Kimura T, Ito H, Hatano T. Interaction of Polyphenols with Proteins: Binding of (-)-Epigallocatechin Gallate to Serum Albumin, Estimated by Induced Circular Dichroism. *Chem Pharm Bull*. 2009; 57(2):224–8. <https://doi.org/10.1248/cpb.57.224>
41. Engström MT, Sun X, Suber MP, Li M, Salminen JP, Hagerman AE. The Oxidative Activity of Ellagitannins Dictates Their Tendency to Form Highly Stabilized Complexes with Bovine Serum Albumin at Increased pH. *J Agric Food Chem*. 2016; 64(47):8994–9003. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01571>



Примљено / Received
16. 12. 2022.

Ревидирано / Revised
5. 3. 2025.

Прихваћено / Accepted
6. 3. 2025.

Кореспонденција / Correspondence

Мирослава Вујчић – Miroslava Vujčić
miroslava.vujcic@ihtm.bg.ac.rs

ORCID

Miroslava Vujčić
<https://orcid.org/0000-0001-6375-0309>

Aleksandra Margetić
<https://orcid.org/0000-0003-2445-0375>

Milan Mišić
<https://orcid.org/0000-0002-9673-9226>

Zoran Vujčić
<https://orcid.org/0000-0002-8963-2439>