

Udio teških metala i ukupnih polifenola te antioksidativna aktivnost kava s dodatkom gljiva

Pernar, Patricija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:629309>

Rights / Prava: [Attribution-ShareAlike 4.0 International / Imenovanje-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-12**

REPOZITORIJ

PTF

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Patricija Pernar

**UDIO TEŠKIH METALA I UKUPNIH POLIFENOLA TE ANTIOKSIDATIVNA
AKTIVNOST KAVA S DODATKOM GLJIVA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj 2024

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju

Katedra za ekologiju i toksikologiju

Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Opasnosti vezane za hranu

Tema rada: je prihvaćena na VII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2022./2023. održanoj 2. svibnja 2023.

Mentor: prof. dr. sc. *Tomislav Klapac*

Komentor: prof. dr. sc. *Ana Bucić-Kojić*

Pomoć pri izradi: dr. sc. *Gordana Šelo*

Udio teških metala i ukupnih polifenola te antioksidativna aktivnost kava s dodatkom gljiva

Patricija Pernar, 0113145771

Sažetak: Određen je udio teških metala (olova, kadmija i arsena) u prženim mljevenim kavama, instant kavama, komercijalno dostupnim kavama s gljivama, te prahovima i ekstraktima 5 vrsta gljiva: *Innonotus obliquus*, *Cantharellus cibarius*, *Cordyceps sinensis*, *Hericium erinaceus* i *Ganoderma lucidum*. Pripremljene su i mješavine kava s preparatima gljiva koje su analizirane. Koncentracija teških metala u uzorcima analizirana je grafitnom tehnikom atomske apsorpcijske spektrometrije, ukupni polifenoli su određeni Folin-Ciocalteu metodom, a antioksidacijska aktivnost DPPH metodom. Prahovi gljiva općenito sadrže znatno više srednje koncentracije teških metala (428,0 ng/g Pb, 58,4 ng/g Cd, 335,8 ng/g As) u odnosu na kave (4,0 – 39,6 ng/g Pb, 6,3 – 7,5 ng/g Cd, 89 – 131,7 ng/g As) i ekstrakte gljiva (1,4 ng/g Pb, 1,5 ng/g Cd, 43,9 ng/g As). Koncentracije teških metala u mješavinama kava i preparata gljiva ovise o sastavnicama te su prosječno više u mješavinama koje uključuju prahove gljiva u odnosu na one s ekstraktima. Procjenom unosa teških metala konzumacijom tri šalice mješavina kava s dodatkom preparata gljiva utvrđeno je da dnevni unos teških metala može činiti značajan udio sigurnih doza ili čak biti dvostruko veći. Očekivano, srednje koncentracije ukupnih polifenola su najveće u instant kavama (147,1 mg CAE/g) i znatno manje u preparatima gljiva (2,5 – 4,2 mg CAE/g). Analogni odnosi su ustanovljeni za antioksidacijsku aktivnost koja prvenstveno ovisi o polifenolima. Osjetljive populacijske skupine (trudnice, dojilje, bolesne osobe itd.) bi trebale ograničiti unos prahova gljiva ili koristiti ekstrakte. Instant kave i odgovarajuće kombinacije s gljivama bi mogle imati snažniji pozitivan učinak na zdravlje.

Ključne riječi: gljive, teški metali, ukupni polifenoli, antioksidacijska aktivnost

Rad sadrži: 103 stranice

46 slika

12 tablica

140 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- | | |
|---|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Daliborka Koceva Komlenić</i> | predsjednik |
| 2. prof. dr. sc. <i>Tomislav Klapac</i> | član-mentor |
| 3. prof. dr. sc. <i>Ana Bucić-Kojić</i> | član |
| 4. prof. dr. sc. <i>Mirela Kopjar</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 12. srpnja 2024.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:

Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Applied Chemistry and Ecology
Subdepartment of Ecology and Toxicology
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program: Food Engineering
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology
Course title: Foodborne Hazards
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VII. held on May 2, 2023.
Mentor: Tomislav Klapac, PhD, prof.
Co-mentor: Ana Bucić-Kojić, PhD, prof.
Technical assistance: Gordana Šelo, PhD

Heavy metal and total polyphenol content and antioxidant activity of coffees with mushrooms Patricija Pernar,
0113145771

Summary: The content of heavy metals (lead, cadmium, and arsenic) was determined in roasted ground coffees, instant coffees, commercially available mushroom coffees, and powders and extracts of 5 types of mushrooms: *Inonotus obliquus*, *Cantharellus cibarius*, *Cordyceps sinensis*, *Hericium erinaceus*, and *Ganoderma lucidum*. Coffee blends with mushroom preparations were also prepared and analyzed. The concentration of heavy metals in the samples was analyzed using graphite furnace atomic absorption spectrometry, total polyphenols were determined by the Folin-Ciocalteu method, and antioxidant activity by the DPPH method. Mushroom powders generally contain significantly higher average concentrations of heavy metals (428.0 ng/g Pb, 58.4 ng/g Cd, 335.8 ng/g As) compared to coffees (4.0 – 39.6 ng/g Pb, 6.3 – 7.5 ng/g Cd, 89 – 131.7 ng/g As) and mushroom extracts (1.4 ng/g Pb, 1.5 ng/g Cd, 43.9 ng/g As). The concentrations of heavy metals in coffee blends with mushroom preparations depend on the components and are, on average, higher in blends that include mushroom powders compared to those with extracts. An assessment of heavy metal intake through the consumption of three cups of coffee blends with added mushroom preparations found that the daily intake of heavy metals can constitute a significant portion of the safe doses or even be twice as high. As expected, the average concentrations of total polyphenols are highest in instant coffees (147.1 mg CAE/g) and significantly lower in mushroom preparations (2.5 – 4.2 mg CAE/g). Analogous relationships were found for antioxidant activity, which primarily depends on polyphenols. Sensitive population groups (pregnant women, nursing mothers, sick individuals, etc.) should limit their intake of mushroom powders or use extracts. Instant coffees and appropriate combinations with mushrooms could have a stronger positive effect on health.

Key words: mushrooms, heavy metals, total polyphenols, antioxidant activity
Thesis contains: 103 pages
46 figures
12 tables
140 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Daliborka Koceva Komlenić, PhD, prof. | chair person |
| 2. Tomislav Klapac, PhD, prof. | mentor |
| 3. Ana Bucić-Kojić, PhD, prof. | member |
| 4. Mirela Kopjar, PhD, prof. | stand-in |

Defense date: July 12, 2024

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in:

Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Tomislavu Klapecu na danoj mogućnosti da ostvarim svoju zamisao, kao i na proširivanju cjelokupnog koncepta istraživanja. Hvala na uloženom vremenu i trudu, prenesenom znanju – kako putem predavanja tako i u laboratoriju, te ukazanom povjerenju tijekom izrade diplomskog rada. Hvala što ste bili dostupni kad god sam Vas trebala i što uvijek iskočite s rješenjem prije problema! Hvala što ste imali strpljenja za sve moje komplikacije.

Zahvaljujem dr.sc. Gordani Šelo na odličnoj suradnji i komunikaciji u laboratoriju, uloženom vremenu i posvećenosti tijekom izrade diplomskog rada.

Hvala kolegama, bivšim i sadašnjim studentima, na svim uspomnama koje smo stvorili tijekom studiranja, dijeljenju materijala, zajedničkom učenju, kavama i zabavama.

Hvala sestri Ines koja me uvijek voljna saslušati uz šalicu kave, ohrabriti, nasmijati, podržati u odlukama. Uljepšala si mi svaku godinu studiranja na svoj način i iako se možda tako ne čini uz tebe je bilo sve uvijek lakše.

Hvala bratu Ivanu na svim vožnjama (Vk-Os, Os-Vk) uz dobru glazbu i razgovorima petkom kad bi me pokupio s vlaka pa do kasno u noć. To su bili najšarolikiji osvrti na sve, odjednom nije teško ono što se činilo... Hvala na prozoru u svijet, hvala što si vjerovao u mene.

Hvala mom Andriji koji je uvijek bio uz mene, podnosio me i bio podrška onda kad je bilo neizdrživo. Hvala na učenju sa mnom, ispitivanjima, motivacijskim govorima, iznenađenjima, malim ciljevima, pozitivnoj energiji i još mnogo toga. Hvala na poletnosti!

Hvala šogoru Domagoju na savjetima danim kroz studiranje, racionalnom i konstruktivnom pogledu na tadašnje probleme, čašici razgovora i društvenim igrama uz polemike.

Hvala tetki Marijani i tetku Igoru koji su uvijek bili voljni pomoći i dočekivali me raširenih ruku.

Hvala mojoj majci Antoniji i ocu Zdravku na bezuvjetnoj ljubavi, podršci i povjerenju tijekom cijelog obrazovanja. Hvala što ste svaki moj stres dijelili na 3 i što mi niste stvarali pritisak oko polaganja ispita ili završetka fakulteta. Hvala što ste mi omogućili bezbrižno studiranje jer.. lakše je bilo kad znam – kako god prošao tjedan na fakultetu, ja idem kući. Idem u sigurnu luku, u moju oazu mira.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	4
<u>2.1. Teški metali</u>	<u>5</u>
2.1.1. Arsen	5
2.1.2. Kadmij.....	5
2.1.3. Olovo	6
<u>2.2. Kava</u>	<u>6</u>
2.2.1. Teški metali u kavi	8
2.2.2. Fitokemikalije u kavi	9
<u>2.3. Gljive</u>	<u>11</u>
2.3.1. Medicinske gljive	11
2.3.2. Teški metali u gljivama.....	15
2.3.3. Fitokemikalije u gljivama	16
<u>2.4. Metode određivanja teških metala</u>	<u>18</u>
2.4.1. Mikrovalna digestija	19
2.4.2. Atomska apsorpcijska spektrometrija	19
<u>2.5. Metode određivanja ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti</u>	<u>21</u>
3. EKSPERIMENTALNI DIO	26
<u>3.1. Zadatak</u>	<u>27</u>
<u>3.2. Materijali i metode</u>	<u>27</u>
3.2.1. Uzorci.....	27
3.2.2. Kemikalije i standardi	31
3.2.3. Uređaji.....	32
3.2.4. Metode	34
4. REZULTATI I RASPRAVA	40
<u>4.1. Rezultati analiza teških metala</u>	<u>41</u>
<u>4.2. Rezultati analiza ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti</u>	<u>60</u>
<u>4.3. Korelacija ukupnih polifenola, antioksidacijske aktivnosti i teških metala</u>	<u>68</u>
5. ZAKLJUČCI.....	79
6. LITERATURA.....	93

1. UVOD

Posljednjih godina javlja se sve veća zabrinutost na ekološkoj i globalnoj razini zbog onečišćenja okoliša teškim metalima. Također, izloženost ljudi teškim metalima naglo je porasla kao rezultat eksponencijalnog povećanja njihove upotrebe u nekoliko industrijskih, poljoprivrednih, kućanskih i tehnoloških primjena (Bradl, 2002). Izvori teških metala uključuju geogene, industrijske, poljoprivredne, farmaceutske, otpadne vode i atmosferske izvore (He i sur., 2015).

Iako se prirodno nalaze u Zemljinoj kori, onečišćenje okoliša i izloženost ljudi rezultat je antropogenih aktivnosti poput rudarstva, taljenja, industrijske proizvodnje i upotrebe spojeva koji sadrže metale u kućanstvu i poljoprivredi (He i sur., 2005). Prema Lu i sur., (2017) arsen (As), kadmij (Cd) i olovo (Pb) su teški metali koji nisu razgradivi, dugo ostaju u okolišu i postaju toksični za biljke, životinje i ljude. Ovi metali mogu migrirati iz tla uz površinske vode i završiti u podzemnoj vodi zbog otapanja uzrokovanog kiselim pH, industrijskim ispuštanjem, rudarskim otpadom i odlagalištima smeća (Hussain i sur., 2017).

U novije vrijeme, povećala se svijest o konzumaciji svježe, minimalno procesirane i/ili prirodne hrane bez aditiva, stoga je porasla i potražnja za namirnicama koje promiču zdravlje (WCC, 2021). U tom smislu, bezalkoholna, niskokalorična pića postaju jedna od najvažnijih komponenti ljudske prehrane obzirom na njihovu jednostavnu konzumaciju i visoka nutritivna svojstva. Iako postoji mnogo opcija iz ove kategorije pića, kava je najpoželjniji napitak nakon vode, s potrošnjom koja iznosi oko 500 milijardi čaša godišnje u cijelom svijetu (WCC, 2021).

Kava ima različite zdravstvene učinke poput antioksidativnog, antikarcinogenog, antimutagenog i protuupalnog djelovanja, a konzumacija kave povezana je s prevencijom mnogih kroničnih bolesti (George i sur., 2008). Medicinske gljive se mogu definirati kao makroskopske gljive koje se koriste u obliku ekstrakta ili praha u svrhu ublažavanja, liječenja brojnih bolesti i/ili uravnoteženja prehrane. Postoji više od 130 ljekovitih funkcija koje se pripisuju medicinskim gljivama (Gargano i sur., 2017). Najpopularnije vrste među potrošačima su *Hericium erinaceus* (Lavlja griva), *Inonotus obliquus* (Čaga), *Ganoderma lucidum* (Hrastova sjajnica), *Lentinula edodes* (Šitake), *Cordyceps* (Kordiceps) i *Trametes versicolor* (Šarena tvrdokoška) (Łysakowska i sur., 2023). Kao dio zdrave prehrane, funkcionalna hrana može obogatiti prehranu, a u kombinaciji s drugim namirnicama, poboljšati njihovu nutritivnu vrijednost (Martins i sur., 2016).

Cilj ovog rada je bio ispitati odabrane pozitivne i negativne strane različitih uzoraka kave, gljiva i njihovih kombinacija. Osim teških metala (As, Cd, Pb) u uzorcima su određeni ukupni polifenoli te antioksidacijska aktivnost.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Teški metali

Teški metali često dospijevaju u okoliš kao rezultat različitih antropogenih aktivnosti, uključujući industrijske procese, poljoprivredu, tehnološke postupke i otpadne vode. Prema Kim i sur. (2019), teški metali su skupina metalnih elemenata koji imaju gustoću veću od vode.

Esencijalni i neesencijalni teški metali podijeljeni su u dvije grupe s obzirom na njihovu toksičnost (Kim i sur., 2019). Pri niskim koncentracijama, esencijalni teški metali poput Zn, Cu, Co i Fe su netoksični ili znatno manje štetni. Međutim, neesencijalni teški metali, čak i pri vrlo niskim koncentracijama, mogu biti štetni za zdravlje (Anjulo i sur., 2015).

Emisijom teški metali dospijevaju u atmosferu u obliku pare ili čestica prašine te se mogu naći i u Zemljinoj hidrosferi i litosferi (Zenk, 1996). Općenito, teški metali nisu biorazgradivi, otrovni su i lako se akumuliraju u živim bićima, posebno u ljudskom tijelu, ali u malim količinama (Saydeh i sur., 2017). Bioakumulacija teških metala, poput kadmija i bakra, može prouzročiti nastanak raka, oštećenje živaca, zatajenje jetre i bubrega, ili čak dovesti do smrti (Häyrynen i sur., 2012).

Prema Zhang i sur. (2018), arsen (As), kadmij (Cd) i olovo (Pb) smatraju se primarnim štetnim elementima zbog svoje toksičnosti, perzistentnosti i nerazgradljivosti. Njihova prisutnost u okolišu predstavlja ozbiljan izazov za očuvanje ekosustava i ljudskog zdravlja, te se stoga ističe potreba za učinkovitim mjerama kontrole emisija i smanjenja njihovog utjecaja na okoliš.

2.1.1. Arsen

Arsen se prenosi u tlo putem industrijskih ispuštanja, loših poljoprivrednih praksi ili otpadnih voda (Singh i sur., 2007). Ima svojstva polumetala, izrazito je toksičan i karcinogen te široko dostupan u obliku oksida ili sulfida ili kao sol željeza, natrija, bakra ili kalcija.

Ovaj metaloid toksičan je u trovalentnom i peterovalentnom stanju. Najčešće se nalazi u vodi ili u namirnicama biljnog podrijetla, iako žitarice najviše doprinose unosu anorganskog arsena prehranom. Toksičnost se očituje u promjenama na koži (hiperkeratoza), a uz to može biti neurotoksičan, toksičan za kardiovaskularni sustav i karcinogen (Klapec i sur., 2022).

2.1.2. Kadmij

Prema Klapec i sur. (2022), kadmij se u prirodi može naći kao posljedica erupcije vulkana, šumskih požara, razlaganja stijena ili ljudskog djelovanja poput izrade baterija, industrije metala i sagorijevanja fosilnih goriva. Najveće koncentracije zabilježene su u suplementima od algi, kakao prahu i čokoladi, dok unosu

putem prehrane najviše doprinosi povrće i žitarice. Bitno je napomenuti kako duhan akumulira Cd iz tla te su pušači dodatno izloženi ovom toksičnom elementu. Prvenstveno je nefrotoksičan i nakuplja se godinama u bubrezima, no kod izrazito visokih koncentracija može izazvati demineralizaciju koštanog tkiva, što dovodi do itai-itai bolesti (bolest bolnih kostiju).

2.1.3. Olovo

Olovo se primjenjuje u baterijama, pigmentima i kao antidektonator u gorivima (Klapec i sur., 2022). Navedeni toksični element može ući u ljudsko tijelo na mnogo načina a glavni su komzamacija hrane i udisanje. Djeca su znatno izloženija olovu jer mogu progutati tlo kontaminirano olovom, prašinu ili komadiće boje. Približno 15% olova se apsorbira kod odraslih ljudi dok djeca i osobe s deficitom cinka, kalcija ili željeza te trudnice apsorbiraju nešto veći postotak (Wani i sur., 2015).

Problem predstavlja i kontaminirano tlo, naročito blizu prometnih puteva, jer biljke lako apsorbiraju olovo iz tla (Klapec i sur., 2022). Biljke mogu predstavljati potencijalni izvor olova ukoliko su ga apsorbirale. Količina apsorbiranog olova ovisi o koncentraciji olova u tlu, vrsti biljke i ostalim faktorima. Najznačajniji izvor predstavlja gomoljasto povrće poput mrkve i batata a odmah zatim i salata te špinat. Biljke predstavljaju ¼ ukupnog unosa olova (Sharma i sur., 2005).

Također, olovo može migrirati iz olovnih vodovodnih cijevi i keramičkih posuda ukoliko se nalaze u kontaktu s namirnicama koje imaju kiseli pH. Posljedice unošenja olova u organizam su razvojna neurotoksičnost, kardiovaskularna toksičnost i nefrotoksičnost.

2.2. Kava

Kava je jedno od najčešće konzumiranih pića u cijelom svijetu. Privlačna je zbog svoje arome i mirisa, a cijenjena zbog visokog udjela kafeina. Kafein je blagi stimulans za središnji živčani sustav, a uz to povišuje razinu budnosti i energije (Clark i sur., 2017). Kao svakodnevno konzumirano piće, važno je istražiti njezine dobrobiti, kao i loš utjecaj koji može imati na zdravlje pojedinca.

Tri šalice kave dnevno umanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti, koronarne bolesti srca i moždanog udara (Grosso i sur., 2016). Osim što snižava rizik kognitivnih poremećaja i depresije, također snižava rizik Parkinsonove i Alzheimerove bolesti (Liu i sur., 2016).

Ijaz i sur. (2021) izvještavaju kako kava ima snažna farmakološka svojstva zato što je bogata biološki aktivnim komponentama poput kafeina i kafeinske kiseline koje imaju antioksidativno, protuupalno,

antimikrobno i antimalarijsko djelovanje. Konzumacija kave također može poboljšati mišićno-koštani sustav i prevenirati nastanak žučnih kamenaca. Ističu kako su negativne strane konzumacije kave hipertenzija, aritmija, želučani refluks i ovisnost. Dodatno, trudnice i žene u menopauzi bi trebale smanjiti konzumaciju kave.

Prema Pravilniku o kavi, kavovinama te proizvodima od kave i kavovina (MPŠVG, 2004), sirova kava se definira kao naziv za osušena zrna kave kultivara roda *Coffea*, dobivene odgovarajućim tehnološkim postupkom od ploda kave, uz uklanjanje mezokarpa, endokarpa i tegumenta (srebrnaste opne), a stavlja se na tržište pod nazivom sirova kava ili sirova kava bez kafeina. Sirova kava, ovisno o botaničkoj vrsti, razvrstava se kao:

- Arabika (*Coffea arabica*),
- Robusta (*Coffea canephora*),
- Liberika (*Coffea liberica*),
- Ekselsa (*Coffea dewevrei* cv. *Excelsa*) i
- Arabusta (*Coffea arabica* x *Coffea canephora*).

Rod *Coffea* obuhvaća više od 100 vrsta, ali glavne vrste kave gledano s gospodarskog stanovišta i svjetskog tržišta čine Arabika i Robusta. Arabika je zauzimala 58%, a Robusta 42% proizvodnje na globalnoj razini 2020. godine (Bermudez, 2022).

Biljka kave Arabika osjetljivija je na visoke temperature, a pogodno ju je uzgajati u suptropskoj klimi na nadmorskoj visini 600 – 2000 m. Upravo zbog višeg geografskog položaja, nastane više esencijalnih ulja pa Arabika postaje blaža, kiselija i nježnija (Petruzzello, 2021). Kroz povijest je smatrana kvalitetnijom kavom zbog glatkog i slatkastog okusa. Zelena zrna kave Arabike sadrže više saharoze od Robuste, pa je i to jedan od faktora koji doprinosi kiselosti kave nakon prženja. Ugljikohidrati, uključujući topive polisaharide, razgrađuju se tijekom prženja te nastaju furani koji pridonose slatkoj aromi, aromi karamele i aromi pržene kave (Bolka i Emire, 2021).

Biljka kave Robusta je otpornija na fluktuacije temperatura i uzgaja se na 600 m nadmorske visine, u potpunosti izložena suncu (Bolka i Emire, 2021). Također, otpornija je na bolesti i općenito daje veće prinose od Arabike. Robusta sadrži dvostruko više kafeina, što ju čini gorčom i pogodnijom u izradi gotovih pića i mješavina espressa. Prepoznatljiva je po svojim začinskim, zemljanim i oporim notama (Bolka i Emire, 2021).

Biljka kave Liberika je u 19. stoljeću donešena u Indoneziju kako bi zamjenila Arabiku koju su napali štetnici. Aromom je sličnija Robusti, no okusom podsjeća na kruhovac. Zrna su veća od zrna Arabike i Robuste (Bolka i Emire, 2021).

Ekscelsa taksonomski pripada u *Coffea liberica*, a okusom se znatno razlikuje od Arabike i Robuste (Remondus i sur., 2023). Gorča je od Liberike i ima velik potencijal za razvoj upravo zbog jedinstvenog okusa i otpornosti na bolesti tijekom rasta, u prvom redu, lisnu hrđu. Biljka je prilagodljiva različitim podnebljima, ali plodu treba dugo vremena da sazrije i produktivnost je vrlo niska (Afliana, 2018).

Arabusta je hibrid vrsta *C. arabica* i *C. robusta* razvijen u Obali Bjelokosti (Chakraverty i sur., 2003). Odlike ovog hibrida su bolja kvaliteta okusa od Robuste i veća otpornost na bolesti od Arabike. Zelena zrna kave imaju niži sadržaj kafeina od križanih vrsta. Uzgoj ove vrste ograničen je zbog malog prinosa i manjih plodova. Primaran razlog razvoja Arabuste bio je pokušaj da se dobije biljka kave bez ili s malim udjelom kafeina, ali nažalost, sa slabim uspjehom (Chakraverty i sur., 2003).

Zrna Arabika kave sadrže više trigonelina i lipida što doprinosi blažem, glatkijem i bogatijem okusu. S druge strane, zrna Robusta kave karakterizira veći sadržaj kafeina i klorogenske kiseline, što rezultira izraženijim profilom kave, ali ima siromašniji okus i neprivlačan miris (Flament, 2001).

2.2.1. Teški metali u kavi

Gledajući kemijski sastav, kava je složena smjesa koja sadrži više od tisuću kemikalija koje uključuju ugljikohidrate, lipide, dušične spojeve, vitamine, minerale, alkaloidne i fenolne spojeve (Spiller, 1998). Izložena je i kontaminaciji teškim metalima. Konzumacija kave koja je kontaminirana teškim metalima može predstavljati rizik za zdravlje ljudi.

Kako ovi sastojci mogu utjecati na živa bića, posebice kad su izložena niskim koncentracijama, postavlja se pitanje štetnih posljedica, poput karcinogenosti, mutagenosti, genotoksičnosti i teratogenosti (Dixit i sur., 2015).

Zbog toksičnog djelovanja teških metala, u posljednje vrijeme se posebno pridodaje pažnja njihovoj prisutnosti u prehrambenim proizvodima budući da se mogu akumulirati u prehrambenom lancu (Briffa i sur., 2020).

Biljke kave mogu apsorbirati teške metale iz tla i akumulirati ih u korijenu, izdancima ili zrnu, ali sadržaj je inače veći u vegetativnim dijelovima nego u samom zrnu (Singh i sur., 2012). Što se tiče mljevene i instant kave, Długaszek i sur. (2010) su ustanovili da instant kava sadrži više minerala (kalcij, magnezij, cink, mangan, aluminij, krom, željezo, aluminij i nikal) u usporedbi s istom količinom mljevene kave. Sadržaj

metala u šalici kave izravno je povezan sa stupnjem onečišćenja u sirovim zrnima, koracima obrade poput ljuštenja, prženja i mljevenja te metodom kuhanja (omjer vode i kave ili vremenom kuhanja) (Pohl i sur., 2022).

Pigozzi i sur. (2018) su proveli istraživanje na komercijalno dostupnim, prženim, mljevenim kavama i ukazali na raznolikost prisutnosti teških metala u uzorcima. Dok sadržaj kadmija, bakra, nikla i cinka nije prelazio propisane granice brazilskog zakonodavstva, olovo i krom pronađeni su u visokim razinama u nekoliko uzoraka, prelazeći dopuštene granice. Ovi rezultati naglašavaju važnost praćenja sadržaja teških metala u kavi kako bi se osigurala sigurnost konzumacije.

Dodatno, istraživanje provedeno u Brazilu, Poljskoj, Bosni i Hercegovini i Libanonu (Nędzarek i sur., 2013) dodaje dimenziju globalne zabrinutosti. Na primjeru Bosne i Hercegovine, gdje se konzumira najviše kave, godišnji unos olova ovim pićem po osobi iznosio je prosječno 12 mg, što je značajno iznad toleriranih granica. Iako ovaj unos ne dovodi do trovanja kod odraslih, zabrinutost raste kad se uzme u obzir veća apsorpcija olova kod djece, dojenčadi i fetusa. Konzumacija kave s povišenim razinama olova tijekom trudnoće može rezultirati ozbiljnim posljedicama poput mentalne retardacije i oštećenja ploda (Nevin, 2009). Ovi nalazi naglašavaju važnost redovitog praćenja sadržaja teških metala u kavi, kao i implementacije mjera za smanjenje kontaminacije tijekom uzgoja i prerade, kako bi se osigurala kvaliteta kave i zaštitilo zdravlje potrošača.

2.2.2. Fitokemikalije u kavi

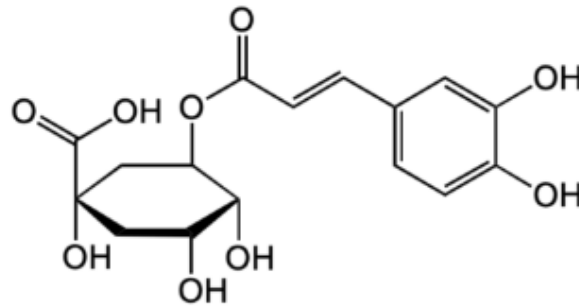
Fitokemikalije čine skupinu sekundarnih biljnih metabolita koji blagotvorno djeluju na zdravlje, iako nisu esencijalni nutrijenti. Mogu se pronaći u voću, povrću, mahunarkama, žitaricama i raznim biljnim napicima, uključujući kavu, vino i čaj (Arts i Hollman, 2005).

Kava je bogata fenolnim kiselinama koje pripadaju skupini hidroksicimetnih kiselina. To uključuje kafeinsku i klorogensku kiselinu, p-kumarinsku, feruličnu kiselinu, te druge kiseline u manjim koncentracijama. Uobičajeni polifenoli prisutni u kavi su kafein, diterpeni i trigonelin (Lee i sur., 2015).

Polifenoli su široko rasprostranjeni spojevi koji se prirodno javljaju u biljkama, a podijeljeni su u četiri kategorije: fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni i lignani (Pandey i Rizvi, 2009). Navedene skupine spojeva imaju sposobnost smanjenja oksidativnog stresa, neutralizacije slobodnih radikala, te su dokazano protuupalni i antioksidativni agensi (Kruk i sur., 2022).

Klorogenska kiselina (**Slika 1**) igra ključnu ulogu u antioksidativnom i protuupalnom djelovanju s pozitivnim učincima na jetru i kardiovaskularni sustav. Osim toga, pokazuje antikarcinogeno i neuroprotektivno

djelovanje (Farah i de Paula Lima, 2019). No, zbog svoje termalne nestabilnosti, klorogenska kiselina prolazi kroz niz promjena tijekom prženja zrna kave, uključujući izomerizaciju, epimerizaciju, laktonizaciju, degradaciju na spojeve niske molekularne mase poput fenola i katehola, te formiranje melanoida koji doprinose boji i okusu (Farah, 2019). Uz produljeno prženje, njezin udio značajno opada, možda čak i do 1%. U svrhu smanjenja gubitka klorogenske kiseline i drugih polifenola, preporučuje se brzo prženje na visokim temperaturama od 230°C (Farah, 2019).

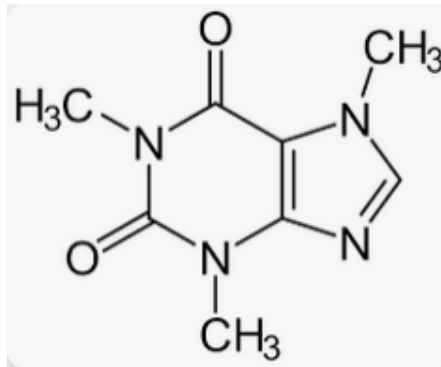


Slika 1 Kemijska struktura klorogenske kiseline

Klorogenska kiselina djeluje povoljno i na dijabetes, iako se isprva mislilo da je za hipoglikemijski potencijal odgovoran isključivo kafein (Farah, 2019).

