

Streszczenie jednotematycznego cyklu publikacji pt.

„Interakcje bioaktywnych składników kawy i wybranych dodatków funkcjonalnych jako czynnik modyfikujący potencjalną aktywność biologiczną”

Konsumpcja żywności i napojów o wysokiej zawartości związków fenolowych wiąże się z zapobieganiem chorobom wieńcowym, nowotworom i innym, tzw. chorobom cywilizacyjnym. W wiele z tych zaburzeń zaangażowany jest stres oksydacyjny wynikający z nadprodukcji reaktywnych form tlenu (RFT), które powstają również na skutek aktywności enzymów prooksydacyjnych, między innymi lipooksygenazy (LOX) czy oksydazy ksantynowej (OX). Do obrony przed RFT organizm wykorzystuje własny układ enzymatyczny oraz przeciwutleniacze egzogenne, na przykład związki fenolowe. Ich skuteczność antyoksydacyjna wynika wielokierunkowego działania: mogą być inhibitorami reakcji wolnorodnikowych poprzez hamowanie powstawania rodników lipidowych, przerywanie propagacji łańcuchowych reakcji autooksydacji, wygaszanie tlenu singletowego, mogą działać jako czynniki redukujące przekształcające wodoronadtlenki do trwałych związków, jako związki chelatujące jony metali przejściowych oraz jako inhibitory enzymów prooksydacyjnych.

Dane epidemiologiczne wskazują na istotny związek między regularnym pićm kawy, a zmniejszonym ryzykiem wystąpienia cukrzycy typu 2, raka wątroby i błony śluzowej trzonu macicy oraz raka jelita grubego. Korzyści te częściowo można przypisać kwasom chlorogenowym. Przyprawy i zioła są dodawane do żywności od czasów starożytnych, nie tylko jako środki smakowe, ale również jako substancje lecznicze i konserwanty żywności. Prozdrowotne działanie przypraw wiąże się między innymi z właściwościami przeciwzakrzepowymi, przeciwmiażdżycowymi, hipolipemicznymi, hipoglikemicznymi, hipotensyjnymi, przeciwzapalnymi, antyartretycznymi i hamującymi agregację trombocytów. W niniejszej pracy do wzbogacania naparów z kawy palonej zastosowano cynamon, imbir, kardamon oraz chili, które wpływają nie tylko na smak i zapach, ale także właściwości przeciwutleniające gotowego napoju.

Głównymi czynnikami decydującymi o aktywności biologicznej związków polifenolowych pochodzących z żywności są ich przemiany metaboliczne oraz biodostępność, a zagadnieniem bardzo często pomijanym w badaniach nad żywnością są interakcje jej składników. Celem pracy było określenie profilu polifenolowego kawy palonej i wybranych dodatków funkcjonalnych oraz określenie rodzaju interakcji substancji biologicznie czynnych w aspekcie ich biodostępności. Otrzymane rezultaty zostały porównane z oddziaływaniami w

układzie modelowym złożonym z czystych chemicznie wzorców (zidentyfikowanych jako dominujące związki czynne badanych ekstraktów) w celu określenia wpływu matrycy żywności na rodzaj interakcji obserwowanej w ramach danej aktywności biologicznej.

