



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU, BIOHEMIJU I
ZAŠTITU ŽIVOTNE SREDINE



MR SVETLANA BOŠKOVIĆ

**FITOHEMIJSKI SASTAV, LEKOVITI POTENCIJAL I
SENZORNE KARAKTERISTIKE SORTI VRSTA
BRASSICA OLERACEA L. I *BRASSICA RAPA* L.
(BRASSICACEAE) IZ ORGANSKOG I
KONVENCIONALNOG SISTEMA PROIZVODNJE**

- DOKTORSKA DISERTACIJA -

NOVI SAD, 2016

Predgovor

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je rađen u laboratoriji za biohemiju lekovitog bilja i tečnu hromatografiju Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, potom u laboratoriji za mikrobiologiju i gasnu hromatografiju Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu i u laboratoriji za ćelijske kulture Instituta za onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici.

Ovom prilikom želim da se zahvalim svima koji su doprineli izradi ove disertacije, a na prvom mestu svojoj mentorki prof. dr Nedi Mimici-Dukić, za nesebičnu podršku koju mi je pružila u više navrata do sada, strpljenju i razumevanju koje je imala za mene u dosadašnjem radu, beskrajnoj energiji koju nosi sa sobom, i životnom stavu koji je krasi da u svemu pronade pozitivnu i lepu stranu.

Vanrednom prof. dr Dejanu Orčiću zahvaljujem na učešću u eksperimentalnom radu iz oblasti gasne i tečne hromatografije, na nespavanju zbog tumačenju dobijenih rezultata i pruženoj pomoći prilikom pisanja rada.

Vanrednom prof. dr Maji Karaman zahvaljujem na liofilizaciji, pozajmljenom posudu i učešću u izradi eksperimentalnog dela rada vezanog za antimikrobnu aktivnost.

Naučnom savetniku, dr Dragani Četojević-Simin zahvaljujem na učešću i izradi eksperimentalnog dela rada koji se odnosi na citotoksičnost i apoptozu, kao i korisnim savetima koje mi je pružila prilikom pisanja ovog rada.

Zahvaljujem doc. dr Nataši Simin na pružanju svih „malih“ i „velikih“ pomoći koje su mi olakšale izradu eksperimentalnog dela rada, pisanje saopštenja i radova i vedrom duhu koji širi oko sebe.

Doc. dr Emiliji Svirčev i mr Milošu Svirčevu takođe zahvaljujem na pomoći u radu u laboratoriji i korisnim savetima. Arčon Otu zahvaljujem na aerisanju destilovane vode, i zajedničkim pauzama. Prof. dr Mirjani Popsavin na trenucima predaha uz kafu i inspirativnim razgovorima vezanim za neka druga interesovanja. Vanrednom prof. dr Ivani Beari i doc. dr Mariji Lesjak zahvaljujem na korisnim savetima, centrifugiranju i sterilizaciji, ali i na duhovitosti. Zahvaljujem svima sa trećeg sprata koji su mi ustupali prostor za čuvanje biljnog materijala.

Hvala Biljani Bala i Mariji Petrin na zajedničkim pokušajima da savladamo „nezgodne“ molekule i posvećenom vremenu.

I konačno želim da zahvalim svim svojim prijateljima koji su me bodrili i nestrpljivo čekali da se rad na disertaciji privede kraju, a posebno bih istakla one koji su na samom početku mog rada, prošli zajedno sa mnom svojevrsnu odiseju sa kupusom- Anđelki i Stevi Zec, Tatjani Nedeljković i Nataši Kosanić od srca hvala, kao i Vladimiru Pantoviću zbog ponovnog susreta sa hemijom.

mr Svetlana Bošković

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
2. Opšti deo	3
2. 1 Taksonomija, rasprostranjenosti značaj reda Brassicales i porodice Brassicacea	3
2.1. 1 Kratka istorija i filogenetska poreklo vrsta roda <i>Brassica</i>	4
2.2.1.1 <i>Brassica oleracea</i>	6
2.1.1.2 <i>Brassica rapa</i>	6
2.1.1.3 <i>Brassica nigra</i>	7
2.1.1.4 <i>Brassica napus</i>	7
2.1.1.5 <i>Brassica carinata</i>	7
2.1.1.6 <i>Brassica juncea</i>	7
2. 2. Hemijski sastav biljaka porodice Brassicaceae.....	8
2.2.1 Primarni metaboliti porodice Brassicaceae	9
2.2.2 Sekundarni metaboliti porodice Brassicaceae	11
2.2.2.1 Fenolna i polifenolna jedinjenja	11
2.2.2.2 Terpenoidi.....	14
2.2.2.3 Alkaloidi	14
2.2.2.4 Organo-sumporna jedinjenja	15
2.3 Oksidativni stres i značaj i uloga reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta u biološkim sistemima	21
2.3.1 Reaktivne kiseonične (ROS) i azotne vrste (RNS)	21
2.3.2 Uloga ROS u razvoju oksidativnog stresa i antioksidanti odbrambeni mehanizam	22
2.3.2.1 Antioksidantna mreža	24
2.3.2.2 ROS i redoks homeostaza.....	25
2.3.3 Molekulske osnove starenja i nastanka hroničnih degenerativnih oboljenja	26
2.4 Kancerogeneza	28
2.4.1 p53.....	29
2.4.2 Programirana ćelijska smrt.	29
2.4.3 Terapijski značaj apoptoze	32
2.5 Mikrobne infekcije	33
2.5.1 Antibiotička terapija i pojava rezistentnosti na antibiotike..	34
2. 6 Biološka aktivnost i lekoviti potencijal porodice Brassicaceae	35
2.6.1 Mehanizam delovanja fenolnih i sumpornih jedinjenja porodice Brassicaceae	39
2.6.1.1 Fenolna jedinjenja	39
2.6.1.2 Organo-sumporna jedinjenja	41

2.9 Faktori koji utiču na nutritivnu vrednost i sadržaj bioaktivnih jedinjenja povrća	42
2.9.1 Uticaj organskog i konvencionalnog sistema proizvodnje na sadržaj bioaktivnih jedinjenja porodice Brassicaceae	43
3. Eksperimentalni deo	45
3.1 Spisak hemikalija i opreme	45
3.2 Biljni materijal	45
3.3 Priprema sokova povrća	46
3.4 Liofilizacija biljnog materijala i sokova	46
3.5 Headspace GC-MS analiza volatilnih komponenti	46
3.6 Hemijsko profilisanje biljnih sokova pomoću LC-DAD-MS/MS tehnike	47
3.7 Kvantifikacija odabranih fenolnih jedinjenja pomoću LC-MS/MS tehnike	47
3.8 Određivanje sadržaja ukupnih glukozinolata	48
3.9 Određivanje sadržaja ukupnih fenola	48
3.10 Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	49
3.11 Određivanje sadržaja antocijana	50
3.12 Određivanje antioksidantnog kapaciteta sokova	51
3.12.1 Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH [•] radikala	51
3.12.2 Određivanje kapaciteta neutralizacije ABTS ^{•+} katjon radikala	51
3.12.3 Određivanje sposobnosti redukcije Cu(II) jona (CUPRAC test)	52
3.12.4 Test izbeljivanja β-karotena (mikro βCB test)	53
3.13 Određivanje antimikrobne aktivnosti	53
3.13.1 Određivanje antibakterijske/antifungalne aktivnosti	53
3.13.2 Određivanje aktivnosti na plesni (filamentozne gljive)	54
3.14. Određivanje antitumorske aktivnosti sokova	54
3.14.1 Određivanje citotoksične aktivnosti	54
3.14.2 Ispitivanje mehanizma ćelijske smrti	55
3.15 Statistička analiza	56
4. Rezultati i diskusija	57
4.1 Rezultati preliminarnih ispitivanja	57
4.1.1 Opis postupka gajenja organskog povrća i analiza kvaliteta zemljišta	57
4.1.2. Ispitivani varijeteti i priprema biljnog materijala	57
4.1.3 Preliminarni skrining hemijskog sastava i antioksidantne aktivnosti ispitivanih varijeteta vrsta <i>B. oleracea</i> i <i>B. rapa</i>	58
4.1.3.1. Frakcionisanje odabranih metanolnih ekstrakata i TLC hromatografska analiza ekstrakata	59
4.1.3.2 Ostala ispitivanja i zaključci izvedeni na osnovu preliminarnih analiza	62
4.2 Hemijski sastav vrsta roda <i>Brassica</i>	63

4.2.1	Volatilne komponente svežih biljaka	63
4.2.2	Hemijski profil sokova	67
4.2.3	Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja u biljnim sokovima	71
4.2.4	Sadržaj ukupnih glukozinolata u ekstraktima liofilizovanog biljnog materijala	72
4.2.5	Sadržaj ukupnih fenola u sokovima	74
4.2.6	Sadržaj ukupnih flavonoida u sokovima	75
4.2.7	Sadržaj monomernih antocijana	76
4.3	Antioksidantni kapacitet sokova	77
4.3.1	Sposobnost neutralizacije DPPH [•] radikala	77
4.3.2	Sposobnost hvatanja ABTS ^{•+} katjon radikala	78
4.3.3	Sposobnost redukcije Cu(II) jona	79
4.3.4	Inhibicija oksidacije β-karotena	80
4.3.5	Korelacija hemijskog sastava i antioksidantnog kapaciteta	83
4.4	Antimikrobna aktivnost sokova	86
4.5	<i>In vitro</i> antitumorska aktivnost sokova i detekcija tipa ćelijske smrti	91
5.	Zaključak	98
6.	Summary	102
7.	Literatura	106
8.	Prilog	117

1. UVOD

Povrće kao neizostavni deo ljudske ishrane predstavlja važan izvor nutritivnih supstanci i bioaktivnih jedinjenja koja ispoljavaju jaku antioksidantnu aktivnost i smanjuju rizik od pojave hroničnih oboljenja. Smatra se da ova jedinjenja deluju preventivno u slučaju oštećenja izazvanih slobodnim radikalima i vrše modifikaciju metaboličkih aktivnosti, detoksifikaciju od karcinogena i dovode do alteracija tumorskih ćelija (Park i Pezzuto, 2002; Dias, 2012). Stoga redovan unos povrća poboljšava opšti zdravstveni status, funkcionisanje gastrointestinalnog trakta i vida, umanjuje rizik od pojave pojedinih oblika kancera, srčanih bolesti, moždanih udara, dijabetesa, anemije, ulcera želuca, reumatoidnog artritisa i brojnih drugih hroničnih oboljenja. Prema procenama na svetskom nivou, nizak unos povrća uz nepoštovanje principa optimalne ishrane dovodi do pojave 31% svih ishemičnih srčanih oboljenja i 11% moždanih udara (Dias, 2012). Od ukupno 402 kultivisanih vrsta, pripadnica 69 porodica i 230 rodova, najčešće se konzumira lisnato povrće (53%), a u manjoj meri jestivi podzemni (17%) i nadzemni plodovi (15%). Svaka grupa biljaka ima jedinstven hemijski sastav i količinu bioaktivnih jedinjenja, ali većinu karakteriše prisustvo vitamina C, vlakana, selen, folne kiseline, karotenoida i flavonoida, dok je prisustvo glukozinolata i tiosulfida ekskluzivno vezano za primerke *Brassica* i *Allium* vrsta (Dias, 2012).

Pripadnice porodice Brassicaceae kao kosmopolitske vrste predstavljaju relativno jeftin i lako dostupan izvor nutrijenata i bioaktivnih jedinjenja. Ove biljke su od neprocenjivog značaja budući da se koriste u ishrani ljudi i stoke, kao industrijske sirovine, u dekorativne svrhe i procesu fitoremedijacije zbog izražene sklonosti bioakumulacije teških metala (Jahangir et al., 2009, Martinez et al., 2010). Najčešće gajeni i najznačajniji primerci su kupus i njemu srodne *Brassica*-podvrste, bela slačica-*Sinapsis alba* L., rotkvica-*Raphanus sativus* L., rukola-*Eruca sativa* Mill., kres salata-*Lepidium sativum* L., ren-*Armorica rusticiana* P. Gaertn., B. Mey. Scherb., vasabi-*Wasabia japonica* (Miq.) Matsum, potočarka-*Nasturtium officinale* W.T. Aiton. i uljanu repicu- *Brassica napus* L. U ovoj grupi se nalazi i popularni model organizam skupljen-*Arabidopsis thaliana* koji se koristi za različita istraživanja u području biologije i medicine.

S obzirom da se danas osim nutritivne uloge u velikoj meri pažnja poklanja i funkcionalnosti hrane, odnosno njenoj sposobnosti da pruža zaštitu od bolesti na molekularnom nivou, kao jedna od najvažnijih bioloških aktivnosti Brassia vrsta ističe se njihovo antitumorsko delovanje. Brojna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja i epidemiološke studije ukazuju na recipročan odnos između unosa ovog povrća i incidence kolorektalnog kancera, kancera pluća, dojke, pankreasa, gastrotestinalnog i kancera ovarijuma, kao i na pozitivnu korelaciju njihovog unosa i hemopreventivnog dejstva (Manchali et al., 2012). Hemopreventivni i hemoterapeutski potencijal ovih biljaka se u najvećoj meri oslanja na sadržaj glukozinolata i enzimsku aktivnost svežeg povrća, ali se ne isključuje uticaj drugih sumpornih i fenolnih jedinjenja. Pored antitumorskog, ove biljke ispoljavaju značajan kardioprotektivan efekat, antidijabetičko i antimikrobno delovanje, pomažu u očuvanju kognitivnih funkcija i deluju protektivno u slučaju Alchajmerove i Parkinsonove bolesti. Pojedine vrste su sposobne da uklanjaju krajne proizvode glikacije (AGEs) koji su snažni oksidujuć agensi, a kojima se danas poklanja sve veća pažnja, jer njihovo prisustvo predstavlja uvod u brojna patološka stanja. (Hounscome et al., 2008, Younus i Anwar, 2016).

Različiti biotički i abiotički faktori poput genotipa, primenjenih agronomskih mera, klime, raspoloživosti vode i svetlosti i koncentracija CO₂ utiču na profil sekundarnih biomolekula porodice *Brassicaceae* (Bjorkman et al., 2011). Moguće

interakcije između faktora spoljašnje sredine, biohemijskih i fizioloških procesa, i između pojedinih biljnih organa takođe mogu uticati na akumulacije pojedinih jedinjenja, ali ti uticaji nisu u dovoljnoj meri ispitani, ni razjašnjeni. (Poiroux-Gonord et al., 2010). Organski tip proizvodnje bez upotrebe pesticida se sve više favorizuje pošto se smatra da dobijene proizvode karakteriše odsustvo hormona rasta i genetske modifikacije, da poseduju privlačniji ukus, odnosno bolje senzorne karakteristike i povećan sadržaj bioaktivnih jedinjenja u odnosu na konvencionalne proizvode (Lima i Vianello, 2011). Međutim, različita ispitivanja nisu dala jedinstvene smernice o mogućem uticaju organske proizvodnje na sadržaj sekundarnih biomolekula, biološku aktivnost i organoleptičke karakteristike povrća (Naguib et al., 2012; Young et al., 2005; Lima et al., 2008; Dangour et al., 2009).

U skladu sa aktuelnom problematikom u ovom radu su ispitani uzorci vrsta *B.oleracea* i *B. rapa* (porodica Brassicaceae) poreklom iz organske i konvencionalne proizvodnje kako bi se utvrdilo u kojoj meri primenjeni sistem proizvodnje utiče na prisustvo i količinu bioaktivnih jedinjenja, biološku aktivnost biljaka, kao i pojedina organoleptička svojstva poput mirisa i ukusa. Ispitivanja su obuhvatila određivanja:

- hemijskog sastava,
- antioksidantnog potencijala,
- antimikrobne aktivnosti i
- antitumorske aktivnosti.

U okviru ispitivanja hemijskog sastava određen je karakterističan profil volatilnih komponenti svežeg biljnog materijala ispitivanih vrsta pomoću statične headspace GC-MS tehnike. Hemijski sastav biljnih sokova kao i sadržaj individualnih fenolnih jedinjenja je određen pomoću LC-MS/MS tehnike, dok su spektrofotometrijski određeni sadržaj ukupnih glukozinolata u liofilizovanom biljnom materijalu, sadržaj ukupnih fenola (ukupan redukcionni potencijal) i ukupnih flavonoida u sokovima ispitivanih vrsta, kao i sadržaj monomernih antocijana u sokovima crvenog kupusa.

Antioksidatni potencijal sokova ispitivanih vrsta je određen primenom više testova koji procenjuju sposobnost transfera elektrona (ET) i doniranja atoma vodonika (HAT). ET testovi su obuhvatili ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH[•] radikala, kapaciteta hvatanja ABTS^{•+} katjon radikala i kapaciteta redukcije CUPRAC reagensa (Cu(II) jona), dok je u okviru HAT testova ispitana sposobnost inhibicije dekolizacije β-karotena.

Antimikrobna aktivnosti sokova ispitivanih varijeteta je utvrđena određivanjem antibakterijskog i antifungalnog dejstva na rast gram pozitivnih i gram negativnih bakterija, više sojeva *C. albicans* i filamentoznih gljiva (plesni).

Antitumorska aktivnost je određena ispitivanjem uticaja biljnih sokova na rast zdravih i adherentnih i neadherentnih tumorskih ćelija (određivanje antiproliferativne aktivnosti) kao i detekcijom dominantnog tipa ćelijske smrti koji indukuju odabrani sokovi u adherentnim ćelijskim linijama tumora.

2. OPŠTI DEO

2.1 TAKSONOMIJA, RASPROSTRANJENOSTI ZNAČAJ REDA BRASSICALES I PORODICE BRASSICACEA

Red Brassicales i porodica Brassicaceae (ranije Cruciferae- Krstašice) prema aktuelnoj sistematici zauzimaju sledeći položaju biljnom carstvu:

Carstvo: *Plantae* (Biljke)

Podcarstvo: *Tracheobionta* (Vaskularne biljke)

Nadrazdeo: *Spermatophyta* (Semenice)

Razdeo: *Magnoliophyta* (Cvetnice)

Klasa: *Magnoliopsida* (Dikotiledone)

Red: *Brassicales* (= *Cruciales*)

Porodica: *Brassicaceae* (= *Cruciferae*)

Red Brassicales obuhvata 17 morfološki različitih porodica i do sada je predstavljao jednu od veoma problematičnih grupa biljaka za klasifikaciju (Fay i Christenhusz, 2010). U više navrata je pokušano uvrštavanje većine aktuelnih pripadnika ovog reda na osnovu specifične produkcije sumpornih jedinjenja- glukozionalata, koji degradacijom daju izotiocijanate tipične za ulje slačice ali i ostale vrste poput prokelja i kapra. Prisustvo ovih jedinjenja utiče na karakteristično oštar i ljut ukus i aromu koja se percipira ili kao krajnje poželjna ili kao krajnje odbojna. Distribucija ovih jedinjenja je poznata u 15 porodica dikotiledona još od ranih devedestih godina prošlog veka, a rezultati brojnih citogenetskih i drugih istraživanja pokazuju da sve biljke koje proizvode glukozinolate pripadaju jednom redu-redu Brassicales, te se smatra da moraju zauzimati jedinstvenu poziciju u herbarijumskom materijalu i odgovarajućim kolekcijama biljaka.

Redu Brassicales pripadaju sledeće, više ili manje srodne familije: Gyrostemanaceae, Resedaceae, Tovariaceae, Pentadiplandraceae, Cleomaceae, Brassicaceae, Capparaceae, Emblingiaceae, Bataceae, Salvadoraceae, Koeberliniaceae, Limnanthaceae, Setchellanthaceae, Moringaceae, Caricaceae, Akaniaceae, Tropaeolaceae. Tri familije: Capparaceae, Cleomaceae i Brassicaceae su filogenetski veoma bliske i čine većinu vrsta reda Brassicales, u okviru koga je porodica Brassicaceae (= Cruciferae, krstašice) najveća. Broj pripadajućih rodova i vrsta se razlikuje u zavisnosti od autora: prema Fay i Christenhusz (2010) porodica obuhvata oko 340 rodova i 3350 vrsta, Cheng et al. (2014) klasifikuju 308 od ukupno 338 rodova u 44 tribusa, a porodica broji ukupno 3709 vrsta, odnosno porodica obuhvata 350 rodova i oko 3500 vrsta po Jahangir et al. (2009).

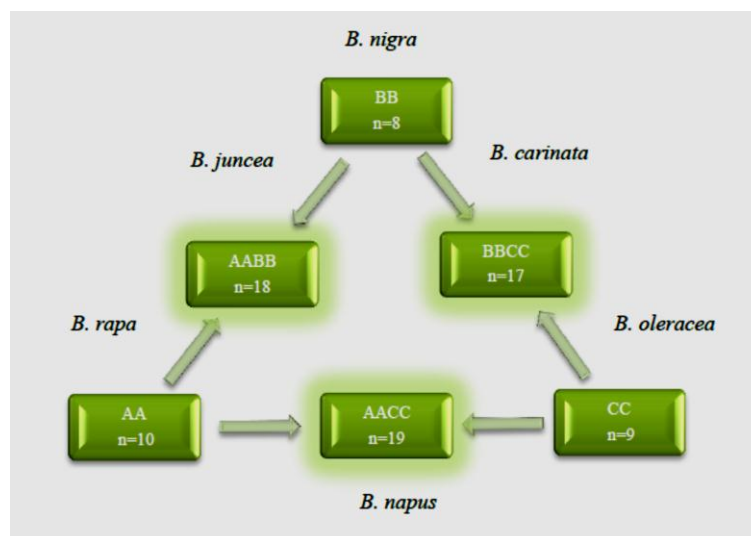
Pripadnici porodice Brassicaceae su kosmopolitske vrste najšire rasprostranjene na severnoj hemisferi, posebno u području mediteranskog bazena i jugo-zapadnoj centralnoj Aziji. Imaju veliki ekonomski značaj jer su najšire zastupljeni u ishrani ljudi i stoke, koriste se kao industrijske sirovine i u dekorativne svrhe. Najzastupljenije gajene kulture su kupus i njegovi srodnici *Brassica*-podvrste, bela slačica-*Sinapsis alba* L., rotkvica-*Raphanus sativus* L., rukola-*Eruca sativa* Mill., kres salata-*Lepidium sativum* L.,

ren-*A Armorica rusticiana* P. Gaertn., B. Mey. Scherb., vasabi-*Wasabia japonica* (Miq.) Matsum. i potočarka-*Nasturtium officinale* W.T. Aiton. Uljana repica- *Brassica napus* L. se koristi kao stočna hrana, industrijska biljna kultura i dodatni izvor jestivog ulja. Zahvaljujući veoma malom genomu i srodstvu sa važnim poljoprivrednim povrtarskim kulturama jedna od biljaka porodice Brassicaceae, skopljen- *Arabidopsis thaliana* je postao popularni model organizam za istraživanja u biologiji i u genetici. Smatra se da je to prva biljka kojoj je sekvencioniran genom, mada prema novijim saznanjima, ne i u potpunosti (Fay i Christenhusz, 2010). Ostali članovi familije Brassicaceae su od manjeg značaja ili predstavljaju istorijski značajne kulture.

2.1.1 Kratka istorija i filogenetska poreklo vrsta roda Brassica

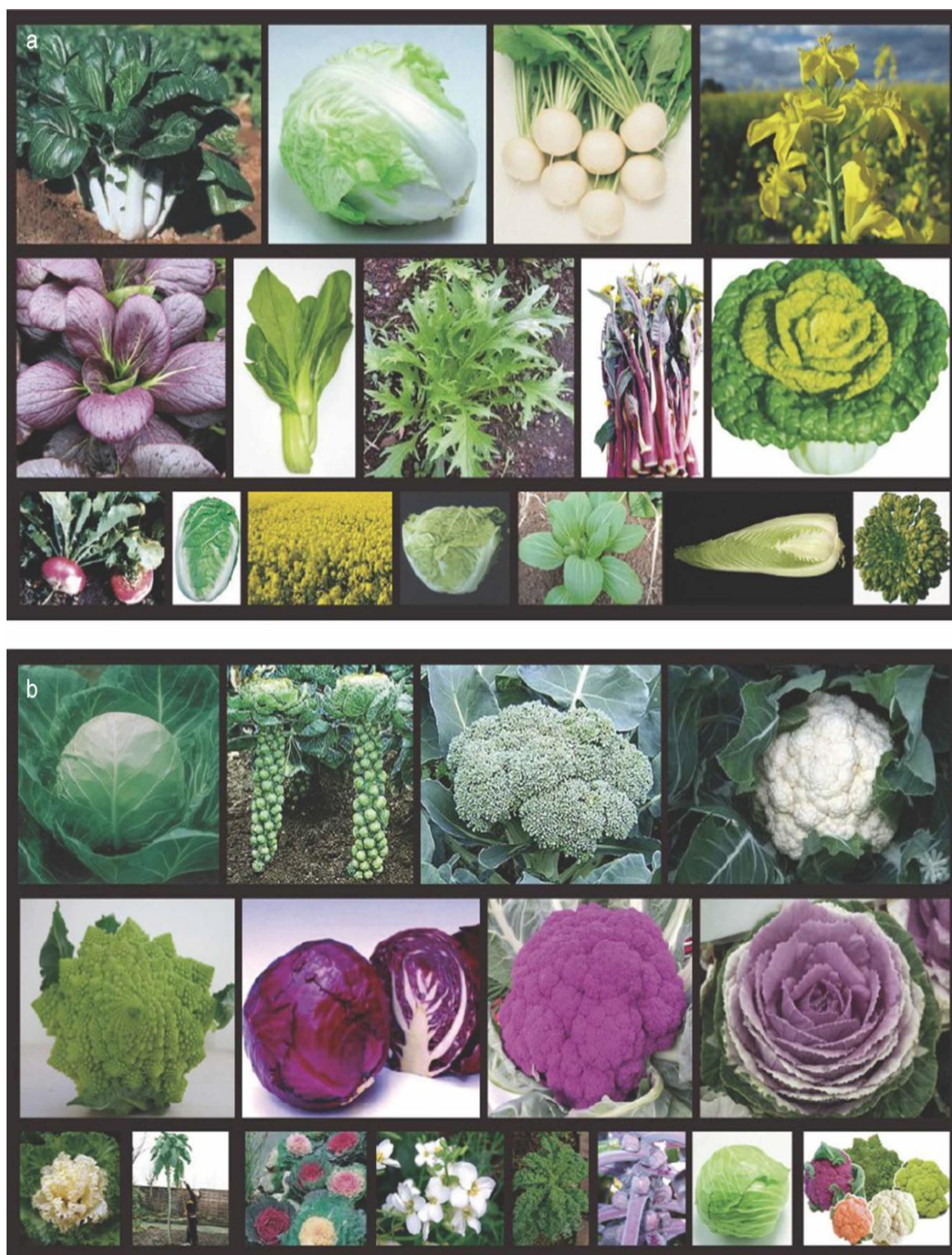
Rod *Brassica* je jedan od 51 pripadajućih rodova iz tribusa Brassiceae (porodica Brassicaceae) koji obuhvata prema nekim oko 35 (Warwick, 2011), dok po drugim autorima broji 37 vrsta (Rakow, 2004). To su uglavnom jednogodišnje, zeljaste biljke, ali u okviru roda postoji i nekoliko višegodišnjih, i drvenastih, žbunolikih biljaka.

Šest gajenih vrsta je genomski povezano u obliku trougla U (1935) prikazanog na Slici 2.1. Tri vrste su diploidne: *Brassica nigra* ($2n=16$, genom BB), *Brassica oleracea* ($2n=18$, genom CC) i *Brassica rapa* ($2n=20$, genom AA), dok su preostale tri amfidiploidni derivati: *Brassica carinata* ($2n=34$, BBCC), *Brassica juncea* ($2n=36$, AABB) i *Brassica napus* ($2n=38$, AACC) dobijene hibridizacijom i poliploidizacijom iz dva diploidna taksona (Chiang et al., 1993; Babula i sar, 2007; Ostergaard i King, 2008; Warwick, 2011).



Slika 2.1. Genetska povezanost šest kultivisanih vrsta Brassica u obliku trougla U (1935).

B. oleracea, *B. rapa* i *B. juncea* su morfološki veoma raznovrsne vrste što se ogleda u brojnim podvrstama, varijetetima i sortama koje su se istorijski razvijale vrlo sličnom linijom. Primeri različitih morfoloških tipova pripadnica vrsta *B. rapa* i *B. oleracea* su prikazani na Slici 2.2. Gotovo svi delovi ovih biljaka su jestivi, u ishrani se koriste korenovi, stabljike, lišće, pupoljci, cvetovi i seme.



Slika 2.2. Morfološka raznovrsnost roda *Brassica* (Cheng et al., 2014). (a) Morfo tipovi *B. rapa*; Prva dva reda sa leva na desno: pak choi, repa koren, uljana repica, ljubičasti pak choi, kaiksin, mizuna, ljubičasti kaitai i takucai; treći red pokazuje dodatne morfotipove prethodnih varijeteta. (b) Morfo tipovi *B. oleracea*; prva dva reda sa leva na desno: glavičasti kupus, prokelj, brokoli, karfiol, brokoleto, crveni kupus, ljubičasti karfiol, ukrasni raštan; treći red pokazuje dodatne morfotipove navedenih varijeteta (foto: Cheng et al., 2014).

2.1.1.1 *Brassica oleracea*

Vrsta poznata kao “cole” grupa (“cole”- varijacija latinske reči “caulis” koja se odnosi na stabljiku, posebno kupusa) obuhvata različite morfotipove (Maggioni, 2015). Kao član CC genomskog kompleksa, uključuje brojne neplodne mediteranske vrste (*Brassica cretica*, *Brassica hilarionis*, *Brassica incana*, *Brassica insularis*, *Brassica macrocarpa*, *Brassica montana*, *Brassica rupestris*, *Brassica villosa*), divlju *B. oleracea* iz obalnih područja zapadne Evrope i *B. bourgeaui* sa Kanarskih ostrva. Najvažniji pripadnici vrste *B. oleracea* su:

- raštan (var. *viridis*, var. *costata*, var. *medullosa*, var. *sabelica*) koji je razvio jako glavno, vaskularno stablo i koristi se zbog jestivog lista,
- granati žbunasti raštan (var. *ramosa*) u prošlosti više gajen zbog jestivog lista,
- kupus i kelj (var. *capitata* i var. *sabauda*) karakteristično formiranih glava od gusto pakovanog lišća,
- prokelj (var. *gemmifera*) sa aksilarnim pupoljci u formi jestivih glavica na zbijeno pakovanom lišću,
- keleraba (var. *gongylodes*) sa uvećanim jestivim nadzemnim stablom,
- karfiol i brokoli (var. *botrytis* i var. *italica*) gusto pakovanih zadebljanih cvetova i
- kineski raštan, kailan (var. *alboglabra*) kultivisano povrće sa belim cvetom koje se gaji u Kini. Kineski raštan se generalno smatra proizvodom drevnog upliva iz mediteranskog regiona i često tretira kao zasebna vrsta *Brassica alboglabra*.

Postoje oprečni stavovi o poreklu ovih biljaka, od toga da su poreklom od jedne vrste divlje *B. oleracea* iz zapadne Evrope, do mogućnosti trostrukog ili čak višestrukog porekla od odgovarajućih divljih vrsta CC kompleksa (Babula et al., 2007, Warwick, 2011). Na osnovu molekulskih studija potvrđeno je monofiletičko poreklo od progenitora sličnog divljoj vrsti *B. oleracea*, a u skladu sa morfološkom evidencijom o najranije kultivisanoj vrsti *B. oleracea* što je najverovatnije bio lisnati raštan od koga sve gajene vrste dalje vode poreklo. Molekulska evidencija pokazuje na mogućnost selektivne introgresije drugih članova CC kompleksa, *B. insularis* i *B. incana* što je možda uticalo na varijabilnosti kultivisane vrste *B. oleraceae*.

2.1.1.2 *Brassica rapa*

B. rapa je polimorfna vrsta koja obuhvata brojno povrće koje se odomaćilo u toku dugog istorijskog perioda u Evropi i Aziji. Malo toga je poznato o realnom prisustvu ove vrste u divljini, a pronađeni primerci verovatno vode poreklo od kultivisanih biljaka (podvrste *sylvestris*). Najvažnije povrće koje pripada *B. rapa* je:

- repa (var. *rapa*), postrna repa (var. *rapa*) koje formiraju lisnate rozete i/ili zadebljali koren,
- kanola (var. *oleifera*) i Indijska repa (podvrsta *dichotoma*) biljka sa crnim semenkama, jednogodišnjeg prolećnog tipa i dvogodišnji zimski tip koje se koriste za dobijanje ulja,
- žuta slačica (var. *trilocularis*), jednogodišnja biljka čije se žutim semenom koje se koristi za dobijanje ulja,

- kineski kupus (podvrsta *pekinensis*), azijsko glavičasto povrće sa krilasto vezanim listovima,
- pak choi (var. *chinensis*) kineski lisnati kupus, sa mesnatim ali čvrsto vezanim peteljka,ma,
- mizuma ili lisnata repa (podvrsta. *nipposinica*), azijsko neglavičasto lisnato povrće sa mnogo izdanaka i perastim (mizuma) ili celovitim listovima (mibuna),
- kineski kelj (var. *narinosa*) azijski neglavičasto lisnato povrće, ravnih rozeta sa mnogo malog lišća i
- brokolet (ranije smatran kao *Brassica ruvo*, pridružen podvrsti *oleifera*)-evropsko povrće uvećanih, kompaktnih cvetova.

Većina navedenog povrća je opisano kao zasebna vrsta ali se rado međusobno ukrštaju i pripadaju $n=10$ citodemu. Dosadašnja ispitivanja ukazuju da se *B. rapa* deli u dve glavne grupe najverovatnije usled dva različita centra porekla. Primarni centar je Evropa i uključuje repu i postnu repu, od kojih dalje azijska slačica i indijska repa vode poreklo. Drugi centar je Kina i uključuje raznovrsno povrće.

2.1.1.3 *Brassica nigra*

Crna slačica je ranije masovno gajena kao začinska biljka ali je danas zamenjena sa *B. juncea* premda se i dalje gaji u Aziji. Najverovatnije vodi poreklom iz centralne i južne Evrope. Smatra se da je uvedena u Indiju u relativno bliskoj prošlosti. Evoluirala je zasebno u odnosu na dve diploidne *Brassica* vrste i bliskija je genetski sa rodom *Sinapis*, posebno sa travnatim vrstama *S. arvensis* ($n=9$) nego sa vrstama *B. oleracea* i *B. rapa*.

2.1.1.4 *Brassica napus*

Kanadska uljana repa ili kanola je skorašnjeg porekla i nisu nađeni samonikli primerci ove biljke. Smatra se da je poreklom iz južne Evrope ili mediteranske regije gde dva roditeljska taksona *B. rapa* i *B. oleracea* paralelno geografski egzistiraju. Dosadašni podaci pokazuju na poliploidno poreklo *B. napus* uključujući ukrštanja vrsta *B. rapa* i *B. oleracea* i *B. rapa* sa jednim od divljih C genomskih srodnika- *B. montana*. Prepoznaju se dve podvrste: dvogodišnja žuta repa koren (var. *rapifera*) i jednogodišnja uljana repica ili stočna repa (podvrsta. *napus* ili podvrsta. *oleifera*).

2.1.1.5 *Brassica carinata*

Etiopljanski kupus je i uljna i povrtarska kultura iz Etiopije sa malom diferencijacijom u različite tipove kultura. Divlji tip nije pronađen ali se smatra da je poreklom sa etiopljanskog platoa severno- zapadne Afrike i da je nastala ukrštenjem divlje *B. nigra* i kultivisane forme *B. oleracea* slične raštanu.

2.1.1.6 *Brassica juncea*

Indijska ili smeđa slačica se gaji u severnoj Americi i Evropi kao začina, na Indijskom potkontinentu se gaji zbog uljastih semenki, a na Dalekom istoku kao povrće.

Brojne morfološki raznovrsne forme su dostupne uključujući uljastu, semi-uljastu, repastu i lisnatu. Postoji određena nesigurnost o mogućem poreklu *B. juncea*. Najverovatnije potiče sa srednjeg istoka ili zapadno-azijskog regiona što je zaključeno na osnovu geografskog suživota roditeljskih taksona *B. nigra* i *B. rapa* i prisustva samonikle *B. juncea* u istom tom području. Druge hipoteze sugerišu azijsko poreklo sa centrom glavnog diverziteta u Kini. Najverovatnije je *B. juncea* nastala kao rezultat više od jednog ukrštanja, slično vrsti *B. napus*. Skorašnje studije pokazuju na raznoliko poreklo sva tri varijeteta: var. *multisepts*, var. *rapifera* i *tsa-tsai*.

2. 2. HEMIJSKI SASTAV BILJAKA PORODICE BRASSICACEAE

Povrće produkuje veoma širok spektar različitih jedinjenja koja uglavnom, ako ne i u potpunosti pokrivaju nutritivne potrebe čoveka. Pored toga ono predstavlja i odličan izvor bioaktivnih molekula značajnih za prevenciju i sprečavanje razvoja bolesti kod čoveka (Podsedek, 2005; Hounsome et al., 2008). Brokoli, karfiol, prokelj, repa, raštan i slačica obiluju jedinjenjima sa antioksidantnom, antifungalnom, citotoksičnom, antimutagenom i antivirusnom aktivnošću. Dijetetska vlakna, flavonoidi, steroli, fenolne kiseline i glukozionolati se smatraju glavnim bioaktivnim molekulima koji ispoljavaju pozitivan efekat kod srčanih oboljenja, dijabetesa, visokog krvnog pritiska, katarakte, degenerativnih oboljenja i gojaznosti (Hounsome et al., 2008).

Pored primarnih biomolekula, koji su neophodni za rast i razviće biljaka, biljke sintetišu čitav spektar strukturno različitih jedinjenja, tzv. sekundarne biomolekule pomoću kojih se biljke prilagođavaju uslovima životne sredine i brane od brojnih biotičkih i abiotičkih faktora (Thompson i Thompson, 2010; Bernhoft, 2010; Web, 2011). Ova jedinjenja nastaju vrlo kompleksnim i energetski „skupim“ biosintetskim putevima. Zbog toga ih biljke sintetišu u ograničenim količinama i većina enzima koji katalizuju reakcije sekundarnih metabolita su indusibilni enzimi čija je sinteza regulisana brojnim faktorima koji učestvuju u ekspresiji određenih gena. Sekundarni biomolekuli imaju brojne funkcije u biljkama: odgovorni su za boju cvetova čime pospešuju oprašivanje, specifičnim mirisom i ukusom odbijaju herbivore i insekte, pružaju zaštitu od mikroorganizama, apsorpcijom svetlosti u UV-oblasti pospešuju oprašivanje delujući kao „tajni vodiči pčela“, štite biljke od prekomernog UV zračenja, neki od njih deluju kao signalni molekuli u uslovima stresa. Funkcija mnogih od njih nije ni do danas razjašnjena.

Postoje različite podele sekundarnih metabolita koje se zasnivaju na biosintezi, pripadnosti određenim botaničkim vrstama, biološkoj aktivnosti ili hemijskom karakteru, a jedna od mogućih podela podrazumeva tri glavne grupe jedinjenja:

- fenole i polifenolna jedinjenja sa približno 8000 jedinjenja,
- terpenoide sa oko 25000 jedinjenja i
- alkaloidne (oko 12000) i sumporna jedinjenja.

U okviru svake od navedenih grupa se nalaze manje, specifičnije podgrupe jedinjenja.

Sekundarni biomolekuli (fitonutrijenti) predstavljaju i treću funkcionalnu komponentu hrane koja je od značaja u prevenciji bolesti na molekulskom nivou (Drewnowski i Gomez-Carneros, 2000). Ova preventivna uloga hrane se posmatra nezavisno od primarne nutritivne uloge i sekundarne funkcije vezane za senzorne karakteristike, ukus i aromu biljaka. Međutim, kako većina bioaktivnih jedinjenja poseduje gorak, opor ili kiseo ukus to dovodi do smanjenog unosa povrća u odnosu na poželjne količine. Ilustrativan primer su gluzinolati, jedinjenja koje karakteriše ljut ukus i

neprijatan miris, a koji su glavne bioaktivne komponente u biljkama porodice Brassicaceae. Ovaj problem se rešava u savremenoj industrijskoj proizvodnji hrane uklanjajem nepoželjnih, gorkih komponenti, odnosno smanjenjem njihovog sadržaja posredstvom genetske manipulacije, selektivnog gajenja određenih sorti ili promenom uslova gajenja.

2.2.1 Primarni metaboliti porodice Brassicaceae

Fruktoza, glukoza i saharoza predstavljaju dominantne šećere porodice Brassicaceae. Fruktoza čini i preko 50% ukupne količine šećera u nekim sortama brokolija (Jahangir et al., 2009). Kupus poseduje viši sadržaj monosaharida niske molekulske mase u odnosu na karfiol i raštan, dok raštan sadrži najmanju količinu ovih šećera (Nilsson et al., 2006). U biljkama su prisutni u manjoj količini i šećerni alkoholi sorbitol i inozitol, uz relativno nizak sadržaj saharoze. Dijetetska vlakana se sastoje iz neskrobnih polisaharida, od čega je jedan deo vlakana rastvorljiv. Pored fruktopolisaharida i neskrobnih polisaharida, dijetetska vlakna biljaka uključuju i nesvarljive oligosaharide, lignin i njemu slične supstance poput rezistentih skrobova, voskova, kutina i suberina. Vlakna mogu činiti i do jedne trećine ukupne količine šećera u belom kupusu, dok se u ostaku nalaze glukoza, uronska kiselina, arabinoza i galaktoza (Jahangir et al., 2009).

Pored ugljenih hidrata povrće sadrži i sve esencijalne amino kiseline neophodne za biosintezu proteina, ali te količine često nisu adekvatne čovekovim potrebama. U povrću je prisutno i više od 250 neproteinogenih amino kiselina, od kojih neke ispoljavaju značajnu biološku aktivnost (Hounscome et al., 2008). U brokoliju je do sada utvrđeno prisustvo 17 amino kiselina: L- alanina, L- ariginina, L- asparagina, L-aspraginska kiselina, glicina, L-glutaminske kiseline, L-glutamina, L- histidina, L-leucina, L-izoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-serina, L-treonina, L-tripotofana, L-tirozina i L-valina kao i neproteinogene amino kiseline, S-metil-L-cistein sulfoksida (SMCSO) koja je prisutna i u drugim Brassica vrstama (Jahangir et al., 2009; Edmands et al., 2013). Dominantne amino kiseline u svežem brokoliju su glutaminska i asparaginska kiselina, dok je sadržaj sumpornih amino kiselina, metionina i cisteina minimalan (Kmiecik et al., 2009). Metionin i cistein su amino kiseline od posebnog značajna pošto učestvuju kao donori tiolne grupe u biosintezi čitave grupe biološki važnih organo-sumpornih jedinjenja-glukozinolata (Zukalova i Vašak, 2002).

Uljana repica se ističe kao varijetet bogat skladišnim proteinima- napinom i kruciferinom, kao i stuktturnim proteinom- oleorezinom. Nakon ekstrakcije ulja u ostacima pojedinih vrsta roda *Brassica* se može nalaziti i do 50% proteina, stoga one mogle biti važan izvor proteina za ljudsku ishranu. Međutim, zbog prisutnih antinutrijenata- glukozionolata, fitata i fenola, kao i potencijalnih alergena, 2S albumina, odnosno napina, uljana repica i repa-koren se još uvek koriste isključivo u ishrani stoke. Denaturacija proteina usled primene visokih temperatura i organskih rastvarača pri ekstrakciji ulja predstavlja još jedan dodatni razlog za ograničenost njihove upotrebe u ljudskoj ishrani.

Limunska, sirćetna, malonska, šikimska, akonitna i askorbinska kiselina su rasprostranjene organske kiseline u biljkama, a povrćem dominiraju malonska i limunska kiselina. Zeleno povrće sadrži i nizak nivo ćilibarne, fumarne i hinske kiseline. Visok nivo vitamina C je utvrđen u pak choi-u, brokoliju, karfiolu i kupusu. U biljkama roda *Brassica* ovaj vitamin prisutan je i oksidovanoj formi kao dehidroaskorbinska kiselina (DHA), i u obliku askorbigena koji su proizvod reakcije askorbinske kiseline i degradacionih proizvoda indol-3-ilmetilglukozinolata. Smatra se da se 30-60% indolnih

glukoziolata transformiše u askorbigene, pri čemu sadržaj vitamina C usled pomenute konverzije ne opada više od 10% prilikom obrade povrća (Podsedeck, 2005; Hrnčirik et al., 2001). Vitamin C je generalno osetljiv na prisustvo kiseonika tako da se često prilikom obrade povrća konvertuje u dehidroaskorbinsku kiselinu pa je neophodno određivanje oba oblika u kojima se može naći ovaj vitamin (Barrett i Lloyd, 2012).

Pored vitamina C, zeleno lisnato povrće poput prokelja, karfiola i repe sadrži i vitamine B kompleksa koji uključuju: B₁ (tiamin), B₂ (riboflavin), B₃ (nikotinska kiselina, niacin), B₅ (pantotenska kiselina), B₆ (piridoksin), B₇ (biotin) i B₉ (folna kiselina) vitamin. Značajne količine karotenoida- provitamina vitamina A i različitih tokoferola, odnosno vitamina E su takođe prisutne u Brassica povrću. Međutim, kako navedena jedinjenja pripadaju grupi sekundarnih biljnih metabolita, odnosno grupi terpenoida, ona će biti detaljnije opisana nešto kasnije u odeljku koji razmatra ovu grupu jedinjenja.

Karfiol, pak čoi, brokoli i raštan su kulture bogate mineralima. Generalno je prihvaćeno da Brassica povrće predstavlja dobar izvor kalcijuma i gvožđa, pri čemu je najviši nivo minerala prisutan u raštanu u odnosu na ostalo tamnozeleno povrće. Pored toga, raštan sadrži značajne količine fosfora, sumpora, hlora, kalcijuma, stroncijuma i kalijuma. Brokoli se smatra izuzetno značajnim povrćem u očuvanju ljudskog zdravlja zbog izražene sposobnost akumulacije selena iz zemljišta, te je taj mineral u biljci prisutan u većoj količini nego u tlu. Crvene sorte kupusa akumuliraju mnogo veći sadržaj gvožđa, olova, cinka, bakra i nikla u poređenju sa zelenim varijetetima i poseduju mnogo višu antioksidantnu aktivnost (Nica et al., 2012). Upravo zahvaljujući visokoj sposobnosti akumulacije metala, biljke roda *Brassica* se koriste i u fitoremedijaciji, posebno *B. oleracea* i *B. napus*. Sa druge strane, uzgajanje na kontaminiranom zemljištu predstavlja potencijalnu opasnost ukoliko su biljke namenjene ljudskoj ishrani, pogotovo ako se uzme u obzir činjenica da se neke od biljaka reda Brassicales odlikuju sposobnošću hiperakumulacije teških metala poput nikla i olova (Broadley, 2001; Prasad, 2003).

U zelenom povrću poput kineskog kupusa, prokelja i potočarke je utvrđen visok nivo polinezasićenih masnih kiselina, primarno u obliku α -linolenske kiselina. Ulje uljane repica karakteriše visoka nutritivnu vrednost zahvaljujući visokom sadržaju nezasićenih masnih kiselina. Ulje slačice sadrži oko 94% nezasićenih i 5.5% zasićenih masnih kiselina. Prisutne su: a linolensku kiselina (21.4%), palmitinska (2.9%), stearinska kiselinu (1%), oleinska kiselinu (19.4%), linolna (9.7%) i erucična kiselinu (44.4%). Sadržaj ulja u različitim genotipovima *B. campestris* varira od 38.9% do 44.6%, a glavne masne kiseline su oleinska, linolna, linolenska, eikozanska i erucična. Semenke kanole su jedan od najbogatijih izvora omega-3-nezasićenih kiselina, posebno α -linolenske kiseline, dok je ulje *B. napus* bogato oleinskom, uz umereni nivo linolne i linolenske kiseline. Visoka nutritivna vrednost i kvalitet karfiola se vezuju za stabilnost masnih kiselina ove biljke, pri čemu se njihov sadržaj povećava u uslovima stresa.

Triacilgliceoroli čine 98% frakcije ulja biljaka roda *Brassica*, dok je ostatak neglicerolske prirode i sadrži tokoferole, sterole (stigmasterol, sitosterol, kampesterol, holesterol), sterolne estre, fosfolipide (fosfatidiletanolamin, fosfatidilholin) i sfingolipide(cerebrozidi). U raštanu je utvrđen visok sadržaj 1,2-di-*O*- α -linoleoil-3-*O*- β -D-galaktopiranozil-sn-glicerola (Larsen i Christensen, 2007), a značajne količine ovog galaktopida su utvrđene u brokoliju i prokelju.

2.2.2 Sekundarni metaboliti porodice Brassicaceae

2.2.2.1 Fenolna i polifenolna jedinjenja

Fenolnim jedinjenjima pripada više od 15 klasa jedinjenja, koje obuhvataju različita jedinjenja, od jednostavnih molekula do polimera visokih molekulskih masa (Drewnowski i Gomez-Carneros, 2000). Ovoj grupi biomolekula pripadaju flavonoidi, fenolne kiseline, lignani, stilbeni i kompleksni polimeri- biljni tanini (sa molekulskom masom >500). Veoma mali broj fenolnih jedinjenja se u biljkama javlja u slobodnom obliku, ona su najčešće vezana u formi glikozida što umanjuje njihovu endogenu toksičnost. Do sada je lekoviti potencijal biljaka roda *Brassica* uglavnom pripisivan sadržaju nekih nutritijenata i vitamina E, C kao i β -karotena, međutim u poslednje vreme sve veći značaj pripisuje se fenolnim jedinjenjima prisutnim u ovim biljnim vrstama. Neki od najznačajnijih fenola *Brassica* povrća su prikazani na *Slici 2.3*.

Flavonoidi

Flavonoidi kao najvažnija i najbrojnija grupa fenolnih jedinjenja, obuhvataju preko 5000 različitih molekula svrstanih u najmanje 13 klasa (Drewnowski i Gomez-Carneros, 2000). Uključuju flavanone, flavonole (kvercetin, kemferol, izoramnetin), flavone (apigenin, luteolin, krizoeriol), flavane (katehine), antocijanidine (cijanidin, delphinidin, malvidin), halkone, dihidrohalkone i izoflavone. U podvrstama *Brassica* kao što su brokoli, raštan, kupus i prokelj dominiraju kompleksne smeše flavonola, odnosno glikozidi kvercetina i miricetina uz prisutne konjugate kvercetina (Kyle i Duthie, 2006). Do sada je identifikovano preko 20 fenolnih jedinjenja u pojedinim varijetetima koji uključuju brokoli, raštan, beli i crni kupus, karfiol i portugalski kupus (Cartea et al., 2011, Podsek, 2005). 22 derivata kemferola, ferulne i sinapinske kiseline je identifikovano brokoliju, pri čemu su glavni flavonol-glikozidi u cvetovima kvercetin- i kemferol-3-*O*-soforozid-7-*O*-glukozid, dok su minorni glikozidi izokvercitrin- i kemferol-3-*O*-glukozid i kemferol-3-*O*-diglukozid (*Slika 2.3*). U raštanu, belom, crnom kupusu, portugalskom kupusu i karfiolu glavna fenolna jedinjenja su kemferol- i kvercetin-3-*O*-soforozid-7-*O*-glukozid i njihova kombinacija sa različitim hidroksicimetnim kiselinama, uglavnom kemferol- i kvercetin-3-*O*-(kafeoil/sinapoil)-soforozid. Prisustvo kvercetina, kemferola i izoramnetina je potvrđeno u *B. napus*, kao i kemferola i izoramnetina u *S. alba*. U dosadašnjim ispitivanjima je utvrđena veća homogenost u fenolnom sastavu delova biljaka koji su manje izloženim uticajima iz spoljašnje sredine, na primer unutrašnjih odnosu na spoljašnje listove, što nije začuđujuća činjenica, obzirom da je poznato da se uticaji iz okruženja umnogome odražavaju na produkciju fenolnih jedinjenja (Sousa et al., 2006).

Fenolne kiseline

Derivati hidroksibenzoeve kiseline su u jestivom bilju prisutni u izuzetno niskim koncentracijama, dok su hidroksicimete kiseline dominantna jedinjenja (Manach et al., 2004). Pul ovih kiselina čine pre svega *p*-kumarinska, kafena, ferulna i sinapinska kiselina. Njihovo prisustvo je identifikovano u vodenoj frakciji fenolnih jedinjenja lista uljane repice, dok su galna, protokatehinska *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska, salicilna, *p*-kumarinska, kafena, ferulna i sinapinska kiselina identifikovane fenolne kiseline raštana. Sinapinska kiselina i njeni derivati se smatraju najvažnijim fenolnim jedinjenjima porodice Brassicaceae, uz već pomenute dominantne glikozide kvercetina i kemferola, tim pre što su i flavonoidi i antocijani veoma često acilovani ovom kiselinom (Nićiforović i Abramović, 2014). Delovi biljke izloženim uticajima spoljašnje sredine, kao i seme akumuliraju najviši sadržaj tih jedinjenja (Ferrerres et al., 2007). Pored karakterističnog prisustva sinapina, u semenu kultura porodice Brassicaceae, prisutni su i

holinski estri, feruol- i izoferuolholin kao i estri hidroksibenzojeve kiseline. U raštanu, kupusu, brokoliju i karfiolu se akumuliraju konjugati hidroksicimetnih kiseline sa glukozom i gentobiozom u obliku 1, 2-disinapoilgentiobioze, 1-sinapoil-2-feruloilgentiobioze, 1,2,2'-trisinapoilgentiobioze i 1,2'-disinapoil-2-feruloilgentiobioze, kao i različiti konjugati hidroksicimetnih kiselina sa hinskim kiselinom poput 3-kafeoilhinske kiseline, 3-*p*-koumaroilhinske kiseline (Cartea et al., 2011). Strukture ovih jedinjenja su prikazane na *Slici 2.3*.

Antocijani

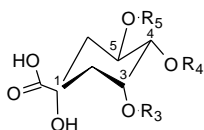
Do sada je poznato je preko 500 različitih struktura antocijana i 23 strukture antocijanidina, od čega je samo šest redovno prisutno u vaskularnim biljkama (Castaneda-Ovando et al., 2009). U voću i povrću to su cijanidin, delphinidin, pelargonin, peonidin, petunidin i malvidin, i to najčešće u obliku 3-monozida, 3-biozida i 3,5- i 3,7-diglukozida. Prisustvo 3-glukozida je 2.5 puta češće od 3,5-diglukozida, a najrasprostranjeniji antocijan je cijanidin-3-glukozid. U pitanju su veoma nestabilna jedinjenja, podložna degradaciji u zavisnosti od pH vrednosti, temperature, uslova čuvanja, strukture, svetlosti, prisustva kiseonika, koncentracije, rastvarača i prisutnih enzima, flavonoida, proteina i metalnih jona. Više od 15 različitih antocijana-acilglikozida cijanidina je odgovorno za boju crvenog kupusa. Antocijanine roda *Brassica* karakteriše neuobičajeno kompleksna struktura koje podrazumeva prisustvo jedne ili više hidroksicimetnih kiselina (*Slika 2.3*.) Glavni antocijanini crvenog kupusa i izdanaka brokolijski su cijanidin 3-*O*-(sinapoil)(feruol)diglukozid-5-*O*-glukozid i cijanidin 3-*O*-(sinapoil)(sinapoil)diglukozid-5-*O*-glukozid, pri čemu su utvrđene kvantitativne razlike u njihovom sadržaju, kako unutar tako i između pojedinih vrsta roda *Brassica* (Cartea et al., 2011). Tako se na primer, *p*-kumarinski i feruol estri cijanidin-3-soforozid-5-glikozida pojavljuju kao predominantna jedinjenja u karfiolu, dok sinapil estri preovladavaju u crvenom kupusu; cijanidin-3,5-diglikozid nije identifikovan u karfiolu, dok je identifikovan u crvenom kupusu (Lo Scalzo et al., 2008). Značajan sadržaj ovih jedinjenja je prisutan u crvenoj rotkvici. Od ukupno dvanaest identifikovanih acilovanih antocijana, šest su antocijanski glikozidi sa jednom ili dve hidroksicimetne kiseline.

Lignani

Lignani su polifenolna jedinjenja vezana za visok sadržaj vlakana koji je tipičan za žitarice ali su generalno prisutni u svojoj hrani biljnog porekla. Povrće predstavlja njihov glavni izvor u ishrani, pri čemu je u različitim podvrstama kupusa, raštana i prokelja utvrđena visoka količina lignana pretežno tipa pinorezinola i laricirezinola (Landete, 2012) čije su strukture prikazane na *Slici 2.3*.

Tanini i fitinska kiselina

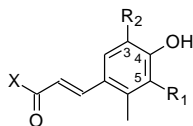
Tanini se generalno dele u dve velike grupe, na rastvorljive tanine- derivate galne kiseline i kondenzovane polimere flavonoida- proantocijanidine. Do sada je najbolje ispitana grupa kondenzovanih tanina koja u svojoj osnovi ima flavan-3-ole. U Brassicaceae povrću je utvrđeno prisustvo fitinske kiseline i kondenzovanih tanina. Soli ove kiseline sa metalima kao i kompleksi sa proteinima su poznati pod nazivom fitati. Kupus i repa-koren poseduju različit sadržaj fitinske, taninske i/ili oksalne kiseline, dok su nerastvorni tanini dominantni u uljanoj repici i kanoli.

**Hinska kiselina**

$R_1 = R_3 = R_4 = R_5 = H$

Hidroksicinamoil hinske kiseline:

svako: $R_n =$ Hidroksicinamoil,
ostali: $R_n = H$

**Hidroksicinamoil :**

X= Hinska kiselina

p-kumaroil: $R_1 = R_2 = H$

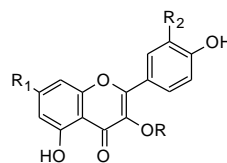
Kafeoil: $R_1 = OH$ $R_2 = H$

Feruoil: $R_1 = OMe$ $R_2 = H$

Hidroksikafeoil: $R_1 = R_2 = OH$

Hidroksiferuoil: $R_1 = OMe$ $R_2 = OH$

Sinapoil: $R_1 = R_2 = OMe$

**Flavonoli i glikozidi flavonola:**

Kemferol: $R = R_1 = R_2 = H$

Kvercetin: $R = R_1 = H$ $R_2 = OH$

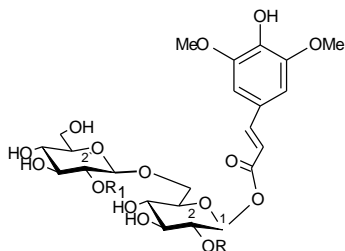
Izorametetin: $R = R_1 = H$ $R_2 = OMe$

Flavonol-3-O-glukozil-7-O-glukozid: R i $R_1 =$ glukozil

Flavonol-3-O-glikozidi: $R_1 = H$ $R_2 =$ glukozil

Flavonol-7-O-glikozidi: $R = H$ $R_1 =$ glukozil

Flavonol-3-O-soforozid-7-O-glukozidi: $R_1 =$ glukozil $R =$ soforozil

**Hidroksicinamoilgentiobizidi:**

R i R_1 : H ili acil

1,2-disinapoilgentiobioza

1-sinapoil-2-feruloilgentiobioza

1,2-diferuloilgentiobioza

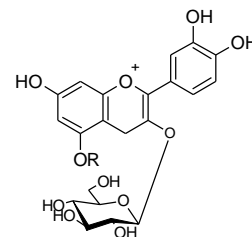
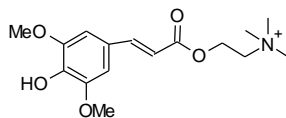
1,2,2'-trisinapoilgentiobioza

1,2'-disinapoil-2-feruloilgentiobioza

1-sinapoil-2,2'-diferuloilgentiobioza

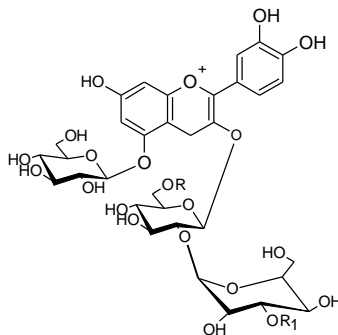
Sinapin

Sinapoil holin

**Glikozidi cijanidina:**

Cijanidin-3-glukozid: $R = H$

Cijanidin-3-glukozid-5-glukozid: $R =$ glukozil

**Acilovani antocijani:**

Cijanidin-3-soforozid-5-glukozid: $R = H$ $R_1 =$ glukozil

Cijanidin-3(6-p-kumaroil)-soforozid-5-glukozid: $R =$ p-kumaroil $R_1 = H$

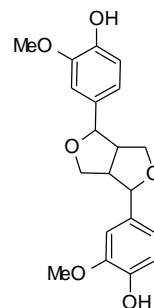
Cijanidin-3(6-feruloil)-soforozid-5-glukozid: $R =$ feruloil $R_1 = H$

Cijanidin-3(6-sinapoil)-soforozid-5-glukozid: $R =$ sinapoil $R_1 = H$

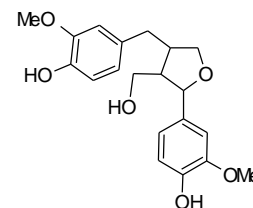
Cijanidin-3(6-p-kumaroil)-soforozid-5(6-sinapoil)-glukozid: $R =$ p-kumaroil $R_1 =$ sinapoil

Cijanidin-3(6-feruloil)-soforozid-5(6-sinapoil)-glukozid: $R =$ feruloil $R_1 =$ sinapoil

Cijanidin-3(6-sinapoil)-soforozid-5(6-sinapoil)-glukozid: $R =$ sinapoil $R_1 =$ sinapoil

**Lignani:**

Pinorezinol



Laricorezinol

Slika 2.3. Strukturne formule derivata hidroksicimetnih kiselina, flavonoida i lignana prisutnih u *Brassica* vrstama (Lin i Harnly, 2009; Lin i Harnly, 2010; Nićiforović i Abramović, 2014; Scalzo et al., 2008; Landete, 2012).

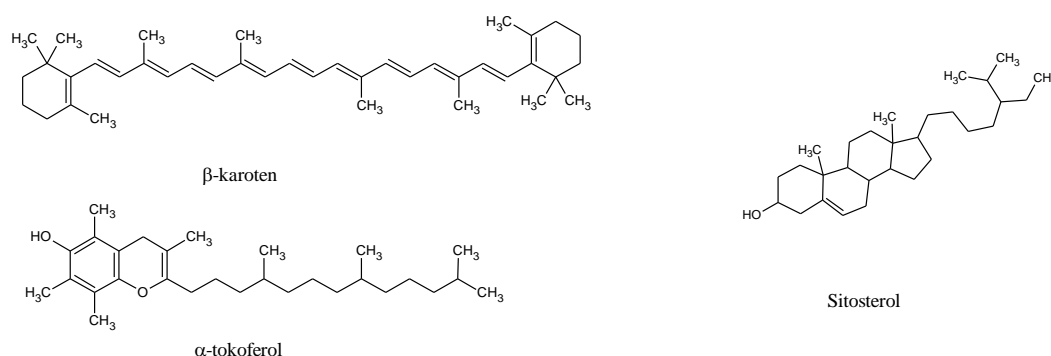
2.2.2.2 Terpenoidi

Terpenoidi su jedna od najbrojnijih klasa prirodnih proizvoda koji pripadaju grupi izoprenopida i čije se strukture izvode iz izoprena. Strukture najznačajnijih terpenoida u biljkama porodice Brassicaceae date su na Slici 2.4.

U biljkama roda *Brassica* je utvrđen visok sadržaj karotenoida i tokoferola, pored vitamina C i folne kiseline. α -tokoferol je dominantni tokoferol vrsta roda *Brassica*, izuzev u karfiolu u kome je uglavnom prisutan γ -tokoferol i uljanjoj repici kod koje je prisutna smeša različitih tokoferola. Pojedine vrste roda *Brassica* sadrže dvostruko veću količinu karotenoida od spanaća. U *B. chinensis*, *B. parachinensis* i *B. pekinensis* je identifikovano 16 karotenoida, a dominantni su lutein i β -karoten. U raštanu je utvrđeno prisustvo luteina uz visok sadržaj karotenoida, uglavnom β -karotena, dok prokelj i zeleni kupus sadrže značajne količine i *trans*- i *cis*- β -karotena. Generalno gledajući, raštan i brokoli predstavljaju najbogatiji izvor liposolubilnih antioksidanata, dok karfiol i kupus imaju relativno nizak sadržaj ovih jedinjenja (Kurilich et al., 1999; Podsedek, 2005).

Filohinon (vitamin K1) učestvuje u transportu u toku fotosinteze i generisanju aktiviranih oblika kiseonika u biljkama pri napadu patogena ili pri stresnim uslovima. Hinoni su reaktivni i odgovorni za tamnjenje presečenog ili povređenog povrća.

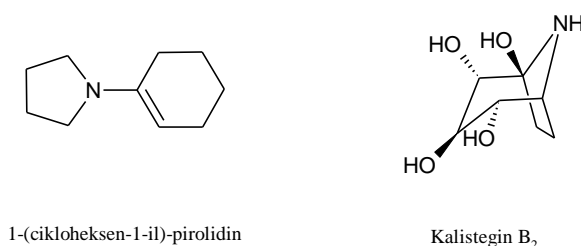
Steroli poput β -sitosterola, kamesterola, brazikasterola i stigmasterola regulišu fluidnost i permeabilnost fosfolipidnih membrana. Prekursori su brazinosteroida, biljnih hormona koji utiču na razvoj embriona, ćelijsku deobu, rast i plodnost biljke. Usled UV zračenja steroli se konvertuju u vitamin D (kalciferol) u telu čoveka koji učestvuju u apsorpciji kalcijuma i rastu kostiju.



Slika 2.4. Pojedini terpenoidi porodice Brassicaceae.

2.2.2.3 Alkaloidi

1-(cikloheksen-1-il)-pirolidin je izolovan iz vodenog ekstrakta lista belog kupusa (Mohammed i Al Maliki, 2014). U jestivim pripadnicima porodice Brassicaceae je utvrđeno i prisustvo tropanskih alkaloida poznatih pod nazivom kalistegini (EFSA CONTAM Panel, 2013). Strukture nekih od najznačajnijih alkaloida u vrstama Brassicaceae prikazani su na slici 2.5.



Slika 2.5. Alkaloidi porodice Brassicaceae

2.2.2.4 Organo-sumporna jedinjenja

Glukozinolati

Organo-sumporna jedinjenja-glukozinolati su velika grupa derivata amino kiselina koji sadrže bočni niz, ostatak β -D-tiogluoze i sulfonovanog oksima. Poznati su još i pod nazivima β -D-tiogluozid-N-hidroksisulfati, (Z) (ili cis)-N-hidroksimosulfatni estri ili S-glukopiranoziltiohidroksimati (Hanschen et al., 2014). Prvi glukozinolati su otkriveni još početkom 19. veka kada je sinigrin izolovan iz semenki crne slačice (*B. nigra*) i sinalbin iz semenki bele slačice (*Sinapis alba*). Do sada je identifikovano više od 200 glukozinolata prisutnih uglavnom u vrstama reda Brassicales. Strukture najznačajnijih glukozinolata u vrstama Brassicaceae date su u *Tabeli 2.1*.

Ova jedinjenja se skladište u vakuolama u obliku kalijumovih soli, zbog prisustva kiselog sulfata, dok im je bočni niz izveden iz metionina, fenilalanina, triptofana ili amino kiselina sa razgranatim bočnim nizom (Moreno et al., 2006). U zavisnosti od prirode bočnog niza, odnosno amino kiseline-prekursora, dele se na: alifatične, aromatične i indolne (*Tabela 2.1*). Oko 50% do sada identifikovanih glukozinolata je alifatično sa izuzetno varijabilnim bočnim nizovima. Progoitrin i sinigrin su glukozinolati identifikovani u belom i crvenom kupusu, prokelju i karfiolu, glukoberin i glukorafanin u brokoliu, crvenom radiču i daikonu, a sinigrin i glukonasturtiin u slačici i renu. Sam sadržaj glukozinolata varira od vrste do vrste, naime produkcija ovih jedinjenja u biljkama je genetski uslovljena, i to prvenstveno u slučaju alifatičnih glukozinolata, dok su na biosintezu indolnih glukozinolata značajno utiču i faktori životne sredine (Dias, 2012). U zavisnosti od varijeteta, uslova gajenja, ali i primenjenih metoda za njihovu analizu, u literaturi se mogu naći različiti podaci za sadržaj glukozinolata poreklom iz metionina i indolnih glukozinolata poreklom iz tritofana (Mithen, 2000). Takođe su utvrđene razlike u sadržaju u autohtonim varijetetima i komercijalnim sortama karfiola poreklom sa Sicilije, posebno izražene u pogledu sadržaja glukorafanina, sa višom akumulacijom u korist lokalnih, autohtonih i obojenih sorti (Branca et al., 2002).

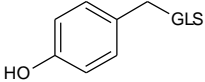
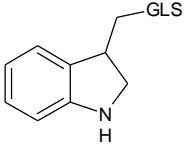
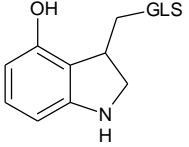
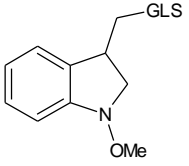
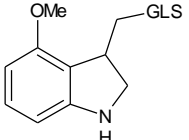
Indolni tip glukozinolata je dominantan u rodu *Brassica*, posebno glukobrazicin (Veroheven et al., 1997; Mithen et al., 2000, Delonga et al., 2007). Kao predominantni glukozinolati u brokoliu su identifikovani glukorafanin, glukobrazicin, progoitrin i glukonasturtiin. U prokelju, karfiolu, portugalskom kupusu i raštanu utvrđeno dominantno prisustvo sinigrina, progoitrina i glukobrazicina (*Tabela 2.1*). Pored dominantnih, svaka biljka sadrži i manju količinu svih ostalih glukozinolata. U biljkama se može nalaziti najviše četiri glukozinolata u značajnijim količinama, pri čemu su maksimalne koncentracije glukozinolata utvrđena u semenu, izuzev u slučaju indol-3-il etil- i N-metoksiindol-3-ilmetil glukozinolata koji se retko nalaze u semenu (Mithen et al., 2000).

Tabela 2.1. Strukturne formule alifatičnih, aromatičnih i indolnih glukozinolata (Mithen et al., 2000; Cartea i Valesco, 2008).