Istraživanje financirano od strane Nacionalnog instituta za zdravlje SAD-a je pokazalo da kafein (**Slika 2**), iako kratkoročno povisuje šećer u krvi, ipak snižava rizik od razvijanja dijabetesa tipa 2 u usporedbi s osobama koje ne piju kavu svaki dan. Ding i suradnici (2014) su objavili rezultate analize 45335 osoba s dijabetesom tipa 2 praćenih 20 godina. Rezultati su pokazali da postoji poveznica između povećanja broja popijenih šalica kave na dan i smanjenja rizika dijabetesa. U usporedbi s ljudima koji ne konzumiraju kavu, rizik je umanjen do 8% jednom šalicom na dan, do 33% za 6 šalica na dan, bez obzira je li kava bila kafeinska ili bez kafeina.

Kava s većim udjelom kafeina potvrđeno smanjuje rizik nastanka Parkinsonove bolesti, dok se za Alzheimerovu bolest tek mora utvrditi učinak (Socala i sur., 2020). Smatra se da kafein smanjuje proizvodnju enzima koji su značajni pri formiranju amiloida. Raznim istraživanjima na životinjama je dokazano da kava s kafeinom i metabolitima djeluje neurozaštitno (Socala i sur., 2020).



Slika 2 Kemijska struktura kafeina

2.3. Gljive

Gljive su kemoheterotrofni organizmi, sveprisutne su podzemno i na kopnu, važni su životinjski i biljni simbionti, patogeni i prirodni razgrađivači organskih i proizvedenih materijala (Gadd, 2007). Mogu rasti na tlu, kori drveta ili u larvama kukaca. U kulinarskom svijetu cijenjene su zbog okusa, mirisa i teksture, te visokog udjela bjelančevina i vitamina uz niski udio masti (Thu i sur., 2020).

Jestive gljive značajan su izvor bjelančevina, budući da sadrže između 200 do 250 grama bjelančevina po kilogramu suhe mase. Prema Thu i sur. (2020) gljive sadrže svih 9 esencijalnih aminokiselina, a među najčešćim aminokiselinama prisutnima u gljivama ističu se leucin, asparaginska kiselina, valin, glutamin i glutaminska kiselina. Dobar su izvor nutrijenata poput fosfora, željeza i vitamina uključujući tiamin, riboflavin, askorbinsku kiselinu, ergosterol i niacin.

Iako su jestive gljive općenito pune dobrobiti za zdravlje, ipak postoje vrste koje imaju značajniji pozitivni učinak na zdravlje od drugih, a kroz povijest su neke od gljiva korištene u medicinske svrhe.

2.3.1. Medicinske gljive

U širem smislu, pojam medicinske gljive obuhvaća jestive i nejestive vrste gljiva koje posjeduju terapijska svojstva na ljudski organizam. Dokazano je 126 medicinskih učinaka ovih gljiva, uključujući antitumorsko, antikarcinogeno, imunomodulatorno, kardiovaskularno, hepatoprotektivno, antiparazitsko, antibakterijsko i antidijabetetsko djelovanje (Wasser, 2011). Naziv "medicinske gljive" proizlazi iz njihove povijesne primjene u medicinske svrhe, a danas, zbog farmakološke vrijednosti, ekstrakti iz određenih vrsta gljiva koriste se za proizvodnju preparata koji sadrže koncentrirane bioaktivne spojeve (Wasser, 2011).

Globalno tržište funkcionalnih gljiva procijenjeno je na 26,7 milijardi američkih dolara u 2021. godini i očekuje se rast od 10,8 % u periodu od 2022. do 2030. godine. Također, funkcionalnim gljivama se pripisuje etiketa „superhrane“ zbog brojnih zdravstvenih prednosti. Rast industrije gljiva dodatno potiče i činjenica kako se povećava opseg primjene ovih proizvoda u farmaceutskoj industriji.

Medicinske gljive se razlikuju po svom kemijskom sastavu i svaka ima specifične spojeve koji drukčije, ali pozitivno, utječu na ljudski organizam. Dok neke gljive sadrže velik broj polisaharida, triterpena, melanina, vitamina i kalija, druge opet imaju specifične bioaktivne spojeve kao što su ganoderična kiselina, kordicepin, kordicepinska kiselina te erinacini i hericenonski spojevi (Bhambri, 2022).

Polisaharidi s većom molekulskom masom općenito imaju bolju biološku učinkovitost i antitumorsko djelovanje (Zhang i sur., 2018). S druge strane, polisaharidi male molekulske mase, zbog svojih poboljšanih fizioloških svojstava omogućuju bolju difuziju kroz biološke barijere pa se zbog toga koriste u terapijske svrhe (Liu i sur., 2018).

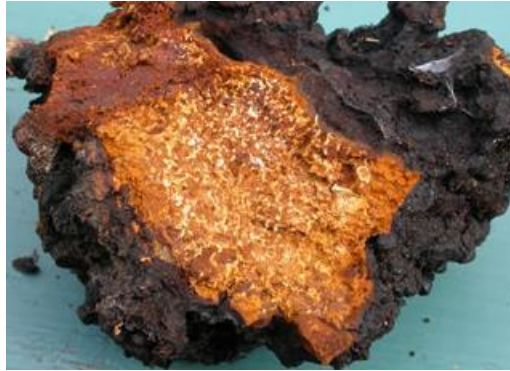
Iako gljive sadrže navedene i brojne druge kemijske spojeve, smatra se da je pozitivan utjecaj na ljudski organizam ipak rezultat djelovanja kombinacije spojeva, umjesto jednog specifičnog aktivnog spoja. Neke od gljiva s dokazanim medicinskim djelovanjem su *Cantharellus cibarius* (lisičarka), *Hericiium erinaceus* (lavlja griva), *Inonotus obliquus* (čaga), *Cordyceps militaris*, *Cordyceps sinensis* (kordiceps) i *Ganoderma lucidum* (hrastova sjajnica) (Lysakowska i sur, 2023).

2.3.1.1. *Inonotus obliquus* (Čaga)

Čaga je parazitska gljiva koja raste na kori živućih breza i može se pronaći kroz cijelu godinu. Naizgled je slična pougljenom drvetu. Naprijed ima oblik njuške, crna je, tvrda i duboko izbrazdana izvana (**Slika 3**), dok je iznutra žute boje i teksture poput pluta (**Slika 4**.)

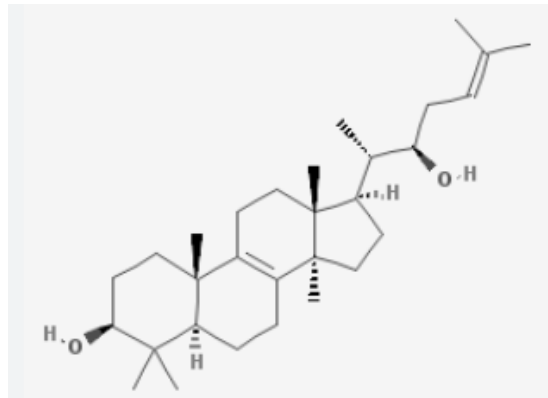


Slika 3 Vanjski izgled čage



Slika 4 Unutarnji izgled čage

Ova gljiva je bogata tetracikličkim triterpenima, poput inotodiola i lanosterola, a zbog parazitiranja na drvetu breze bogata je i betulinom i betulinskom kiselinom (Kahlos, 1994). Inotodiol (**Slika 5**) je spoj koji se može naći isključivo u čagi i djeluje protuupalno i antikarcinogeno na ljudski organizam (Nguyen i sur., 2023). Betulin i betulinska kiselina dovode stanice raka do apoptoze zbog nižeg pH u stanicama raka ili tumora (Fulda, 2008).



Slika 5 Kemijska struktura inotodiola

2.3.1.2. *Cantharellus cibarius* (Lisičarka)

Lisičarka (**Slika 6**) je jestiva divlja gljiva koju je vrlo lako prepoznati u prirodi. Naraste 3-10 cm širine i 5-10 cm visine, a boja varira od žute do tamno žute. Ukoliko je oštećena, na kapici će se pojaviti crvene točkice. Vrlo je cijenjena u svijetu kulinarstva te postaje sve popularnija u obliku ekstrakta i kapsula zbog svog pozitivnog utjecaja na ljudski organizam (O'Reilly, 2016). Prethodna istraživanja su pokazala da sadrži minerale, aminokiseline, vitamin D, proteine, masnoću, vlakna, askorbinsku kiselinu te fenolne spojeve, kao što su kafeinska kiselina i p-kumarinska kiselina (Zelman, 2022). Zbog svog kemijskog sastava,

kombinacija spojeva dokazano ima antimikrobna i insekticidna svojstva, antioksidativnu i antikarcinogenu aktivnost te usporava procese starenja (Režić Mužinić i sur., 2023).



Slika 6 Lisičarka

2.3.1.3. *Hericium erinaceus* (Lavlja griva)

Lavlja griva (Slika 7) je divlja gljiva koja raste uz mrtvo ili živeće drveće, a većinom bude promjera 5-40 cm. Sastoji se od hrpe visećih cjevčica dužine 1-5 cm i bijele je boje.

Postala je popularna zbog svojih potencijalnih neurozaštitnih svojstava, što ju čini jednim od kandidata u prevenciji Alzheimerove bolesti, a dokazano pospješuje rast neurona zbog erinacina i hericenona (Zhang i sur., 2017). Erinacini A-I su pokazali snažnu sposobnost povećanja ekspresije mRNA prilikom sinteze faktora rasta živaca (nerve growth factor, NGF) (Zhang i sur., 2017).



Slika 7 Lavlja griva

2.3.1.4. *Cordyceps militaris* i *Cordyceps sinensis*

Kordiceps je još jedna od parazitskih vrsta koja parazitira na larvama insekata. Raste 4-10 cm visine i dok je svjež zlatno-narančaste je boje (Slika 8). Glavni sastojci ove gljive su nukleozidi, među kojima se nalazi i specifični kordicepin, steroli, slobodne masne kiseline i ugljikohidrati (Ashraf i sur., 2020). *Cordyceps*, zbog

svojih sastojaka, djelujem imounoprotektivno te dokazano smanjuju upalne procese, pomaže pri borbi protiv autoimunih bolesti kao što je lupus te sprječava odbijanje organa nakon transplatacije. Još se koristi i za liječenje plućnih bolesti, depresije i kroničnog umora, promiče reproduktivnu funkciju kod oba spola te djeluje nefroprotektivno (Lin i Li, 2011).



Slika 8 Kordiceps

2.3.1.5. *Ganoderma lucidum* (Hrastova sjajnica)

Hrastova sjajnica ili reiši (Slika 9), poznata i kao eliksir života, dugo je korištena u tradicionalnoj kineskoj medicini, slavljena zbog svog pozitivnog utjecaja na imunosni i krvožilni sustav te smanjenje stresa (Breene, 1990). Prilikom doziranja miševa ovim gljivama, utvrđene su smanjene spontane motoričke aktivnosti, produljeni potpomognuti san, manji broj konvulzija vezanih uz konzumaciju nikotina, a pokazali su se i kao inhibitori rasta stanica sarkoma 180 implantiranih u miševu (Breene, 1990).



Slika 9 Hrastova sjajnica

2.3.2. Teški metali u gljivama

Glavni potencijalni nedostatak gljiva je moguća bioakumulacija elemenata iz tla i zraka (Costa i Leite, 1991). Mogu sadržavati otrovne metalne elemente (Cd, Hg, Pb), otrovne metaloide (As), esencijalne metaloide (Se), kao i brojne druge elemente (Ag, Au, Rb, Zn, V). Također, mogu sadržavati prirodne (^{40}K) i antropogene radionuklide (^{137}Cs , ^{134}Cs , ^{90}Sr). Bioakumulacija elemenata iz tla može biti i pozitivna stvar jer mogu djelovati kao učinkovit biosorbent toksičnih metala. Rastu na prirodnom staništu i imaju čvrstu, veliku

teksturu te druge pogodne karakteristike pogodne za njihov razvoj u sorbente. Gljive mogu akumulirati ekstremno visoke koncentracije metalnih elemenata, čak i kada rastu iznad tla s niskim udjelom metala (Costa i Leite, 1991).

Prema Dowlati i suradnicima (2021), postoje dva glavna čimbenika koja utječu na nakupljanje teških metala u gljivama, a to su čimbenici vezani uz okoliš i čimbenici vezani uz gljive. Pod čimbenicima vezanim uz okoliš smatra se pH, količina organske tvari i koncentracija teških metala u tlu. Čimbenici koji su vezani na gljive uključuju vrste gljiva, njihova starost, micelij, faze rasta, morfološki dio plodišta i biokemijsku strukturu.

Biokoncentracijski faktor (BCF) je omjer koncentracije teških metala koji se nalaze u gljivama u odnosu na supstrat ili tlo na kojem rastu (Širić i sur., 2022). BCF je pokazatelj sposobnosti bioakumulacije teških metala za pojedinu vrstu gljiva.

Campos i sur. (2009) proveli su istraživanje u Španjolskoj kako bi provjerili akumulaciju teških metala u sporokarpima divljih gljiva. U istraživanje je bilo uključeno 12 vrsta gljiva, između kojih i *Cantharellus cibarius*, koja je pokazala najvišu apsorpciju olova (4,86 µg/g) i neodimija (7,10 µg/g).

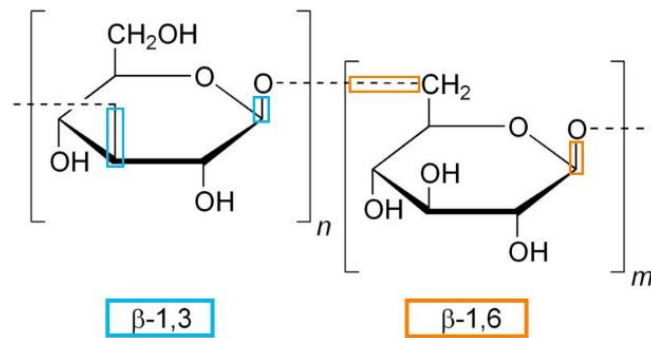
U Kini je 2016. godine prijavljeno nekoliko slučajeva trovanja teškim metalima konzumiranjem biljki iz divljine, specifično *Cordyceps sinensis*. Uzorci su prikupljeni iz različitih regija Kine, a svaki od uzoraka je razdvojen od domaćina kako bi se testirao i micelij i domaćin. Istraživanje je pokazalo normalne razine toksičnih metala olova, žive, kadmija i antimona, ispod 5 ppm. Nažalost, razina arsena u domaćinu je bila visoka, varirala je između 0,379 – 32,2 ppm, dok je u miceliju pronađena razina malo ispod 2 ppm (Wei i sur., 2017).

2.3.3. Fitokemikalije u gljivama

Biološki aktivni spojevi su polisaharidi koji su sastavni dio stanične stijenke gljiva, kao što su β-glukani, proteini ili sekundarni biljni metaboliti poput steroida, terpena i fenolnih spojeva. Aktivnost i raspoloživost ovih spojeva ovisi o mnogo čimbenika, poput vrste gljive, stupnja razvoja i uvjeta uzgoja (Guillamón i sur., 2010).

Polisaharidi predstavljaju glavnu skupinu biološki aktivnih komponenata u gljivama i odgovorni su za antioksidativno, antikarcinogeno, antidijabetičko, protuupalno, antimikrobno i imunomodulatorno djelovanje (Kozarski i sur., 2011).

Polisaharidi glukani, naročito β-glukan (**Slika 10**), pokazuju izrazito antimikrobno i hipoglikemijsko djelovanje, a imunitet osnažuju aktivacijom makrofaga (Yang i sur., 2018).



Slika 10 1,3 i 1,6 β -glukani

Terpeni su odgovorni za antioksidativno, antikarcinogeno i protuupalno djelovanje gljiva. Terpeni imaju svojstva koja mogu smanjiti upalu tako da djeluju na različite biološke puteve uključene u upalne procese. Mogu inhibirati aktivnost enzima i molekula koji potiču upalu te smanjivati oslobađanje upalnih medijatora (Ruan i Popovich, 2012).

Ganoderma lucidum je izvor nekoliko triterpena poput ganoderične, lucidske i triterpenske kiseline lanostana (Iwatsuki i sur., 2003). *Ganoderma lucidum* sadrži triterpene poput ganoderičnih kiselina, ganoderiola, ganodermanontriola, te ganoderana A i B. Ovi triterpeni su povezani s antikarcinogenim i antivirusnim svojstvima, kao i hepatoprotektivnim i protuupalnim učincima. Dodatno, luciderične i ganoderične kiseline, lanostanski triterpeni, Lingzhi-8 protein i drugi sastojci u ovoj gljivi doprinose imunomodulacijskim, antifungalnim i antioksidativnim svojstvima.

Farmakološki najbitniji su polisaharidi i triterpeni koji čine više od 330 pronađenih sastojaka. Triterpeni su se pokazali kao odlični antihistaminici, hepatoprotektivni su i imaju učinak u borbi protiv upala i tumorskih stanica, dok su polisaharidi (naročito β -glukani) odlični zaštitnici protiv slobodnih radikala i smanjuju štetu stanicama uzrokovanu mutagenima (Sheikha, 2022).

Razni steroli i triterpeni kao što su inotodiol, trametenolna kiselina, ergosterol i ergosterol peroksid pronađeni su u *Inonotus obliquus* (Elkhateeb i sur., 2019).

Gljive su bogate različitim polifenolnim spojevima koji su izvrsni antioksidansi budući da imaju sposobnost neutralizacije slobodnih radikala pomoću transfera jednog elektrona (Hirano i sur., 2001). Fenolni spojevi uključuju fenolne kiseline, oksidirane polifenole, hidroksibenzojevu kiselinu, flavonoide, tanine, hidroksicimetnu kiselinu, stilbene i lignane (D'Archivio i sur., 2010).

Cordyceps sadrži monosaharide, disaharide, polisaharide, oligosaharide, sterole i nukleozide (Sheikha, 2022). Dodatno, 3-8% ukupne težine čine polisaharidi koji većinom nastaju u plodištu. Glavna bioaktivna

komponenta je polisaharid kordicepsa (Elkhateeb i sur., 2019). *Cordyceps sinensis* sadrži sirove masti, proteine, vlakna, ugljikohidrate, kordicepin (30-deoksiadenozin), kordicepinsku kiselinu (D-manitol) i vitamine. Kordicepin i kordicepinska kiselina istražuju se u svrhu povećanja iskoristivosti ATP-a, a dokazano je i da kordicepin stabilizira razinu šećera u krvi (Zhou i sur., 2009).

Kemijskom analizom utvrđeno je da *Cordyceps militaris* sadrži kordicepin, adenzin, polisaharide, manitol, trehalozu, polinezasićene masne kiseline, δ -tokoferol, p-hidroksibenzojevu kiselinu i β -glukan (Elkhateeb i sur., 2019).

Inonotus obliquus sadrži triterpenoide, ergosterol i njegov peroksid, seskviterpene (azulene), derivate benzojeve kiseline, analoge hispidina, melanine i polisaharide, uključujući β -glukane (Zheng i sur., 2010). Također sadrži različite fitokemikalije poput izotiocijanata, organosumpornih spojeva, glukozinata, luteina, zeaksantina, kvercetina, kempferola, bicikličkih monoterpena (iridoida) i stilbenskih spojeva (Kyriakou i sur., 2022).

Hericium erinaceus sadrži masne kiseline, alkaloidne, terpenoide, steroide, piranone i oko 80 specifičnih spojeva (Zhang, 2016). Hericenoni se općenito nalaze u plodištu, a erinacini u miceliju ove gljive (Chen i sur., 2018).

Hericenoni i erinacini pripadaju skupini diterpenoida i pokazuju biološku aktivnost kao stimulatori sinteze faktora rasta živaca (NGF), a mogu biti korisni u liječenju neurodegenerativnih poremećaja i periferne neuropatije (Apfel i Kessler, 1996). Riječ je o spojevima male molekulske težine koji lako prolaze krvno-moždanu barijeru (Bing-Ji i sur., 2009).

Prema Kim i sur. (2009), *Cantharellus cibarius* sadrži fenolne spojeve, terpenoide, steroide, razne vrste polisaharida i proteine poznate po svom imunomodulirajućem i antiproliferativnom djelovanju. Palacios (2011) tvrdi da osim navedenih svojstava ova gljiva ima protuupalna i antibakterijska svojstva, a biomolekule kojima se svojstva pripisuju su fenolni spojevi, flavonoidi i tanini.

2.4. Metode određivanja teških metala

Postoji više različitih instrumentalnih analitičkih tehnika za određivanje teških metala u različitim materijalima (Madjar i sur., 2020). Najčešće korištene su atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS), plamena emisijska spektrometrija (FES), UV/VIS spektrometrija, induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom (ICP-MS), optička emisijska spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES) i spektrometrija rendgenske fluorescencije (XRF). Tehnike atomske apsorpcijske spektrometrije su

plamena (*Flame Atomic Absorption Spectrometry*, FAAS), grafitna (*Graphite Furnace*, GFAAS) i hidridna (*Hydride Generation*, HGAAS).

Priprema uzorka provodi se s ciljem odvajanja analita od matriksa i kako bi se izbjegla interakcija organske tvari s metalnim ionima ili kemijskim reagensom. Izbor postupka ovisi o prirodi organske tvari, sadržaju anorganskih tvari, kao i o teškim metalima koji će se određivati te izabranom tehnici za određivanje istih. Najčešće korištene metode za digestiju (razaranje) su suho spaljivanje, vlažna digestija i mikrovalna digestija (Husejnović i sur., 2016).

2.4.1. Mikrovalna digestija

Svrha mikrovalne digestije je prevođenje čvrstog uzorka u otopinu. Općenito, takav prijelaz se postiže kombinacijom oksidansa i izvora energije, čime dolazi do pucanja molekulskih veza i narušavanja kristalne strukture, što potiče djelomičnu ili potpunu digestiju čvrstih tvari (Da Costa i sur., 2013).

Matriks uzorka razara se u potpunosti kako bi analit od interesa bio topljiv i slobodan za određivanje izabranom analitičkom metodom. Mikrovalno zračenje izaziva rotacije molekula, čime dolazi do trenja između molekula i povišenja temperature. Na određenoj temperaturi isparava reagens i to dovodi do rasta tlaka u specijaliziranim posudama od teflona. Rast tlaka uzrokuje povišenje temperature vrelišta reagensa, što znači da je temperatura vrelišta u mikrovalnom uređaju viša od one pri atmosferskom tlaku. Prednosti zatvorenih sustava su sprječavanje kontaminacije, bolje razaranje pri višim temperaturama i manja upotreba kemikalija (Da Costa i sur., 2013).

Učinkovita alternativna metoda za pripremu uzoraka je korištenje razrijeđenih kiselina u mikrovalno potpomognutoj digestiji. Prednosti korištenja razrijeđenih kiselina u odnosu na koncentrirane su: veća čistoća slijepe probe, snižavanje granice kvantifikacije, smanjenje količine proizvedenog otpada i manji rizik oštećenja opreme (Da Costa i sur., 2013).

Mineralne kiseline koje se koriste su dušična, fluorovodična, klorovodična, sumporna i perklorna ili kombinacija navedenih kiselina (Deepak, 2014).

2.4.2. Atomska apsorpcijska spektrometrija

Dvije tehnike koje se koriste za analizu teških metala a temelje na Beer-Lambertovom zakonu su plamena i grafitna tehnika. Beer-Lambertov zakon povezuje apsorpciju svjetlosti (A), koncentracije tvari (c) i duljine ćelije (l), koristeći molarni apsorpcijski koeficijent (ϵ) kao mjeru za svojstva tvari i valnu duljinu svjetlosti.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

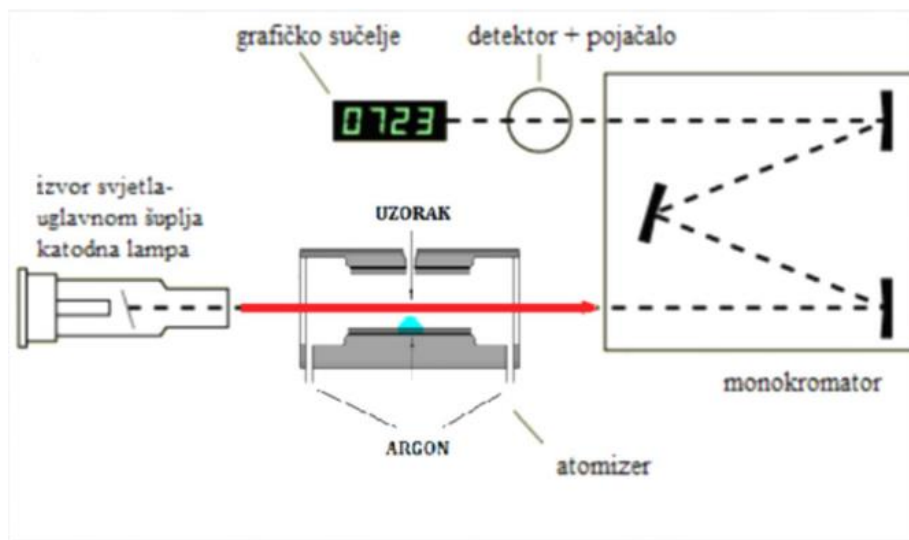
Pomoću gore navedenog zakona moguće je analitički odrediti koncentraciju otopine tvari koja se ispituje iz izmjerene apsorbancije (Škorić, 2016).

Prednosti grafitne u odnosu na plamenu tehniku su:

- Uzorak može biti u obliku otopine, suspenzije ili krutine,
- Efikasniji atomizator,
- Mikrolitarske količine uzorka su dovoljne za analizu, no ukoliko je potrebno poboljšati osjetljivost, volumen se može povećati na 50 - 100 μL ,
- Osiguranje reducirajućeg okruženja za elemente koji se lako oksidiraju,
- Granice detekcije su 100 – 1000 puta bolje, što omogućuje analizu ppb koncentracija,
- Mogućnost reguliranja temperature pomaže u efikasnijem uklanjanju otapala ili smetajućih tvari (do 2700°C, ovisno o uzorku),
- Nizak limit detekcije zbog dužeg zadržavanja atoma na putu svjetla (Farrukh, 2012).

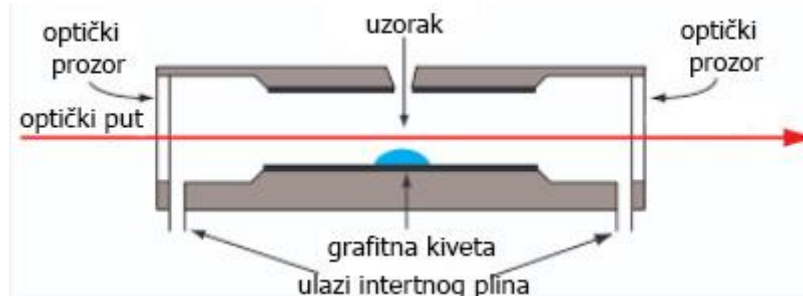
Grafitna tehnika atomske apsorpcijske spektrometrije (**Slika 11**) se sastoji od tri faze: sušenje, piroliza i atomizacija. Tijekom sušenja dolazi do isparavanja otapala, a čvrsti dio ostaje unutar grafitne kivete. Temperatura sušenja treba biti podešena na 120°C kako ne bi došlo do prskanja uzorka jer može doći do gubitaka, a dalje u postupku, atomizacija uzorka neće biti provedena u potpunosti (LaRue i Tyson, 1993).

Plin nosioc uzorka je argon, a izvor zračenja je žarulja sa šupljom katodom. Piroliza ili spaljivanje je druga faza procesa u kojoj se uklanjaju organska onečišćenja na temperaturama 200-700°C. Završna faza, atomizacija, se odvija u grafitnoj kiveti, pri čemu dolazi do prevođenja uzorka u atomski oblik koji apsorbira zračenje (Beaty i Kerber, 1993).



Slika 11 Princip rada grafitne tehnike AAS-a

Grafitna kiveta koju je izradio Massmann (**Slika 12**) je jednostavnog dizajna i sastoji se od grafitne cijevi koja se zagrijava strujom jakosti 500 A (Tomljanović, 2000). Kiveta je otvorena s obje strane, što omogućava konstantan protok inertnog plina, čime je spriječen ulazak atmosferskog zraka. Na središnjem dijelu kivete nalazi se otvor kroz koji se unosi uzorak uz pomoć mikropipete (Tomljanović, 2000).



Slika 12 Shematski dijagram grafitne kivete

Grafitna kiveta s pirolitičkim premazom je rješenje za elemente koji stvaraju karbide prilikom reagiranja s grafitom poput Ni, Ca, Ti, Si, V i Mo (Tomljanović, 2000). Uzorak ulazi u poroznu strukturu kristala grafita u kiveti visoke gustoće, čime se ostvaruje veća kontaktna površina između uzorka i grafita. Pirolitički obložena kiveta ima manju kontaktnu površinu, te je potisnuto stvaranje karbida, što na kraju rezultira većom osjetljivošću kivete. Atomizacija uzorka u platformskim kivetama odvija se tek nakon što cijela kiveta postigne temperaturu atomizacije. Platformske kivete zahtijevaju višu temperaturu spaljivanja i atomizacije za 100-200°C od kivete s pirolitičkim premazom. Razlika u zagrijavanju platformske kivete obzirom na standardne je minimiziranje smetnji matriksa složenog uzorka tako da signal u potpunosti odvojen od signala elementa, pogotovo ako se koriste u kombinaciji s modifikatorima matriksa poput paladija, iridija, rodija i dr. (Shimadzu, 2023).

Omega kivete imaju integriranu platformu i produljen vijek trajanja u odnosu na kivete s tankim pirolitičkim premazom, što osigurava savršene izotermalne uvjete unutar kivete prilikom atomizacije uzorka (Thermo Fisher Scientific, 2008). Prilikom prevođenja uzorka u parnu fazu mogu se dogoditi parne interferencije koje su izbjegnute grijanjem pomoću radijacije iz stijenke kivete. Temperatura platforme je niža nego na stijenci kivete, a rezultat te razlike u temperaturi je toplija parna faza, što smanjuje nastanak molekularnih vrsta analita koji smetaju prilikom mjerenja uzorka (Thermo Fisher Scientific, 2008).