W naparze z kawy zidentyfikowano kilkanaście związków fenolowych. Były to głównie substancje z grupy kwasów hydroksycynamonowych (Durak i in. **I.-III.**). W pracy Durak i in. **III.** wyznaczony został współczynnik biodostępności związków fenolowych (APC). Jego wartość wynosiła 0,88, co może wskazywać na dość dobrą skuteczność ekstrakcji związków czynnych przez symulowany układ trawienny. W ekstraktach z cynamonu zidentyfikowano 8 związków aktywnych: cztery związki z grupy proantocyjanidyn, kwas cynamonowy i inne polifenole, takie jak kumaryna, oraz aldehydy cynamonowe *-cis* i *-trans* (Durak i in. **I.**). W naparze z imbiru zidentyfikowano 5 związków lotnych: były to pochodne gingerolu. Ponadto wszystkie te związki były obecne w ekstraktach imbiru po trawieniu (Durak i in. **II.**). W wodnym naparze z kardamonu zidentyfikowano kwas protokatechowy, kwas wanilinowy, kwas ρ -kumarowy oraz kwas ferulowy (Durak i in. **III.**). Jakościowo- ilościowa analiza profilu fenolowego chili wykazała obecność ośmiu związków biologicznie czynnych. Dominującym związkiem czynnym okazała się kapsaicyna występująca w suszonych owocach czerwonej papryczki chili w najwyższym stężeniu, ale wykazano również obecność pochodnych kwercetyny, apigeniny i luteoliny (Durak i in. **IV.**). Całkowite stężenie związków fenolowych w ekstrakcie z przyprawy chili ($966,27 \pm 14,46$ mg/g) było dużo wyższe niż w przypadku ekstraktu kawy ($224,9 \pm 11,25$ mg/g) i ekstraktów pozostałych badanych przypraw, takich jak cynamon ($42,6 \pm 2,11$ mg/g) (Durak i in. **I.**) i imbir ($5,4 \pm 0,01$ mg/g) (Durak i in. **II.**) oraz kardamon ($2,121 \pm 0,05$ mg/g) (Durak i in. **III.**). Biorąc pod uwagę profil polifenolowy w badanych przyprawach uzyskano następujący szereg: chili>cynamon>imbir>kardamon. Pomimo bardzo niskiego stężenia związków czynnych, dla ekstraktu z kardamonu odnotowano wysoką ich biodostępność (APC= 2,85) (Durak i in. **III.**).

Właściwości przeciwutleniające ekstraktów z kawy oraz z zaproponowanych przypraw zbadano przy użyciu kilku metod opierających się na zróżnicowanych mechanizmach działania. Wyniki zostały przedstawione jako EC50 (mg/ml), czyli stężenie próby badanej niezbędne do uzyskania 50% badanej aktywności (Durak i in. **I.-IV.**). W przypadku ekstraktu z kawy potencjał antyoksydacyjny (wyrażony jako zdolność do neutralizowania rodnika ABTS⁺) wynosił 1,86 mg/ml. Pod względem pojemności przeciwutleniającej aromatyczne dodatki można uszeregować następująco: cynamon (1,52 mg/ml)>kardamon (3,68 mg/ml)>imbir (6,40 mg/ml)>chili (16,11 mg/ml). Po trawieniu *in vitro* zaobserwowano spadek wartości EC50. Dla kawy współczynnik EC50 obniżył się do 1,47mg/ml, zaś dla trawionych ekstraktów z przypraw

wyniki można ułożyć w następujący szereg: cynamon (1,18 mg/ml)>kardamon (2,24 mg/ml)>imbir (3,82 mg/ml)>chili (6,59 mg/ml). Źródłem związków o największej aktywności przeciwutleniającej wobec kationorodnika ABTS⁺ okazał się cynamon. Drugą z przeprowadzonych analiz była ocena siły redukcji (Durak i in. **III.**; Durak i in. **IV.**). W tym przypadku dla wodnego ekstraktu kawy odnotowano EC50 na poziomie 0,58 mg/ml i co ciekawe, współczynnik ten wzrósł do 1,21 mg/ml po procesie trawienia *in vitro*. Chili wykazywała lepsze właściwości niż kardamon, aczkolwiek w obydwu przypadkach siła redukcji wzrosła do zbliżonej wartości (4,94 mg/ml dla chili i 5,07 mg/ml dla kardamonu) po procesie symulowanego trawienia. Analizując zdolność do chelatowania jonów metali przejściowych najlepsze rezultaty odnotowano dla naparu z chili, gdzie proces trawienia jeszcze zwiększył aktywność tego ekstraktu, w przeciwieństwie do ekstraktów z kawy, których zdolność chelatowania po procesie trawienia *in vitro* zdecydowanie zmalała (z 0,58 mg/ml do 1,21 mg/ml). Kardamon okazał się źródłem związków o bardzo niskiej zdolności chelatowania jonów metali przejściowych, aczkolwiek właściwości tego ekstraktu nieznacznie wzrosły na skutek symulowanego trawienia. W przypadku zdolności do neutralizowania rodnika hydroksylowego zaobserwowano istotny spadek wartości EC50 w ekstraktach z kawy i z kardamonu na skutek trawienia *in vitro*. Biorąc pod uwagę ekstrakt z chili aktywność naparu była zbliżona do aktywności ekstraktu z kawy, ale po procesie trawienia *in vitro* zaobserwowano istotny spadek badanej aktywności. Trawienie *in vitro* spowodowało istotny spadek zdolności do neutralizowania rodnika ponadtlenkowego przez związki zawarte w naparze z kawy (EC50 odpowiednio 14,96 mg/ml i 10,30 mg/ml).