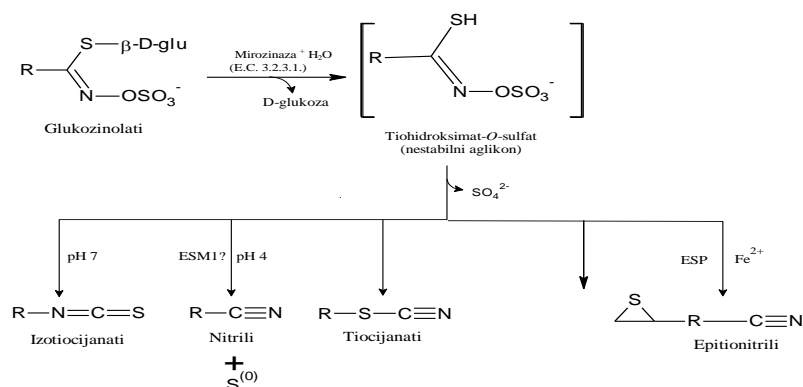
Amino kiselina prekursor	Struktura glukozinolata	Elongacija
Metionin		
Metiltioalkil		n= 1-8 n=1: 3-metiltiopropil (glukoibervirin) n=2: 4-metiltiobutil (glukoerucin)
Metilsulfinilalkil		n= 1-9 n=1: 3-metilsulfinilpropil (glukoiberin) n=2: 4-metilsulfinilbutil (glukorafanin)
Metilsulfonylalkil		n= 1, 2, 6
4-metilsulfinil-3-butenil		
Alkenil		n= 1-3 n=1: 2-propenil (sinigrin) n=2: 3-butenil (glukonapin) n= 3: 4-pentenil (glukobrazikanapin)
2-Hidroksi-3-butenil		progoitrin
2-Hidroksi-4-pentenil		glukonapoleiferin
Hidroksialkil		n= 1-3
Benzoiloksialkil		n= 1-4
Valin		n= 0-2
Izoleucin		n= 0,1
Fenilalanin Fenilalkil		n= 0-4 n= 0: 2-feniletil (glukonasturtiin)

Napomena: Nastavlja se na narednoj strani

Tabela - Nastavak Tabele 2.1.

Tirozin	<i>p</i> -hidroksibenzil	
Triptofan	3-indolilmetil (glukobrazicin)	
	4-hidroksi-3-indolilmetil (4-hidroksiglukobrazicin)	
	1-metoksi-3-indolilmetil (neoglukobrazicin)	
	4-metoksi-3-indolilmetil (4-metoksiglukobrazicin)	

Intenzivno proučavanje glukozinolata traje još od sedemdesetih godina prošlog veka, budući da hidrolitičkom razgradnjom ovih jedinjenja nastaju izotiocijanati i indolna jedinjenja koji utiču na procese u kancerogenezi delovanjem na pojedine enzime, kontrolisanjem apoptoze i blokadom ćelijskog ciklusa (Cartea i Velasco, 2008). Nakon povređivanja biljnog tkiva dolazi do brze hidrolize glukozinolata posredstvom enzima mirozinaze koja uklanja molekul glukoze. Ostatak molekula se konvertuje u tiocijanate, izotiocijanate i nitrile (*Slika 2.6.*) kojima se pripisuje uloga alelo hemikalija koje štite biljke od herbivora, štetočina i patogena. Nastanka nitrila je tipičan za proces hidrolize u u svežem biljnom tkivu, a manje je verovatna posledica termičke razgradnje glukozinolata (Stoewsand, 1995). U zavisnosti od prirode bočnog niza mogu nastati različiti proizvodi hidrolize. Ukoliko aglikon sadrži hidroksilnu grupu (progoitrin), nastali izotiocijanat je nestabilan i ciklizacijom se fomira oksazolidintion. Kod terminalno nezasićenih glukozinolata ili u uslovima pogodnim za formiranje nitrila, molekul glukozinolata zadržava sumpor i dolazi do formiranja episulfida (Mithen et al., 2000). Glukobrazin i drugi indolilmetil glukozinolati kao proizvod hidrolize daju nestabilni izotiocijanat koji se kvantitativno raspada na neorganski tiocijanatni jon uz druge proizvode koji uključuju indol-3-karbinol (I3C). Na *Slici 2.7.* su prikazane degradacija a) alifatičnog glukozinolata sinigrina i b) indolnog glukozinolata, glukobrazicina.



Slika 2.6. Opšta šema enzimske degradacije glukozinolata pod uticajem endogenog enzima mirozinaze (Stoewsand, 1995; Verhoeven et al., 1997; Hayes et al., 2008). Nestabilni aglikon se transformiše u različite proizvode u zavisnosti od prirode bočnog niza R, uslova u kojima se odvija hidroliza i prisutnih kofaktora. ESM1- epitiospecifični modifikator gen; ESP- epitiospecifični protein.

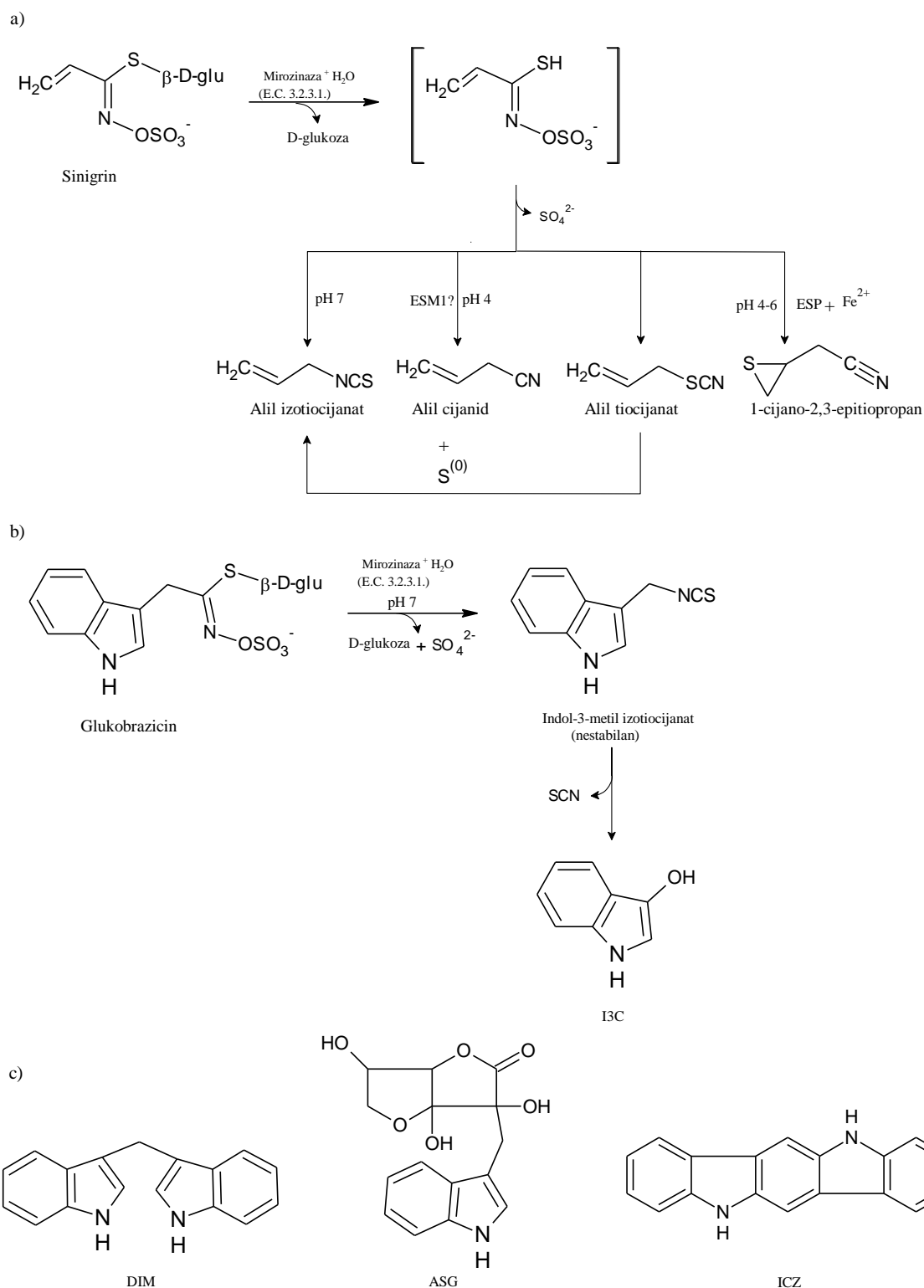
Indolni glukozinolati se nakon povređivanja tkiva razgrađuju preko nestabilnog aglikona indol-3-ilacetotiohidroksimat-*O*-sulfonata do odgovarajućih nitrila ili izotiocijanata, odnosno tiocijanata i epitionitrila. Ravnoteža između formiranja nitrila i pregrađivanja u izotiocijanate je kao i u slučaju ostalih glukozinolata pod uticajem epitiospecifičnog proteina, pH vrednosti i prisustva Fe(II)-jona (Agerbirk et al., 2009). Nezavisno od hidrolize nastaje i indol-3-acetonitril (IAN). Nitrili su relativno stabilni metaboliti ali se pod uticajem nespecifične nitrilaze konvertuju u auksin- indol-3-sirćetnu kiselinu (IAA). U švedskoj repi dolazi do oksidativnog skraćivanja lanaca IAN i IAA i nastaju indol-3-karboksilna kiselina i njen estar metil indol-3-karboksilat. Izotiocijanati nastali degradacijom indolnih glukozinolata su nestabilni, jer se tiocijanatni SCN⁻ joni lako zamenjuje različitim nukleofilima. IMI i I3C generalno mogu stupiti u reakciju sa drugim biljnim metabolitima koji su navedeni u *Tabeli 2.2.*, pri čemu se formiraju različita biološki aktivna jedinjenja od kojih su neka prikazana na *Slici 2.7.* Dva glavna proizvoda IMI su askorbigen nastao u reakciji sa askorbatom, odnosno indol-3-karbinol (I3C) u reakciji sa vodom uz nastanak neorganskog izotiocijanatnog jona pri neutralnoj pH (Agerbirk et al., 2009; Verhoeven et al., 1997). Zahvaljujući tome indol-3-il metilizotiocijanat (IMI) nikada nije detektovan u toku enzimske hidrolize, a 1-metoksiindol-3-il metil izotiocijanat je jedini degradacioni proizvod indolnih glukozinolata čije je prisustvo direktno dokazano.

Tabela 2.2. – Pregleda reakcija indol-3-ilmetilizotiocijanata i/ili indol-3-karbinola

Nukleofilni atom	Reaktant	Proizvod
C	Askorbat	Askorbigen
	I3C, indoli	“Oligomeri”
	IMG	IM-IMG adukt
	I3C, askorbinogen 1-metoksiIMI	ICZ 1-metoksiDIM
N	Amino kiseline	N-adukt
	I3C	N-adukt
O	Alkoholi	Etri
S	Cistein	S-adukti
	Glutation	
C, N, O, S	Proteini	Različito

IM- indol-3-ilmetil; ICZ- indolo[3,2-b] karbazol; DIM- di(indol-3-il) metan;

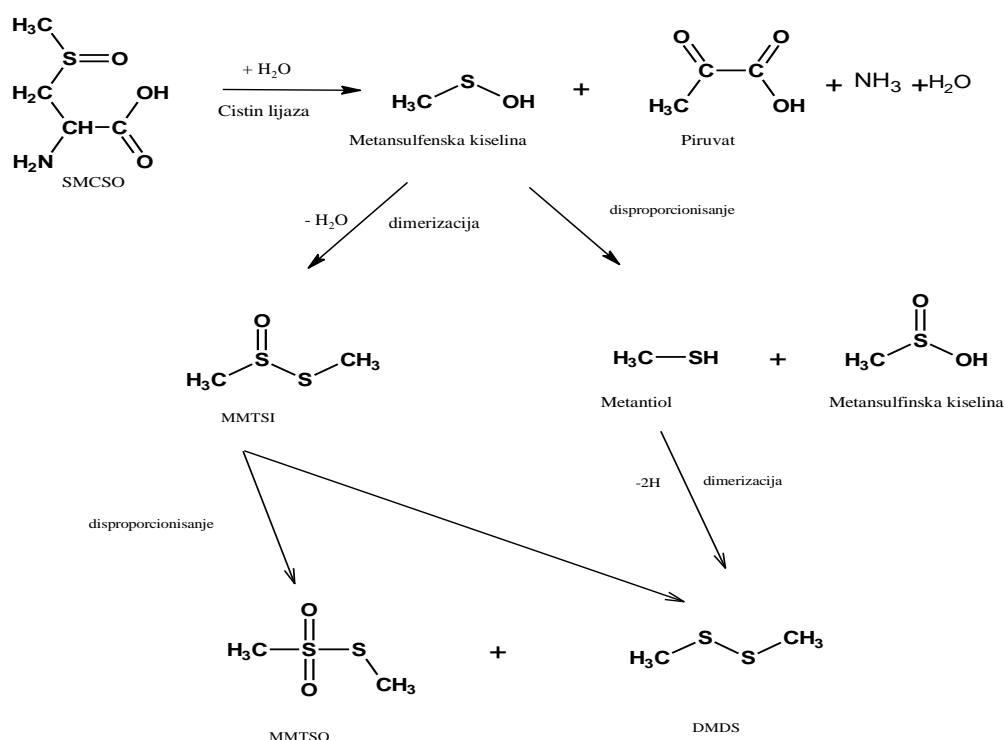
IMI- indol-3-ilmetilijotiocijanat; I3C- indol-3-karbinol; IMG- indol-3-ilmetilglukozinolat



Slika 2.7. Degradacija a) sinigrina; b) glukobrazicina; c) degradacioni proizvodi indolnih glukozinolata: DIM-dimetilinolil; ASG- askorbigen; ICZ- indolo[3,2-b] karbazol

S-metil-L-cistein-sulfoksid (SMCSO)

Prisustvo neproteigene amino kiseline SMCSO u rodu *Brassica* je otkriveno 1956. godine od strane dve nezavisne istraživačke grupe, pri čemu je utvrđeno da sadržaj SMCSO iznosi 1-2% suve mase biljke, u nekim uzorcima čak i do 5%, što je daleko više od utvrđene koncentracije glukozinolata (0.1-0.6%) (Marks et al., 1992; Edmands et al., 201). Ovaj fitoaleksin je prisutan u izuzetno niskoj koncentraciji u semenu biljke koja se povećava u toku rasta i razvoja i dostižu svoj maksimum u mladom lišću. Nakon povređivanja biljnog tkiva delovanjem enzima cistein liaze SMCSO se konvertuje u piruvat, amonijak i alkilsulfinat što je prikazano na *Slici 2.8*. Metansulfinska kiselina je izuzetno reaktivno jedinjenje koje se odmah disproporcioniše na metilmetantiosulfinat, metimetantiosulfonat, dimetil disulfid i metantiol, u zavisnosti od reakcionih uslova (Edmands et al., 20). Marks et al., 1992 su utvrdili da je to strogo vremenski i pH zavisian proces u sokovima *Brassica* povrća. Tiosulfinati kao veoma nestabilnih jedinjenja daljim raspadom daju kompleksne smeše kojima dominiraju mono-, di- i trisulfidi, pri čemu su *Brassica* povrću to različiti metilsulfidi (Munday, 2012).



Slika 2.8. Metabolička degradacija SMCSO (Edmands et al., 2013). MMTSI, S-metilmetantiosulfinat; MMTSO, S-metilmetantiosulfonat; DMDS, dimetil disulfid.

2.3 OKSIDATIVNI STRES I ZNAČAJ I ULOGA REAKTIVNIH KISEONIČNIH I AZOTNIH VRSTA U BIOLOŠKIM SISTEMIMA.

2.3.1 Reaktivne kiseonične (ROS) i azotne vrste (RNS)

Reaktivne kiseonične vrste (ROS) uključuju slobodne radikale kao što su superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil (OH^{\cdot}), hidroperoksi (HO_2^{\cdot}), peroksi (ROO^{\cdot}), lipid peroksi (LOO^{\cdot}) i alkoksi (RO^{\cdot}) radikal, dok u korpus rekativnih azotnih vrsta (RNS) spadaju azot(II)-oksid radikal (NO^{\cdot}) i azot(IV)-oksid radikal (NO_2^{\cdot}) (Sen i Chakraborty, 2011). Pored radikalskih, ROS i RNS podrazumevaju mnoge neradikalske vrste: vodonik-peroksid (H_2O_2), ozon (O_3), singlet kiseonik (1O_2), hipohloritnu kiselina ($HClO$), azotastu kiselinu (HNO_2), peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$), azot(III)-oksid (N_2O_3) i lipid hidroperoksid ($LOOH$) koji uzrokuju dalje slobodno radikalske reakcije, kao i nitrozilovanje i narušavanje biološke funkcije proteina.

U procesu disanja, oko 5% molekulskog kiseonika u toku respiracije u mitohondrijama podleže sukcesivnoj redukciji do molekula vode, pri čemu nastaju reaktivne kiseonične vrste: $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO_2^{\cdot} i OH^{\cdot} radikal. Superoksid anjon radikal kao „primarni“ ROS u interakciji sa drugim molekulima u enzimskim i metal katalizovanim reakcijama dalje generiše „sekundarne“ ROS (Klaunig et al., 2010). Naime, superoksid dismutaza (SOD) vrši dismutacijom superoksida do H_2O_2 iz koga u toku Fentonove reakcije nastaje toksični OH^{\cdot} što je prikazano jednačinama 2.1-2.5.



(Fentonova reakcija katalizovana jonima prelaznih metala Cu^{2+} , $Cr(V)$ i Ni)

Nastali hidroksil, peroksil i superoksid anjon radikal su dovoljno reaktivni i mogu stupiti u interakciju sa biomolekulima ćelije pri čemu nastaju nove reaktivne vrste. Hidroksil radikal se smatra najreaktivnijim oblik aktiviranog kiseonika, pri čemu ćelija proizvodi 50 hidroksil radikala svake sekunde, što odgovara konačnom broju od 4 miliona hidroksil radikala na dan koji moraju biti neutralisani ili nespecifično napadaju druge biomolekule (Ayala et al., 2014). Hidroksil radikal ispoljava aktivnost na malim rastojanjima ($< 1nm$) u odnosu na mesto svog nastanka i smatra se reaktivnom vrstom odgovornom za nastanak neurodegenerativnih poremećaja, kardiovaskularnih bolesti i proces tumorogeneze. Peroksil radikal je snažniji oksidant u odnosu na superoksid anjon radikal, a njegovu metu prvenstveno predstavljaju nezasićeni fosfolipidi ćelijskih membrana stoga remeti njihovo funkcionisanje.

ROS nastaju i u toku normalnih fizioloških, ali i u toku patoloških procesa, a mogu biti i egzogenog porekla. Kontinuirana produkcija ROS i RNS u telu predstavlja rezultat:

- aktivnosti mitohondrija koje generišu konstantno raznovrsne oksidativne radikale i ROS kao toksični otpad
- aktivnosti imunog sistema (generisanje oksidativnih radikala i ROS kao odgovor na patogene od strane imunog sistema ćelije),
- metaboličkih procesa (generisanje iz arahidonske kiseline, trombocita, makrofaga i ćelija glatkih mišića),

- procesa lipidne peroksidacije
- u toku enzimskih oksidacija katalizovanih enzimima mitohondrijalne citohrom oksidaze, ksantin oksidaze,
- procesa inflamacije (rezultat otpuštanje citokina i iniciranja neutrofila, makrofaga i neutrofila),),
- mentalnog i fizičkog stresa pri čemu i hormoni medijatori stresa- kortizol i kateholamin prelaze u destruktivne radikale,
- zagađenja (vazduha usled prisustva azbesta, benzena, CO, hlora, formaldehida, ozona, toluena; prisustva rastvarača (sredstva za čišćenje, lepak, bojenje, razređivači, parfemi i pesticidi) i vode (hloroform i ostali trihalometani); sagorevanja organskih materija u toku kuvanja, šumskih požara, vulkanske aktivnosti,
- zračenja (UV, rendgenski x-zraci, γ -zraci, mikrotalasi),
- ishrane (prisutvo aditiva u hrani, alkohol, kafa, hrana životinjskog porekla sa roštilja, pržena, grilovana ili obrađivana na visokim temperaturama, potamnela i zagorela hrana, herbicidi, hidrogenizovana biljna ulja, pesticidi, šećer i industrijski obrađena hrana sa visokim nivoom lipid peroksida),
- unosa toksina i lekova (ugljen tetrahlorid, parakvat, benzo piren, anilinske boje, toluen, lekovi poput adriamicina, bleomicina, mitomicina C, nitrofurantoina, hlompromazina i sl.)
- i ostalih faktora (izduvni gasovi, pušenje).

Većina ćelija poseduje sposobnost produkcije superoksida, vodonik peroksida i NO radikala, dok ostale imaju induktivni ROS/RNS sistem otpuštanja. Pozitivan efekti pri niskim i umerenim koncentracijama ovih vrsta se uočavaju prilikom odbrane od patogena u toku fagocitoze, ubijanja malignih ćelija od strane makrofaga i citotoksičnih limfocita, detoksifikacije od ksenobitika na citohromu P450, generisanja ATP-a u mitohondrijama (produkcija energije), ćelijskog rasta, indukcija mitotičkih odgovora i brojnih drugih procesa. Dovoljno niske koncentracije utiču i na ćelijski signaling i na aktivaciju nekih citokina i signaling faktora rasta, nereceptorske tirozin kinaze, fosforilaciju tirozina proteina, oslobađanje kalcijuma iz intracelularnih skladišta i nuklearni transkripcioni faktor Nrf2.

Brojni literaturni podaci ukazuju i na sve veći značaj ROS u ulozi kritičnih signalnih molekula za ćelijsku proliferaciju i preživljavanje. Takođe, ROS pomažu proces transkripcije gena i regulišu aktivnost solubilne guanilat ciklaze. NO radikal koga otpuštaju ćelije endotela je ključan molekul u regulaciji krvnog pritiska pomoću vaskularnih glatkih mišića, adheziji leukocita, agregaciji trombocita, angiogenezi i trombozi. U neuronima igra ulogu neurotransmitera odgovornog za plastičnost neurona, dok je NO otpušten od strane makrofaga ključni medijator imunih odgovora. U nekim novijim istraživanjima potvrđeno je da ROS poput superoksida i peroksida predstavljaju sekundarne glasnike ali su isto tako i toksični pri pojačanoj akumulaciji (Liochev, 2013).

2.3.2 Uloga ROS u razvoju oksidativnog stresa i antioksidanti odbrambeni mehanizam

U zdravim ćelijama postoji balans između produkcije slobodnih radikala i antioksidantnog odbrambenog sistema ćelije. Ukoliko dođe do disbalansa ili izostane

normalna aktivnost sistema za reparaciju i zamenu oštećenja uzrokovanih slobodnim radikalima, koncentracija ROS i ostalih oksidanata prevazilazi kapacitet ćelije da pruži efikasan antioksidantni odgovor što odgovara stanju oksidativnog stresa (Sadi i Sadi, 2010; Ray et al., 2012). Oksidativni stres uzrokuje različita oštećenja ćelijskih struktura koje uključuju lipide, proteine i nukleinske kiseline, potom i narušavanje redoks homeostaze i nakupljanja oštećenih molekula u ćeliji. Kao rezultat navedenih promena javlja se hronična inflamacija, koja predstavlja uvod u nastanka kancera, kardiovaskularnih, neurodegenerativnih i inflamatornih oboljenja i intenzivira proces starenja.

Čovek je razvio veoma sofisticirane mehanizme zaštite od viših koncentracija ROS. Ćelije se brane od oksidativnog stresa putem kombinacije fizičkih, preventivnih, reparacionih i antioksidantnih odbrambenih mehanizama. Antioksidantni odbrambeni sistem je glavni protektivni mehanizam, u kome ćelija koristi antioksidante da bi se zaštitila od oksidanata i elektrofila (Magesh et al., 2012). Na osnovu izvora, prirode i mehanizma dejstva, antioksidanti se dele na endogene (metaboličke i enzimske) i egzogene (nutritivne antioksidante) kao i na direktne i indirektno, odnosno bifunkcionalne antioksidante. Pregled različitih vrsta antioksidanata je dat u *Tabeli 2.3*.

Tabela 2.3. Klasifikacija antioksidanata na osnovu prirode, izvora i mehanizma dejstva.

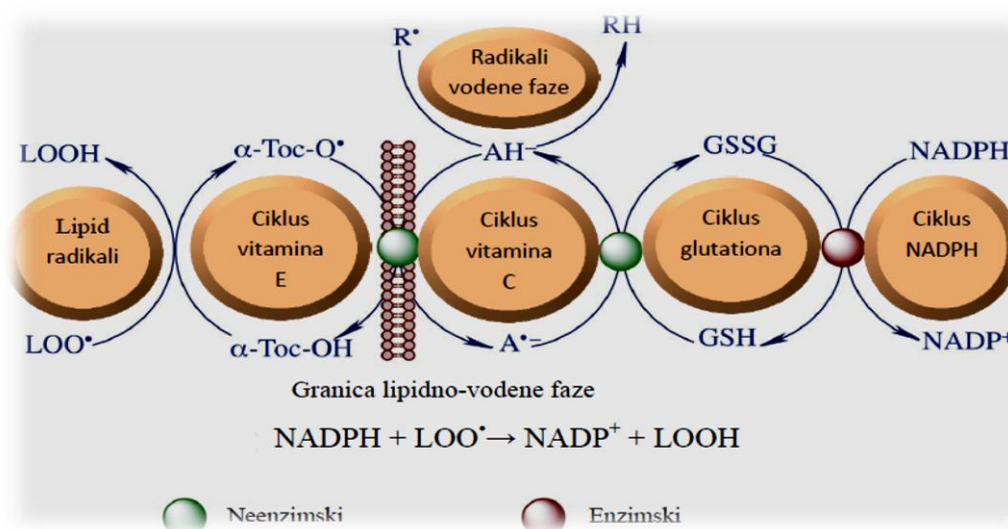
A. Klasifikacija na osnovu prirode	
1. Enzimski antioksidanti	Superoksid-dizmutaza (SOD), katalaza (CAT), Glutation-peroksidaza (GPx), glutacion-reduktaza (GR)
2. Neenzimski antioksidanti	
a. Metabolički antioksidanti	Redukovani glutacion (GSH), liponska kiselina, L-arginin, kofeofilin Q10, melatonin, mokraćna kiselina, bilirubin, metal-helirajući proteini, transferin, itd.
b. Nutritivni antioksidanti	Vitamin C, vitamin E, karotenoidi, metali u tragovima (selen, mangan, cink), flavonoidi, omega-3 i omega-6 masne kiseline?
B. Klasifikacija na osnovu izvora	
1. Endogeni antioksidanti	Bilirubin, glutacion, liponska kiselina, N-acetil cistein, NADPH; NADH; koenzim Q10, mokraćna kiselina, enzimi- SOD, CAT, GPx, GR
2. Dijejetski antioksidanti	Vitamin C, vitamin E, beta karoten i ostali karotenoidi i oksikarotenoidi (likopen, i lutein), polifenoli (flavonoidi-flavoni, flavonoli i proantocijanidini)
3. Metal vezujući proteini	Albumin (bakar), ceruloplazmin (bakar), metalotionein (bakar), feritin (gvožđe), mioglobin (gvožđe), transferin (gvožđe)
C. Klasifikacija na osnovu mehanizma dejstva	
1. Katalitički sistemi	koji neutrališu ili vrše skretanje ROS SOD, CAT, GPx
2. Vezivanje/inaktivacija metalnih jona	sprečava nastanak ROS u Haber Weiss-ovoj reakciji Feritin, ceruloplazmin, katehini
3. Molekuli samoubice, scavenging prekidanje lančanih reakcija, uništenje ROS	Vitamin C, vitamin E, mokraćna kiselina, glutacion, flavonoidi
4. Gašenje ROS, hemijsko hvatanje u cilju apsorbovanja energije	Karotenoidi, antocijanidini

Direktni antioksidanti su redukujuće, kratko-živeće vrste, koje se troše u toku oksidacije i moraju se regenerirati da bi se ponovo aktivirale u zaštiti od oksidativnog stresa. Za razliku od njih, indirektni antioksidanti koji mogu ali i ne moraju biti redukujuće vrste, ispoljavaju antioksidantnu aktivnost putem nad-regulacije različitih citoprotektivnih jedinjenja i proteina kao što su NAD(P)H, NAD(P)H: hinon-

oksidoreduktaza 1 (NQOR1), superoksid-dizmutaza (SOD), glutation-S-transferaza (GST), glutation-peroksidaza (GPx), hem oksigenaza-1 (HO1), glutamat-cistein ligaza (GCL), katalaza (CAT) i tioredoksin (Trx). Ova jedinjenja su poznata i kao „ultimativni antioksidanti“ jer imaju relativno dug period poluživota, ne troše se u toku antioksidantne aktivnosti, mogu da katalizuju raznovrsne reakcije detoksifikacije i vrše regeneraciju nekih od direktnih antioksidanta.

2.3.2.1 Antioksidantna mreža

Na *Slici 2.9.* je prikazana antioksidantna mreža ćelije koja podrazumeva interakcije lipid radikala, hidro i liposolubilnih antioksidanata i njihovu vezu sa redukujućim sistemom ćelije (Cadenas et al., 2016). Dihidroliponska kiselina nastala iz liponske kiseline na kompleksima dehidrogenaza α -keto kiselina mitohondrija i delovanjem tioredoksina je zajednički redoks partner više prirodnih antioksidanata i redoks ciklusa ćelije koje povezuje u jedinstvenu antioksidantnu mrežu. Brojne supstance funkcionišu kao antioksidanti koji u niskim koncentracijama inhibiraju ili odlažu proces oksidacije, pri čemu često sami bivaju oksidovani.



Slika 2.9. Antioksidantna mreža (Cadenas et al., 2016). Antioksidantna mreža predstavlja mrežu ne-redoks i redoks antioksidanata koji deluju ili kao gasioci slobodnih radikala ili kao redoks sistemi. α -tokoferol, hidrofobni antioksidant iz lipidnog dvosloja ćelije i hidrofилна L-askorbinska kiselina iz citoplazme, u međusobnoj kooperaciji pružaju zaštitu od ROS i u lipidnoj, i u vodenoj fazi. Dihidroliponska kiselina održava koncentraciju redukovanoг glutationa (GSH), tioredoksina, L-askorbinske kiseline, tokoferola i ubihinona. Nakon hvatanja peroksil radikale (LOO[•]) od strane α -tokoferola, nastali α -tokoferil radikal može biti redukovан pomoću GSH, ubihinona, askorbata i dihidroliponske kiseline, koja može da redukuje sve navedene antioksidante na račun NADPH, pri čemu se sama regeneriše pomoću lipoamid reduktaze (Sadi i Sadi, 2010). Neto reakcija: $\text{NADPH} + \text{LOO}^{\bullet} \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{LOOH}$; LOO[•]- lipid peroksil radikal; LOOH- lipid hidroperoksid; α -Toc-O[•]- α -tokoferil radikal; α -Toc-OH- α -tokoferol; R[•]-hidrosolubilni radikali; AH- askorbinska kiselina; A⁻- askorbil radikal; GSH- redukovani glutaton; GSSG- oksidovani glutation.

Iako od esencijalnog značaja u zaštiti od oksidativnog oštećenja, nenezimski antioksidanti nemaju potpuni kapacitet zaštite od konstantne produkcije slobodnih radikala, tačnije superoksida i vodnik peroksida. Ćelija je evolutivno razvila zaštitu u obliku antioksidantnih enzima koji održavaju ravnotežnu koncentraciju radikala i peroksida u skladu sa njenim potrebama. Indukcija, inhibicija i aktivacija ovih enzima je strogo kontrolisana putem transkripcionih, translacionih i post-translacionih mehanizama. U

antioksidantne enzime spadaju pre svega superoksid-dizmutaza (SOD), glutation-peroksidaza (GSHPx) i katalaza (CAT), kao i enzimi faze II detoksifikacije od ksenobiotika, odnosno različite glutation-S-transferaze. SOD uklanjanja superoksid anjon radikala u reakciji dismutacije pri čemu nastaje manje toksičan oblik- vodonik-peroksid koji se posredstvom CAT konvertuje u vodu i kiseonik. CAT takođe vrši i konverziju organskih peroksida u alkohole i vodu.

Izuzetno značajno mesto u antioksidantnoj odbrani zauzimaju enzimi redoks ciklusa glutationa: Glutation-peroksidaza (GSH-Px), glutation-S-transferaza (GST) i glutation-reduktaza (GR). GSH-Px oksiduje redukovani glutation GSH u oksidovan oblik GSSG, pri čemu eliminiše vodonik peroksid koji se konvertuje u vodu, dok iz organskih peroksida (hidroperoksidi masnih kiselina, fosfolipida i holesterola) nastaju manje toksični alkoholi. GST je ključni enzim ćelijske detoksifikacije koji omogućava vezivanje, odnosno konjugaciju ksenobiotika sa GSH koji se u konjugovanom obliku i metabolišu. *Alfa*, *mu* i *pi* izooblici ovog enzima su najzastupljeniji kod sisara, a porast njihovog nivoa nakon izlaganja ksenobiotcima se regulišu preko antioksidantnih responsivnih elemenata (ARE). *Sigma* forma ovog enzima učestvuje u sintezi prostaglandina, dok *teta*, *pi* i *tau* izoforme redukuju organske hidroperoksidge nastale peroksidacijom masnih kiselina do odgovarajućih monohidroksilnih alkohola te na taj način deluju protektivno pri lipidnoj peroksidaciji. GR redukuje GSSG u GSH uz utrošak NADPH, odnosno omogućava održavanje neophodnog nivoa redukovanog glutationa GSH pošto je visok odnos GSH/GSSG neophodan za efikasnu zaštitu od oksidativnog stresa.

Pored enzima redoks ciklusa tiola značajno mesto u antioksidantnoj odbrani zauzimaju i tiol specifični antioksidanti- tioredoksini (Trx) i peroksiredoksini (Prx). Trx su proteini koji omogućavaju reakcije tioldisulfidne razmene cisteina sa drugim proteinima. Zajedno sa tioredoksin reduktazom (TR) koja redukuje oksidovane tirole, čine jedinstveni oksido-redukcioni sistem, koji poseduje i antioksidatnu i redoks regulatornu ulogu. Peroksiredoksini (Prx) su tiol zavisni antioksidanti i čine porodicu peroksidaza koje redukuju vodonik peroksid i organske peroksidge uz utrošak NADPH, zajedno sa sistemom tioredoksina. Međutim oni sporije od ostalih peroksidaza katalizuju razgradnju H₂O₂. Preciznije pri niskim koncentracijama H₂O₂ ovi enzimi su odgovorni za njegovo uklanjanje, dok pri visokim koncentracijama vodonik peroksida bivaju delimično inhibirani što omogućava ekspresiju gena prouzrokovanu redoks regulacijom pomoću procesa fosforilacije i defosforilacije.

2.3.2.2 ROS i redoks homeostaza

Redoks status ćelije i njegove oscilacije određuju funkcionisanje ćelije, a održavanje redoks homeostaze je u tesnoj povezanosti sa odnosom produkcije i uklanjanja slobodnih radikala od strane antioksidanasa. Paradoksalno, i različite aktivnost posredovane ROS štite ćeliju od ROS indukovanog oštećenja, i ponovo uspostavljaju ili održavaju redoks homeostazu. Naime, utvrđeno je da ekspresiju gena nekoliko enzima i proteina regulišu antioksidanati, oksidanati i ostali faktori koji utiču na redoks status ćelije (Sadi i Sadi, 2010). Za direktnu modulaciju ćelijskog metabolizma su odgovorni redoks senzitivni metabolički enzimi, dok redoks senzitivni signalni proteini ispoljavaju svoju funkciju indirektno preko toka signalnih elemenata kao što su kinaze, fosfataze i transkripcioni faktori. ROS mogu da oksiduju direktno ili indirektno ove signalne proteine i na taj način usporavaju ili ubrzavaju tok signalnih puteva u zavisnosti od redoks statusa ćelije.

Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein)- nuklearni transkripcioni factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2)- antioksidantni responsivni elementi ARE je glavni signalni put koji reguliše bateriju citoprotektivnih proteina na transkripcionom nivou, a aktivira se na brojne načine prilikom održavanje ćelijske redoks homeostaze i metabolizma (Magesh et al., 2012). U suštini, ovaj signalni put indukuje adaptivni odgovor na oksidativni stres koji bi u protivnom predstavljao uvod u inflamatorna oboljenja kao što su kancer, Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest i dijabetes.

2.3.3 Molekulske osnove starenja i nastanka hroničnih degenerativnih oboljenja

Brojne teorija nastale kao rezultat pokušaja da se odgovori na dva pitanja: Zašto starimo i kako starimo? (Jin, 2010; Anisimov, 2010). Moderne teorije buhvataju dve velike grupe, a to su:

- stohističke teorije- teorija somatskih mutacija, teorija katastrofalne greške, teorija DNK oštećenja-reparacije, teorija oštećenja proteina, teorija nastanka ukrštenih veza, teorija habanja (wear and tear) i
- teorije programiranog starenja- genetička teorija, teorija gena smrti, teorija selektivne smrti, teorija skraćanja telomera, teorija diferencijacije poremećaja, teorija akumulacije „otpada“, neuroendokrini, imunološka i metabolička, teorija slobodnih radikala, teorija sata starenja i evolucione teorije.

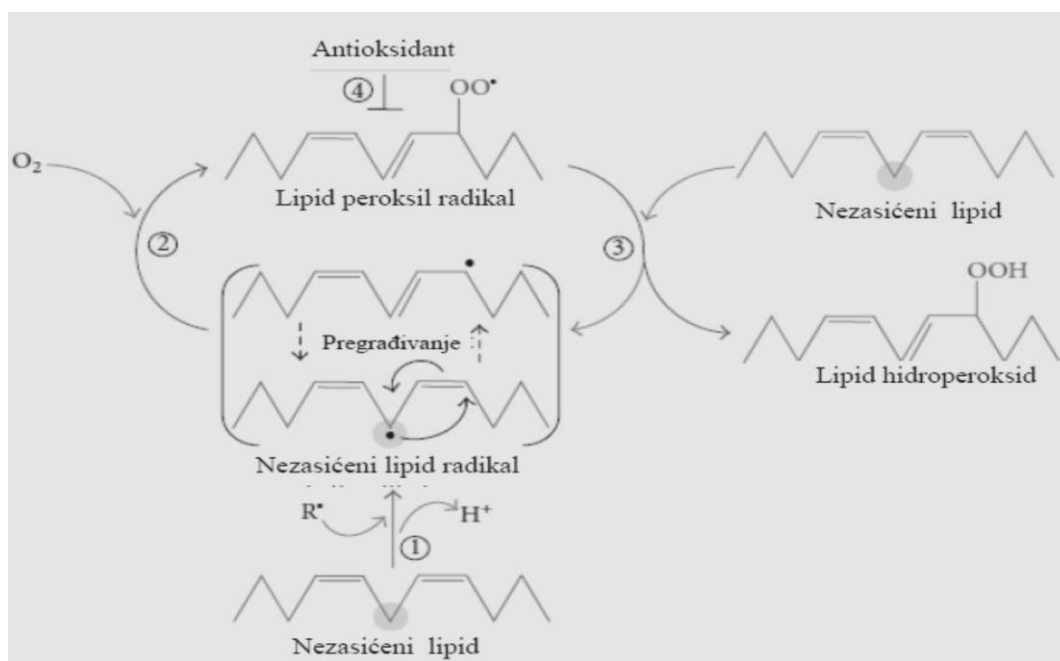
Sve navedene teorije, izuzev metaboličke, su teorije sa više ili manje elemenata potvrđenih eksperimentalnom putem ali ni jedna od navedenih ne pruža kompletne odgovore, stoga je njihova kombinacija najverovatnije put otkrivanja uzroka i načina procesa starenja kao i razvoja hroničnih degenerativnih oboljenja (Jin, 2010; Anisimov, 2010).

Savremena interpretacija teorije slobodnih radikala kao jedno od ključnih mesta ističe balans između toksičnih i pozitivnih efekata reaktivnih kiseoničnih (ROS) i azotnih vrsta (RNS) pretežno nastalih pri sintezi ATP-a u mitohondrijama (Sen i Chakraborty, 2011). U zavisnosti od stepena produkcije ROS i RNS ove organele mogu biti generator i izvor oksidativnog stresa i na taj način doprineti oštećenju ćelije i procesu starenja.

Prema mitohondrijalnoj teoriji starenja, mitohondrije su posebno osetljive na oštećenja zbog odsustva enzime neohodnih za reparaciju DNK, usled čega tokom vremena gube svoju fiziološku ulogu i pojačano produkuju ROS. Pojačana produkcija slobodnih radikala nastaje kao posledica poremećaja oksidativnog fosforilovanja što konstantno izlaže mitohondrije oksidativnom napadu, a disbalans između ovog procesa i mreže ćelijske antioksidantne odbrane dalje vodi u oštećenja DNK, lipida i proteina (Finley et al., 2015). Smatra se da je ovaj mehanizam uključen u proces starenja kao i u nastanak mnogih hroničnih oboljenja poput kancera i kardiovaskularnih bolesti. Oksidativna modifikacija proteina koji su najzastupljeniji molekuli u ćeliji je redovni pratilac različitih neurodegenerativnih oboljenja poput Huntingtonove i Alchajmerove bolesti i mnogih drugih za starenje vezanih bolesti (Höhn et al., 2013). Značajan doprinos daje i proces lipidne peroksidacije do koga dolazi usled napada radikalskih i neradikalskih vrsta na polinezasićene masne kiseline (omega-3 i omega-6), fosfolipide i holesterol što može dovesti do oštećenja na molekulskom nivou i biti uvod u mnoga patološka stanja i starenje. Faze procesa lipidne peroksidacije su prikazane na *Slici 2.10*.

Usled peroksidacije lipida ćelijskih membrana u zavisnosti od stanja i kapaciteta za reparaciju ćelije, krajnji ishodi ovih promena mogu biti preživljavanje ćelije ili

indukovana ćelijska smrt. U fiziološkim uslovima i pri niskom intenzitetu lipidne peroksidacije, stimuliše se održavanje i preživljavanje ćelije preko antioksidantnog odbrambenog sistema ili aktivacijom signalnih puteva koji regulišu aktivnost antioksidantnih proteina što kao posledicu ima adaptivni odgovor ćelije na stres. Međutim, pri srednjem ili visokom intenzitetu lipidne peroksidacije (toksični uslovi) u ćeliji se indukuje apoptoza ili nekroza, odnosno dolazi do pojave programirane ćelijske smrti. Uz glavni proizvod lipid hidroperoksid nastaju i mnogi drugi sekundarni proizvodi lipidne peroksidacije od kojih je malonil dialdehid (MDA) najsnažniji mutageni proizvod lipidne peroksidacije, dok je 4-hidroksinonenal (4HNE) najtoksičniji proizvod.



Slika 2.10. Proces lipidne peroksidacije (Ayala, 2014). U fazi inicijacije prooksidant vrši apstrakciju alil voodnika i nastaje ugljenik centrirani lipid radikal koji se pregrađuje u stabilniji konjugovani dien (reakcija 1). U fazi propagacije lipid radikal brzo reaguje sa kiseonikom i formira se lipid peroksil radikal (reakcija 2) koji potom oduzima vodonik novom molekulu lipida i formira se novi lipid radikal i lipid hidroperoksid (reakcija 3). U fazi terminacije antioksidant- vitamin E donira voodnikov atom lipid peroksil radikal u pri čemu se konvertuje u α -tokoferilradikal koji sa novim lipid peroksil radikalom daje neradikalni proizvod (reakcija 4).

U interpretaciji procesa starenja i određenih patoloških stanja kao što je dijabetes tipa 2 sve više pažnje se poklanja i procesu glikacije koji se odvija u fiziološkim uslovima *in vivo*, gde u toku Mailliard-ove reakcija (reakcija tamnjenja) dolazi do neenzimskog vezivanja redukujućih šećera za amino grupe proteina, lipide i nukleinske kiseline pri čemu nastaju AGEs- advanced glycation end products ili glikotoksini koji predstavljaju snažne oksidujuće agense (Uribarri et al., 2010; Aćimović et al., 2012). Osim u telu čoveka, krajnji proizvodi glikacije su prisutni i u hrani, posebno animalnog porekla koja sadrži visok procenat masti i proteina, pri čemu se njihov nastanak dodatno intenzivira prilikom termičke obrade. U uslovima vrlo visoke koncentracije u krvotoku i u tkivima, AGEs se vezuju za receptore na površini ćelije i dovode do umrežavanja telesnih proteina, uzrokujući na taj način alteraciju njihove strukture i funkcije, što kao posledicu ima pojavu oksidativnog stresa i inflamacije. U prisustvu ROS i redoks aktivnih metala nastanak AGE-s se ubrzava i tada nastaju proizvodi poznati pod nazivom krajnji proizvodi gliksidacije (Gkogkolou i Böhm, 2012). Do sada su najintenzivnije proučavani relativno inertan i stabilan karboksimetil lizin (CML) i izuzetno reaktivni derivati metil gliksala (MG) koji mogu nastati kao rezultat glikacije proteina i lipida. Direktna

korelacije unosa AGEs iz hrane, sa prisutnim proizvodima glikacije, CML i MG u krvotoku kao i sa markerima oksidativnog stresa je utvrđena u toku kliničkih ispitivanja, a na osnovu kliničkih i animalnih studija je utvrđeno da je moguće odlaganja pojave hroničnih oboljenja i procesa starenja kod životinje i najverovatnije kod čoveka putem isključenja iz ishrane proizvoda bogatih AGEs.

2.4 Kancerogeneza

Kancer nastaje kao rezultat abnormalne proliferacije ćelija bilo koje vrste, otuda postoji na stotine vrsta kancera međusobno različitih i po ponašanju kao i u odgovoru na primenjenu terapiju (Cooper, 2000). Za razliku od ograničenih, benignih tumora, maligni tumori vrše invaziju na okolno zdravo tkivo i šire se po telu putem krvi ili limfe, odnosno dolazi do formiranja metastaza. Većina kancera pripada jednoj od tri osnovne grupe: karcinomi, sarkomi i leukemije/limfomi. Karcinom predstavlja malignitet epitelnih ćelija koji obuhvata približno 90% humanih kancera, dok je pojava sarkoma- solidnog tumora vezivnog tkiva mišića, kostiju, hrskavica i fibroznog tkiva veoma retka kod čoveka. Incidenca leukemije i limfoma, poreklom iz ćelija krvi i imunog sistema iznosi približno 8%. Tumori dojke, prostate, pluća, kolona i rektuma čine gotovo polovinu svih kancera, dok je kancer pluća najsmrtonosniji tip maligniteta i uzročnik oko 30% smrtnosti od malignih oboljenja.

Proces karcinogeneze započinje abnormalnom proliferacijom jedne ćelije koja u startu ne poprima maligne odlike, već se proces odvija u nekoliko koraka u kojima ćelija progenitor postaje maligna kroz seriju alteracija. Zbog toga je pojava kancera tipična za pozno životno doba, i njegova incidenca se uvećava sa starenjem. Incidenca kancera kolona se uvećava deset puta između tridesete i pedesete godine, a nakon toga sledi još jedno desetostruko uvećanje između pedesete i sedamdesete godine života kao rezultat akumuliranja različitih abnormalnosti.

Na ćelijskom nivou razvoj kancera podrazumeva mutacije i selekciju ćelija sa povećanim kapacitetom za proliferaciju, preživljavanje, invaziju i metastaze (Cooper, 2000). Klonalna selekcija intenzivira i ubrzava rast tumora koji postaje sve maligniji. Prednost imaju ćelije koje su izgubile komponente za mehanizam ćelijske smrti ili sa prekomernom ekspresijom inhibitora ćelijske smrti (Gerl i Vaux, 2005).

Različiti uzročnici, karcinogeni uzrokuju pojavu maligne alteracije, ali je veoma mala verovatnoća da proces karcinogeneze uzrokuje jedan samostalan agens. Zračenje, različite hemijske supstance i virusi pripadaju karcinogenima koji vrše indukciju pojave kancera, dok pored njih postoje i promoteri tumora koji stimulišu ćelijsku proliferaciju. Forbol estri stimulišu proliferaciju ćelija putem aktivacije protein kinaze C, dok estrogen stimuliše razvoj tumora endometrijuma materice, pri čemu izlaganje povišenom nivou estrogena dovodi do nastanka kancera tipično u periodu menopauze ukoliko se primenjuje supstitucionna terapija sa visokim dozama ovog hormona.

Ćelije kancera ispoljavaju niz abnormalnosti vezanih za mehanizme regulacije proliferacije, diferencijacije i preživljavanja. Za razliku od normalnih ćelija, proliferacija malignih ćelija nije zavisna od dostignute gustine ćelija, zahteva redukovano prisustvo faktora rasta, a u nekim slučajevima i same maligne ćelije proizvode ove faktore i dolazi do konstante autostimulacije podele ćelija. Posledica toga jesu poremećaji u ćelijskom signalingu, gde su ćelije kancera manje podložne interakcijama, odnosno ograničavanju od strane drugih ćelija kao i interakcijama ćelija i matriksa i odlikuju se manjom adherentnošću od normalnih ćelije usled čega i poseduju sposobnost invazije i formiranja metastaza. Usled smanjene adherentnosti javljaju se i promene u morfološkim

karakteristikama i citoskeletu. Maligne ćelije luče proteaze koje vrše digestiju komponenata matriksa što takođe dovodi do invazije zdravih tkiva, a izlučeni faktori rasta uzrokuju pojavu angiogenze, koja pospešuje rast i pojavu metastaza. Pored toga razvoj malignih ćelija je najčešće blokiran u ranoj fazi diferencijacije i one ne podležu programiranoj ćelijskoj smrti- apoptozi koja predstavlja integralni deo diferencijacije, pa imaju produženi životni vek koji doprinosi rastu tumora. Sposobnost preživljavanja u nedostatka faktora rasta dovodi do pojave rezistentnosti na zračenje i hemoterapije koji deluju putem oštećenja DNK.

2.4.1 p53

p53 protein je transkripcioni faktor koji reguliše faze ćelijskog rasta i aresta, i koji se održava na niskom nivou u zdravim ćelijama (Elmore, 2007, Parthasarathy i Philipp, 2012). Tri gena p53, p63 i p73 vrše podešavanje ciklusa ćelijskog rasta i apoptoze nakon oštećenja DNK (Saeidnia i Abdollahi, 2013) a p53 je najčešće mutirani gen u procesu tumorogeneze, odgovoran za aktivaciju DNK reparacionih proteina, održavanje ćelijskog ciklusa u G1/S tački za prepoznavanja oštećenja DNK i iniciranje apoptoze ukoliko se registruje nepopravljivo oštećenje. Za sada nije poznato koja aktivnost, indukcija apoptoze ili arest ćelijskog ciklusa je presudna za supresiju tumora od strane p53 (Gerl i Vaux, 2005).

Prisustvo mutiranog p53 je utvrđeno u preko 50% tipova humanih kancera. Posledice oštećenja ovog gena je redukcija supresije tumora, a mogu ga oštetiti zračenje, različite hemikalije, virusi kao što je humani papiloma virus (HPV). Ljudi koji su nasledili samo jednu funkcionalnu kopiju ovog gena najčešće razvijaju Li-Fraumeni sindrom koji dovodi do pojave kancera u mlađim godinama. Ataksija telangiektazija mutirani gen (ATM) je takođe učesnik tumorogeneze preko ATM/p53 signalnog puta. ATM gen kodira protein kinazu koja je supresor tumora. p53 sistem za kontrolu ćelijskog rasta i aresta može biti inaktiviran na brojne načine putem somatskih genetskih, epigenetičkih alteracija.

2.4.2 Programirana ćelijska smrt

Apoptoza ili programirana ćelijska smrt predstavlja genetski determinisano eliminisanje ćelija. Javlja u toku procesa razvoja i starenja kao deo homeostaznog mehanizma za održavanje populacije ćelija i tkiva, kao odbrambeni mehanizam u toku imunih reakcija i prilikom oštećenja ćelija usled pojave bolesti ili delovanja noksioznih agenasa. Ona predstavlja vitalnu komponentu funkcionisanja ćelije, razvoja i funkcionisanja imunog sistema, hormonski zavisne atrofije, razvoja embriona i hemijski indukovane ćelijske smrti (Elmore, 2007). Neprikladna apoptoza, isuviše jakog ili slabog intenziteta se nalazi u osnovi mnogih neurodegenerativnih oboljenja, ishemičnih oštećenja, autoimunih poremećaja i različitih tipova kancera. Zbog svoje modulatorne uloge u životu i smrti ćelija, apoptoza poseduje i ogroman terapeutski potencijal.

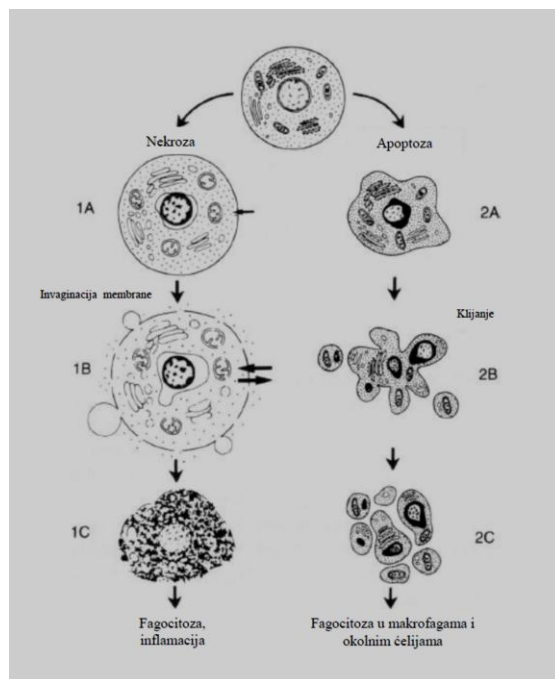
U toku rane faze apoptoze dolazi do skupljanja volumena ćelija i piknoze, pojave skupljanja ćelijskog jedra i kondenzacije hromatina u čvrstu amorfnu masu (Majno i Joris, 1995; Gerl i Vaux, 2005, Elmore, 2007). Piknoza je karakteristična promena za apoptozu, nakon koje sledi invaginacija plazmatskih membrana, karioreksa i separacije ćelijskih fragmenata u apoptotična tela u procesu „klijanja“. Apoptotična tela bivaju fagocitovana od strane makrofaga, ćelija parenhima ili neoplastičnih ćelija i degradirana u fagolizozomima. Apoptozu ne prati procesa inflamacije pošto nema izlivanja sadržaja

ćelije u okolno tkivo, brza fagocitoza sprečava pojavu sekundarne nekroze, a digestivne ćelije ne proizvode inflamatorne citokine (Majno i Joris, 1995; Elmore, 2007). Međutim ponekad dolazi do pojave sekundarne nekroze pre procesa fagocitoze, u kom slučaju i apoptozu može prati inflamatorni odgovor (Rock i Kono, 2008). Mada ta pojava nije razjašnjena smatra se da je presudna brzina fagocitoze kojom se uklanja apoptotična ćelija.

Za razliku od apoptoze koja predstavlja energetski zavisian biohemijski proces, nekroza je toksični proces u kome ćelija igra ulogu pasivne žrtve i predstavlja energetski nezavisian tip ćelijske smrti. Iako su po mehanizmu i morfologiji apoptoza i nekroza različite, ova dva procesa se preklapaju i dele isu biohemijsku mrežu poznatu i kao „apoptoza-nekroza kontinuum“ (Elmore, 2007). Da li smrt ćelija sledi mehanizam apoptoze ili nekroze, zavisi delom od ćelijskih signala smrti, tipa tkiva, stadijuma razvoja tkiva i fiziološkog okruženja.

Histološki je veoma teško razlikovati apoptozu od nekroze, pogotovo što se one mogu odvijati istovremeno u zavisnosti od intenziteta i vremena trajanja stimulansa, razgradnje ATP-a i dostupnosti kaspaza. Nekroza kao pasivan i nekontrolisan proces zahvata veliko područje ćelija, dok apoptoza kao kontrolisan i energetski zavisian proces pogađa pojedinačne ćelije ili klastere ćelija (Majno i Joris, 1995). Nekroze porazumeva uticaj na energetsko snabdevanje ćelija i oštećenja ćelijskih membrana. Nakon gubitka integriteta membrane dolazi do izlivanja citoplazme u okolno tkivo i slanja hemotaktičkih signala što može regrutovati i inflamatorne ćelije. Mada tipične za apoptozu piknoza i karioreksa se mogu dešavati i u toku nekroze.

Sve do skoro se smatralo da je apoptoza nepovratan proces, međutim danas je poznato da je ona pod izvesnim uslovima reverzibilna, odnosno da se ranij fazi p-53 indukovane apoptotske ćelije mogu spasiti iz apoptotskog programa po uklanjanju apoptotskog stimulusa (Elmore, 2007). To sugerise na ranu aktivaciju reparacije DNK u toku p53-indukovane apoptoze.



Slika 2.11. Mehanizam apoptoze i nekroze..

Mehanizam apoptoze podrazumeva dva glavna puta: ekstrinzični ili put receptora smrti i intrinzički ili mitohondrijalni put (Elmore, 2007, Parthasarathy i Philipp, 2012). Ova dva puta su međusobno povezana i molekuli jednog puta utiču na drugi. Takođe postoji i još jedan dodatni put u kome je citotoksičnost posredovana T ćelijama i perforin-granzim zavisnim ubijanjem ćelija. Preforin-granzim apoptotični put indukuje apoptozu putem granzima A ili granzima B. Ekstrinzični, intrinzički i granzim B put apoptoze konvergiraju u zajednički izvršni put iniciran cepanjem kaspaze-3, gde dolazi do DNK fragmentacije, degradacije citoskeleta i proteina nukleusa, nastanka ukrštenih veza između proteina, formiranju apoptotičnih tela, ekspersije liganada receptora fagocitnih ćelija i konačne digestije u fagocitima. Granzim A put apoptoze egzistira kao paralelni put ćelijske smrti nezavisan od kapsaza i oštećuje jedolančanu DNK.

Kaspaze su prisutne u neaktivnom proenzimskom obliku u većini ćelija, a jednom pošto se aktiviraju vrše dalju aktivaciju drugih prokaspaza i na taj način se stvara apoptotični signalni put koji vodi u brzu ćelijsku smrt (Gerl i Vaux, 2005; Elmore, 2007). Kaspaze poseduju proteolitičku aktivnost, one raskidaju peptidne veze poreklom iz apsaraginske kiseline. Deset do sada identifikovanih klasa su kaspaze inicijatori (kapaza-2, -8, -9, -10), efektori i egzekutori (kapaza-3, -6, -7) i inflamatorne kaspaze (kapaza -1, -4, -5). Kapaza-11 reguliše apoptozu i zrenje citokina u toku septičnog šoka, kapaza-12 posreduje endoplazmatičnu-specifičnu apoptozu i citotoksičnost β -amiloida, kapaza-13 je goveđi gen dok je kapaza-14 prisutna u embrionalnom tkivu, ali ne i u tkivu odrasle jedinke.

Ekstrinzični signalni put apoptoze uključuje receptore smrti koji su članovi superporodice receptora gena faktora nekroze tumora (TNF) (Elmore, 2007). Receptori ove superporodice imaju domen od oko 80 aminokiselina u citopolazmi, poznat kao „domen smrti“. On igra kritičnu ulogu u prenosu signala smrti sa površine ćelije na intracelularni signalni put. Do danas su najbolje okarakterisani ligandi i odgovarajući receptori smrti FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 i Apo2L/DR5.

Intrinzički signalni put podrazumeva ne-receptorske stimuluse koji proizvode unutarćelijske signale koji deluju direkto na mete u ćeliji i predstavljaju mitohondrijama inicirane događaje (Elmore, 2007; Galluzzi et al., 2014). Negativni signali su odsustvo faktora rasta, hormona i citokina što sprečava supresiju programa smrti, odnosno predstavlja okidač za apoptozu. Pozitivni signali uključuju zračenje, toksine, hipoksiju, hipertermiju, viralne infekcije i slobodne radikale. Navedeni stimuli dovode do promena u unutrašnjoj membrani mitohondrija, pri čemu se otvaraju pore membranske transmisije, gubi mitohondrijalni transmembranski potencijal i otpuštaju dve grupe proapoptotičnih proteina iz intermembranskog prostora u citosol. U prvoj grupi su citohrom *c*, Smac/DIABLO, i serinska proteaza HtrA2/Omi koji aktiviraju kapaza zavisni mitohondrijalni put. Druga grupa proapoptotičnih proteina, AIF, endonukleaze G i CAD otpuštaju mitohondrije u toku apoptoze, što predstavlja kasni događaj koji sledi nakon ulaska ćelije u program smrti. Regulacija i kontrola apoptotičnih događaja u mitohondriji se odvija preko Bcl-2 porodice proteina čiju regulaciju vrši protein supresor tumora p53 ali tačan mehanizam tog procesa još uvek nije poznat. Bcl-2 porodica utiče na permeabilnost membrana mitohondrije i može delovati i pro- i anti-apoptotski.

Put egzekucije je jedinstveno put za oba mehanizma u krajnjem ishodu apoptoze. Ova faza započinje aktivacijom egzekucione kaspaze, pri čemu se kaspaza-3 smatra najvažnijom egzekucionom kaspazom koju aktivira bilo koja od inicirajućih kaspaza. Varenje od strane fagocita je završna faza apoptoze pri čemu pojava fosfatidil serina na spoljašnjosti apoptotične ćelije olakšava neinflamatorno prepoznavanje od strane fagocita.

U fiziološkim uslovima apoptoza je komplementaran ali opozitni par mitoze i ćelijske proliferacije koji sprečava prekomernu produkciju ćelija u toku razvoja nervnog i imunog sistema, omogućava eliminaciju ćelije pod invazijom patogena, izlečenje rana putem eliminacije inflamatornih ćelija, evoluiranja granulacionog u ožiljno tkivo, eliminiše aktivirane ili auto agresivne imune ćelije u toku zrenja u centralnim limfoidnim organima (koštana srž, timus) ili u perifernim tkivima. Smatra se da se u toku starenja neke ćelije brže degradiraju i eliminišu putem apoptoze, a da oksidativni stres igra primarnu ulogu u patofiziologiji putem starosti indukovane apoptoze do čega dolazi usled akumuliranja oštećenja mitohondrijalne DNK izazvanog slobodnim radikalima.

U patološkim uslovima apoptoza igra veoma važnu ulogu u nastanku kancera, autoimunih proliferativnih bolesti, AIDS-a, ishemije, Parkinsonove bolesti, Alchajmerove bolesti, Hantingtonove bolesti i amiotrofične lateralne skleroze. Stanje kancera karakteriše ili prekomerna proliferacija ili redukovano uklanjanjem ćelija, pri čemu supresija apoptoze zauzima centralno mesto u razvoju i progresiji nekih tipova kancera. Tumorske ćelije postaju rezistentne na apoptozu na različite načine, na primer putem ekspresije anti-apoptotičnih proteina porodice Bcl-2 ili smanjene produkcije i mutacija u pro-apoptotičnom proteinu Bax koje reguliše p53 gen supresor tumora.

Postoje i mnogi drugi tipovi programirane ćelijske smrti (Tait et al., 2014, Galluzzi et al., 2014) kao što su aponekroza koja ima karaktistike i apoptoze i nekroze, zatim kaspazno nezavisni tip smrti neurona, parapoptoza, autofagija koja sa apoptozom takođe može da deli isti signalni put (Elmore, 2007). Pod nekim uslovima autofagija može da funkcioniše kao zaštitni mehanizam koji ograničava nekontrolisan rast ćelija i kao protektivni mehanizam protiv apoptoze. Iako je ovaj tip ćelijske smrti još uvek predmet diskusije, smatra se da se autofagija aktivira u uslovima gladovanja u nedostatku amino kiselina, u uslovima hipoksije i pri visokim temperaturama (Tsujimoto i Shimizu, 2005). Predstavlja svojevrsan oblik kanibalizma gde ćelija delimično jede samu sebe i na taj način obezbeđuje preživljavanje u kratkom vremenskom periodu. Sa jedne strane autofagija može dovesti do supresije tumora ali isto tako omogućava beg ćelija kancera u uslovima stresa i predstavlja put za formiranje metastaza (Csermely et al., 2013).

2.4.3 Terapijski značaj apoptoze

Sve ćelije nastale u toku mitoze, umiru u procesu apoptoze, a kada se balans između mitoze i apoptoze naruši dolazi do pojave kancera. Stoga je glavni cilj u terapiji kancera promocija smrt malignih ćelija, uz što manje oštećenje zdravih ćelija. Danas dostupne terapije kancera deluju na dva načina ili putem indukcije apoptoze ili direktnom toksičnošću (Gerl i Vaux, 2005). Normalne ćelije za razliku od malignih imaju očuvan mehanizam za apoptozu, tako da većina postojećih terapija kancera pogađa i zdravo tkivo pri čemu zdrave ćelije podležu apoptozi. Kao posledica toga javljaju se sporedni efekti terapije kancera u vidu oštećenja gastrointestinalnog trakta, koštane srži i kože. Otuda je velika verovatnoća da je terapija kancera koja indukuje apoptozu, a istovremeno ne ispoljava intrinzičku citotoksičnost, uzročnik smrti većeg broja zdravih od bolesnih ćelija. Gotovo sve efikasne terapije kancera ispoljavaju direktnu toksičnost i inhibiraju replikaciju DNK, sintezu proteina, i funkcionisanje mikrotubula dok agensi koji inhibiraju a ne indukuju apoptozu mogu biti korisni kao deo koterapije radio- i hemoterapije za sprečavanje pojave sporednih efekata nastalih usled apoptoze zdravih ćelija. Najveći broj aktuelnih antikancer agenata je razvijen pre nego što su postojala određena saznanja o procesu apoptoze ali kod većine je utvrđeno da indukuju apoptozu indirektno, kao odgovor na stres usled upliva u ćelijski metabolizam. Iako je indukcija apoptoze poželjna

još uvek nije poznato koliki je njen značaj u odnosu na direktnu toksičnost u terapiji kancera (Gerl i Vuax, 2005).

U ovom radu citotoksičnost odnosno antiproliferativna aktivnost svežih sokova vrsta *B. oleracea* i *B. rapa* je ispitana pomoću metode koja se zasniva na bojenju proteina pomoću sulforodamina B (SRB test), dok je tip ćelijske smrti odnosno detekcija apoptoze i nekroze izvršena *in vitro* spektrofotometrijskom metodom baziranoj na kvalitativnom i kvantitativnom određivanju mono- i oligonukleozoma u citoplazmatskoj frakciji pre i posle liziranja ćelija.

2.5 MIKROBNE INFEKCIJE

Infektivne bolesti su vodeći uzrok smrtnosti širom sveta. Pored novih infektivnih bolesti, stare smrtonosne infekcije sve više uzimaju maha, dok rastuća rezistentnost mikroba na postojeće terapije predstavlja opasnost po javno zdravlje i dobrobit čoveka (Wilson et al., 2002). Infektivna bolest je biološki proces koji narušava normalnu fiziologiju višćelijskog organizma usled prisustva patogenog mikroorganizma na ili u telu. Patogen se definiše kao agens koji uzorkuje štetu u toku interakcije sa hostom ili se ona javlja kao posledica interakcije sa hostom-domaćinom (Van Baarlen, 2007). Ona može biti rezultat direktnog prisustva mikroorganizma (toksini i drugi virulentni faktori) ili nastati indirektno u toku aktivnosti imunog odgovora domaćina. Kod zdravih individua mikroorganizmi su ograničeno lokalizovani na: koži, sluzokoži usne duplje i nosa, vagini i u gastrointestinalnom traktu. Unutrašnje tkiva su sterilna, a do prodora patogena dolazi usled povreda ili zbog evolutivno stečene sposobnosti patogena da prolaze kroz barijere hosta.

Uprkos velikom broju mikroba, svega nekoliko su izvor infekcija za čoveka (Casadevall i Pirofski, 2000). Aktuelni patogeni se sistematizuju kao bakterije, gljivice, protozoe, helminti i oomicete, a tradicionalno dele na oportune, fakultativne i obligatorne (Van Baarlen, 2007). Obligatorni patogeni uzrokuju infekcije u ograničenom broju domaćina, pri čemu mogu inficirati zdrave i imunokompenzovane jedinke osetljivih vrsta. *Mycobacterium tuberculosis* predstavlja obligatorni patogen čoveka koji uzrokuje tuberkulozu čija replikacija i preživljavanje zahteva prisustvo živog domaćina. Danas ovaj mikroorganizam predstavlja glavnu infektivnu pretnju za čoveka, jer pokazuje sve veću rezistentnost na različite terapijske tretmane. Fakultativni patogeni su ograničeni na uzak broj domaćina ali za razliku od obligatornih mogu da prežive i izvan hosta-domaćina, dok oportuni mikroorganizmi rastu na raznolikim organskim supstratima i imaju nisku virulentnost za brojne organizme. Međutim ukoliko dodje do povređivanja ili kompromitovanja imunog odgovora potencijalnog domaćina, mogu izvršiti agresivan napad ili ispoljiti nisku ali progresivnu aktivnost.

Broj patogena neophodnih da uzrokuju infekciju je veoma varijabilan (Leggett et al., 2012). Svega 10 ćelija *Shigella* i *Giardia lamblia* je neophodno za otpočinjanje infekcije, dok *Vibrio cholera* i *Staphylococcus aureus* zahtevaju 10^3 - 10^8 ćelija. Ove razlike u patogenoj dozi su verovatno vezane za mehanizme koje patogeni koriste da inficiraju domaćina. Patogeni luče brojne molekule koji vrše supresiju i/ili invadiraju imuni odgovor domaćina i ukoliko ti molekuli deluju lokalno, početak infekcije zahteva mali broj patogenih ćelija. Međutim ukoliko izlučeni patogeni molekuli difunduju i deluju u udaljenim područjima, u tom slučaju je potreban veći broj patogenih ćelija.

Premda se razlikuju svi patogeni u osnovi koriste istu strategiju za izazivanje infekcije i bolesti. Opšta matrica za nastanak infekcije podrazumeva adheziju mikroorganizma za ćelije ili tkiva hosta-domaćina, nakon čega dolazi do prodora i ulaska u domaćina, a potom sledi kolonizacija i lučenje toksina i litičkih enzima i apsorpcija

nutrijenta iz nekrotičnog tkiva (Wilson et al., 2002; Van Baarlen, 2007). Nastala infekcija može biti akutna ukoliko dođe do planktonskog rasta mikroorganizama ili poprimiti hroničan tok ukoliko dođe do formiranja biofilmova koji zbog svog specifičnog sastava i funkcionisanja predstavljaju rezervoar za rekurentne infekcije.