2.5. Metode određivanja ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti

Poznavanje koncentracije ukupnih polifenola ima bitnu ulogu u analizi antioksidacijskog kapaciteta namirnice jer taj podatak predstavlja prvi korak u određivanju indeksa ukupnih antioksidansa (Berend i

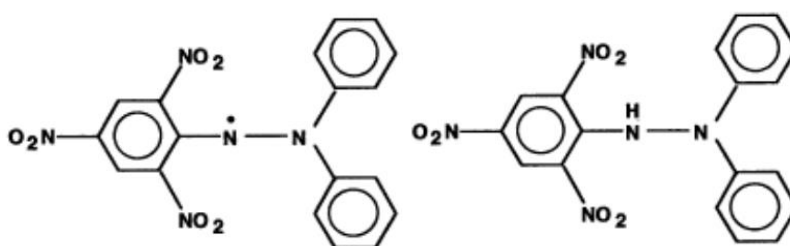
Grabarić, 2008). Indeks ukupnih polifenola predstavlja prosjek odziva različitih fenolnih spojeva u uzorku. Najpouzdanija spektrometrijska metoda za određivanje indeksa ukupnih polifenola je Folin-Ciocalteu metoda (FC metoda). FC reagens smjesa je fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline koja reakcijom s polifenolima u blago alkalnim uvjetima stvara relativno stabilan, plavičasto obojen kompleks. Intenzitet obojenja proporcionalan je udjelu fenolnih spojeva u uzorku, a određuje se spektrometrijski na UV/VIS spektrometru pri valnoj duljini od 765 nm. Najčešći standard korišten za izradu baždarnih krivulja je galna kiselina. Galna kiselina koristi se za izražavanje ukupnih polifenola u uzorcima poput biljaka, plodova, sokova i prerađevina. Rezultati se izražavaju kao miligrami ekvivalenta galne kiseline (GAE) po gramu ili litri uzorka (Berend i Grabarić, 2008).

Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti dijele se na kromatografske, spektrometrijske i elektrokemijske. Spektrometrijske metode su ABTS, ORAC, CUPRAC, PFRAP, TRAP, HORAC, DPPH i FRAP (Pregiban, 2017). U **Tablici 1** navedena su glavna obilježja sedam metoda.

Tablica 1 Spektrometrijske metode određivanja antioksidacijske aktivnosti

Metode	Princip djelovanja	Određivanje završne točke
ABTS	Antioksidans reagira sa slobodnim radikalom	Kolorimetrija
ORAC	Antioksidans reagira s peroksidnim radikalom	Gubitak fluorescencije fluoresceina
CUPRAC	Cu (II) redukcijom pomoću antioksidansa prelazi u Cu (I)	Kolorimetrija
PFRAP	Kalijev fericijanid reagira s antioksidansom i Fe ⁺²	Kolorimetrija
TRAP	Radikali nastali uz luminol se neutraliziraju uz antioksidans	Kolorimetrija
HORAC	Hidroksilne radikale dobivene iz Co (II) kompleksa (Fentonova reakcija) veže antioksidans	Gubitak fluorescencije fluoresceina
FRAP	Antioksidans reagira s Fe (III) kompleksom	Kemiluminiscencijski signal

DPPH ili 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal je molekula koja ima delokaliziran elektron oko cijele molekule i zbog toga ne dimerizira kao druge molekule radikala (Tailor i Goyal, 2017). Delokalizacija dovodi do razvoja tamno ljubičaste boje u otopini etanola, a apsorbancija se mjeri na valnim duljinama od 515 do 520 nm. Miješanjem otopine DPPH s antioksidansom koji donira atom vodika nastaje stabilan hidrazinski oblik DPPH-H (**Slika 13**) uz prijelaz iz ljubičaste u žutu boju, čime dolazi i do pada apsorbancije. Zaostala blijedo žuta boja dolazi od i dalje prisutne pikrilne skupine, a obezbojenje je u stehiometrijskom odnosu s količinom primljenih elektrona. Nastali reducirani oblik DPPH-H teško oksidira, ali ako se to i dogodi, reakcija je ireverzibilna. Sposobnost hvatanja slobodnih radikala izražava se preko postotka preostalog DPPH jer je proporcionalan udjelu antioksidansa (Molyneux, 2003).



Slika 13 DPPH radikal i reducirani oblik DPPH

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Zadatak ovog diplomskog rada bio je utvrditi koncentraciju odabranih teških metala (Pb, Cd, As), ukupnih polifenola te antioksidacijsku aktivnost popularnih kava s dodatkom gljiva. Osim komercijalno dostupnih kava s ekstraktima gljiva, u laboratoriju su pripremljene i mješavine najprodavanijih brandova mljevenih i instant kava s ekstraktima gljiva ili prahom sušenih gljiva (*Cantharellus cibarius*, *Hericium erinaceus*, *Inonotus obliquus*, *Cordyceps sinensis*, *Ganoderma lucidum*).

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Uzorci

Prema istraživanju tržišta, zaključno s 2019. godinom, najprodavaniji brandovi kava bili su Franck, Gloria, Anamaria, Barcaffé, Nescafé i Jacobs (Nielsen, 2020). Za potrebe analize odabrana su tri različita branda prženih mljevenih kava, tri branda instant kava te tri komercijalno dostupne kave s dodatkom ekstrakta gljiva (Tablica 2, Slike 14 i 15). Dodatno su nabavljene najpopularnije ljekovite gljive u obliku integralnog praha ili ekstrakta (Tablica 3, Slika 16).

Tablica 2 Analizirani uzorci kava

Vrsta kave	Brand	Sastav
Mješavine pržene mljevene kave	Franck, Jubilarina	<i>Coffea arabica</i> <i>Coffea robusta</i>
	Gloria, Minas	
	Anamaria, Minas	
Instant kave	Jacobs, Cronat Gold	
	Nescafé, Classic	
	Franck, Classical	
Mješavine kave i ekstrakta gljiva	OstroVit, Coffee with Mushroom	<i>Coffea arabica</i> , <i>Inonotus obliquus</i> , <i>Hericium erinaceus</i>
	Mushroom Cups, Go Tireless	<i>Coffea arabica</i> , <i>Cordyceps militaris</i> , <i>Cantharellus cibarius</i>
	Mushroom Cups, Go Sharp	<i>Coffea arabica</i> , <i>Hericium erinaceus</i> , <i>Cantharellus cibarius</i>

Proučavanjem članaka s interneta i uputa proizvođača raznih pripravaka od gljiva, odlučeno je da će ispitivane mješavine ekstrakata gljiva i kave biti pripremljene u laboratoriju u omjeru 1:5, dok su mješavine dehidriranog praha gljiva i kava bile u omjeru 1:1.

Tablica 3 Analizirani uzorci gljiva

Vrsta gljive	Brand	Oblik
<i>Cordyceps sinensis</i>	Solve Labs	Ekstrakt
<i>Ganoderma lucidum</i>	OstroVit	
<i>Hericium erinaceus</i>		
<i>Inonotus obliquus</i>		
<i>Chantarellus cibarius</i>	Bokun	Dehidrirani listići
<i>Hericium erinaceus</i>	Natures Finest	Prah
<i>Inonotus obliquus</i>		
<i>Ganoderma lucidum</i>	Premium Superfoods	
<i>Cordyceps sinensis</i>		



Slika 14 Pržene mljevene i instant kave (s lijeva na desno: Franck, Jubilarna; Gloria, Minas; Anamaria, Minas; Nescafé, Classic; Franck, Classical; Jacobs, Cronat Gold)



Slika 15 Kave s ekstraktima gljiva (s lijeva na desno: Mushroom Cups, Go Sharp; Mushroom Cups, Go Tireless; OstroVit, Coffee with Mushroom)



Slika 16 Ekstrakti gljiva i dehidrirane gljive (s lijeva na desno: *Cordyceps sinensis*, ekstrakt; *Ganoderma lucidum*, ekstrakt; *Hericium erinaceus*, ekstrakt; *Inonotus obliquus*, ekstrakt; *Ganoderma lucidum*, prah; *Cantharellus cibarius*, dehidrirana; *Inonotus obliquus*, prah; *Cordyceps sinensis*, prah; *Hericium erinaceus*, prah)

Popis svih mješavina naveden je u **Tablici 4**. Navedene mješavine korištene su za analize određivanja ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti.

Mješavine su pripravane u laboratoriju tako što je odvagana točna masa gljiva i kave (**Slika 17**) koja je kvantitativno prenesena u prozirne plastične vrećice. Vrećice su zatvorene i smjesa kave i gljiva je homogenizirana intenzivnim protresanjem vrećica (**Slika 18**).

Tablica 4 Mješavine kava i pripravaka gljiva pripravljene u laboratoriju

Kava	Gljiva	Omjer (gljiva/kava)
Franck, Jubilarna	<i>Cordyceps sinensis</i> , ekstrakt	1:5
Franck, Jubilarna	<i>Ganoderma lucidum</i> , ekstrakt	1:5
Franck, Jubilarna	<i>Hericium erinaceus</i> , ekstrakt	1:5
Franck, Jubilarna	<i>Inonotus obliquus</i> , ekstrakt	1:5
Franck, Jubilarna	<i>Cantharellus cibarius</i> , prah	1:1
Franck, Jubilarna	<i>Hericium erinaceus</i> , prah	1:1
Franck, Jubilarna	<i>Inonotus obliquus</i> , prah	1:1
Franck, Jubilarna	<i>Ganoderma lucidum</i> , prah	1:1
Franck, Jubilarna	<i>Cordyceps sinensis</i> , prah	1:1
Gloria, Minas	<i>Cordyceps sinensis</i> , ekstrakt	1:5
Gloria, Minas	<i>Ganoderma lucidum</i> , ekstrakt	1:5
Gloria, Minas	<i>Hericium erinaceus</i> , ekstrakt	1:5
Gloria, Minas	<i>Inonotus obliquus</i> , ekstrakt	1:5
Gloria, Minas	<i>Cantharellus cibarius</i> , prah	1:1
Gloria, Minas	<i>Hericium erinaceus</i> , prah	1:1

3. Eksperimentalni dio

Gloria, Minas	<i>Inonotus obliquus</i> , prah	1:1
Gloria, Minas	<i>Ganoderma lucidum</i> , prah	1:1
Gloria, Minas	<i>Cordyceps sinensis</i> , prah	1:1
Anamaria, Minas	<i>Cordyceps sinensis</i> , ekstrakt	1:5
Anamaria, Minas	<i>Ganoderma lucidum</i> , ekstrakt	1:5
Anamaria, Minas	<i>Hericium erinaceus</i> , ekstrakt	1:5
Anamaria, Minas	<i>Inonotus obliquus</i> , ekstrakt	1:5
Anamaria, Minas	<i>Cantharellus cibarius</i> , prah	1:1
Anamaria, Minas	<i>Hericium erinaceus</i> , prah	1:1
Anamaria, Minas	<i>Inonotus obliquus</i> , prah	1:1
Anamaria, Minas	<i>Ganoderma lucidum</i> , prah	1:1
Anamaria, Minas	<i>Cordyceps sinensis</i> , prah	1:1
Nescafé, Classic	<i>Cordyceps sinensis</i> , ekstrakt	1:5
Nescafé, Classic	<i>Ganoderma lucidum</i> , ekstrakt	1:5
Nescafé, Classic	<i>Hericium erinaceus</i> , ekstrakt	1:5
Nescafé, Classic	<i>Inonotus obliquus</i> , ekstrakt	1:5
Nescafé, Classic	<i>Cantharellus cibarius</i> , prah	1:1
Nescafé, Classic	<i>Hericium erinaceus</i> , prah	1:1
Nescafé, Classic	<i>Inonotus obliquus</i> , prah	1:1
Nescafé, Classic	<i>Ganoderma lucidum</i> , prah	1:1
Nescafé, Classic	<i>Cordyceps sinensis</i> , prah	1:1
Jacobs, Cronat Gold	<i>Cordyceps sinensis</i> , ekstrakt	1:5
Jacobs, Cronat Gold	<i>Ganoderma lucidum</i> , ekstrakt	1:5
Jacobs, Cronat Gold	<i>Hericium erinaceus</i> , ekstrakt	1:5
Jacobs, Cronat Gold	<i>Inonotus obliquus</i> , ekstrakt	1:5
Jacobs, Cronat Gold	<i>Cantharellus cibarius</i> , prah	1:1
Jacobs, Cronat Gold	<i>Hericium erinaceus</i> , prah	1:1
Jacobs, Cronat Gold	<i>Inonotus obliquus</i> , prah	1:1
Jacobs, Cronat Gold	<i>Ganoderma lucidum</i> , prah	1:1
Jacobs, Cronat Gold	<i>Cordyceps sinensis</i> , prah	1:1
Franck, Classical	<i>Cordyceps sinensis</i> , ekstrakt	1:5
Franck, Classical	<i>Ganoderma lucidum</i> , ekstrakt	1:5
Franck, Classical	<i>Hericium erinaceus</i> , ekstrakt	1:5
Franck, Classical	<i>Inonotus obliquus</i> , ekstrakt	1:5
Franck, Classical	<i>Cantharellus cibarius</i> , prah	1:1
Franck, Classical	<i>Hericium erinaceus</i> , prah	1:1
Franck, Classical	<i>Inonotus obliquus</i> , prah	1:1
Franck, Classical	<i>Ganoderma lucidum</i> , prah	1:1
Franck, Classical	<i>Cordyceps sinensis</i> , prah	1:1



Slika 17 Primjer nehomogeniziranog uzorka kave i ekstrakta gljive



Slika 18 Homogenizirani uzorci pripremljenih mješavina kave i pripravaka gljiva

3.2.2. Kemikalije i standardi

Korištene su sljedeće kemikalije: apsolutni etanol (Gram-Mol, Hrvatska), natrijev karbonat (Kemika, Hrvatska), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Sigma Aldrich, SAD), suprapur dušična kiselina, 68% (Acros Organics, Belgija), Folin-Ciocalteu reagens (CPAchem, Bugarska).

Sljedeći standardi su korišteni u analizama: galna kiselina i kafeinska kiselina (Sigma Aldrich, SAD), standardne otopine kadmija, olova, arsena, modifikator matriksa tj. otopina paladijevog nitrata i trolox (Acros Organics, Belgija).

Referentni materijal za analizu elemenata bio je pšenični gluten (NIST RM 8418, SAD). Referentni materijal je pripremljen za analizu homogenizacijom (protresanjem bočice) i sušenjem pri temperaturi od 85°C u trajanju od 4 h.

3.2.3. Uređaji

Sustav za mikrovalnu digestiju

Uređaj za mikrovalnu digestiju (Multiwave 5000, Anton Paar, Austrija) (**Slika 19**) korišten je za prevođenje krutog uzorka u tekućinu, kako bi se uzorci i analiti od interesa (As, Cd, Pb) preveli u oblik koji se može analizirati atomskim apsorpcijskim spektrofotometrom.



Slika 19 Sustav za mikrovalnu digestiju

Atomski apsorpcijski spektrofotometar

Atomski apsorpcijski spektrofotometar (AA-7000, Shimadzu Corporation, Japan) (**Slika 20**) pokriva područje valnih duljina od 185 – 900 nm. Ima mogućnost provedbe plamene, grafitne i hidridne tehnike. Ovo istraživanje uključivalo je određivanje elemenata grafitnom tehnikom.



Slika 20 Atomski apsorpcijski spektrofotometar

UV-VIS Spektrofotometar

Uređaj (UV-1280, Shimadzu Corporation, Japan) (**Slika 21**) omogućuje mjerenje apsorbancije i transmitacije u području valnih duljina 190-1100 nm. UV/VIS spektrofotometar u ovom radu korišten je za kolorimetrijsko određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu metodom uz mjerenje apsorbancije kod 765 nm i određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom s očitanjem na 515 nm u uzorcima kava, gljiva i njihovih mješavina.



Slika 21 UV-VIS spektrofotometar

Ostali uređaji korišteni za pripremu uzoraka su:

- Vodena kupelj s tresilicom (WSB-30, Witeg, Njemačka) (**Slika 22**), primijenjena za ekstrakciju fenolnih spojeva iz uzoraka kava, gljiva i njihovih kombinacija.



Slika 22 Uzorci u vodenoj kupelji

- Ultracentrifugalni mlin (ZM200, Retsch, Njemačka) je korišten za mljevenje sušene lisičarke.
- Analitička vaga (Nimbus NBL 214e, Adam Equipment, Velika Britanija) je korištena za točno vaganje uzoraka i referentnog materijala za mikrovalnu digestiju, uzoraka za ekstrakciju, i pripremu otopine DPPH.
- Centrifuga s hlađenjem (Z326K, Hermle, Njemačka) je korištena u svrhu dobivanja supernatanta i taloga iz ekstrakata. Dobiveni supernatant analiziran je u svrhu određivanja ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti.

- Vrtložna miješalica (VM10, Witeg, Njemačka) je korištena za miješanje uzorka i homogenizaciju.
- Vodena kupelj s tresilicom (SBS40, Stuart, Velika Britanija) je poslužila za termostatiranje bez potresanja.

3.2.4. Metode

3.2.4.1. Priprema uzoraka za određivanje ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti

Jedan gram uzorka (kava, gljive, mješavine) ekstrahiran je s 40 mL vode u tikvicama s čepom na vodenoj kupelji s tresilicom tijekom 15 minuta, pri 80 °C i 200 rpm. Ekstrakcija je provedena u dvije paralele, nakon čega su uzorci centrifugirani (10000 x g) tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Supernatant je potom dekantiran i korišten za određivanje ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti (**Slika 23**).



Slika 23 Talog i supernatant

3.2.4.2. Folin-Ciocalteu metoda

Ukupni polifenoli određivani su spektrofotometrijski prema modificiranoj Folin-Ciocalteu metodi (Waterhouse, 2002). Navedena metoda je kolorimetrijska metoda koja se temelji na oksido-redukcijskim reakcijama. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline. Reagens u alkalnom mediju oksidira fenolne spojeve, a navedene kiseline reducira u volframov oksid i molibdenov oksid plave boje te se apsorbancija mjeri pri valnoj duljini od 765 nm (Stratil i sur., 2006).

Postupak

Otopina natrij karbonata (20%-tna) je pripravljena otapanjem 200 g bezvodnog natrij karbonata u 800 mL vode. Otopina je zagrijavana do ključanja, zatim ohlađena na sobnu temperaturu te je dodano nekoliko kristala natrij karbonata. Nakon 24 h otopina je profiltrirana te nadopunjena destiliranom vodom do volumena 1 L.

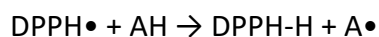
U epruvete je otpipetirano 40 μL ekstrakta, potom 3160 μL destilirane vode i 200 μL Folin-Ciocalteuova reagensa te je sadržaj epruveta dobro promiješan na vrtložnoj miješalici. Nakon stajanja 30 sekundi i 8 minuta u svaku epruvetu dodano je 600 μL 20%-tne otopine Na_2CO_3 i dobro promiješano na miješalici. Na isti način je pripremljena slijepa proba, no umjesto ekstrakta dodano je 40 μL destilirane vode. Uzorci su ostavljeni u vodenoj kupelji na 40 °C tijekom 30 minuta, nakon čega je izmjerena apsorbancija pri 765 nm. Iz dobivenih apsorbancija preko kalibracijske krivulje (**Slika 30**) izračunate su koncentracije ukupnih polifenola, izražene u ekvivalentima kafeinske kiseline (eng. Caffeic Acid Equivalents, CAE) koja je korištena kao standard te preračunate na masu uzorka (mg CAE/g uzorka). Određivanje ukupnih polifenola provedeno je u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ponavljanja \pm SD.

Postupak izrade kalibracijske krivulje

Pripremljene su otopine kafeinske kiseline u koncentracijama od 0 do 1 mg/mL. Prema opisanom postupku za određivanje ukupnih polifenola u uzorcima je izmjerena apsorbancija pripremljenih razrijeđenja otopine kafeinske kiseline te je iz dobivenih rezultata kreirana kalibracijska krivulja.

3.2.4.3. DPPH metoda

Antioksidacijska aktivnost ekstrahiranih kava, gljiva ili kombinacija kava i gljiva određena je DPPH metodom. Osnova metode je reduksijska sposobnost sintetičkog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH•) koji je otopljen u alkoholnoj otopini u prisustvu antioksidansa (AH) koji doniranjem jednog atoma vodika oslobađa mjesto, pa može vezati slobodni DPPH radikal. Navedenom reakcijom nastaje neradikalni oblik DPPH-H i stabilizirani fenoksi radikal (A•) (Benvenuti i sur., 2004):



Apsorbancija je mjerena pri 515 nm, a poželjna boja uzorka je svijetloljubičasta. Ukoliko je boja žuta, to znači da je uzorak dodan u prevelikoj koncentraciji i treba ga razrijediti. Koncentracija inhibiranog DPPH radikala pokazuje veću ili manju antioksidacijsku aktivnost ispitivanog uzorka.

Postupak

U 0,1 mL alikvota ekstrakta dodano je 3,9 mL otopine DPPH u 96 %-tnom etanolu (0,026 mg DPPH/mL). Reakcijska smjesa ostavljena je na tamno mjesto 30 minuta, nakon čega je očitana apsorbancija pri 515 nm u odnosu na slijepu probu (96%-tni etanol).

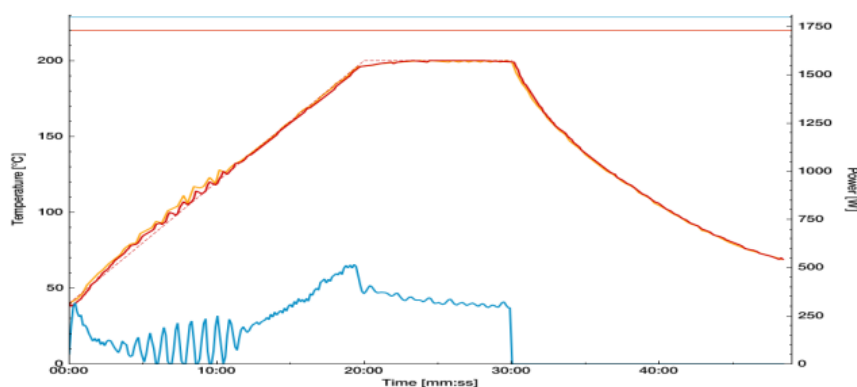
Otopina DPPH mora uvijek biti svježije pripremljena i upotrebljava se unutar 24 sata, a njezina apsorbancija se očitava isto kao i apsorbancija uzoraka, u odnosu na slijepu probu. Inhibicija DPPH• uslijed antioksidacijske aktivnosti ispitivanih uzoraka izračunata je u postotku (%) prema sljedećem izrazu (Benvenuti i sur., 2004):

$$\% \text{ inhibicije DPPH} = \left[\frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{ekst.}}}{A_{\text{DPPH}}} \right] \cdot 100$$

Postotak (%) inhibiranog DPPH· radikala je uvršten u jednadžbu pravca dobivenu iz kalibracijske krivulje pripremljene s troloxom kao standardom (**Slika 35**) te su rezultati izraženi u ekvivalentima troloxa (mg Troloxa/g). Za svaki ekstrakt antioksidacijska aktivnost je određena u tri paralelna ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ponavljanja \pm SD.

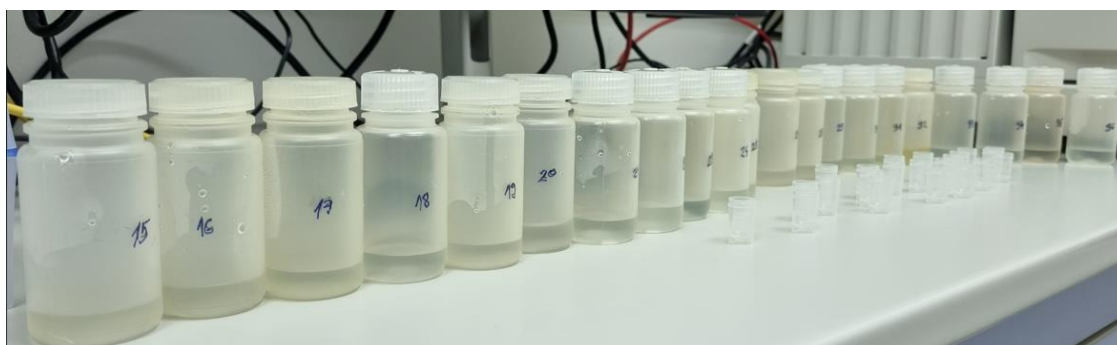
3.2.4.4. Priprema uzoraka za atomsku apsorpcijsku spektrometriju

Uzorci (otprilike 500 mg) odvagano je u teflonske posude te dodano 5 mL 65%-tne dušične kiseline. Kiselinska digestija u mikrovalnoj pećnici traje sveukupno 45 minuta od čega prvih 10 minuta uređaj zagrijava uzorke do temperature 200°C, idućih 10 minuta održava temperaturu od 200°C, nakon čega se uzorci hlade do 50°C (**Slika 24**). Korišten je program proizvođača predviđen za biljni materijal.



Slika 24 Dijagram programa digestije mikrovalne pećnice

Nakon digestije se sadržaj iz teflonskih kiveta u digestoru kvantitativno prenosi u male bočice uz ispiranje kiveta demineraliziranom vodom do maksimalne mase od 15 g. Mjerenje koncentracije teških metala na atomskom apsorpcijskom spektrometru obavlja se nedugo nakon mikrovalne digestije, a za to vrijeme uzorci (**Slika 25**) su čuvani na temperaturi hladnjaka od 4°C.



Slika 25 Bočice s digestatima uzoraka neposredno prije analize na AAS uređaju

3.2.4.5. Atomska apsorpcijska spektrometrija

Za određivanje koncentracije teških metala (As, Cd, Pb) korištena je metoda atomske apsorpcijske spektrometrije s platformskom grafitnom kivetom (**Slika 26**). Inertni plin nositelj je argon. Izvor zračenja je šuplja katodna lampa (žarulja sa šupljom katodom), koja je ključna komponenta uređaja i omogućuje selektivnu analizu različitih metala. Za svaki analizirani element, priređena je otopina standarda za pripremu kalibracijske krivulje. Slijepa proba (0,012 M otopina dušične kiseline) je redovito analizirana u svrhu korekcije izmjerenih vrijednosti. Volumen injektiranja uzorka je bio 20 μL te je u uzorcima dodano 5 μL modifikatora matriksa tj. otopine paladijevog nitrata, $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$. Mjerenja su provedena u dvije ili tri paralele te su rezultati izraženi kao srednja vrijednost u ng/mL .



Slika 26 Omega grafitna kiveta

Odabrani analitički parametri u određivanju arsena

- Valna duljina (λ): 193,7 nm
- Temperatura atomizacije: 2000°C
- Raspon koncentracija kalibracijske krivulje: 0 – 20 ppb

Odabrani analitički parametri u određivanju kadmija

- Valna duljina (λ): 228,8 nm
- Temperatura atomizacije: 2000°C
- Raspon koncentracija kalibracijske krivulje: 0 – 1 ppb

Odabrani analitički parametri u određivanju olova

- Valna duljina (λ): 283,3 nm
- Temperatura atomizacije: 2000°C
- Raspon koncentracija kalibracijske krivulje: 0 – 20 ppb

Parametri praćeni tijekom mjerenja:

- Nagib kalibracijske krivulje – m
- SD – standardna devijacija višestrukih izmjera slijepe probe

Ućinkovitost instrumenta ili analitićke metode ocjenjuje se odrećivanjem vrijednosti LOD-a (limit detekcije) i LOQ-a instrumenta (limit kvantifikacije). LOD predstavlja najnižu koncentraciju analita koja se moųe detektirati i pouzdano se razlikuje od nule, ali ne mora biti nuųno kvantificirana. S druge strane, LOQ predstavlja najnižu koncentraciju analita koju se moųe kvantitativno odrećiti s prihvatljivom razinom preciznosti i toćnosti (Gonzalez i Herrador, 2007).

Vrijednosti LOD i LOQ izraćunati su na sljedeći naćin:

$$LOD = (3 \times SD) \div m$$

$$LOQ = (10 \times SD) \div m$$

Dio rezultata je bio ispod razina vrijednosti LOD-a, te je s takvim podacima postupano prema uputama WHO-a (EFSA, 2010), korištenjem tzv. pristupa srednje granice (middle bound), tj. promijenjeni su u LOD/2.

U mješavinama kava, instant kava i praha gljiva vrijednosti metala raćunate su na sljedeći naćin:

$$[C_{\text{metal}} \text{ u kavi} + C_{\text{metal}} \text{ u prahu gljive}] \div 2 \quad [ng/g]$$

Razlog tome je sastav mješavine, tj. kava i prah gljive pomiješani su u omjeru 1:1.

U mješavinama kava, instant kava i ekstrakta gljive, vrijednosti metala raćunate su na sljedeći naćin:

$$[(C_{\text{metal}} \text{ u kavi}) \times 5 + (C_{\text{metal}} \text{ u ekstraktu gljive}) \times 1] \div 6 \quad [ng/g]$$

Razlog tome je sastav mješavine, tj. kava i ekstrakt gljive pomiješani su u omjeru 5:1.

3.2.4.6. Dnevni unos teških metala

Dnevni unos teških metala (As, Pb, Cd) iz mješavina kava (prųena mljevena ili instant) i gljiva (ekstrakt ili prah), izraćunat je na temelju konzumacije tri šalice kave dnevno.