Biorąc pod uwagę fakt, iż powstawanie wolnych rodników związane jest także z aktywnością pro-oksydacyjnych enzymów takich jak lipooksygenaza (LOX) przeprowadzono analizę zdolności do hamowania aktywności tego enzymu przez ekstrakty z kawy oraz cynamonu, imbiru i kardamonu (Durak i in. **I.-III.**). W przypadku naparu z kawy wartość EC50 dla ekstraktu sprzed trawienia wynosiła 4,22 mg/ml i wzrosła do 1,45 mg/ml na skutek zmian zachodzących podczas procesu trawienia *in vitro*. Analizując zdolności naparów z przypraw do hamowania aktywności LOX zaobserwowano następującą hierarchię: kardamon (EC50= 2,53 mg/ml) > imbir (EC50= 3,83 mg/ml) > cynamon (EC50= 4,98 mg/ml). Wszystkie ekstrakty z przypraw po trawieniu *in vitro* wykazywały dużo wyższą zdolność hamowania aktywności LOX w porównaniu z naparami wyjściowymi. Zarówno napar z kawy jak i z kardamonu wykazywał zdolność do hamowania aktywności oksydazy ksantynowej (XO) (Durak i in. **III.**). Co ważne, kardamon okazał się bardzo dobrym źródłem potencjalnie biodostępnych inhibitorów XO.

Kolejny etap badań obejmował ocenę interakcji pomiędzy bioaktywnymi składnikami kawy oraz zaproponowanych dodatków aromatycznych. Wyniki zostały porównane do interakcji czystych chemicznie wzorców tworzących układy modelowe. Analizując zdolność do wymiatania kationorodnika ABTS^{•+} zaobserwowano reakcję antagonistyczną w przypadku mieszaniny ekstraktów kawy i cynamonu oraz w układzie modelowym złożonym z kwasu chlorogenowego i cynamonowego (Durak i in. I.). W przypadku kawy z imbirem, napary wodne działały synergistycznie, w ekstraktach po symulowanym trawieniu zaobserwowano reakcję addycji, zaś w układzie modelowym antagonizm (Durak i in. II.). Wodne napary z kawy i kardamonu działały synergistycznie, zaś w przypadku ekstraktów po symulowanym trawieniu oraz w układzie modelowym - antagonistycznie (Durak i in. III.). Związki bioaktywne zawarte w kawie i w przyprawie chili działały synergistycznie wobec kationorodnika ABTS^{•+}, aczkolwiek po procesie trawienia *in vitro* odnotowano antagonizm działania (Durak i in. IV.). Analizując zdolność do redukcji stwierdzono synergizm w przypadku wodnych jak i trawionych ekstraktów z kawy i z kardamonu oraz w stworzonym dla nich układzie modelowym (Durak i in. III.). Taki sam rodzaj interakcji odnotowano dla ekstraktów kawy i przyprawy chili przed procesem trawienia jak i po nim (Durak i in. IV.). Związki zdolne do chelatowania jonów metali przejściowych zawarte w ekstraktach kawy i kardamonu działały synergistycznie, zaś po procesie symulowanego trawienia i w układzie modelowym zaobserwowano reakcję addycji (Durak i in. III.). Ekstrakty kawy i chili działały antagonistycznie, a proces trawienia *in vitro* nie wpłynął na rodzaj obserwowanej interakcji (Durak i in. IV.). Z kolei w przypadku zdolności do neutralizowania rodnika hydroksylowego zaobserwowano silny antagonizm pomiędzy związkami zawartymi w naparach z kawy i z kardamonu, reakcję addycji po trawieniu, zaś w układzie modelowym - synergizm działania kwasu chlorogenowego i wanilinowego (Durak i in. III.). Składniki kawy i chili działały synergistycznie wobec rodnika hydroksylowego, aczkolwiek po procesie trawienia *in vitro* odnotowano antagonizm (Durak i in. IV.). Związki zdolne do neutralizowania rodnika ponadtlenkowego (O₂^{•-}) obecne w naparach kawy i chili działały synergistycznie (Durak i in. IV.). Taką samą zależność zaobserwowano dla kawy z kardamonem, zaś dla tych ekstraktów po trawieniu oraz w układzie modelowym odnotowano silny antagonizm działania (Durak i in. III.).