Nekoliko mikroorganizama je razvilo sposobnost inficiranja organizama koji pripadaju potpuno različitim carstvima, odnosno formama života (Van Baarlen, 2007). Takav patogen predstavlja *Pseudomonas aeruginosa*, gram negativna saprotrofna bakterija, rasprostranjena u životnoj sredini koja retko dovodi do infekcija kod imunokompenzovanih jedinki i generalno se smatra oportunističkim patogenom. Međutim, ona je izuzetno opasan uzročnik sepse kod pacijenata sa opekotinama i kod imunodeficientnih pacijenata i glavni uzročnik smrtnosti u stanjima cistične fibroze. Pored čoveka, ova bakterija je sposobna da inficira biljke, nematode i insekte. Slično se ponašaju i *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis* koji mogu inficirati biljke i nematode, što ipak nije do sada registrovano u prirodi.

Aspergillus sp., askomicetina gljivica redovni stanovnik zemljišta i komposta nije uzročnik infekcija kod toplokrvnih organizama, ali se nekoliko pripadnika ovih plesni smatra virulentnim oportunističkim patogenima koji uzrokuju aspergilozu kod ljudi i životinja. Kod imunokompetentnih jedinki aspergiloza se ispoljava u vidu alergijskih reakcija, kao kod ljudi sa astmom, potom lokalne kolonizacije plućnih alveola (aspergilom ili lopta od gljivica) i naseljavanja nazalnih sinusa ili epitela spoljašnjeg uha. Kod imunokompromitovanih pacijenata *Aspergillus* dovodi do pojave peritonitisa, lokalizovane invazivne pulmonarne infekcije i diseminirane aspergiloze. *Aspergillus fumigatus* je redovni stanovnik komposta, biljnih ostataka, perja i izlučevina ptica i žitarica čije se spore nalaze u kućnoj prašini, naročito u toplim područjima, kao i u vazduhu. Udisanje od strane imunokompromitovanih pacijenata uzrokuje pojavu pojedinačnih oboljenja, a ponekad dovodi i do pojave lokalnih epidemija. Mortalitet od invazivne aspergiloze je veoma visok i iznosi 60-80%. Patogenost *Aspergillus* je vezana za proteine i sekundarne metabolite koje luči ova plesan, pri čemu je utvrđeno da metaboliti *Aspergillus fumigatus* vrše inhibiciju ciklusa ćelijskog rasta sisara, indukciju toksičnog šoka i nekroze tkiva i inicijaciju tremora, dok *Aspergillus flavus* koji raste na kukuruzu i kikirikiju proizvodi toksične aflatoksine.

2.5.1 Antibiotičke terapije i pojava rezistentnosti na antibiotike

Kao posledica selektivne primene antibiotika na početku dvadesetog veka su primat u etiologiji cirkulatornih oboljenja preuzeli gram negativni mikrobi, da bi na kraju dvadesetog veka primarni uzročnici infekcija ponovo postali gram pozitivni mikroorganizmi ali i gljivice (Casadevall i Pirofski, 2000). Fungalnim infekcijama se u prošlosti nije pridavao veliki značaj i postojalo je svega nekoliko lekova za tretman ozbiljnih gljivičnih infekcija, međutim usled prelaska na imunosupresivne metode lečenja, isuviše česte i neopravdane upotrebe antibiotika širokog spektra, intravenskog pribora i napretka imunosupresivnih viralnih infekcija poput AIDS-a, stopa oboljevanja od fungalnih infekcija je značajno porasla kao i stopa smrtnosti od kandidijaze (Ghannoum i Rice, 1999).

Konvencionalni antibiotici ubijaju bakterije ili zaustavljaju njihov rast tako što remete funkcionisanje DNK, RNK i sintezu proteina, a usled selektivnog pritiska i raširene upotrebe došlo je do porasta rezistentnosti mikroorganizama na antibiotike (Wilson et al., 2002; Dong et al., 2007). Posebno je značajna činjenica da antibiotici predstavljaj jedine lekove čija široka upotreba ograničava njihov dalji terapijski efekat i da predstavljaju uzrok razvoja novih infekcija, odnosno dovode do povratka u pre-

antibiotičku eru (Dou et al., 2016). I gram pozitivne i gram negativne bakterije su postale rezistente ne samo na jedan, već na veći broj antibiotika (na primer, uzročnici dijareje- *Shigella*, *Salmonela*, *E.coli*, respiratorni patogeni- *Klebsiella pneumoniae* i *P. aeruginosa*, patogeni urinarnog trakta poput *E. coli* i *M. tuberculosis* koji je ostao vodeći uzročnik smrtnosti od jedne samostalne infektivne bolesti širom sveta). Pored toga, i suviše česta upotreba antifingalnih preparata je dovela do rezistentnosti gljivičnih patogena, zbog čega se ukazala potreba za pronalaskom novih lekova i strategija za lečenje mikrobnih infekcija kao i za alternativnim tretmanima infekcija bez upotrebe antibiotika (Dou et al., 2016).

Obzirom na situaciju u kojoj antibiotici postepeno gube bitku sa mikrobima, što posebno pogađa zemlje u razvoju, sve veća pažnja se poklanja tradicionalnoj medicini i prirodnim preparatima. Prirodni proizvodi su već uključeni u savremene načine lečenja iako još uvek za većinu preparata efikasnost nije potvrđena kliničkim studijama. Jedan od problema je i kompleksnost sastava većine prirodnih preparata što ispitivanje njihove efikasnosti čini veoma složenim.

U cilju iznalaženja novih antimikrobnih agenasa u ovom radu je ispitana antimikrobna aktivnost svežih sokova podvrsta *B. oleracea* i *B. rapa* na šest bakterijskih sojeva, tri soja *C. albicans* i dve vrste plesni (filamentoznih gljiva), uglavnom iz grupe oportunih patogena uobičajeno prisutnih u okruženju ili organizmu čoveka, pri čemu su neki veoma česti uzročnici humanih infekcija.

2. 6 BIOLOŠKA AKTIVNOST I LEKOVITI POTENCIJAL PORODICE BRASSICACEAE

Biološki efekti i lekoviti potencijal Brassica povrća se zasniva pretežno na sadržaju sekundarnih biomolekula, iako ovo povrće ima visoku nutritivnu vrednost zahvaljujući prisustvu ugljenih hidrata, slobodnih amino kiselina i proteina, organskih i masnih kiselina, minerala i elemenata u tragovima koji takođe ispoljavaju određene biološke efekte, a utiču i na organo-leptička svojstva biljaka (Jahangir et al., 2009). Do sada je utvrđeno da visok unos Brassica povrća umanjuje rizik od pojave različitih tipova kancera, pre svega kancera pluća, gastrointestinalnog trakta i kancera prostate (Moreno et al., 2006). Iz brojnih kliničkih ispitivanja je uočena obrnuta srazmera unosa Brassic povrća i incidence kolorektalnog kancera, kancera pluća, dojke, pankreasa, gastrotestinalnog i kancera ovarijuma (Manchali et al., 2012). U brojnim *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima je utvrđeno da izotiocijanati i indol-3-karbinol blokiraju nastanak kancera u fazi inicijacije i progresije, a manji broja sprovedenih epidemioloških studija je pokazao pozitivnu korelaciju između unosa ovog povrća i njegovog preventivnog dejstva.

Biljke porodice Brassicaceae su efikasne u prevenciji oksidativnog stresa, one vrše indukciju enzima detoksifikacije, stimulaciju imunog sistema, smanjuju rizik od pojave kancera, inhibiraju proces maligne transformacije, mutacije karcinogena i smanjuju proliferaciju ćelija kancera (Kapusta-Duch et al., 2012). Analiziranjem aktivnost svežih sokova 34 različite vrste povrća na različitim ćelijama tumora (adenokarcinom želuca (AGS), adenokarcinom dojke (MCF-7), karcinom pankreasa (Panc-1), adenokarcinom prostate (PC-3), karcinom pluća (A549), meduloblastom (Daoy), glioblastom (U-87 MG) i karcinom bubrega (Caki-2)) Boivin et al. (2009) su utvrdili da najjaču antiproliferativnu aktivnost ispoljavaju upravo podvrsta porodice Brassicaceae, uz pojedine *Allium* vrste. Prokelj je bio varijetet koji je u najvećoj meri doveo do inhibicije ćelijskog rasta, a veoma visoku aktivnost su ispoljile i različite podvrste belog kupusa i raštan, dok su brokoli, karfiol, crveni kupus, rotkvica i švedska repa imali nešto nižu sposobnost inhibicije ćelijskog rasta. U ovom ispitivanju je utvrđeno

da uočeni antiproliferativna efekat zavisi od tipa maligniteta i da je potpuno nezavisan od antioksidantne aktivnosti određene pomoću ORAC testa.

Sadržaj glukozinolata u velikoj meri utiče na sposobnost indukcije enzima metabolizma ksenobiotika faze I i II, inhibiciju metilacije DNK i razvoja kancera. Intaktni glukozinolati ispoljavaju slab doprinos ukupnoj antioksidantnoj aktivnosti Brassica povrća, najverovatnije putem doniranja protona. Do sada nije utvrđen međusoban sinergizam ili antagonizam različitih glukozinolata pri ispoljavanju antioksidantne aktivnosti, međutim njihova aktivnost se pojačava u sinergiji sa drugim biomolekulima (Cabello-Hurtado et al., 2012). Za razliku od intaktnih glukozinolata, njihovi hidrolitički proizvodi pokazuju izrazitu antioksidantnu aktivnost i smatra se da je gotovo celokupna biološka aktivnost ovih jedinjenja zasnovana na aktivnosti degradacionih proizvoda i to pre svega izotiocijanata (Carbonell-Capella et al., 2014) i indola (Zukalova i Vašak, 2002).

Prisustvo glukozinolata se do sada smatralo nepoželjnim usled neprihvatljivih senzornih i/ili fizioloških karakteristika proizvoda njihove degradacije. Pre svega zbog neprihvatljivog gorkog ukusa, potencijalne toksičnosti i mogućnosti pojave gušavosti. Glukozinolati su odgovorni za gorak ukus Brassica biljaka i njihovi degradacioni proizvodi poput izotiocijanata, nitrila i tiocijanata formiraju ljut i oštar ukus ulja slačice koji potrošači percipiraju. Dobro je poznata činjenica da mnogi proizvodi degradacije glukozinolata predstavljaju isparljiva jedinjenja, koja učestvuju u formiranju arome i odbojnog mirisa biljaka porodice Brassicaceae. Sinigrin i proizvodi njegove degradacije poseduju gorak ukus, dok su progoitrin i glukonapoleiferin bez ukusa ali njihove hidrolitičke proizvode karakteriše izrazita gorčina. Alilizotiocijanat i benzilizotiocijanat ulja slačice su prvenstveno odgovorni za navedeni tipičan ljut ukus i oštar miris ove biljke. Pored karakteristične gorčine i ljutog ukusa, utvrđeno je da su nitrili S-1-cijano-2-hidroksi-3-buten i 1-cijano-2-hidroksi-3,4-epitiobutan najtoksičniji proizvodi koji nastaju normalnom hidrolizom glukozinolata sa letalnom dozom za čoveka 170 i 178 mg/kg, a neki od degradacionih proizvoda glukozinolata dovode i do pojave gušavosti kod životinja (Mithen et al., 2000; Jahangir et al., 2009; Hanschen et al., 2014, Zukalova i Vašak, 2002). Goitrin nastao iz progoitrina inhibira sintezu tiroidnih hormona, tiroksina i trijod tironina putem selektivnog vezivanja joda i sprečavanja ulaska joda u tirodinu žlezdu, tiocijanatni jon je kompetitor sa jodom u organizmu životinja što se može prevazići povećanim unosom joda, dok je 5-viniloksazolidin-2-tion inhibitor sinteze tiroksina. Ovaj efekat je moguć i kod čoveka, o čemu međutim postoji vrlo malo, odnosno gotovo da i nema epidemioloških podataka. Smatra se da izostaje zbog kuvanja povrća u toku čega se inaktivira enzim mirozinaza, a potom izostaje i degradacija glukozinolata. Pored toga, degradacioni proizvodi indolnih glukozinolata, indol-3-karbinol i indol-3-acetonitril mogu podleći reakciji nitrozilovanju i dati mutagena N-nitroso jedinjenja, međutim ta jedinjenja nisu dovoljno stabilna pri uslovima pripreme i varenja hrane, stoga nije dokazan ni njihov toksičan efekat. Za termički neobrađene sokove Brassica povrća je utvrđeno da uzrokuju mutacije u mikroorganizmima i klastrogene promene u ćelijama sisara u uslovima *in vitro* i to usled dejstva alil i fenil izotiocijanata, međutim identičan efekat ovih jedinjenja nije uočen *in vivo* (Mithen et al., 2000; Hanschen et al., 2014). Potencijalna toksičnost i mogućnost uzrokovanja gušavosti je u određenoj meri usmerio tok daljih istraživanja u pravcu iznalaženja mogućnosti smanjenja sadržaja glukozinolata u semenu određenog Brassica povrća (Jahangir et al., 2009) što svakako nije povoljan trend ako se uzme u obzir njihov lekoviti potencijal.

Pored antioksidantne aktivnosti proizvodi hidrolize i degradacije ispoljavaju i brojne druge biološke aktivnosti poput baktericidne i antifungalne i generalno poboljšavaju zdravstveni status i biljaka i čoveka (Zukalova i Vašak, 2002). Degradacioni proizvodi glukozinolata potpomažu aktivnost i direktnih antioksidanata kao što je tokoferol, potom

pospešuju sintezu najvažnijeg endogenog antioksidanta- glutationa, dok izotiocijanati i nitrili modifikuju enzime metabolizma ksenobiotika i indukuju ciklus ćelijskog aresta i apoptozu. Kombinacija svih navedenih aktivnosti najverovatnije može da potkrepi do sada uočeni hemopreventivni karakter *Brassica* vrsta, tako da se smatra se da bi potencijalna kombinacija biljaka porodice Brassicaceae mogla obezbediti optimalnu zaštitu čoveka.

Hemopreventivna aktivnost izotiocijanati se odvija putem snažne inhibicije glutation-S-transferaze, dok je druga moguća kancer blokirajuća aktivnost intaktnih glukozinolata i glukozinolata tretiranih tioglukozid-glukohidrolazom indukcija GST-a, zavisna od prirode bočnog niza osnovnog jedinjenja. Tako na primer, izotiocijanat sulforan prisutan u *Brassica* vrstama blokira nastanak tumora, a u ekstraktu brokolija zajedno sa 7-metilsulfinilheptil izotiocijanatom pokazuje inhibitorni efekat na 12-O-tetradekanoliforbol-13-acetatom indukovanu invaziju malignih ćelija i aktivnost metaloroteinaza-9 matiksa kod čoveka i umanjuje verovatnoću nastanka kancera kolona i rektuma. Takodje on deluje inhibitorno i na infekcije izazvane *Helicobacter pylori* i blokira nastanka gastričnih tumora. Stoga konzumacija brokolija može biti preventivna u slučaju pojave hroničnog atrofičnog gastritisa i kancera indukovanog ovom bakterijom. Gastroprotektivni efekat etanolnog ekstrakt određene podvrste raštana se zasniva na stimulaciji lučenja sluzi, povećanja pH vrednosti i smanjenjem koncentracije H^+ jona u želucu (Lemos et al., 2011) što bi se moglo povezati za *in vitro* uočenu sposobnost glukozinolata da inhibiraju aktivnost ($H^+ - K^+$) ATP-aze.

Raznolikost u sadržaju glukozinolata u različitim varijetetima *B. oleracea* uslovljava i značajne razlike u lekovitom potencijalu tih biljaka. Indol-3-karabinol prisutan u kupusu, izdancima brokolija i prokelja, karfiolu, pak choi-u i raštanu predstavlja perspektivan antitumorski agent u slučaju kancera prostate i umanjuje incidencu i multipliciranje tumora dojke. Oralna administracija ovog jedinjenja ima pozitivan efekat i na metabolizam estrogena kod čoveka, dok visok unos može imati i širi hemopreventivni efekat. Međutim 5,6,11,12,17,18-heksahidrociklonon[1,2-b:4,5-b:7,8-b] triindol, glavni proizvod varenja indol-3-karabinola ispoljava jaku estrogenisku aktivnost i pospešuje proliferaciju estrogen zavisnih ćelija raka dojke.

Pored hemopreventivne i terapeutske uloge u tretmanu kancera druga važna uloga vrsta roda *Brassica* je njihovo kardioprotektivno delovanje (Manchali et al., 2012). Sulforan brokolija je sposoban da vrši nad-regulaciju GST-a pri poremećaju funkcije ćelija glatkih mišića aorte, i na taj način redukuje oksidativni stres koji je glavni uzročnik kardiovaskularnih komplikacija. Hranjenje eksperimentalnih pacova žutim i zelenim povrćem koje uključuje i brokoli značajno snižava nivo aterosklerotičnih markera, a utvrđeno je i *in vivo* protektivno delovanje sulforana u slučaju ishemičnih povreda srca. Ishrana brokolijem je dovela i do poboljšanja post ishemične ventrikularne funkcije, redukcije veličine infarkta miokarda i protektivno delovala u kaspaza-3 i citohrom C posredovanoj apoptozi kardiomiocita, dok je ishrana liofilizovanom biljkom od pomoći prilikom kontrole homeostaze holesterola kod eksperimentalnih životinja. Konzumiranje izdanaka brokolija u toku jedne nedelje umanjuje nivo markera oksidativnog stresa i porasta metabolizma holesterola. Pored degradacionih proizvoda glukozinolata kardioprotektivan efekat je najverovatnije posledica prisustva selena, flavonoida, antocijana, polifenola i antioksidantnih enzima. Smatra se da se antioksidantna aktivnost *Brassica* podvrsta dobrim delom zasniva na aktivnosti SOD, CAT i P_x koji su prisutni u značajnoj količini u svežim biljkama, dok se citotoksičan efekat zasniva na sposobnosti generisanja oksidativnog stresa u ćelijama tumora putem indukcije citohroma P450 i oštećenja DNK, što je uočeni efekat glukorafanina kod eksperimentalnih životinja (Manchali et al., 2012).

Zahvaljujući prisustvu još jednog sumpornog jedinjenja, SMCSO (Edmands et al., 2013) posle oralne administracije biljaka pripadnica roda *Brassica* dolazi do smanjenja nivoa holesterola kod životinja, kao i serumskog LDL-holesterola. Iako pokazuje brojne biološke efekte SMCSO je poprilično zapostavljeno jedinjenje, a sva pažnja je usmerena na glukozinolate što bi delimično moglo biti posledica sklonost životinja koje su hranjenje podvrstom raštana *B. Oleracea* var. *medullosa* ka razvoju hemolitičke anemije sa mogućim fatalnim ishodom usled konverzije SMCSO u aktivan faktor hemolitičke anemije- dimetil disulfid u buragu preživara (Bell, 2003). SMCSO ne ispoljava toksičnost kod svih životinja, kao ni kod čoveka. I kod čoveka su prisutne bakterija u gastrointestinalnom traktu koje mogu konvertovati SMCSO u toksični dimetil disulfid. Međutim, određena količina SMCSO se gubi u obliku isparljivih jedinjenja u toku usitnjavanja povrća ili dobar deo intaktnog SMCSO biva ekstrahovan u vodi za kuvanje pri termičkoj obradi (Edmands et al., 2013). Neisparljivi intermedijer metilmetantiosulfinat nastao pri degradaciji SMCSO ispoljava snažnu antimikrobnu aktivnost, a krajnji proizvodi razgradnje ove amino kiseline imaju takođe više ili manje izraženo antimikrobno dejstvo (Kyung and Fleming, 1996). Utvrđeno je da DMTS ispoljava umerenu antibakterijsku i snažnu antifungalnu aktivnost, dok DMDS ispoljava nizak antimikrobni efekat ali je sposoban da oksiduje redukovani glutation i reaguje sa tiolnim grupama proteina u ćelijskim membranama eritrocita, te na taj način dovede do njihove hidrolize. Najmanje aktivan sulfid nastao degradacijom SMCSO, je DMS (Kyung i Fleming, 1996).

Vodeni ekstrakti liofilizata portugalskog kupusa, raštana i repe poseduju značajnu antioksidantu kao i antibakterijsku aktivnost prema gram pozitivnim bakterijama (*S. aureus*, *B. cereus* i *B. subtilis*), dok su neaktivni u odnosu na gram negativne bakterije (*P. aeruginosa*, *E. coli* i *K. pneumoniae*) i gljivice (*C. albicans* i *C. neoformans*) (Sousa et al., 2008). Za razliku od njih metanolni ekstrakt crvenog kupusa deluje inhibitorno na meticilin-rezistentni *S aureus*, *E coli O157:H7*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, kao i protiv gljivičnih patogena *Trichophyton rubrum* i *Aspergillus terreus* (Hafidh et al., 2011). Autori su protumačili da je ovaj efekat ispoljen najverovatnije usled prisustva kompleksne smeše flavonoida u ekstraktu ove biljke, pre svega antocijana. Smatra se da ova jedinjenja ispoljavaju antioksidantnu, antiinflamatornu, antimikrobnu i antikarcinogenusku aktivnost, potom da poboljšavaju vid, indukuju apoptozu i imaju neuroprotektivni efekat (Mazza, 2007).

Brassica povrće može delovati preventivno i u slučaju različitih metaboličkih poremećaja, poput dijabetesa tipa 2, gojaznosti, astme i Alchajmerove bolesti. Utvrđeno je da alkaloid, 1-(cikloheksen-1-il)-pirolidin iz vodenog ekstrakta lista belog kupusa pokazuje značajan antidijabetični efekat u slučaju aloksan indukovanog dijabetesa kod pacova (Mohammed i Al Maliki, 2014). Pored toga, tropanski alkaloidi- kalistegini prisutni u različitim podvrstama roda *Brassica* ispoljavaju antidijabetični efekat (Patel et al., 2012) ali i inhibiraju enzime gastrointestinalnog trakta i jetre (Molyneux et al., 2007). Visok unos *Brassica* povrća umanjuje pad kognitivnih funkcija u starijem životnom dobu (Manchali et al., 2012) i prevenira pojavu Alchajmerove bolesti. U ovom povrću su prisutne značajne količine vitamina E. Do sada je utvrđeno da neadekvatne količine vitamina E dovode do nepravilnog razvoja mozga, a nesposobnost održavanja normalne veličine i konzistencije mozga vodi u demenciju. Regulacija nivoa vitamina E se odvija u mozgu što za sobom ostavlja otvoreno područje za dalja istraživanje o ulozi vitamina E u ljudskom organizmu (Cadenas et al., 2016).

Neke podvrste roda *Brassica* su prirodni inhibitori krajnjih proizvoda glikacije (AGEs) koji zauzimaju primarno mesto u etiologiji šećerne bolesti i učestvuju u nastanku za starenje vezanih hroničnih bolesti poput kardiovaskularnih bolesti, Alchajmerove bolest, malignih oboljenja i periferalne neutropatije (Hounscome et al., 2008, Younus i

Anwar, 2016). Nedavno je utvrđeno da je sinigrin snažan inhibitor nastanka ranih Amadorijevih proizvoda i AGEs, odnosno da predstavlja efikasan inhibitor procesa glikacije (Awasthi i Saraswathi, 2016).

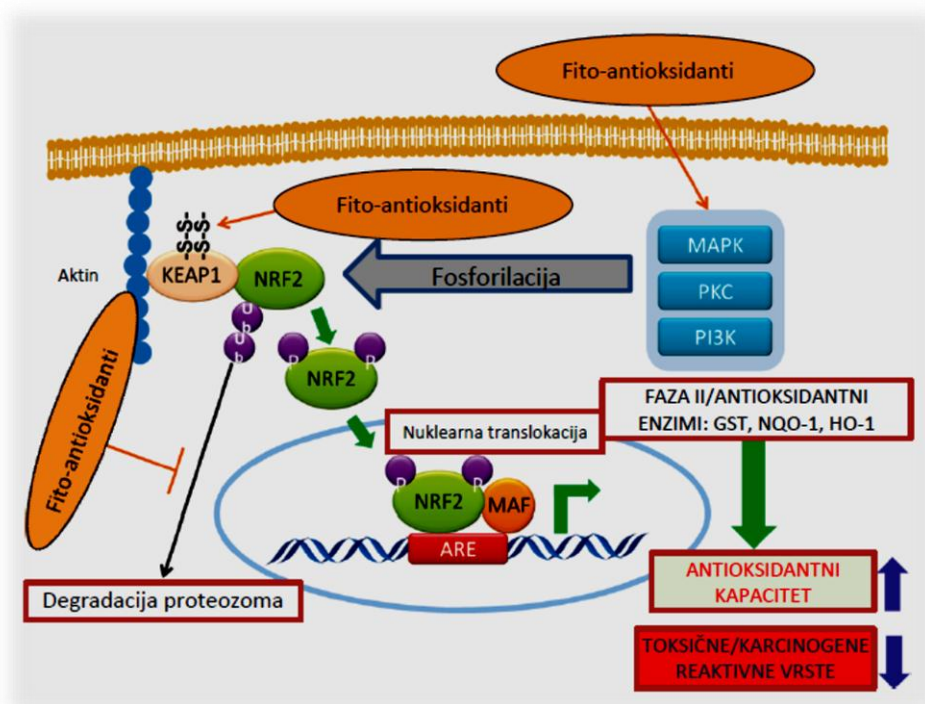
2.6.1 Mehanizam delovanja fenolnih i sumpornih jedinjenja porodice Brassicaceae

2.6.1.1 Fenolna jedinjenja

Do sada predloženu okosnicu antioksidantne aktivnosti fenolnih jedinjenja čine pre svega njihova sposobnosti neutralizacije ROS/RNS, potom supresija produkcije ROS/RNS putem inhibicije aktivnosti nekih enzima i heliranja jona metala prisutnih u tragovima, kao i sposobnost nad-regulacije i zaštite postojećih sistema antioksidante odbrane (Dai i Mumper, 2010). Neki od prirodnih proizvoda sa antioksidantnim svojstvima indukuju i/ili učestvuju u promenama u ekspresije gena (*Slika 2.12.*), odnosno dovode do aktivacije protektivnih enzima koji elimišu ROS i/ili toksine, uključujući i one iz početne faze razvoja kancera (Finley et al., 2015). Sposobnost alteracije ekspresije gena uočena u slučaju flavona i srodnih jedinjenja, fenolnih antioksidanata, butilovanog hidroksianizola (BHA) kao i sposobnost podizanja aktivnosti detoksifikujućih enzima faze II poput glutation-S-transferaze (GST) od strane bioaktivnih jedinjenja porodice Brassicaceae nedvosmisleno sugerišena na njihovu snažnu antikarcinogenusku aktivnost.

Utvrđeno je da se najveći deo fenolnih jedinjenja unetih putem ishrane eliminiše ekskrecijom u toku 24 časa. Pri tome se samo neki od fenolnih aglikona (poput kvercetina, miricetina i kemferola) apsorbuju u tankom crevu (Lima et al., 2014), dok fenolni glikozidi uglavnom dospevaju do kolona u kome podležu hidrolizi od strane crevnih bakterija pri čemu u drugoj fazi dolazi i do dalje degradacije oslobođenih aglikona. Zbog toga je bioraspoloživost fenolnih jedinjenja izuzetno niska. Pored toga fenolna jedinjenja u toku apsorpcije podležu modifikacijama tipičnim za procese eliminacije ksenobiotika: metilaciji, sulfonovanju (sulfokonjugaciji) i glukuronidaciji što povećava njihovu hidrofilitnost i olakšava eliminaciju (Manach et al., 2004). Prisutvo direktnih antioksidanata u niskim koncentracijama u plazmi čoveka (~ 1/1000 koncentracije antioksidantnih vitamina) ukazuje na minornu ulogu direktnih gasioca ROS u održavanju antioksidantne ravnoteže u ćeliji (Finley et al., 2015). ORAC test koji meri direktne antioksidante i koristi se u industiji za određivanje antioksidantnog kapaciteta proizvoda bogatih fenolima iz tih razloga ne pruža adekvatnu sliku o realnom antioksidantnom kapacitetu *in vivo*. U prilog tome govori i nedostatak korelacije između ORAC vrednosti utvrđenih za brokoli i sposobnosti njegovih ekstrakata u kontrolisanju intracelularnog oksidativnog stresa.

Danas se smatra da je sposobnost aktivacije endogene redoks kontrole od strane nekih fenolnih jedinjenja- okidača nuklearnog transkripcionog faktora Nrf2 (*Slika 2.12.*) i redoks balansa tiola daleko važnije svojstvo od sposobnosti direktne neutralizacije slobodnih radikala. Prema Halliwell-u (2012) mobilizacija čovekove unutrašnja antioksidantne odbrane je mnogo važnija od visokog unosa antioksidanata kao što su vitamin C i E i flavonoida, a jedan od najvažnijih sistema adaptacije je upravo Nrf2 koji podiže nivo protektivnih supstanci uključujući i ekspresiju endogenih antioksidanata kao što je GSH kao odgovor na prisustvo toksičnih vrsta.



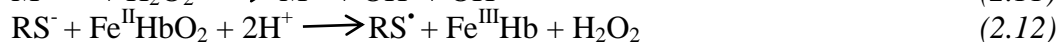
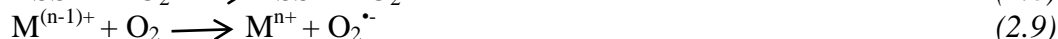
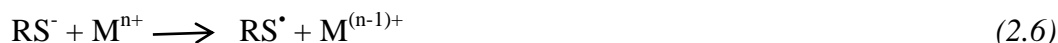
Slika 2.12. Antioksidantna aktivnost posredovana ekspresijom gena (Finley et al., 2015). Na slici je prikazan moguć uticaj antioksidanta biljaka na jedan od ključnih ćelijskih odbrambenih mehanizama protiv oksidativnog stresa i oštećenja izazvanog ksenobiotičima. Aktivacija Nrf2 indukuje transkripcionu regulaciju ARE-zavisne ekspresije različitih detoksifikujućih i antioksidantnih odbrambenih enzima i proteina (Magesh et al., 2012).

ARE- antioksidant-responsivni element; KEAP 1- Kelch like ECH protein 1; Nrf2- nuklearni transkripcioni faktor ((erythroid derived 2) -like 2); PI3K-fosfatidil inozitol 3-kinaza; PKC- protein kinaza; MAPK- mitogen aktivirana protein kinaza, MAF- mali MAF protein; GST- glutation-S-transferaza; NQO-1- NAD(P)H hinon dehidrogenaza; HO-1- hem oksigenaza 1.

Takođe su i nedavni rezultati *in vivo* istraživanja bliži teoriji da proizvodi metabolizma flavonoida moduliraju aktivnost lipid i protein kinaza delujući na taj način prvenstveno kao signalni molekuli, a ne kao direktni antioksidanti, dok se protektivna uloga kvercetina i njegovih derivata u zaštiti hrane bez ikakve sumnje zasniva na antioksidantnoj i antibakterijskoj aktivnosti intaktnih jedinjenja (Materska, 2008). Čak šta više, Halvorsen et al. (2002) su utvrdili da su biljne vrste koje sadrže maksimalnu koncentraciju direktnih antioksidanata različite od biljnih vrsta koje dovode do najefikasnije indukcije enzima faze 2 iz čega se može zaključiti da za direktnu antioksidantnu aktivnost i indirektno antioksidantno dejstvo odgovorna različita jedinjenja. Do sada nije utvrđeni da li su fenolna jedinjenja sposobna da heliraju jone metala *in vivo*, uprkos tome što se savetuje njihova primena u slučaju hemohromatoze (nagomilavanje gvožđa u organizmu) i Wilson-ove bolesti (hiperakumulacija bakra) (Craft et al., 2012). Konačno, treba naglasiti i dvojaku ulogu antioksidanta u procesu kancerogenze, gde pored inhibicije rasta oni mogu i pospešiti održavanje i rast ćelija tumora aktivacijom alternativnog puta metaboličkog spašavanja što sve više umanjuje njihov značaj u potencijalnoj primeni u terapiji kancera, naročito u inicijalnim fazama bolesti (Saeidnia i Abdollahi, 2013). Ovo dodatno pojačava i zaključak do koga se dolazi na osnovu malog broja kontradiktornih literaturnih podataka o uticaju antioksidanata biljaka na nivo oksidativnog oštećenja *in vivo*, koji bi mogao biti minoran ili čak uopšte i ne postoji (Halliwell, 2012).

2.6.1.2 Organo-sumporna jedinjenja

In vivo disulfidi se lako redukuju do tiola pomoću redukovanog glutationa (GSH) u prisustvu glutation-S-transferaze (GST). Tioli se dalje oksiduju u prisustvu metalnih jona do disulfida usled čega se generišu ROS: superoksid anjon radikal, vodonik peroksid i hidroksil radikal (*Jednačine 2.6-2.12*) (Munday, 2012). Autoksidaciju alifatičnih i aromatičnih tiola uspešno katalizuje gvožđe. Proces započinje reakcijom tiola i Fe (II) jona iz oksihemoglobina (*Jednačina 2.12*).



Smatra se da se citotoksičnost sulfida *Allium* vrsta zasniva upravo na generisanju ROS, pri čemu je mnogo veća osetljivost tumorskih u odnosu na zdrave ćelije. Tetrasulfidi i trisulfidi *Allium* vrsta ispoljavaju najjaču i približno istu citotoksičnost koja opada sa smanjenjem broja atoma sumpora, dok priroda alkil ili alkenil grupa ne igra gotov nikakvu ulogu za dati efekat. Supresija rasta ćelija se odvija putem aresta ćelijskog ciklusa u G2/M fazi i indukciji apoptoze. Sličan efekat je uočen i kod *Brassica* vrsta na osnovu čega je konstruisana hipoteza da se proapoptotska aktivnost karakteristična za *Allium* i *Brassica* vrste zasniva na sposobnosti organo-sumpornih jedinjenja da generišu ROS, što dodatno opterećuje ćelije tumora jer već funkcionišu u uslovima pojačane produkcije i neutralizacije ROS (Fimognari et al., 2009). Usled povišene dinamike pri održavanju redoks balansa one su mnogo osetljivije od zdravih ćelija na dodatne oksidativne udare egzogenog porekla.

Visok oksido-redukcioni kapacitet tiola, odnosno balans između oksidovanih i redukovanih oblika je jedno od ključnih mesta regulacije oksidacionih procesa u ćeliji. Elektrofili iz hrane u tom slučaju mogu biti okidači za nuklearni transkripcioni faktor (Nrf2) i potpomoći kontrolu redoks ravnoteže (Finley et al., 2015). Pretpostavlja se da se alifatični izotiocijanati brokolija, sulforan, vezuje za redukovani glutation (GSH), pri čemu se menja odnos GSH/GSSG, tj redoks potencijal prelazi u više oksidovano stanje čime se aktiviraju brojni tiolni molekularni prekidači. U uslovima povećanog sadržaja izotiocijanata, rezerve GSH u ćeliji opadaju, GSH se konjuguje sa drugim proteinima što dovodi do kontrolisane ili u konačnom obliku nekontrolisane ćelijske smrti (Hanschen et al., 2014). Više od 30 proteina citoskeleta, redoks sistema, proteozoma i signalinga apoptoze/ćelijskog preživljavanja stupa u interakciju sa izotiocijanatima. Adams et al. (2013) su utvrdili da većina malih molekula kao što su elektrofili iz hrane koji uzrokuju pojačanu produkciju ROS, ne utiču samostalno na rast i vijabilnost malignih ćelija, već indukuju ćelijsku smrt samo u ko-tretmanu sa drugim molekulima na primer sa inhibitorom biosinteze glutationa, L-butionin sulfoksiminom (BSO). Sposobnost aktivacije Nrf2 je utvrđena i u slučaju drugih izotiocijanata *Brassica* povrća kao što su alil, butil i fenil izotiocijanati (Wagner et al., 2013; Adams et al. 2013). Ona podrazumeva i posredno delovanje na NFκB, a postojanje unutrašnje ukštene komunikacije u Nrf2 i NFκB signalingu je upravo potvrđena zahvaljujući istovremenoj antioksidantnoj i antiinflamatornoj aktivnosti koju ispoljava većina bioaktivnih jedinjenja biljaka. Pretpostavlja se da se hemopreventivni, antikarcinogeni i antifungalni potencijal izotiocijanata zasniva na sledećim procesima: pojačanoj produkciji ROS u

mitohondrijama, promeni membranskog potencijala mitohondrije usled pojačane produkcije ROS, kao i na smanjenju sadržaja GSH putem inhibicije glutation-reduktaze i konjugacije sa izotiocijanatima koju posreduje glutation-S-transferaza (Calmes et al., 2015).

Antibakterijski potencijal ovih jedinjenja je najverovatnije posredovan sličnim procesima. Mogući mehanizmi se zasnivaju na vezivanju izotiocijanata za ostake cisteina koji održavaju terciarnu strukturu proteina što dovodi do ruptur membrana bakterija, menjanju redoks statusa putem konjugacije sa GSH, promenom membranskog potencijala bakterije kao i aktivnosti specifičnih bakterijskih enzima i respiratornih enzima, indukcijom toplotnog šoka i oksidativnog stresa kao i indukciju samog bakterijskog odgovora na stresne uslove (Dufour et al., 2015). Usled svega navedenog kod izotiocijanata je primećeno dozno zavisno bakteriostatsko i baktericidno dejstvo. Svakako treba naglasiti da su veze između svih navedenih procesa u ćelijama sisara kao i u mikroorganizmima još uvek predmet diskusije, nedovoljno ispitane a u većem delu i nepoznate.

2.7 FAKTORI KOJI UTIČU NA NUTRITIVNU VREDNOST I SADRŽAJ BIOAKTIVNIH JEDINJENJA POVRĆA

Pošto voće i povrće predstavlja bogat izvor nutrijenata i bioaktivnih jedinjenja sa pozitivnim uticajem na ljudsko zdravlje, prema preporuci Svetske zdravstvene organizacije (WHO) i FAO unos od 400 g voća i povrća na dan predstavlja neophodan minimum za održavanje dobrog zdravstvenog statusa, dok je 800 g idealna dnevna količina (Poiroux-Gonord et al., 2010). Uprkos brojnim nastojanjima i kampanjama širom sveta, unos voća i povrća je i dalje ostao ispod poželjnog nivoa, a smatra se da je ovaj problem nastao pre svega usled loših navika u ishrani i da se može prevazići upotrebom voća i povrća sa povećanom koncentracijom bioaktivnih jedinjenja.

Na sintezu i i sadržaj bioaktivnih komponenti povrća, pored genetske uslovljenosti utiču i brojni drugi faktori kao što su faktori rasta poput svetlosti i temperature, vlažnosti i tipa zemljišta, primena fertilizatora, šteta prouzorkovana mikroorganizmima i insektima, stres indukovano UV zračenjem, kao i prisustvo teških metala i pesticida koji mogu bitno uticati na sadržaj nutrijenata i bioaktivnih jedinjenja (Falk et al., 2007; Charron et al., 2005; Perez-Balibrea et al., 2008). Pored toga i način transporta i skladištenja povrća, kao i način pakovanja i ambijentalni uslovi, pre svega temperatura skladištenja nakon berbe utiču na sadržaj nutritivnih i bioaktivnih komponenti i biološku aktivnost povrća (Nath et al., 2011). Mogu se jasno razgraničiti faktori koji ispoljavaju uticaj do trenutka berbe (sorta, uslovi životne sredine, način gajenja, sama berba, deo biljke koji se bere) od faktora koji ispoljavaju uticaj nakon trenutka berbe (način transporta i prerade, uslovi skladištenja) (Nilsson et al., 2006; Tiwari i Cummins, 2013). Optimalnim izborom faktora pre berbe (vremena sađenja, fertilizatora, navodnjavanje, berba u različitim fazama zrelosti) može se postići optimalni sadržaj fitohemikalija u voću i povrću kao i njihovim proizvodima. Tako je na primer utvrđeno da gajenje brokolija u specifičnim hidroponskim uslovima uz primenu elicitora poboljšava njegovu nutritivnu vrednost (Moreno et al., 2008), da izazivanje umerenog stresa u toku gajenja pomoću NaCl povećava koncentraciju glukozinolata i fenolnih jedinjenja uz neizmenjen sadržaj vitamina C u cvetovima ove biljke (López-Berenguer et al., 2009) i da je u mladim izdancima brokolija starosti 3-5 dana gajenih pod uticajem svetlosti povećana koncentracija bioaktivnih jedinjenja u odnosu na zrele cvetove (Perez-Balibrea et al., 2008). Međutim u ovom trenutku nema dovoljno informacija o međusobnim uticajima različitih faktora, o interakcijama svetlosti i temperature, genetskih faktora i okruženja, procesa primarnog metabolizma i ontogeneze kao i između samih organa, na primer

uticaja fotooksidativnog stresa u lišću na odvijanje metabolizma u plodu (Poiroux-Gonord et al., 2010). Kako je fokus ovog rada bio na ispitivanju uticaja organskog i konvencionalnog sistema proizvodnje na sadržaj bioaktivnih jedinjenja i biološku aktivnost varijeta vrsta *B. oleracea* i *B. rapa* koje pripadaju rodu Brassica u narednom odeljku biće razmatrani do sada uočeni uticaji ova dva sistema na fitohemijski sastav biljaka.

2.7.1 Uticaj organskog i konvencionalnog sistema proizvodnje na sadržaj bioaktivnih jedinjenja porodice Brassicaceae

Danas se organska proizvodnja favorizuje kao alternativni vid gajenja u odnosu na konvencionalnu proizvodnju prvenstveno usled nastojanja da se eliminiše ili svede na minimum, primena pesticida i herbicida čije rezidue u hrani biljnog porekla deluju toksično i uzročnici su brojnih patoloških stanja i oboljenja čoveka. Pored toga se smatra da je prednost organske proizvodnje to što dobijene proizvoda karakteriše odsustvo hormona rasta i genetske modifikacije, privlačniji ukus, odnosno bolje senzorne karakteristike u odnosu na konvencionalne proizvode i povećan sadržaj bioaktivnih jedinjenja (Lima i Vianello, 2011). Prema ovim autorima do sada je utvrđen nešto viši nivo fenolnih jedinjenja i nekih vitamina (vitamin C) u hrani organskog porekla, kao i niži nivo nitrata i pesticida. Taj podatak treba uzeti sa rezervom budući da pojedni organski proizvodi imaju i povišen sadržaj poliamina koji stimulišu ćeljsku deobu i mogu biti od pomoći za održavanje dobrog zdravstvenog stanja u starijem dobu ali isto tako mogu imati negativan efekat kod pacijenata obolelih od kancera. Uz to postoji i mogućnost kontaminacije organskih proizvoda određenim bakterijama (najčešće *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*) i parazitima usled korišćenja stajskog đubriva. Kombicija stajnjaka i redukovane upotrebe fungicida i antibiotika često ima kao posledicu kontaminaciju mikroorganizmima i njihovim proizvodima ali je utvrđeno da nema bitnih razlika u kontaminaciji mikotoksinima između organskih i konvencionalnih proizvoda.

Neki autori smatraju da pojačana produkcija fenolnih jedinjenja nastaje kao posledica oksidativnog stresa kojem su izložene biljke gajene bez upotrebe pesticida, dok drugi smatraju da do nje dolazi usled odsustva fertilizatora u organskom načinu proizvodnje. Međutim, Naguib et al. (2012) su utvrdili da upravo primena organskih fertilizatora povećava sadržaj sekundarnih metabolita u različitim sortama brokolija, dok su Young et al. (2005) utvrdili da nema razlike u fitohemijskom sastavu salate i raštana iz organskog i konvencionalnog sistema proizvodnje čak i u strogo kontrolisanim uslovima, a da napad insekata dovodi do porasta sadržaja fenolnih jedinjenja u organski gajenom pak choi-u. Prilikom ispitivanja pojedinih delova različitog povrća koje je uključivalo i određene Brassica vrste, Lima et al., (2008) su utvrdili da većina ispitivanih vrsta akumulira više poliamina i fenola pod uticajem organskog sistema proizvodnje, dok je sadržaj flavonoida bio uvećan uglavnom pod uticajem konvencionalnog sistema proizvodnje.

Na osnovu rezultata različitih ispitivanja se može uočiti nedostatak konzistentnih rezultata u ovoj oblasti. U revijalnom radu Dangour et al. (2009) su uzeli u obzir sva ispitivanja iz perioda 1958-2008. godine i od 52417 pronađenih radova identifikovali 162 ispitivanja koja su razmatrala uticaj organskog i konvencionalnog sistema proizvodnje (od čega se 137 odnosilo na biljne vrste, a 25 na stoku). U suštini 55 ispitivanja je bilo zadovoljavajućeg kvaliteta i na osnovu njih su utvrdili da nema razlika u nutritivnom kvalitetu između organski i konvencionalno proizvedene hrane, a da male razlike koje se

pojavljuju u pogledu sadržaja nutrijenata nisu biološki značajne i predstavljaju posledicu primene različitih metodologija u načinu proizvodnje.

U cilju određivanja u kojoj meri organski i konvencionalni sistem proizvodnje utiču na nutritivnu vrednost, odgovarajuće senzorne karakteristike kao i antioksidantnu, citotoksičnu i antimikrobnu aktivnost ispitivanih varijeteta vrsta *B. olerace* i *B. rapa* u ovom radu su u eksperimentima korišćeni uzorci dobijeni iz organske proizvodnje, a paralelno sa njima su analizirani i konvencionalno gajeni uzorci nakon čega je izvršeno poređenje dobijenih rezultata.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1 SPISAK HEMIKALIJA I OPREME

Spisak hemikalija upotrebljavnih u eksperimentima kupljenih u Sigma-Aldrich Chem (Steinheim, Germany): aluminijum-hlorid, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil radikal (DPPH); 2,2'-azino-bis(3-etilbenzthiazolin-6-sulfonska kiselina (ABTS), natrijum-karbonat, natrijuma-acetat, kalijum-persulfat, galna kiselina, metil- β -ciklodekstrin, bakar(II)- hlorid, Folin-Ciocolateu reagens, 2,9-dimetil-1,10-fenatrolin (neokuproin), amonijum-acetat, natrijum-tertahloropaladat (II), natrijum-hlorid, kalijum-hlorid, dinatrijum-fosfat, kalijum-fosfat, hlorovodonična kiselina, kvercetin, (-)-sinigrin hidrat, (\pm)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina (Troloks), hinska kiselina, katehin, *p*-O-kafeoilhinska kiselina (hlorogenska kiselina), galna kiselina, epikatehin, 2,5-dihidroksibenzoeva kiselina, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, siringinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, umbeliferon, skopoletin, viteksin, sinapinska kiselina, o-kumarinska kiselina, miricetin, kvercitrin, 3,4-dimetoksicimetna kiselina, bajkalin, daidzein, cimetna kiselina, genistein, izoramnetin, bajkalein, amentoflavon. Standardi kafena kiselina, luteolin i apigenin poručeni su od ChromaDex (Santa Ana, CA), a protokatehinska kiselina, epigalokatehin galat, eskuletin, hiperozid, kvercetin-3-*O*-glukozid, apiin, kemferol-3-*O*-glukozid, kemferol, krizoeriol, luteolin-7-*O*-glukozid i apigenin-7-*O*-glukozid od Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany). Penicilin i streptomycin nabavljeni su od Galenike (Beograd, RS). Od PAA Laboratories GmbH (Pasing, Austria) nabavljeni su fetusni goveđi serum (FBS), osnovni medijum DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium) bez L-glutamina sa 4,5 g/L glukoze, fosfatni pufer (Dulbecco's PBS (10 \times) (pH 6.5) bez kalcijuma i magnezijuma), tripsin je kupljen od Serva (Heidelberg, Germany). Folin-Ciocolateu (FC) reagens poručen je od Fisher Scientific (Leicestershire, UK). Metanol i etanol su kupljeni od J.T. Backer (Deventer, The Netherlands). Hranljivi medijum za gajenje kultura (Mueller-Huntton agar, and broth) je nabavljen sa Torlak Instituta (Beograd, Srbija).

Statična head space GC-MS analiza je izvršena na Agilent Technologies 6890ND gas hromatografskom sistemu, kuplovanom sa Agilent Technologies 5975B masenim spektrometrom opremljenim sa Agilent Technologies 7694 headspace autosemplerom. LC-DAD-MS/MS analiza je izvršena na Agilent Technologies 1200 series tečnom hromatogramu sa Agilent Technologies 6410A series triple-quadrupole MS/MS detektorom sa elektrosprej izvorom jonizacije (ESI). Sva spektrofotometrijska određivanja su izvršena pomoću Multiskan Spectrum čitača mikroploča (Thermo Scientific).

3.2 BILJNI MATERIJAL

Tri do pet biljaka ukupno šest varijeteta vrste *B. oleracea* L.: brokoli (*B. oleracea* L, var. *italica* Plenck.), karfiol (*B. oleracea* L var. *botrytis* l.c.), keleraba (*B. oleracea* L var. *gongylodes* l.c.), *B. oleracea* var. *sabauda* (kelj), *B. oleracea* var. *capitata*, forma *alba* (beli kupus), *B. oleracea* var. *capitata*, forma *rubra* (crveni kupus) i jedan pripadnik vrste *B. rapa* L.: *B. rapa* var. *pekinensis* (kineski kupus) je prikupljeno od sertifikovanog organskog proizvođača Vozar (Kisač, Vojvodina) kao i paralelni uzorci od konvencionalnog proizvođača povrća iz Rume u jesen 2013. Vaučeri ispitivanih vrsta su potvrđeni od strane dr Gorana Anačkova i primerci pohranjeni u Herbarijumu Departmana za biologiju i ekologiju (BUNS Herbarijum), Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu. Spisak ispitivanih varijeteta i brojevi vaučera su

dati u *Prilogu 8* u *Tabeli 8.1.*). Prikupljeno povrće je čuvano u plastičnim vrećicama na 4°C i pripremljeno u toku narednih sedam dana prema dalje opisanoj proceduri.

3.3 PRIPREMA SOKOVA POVRĆA

Odmerene količine svežeg biljnog materijala (cvetovi i gornji deo stabla brokolija i karfiola, stablo kelerabe, listovi kelja, crvenog kupusa, belog kupusa i kineskog kupusa) isečene su na manje komade, a potom iscedene u centrifugalnom sokovniku (Braun) i dobijeni sok proceđen kroz četiri sloja gaze. Ostatak biljne mase je potom dodatno ručno isceđen u cilju dobijanja što veće količine soka. Dobijeni sokovi su centrifugirani na 10.000 obrtaja u minuti, na 4 °C u toku 15 minuta, a potom je supernatant sterilisan propuštanjem kroz mebranski filter debljine 0.2 µm, podeljen u male porcije (0,5-1 ml) i čuvan u zamrznutom stanju na -20 °C do dalje upotrebe. Pregled dobijenih zapremina sokova je dat u *Prilogu 8* u *Tabeli 8.2.*

3.4 LIOFILIZACIJA BILJNOG MATERIJALA I SOKOVA

Odmerene mase svežeg povrća su odmah nakon sečenja odložena u Petrijeve šolje i upakovana u plastične vrećice i zamrznute (-20 °C). Povrće je u zamrznutom stanju preneto u liofilizator (Alpha Christ freeze dryer) u kome je nakon postignutih zadatih uslova (p= 0,04 mbar; t= -85 °C) biljni material i određena zapremina sokova povrća liofilizovano u toku 72-96 časova u zavisnosti od sadržaja vode u uzorcima. Prinosi nakon liofilizacije svežeg biljnog materijala i sokova su prikazani u *Prilogu* u *Tabelama 8.2.* i *8.3.* Ostatak nakon liofilizacije je izmeren a potom prenet u staklene posude i hermetički zatvoren i čuvan na temperaturama (-18 °C i 4 °C) do dalje upotrebe.

3.5 HEADSPACE GC-MS ANALIZA VOLATILNIH KOMPONENTI

Priprema uzoraka: Oko 10 g jestivih delova (cvetovi, stablo i listovi u zavisnosti od varijeteta) svežeg povrća su usitnjeni i blendirani u što kraćem vremenskom periodu, a potom brzo preneseni i zapečaćeni u staklene krimp vijale. Vijale su čuvane u zamrznutom stanju na -20 °C, u period 24-48 h, a potom odmrznute na sobnoj temperaturi i ostavljene dodatnih 15 min kako bi se stimulisala emisija i uravnotežio proces otpuštanja isparljivih jedinjenja pre GC-MS analize.

Postupak: Vijale su uravnotežene na 90 °C (10 min), potom je u toku 0.15 min strujom helijuma podignut pritisak u vijali, nakon čega su isparljive komponente prenete u petlju na 105 °C (fill time 0.15 min), i uravnotežene u toku 0.15 min. Uzorak je prenet transfer-linijom temperature na 115 °C u GC split/splitless inlet temperature 250 °C u toku 1.0 min uz split mod (split protok 4.0 mL/min). Helijum (čistoće 5.0) je korišćen kao gas nosač sa konstantnim protokom 1.1 mL/min. Komponente su razdvojene na HP-5ms (Agilent Technologies) WCOT kapilarnoj koloni sa stacionarnom fazom na bazi 5% fenil, 95% polidimetilsiloksana, dužine 30 m, prečnika 0.25 mm, debljine filma 0.25 µm sa sledećim temperaturnim programom: startna temperatura 50 °C brzinom 8 °C/min do 120 °C, 15 °C/min do 169 °C. Eluat je prenet preko transfer linije temperature 280 °C na single-quad maseni spektrometar sa elektonskom jonizacijom 70 eV i analiziran u sken modu u opsegu $m/z = 35-300$. Za identifikaciju masenih spektara su korišćeni Wiley Registry of Mass Spectral Data 7th Edition i NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library 05.

3.6 HEMIJSKO PROFILISANJE BILJNIH SOKOVA POMOĆU LC-DAD-MS/MS TEHNIKE

Hemijski profil ispitivanih sokova je analiziran pomoću LC-DAD-MS/MS tehnike. 1 µL soka je filtriran kroz 0.45 µm membranski filter na bazi regenerisane celuloze i analiziran na Agilent Technologies 1200 series tečnom hromatogramu sa Agilent Technologies 6410A series triple-quadrupole MS/MS detektorom sa elektrosprej izvorom jonizacije (ESI). Komponente su separisane na Agilent Technologies Zorbax XDB-C18 koloni (50 mm × 4.6 mm i.d., veličine čestica 1.8 µm) na 50 °C. Mobilna faza je isporučena pri brzini protoka 1.0 mL/min i sastojala se od 0.1 % vodenog rastvora mravlje kiseline i metanola. Elucija je izvršena u gradijentnom režimu: 30% MeOH, 100 % MeOH u toku 10 min uz održavanje sastava dodatne 2 min, i ponovnim uravnotežavanjem na početni sastav u toku 3 min. Eluat je direktno, bez splitting protoka prebačen na DAD i MS/MS. DAD je bio podešen za snimanje kompletnog spektra u rangu 190–700 nm. Analiti su subsekventno jonizovani pomoću ESI, sa azotom kao gasom za sušenje (temperatura 350 °C, protok 9.5 L/min) i pritiskom gasa za nebulizaciju 50 psi i napona kapilare 4.0 kV. MS²Scan mode (MS¹ eksperiment), sa $m/z = 120–1000$, sken vremenom 200 ms i naponom fragmentacije 135 V je korišćen za preliminarni skrining komponenti i selekciju jona prekursora za MS² eksperimente. Podaci su analizirani i u pozitivnom i u negativnom modu, za pouzdaniji prenos jona i određivanje molekulskih masa. Pomoću Product Ion Scan moda (MS² eksperiment) su dobijeni spektralni podaci za identifikaciju komponenti. $[M+H]^+$ i $[M-H]^-$ joni reprezentativnih komponenti su upotrebljeni kao prekursori za CID, korišćenjem azota visokog stepena čistoće kao kolizionog gasa i koliziona energije u rangu 5–35 V (10 V inkrementi). Dobijeni joni su skenirani u rangu m/z od 30 jedinica, do 2 jedinice za prethodni prekursor m/z .

Instrument je kontrolisan od strane MassHunter B.03.03 softvera (Agilent Technologies) a dobijeni podaci analizirani pomoću MassHunter Workstation Qualitative Analysis B.06.00 softvera (Agilent Technologies), u konjukciji sa NIST MS Search 2.0d softverom opremljenim sa interno kreiranom LAFIB bibliotekom masenih spektara (Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Srbija).

3.7 KVANTIFIKACIJA ODABRANIH FENOLNIH JEDINJENJA POMOĆU LC-MS/MS TEHNIKE

Primenom LC-MS-MS tehnike (Orčić et al., 2014) određen je sadržaj 45 izabrana sekundarna biomolekula (hinske kiseline, 14 fenolnih kiselina, 25 flavonoida, 3 kumarina i 2 lignana) u sokovima ispitivanog povrća. Uzorci su analizirani na Agilent 1200 tečnom hromatografu kuplovanom sa Agilent G6410A QqQ tandemskim masenim spektrometrom i elektrosprej (ESI) jonskim izvorom. Komponente su razdvojene na Zorbax Eclipse XDB-C18 RR (4,6 mm × 50 mm, 1,8 µm) (Agilent Technologies, USA) reverzno-faznoj koloni. U instrument je injektovano 5 µL uzorka. Binarna mobilna faza se sastojala od faze A (0,05% mravlje kiseline) i faze B (metanola), protok je iznosio 1 mL/min, a temperatura kolone 45 °C. Razdvajanje analita je izvršeno u gradijentni modu, sa sledećim odnosom faza: 0 min 30% B, 6 min 70% B, 9 min 100% B, 12 min 100% B, sa vremenom reekvilibracije od 3 min. Eluat je prosleđen bez deljenja toka na ESI jonski izvor, čiji su parametri bili: temperatura gasa za sušenje (N₂) 350 °C, protok 9 L/min, pritisak gasa za nebulizaciju 40 psi, napon na kapilari 4 kV, negativan polaritet. Kontrola instrumenta i obrada rezultata je izvršena pomoću MassHunter ver. B.03.01. (Agilent Technologies, USA) softvera.

3.8 ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH GLUKOZINOLATA

Sadržaj ukupnih glukozinolata je određen po metodi Kestwal et al. (2011). Princip metode se zasniva na građenju obojenog kompleksa glukozinolata sa natrijum-tetrahaloropaladatom(II), a intenzitet boje nastalog kompleksa se meri na 450 nm.

Ekstrakcija glukozinolata je izvršena u slanom fosfatnom puferu, pH=7 koji je pripremljen rastvaranjem 4 g NaCl, 0,1 g KCl, 0,72 g Na₂HPO₄ i 0,12 g KHPO₄ u 400 ml destilovane vode, pH vrednost pufera je podešena sa 1 mol/L HCl, rastvor dopunjen destilovanom vodom do 500 ml i sterilisan u autoklavu, 20 min na 15 psi.

0.5 g liofilizovanog povrća je izmešano sa 15 ml pufera i ostavljeno u ključalom vodenom kupatilu u toku 10 min da bi se inaktivirala mirozinaza. Nakon toga puferi rastvor je ohlađen na sobnoj temperaturi, a ekstrakcija je nastavljena u ledu uz konstantno mućkanje u toku jednog časa. Dobijeni ekstrakt je centrifugiran na 15000 obrtaja u minuti u toku 10 min na 4 °C. Supernatant je odvojen i čuvan na -20 °C. 20 µl dobijenog ekstrakta je spajkovano sa različitim zapreminama 2,5 mmol/L rastvora sinigrina (0, 5, 10, 15 i 20 µl), potom dopunjeno sa destilovanom vodom do 150 µl i pomešano sa 150 µL, 4 mmol/L rastvora natrijum-tetrahaloropaladata(II) što je u finalnoj koncentraciji odgovaralo dodatku 300 µl 2 mmol/L rastvora natrijum-tetrahaloropaladata (II) prema originalnoj proceduri. Reakciona smeša je ostavljena da stoji 30 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je apsorbancija merena na 450 nm.

Sadržaj ukupnih glukozinolata je izračunat nakon konstruisanja krive zavisnosti apsorbance od zapremine dodatog standarda, na osnovu zapremine dobijene ekstrapolacijom na negativni deo ose (V). Koncentracija sinigrina je izražena u mmol/L ekvivalentna sinigrina (mmol/L SE), prema formuli:

$$\text{Sadržaj ukupnih glukozinolata (mmol SE/L)} = V_x \times C_{\text{sin}} / V_e$$

V_x - zapremina očitana sa grafika nakon ekstrapolacije
 C_{sin} - inicijalna koncentracija dodavanog standarda (sinigrina)
 V_e - zapremina ekstrakta

Svaka analiza je ponavljana tri puta, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri merenja \pm SD.

3.9 ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH FENOLA

Sadržaj ukupnih fenola je određen po metodi Singleton et al. (1999), prilagođenoj za mikroploče. Princip metode se zasniva na reakciji fenolnih jedinjenja sa Folin-Ciocalteu reagensom (oksidujućim reagensom molibdofosfovoframova heteropolikiselina se sastoji iz 3H₂O-P₂O₅-13WO₃-5MoO₃-10H₂O (hetero polianjon: P₂Mo₅W₁₃O₆₂⁶⁻), a hipotetički centar je Mo(VI) jon) pri čemu dolazi do promene boje:



30 µl razblaženog soka povrća je izmešano sa 150 µl 0,1 mol/L Folin-Ciocalteu reagensa i nakon šest minuta je dodato 120 µl, 75 g/L rastvora natrijum karbonata. Nakon 90 min inkubacije u mraku, apsorbancija je očitana na 760 nm u odnosu na kontrolu koja je pripremljena na isti način kao ispitivane probe s tom razlikom što je u nju umesto soka povrća dodata destilovana voda. Sve vrednosti apsorbance su korigovane za apsorbancu

destilovane vode. Standardna kalibraciona kriva je konstruisana pomoću rastvora galne kiseline, i sadržaj ukupnih fenola je izražen u miligramima ekvivalenta galne kiseline po litru (mg GAE/L) pri čemu je izračunavanje vršeno prema formuli:

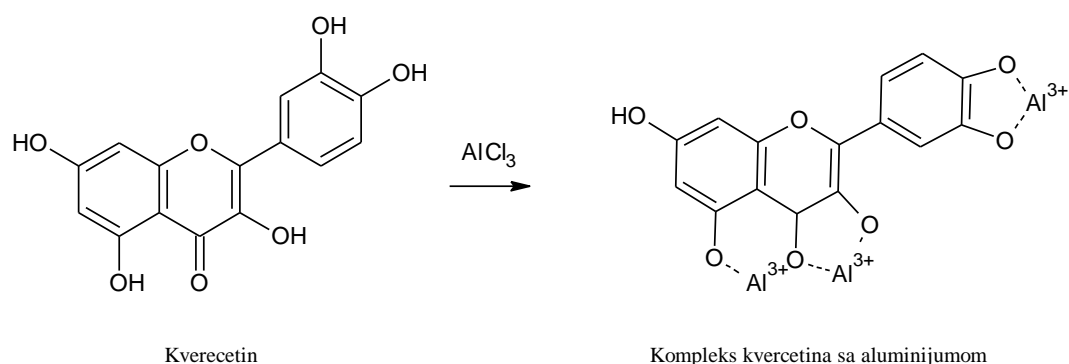
$$\text{Sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/L)} = C_{GA} / C_s \times 1000$$

C_{GA} - očitana koncentracija galne kiseline sa kalibracione krive
 C_s - radna koncentracija soka

Svaki eksperiment je rađen u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri merenja \pm SD.

3.10 ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH FLAVONOIDA

Sadržaj ukupnih flavonoida je određen kolorimetrijskom metodom prema uputstvu Chang et al. (2002), adaptiranom za mikroploče (Lesjak et al., 2014). Princip metode se zasniva na građenju obojenog kompleksa flavonoida sa $AlCl_3$. Nastali kompleks pokazuje apsorpcioni maksimum na 415-425 nm.



Slika 3.1. Nastanak kompleksa kvercetina sa aluminijumom

U 30 μ L razblaženog soka povrća je dodato 6 μ L 0,75 mol/L aluminijum-hlorida, 6 μ L 1 mol/L natrijum-acetata i 260 μ L destilovane vode. Apsorbanca je očitavana posle 30 min na 415 nm u odnosu na slepu probu koja je umesto soka povrća sadržala 30 μ L destilovane vode. Sve aporbance su korigovane za apsorbancu rastvarača i sadržaj ukupnih flavonoida je izražen u mg ekvivalenta kvercetina po litru soka (mg QE/L) na osnovu kalibracione krive konstruisane za kvercetin, pri čemu je izračunavanje vršeno po formuli:

$$\text{Sadržaj ukupnih flavonoida (mg QE/L)} = C_Q / C_s \times 1000$$

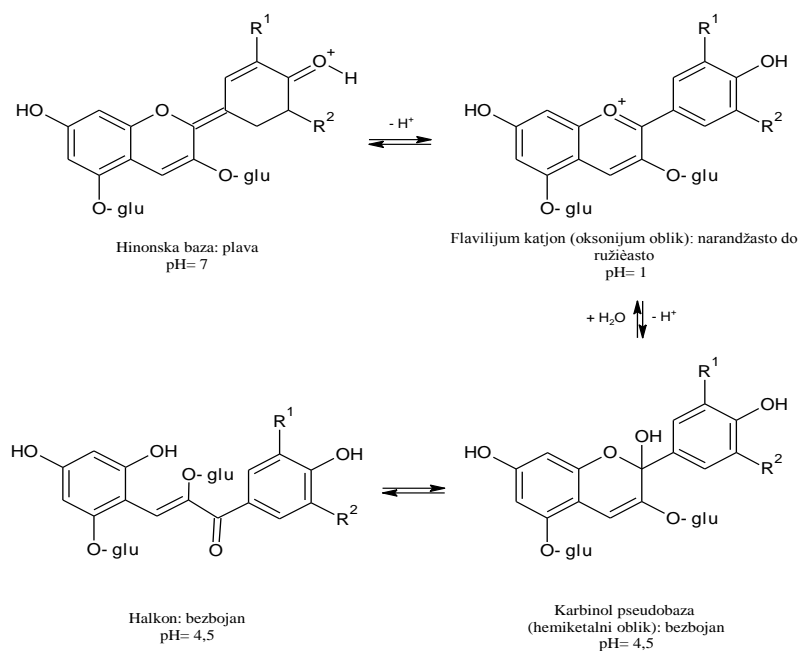
C_Q - očitana koncentracija kvercetina sa kalibracione krive
 C_s - radna koncentracija soka

Svaki eksperiment je rađen u tri ponavljanja, a rezultat je izražen kao srednja vrednost tri merenja \pm SD.

3.11 ODREĐIVANJE SADRŽAJA ANTOCIJANA

Sadržaj monomernih antocijana je određen u sokovima crvenog kupusa pomoću pH diferencijalne metode (Giusti i Wrolstad, 2001).

Princip metode se zasniva na promeni strukture antocijana do koje dolazi na različitim pH vrednostima, pri čemu obojeni oksonijum jon koji je prisutan na pH 1, prelazi u bezbojan hemiketalni oblik (pH 4,5). Strukturne promene antocijana na pH 1 i pH 4,5 su prikazane na *Slici 3.2*. Metoda polazi od pretpostavke da „čisti antocijani“ nemaju ili imaju vrlo nisku apsorbanca na pH 4,5, dok polimerni pigmenti i degradacioni proizvodi antocijana apsorbuju na toj pH vrednosti (Lee et al., 2005).



Slika 3.2. Strukturne promene antocijana pri različitim pH vrednostima.

Neophodno razbleženje soka je podešeno rastvaranjem soka crvenog kupusa u kalijum-hloridnom puferu, pH=1 (125 ml 2mol/L rastvora KCl u 375 ml 0,2 mol/L rastvora HCl) prilikom čega apsorbanca ne sme prelaziti 1,2. Potom su odgovarajuće zapremina soka crvenog kupusa razblažene u kalijum-hloridnom puferu i natrijum-acetatnom puferu, pH=4,5 (400 ml 1 mol/L rastvora CH₃COONa je izmešano sa 240 ml 1mol/L rastvora HCl, a potom dodato 360 ml destilovane vode). Dilucioni faktor (DF) je izračunat deljenjem inicijalne zapremine soka sa ukupnom zapreminom razblaženih uzoraka (kako se ne bi prevazišao kapacitet pufera u ovoj metodi inicijalna zapremina uzorka ne sme da premaši 20% ukupne zapremine uzorka). Probe su ostavljene da se uravnoteže u toku 15 minuta, nakon čega je merena apsorbanca na dve talasne dužine, na λ_{max} - 510 nm i na 700 nm u cilju korekcije zamućenja. Sva očitavanja su izvršena u odnosu na destilovanu vodu.

Koncentracija monomernih antocijana je izražena pomoću sadržaja cijanidin-3-glukozida u originalnom uzorku soka (mg/L) i računata po fomuli:

$$\text{Ukupni monomerni antocijani (mg/L)} = (A \times Mr \times DF \times 1000) / \epsilon \times l$$

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH1,0} - (A_{510} - A_{700})_{pH4,5}$$

$M_r(\text{cijanidin-3-glukozida}) = 449,2$

Molarni ekstinkcioni koeficijent, $\epsilon = 26900$

Dužina puta svetlosti kroz ćeliju mikroploče, $l = 0,8$ cm.

3.12 ODREĐIVANJE ANTIOKSIDANTNOG KAPACITETA SOKOVA

3.12.1 Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH[•] radikala

Sposobnost sokova da neutrališu DPPH[•] radikale je određena prema procedure Silva et al. (2004), sa manjim modifikacijama. Princip ove metode se zasniva na dekolorizaciji stabilnog 2,2-di(4-terc-oktilfenil)-1-pikril hidrazil DPPH[•] radikala ($\lambda_{\text{max}} = 515$ nm) prilikom predaje elektrona od strane antioksidanta:



Reakciona smeša se sastojala iz 25 μL razblaženog soka povrća i 200 μL , 120 mmol/L rastvora DPPH[•] u metanolu. Nakon inkubacije 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi, apsorbancu je očitana na 515 nm u odnosu na kontrolnu probu u koju je umesto razblaženog soka povrća dodata destilovana voda. Sve vrednosti apsorbance su korigovane za apsorbancu slepe probe koja se sastojala iz 200 μL metanola i 25 μL destilovane vode. Troloks, sintetički analog vitamin E je upotrebljen kao standardno jedinjenje i kapacitet neutralizacije DPPH radikala ($\text{TEAC}_{\text{DPPH}}$) je izražen u mmol/L ekvivalenta troloksa (mmol/L TE). Izračunavanje je vršeno prema formuli:

$$\text{TEAC}_{\text{DPPH}} \text{ (mmol TE/L)} = C_{Tr} / C_s \times 1000.$$

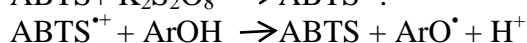
C_{Tr} - Očitana koncentracija troloksa

C_s - Radna koncentracija soka

Svaki eksperiment je ponavljan tri puta, a rezultat je iskazan kao srednja vrednost tri merenja \pm SD.