Dolje navedena formula odnosi se na prųene mljevene kave (Franck Jubilarna, Gloria Minas i Anamaria Minas) u kombinacijama s prahovima gljiva (*C. cibarius*, *H. erinaceus*, *I. obliquus*, *G. lucidum* i *C. sinensis*). Za pripremu navedenih mješavina korišteno je 6 grama prųene mljevene kave i 6 grama praha gljive na 100 mL vode. U svrhu izraćuna dnevnog unosa teških metala pijenjem mješavina, pretpostavljeno je da prosjećni konzument kave popije 3 šalice kave dnevno, stoga se dobivena vrijednost teških metala u šalici kave mnoųi sa 3.

$$\left[(6 \times c_{\text{teškog metala u prženoj mljevenoj kavi}}) + (6 \times c_{\text{teškog metala u prahu gljive}}) \right] \times 3 \quad [\text{ng/dan}]$$

Donja formula odnosi se na pržene mljevene kave (Franck Jubilarna, Gloria Minas i Anamaria Minas) u kombinacijama s ekstraktima gljiva (*C. sinensis*, *G. lucidum*, *H. erinaceus* i *I. obliquus*). Za pripremu navedenih mješavina korišteno je 6 grama pržene mljevene kave i 1,2 grama ekstrakta gljive na 100 mL vode. Postupak za računanje dnevnog unosa identičan je prethodnom.

$$\left[(6 \times c_{\text{teškog metala u prženoj mljevenoj kavi}}) + (1,2 \times c_{\text{teškog metala u ekstraktu gljive}}) \right] \times 3 \quad [\text{ng/dan}]$$

Dolje navedena formula odnosi se na instant kave (Néscafe Classic, Jacobs Cronat Gold i Franck Classical) u kombinaciji sa spomenutim prahovima gljiva. Princip računanja je isti, samo što se na 100 mL vode priprema mješavina od 3 grama instant kave i 3 grama praha gljive. Dobivena koncentracija određivanog teškog metala u šalici kave množi se s 3.

$$\left[(3 \times c_{\text{teškog metala u instant kavi}}) + (3 \times c_{\text{teškog metala u prahu gljive}}) \right] \times 3 \quad [\text{ng/dan}]$$

Dolje navedena formula odnosi se na instant kave (Néscafe Classic, Jacobs Cronat Gold i Franck Classical) u kombinaciji sa spomenutim ekstraktima gljiva. Za pripremu mješavina korišteno je 3 grama instant kave i 0,6 grama ekstrakta gljive. Dobivena koncentracija teškog metala u šalici kave množi se s 3.

$$\left[(3 \times c_{\text{teškog metala u instant kavi}}) + (0,6 \times c_{\text{teškog metala u ekstraktu gljive}}) \right] \times 3 \quad [\text{ng/dan}]$$

Izračun dnevnog ili tjednog unosa teških metala

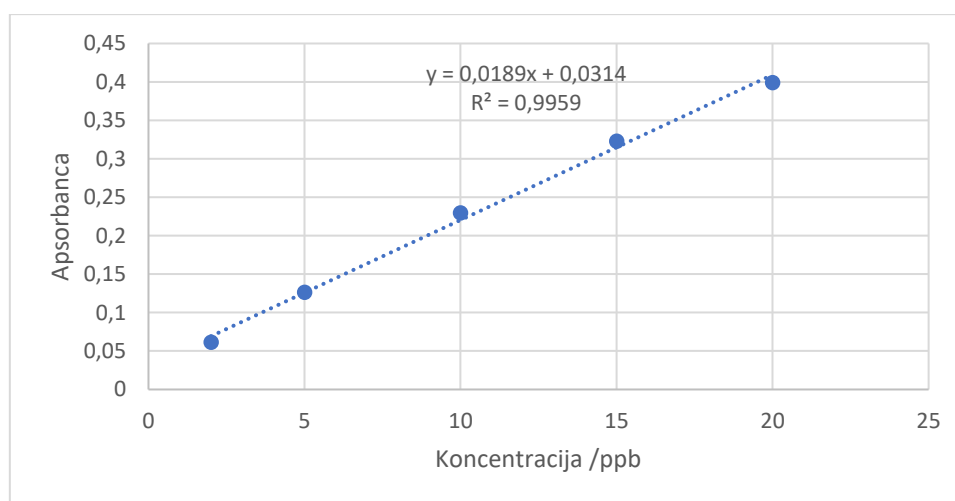
Izračunat je doprinos konzumacije 3 šalice kave dnevno unosu teških metala (izražen u $\mu\text{g/kg}$ na 70 kg tjelesne težine) te utvrđen udio unosa u odnosu na sigurne razine izloženosti tj. referentnu dozu (eng. benchmark dose lower confidence limit, BMDL, u $\mu\text{g/kg}$ na dan) za arsen i olovo, odnosno tolerirani tjedni unos (eng. tolerable weekly intake, TWI, u $\mu\text{g/kg}$ tjedno) za kadmij.

$$\text{Postotak BMDL ili TWI vrijednosti} = \left(\frac{\text{Dnevni ili tjedni unos metala iz kava}}{\text{BMDL ili TWI}} \right) \times 100 \quad [\%]$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati analiza teških metala

Dolje je prikazana kalibracijska krivulja za olovo (**Slika 27**). Korelacijski koeficijent (R^2) ima visoku vrijednost, što ukazuje na odličnu linearnost tj. vezu između koncentracije olova i signala instrumenta u rasponu koncentracija od 2 do 20 ng/mL. Na temelju kalibracijske krivulje su određene i vrijednosti LOD-a (0,33 ppb) i LOQ-a (1,11 ppb), što znači da uređaj pouzdano detektira i kvantificira vrlo niske koncentracije olova u uzorku. Vrijednost LOD-a se nalazi unutar raspona prema vrijednostima iz priručnika proizvođača (0,1 – 0,4 ppb), dok je vrijednost LOQ-a neznatno viša (0,3 – 1,0 ppb).



Slika 27 Tipična kalibracijska krivulja za olovo

Massoud i sur. (2022) su istraživali sadržaj teških metala u prženim mljevenim kavama iz Irana i Turske, ICP-MS tehnikom. Za sve teške metale analizirane u navedenom radu, uključujući i olovo, dobivene vrijednosti za LOD (0,1 ppb) i LOQ (0,3 ppb) ukazuju na veću osjetljivost instrumenta tj. pri manjim koncentracijama će biti moguće detektirati i kvantificirati olovo u uzorcima kave. Winiarska-Mieczan i sur. (2022) su ICP-MS tehnikom odredili sadržaj olova i kadmija instant kava, zamjena za kavu i instant napitaka od kave, te utvrdili vrlo niske vrijednosti za LOD (0,005 ppb) i LOQ (0,030 ppb) za olovo.

Koncentracije olova u uzorcima kreću se od 0,5 do 941,6 ng/g (**Tablica 5**). Najmanju koncentraciju olova ima ekstrakt gljive *Ganoderma lucidum*, a najveću prah gljive *Cantharellus cibarius*. *Cantharellus cibarius* je divlja gljiva, a utvrđeni sadržaj olova odgovara rezultatima istraživanja Orywal i suradnika (2021) koji su utvrdili da se sadržaj olova u sušenim divljim gljivama kreće od 928 do 1156 ng/g.

Tablica 5 Srednje vrijednosti olova u uzorcima kava, kava s gljivama i preparatima gljiva

Uzorak	Pb (ng/g)	SD
Franck, Jubilarna	39,1	9,1
Gloria, Minas	37,2	0,5
Anamaria, Minas	42,5	3,3
Nescafé, Classic	31,3	5,8
Jacobs, Cronat Gold	37,1	4,6
Franck, Classical	32,1	4,9
Mushroom Cups, Go Tireless	5,9	5,7
Mushroom Cups, Go Sharp	2,5	2,6
OstroVit, Coffee with Mushroom	3,6	1,0
<i>C. cibarius</i>, prah	941,6	42,1
<i>G. lucidum</i>, prah	478,9	209,0
<i>I. obliquus</i>, prah	717,5	313,0
<i>C. sinensis</i>, prah	1,2	1,3
<i>H. erinaceus</i>, prah	0,9	1,1
<i>G. lucidum</i>, ekstrakt	0,5	0,6
<i>I. obliquus</i>, ekstrakt	1,6	2,1
<i>C. sinensis</i>, ekstrakt	1,0	1,1
<i>H. erinaceus</i>, ekstrakt	3,0	4,4

Ekstrakt *G. lucidum* ima najmanju koncentraciju olova, a vrlo blisku vrijednost ima prah gljive *H. erinaceus* (Tablica 5). Čimbenici koji utječu na razinu olova u prahu ili ekstraktu gljiva uključuju vrste ili ekologiju gljiva, analizirani morfološki dio (plodište ili ostatak tijela gljive) i uvjeti rasta gljive (npr. onečišćenje uzrokovano prometom) (Chiocchetti i sur., 2020).

Gljive se većinom uzgajaju u zatvorenim prostorima u kontroliranom okruženju, što osigurava zaštitu od nepovoljnih vremenskih uvjeta, kontaminacije i moguć je uzgoj tijekom cijele godine.

Uzgoj funkcionalnih gljiva na supstratu je biotehnološki postupak pretvorbe različitih lignoceluloznih otpadaka u nutritivno vrijednu hranu, stoga će prinos proizvodnje gljiva biti podložan karakteristikama istog. Dodatno, sastav nutritivnih, ali i toksičnih elemenata u gljivama ovisit će o sastavu supstrata (Koopmas, 2021; Suwannarach i sur., 2012; Siwulski i sur., 2019).

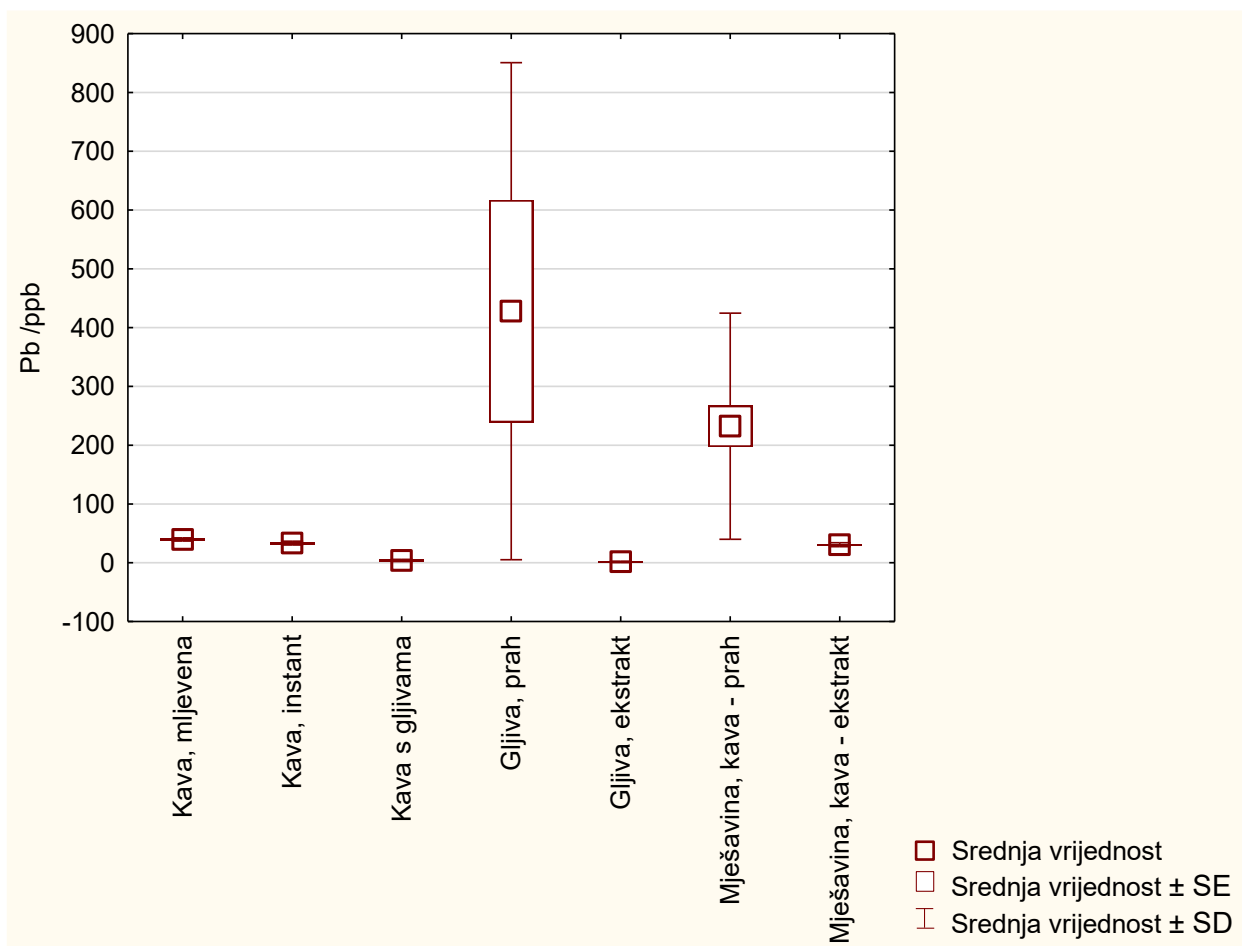
Na Slici 28 prikazane su srednje vrijednosti olova za podskupine. Vidljivo je kako podskupina instant kava ima nešto niže vrijednosti olova od podskupine u kojoj se nalaze pržene mljevene kave. Razlog tome može

biti rezultat dodatnog procesa pročišćavanja ili rafinacije kojim se uklanjaju kontaminanti. Također, vidljivo je kako podskupina komercijalno dostupnih kava s gljivama ima znatno niže koncentracije od prženih mljevenih i instant kava.

Podskupina gljiva u prahu pokazuje značajnu varijabilnost, kao i podskupina mješavina kava – prah (**Slika 28**), što je i logično obzirom da su u pitanju različite vrste gljiva. Isto tako, moguće da je varijabilnost rezultat različitih načina uzgoja gljive, procesa sušenja i mljevenja, kao i kontaminacije od uzgoja do finalne obrade. Važeća uredba Europske unije (Europska komisija, 2023) je definirala gornje vrijednosti koncentracija olova u kultiviranim gljivama od 300 ng/g te 800 ng/g za divlje gljive. Prahovi gljiva *C. cibarius*, *G. lucidum* i *I. obliquus* premašuju ove limite.

Podskupina ekstrakata gljiva pokazuje znatno niže koncentracije olova zbog kombinacije ekstrakcije ili selektivnog izoliranja određenih bioaktivnih spojeva, pročišćavanja i kontroliranih uvjeta uzgoja, pri kojim je minimizirana mogućnost nakupljanja teških metala i ostalih nečistoća.

Mješavine praha gljiva i kave pokazuju znatno viši sadržaj olova u odnosu na čiste kave, što se može pripisati visokoj početnoj koncentraciji u prahu gljiva. Što se tiče mješavina kava i ekstrakata gljiva, ekstrakti gljiva koji su pročišćeni i sami po sebi imaju nizak sadržaj olova, doprinose neznatnom smanjenju koncentracije olova u mješavinama ($30,7 \pm 3,3$ ng/g) u odnosu na mljevene ($39,6 \pm 2,7$ ng/g) i instant kave ($33,5 \pm 3,1$ ng/g) (**Slika 28**).



Slika 28 Srednje vrijednosti olova za podskupine uzoraka

Statističkom analizom testirana je razlika samo između podskupina mješavina jer ostale podskupine imaju premali broj pojedinačnih uzoraka. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji olova ($p = 0,213$), što se može pripisati velikoj vrijednosti standardne devijacije u mješavinama kava i praha gljive ($232,2 \pm 192,3$ ng/g). Najveća odstupanja postoje u podskupini praha od gljiva (**Tablica 5**), pri čemu su u prahu *C. sinensis* i *H. erinacea* ustanovljene znatno niže koncentracije u odnosu na druge analizirane vrste.

Koncentracije olova za podskupinu instant kava se ne razlikuju od koncentracija u podskupini mljevenih kava (**Slika 28**). Istraživanjem provedenim u Poljskoj (Winiarska-Mieczan i sur., 2021) utvrdili su znatno više vrijednosti olova u instant ($82,6 \pm 6,9$ ng/g) u odnosu na mljevenu kavu ($11 \pm 1,9$ ng/g). Iako su vrijednosti u instant kavi bile znatno veće i dalje nisu prelazile sigurnosne razine. Naime, prema važećoj uredbi Europske unije (Europska komisija, 2023) nisu definirani limiti za olovo u kavama, ali usporedbom s limitom za žitarice (200 ng/g), koje se konzumiraju češće i u većim količinama od kave, jasno je da je rizik bolesti povezan s kroničnom izloženošću jako mali. Razlike između rezultata navedenog istraživanja i rezultata

prezentiranih ovdje mogu se pripisati činjenici da će sadržaj olova u kavi određivati primijenjeni tehnološki procesi i proizvodnja (Prugarová i Kováč, 1987).

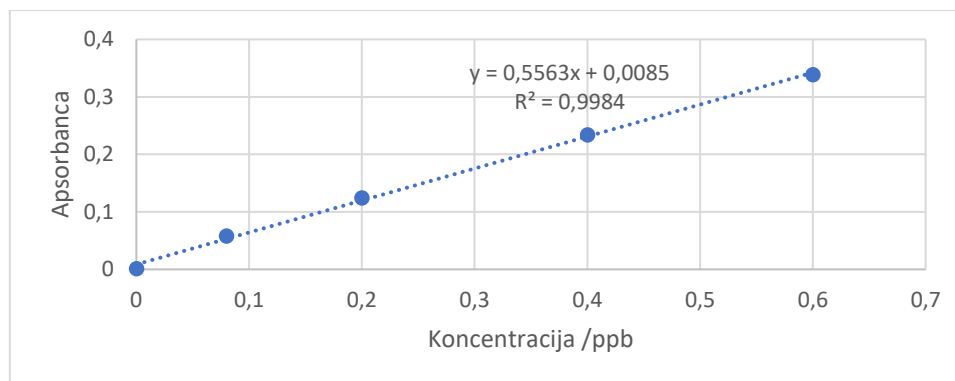
Također, vidljivo je kako kave u kombinaciji s ekstraktima gljiva snižavaju koncentraciju olova mješavina, dok pripremanjem mješavina kava i praha gljiva, koncentracija značajno raste (**Tablica 5 i 6**). Dodatak praha gljiva *C. cibarius*, *G. lucidum* i *I. obliquus* u kave i instant kave je naročito snažno povećao koncentraciju olova mješavina. Usporedbom izvornog sadržaja olova u kavama i mješavinama istih s prahom gljive *C. cibarius*, vidljivo je da se koncentracija olova mješavina poveća oko 13 puta dodatkom praha ove gljive. Pripravci gljiva koji pozitivno utječu (smanjuju ukupni sadržaj olova u mješavini) su prahovi gljiva *C. sinensis* i *H. erinaceus*, i ekstrakti gljiva *G. lucidum*, *I. obliquus*, *C. sinensis* i *H. erinaceus*. Razloge nižih razina olova u dva od pet prahova gljiva treba tražiti prvenstveno u uvjetima uzgoja tj. supstratu na kojem su gljive rasle, iako su moguće i razlike između vrsta gljiva u sposobnosti akumulacije teških metala (Širić, 2016).

Tablica 6 Srednje vrijednosti olova u mješavinama kava i preparata gljiva

Kava	Preparat gljiva	Pb (ng/g)
Franck, Jubilarna	<i>C. cibarius</i> , prah	490,3
	<i>G. lucidum</i> , prah	259,0
	<i>I. obliquus</i> , prah	378,3
	<i>C. sinensis</i> , prah	20,1
	<i>H. erinaceus</i> , prah	20,0
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	32,6
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	32,8
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	32,7
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	33,1
Gloria, Minas	<i>C. cibarius</i> , prah	489,4
	<i>G. lucidum</i> , prah	258,0
	<i>I. obliquus</i> , prah	377,3
	<i>C. sinensis</i> , prah	19,2
	<i>H. erinaceus</i> , prah	19,0
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	31,1
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	31,2
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	31,2
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	33,5
Anamaria, Minas	<i>C. cibarius</i> , prah	492,0
	<i>G. lucidum</i> , prah	260,7
	<i>I. obliquus</i> , prah	380,0
	<i>C. sinensis</i> , prah	21,8
	<i>H. erinaceus</i> , prah	21,7
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	35,5
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	35,6
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	35,5

	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	35,9
Nescafé, Classic	<i>C. cibarius</i> , prah	486,5
	<i>G. lucidum</i> , prah	255,1
	<i>I. obliquus</i> , prah	374,4
	<i>C. sinensis</i> , prah	16,2
	<i>H. erinaceus</i> , prah	16,1
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	16,2
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	26,4
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	26,3
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	2,6
Jacobs, Cronat Gold	<i>C. cibarius</i> , prah	489,4
	<i>G. lucidum</i> , prah	258,0
	<i>I. obliquus</i> , prah	377,3
	<i>C. sinensis</i> , prah	19,1
	<i>H. erinaceus</i> , prah	19,0
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	31,0
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	31,2
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	31,1
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	31,4
Franck, Classical	<i>C. cibarius</i> , prah	486,9
	<i>G. lucidum</i> , prah	255,5
	<i>I. obliquus</i> , prah	374,8
	<i>C. sinensis</i> , prah	16,6
	<i>H. erinaceus</i> , prah	16,5
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	26,8
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	27,0
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	26,9
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	27,2

Tipična kalibracijska krivulja za kadmij prikazana je na **Slici 29**. Korelacijski koeficijent (R^2) ima visoku vrijednost, što ukazuje na odličnu linearnost tj. vezu između koncentracije kadmija i signala instrumenta u rasponu koncentracija 0 do 0,6 ng/mL. Vrijednosti LOD-a (0,02 ppb) i LOQ-a (0,05 ppb) se nalaze unutar raspona vrijednosti iz priručnika proizvođača (LOD: 0,005 – 0,02 ppb; LOQ = 0,02 – 0,06 ppb).



Slika 29 Tipična kalibracijska krivulja za kadmij

Winiarska-Mieczan i sur. (2022) su ICP-MS tehnikom odredili sadržaj olova i kadmija instant kava, zamjena za kavu i instant napitaka od kave, te utvrdili vrlo niske vrijednosti za LOD (0,004 ppb) i LOQ (0,010 ppb) za kadmij.

Koncentracije kadmija u uzorcima kreću se od 0,2 do 101,6 ng/g (**Tablica 7**). Najmanju koncentraciju kadmija ima ekstrakt gljive *C. sinensis*, a najveću prah gljive *C. cibarius*. Veće koncentracije kadmija također imaju prahovi gljiva *G. lucidum* i *I. obliquus*, dok ekstrakti gljiva imaju izrazito niske koncentracije kadmija, s najvećom koncentracijom od 2,8 ng/g (ekstrakt gljive *I. obliquus*). Ekstrakti i prahovi istih vrsta gljiva se značajno razlikuju u koncentraciji kadmija.

Razumljivo je da ekstrakti imaju niže koncentracije, jer proces proizvodnje ekstrakta gljiva sastoji se od namakanja ili kuhanja gljiva u vodi ili drugim otapalima koji efektivno ekstrahiraju i odvajaju teške metale od gljiva (Abulude i Ndamitso, 2018). Slično utvrđenom za olovo, niže razine kadmija, kako u praškastom obliku tako i u ekstraktu, pokazuju gljive *C. sinensis* i *H. erinaceus*. Prema Meglaru i suradnicima (2016), čimbenici koji utječu na sposobnost apsorpcije kadmija u gljivama uključuju vrstu gljive, bioraspoloživost kadmija u tlu i sastav supstrata. Različite vrste gljiva akumuliraju različite koncentracije teških metala, pa tako i kadmija.

Uredba Europske komisije je odredila limit za sadržaj kadmija u kultiviranim (150 ng/g) i divljim gljivama (500 ng/g) (Europska komisija, 2023), te su svi analizirani uzorci sukladni. Nije postavljen limit za kavu, ali

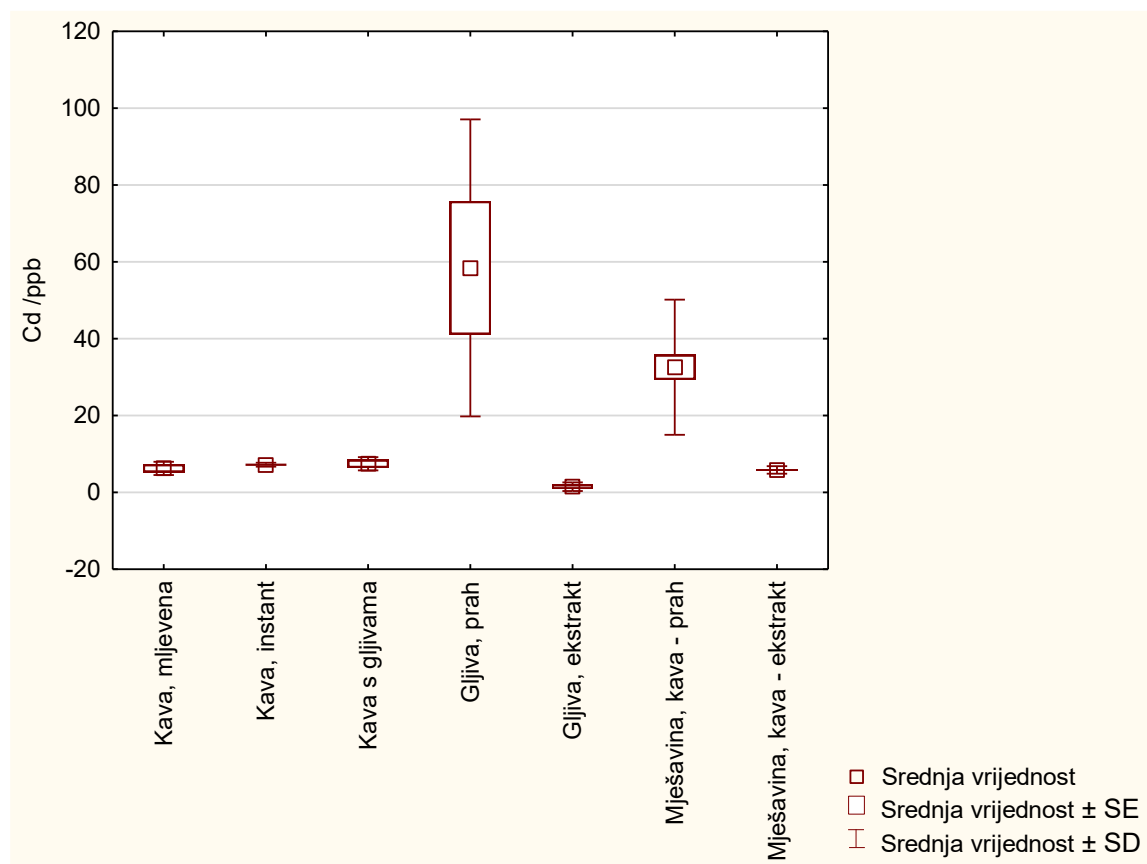
najveće dopuštene vrijednosti za žitarice (100 ng/g) i kakao prah (600 ng/g) mogu dati uvid u razinu kontaminacije analiziranih proizvoda (**Tablica 7**).

Tablica 7 Srednje vrijednosti kadmija u uzorcima kava, kava s gljivama i preparatima gljiva

Uzorak	Cd (ng/g)	SD
Franck, Jubilarna	4,9	0,7
Gloria, Minas	8,2	2,0
Anamaria, Minas	5,7	0,8
Nescafé, Classic	7,8	1,9
Jacobs, Cronat Gold	6,8	0,4
Franck, Classical	7,1	0,9
Mushroom Cups, Go Tireless	5,8	0,9
Mushroom Cups, Go Sharp	9,2	0,4
OstroVit, Coffee with Mushroom	7,4	1,2
<i>C. cibarius</i>, prah	101,6	1,1
<i>G. lucidum</i>, prah	78,5	2,8
<i>I. obliquus</i>, prah	76,6	5,5
<i>C. sinensis</i>, prah	24,4	0,1
<i>H. erinaceus</i>, prah	11,3	0,7
<i>G. lucidum</i>, ekstrakt	1,9	0,2
<i>I. obliquus</i>, ekstrakt	2,8	2,6
<i>C. sinensis</i>, ekstrakt	0,2	0,0
<i>H. erinaceus</i>, ekstrakt	1,0	0,9

Na **Slici 30** prikazane su srednje vrijednosti kadmija za podskupine uzoraka. Ispitivana razlika između mješavina je visoko statistički značajna ($p < 0,000001$). Podskupine mljevene kave ($6,3 \pm 1,7$ ng/g) i instant kava ($7,2 \pm 0,5$ ng/g) imaju slične vrijednosti kadmija s relativno niskom standardnom devijacijom, što ukazuje na male razlike između uzorkovanih brandova. Podskupina gljive u prahu ima najveću koncentraciju kadmija, što je vezano uz prirodnu sposobnost gljiva da akumuliraju ovaj i druge teške metale zbog svojih genetskih karakteristika, uključujući transportne gene i vezne ligande (Gałgovska i Pietrzak-Fiećko, 2021). Dokumentirani su slučajevi akumulacije velikih količina kadmija ako su gljive rasle u tlu koje je bilo kontaminirano određenim industrijskim otpadom, pesticidima ili prirodnim mineralima koji u svom sastavu sadrže kadmij (Orywal i sur., 2021). Slično rečenom za olovo, visoka standardna devijacija ukazuje na veliki raspon koncentracija u prahovima, od najmanje ($11,3 \pm 0,7$ ng/g za *H. erinaceus*) do najveće ($101,6 \pm 1,1$ ng/g), koja se može pripisati raznolikosti vrsta gljiva, različitoj sposobnosti apsorpcije kadmija ili različitim uvjetima sušenja i mljevenja.

Obzirom da prahovi gljiva pokazuju veliku varijabilnost, ona se odrazila i na podskupinu mješavina kava s prahovima gljiva. Ova podskupina mješavina ima znatno višu koncentraciju kadmija od samih kava (Slika 30), dok je dodatak ekstrakata u kave ipak rezultirao nešto nižom koncentracijom od kava.



Slika 30 Srednje vrijednosti kadmija za podskupine uzoraka

Srednje vrijednosti koncentracije kadmija u mješavinama kava i preparata gljiva kreću se od 4,1 do 54,9 ng/g (Tablica 8). Najvišu koncentraciju kadmija ima Gloria Minas kava pripremljena s prahom gljive *C. cibarius*, kao i sve kave u kombinaciji s prahom ove gljive i prahovima gljiva *I. obliquus* i *G. lucidum*. Poznato je kako *C. cibarius* akumulira kadmij iz okoliša, a različiti dijelovi gljive akumuliraju različite koncentracije kadmija (Drewnowska i sur., 2017).