Badając interakcje w obrębie zdolności do hamowania aktywności lipooksygenazy zaobserwowano synergizm inhibitorów LOX zawartych w naparze z kawy i z cynamonu oraz w układzie modelowym jednakże po procesie symulowanego trawienia stwierdzono antagonizm (Durak i in. I.). W przypadku kawy z imbirem napary działały antagonistycznie,

ale dla ekstraktów po trawieniu *in vitro* oraz w układzie modelowym odnotowano reakcję synergistyczną (Durak i in. **II.**). Analizując interakcje naparów z kawy i kardamonu oraz układ modelowy wykazano synergizm działania, zaś ekstrakty trawione oddziaływały antagonistycznie (Durak i in. **III.**). Biorąc pod uwagę zdolność mieszanki ekstraktów kawy i kardamonu hamowania aktywności OX zaobserwowano reakcję synergistyczną zarówno w przypadku ekstraktów jak i w układzie modelowym złożonym z kwasu chlorogenowego i wanilinowego (Durak i in. **III.**).

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na wielokierunkową aktywność biologiczną zaproponowanych surowców uzasadniającą ich potencjalne wykorzystanie jako dodatków funkcjonalnych. Szczególnie cenne są ich właściwości pozwalające na profilaktykę/wspomaganie leczenia tzw. chorób cywilizacyjnych o podłożu wolnorodnikowym, w tym zdolność hamowania aktywności enzymów pro-oksydacyjnych.

Piśmiennictwo:

- I.** Durak A., Gawlik-Dziki, U., Pecio, Ł. 2014. Coffee with cinnamon – impact of phytochemicals interactions on antioxidant and anti-inflammatory *in vitro* activity. *Food Chemistry*, 162, 81-88
- II.** Durak A., Gawlik-Dziki, U., Kowalska, I., 2014. Coffee with ginger- interactions of biologically active phytochemicals in the model system. *Food Chemistry*, Vol. 166, 261-269.
- III.** Durak A., Gawlik-Dziki, U., Kowalska, I., 2016. Evaluation of interactions between coffee and cardamom, their type, and strength in relation to interactions in a model system, *CyTA - Journal of Food*, Vol. 15, Issue 2, 266-276. DOI: 10.1080/19476337.2016.1247298.
- IV.** Durak A., Kowalska, I., Gawlik-Dziki, U., 2017. UPLC–MS method for determination of phenolic compounds in chili as a coffee supplement and their impact of phytochemicals interactions on antioxidant activity *in vitro*. *Acta Chromatographica*. To link to this article: <http://www.akademai.com/doi/abs/10.1556/1326.2016.00173>