3.12.2 Određivanje kapaciteta neutralizacije ABTS^{•+} katjon radikala

ABTS test je urađen prema proceduri Arnao et al., 2001. Princip ove metode se zasniva na reakciji plavo-zelenog ABTS^{•+} katjon radikala sa prisutnim antioksidantima pri čemu dolazi do obezbojavanja rastvora. Ovaj radikal pokazuje apsorpcioni maksimum na 734 nm, a generiše se u reakciji ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) sa kalijum-persulfatom:



Osnovni rastvor ABTS^{•+} katjon radikal je napravljen mešanjem 9 ml 4,27 mg/ml rastvora ABTS i 1 ml 6,62 mg/ml rastvora $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ da se postignu finalne koncentracije 7 mmol/L rastvora ABTS i 2.45 mmol/L rastvora kalijum-persulfata. Osnovni rastvor je

ostavljen 16 sati u mraku, da se generiše ABTS^{•+} katjon radikal, nakon čega je razblažen u etanolu.

10 µL razblaženog soka je dodato u 290 µL razblaženog rastvora ABTS^{•+} katjon radikala i nakon 6 min inkubacije u mraku, apsorbancija je očitana na 734 nm u odnosu na kontrolu u koju je umesto sokova povrća dodata destilovana voda. Sve vrednosti apsorbancija su korigovane za apsorbancu slepe probe koja sadržala 290 µl etanola i 10 µl destilovane vode. Troloks je upotrebljen kao standardno jedinjenje a sposobnost hvatanja, odnosno redukcije ABTS^{•+} radikala (TEAC_{ABTS}) je iskazana u mmol/L ekvivalenta troloksa (mmol/L TE). Izračunavanje je vršeno prema formuli:

$$\text{TEAC}_{\text{ABTS}} \text{ (mmol TE/L)} = C_{Tr}/C_s \times 1000.$$

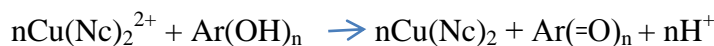
C_{Tr} - Očitana koncentracija troloksa

C_s - Radna koncentracija soka

Svaki eksperiment je rađen u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri merenja ± SD.

3.12.3 Određivanje sposobnosti redukcije Cu(II) jon (CUPRAC test)

Redukcioni potencijal sokova povrća je određen pomoću CUPRAC testa po proceduri Apak et al. (2007), kasnije prilagođenoj za mikroploče (Miser-Salihoglu et al., 2010). Princip metode se zasniva na redukciji neokuproina sa prisutnim antioksidantima, pri čemu se hidrosilne grupe polifenola oksiduju do odgovarajućeg hinona:



Redukcioni proizvod bis(neokuproin)Cu(I) [Cu(I)/Nc] pokazuje apsorpcioni maksimum na 450 nm. U reakciji redukcije ne učestvuju sve polifenolne OH grupe, već u zavisnosti od njihovog broja i pozicije kao i konjugacije polifenolnog molekula one mogu biti oksidovane.

27.5 µL soka povrća rastvorenog u 7% rastvoru makrocikličnog oligosaharidametil β- ciklodekstrina (M-β-CD) i 27.5 µL destilovane vode je dodato u otvore mikroploče sa 50 µL 20 mmol/L bakar(II)-hlorida, 50 µL 7.5 mmol/L rastvora neokuproina u 96% etanolu i 50 µL 1 mol/L amonijum -acetatnog pufera, pH=7 (19.27 g of NH₄Ac rastvoreno u 250 mL destilovane vode). Reakciona smeša je pažljivo izmešana i inkubirana u mraku 30 min, nakon čega je očitavana apsorbancija na 450 nm u odnosu na kontrolu u koju je umesto soka povrća dodata destilovana voda. Apsorbancija je očitana na 450 nm i sve vrednosti su korigovane za apsorbancu slepe probe koja je sadržala 155 µl destilovane vode i 50 µl etanola. Troloks je upotrebljen kao standardno jedinjenje, a redukcioni potencijala iskazan kao TEAC_{CUPRAC} u mmol ekvivalenta troloksa po litru soka (mmol/L TE). Izračunavanje je vršeno prema formuli:

$$\text{TEAC}_{\text{CUPRAC}} \text{ (mmol TE/L)} = C_{Tr}/C_s \times 1000.$$

Svi eksperimenti su ponavljani tri puta, a rezultat je izražen kao srednja vrednost tri merenja ± SD.

3.12.4 Test izbeljivanja β -karotena (mikro- β CB test)

Sposobnosti doniranja atoma vodonika je određena pomoću mikro- β CB testa po proceduri prilagođenoj za mikroploče (Mikai et al., 2009; Prieto et al., 2012). Princip metode se zasniva na merenju gubitka žute boje β -karotena koji nastaje kao rezultat oksidacije beta karotena peroksi radikalom nastalim oksidacijom linolne kiseline. Dodatak ekstrakta koji sadrži antioksidante usporava gubitak boje β -karotena.



8 μL razblaženog soka povrća ili rastvora Troloksa je dodato u otvor mikroploče, nakon čega je dodato 200 μL test emulzije (20 mg linolne kiseline, 200 mg Tween 20 i 1 ml, 10 mg/mL rastvora β -karotena u hloroformu je upareno u u struji azota, a uljasti ostatak rastvoren u 50 mL aerisane destilovane vode). Paralelno su pripremljene kontrolna proba sa 8 μL destilovane vode umesto soka povrća, i emulzija linolne kiseline bez dodatka β -karotena sa 8 μL destilovane vode (slepa proba). Mikroploče su potom inkubirane na 45 °C uz neprekidno mešanje, a apsorbancija je merena na 470 nm u intervalima: $t=0$ min, $t=5$ min, a potom na svakih 15 min, u ukupnom trajanju 110 min. Sve vrednosti apsorbance su korigovane za vrednost apsorbance slepe probe, a inhibicija degradacije β -karotena je računata po formuli:

$$I (\%) = [(A_{s(110)} - A_{k(110)}) / (A_{k(0)} - A_{k(110)})] \times 100$$

$A_{s(120)}$ - Apsorbanca soka, $t=110$ min

$A_{k(120)}$ - Apsorbanca kontrole, $t=110$ min

$A_{k(0)}$ - Apsorbanca kontrole, $t=0$ min

Svaki eksperiment je ponavljan tri puta, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost dva merenja \pm SD.

3.13 ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI

3.13.1 Određivanje antibakterijske/antifungalne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost je određena na šest referentnih bakterijskih sojeva (American Type of Culture Collection: tri gram-pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, tri gram-negativne *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 i *Salmonella enteritidis* ATCC 13076); tri vrste *Candida albicans* (poreklom iz usne duplje (snabdevač mikrobiološka laboratorija Univerziteta u Novom Sadu; dva klinička izolata vaginalnih sojeva (Departman ginekologiju i akušerstvo, Univerzitet u Novom Sadu)) i dve vrste filamentoznih gljiva (*Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp (univerzitetska mikrobiološka laboratorija)). Antibakterijska i antifungalna susceptibilnost su testirane pomoću broth mikrodilucione metode u skladu sa zvaničnim protokolima (CLSI, 2008a; CLSI, 2008b; CLSI, 2012).

Bakterijska suspenzija je dobijena iz prekonocnih kultura uzgajanih na 37 °C, a suspenzija *C. albicans* pripremljena u sterilnom fiziološkom rastvoru. Gustina bakterijskog inokuluma je podešena na 0,5 McFarland-ove skale. Inicijalni broj ćelija u testiranom inokulumu je podešen na $1,5 \times 10^8$ CFU/ml, a broj ćelija u inokulumu *C.*

albicans na $1,5 \times 10^6$ CFU/ml. 100 μ L razblaženog soka povrća i 10 μ L suspenzije bakterijal/gljivica je dodato u otvore mikroploče sa 100 μ L Mueller-Hunton bujona. Mikroploče sa bakterijskim sojevima su inkubirane 24 h na 37 °C (48 h, *C. albicans*), nakon čega je rast u otvoru mikroploča upoređen sa kontrolnim otvorom u koji nije dodat sok povrća u cilju određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC).

U cilju određivanja minimalne baktericidne/fungicidne koncentracije (MBC/MFC) 100 μ l sadržaja otvora mikroploče bez vidljivog rasta je zasejano u Petrijevu posude sa hranljivim agarom i ostavljeno naredna 24 časa na 37 °C u slučaju bakterijskih sojeva, odnosno 48 h na 25 °C za gljivične kulture, nakon čega je izvršeno prebrojavanje izraslih bakterijskih/fungalnih kolonija (CFU).

3.13.2 Određivanje aktivnosti na plesni (filamentozne gljive)

Antifungalna susceptibilnost je ispitana i na dve vrste filamentoznih gljiva *Aspergillus* sp. i *Penicillium* sp. Svaki otvor mikroploče je sadržao 100 μ l bujona, 100 μ l soka povrća i 2 μ l suspenzije spora. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC, v/v) i minimalna fungicidna koncentracija (MFC, v/v) su određene inokulacijom Petrijevih solja sa Müeller Hinton agarom presejavanjem mikroba iz otvora mikroploče bez vidljivog zamućenja.

3.14. ODREĐIVANJE ANTITUMORSKE AKTIVNOSTI SOKOVA

3.14.1 Određivanje citotoksične aktivnosti

Citotoksična aktivnost svežih sokova vrsta *B. oleracea* i *B. rapa* je ispitivana na četiri humane tumorske ćelijske linije: HeLa (epitelni karcinom cerviksa, ECACC93021013), MCF7 (adenokarcinom dojke, ECACC 86012803), HT-29 (adenokarcinom debelog creva, ECACC 91072201), Raji (limfoblasti Burkitt-ovog limfoma ECACC 85011429) kao i na liniji humanih zdravih ćelija MRC-5 (fetalni fibroblasti pluća, ECACC84101801) pomoću SRB testa.

Princip metode se zasniva na određivanju intenziteta ćelijskog rasta merenjem ukupne količine proteina kolorimerijskom metodom pomoću sulforodamina B, fluorescentne anjonske boje koja se u blago kiseloj sredini elektrostatički vezuje za pozitivno naelektrisane aminokiselinske ostatke ćelijskih proteina dajući izrazito stabilne konjugate koji fluoesciraju jarko crveno. Nakon vezivanja proteina i ispiranja viška boje, dodatkom slabe baze (TRIS), SRB se kvantitativno ekstrahuje iz ćelije i izmeri absorbancija na specifičnoj talasnoj dužini (540 nm) na osnovu čega se određuje ćelijski rast.

Suspenzije ćelija, gustine $3-5 \times 10^3$ ćelija po otvoru, dodate su u 180 μ l DMEM medijuma sa 50 mg/mL FBS u mikrotitar ploče sa 96 otvora (Sarstedt, Newton, USA) i preinkubirane 24 h na 37 °C. U svaki otvor dodato je po 20 μ l soka povrća (serija duplih razblaženja) do postizanja željene finalne koncentracije (0,3125-5ml/L). U kontrole je umesto uzorka dodavana ekvivalentna zapremina rastvarača. Posle dodavanja uzoraka, probe su inkubirane 48 h na 37 °C, što odgovara vremenu od 2-3 generacije ćelija u kontroli. Nakon inkubacije, ćelije su fiksirane sa 0,5 g/mL TCA u toku 1 h na 4 °C, isprane destilovanom vodom (adherentne ćelije su ispirane automatski (Wellwash 4, Labsystems; Helsinki, Finland)) i obojene sa 4 mg/mL SRB u 10 mL/L sirćetnoj kiselini (75 μ L po otvoru) u toku 30 min na sobnoj temperaturi. Ploče su zatim isprane 4 puta sa 10 mL/L sirćetnom kiselinom (200 μ L po otvoru) da bi se uklonio višak boje. SRB je

ekstrahovan iz ćelije dodatkom 10 mmol/L tris[hidroksimetil]aminometanom (TRIS) (200 μ L po otvoru). Absorbanca dobijenog rastvora merena je na 540 nm (specifična talasna dužina za SRB) i 620 nm (referentna talasna dužina za uklanjanje apsorbance pozadine) pomoću fotometra (Multiscan Ascent, Labsystems; Helsinki, Finland). Efekat na ćelijski rast izražen je kao procenat od kontrole i računat prema formuli: $K [\%] = (Au/Ak) \times 100$ gde je: K – procenat od kontrole, Au – absorbanca uzorka, Ak – absorbanca kontrole. Absorbanca je dobijena oduzimanjem apsorbance na 690 nm od apsorbance na 540 nm ($A = A_{540 \text{ nm}} - A_{690 \text{ nm}}$). Svi tretmani ispitani su u četiri ponavljanja. Antiproliferativna aktivnost ekstrakta izražena je kao IC_{50} vrednost (koncentracija soka pri kojoj je inhibicija ćelijskog rasta 50 %). Ova vrednost očitana je iz kriva zavisnosti ćelijskog rasta od finalne koncentracije soka dobijenih polinomskom regresionom analizom (software ORIGIN 8.0, OriginLab, USA).

3.14.2 Ispitivanje mehanizma ćelijske smrti

Apoptoza i nekroza detektovane su korišćenjem Cell Death Detection ELISAPLUS kita (Version 11.0, Roche). Ovaj spektrofotometrijski test se koristi za specifično *in vitro* kvalitativno i kvantitativno određivanje mono- i oligonukleozoma (DNA fragmenata vezanih za histone) u citoplazmatskoj frakciji pre i posle liziranja ćelija. Zasnovan je na enzimskoj sendvič- imunoadsorbcionoj metodi, u kojoj se koriste monoklonalna antitela miša – anti-DNA i anti-histon, koja vezuju DNA i histone, respektivno. Za anti-histon antitelo vezan je biotin koji može da reaguje sa streptavidinom, proteinom koji ima izrazito visok afinitet za biotin, a kojim su obložene mikroploče. Anti-DNA antitelo sadrži enzim peroksidazu (POD), koja katalizuje oksidaciju 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline (ABTS)) i prevodi ga u zeleni $ABTS^{+}$ katjon radikal. Tokom perioda inkubacije, anti-histon antitelo vezuje se za histonsku komponentu nukleozoma i simultano gradi imunokompleks sa streptavidinom putem biotinizacije. Pored toga, anti-DNA-POD antitelo reaguje sa DNA komponentom nukleozoma. Količina nukleozoma ekvivalentna je količini peroksidaze iz imunokompleksa, a ona se određuje spektrofotometrijski bojenom reakcijom sa ABTS supstratom (Slika 3.13.). Korišćena anti-histon antitela miša vezuju se za histone H1, H2A, H2B, H3 i H4 različitih organizama, dok anti-DNA-POD antitelo reaguje i sa jednostrukim i sa dvostrukim lancem DNA.

Detekcija tipa ćelijske smrti rađena je po metodi Četojević-Simin et al. (2015) za odabrane sokove dva morfološki različita varijeteta, pri čemu je sok organski gajenog kelja izabran jer je pokazao najjaču antiproliferativnu aktivnost, a sok brokolija u svrhe poređenja mehanizma delovanja glavičastog i neglavičastog povrća. Da bi se vreme inkubacije ćelija sa sokovima skratilo na 2 h korišćena je osam puta veća koncentracija soka od one koja za 48 h inhibira ćelijski rast za 50% ($c = 8 \times IC_{50}$). Test je izveden prema uputstvima proizvođača. U mikroploče sa 96 otvora je zasejano 1×10^4 ćelija, preinkubirano 24 h, a zatim su u radne probe dodati sokovi, a u negativne kontrole rastvarač. Sve probe su radjene u četiri ponavljanja. Nakon inkubacije od 2 h, mikroploče su centrifugirane, a supernatant odvojen i korišćen za određivanje nekroze. Ćelije su zatim lizirane, centrifugirane, a lizati odvojeni za određivanje apoptoze. Odmereno je 20 μ L supernatanta ili lizata u mikroploče obložene streptavidinom i 80 μ L imunoreagensa (smeša antitela), a zatim inkubirano 2 h uz mešanje. Sve probe su uradjene u duplikatu s obzirom da i supernatanti i lizati sadrže oligonukleozome, dolazi do intereakcije sa anti-histon antitelima obeleženim biotinom i vezivanja za streptavidin, kao i do reakcije sa anti-DNA antitelima sa peroksidazom. Mikroploče su isprane puferom, a zatim je dodat supstrat peroksidaze – ABTS. Razvoj boje praćen je pomoću fotometra Multiscan Ascent (Labsystems; Helsinki, Finland) na 405 nm, a očitavanje na 492 nm je korišćeno za

uklanjanje apsorbance pozadine. Vrednost absorbance na 492 nm oduzeta je od srednje vrednosti absorbanci očitanih na 405 nm za datu probu. Step en apoptoze ili nekroze izražen je kao faktor povećanja koncentracije mono i oligonukleozoma (EF), koji je računat kao AT/AC, gde je AT absorbanca probe tretirane sokom, a AC absorbanca negativne kontrole (samo rastvarač). Odnos apoptoza/nekroza (A/N) izračunat je za svaku probu i kontrolu na osnovu odgovarajućih apsorbancija. Porast apoptoze (AI) dobijen je deljenjem EF apoptoze sa EF nekroze (Četojević- Simin et al., 2015).

3.15 STATISTIČKA ANALIZA

Svi eksperimenti su rađeni u tri ponavljanja, izuzev određivanja citotoksične i antimikrobne aktivnosti gde su eksperimenti ponavljani četiri puta, kao i statičke headspace GC-MS analize, kvalitativne i kvantitativne analize pomoću LC-MS/MS tehnike koje su rađene bez ponavljanja. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Pomoću regresione analize su izračunati Pearson-ovi korelacioni koeficijenti kako bi se utvrdila korelacija hemijskog sastava i antioksidantnog kapaciteta ispitivanih vrsta.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 REZULTATI PRELIMINARNIH ISPITIVANJA

4.1.1. Opis postupka gajenja organskog povrća i analiza kvaliteta zemljišta

U toku preliminarnih ispitivanja (period 2011-2012) su uzeti podaci o načinu gajenja organskog povrća proizvođač Vožar (Kisač), izvršena je analiza osnovne plodnosti zemljišta i određivanje sadržaja teških metala u zemljištu validiranim metodama navedenim u *Prilogu 8.1*. Opis gajenja ispitivanih varijeteta u skladu sa Zakonom o organskoj proizvodnji je dat u *Prilogu 8.2*. Podaci o kvalitetu zemljišta su prikazani u *Tabelama 4.1* i *4.2*.

Na osnovu podataka koje je pružio proizvođač i izvršene analize zemljišta može se uočiti da su postignuti optimalni ili u nekim segmentima minimalni uslovi neohodni za proizvodnju povrća i da osim toksičnog nivoa kalijuma, nisu bili prisutni i drugi parametri u zemljištu koji bi mogli dovesti do pojave stresa u ispitivanim biljkama. Stoga se moglo pretpostaviti da utvrđene razlike u hemijskom sastavu i biološkoj aktivnosti uglavnom počivaju na razlikama između ispitivanih varijeteta.

Tabela 4.1. Klasifikacija zemljišta na osnovu određenih parametara: pH vrednosti, sadržaja humusa, ukupnog azota, lako pristupačnog fosfora i kalijuma u reprezentativnom uzorku zemljišta.

pH	pH	CaCO ₃	Humus	Ukupan N	P ₂ O ₅	K ₂ O
u H ₂ O	u KCl		%		mg/100 g	
7,58	7,02	6,33	3,10	0,2048	17,14	37,80
Alkalno	Neutralno	Srednje krečno zemljište	Dosta humozna	Optimalan	Srednje minimalno potreban	Toksičan

Tabela 4.2. Sadržaj mikroelemenata i teških metala u reprezentativnom uzorku zemljišta

	Cr	Ni	Cd	Pb	Fe	Mg
	mg/kg					%
Sadržaj	10.03±1.69	15.62±1.74	0.68±0.24	4.17±0.30	24855±757	1.06±0.06
MDK	100	50	3	100	-	-

4.1.2 Ispitivani varijeteti i priprema biljnog materijala

U toku preliminarnih ispitivanja analiziran je hemijski sastav i antioksidantna aktivnost ukupno osam varijeteta vrsta *B. oleracea* (*B. oleracea* var. *acephala* (raštan), *B. oleracea* var. *capitata*, forma *alba* (beli kupus), *B. oleracea* var. *capitata*, forma *rubra* (crveni kupus), *B. oleracea* var. *sabauda* (kelj), *B. oleracea* var. *Botrytis* (karfiol), *B. oleracea* var. *italica* (brokoli)) i *B. rapa* (*B. rapa* var. *chinensis* (pak čoi) i *B. rapa* var. *pekinensis* (kineski kupus) poreklom iz organskog sistema proizvodnje. Metodom slučajnog uzorka sa odgovarajuće parcele je prikupljeno približno 3 kg svakog od ispitivanih varijeteta, koji su potom sušeni uz konstantno strujanje vazduha približno šest nedelja (brokoli, karfiol i keleraba su sušeni na 45 °C konstantno u toku tri dana). Osušeni biljni material je usitnjen, prelišen sa 65% metanolom i maceriran u toku 72 časa uz

konstantno mešanje. Nakon ceđenja preko Buhnerovog levka, ekstrakti su upareni na rotacionom, vakum uparivaču a potom je pripremljen 30% rastvor, rastvaranjem suvog ostatka sirovog ekstrakta u 65% metanolu. Na taj način pripremljeni rastvori su korišćeni u daljim eksperimentima.

4.1.3 Preliminarni skrining hemijskog sastava i antioksidantne aktivnost ispitivanih varijeteta vrsta *B. oleracea* i *B. rapa*

U ekstraktima ispitivanih varijeteta je određen sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, sposobnost neutralizacije DPPH radikala, kapacita hvatanja $O_2^{\cdot-}$ radikala, redukcionog potencijala (FRAP test) pri čemu su dobijeni rezultati prikazani u *Tabeli 4.3.* a koji su detaljnije predstavljeni u diplomskim radovima rađenim na departmanu (Volčević, 2012; Stuparski, 2012).

Prema navedenim podacima u *Tabeli 4.3.* najviši sadržaj ukupnih fenola je utvrđen u u belom kupusu ($45,29 \pm 0,52$ mg GAE/g s.e) čiji ekstrakt je potpuno neočekivano tom sadržaju ispoljio najniži potencijal neutralizacije DPPH radikala, hvatanja $O_2^{\cdot-}$ radikala i redukcionog potencijal. Najniži sadržaj ukupnih fenola je utvrđen u kineskom kupusu ($6,71 \pm 0,86$ mg GAE/g s.e) koji nije ispoljio značajniju sposobnost neutralizacije DPPH radikala, ali je bio u grupi varijeteta sa višom sposobnošću hvatanja $O_2^{\cdot-}$ radikala i ispoljio je umeren redukcionog potencijal.

Raštan je bio varijetet najbogatiji flavonoidima ($3,31 \pm 0,09$ mg QE/g s.e), uz niži sadržaj ukupnih fenola u odnosu na beli kupus i potencijal neutralizacije DPPH u odnosu na ekstrakt crvenog kupusa, ali sa višim sadržajem ukupnih fenola i sposobnošću neutralizacije DPPH radikala od ostalih varijeteta. Ekstrakt brokolija je ispoljio najvišu efikasnost u hvatanju $O_2^{\cdot-}$ radikala ($58,95 \pm 0,57$ μ g/ml), umerenu sposobnost neutralizacije DPPH radikala i redukcionog potencijal. Takođe je imao i umeren sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u poređenju sa ostalim varijetetima.

Tabela 4.3. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida, sposobnost neutralizacije DPPH radikala, hvatanja $O_2^{\cdot-}$ radikala i redukcionog potencijal ispitivanih varijeteta vrsta *B. oleracea* i *B. rapa*.

Varijetet	Sadržaj ukupnih fenola	Sadržaj ukupnih flavonoida	DPPH	$O_2^{\cdot-}$ radikal	FRAP test
	mg GAE/g s.e.	mg QE/g s.e.	IC ₅₀ (μ g/ml)		mg ekv. vit. C
Brokoli	$21,27 \pm 1,84$	$0,37 \pm 0,01$	$297,83 \pm 5,15$	$58,95 \pm 0,57$	$13,20 \pm 1,19$
Karfiol	$10,14 \pm 1,37$	$0,07 \pm 0,01$	$496,47 \pm 35,27$	$76,59 \pm 6,87$	$5,15 \pm 1,33$
Kelj	$25,080,58$	$1,37 \pm 0,03$	$175,83 \pm 11,94$	$89,89 \pm 5,2$	$16,51 \pm 1,45$
Crveni kupus	$27,04 \pm 1,98$	$0,54 \pm 0,05$	$67,41 \pm 3,31$	$97,87 \pm 7,72$	$20,51 \pm 2,29$
Beli kupus	$45,29 \pm 0,52$	$0,09 \pm 0,01$	$548,55 \pm 31,02$	$129,62 \pm 5,03$	$2,69 \pm 0,08$
Raštan	$43,05 \pm 6,71$	$3,31 \pm 0,09$	$118,86 \pm 10,17$	$62,72 \pm 3,57$	$18,82 \pm 1,36$
Kineski kupus	$6,71 \pm 0,86$	$0,82 \pm 0,08$	$236,71 \pm 9,27$	$63,79 \pm 2,64$	$14,60 \pm 1,87$
Pak čoi	$27,49 \pm 1,64$	$1,74 \pm 0,03$	$183,28 \pm 18,26$	$105,22 \pm 3,58$	$13,12 \pm 1,18$

Osim crvenog kupusa koji je imao uporedljivu vrednost IC₅₀ sa vrednostima dobijenim na departmanu za sintetičke antioksidanate BHT (12,63±1,15 µg/ml) i BHA (8,62±0,90 µg/ml) pri neutralizaciji DPPH[•] radikala, ostali ekstrakti su ispoljili daleko niži antioksidati potencijal. Međutim u poređenju sa IC₅₀ vrednostima dobijenim pri ispitivanju sposobnost neutralizacije DPPH[•] radikala i hvatanja O₂^{•-} radikala raštana, portugalskog kupusa i repe (Sousa et al., 2008), metanolni ekstrakti ispitivanih vrsta u ovom radu su ispoljili značano viši antioksidanti potencijal.

4.1.3.1 Frakcionisanje odabranih metanolnih ekstrakata i TLC hromatografska analiza ekstrakata

Za frakcionisanje su odabrani po jedan pripadnik svake od ispitivanih Brassica vrsta, crveni kupus (*B. oleracea*) i kineski kupus (*B. rapa*). Ovaj deo preliminarnih ispitivanja hemijskog sastava spada u deo nepublikovanih rezultata.

Odabrani metanolni ekstrakti su upareni do suvog ostatka na rotacionom vakuum uparivaču i nakon sušenja u vakumu, suvi ostatak je rastvoren u vrućoj vodi na ultravučnom kupatilu, a potom je izvršena iscrpna, sukcesivna tečno-tečno ekstrakcija pomoću heksana i etilacetata pri čemu su dobijene dve frakcije: heksanska (nepolarne komponente) i etilacetatna (fenolna jedinjenja i glukozinolati), a zaostala vodena faza prečišćena pomoću SPE tehnike i na taj način je dobijena frakcija izolovanih i prečišćenih antocijana i zaostala vodena frakcija (šećeri i organske kiseline). Heksanska i etilacetatna frakcija su potom osušene preko anhidrovanog Na₂SO₄, nakon čega su sve dobijene frakcije uparene do suvog ostatka na rotacionom vakuum uparivaču, osušene u vakumu i rastvorene u metanolu (heksanska frakcija kineskog kupusa je rekonstituisana u heksanu, dok je ista frakcija crvenog kupusa rastvorena u dihlormetanu zbog uočene izomerizacije β-karotena).

Hemijski sastav dobijenih ekstrakata je analiziran pomoću tankoslojne hromatografije (TLC) na pločicama od silika gela nanošenjem širokih traka na startnu liniju svake pločice u nekoliko slojeva i razvijanjem u odgovarajućem sistemu razvijaača. Nakon razvijanja hromatograma, pločice su osušene i posmatrane u vidljivoj delu spektra i pod ultraljubičastom lampom na 254 i 366 nm. U cilju bolje vizualizacije pojedine pločice su prskane sa Naturstoff reagensom (1% rastvor u etanolu). Na osnovu linije fronta rastvarača i pređenog puta svake komponente su izračunate R_f vrednosti koje su prikazane u tabeli za svaki ispitivani ekstrakt.

Na osnovu uočenih komponentata u TLC hromatogramima razvijenim pomoću sistema za razdvajanje glikozida flavonoida i izračunatih R_f vrednosti (*Tabela 4.4.*), fenolna jedinjenja su bila najzastupljenija u ispitivanim ekstraktima. U etilacetatnom ekstraktu crvenog kupusa je detektovano osam glikozida flavonoida, u frakciji antocijana je bilo prisutno šest jedinjenja karakteristične svetloplave do tamno ljubičaste boje, dok u vodenom ekstraktu nije bilo vidljivog prisutva fenolnih jedinjenja, najverovatnije zbog njihove dobre rastvorljivosti u etilacetatu i kvantitativne izolacije antocijana putem ekstrakcije na čvrstoj fazi. R_f vrednosti detektovanih jedinjenja u TLC hromatogramima kineskog kupusa ukazuju na manji broj prisutnih glikozida flavonoida u etilacetatnom ekstraktu (šest) i prisustvo tri jedinjenja u frakciji antocijana. Za razliku od crvenog kupusa u vodenom ekstraktu kineskog kupusa je preostalo tri fenolna jedinjenja.

U etilacetatnom ekstraktu kineskog kupusa je detektovan veći broj komponentata koje bi potencijalno mogle značiti prisustvo gorkih principa, glukozinolata ili alkaloida. nego u etilacetatnom ekstraktu crvenog kupusa (*Tabela 4.5.*). U TLC hromatogramu kineskog kupusa je utvrđeno prisustvo šest traka, dok je etilacetatni

ekstrakt crvenog kupusa sadržao dve trake koje ukazuju na prisustvo glukozinolata/alkaloida. U vodenom ekstraktu i jednog i drugog varijeteta je preostalo svega dve takve komponente. Na osnovu Rf vrednosti prikazanih u *Tabeli 4.6* u ekstraktu kineskog kupusa u heksanu je bilo prisutno više nepolarnih komponenti (šest) nego u ekstraktu crvenog kupusa (tri). Na osnovu karakterističnih Rf vrednosti utvrđeno je prisustvo ksantofila (u oba ekstrakta) i β -karotena (u kineskom kupusu).

Tabela 4.4. Detekcija fenolnih jedinjenja na osnovu TLC hromatograma i izračunatih Rf vrednosti u etil acetatnom i vodenom ekstraktu kineskog i crvenog kupusa u vidljivom delu spektra (VIS) i ultraljubičastoj oblasti, na dve talasne dužine (254 i 366 nm).

Rf vrednosti							
Kineski kupus				Crveni kupus			
Razvijlač EtOAc:MeOH:H ₂ O (79:11:10)							
EtOAc ekstrakt							
VIS	254 nm	366 nm	Naturstoff reagens	VIS	254nm	366 nm	Naturstoff reagens
	0.063		Plavo		0.075	Plavo	Plavo
		0.126- Plavo	Plavo			0.107- Zeleno	Žuto
	0.168		Žuto			0.14- Plavo	Plavo
		0.2- Plavo	Plavo			0.215- Plavo	Plavo
			0.589- Plavo			0.602- Plavo	Plavo
			0.653- Plavo			0.656 - Plavo	
						0.731- Plavo	
						0.796- Plavo	
Ekstrakt antocijana (izolovanih pomoću SPE tehnike)							
						0,064- Ljubičasto	
0,125 Žuto				0,128- Žuto			
		0,162- Plavo				0,167- Svetlo ljubičasto	
		0,312- Svetlo plavo				0,320- Plavo	
						0,350- Svetlo plavo	
		0,9- Svetlo plavo				0,987- Svetlo plavo	
Vodeni ekstrakt (ostatak)							
		0.032- Tamno					
		0.053					
		0.096					

Tabela 4.5. Detekcija glukozinolata na osnovu TLC hromatograma i izračunatih Rf vrednosti u etil acetatnom i vodenom ekstraktu kineskog i crvenog kupusa u vidljivom delu spektra (VIS) i ultraljubičastoj oblasti, na dve talasne dužine (254 i 366 nm).

Rf vrednosti					
Kineski kupus			Crveni kupus		
Razvijatelj (Izopropil alkohol: EtOAc:H ₂ O (7:1:2))					
EtOAc ekstrakt					
VIS	254 nm	366 nm	VIS	254nm	366 nm
		0,130- Braon			
		0,449- Plavo			
		0,521- Plavo			
0,609- Braon	Fosforescencija	Braon	0,657- Braon	Fosforescencija	Braon
0,739- Braon		Plavo			
0,82- Braon		Braon	0,836- Braon	Fosforescencija	Plavo
Vodeni ekstrakt (ostatak nakon prečišćavanja pomoću SPE tehnike)					
	0,087- Braon	Žuto			
	0,179- Braon	Plavo			
		0,362- Plavo			
		0,522- Plavo			
	0,609- Braon	Braon			
		0,768- Plavo			0,727- Plavo
					0,828- Plavo

Tabela 4.6. Detekcija nepolarnih komponenti na osnovu TLC hromatograma i izračunatih Rf vrednosti u etil acetatnom i vodenom ekstraktu kineskog i crvenog kupusa u vidljivom delu spektra (VIS) i ultraljubičastoj oblasti, na dve talasne dužine (254 i 366 nm).

Rf vrednosti					
Kineski kupus			Crveni kupus		
Razvijatelj heksan:acetona (70:30)					
Heksan- Rf vrednosti			Dihlormetan- Rf vrednosti		
VIS	254 nm	366 nm	VIS	254 nm	366 nm
0,078- Zeleno žuto			0,269		Plavo
0,272	Fosforescencija		0,538 (Ksanotifili)	Fosforescencija	
0,325 (Ksanotifili)			0,846		
0,390		Crveno			
0,402					
0,909 (Karoten)					

4.1.3.2 Ostala ispitivanja i zaključci izvedeni na osnovu preliminarnih analiza

Pored navedenih ispitivanja, u početnoj fazi je izvršena i statička headspace GC-MS analiza biljog materijala, kao i određivanje inhibitornog dejstva metanolnih ekstrakata ispitivanih varijeteta na proces lipidne peroksidacije i nastanak OH i NO radikala. Međutim, dobijeni hromatogrami u toku GC-MS analize nisu bili zadovoljavajućeg kvaliteta, a ispitivani metanolni ekstrakti nisu pokazali značajniju aktivnost pri inhibiciji procesa lipidne peroksidacije i nastanka navedenih radikala.

Na osnovu svih rezultata preliminarnih ispitivanja je zaključeno da je uzorke potrebno pripremiti nekom od adekvatnijih metoda kako bi se smanjili gubici bioaktivnih jedinjenja i očuvala biološke aktivnosti tipična za sveže povrće, koja se delom naslanja i na enzimsku aktivnost. Kao najadekvatnija metoda čuvanja i pripreme biljnog materijala za pojedine analize je izabrana liofilizacija, a biološka aktivnost ispitivanih varijeteta je ispitana upotrebom svežih sokova (Pinela et al., 2011; Hung i Duy, 2012; Tiwari i Cummins, 2013). Na taj način je izbegnut proces višednevne maceracije pri kojem dolazi do oksidacije fenolnih jedinjenja usled kontaktu sa kiseonikom i razgradnje termolabilnih jedinjenja, kao i upotreba rastvarača koji bi zaustavili aktivnost enzima značajnu za biološku aktivnost *Brassica* vrsta.

4.2 HEMIJSKI SASTAV VRSTA RODA *BRASSICA*

4.2.1 Volatilne komponente svežih biljaka

Primenom hromatografske headspace GC-MS tehnike u svežem biljnom materijalu je detektovano ukupno dvadeset isparljivih jedinjenja. Dobijeni hromatogrami ispitivanih vrsta su prikazani u *Prilogu* u *Tabeli 8.4*. Dvanaest identifikovanih komponenti je predstavljalo proizvode enzimske degradacije sumpornih jedinjenja (glukozinolata i *S*-metil-L-cistein sulfoksida) kao i degradacione proizvode masnih kiselina. Pregled detektovanih i identifikovanih isparljivih jedinjenja je dat u *Tabeli 4.7*.

Degradacioni proizvodi masnih kiselina su bili dominantne volatilne komponente crvenog kupusa, brokolija i kelja poreklom iz organske proizvodnje, kao i konvencionalnog uzorka brokolija, pri čemu je 2-etilfuran najzastupljeniji (41.03, 30.83, 27.90%, 26.16%, u navedenim biljkama). Alifatični aldehid heksanal, degradacioni proizvod linolne kiseline (Lo Scalzo et al., 2007) je bio zastupljen u značajnijoj meri u organski gajenom crvenom kupusu (29.13%) i u uzorcima brokolija potpuno nezavisno od primenjenog sistema proizvodnje. Naime, utvrđena je gotovo identičan udeo ovog jedinjenja u organskom (20.71%) i konvencionalnom uzorku (20.22%).

Sumporna jedinjenja su bila dominantna u volatilnom profilu karfiola i kelerabe iz oba tipa proizvodnje, crvenog kupusa iz konvencionalnog tipa proizvodnje i organskih uzoraka belog i kineskog kupusa. Na osnovu podataka dobijenih headspace GC-MS tehnikom u isparljivoj frakciji pojedinih biljaka su identifikovana dva proizvoda enzimske degradacije alifatičnog glukozinolata sinigrina. Alil izotiocijanat je bio dominantno jedinjenje u konvencionalnom uzorku kelja (33.26%) i organskom uzorku belog kupusa (36.01%). Drugi degradacioni proizvod sinigrina- alili cijanid je bio prisutan u daleko manjoj meri, relativni udeo ove isparljive komponente je bila ispod 10% u uzorku karfiola iz konvencionalnog sistema proizvodnje, u svežim uzorcima kelja iz oba sistema proizvodnje i u organski gajenom belom kupusu. Proizvod degradacije neproteinogene amino kiseline *S*-metil-L-cistein sulfoksida, dimetil sulfid (DMS) je identifikovan je kao dominantno jedinjenje u headspace-u organski gajene kelerabe, kineskog kupusa i karfiola (71.85, 34.39 i 31.35%,). Druga dva degradaciona proizvoda SMCSO, dimetil disulfid (DMDS) i dimetil trisulfid (DMTS) su takođe bili zastupljeni u značajnim količinama. DMDS je bio dominantna volatilna komponenta konvencionalno gajenih uzoraka kelerabe i karfiola (39.96 i 25.83%, prema navedenom redosledu biljaka), dok je udeo DMTS bio najviši u konvencionalnim uzorcima kelerabe, crvenog kupusa i karfiola (48.18, 30.23 i 21.74%,). Interesantno je to da je veoma slična ukupna količina degradacionih proizvoda masnih kiselina i sumpornih jedinjenja bila prisutna u isparljivoj fazi konvencionalno gajenog kelja (48.36 and 44.33%) što se u potpunosti razlikovalo u odnosu na sastav isparljive faze organski gajenog uzorka koju je činilo 85.57% degradacionih proizvoda masnih kiselina i 9.58% volatilnih komponenti poreklom iz sumpornih jedinjenja. Takođe je gotovo identičan udeo degradacionih proizvoda masnih kiselina uočen u organskim i konvencionalnim uzorcima brokolija, a sličan trend je uočen i kod sumpornih jedinjenja prisutnih u isparljivim frakcijama ove biljke. Udeo jedinjenja poreklom iz SMCSO je bio potpuno nezavisan od primenjenog sistema proizvodnje u uzorcima karfiola i kelja.

Pored toga što pruža podatke o prisustvu i stabilnosti pojedinih biomolekula, što je veoma značajno sa aspekta kvaliteta hrane, analiza volatilnih komponenti pruža i podatke o senzornim karakteristikama, odnosno aromi i mirisu koji su veoma često nespojivi sa lekovitim potencijalom hrane koji najčešće zavisi od prisustva komponenti koje nemaju prijatan ukus i miris. Pomoću statičke headspace GC-MS analize mogu se identifikuju

samo dominantne mirisne komponente pošto je u ispitivanim uzorcima prisutan visok procenat vode prilikom analize (Belitz et al., 2009).

U ovom radu je identifikovan veći broj volatilnih komponenata koja se smatraju ključnim jedinjenja za formiranje mirisa, ukusa i arome tipične za podvrste *Brassica*. Iz linolne i linolenske kiseline dejstvom lipoksigenaze ili udruženim dejstvom lipoksigenaze i hidroperoksid lijaze, nastaju okso kiseline, aldehidi i alil alkoholi, pri čemu su za formiranje arome važni heksanal, (*E*)-2-heksenal, (*Z*)-2-heksenal, (*Z*)-3 heksanal i ili (*E*)-2-nonenal, (*Z*)-3-nonenal, (*E,Z*)-2,6-nonadienal i (*Z,Z*)-3,6-nonadienal (Belitz et al., 2009). Ovi aldehidi se uobičajeno pojavljuju nakon povređivanja tkiva u prisustvu kiseonika. Heksanal, proizvod degradacije linolne kiseline povrću daje prijatan, svež miris koji se tipično percipira u zelenom lisnatom povrću (ref). u ovom radu relativni udeo heksanala je bio najviši u uzorku organski proizvedenog crvenog kupusa, dok je u potpunosti izostao iz isparljivog profila biljke poreklom iz konvencionalne proizvodnje. Potpuno nezavisno od primenjenog načina proizvodnje ovaj aldehyd je bio prisutan u sledećim biljkama: brokoliju, kelju i karfiolu. (*E*)-2- heksenal i (*E*)-3-heksen- 1-ol su se pojavili u isparljivoj frakciji kelja i brokoliya iz oba tipa proizvodnje, dok su u ostalim biljkama bili prisutni ili u organskim ili u konvencionalnim uzorcima i potuno izostali iz isparljivog profila kelerabe, nevezano za tip proizvodnje. 2-metilpropanal nastao enzimskom degradacijom valina, koji povrću daje sladunjav ukus je detektovana komponenta u isparljivim profilima sledećih uzoraka: organski karfiol, organski brokoli, konvencionalni karfiol i organski kelj, dok u ostalim uzorcima nije utvrđeno njegovo prisustvo.

Glukozinolati koje u najvećoj meri odlikuje gorak ukus se smatraju odgovornim molekulima za neprijatnu aromu svežeg ili kivanog povrća roda *Brassica* (Drewnowski i Gomez-Carneros, 2000). Iz njih nastaju u toku enzimske degradacije izotiocijanati koji se opisuju kao ljute i nadražujuće supstance koje izazivaju suze. Po nekim opisima imaju aromu "nalik na beli luk" ili "nalik potočarki" i izazivaju senzacije peckanja. Alili izotiocijanat, degradacioni proizvod sinigrina je bio prisutan u značajnoj količini u isparljivim frakcijama organskog uzorka belog kupusa i konvencionalnog uzorka kelja, dok u ostalim isparljivim frakcijama nije bio prisutan. Pored toga u svim isparljivim frakcijama ispitivanog povrća su bili prisutni i degradacioni proizvodi SMCSO, volatilne komponente poznate po tome što hrani daju tipičnu aromu „nalik kupusu“, što se vezuje prvenstveno za disulfid i trisulfid, dok se DMS percipira kao tipična aromu kivanog asparagusa (Belitz et al., 2009). Budući da ima veoma nisku donju granicu percepcije (0,01 µg/L) DMTS spada u red veoma aromatičnih jedinjenja i čest je pratilac metantiola. Metaboliti SMCSO su činili celokupnu isparljivu frakciju kako konvencionalnog uzorka (ako se zanemari kontaminacija), tako i organskog uzorka kelerabe. Takođe su činili i najveći deo isparljive frakcije organski gajenog kineskog kupusa i konvencionalno gajenog crvenog kupusa. Na osnovu rezultata o distribuciji mirisnih komponenti, nije moguće izvesti precizan zaključak o uticaju sistema proizvodnje na miris i aromu *Brassica* povrća, budući da su neke od komponenata pretežno zastupljene u organskim, dok su druge dominantne u konvencionalnim uzorcima, a izvestan broju distribuisan u biljkama potpuno nezavisno od sistema proizvodnje.

Tabela 4.7. Sadržaj isparljivih jedinjenja u svežem biljnom materijalu ispitivanih vrsta *B. oleracea* i *B. rapa*.

R. br.	t_r (min)	Jedinjenje	Brokoli		Karfiol		Keleraba		Kelj		Crveni kupus		Beli kupus		Kineski kupus	
			O	K	O	K	O	K	O	K	O	K	O	K	O	K
			Relativni udeo u uzorku (%)													
1.	1.60	Dimetil sulfid	26.19	24.69	31.35	11.92	71.85	9.40	7.65	3.48	14.91	15.80	23.30			34.39
2.	1.62	Metilen hlorid (kontaminacija)						2.46								
3.	1.67	2-Metil propanal/ butanal	2.42		10.60	1.18			0.95							
4.	1.76	Butanal+ nepoznato				0.89			1.02							
5.	2.01	Nepoznato	2.25						1.05							
6.	2.02	Alil cijanid (3-butenonitril)/ izopropan cijanid (2-metil-2-propenonitril)+ Nepoznato				9.07			1.93	3.96			4.54			
7.	2.06	Nepoznato	1.74			1.39										
8.	2.14	Jon 57 (1-Penten-3-ol)	7.45	8.78	8.16	4.98	6.33		15.07	2.93	4.86	3.74				
9.	2.23	3-Pentanon	0.83						1.36							
10.	2.26	2-Etilfuran	30.83	26.16	14.57		8.50		27.90	18.12	41.03	17.34	6.56			
11.	2.61	Dimetil disulfid		3.52	16.99	25.83	13.31	39.96		2.97		15.28	8.27			29.55
12.	2.69	Nepoznato							1.14							
13.	2.82	Nepoznato							1.05							
14.	3.10	Heksanal	20.71	20.22	8.86	7.01			10.50	10.92	29.13	8.48				

15	3.76	<i>E</i> -2-heksenal					7.74	3.74						
16	3.78	<i>Z</i> -3-heksen-1-ol					21.10	12.99						
17	3.80	<i>E</i> -2-Heksenal+ <i>Z</i> -3-heksen-1-ol	7.59	16.33	1.49				10.07	9.12	11.20	25.83		
18	3.95	Nepoznato					1.55							
19	4.17	Alil izotiocijanat						33.26			36.01			
20	5.58	Dimetil trisulfid			9.47	21.74	48.18	7.56		30.23	10.12	10.23		
21	6.15	Nepoznato						0.04						
Degradacioni proizvodi masnih kiselina (%)			69.83	71.49	42.19	15.55	14.83	-	85.57	48.36	85.09	38.68	17.76	25.83
Degradacioni proizvodi glukozinolata (%)			-	-	-	9.07	-	1.93	37.22	-	-	-	40.55	
Degradacioni proizvodi <i>S</i> -methyl-L-cistein sulfoksida (%)			26.19	28.21	57.81	59.49	85.16	97.54	7.65	7.01	14.91	61.31	41.69	74.17
Nepoznato (%)			3.99	-	-	1.39	-	3.24	0.04	-	-	-	-	
Kontaminacija							2.46							
Ukupna zastupljenost u uzorku (%)			100.00	99.70	100.00	85.5	99.99	97.54	98.39	92.63	100.00	99.99	100.00	100.00

4.2.2 Hemijski profil sokova

Hemijski sastav sokova vrsta *B. oleracea* i *B. rapa* je analiziran pomoću LC-DAD-MS/MS tehnike. Preliminarni skrining komponenti i selekciju jona prekursora za MS² eksperimente su izvršeni u MS2Scan modu (MS¹ eksperiment). Podaci su analizirani i u pozitivnom i u negativnom modu, za pouzdaniji prenos jona i određivanje molekulskih masa. U Product Ion Scan modu (MS² eksperimenti) su dobijeni spektralni podaci za identifikaciju komponenti. BPC hromatogrami analiziranih sokova kao i pojedini UV spektri su predstavljeni u *Prilogu (Tabela 8.5.; Slika 8.1.)*. Najreprezentativniji primeri BPC hromatograma prikazani su na *Slici 4.1*. Spektralni podaci i fragmentacija detektovanih jedinjenja su dati u *Tabeli 4.8*.

Na osnovu dobijenih podataka kao i poređenja sa podacima iz literature identifikovano je ukupno devet jedinjenja. Predominanti, rano eluirajući pikovi ($t_r < 0.8$ min), prisutni u svim uzorcima identifikovani su kao primarni biomolekuli – limunska kiselina (P1), fenilalanin (P2) i triptofan (P3) poređenjem MS² spektra sa referentnim standardima i Human Metabolome Database (Wishart et al., 2007). Serija kasnije eluirajućih pikova (t_r u opsegu 5.4–7 min) je odgovarala seriji jedinjenja molekulskih mase 328 (P13) i 330 (P14) koja nisu identifikovana ali se na osnovu prethodnih radova pretpostavlja da pripadaju uobičajenim primarnim biomolekulima.

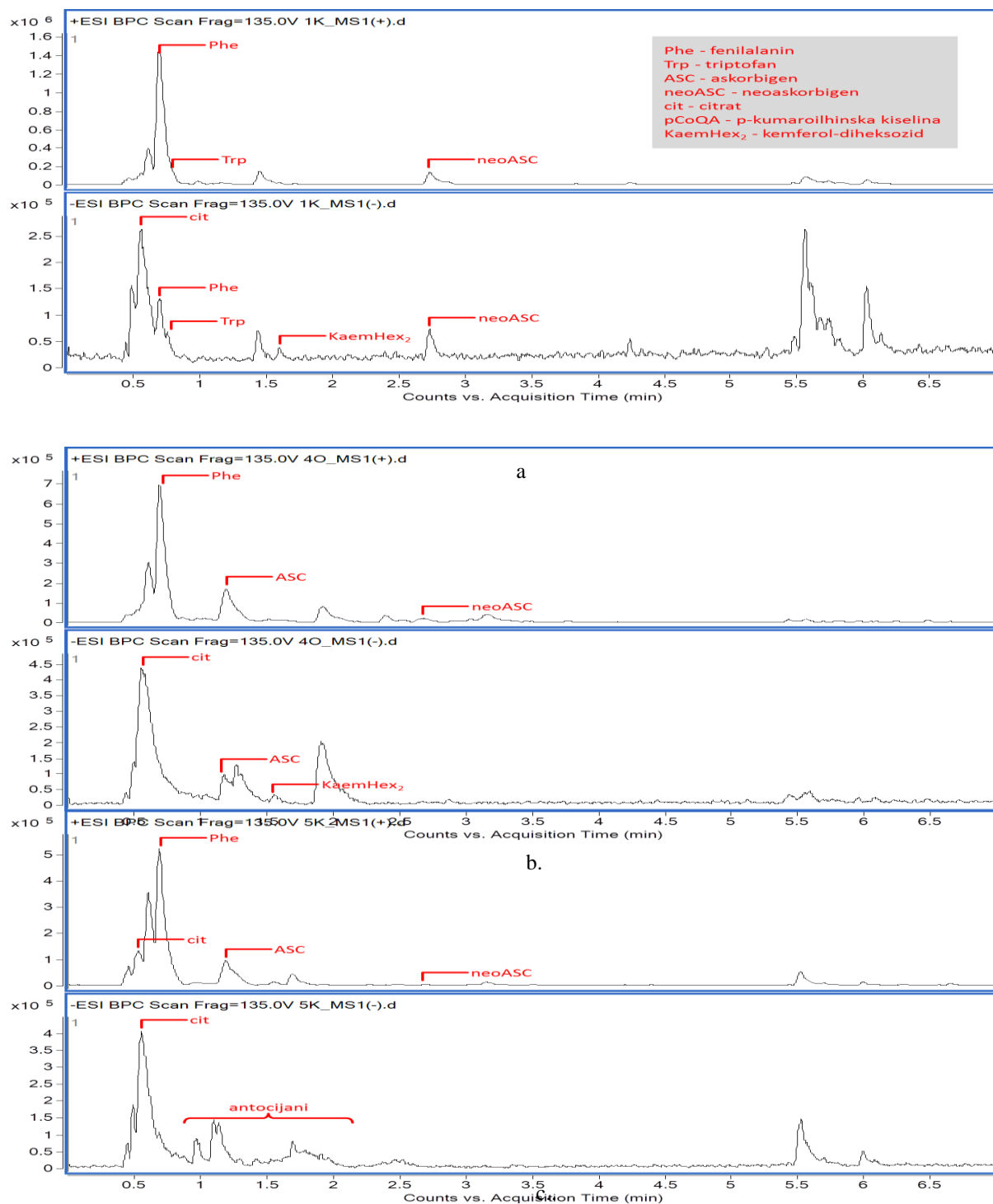
Pikovi na 1.13 min i 1.54-1.55 min (P4 i P9) sa identičnom molekulskom masom 338 su identifikovani kao 3-*O-p*-kumaroilhinska kiselina i 4-*O-p*-kumaroilhinska kiselina na osnovu poređenja spektralnih podataka sa literaturnim podacima (Clifford i Kuhnert, 2006).

Pikove koji su se pojavili na 1.20 min i 2.73 min (P6 i P11) je karakterisala prominentna traka na približno 220 nm u i slaba traka sa proširenim maksimumom u opsegu 270–290 nm UV spektra, slično triptofanu. Kod oba jedinjenja je uočen gubitak 176 jedinica u PI spektru. Razlika u masi između P5 i P9 od 30 jedinica je ukazivala na metoksilaciju, što potvrđuju naredni gubici 15 i 28 jedinica (CH₃· i CO) jona na m/z 160 uočenog u PI spektru jedinjenja P9. Gubitak CO (formiranog kontrakcijom prstena) ukazuje na C-metoksilaciju. Na osnovu literaturnih podataka Plikhtyak et al., 1992: Bennet et al., 2004), ova jedinjenja su identifikovana kao askorbigen i 4-metoksi askorbigen, čije je prisustvo ranije već utvrđeno u *Brassica* vrstama. Uv spektri ovih jedinjenja su prikazani na *Slici 8.1* u *Prilogu 8*.

Pik P5 je odgovarao jedinjenju molekulske mase 469, što ukazuje na neparan broj atoma azota. Subsekventni gubitak od 146 i 162 jedinice uočen u PI MS² spektru, je ukazao na prisustvo deoksiheksozil i heksozil jezga (izobarne alternative – *p*-kumaroil i kafeoil – su odbačene usled nepostojanja apsorbanse apsorpcione trake na približno 300 nm), i najverovatnije predstavlja uobičajeno jezgro rutinozila. Na osnovu UV spektra i mase aglikona, P4 verovatno predstavlja rutinoza indolkarboksilat mada je neophodna dalja potvrda identiteta ovog jedinjenja.

Svega jedna flavonoid je detektovan sa MS¹ hromatograma – P10. Joni u MS² spektru na m/z 287, 285 and 284, koji odgovaraju Y₀⁺, Y₀⁻ and [Y₀-H]⁺, u navedenom redosledu, ukazuju na kemferol ili luteolin kao aglikon. Na osnovu UV spektra (*Slika 8.1* u *Prilogu*) identifikovan je 3-*O*-supstituisan kemferol a na osnovu fragmentacije, ovo jedinjenje je ili kemferol 3-*O*-heksozilheksozid ili kemferol 3,*x*-di-*O*-heksozid.

Prisustvo antocijana u sokovima crvenog kupusa je potvrđeno na osnovu regiona ($t_r \sim 0,9-2,2$ min) u hromatogramima navedenih varijeteta koji daje široku traku u VIS hromatogramu na 520 \pm 20 nm koja predstavlja karakterističnu traku antocijana (*Slika 4.1*), međutim ova jedinjenja nisu mogla biti identifikovana na osnovu masenih, ni UV/VIS spektara usled velikog broja preklopljenih pikova.



Slika 4.1. BPC hromatogrami sokova: a. konvencionalno gajenog brokolija; b. organski gajenog kelja; c. konvencionalno gajenog crvenog kupusa.

Tabela 4.8. Spektralni podaci i fragmentacija detektovanih jedinjenja.

Pik	tr [min]	Mr	UV	MS ² spektar: polarnost, kolizioni napon, <i>m/z</i> (zastupljenost)	Identifikacija
P1	0.56	192	n/a*	NI, 5V: 191(6), 173(5), 129(6), 111(100), 87(18), 85(15) NI, 15V: 191(5), 111(100), 87(39), 85(26), 67(5) NI, 25V: 111(48), 111(50), 87(100), 85(54), 67(45), 57(24), 43(12), 41(10) NI, 35V: 87(63), 57(100), 43(58), 39(66) PI, 5V: 120(100) PI, 15V: 120(100), 103(16)	Limunska kiselina
P2	0.70	165	320–355 (broad), 256, 206, 198	PI, 25V: 120(85), 103(100), 93(15), 91(12), 79(10), 77(25) PI, 35V: 120(16), 103(100), 93(8), 91(27), 79(12), 77(96), 51(8) NI, 5V: 164(18), 147(100), 103(32), 72(10) NI, 15V: 147(52), 103(100), 91(7), 72(17) NI, 25V: 103(92), 72(100) PI, 5V: 120(100) PI, 15V: 120(100), 103(16) PI, 25V: 120(85), 103(100), 93(15), 91(12), 79(10), 77(25) PI, 35V: 120(16), 103(100), 93(8), 91(27), 79(12), 77(96), 51(8) NI, 5V: 164(18), 147(100), 103(32), 72(10) NI, 15V: 147(52), 103(100), 91(7), 72(17) NI, 25V: 103(92), 72(100)	Fenilalanin
P3	0.76	204	278, 272, 217, 198	PI, 25V: 120(85), 103(100), 93(15), 91(12), 79(10), 77(25) PI, 35V: 120(16), 103(100), 93(8), 91(27), 79(12), 77(96), 51(8) NI, 5V: 164(18), 147(100), 103(32), 72(10) NI, 15V: 147(52), 103(100), 91(7), 72(17) NI, 25V: 103(92), 72(100) NI, 5V: 191(6), 163(100) NI, 15V: 191(14), 163(100), 119(36), 111(5) NI, 25V: 191(19), 163(64), 119(100) NI, 35V: 163(11), 119(100)	Triptofan
P4	1.13	338	310, sh290	PI, 5V: 324(100), 162(29) PI, 15V: 324(16), 162(100) PI, 25–35V: 162(100) NI, 5–35V: 145(100)	3- <i>O</i> -p-kumaroilhinska kiselina
P5	1.16	469	286, 220 (nečisto?)	PI, 5–35V: 130(100) NI, 5–35V: 116(100)	Rutinoza indol-3-karboksilat ?
P6	1.20	305	280, ~272, 218, 196	PI, 5V: 197(100), 132(52), 86(33), 84(11), 84(9) PI, 15V: 132(21), 86(100), 84(67) PI, 25V: 86(46), 86(46), 84(100), 56(17), 41(13) PI, 35V: 84(100), 56(20), 41(37)	Askorbigen
P7	1.44	242	n/a*	NI, 5V: 241(70), 241(96), 197(100), 141(6) NI, 15V: 241(34), 241(22), 197(100), 169(13), 141(19), 130(12), 112(26), 82(49) NI, 25V: 168(45), 141(84), 141(52), 82(100) NI, 35V: 82(100), 70(47)	?

* nije				PI, 5V: 348(6), 331(12), 330(21), 317(39), 201(15), 174(19), 87(100), 86(24) PI, 15V: 348(71), 317(8), 201(10), 174(56), 159(6), 112(9), 87(100), 86(35), 70(6), 59(7), 44(13) PI, 25V: 174(58), 159(34), 113(5), 112(8), 87(100), 86(36), 73(6), 70(27), 59(36), 44(59) PI, 35V: 174(22), 159(85), 144(9), 143(16), 131(11), 87(38), 86(30), 73(9), 72(5), 70(42), 59(98), 44(100), 43(8) NI, 5V: 199(100) NI, 15V: 185(100), 143(34) NI, 25V: 185(100), 116(13) NI, 3V: 185(100)	?
P8	1.45	347	n/a*		
P9	1.54-1.55	338	310, sh290	NI, 5V: 173(100), 163(20) NI, 15V: 173(100), 163(14), 93(8) NI, 25V: 173(100), 163(11), 119(49), 93(66) NI, 35V: 119(58), 93(100)	4-O-p-kumaroilhinska kiselina
P10	1.59	610	348, 264	PI, 5V: 448(11), 287(100) PI, 15-35V: 287(100) NI, 5-15V: 609(100) NI, 25V: 285(33), 284(100) NI, 35V: 285(42), 284(100)	Kemferol-3,x-di-O-heksozid ili kemferol-3-O-heksosilheksozid
P11	2.73	335	289, 276, 220, 197	PI, 5V: 305(12), 304(32), 160(100) PI, 15V: 160(100), 145(7), 130(8) PI, 25V: 160(100), 145(48), 130(12), 128(16), 117(18) PI, 35V: 160(56), 145(100), 130(25), 129(21), 128(53), 117(83) PI, 5V: 148(73), 133(54), 132(20), 117(40), 116(100)	Metoksi askorbigen
P12	3.83	191	290, sh~230, 216, 196	PI, 15V: 133(46), 132(31), 117(100), 116(72), 105(18), 104(15) PI, 25V: 117(100), 116(62), 105(22), 104(57), 90(18), 89(30), 77(18) PI, 35V: 117(84), 104(51), 90(100), 89(78)	?
P13	5.4-6.4**	328	n/a (<215)	n/a	?
P14	5.9-7**	330	n/a (<215)	PI, 5V: 329(100), 229(12), 211(13) PI, 15V: 329(100), 229(14), 211(16) PI, 25V: 329(31), 229(47), 211(100), 209(8), 183(14), 171(18), 167(7), 139(5), 127(5), 99(8) PI, 35V: 211(100), 193(34)	?

dostupno – koeluirano ili suviše slab signal

** serija pikova

4.2.3 Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja u biljnim sokovima

Kvantitativnom LC-MS/MS analizom je utvrđeno pojedinačno prisustvo svega dvanaest od 45 analiziranih fenolnih jedinjenja (*Tabela 4.9.*). Kalibracione krive na osnovu kojih je određen sadržaj detektovanih jedinjenja se nalaze u *Prilogu* u *Tabeli 8.6.* U sokovima su bila prisutna uglavnom jednostavna fenolna jedinjenja: derivati hidroksibenzoeve i hidroksicimetne kiseline. S obzirom da su u vrstama roda Brassica prisutne kompleksne smeše fenolnih jedinjenja kojima dominiraju konjugati flavonoida i različiti derivati hidroksicimetnih kiselina (Kyle i Duthie, 2006; Cartea et al., 2011), navedena jedinjenja nisu mogla biti detektovana zbog nedostataka standard za određivanje, pa su kvantifikovane samo minorne komponente.

Kao najdominantnije jedinjenje izdvojila se hinska kiselina, čiji je sadržaj bio najviši u sokovima crvenog kupusa: 9,89 mg/L u organskom i 9,17 mg/L u konvencionalnom uzorku. Nešto niži sadržaj je imao sok dobijen iz organski gajenog kelja (8,75mg/L), a potom i sokovi brokolija- 8,56 mg/L organski i 8,05 mg/L konvencionalni uzorak. Najniža koncentracija hinske kiseline je nađena u sokovima kelerabe, pri čemu je minimalna koncentracija određena u soku konvencionalnog uzorka (1,85 mg/L). Analiziranjem sadržaja hinske kiseline u ispitivanim uzorcima može se uočiti porast koncentracije ovog jedinjenja pod uticajem organskog sistema proizvodnje, pri čemu je intenzitet tog uticaja zavisio i od ispitivanog varijeteta. Na osnovu razlika u sadržaju ovog jedinjenja u organskim i konvencionalnim uzorcima može se zaključiti da je kelj bio varijetet najpodložniji tom trendu.

Najviši nivo sinapinske kiseline je određen u sokovima crvenog kupusa, ali za razliku od hinske kiseline, njena koncentracija je bila viša u soku konvencionalnog uzorka, 2,77 mg/L u odnosu na 2,22 mg/L u soku organskog uzorka. Sličan trend je uočen u sokovima kineskog kupusa (1,55 mg/L konvencionalni i 1,23 mg/L organski uzorak) koji je uz crveni kupus imao veće količine ovog jedinjenja od ostalih varijeteta. Prema podacima iz tabele može se zaključiti da se sinapinska kiselina akumulirala uglavnom u lisnatom povrću analiziranom u ovom radu, dok je u cvetovima brokolija i karfiola, kao i u stablu kelerabe sinapinska kiselina nađena samo u tragovima. Sok dobijen iz organski gajenog kineskog kupusa je imao i najvišu koncentraciju ferulne kiseline (1,33 mg/L) dok je u ostalim sokovima nađena daleko manja koncentracija ove kiseline. Ferulna kiselina je bila prisutna u tragovima u sokovima organskog brokolija i kelerabe.

Značajnija koncentracija *p*-kumarinske kiseline je nađena u soku organski gajenog crvenog kupusa u odnosu na konvencionalan uzorak i ostale varijetete. Dvostruko viša koncentracija *p*-hidroksibenzoeve kiseline detektovana je u sokovima organskog brokolija i karfiola u odnosu na konvencionalne uzorke, dok je u ostalim varijetetima ova kiselina detektovana uglavnom u tragovima.

Tabela 4.9. Sadržaj individualnih fenolnih jedinjenja u sokovima vrsta *B. oleracea* i *B. rapa*.

	Kvantifikovana jedinjenja											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Brokoli O	0.52	<0.01	0.05	<0.01	8.56	<0.02	<0.02	<0.10	<0.01	<0.01	0.01	<0.01
Brokoli K	0.27	<0.01	0.07	<0.01	8.05	0.12	0.16	<0.10	0.01	0.29	<0.01	0.11
Karfiol O	0.42	<0.01	0.63	<0.01	6.46	<0.02	0.63	<0.10	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Karfiol K	0.16	<0.01	0.21	<0.01	5.34	<0.02	0.12	<0.10	0.01	<0.01	<0.01	0.04
Keleraba O	<0.02	<0.01	<0.01	<0.01	2.94	<0.02	<0.02	<0.10	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Keleraba K	<0.02	<0.01	<0.01	<0.01	1.85	<0.02	0.03	<0.10	<0.01	<0.01	<0.01	0.03
Kelj O	0.04	<0.01	0.07	<0.01	8.75	<0.02	0.03	<0.10	<0.01	0.07	<0.01	<0.01
Kelj K	<0.02	<0.01	0.08	<0.01	6.35	<0.02	0.07	0.70	<0.01	<0.01	<0.01	0.02
Crveni kupus O	<0.02	0.12	1.07	0.03	9.89	<0.02	0.53	2.22	0.02	<0.01	0.02	<0.01
Crveni kupus K	<0.02	0.08	0.47	0.03	9.17	<0.02	0.77	2.77	0.02	0.02	0.02	0.01
Beli kupus O	<0.02	<0.01	0.05	<0.01	5.21	<0.02	0.25	0.76	0.04	<0.01	<0.01	<0.01
Beli kupus K	<0.02	<0.01	0.32	<0.01	4.78	<0.02	0.18	0.55	0.01	0.01	0.01	0.01
Kineski kupus O	<0.02	<0.01	0.08	0.02	4.03	<0.02	1.33	1.23	0.03	<0.01	<0.01	<0.01
Kineski kupus K	<0.02	<0.01	<0.01	0.02	3.31	<0.02	0.43	1.55	0.04	<0.01	<0.01	<0.01

1. *p*-hidroksibenzojeva kiselina, 2. Protokatehinska kiselina, 3. *p*-kumarinska kiselina, 4. Kafena kiselina, 5. Hinska kiselina, 6. Skopoletin, 7. Ferulna kiselina, 8. Sinapinska kiselina, 9. 5-*O*-kafeoilhinska kiselina, 10. Kemferol-3-*O*-glukozid, 11. Kvercetin-3-*O*-glukozid, 12. Amentoflavon.

4.2.4 Sadržaj ukupnih glukozinolata u ekstraktima liofilizovanog biljnog materijala

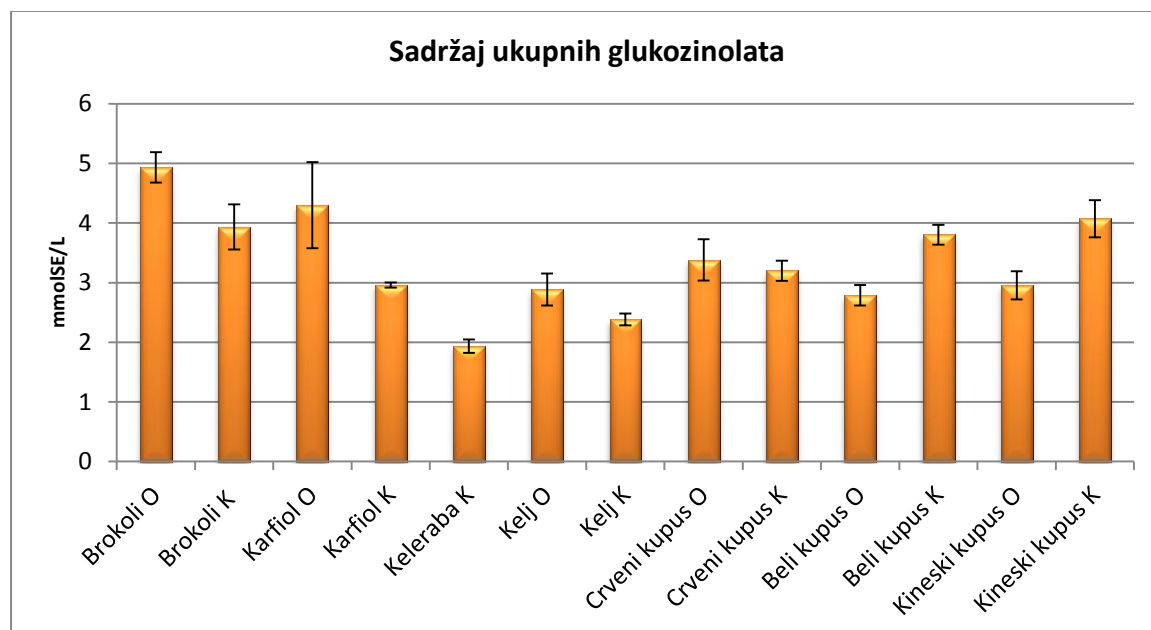
Sadržaj ukupnih glukozinolata u ekstraktima liofilizovanog povrća je određen spektrofotometrijski, putem reakcije kompleksiranja glukozinolata sa natrijum-tetrahlorpaladat(II). U ispitivane probe je dodavano standardno jedinjenje sinigrin u cilju eliminacije interference matriksa. Rezultati određivanja sadržaja glukozinolata su prikazani u *Prilogu* u *Tabelama* 8.7. i 8.8. i na *Slici* 4.2.