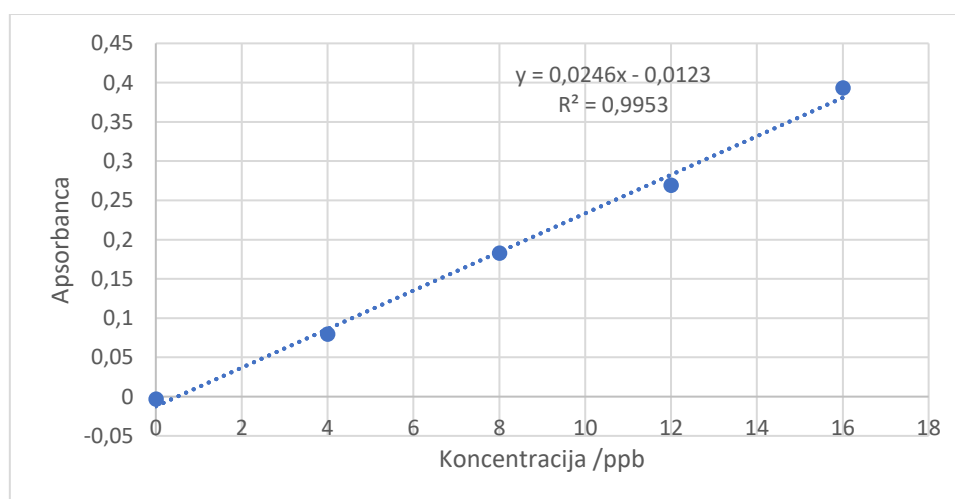
Općenito, ekstrakti sadrže znatno niže koncentracije, ali dodatak ekstrakta u kave nije rezultirao značajnim smanjenjem ukupne koncentracije kadmija (Tablice 7 i 8).

Tablica 8 Srednje vrijednosti kadmija u mješavinama kava i preparata gljiva

Kava	Preparat gljiva	Cd (ng/g)
Franck, Jubilarna	<i>C. cibarius</i> , prah	53,2
	<i>G. lucidum</i> , prah	41,7
	<i>I. obliquus</i> , prah	40,7
	<i>C. sinensis</i> , prah	14,6
	<i>H. erinaceus</i> , prah	8,1
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	4,4
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	4,5
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	4,1
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	4,2
Gloria, Minas	<i>C. cibarius</i> , prah	54,9
	<i>G. lucidum</i> , prah	43,3
	<i>I. obliquus</i> , prah	42,4
	<i>C. sinensis</i> , prah	16,3
	<i>H. erinaceus</i> , prah	9,7
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	7,1
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	7,3
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	6,8
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	7,0
Anamaria, Minas	<i>C. cibarius</i> , prah	53,6
	<i>G. lucidum</i> , prah	42,1
	<i>I. obliquus</i> , prah	41,1
	<i>C. sinensis</i> , prah	15,0
	<i>H. erinaceus</i> , prah	8,5
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	5,1
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	5,2
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	4,8
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	4,9
Nescafé, Classic	<i>C. cibarius</i> , prah	54,7
	<i>G. lucidum</i> , prah	43,1
	<i>I. obliquus</i> , prah	42,2
	<i>C. sinensis</i> , prah	16,1
	<i>H. erinaceus</i> , prah	9,5
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	6,8
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	6,9
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	6,5
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	6,7
	<i>C. cibarius</i> , prah	54,2
	<i>G. lucidum</i> , prah	42,6

Jacobs, Cronat Gold	<i>I. obliquus</i> , prah	41,7
	<i>C. sinensis</i> , prah	15,6
	<i>H. erinaceus</i> , prah	9,0
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	6,0
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	6,1
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	5,7
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	5,8
Franck, Classical	<i>C. cibarius</i> , prah	54,3
	<i>G. lucidum</i> , prah	42,8
	<i>I. obliquus</i> , prah	41,8
	<i>C. sinensis</i> , prah	15,7
	<i>H. erinaceus</i> , prah	9,2
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	6,2
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	6,3
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	5,9
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	6,0

Dolje je prikazana jedna od kalibracijskih krivulja za arsen korištenih tijekom analize uzoraka (**Slika 31**). Utvrđena je odlična linearnost krivulje (R^2) u rasponu koncentracija 0 do 16 ng/mL standardne otopine. Vrijednosti LOD-a (0,36 ppb) i LOQ-a (1,19 ppb) nalaze se unutar raspona vrijednosti iz priručnika proizvođača (LOD: 0,1 – 0,5 ppb; LOQ: 0,4 – 2 ppb).



Slika 31 Tipična kalibracijska krivulja za arsen

Znatno osjetljivijom ICP-MS tehnikom Guadalupe i sur. (2023) su odredili sadržaj anorganskog arsena u pet vrsta kava iz pet peruanskih regija, te utvrdili vrlo niske vrijednosti za LOD (0,005 ppb) i LOQ (0,010 ppb) za arsen.

Koncentracije arsena u uzorcima kava, kava s gljivama i preparatima gljiva kreću od 9,9 do 723 ng/g (**Tablica 9**). Suprotno rezultatima za olovo i kadmij, prah gljive *H. erinaceus* ima najveću koncentraciju arsena od svih analiziranih prahova. Arsen se akumulira u svim dijelovima ove gljive, što ukazuje na pojačanu apsorpciju i nakupljanje arsena u ovoj vrsti (Zhang i sur., 2017). Pretpostavka da se u prah gljive melje cijela gljiva mogla bi djelomično objasniti zašto je koncentracija tako visoka. Mleczek i sur. (2016) su proveli istraživanje na izabranim vrstama gljiva između kojih je i *H. erinaceus*. Kultivacijom na supstratima koji su imali različite koncentracije arsena, određivali su kinetiku apsorpcije arsena. Izvijestili su da je u gljivi *H. erinaceus* zabilježen porast ukupnog arsena kada je uzgajana na supstratu koji sadrži 0,2 mM arsena te ukazali na važnost sastava supstrata u sprječavanju kontaminacije. Čimbenici koji utječu na sadržaj arsena u proizvodima od gljiva su vrsta gljive, metode kuhanja i prisutnost mikrobne populacije. Za razliku od razine žive, kadmija i olova, kuhanjem se smanjuje razina arsena (Chiocchetti i sur., 2020; Shuangyang i sur., 2020).

Ekstrakti imaju znatno niže koncentracije od praha gljiva, što može biti rezultat niske početne koncentracije same sirovine (ujedno i pokazatelj kontroliranog uzgoja), kao i pokazatelj da se procesima obrade i efikasnim metodama ekstrakcije učinkovito uklanja arsen. Ipak, ekstrakt gljive *C. sinensis* ima koncentraciju arsena 11 puta višu od koncentracija u ostalim ekstraktima (**Tablica 9**).

Europska unija nije odredila najviše dopuštene koncentracije anorganskog arsena u kavi ili gljivama, ali utvrđene razine kontaminacije u prahovima bi mogle biti problematične budući da je za rižino brašno postavljen limit od 250 ng/g (Europska komisija, 2023).

Tablica 9 Srednje vrijednosti arsena u uzorcima kava, kava s gljivama i preparatima gljiva

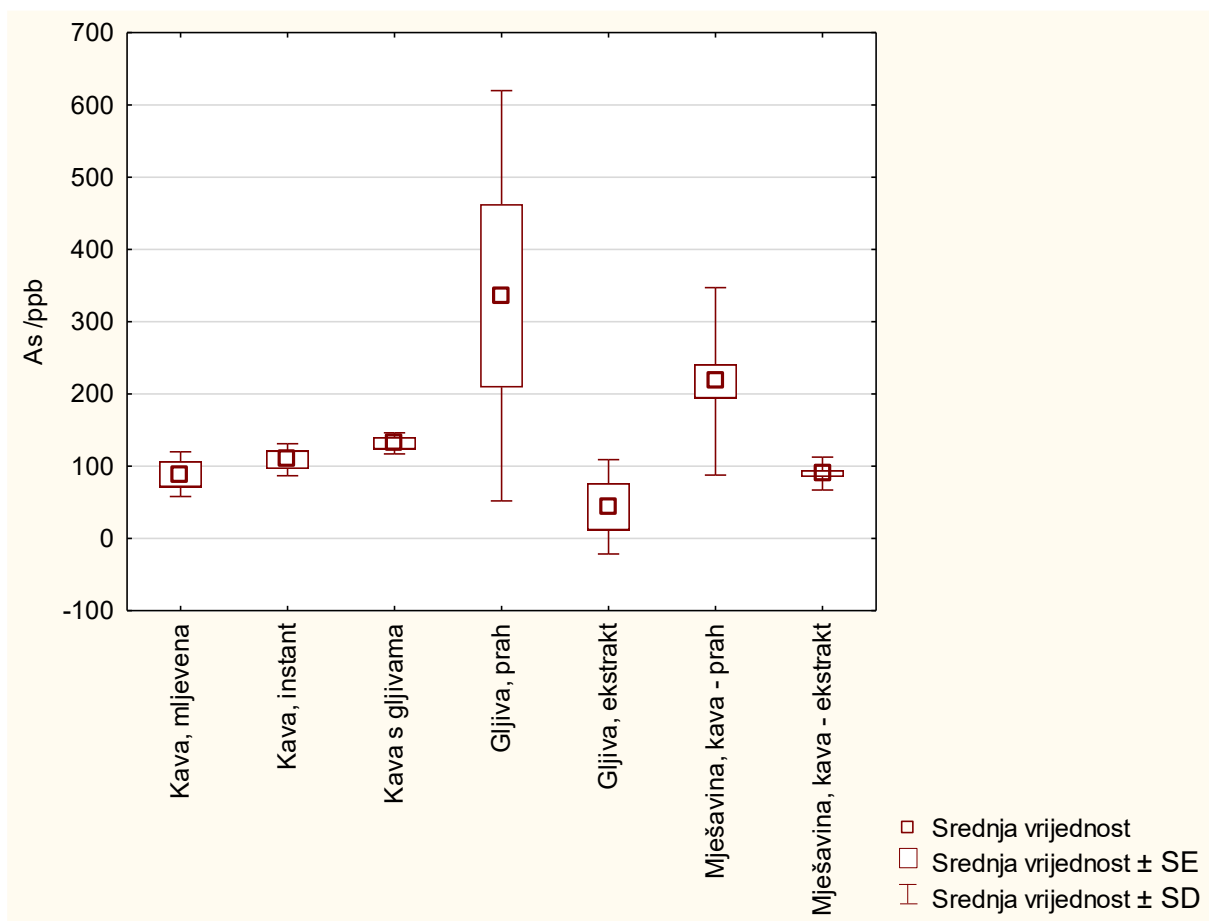
Uzorak	As (ng/g)	SD
Franck, Jubilarna	123,9	7,0
Gloria, Minas	64,7	0,3
Anamaria, Minas	78,4	5,7
Nescafé, Classic	118,4	7,3
Jacobs, Cronat Gold	83,6	7,3
Franck, Classical	125,0	67,4
Mushroom Cups, Go Tireless	130,1	5,1
Mushroom Cups, Go Sharp	117,9	22,8
OstroVit, Coffee with Mushroom	147,0	26,1
<i>C. cibarius</i>, prah	141,0	2,6
<i>G. lucidum</i>, prah	18,2	4,7
<i>I. obliquus</i>, prah	511,2	205,3
<i>C. sinensis</i>, prah	285,3	5,1

<i>H. erinaceus</i> , prah	723,4	414,0
<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	12,6	2,8
<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	9,9	8,0
<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	141,8	9,7
<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	11,1	3,2

Razlika u sadržaju arsena između mješavina kava s prahovima gljiva i mješavina kava s ekstraktima gljiva je statistički značajna ($p = 0,0001$) (**Slika 32**). Dodatak praha gljiva u prosjeku povećava koncentraciju ovog elementa u mješavinama, a mješavine kava i ekstrakata ne dovode do povećanja srednje koncentracije u odnosu na kave.

Ponovno, podskupina ekstrakata gljiva ima najniže vrijednosti, dok podskupina prahova ima najviše koncentracije i pokazuje najveću varijabilnost. Analizom ukupnog arsena u različitim vrstama gljiva, Llorente-Mirandes i sur. (2016) utvrdili su kako koncentracija varira ovisno o vrsti, ali metode poput kuhanja, prokuhavanja ili dinstanja gljiva mogu reducirati ukupni arsen do 71%.

Instant kave imaju minimalno višu koncentraciju od prženih mljevenih kava, dok komercijalno dostupne kave s gljivama imaju nešto višu srednju koncentraciju u odnosu na instante (**Slika 32**). Pored uobičajenih, već spomenutih razloga odstupanja, instant kava je koncentriranija pa može sadržavati više kontaminanata u odnosu na mljevene kave. Više koncentracije u kavama s gljivama mogu biti posljedica korištenja gljiva koje imaju sposobnost akumulacije arsena, a nisu podvrgnute odgovarajućim metodama ekstrakcije prije dodatka.



Slika 32 Srednje vrijednosti arsena za podskupine uzoraka

Dolje su prikazane srednje vrijednosti arsena u mješavinama prženih mljevenih ili instant kava u kombinaciji s prahovima ili ekstraktima gljiva (Tablica 10). Koncentracije u pripremljenim mješavinama kreću se od 41,4 do 424,2 ng/g. Mješavina s najmanjom koncentracijom arsena je Gloria Minas kava u kombinaciji s ekstraktom gljive *G. lucidum*, a slično niske razine utvrđene su u kombinacijama kava s ekstraktima gljiva *I. obliquus* i *H. erinaceus*, te prahom gljive *G. lucidum*.

Tablica 10 Srednje vrijednosti arsena u mješavinama kava i preparata gljiva

Kava	Preparat gljive	As (ng/g)
Franck, Jubilarna	<i>C. cibarius</i> , prah	132,4
	<i>G. lucidum</i> , prah	71,0
	<i>I. obliquus</i> , prah	317,6
	<i>C. sinensis</i> , prah	204,6
	<i>H. erinaceus</i> , prah	423,7
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	105,4
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	104,9

	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	126,9
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	105,1
Gloria, Minas	<i>C. cibarius</i> , prah	102,8
	<i>G. lucidum</i> , prah	41,4
	<i>I. obliquus</i> , prah	288,0
	<i>C. sinensis</i> , prah	175,0
	<i>H. erinaceus</i> , prah	394,1
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	56,0
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	55,6
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	77,5
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	55,8
	Anamaria, Minas	<i>C. cibarius</i> , prah
<i>G. lucidum</i> , prah		48,3
<i>I. obliquus</i> , prah		294,8
<i>C. sinensis</i> , prah		181,9
<i>H. erinaceus</i> , prah		400,9
<i>G. lucidum</i> , ekstrakt		67,4
<i>I. obliquus</i> , ekstrakt		67,0
<i>C. sinensis</i> , ekstrakt		88,9
Nescafé, Classic	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	67,2
	<i>C. cibarius</i> , prah	129,7
	<i>G. lucidum</i> , prah	68,3
	<i>I. obliquus</i> , prah	314,8
	<i>C. sinensis</i> , prah	201,9
	<i>H. erinaceus</i> , prah	420,9
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	100,8
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	100,4
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	122,3
Jacobs, Cronat Gold	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	100,6
	<i>C. cibarius</i> , prah	112,3
	<i>G. lucidum</i> , prah	50,9
	<i>I. obliquus</i> , prah	297,4
	<i>C. sinensis</i> , prah	184,4
	<i>H. erinaceus</i> , prah	403,5
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	71,7
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	71,3
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	93,3
Franck, Classical	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	71,5
	<i>C. cibarius</i> , prah	133,0
	<i>G. lucidum</i> , prah	71,6
	<i>I. obliquus</i> , prah	318,1

	<i>C. sinensis</i> , prah	205,1
	<i>H. erinaceus</i> , prah	424,2
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	106,2
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	105,8
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	127,8
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	106,0

U **Tablicama 11 i 12** prikazana je ukupna koncentracija teških metala te doprinos ukupno unešenim teškim metalima konzumacijom 3 šalice kave dnevno. Provedeni način pripreme mješavina (1:1 za kombinacije kave i prahova, te 5:1 za kombinacije kave i ekstrakata) vjerojatno precijenjuje prosječan unos prahova i ekstrakata gljiva, ali je namjerno odabran radi procjene izloženosti i u slučaju najvećih konzumenata. Ukoliko se utvrdi mali rizik i u takvom scenariju, tada se sa sigurnošću može tvrditi da su preparati gljiva i mješavine s kavama zdravstveno ispravne i sigurne za konzumaciju. Prilikom računanja dnevnog doprinosa, za olovo i arsen smo uzeli donju granicu TDI vrijednosti.

Vrijednosti referentne doze tj. BMDL-a, kao mjere praga štetnog djelovanja toksikanta, za izloženost odraslih osoba olovu kreću se između 0,63 – 1,50 µg/kg tjelesne mase na dan (EFSA, 2010). Najveći ukupni dnevni unos olova procijenjen je za konzumaciju mješavine Anamaria Minas kave u kombinaciji s prahom gljive *C. cibarius* (17,7 µg tj. 0,3 µg/kg osobe mase 70 kg), a najmanji konzumacijom Néscafe Classic i ekstrakta gljive *G. lucidum* (0,3 µg tj. 0,004 µg/kg osobe mase 70 kg) (**Tablica 11**).

Konzumacijom bilo koje pržene mljevene kave u kombinaciji s prahom gljive *C. cibarius* rezultirat će sličnim ishodom, unosom oko 17 µg olova, što je otprilike 40 % niže BMDL vrijednosti (0,63 µg/kg) za osobu težine 70 kg (**Tablice 11 i 12**). Osoba koja pije istu vrstu kave s prahom gljive *I. obliquus* unijet će približno 13,5 µg olova, što je oko 30 % BMDL vrijednosti. Navedene mješavine tj. prahovi gljiva mogu značajno doprinijeti dnevnom unosu olova te povećati rizik uslijed izloženosti olovu.

Najniži doprinos dnevnom unosu imaju mješavine instant kava u kombinaciji s ekstraktima gljiva, drugim riječima, ovim mješavinama će osoba mase 70 kg unijeti oko 0,3 µg/kg olova, što otprilike čini 0,5 % niže BMDL vrijednosti. Konzumacijom ovih mješavina će izloženost olovu putem kave biti svedena na minimum.

Tolerirani tjedni unos (TWI) za kadmij iznosi 2,5 µg/kg tjelesne mase (EFSA, 2009). Dnevni unos kadmija je najveći konzumacijom mješavine Gloria Minas kave u kombinaciji s prahom gljive *C. cibarius* i iznosi 13,8 µg, što čini 8 % TWI vrijednosti za osobu od 70 kg (0,2 µg/kg) (**Tablice 11 i 12**). Slično vrijedi za ostale mješavine mljevenih kava u kombinaciji s prahom lisičarke.

Najniži doprinos tjednom unosu kadmija imaju mješavine instant kava s ekstraktima gljiva, a vrijednosti se kreću oko 0,7 µg kadmija tjedno konzumacijom 3 šalice mješavine dnevno (**Tablica 11**). Navedene mješavine doprinosit će svega 0,4 % TWI vrijednosti (**Tablica 12**), što je zanemarivo.

EFSA-ina BMDL vrijednost za anorganski arsen je 0,06 µg/kg (EFSA, 2024). Ovo istraživanje je atomskim apsorpcijskim spektrometrom odredilo samo ukupni arsen u uzorcima, ali sadržaj organskih oblika arsena u kavi i gljivama je minoran (EFSA, 2009). Dnevni unos arsena putem kave, najveći je konzumacijom mješavina mljevenih kava s prahom gljive *H. erinaceus*, tj. u slučaju Franckove Jubilarne kave, čak 7,6 µg (**Tablica 11**). Osoba od 70 kg će tako samo ovom mješavinom unijeti 0,1 µg/kg tj. 180 % BMDL vrijednosti (**Tablica 12**).

Velik doprinos dnevnom unosu arsena imaju i pržene mljevene kave u kombinaciji s prahom gljive *I. obliquus* (otprilike 130 % BMDL vrijednosti), kao i mješavine ovih kava s prahom gljive *C. sinensis* (oko 90 % BMDL-a).

Najmanji dnevni unos postiže se mješavinama ekstrakata gljiva u kombinaciji s instant kavama, pri čemu Jacobs Cronat Gold u kombinaciji s ekstraktom gljive *H. erinaceus* rezultira unosom od 0,6 µg (**Tablica 11**), što je oko 15 % BMDL vrijednosti za osobu mase 70 kg (**Tablica 12**).

Tablica 11 Dnevni unos olova i arsena i tjedni unos kadmija mješavinama kava i preparata gljiva za osobu mase 70 kg

Kava	Preparat gljive	Pb (µg/kg)	Cd (µg/kg)	As (µg/kg)
Franck, Jubilarna	<i>C. cibarius</i> , prah	0,25	0,19	0,07
	<i>G. lucidum</i> , prah	0,13	0,15	0,04
	<i>I. obliquus</i> , prah	0,19	0,15	0,16
	<i>C. sinensis</i> , prah	0,01	0,05	0,11
	<i>H. erinaceus</i> , prah	0,01	0,03	0,22
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	0,01	0,01	0,03
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	0,01	0,01	0,03
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	0,01	0,01	0,04
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	0,01	0,01	0,03
Gloria, Minas	<i>C. cibarius</i> , prah	0,25	0,20	0,05
	<i>G. lucidum</i> , prah	0,13	0,16	0,02
	<i>I. obliquus</i> , prah	0,19	0,15	0,15
	<i>C. sinensis</i> , prah	0,01	0,06	0,09
	<i>H. erinaceus</i> , prah	0,01	0,03	0,20
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	0,01	0,02	0,02
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	0,01	0,02	0,02
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	0,01	0,01	0,02

	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	0,01	0,01	0,02
Anamaria, Minas	<i>C. cibarius</i> , prah	0,25	0,19	0,06
	<i>G. lucidum</i> , prah	0,13	0,15	0,02
	<i>I. obliquus</i> , prah	0,20	0,15	0,15
	<i>C. sinensis</i> , prah	0,01	0,05	0,09
	<i>H. erinaceus</i> , prah	0,01	0,03	0,21
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	0,01	0,01	0,02
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	0,01	0,01	0,02
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	0,01	0,01	0,03
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	0,01	0,01	0,02
Nescafe, Classic	<i>C. cibarius</i> , prah	0,13	0,10	0,03
	<i>G. lucidum</i> , prah	0,07	0,08	0,02
	<i>I. obliquus</i> , prah	0,10	0,08	0,08
	<i>C. sinensis</i> , prah	0,00	0,03	0,05
	<i>H. erinaceus</i> , prah	0,00	0,02	0,11
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	0,00	0,01	0,02
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	0,00	0,01	0,02
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	0,00	0,01	0,02
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	0,00	0,01	0,02
Jacobs Cronat Gold	<i>C. cibarius</i> , prah	0,13	0,10	0,03
	<i>G. lucidum</i> , prah	0,07	0,08	0,01
	<i>I. obliquus</i> , prah	0,10	0,08	0,08
	<i>C. sinensis</i> , prah	0,00	0,03	0,05
	<i>H. erinaceus</i> , prah	0,00	0,02	0,10
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	0,00	0,01	0,01
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	0,00	0,01	0,01
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	0,00	0,01	0,01
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	0,00	0,01	0,01
Franck, Classical	<i>C. cibarius</i> , prah	0,13	0,10	0,03
	<i>G. lucidum</i> , prah	0,07	0,08	0,02
	<i>I. obliquus</i> , prah	0,10	0,08	0,08
	<i>C. sinensis</i> , prah	0,00	0,03	0,05
	<i>H. erinaceus</i> , prah	0,00	0,02	0,11
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	0,00	0,01	0,02
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	0,00	0,01	0,02
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	0,00	0,01	0,02
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	0,00	0,01	0,02

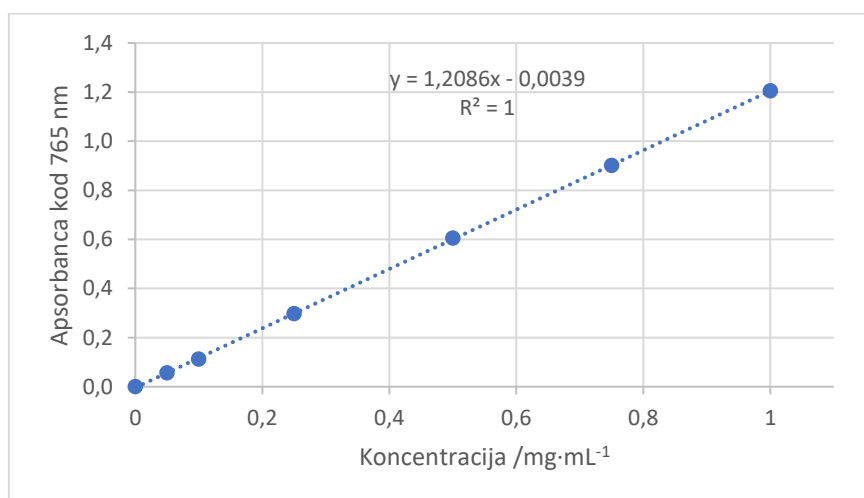
Tablica 12 Udio BMDL vrijednosti olova i arsena i TWI vrijednosti kadmija unosom mješavina kava i preparata gljiva za osobu tjelesne mase 70 kg

Kava	Preparat gljive	% BMDL-a Pb	% TWI-a Cd	% BMDL-a As
Franck, Jubilarna	<i>C. cibarius</i> , prah	40,03	7,67	113,51
	<i>G. lucidum</i> , prah	21,14	6,00	60,88
	<i>I. obliquus</i> , prah	30,88	5,87	272,19
	<i>C. sinensis</i> , prah	1,64	2,11	175,38
	<i>H. erinaceus</i> , prah	1,63	1,16	363,14
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	1,60	0,38	54,18
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	1,61	0,39	53,95
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	1,60	0,35	65,25
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	1,62	0,37	54,05
Gloria, Minas	<i>C. cibarius</i> , prah	39,95	7,90	88,14
	<i>G. lucidum</i> , prah	21,06	6,24	35,51
	<i>I. obliquus</i> , prah	30,80	6,10	246,82
	<i>C. sinensis</i> , prah	1,57	2,34	150,01
	<i>H. erinaceus</i> , prah	1,55	1,40	337,77
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	1,52	0,62	28,81
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	1,53	0,63	28,58
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	1,53	0,59	39,88
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	1,54	0,50	36,76
Anamaria, Minas	<i>C. cibarius</i> , prah	40,17	7,72	94,00
	<i>G. lucidum</i> , prah	21,28	6,06	41,37
	<i>I. obliquus</i> , prah	31,02	5,92	252,68
	<i>C. sinensis</i> , prah	1,78	2,16	155,88
	<i>H. erinaceus</i> , prah	1,77	1,22	343,63
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	1,74	0,44	34,67
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	1,75	0,45	34,44
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	1,74	0,41	45,74
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	1,76	0,43	34,54
Nescafe, Classic	<i>C. cibarius</i> , prah	19,86	3,94	55,59
	<i>G. lucidum</i> , prah	10,41	3,10	29,27
	<i>I. obliquus</i> , prah	15,28	3,04	134,93
	<i>C. sinensis</i> , prah	0,66	1,16	86,52
	<i>H. erinaceus</i> , prah	0,66	0,69	180,40
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	0,64	0,29	25,92
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	0,65	0,30	25,80
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	0,64	0,28	31,46

Jacobs Cronat Gold	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	0,65	0,29	25,86
	<i>C. cibarius</i> , prah	19,97	3,90	48,11
	<i>G. lucidum</i> , prah	10,53	3,07	21,80
	<i>I. obliquus</i> , prah	15,40	3,00	127,45
	<i>C. sinensis</i> , prah	0,78	1,12	79,05
	<i>H. erinaceus</i> , prah	0,78	0,65	172,92
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	0,76	0,26	18,44
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	0,76	0,26	18,33
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	0,76	0,24	23,98
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	0,77	0,25	18,38
Franck, Classical	<i>C. cibarius</i> , prah	19,87	3,91	56,98
	<i>G. lucidum</i> , prah	10,43	3,08	30,67
	<i>I. obliquus</i> , prah	15,30	3,01	136,32
	<i>C. sinensis</i> , prah	0,68	1,13	87,92
	<i>H. erinaceus</i> , prah	0,67	0,66	181,80
	<i>G. lucidum</i> , ekstrakt	0,66	0,27	27,32
	<i>I. obliquus</i> , ekstrakt	0,66	0,27	27,20
	<i>C. sinensis</i> , ekstrakt	0,66	0,26	32,85
	<i>H. erinaceus</i> , ekstrakt	0,67	0,26	27,25

4.2. Rezultati analiza ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti

Kalibracijska krivulja sa standardom kafeinske kiseline, prema kojoj je izražena koncentracija ukupnih polifenola u uzorcima, prikazana je na **Slici 33**. Utvrđena je odlična linearnost krivulje u rasponu koncentracija od 0 do 1 mg/mL, kao i niska vrijednosti LOD-a (0,005 mg/mL) i LOQ-a (0,016 mg/mL).



Slika 33 Kalibracijska krivulja za određivanje koncentracije ukupnih polifenola u ekstraktima Folin-Ciocalteuovom metodom (kafainska kiselina je korištena kao standard)

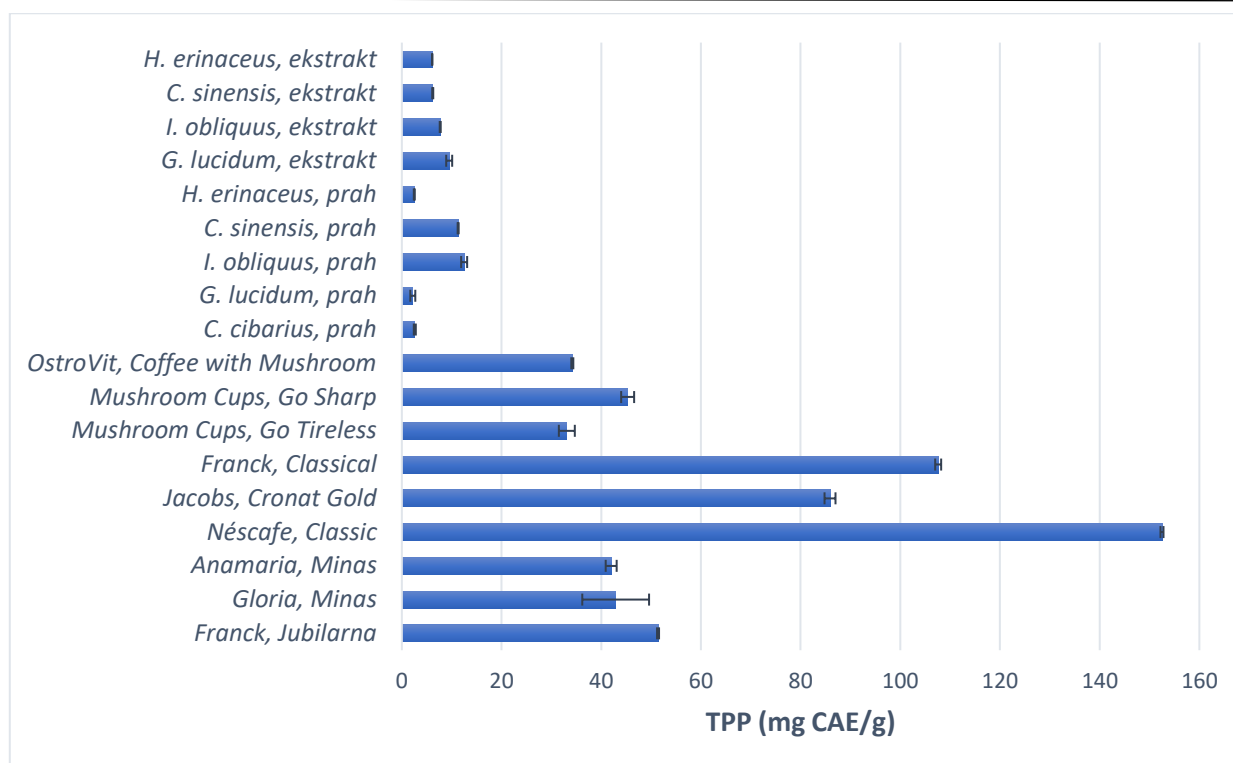
Slika 34 prikazuje ukupne polifenole (TPP) u komercijalno dostupnim kavama, kavama s gljivama i prahovima te ekstraktima gljiva, iskazanim u ekvivalentima kafeinske kiseline (CAE). Najvišu koncentraciju ukupnih polifenola ima instant kava Néscafe Classic (152,5 mg CAE/g), a najmanju prah gljive *G. lucidum* (2,2 mg CAE/g).

U istraživanju koje su proveli Ahmad i sur. (2018) navedena vrijednost za ukupne polifenole u ispitivanoj instant kavi bila je 87,01 mg GAE/g tj. 92,2 mg CAE/g, te se njihova dobivena vrijednost koncentracije smjestila između Jacobs Cronat Gold i Franck Classical (**Slika 34**).

S druge strane, Olechno i sur. (2020) utvrdili su 19,5 mg GAE/100g (20,6 mg CAE/g) u instant kavi, što je znatno niže od vrijednosti za instant kave utvrđene ovim istraživanjem. Postupak pripreme kave i temperature prženja utjecat će na sadržaj ukupnih polifenola u napitcima od kave (Popelka i sur., 2020).

Prahovi i ekstrakti gljiva su općenito sadržavali niske koncentracije ukupnih polifenola (**Slika 34**). Primjerice, gljiva *G. lucidum* ima najnižu koncentraciju od samo 2,2 mg CAE/g. Tabbasum i sur. (2022) odredili su ukupne polifenole u izabranim vrstama gljiva između kojih je bila i *G. lucidum* te odredili $81,34 \pm 0,68$ mg GAE/g, što su znatno više vrijednosti. Ovako velika razlika u vrijednosti može se pripisati vrsti supstrata ili vremenu branja, pri čemu različiti stupanj zrelosti utječe na varijacije u koncentraciji polifenola. Proizvodnja polifenola je odgovor na stres unutar same gljive, te će količina i kvaliteta ovih spojeva ovisiti o mnogim čimbenicima poput: klime, vremenskih uvjeta, stupnju razvoja i vrsti, a uz to i njihovom botaničkom te geografskom podrijetlu (Abdelshafy i sur., 2022). Nadalje, u slučaju kultiviranih gljiva također utječu kvaliteta komposta i stupanj razvoja te priježetvene i posliježetvene radnje.

Podatke sličnije prezentiranim u ovom radu su utvrdili Charumathy i sur. (2016) za količinu ukupnih polifenola u plodištu gljive *H. erinaceus*: 8,77 mg GAE/g ili 9,29 mg CAE/g. Prahovi gljiva *I. obliquus* i *C. sinensis* imaju višu koncentraciju od ekstrakata, što je neobično obzirom da su ekstrakti koncentrirani i trebali bi imati veće vrijednosti od praha. Ipak, sve ovisi o početnoj sirovini, načinu ekstrakcije i topljivosti polifenola, a vrijednosti koncentracija praha i ekstrakta gljive *G. lucidum* su ipak logičnije u tom pogledu (**Slika 31**).



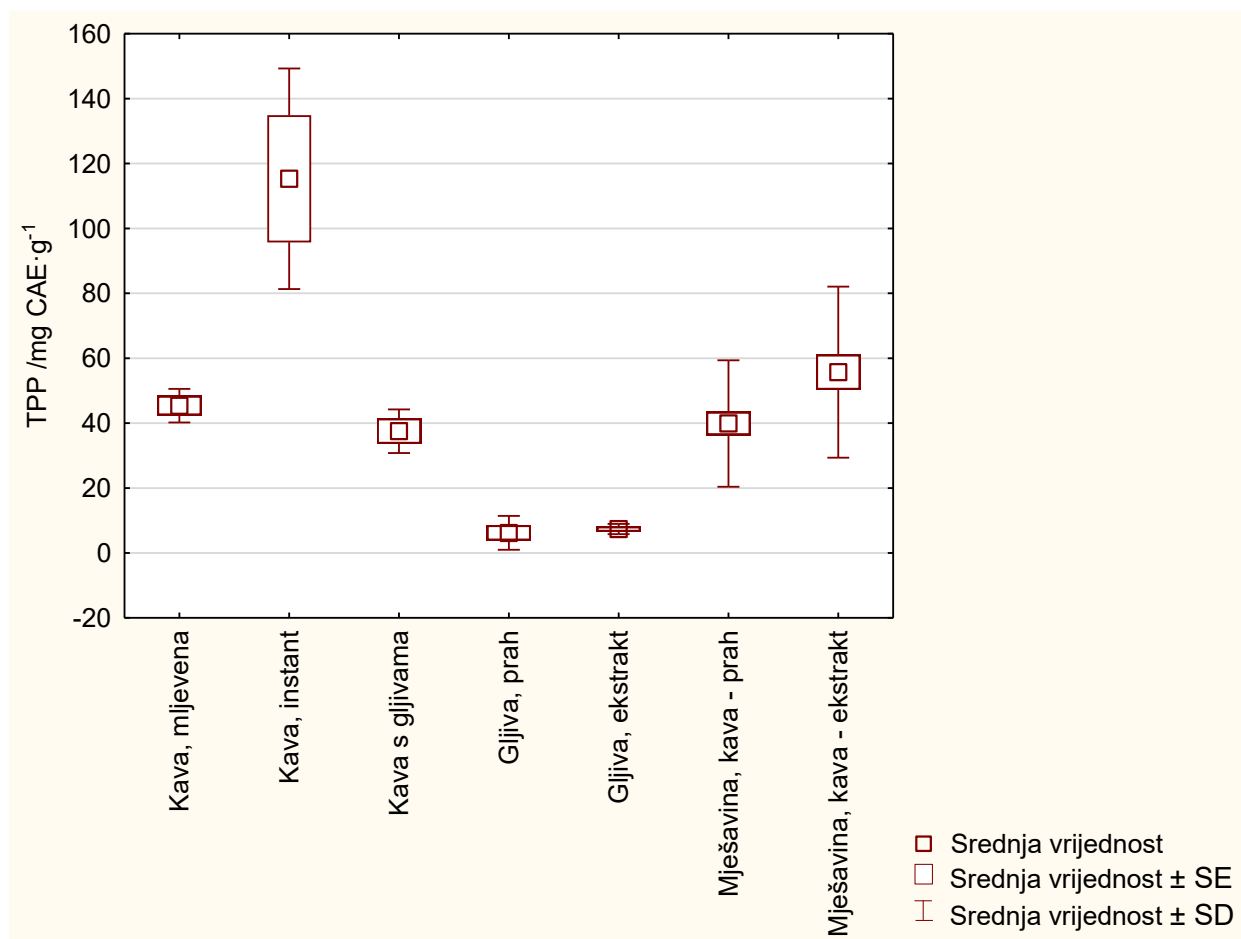
Slika 34 Ukupni polifenoli (TPP, izraženi preko kafeinske kiseline) u uzorcima kava, kava s gljivama i preparatima gljiva

Slika 35 prikazuje srednje koncentracije ukupnih polifenola za podskupine uzoraka, pri čemu daleko najvišu srednju koncentraciju imaju instant kave. Dodatak praha i ekstrakta gljiva smanjuje ukupnu koncentraciju polifenola u podskupini mješavina kava i prahova.

Kemijski sastav napitaka od kave ovisi od primijenjenih procesa (preprženje i prženje) zelenih zrna kave, metodama obrade u fazi žetve, kao i metodama koje potrošači koriste pri pripremanju napitaka (Pereira i sur., 2021). Sukladno rečenom, možda su fenolni spojevi bolje sačuvani u instant kavama nego u prženim mljevenim kavama.

Također, prema Gobbi i sur. (2023) smanjenje bioaktivnih spojeva u napitcima od kave može biti rezultat visoke temperature i tlaka tijekom kuhanja, kao i kontaktne površine između vode i čestica kave te veličina samog praha kave može utjecati na ekstrakciju fenolnih spojeva. Obzirom da su parametri ekstrakcije bili isti za sve uzorke, moguće da je veća količina fenolnih spojeva bila ekstrahirana iz instant kava.

Neppravilno skladištenje može biti uzrok gubljenja polifenola, jer stabilnost i topljivost polifenola prema Khoshnoudi-Nia i sur. (2020) ovisi o različitim stupnjevima obrade i skladištenju te može doći do ograničavanja njihove bioraspoloživosti u samom napitku.



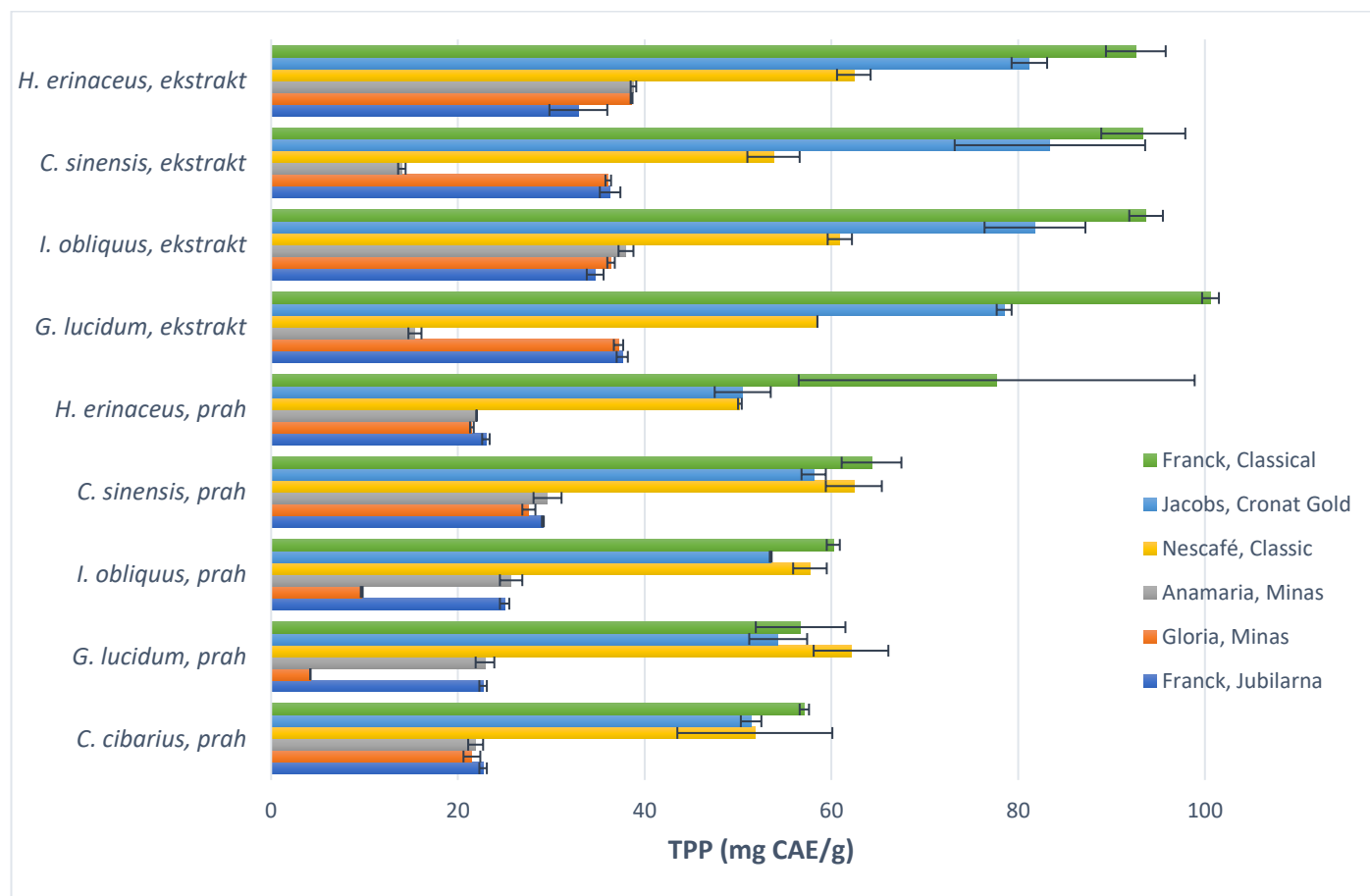
Slika 35 Ukupni polifenoli (TPP, izraženi preko kafeinske kiseline) u podskupinama uzoraka

Sadržaj ukupnih polifenola u mješavinama prženih mljevenih i instant kava u kombinaciji s prahom ili ekstraktom gljiva znatno varira (**Slika 36**). Najveću koncentraciju polifenola ima Franck Classical kava u kombinaciji s ekstraktom gljive *G. lucidum* (100,6 mg CAE/g), a najmanju Gloria Minas kava s prahom iste gljive (4,2 mg CAE/g). Franck Classical instant kava sama po sebi ima veliku koncentraciju ukupnih polifenola (**Slika 35**), tako da dodatak ekstrakta koji ima velik udio bioaktivnih sastojaka doprinosi povećanju koncentracije. Pržena mljevena kava Gloria Minas, pak, ima nisku početnu koncentraciju polifenola i dodatak praha *G. lucidum* koji sadrži 10 puta manje polifenola rezultira vrlo niskom konačnom koncentracijom u mješavini.

Song (2020) izvještava kako je miješanjem praha gljive *C. sinensis* i Arabika kave u omjeru 1:2 postignuta veća konačna koncentracija ukupnih polifenola (37,34 mg GAE/g) u odnosu na početnu koncentraciju čistih komponenti. Prije miješanja koncentracija ukupnih polifenola u Arabiki iznosila je 21,3 mg GAE/g, a prah navedene gljive je imao koncentraciju 23,17 mg GAE/g.

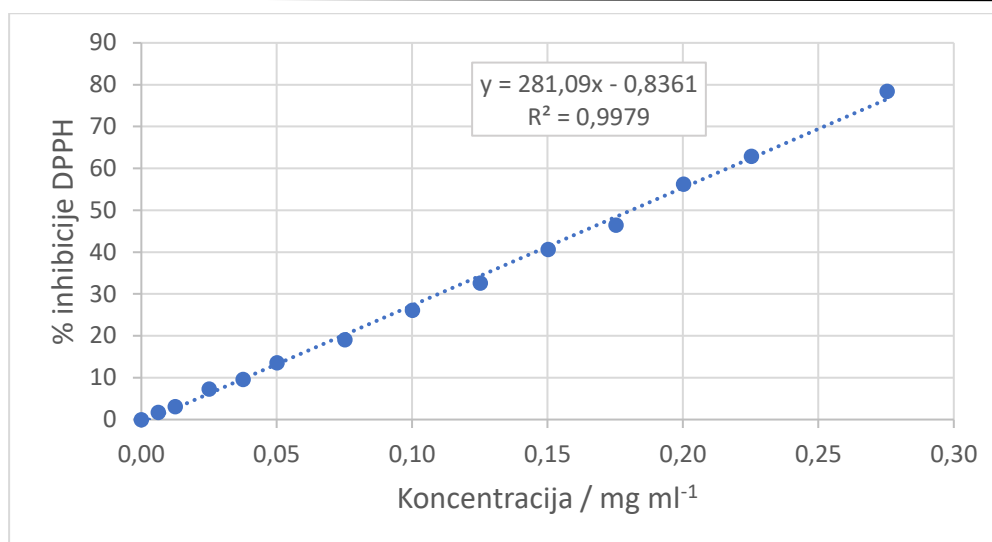
Polisaharidi iz preparata *G. lucidum* ili nekog drugog preparata gljive mogu se povezati vodikovim vezama ili hidrofobnim interakcijama s fenolnim spojevima iz kave i stvoriti kompleks. Interakcije mogu rezultirati

nastankom netopljivog taloga i time se smanjuje bioraspoloživost polifenola u napitku. Ova pretpostavka proizlazi iz karakteristika ove dvije skupine spojeva, a interakcije ovog tipa opisao je i Zhu (2018).



Slika 36 Ukupni polifenoli (TPP, izraženi preko kafeinske kiseline) u mješavinama kava i preparata gljiva

Kalibracijska krivulja s Troloxom kao standardom, korištena za izražavanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka, prikazana je na **Slici 37**. Utvrđena je odlična linearnost krivulje u rasponu koncentracija od 0 do 0,3 mg/mL ($R^2 = 0,9979$), te niske vrijednosti LOD-a (0,005 mg/mL) i LOQ-a (0,018 mg/mL).



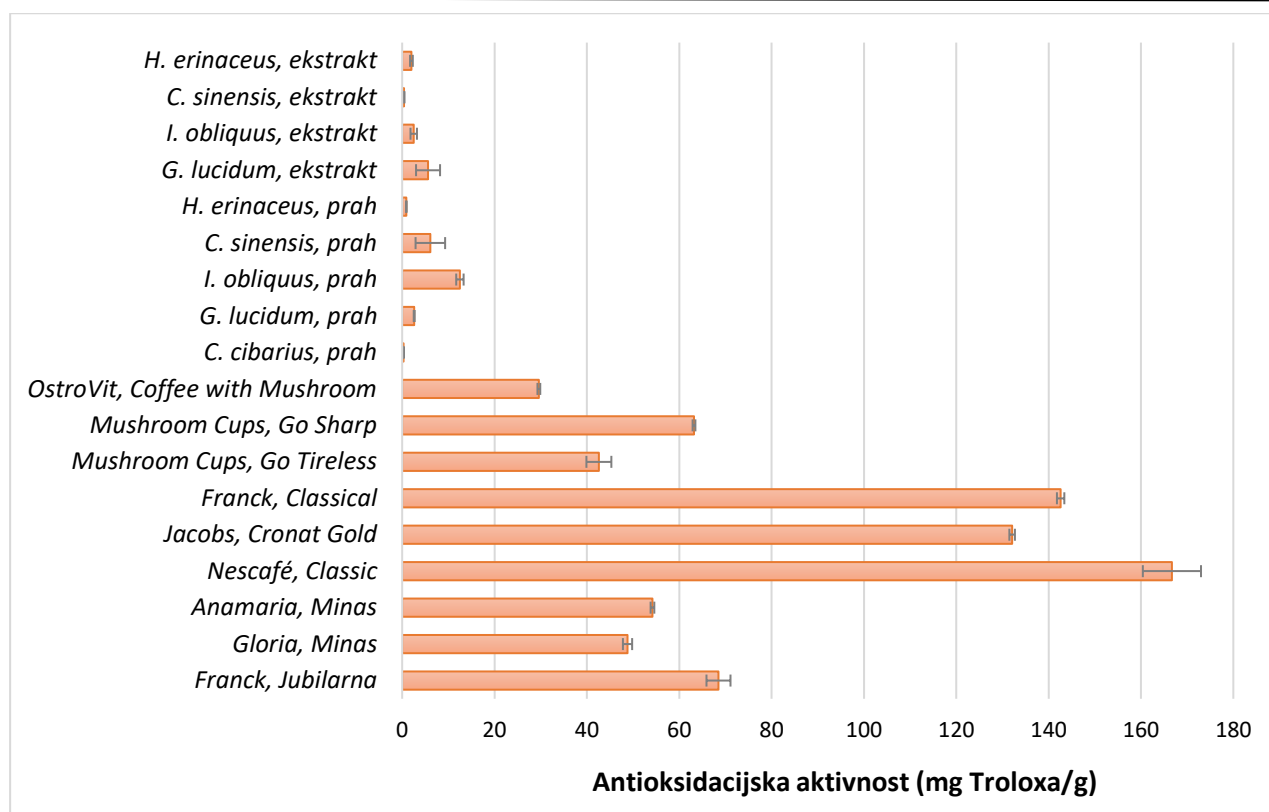
Slika 37 Kalibracijska krivulja za određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata DPPH metodom (Trolox je korišten kao standard)

Srednje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti prženih mljevenih kava, instant kava, komercijalno dostupnih kava s gljivama i prahova te ekstrakata gljiva navedene su na **Slici 38**. Najveću antioksidacijsku aktivnost ima instant kava Nescafé Classic (166,7 mg Troloxa/g), a najmanju prah gljive *C. cibarius* (0,3 mg Troloxa/g).

Utvrđene su i znatne razlike u antioksidacijskoj aktivnosti komercijalno dostupnih kava s gljivama, pri čemu kava Mushroom Cups, Go Sharp ima dvostruko veću vrijednost (63,2 mg Troloxa/g) u odnosu na OstroVit kavu (29,6 mg Troloxa/g) (**Slika 38**). Razlozi nisu jasni jer oba branda koriste kavu Arabiku. Obzirom na antioksidacijsku aktivnost izmjerenu u ekstraktima, mala je vjerojatnost da je razlika uzrokovana korištenim ekstraktima gljiva (*H. erinaceus* i *C. cibarius* u Go Sharpu te *I. obliquus* i *H. erinaceus* u OstroVitu).

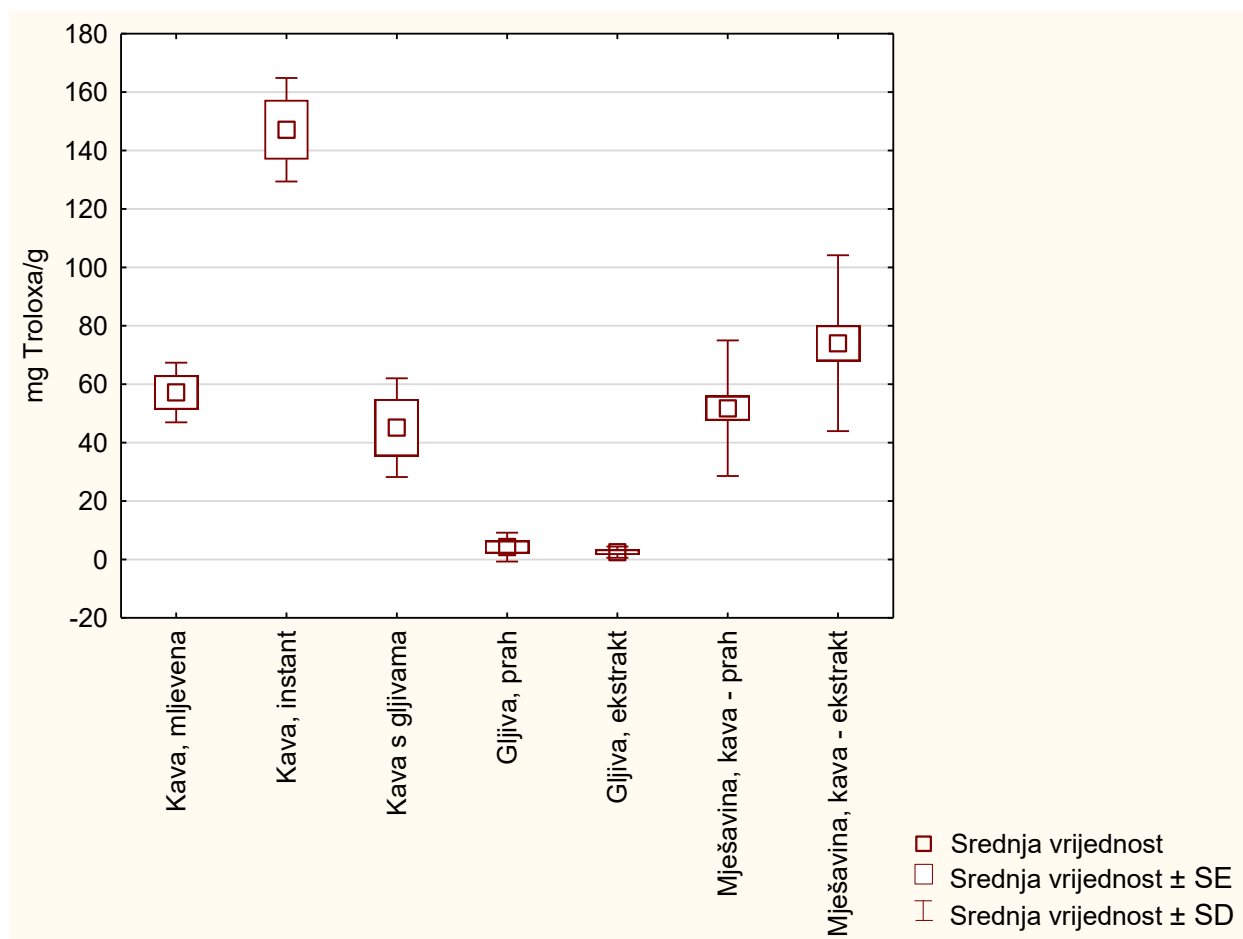
Prah gljive *I. obliquus* ima najveću antioksidacijsku aktivnost između prahova i ekstrakata gljiva (**Slika 38**), zatim slijedi prah gljive *C. sinensis*. Općenito više vrijednosti utvrđene u prahovima u odnosu na ekstrakte gljiva se možda mogu pripisati sastavu praha koji uključuje cijelu gljivu, a samim time i širok spektar bioaktivnih spojeva poput polisaharida, triterpenoida i sterola koji sinergističkim učinkom povećavaju antioksidacijsku aktivnost.

Sukladno ovoj hipotezi, Milyuhina i sur. (2021) su utvrdili da postupci poput remaceracije i mikrovalnog zračenja mogu povećati antioksidacijsku i antimikrobnu moć ekstrakta gljive *I. obliquus* u usporedbi s konvencionalnim metodama ekstrakcije. Značajnu ulogu ima i izbor ekstrakcijskog otapala.



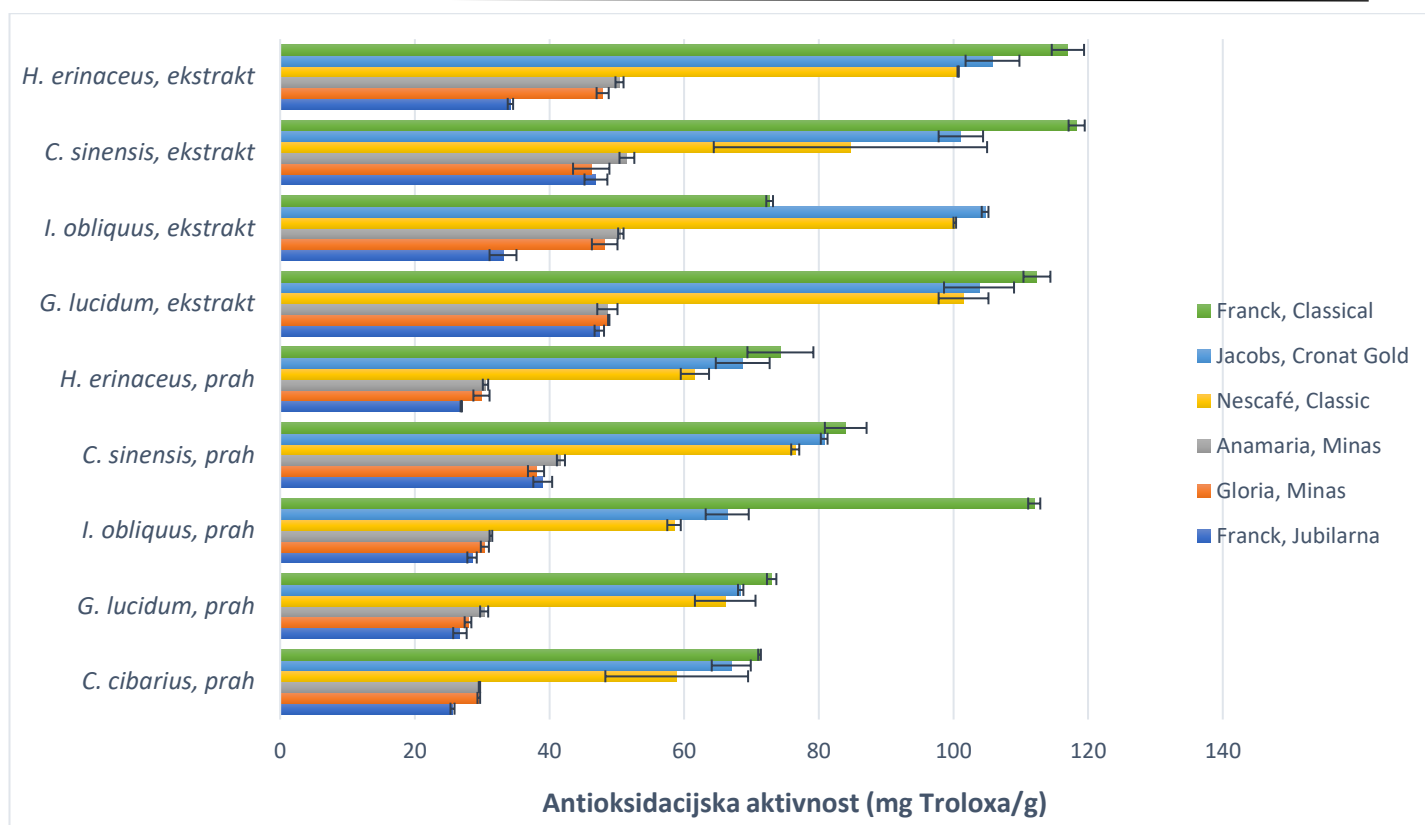
Slika 38 Srednje antioksidacijske aktivnosti (u mg Troloxa/g) u uzorcima kava, kava s gljivama i preparatima gljiva

Analogno utvrđenom za sadržaj ukupnih polifenola (**Slika 35**), najvišu antioksidacijsku aktivnost ima podskupina instant kava, a zatim slijede podskupine mješavina (**Slika 39**) u kojima antioksidacijskoj aktivnosti najviše doprinose polifenoli iz instant kava.