Sadržaj ukupnih glukozinolata kretao se u opsegu 1,93-4,93 mmol sinigrin ekvivalenta (SE)/L, a najviši sadržaj je određen u ekstraktu organski gajenog brokolija. Potom su sledili organski karfiol sa sadržajem 4,30 mmol SE/L, i ekstrakti konvencionalnog kineskog i belog kupusa u kojima je sadržaj glukozinolata bio 4,07 i 3,80 mmol SE/L.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da primenjeni sistem proizvodnje povrća nije ispoljio značajniji uticaj na sadržaj ukupnih glukozinolata u crvenom kupusu u čijim ekstraktima je utvrđena količina 3,38 mmolSE/L i 3,20 mmolSE/L, uz blagi porast u korist organski gajenih uzoraka. U ekstraktu kelerabe je nađen najniži sadržaj ukupnih glukozinolata (1.93 mmolSE/L), međutim poređenje ove vrednosti sa ekstraktom konvencionalnog uzorka nije bilo moguće zbog nedostupnosti biljnog materijala.

Sa priloženog histograma (*Slika* 4.2.) se može uočiti da je organski tip proizvodnje prouzrokovao porast sadržaja ukupnih glukozinolata u većini ispitivanih varijeteta, uz nekoliko izuzetaka. Naime, ekstrakti belog i kineskog kupusa su imali povećan sadržaj ovih jedinjenja pod uticajem konvencionalnog tipa proizvodnje, dok za kelerabu ovaj

uticaj nije mogao biti analiziran usled nedostatka konvencionalnih uzoraka liofilizovanih biljaka.



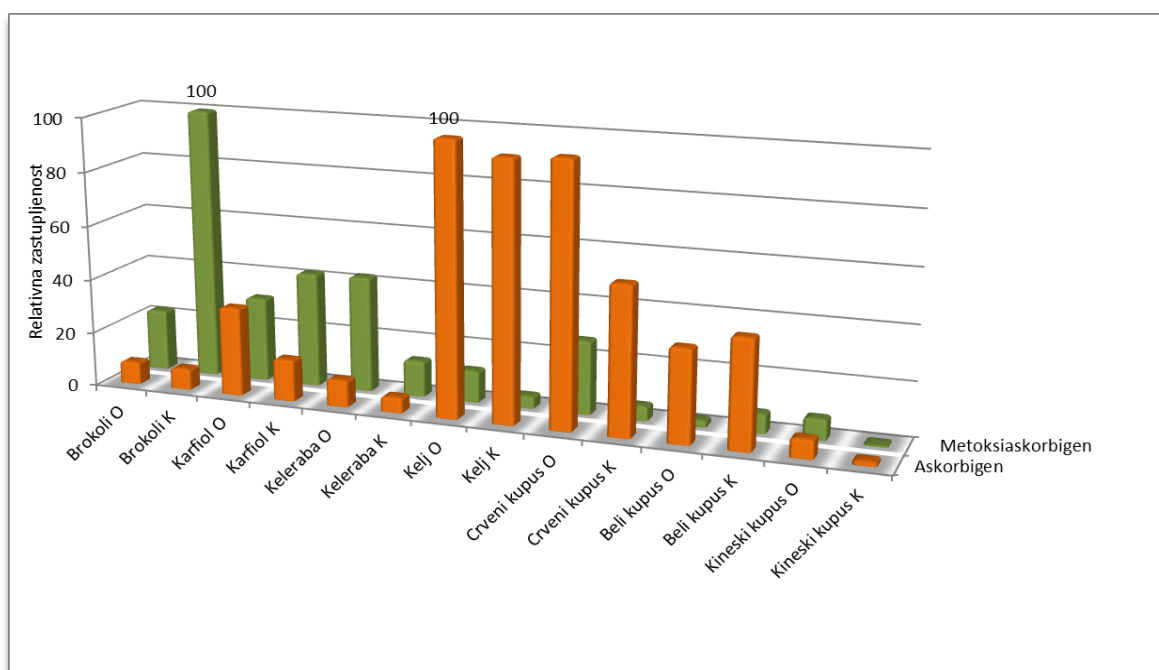
Slika 4.2. Sadržaj ukupnih glukozinolata u ekstraktima liofilizovanih biljaka.

Ostvareni uticaj organske proizvodnje u većini ispitivanih varijeteta je u saglasnosti sa rezultatima Miranda Rossetto et al. (2013) koji su utvrdili veću koncentraciju glukozinolata kod većine ispitivanih biljaka porodice Brassicaceae poreklom iz organske proizvodnje, uglavnom zasnovanu na povećanom sadržaju benzil glukozinolata. Nasuprot tome, rezultati Vicas et al. (2013) ukazuju na smanjenje sadržaja glukozinolata u brokoliju pod uticajem organske proizvodnje, dok su Valverde et al. (2015) u istoj biljci pod uticajem organskog sistema proizvodnje našli povećan nivo pojedinih glukozinolata.

Primenjena kolorimetrijska metoda ne pruža podatke o količini i prisustvu individualnih glukozinolata, međutim ona predstavlja vrlo koristan izvor informacije o ukupnom sadržaju ovih jedinjenja koja utiču na ukus i aromu ispitivanih vrsta i poseduju lekoviti potencijal. Individualno prisustvo pojedinih glukozinolata u vrstama *B. oleracea* i *B. rapa* je utvrđeno na osnovu analize volatilnih komponenti svežih biljaka i pri hemijskom profilisanju sokova ispitivanih varijeteta. Alil cijanid i alil izotiocijanata prisutni u headspace-u pojedinih biljaka su ukazali na prisustvo alifatičnog glukozinolata sinigrina. Obzirom da genomski kompleks podvrsta Brassicacea uslovljava prisustvo individualnih glukozinolata (Ishida et al., 2014) pri čemu *B. oleracea* (CC, $2n=18$) sadrži glukozinolate sa 3 ili 4 ugljenikova atoma u bočnom nizu, dok su u *B. rapa* (AA, $2n=20$) prisutni glukozinolati sa 4 ili 5 ugljenikovih atoma, ovo je bio u potpunosti očekivan rezultat.

Na osnovu PI spektara je konstruisan grafikoni koji pokazuju relativnu zastupljenost identifikovanih degradacionih proizvoda indolnih glukozinolata pomoću LC-DAD-MS/MS tehnike što je prikazano na *Slici 4.3*. Može se uočiti da je relativna zastupljenost askorbigena poreklom iz glukobrazicina viša u sokovima organskog nego u sokovima konvencionalnog povrća, izuzev u slučaju belog kupusa i da je ovaj kondenzacioni proizvod indol-3-karbinola sa askorbinskom kiselinom najzastupljeniji u sokovima kelja i crvenog kupusa. Askorbigen nije prisutan u intaktnom tkivu biljaka, već

nastaje kao rezultat enzimske hidrolize prilikom obrade, odnosno povređivanja povrća. Količina nastalog askrobigena je u najvećoj meri zavisna od inicijalne količine glukobrazicina, pH vrednosti i prisutva metalnih jona. pH vrednost Brassica vrsta se kreće u intervalu 5-6,5 tako da i male varijacije uslovljavaju različite količine formiranog askorbigena. U slučaju drugog degradacionog proizvoda, metoksiaskorbigena, koji vodi poreklo iz metoksiglukobrazicina se uočava potpuno suprotan efekat u sokovima brokolijsa i karfiola (Slika 4.3.). Naime, sokovi ovih biljaka proizvedeni u konvencionalnom sistemu proizvodnje su imali viši sadržaj metoksiaskorbigena u odnosu na organske uzorke, dok su organski uzorci kelerabe, kelja, crvenog i kineskog kupusa imali viši sadržaj ovog jedinjenja u odnosu na konvencionalne uzorke. Metoksiaskorbigen je bio zastupljen u daleko većoj meri u soku konvencionalno gajenog brokolijsa nego u ostalim uzorcima.

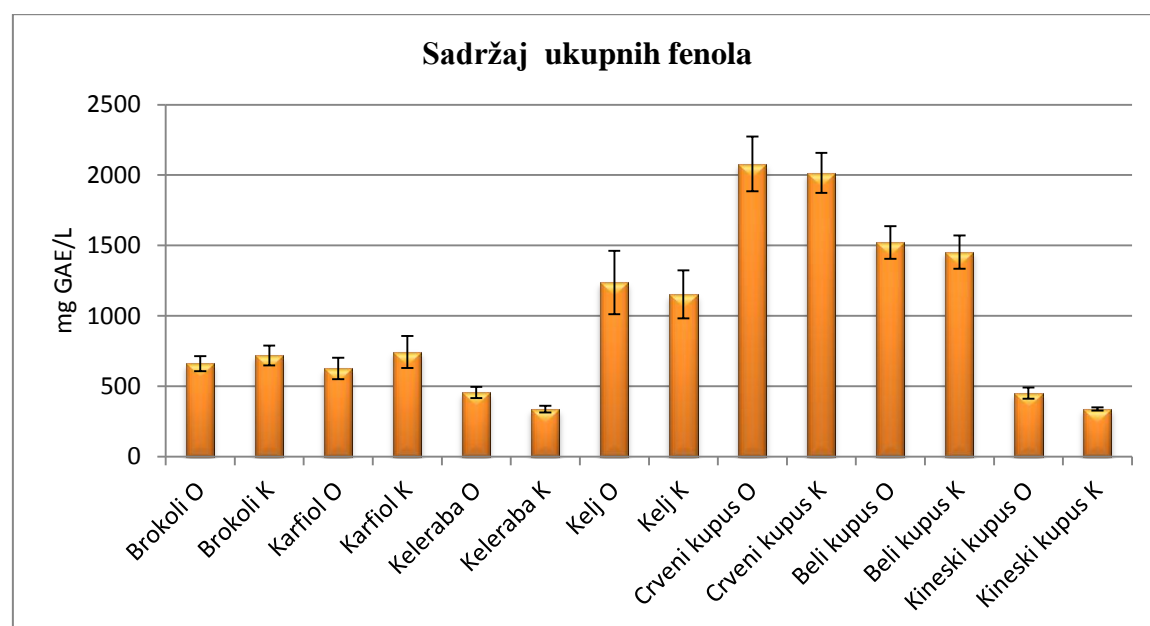


Slika 4.3. Relativna zastupljenost askorbigena i metoksiaskorbigena (skalirana 0-100) u sokovima ispitivanih vrsta *B. oleracea* i *B. rapa*.

4.2.5 Sadržaj ukupnih fenola u sokovima

Sadržaj ukupnih fenola u sokovima ispitivanih vrsta *B. oleracea* i *B. rapa* je određen spektrofotometrijski na osnovu reakcije fenolnih jedinjenja sa Folin-Ciocalteu reagensom. Pregled očitanih apsorbanci i izračunavanje sadržaja su dati u *Prilogu u Tabeli 8.9*. Sadržaj ukupnih fenola u sokovima ispitivanog povrća se kretao u rasponu 338,2 do 2080 mg GAE/L. Najviši sadržaj ukupnih fenola je utvrđen u sokovima crvenog kupusa, bez velike razlike između uzoraka gajenih u organskom i konvencionalnom sistemu, (2080 organski uzorak i 2015 mg GAE/L konvencionalni uzorak). Primenjeni tip proizvodnje nije ostvario značajniji uticaj ni u slučaju ostalih biljaka. Naime, nešto niži sadržaj ukupnih fenola u sokovima belog kupusa je iznosio 1522 (organski uzorak) i 1452 mg GAE/L (konvencionalni), dok je u sokovima organskog i konvencionalnog kelja iznosio 1238 i 1153 mg GAE/L. Ostalo povrće je imalo daleko manji sadržaj ukupnih fenola pri čemu je najniži sadržaj utvrđen u sokovima kelerabe (457,4 u organskom i 338,2 mg GAE/L soka u konvencionalnom uzorku). Izuzev kod uzoraka brokolijsa i

karfiola kod svog ostalog povrća se može uočiti nešto viši sadržaj fenolnih jedinjenja u organskim u odnosu na konvencionalne uzorke što je bilo slično do sada utvrđenom uticaju organskog sistema proizvodnje na sadržaj ukupnih fenola u različitim vrstama povrća koje su ispitivali Pereira Lima i saradnici (2008). Međutim, ukoliko se sadržaj ukupnih fenola u sokovima ispitivanih vrsta *B. oleraceae* i *B. rapa* uporedi sa rezultatima dobijenim prilikom ispitivanja uticaja svetlosti i stresa indukovano glukozom na izdanke brokolija (Masci et al., 2015) može se utvrditi da drugi faktori, kao što su faza razvoja biljke i uslovi koji vladaju u životnoj sredini imaju daleko veći uticaj na sadržaj fenolnih jedinjenja od organske i konvencionalne proizvodnje. Sadržaj ukupnih fenola u izdancima brokolija izlaganim svetlosti je iznosio 2,86 mg GAE/ml, što je daleko veća količina od one koja je utvrđena u soku organski gajenog crvenog kupusa koji je bio najbogatiji varijetet fenolima u ovom radu.



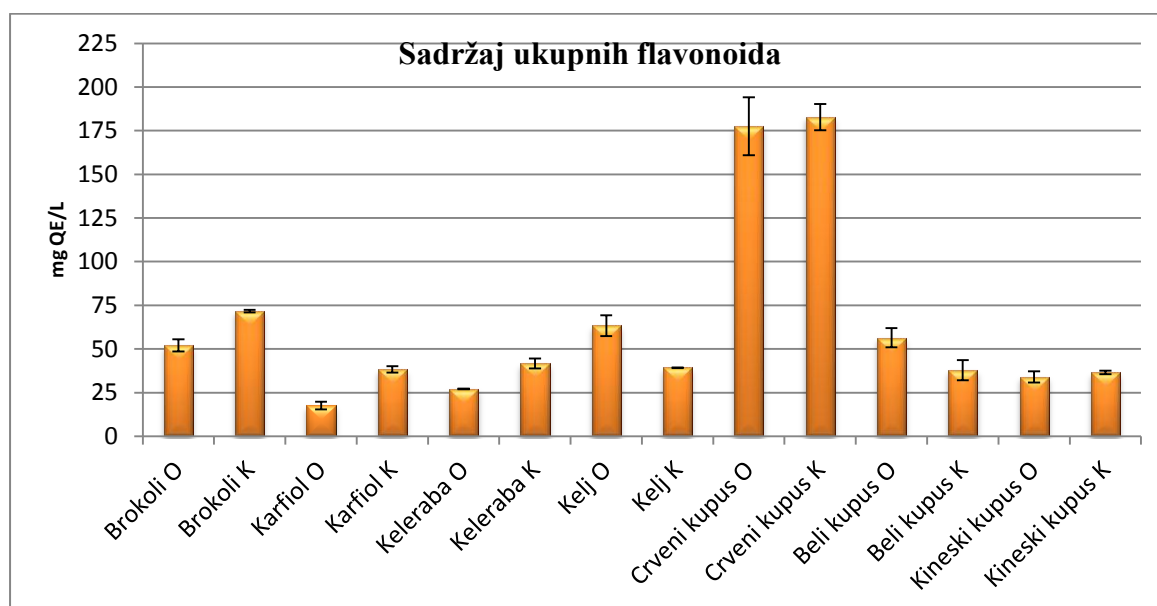
Slika 4.4. Sadržaj ukupnih fenola u sokovima ispitivanog povrća iz organske i konvencionalne proizvodnje.

4.2.6 Sadržaj ukupnih flavonoida u sokovima

Sadržaj flavonoida u sokovima ispitivanih varijeteta je određen spektrofotometrijski pomoću reakcije kompleksiranja sa $AlCl_3$, dobijeni rezultati su prikazani u Prilogu u *Tabeli 8.10.* i na *Slici 4.5.* pri čemu je utvrđeno da se u sokovima nalazi 17,59- 182,80 mg QE/L. Najviši sadržaj ukupnih flavonoida je utvrđen u soku konvencionalno gajenog crvenog kupusa, dok je najniži sadržaj utvrđen u soku karfiola poreklom iz organske proizvodnje. I sok organski gajenog crvenog kupusa je sadržao daleko veću količinu ukupnih flavonoida (175,12 mg QE/L) u odnosu na sokove ostalih varijeteta, a može se primetiti da primenjeni sistema proizvodnje nije ostvario značajniji uticaj na sadržaj ovih jedinjenja u crvenom kupusu.

Sa priložene *Slike 4.5.* se može uočiti opšti trend porasta sadržaja flavonoida pod uticajem konvencionalnog sistema proizvodnje. Do sličnog zaključka su došli i Pereira Lima et al. (2008) ispitujući povrće koje je uključivalo i pojedini pripadnike *Brassica* vrsta. Ovaj uticaj je naročito bio izražen kod povrća za koje je karakteristično formiranje cvetove i zadebljalog stabla (brokoli, karfiol i keleraba), dok kod lisnatog povrća nije

doveo do značajnijih razlika u sadržaju ukupnih flavonoida. Od ovog trenda su potpuno neočekivano odstupili uzorci kelja, kod kojih je organski sistem proizvodnje značajno podstakao akumulaciju flavonoida. Sličan ali manji uticaj istog sistema proizvodnje je uočen i u uzorcima belog kupusa.

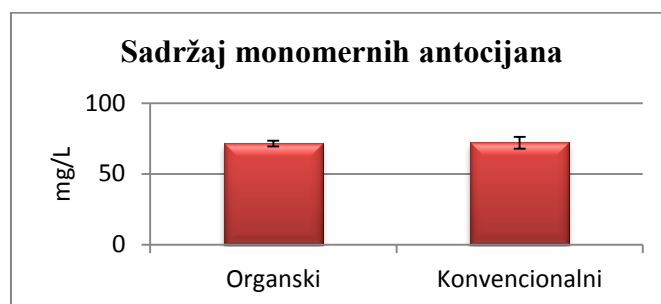


Slika 4.5. Sadržaj ukupnih flavonoida u sokovima ispitivanih vrsta *B. oleracea* i *B. rapa*.

4.2.7 Sadržaj monomernih antocijana

U uzorcima sokova crvenog kupusa je pomoću pH diferencijalne metode utvrđen podjednak sadržaj monomernih antocijana, potpunosti nezavisno od tipa proizvodnje povrća. U organskom uzorku soka je sadržaj izražen preko koncentracije cijanidin-3-glukoziida iznosio 71,40 mg/L, dok je u konvencionalnom uzorku koncentracija monomernih antocijana iznosila 71,94 mg/L što se može videti na *Slici 4.6*. Očitane apsorbance i izračunavanje sadržaja monomernih antocijana u sokovima crvenog kupusa su dati u *Prilogu (Tabele 8.11-8.13)*.

Na osnovu dobijenih vrednosti može se zaključiti da je kvalitet crvenog kupusa proizvedenog u organskom i konvencionalnom sistemu proizvodnje podjednak budući da stabilnost antocijana zavisi od mnogobrojnih faktora, a prvenstveno od strukturnih karakteristika i matriksa u kome se nalaze (Wrolstad et al., 2005). Naime, visok stepen glikozilacije, posebno acilovanje šećernih ostataka sa cimetnim kiselinama povećava stabilnost antocijana. Enzimi prisutni u biljnom tkivu kao što je peroksidaza i askorbinska kiselina uzrokuju njihovu degradaciju. Pred toga značajan je uticaj i svetlosti kao sklonost antocijana da grade obojene polimerne pigmente sa drugim fenolnim jedinjenjima. Polimerni pigmenti antocijana ne menjaju boju prilikom promene pH, i njihov sadržaj se ne uračunava prilikom merenja sadržaja monomernih antocijana pH diferencijalnom metodom.



Slika 4.6. Sadržaj ukupnih monomernih antocijana u sokovima crvenog kupusa određen pH diferencijalnom metodom.

Prisustvo antocijana je potvrđeno i u toku kvalitativne LC-DAD-MS/MS analize gde je na hromatogramima organskog i konvencionalnog uzorka crvenog kupusa uočena region (tr~0,9-2,2 min) koji daje široku traku u VIS hromatogramu na 520+/-20 nm. Uočena traka je uobičajeno prisutna karakterističnu traku antocijana, međutim ova jedinjenja nisu mogla biti identifikovana ni na osnovu masenih ni UV/VIS spektara usled velikog broja preklapljenih pikova.

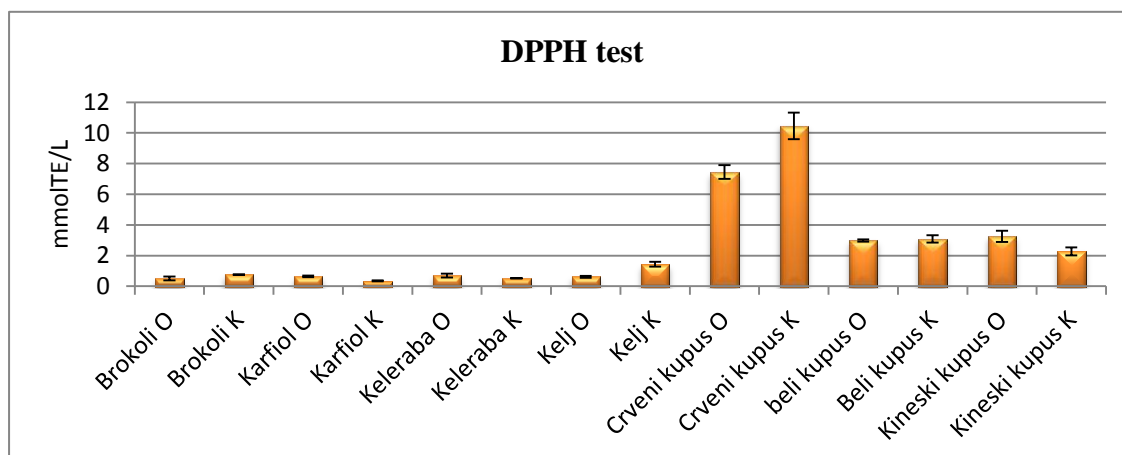
U toku preliminarnih ispitivanja antocijani iz vodene frakcije dobijene nakon sukcesivne tečno-tečno ekstrakcije metanolnog ekstrakta crvenog kupusa heksanom i etilacetatom su razdvojeni tankoslojnom hromatografijom. Nakon posmatranja TLC pločica u VIS i UV oblasti na 366 nm uočeno je prisustvo šest antocijana na osnovu karakterističnih traka svetlo plave do ljubičaste boje.

4.3 ANTIOKSIDANTNI KAPACITET SOKOVA

4.3.1 Sposobnost neutralizacije DPPH[•] radikala

Antiradikalska aktivnost vrsta *B. oleracea* i *B.rapa* je ispitana pomoću DPPH[•] testa u kome stabilni DPPH[•] radikal u prisustvu antioksidanta prelazi u redukovani oblik i menja boju iz ljubičaste u žutu. Na osnovu izmerenih apsorbanci (u *Prilogu Tabela 8.14*) antioksidantni kapacitet sokova ispitivanih vrsta pri neutralizaciji ovog radikala se kretao u rasponu 0,37-10,50 mmolTE/L (*Slika 4.7*). Sok konvencionalno gajenog crvenog kupusa čiji je TEAC_{DPPH} iznosio 10.50 mmol TE je bio najefikasniji u neutralizaciji ovog radikala, a potom je sledio sok organskog uzorka iste biljke sa nešto nižom sposobnošću neutralizacije (7,50 mmol TE/L). Sokovi kineskog i belog kupusa su ispoljili višestruko manju sposobnost neutralizacije DPPH[•] radikala, ali višu od ostalog povrća koje imalo TEAC_{DPPH} ispod 1.5 mmol TE/L. U toj grupi najmanje aktivnog povrća se kao najuspešniji izdvojio sok konvencionalnog uzorka kelja sa TEAC_{DPPH} 1.43 mM TE/L, a najmanju sposobnost neutralizacije DPPH[•] radikala je određena u soku konvencionalno gajenog karfiola (0.37 mM TE/L). Sun et al. (2007) su utvrdili da antioksidantni kapacitet soka konvencionalno gajenog brokolija iznosi 0,4 mmol TE/L, što je približno dva puta niža vrednost od TEAC_{DPPH} soka konvencionalnog uzorka brokolija utvrđenog u ovom radu (0,76 mmol TE/L), i nešto niža od 0,50 mmol TE/L utvrđenih za sok organski gajene biljke.

Poređenjem aktivnosti sokova organskih i konvencionalnih biljaka može se uočiti da je konvencionalni sistem proizvodnje doveo do porasta antioksidantnog kapaciteta crvenog kupusa u većoj meri uz nešto blaži uticaj u slučaju brokolija, kelja, i belog kupusa, dok je organska proizvodnja usloвила blagi porast antioksidantnog kapaciteta karfiola, kelerabe i kineskog kupusa.

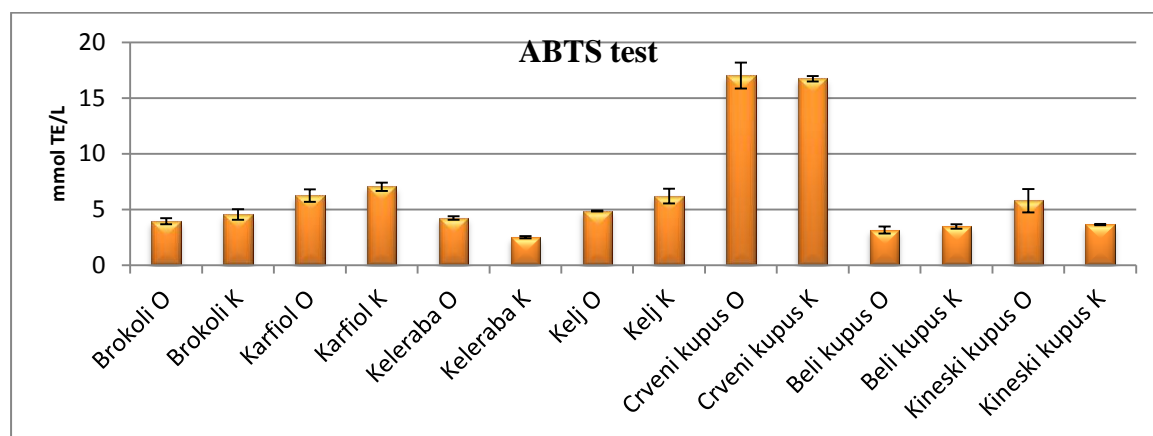


Slika 4.7. Sposobnost neutralizacije DPPH radikala.

4.3.2 Sposobnost hvatanja ABTS^{•+} katjon radikala

Antiradikalna aktivnost sokova ispitivanih vrsta *B. oleracea* i *B. rapa* je određena i pomoću ABTS testa koji se zasniva na redukciji (obezbojavanju) zeleno-plavog sintetičkog ABTS^{•+} katjon radikala. Za razliku od DPPH radikala koji je ograničen na reakcije sa antioksidantima manje polarnosti, ABTS^{•+} katjon radikal je pogodan za određivanje antioksidantnog kapaciteta i hidrofилnih i lipofilnih antioksidanata, jer se dobro rastvara u vodi, i u organskim rastvaračima i nije pod uticajem jonske jačine rastvora (Apak et al., 2013). Na osnovu dobijenih rezultata prikazanih u *Prilogu u Tabeli 8.15*. TEAC_{ABTS} ispitivanih sokova povrća se kretao u rasponu 2,5-17,0 mmol TE/L, a najefikasniji hvatač ovog radikala je bio sok dobijen iz organski gajenog crvenog kupusa (17.0 mM TE), potom je sledio sok konvencionalnog uzorka iste biljke (16.7 mM TE). Ostali sokovi su ispoljili daleko manju antiradikalnu aktivnost. TEAC_{ABTS} karfiola je bio i više od dva puta niža od TEAC_{ABTS} crvenog kupusa (7 mmol/L sok konvencionalni i 6.2 mM TE sok organskog uzorka karfiola). Sličan antioksidantni kapacitet je pokazao sok konvencionalno gajenog kelja (6.2 mM TE), a potom su sledili sokovi: kineskog kupusa (5.8 mmol TE/L) i kelja (4,9 mmol TE/L) iz organske proizvodnje i sok konvencionalno gajenog brokolija (4.6 mmol TE/L). Ostatak sokova ispitivanog povrća je ispoljio daleko nižu sposobnost hvatanja ABTS^{•+} katjon radikala, pri čemu je najmanji TEAC_{ABTS} određen u soku konvencionalno gajene kelerabe (2.5 mmol TE/L).

Poređenjem dobijenih vrednosti TEAC_{ABTS} vrednosti ispitivanih sokova pojedinih varijeteta može se zaključiti da je konvencionalni sistem proizvodnje poboljšao antioksidantni kapacitet brokolija, karfiola, kelja i belog kupusa dok je organska proizvodnja dovela do porasta antioksidantne aktivnosti kelerabe, crvenog i kineskog kupusa.

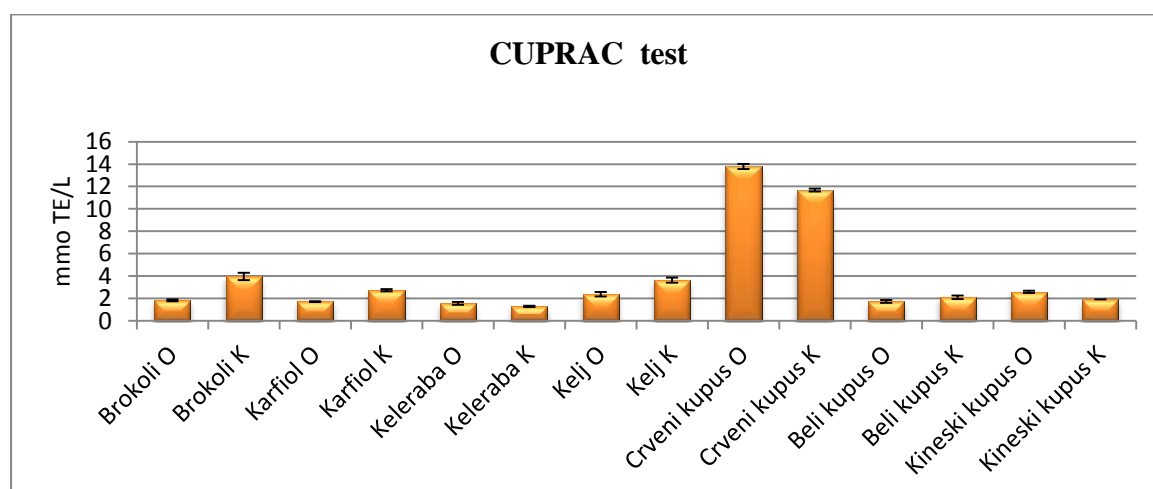


Slika 4.8. Sposobnost hvatanja ABTS katjon radikala.

4.3.3 Sposobnost redukcije Cu(II) jona

Redukciona moć vrsta *B.oleracea* i *B. rapa* je određena reakcijom sokova ispitivanih biljaka sa CUPRAC reagensom (bis(neokuproin)bakar(II) katjon) pri čemu se meri apsorbancu formirane hromofore- Cu(I)-neokuproin(Nc) kompleksa. Na osnovu očitanih apsorbanci i rezultata dobijenih u ovom testu (Prilog- Tabela 8.16.; Slika 4.9.) TEAC_{CUPRAC} se kretao u opsegu 1,31-13,79 mmol TE/L.

Najsnažnijih redukujući agens je bio sok organski gajenog crvenog kupusa (13.8 mmol TE/L), a odmah potom je sledio sok konvencionalnog uzorka ove biljke (TEAC_{CUPRAC} 11.7 mmol TE/L). Redukciona moć ostalog povrća je bila daleko slabija u odnosu na redukujuću moć crvenog kupusa. TEAC_{CUPRAC} sokova konvencionalnih uzoraka brokolija, kelja i karfiola je iznosio 4.0; 3.65 i 2.74 mmol TE/L. Navedeno povrće uz konvencionalno gajeni beli kupus je ispoljilo veću redukcionu moć u odnosu na organske uzorke. Sokovi organski gajenog brokolija, belog kupusa i karifola su imali veoma sličan redukcionu potencijal < 2 mmol TE/L. Poslednji u nizu i najslabiji redukujući agens je bio sok konvencionalno gajene keleraba sa TEAC_{CUPRAC} 1.3 mmol TE/L.



Slika 4.9. Sposobnost redukcije Cu (II) jona sokova ispitivanih vrsta *B. oleracea* i *B. rapa*.

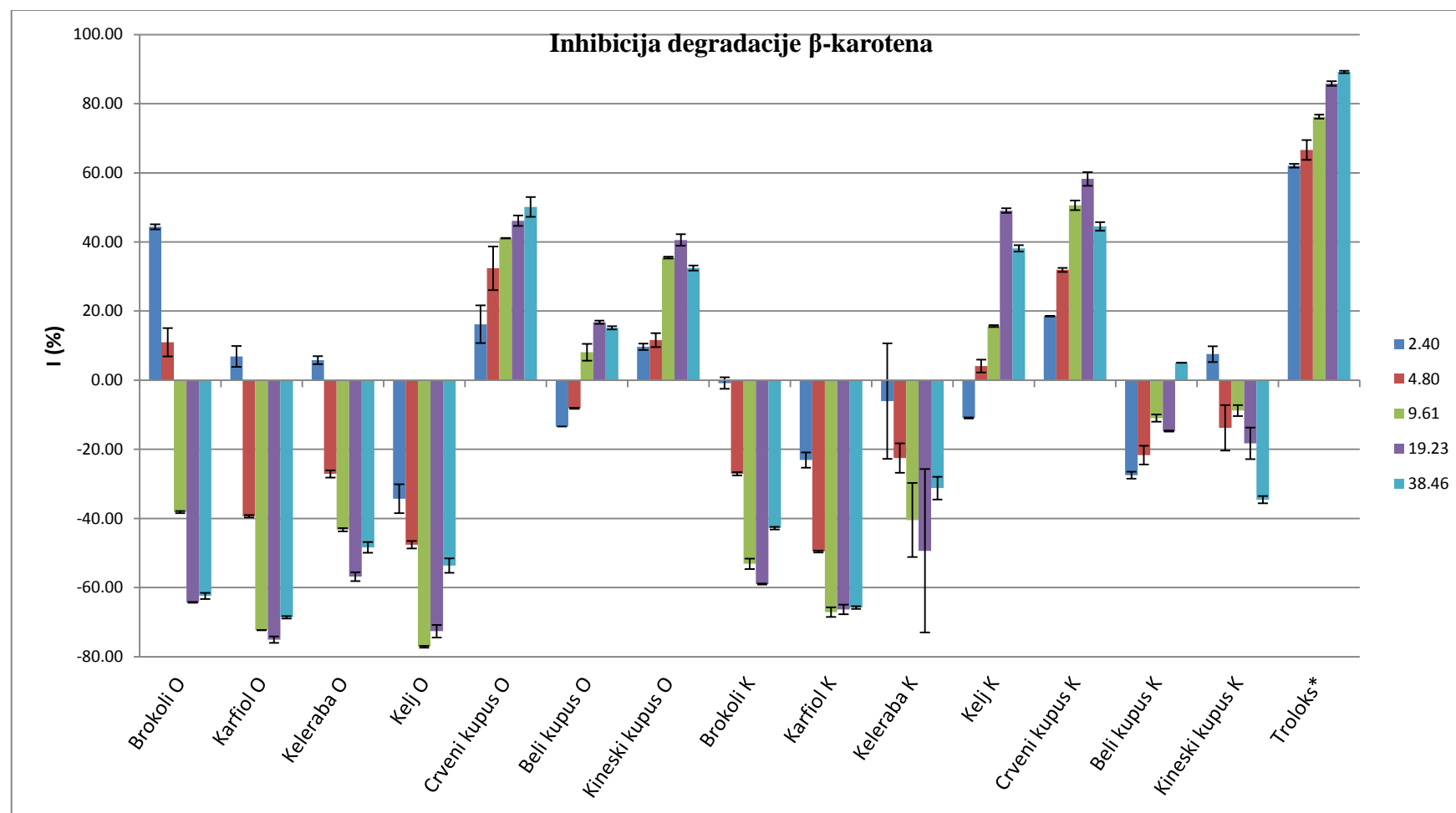
Poređenjem aktivnosti organskog i konvencionalnog povrća može se zaključiti da je redukciona moć sokova brokolija, karfiola, kelja i belog kupusa bila veća pod uticajem konvencionalnog sistema proizvodnje, a da se sposobnost redukcije CUPRAC reagensa sokova kelerabe, crvenog i kineskog kupusa povećala pod uticajem organskog sistema proizvodnje.

4.3.4 Inhibicija oksidacije β -karotena

Sposobnost zaštite β -karotena od oksidacije je ispitana pomoću mikro- β CB testa koji se zasniva na gubitku žute boje ovog jedinjenja usled njegove degradacije pri reakciji sa radikalima nastalih oksidacijom linolne kiseline u ispitivanoj emulziji. Kako na brzinu degradacije utiču prisutni antioksidanti, u ovom radu je ispitana inhibitorna aktivnost sokova vrsta *B. oleracea* i *B. rapa* i upoređena sa aktivnošću Troloksa, sintetičkog analoga vitamina E. Izmerene apsorbance određene pomoću mikro- β CB testa su prikazane u Prilogu u Tabeli 8.17. Iz priloženog histograma (Slika 4.10.) se može videti da su sokovi pojedinih varijeteta u ispitivanom opsegu koncentracija ispoljili antioksidantnu aktivnost i uspešno inhibirali degradaciju β -karotena, ali je kod određenog broja varijeteta došlo je do pojave prooksidantnog dejstva. I antioksidantna i prooksidantna aktivnost ispitivanih sokova su bile koncentraciono-zavisne.

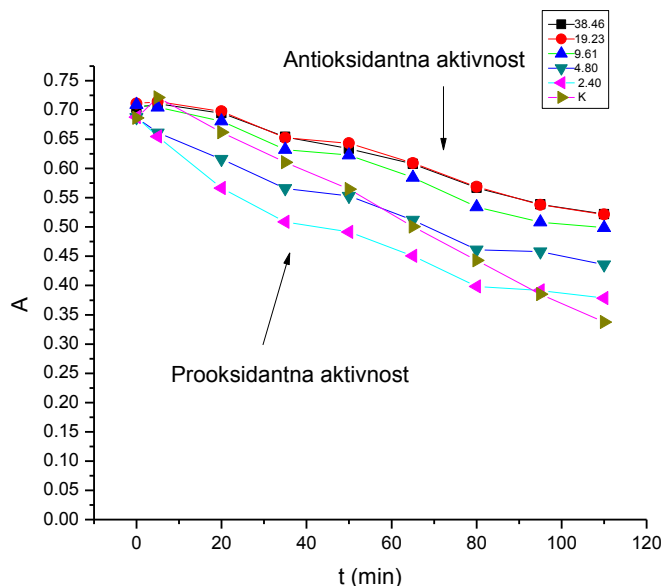
Sposobnosti doniranja vodonikovog atoma u ovom sistemu su ispoljili sokovi crvenog, belog i kineskog kupusa iz oba tipa proizvodnje, brokolija, karfiola i kelerabe iz organskog sistema proizvodnje i kelja iz konvencionalnog sistema proizvodnje. Sokovi crvenog kupusa su ispoljili najsnažniji inhibitoran efekat. Sok konvencionalno uzorka je doveo do efikasnije inhibicije (58,25% i 50,62% pri koncentracijama 19,23 ml/L i 9,61 ml/L) u odnosu na sok organskog uzorka (50,13%, i 46,13% inhibicije pri koncentraciji 38,46 i 19,23 ml/L). Sokovi ovog varijeteta su usporili degradaciju β -karotena u svim ispitivanim koncentracijama. Nešto slabije inhibitorno dejstvo je ispoljio sok konvencionalno gajenog kelja (49,08% inhibicije pri koncentraciji 19,23 ml/L), organski gajenog brokolija (44,39% pri koncentraciji 2,4 ml/L) potom organski gajenog kineskog kupusa (40,58% pri koncentraciji 19,23 ml/L). Sok konvencionalno gajenog kelja nije ispoljio sposobnost inhibicije degradacije β -karotena pri najnižoj koncentraciji (2,40 ml/L), sok organski gajenog kineskog kupusa je ispoljio inhibitorno dejstvo i bio efikasan u svim ispitivanim koncentracijama, dok je sok organski gajenog brokolija pri koncentracijama > 4,80 ml/L ispoljio prooksidantno dejstvo.

U poređenju sa Troloksom ispitivani sokovi nisu ispoljili značajniju aktivnost budući da je inhibicija degradacije β -karotena pod uticajem ovog sintetičkog analoga vitamina E kretala u intervalu 62,05-89,20%.



Slika 4.10. Uticaj sokova ispitivanih vrsta *B. olearcea* i *B. rapa* na intenzitet degradacije β -karotena. Koncentracija troloksa je iznosila 4,81; 9,62; 19,23; 38,46 i 76,92 $\mu\text{mol/L}$.

Mada poseduje brojne nedostatke, prednost β CB-testa predstavlja mogućnost utvrđivanja i antioksidantne i prooksidantne aktivnosti (Ndhalala et al., 2010). Prooksidantna aktivnost sokova pojedinih varijeteta nađena u ovom radu se najverovatnije javila zbog prisustva termolabilnih jedinjenja usled pripreme sokova na niskoj temperaturi i čuvanja u zamrznutom stanju. Do ovog zaključka su došli Papetti et al. (2002) koji su nakon kuvanja svežih, ili lioofilizovanih sokova povrća uočili gubitak prooksidantne aktivnosti koja potiče od termolabilnih jedinjenja i lipooksigenaze i pojavu snažne antioksidantne aktivnosti koja odgovara drugim komponentama sokova povrća. Pored tog maskirajućeg efekta i aktivnost peroksidaze inicira generisanje superoksid anjon radikala čime se intenzivira proces oksidacija linolne kiseline i pojačava intenzitet degradacije β -karotena. Visoka aktivnost peroksidaze je karakteristična za ispitivane Brassica vrste. Na *Slici 4.11.* je prikazana brzina degradacije β -karotena u prisustvu sokova crvenog kupusa odakle se jasno može uočiti da sa porastom vremena inkubacije na 45 °C pri nižim koncentracijama sokova dolazi do postepenog izlaska iz zone prooksidantne (vrednosti apsorbance niže od apsorbance kontrole K) i ulaska u zonu antioksidantne aktivnosti (vrednosti apsorbance iznad apsorbance kontrole K). Očitane apsorbance pri praćenju brzine degradacije β -karotena su prikazane u *Prilogu u Tabelama 8.18.-8.20.*



Slika 4.11. Brzina degradacije β -karotena pod uticajem sokova organski gajenog crvenog kupusa različite koncentracije. K- kontrola

4.3.5 Korelacija hemijskog sastava i antioksidantnog kapaciteta ispitivanih vrsta *B. oleracea* i *B. rapa*

Primenom regresione analize su izračunati Pearson-ovi korelacioni koeficijenti kako bi se utvrdila korelacija hemijskog sastava i antioksidantnog kapaciteta ispitivanih vrsta *B. oleracea* i *B. rapa*. Rezultati regresione analize su prikazani u *Tabeli 4.10*. U diskusiji su uzeti u obzir statistički značajni rezultati.

Visoka pozitivna korelacija je utvrđena između sadržaja askorbigena i ukupnih fenola ($r=0,703$; $p<0,01$), što se i moglo očekivati ako se uzme u obzir nespecifična reaktivnost Folin-Ciocalteu reagensa za koji se smatra da osim sa fenolnim jedinjenjima reaguje i sa ostalim redukujućim agensima i metal helatorima (Prior et al., 2005). To može biti razlog zbog koga je ostvarena i umerena pozitivna korelacija ($r=0,578$; $p<0,05$) između sadržaja ukupnih fenola i flavonoida, pri čemu i sama kolorimetrijska metoda sa $AlCl_3$ za određivanje flavonoida zbog svoje selektivnosti prema flavonolima i luteolinu iz porodice flavanola može biti razlog ove umerene korelacije.

Visok stepen pozitivne korelacije je ostvaren između sadržaja ukupnih fenola i DPPH, ABTS i CUPRAC testa ($r=0,763$; $r=0,725$; $r=0,764$; $p<0,01$) i umerena korelacija sa rezultatima mikro- β CB testa ($r=0,591$; $p<0,05$). Visoka pozitivna korelacije je ostvarena i između sadržaja ukupnih flavonoida i ABTS ($r=0,732$; $p<0,01$) i CUPRAC testa ($r=0,820$; $p<0,01$) i postignuta umerena korelacija sa antioksidantnim kapacitetom određenom pomoću DPPH testa ($r=0,629$; $p<0,05$). Do sada je utvrđeno da se direktna antioksidantna aktivnost fenolnih jedinjenja i flavonoida zasniva na broju i položaju hidroksilnih grupa, prisustvu karbonilne grupe, prisustvu supstituenata sa sposobnošću doniranja vodonika ili elektrona i sposobnosti delokalizacije elektrona i formiranja stabilnog fenoksi radikala (Cartea et al., 2011; Frankel, 1999; Shahidi i Ambigaipalan, 2015). Porast broja hidroksilnih grupa u molekulim flavonoida i fenolnih kiselina dovodi do porasta antioksidantne aktivnosti (Cartea et al., 2011). Najjaču antioksidantnu aktivnost ispoljavaju flavonoidi koji poseduju 3',4'-dihidroksi grupu u prstenu B; 3-OH grupu u prstenu C; 2,3-dvostruku vezu u prstenu C konjugovanu sa okso funkcijom u položaju 4; hidroksilne grupe u položaju 3 prstena C i položaju 5 prstena A u kombinaciji sa karbonilnom grupom u položaju 4 i 2,3-dvostrukom vezom prstena C (Shahidi i Ambigaipalan, 2015). Prisustvo blokirajućih supstituenata kao što su šećeri i metoksi grupe umanjuje antioksidatnu aktivnost derivata kvercetina, povećava njihovu hidrofilnost, te stoga menja i raspodelu između vodene i lipidne faze što se može odraziti na aktivnost ispitivanih jedinjenja u različitim test sistemima poput ABTS i β CB testa (Materska, 2008).

U sokovima ispitivanih vrsta *B. oleracea* i *B. rapa* je pomoću LC-MS/MS tehnike detektovano prisustvo više derivata hidroksibezoeve i hidroksicimetne kiseline, potom glikozida flavonola: kemferol-3-*O*-glukozida, kvercetin-3-*O*-glukozida, kemferol-3-*O*,*x*-diheksozida (kemferol-3-*O*-heksozilheksozida), biflavonoida- amentoflavona i kumarina-skopoletina. Na osnovu utvrđene korelacije sa DPPH, ABTS i CUPRAC testovima koji mere sposobnost transfera elektrona (ET) i mikro- β CB testom koji pokazuje sposobnost antioksidanta da donira atome vodonika (HAT) može se zaključiti da se aktivnost fenolnih jedinjenja i flavonoida prisutnih u sokovima ispitivanih vrsta *B. oleracea* i *B. rapa* odvija primarno putem ET mehanizma, a da je u manjoj meri vezana za sposobnost doniranja atoma vodonika. U slučaju crvenog kupusa, varijeteta sa izuzetno visokim antioksidantim potencijalom je utvrđena sposobnost antioksidatnog delovanja koje podjednako uključuje oba mehanizma, najverovatnije zbog najvišeg sadržaja ukupnih fenola i flavonoida, najvišeg sadržaja hinske i sinapinske kiseline, kao i prisutnih antocijana u sokovima ove biljke.

Visoka korelacija je utvrđena između DPPH i ABTS, CUPRAC i β CB testa ($r=0,860$, $r=0,837$, $r=0,764$; $p<0,01$), ABTS i CUPRAC testa ($r=0,966$; $p<0,01$), a umerena pozitivna korelacija između ABTS i β CB testa ($r=0,574$; $p<0,05$) i CUPRAC i β CB testa ($r=0,611$; $p<0,05$). Visok stepen korelacije između ET testova se mogao očekivati budući da se navedeni testovi zasnivaju na istom mehanizmu, ali kako se test sistemi razlikuju po svom redoks potencijalu (Apak et al., 2013) i antioksidantni kapacitet sokova ispitivanih vrsta *B. oleracea* i *B. rapa* se ispoljio u redosledu: $TEAC_{ABTS} > TEAC_{CUPRAC} > TEAC_{DPPH}$. $ABTS^{+}$ katjon radikal je sposoban da reaguje sa velikim brojem različitih jedinjenja, dok hromogeni reagens CUPRAC testa pokazuje veću selektivnost prema pravim antioksidantima. Pristup antioksidanata DPPH radikalima je sterno ograničen, pristupačni su za manje molekule i reaguju sa jedinjenjima manje polarnosti (Prior et al., 2005; Apak et al., 2007) što je razlog najniže utvrđenog antioksidantnog kapaciteta pomoću DPPH testa u ovom radu.

Pošto se u hrani biljnog porekla može se naći i po nekoliko stotina različitih antioksidanata, smatra se da je optimalno utvrđivanje ukupne koncentracija prisutnih reduktanata- elektron donora, (Halvorsen et al., 2002) što se može postići jedino pomoću više različitih testova (Antolovich et al., 2002). Hrana kao višefazni sistem, predstavlja emulziji u kojoj zajedno egzistiraju i lipidna i vodena faza, pri testiranju je neophodna i upotreba heterogenih sistema poput test emulzije iz β CB testa (Terpinc et al., 2009). U ovom radu najniži $TEAC_{DPPH}$ i visoka korelacija DPPH sa β CB testom u kome je deo sokova ispoljio i prooksidantno dejstvo, ukazuju na ograničenu reaktivnost polarnih antioksidanata iz ispitivanih vrsta *B. oleracea* i *B. rapa* sa DPPH radikalima i linolnom kiselinom u emulziji sa β -karotenom. Uočena prooksidantna aktivnost (β CB test) je najverovatnije posledica već navedenog prisustva termolabilnih jedinjenja i aktivnosti peroksidaze ali je za β CB test je tipična i pojava takozvanog „polarnog paradoksa“. Polarni antioksidanti pretežno ostaju u vodenoj fazi emulzije test sistema, uz nisku koncentraciju u lipidnoj fazi što smanjuje njihovi efikasnost u zaštiti linolne kiseline (Kulisic et al., 2004).

Tabela 4.10. Korelacija hemijskog sastava i antioksidantne aktivnosti ispitivanih vrsta *B. oelarace* i *B. rapa* izražena pomoću Pearson-ovih koeficijenata korelacije.

		Ukupni glukozinolati	Askorbigen	Metoksi askorbigen	Ukupni fenoli	Ukupni flavonoidi	DPPH	ABTS	CUPRAC	βCB*
Ukupni glukozinolati	Pearson Corr.	1	-0.3191	0.13488	-0.15498	0.08317	-0.06532	-0.09044	-0.04875	-0.32106
	Sig.	--	0.28791	0.66043	0.61317	0.78706	0.83211	0.76889	0.87434	0.28479
Askorbigen	Pearson Corr.	-0.3191	1	-0.2825	0.7302	0.42472	0.36337	0.51114	0.52034	0.39669
	Sig.	0.28791	--	0.32777	0.00302	0.13009	0.20159	0.06176	0.05646	0.16022
Metoksiaskorbigen	Pearson Corr.	0.13488	-0.2825	1	-0.23288	0.21171	-0.29854	-0.04437	0.00387	-0.47744
	Sig.	0.66043	0.32777	--	0.423	0.46747	0.29984	0.88028	0.98953	0.08426
Ukupni fenoli	Pearson Corr.	-0.15498	0.7302	-0.23288	1	0.57785	0.76263	0.72543	0.76379	0.59108
	Sig.	0.61317	0.00302	0.423	--	0.03044	0.00151	0.00332	0.00147	0.02601
Ukupni flavonoidi	Pearson Corr.	0.08317	0.42472	0.21171	0.57785	1	0.62904	0.73196	0.81986	0.31008
	Sig.	0.78706	0.13009	0.46747	0.03044	--	0.01595	0.00292	3.31E-04	0.28061
DPPH	Pearson Corr.	-0.06532	0.36337	-0.29854	0.76263	0.62904	1	0.86029	0.8735	0.76401
	Sig.	0.83211	0.20159	0.29984	0.00151	0.01595	--	7.89E-05	4.48E-05	0.00147
ABTS	Pearson Corr.	-0.09044	0.51114	-0.04437	0.72543	0.73196	0.86029	1	0.96562	0.5744
	Sig.	0.76889	0.06176	0.88028	0.00332	0.00292	7.89E-05	--	2.22E-08	0.03169
CUPRAC	Pearson Corr.	-0.04875	0.52034	0.00387	0.76379	0.81986	0.8735	0.96562	1	0.61145
	Sig.	0.87434	0.05646	0.98953	0.00147	3.31E-04	4.48E-05	2.22E-08	--	0.02015
βCB	Pearson Corr.	-0.32106	0.39669	-0.47744	0.59108	0.31008	0.76401	0.5744	0.61145	1
	Sig.	0.28479	0.16022	0.08426	0.02601	0.28061	0.00147	0.03169	0.02015	--

* Prilikom izračunavanja uzeto je u obzir inhibitorno dejstvo pri koncentraciji 83,33 ml/L; Visok korelacioni koeficijent; Umeren korelacioni koeficijent; Statistički značajan koeficijent korelacije.

4.4 ANTIMIKROBNA AKTIVNOST SOKOVA

U ovom radu antimikrobna aktivnost je ispitana pomoću *broth mikrodilucione* metode na više vrsta uglavnom oportunih mikroorganizama koje uključuju tri gram pozitivne i tri gram negativne bakterije, tri soja jednog od najčešćih fungalnih patogena za čoveka- *C. albicans* i dve vrste plesni (filamentoznih gljiva). Određene su MIC- najniža koncentracija testirane supstance/ekstrakata koja inhibira vidljivi rast mikroorganizama (mg/ml, u ovom radu iskazana kao ml/L), MBC- najniža koncentraciju pri kojoj je 99,9% finalnog inokuluma ubijeno (mg/ml, u ovom radu ml/L) i MFC vrednost- najniža koncentracija pri kojoj je 98-99,9% mikroorganizama ubijeno u poređenju sa inicijalnim inokulumom (mg/ml, u ovom radu ml/L), a potom i izračunat odnos MBC:MIC i MFC:MIC u cilju procene na koji način se ispoljava antimikrobna aktivnost ispitivanih sokova.

Sokovi konvencionalnog povrća su ispoljili jače inhibitorno dejstvo na rast bakterija od sokova organskog povrća. Najjači antibakterijski efekat je ispoljio sok konvencionalno gajenog karfiola na gram negativne bakterije. On je uspešno inhibirao rast *E. coli* ^{ATCC 25922}, sa identičnim vrednostima utvrđenim za MIC i MBC (12,5 ml/L) i jedini postigao obe vrednosti za MIC i MBC (25 µL/mL) prilikom inhibicije rasta *P. aeruginosa* ^{ATCC 9027}. Sok konvencionalno gajenog brokolija je najefikasnije inhibirao rast gram pozitivnog mikroorganizma *S. aureus* ^{ATCC 25923} pri čemu su postignute identične vrednosti za MIC i MBC (25 ml/L)). Ovaj uzorak je ispoljio širi spektar antibakterijskog dejstva u odnosu na ostale varijetete. Naime, on je delovao na sve bakterije osim na gram pozitivnu *E. faecalis* ^{ATCC 19433} koja je i predstavljala najrezistentniju bakterijsku vrstu u ovom ispitivanju. Jedini varijetet čiji je sok inhibirao rast ovog patogena je bio organski gajeni karfiol, ali je postignuta samo MIC vrednost (50 ml/L), dok MBC nije mogla biti određena pri testiranim koncentracijama (MBC >50 ml/L). Organski gajeni kelj je ispoljio najjače antibakterijsko dejstvo u slučaju *B. subtilis* ^{ATCC 6633} pri čemu su utvrđene identične vrednosti za MIC i MBC (25 ml/L)), dok su za većinu sokova ostalih varijeta utvrđene vrednost za MIC (25 ili 50 ml/L), ali ne i za MBC (>50 ml/L). Najjaču antibakterijska aktivnost prema gram negativnoj *S. enteritidis* ^{ATCC 13076} su ispoljili sokovi konvencionalno gajenih brokolija i karfiola pri maksimalnim koncentracijama (MIC=MBC=50 ml/L). Sokovi organski gajenog crvenog kupusa, konvencionalno gajenog belog kupusa i kineskog kupusa iz oba sistema nisu ispoljili antibakterijsku aktivnost u odnosu na ispitivane mikroorganizme (MIC i MBC vrednosti nisu utvrđene pri testiranim koncentracijama (>50 ml/L)).

Sokovi konvencionalnih uzoraka brokolija, karfiola, kelerabe i crvenog kupusa su ispoljili najjaču antifungalnu aktivnost u odnosu na klinički izolat *C. albicans* II pri čemu su za navedene varijetete utvrđene vrednosti za MIC i MFC na 6,25 ml/L. Organski gajeni karfiol i keleraba su najefikasnije inhibirali rast laboratorijskog soja *C. albicans* sa MIC vrednošću od 6.25 ml/L (MFC 50 ml/L) i MIC=MFC=12.5 ml/L, prema navedenom redosledu varijeteta. Sokovi konvencionalno gajenih brokolija i kelerabe i organski gajenog belog kupusa su takođe inhibirali rast ovog patogena (MIC i MFC vrednosti 12.5 i 25 ml/L), dok su konvencionalno gajeni brokoli i karfiol ispoljili najveću efikasnost pri inhibiciji rasta kliničkog izolata *C. albicans* I (MIC=MFC= 25 ml/L). Sok konvencionalno gajenog belog kupusa nije ispoljio antifungalnu aktivnost na ispitivane gljivice (MIC i

MFC > 50 ml/L), a slično odsustvo antifungalne aktivnosti sokova organski gajenog kelja, crvenog i kineskog kupusa pri testiranim koncentracijama je uočeno u slučaju kliničkog izolata *C. albicans* I.

Sok konvencionalno gajenog karfiola je ispoljio najjaču antifungalnu aktinost na plesni i doveo do inhibicije rasta *Penicilium sp.* (MIC=MFC=12.47 ml/L) kao i MIC na 12.4 i MFC na 24.7 ml/L pri inhibiciji rasta *Aspergillus sp.* Sok organskog uzorka ove biljke nije ispoljio efikasnost u odnosu na ove plesni pri testiranim koncentracijama (MIC i MFC>50 ml/L). Sok konvencionalno gajenog brokolija je inhibirao rast *Penicilium sp.* i *Aspergillus sp.* pri čemu su postignute identične vrednosti za MIC i MFC na 24.7 (*Penicillium sp.*) i 49.5 ml/L (*Aspergillus sp.*), dok je sok organskog uzorka bio aktivan isključivo u odnosu na *Penicilium sp.* (MIC=MFC=49.5 ml/L). Konvencionalno gajena keleraba je uticala na rast obe plesni pri maksimalnoj koncentraciji, pri čemu su za sok organski gajene kelerabe utvrđene vrednosti i za MIC i MFC prilikom inhibicije rasta *Aspergillus sp.* Ostali sokovi nisu ispoljili antifungalnu aktivnost na ispitivane plesni pošto minimalna inhibitorna i fungicidna koncentracija nisu mogle biti određene pri testiranim koncentracijama (>50 ml/L).

Vrednosti MIC, MBC, i MFC utvrđene pomoću *broth mikrodilucione* metode služe za određivanje anitimikrobnog dejstva, međutim one ne pokazuju način delovanja antimikrobnog agensa. Za procenu modaliteta antibakterijskog i antifungalnog delovanja se koristi odnos MBC:MIC i MFC:MIC. Ukoliko se taj odnos kreće između 1:1 i 1:2 antimikrobni agens ubija mikroorganizme, odnosno ispoljava baktericidno/fungicidno dejstvo, a ukoliko je >2:1, antimikrobni agens inhibira rast, ali ne ubija mikroorganizme, odnosno ispoljava bakteriostatsko/fungistatno dejstvo (Hafidh et al., 2011). Na osnovu izračunatog odnosa MBC:MIC i MFC:MIC može se zaključiti da sokovi ispitivanih varijeteta deluju baktericidno/fungicidno, odnosno ubijaju patogene ispitivane u ovom radu, pri čemu su jedino sokovi organski gajenih varijeteta ispoljili fungistatno dejstvo bez sposobnosti ubija patogenih mikroorganizama (sok karfiola u slučaju laboratorijskog soja *C. albicans*; sok belog kupusa u slučaju kliničkog izolata *C. albicans* II).

Generalno, u ovom radu je utvrđena nešto višu antimikrobnu aktivnost sokova konvencionalnih u poređenju sa organskim varijetetom i razlike u antimikrobnom dejstvu ispitivanih varijeteta, pri čemu se primećuje dominantnija antimikrobna aktivnost neglavičastih u odnosu na glavičaste vrste. Antimikrobna aktivnost se ispoljila u zavisnosti od ispitivane vrste patogena u redosledu: antifungalna aktivnost (gljivice>plesni)>antibakterijska aktivnost. Pored toga ispitivani sokovi su ispoljili i jače baktericidno dejstvo na gram negativne bakterije, mada su delovali i na neke od gram pozitivnih vrsta.

Do sada uočena antimikrobna aktivnost porodice Brassicacea se vezuje pre svega za sadržaj organo-sumpornih jedinjenja čiji su degradacioni proizvodi identifikovani u ovom radu ali nije isključen ni uticaj fenolnih jedinjenja za koje je utvrđeno da predstavljaju značajne antimikrobne agense. U prilog tome govori potpuni izostanak antibakterijske aktivnosti metanolnih ekstrakata belog i kineskog kupusa (dobijenih liofilizacijom, potom ekstrakcijom pomoću 80% metanola, uparavanjem na 30 °C i rekonstituisanja u metanolu) prema testiranim bakterijama *S. aureus*, *E. coli*, *S. enterica serovar Typhimurium*, *B. subtilis* (Šamec et al., 2011) kao i vodenih ekstrakata belog kupusa, kineskog kupusa i repe (pripremljenih nakon liofilizacije i ekstrakcije uz

zagrevanje, uz ponovnu liofilizaciju i rekonstituciju u vodi) prema *P. aeruginosa*, *E.coli*, *K.peumoniae*, *C.albicans* i *C.neoformans* (Sousa et al., 2008). Uzrok navedenim gubicima antimikrobne aktivnosti bi mogli biti gubici termolabilnih i lako isparljivih jedinjenja, usled ponavljanja procesa liofilizacije, uparavanja i ekstrakcije uz zagrevanje, a što je izbegnuto prilikom testiranja antimikrobne aktivnosti svežih sokova ispitivanih Brassica vrsta u ovom radu. Međutim, vodeni ekstrakti su očuvali aktivnost prema *B. subtilis* i *S. aureus* (Sousa et al., 2008) i bili efikasniji u inhibiciji raasta *S. aureus* od sokova ispitivanih Brassica vrsta u ovom radu, naverovatnije usled više koncentracije fenolnih jedinjenja u vodenim ekstraktima nakon ekstrakcije na povišenoj temperaturi .

Tabela 4.11. Antibakterijska i antifungalna aktivnost sokova vrsta *B. oleracea* i *B. rapa*.

		Brokoli		Karfiol		Keleraba		Kelj		Crveni kupus		Beli kupus		Kineski kupus			
		O	K	O	K	O	K	O	K	O	K	O	K	O	K		
Bakterije																	
Gram +																	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	MIC	50	25	50	-	-	-	50	50	-	-	-	-	-	-		
	MBC		25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MBC:MIC		1:1															
<i>Način delovanja</i>		Baktericid															
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	MIC	-	-	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	MBC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MBC:MIC																	
<i>Način delovanja</i>		Baktericid															
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	MIC	25	25	50	25	25	25	25	50	-	50	50	-	-	-		
	MBC	-	-	-	-	-	-	25	-	-	-	-	-	-	-		
MBC:MIC		1:1															
<i>Način delovanja</i>		Baktericid															
Gram -																	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	MIC	25	25	50	12.5	25	50	50	-	-	50	50	-	-	-		
	MBC	50	25	-	12.5	50	-	-	-	-	50	-	-	-	-		
MBC:MIC		2:1	1:1		1:1	2:1					1:1						
<i>Način delovanja</i>		Baktericid	Baktericid		Baktericid	Baktericid					Baktericid						
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	MIC	-	50	-	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	MBC	-	-	-	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MBC:MIC		1:1															
<i>Način delovanja</i>		Baktericid															
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	MIC	50	50	-	50	50	50	50	50	-	-	-	-	-	-		
	MBC	-	50	-	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MBC:MIC		1:1		1:1													
<i>Način delovanja</i>		Baktericid		Baktericid													

Napomena: Nastavlja se na narednoj strani

Nastavak Tabele 4.11.

Gljivice															
<i>C. albicans</i> L*	MIC	25	12.5	6.25	25	12.5	12.5	50	25	50	25	12.5	-	25	50
	MFC	25	25	50	25	12.5	25	-	-	-	50	25	-	50	-
MFC:MIC		1:1	2:1	8:1	1:1	1:1	2:1				2:1	2:1		2:1	
<i>Način delovanja</i>		Fungicid	Fungicid	Fungistat	Fungicid	Fungicid	Fungicid				Fungicid	Fungicid		Fungicid	
<i>C. albicans</i> I**	MIC	50	25	-	25	50	50	-	50	.	50	.	-	-	-
	MFC		25	-	25	50	50	-	-	-	-	-	-	-	-
MFC:MIC			1:1		1:1	1:1	1:1								
			Fungicid		Fungicid	Fungicid	Fungicid								
<i>C. albicans</i> II**	MIC	50	6.25	50	6.25	25	6.25	50	25	50	6.25	12.5	-	50	25
	MFC	50	6.25	50	6.25	25	6.25	50	50	50	6.25	50	-	50	25
MFC:MIC		1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	2:1	1:1	1:1	4:1		1:1	1:1
		Fungicid	Fungicid	Fungicid	Fungicid	Fungicid	Fungicid	Fungicid	Fungicid	Fungicid	Fungicid	Fungistat		Fungicid	Fungicid
Plesni															
<i>Penicillium</i> sp.	MIC	49.5	24.7	-	12.4	-	49.5	-	-	-	-	-	-	-	-
	MFC	49.5	24.7	-	12.4	-	49.5	-	-	-	-	-	-	-	-
MFC:MIC		1:1	1:1		1:1		1:1								
		Fungicid	Fungicid		Fungicid		Fungicid								
<i>Aspergillus</i> sp.	MIC	-	49.5	-	12.4	49.5	49.5	-	-	-	-	-	-	-	-
	MFC	-	49.5	-	24.7	49.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MFC:MIC			1:1		2:1	1:1									
		Fungicid			Fungicid	Fungicid									

MIC- Minimalna inhibitorna koncentracija; MBC- Minimalna baktericidna koncentracija; MFC- Minimalna fungicidna koncentracija; MBC/MFC:MIC- odnos na osnovu koga je procenjen moguć efekat delovanja; Baktericid.- Baktericidno dejstvo; Fungicid.- Fungicidno dejstvo; Fungistat.- Fungistatno dejstvo.

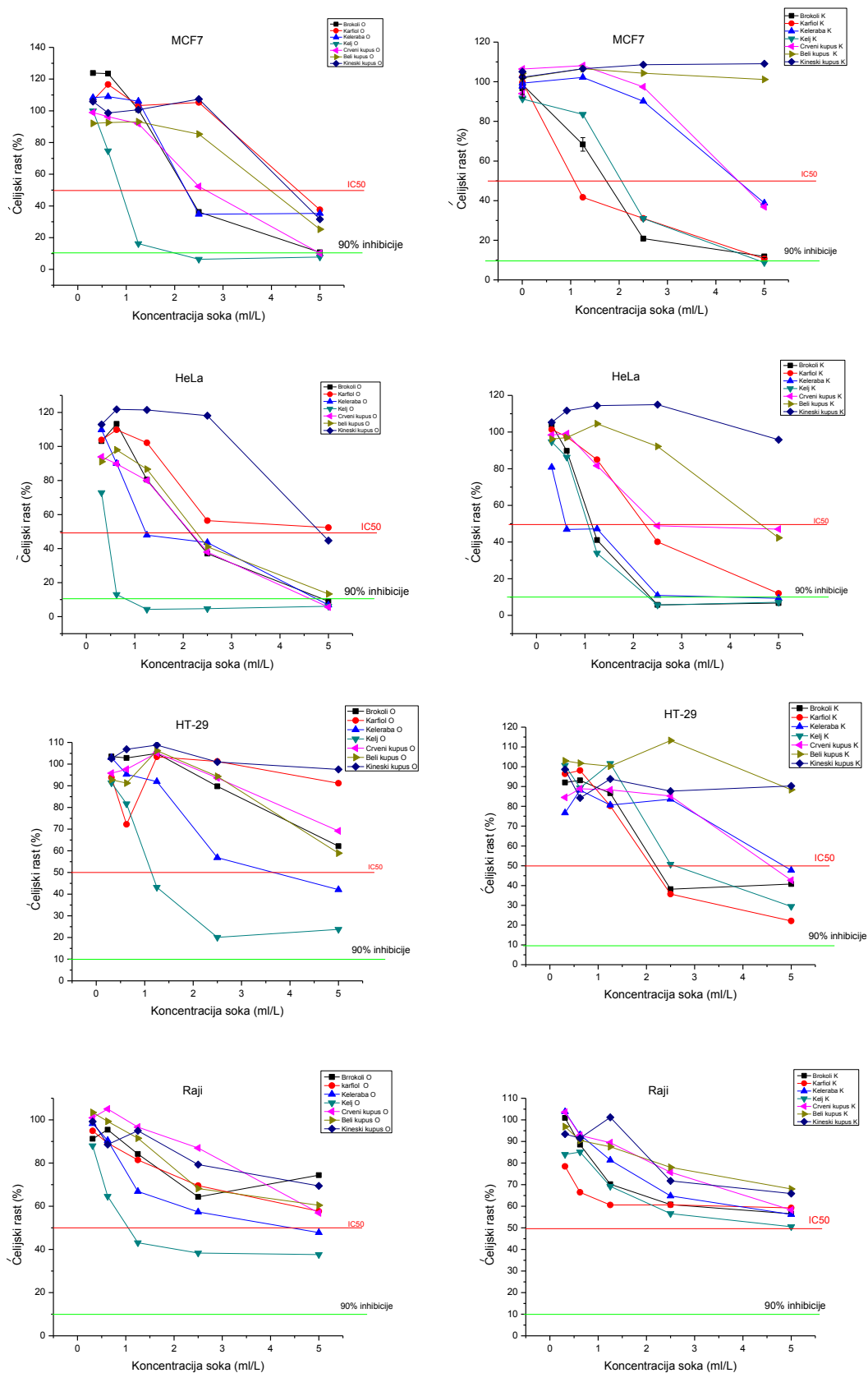
4.5 IN VITRO ANTITUMORSKA AKTIVNOST SOKOVA I DETEKCIJA TIP ĆELIJSKE SMRTI

Citotoksična aktivnost svežih sokova vrsta *B. olerace* i *B. rapa* je ispitana prema humanim ćelijskim linijama epitelnog karcinoma cerviksa (HeLa, ECACC 93021013), adenokarcinoma dojke (MCF7, ECACC 86012803), adenokarcinoma debelog creva (HT-29, ECACC 91072201), limfoblastima Burkitt-ovog limfoma (Raji, ECACC 85011429), i fetalnim fibroblastima pluća (MCR-5, ECACC84101801) upotrebom sulforodamin B (SRB) testa. Na osnovu očitanih apsorbanci je izračunat procenat vijaibilnih ćelija (Prilog) i utvrđen intenzitet inhibitornog dejstva sokova što je prikazano na *Slikama 4.12.* i *4.13.* Antiproliferativna aktivnost sokova ispitivanih vrsta je u konačnom obliku iskazana kao IC₅₀ vrednost (koncentracija pri kojoj je postignuto 50% inhibicije rasta ćelija).