Slika 39 Antioksidacijska aktivnost (u mg Troloxa/g) podskupini uzoraka

Na **Slici 40** je vidljivo kako najvišu antioksidacijsku aktivnost ima Franck Classical instant kava s ekstraktom gljive *C. sinensis* (118,3 mg Troloxa/g), a najmanju Franck Jubilarna mljevena kava s prahom gljive *C. cibarius* (25,6 mg Troloxa/g).



Slika 40 Srednje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti (u mg Troloxa/g) u mješavinama kava i preparata gljiva

4.3. Korelacija ukupnih polifenola, antioksidacijske aktivnosti i teških metala

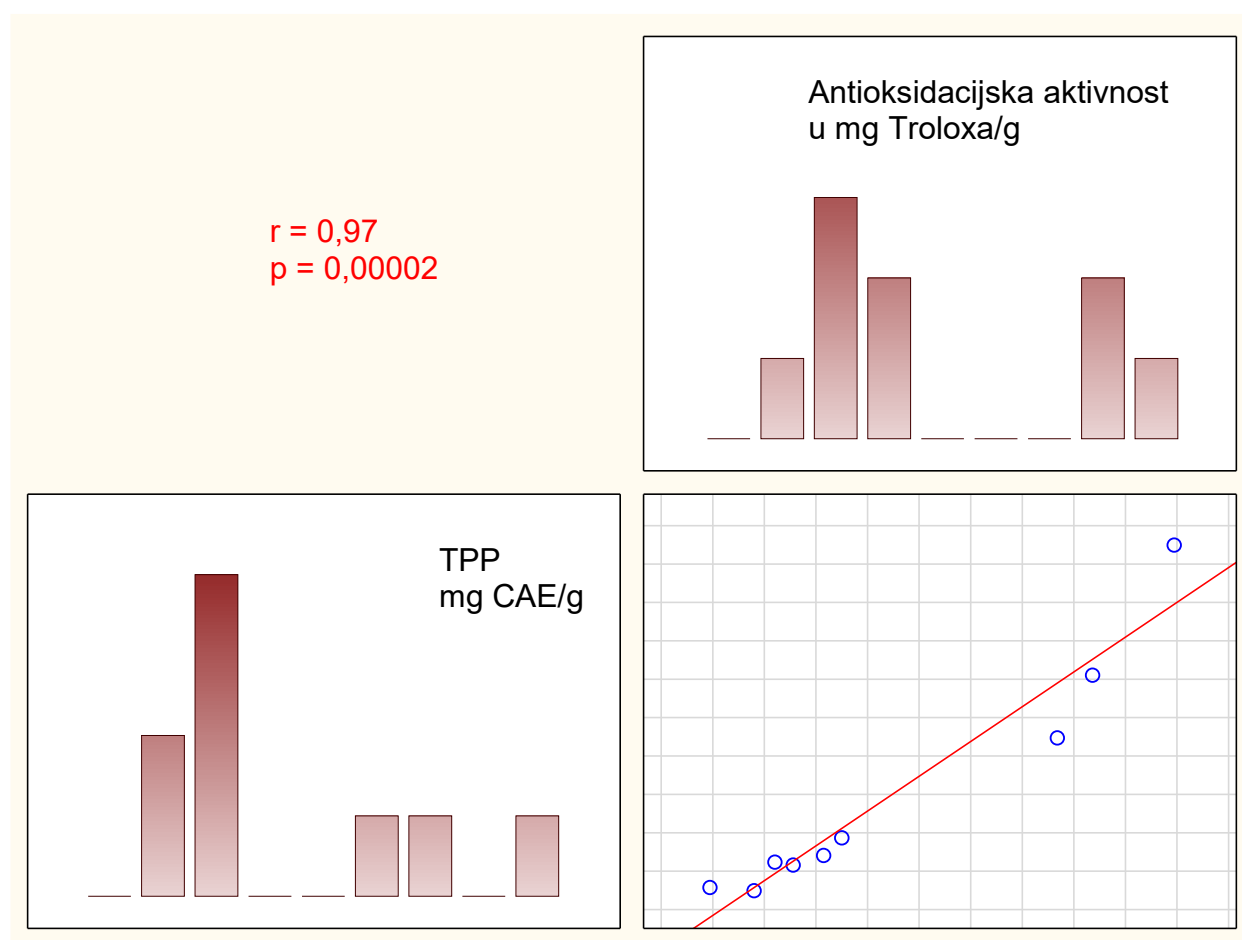
U radu je ispitana povezanost različitih varijabli, svih uzoraka i uzoraka unutar podskupina.

Korelacija koncentracije ukupnih polifenola (TPP) i antioksidacijske aktivnosti (izražene u miligramima Troloxa) u podskupini uzoraka u kojoj su mljevene kave, instant kave i kave s gljivama prikazana je na **Slici 41**. Utvrđeni korelacijski koeficijent ukazuje na snažan, statistički značajan, pozitivan odnos između ispitivanih varijabli. Očito su polifenoli glavni sastojci koji pridonose antioksidacijskoj aktivnosti kava.

Daniel i Workneh (2017) su proveli istraživanje na 5 kava različitih brandova iz Etiopije. Folin-Ciocalteu metodom su određivali ukupne polifenole s galnom kiselinom korištenom kao standard i antioksidacijsku aktivnost DPPH metodom uz još nekoliko provedenih analiza. Rezultati dobiveni u tom istraživanju potvrđuju kako ukupni polifenoli utječu na antioksidacijsku aktivnost te je potvrđena vrlo jaka pozitivna veza ($r = 0,928$) između sadržaja ukupnih polifenola i inhibicije DPPH radikala u vodenim ekstraktima odabranih kava.

Nije utvrđena statistički značajna povezanost između koncentracije teških metala (Pb, Cd, As) s antioksidacijskom aktivnošću ili koncentracijom ukupnih polifenola u ovoj podskupini. Slično su zaključili Alnsour i sur. (2022).

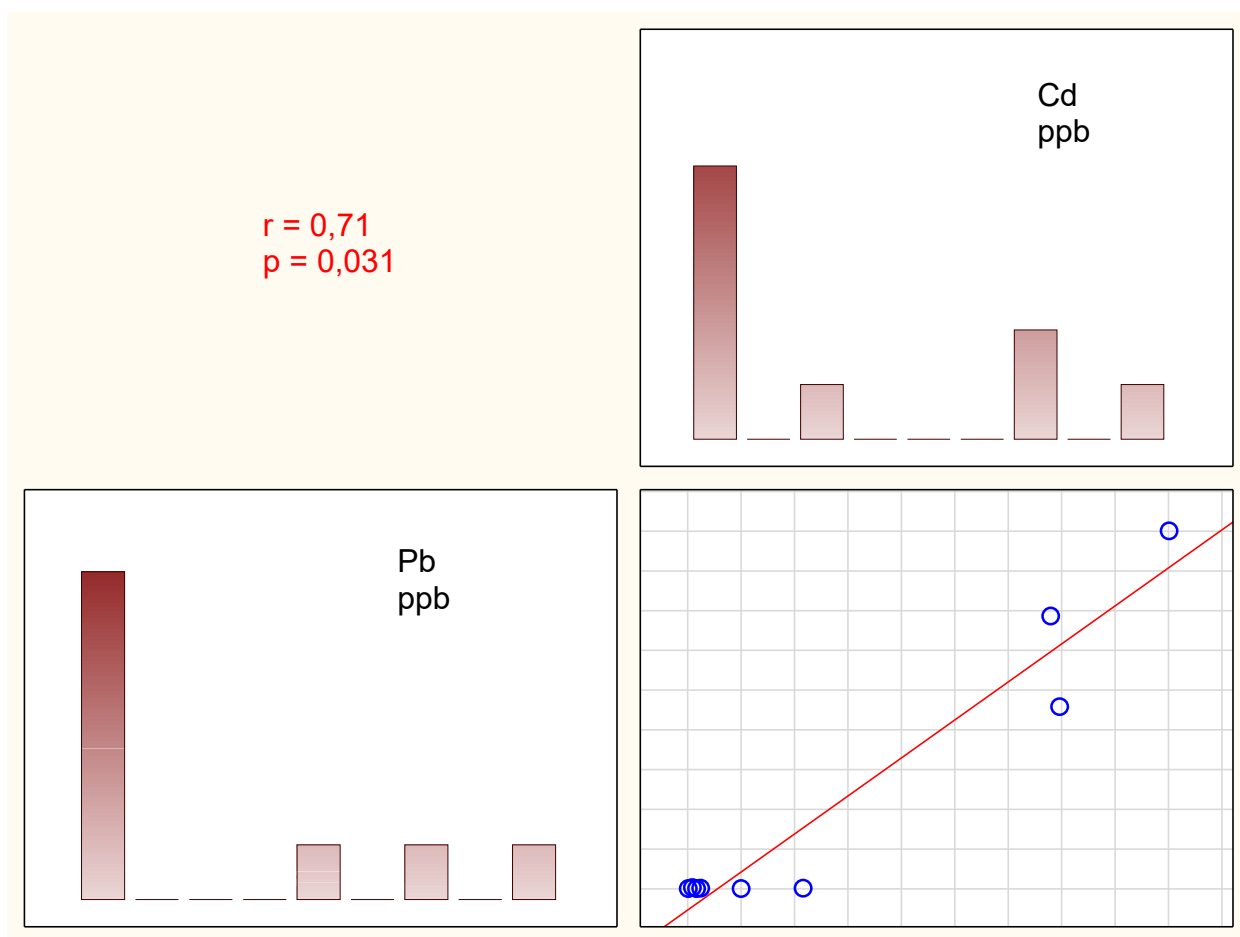
Ustanovljena je jaka negativna veza ($r = -0,60$; $p = 0,088$) između razina olova i kadmija, kao i olova i arsena ($r = -0,55$; $p = 0,125$) u podskupini kava, no korelacije nisu dosegle razinu statističke značajnosti. Slaba negativna korelacija je utvrđena i između koncentracija kadmija i arsena u kavama ($r = -0,18$; $p = 0,637$). Negativna veza možda ukazuje na kompetitivne mehanizme apsorpcije i nakupljanja ovih neesencijalnih teških metala u biljci kavi. Na primjer, Khan i sur. (2014) navode kako neesencijalne elemente poput arsena i kadmija biljke apsorbiraju i prenose između biljnih tkiva istim transporterima koji mobiliziraju hranjive tvari poput Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} ili PO_4^{2-} .



Slika 41 Korelacija ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti u podskupini kava

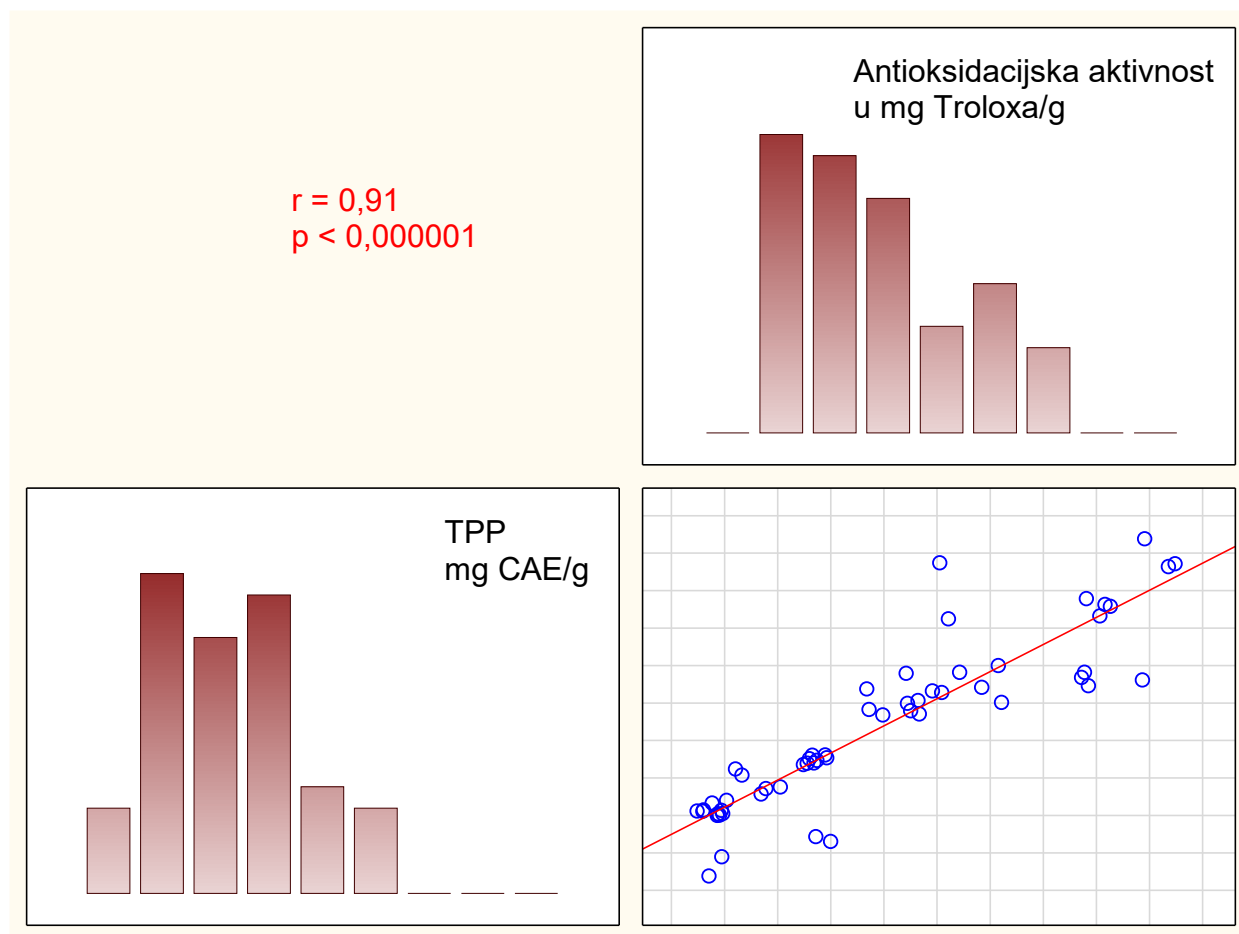
Korelacija koncentracije ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti (u mg Troloxa/g) ispitana je i u podskupini uzoraka koji uključuju prahove i ekstrakte gljiva. Uočena je jaka pozitivna veza ($r = 0,62$) koja nije dosegla statističku značajnost ($p = 0,077$). Očito, i pored znatno nižeg sadržaja polifenola u preparatima gljiva, polifenoli imaju primaran utjecaj na antioksidacijsku aktivnost.

Statistički značajne povezanosti nisu uočene između razina teških metala i antioksidacijske aktivnosti ili razina polifenola u podskupini preparata gljiva. Postoji jaka, statistički značajna korelacija između koncentracija olova i kadmija ($r = 0,71$; $p = 0,031$) (**Slika 42**), koja je možda pokazatelj sličnih načina akumulacije ovih metala u gljivama. S druge strane, razine arsena i olova nisu korelirane ($r = -0,12$; $p = 0,761$), dok su arsen i kadmij umjereno povezani ($r = 0,30$; $p = 0,433$), bez statističke značajnosti.



Slika 42 Korelacija kadmija i olova u podskupini preparata gljiva

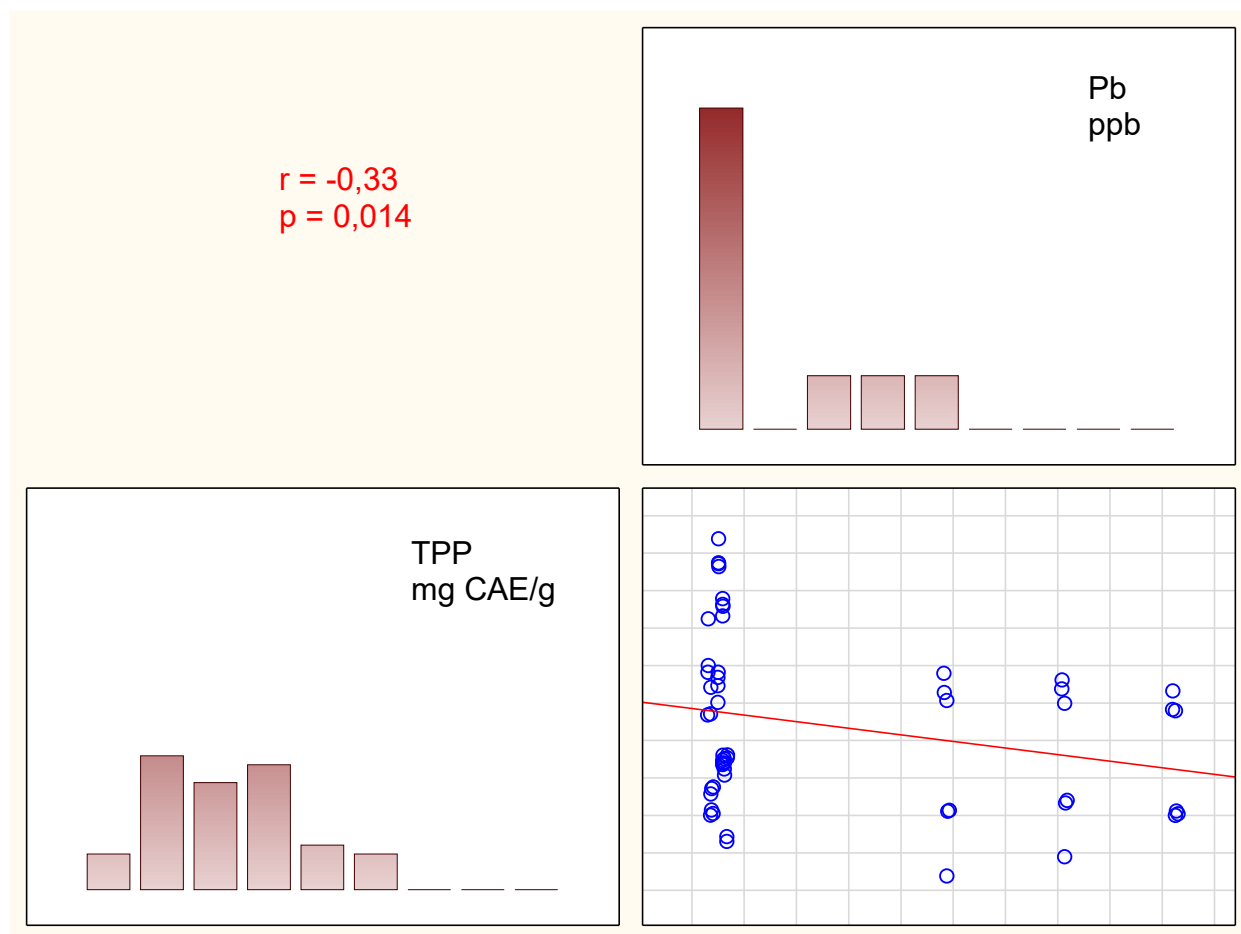
Slika 43 prikazuje korelaciju koncentracije ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti (u mg Troloxa/g) u podskupini mješavina. Slično rezultatima za podskupinu kava (**Slika 41**), utvrđena je jaka pozitivna veza ($r = 0,91$) s visokom statističkom značajnosti ($p < 0,000001$).



Slika 43 Korelacija antioksidacijske aktivnosti i ukupnih polifenola u podskupini mješavina

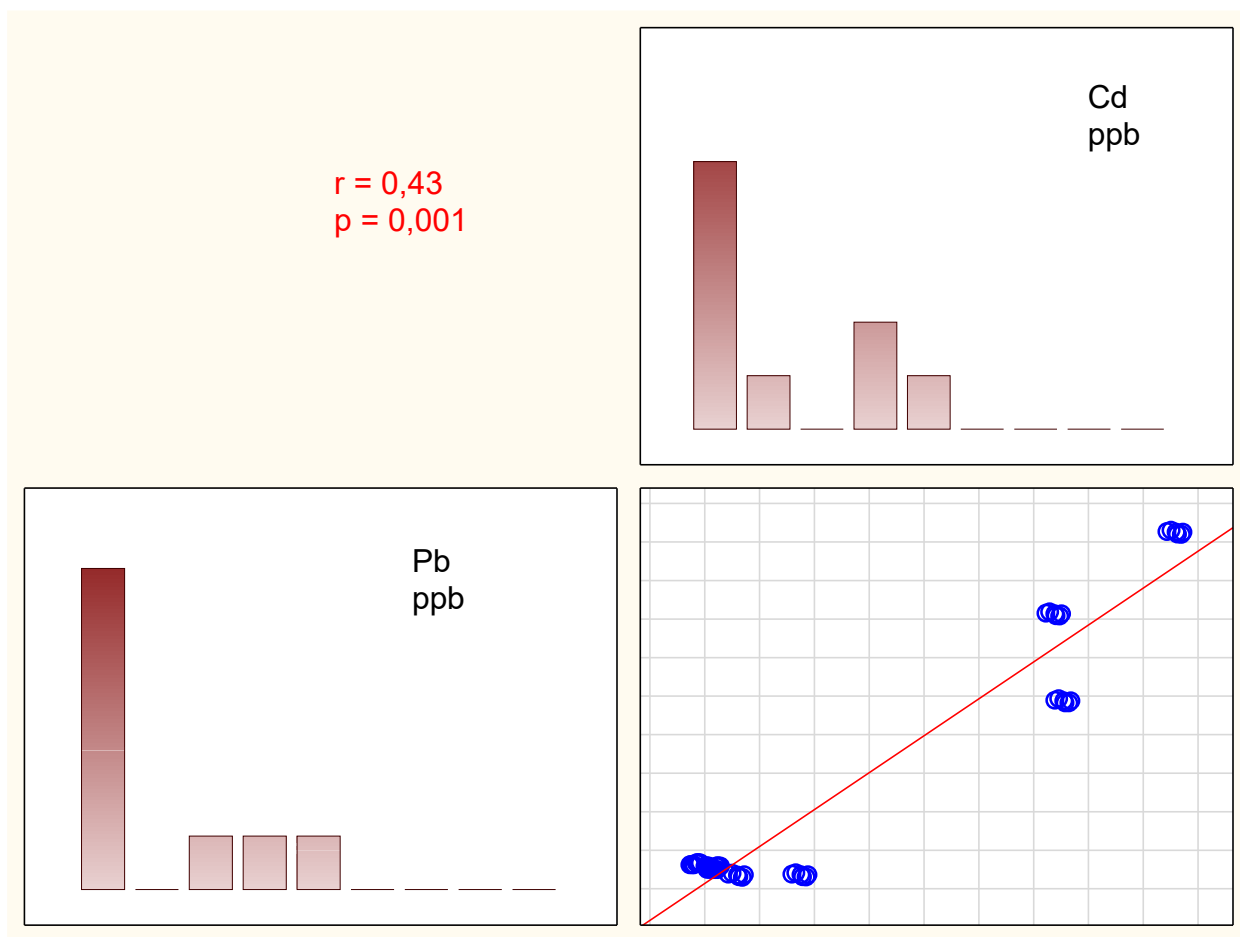
Nisu utvrđene statistički značajne povezanosti razina kadmija i arsena s antioksidacijskom aktivnošću ili razinama TPP-a u podskupini mješavina, za razliku od olova ($r = -0,33$; $p = 0,014$) (**Slika 44**). Budući da nije ustanovljena negativna veza koncentracija olova s koncentracijom ukupnih polifenola u kavama ili preparatima gljiva, nego tek u mješavinama, moguće je da visoke razine ovog elementa iz prahova gljiva na neki način ometaju samu metodu određivanja polifenola u kombiniranim uzorcima.

Harangozo i sur. (2014) proveli su ispitivanje na sjemenkama lana koje su kultivirali u stvarnim i idealnim uvjetima. U tri uzorka dodano je olovo u obliku topljive soli, a četvrti uzorak bio je čisti, kontrolni. Utvrdili su kako se povećanjem koncentracije olova u tlu smanjuje koncentracija ukupnih polifenola u sjemenkama lana. Razlike u koncentracijama polifenolnih spojeva između uzoraka sjemenki lana ipak nisu bile statistički značajne i nije utvrđena korelacija između ukupne koncentracije polifenola i koncentracije olova.



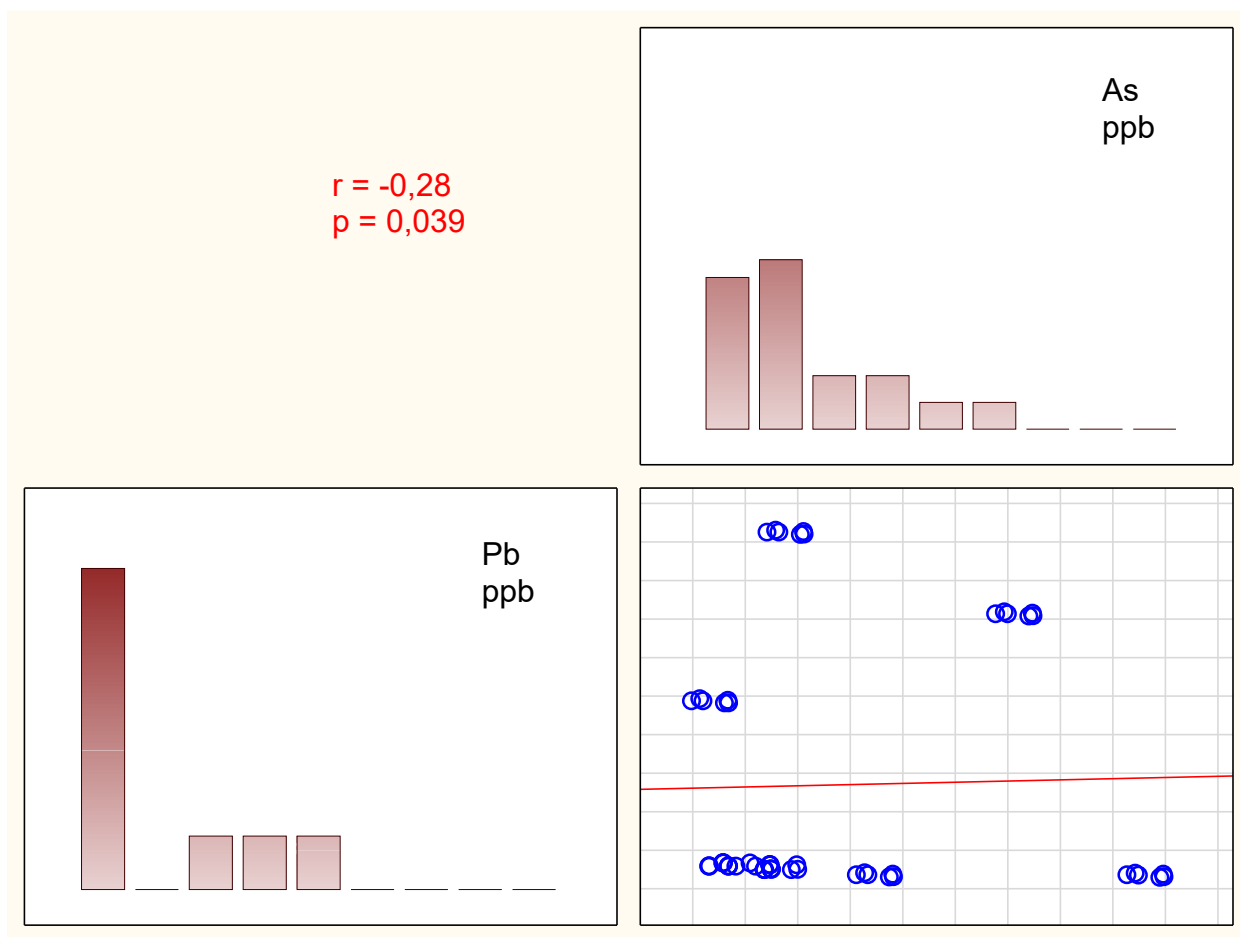
Slika 44 Korelacija olova i ukupnih polifenola u podskupini mješavina

Na **Slici 45** vidljivo je kako je korelacijski koeficijent između koncentracija olova i kadmija u podskupini mješavina pozitivan i statistički značajan ($r = 0,43$; $p = 0,001$). Moguće je da ovakav ishod proizlazi iz toga da olovo i kadmij često dijele slične izvore poput matičnih stijena i mineralnih izvora ili agrokemikalija, metalurgije, proizvodnje energije ili ispuštanja kanalizacije (Nkwunonwo i sur., 2020). Ukoliko su kava ili gljive rasle na području koje je kontaminirano, veća je vjerojatnost da će sadržavati slične razine kadmija i olova. Također, poljoprivredna praksa koja uključuje korištenje određenih gnojiva ili pesticidi koji su kontaminirani teškim metalima mogu povećavati koncentracije u finalnom proizvodu.



Slika 45 Korelacija kadmija i olova u podskupini mješavina

Utvrđena je negativna korelacija razina arsena i olova u mješavinama ($r = -0,28$; $p = 0,039$) (Slika 46), a slična korelacija pozitivnog predznaka je utvrđena za arsen i kadmij ($r = 0,23$; $p = 0,091$), ali bez statističke značajnosti. Ovi teški metali i njihovi spojevi imaju različita svojstva, među kojima je i sposobnost stvaranja kompleksnih spojeva s drugim tvarima. Zbog toga su moguće brojne interakcije u mješavini kava – preparat gljive koje mogu utjecati na rezultate. Složene interakcije između metala prilikom apsorpcije u kavu ili gljive su također zamislive, sukladno rezultatima istraživanja Pistona i sur. (2019) koji su primijetili pozitivnu korelaciju između koncentracija arsena i kadmija u sjemenkama soje.