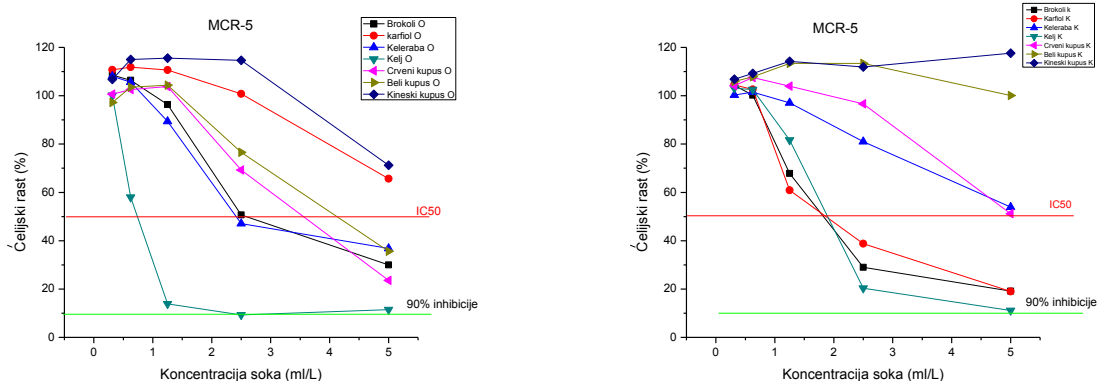
Svi sokovi su delovali inhibitorno na rast ćelija, pri čemu je intenzitet inhibicije zavisio od ćelijske linije, ispitivanog varijeteta i primenjene koncentracije soka. Snažna inhibicije rasta je osvarena u slučaju adherentnih ćelija epitelnog karcinoma cerviksa, HeLa i adenokarcinoma dojke, MCF7. Nezavisno od primenjenog sistema proizvodnje pojedini sokovi su inhibirali > 90% rast HeLa ćelija, i to sokovi kelja (organski uzorci u koncentracijama 1,25-5 ml/L; konvencionalni uzorci u koncentracijama 2,5 i 5 ml/L), brokolija (organski uzorci pri maksimalnoj koncentraciji (5 ml/L); konvencionalni uzorci pri koncentracijama 2,5 i 5 ml/L) i kelerabe iz oba sistema proizvodnje pri maksimalnoj koncentraciji (5ml/L). Sok organski gajenog crvenog kupusa je ispoljio isti stepen inhibicije pri maksimalnoj koncentraciji (5 ml/L). Sokovi kelja su takođe potpuno nezavisno od tipa proizvodnje pri maksimalnoj koncentraciji (5 ml/L) inhibirali > 90% rast ćelija adenocarcinoma dojke, MCF7 (*Slika 4.12.*) što predstavlja izuzetno značajan rezultat budući da tumori dojke spadaju u jedan od najučestalijih tipova tumora.

Sokovi konvencionalno gajenog kelja (u koncentraciji 2,5 ml/L), i organskog uzorka ovog varijeteta (u koncentraciji 5 ml/L) su ispoljili sličan inhibitorni efekta i na rast ćelija zdravog tkiva- fetalnih fibroblasta pluća (MCR-5), što se može videti na *Slici 4.13.* a ne predstavlja poželjan efekat budući da se od terapije kancera zahteva veća selektivnost prema ćelijama tumora u odnosu na zdravo tkivo.

Nešto niži stepen inhibicije je postignut prema adherentnim ćelijama adenokarcinoma debelog creva HT-29, koji je takođe jedan od karcinoma sa veoma visokom incidencom. Najjači inhibitorni efekat su ispoljili sokovi organski gajenog kelja (u koncentraciji 2,5 ml/L) i konvencionalnih uzoraka karfiola i kelja pri maksimalnim koncentracijama (5 ml/L) ali nije postignuto 90% inhibicije ni u jednom od navedenih slučajeva (*Slika 4.12.*). Najslabiji inhibitorni efekat ispitivanih sokova se može uočiti u slučaju ne-adherentnih tumorskih ćelija, limfoblasta Burkitt-ovog limfoma (Raji) u kojima su sokovi organski i konvencionalno gajenog kelja i organski gajene kelerabe uzrokovali > 50% inhibicije rasta. Ove ćelije su bile najrezistentije na inhibitorno dejstvo sokova ispitivanih vrsta.



Slika 4.12. Antiproliferativna aktivnost sokova vrsta *B. oleracea* i *B. rapa*.



Slika 4.13. Uticaj sokova vrsta *B. oleracea* i *B. rapa* na rast zdravih ćelija.

Analiziranjem dobijenih IC_{50} vrednosti prikazanih u *Tabeli 4.12.*, se može uočiti najjača antiproliferativnu aktivnost soka organski gajenog kelja prema svim ispitivanim ćelijama. Sok ovog varijeteta je imao daleko niže vrednosti IC_{50} od sokova ostalih varijeteta i one su iznosile 0,56; 0,76; 0,88 i 1,07 ml/L prema HeLa, MCF7, Raji i HT-29 ćelijama. Pored toga sok organski gajenog kelja je ispoljio i najjaču antiproliferativnu aktivnost prema zdravom tkivu ($IC_{50}=0,66$ ml/L). U poređenju sa sokom konvencionalnog uzorka organski gajeni kelj je ispoljio i do dva puta višu antiproliferativnu aktivnost. Najslabiju antiproliferativnu aktivnost je ispoljio sok konvencionalno gajenog kineskog kupusa koji nije postigao 50% inhibicije rasta na ispitivanim ćelijskim linijama, a veoma nisku aktivnost su ispoljili i sokovi organski gajenog karfiola i konvencionalno gajenog belog kupusa, dok su umerenu antiproliferativnu aktivnost imali sokovi organski gajenog belog i kineskog kupusa i crvenog kupusa poreklom iz oba tipa proizvodnje. Poređenjem izračunatih vrednosti IC_{50} varijeteta poreklom iz organskog i konvencionalnog sistema proizvodnje može se zaključiti da su veću citotoksičnost prema ispitivanim ćelijskim linijama ispoljili uglavnom organski gajeni varijeteti ($IC_{50}\downarrow$: kelj, keleraba, beli, crveni i kineski kupus), dok je konvencionalni sistem proizvodnje povećao citotoksičnost ($IC_{50}\downarrow$) brokolija i karfiola. Na *Slikama 4.14-4.18.* je prikazan uporedni pregled uticaja sokova ispitivanih vrsta na rast pojedinačnih ćelija odakle se može uočiti visoka antiproliferativna aktivnost pojedinih varijeteta u redosledu:

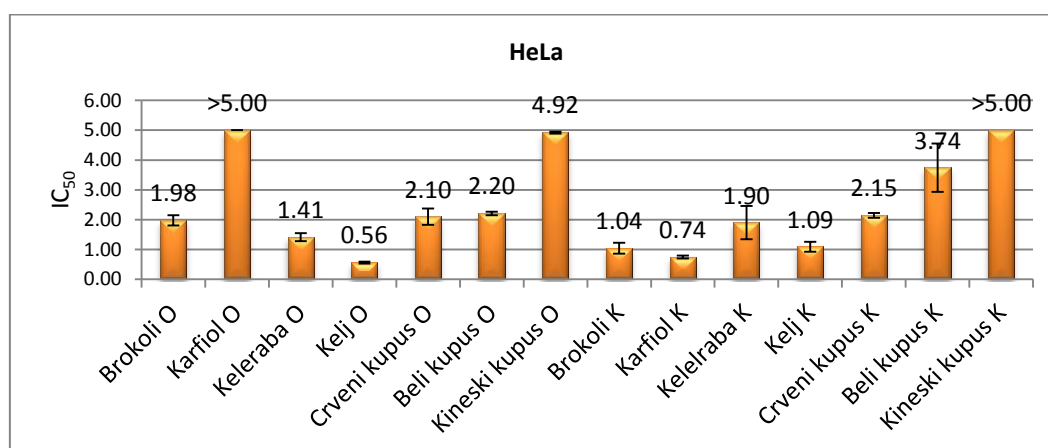
- HeLa ćelije (IC_{50} u opsegu 0.56-1.98 ml/L): organski gajeni kelj > konvencionalno gajeni karfiol > konvencionalno gajeni brokoli > konvencionalno gajeni kelj > organski gajena keleraba > konvencionalno gajena keleraba > organski gajeni brokoli.
- MCF7 ćelije (IC_{50} u opsegu 0.76-1.55 ml/L): organski gajeni kelj > konvencionalno gajeni karfiol > konvencionalno gajeni brokoli > organski gajena keleraba.
- HT-29 ćelije (IC_{50} u opsegu 1.07-2.51 ml/L): organski gajeni kelj > konvencionalno gajeni brokoli > konvencionalno gajeni karfiol > konvencionalno gajeni kelj.
- Raji ćelije: organski gajeni kelj ($IC_{50}=0.88$ ml/L) > organski gajena keleraba ($IC_{50}=2.59$ ml/L) > konvencionalno gajeni kelj ($IC_{50}=2.59$ ml/L).
- MCR-5 (IC_{50} u opsegu 0.66-1.70 ml/L): organski gajeni kelj > konvencionalno gajeni brokoli > konvencionalno gajeni kelj > konvencionalno gajeni karfiol.

Kako su najvišu antiproliferativnu aktivnost prema svim ćelijskim linijama ispoljili određeni varijeteti iz navedenih podataka se može zaključiti da je antiproliferativnu aktivnost manje zavisna od tipa ćelijske linije, a više vezana za aktivnost pojedinačnih varijeteta, i da je pojava rezistentnosti ćelija najverovatnije vezana za koncentracije sokova neophodne za uspešnu inhibiciju ćelijskog rasta.

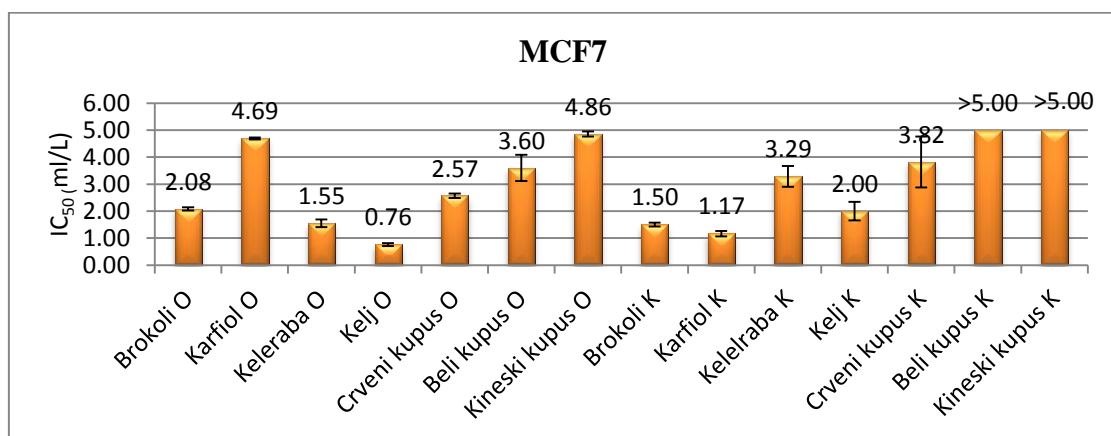
Tabela 4.12. IC₅₀ vrednosti svežih sokova vrsta *B. oleracea* i *B. rapa* određene na tumorskim ćelijskim linijama i zdravom tkivu.

	IC ₅₀ (ml/L)*				
	HeLa	MCF7	HT-29	Raji	MCR-5
Brokoli O	1.98±0.17	2.08±0.06	4.69±0.41	>5	2.54±0.19
Karfiol O	>5	4.69±0.04	>5	>5	>5
Keleraba O	1.41±0.14	1.55±0.14	3.18±0.46	2.59±0.84	2.30±0.31
Kelj O	0.56±0.03	0.76±0.05	1.07±0.13	0.88±0.23	0.66±0.03
Crveni kupus O	2.10±0.28	2.57±0.09	>5	>5	2.63±0.03
Beli kupus O	2.20±0.06	3.60±0.49	3.37±0.00	>5	2.81±0.06
Kineski kupus O	4.92±0.03	4.86±0.09	>5	>5	>5
Brokoli K	1.04±0.18	1.50±0.07	1.55±0.39	>5	1.59±0.21
Karfiol K	0.74±0.05	1.17±0.10	2.00±0.03	>5	1.70±0.24
Keleraba K	1.90±0.56	3.29±0.38	4.60±0.51	>5	>5
Kelj K	1.09±0.17	2.00±0.34	2.51±0.00	4.48±0.00	1.66±0.28
Crveni kupus K	2.15±0.08	3,82±0,94	4.17±0.64	>5	4.98
Beli kupus K	3.74±0.81	>5	>5	>5	>5
Kineski kupus K	>5	>5	>5	>5	>5

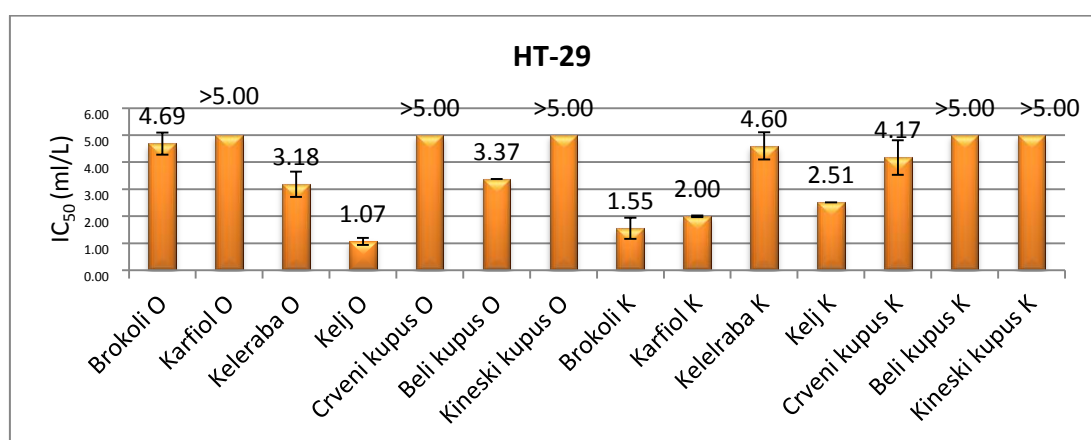
* IC₅₀ je iskazana kao srednja vrednost četiri merenja± SD; >5 ml/L- nije postignuta vrednost IC₅₀ pri testiranim koncentracijama.



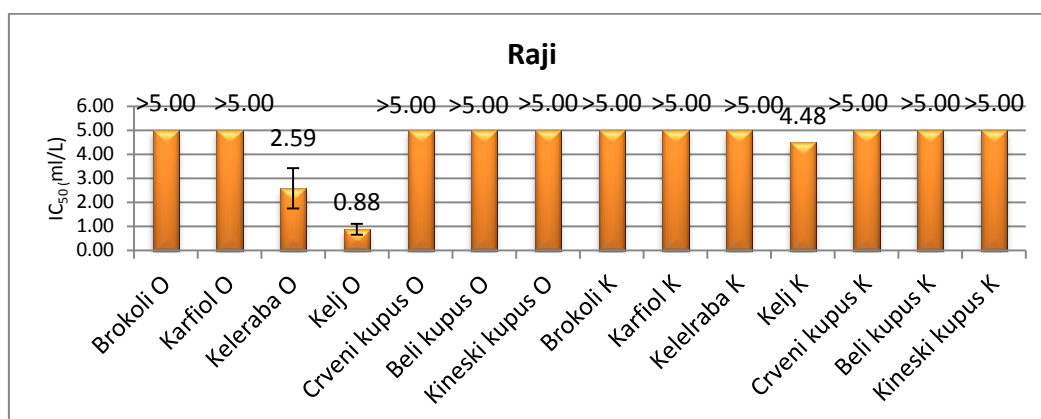
Slika 4.14. IC₅₀ vrednosti sokova ispitivanih vrsta određene u ćelijama epitelnog karcinoma cerviksa.



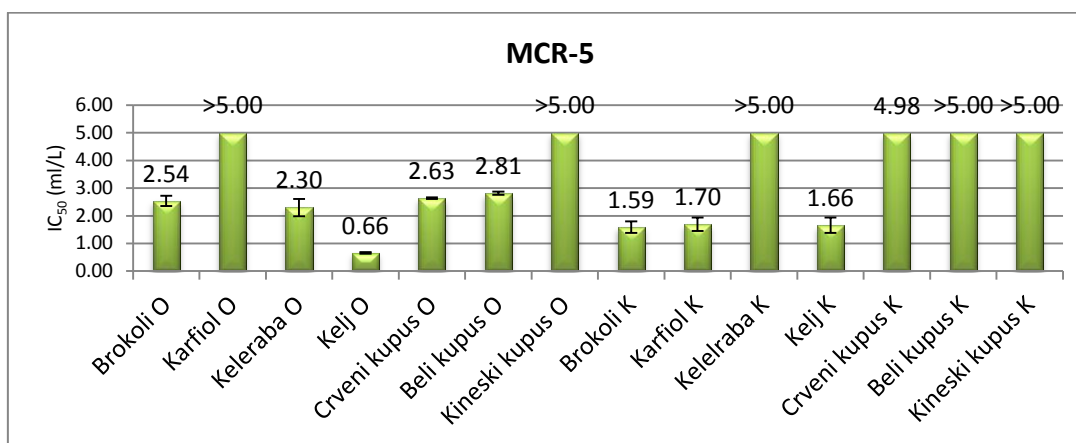
Slika 4.15. IC₅₀ vrednosti sokova ispitivanih vrsta određene u ćelijama adenocarcinoma dojke.



Slika 4.16. IC₅₀ vrednosti sokova ispitivanih vrsta određene u ćelijama adenocarcinoma debelog creva.



Slika 4.17. IC₅₀ vrednosti sokova ispitivanih vrsta određene u limfoblastima Burkitt-ovog limfoma.



Slika 4.18. IC₅₀ vrednosti sokova ispitivanih vrsta određene u ćelijama fetalnih fibroblastapluća.

Pošto su su sokovi ispitivanih vrsta delovali i na zdrave ćelije izračunat je NT/T odnos ($NT/T = IC_{50}$ ne-tumorske linije ćelija / IC_{50} tumorske linije ćelija) na osnovu koga se može proceniti u kojoj meri oni štete zdravo tkivo u odnosu na tumorsko tkivo (Četojević-Simin et al., 2015). Kada je $NT/T > 1$ potencijalni antitumorski agens pokazuje veću aktivnost u tumorskom nego u zdravom tkivu. Prema podacima iz tabele može se utvrditi da su sokovi ispitivanih vrsta pokazali nešto veću citotoksičnost prema ćelijama epitelnog karcinoma cerviksa (HeLa) u odnosu na zdravo tkivo ($NT/T > 1$), kao i nešto jače citotoksično delovanje većina ispitivanih sokova na ćelije adenokarcinoma dojke (MCF7). Ispitivani sokovi su osim u slučaju konvencionalno gajenog brokolija, kelerabe i crvenog kupusa ispoljili slabije citotoksično dejstvo na ćelije adenocarcinoma debelog creva (HT-29) u odnosu na zdravo tkivo (MCR-5), i izuzetno nisku selektivnost prema limfocitima Burkitt-ovog limfoma ($NT/T < 1$, u slučaju svih varijeteta gde je taj odnos mogao biti određen).

Dominantan tip ćelijske smrti koju indukuju vrste *B. oleracea* i *B. rapa* je ispitan pomoću sokova organski gajenog kelja koji je ispoljio najjaču antiproliferativnu aktivnost, i organski gajenog brokolija koji je ispoljio manju antiproliferativnu aktivnost ali predstavlja morfološki različit varijetet. Indukcija ćelijske smrti je ispitana na adherentnim HeLa, MCF7 i HT-29 ćelijama.

Na osnovu fragmentacije DNK, i utvrđenog odnosa faktora apoptoze i nekroze koji je prikazan u tabeli utvrđeno je da sok organski gajenog kelja u ćelijama epitela karcinoma cerviksa i adenokarcinoma dojke dovodi prvenstveno do indukcije apoptoze ($EF A/N > 1$; HeLa-1,95 i MCF7-1,56), dok je u ćelijama adenocarcinoma rektuma pretežno doveo do pojave nekroze ($EF A/N < 1$; HT-29-0,86). Za razliku od kelja, organski gajeni brokoli je u jednakoj meri doveo do indukcije apoptoze i nekroze u HeLa ćelijskoj liniji ($EF A/N = 0,97$).

Citotoksična, propapotoska aktivnost Brassica vrsta je dokazano u brojnim dosadašnjim ispitivanjima i prvenstveno se vezuje za prisustvo degradacionih proizvoda alifatičnih i indolnih glukozinolata. U ovom radu je utvrđeno prisustvo ukupnih glukozinolata uobičajeno za ispitivane vrste *B. oleracea* i *B. rapa*, čiji se nivo uvećao pod uticajem organskog sistema proizvodnje, a brokoliji je bio varijetet koji odlikuje najveći sadržaj. Prisustvo degradacionih proizvoda sinigrina- alili izotiocijanata i alil cijanida je utvrđeno nakon homogenizovanja svežeg tkiva pojedinih varijeta, dok je u svim sokovima utvrđeno prisustvo kondenzacionih proizvoda degradacionih proizvoda indol-3-metilglukozinolata sa askorbinskom kiselinom. Pojedinačno prisustvo određenih jedinjenja je značajno budući da svi degradacioni proizvodi ne pokazuju istu

antitumorsku aktivnost. Posebno je značajno prisustvo askorbigena koji je bio zastupljeniji u sokovima organski gajenih varijeteta, pri čemu je u soku kelja utvrđen najviši nivo. Ovo jedinjenje karakteriše značajno imunomodulatorno dejstvo i antitumorski efekat (Olsufyeva, i Preobrazhenskaya, 2004). Pored njega, drugi identifikovani kondenzacioni proizvod, metoksiaskorbigen je bio najzastupljeniji u konvencionalno gajenom brokoliju, a potom u konvencionalno gajenom karfiolu i organski gajenoj kelerabi.

IC₅₀ vrednosti soka organski gajenog kelja preračunate u mg/ml na osnovu prinosa nakon liofilizacije sokova (Prilog) iznose 0,040-0,077 mg/ml što bi odgovaralo slabijoj citotoksičnosti u odnosu na ispoljeno citotoksično dejstvo pojedinih vodenih ekstrakata belih i crnih tartufa, ali i jačem citotoksičnom dejstvu u odnosu na metanolne ekstrakte pojedinih lukova i daleko višoj citotoksičnosti od metanolnih ekstrakata različitih *Plantago* vrsta (Četojević-Simin et al., 2015).

Tabela 4.13. NT_{IC50}/T_{IC50} odnos kao pokazatelj citotoksičnosti ispitivanih vrsta *B. oleracea* i *B. rapa* prema zdravom i tumorskom tkivu.

	NT _{IC50} /T _{IC50}			
	HeLa	MCF7	HT-29	Raji
Brokoli O	-	> 1.06	-	-
Karfiol O	1.63	1.48	0.72	0.89
Keleraba O	1.18	0.86	0.62	0.75
Kelj O	1.25	1.03	< 0.53	< 0.53
Crveni kupus O	1.28	0.78	0.83	< 0.56
Beli kupus O	>1.01	> 1.03	-	-
Kineski kupus O	1.53	1.06	1.02	< 0.32
Brokoli K	2.28	1.45	0.85	< 0.34
Karfiol K	> 2.63	> 1.52	> 1.09	-
Keleraba K	1.52	0.83	0.66	0.37
Kelj K	2.32	1.30	1.19	< 1.00
Crveni kupus K	> 1.34	-	-	-
Beli kupus K	-	-	-	-
Kineski kupus K	-	> 1.06	-	-

Tabela 4.14. Detekcija tipa ćelijske smrti u ćelijama epitelnog karcinoma ovarijuma, adenokarcinoma dojke i adenokarcinoma debelog creva indukovana sokovima organski gajenih kelja i brokolija.

	HeLa			MCF7			HT-29		
	EFA	EFN	EF A/N	EFA	EFN	EF A/N	EFA	EFN	EF A/N
Kelj	1,50	0,77	1,95	1,32	0,85	1,56	0,97	2,75	0,86
Brokoli	2,46	2,54	0,97	-	-	-	-	-	-

5. ZAKLJUČAK

Pored visoke nutritivne uloge, biljke porodice Brassicaceae karakteriše i značajan lekoviti potencijal potvrđen u različitim *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima i epidemiološkim studijama. Danas se sve više insistira na funkcionalnoj ulozi hrane, odnosno njenoj sposobnosti da pruži zaštitu od bolesti na molekularnom nivou, dok se u isto vreme favorizuje organski sistem proizvodnje za koji se smatra da obezbeđuje proizvode koje karakteriše povećan sadržaj bioaktivnih jedinjenja, odsustvo pesticida, genetske modifikacije i hormona rasta i bolje senzorne karakteristike u odnosu na konvencionalne proizvode. Kako u navedenom području istraživanja ne postoje jedinstveni rezultati koji jasno ukazuju na prednosti organskog nad konvencionalnim sistemom proizvodnje, u ovom radu je ispitan hemijski sastav, antioksidantna, antimikrobna i citotoksična aktivnost ekonomski najznačajnijih vrsta porodice Brassicaceae poreklom iz organske i konvencionalne proizvodnje. Na taj način ova doktorska disertacija pruža doprinos postojećim podacima pošto obezbeđuje istovremeno poređenje većeg broja varijeta poreklom iz organskog i konvencionalnog sistema proizvodnje, a kako na području pokrajine Vojvodine do sada nije bilo sličnih ispitivanja, ona ima još veći značaj.

Hemijski sastav ispitivanih vrsta je analiziran pomoću headspace GC-MS, LC-DAD-MS/MS i LC-MS/MS tehnike kao i spektrofotometrijskim metodama kojima je određen sadržaj ukupnih glukozinolata, sadržaj ukupnih fenola i flavonoida i sadržaj ukupnih monomernih antocijana u sokovima crvenog kupusa. Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Glavne volatilne komponente vrsta *B. oleracea* i *B. rapa* su degradacioni proizvodi masnih kiselina i organosumpornih jedinjenja- glukozinolata i SMCSO. Pojedina identifikovanih jedinjenja kao što su heksanal, E-2-heksanal, 2-metilpropanal, alil-izotiocijanat, alil-cijanid i različiti sulfidi (DMDS, DMTS i DMS) spadaju u ključne molekule odgovorne za ukus i miris ispitivanog povrća. Na osnovu dobijenih rezultata o distribuciji tih komponenata, nije bilo moguće izvesti precizan zaključak o uticaju primenjenog sistema proizvodnje na miris i aromu ispitivanih vrsta, budući da su neke od komponenata bile pretežno zastupljene u organskim, dok su druge bile dominantne u konvencionalnim uzorcima, a izvestan broj distribuisan u biljkama potpuno nezavisno od sistema proizvodnje.
- Sokovima ispitivanih vrsta su sadržali pored primarnih metabolita (limunska kiselina, fenilalanin, triptofan), slobodne hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (*p*-hidroksibenzojeva kiselina, protokatehinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, kafena kiselina, hinska kiselina, ferulna kiselina, sinapinska kiselina), derivate hinske i hidroksicimetnih kiselina (3-*O*-*p*-kumaroilhinska kiselina i 4-*O*-*p*-kumaroilhinska kiselina, 5-*O*-kafeoilhinska kiselina), glikozide flavonola (kemferol-3-*O*-glukozida, kvercetin-3-*O*-glukozida, kemferol-3-*O*,*x*-diheksozid), biflavonoid (amentoflavon) i jedan kumarin (skopoletin). Pored toga u sokovima svih ispitivanih vrsta je detektovano prisustvo askorbigena i metoksiaskorbigena, kondenzacionih proizvoda degradacionih proizvoda indolnih glukozinolata i askorbinske kiseline, a u sokovima crvenog kupusa je identifikovano prisustvo antocijana.
- Organski sistem proizvodnje je uslovio porast sadržaja ukupnih glukozinolata u većini ispitivanih vrsta, dok je u ekstraktu brokolija je utvrđen najviši sadržaj ovih jedinjenja. Pošto se na osnovu spektrofotometrijskog određivanja sadržaja ukupnih glukozinolata ne može govoriti o pojedinačnom prisustvu ovih jedinjenja, tumačenjem rezultata dobijenih u toku headspace GC-MS i LC-DAD-MS/MS

analiza, a na bazi detektovanih degradacionih proizvoda, se može zaključiti da su u ispitivanim vrstama bili prisutni alifatičan glukozinolat sinigrin i indolni glukozinolati glukobrazicin i 4-metoksiglukobrazicin.

- Sadržaj ukupnih fenola u većini ispitivanih vrsta je bio blago povećan pod uticajem organskog sistema proizvodnje, pri čemu se po sadržaju ovih jedinjenja izdvojio crveni kupus u odnosu na ostale varijetete. Od pojedinačnih jedinjenja je utvrđen viši nivo hinske kiseline u odnosu na ostala analizirana fenolna jedinjenja, koja se akumulirala više u organskim nego u konvencionalnim uzorcima i bila prisutna u najvišoj koncentraciji u crvenom kupusu.
- U sokovima većine ispitivanih vrsta je utvrđen viši sadržaj ukupnih flavonoida pod uticajem konvencionalnog sistema proizvodnje. U toku kvalitativne i kvantitativne analize je detektovano ukupno tri glikozida flavonola i jedan biflavonoid.
- Sadržaj ukupnih monomernih antocijana je bio gotovo identičan u soku organski i konvencionalno gajenog crvenog kupusa odakle se može zaključiti da primenjeni sistem proizvodnje ne ostvaruje značajniji uticaj na kvalitet crvenog kupusa, pošto stabilnost antocijana zavisi od mnogobrojnih faktora, uključujući i matriks u kome se nalaze. Prisustvo antocijana je potvrđeno i u toku kvalitativne LC-DAD-MS/MS, a u preliminarnim ispitivanjima, nakon izolacije iz vodene frakcije metanolnog ekstrakta crvenog kupusa pomoću SPE tehnike, hromatografijom na tanskom sloju je razdvojeno ukupno šest antocijana.

Antioksidantni kapacitet sokova vrsta *B. oleracea* i *B. rapa* je određen pomoću četiri testa koji se zasnivaju na različitim mehanizmima. Od testova koji mere sposobnost doniranja elektrona (ET) u radu su korišteni DPPH, ABTS i CUPRAC test, dok je sposobnost doniranja vodonikovog atoma (HAT) ispitana pomoću mikro- β CB testa. Na taj način se dobila sveobuhvatna slika u kojoj meri ispitivane vrste pružaju zaštitu od slobodnih radikala u višefaznim sistemima kao što je hrana. Dobijeni rezultati su pokazali sledeće činjenice:

- Najveći antioksidantni kapacitet, odnosno sposobnost neutralizacije, hvatanja i redukcije slobodnih radikala poseduje crveni kupus i u lipidnoj i vodenoj fazi, odnosno u višefaznim sistemima. Ove činjenice su utvrđene na osnovu najjače antiradikalske aktivnosti i redukcione moći soka crvenog kupusa iskazane kao $TEAC_{DPPH}$, $TEAC_{ABTS}$ i $TEAC_{CUPRAC}$, kao i najvišoj sposobnosti zaštite linolne kiseline od oksidacije u test emulziji sa β -karotenom.
- Primenjeni sistemi proizvodnje ostvaruju različite uticaje na antioksidantnu aktivnost ispitivanih vrsta. Poređenjem aktivnosti sokova organskog i konvencionalnog povrća može se zaključiti da organski sistem proizvodnje najverovatnije podstiče akumulaciju polarnijih i kompleksnijih antioksidanata u crvenom kupusu i kelju na osnovu viša vrednost $TEAC_{DPPH}$ kod konvencionalnih i $TEAC_{ABTS}$ i $TEAC_{CUPRAC}$ određenih za sokove organskih uzoraka. U prilog tome govori i nešto jača aktivnost sokova konvencionalno gajenog crvenog kupusa u poređenju sa organskim uzorkom, kao i prooksidantna aktivnost organskog i antioksidantna aktivnost soka konvencionalnog uzorka kelja pri inhibiciji degradacije β -karotena. Za razliku od ovih varijeteta konvencionalni sistem proizvodnje je poboljšao ukupni antioksidantni kapacitet brokolija i belog kupusa, zasnovan na ET ali ne i na HAT mehanizmu, i uglavnom doprineo većoj sposobnosti predaje elektrona karfiola, takođe bez sposobnosti doniranja atoma vodonika. Organski sistem proizvodnje je doprineo većoj antioksidantnoj aktivnosti kineskog kupusa zasnovanoj na sposobnosti doniranja elektrona,

međutim kako je samo uzorak iz konvencionalnog sistema proizvodnje ispoljio sposobnost zaštite linolne kiseline od oksidacije, pod uticajem organske proizvodnje i ovde je najverovatnije došlo do akumulacije veće količine polarnih jedinjenja.

Antimikrobna aktivnost ispitivanih vrsta je određena pomoću *broth mikrodilucione* metode na tri gram pozitivne, tri gram negativne bakterije, kao i tri soja *C. albicans* i dve vrste plesni. Većina izabranih mikroorganizama pripada grupi oportunih patogena koji pri određenim uslovima mogu uzrokovati teške infekcije i dovesti do smrtnog ishoda. Nakon određivanja MIC, MBC i MFC je utvrđeno da:

- Sokovi konvencionalnog povrća su ispoljili jaču antibakterijsku i antifungalnu aktivnost od sokova organskih uzoraka a primećena je i jača antimikrobna aktivnost neglavičastih u odnosu na glavičaste vrste. Sok konvencionalno gajenog karfiola je ispoljio najjači inhibitorski efekat na rast pojedinih gram negativnih, dok je sok konvencionalno gajenog brokolija najuspešnije inhibirao rast gram pozitivnih bakterija. Za sokove brokolija, karfiola, kelerabe i crvenog kupusa su utvrđene najniže vrednosti za MIC i MFC u odnosu na klinički izolat *C. albicans* II, a sok konvencionalno gajenog karfiola je ispoljio najjaču antifungalnu aktivnost na testirane sojeve plesni.
- Izračunati odnosi MBC:MIC i MFC:MIC pokazuju da sokovi ispitivanih varijeteta deluju prvenstveno baktericidno i fungicidno na patogene testirane u ovom radu. Antifungalnu aktivnost sokova je bila izraženija u odnosu na antibakterijsku aktivnost, a *C. albicans* je bila osetljivija na delovanje sokova od testiranih plesni, kao i gram negativne od gram pozitivnih bakterija.

Citotoksična aktivnost svežih sokova vrsta *B. olerace* i *B. rapa* je ispitana prema humanim ćelijskim linijama epitelnog karcinoma cerviksa, adenokarcinoma dojke, adenokarcinoma debelog creva, limfoblastima Burkitt-ovog limfoma i fetalnim fibroblastima pluća pomoću SRB testa, a potom je izvršena detekcija tipa ćelijske smrti koju indukuju sokovi organski gajenog kelja i brokolija. Na osnovu dobijenih rezultata nakon tretmana ćelija sokovima ispitivanih vrsta i utvrđenog tipa ćelijske smrti može se izvesti sledeći zaključak:

- Najjaču antiproliferativnu aktivnost poseduje organski uzorak kelja koji je postigao najviši stepen inhibicije rasta u testiranim ćelijama (preko 90% inhibicije rasta u ćelijama epitelnog karcinoma cerviksa, adenokarcinoma dojke i ćelijama zdravog tkiva- fetalnih fibroblasta pluća) i imao najniže vrednosti IC₅₀ prema svim ćelijskim linijama. Detekcijom tipa ćelijske smrti je utvrđeno da ovaj varijetet dovodi do pojave indukcije apoptoze u ćelijama epitelnog kancera cerviksa i adenokarcinoma dojke, dok u ćelijama adenokarcinoma debelog creva prouzrokuje pojavu nekroze.
- Pored organski gajenog kelja, visoku antiproliferativnu aktivnost su ispoljili i sokovi konvencionalno gajenih karfiola, brokolija i organski gajene kelerabe prema većini tumorskih ćelija. Kako je antiproliferativna aktivnost sokova bila izražena i u ćelijama zdravog tkiva, na osnovu utvrđenog NT/T odnosa je ustanovljeno da sokovi ispitivanih vrsta pokazuju nešto veću citotoksičnost prema ćelijama epitelnog karcinoma cerviksa (NT/T>1), uz nešto jače citotoksično delovanje pojedinih sokova na ćelije adenokarcinoma dojke, slabije citotoksično dejstvo na ćelije adenokarcinoma debelog creva i izuzetno nisku selektivnost prema limfoblastima Burkitt-ovog limfoma (NT/T<1) u odnosu na zdravo tkivo.

Sumiranjem svih dobijenih rezultata može se izvesti opšti zaključak da u zavisnosti od primenjenog tipa proizvodnje mogu biti poboljšane neke od karakteristika

ispitivanih vrsta *B. oleracea* i *B. rapa* i da je uticaj sistema proizvodnje prvenstveno vezan za pojedine varijetete, a nikako za celu vrstu. Mnogo bitnija odrednica su sami morfortipovi u okviru ispitivanih vrsta koji ispoljavaju određene biološke aktivnosti, što se može zaključiti po podacima koji pokazuju da je crveni kupus varijetet bogat fenolnim antioksidantima koji može da pruži najjaču zaštitu od toksičnog delovanja slobodnih radikala, i da nije podložan značajnijem uticaju primenjenog sistema proizvodnje, dok konvencionalno gajeni brokoli i karfiol predstavljaju varijetete koji ispoljavaju najjače antimikrobno dejstvo, a organski gajeni kelj ispoljava najjači antitumorski efekat. Stoga bi primena određenog sistema proizvodnje mogla biti opravdana u zavisnosti od željenog biološkog efekata i varijeteta koji se proizvodi.

Na osnovu rezultata ovog rada može se zaključiti da bi optimalna kombinacija svežih sokova crvenog kupusa, brokolija, karfiola i kelja mogla da pruži jednu kompleksnu i efikasnu zaštitu od nastanka različitih oboljenja ispoljavajući istovremeno antioksidantno, antimikrobno i antitumorsko delovanje. Stoga bi dalja ispitivanja trebalo usmeriti u pravcu ispitivanja biološke aktivnosti kombinacija sokova navedenih biljaka, a najefikasnija kombinacija bi se odabrala za dalja klinička ispitivanja.

6. SUMMARY

Besides their highly nutritional role, numerous *in vitro* and *in vivo* investigations, as well as epidemiological studies showed significant healing potential of Brassica vegetables. Nowadays, functional role of food is being increasingly insisted on, i.e. its ability to offer protection against diseases on a molecular level, while organic cropping system is seen as the preferred way of production which enables crops with higher content of bioactive compounds, free from pesticides, genetic modifications, growth hormones and with better sensory characteristics in comparison to conventionally produced plants. As there are no clear and concise evidence in this area of investigation, which can confirm better characteristics of organic cropping system in comparison to the conventional one, in the present work chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activity of economically most important species of family Brassicaceae, originating from organic and conventional cropping system were investigated. Thus, this doctoral thesis makes contribution to the existing evidence because it offers comparison of a higher number of subspecies originating from organic and conventional cropping systems. Furthermore, there were no previous investigations similar to the present in the area of province of Vojvodina, thus this doctoral thesis is more significant.

The chemical composition of investigated species was analyzed by headspace GC-MS, LC-DAD-MS/MS and LC-MS/MS technique, total content of glucosinolates, total content of phenolic compounds and flavonoids by spectrophotometric methods, as well as total content of monomeric anthocyanes in juices of red cabbage. Based on the results obtained by these techniques, it can be concluded:

- The main volatile compounds of *B. oleracea* and *B. rapa* species were degradation products of fatty acids and organosulfur compounds- glucosinolates and SMCSO. Some of identified compounds such as hexanal, 2-methylpropanal, allyl isothiocyanate, allyl cyanide and various sulfides (DMDS, DMTS and DMS) are the key aromatic compounds responsible for the taste and aroma of investigated vegetables. On the basis of the obtained results of the distribution of these components, it was not possible to make precise conclusion on the influence of applied cropping system on the aroma and taste of investigated species, since some components were mainly abundant in organic, while others were dominant compounds in the conventional samples and certain number was distributed in plants completely independent on the type of the production.
- Besides primary metabolites (citric acid, phenylalanine, tryptophan), juices of investigated species also contained free hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids (*p*-hydroxybenzoic acid, protocatehuic acid, *p*-cumaric acid, caffeic acid, quinic acid, ferulic acid, sinapyc acid), derivatives of quinic acid and hydroxycinnamic acids (3-*O*-*p*-cumaroilquinic acid, 4-*O*-*p*-cumaroilquinic acid, 5-*O*-caffeoylquinic acid), glucosides of flavonols (keampferol-3-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-glucoside, keampferol-3-*O*,*x*-dihexoside), bioflavonoid (amenthoflavon) and one coumarin (scopoletin). Moreover, in all juices were detected ascorbigen and metoxyascorbigen, condensation products of degradation products of indole glucosinolates and ascorbic acid, as well as anthocyanes in red cabbage juices.
- Organic cropping system caused an increase of the total content of glucosinolates in the majority of investigated species while in broccoli extract the highest content of these compounds was determined. Total glucosinolates content determined by spectrophotometric method does not give information on the presence of individual glucosinolates, but aliphatic glucosinolate sinigrin and indole glucosinolates glucobrazycin and 4-metoxyglucobrazycin were present in

investigated species according to results obtained during headspace GC-MS i LC-DAD-MS/MS analysis, where their degradation products were detected.

- Total phenolic content in the majority of investigated species was slightly increased under the influence of organic cropping conditions, and content of these compounds was particularly high in red cabbage. Higher level of quinic acid was determined among the analysed phenolic compounds, and higher concentration of this compound was found in red cabbage.
- Higher total content of flavonoids was determined under the influence of conventional cropping conditions in the majority of juices of investigated species. During qualitative and quantitative analysis three glucosides of flavonols and one biflavonid were detected.
- Total content of monomeric anthocyanes was almost identical in juices of organically and conventionally produced red cabbage, thus meaning that applied cropping system does not have any significant impact on the quality of red cabbage, as the stability of anthocyanes depends on numerous factors including the matrix in which are present. The presence of anthocyanes was also confirmed during qualitative LC-DAD-MS/MS, as well in the preliminary investigations after isolation by SPE technique from the water fraction of methanol extract of red cabbage, where six anthocyanes were separated by the tin layer chromatography.

The antioxidant capacity of species *B. oleracea* and *B. rapa* was determined by four assays based on different mechanisms. DPPH, ABTS and CUPRAC assays, which measure ability of electron transfer (ET) and micro β CB test, which measure hydrogen atom transfer (HAT) were used. In that way, a comprehensive picture of the ability of investigated species to offer protection from free radicals in multiphase systems, such as food, was obtained. The obtained results showed the following facts:

- Red cabbage possesses highest antioxidant capacity in the terms of its ability of neutralization, quenching and reduction of free radicals in the lipidic and water phase and multiphase systems. These facts were concluded due to the highest antiradical activity and reduction power expressed as $TEAC_{DPPH}$, $TEAC_{ABTS}$ and $TEAC_{CUPRAC}$ as well as the highest ability of protection of linoleic acid in emulsion with β -caroten from the oxidation.
- Applied cropping system showed variable influence on the antioxidant activity of investigated species. By comparison of the activity of juices of organically and conventionally grown vegetables it can be concluded that organic cropping system led to the accumulation of more polar and complex antioxidant in red and Savoy cabbage due to the higher values $TEAC_{DPPH}$ in conventional and $TEAC_{ABTS}$ i $TEAC_{CUPRAC}$ determined in organic samples. In addition to these facts somewhat higher activity of juices of conventionally grown red cabbage in comparison to organic sample, as well as pro-oxidant activity of organic and antioxidant activity of conventional samples of Savoy cabbage were shown by measuring their ability of inhibition of degradation of β -carotene. Unlike these varieties, conventional cropping conditions improved total antioxidant capacity of broccoli and white cabbage based on ET mechanism, but not that based on HAT, and mainly caused higher electron donating ability of cauliflower, also without ability of hydrogen atom donation. Organic cropping system contributed to antioxidant activity of Nappa cabbage by increasing ability of electron donation. Nevertheless, only conventional sample showed the ability to protect linoleic acid from oxidation most likely due to higher accumulation of polar compounds under the influence of organic cropping conditions.

Antimicrobial activity of investigated species was determined by *broth microdilution* assay on three gram positive, three gram negative bacteria, three species of *C. albicans* and two types of molds. A majority of microbials under the study belonging to the group of opportunistic pathogens that may cause severe infections under certain condition and led to the lethal outcome. After the MIC, MBC and MFC determination, it was concluded:

- Juices of conventional vegetables showed better antibacterial and antifungal activity than juices of organic samples and better antimicrobial activity of non-heading species in comparison to heading ones was observed. Juice of conventionally grown cauliflower expressed the highest inhibitory effect on the growth of particular gram negative species while juice of conventionally grown broccoli most successfully inhibited the growth of gram positive bacteria. The lowest values of MIC and MFC against clinical isolate of *C. albicans* were shown by juices of broccoli, cauliflower, kohlrabi and red cabbage, while juice of conventionally grown cauliflower showed the strongest antifungal activity against tested molds.
- Determined ratios of MBC:MIC and MFC:MIC showed bactericidal and fungicidal activity of juices of investigated varieties against tested pathogens in this study. Antifungal activity of juices was more prominent in comparison to antibacterial activity, *C. albicans* was more sensitive on juices than tested molds as well as gram negative bacteria in comparison to gram positive species.

Cytotoxic activity of fresh juices of *B. oleracea* and *B. rapa* species was investigated on human cervical cancer cells, human breast adenocarcinoma, human colon adenocarcinoma, human Burkitt lymphoma cells and fetal lung fibroblasts by SRB assay, and afterwards it was determined type of cell death caused by juices of organically produced Savoy cabbage and broccoli. Based on the results obtained after treatment of cells with juices of investigated species and determined type of cell death it can be concluded:

- The highest antiproliferative activity possesses organically produced Savoy cabbage which caused highest inhibition of the growth of tested cells (more than 90% of inhibition of the growth of cervical cancer cells, human breast adenocarcinoma and fetal lung fibroblasts) and had the lowest IC₅₀ values on all cell lines. This variety induced apoptosis in cervical cancer and breast adenocarcinoma cells while in cells of human colon adenocarcinoma caused necrosis as was observed by detection of the type of cell death.
- Juices of conventionally grown cauliflower, broccoli and organically grown kohlrabi also showed high antiproliferative activity besides organically grown Savoy cabbage. However, high antiproliferative activity of juices in the healthy tissue was observed and on the basis of calculated NT/T ratio, higher cytotoxic activity on cervical cancer cells than on the healthy cells was observed (NT/T>1), besides somewhat higher cytotoxicity of some juices on breast adenocarcinoma cells, weaker cytotoxic activity on colon adenocarcinoma cells and very low selectivity to Burkitt lymphoma cells in comparison to the healthy tissue.

Summarising all obtained results, a general conclusion can be drawn. Depending on the type of cropping conditions, some characteristics of investigated species *B. oleracea* and *B. rapa* can be improved. Influence of cropping practice is mainly linked to individual varieties, and not for whole species. More important item are the morphotypes of investigated species which express certain biological activities, which can be concluded due to data which show that red cabbage is a variety rich in phenolic compounds and can offer the greatest protection from the toxicity of free radicals and a

variety not significantly affected by the type of cropping conditions. Conventionally grown broccoli and cauliflower represent varieties with the highest antimicrobial activity while organically grown Savoy cabbage expresses highest antitumor effect. Hence, application of particular cropping system can be useful for certain biological effects and varieties that are produced.

Based on the results obtained in this work can be concluded that potential combination of fresh juices of red cabbage, broccoli, cauliflower and Savoy cabbage most likely can offer a complex and effective protection against different diseases due to simultaneous antioxidant, antimicrobial and antitumor activity. Thus, some future investigations should be directed to evaluation of the biological activity of such combination of juices and most effective combination should be selected for further clinical studies.

7. LITERATURA

- Aćimović, J. (2012). MODIFIKACIJA –SH GRUPE PROTEINA α -DIKARBONILNIM JEDINJENJIMA: IDENTIFIKACIJA PROIZVODA, MOGUĆNOSTI ODREĐIVANJA I PRIMENE U KLINIČKOJ PRAKSI. Doktorska disertacija, Beograd.
- Adams, D. J., Boskovic, Z. V., Theriault, J. R., Wang, A. J., Stern, A. M. (2013). Supporting Information High-Throughput Screening Identifies Small-Molecule Enhancers of Reactive Oxygen Species that are Nontoxic or Cause Genotype- Selective Cell Death. *ACS Chemical Biology*, 8, 923-929.
- Agerbirk, N., De Vos, M., Kim, J. H., Jander, G. (2009). Indole glucosinolate breakdown and its biological effects. *Phytochemistry Reviews*, 8, 101–120.
- Anisimov, V. N. (2010). Is there an unambiguous answer to the question: Whether the aging program exists or not? *Russian Journal of General Chemistry*, 80(7), 1395–1406.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*, 127(1), 183–198.
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report)*. *Pure and Applied. Chemistry*, 85(5), 957–998.
- Apak, R., Guclu, K., Demirata, B., Ozyurek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I., Ozyurt, D. (2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, 12(7), 1496–1547.
- Arnao, M. B., Cano, A., Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73(2), 239–244.
- Awasthi, S., Saraswathi, N. T. (2016). Sinigrin, a major glucosinolate from cruciferous vegetables restrains non-enzymatic glycation of albumin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 83, 410–415.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1–31. doi.org/10.1155/2014/360438
- Babula, D., Kaczmarek, M., Ziolkowska, P. A., Sadowski, J. (2007). Brassica oleracea. In: C Kole (ur.) Genoma Mapping and *Molecular Breeding in Plants*, vol 5: Vegetables. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, str 227-285.
- Barrett, D. M., Lloyd, B. (2012). Advanced preservation methods and nutrient retention in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(August 2011), 7–22.
- Belitz, H., Grosch, W., Schieberle, P. (2009). Aroma Compounds. *Food Chemistry*, 340–402.
- Bell, E. A. (2003). Nonprotein amino acids of plants: Significance in medicine, nutrition, and agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2854–2865.
- Bendary, E., Francis, R. R., Ali, H. M. G., Sarwat, M. I., El Hady, S. (2013). Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Annals of Agricultural Sciences*, 58(2), 173–181.
- Bennett, R. N., Mellon, F. A., Kroon, P.A. (2004). Screening Crucifer Seeds as Sources of Specific Intact Glucosinolates Using Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography Negative Ion Electrospray Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 428-438.

- Bernhoft, A. (2010). A brief review on bioactive compounds in plants. In: A. Bernhoft (ur.) *Bioactive compounds in plants - benefits and risks for man and animals: Proceedings of The Norwegian Academy of Sciences and Letters*, Oslo, 13-14 November 2008 (str. 11-17) Oslo: The Norwegian Academy of Sciences and Letters.
- Boivin, D., Lamy, S., Lord-Dufour, S., Jackson, J., Beaulieu, E., Côté, M., Moghrabi, A., Barrette, S., Gingras, D., Béliveau, R. (2009). Antiproliferative and antioxidant activities of common vegetables: A comparative study. *Food Chemistry*, 112, 374–380.
- Björkman, M., Klingen, I., Birch, A. N. E., Bones, A. M., Bruce, T. J. a, Johansen, T. J., Medow, R., Molmann, J., Seljasen, R., Smart, L. E., Stewart, D. (2011). Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health - Influences of climate, environment and agronomic practice. *Phytochemistry*, 72, 538–556.
- Branca, F., Li, G., Goyal, S., Quiros, C. F. (2002). Survey of aliphatic glucosinolates in Sicilian wild and cultivated Brassicaceae. *Phytochemistry*, 59, 717–724.
- Broadley, M. R., Willey, N. J., Wilkins, J. C., Baker, a. J. M., Mead, A., White, P. J. (2001). Phylogenetic variation in heavy metal accumulation in angiosperms. *New Phytologist*, 152, 9–27.
- Cabello-Hurtado, F., Gicquel, M., Esnault, M. A. (2012). Evaluation of the antioxidant potential of cauliflower (*Brassica oleracea*) from a glucosinolate content perspective. *Food Chemistry*, 132(2), 1003–1009.
- Cadenas, E., Packer, L., Traber, M. G. (2016). Antioxidants, oxidants, and redox impacts on cell function — A tribute to Helmut Sies —. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 595, 94–99.
- Calmes, B., N'Guyen, G., Dumur, J., Brisach, C. A., Campion, C., Iacomi, B., Pignes, S., Dias, E., Macherel, D., Gullemette, T., Simoneau, P. (2015). Glucosinolate-derived isothiocyanates impact mitochondrial function in fungal cells and elicit an oxidative stress response necessary for growth recovery. *Frontiers in Plant Science*, 6, 414. doi.org/10.3389/fpls.2015.00414
- Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., Frígola, A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 155–171.
- Cartea, M. E., Velasco, P. (2008). Glucosinolates in Brassica foods: Bioavailability in food and significance for human health. *Phytochemistry Reviews*, 7(2), 213–229.
- Cartea, M. E., Francisco, M., Soengas, P., Velasco, P. (2011). Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules*, 16, 251–280.
- Casadevall, A., Pirofski, L. (2000). Host-Pathogen Interactions : Basic MINIREVIEW Host-Pathogen Interactions : Basic Concepts of Microbial Commensalism , Colonization , Infection , and Disease. *Infection and Immunity*, 68(12), 6511–6518.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. D. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859–871.
- Chang, C-C., Yang M-H., Wen, H-M. & Chern, J-C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182.
- Charron, C. S., Saxton, A. M., Sams, C. E. (2005). Relationship of climate and genotype to seasonal variation in the glucosinolate-myrosinase system. I. Glucosinolate content in ten cultivars of Brassica oleracea grown in fall and spring seasons. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 671–681.
- Cheng, F., Wu, J., Wang, X. (2014). Genome triplication drove the diversification of Brassica plants. *Horticulture Research*, 1, 14024.

- Clifford, N. M., Wu, W., Kuhnert, N. (2006). The chlorogenic acids of *Hemerocallis*. *Food Chemistry*, 95(5), 574-578.
- CLSI (2008a). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard-Third edition*. CLSI document M27-A3. Wyne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI (2008b) *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard*. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cooper GM. *The Cell* (2000): A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. The Development and Causes of Cancer.
- Craft, B. D., Kerrihard, A. L., Amarowicz, R., Pegg, R. B. (2012). Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 148–173.
- Csermely, P., Korcsmaros, T., Kiss, H. J. M., London, G., Nussinov, R. (2013). Structure and dynamics of molecular networks: A novel paradigm of drug discovery: A comprehensive review. *Pharmacology and Therapeutics*, 138(3), 333–408.
- Četojević-Simin, D., Beara, I., Simin, N. (2015). Ne-tumor/tumor IC₅₀ odnos kao parametar za procenu antitumorske in vitro aktivnosti vrsta roda *Plantago*, *Allium* i *Tuber*. *Lekovite sirovine*, 35(35), 103–111.
- Dai, J., Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313–7352.
- Dangour, A. D., Dodhia, S. K., Hayter, A., Allen, E., Lock, K., Uauy, R. (2009). Nutritional quality of organic foods: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90(3), 650-655.
- Delonga, K., Radojčić Redovniković, I., Dragović-Uzelac, V., Mrkić, V., Vorkapić-Furač, J. (2007). Distribution of glucosinolates in some raw and processed *Brassica* vegetables grown in Croatia. *Acta Alimentaria*, 36(2), 207–216.
- Dias, J. S. (2012). Nutritional Quality and Health Benefits of Vegetables: A Review. *Food and Nutrition Sciences*, 03(10), 1354–1374.
- Dong, Y., Wang, L., Zhang, L.-H. (2007). Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 362(1483), 1201–11.
- Dou, J.-L., Jiang, Y.-W., Xie, J.-Q., Zhang, X.-G. (2016). New Is Old, and Old Is New: Recent Advances in Antibiotic-Based, Antibiotic-Free and Ethnomedical Treatments against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Wound Infections. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5), 617.
- Drewnowski, A., Gomez-Carneros, C. (2000). Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(22), 1424–1435.
- Dufour, V., Stahl, M., Baysse, C. (2015). The antibacterial properties of isothiocyanates. *Microbiology (Reading, England)*, 161(2015), 229–243.
- Edmands, W. M. B., Gooderham, N. J., Holmes, E., Mitchell, S. C. (2013). S-Methyl-l-Cysteine Sulphoxide: the Cinderella phytochemical? *Toxicology Research*, 2, 11–22.

- EFSA CONTAM Panel (2013). Scientific Opinion on Tropane alkaloids in food and feed. *EFSA Journal* 11(10), 1–113.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicological Pathology*, 35 (4), 495–516.
- Falk, K. L., Tokuhisa, J. G., Gershenzon, J. (2007). The effect of sulfur nutrition on plant glucosinolate content: Physiology and molecular mechanisms. *Plant Biology*, 9, 573–581.
- Fay, M. F., Christenhusz, M. J. M. (2010). Brassicales – an order characterized by shared chemistry. *Curtis's Botanical Magazine*, 27(3), 165–196.
- Ferreres, F., Sousa, C., Valentão, P., Seabra, R. M., Pereira, J. A., Andrade, P. B. (2007). Tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) seeds: Phytochemical characterization and antioxidant potential. *Food Chemistry*, 101, 549–558.
- Fimognari, C., Lenzi, M., Hrelia, P. (2009). Apoptosis Induction by Sulfur-Containing Compounds in Malignant and Non-Malignant Human Cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50, 171–189.
- Finley, J. W., Kong, A., Hintze, K. J., Jeffery, E. H., Ji, L. L., Lei, X. G. (2015). Antioxidants in Foods : State of the Science Important to the Food Industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 6837–6846.
- Frankel, E. N. (1999). Plenarvorträge / Plenary Lectures Food antioxidants and phytochemicals : present and future perspectives. *Fett/Lipid*, 101(12), 450–455.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M. et al. (2014). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death and Differentiation*, 1–16.
- Gerl, R., Vaux, D. L. (2005). Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis*, 26(2), 263–270.
- Ghannoum, M. A., Rice, L. B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 501–17.
- Giusti, M. M., Wrolstad, R. E. (2001). Unit F1.2: Anthocyanins Characterisation and Measurement with UV visible spectroscopy. U: Wrolstad, R. E. (ur.) *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, str 1-13.
- Gkogkolou, P., Böhm, M. (2012). Advanced glycation end products: Key players in skin aging? *Dermato-Endocrinology*, 4(3), 259–70.
- Góralaska, K., Dynowska, M., Ciska, E. (2009). Fungistatic Properties of Glucosinolates – a Reconnaissance Study, *Polish Journal of Environmental Study*, 18(3), 377-382.
- Hafidh, R. R., Abdulmir, A. S., Vern, L. S., Abu Bakar, F., Abas, F., Jahanshiri, F., Sekawi, Z. (2011). Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *The Open Microbiology Journal*, 5, 96–106.
- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutrition Reviews*, 70(5), 257–265.
- Halvorsen, B. L., Holte, K., et al. (2002). A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *The Journal of Nutrition*, 132(3), 461–471.

- Hansch, F. S., Lamy, E., Schreiner, M., Rohn, S. (2014). Reactivity and stability of glucosinolates and their breakdown products in foods. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 53(43), 11430–11450.
- Hayes, J. D., Kelleher, M. O., Eggleston, I. M. (2008). The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *European Journal of Nutrition*, 47(2008), 73–88.
- Chiang, M. S., Chong, C., Landry, R. S., Crete, R. (1993). Cabbage *Brassica oleracea* subsp. *capitata* L. U: Kalloo, G., Berg, B. O. (ur.) *Genetic Improvement of Vegetable Crops*, str 113-155.
- Höhn, A., König, J., Grune, T. (2013). Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *Journal of Proteomics*, 92, 132–159.
- Hounsome, N., Hounsome, B., Tomos, D., Edwards-Jones, G. (2008). Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *Journal of Food Science*, 73(4), 48–65.
- Hrcirik, K., Valusek, J., Velisek, J. (2001). Investigation of ascorbigen as a breakdown product of glucobrassicin autolysis in Brassica vegetables. *European Food Research and Technology*, 212(5), 576–581.
- Hung, P. V., Duy, T. L. (2012). Effects of drying methods on bioactive compounds of vegetables and correlation between bioactive compounds and their antioxidants. *International Food Research Journal*, 19(1), 327–332.
- Ishida, M., Hara, M., Fukino, N., Kakizaki, T., Morimitsu, Y. (2014). Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breeding Science*, 64(1), 48–59.
- Jahangir, M., Kim, H. K., Choi, Y. H., Verpoorte, R. (2009). Compounds in Brassicaceae. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8, 31–43.
- Jin, K. (2010). Modern Biological Theories of Aging. *Aging and Disease*, 1(2), 72–74.
- Kapusta-Duch, J., Kopec, A., Piatkowska, E., Borczak, B., Leszczynska, T. (2012). The beneficial effects of Brassica vegetables on human health. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 63(4), 389–395.
- Kestwal, R. M., Lin, J. C., Bagal-Kestwal, D., Chiang, B. H. (2011). Glucosinolates fortification of cruciferous sprouts by sulphur supplementation during cultivation to enhance anti-cancer activity. *Food Chemistry*, 126(3), 1164–1171.
- Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M., Hocevar, B. A. (2010). Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicologic Pathology*, 38(1), 96–109.
- Kmiecik, W., Słupski, J., Lisiewska, Z. (2010). Comparison of amino acid content and protein quality in raw broccoli and in broccoli after technological and culinary processing. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34(SUPPL. 2), 639–652.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Griel, E. M., Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 113 (9B), 71S–88S.
- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidant activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 85, 633–640.
- Kumar, S., Andy, A. (2012). Minireview health promoting bioactive phytochemicals from brassica. *International Food Research Journal*, 19(1), 141–152.

- Kurilich, A. C., Tsau, G. J., Brown, A., Howard, L., Klein, B. P., Jeffery, E. H., Kushad, M., Wallig, M. A., Juvik, J. A. (1999). Carotene, tocopherol, and ascorbate contents in subspecies of Brassica oleracea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1576–1581.
- Kyle, J. A. M., Duthie, G. G. (2006) Flavonoids in foods. U: *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications* (Andersen, O. M. i Markham, K. R., urednici). Boca Raton, FL, CRC Press, str. 219-259.
- Kyung, K. H., Fleming, H. P. (1997). Antimicrobial activity of sulfur compounds derived from cabbage. *Journal of Food Protection*.. 60, 67-71.
- Landete, J. M. (2012). Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. *Food Research International*, 46(1), 410–424.
- Larsen, E., Christensen, L. P. (2007). Common vegetables and fruits as a source of 1,2-di-O- α -linolenoyl-3-O- β -D-galactopyranosyl-sn-glycerol, a potential anti-inflammatory and antitumor agent. *Journal of Food Lipids*, 14, 272–279.
- Lee, J., Durst, R. W., Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88, 1269–1278.
- Leggett, H. C., Cornwallis, C. K., West, S. A. (2012). Mechanisms of pathogenesis, infective dose and virulence in human parasites. *PLoS Pathogens*, 8(2), 10–12
- Lemos, M., Santin, J. R., Júnior, L. C. K., Niero, R., Andrade, S. F. De. (2011). Gastroprotective activity of hydroalcoholic extract obtained from the leaves of Brassica oleracea var. acephala DC in different animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, 138(2), 503–507.
- Lesjak, M. M., Beara, I. N., Orčić, D. Z., Petar, K. N., Simin, N. Đ., Emilija, S. Đ., Mimica-Dukić, N. M. (2014). Phytochemical composition and antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities of Juniperus macrocarpa Sibth. et Sm. *Journal of Functional Foods*, 7, 257-268.
- Lima, G. P. P., Vianello, F. (2011). Review on the main differences between organic and conventional plant-based foods. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1–13.
- Lima G. P. P., Vianello, F., Corrêa, C. R., Arnoux, R., Campos, D. S., Borguini, M. G. (2014). Polyphenols in Fruits and Vegetables and Its Effect on Human Health. *Food and Nutrition Sciences*, 5(5), 1065–1082.
- Lima, G. P. P., Da Rocha, S. A., Takaki, M., Ramos, P. R. R., Ono, E. O. (2008). Comparison of polyamine, phenol and flavonoid contents in plants grown under conventional and organic methods. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(10), 1838–1843.
- Lin, L. Z., Harnly, J. M. (2009). Identification of the phenolic components of collard greens, kale, and chinese Broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7401–7408.
- Lin, L. Z., Harnly, J. M. (2010). Phenolic component profiles of mustard greens, Yu Choy, and 15 other Brassica vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6850–6857.
- Liochev, S. I. (2013). Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 60, 1–4.
- López-Berenguer, C., Martínez-Ballesta, M. D. C., Moreno, D. a., Carvajal, M., García-Viguera, C. (2009). Growing hardier crops for better health: Salinity tolerance and the nutritional value of broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 572–578.
- Magesh, S., Chen, Y., Hu, L. (2012). Small Molecule Modulators of Keap1-Nrf2-ARE Pathway as Potential Preventive and Therapeutic Agents*. *Medicinal Research Reviews*, 32, 4, 687–726.

- Maggioni, L. (2015). Domestication of Brassica oleracea L. Doktorska disertacija. Faculty of Landscape Architecture, Horticulture and Crop Production Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp.
- Majno, G., Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American Journal of Pathology*, 146(1), 3–15.
- Manach, C. (2004). Polyphenols : food sources and bioavailability *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727 – 747.
- Manchali, S., Chidambara Murthy, K. N., Patil, B. S. (2012). Crucial facts about health benefits of popular cruciferous vegetables. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 94–106.
- Marks, H. S., Hilaon, J. A., Leichtweis, H. C., Stoewsand, G. S. (1992). S-Methylcysteine Sulfoxide in Brassica vegetables and formation of Methyl methanetiosulfinate from Brussels sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 2098–2101.
- Martínez, S., Losada, P., Franco, I., Carballo, J. (2011). Protein, amino acid, ash and mineral contents in Brassica spp. grown in Northwest Spain. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 146–153.
- Masci, A., Mattioli, R., Costantino, P., Baima, S., Morelli, G., Punzi, P., Giordano, C., Pinto, A., Donini, L. M., dErme, M., Mosca, L. (2015.). Neuroprotective Effect of Brassica oleracea Sprouts Crude Juice in a Cellular Model of Alzheimer ' s Disease. Article ID 7181938.
- Materska, M. (2008). Quercetin and its Derivatives: Chemical Structure and Bioactivity - a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 58(4), 407–413.
- Mazza, G. (2007). Anthocyanins and heart health. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita*, 43(4), 369–374.
- Mikami, I., Yamaguchi, M., Shinmoto, H., Tsushida, T. (2009) Development and Validation of Microplate-based β -caroten Bleaching Assay and Comparison of Antioxidant Activity (AOA) in Several Crops measured by β -caroten Bleaching, DPPH and ORAC Assays. *Food Science Technology research*, 15(2), 171-178.
- Miranda Rossetto, M. R., Shiga, T. M., Vianello, F., Pereira Lima, G. P., 2013. Analysis of total glucosinolates and chromatographically purified benzylglucosinolate in organic and conventional vegetables. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), 247–252.
- Miser-Salihoglu, E., Akaydin, G., Caliskan-Can, E., Yardim-Akadim, S. (2010). Evaluation of Antioxidant Activity of Various Herbal Folk Evaluation Medicine. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 35, 59-67.
- Mithen, R. F., Dekker, M., Verkerk, R., Rabot, S., Johnson, I. T. (2000). The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 967–984.
- Mohammed, K. A., Al-Maliki, A. D. M. (2014). Effect of phenolic and alkaloid compounds extracted from Brassica oleracea var .capitata seed on glucose level in blood of alloxan- induced diabetes rabbits, 2(1), 24–29.
- Molyneux, R. J., Lee, S. T., Gardner, D. R., Panter, K. E., James, L. F. (2007). Phytochemicals: The good, the bad and the ugly? *Phytochemistry*, 68(22-24), 2973–2985.
- Moreno, D. a., Carvajal, M., López-Berenguer, C., García-Viguera, C. (2006). Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1508–1522.

- Munday, R. (2012). Harmful and beneficial effects of organic monosulfides, disulfides, and polysulfides in animals and humans. *Chemical Research in Toxicology*, 25(1), 47–60.
- Naguib, A. E.-M. M., El-Baz, F. K., Salama, Z. A., Abd El Baky Hanaa, H., Ali, H. F., Gaafar, A. A. (2012). Enhancement of phenolics, flavonoids and glucosinolates of Broccoli (*Brassica oleracea*, var. *Italica*) as antioxidants in response to organic and bio-organic fertilizers. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 11(2), 135–142.
- Ndhkala, A. R., Moyo, M., Van Staden, J. (2010). Natural antioxidants: Fascinating or mythical biomolecules? *Molecules*, 15, 6905–6930.
- Nica, D., Gergen, I., Liana, A., Adriana, M., Alda, S., Gogoasa, I., Moigradean, D., Borozan, Aurica, B., Bordean, D-M. (2012). Comparative assessment of mineral content and antioxidant properties of some cabbage varieties available on Romanian market. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 16(3), 18–21.
- Nićiforović, N., Abramović, H. (2014). Sinapic acid and its derivatives: Natural sources and bioactivity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 34–51.
- Nilsson, J., Olsson, K., Engqvist, G., Ekvall, J., Olsson, M., Nyman, M., Åkesson, B. (2006). Variation in the content of glucosinolates, hydroxycinnamic acids, carotenoids, total antioxidant capacity and low-molecular-weight carbohydrates in Brassica vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(December 2003), 528–538.
- Olsufyeva, E. N., Preobrazhenskaya, M. N., 2004. Antibiotics produced at the G. F. Gauze Scientific-Research Institute of new antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences (marking the fiftieth anniversary of the institute). (Review). *Chem.Heterocycl.Comp*, 40(11), 1381–1395.
- Ostergaard, L., King, G. J. (2008). Standardized gene nomenclature for the Brassica genus. *Plant Methods*, 4, 10.
- Pankey, G. A., Sabath, L. D. (2004). Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 38(6), 864–870.
- Papetti, A., Daglia, M., Gazzani, G. A. G. (2002). Anti- and Pro-oxidant Water Soluble Activity of Cichorium Genus Vegetables and Effect of Thermal Treatment, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4696–4704.
- Park, E. J., Pezzuto, J. M. (2002). Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer and Metastasis Reviews*, 21, 231–255.
- Parthasarathy, G., Philipp, M. T. (2012). Review: Apoptotic mechanisms in bacterial infections of the central nervous system. *Frontiers in Immunology*, 3(OCT), 1–13.
- Patel, D. K., Kumar, R., Laloo, D., Hemalatha, S. (2012). Natural medicines from plant source used for therapy of diabetes mellitus: An overview of its pharmacological aspects. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2(3), 239–250.
- Perez-Balibrea, S., Moreno, A. D.I Garcia-Viguera, C. (2008). Influence of light on health-promoting phytochemicals of broccoli sprouts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 904–910.
- Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C. F. R. (2011). Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe Genisteae (Fabaceae). *Food and Chemical Toxicology*, 49(11), 2983–2989.
- Plikhtyak, L. H., Yartseva, I. V., Aleksandrova, L. G., Podkhalyuzina, N. Y., Preobrazhenskaya, M. N. (1992). Indole 3-hydroxymethylation and the synthesis of ascorbigens. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 25:420–422.

- Podsedeck, A. (2005). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 40(1), 1–11.
- Podsedeck, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 40(1), 1–11.
- Poiroux-Gonord, F., Bidel, L. P. R., Fanciullino, A. L., Gautier, H., Lauri-Lopez, F., Urban, L. (2010). Health benefits of vitamins and secondary metabolites of fruits and vegetables and prospects to increase their concentrations by agronomic approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12065–12082.
- Prasad, M. N. V. (2003). Phytoremediation of Metal-Polluted Ecosystems: Hype for Commercialization. *Russian Journal of Plant Physiology*, 50(5), 686–700.
- Prieto, M. A., Rodriguez-Amado, I., Vazquez, J. A., Murado, M. A. (2012). B-caroten Assay revisited. Application to Characterize and Quantify Antioxidant and Prooxidant Activities in Microplate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 8983-8993.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50, 586–621.
- Rakow, G. (2004) Species origin and economic importance of Brassica. In: E.C. Pua, D.J. Douglas (eds.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry 54: Brassica*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 3-11.
- Ray, P. D., Huang, B. W., Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981–990.
- Rock, K. L., Kono, H. (2008). The inflammatory response to cell death. *Annual Rev Pathol*, 3, 99–126.
- Sadi, G., Sadi, O. (2010). Antioxidants and Regulation of Antioxidant Enzymes by Cellular Redox Status, *Turkish Journal and Scientific Reviews* 3(2): 95-107.
- Saeidnia, S., Abdollahi, M. (2013). Antioxidants: Friends or foe in prevention or treatment of cancer: The debate of the century. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 271(1), 49–63.
- Sankhari, J. M., Thounaojam, M. C., Jadeja, R. N., Devkar, R. V., Ramachandran, a. V. (2012). Anthocyanin-rich red cabbage (*Brassica oleracea* L.) extract attenuates cardiac and hepatic oxidative stress in rats fed an atherogenic diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(April 2011), 1688–1693.
- Scalzo, R. L, Genna, a., Branca, F., Chedin, M., Chassaingne, H. (2008). Anthocyanin composition of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) and cabbage (*B. oleracea* L. var. capitata) and its stability in relation to thermal treatments. *Food Chemistry*, 107, 136–144.
- Sen, S., Chakraborty, R. (2011). The Role of Antioxidants in Human Health. *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*, 1083, 1–37. <http://doi.org/doi:10.1021/bk-2011-1083.ch001>
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820–897.
- Silva, B. M., Andrade, P. B., Valentão, P., Ferreres, F., Seabra, R. M., & Ferreira, M. A. (2004). Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: Antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4705–4712.

- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Sousa, C., Taveira, M., Valentão, P., Fernandes, F., Pereira, J. a., Estevinho, L., Bento, A., Ferreres, F., Seabra, R., Andrade, P. B. (2008). Inflorescences of Brassicacea species as source of bioactive compounds: A comparative study. *Food Chemistry*, 110, 953–961.
- Staparski, M. (2012). Hemijski sastav i antioksidantna aktivnost odabranih varijeteta vrste *Brassica oleracea* L. Diplomski rad, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija.
- Stoewsand, G. S. (1995). Bioactive organosulfur phytochemicals in Brassica oleracea vegetables - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 33(6), 537–543.
- Sun, T., Powers, J. R., Tang, J. (2007). Evaluation of the antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices. *Food Chemistry*, 105, 101–106.
- Šamec, D., Piljac-Žegarac, J., Bogović, M., Habjanič, K., Grúz, J. (2011). Antioxidant potency of white (*Brassica oleracea* L. var. capitata) and Chinese (*Brassica rapa* L. var. pekinensis (Lour.)) cabbage: The influence of development stage, cultivar choice and seed selection. *Scientia Horticulturae*, 128, 78–83.
- Tait, S. W. G., Ichim, G., Green, D. R. (2014). Die another way--non-apoptotic mechanisms of cell death. *Journal of Cell Science*, 127, 2135–44.
- Terpinc, P., Bezjak, M., Abramović, H. (2009). A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. *Food Chemistry*, 115(2), 740–744.
- Thompson, M. D., Thompson, H. J. (2010). Botanical diversity in vegetable and fruit intake: Potential health benefits. U: Watson, R. R., Preedy, V. R. (ur.) *Bioactive Foods in Promoting Health*. San Diego, USA: Elsevier, str 1-17.
- Tiwari, U., Cummins, E. (2013). Factors influencing levels of phytochemicals in selected fruit and vegetables during pre- and post-harvest food processing operations. *Food Research International*, 50, 497–506.
- Tsujimoto, Y., Shimizu, S. (2005). Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death and Differentiation*, 12, 1528–1534.
- U, N. 1935. Genomic analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany*, 7, 389-452.
- Uribarri, J., Woodruff, S., Goodman, S., Cai, W., Chen, X., Pyzik, R., Yong, A., Striker, G. E., Vlassara, H. (2010). Advanced Glycation End Products in Foods and a Practical Guide to Their Reduction in the Diet. *Journal of the American Dietetic Association*, 110(6), 911–916.
- Van Baarlen, P., Van Belkum, A., Summerbell, R. C., Crous, P. W., Thomma, B. P. H. J. (2007). Molecular mechanisms of pathogenicity: How do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps? *FEMS Microbiology Reviews*, 31(3), 239–277.
- Verhoeven, D. T. H., Verhagen, H., Goldbohm, R. A., Brandtb, P. a Van Den, Poppel, G. Van. (1997). A review of mechanisms underlying anticarcin ~ genicity by brassica vegetables. *Chemico-Biological Interactions*, 103, 79-129.
- Volčević, M. (2012). Antioksidantni potencijal odabraih varijeteta vrste *Brassica oleracea* L. Diplomski rad. Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija.

- Wagner, A. E., Terschluessen, A. M., Rimbach, G. (2013). Health promoting effects of brassica-derived phytochemicals: From chemopreventive and anti-inflammatory activities to epigenetic regulation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi.org/10.1155/2013/964539
- Wang, L., Bohn, T. (2011). Health-Promoting Food Ingredients and Functional Food Processing. In: J. Bouayed I T. Bohn (ur.) *Nutrition, Well-Being and Health*. InTeach, str. 201-225.. DOI: 10.5772/25862
- Warwick, S. I. (2011). In: R. Schmidt, I Bancroft (eds.). *Genetics and Genomics of the Brassicaceae.*, Plant Genetics and Genomic: Crops and Models 9 Springer, pp 33-65.
- Webb, G. P. (2011). *Natural Products and Extracts. U: Dietary Supplements and Functional Foods*, 2nd edition. Blackwell, Oxford, UK, str. 213-262.
- Wilson, J. W., Schurr, M. J., LeBlanc, C. L., Ramamurthy, R., Buchanan, K. L., Nickerson, C. A. (2002). Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgraduate Medical Journal*, 78(August 2008), 216–224.
- Wishart DS, Tzur D, Knox C, et al., 2007, HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Research*, 35:D521-6, URL: <http://www.hmdb.ca/structures/search/metabolites/mass>
- Wrolstad, R. E., Durst, R. W., Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 423–428.
- Young, J. E., Zhao, X., Carey, E. E., Welti, R., Yang, S. S., Wang, W. (2005). Phytochemical phenolics in organically grown vegetables. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49, 1136–1142.
- Younus, H., Anwar, S. (2016). Prevention of non-enzymatic glycosylation (glycation): Implication in the treatment of diabetic complication. *International Journal of Health Sciences*, 10(2). Retrieved from
- Zukalová, H., Vašák, J. (2002). The role and effects of glucosinolates of Brassica species – a review. *Rostlinná Výroba*, 48(4), 175–180.

8. PRILOG

Prilog 8.1. Spisak metoda korišćenih za analizu osnovne plodnosti zemljišta i određivanje sadržaja teških metala u zemljištu.

Analiza osnovne plodnosti zemljišta je izvršena pomoću sledećih validiranih metoda:

- ✓ pH vrednost u H₂O i KCl je određena potenciometrijskom metodom
- ✓ sadržaj CaCO₃ je određen volumetrijski pomoću Scheibler-ovog kalcimetra
- ✓ sadržaj lako pristupačnog kalijuma u zemljištu je određen AL-metodom za određivanje kalijuma po Enger Richm-u
- ✓ sadržaj lako pristupačnog fosfora je određen AL-metodom za određivanje fosfora po Enger Richm-u
- ✓ sadržaj humusa je određen metodom po Tjurinu uz fenilantranilnu kiselinu kao indikator, dok je sadržaj azota dobijen računskim putem, množenjem sadržaja humusa sa koeficijentom 0,066.

Sadržaj teških metala u zemljištu je određen plameno-jonizacionom tehnikom na atomskom apsorpcionom spektrofotometru kalibracijom sa tri standarda. Dobijene vrednosti predstavljaju apsolutne koncentracije izražene na suhu masu zemljišta.

Prilog 8.2. Opis lokacije i načina gajenja organskih proizvoda

Lokacija - Kisač katastarske parcele 610, 611, 612, 613, 615/1, u ukupnom iznosu 5,5 ha, koje pripadaju katastarskoj opštini Čenej. Sa svake strane parcele mora da postoji tampon zona od 3m kao izolacija. Zemljište koje se koristi u organskoj proizvodnji se redovno analizira na prisustvo teških metala i pesticida.

Proizvodnja- Za proizvodnju biljaka koristi se seme iz sopstvene proizvodnje i kupovno seme koje nije hemijskim putem tretirano i nije hibridno prema deklaraciji. Seme se seje na sterilnoj, kupovnoj zemlji (Klausman, nemački treset) u kontejnerima sa 66 otvora u toku maja i juna. Period vegetacije iznosi 30-40 dana, uz svakodnevno zalivanje i bez hemijskih tretmana i prihranjivanja. Sadnja rasada prema zakonu o organskoj proizvodnji se odvija korišćenjem sopstvene mehanizacija, apsolutno čiste. Operacije: ljuštenje strništa, uz povremenu primenu Baktofila- preparata koji podstiče bakterijsku razgradnju zeljišta, đubrenje kozjim đubrivom (50 prikolica od 2t na 7,5 ha), drljanje, priprema predsetve setvospremačem ili frezom, špartanje na 10 i 40 dana nakon rasađivanja, kopanje odmah posle setve umesto primene herbicida i po potrebi se koristi Robal-bioinsekticid protiv leptira i Fitokuprol- preparat bakra protiv plamenjače. Za prihranu se koriste ekološka sredstva Humusin ili Slavol, navodnjavanje se vrši iz dva bunara iskopana na parceli (dubine 30m). Za navodnjavanje se koristi voda I ili II kategorije čiji se kvalitet redovno proverava (podaci o analizama se nalaze u sertifikacionoj kući). Navodnjavanje se vrši putem tifona, orošavanjem i zalivanjem. Berba biljaka se vrši ručno i biljke slažu u prikolice, nakon čega idu u prodaju ili na dalju preradu.

Tabela 8.1. Opis ispitivanog biljnog materijala i brojevi vaučera.

Broj vaučera	Vrsta	Varijetet	Porodica	Lokalitet	Tip proizvodnje	Vreme berbe
2-1517	<i>Brassica oleracea</i> L. 1753	var. <i>gongylodes</i> l.c.	Brassicaceae	Srbija Kisač kultivisana UTM Code: CR 4 92	Stara sorta- organski	Novembar 2013.
2-1518	<i>Brassica oleracea</i> L. 1753	var. <i>italica</i> Plenck 1794 "Corvet"	Brassicaceae	Srbija Kisač kultivisana UTM Code: CR 4 92	Kultivisana vrsta- organski	Novembar .2013.
2-1519	<i>Brassica oleracea</i> L. 1753	var. <i>italica</i> Plenck 1794	Brassicaceae	Srbija Ruma kultivisana UTM Code: DQ 1 08	Kultivisana vrsta- konvencionalni	Novembar .2013.
2-1520	<i>Brassica oleracea</i> L. 1753	var. <i>botrytis</i> l.c. "Santa Maria"	Brassicaceae	Srbija Ruma kultivisana UTM Code: DQ 1 08	Stara sorta- konvencionalni	Novembar .2013.
2-1521	<i>Brassica oleracea</i> L. 1753	var. <i>botrytis</i> l.c. "Snowball"	Brassicaceae	Srbija Kisač kultivisana UTM Code: CR 4 92	Kultivisana vrsta- organski	Novembar .2013.
2-1522	<i>Brassica oleracea</i> L. 1753	var. <i>gongylodes</i> l.c.	Brassicaceae	Srbija Ruma kultivisana UTM Code: DQ 1 08	Stara sorta- konvencionalni	Novembar 2013.
2-1496	<i>Brassica oleracea</i> L. 1753	var. <i>italica</i> Plenck 1794	Brassicaceae	Srbija Kisač kultivisana UTM Code: CR 4 92	Kultivisana vrsta- organski	Decembar, 2015.
2-1495	<i>Brassica oleracea</i> L. 1753	var. <i>sabauda</i> L. 1753 "Premius"	Brassicaceae	Srbija Kisač kultivisana UTM Code: CR 4 92	Kultivisana vrsta- organski	Decembar, 2015.
2-1494	<i>Brassica rapa</i> L. 1753	subsp. <i>pekinensis</i> (Lour.) Kitam.1984	Brassicaceae	Srbija Kisač kultivisana UTM Code: CR 4 92	Kultivisana vrsta- organski	Novembar, 2013.
2-1493	<i>Brassica rapa</i> L. 1753	subsp. <i>pekinensis</i> (Lour.) Kitam.1984	Brassicaceae	Srbija Ruma kultivisana UTM Code: DQ 1 08	Kultivisana vrsta- konvencionalni	Novembar, 2013.
2-1492	<i>Brassica oleracea</i> L. 1753	var. <i>capitata</i> L. 1753 „Junior“	Brassicaceae	Srbija Kisač kultivisana UTM Code: CR 4 92	Kultivisana vrsta- organski	Novembar, 2013.

2-1491	<i>Brasica oleracea</i> L. 1753	var. <i>capitata</i> L. 1753 „Junior“	Brassicaceae	Srbija Ruma kultivisana UTM Code: DQ 1 08	Kultivisana vrsta- konvencionalni	Novembar, 2013.
2-1490	<i>Brasica oleracea</i> L. 1753	var. <i>rubra</i> L. 1753 „Reball“	Brassicaceae	Srbija Kisač kultivisana UTM Code: CR 4 92	Kultivisana vrsta- organski	Novembar, 2013.
2-1489	<i>Brasica oleracea</i> L. 1753	var. <i>rubra</i> L. 1753 „Reball“	Brassicaceae	Srbija Ruma kultivisana UTM Code: DQ 1 08	Kultivisana vrsta- konvencionalni	Novembar, 2013.
2-1488	<i>Brasica oleracea</i> L. 1753	var. <i>sabauda</i> L. 1753 „Premius“	Brassicaceae	Srbija Kisač kultivisana UTM Code: CR 4 92	Kultivisana vrsta- organski	Novembar, 2013.
2-1487	<i>Brasica oleracea</i> L. 1753	var. <i>sabauda</i> L. 1753 „Premius“	Brassicaceae	Srbija Ruma kultivisana UTM Code: DQ 1 08	Kultivisana vrsta- konvencionalni	Novembar, 2013.

Tabela 8.2. Zapremine sokova dobijene ceđenjem biljnog materijala i originalne koncentracije sokova izračunate na osnovu suvog ostaka nakon liofilizacije.

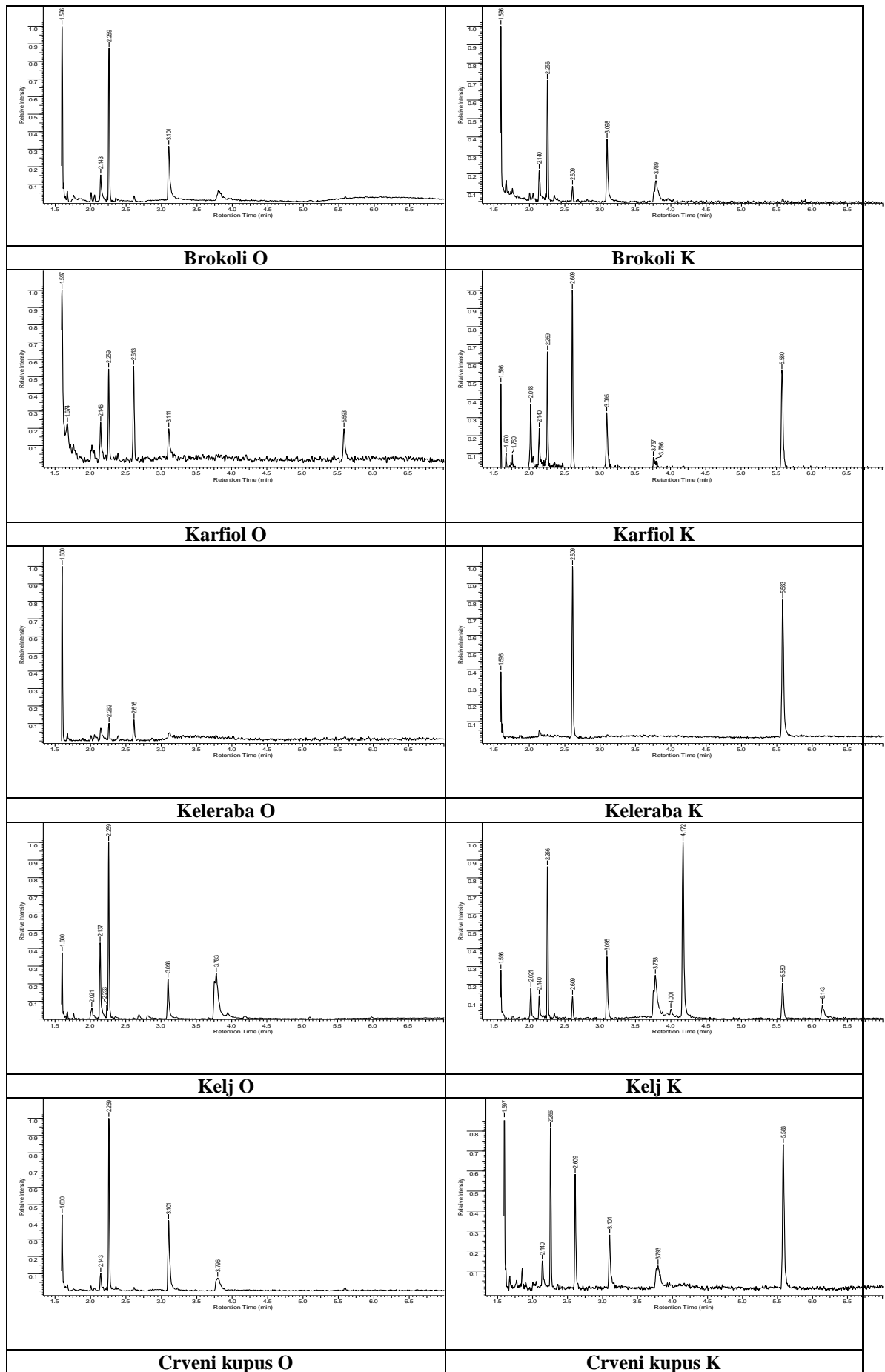
Varijetet	Masa svežeg biljnog materijala (g)	Zapremina dobijenog soka (ml)	Masa suvog ostatka nakon liofilizacije 75 ml soka (g)	Originalna koncentracija soka (m/V, mg/ml)
Brokoli O	400	200	4,81	64,13
Brokoli K	400	174	5,24	69,87
Karfiol O	400	175	4,34	57,88
Karfiol K	400	163	6,79	90,53
Keleraba O	350	141	5,30	70,67
Keleraba K	400	267	3,87	51,60
Kelj O	400	150	5,43	72,4
Kelj K	400	107	4,75*	79,17
Crveni kupus O	400	188	4,89	65,07
Crveni kupus K	400	211	5,74	76,00
Beli kupus O	400	225	5,01	66,80
Beli kupus K	400	198	4,60	61,33
Kineski kupus O	400	228	2,92	38,93
Kineski kupus K	400	256	3,11	41,47

* liofilizovano je 60 ml

Tabela 8.3. Prinos nakon liofilizacije 50 g svežeg biljnog materijala

Varijetet	Masa suvog ostatka nakon liofilizacije (g)	Prinos (%)
Brokoli O	2,97	5,94
Brokoli K	6,17	12,34
Karfiol O	3,9	7,80
Karfiol K	5,18	10,36
Keleraba O	3,82	7,64
Keleraba K	-	-
Kelj O	6,30	12,60
Kelj K	5,66	11,32
Crveni kupus O	4,88	9,76
Crveni kupus K	5,74	11,48
Beli kupus O	4,32	8,64
Beli kupus K	4,52	9,04
Kineski kupus O	2,60	5,20
Kineski kupus K	3,03	6,06

Tabela 8.4. GC-MS hromatogrami ispitivanih varijeteta.



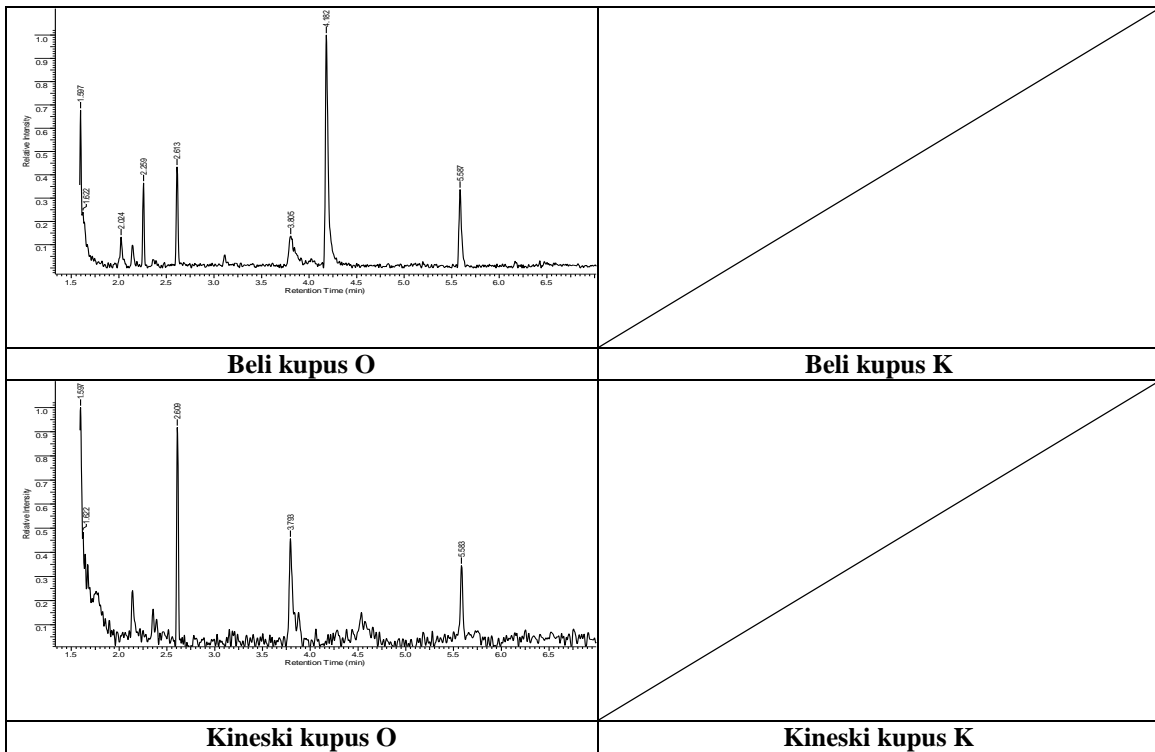
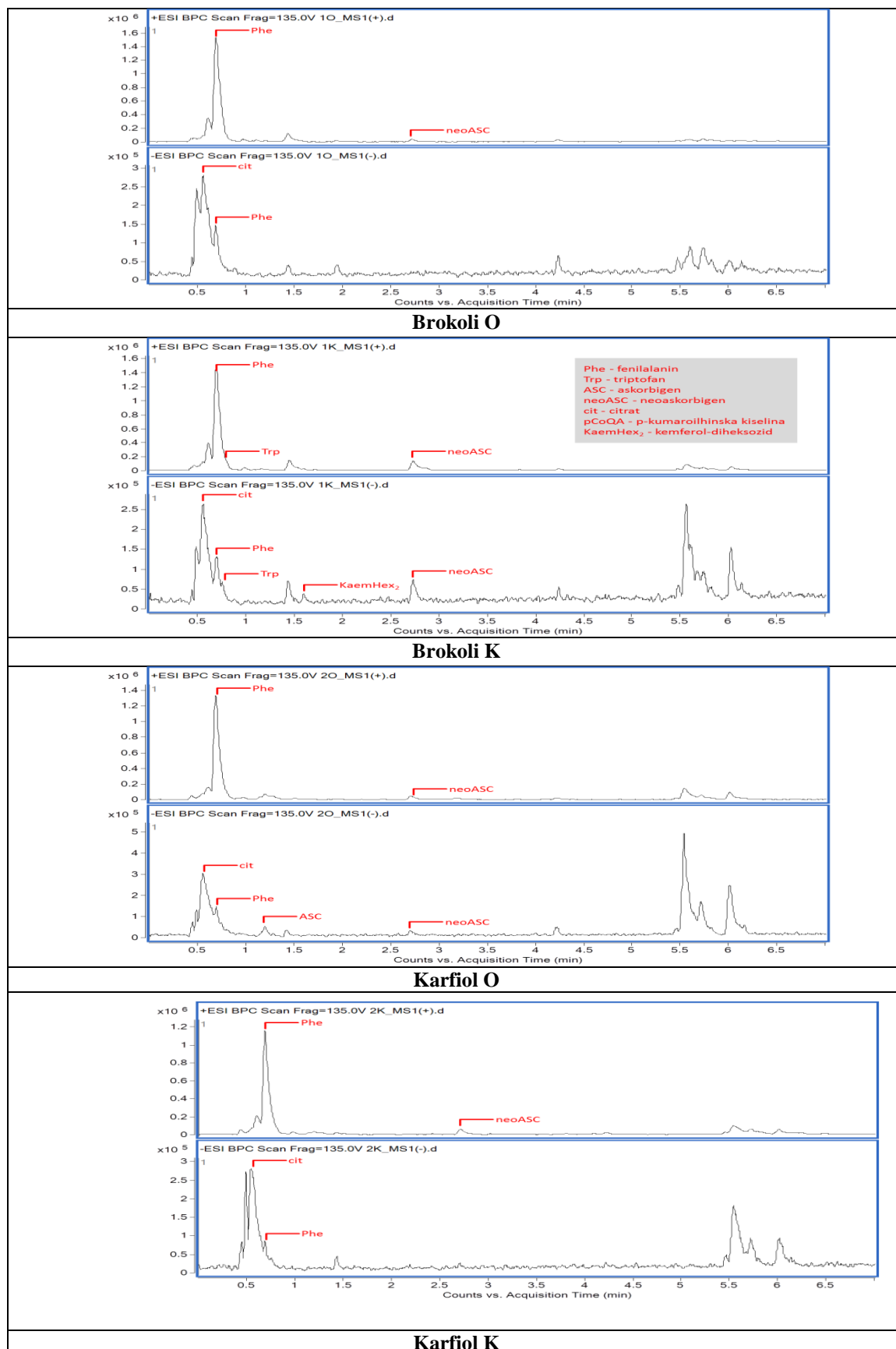
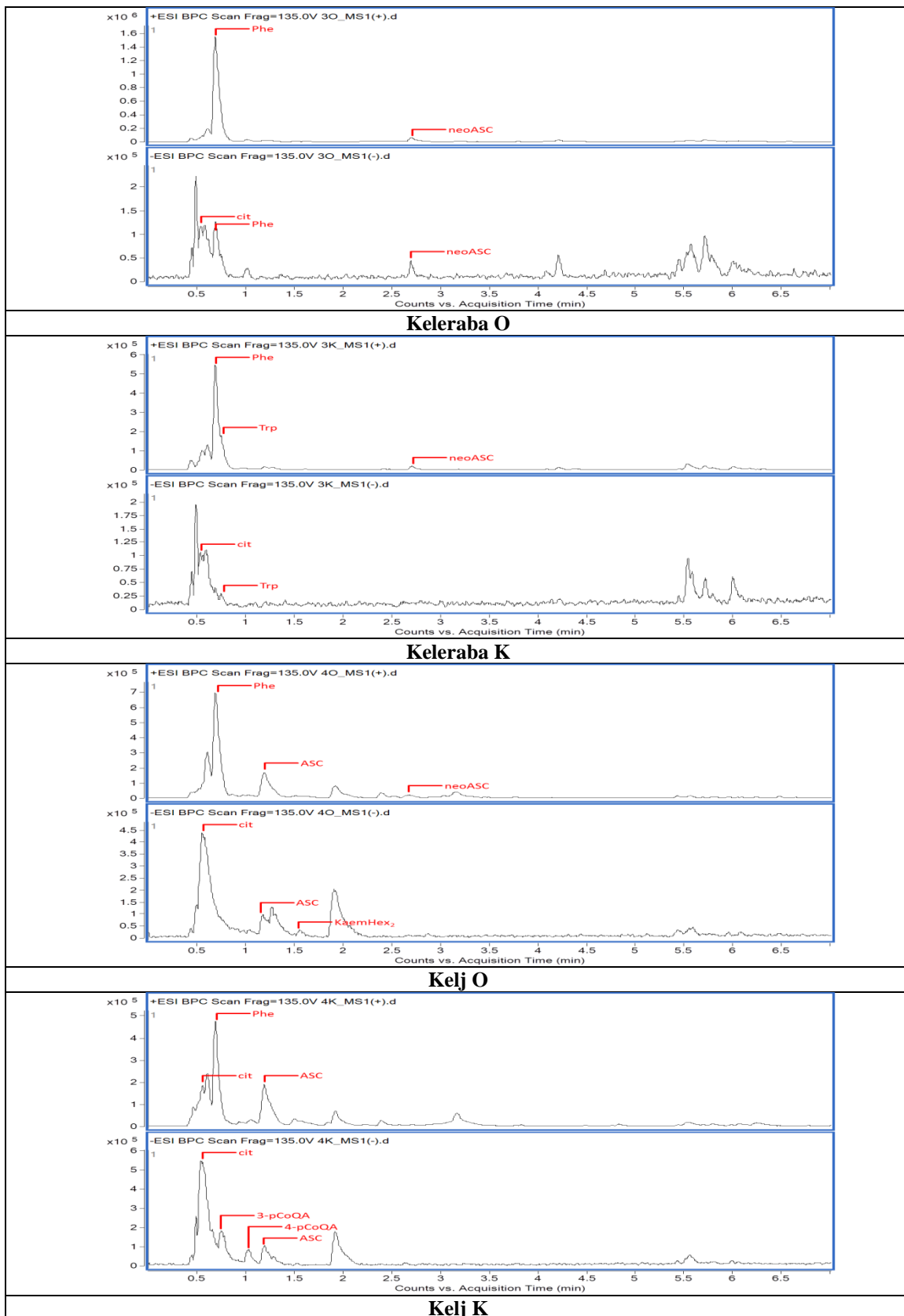
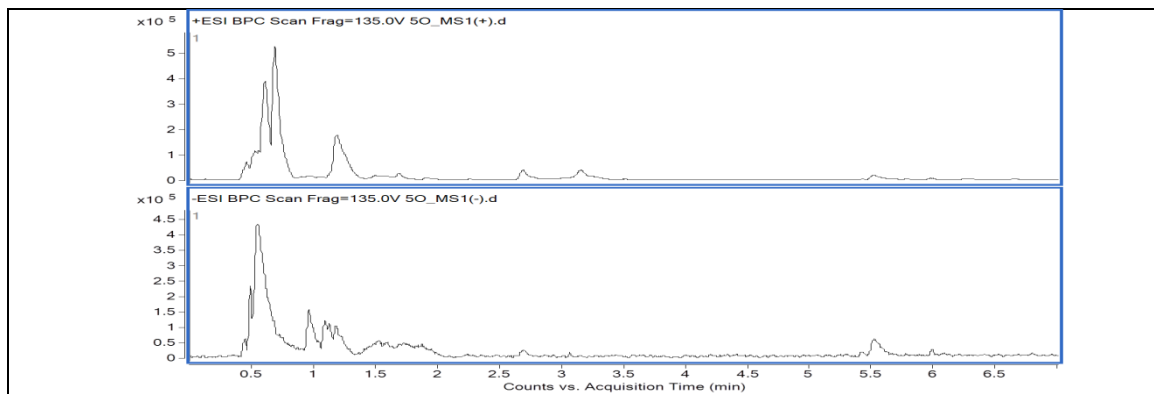
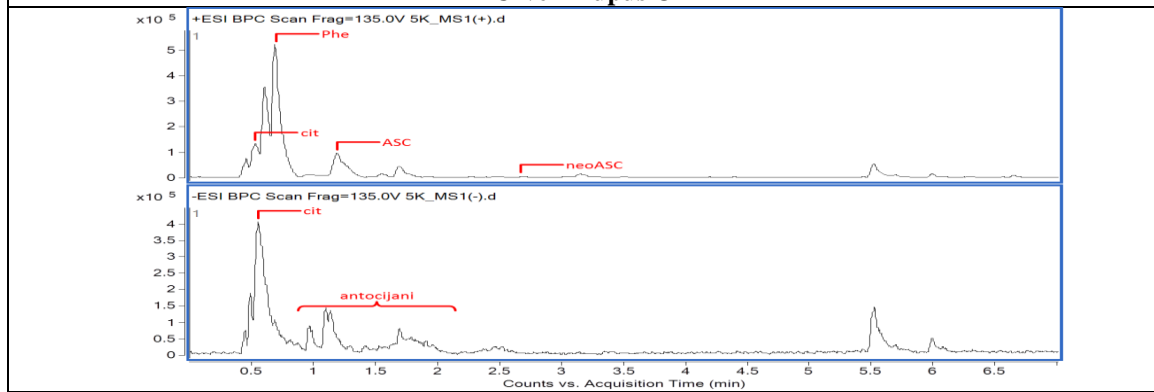
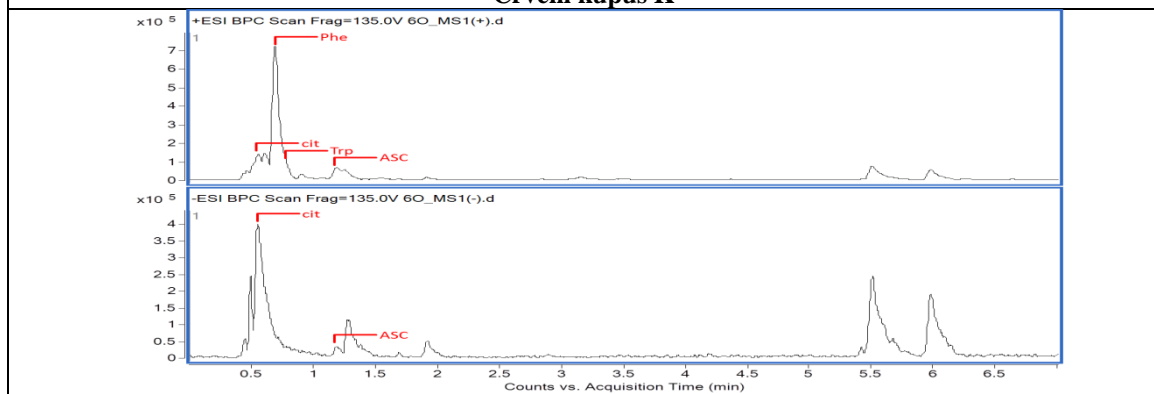
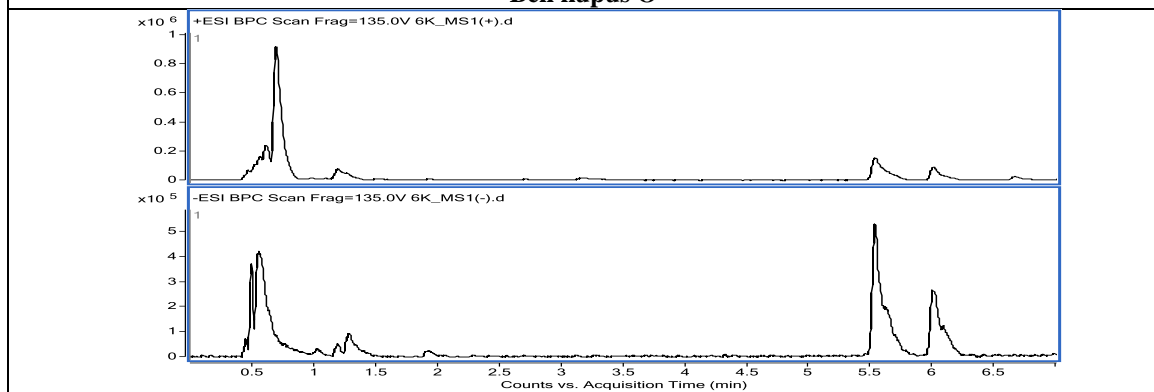
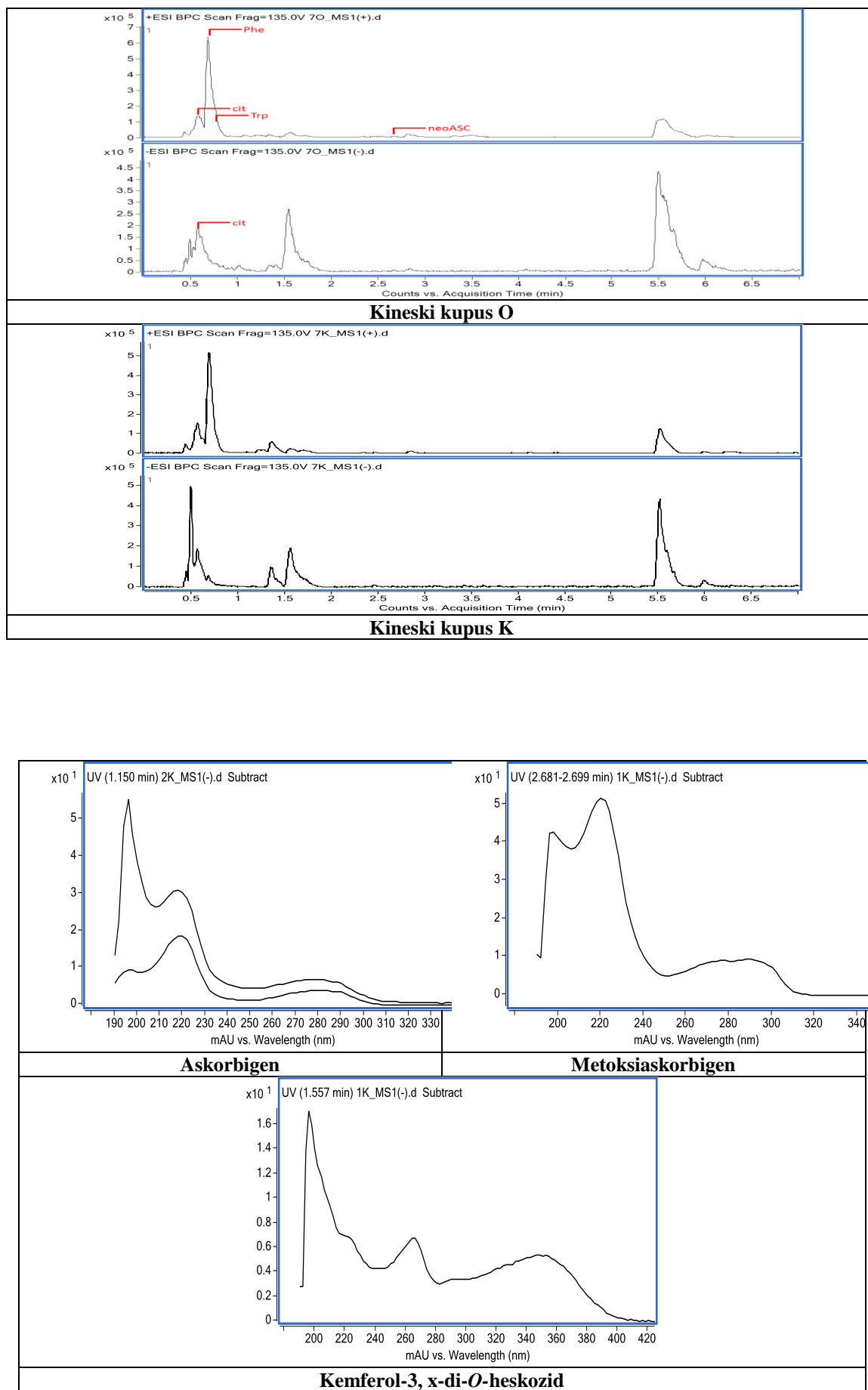


Tabela 8.5. BPC hromatogrami sokova ispitivanih vrsta.



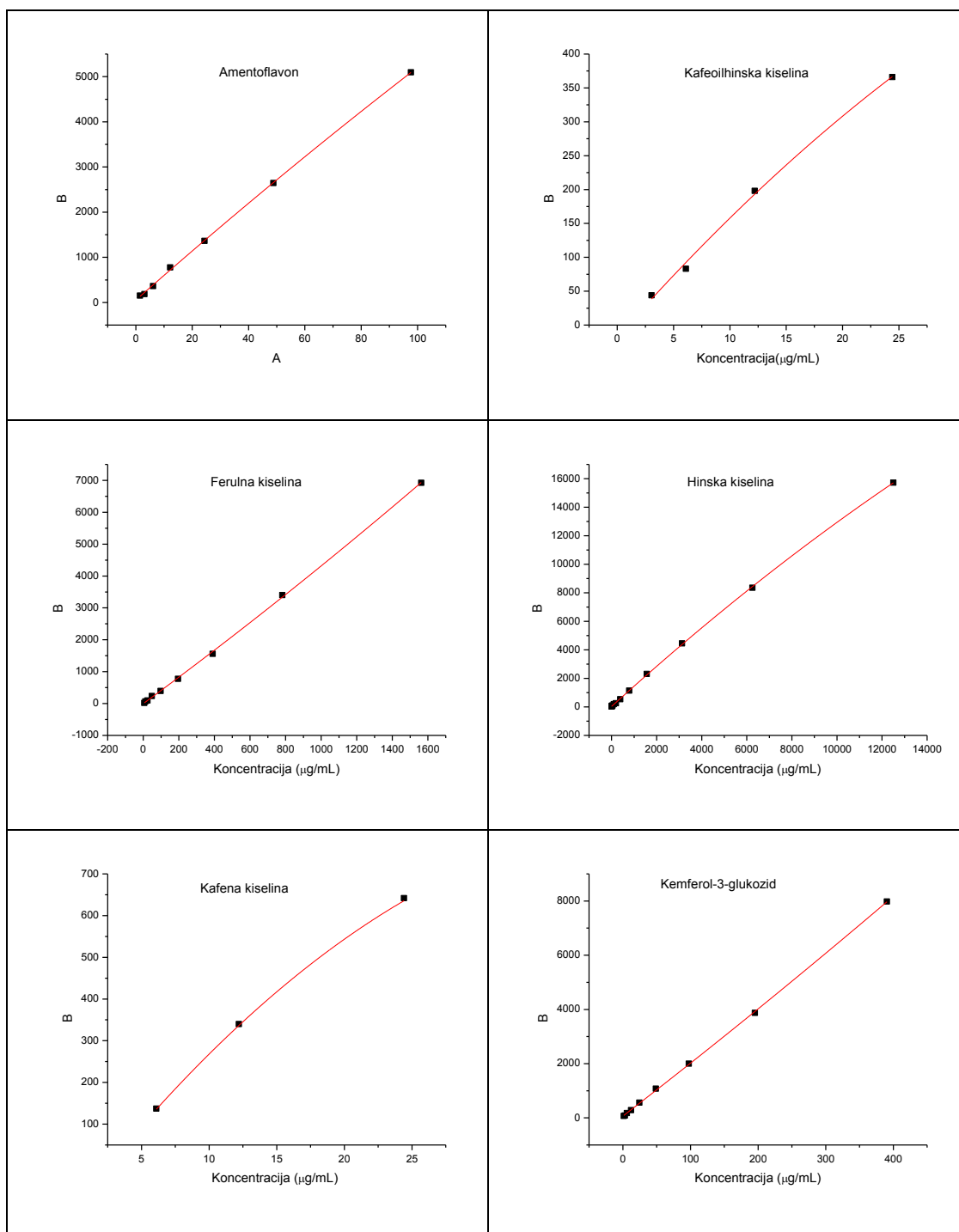


**Crveni kupus O****Crveni kupus K****Beli kupus O****Beli kupus K**



Slika 8.1. UV spektri pojedinih identifikovanih jedinjenja

Tabela 8.6. Kalibracione krive korišćene pri kvantifikaciji fenolnih jedinjenja.



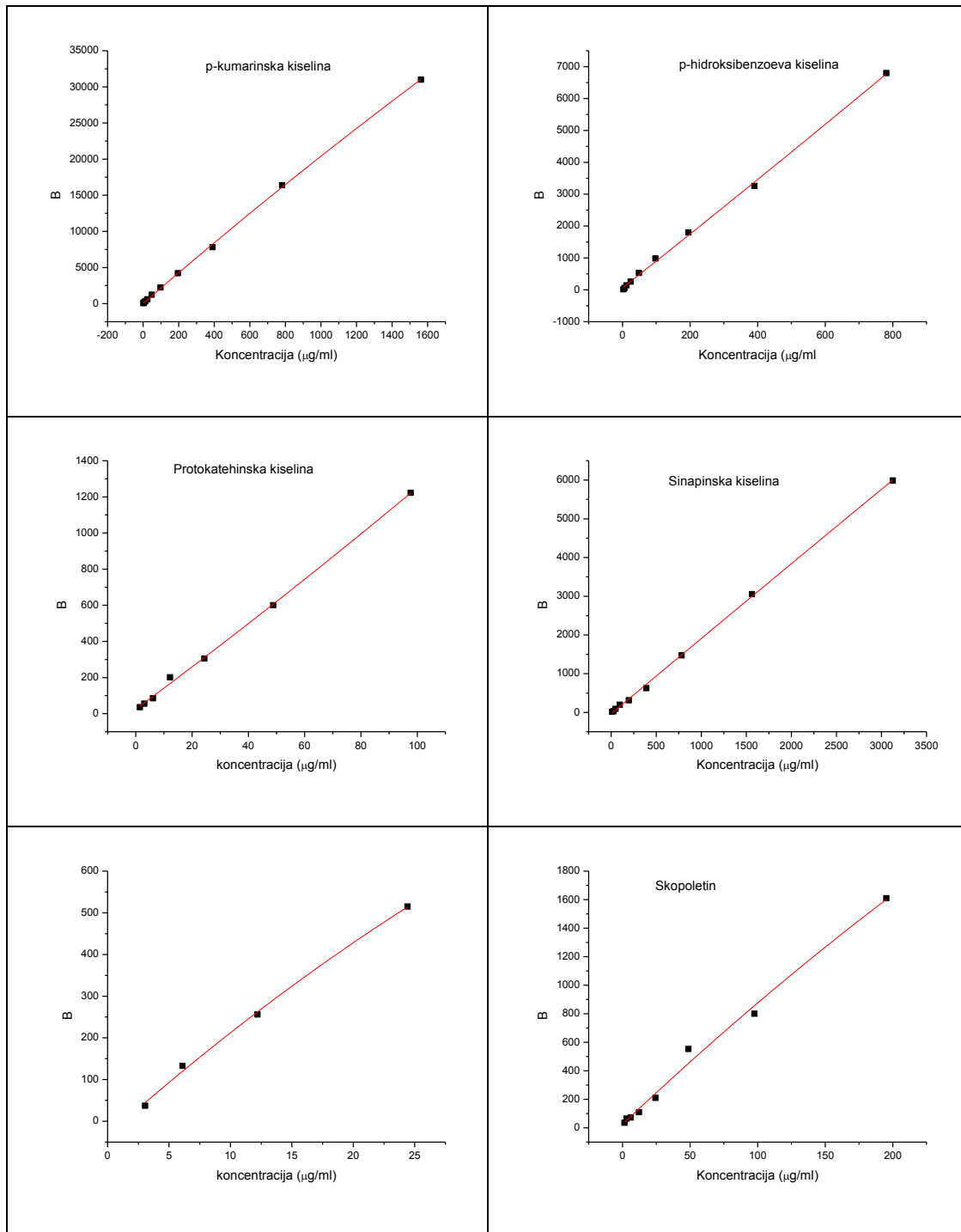
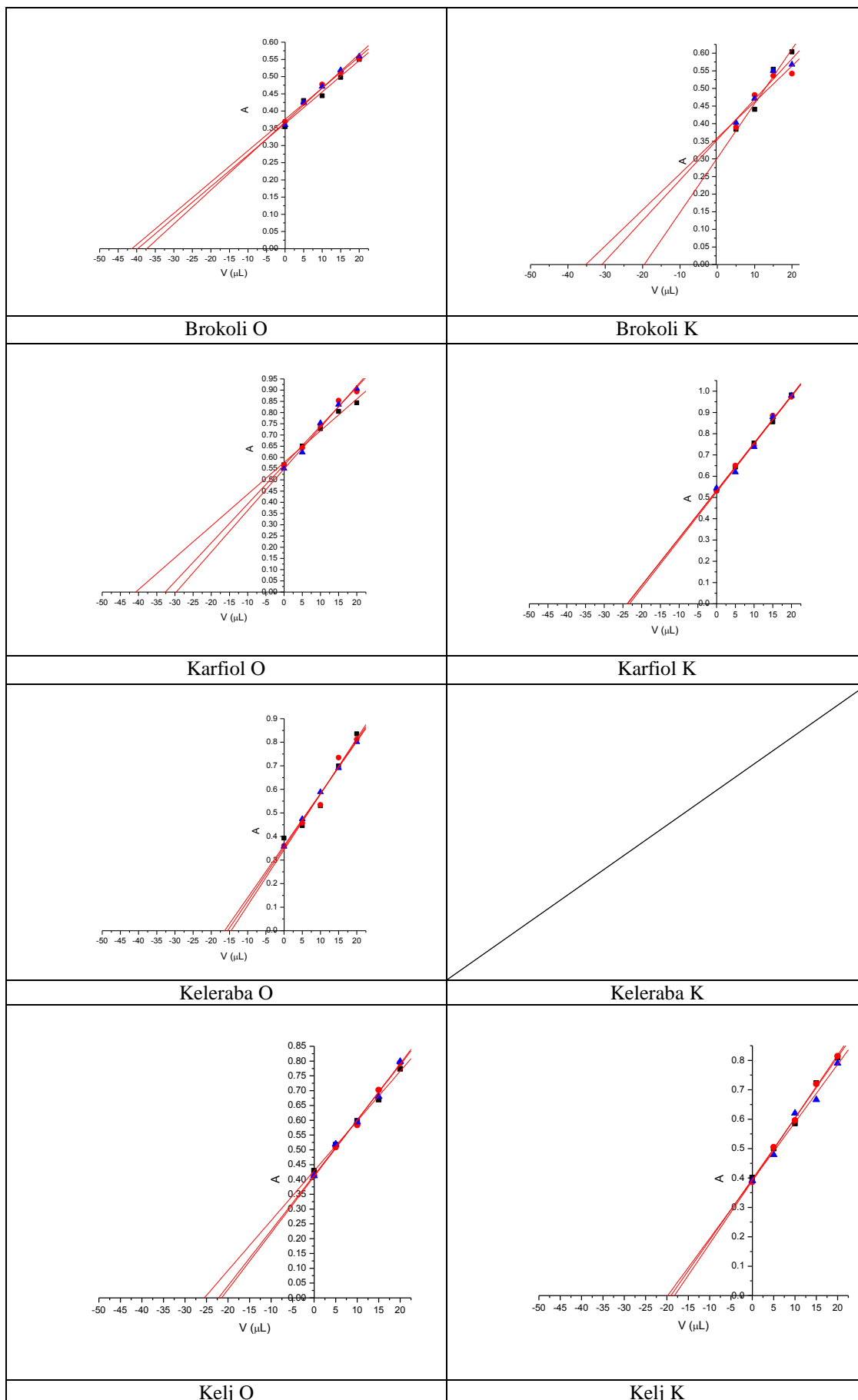


Tabela 8.7. Određivanje sadržaja ukupnih glukozinola metodom dodatka standarda (rastvor sinigrina).



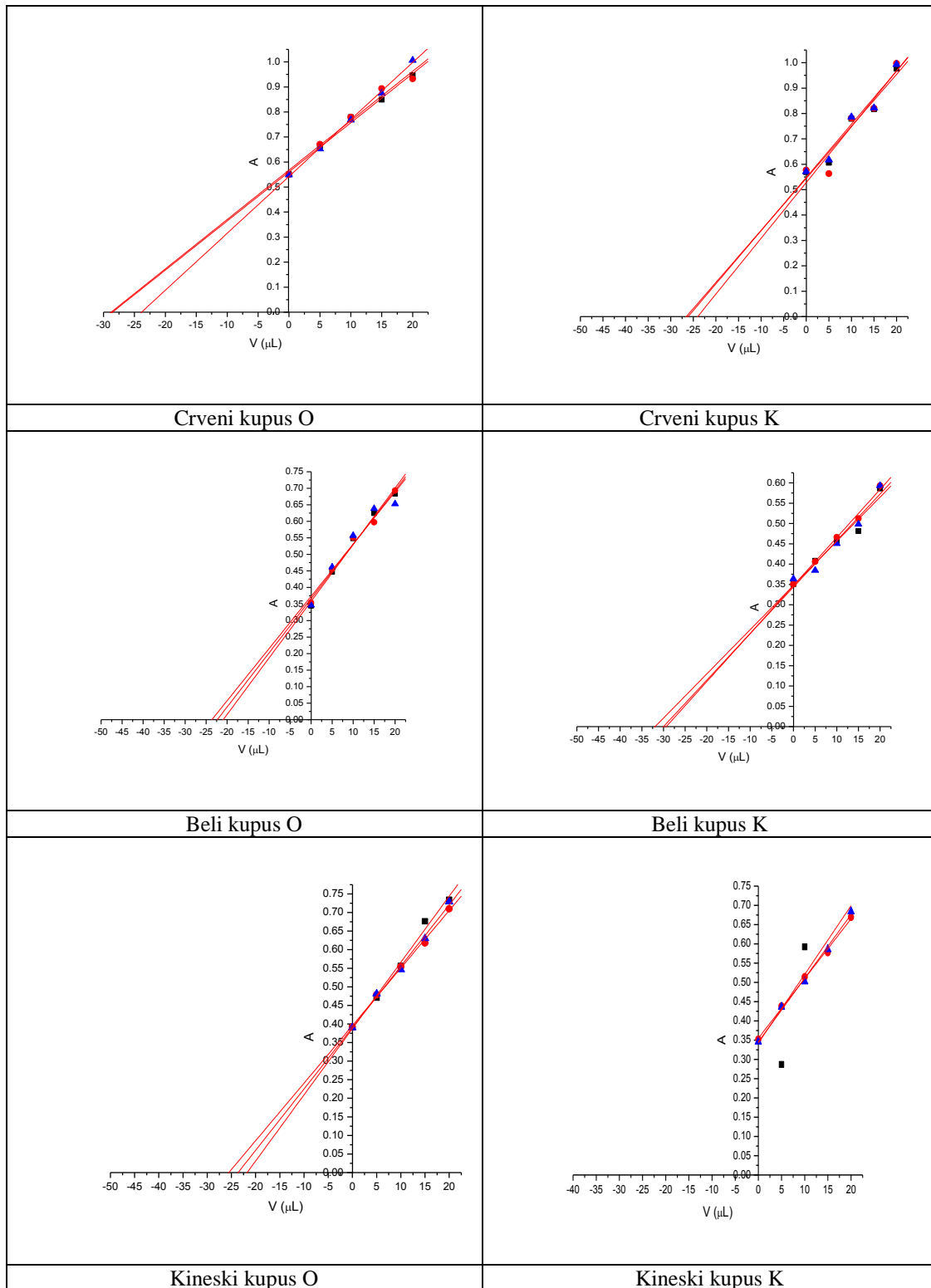


Tabela 8.8. Izračunate vrednosti sadržaja ukupnih glukozinolata u mmol SE/L; ekstrakta.

	V_1	V_2	V_3	n_1	n_2	n_3	C_1	C_2	C_3	C_{sr}	SD
		μl			mmol			mmol/ml		mmol SE/L	
Brokoli O	-39.75	-41.33	-37.29	0.00010	0.00010	0.00009	0.00497	0.00517	0.00466	4.93	0.25
Brokoli K	-19.56	-35.20	-30.91	0.00005	0.00009	0.00008	0.00245	0.00440	0.00386	3.93	0.38
Karfiol O	-40.81	-32.65	-29.65	0.00010	0.00008	0.00007	0.00510	0.00408	0.00371	4.30	0.72
Karfiol K	-23.91	-23.81	-23.27	0.00006	0.00006	0.00006	0.00299	0.00298	0.00291	2.96	0.04
Keleraba K	-15.52	-14.57	-16.37	0.00004	0.00004	0.00004	0.00194	0.00182	0.00205	1.94	0.11
Kelj O	-25.51	-21.48	-22.20	0.00006	0.00005	0.00006	0.00319	0.00269	0.00277	2.88	0.27
Kelj K	-19.08	-18.24	-19.83	0.00005	0.00005	0.00005	0.00239	0.00228	0.00248	2.38	0.10
Crveni kupus O	-28.56	-28.77	-23.85	0.00007	0.00007	0.00006	0.00357	0.00360	0.00298	3.38	0.35
Crveni kupus K	-26.56	-24.04	-26.15	0.00007	0.00006	0.00007	0.00332	0.00300	0.00327	3.20	0.17
Beli kupus O	-20.93	-22.35	-23.64	0.00005	0.00006	0.00006	0.00262	0.00279	0.00295	2.79	0.17
Beli kupus K	-31.93	-29.37	-30.00	0.00008	0.00007	0.00008	0.00399	0.00367	0.00375	3.80	0.17
Kineski kupus O	-21.74	-25.54	-23.62	0.00005	0.00006	0.00006	0.00272	0.00319	0.00295	2.95	0.24
Kineski kupus K	-34.59	-33.36	-29.79	0.00009	0.00008	0.00007	0.00432	0.00417	0.00372	4.07	0.31

V_1, V_2, V_3 - očitane zapremine sa grafika zavisnosti apsorbance od dodate zapremine standarda..

Tabela 8.9. Izmerene apsorbance i sadržaj ukupnih fenola izražen u mg ekvivalenata galne kiseline/L soka (mg GAE/L)

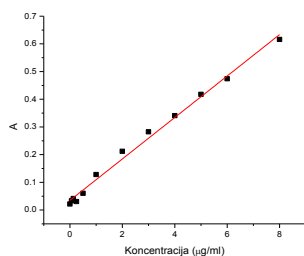
A ₁	A ₂	A ₃	Asr	(Asr-Akor)-(Asp-Akor)	C galne kis.	µgGA	µL/ml soka	µg GAE/ml	Sr. vredn.	SD
Brokoli O										
0.882	0.880	0.854	0.872	0.800	13.84	0.42	25	553.68		
0.550	0.523	0.510	0.517	0.445	7.80	0.23	12.5	623.73	661.33	53.17
0.323	0.317	0.306	0.315	0.243	4.37	0.13	6.25	698.92		
Brokoli K										
1.043	0.883	1.192	1.039	0.968	16.69	0.50	25	667.71		
0.654	0.648	0.633	0.645	0.574	9.99	0.30	12.5	798.89	718.68	70.31
0.319	0.312	0.313	0.314	0.240	4.31	0.13	6.25	689.43		
Karfiol O										
0.882	0.878	0.885	0.882	0.810	14.01	0.42	25	560.44		
0.492	0.587	0.524	0.508	0.436	7.65	0.23	12.5	611.97	627.79	76.50
0.322	0.325	0.312	0.320	0.248	4.44	0.13	6.25	710.97		
Karfiol K										
0.999	1.018	0.957	0.978	0.906	15.65	0.47	25	625.94		
0.631	0.616	0.607	0.612	0.540	9.41	0.28	12.5	753.06	743.92	113.69
0.359	0.384	0.065	0.372	0.300	5.33	0.16	6.25	852.77		
Keleraba O										
0.706	0.694	0.666	0.689	0.617	10.73	0.32	25	429.18		
0.422	0.413	0.410	0.415	0.343	6.07	0.18	12.5	485.59	457.39	39.89
0.278	0.276	0.271	0.275	0.203	3.69	0.11	6.25	589.99		
Keleraba K										
0.548	0.529	0.516	0.531	0.460	8.05	0.24	25	321.87		
0.336	0.318	0.302	0.319	0.247	4.43	0.13	12.5	354.62	338.24	23.16
0.211	0.207	0.211	0.210	0.138	2.57	0.08	6.25	411.99		
Kelj O										
0.814	0.852	0.805	0.810	0.736	12.76	0.38	12.5	1020.63		
0.518	0.513	0.497	0.509	0.436	7.65	0.23	6.25	1224.16	1122.40	143.92
0.330	0.336	0.323	0.330	0.256	4.59	0.14	3.125	1468.95		
Kelj K										
0.796	0.768	0.775	0.780	0.707	12.25	0.37	12.5	979.95		
0.489	0.486	0.480	0.485	0.412	7.24	0.22	6.25	1157.71	1153.23	171.08
0.295	0.315	0.297	0.303	0.230	4.13	0.12	3.125	1322.03		
Crveni kupus O										
0.776	0.781	0.767	0.775	0.700	12.14	0.36	6.25	1942.90		
0.475	0.465	0.465	0.468	0.394	6.93	0.21	3.125	2217.55	2080.22	194.21
0.290	0.300	0.292	0.294	0.220	3.97	0.12	1.5625	2537.86		
Crveni kupus K										
0.754	0.724	0.767	0.748	0.674	11.69	0.35	6.25	1871.19		
0.470	0.453	0.448	0.457	0.383	6.74	0.20	3.125	2156.21	2015.86	142.56

0.274	0.260	0.206	0.247	0.172	3.16	0.09	1.5625	2020.17		
Beli kupus O										
0.318	0.324	0.311	0.318	0.243	4.36	0.13	3.125	1396.27		
0.135	0.132	0.141	0.136	0.061	1.27	0.04	0.78125	1624.15	1522.29	115.85
0.095	0.099	0.096	0.097	0.022	0.60	0.02	0.39062 5	1546.44		
Beli kupus K										
0.206	0.204	0.197	0.202	0.128	2.40	0.07	1.5625	1536.03		
0.110	0.111	0.111	0.111	0.036	0.84	0.03	0.78125	1077.04	1452.43	118.22
0.077	0.079	0.075	0.077	0.002	0.27	0.01	0.19531 3	1368.83		
Kineski kupus O										
0.701	0.702	0.642	0.682	0.609	10.58	0.32	25	423.39		
0.413	0.415	0.407	0.412	0.339	5.99	0.18	12.5	479.38	451.38	39.59
0.264	0.266	0.252	0.261	0.188	3.42	0.10	6.25	547.94		
Kineski kupus K										
0.571	0.561	0.537	0.556	0.483	8.45	0.25	25	338.13		
0.320	0.320	0.295	0.320	0.247	4.44	0.13	12.5	354.94	339.20	11.89
0.184	0.177	0.176	0.179	0.106	2.03	0.06	6.25	324.53		

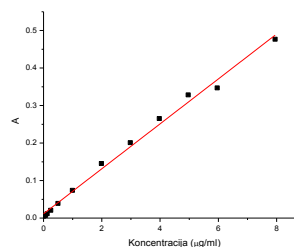
Tabela 8.10. Izmerene apsorbance i izračunate vrednosti sadržaja ukupnih flavonoida u sokovima vrsta *B. oleracea* i *B. rapa*.

C. soka (μ l/ml)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	μ g/ml kvercetin a	mg/L QE	Sr. vr.	SD
Brokoli O								
24.83	0.127	0.135	0.141	0.135	0.084	1.35418	54.53	
12.42	0.085	0.094	0.092	0.090	0.048	0.61589	49.60	52.06
6.21	0.077	0.081	0.077	0.078	0.036	0.41546	66.92	3.49
Brokoli K								
24.83	0.162	0.159	0.162	0.161	0.119	1.79359	72.22	
12.42	0.107	0.104	0.107	0.106	0.064	0.87883	70.78	71.69
6.21	0.081	0.080	0.080	0.080	0.038	0.44743	72.07	0.79
Karfiol O								
24.83	0.086	0.083	0.081	0.083	0.041	0.49628	19.98	
12.42	0.066	0.067	0.065	0.066	0.024	0.21226	17.09	17.59
6.21	0.059	0.058	0.060	0.059	0.017	0.09744	15.69	2.19
Karfiol K								
24.83	0.106	0.101	0.121	0.109	0.067	0.93135	37.50	
12.42	0.090	0.069	0.091	0.083	0.042	0.50056	40.31	38.22
6.21	0.073	0.057	0.071	0.067	0.025	0.22876	36.85	1.84
Keleraba O								
24.83	0.095	0.094	0.091	0.094	0.052	0.66958	26.96	
12.42	0.078	0.070	0.073	0.074	0.032	0.33792	27.21	27.09
6.21	0.067	0.065	0.067	0.067	0.025	0.21828	35.16	0.18
Keleraba K								
24.83	0.114	0.109	0.112	0.112	0.070	0.97184	39.13	
12.42	0.081	0.087	0.085	0.084	0.042	0.51026	41.09	41.65
6.21	0.068	0.077	0.065	0.070	0.028	0.27759	44.71	2.83
Kelj O								
12.42	0.101	0.111	0.103	0.105	0.063	0.85817	69.11	
6.21	0.078	0.076	0.077	0.077	0.035	0.39503	63.63	63.32
3.10	0.065	0.063	0.061	0.064	0.022	0.1776	57.21	5.96
Kelj K								
12.42	0.083	0.083	0.082	0.083	0.041	0.48541	39.09	
6.21	0.071	0.066	0.067	0.068	0.026	0.24418	39.33	39.21
3.10	0.078	0.052	0.068	0.060	0.018	0.10432	33.60	0.17
Crveni kupus O								
6.21	0.117	0.113	0.113	0.114	0.072	1.01563	163.58	
3.10	0.091	0.087	0.086	0.088	0.046	0.57945	186.66	175.12
1.55	0.074	0.078	0.076	0.076	0.034	0.37472	241.42	16.32
Crveni kupus K								

6.21	0.125	0.120	0.123	0.123	0.081	1.15643	186.26		
3.10	0.098	0.089	0.086	0.087	0.046	0.5675	182.81	180.36	7.43
1.55	0.072	0.061	0.067	0.069	0.028	0.267	172.02		
Beli kupus O									
12.42	0.079	0.076	0.062	0.073	0.031	0.31825	25.63		
6.21	0.079	0.068	0.072	0.073	0.031	0.32607	52.52	56.41	5.50
3.10	0.060	0.078	0.069	0.065	0.023	0.18717	60.29		
Beli kupus K									
12.42	0.074	0.073	0.073	0.073	0.031	0.33186	26.73		
6.21	0.058	0.057	0.055	0.057	0.015	0.05234	8.43	6.84	2.25
3.10	0.049	0.059	0.056	0.054	0.012	0.01628	5.24		
Kineski kupus O									
24.83	0.104	0.111	0.106	0.107	0.065	0.89575	36.07		
12.42	0.075	0.074	0.076	0.075	0.033	0.36247	29.19	33.99	3.22
6.21	0.067	0.066	0.066	0.067	0.025	0.21947	35.35		
Kineski kupus K									
24.83	0.106	0.103	0.110	0.106	0.064	0.87916	35.40		
12.42	0.080	0.080	0.084	0.081	0.039	0.46561	37.50	36.54	1.06
6.21	0.075	0.067	0.067	0.067	0.025	0.22803	36.73		



Galna kiselina



Kvercetin

Slika 8.2. Kalibracione krive za određivanje sadržaja ukupnih fenola i sadržaja ukupnih flavonoida.