Slika 46 Korelacija olova i arsena u podskupini mješavina

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Nisu utvrđene velike razlike između različitih podskupina kava (pržene mljevene, instant, komercijalne kave s ekstraktima gljiva) u prosječnim koncentracijama olova (do 42,5 ng/g), kadmija (do 9,2 ng/g) i arsena (do 147,0 ng/g).
2. Prahovi gljiva općenito sadrže znatno više srednje koncentracije teških metala (428,0 ng/g olova, 58,4 ng/g kadmija, 335,8 ng/g arsena) u odnosu na kave (4,0 – 39,6 ng/g olova, 6,3 – 7,5 ng/g kadmija, 89 – 131,7 ng/g arsena) i ekstrakte gljiva (1,4 ng/g olova, 1,5 ng/g kadmija, 43,9 ng/g arsena). Očito se prilikom proizvodnje ekstrakta uklanja najveći dio prisutnih teških metala. Utvrđena je i velika varijabilnost u koncentracijama za sva tri teška metala u prahovima, što ovisi o vrsti gljive, načinu uzgoja, metodama sušenja i sl.
3. Koncentracije teških metala u mješavinama kava i preparata gljiva ovise o sastavnicama te su prosječno više u mješavinama koje uključuju prahove gljiva u odnosu na mješavine s ekstraktima (232,2 prema 30,7 ng/g olova, 32,6 prema 5,9 ng/g kadmija, 217,4 prema 89,8 ng/g arsena).
4. Procjenom unosa teških metala konzumacijom tri šalice mješavina kava s dodatkom preparata gljiva utvrđeno je da to ponekad može rezultirati dnevnim unosom olova koji čine 40 % referentne doze (BMDL), kao mjere praga štetnog djelovanja toksikanta, za osobu tjelesne mase od 70 kg. U slučaju kadmija je najveći unos procijenjen na 8 % tolerirane tjedne vrijednosti (TWI), dok je najveći dnevni unos arsena gotovo dvostruko veći (180 %) od BMDL vrijednosti za anorganski arsen za osobu tjelesne mase od 70 kg.
5. Prilikom izbora preparata gljive koji će se koristiti kao dodatak u kave treba obratiti pažnju na podrijetlo iste. Najbolji primjer je divlja gljiva *Cantharellus cibarius* koja je imala najveće vrijednosti za olovo (941,6 ng/g) i kadmij (101,6 ng/g). Bitno je prilikom uzgoja gljive osigurati uvjete u kojima neće doći do nakupljanja teških metala do razina koje mogu predstavljati rizik za zdravlje.
6. Koncentracije ukupnih polifenola variraju među različitim podskupinama kava, pri čemu instant kave imaju znatno višu srednju koncentraciju (115,3 mg CAE/g) u odnosu na pržene mljevene kave (45,4 mg CAE/g) i komercijalne kave s gljivama (37,5 mg CAE/g). Koncentracije ukupnih polifenola u preparatima gljiva su niske te nema značajne razlike između prahova i ekstrakata (6,2 prema 7,4 mg CAE/g). Mješavine kava s preparatima gljiva s najvećom koncentracijom ukupnih polifenola su one koje uključuju instant kave i ekstrakte.
7. Najveću antioksidacijsku aktivnost imala je podskupina instant kava (147,1 mg Troloxa/g), dok pržene mljevene i komercijalne kave s gljivama imaju otprilike triput niže vrijednosti (57,2 i 45,1 mg Troloxa/g). Antioksidacijska aktivnost preparata gljiva je slaba tj. prosječno 4,2 mg Troloxa/g za

prahove i 2,5 mg Troloxa/g za ekstrakte. Mješavine koje uključuju instant kave su imale najveće srednje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti.

8. Obzirom na visok sadržaj teških metala u prahovima gljiva, osjetljive populacijske skupine (trudnice, dojilje, bolesne osobe itd.) bi trebale ograničiti unos prahova gljiva i eventualno koristiti ekstrakte. Prema sadržaju ukupnih polifenola i antioksidacijskoj aktivnosti, instant kave i odgovarajuće kombinacije s gljivama bi mogle imati snažniji pozitivan učinak na zdravlje.

6. LITERATURA

- Abdelshafy AM, Belwal T, Liang Z, Wang L, Li D, Luo Z, Li L: A Comprehensive Review on Phenolic Compounds from Edible Mushrooms: Occurrence, Biological Activity, Application and Future Prospective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 62:6204–6224, 2022.
- Afliana I: Characteristics and Potential of Liberica Coffee. U *The Brewing Process: Extraction of Aroma and Flavor Compounds by Hot Water*, str. 45-55. Springer, 2018.
- Ahmad I, Surya Pertiwi A, Heryani Kembaren Y, Rahman A, Mun'im A: Application of Natural Deep Eutectic Solvent-Based Ultrasonic Assisted Extraction of Total Polyphenolic and Caffeine Content from Coffea Beans (*Coffea Beans L.*) For Instant Food Products. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 8:138-143, 2018.
- Alnsour L, Issa R, Awwad S, Albals D, Al-Momani I: Quantification of Total Phenols and Antioxidants in Coffee Samples of Different Origins and Evaluation of the Effect of Degree of Roasting on Their Levels. *Molecules* 27:1591, 2022.
- Anjulo TK, Mersso BT: Assessment of dairy feeds for heavy metals. *American Academic Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences* 11:20-31, 2015.
- Apfel SC, Kessler JA: Neurotrophic factors in the treatment of peripheral neuropathy. U *Ciba Foundation Symposium 196 - Growth Factors as Drugs for Neurological and Sensory Disorders*, str. 98-108, Ciba Foundation, 1996.
- Arts IC, Hollman PC: Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 81:317–S325, 2005.
- Ashraf SA, Elkhailifa AEO, Siddiqui AJ, Patel M, Awadelkareem AM, Snoussi M, Ashraf MS, Adnan M, Hadi S: Cordycepin for Health and Wellbeing: A Potent Bioactive Metabolite of an Entomopathogenic Medicinal Fungus *Cordyceps* with Its Nutraceutical and Therapeutic Potential. *Molecules* 25:2735, 2020.
- Beatty RD, Kerber JD: *Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry*. The Perking-Elmer Corporation, 1993.
- Benvenuti S, Pellati F, Melegari M, Bertelli D: Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *Journal of Food Science* 69:FCT164–FCT169, 2004.
- Berend S, Grabarić Z: Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 59:205-212, 2008.
- Bermudez S, Voora V, Larrea C: *Coffee prices and sustainability*. International Coffee Organization, 2022. <https://www.iisd.org/system/files/2022-09/2022-global-market-report-coffee.pdf>
- Bhambri A, Srivastava M, Mahale VG, Mahale S, Karn SK: Mushrooms as Potential Sources of Active Metabolites and Medicines. *Microbiotechnology* 13:837266, 2022.
- Bing J, Shen JW, Yu HY, Ruan Y, Wu TT, Zhao XU: Hericenones and erinacines: stimulators of nerve growth factor (NGF) Biosyntheses in *Hericium erinaceus*. *Mycology* 1:92-98, 2010.
- Bolka M, Emire S: Effects of coffee roasting technologies on cup quality and bioactive compounds of specialty coffee beans. *Food, Science & Nutrition* 8:6120-6131, 2020.
- Bradl H: Sources and Origins of Heavy Metals. U *Heavy Metals in the Environment: Origin, Interaction and Remediation*, str. 1-20, Academic Press, 2002.

- Breene WM: Nutritional and Medicinal Value of Specialty Mushrooms. *Journal of Food Protection* 53:883-894, 1990.
- Briffa J, Sinagra E, Blundell R: Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon* 6:e04691, 2020.
- Campos JA, Tejera NA, Sánchez CJ: Substrate role in the accumulation of heavy metals in sporocarps of wild fungi. *Biometals* 22:835-841, 2009.
- Chakraverty A, Mujumdar AS, Raghavan GSV, Ramsawamy HS: A Perspective on Processing and Products. U *Handbook of Postharvest Technology: Cereals, Fruits, Vegetables, Tea and Spices*, str. 675-678, Marcel Dekker, 2003.
- Charumathy M, Sudha G, Packialakshmi B: Antioxidant activity and bioactive constituents in the fruiting bodies of *Hericum erinaceus* Pers, an edible mushroom. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 8:152-156, 2016.
- Chiocchetti GM, Latorre T, Clemente MJ, Jadán-Piedra C, Devesa V, Vélez D. Toxic trace elements in dried mushrooms: Effects of cooking and gastrointestinal digestion on food safety. *Food Chemistry* 306:125478, 2020.
- Clark I, Landolt HP: Coffee, caffeine, and sleep: A systematic review of epidemiological studies and randomized controlled trials. *Sleep Medicine Reviews* 31:70-78, 2017.
- Da Costa ACA, Leite SGC: Metal biosorption by sodium alginate immobilized *Chlorella* hemisphere. *Biotechnology Letters* 13:559-562, 1991.
- D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scaccocchio B, Masella R: Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences* 11:1321-1342, 2010.
- Da Costa SSL, Lima Pereira AC, Andrade Passos E, Alves JH: Multivariate optimization of an analytical method for the analysis of dog and cat foods by ICP OES. *Talanta* 108:157-164, 2013.
- Daniel A, Workneh M. Determination of total phenolic content and antioxidant activities of five different brands of Ethiopian coffee. *International Journal of Food and Nutrition Research* 1:1-5, 2017.
- Deepak B: *Benefits of Microwave Digestion over Open Acid Digestions*. Lab-training, 2014. <https://lab-training.com/benefits-of-microwave-digestion-over-open-acid-digestions/> [27.7.2023].
- De Melo Pereira GV, De Carvalho Neto DP, Junior AIM, Do Prado FG, Pagnocelli MGB, Karp SG, Soccol CR: Chemical composition and health properties of coffee and coffee-by-products. *Advances in Food and Nutrition Research* 91:65-95, 2020.
- Ding M, Bhupathiraju SN, Chen M, Van Dam RM, Hu FB: Caffeinated and decaffeinated coffee consumption and risk of type 2 diabetes: a systematic review and a dose-response meta-analysis. *Diabetes Care* 37:569-586, 2014.

- Dixit R, Wasiullah MD, Pandiyan K, Singh UB, Sahu A, Shukla R, Singh BP, Rai JP, Sharma PK, Lade H, Paul D: Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability* 7:2189–2212, 2015.
- Długaszek M, Połec J, Mularczyk-Oliwa M: The content of chosen elements in coffee infusions depending on the method of their preparation. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* 43:493–497, 2010.
- Dowlati M, Sobhi HR, Esrafil A, Farzad K M, Yehaneh M: Heavy metals content in edible mushrooms: a systematic review, meta-analysis and health risk assessment. *Trends in Food Science & Technology* 109:527-535, 2021.
- Drewnowska M, Hanć A, Barańkiewicz D, Falandysz J: Pickling of chantarelle *Chantarellus cibarius* mushrooms highly reduce cadmium contamination. *Environmental Science and Pollution Research* 24:21733-21738, 2017.
- EFSA, European Food Safety Authority: Cadmium in food – Scientific opinion of the Panel on Contaminants in Food Chain. *EFSA Journal* 7:980, 2009.
- EFSA, European Food Safety Authority: Guidance on selected default values to be used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the absence of actual measured data. *EFSA Journal* 10:2579, 2012.
- EFSA, European Food Safety Authority: Scientific Opinion on Lead in Food. *EFSA Journal* 8:1570, 2010.
- EFSA, European Food Safety Authority: Scientific opinion on arsenic in food. *EFSA Journal* 7:1351, 2009.
- EFSA, European Food Safety Authority: Update of the risk assessment of inorganic arsenic in food. *EFSA Journal* 22:e8488, 2024.
- Elkhateeb WA, Daba GM, Thomas PW, Wen T: Medicinal mushrooms as a new source of natural therapeutic bioactive compounds. *Egyptian Pharmaceutical Journal* 18:88-101, 2019.
- Europska komisija: *Uredba komisije (EU) 2023/915 od 25. travnja 2023. o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani i o stavljanju izvan snage Uredbe (EZ) br. 1881/2006*. OJ L 119, 2023.
- Farah A, de Paula Lima J: Consumption of Chlorogenic Acids through Coffee and Health Implications. *Beverages* 5:11, 2019.
- Farah A: Chlorogenic Acids. *U Coffee Production, Quality and Chemistry*, str. 565-583. Royal Society of Chemistry, 2019.
- Farrukh MA: Atomic Absorption Spectroscopy with graphite furnace. *U Atomic Absorption Spectroscopy*, str. 9-11, IntechOpen, 2012.
- Flament I: Trigonelline and derivatives. *U Coffee Flavor Chemistry*, str. 627-640, John Wiley & Sons, 2001.
- Fulda S: Betulinic Acid for Cancer Treatment and Prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 9:1096-1107, 2008.

- Gadd GM: Geomycology: Biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research* 111:3–49, 2007.
- Gałgowska M, Pietrzak-Fiećko R: Cadmium and Lead Content in Selected Fungi from Poland and Their Edible Safety Assessment. *Molecules* 26:7289, 2021.
- Guadalupe GA, Chavez SG, Arellanos E, Doménech E: Probabilistic Risk Characterization of Heavy Metals in Peruvian Coffee: Implications of Variety, Region and Processing. *Foods* 12:3254, 2023.
- Gargano ML, van Griensven LJLD, Isikhuemhen OS, Venturella G, Wasser SP, Zervakis GI: Medicinal mushrooms: Valuable biological resources of high exploitation potential. *Plant Biosystems* 151:548-565, 2017.
- George SE, Ramalakshmi K, Rao LJMA: A Perception on Health Benefits of Coffee. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48:464–486, 2008.
- Gonzalez AG, Herrador MA: A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends in Analytical Chemistry* 26:227–238, 2007.
- Goyal A. Antioxidant Activity by DPPH Radical Scavenging Method of *Ageratum conyzoides* Linn. Leaves. *American Journal of Ethnomedicine* 4:244-249, 2014.
- Gobbi L, Maddaloni L, Prencipe SA, Vinci G: Bioactive Compounds in Different Coffee Beverages for Quality and Sustainability Assessment. *Beverages* 9:1-18, 2023.
- Grosso G, Micek A, Godos J: Coffee consumption and risk of all-cause, cardiovascular, and cancer mortality in smokers and non-smokers: a dose-response meta-analysis. *European Journal of Epidemiology* 31:1191-1205, 2016.
- Guillamón S, García-Lafuente A, Lozano M, Rostagno MA, Villares A, Martínez JA: Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia* 81:715–723, 2010.
- Harangozo L, Timorackà M, Arvay J, Bajčan D, Tomáš J, Trebichalsky P, Zupka S: The influence of lead on the content of polyphenols in seed of flax under model conditions. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 3:215-217, 2014.
- Häyrynen P, Landaburu-Aguirre J, Pongrácz E, Keiski RL: Study of permeate flux in micellar-enhanced ultrafiltration on a semi-pilot scale: Simultaneous removal of heavy metals from phosphorous rich real wastewaters. *Separation and Purification Technology* 93:59-66, 2012.
- He Z, Shentu J, Yang X, Baligar VC, Zhang T, Stoffella PJ: Heavy metal contamination of soils: sources, indicators and assessment. *Journal of Environmental Indicators* 9:17-18, 2015.
- Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O, Kondo K: Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 47:357-362, 2001.
- Husejnović MŠ, Kozarević CE, Dautović E, Ibišević M: Preparation of samples for the determination of heavy metals in medical plants. U *Proceedings of the Pharmacy Symposium Tuzla Canton*, str. 45-52, 2016.

- Hussain M, Farooq M, Nawaz A, Al-Sadi AM, Solaiman ZM, Alghamdi SS, Ammara U, Ok YS, Siddique KHM: Biochar for crop production: potential benefits and risks. *Journal of Soils and Sediment*. 17:685-716, 2017.
- Ijaz N, Sardar M, Sana Mehak H: Coffee: All You Need to Know. *Frontiers in Chemical Sciences* 2:1-17, 2021.
- Iwatsuki K, Akihisa T, Tokuda H, Ukiya M, Oshikubo M, Kimura Y, Asano T, Nomura A, Nishino H: Lucidenic acids P and Q, methyl lucidenate P, and other triterpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum* and their inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation. *Journal of Natural Products* 66:1582-1585, 2003.
- Kahlos K: *Inonotus obliquus* (Chaga Fungus): In Vitro Culture and the Production of Inotodiol, Sterols and Other Secondary Metabolites. U *Medicinal and Aromatic Plants VI*, str. 179-198, Springer, 1994.
- Khan MA, Guerrero NC, Mendoza-Cozatl D: Moving toward a precise nutrition: preferential loading of seeds with essential nutrients over non-essential toxic elements. *Frontiers in Plant Science* 5:51, 2014.
- Khoshnoudi-Nia S, Sharif N, Jafari SM: Loading of Phenolic Compounds into Electrospun Nanofibers and Electrospayed Nanoparticles. *Trends in Food Science & Technology* 95:59-74, 2020.
- Kim J-J, Kim Y-S, Kumar V: Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 54:226-231, 2019.
- Klapec T, Šarkanj B, Marček T: *Opasnosti vezane uz hranu*. Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek, 2022.
- Kour H, Kour D, Kour S, Singh S, Jawad Hashmi AS, Yadav AN, Kumar K, Sharma YP, Singh Ahluwalia A: Bioactive compounds from mushrooms: An emerging bioresources of food and nutraceuticals. *Food Bioscience* 50:102124, 2022.
- Kozarski M, Klaus A, Niksic M, Jakovljevic D, Helsper JP, Van Griensven LJ: Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chemistry* 129:1667–1675, 2011.
- Kruk J, Aboul-Enein BH, Duchnik E, Marchlewicz M: Antioxidative properties of phenolic compounds and their effect on oxidative stress induced by severe physical exercise. *Journal of Physiological Sciences* 72:19, 2022.
- Kyriakou S, Michailidou K, Amery T, Stewart K, Winyard PG, Trafalis DT, Franco R, Pappa A, Panayiotidis MI: Polyphenolics, glucosinolates and isothiocyanates profiling of aerial parts of *Nasturtium officinale* (Watercress). *Frontiers in Plant Science* 13:998755, 2022.
- LaRue RM, Tyson JF: Calibration of the drying and pyrolysis temperatures for graphite furnace atomic absorption spectrometry by direct observation of the melting of compounds. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 48:1307-1311, 1993.
- Lee S-B, Kim Y-S, Lee Y-H, Ahn B-J, Kim N-S, Lee B-K, Shin HS: Validation of ICP-MS method for trace level analysis of Pb in plasma. *Analytical Science and Technology* 28-309-316, 2015.

- Li IC, Lee LY, Tzeng TT, Chen WP, Chen YP, Shiao YJ, Chen CC: Neurohealth Properties of *Hericium erinaceus* Mycelia Enriched with Erinacines. *Behavioural Neurology* 2018:5802634, 2018.
- Lin B-Q, Li S-P: Cordyceps as an Herbal Drug. U *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*, str. 73-106, CRC Press, 2011.
- Liu QP, Wu YF, Cheng H-Y, Xia T, Ding H, Wang H, Wang Z-M, Xu Y: Habitual coffee consumption and risk of cognitive decline/dementia: A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Nutrition* 32:628–636, 2016.
- Lu Y, Song S, Wang R, Liu Z, Meng J, Sweetman AJ, Jenkins A, Ferrier RC, Li H, Luo W, Wang T: Impacts of soil and water pollution on food safety and health risks in China. *Environmental International* 77:5-15, 2015.
- Łysakowska P, Sobota A, Wirkijowska A: Medicinal Mushrooms: Their Bioactive Components, Nutritional Value and Application in Functional Food Production-A Review. *Molecules* 28:5393, 2023.
- Madjar RM, Mot A, Vasile Saeteanu G, Mihalache M: Methods used for heavy metal determination in agricultural inputs. *Research Journal of Agricultural Science* 52:148-158, 2020.
- Martins N, Morales P, Barros L, Ferreira ICFR: The increasing demand for functional foods. U *Wild Plants, Mushrooms and Nuts: Functional Food Properties and Applications*, str. 1-13, John Wiley & Sons, 2016.
- Massoud R, Mirmohammadmakki F, Mohammad Makki SFM: Evaluation of heavy metals in Roasted Coffee powder in Iran and Turkey. *Coffee Science* 17:e172013, 2022.
- Meglar MJ, Alonso J, García MA: Cadmium accumulation in wild edible mushrooms from NW Spain and their potential risk for human health. *Food and Chemical Toxicology* 88:13-20, 2016.
- Milyuhina AK, Zabodalova LA, Kyzdarbek U, Romazyeva IR: Assessment of antimicrobial and antioxidant components of *Innonotus obliquus* extract as a food ingredient. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science* 689:012025, 2021.
- Mleczek M, Niedzielski P, Siwulski M, Rzymiski P, Gąsecka M, Goliński P, Kozak L, Kozubik T: Importance of low substrate arsenic content in mushroom cultivation and safety of final food product. *European Food Research and Technology* 242:355-362, 2016.
- Molyneux P: The use of the stable radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology* 26:211-219, 2004.
- MPŠVG, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva: *Pravilnik o kavi, kavovinama te proizvodima od kave i kavovina*. Narodne novine 172/2004.
- Nawrocka A, Durkalec M, Michalski M, Posyniak A: Simple and reliable determination of total arsenic and its species in seafood by ICP-MS and HPLC-ICP-MS. *Food Chemistry* 379:132045, 2022.
- Nędzarek A, Tórz A, Karakiewicz B, Clark JS, Laszczyńska M, Kaleta A, Adler G: Concentrations of heavy metals (Mn, Co, Ni, Cr, Ag, Pb) in coffee. *Acta Biochimica Polonica* 60:623-627, 2013.

- Nevin R: Trends in preschool lead exposure, mental retardation, and scholastic achievement: Association or causation? *Environmental Research* 109:301-310, 2009.
- Nguyen TMN, Le HS, Le BV, Kim YH, Hwang I: Anti-allergic effect of inotodiol, a lanostane triterpenoid from Chaga mushroom, via selective inhibition of mast cell function. *International Immunopharmacology* 81:106244, 2020.
- Nielsen, Božana L: *Kava i mješavine kave: Najveći rast bilježi instant kava, cappuccino i mješavine 2u1 i 3u1*. Progressive, 2020. <https://progressive.com.hr/?p=8392> [30.7.2023].
- Nkwunonwo UC, Odika PO, Onyia NI: A review of the health implications of heavy metals in food Chain in Nigeria. *Scientific World Journal* 2020:6594109, 2020.
- Oladoye PO: Natural, low-cost adsorbents for toxic Pb (II) ion sequestration from (waste)water: A state-of-the-art review. *Chemosphere* 287:132130, 2022.
- Olechno E, Puścion-Jakubik A, Markiewicz-Żukowska R, Socha K: Impact of Brewing Methods on Total Phenolic Content (TPC) in Various Types of Coffee. *Molecules* 25:5274, 2020.
- Orywal K, Socha K, Nowakowski P, Zoń W, Kaczyński P, Mroczko B, Łozowicka B, Perkowski M: Health risk assessment of exposure to toxic elements resulting from consumption of dried wild-grown mushrooms available for sale. *PLoS ONE* 16:e0252834, 2021.
- Palacios I, Lozano M, Moro C, D'Arrigo M, Rostagno MA, Martínez JA, García-Laufente A, Guillamón E, Villares A: Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry* 128:674-678, 2011.
- Pandey KB, Rizvi SI: Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2:270-278, 2009.
- Petruzzello M: *Coffea*. Britannica, 2021. <https://www.britannica.com/plant/coffea> [10.8.2023].
- Pigozzi MT, Passos FR, Mendes FQ: Quality of Commercial Coffees: Heavy Metal and Ash Contents. *Journal of Food Quality* 2018:5908463, 2018.
- Pistón M, Vierea I, Machado I, Torre MH: Determination of As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb and Zn in Soybean Seeds and their Correlation with Relevant Biochemical Parameters to assess Food Quality. *Brazilian Journal of Analytical Chemistry* 5:26-34, 2019.
- Pohl P, Welna M, Szymczycha-Madeja A, Greda K, Jamroz P, Dzimitrowicz A: Response Surface Methodology Assisted Development of a Simplified Sample Preparation Procedure for the Multielement (Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Sr and Zn) Analysis of Different Coffee Brews by Means of Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. *Talanta* 241:123215, 2022.
- Popelka P, Várady M, Hrušková T: Effect of preparation method and roasting temperature on total polyphenol content in coffee beverages. *Czech Journal of Food Sciences* 38:417-421, 2020.
- Pregiban K: Metode mjerenja antioksidativne aktivnosti. *Završni rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2024.

- Prugarová A, Kováč M: Lead and cadmium content in cocoa beans (short communication). *Nahrung* 31:635-644, 1987.
- Režić Mužinić N, Veršić Bratinčević M, Grubić M, Frleta Matas R, Čagalj M, Visković T, Popović M: Golden Chanterelle or a Gold Mine? Metabolites from Aqueous Extracts of Golden Chanterelle (*Cantharellus cibarius*) and Their Antioxidant and Cytotoxic Activities. *Molecules* 28:2110, 2023.
- Ruan W, Popovich DG: *Ganoderma lucidum* triterpenoid extract induces apoptosis in human colon carcinoma cells (Caco-2). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 14:203-209, 2012.
- Song HN: Functional Cordyceps Coffee Containing Cordycepin and β -Glucan. *Preventive Nutrition and Food Science* 25:184-193, 2020.
- Sharma P, Dubey RS: Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17:35-52, 2005.
- Sheikha AE: Nutritional Profile and Health Benefits of *Ganoderma lucidum* “Lingzhi, Reishi, or Mannentake” as Functional Foods: Current Scenario and Future Perspectives. *Foods* 11:1030, 2022.
- Shimadzu: *Graphite Tubes*. Shimadzu, 2023. <https://www.shimadzu.hr/products/elemental-analysis/atomic-absorption-spectroscopy-consumables/graphite-tubes/index.html> [10.11.2023].
- Singh N, Kumar D, Sahu A: Arsenic in the environment: effects on human health and possible prevention. *Journal of Environmental Biology* 28:359–365, 2007.
- Singh S, Zacharias M, Kalpana S, Mishra S: Heavy metals accumulation and distribution pattern in different vegetable crops. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology* 4:170-177, 2012.
- Siwulski M, Rzymiski P, Budka A: The effect of different substrates on the growth of six cultivated mushroom species and composition of macro and trace elements in their fruiting bodies. *European Food Research and Technology* 245:419-431, 2019.
- Širić I, Kumar P, Eid E.M, Bachheti A, Kos I, Badeković D, Mioč B, Humar M: Occurrence and Health Risk Assessment of Cadmium Accumulation in Three Tricholoma Mushroom Species Collected from Wild Habitats of Central and Coastal Croatia. *Journal of Fungi* 8:685, 2022.
- Škorić I: *Molekulska spektroskopija*. Nastavni tekst, Zavod za organsku kemiju, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, 2016.
- Spiller MA: The Chemical Components of Coffee. U *Coffee*, str. 97-161. CRC Press, Boca Raton, 1998.
- Stratil P, Klejdus B, Kubán V: Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables – Evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:607-616, 2006.
- Suwannarach N, Kumla J, Zhao Y, Kakumyan P: Impact of Cultivation Substrate and Microbial Community on Improving Mushroom Productivity: A Review. *Biology (Basel)* 11:569, 2022.
- Taylor CS, Goyal A: Antioxidant activity by DPPH radical scavenging method of *Ageratum conyzoides* Linn. leaves. *American Journal of Ethnomedicine* 1:244-249, 2017.

- Thermo Fisher Scientific: *Full Method - Pb in Whole Blood using Omega Platform Cuvettes*. Thermo Fisher Scientific, 2008.
- Thu ZM, Myo KK, Aung HT, Clericuzio M, Armijos C, Vidari G: Bioactive Phytochemical Constituents of Wild Edible Mushrooms from Southeast Asia. *Molecules* 25:1972, 2020.
- Tomljanović M: Grafitna kiveta, atomski rezervoar, tehnika lađice. U *Instrumentalne kemijske metode*, str. 87-89. Studio Flaš, Zenica, 2000.
- Vu AT: Determination of trace Cadmium in water and fish species from estuaries in Tien Hai, Thai Binh: Vietnam By GF-AAS. *Indian Journal of Science and Technology* 13:1300-1309, 2020.
- Wang Z, Zhou X, Shu Z, Zheng Yi, Hu Xilei, Zhang P, Huang H, Sheng L, Zhang P, Wang Q, Wang X, Li N: Regulation strategy, bioactivity, and physical property of plant and microbial polysaccharides based on molecular weight. *International Journal of Biological Macromolecules* 244:125360, 2023.
- Wani AL, Ara A, Usmani JA: Lead toxicity: a review. *Interdisciplinary Toxicology* 8:55-64, 2015.
- Wasser SP: Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89:1323-1332, 2011.
- Waterhouse AL: Determination of Total Phenolics. U *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, 2002.
- Wei X, Hu H, Baogeng Z, Zikri A, Hung-Chung H, Weidong M, Yi-Ming L: Profiling metals in *Cordyceps sinensis* by using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Methods* 9:724-728, 2017.
- Winiarska-Mieczan A, Kwiatkowska K, Kwiecień M, Zaricka E: Assessment of the risk of exposure to cadmium and lead as a result of the consumption of coffee infusions. *Biological Trace Element Research* 199:2420–2428, 2021.
- Yang Y, Zhao X, Li J, Jiang H, Shan X, Wang Y, Ma W, Hao J, Yu G: A β -glucan from *Durvillaea Antarctica* has immunomodulatory effects on RAW264.7 macrophages via toll-like receptor 4. *Carbohydrate Polymers* 191:255–265, 2018.
- Zelman KM: *Health Benefits of Chanterelle Mushrooms*. WebMD, 2022. <https://www.webmd.com/diet/health-benefits-chanterelle-mushrooms> [17.8.2023].
- Zenk MH: Heavy metal detoxification in higher plants-a review. *Genes* 179:21-30, 1996.
- Zhang CC, Cao CY, Kubo M, Harada K, Yan XT, Fukuyama Y, Gao JM: Chemical Constituents from *Hericium erinaceus* Promote Neuronal Survival and Potentiate Neurite Outgrowth via the TrkA/Erk1/2 Pathway. *International Journal of Molecular Sciences* 18:1659, 2017.
- Zhang J, Shengshu A, Hu W, Teng M, Wang X, Qu Y, Liu Y, Youan Y, Wang D: The Neuroprotective Properties of *Hericium erinaceus* in Glutamate-Damaged Differentiated PC12 Cells and an Alzheimer's Disease Mouse Model. *International Journal of Molecular Sciences* 17:1810, 2016.

- Zhang N, Wei F, Ma Y, Yang X: Simultaneous determination of arsenic, cadmium and lead in plant foods by ICP-MS combined with automated focused infrared ashing and cold trap. *Food Chemistry* 264:462-470, 2018.
- Zhu J, Zhang D, Tang H, Zhao G: Structure relationship of non-covalent interactions between phenolic acids and arabian-rich pectic polysaccharides from rapeseed meal. *International Journal of Biological Macromolecules* 120:2597-2603, 2018.
- Zhou X, Gong Z, Su Y, Lin J, Tang K: Cordyceps fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 61:279–291, 2009.