Tabela 8.11.-8.13. Određivanje sadržaja monomernih antocijana

Izmerene vrednosti apsorbance na 510 nm

	pH=1					pH=4,5				
	A ₁	A ₂	A ₃	Asr ₅₁₀	Asr ₅₁₀ -dH ₂ O	A ₁	A ₂	A ₃	Asr ₅₁₀	Asr ₅₁₀ -dH ₂ O
Organski	0.2758392	0.296407	0.2912529	0.287833	0.245872	0.0814812	0.0772	0.078708	0.0791299	0.0371689
	0.5366405	0.552674	0.5440132	0.5444425	0.5024815	0.1421706	0.124268	0.125966	0.1308015	0.0888405
	1.1013544	1.04066	1.068675	1.0702299	1.0282689	0.2051205	0.198232	0.1923023	0.1985515	0.1565905
Konvencionalni	0.319782	0.333378	0.3199222	0.3243607	0.2858217	0.0976986	0.096679	0.0943619	0.0962465	0.0577075
	0.5719384	0.580081	0.5754115	0.5758104	0.5372714	0.1649209	0.170487	0.1685764	0.1679947	0.1294557
	1.099835	1.104325	1.1066749	1.1036116	1.0650726	0.2913663	0.293518	0.2994623	0.294782	0.256243
dH ₂ O	0.0426793	0.041536	0.0416679	0.0419611						
dH ₂ O	0.0381374	0.041862	0.0356169	0.0385388						

Izmerene vrednosti apsorbance na 700 nm.

	pH=1					pH=4,5				
	A ₁	A ₂	A ₃	Asr ₇₀₀	Asr ₇₀₀ -dH ₂ O	A ₁	A ₂	A ₃	Asr ₇₀₀	Asr ₇₀₀ -dH ₂ O
Organski	0.046067	0.05703	0.048717	0.050605	0.010465	0.051818	0.049355	0.05165	0.050941	0.010801
	0.054836	0.054685	0.05334	0.054287	0.014147	0.073437	0.058442	0.059231	0.063704	0.023564
	0.070909	0.064354	0.06084	0.065368	0.025228	0.081173	0.075927	0.073001	0.0767	0.03656
	0.052173	0.056782	0.050032	0.052996	0.015692	0.056925	0.053892	0.053382	0.054733	0.017429
Konvencionalni	0.057203	0.058501	0.057599	0.057767	0.020463	0.066601	0.067102	0.067767	0.067157	0.029853
	0.069802	0.069511	0.069639	0.069651	0.032347	0.090383	0.089707	0.095102	0.091731	0.054427
dH ₂ O	0.039828	0.042121	0.038472	0.04014						
dH ₂ O	0.037214	0.039802	0.034896	0.037304						

Izračunate vrednosti sadržaja monomernih antocijana Na osnovu razlika apsorbanci na 510 i 700 nm.

	$(A_{510}-A_{700})_{pH1}-(A_{510}-A_{700})_{pH4,5}$	DF	Sadržaj monomernih antocijana (mg/L)		SD
Organski	0.209	25	69.81		
	0.423	12.5	70.65	71.39	2.060978
	0.883	6.25	73.73		
Konvencionalni	0.230	25	76.76		
	0.417	12.5	69.67	71.94	4.184185
	0.831	6.25	69.38		

Određivanje antioksidantnog kapaciteta sokova

Tabela 8.14. Izmerene vrednosti apsorbance i izračunate vrednosti TEAC_{DPPH}.

A ₁	A ₂	A ₃	Asr	(A _K - Akor) - (Asr- Akor)	Ctroloks a (μl/ml)	C soka (μl/ml)	mmol TE/L soka	Sr.vr	SD
Brokoli O									
0.512	0.543	0.569	0.541	0.130	0.023	55.56	0.415		
0.586	0.580	0.581	0.582	0.090	0.016	27.78	0.593	0.504	0.126
0.676	0.674	0.662	0.671	0.001	0.002	13.89	0.156		
Brokoli K									
0.429	0.442	0.413	0.428	0.244	0.041	55.56	0.743	0.758	
0.518	0.575	0.561	0.551	0.120	0.021	27.78	0.772	0.758	0.020
0.561	0.588	0.597	0.582	0.090	0.016	13.89	1.185	0.978	
Karfiol O									
0.456	0.460	0.460	0.459	0.213	0.036	55.56	0.654		
0.550	0.573	0.566	0.563	0.109	0.020	27.78	0.704	0.651	0.054
0.621	0.630	0.648	0.633	0.039	0.008	13.89	0.595		
Karfiol K									
0.568	0.569	0.570	0.569	0.103	0.019	55.56	0.336		
0.586	0.581	0.578	0.582	0.090	0.017	27.78	0.595	0.357	0.030
0.634	0.660	0.662	0.652	0.020	0.005	13.89	0.378		
Keleraba O									
0.430	0.409	0.423	0.420	0.251	0.043	55.56	0.765		
0.563	0.545	0.550	0.553	0.119	0.021	27.78	0.764	0.698	0.116
0.630	0.624	0.654	0.636	0.036	0.008	13.89	0.564		
Keleraba K									
0.497	0.498	0.514	0.503	0.169	0.029	55.56	0.526		
0.586	0.597	0.604	0.596	0.076	0.014	27.78	0.514	0.520	0.008
0.654	0.649	0.652	0.652	0.020	0.005	13.89	0.377		
Kelj O									
					--				
0.420	0.499	0.452	0.457	0.215	0.037	55.56	0.660	0.616	
0.586	0.578	0.593	0.586	0.086	0.016	27.78	0.572	0.616	0.062
0.683	0.645	0.643	0.657	0.015	0.004	13.89	0.316		
Kelj K									
0.228	0.231	0.227	0.229	0.443	0.073	55.56	1.322		
0.387	0.371	0.378	0.378	0.293	0.049	27.78	1.774	1.431	0.154
0.542	0.557	0.555	0.552	0.120	0.021	13.89	1.540		
Crveni kupus O									
0.379	0.391	0.407	0.392	0.297	0.050	6.94	7.145		
0.549	0.529	0.548	0.542	0.147	0.025	3.47	7.237	7.446	0.443
0.610	0.605	0.621	0.612	0.078	0.014	1.74	7.955		

Crveni kupus K					--				
0.290	0.291	0.291	0.291	0.399	0.066	6.94	9.527		
0.463	0.474	0.476	0.471	0.219	0.037	3.47	10.587	10.458	0.874
0.561	0.570	0.599	0.576	0.113	0.020	1.74	11.261		
Beli kupus O					-				
0.330	0.285	0.342	0.319	0.370	0.062	27.78	2.215		
0.435	0.457	0.449	0.447	0.243	0.041	13.89	2.931	2.980	0.069
0.568	0.569	0.565	0.567	0.122	0.021	6.94	3.028		
Beli kupus K									
0.215	0.210	0.234	0.220	0.470	0.078	27.78	2.800		
0.461	0.380	0.421	0.421	0.269	0.045	13.89	3.236	3.087	0.249
0.559	0.554	0.565	0.559	0.131	0.022	6.94	3.224		
Kineski kupus O									
0.289	0.302	0.365	0.319	0.371	0.062	27.78	2.218		
0.395	0.390	0.405	0.397	0.293	0.049	13.89	3.519	3.777	0.366
0.518	0.529	0.526	0.524	0.165	0.028	6.94	4.036		
Kineski kupus K									
0.347	0.346	0.353	0.349	0.341	0.057	27.78	2.043		
0.476	0.488	0.473	0.479	0.211	0.035	13.89	2.554	2.276	0.258
0.599	0.582	0.624	0.601	0.088	0.015	6.94	2.231		
Troloks									
mmol/ml	A ₁	A ₂	A ₃	Asr	(A _K -A _{Kor})- (A _{Tr} -A _{Kor})				
0.111111	0.071	0.071	0.072	0.071	0.649				
0.055556	0.292	0.328	0.317	0.313	0.407				
0.027778	0.582	0.589	0.589	0.587	0.133				
0.013889	0.655	0.666	0.678	0.667	0.053				
0.006944	0.686	0.700	0.682	0.689	0.031				
0	0.672	0.687	0.688	0.682	0.006				
K	0.675	0.678	0.675	0.676					

Tabela 8.15. Izmerene vrednosti apsorbance i izračunate vrednosti TEAC_{ABTS}

A ₁	A ₂	A ₃	Asr	(Ak-Akor)- (Asr-Akor)	CTroloksa (µl/ml)	C soka (µl/ml)	TEAC _{ABTS} (mmol TE/L)	Sr. vr.	SD
Brokoli O									
0.565	0.577	0.559	0.567	0.428	0.034	8.333	4.098		
0.770	0.754	0.757	0.760	0.234	0.017	4.167	4.1064	3.94	0.28
0.869	0.881	0.868	0.869	0.125	0.008	2.083	3.6192		
Brokoli K									
0.524	0.499	0.497	0.498	0.497	0.040	8.333	4.8288		
0.730	0.723	0.727	0.727	0.268	0.020	4.167	4.8192	4.55	0.47
0.856	0.864	0.859	0.860	0.134	0.008	2.083	4.0032		
Karfiol O									
0.345	0.360	0.382	0.353	0.642	0.053	8.333	6.3612		
0.641	0.637	0.633	0.637	0.358	0.028	4.167	6.7176	6.23	0.56
0.828	0.819	0.818	0.822	0.173	0.012	2.083	5.616		
Karfiol K									
0.276	0.333	0.301	0.288	0.706	0.059	8.333	7.0404		
0.596	0.613	0.605	0.604	0.390	0.031	4.167	7.4016	7.03	0.37
0.801	0.797	0.794	0.797	0.197	0.014	2.083	6.6528		
Keleraba O									
0.130	0.143	0.169	0.137	0.642	0.053	16.667	3.1758		
0.317	0.332	0.337	0.329	0.450	0.036	8.333	4.3488	4.24	0.16
0.532	0.544	0.567	0.548	0.231	0.017	4.167	4.1256		
Keleraba K									
0.278	0.286	0.288	0.284	0.495	0.040	16.667	2.4072		
0.491	0.489	0.509	0.496	0.282	0.022	8.333	2.5992	2.51	0.10
0.609	0.642	0.683	0.625	0.154	0.010	4.167	2.5104		
Kelj O									
0.573	0.622	0.568	0.570	0.424	0.034	8.333	4.0596		
0.740	0.714	0.723	0.726	0.269	0.020	4.167	4.836	4.86	0.04
0.842	0.831	0.844	0.839	0.155	0.010	2.083	4.8864		
Kelj K									
0.435	0.401	0.425	0.420	0.574	0.047	8.333	5.646		
0.667	0.663	0.678	0.669	0.325	0.025	4.167	6.0336	6.21	0.66
0.811	0.777	0.784	0.790	0.204	0.014	2.083	6.936		
Crveni kupus O									
0.331	0.447	0.331	0.370	0.409	0.033	2.083	15.6672		
0.526	0.536	0.542	0.535	0.244	0.018	1.042	17.5872	17.01	1.17
0.635	0.637	0.644	0.639	0.140	0.009	0.521	17.7792		
Crveni kupus K									
0.382	0.341	0.391	0.341	0.438	0.035	2.083	16.8864		

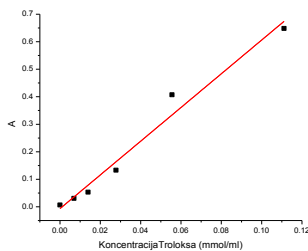
0.532	0.555	0.555	0.547	0.232	0.017	1.042	16.5504	16.72	0.24
0.722	0.757	0.692	0.707	0.072	0.003	0.521	6.3744		
Beli kupus O					--				
0.567	0.643	0.572	0.569	0.418	0.033	8.333	3.9996		
0.784	0.784	0.796	0.788	0.199	0.014	4.167	3.372	3.15	0.31
0.862	0.883	0.890	0.879	0.109	0.006	2.083	2.928		
Beli kupus K									
0.288	0.604	0.607	0.606	0.382	0.030	8.333	3.6168		
0.758	0.793	0.787	0.790	0.198	0.014	4.167	3.3336	3.48	0.20
0.897	0.890	0.895	0.894	0.094	0.005	2.083	2.2752		
Kineski kupus O									
0.153	0.176	0.097	0.165	0.614	0.051	16.667	3.0306		
0.264	0.254	0.270	0.262	0.516	0.042	8.333	5.04	5.78	1.05
0.435	0.427	0.437	0.433	0.346	0.027	4.167	6.5232		
Kineski kupus K									
0.194	0.182	0.188	0.188	0.591	0.048	16.667	2.9082		
0.398	0.385	0.396	0.393	0.386	0.031	8.333	3.678	3.64	0.05
0.576	0.574	0.567	0.572	0.206	0.015	4.167	3.6096		
Troloks									
mmol/ml	A ₁	A ₂	A ₃	Asr	(A _K -Akor)- (ATr-Akor)				
0.06667	0.046	0.047	0.049	0.047	0.940				
0.03333	0.198	0.209	0.214	0.207	0.781				
0.01667	0.478	0.549	0.528	0.539	0.449				
0.00833	0.746	0.752	0.788	0.749	0.239				
0.00417	0.861	0.855	0.862	0.859	0.128				
0.00208	0.914	0.905	0.089	0.909	0.078				
0.00104	0.937	0.947	0.927	0.937	0.051				
0.00052	0.935	0.934	0.929	0.933	0.055				
0.00000	0.980	0.984	0.999	0.988	0.007				
K	0.988	1.000	0.995	0.994					

Tabela 8.16. Očitane apsorbance i izračunate vrednosti za TEAC_{CUPRAC}

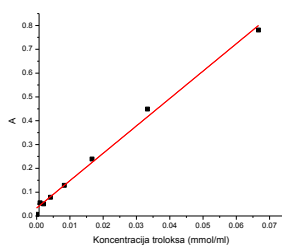
A1	A2	A3	Asr	(Ak-Akor)- (As-Akor)	Ctrolox μmol/ml	Csoka (μ/ml)	TEAC _{CUPRAC} (mmol TE/L)	Srednja vr.	SD
Brokoli O									
0.501	0.522	0.488	0.504	0.171	0.06499	33.53659	1.94		
0.301	0.302	0.303	0.302	-0.031	0.03092	16.76829	1.84	1.85	0.09
0.201	0.216	0.202	0.207	-0.126	0.01479	8.384146	1.76		
Brokoli K									
0.472	0.488	0.438	0.466	0.466	0.06994	16.76829	4.17		
0.368	0.318	0.312	0.333	0.258	0.03467	8.384146	4.14	3.97	0.33
0.232	0.214	0.204	0.217	0.142	0.01505	4.192073	3.59		
Karfiol O									
0.474	0.443	0.453	0.457	0.389	0.05681	33.53659	1.69		
0.310	0.285	0.280	0.291	0.223	0.02887	16.76829	1.72	1.72	0.02
0.213	0.208	0.200	0.207	0.139	0.01461	8.384146	1.74		
Karfiol K									
0.660	0.664	0.656	0.660	0.594	0.0916	33.53659	2.73		
0.391	0.373	0.378	0.381	0.315	0.04442	16.76829	2.65	2.74	
0.246	0.264	0.268	0.259	0.193	0.02384	8.384146	2.84		
Keleraba O									
0.437	0.462	0.441	0.446	0.446	0.05471	33.53659	1.63		
0.284	0.295	0.284	0.287	0.287	0.0278	16.76829	1.66	1.57	0.14
0.193	0.193	0.192	0.193	0.193	0.01182	8.384146	1.41		
Keleraba K									
0.392	0.398	0.380	0.390	0.321	0.04533	33.53659	1.35		
0.256	0.243	0.246	0.248	0.178	0.0213	16.76829	1.27	1.31	0.06
0.169	0.166	0.166	0.167	0.097	0.00759	8.384146	0.91		
Kelj O									
0.545	0.580	0.558	0.561	0.561	0.07371	33.53659	2.20		
0.375	0.367	0.340	0.361	0.361	0.03985	16.76829	2.38	2.39	0.20
0.252	0.259	0.252	0.254	0.254	0.02184	8.384146	2.60		
Kelj K									
0.504	0.470	0.464	0.479	0.411	0.06056	16.76829	3.61		
0.317	0.306	0.318	0.314	0.245	0.03257	8.384146	3.88	3.65	0.22
0.209	0.205	0.206	0.207	0.138	0.01444	4.192073	3.44		
Crveni kupus O									
0.804	0.829	0.817	0.817	0.746	0.11726	8.384146	13.99		
0.473	0.470	0.457	0.467	0.396	0.05809	4.192073	13.86	13.79	0.23
0.294	0.292	0.287	0.291	0.220	0.02837	2.096037	13.54		
Crveni kupus K									
1.263	1.277	1.267	1.269	1.200	0.19394	16.76829	11.57		
0.714	0.721	0.689	0.708	0.639	0.09907	8.384146	11.82	11.68	0.13

0.414	0.409	0.411	0.411	0.342	0.04893	4.192073	11.67		
Beli kupus O									
0.527	0.503	0.487	0.506	0.441	0.0657	33.53659	1.96		
0.301	0.305	0.279	0.295	0.230	0.03006	16.76829	1.79	1.88	0.12
0.190	0.194	0.186	0.190	0.125	0.01233	8.384146	1.47		
Beli kupus K									
0.565	0.563	0.569	0.566	0.494	0.07468	33.53659	2.23		
0.342	0.343	0.333	0.339	0.268	0.03639	16.76829	2.17	2.11	0.15
0.225	0.224	0.211	0.220	0.148	0.01622	8.384146	1.93		
Kineski kupus O									
0.682	0.622	0.570	0.625	0.547	0.08361	33.53659	2.49		
0.404	0.392	0.391	0.396	0.318	0.04493	16.76829	2.68	2.60	0.09
0.257	0.255	0.266	0.260	0.182	0.02191	8.384146	2.61		
Kineski kupus K									
0.525	0.482	0.502	0.503	0.435	0.06461	33.53659	1.93		
0.318	0.307	0.314	0.313	0.244	0.03245	16.76829	1.94	1.93	0.01
0.193	0.185	0.216	0.198	0.129	0.01296	8.384146	1.55		

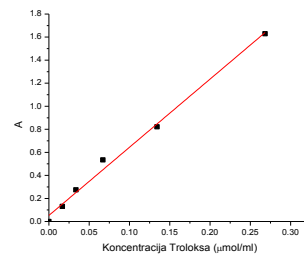
Troloks					
$\mu\text{mol/ml}$	A1	A2	A3	Asr	(Ak-Akor)- (Asr-Akor)
0.268	1.190	1.956	1.956	1.701	1.629
0.134	0.889	0.859	0.933	0.894	0.822
0.067	0.590	0.586	0.644	0.606	0.534
0.034	0.344	0.357	0.339	0.347	0.275
0.017	0.216	0.199	0.192	0.203	0.130
0.000	0.069	0.064	0.072	0.068	0.000



DPPH



ABTS



CUPRAC

Slika 8.3. Kalibracione krive konstruisane za ET testove pomoću standardnog jedinjenja (Troloks)

Tabela 8.17. Izmerene apsorbance i procenat inhibicije degradacije β -karotena određene pomoću mikro- β CB testa.

Csoka (ml/L)	A ₁	A ₂	A ₁ -A _{kor}	A ₂ -A _{kor}	I ₁ (%)	I ₂ (%)	I _{sr} (%)	SD
Brokoli O								
38,46	0.183	0.187	0.132	0.136	-63.05	-61.79	-62.42	0.89
19,23	0.178	0.179	0.127	0.128	-64.39	-64.22	-64.31	0.12
9,61	0.267	0.266	0.216	0.215	-37.95	-38.38	-38.16	0.30
4,80	0.422	0.441	0.371	0.390	8.10	13.86	10.98	4.07
2,40	0.545	0.542	0.494	0.491	44.92	43.86	44.39	0.75
Karfiol O								
38,46	0.163	0.165	0.112	0.114	-68.88	-68.34	-68.61	0.38
19,23	0.145	0.140	0.094	0.089	-74.44	-75.75	-75.09	0.93
9,61	0.152	0.152	0.101	0.101	-72.29	-72.33	-72.31	0.03
4,80	0.261	0.263	0.211	0.212	-39.63	-39.14	-39.39	0.34
2,40	0.425	0.410	0.374	0.360	8.99	4.77	6.88	2.98
Keleraba O								
38,46	0.236	0.228	0.185	0.177	-47.28	-49.50	-48.39	1.57
19,23	0.201	0.207	0.150	0.156	-57.72	-55.92	-56.82	1.28
9,61	0.248	0.250	0.197	0.199	-43.58	-42.94	-43.26	0.45
4,80	0.306	0.301	0.255	0.250	-26.39	-27.86	-27.12	1.04
2,40	0.411	0.417	0.360	0.366	4.97	6.59	5.78	1.15
Kelj O								
38,46	0.219	0.209	0.169	0.159	-52.14	-55.08	-53.61	2.08
19,23	0.155	0.146	0.104	0.095	-71.33	-73.92	-72.63	1.83
9,61	0.135	0.136	0.084	0.085	-77.31	-76.93	-77.12	0.27
4,80	0.237	0.232	0.186	0.181	-46.81	-48.34	-47.57	1.08
2,40	0.289	0.269	0.238	0.219	-31.34	-37.23	-34.28	4.17
Crveni kupus O								
38,46	0.570	0.556	0.519	0.505	52.18	48.09	50.13	2.89
19,23	0.553	0.546	0.502	0.495	47.19	45.08	46.13	1.49
9,61	0.533	0.532	0.482	0.481	41.15	41.06	41.11	0.07
4,80	0.518	0.488	0.467	0.437	36.85	27.95	32.40	6.29
2,40	0.436	0.462	0.385	0.411	12.34	20.04	16.19	5.44
Beli kupus O								
38,46	0.444	0.446	0.393	0.396	14.85	15.51	15.18	0.47
19,23	0.452	0.450	0.401	0.399	17.10	16.43	16.77	0.47
9,61	0.416	0.427	0.365	0.377	6.36	9.81	8.09	2.44
4,80	0.367	0.367	0.317	0.316	-8.03	-8.23	-8.13	0.14
2,40	0.349	0.349	0.299	0.299	-13.38	-13.39	-13.39	0.01
Kineski kupus O								
38,46	0.502	0.505	0.451	0.454	31.93	32.98	32.45	0.74

19,23	0.535	0.527	0.484	0.476	41.75	39.41	40.58	1.66
9,61	0.514	0.513	0.463	0.462	35.65	35.28	35.47	0.26
4,80	0.438	0.428	0.387	0.378	13.03	10.15	11.59	2.03
2,40	0.425	0.429	0.374	0.378	9.01	10.30	9.65	0.91
Brokoli K								
38,46	0.250	0.252	0.199	0.201	-43.06	-42.55	-42.81	0.36
19,23	0.196	0.197	0.145	0.146	-59.08	-58.84	-58.96	0.17
9,61	0.220	0.212	0.169	0.162	-52.04	-54.20	-53.12	1.52
4,80	0.302	0.304	0.251	0.254	-27.45	-26.79	-27.12	0.46
2,40	0.388	0.396	0.337	0.345	-2.02	0.35	-2.02	1.68
Karfiol K								
38,46	0.174	0.173	0.124	0.122	-65.53	-66.06	-65.80	0.38
19,23	0.175	0.168	0.124	0.118	-65.36	-67.31	-66.34	1.38
9,61	0.172	0.166	0.122	0.115	-66.15	-68.09	-67.12	1.37
4,80	0.227	0.229	0.177	0.178	-49.75	-49.40	-49.57	0.25
2,40	0.322	0.312	0.271	0.261	-21.55	-24.65	-23.10	2.19
Keleraba K								
38,46	0.305	0.290	0.254	0.239	-26.58	-31.22	-31.22	3.28
19,23	0.341	0.229	0.290	0.178	-15.93	-49.36	-49.36	23.64
9,61	0.309	0.259	0.259	0.208	-25.33	-40.45	-40.45	10.69
4,80	0.339	0.319	0.288	0.268	-16.49	-22.51	-22.51	4.25
2,40	0.453	0.374	0.403	0.323	17.59	-6.05	-6.05	16.72
Kelj K								
38,46	0.520	0.525	0.469	0.474	37.46	38.80	38.13	0.95
19,23	0.561	0.558	0.510	0.507	49.55	48.62	49.08	0.66
9,61	0.448	0.446	0.397	0.396	15.86	15.46	15.66	0.28
4,80	0.399	0.408	0.348	0.357	1.41	4.09	4.09	1.89
2,40	0.358	0.357	0.307	0.307	-10.84	-11.05	-10.94	0.15
Crveni kupus K								
38,46	0.541	0.547	0.490	0.496	43.62	45.34	44.48	1.21
19,23	0.585	0.595	0.534	0.544	56.86	59.64	58.25	1.96
9,61	0.561	0.568	0.510	0.517	49.64	51.60	50.62	1.39
4,80	0.503	0.500	0.452	0.449	32.33	31.50	31.91	0.59
2,40	0.457	0.457	0.406	0.406	18.52	18.54	18.53	0.01
Beli kupus K								
38,46	0.411	0.411	0.360	0.361	5.01	5.06	5.04	0.03
19,23	0.345	0.345	0.294	0.295	-14.83	-14.61	-14.72	0.16
9,61	0.360	0.355	0.309	0.304	-10.25	-11.73	-10.99	1.05
4,80	0.328	0.315	0.277	0.264	-19.76	-23.57	-21.66	2.69
2,40	0.300	0.290	0.249	0.254	-28.16	-26.76	-27.46	0.99
Kineski kupus K								
38,46	0.281	0.276	0.230	0.225	-33.81	-35.32	-34.56	1.06

19,23	0.344	0.322	0.293	0.271	-15.02	-21.52	-18.27	4.59
9,61	0.369	0.361	0.318	0.310	-7.67	-9.89	-8.78	1.57
4,80	0.348	0.317	0.297	0.266	-13.80	-23.13	-13.80	6.60
2,40	0.425	0.414	0.374	0.363	9.16	5.91	7.54	2.30
Ctroloksa μmol/L	Troloks							
76,92	0.695	0.693	0.644	0.642	89.45	88.95	89.20	0.35
38,46	0.684	0.681	0.633	0.630	86.31	85.38	85.85	0.66
19,23	0.652	0.649	0.601	0.598	76.63	75.81	76.22	0.58
9,62	0.625	0.611	0.574	0.561	68.64	64.62	66.63	2.85
4,80	0.601	0.604	0.551	0.553	61.66	62.45	62.05	0.56

Tabele 8.18-8.20 Izmerene apsorbance radne i slepe probe, kontrole i intenzitet apsorbanci radnih proba u odnosu na kontrolu pri praćenju brzine degradacije β -karotena

	A ₁	A ₂	A ₃	Asr	A ₁	A ₂	A ₃	Asr
	Crveni kupus O				Slepa proba			
Cs (μl/ml)	t=0							
38.46	0.781	0.799	0.795	0.792	0.085	0.097	0.088	0.088
19.23	0.805	0.787	0.806	0.799	0.087	0.086	0.091	
9.61	0.809	0.796	0.788	0.798	0.088	0.087	0.089	
4.8	0.787	0.774	0.767	0.776	0.090	0.089	0.087	
2.4	0.775	0.777	0.777	0.776	0.089	0.085	0.087	
	t=5							
38.46	0.772	0.788	0.776	0.779	0.065	0.079	0.066	0.068
19.23	0.795	0.768	0.784	0.782	0.064	0.067	0.071	
9.61	0.791	0.770	0.757	0.773	0.070	0.068	0.068	
4.8	0.752	0.726	0.711	0.730	0.070	0.070	0.065	
2.4	0.731	0.726	0.713	0.723	0.068	0.066	0.067	
	t=20							
38.46	0.745	0.752	0.747	0.748	0.055	0.066	0.048	0.053
19.23	0.765	0.737	0.752	0.751	0.050	0.050	0.055	
9.61	0.755	0.730	0.718	0.734	0.052	0.051	0.052	
4.8	0.694	0.663	0.651	0.669	0.057	0.051	0.049	
2.4	0.630	0.620	0.608	0.620	0.050	0.053	0.051	
	t=35							
38.46	0.700	0.713	0.708	0.707	0.055	0.066	0.048	0.053
19.23	0.724	0.681	0.712	0.705	0.050	0.050	0.055	
9.61	0.713	0.677	0.666	0.685	0.052	0.051	0.052	
4.8	0.654	0.612	0.592	0.619	0.057	0.051	0.049	
2.4	0.583	0.558	0.545	0.562	0.050	0.053	0.051	
	t=50							
38.46	0.689	0.686	0.685	0.687	0.055	0.067	0.049	0.052

19.23	0.714	0.677	0.698	0.696	0.051	0.051	0.055	
9.61	0.701	0.672	0.655	0.676	0.051	0.051	0.051	
4.8	0.644	0.599	0.575	0.606	0.057	0.052	0.042	
2.4	0.563	0.547	0.524	0.544	0.051	0.052	0.047	
t=65								
38.46	0.668	0.657	0.653	0.660	0.056	0.065	0.047	0.051
19.23	0.686	0.639	0.658	0.661	0.052	0.049	0.050	
9.61	0.667	0.637	0.605	0.636	0.051	0.049	0.049	
4.8	0.603	0.562	0.527	0.564	0.057	0.050	0.042	
2.4	0.529	0.507	0.473	0.503	0.050	0.050	0.043	
t=80								
38.46	0.628	0.620	0.605	0.618	0.056	0.063	0.049	0.051
19.23	0.659	0.598	0.602	0.619	0.051	0.050	0.051	
9.61	0.629	0.588	0.538	0.585	0.051	0.051	0.051	
4.8	0.563	0.509	0.464	0.512	0.053	0.052	0.044	
2.4	0.483	0.453	0.412	0.449	0.050	0.049	0.043	
t=95								
38.46	0.611	0.589	0.571	0.590	0.056	0.063	0.050	0.051
19.23	0.638	0.568	0.562	0.589	0.051	0.050	0.052	
9.61	0.605	0.555	0.519	0.560	0.051	0.051	0.052	
4.8	0.539	0.481	0.508	0.509	0.053	0.052	0.044	
2.4	0.458	0.426	0.446	0.443	0.051	0.050	0.043	
t=110								
38.46	0.594	0.570	0.556	0.573	0.056	0.065	0.051	0.051
19.23	0.620	0.553	0.546	0.573	0.052	0.051	0.052	
9.61	0.586	0.533	0.532	0.550	0.052	0.051	0.051	
4.8	0.518	0.455	0.488	0.487	0.053	0.051	0.041	
2.4	0.436	0.391	0.462	0.430	0.051	0.050	0.043	

t (min)	A1	A2	A3	Asr
Kontrole				
0	0.790	0.772	0.762	0.775
5	0.767	0.750	0.853	0.790
20	0.711	0.725	0.709	0.715
35	0.650	0.678	0.663	0.664
50	0.628	0.618	0.606	0.617
65	0.547	0.557	0.554	0.553
80	0.464	0.504	0.512	0.493
95	0.413	0.449	0.448	0.437
110	0.377	0.395	0.394	0.389

C soka (µl/ml)	Vreme (min)								
	0	5	20	35	50	65	80	95	110
38.46	0.792	0.779	0.748	0.707	0.687	0.660	0.618	0.590	0.573
19.23	0.799	0.782	0.751	0.705	0.696	0.661	0.619	0.589	0.573
9.61	0.798	0.773	0.734	0.685	0.676	0.636	0.585	0.560	0.550
4.8	0.776	0.730	0.669	0.619	0.606	0.564	0.512	0.509	0.487
2.4	0.776	0.723	0.620	0.562	0.544	0.503	0.449	0.443	0.430
K	0.775	0.790	0.715	0.664	0.617	0.553	0.493	0.437	0.389
sp	0.088	0.068	0.053	0.053	0.053	0.052	0.051	0.051	0.051
Asr-Asp									
38.46	0.704	0.710	0.695	0.654	0.634	0.608	0.567	0.539	0.522
19.23	0.711	0.714	0.698	0.652	0.643	0.609	0.569	0.538	0.522
9.61	0.709	0.704	0.681	0.632	0.623	0.584	0.534	0.508	0.499
4.8	0.688	0.661	0.616	0.566	0.553	0.512	0.461	0.458	0.436
2.4	0.688	0.655	0.566	0.509	0.491	0.451	0.399	0.392	0.378
K	0.686	0.722	0.662	0.610	0.564	0.501	0.443	0.385	0.338

Tabela 8.21. Uticaj sokova ispitivanih varijeteta na rast MCR-5 ćelija.

Radna C soka (ml/L)	A1	A2	A3	A4	Ksr	Vij1	Vij2	Vij3	Vij4	IC50 sr (ml/L)	SD	
Brokoli O O						% od K						
0.3125	1.674	1.676	1.752	1.727		106.45	106.57	111.41	109.82			
0.625	1.69	1.628	1.685	1.692		107.46	103.52	107.15	107.59			
1.25	1.502	1.495	1.516	1.546		95.51	95.06	96.4	98.31			
2.5	0.874	0.781	0.728	0.806		55.58	49.66	46.29	51.25			
5	0.457	0.436	0.478	0.513		29.06	27.72	30.4	32.62			
kontrola	1.54	1.555	1.619	1.56								
	1.565	1.589	1.581	1.572	1.573							
						IC50	2.776806	2.485577	2.324181	2.564103	2.54	0.19
Karfiol O												
0.3125	1.696	1.728	1.796	1.746		107.85	109.88	114.2	111.02			
0.625	1.738	1.686	1.813	1.798		110.52	107.21	115.28	114.33			
1.25	1.744	1.69	1.775	1.751		110.9	107.46	112.87	111.34			
2.5	1.554	1.527	1.599	1.662		98.82	97.1	101.68	105.68			
5	1.339	0.954	0.944	0.893		85.14	60.66	60.03	56.78			
kontrola	1.54	1.555	1.619	1.56								
	1.565	1.589	1.581	1.572	1.573							
Keleraba O												
0.3125	1.721	1.658	1.745	1.67		109.43	105.43	110.96	106.19			
0.625	1.72	1.665	1.698	1.561		109.37	105.87	107.97	99.26			
1.25	1.426	1.401	1.378	1.419		90.68	89.09	87.62	90.23			
2.5	0.81	0.657	0.723	0.773		51.51	41.78	45.97	49.15			
5	0.618	0.6	0.586	0.51		39.3	38.15	37.26	32.43			
kontrola	1.54	1.555	1.619	1.56								
	1.565	1.589	1.581	1.572	1.573							
						IC50	2.621204	1.901101	2.210849	2.45757	2.30	0.31

0.3125	1.581	1.68	1.611	1.428		100.53	106.83	102.44	90.8			
0.625	0.889	1.048	0.977	0.736		56.53	66.64	62.13	46.8			
1.25	0.27	0.203	0.196	0.204		17.17	12.91	12.46	12.97			
2.5	0.161	0.128	0.14	0.154		10.24	8.14	8.9	9.79			
5	0.185	0.176	0.181	0.179		11.76	11.19	11.51	11.38			
kontrola	1.54	1.555	1.619	1.56								
	1.565	1.589	1.581	1.572	1.573							
						IC50	0.663196	0.68863	0.669399	0.610128	0.66	0.03
Crveni kupus O												
0.3125	1.706	1.711	1.708	1.719		100.34	100.63	100.46	101.1			
0.625	1.729	1.691	1.786	1.77		101.69	99.46	105.04	104.1			
1.25	1.796	1.765	1.722	1.779		105.63	103.81	101.28	104.63			
2.5	1.285	1.135	1.082	1.208		75.58	66.75	63.64	71.05			
5		0.392		0.41			23.06		24.11			
kontrola	1.774	1.725	1.776	1.674								
	1.692	1.7	1.694	1.567	1.7							
						IC50	2.61481		2.654069	2.63		0.03
Beli kupus O												
0.3125	1.626	1.671	1.682	1.632		95.63	98.28	98.93	95.99			
0.625	1.748	1.747	1.775	1.773		102.81	102.75	104.4	104.28			
1.25	1.815	1.714	1.784	1.784		106.75	100.81	104.93	104.93			
2.5	1.349	1.291	1.32	1.246		79.34	75.93	77.64	73.28			
5	0.638	0.623	0.563	0.598		37.52	36.64	33.11	35.17			
kontrola	1.774	1.725	1.776	1.674								
	1.692	1.7	1.694	1.567	1.7							
						IC50	2.811895	2.883939	2.809857	2.739764	2.81	0.06
Kineski kupus O												
0.3125	1.8	1.772	1.805	1.886		105.87	104.22	106.16	110.92			

0.625	1.93	1.951	1.932	2.008		113.51	114.75	113.63	118.1			
1.25	2.01	1.984	1.901			118.22	116.69	111.81				
2.5	1.943	1.894	1.948	2.014		114.28	111.4	114.57	118.45			
5	1.353	1.107	1.098	1.288		79.58	65.11	64.58	75.75			
kontrola	1.774	1.725	1.776	1.674								
	1.692	1.7	1.694	1.567	1.7	IC50						
Brokoli K												
0.3125	1.753	1.722	1.751	1.866		103.1	101.28	102.98	109.75			
0.625	1.718	1.712	1.713	1.672		101.04	100.69	100.75	98.34			
1.25	1.422	1.123	1.002	1.069		83.63	66.05	58.93	62.87			
2.5	0.582	0.506	0.443	0.439		34.23	29.76	26.05	25.82			
5	0.345	0.321	0.357	0.28		20.29	18.88	21	16.47			
kontrola	1.774	1.725	1.776	1.674								
	1.692	1.7	1.694	1.567	1.7							
						IC50	1.884101	1.568741	1.391012	1.503952	1.59	0.21
Karfiol K												
0.3125	1.865	1.762	1.822	1.822		107.16	101.24	104.69	104.69			
0.625	1.699	1.813		1.845		97.62	104.17		106.01			
1.25	1.153	0.998	1.034	1.052		66.25	57.34	59.41	60.45			
2.5	0.714	0.623	0.669	0.696		41.03	35.8	38.44	39.99			
5	0.82	0.171	0.165	0.165		47.12	9.83	9.48	9.48			
kontrola	1.777	1.794	1.702	1.763								
	1.759	1.714	1.703	1.711	1.74							
						IC50	2.033822	1.552091	1.486929	1.714916	1.70	0.24
Keleraba K												
0.3125	1.66	1.736	1.761	1.827		95.38	99.75	101.19	104.98			
0.625	1.864	1.692	1.721	1.788		107.1	97.22	98.89	102.74			
1.25	1.685	1.657	1.711	1.704		96.82	95.21	98.31	97.91			

2.5	1.421	1.42	1.442	1.354		81.65	81.59	82.86	77.8
5	0.996			0.881		57.23			50.62
kontrola	1.777	1.794	1.702	1.763					
	1.759	1.714	1.703	1.711	1.74				

Kelj K

0.3125	1.775	1.78	1.792	1.829		101.99	102.28	102.97	105.09
0.625	1.745	1.743	1.786	1.863		100.27	100.15	102.62	107.05
1.25	1.494	1.404	1.385	1.399		85.84	80.67	79.58	80.38
2.5	0.6	0.385	0.432			34.48	22.12	24.82	0
5	0.215	0.193	0.184	0.182		12.35	11.09	10.57	10.46
kontrola	1.777	1.794	1.702	1.763					
	1.759	1.714	1.703	1.711	1.74				

Crveni kupus K

0.3125	1.795	1.8	1.764	1.89		103.14	103.43	101.36	108.6
0.625	1.87	1.84	1.836	1.943		107.45	105.72	105.49	111.64
1.25	1.817	1.817	1.765	1.84		104.4	104.4	101.41	105.72
2.5	1.707	1.643	1.609	1.768		98.08	94.4	92.45	101.59
5	0.887	0.908	0.907	0.861		50.97	52.17	52.12	49.47
kontrola	1.777	1.794	1.702	1.763					
	1.759	1.714	1.703	1.711	1.74				

Beli kupus K

0.3125	1.807	1.737	1.702	1.77		109.14	104.92	102.8	106.91
0.625	1.813	1.763	1.741	1.824		109.51	106.49	105.16	110.17
1.25	1.944	1.84	1.821	1.906		117.42	111.14	109.99	115.12
2.5	2.007	1.864	1.76			121.22	112.59	106.3	

5	1.869	1.627	1.572	1.558		112.89	98.27	94.95	94.1
kontrola	1.677	1.612	1.663	1.695					
	1.677	1.676	1.608	1.637	1.656				
Kineski kupus K									
0.3125	1.781	1.802	1.699	1.793		107.57	108.84	102.62	108.3
0.625	1.855	1.81	1.805	1.763		112.04	109.32	109.02	106.49
1.25	1.948	1.879	1.845	1.892		117.66	113.49	111.44	114.28
2.5	1.947	1.9	1.814	1.748		117.6	114.76	109.57	105.58
5	2.034	1.917	1.93	1.909		122.85	115.79	116.57	115.3
kontrola	1.677	1.612	1.663	1.695					
	1.677	1.676	1.608	1.637	1.656				

Tabela 8. 22. Uticaj sokova ispitivanih vrsta na rast limfoblasta Burkitt-ovog limfoma

Radna C (ml/L)	A1	A2	A3	A4	nema	Vij1	Vij2	Vij3	Vij4	IC50sr (ml/L)	SD
Brokoli O											
										% od K	
0,3215	1.623	1.607	1.599	1.551	320	92.82	91.9	91.44	88.7		
0,625	1.609	1.674	1.78	1.61	160	92.02	95.73	101.79	92.07		
1,25	1.347	1.439	1.716	1.388	80	77.03	82.29	98.13	79.38		
2,5	1.066	1.11	1.162	1.16	40	60.96	63.48	66.45	66.34		
5	1.027	2.332	0.926	0.92	20	58.73	133.36	52.96	52.61		
kontrola	1.789	1.859	1.769	1.527							
	1.744	1.686	1.824	1.791	1.749						
Karfiol O											
0,3215	1.701	1.678	1.562	1.695		97.28	95.96	89.33	96.93		

0,625	1.532	1.555	1.464	1.691		87.61	88.93	83.72	96.7			
1,25	1.48	1.387	1.453	1.377		84.64	79.32	83.09	78.75			
2,5	1.264	1.199	1.172	1.229		72.29	68.57	67.02	70.28			
5	0.985	1.032	0.984	1.034		56.33	59.02	56.27	59.13			
kontrola	1.789	1.859	1.769	1.527								
	1.744	1.686	1.824	1.791	1.749							
Keleraba O												
0,3215	1.692	1.659	1.839	1.681		96.76	94.87	105.17	96.13			
0,625	1.769	1.536	1.578	1.445		101.17	87.84	90.24	82.64			
1,25	1.35	1.274	1.105	0.948		77.2	72.86	63.19	54.21			
2,5	1.155	0.941	1.004	0.913		66.05	53.81	57.42	52.21			
5	0.882	0.907	0.769	0.788		50.44	51.87	43.98	45.06			
kontrola	1.789	1.859	1.769	1.527								
	1.744	1.686	1.824	1.791	1.749							
						IC50		3.180247	1.991671	2.59	0.84	
Kelj O												
FINAL C (ug/mL)						kontrola	1	2	3	4		
0,3215	1.532	1.564	1.556	1.501			87.61	89.44	88.98	85.84		
0,625	1.213	1.123	1.18	1.003			69.37	64.22	67.48	57.36		
1,25	0.835	0.681	0.787	0.713			47.75	38.94	45.01	40.77		
2,5	0.701	0.689	0.628	0.661			40.09	39.4	35.91	37.8		
5	0.65	0.705	0.584	0.69			37.17	40.32	33.4	39.46		
kontrola	1.789	1.859	1.769	1.527								
	1.744	1.686	1.824	1.791	1.749							
						IC50	1.124068	0.64479	1.00703	0.724874	0.88	0.23
Crveni kupus O												
0,3215	1.447	1.969	1.617	1.897			84.33	114.75	94.24	110.56		
0,625	1.762	1.66	2.029	1.758			102.69	96.74	118.25	102.46		

1,25	1.387	1.733	1.676	1.836		80.83	101	97.68	107
2,5	1.467	1.343	1.526	1.634		85.5	78.27	88.93	95.23
5	0.909	0.914	1.091	0.99		52.98	53.27	63.58	57.7
kontrola	1.798	1.606	1.647	1.695					
	1.654	1.857	1.705	1.765	1.716				
Beli kupus O									
0,3215	1.67	1.809	1.898	1.723		97.33	105.43	110.61	100.42
0,625	1.478	1.805	1.83	1.703		86.14	105.19	106.65	99.25
1,25	1.464	1.526	1.558	1.733		85.32	88.93	90.8	101
2,5	1.173	1.227	1.174	1.105		68.36	71.51	68.42	64.4
5	1.019	1.022	1.03	1.076		59.39	59.56	60.03	62.71
kontrola	1.798	1.606	1.647	1.695					
	1.654	1.857	1.705	1.765	1.716	IC50			
Kineski kupus O									
0,3215	1.778	1.67	1.721	1.641		103.62	97.33	100.3	95.64
0,625	1.612	1.448	1.451	1.568		93.95	84.39	84.56	91.38
1,25	1.741	1.688	1.68	1.407		101.46	98.38	97.91	82
2,5	1.287	1.486	1.38	1.291		75.01	86.6	80.43	75.24
5	1.152	1.199	1.286	1.128		67.14	69.88	74.95	65.74
kontrola	1.798	1.606	1.647	1.695					
	1.654	1.857	1.705	1.765	1.716	IC50			
Brokoli K									
0,3215	1.803	1.607	1.728	1.787		105.08	93.65	100.71	104.15
0,625	1.616	1.433	1.611	1.417		94.18	83.51	93.89	82.58
1,25	1.317	1.124	1.145	1.23		76.75	65.51	66.73	71.68
2,5	1.02	1.058	1.099	0.995		59.44	61.66	64.05	57.99
5	0.991	1.011	0.928	0.948		57.75	58.92	54.08	55.25
kontrola	1.798	1.606	1.647	1.695					

	1.654	1.857	1.705	1.765	1.716				
Karfiol K									
0,3215	1.49	1.238	1.477	1.483		82.18	68.28	81.47	81.8
0,625	1.112	1.146	1.339	1.222		61.33	63.21	73.86	67.4
1,25	1.049	1.018	1.187	1.138		57.86	56.15	65.47	62.77
2,5	1.049	1.117	1.124	1.106		57.86	61.61	62	61
5	1.029	0.961	1.042	1.264		56.76	53.01	57.47	69.72
kontrola	1.746	1.851	1.94	1.741					
	1.739	1.929	1.789	1.769	1.813				
Keleraba K									
0,3215	1.624	1.837	1.9	2.164		89.58	101.32	104.8	119.36
0,625	1.628	1.662	1.75	1.71		89.8	91.67	96.53	94.32
1,25	1.406	1.442	1.562	1.491		77.55	79.54	86.16	82.24
2,5	1.1	1.197	1.187	1.212		60.67	66.02	65.47	66.85
5	1.018	1.008	1.002	1.048		56.15	55.6	55.27	57.8
kontrola	1.746	1.851	1.94	1.741					
	1.739	1.929	1.789	1.769	1.813				
Kelj K									
0,3215	1.623	1.581	1.39	1.496		89.52	87.2	76.67	82.52
0,625	1.605	1.588	1.498	1.479		88.53	87.59	82.63	81.58
1,25	1.225	1.22	1.292	1.282		67.57	67.29	71.26	70.71
2,5	1.006	1.067	1.053	0.976		55.49	58.85	58.08	53.83
5	2.939	0.947	0.886	0.916			52.23	48.87	50.52
kontrola	1.746	1.851	1.94	1.741				4.484365	4.48
	1.739	1.929	1.789	1.769	1.813				
Cvreni kupus K									
0,3215	1.888	1.759	1.951	1.912		104.14	97.02	107.61	105.46
0,625	1.671	1.699	1.686	1.673		92.17	93.71	93	92.28

1,25	1.729	1.541	1.65	1.567		95.37	85	91.01	86.43
2,5	1.457	1.313	1.335	1.386		80.36	72.42	73.63	76.45
5	1.049	1.046	1.091	1.037		57.86	57.69	60.18	57.2
kontrola	1.746	1.851	1.94	1.741					
	1.739	1.929	1.789	1.769	1.813				
Beli kupus K									
0,3215	1.785	1.767	1.736	1.766		98.05	97.06	95.36	97.01
0,625	1.559	1.549	1.65	1.827		85.64	85.09	90.63	100.36
1,25	1.529	1.748	1.509	1.587		83.99	96.02	82.89	87.17
2,5	1.369	1.346	1.526	1.438		75.2	73.94	83.82	78.99
5	1.259	1.221	1.202	1.268		69.16	67.07	66.03	69.65
kontrola	1.982	1.901	1.718	1.832					
	1.783	1.749	1.773	1.826	1.821				
Kineski kupus K									
0,3215	1.669	1.6	1.657	1.875		91.68	87.89	91.02	102.99
0,625	1.63	1.627	1.71	1.7		89.54	89.37	93.93	93.38
1,25	1.91	1.837	2.009	1.611		104.92	100.91	110.35	88.49
2,5	1.358	1.323	1.271	1.271		74.59	72.67	69.82	69.82
5	1.123	1.231	1.216	1.226		61.69	67.62	66.79	67.34
kontrola	1.982	1.901	1.718	1.832					
	1.783	1.749	1.773	1.826	1.821				

Tabela 8.23. Uticaj sokova ispitivanih vrsta na rast ćelija adenokarcinoma debelog creva.

Radna koncentracija soka (ml/L)	A1	A2	A3	A4		Vij1	Vij2	Vij3	Vij4	IC50sr (ml/L)	SD
Brokoli O					% od K						
0.3125	3.18	3.248	2.933	3.333		103.72	105.94	95.66	108.71		
0.625	3.338	3.351	2.915	3.007		108.87	109.3	95.08	98.08		
1.25	3.082	3.248	3.326	3.21		100.52	105.94	108.48	104.7		
2.5	2.727	2.538	3.089	2.651		88.94	82.78	100.75	86.46		
5	3.215	1.348	1.489	1.567		104.86	43.97	48.56	51.11		
kontrola	3.041	3.356	3.017	3.095							
	3.071	3.253	3.063	2.632	3.066						
						IC50	4.396803	4.976139		4.69	0.41
Karfiol O											
0.3125	2.564	3.019	3.279	2.639		83.63	98.47	106.95	86.07		
0.625	3.255	2.972	0.051	2.574		106.16	96.93	1.66	83.95		
1.25	3.107	3.257	3.052	3.257		101.34	106.23	99.54	106.23		
2.5	3.149	3.069	2.985	3.212		102.71	100.1	97.36	104.76		
5	2.929	2.927	2.697	2.63		95.53	95.47	87.96	85.78		
kontrola	3.041	3.356	3.017	3.095							
	3.071	3.253	3.063	2.632	3.066						
Keleraba O											
0.3125	3.147	3.213	3.11	3.158		102.64	104.79	101.44	103		
0.625	3.227	2.749	2.96	2.749		105.25	89.66	96.54	89.66		
1.25	3.228	2.436	2.945	2.666		105.28	79.45	96.05	86.95		
2.5	1.53	1.612	1.888	1.939		49.9	52.58	61.58	63.24		
5	1.347	1.384	1.284	1.142		43.93	45.14	41.88	37.25		
kontrola	3.041	3.356	3.017	3.095							

	3.071	3.253	3.063	2.632	3.066						
Kelj O											
0.3125	2.776	3.083	2.61	2.734		90.54	100.55	85.13	89.17		
0.625	2.378	2.727	2.63	2.28		77.56	88.94	85.78	74.36		
1.25	1.236	1.341	1.499	1.218		40.31	43.74	48.89	39.73		
2.5	0.638	0.586	0.609	0.631		20.81	19.11	19.86	20.58		
5	0.652	0.804	0.678	0.781		21.27	26.22	22.11	25.47		
kontrola	3.041	3.356	3.017	3.095							
	3.071	3.253	3.063	2.632	3.066						
						IC50	0.999618	1.080336	1.247399	0.950385	1.07 0.13
Crveni kupus O											
0.3125	2.671	2.578	2.65	2.583		97.64	94.24	96.87	94.42		
0.625	2.709	2.449	2.773	2.748		99.03	89.52	101.37	100.45		
1.25	3.082	2.906	2.811	2.705		112.66	106.23	102.76	98.88		
2.5	2.382	2.52	2.638	2.703		87.07	92.12	96.43	98.81		
5	1.991	2.14	1.679	1.758		72.78	78.23	61.38	64.26		
kontrola	2.809	2.721	2.857	2.713							
	3.046	2.679	2.52	2.54	2.736						
Beli kupus O											
0.3125	2.598	2.608	2.397	2.551		94.97	95.33	87.62	93.25		
0.625	2.547	2.517	2.524	2.393		93.1	92.01	92.26	87.48		
1.25	2.962	2.991	3.049	2.617		108.28	109.34	111.46	95.66		
2.5	2.754	2.612	2.642	2.311		100.67	95.48	96.58	84.48		
5	1.816	1.627	1.703	1.298		66.38	59.47	62.25	47.45		
kontrola	2.809	2.721	2.857	2.713							
	3.046	2.679	2.52	2.54	2.736						
Kineski kupus O											
0.3125	2.767	2.924	2.684	2.85		101.15	106.89	98.11	104.18		

0.625	2.819	2.958	3.007	2.905		103.05	108.13	109.92	106.19			
1.25	3.225	2.895	2.775	3.011		117.89	105.83	101.44	110.07			
2.5	2.724	2.789	2.678	2.857		99.58	101.95	97.89	104.44			
5	2.54	2.803	2.594	2.736		92.85	102.46	94.82	100.01			
kontrola	2.809	2.721	2.857	2.713								
	3.046	2.679	2.52	2.54	2.736							
Brokoli K												
0.3125	2.469	2.461	2.545	2.602		90.25	89.96	93.03	95.12			
0.625	2.443	2.681	2.53	2.536		89.3	98	92.48	92.7			
1.25	2.337	2.508	2.302	2.33		85.43	91.68	84.15	85.17			
2.5	1.007	1.211	0.979	0.976		36.81	44.27	35.79	35.68			
5	1.071	1.092	1.262	1.037		39.15	39.92	46.13	37.91			
kontrola	2.809	2.721	2.857	2.713								
	3.046	2.679	2.52	2.54	2.736							
						IC50	1.366215	2.139939	1.354995	1.341499	1.55	0.39
Karfiol K												
0.3125	2.553	2.564	2.596	2.756		94.04	94.45	95.63	101.52			
0.625	2.427	2.687	2.808	2.732		89.4	98.98	103.43	100.64			
1.25	2.17	2.479	1.874	2.188		79.93	91.32	69.03	80.6			
2.5	1.013	0.933	0.892	1.036		37.31	34.37	32.86	38.16			
5	0.623	0.526	0.624	0.629		22.95	19.38	22.99	23.17			
kontrola	2.712	2.948	2.467	2.785								
	2.628	2.718	2.886	2.574	2.715							
						IC50	2	1.95812	2	2.024693	2.00	0.03
Keleraba K												
0.3125	1.988	2.126	2.093	2.125		73.23	78.31	77.1	78.28			
0.625	2.488	2.263	2.434	2.391		91.65	83.36	89.66	88.07			
1.25	2.244	2.184	2.403	1.925		82.66	80.45	88.52	70.91			

2.5	2.394	2.081	2.119	2.485		88.18	76.66	78.06	91.54			
5	1.36	1.301	1.351	1.17		50.1	47.92	49.77	43.1			
kontrola	2.712	2.948	2.467	2.785								
	2.628	2.718	2.886	2.574	2.715							
						IC50	4.845759	4.021184	4.939589	4.60	0.51	
Kelj K												
0.3125	2.529	2.796	2.808	2.807		93.16	102.99	103.43	103.4			
0.625	2.544	2.332	2.463	2.357		93.71	85.9	90.73	86.82			
1.25	2.777	2.787	2.898	2.576		102.29	102.66	106.75	94.89			
2.5	1.357	1.395	1.395	1.366		49.99	51.39	51.39	50.32			
5	0.801	0.814	0.789	0.788		29.51	29.98	29.06	29.03			
kontrola	2.712	2.948	2.467	2.785								
	2.628	2.718	2.886	2.574	2.715							
						IC50	2.512594	2.513163	2.508309	2.51	0.00	
Crveni kupus K												
0.3125	2.259	2.339	2.365	2.217		83.21	86.16	87.12	81.66			
0.625	2.477	2.354	2.492	2.331		91.24	86.71	91.79	85.86			
1.25	2.294	2.415	2.386	2.495		84.5	88.96	87.89	91.91			
2.5	2.293	2.344	2.297	2.32		84.46	86.34	84.61	85.46			
5	1.235	1.226	1.127	1.044		45.49	45.16	41.51	38.46			
kontrola	2.712	2.948	2.467	2.785								
	2.628	2.718	2.886	2.574	2.715							
						IC50	4.808964	3.780375	4.614952	3.482246	4.17	0.64
Beli kupus K												
0.3125	2.743	2.568	2.523	2.264		111.88	104.75	102.91	92.35			
0.625	2.523	2.578	2.53	2.347		102.91	105.15	103.2	95.73			
1.25	2.668	2.571	2.323	2.271		108.83	104.87	94.75	92.63			
2.5	2.92	2.72	2.719	2.748		119.1	110.95	110.91	112.09			

5	2.248	2.266	2.007	2.147		91.69	92.43	81.86	87.57
kontrola	3.05	2.81	2.584	2.452					
	2.501	2.271	2.064	1.881	2.452				
Kineski kupus K									
0.3125	2.505	2.333	2.406	2.433		102.18	95.16	98.14	99.24
0.625	2.11	2.164	2.063	1.925		86.07	88.27	84.15	78.52
1.25	2.06	2.574	2.181	2.386		84.03	104.99	88.96	97.32
2.5	2.184	2.152	2.123	2.141		89.08	87.78	86.6	87.33
5	2.226	2.048	2.404	2.179		90.8	83.54	98.06	88.88
kontrola	3.05	2.81	2.584	2.452					
	2.501	2.271	2.064	1.881	2.452				

Tabela 8. 24. Uticaj sokova ispitivanih vrsta na rast ćelija adenokarcinoma dojke.

Radna koncentracija soka (ml/L)	A1	A2	A3	A4		Vij1	Vij2	Vij3	Vij4	IC50 sr (ml/L)	SD
Brokoli O											
0.3125	2.326	1.926	1.796	2.06		142.06	117.63	109.69	125.81		
0.625	2.062	2.277	1.788	1.957		125.93	139.06	109.20	119.52		
1.25	1.565	1.603	1.65	1.78		95.58	97.90	100.77	108.71		
2.5	0.559	0.585	0.632	0.596		34.14	35.73	38.60	36.40		
5	0.165	0.184		0.181		10.08	11.24		11.05		
kontrola	1.541	1.414	1.464	1.719							
	1.671	1.674	1.602	2.014	1.637	IC50	2.07	2.03	2.14	2.08	0.06
Karfiol O											
0.3125	1.625	1.694	1.899	1.76		99.24	103.46	115.98	107.49		
0.625	2.085	1.828	1.87	1.853		127.34	111.64	114.21	113.17		

	1.25	1.65	1.927	1.481	1.709		100.77	117.69	90.45	104.37			
	2.5			1.724	1.724				105.29	105.29			
	5	0.684	0.6	0.548	0.632		41.77	36.64	33.47	38.60			
kontrola		1.541	1.414	1.464	1.719								
		1.671	1.674	1.602	2.014	1.637							
							IC50		4.67	4.72	4.69	0.04	
Keleraba O													
	0.3125	1.735	1.741	1.758	1.863		105.96	106.33	107.37	113.78			
	0.625	1.745	1.814	1.809	1.766		106.57	110.79	110.48	107.86			
	1.25	1.838	1.848	1.523			112.25	112.86	93.01				
	2.5	0.572	0.503	0.534	0.667		34.93	30.72	32.61	40.74			
	5	0.631	0.591	0.546	0.545		38.54	36.09	33.35	33.28			
kontrola		1.541	1.414	1.464	1.719								
		1.671	1.674	1.602	2.014	1.637							
							IC50	1.62	1.65	1.35	1.58	1.55	0.14
Kelj O													
	0.3125	1.632	1.678	1.541	1.696		99.67	102.48	94.11	103.58			
	0.625	1.087	1.241	1.352	1.211		66.39	75.79	82.57	73.96			
	1.25	0.381	0.174	0.305	0.2		23.27	10.63	18.63	12.21			
	2.5	0.121	0.091	0.108	0.097		7.39	5.56	6.60	5.92			
	5	0.126	0.13	0.129	0.125		7.70	7.94	7.88	7.63			
kontrola		1.541	1.414	1.464	1.719								
		1.671	1.674	1.602	2.014	1.637	IC50	0.76	0.73	0.84	0.73	0.76	0.05
Crveni kupus O													
	0.3125	1.776	1.835	2.061	2.148		89.85	92.84	104.27	108.67			
	0.625	2.015	1.721	1.899	1.974		101.94	87.07	96.07	99.87			
	1.25	1.833	1.776	1.901	1.755		92.73	89.85	96.17	88.79			

	2.5	0.977	0.995	1.073	1.091		49.43	50.34	54.28	55.20			
	5	0.227	0.196	0.169	0.212		11.48	9.92	8.55	10.73			
kontrola		1.886	1.976	2.048	1.957								
		2.038	1.959	2	1.949	1.977							
						IC50	2.48	2.51	2.63	2.66	2.57	0.09	
Beli kupus O													
	0.3125	1.823	1.72	1.898	1.837		92.23	87.02	96.02	92.94			
	0.625	1.824	1.745	1.832	1.921		92.28	88.28	92.68	97.19			
	1.25	1.753	1.841	1.83	1.938		88.69	93.14	92.58	98.05			
	2.5	1.582	1.668	1.683	1.813		80.04	84.39	85.15	91.72			
	5	0.537	0.519	0.442	0.504		27.17	26.26	22.36	25.50			
kontrola		1.886	1.976	2.048	1.957								
		2.038	1.959	2	1.949	1.977	IC50	3.98	3.18	4.05	3.17	3.60	0.49
Kineski kupus O													
	0.3125	2.107	2.109	2.181	1.97		106.60	106.70	110.34	99.66			
	0.625	2.011	1.977	1.929	1.882		101.74	100.02	97.59	95.21			
	1.25	2.03	1.976	1.931	2.021		102.70	99.97	97.69	102.24			
	2.5	2.104	2.074	2.15	2.16		106.44	104.93	108.77	109.28			
	5	0.548	0.44	0.557	0.955		27.72	22.26	28.18	48.31			
kontrola		1.886	1.976	2.048	1.957								
		2.038	1.959	2	1.949	1.977	IC50	4.82	4.78	4.84	4.99	4.86	0.09
Brokoli K													
	0.3125	1.921	1.964	1.808	1.949		97.19	99.36	91.47	98.60			
	0.625	1.951	1.923	1.993	1.921		98.70	97.29	100.83	97.19			
	1.25	1.528	1.306	1.27	1.302		77.30	66.07	64.25	65.87			
	2.5	0.427	0.434	0.413	0.371		21.60	21.96	20.89	18.77			
	5	0.258	0.255	0.245	0.178		13.05	12.90	12.39	9.01			

kontrola	1.886	1.976	2.048	1.957								
	2.038	1.959	2	1.949	1.977		1.60	1.49	1.45	1.47	1.50	0.07
Karfiol K												
IC50												
0.3125	1.985	1.968	1.907	2.014			103.31	102.43	99.25	104.82		
0.625	1.895	1.941	1.873	1.955			98.63	101.02	97.48	101.75		
1.25	0.917	0.831	0.66	0.796			47.73	43.25	34.35	41.43		
2.5	0.623	0.605	0.59	0.567			32.42	31.49	30.71	29.51		
5	0.207	0.221	0.203	0.186			10.77	11.50	10.57	9.68		
kontrola	1.96	1.934	1.903	1.896								
	1.875	1.84	1.916	2.047	1.921	IC50	1.29	1.18	1.04	1.16	1.17	0.10
Keleraba K												
0.3125	1.869	1.803	1.951	1.891			97.27	93.84	101.54	98.42		
0.625	1.97	1.847	1.896	1.918			102.53	96.13	98.68	99.82		
1.25	2.055	1.827	2.039	1.934			106.95	95.09	106.12	100.66		
2.5	1.796	1.734	1.618	1.779			93.47	90.25	84.21	92.59		
5	0.927	0.604	0.719	0.728			48.25	31.44	37.42	37.89		
kontrola	1.96	1.934	1.903	1.896								
	1.875	1.84	1.916	2.047	1.921							
Kelj K												
0.3125	1.719	1.765	1.717	1.854			89.47	91.86	89.36	96.49		
0.625	1.67	1.836	1.725	1.784			86.92	95.56	89.78	92.85		
1.25	1.597	1.701	1.6	1.524			83.12	88.53	83.27	79.32		
2.5	0.961	0.502	0.433	0.483			50.02	26.13	22.54	25.14		
5	0.182	0.161	0.159	0.171			9.47	8.38	8.28	8.90		
kontrola	1.96	1.934	1.903	1.896								
	1.875	1.84	1.916	2.047	1.921	IC50	2.50	1.92	1.81	1.75	2.00	0.34
Crveni kupus K												
0.3125	1.804	1.802	1.861	1.757			93.89	93.79	96.86	91.44		

	0.625	1.928	1.935	2.201	2.115			100.34	100.71	114.55	110.08		
	1.25		2.069	2.211	1.95				107.68	115.07	101.49		
	2.5	1.885	1.95	1.782	1.868			98.11	101.49	92.75	97.22		
	5	0.752	0.723	0.695	0.662			39.14	37.63	36.17	34.45		
kontrola		1.96	1.934	1.903	1.896								
		1.875	1.84	1.916	2.047	1.921	IC50	--	4.84	2.98	3.64	3,82	0,94
Beli kupus K													
	0.3125	2.067	2.046	1.989	2.037			105.90	104.83	101.91	104.37		
	0.625	2.029	2.004	1.987	1.938			103.96	102.68	101.81	99.30		
	1.25	2.129	2.1	2.142	1.947			109.08	107.60	109.75	99.76		
	2.5	2.131	2.011	2.05	1.949			109.18	103.04	105.03	99.86		
	5	2.01	1.935	1.938	2.014			102.98	99.14	99.30	103.19		
kontrola		1.972	1.856	1.895	1.944								
		2.024	1.917	1.989	2.017	1.952							
Kineski kupus K													
	0.3125	2.087	2.119	1.995	2.003			106.93	108.57	102.22	102.63		
	0.625	1.935	1.999	1.989	2.058			99.14	102.42	101.91	105.44		
	1.25	2.135	2.007	2.088	2.089			109.39	102.83	106.98	107.03		
	2.5	2.189	2.075	2.088	2.126			112.16	106.31	106.98	108.93		
	5	2.172	2.073	2.197	2.075			111.28	106.21	112.57	106.31		
kontrola		1.972	1.856	1.895	1.944	2.024							

Tabela 8.25. Uticaj sokova ispitivanih vrsta na rast ćelija epitelnog kancera cerviksa.

Radna koncentracija soka (ml/L)	A1	A2	A3	A4		Vij1	Vij2	Vij3	Vij4	IC50 sr. (ml/L)	SD
Brokoli O					% od K						
0.3125	1.207	1.098	1.237	1.149		106.19	96.60	108.83	101.09		
0.625	1.209	1.406	1.3	1.234		106.37	123.70	114.37	108.57		
1.25	1.007	0.851	0.93	0.871		88.60	74.87	81.82	76.63		
2.5	0.477	0.433	0.424	0.35		41.97	38.10	37.30	30.79		
5	0.132	0.098	0.092	0.088		11.61	8.62	8.09	7.74		
kontrola	1.158	1.051	1.091	1.097							
	1.237	1.123	1.152	1.184	1.137						
					IC50	2.21	1.90	2.00	1.80	1.98	0.17
Karfiol O											
0.3125	1.159	1.125	1.148	1.288		101.97	98.98	101.00	113.32		
0.625	1.347	1.23	1.234	1.181		118.51	108.22	108.57	103.90		
1.25	1.232	1.264	1.047	1.103		108.39	111.21	92.11	97.04		
2.5		0.658	0.664	0.602			57.89	58.42	52.96		
5	0.598	0.576	0.6	0.604		52.61	50.68	52.79	53.14		
kontrola	1.158	1.051	1.091	1.097							
	1.237	1.123	1.152	1.184							
Keleraba O											
0.3125	1.29	1.379	1.156	1.166		113.49	121.32	101.70	102.58		
0.625	1.192	0.867	1.077	0.956		104.87	76.28	94.75	84.11		
1.25	0.556	0.568	0.515	0.537		48.92	49.97	45.31	47.25		
2.5	0.526	0.452	0.487	0.516		46.28	39.77	42.85	45.40		
5	0.083	0.07	0.077	0.08		7.30	6.16	6.77	7.04		
kontrola	1.158	1.051	1.091	1.097	1.237	1.137					

					IC50	1.54	1.22	1.45	1.43	1.41	0.14
Kelj O											
0.3125	1.056	0.789	0.855	0.613		92.91	69.42	75.22	53.93		
0.625	0.35	0.071	0.09	0.081		30.79	6.25	7.92	7.13		
1.25	0.057	0.041	0.046	0.052		5.01	3.61	4.05	4.57		
2.5	0.062	0.047	0.049	0.056		5.45	4.14	4.31	4.93		
5	0.078	0.076	0.061	0.063		6.86	6.69	5.37	5.54		
kontrola	1.158	1.051	1.091	1.097	1.237	1.137					
					IC50	0.61	0.54	0.56	0.53	0.56	0.03
Crveni kupus O											
0.3125	1.266	1.238	1.276	1.254		94.42	92.33	95.16	93.52		
0.625	1.202	1.224	1.183	1.206		89.64	91.28	88.23	89.94		
1.25	1.066	1.04	1.067	1.117		79.50	77.56	79.57	83.30		
2.5	0.514	0.417	0.437	0.668		38.33	31.10	32.59	49.82		
5	0.079	0.074	0.075	0.073		5.89	5.52	5.59	5.44		
kontrola	1.335	1.236	1.301	1.284	1.395	1.341					
					IC50	2.08	1.88	1.94	2.50	2.10	0.28
Beli kupus O											
0.3125	1.177	1.173	1.283	1.254		87.78	87.48	95.68	93.52		
0.625	1.393	1.224	1.361	1.278		103.89	91.28	101.50	95.31		
1.25	1.148	1.157	1.169	1.172		85.62	86.29	87.18	87.41		
2.5	0.574	0.555	0.515	0.558		42.81	41.39	38.41	41.61		
5	0.152	0.194	0.156	0.211		11.34	14.47	11.63	15.74		
kontrola	1.335	1.236	1.301	1.284	1.395	1.341					
					IC50	2.24	2.24	2.12	2.21	2.20	0.06
Kineski kupus O											
0.3125	1.561	1.467	1.468	1.559		116.42	109.41	109.48	116.27		
0.625	1.55	1.562	1.596	1.824		115.60	116.49	119.03	136.03		

1.25	1.588	1.667	1.637	1.623			118.43	124.32	122.08	121.04		
2.5	1.593	1.579	1.572	1.589			118.80	117.76	117.24	118.50		
5	0.617	0.6	0.567	0.611			46.01	44.75	42.29	45.57		
kontrola	1.335	1.236	1.301	1.284	1.395	1.341						
						IC50	4.96	4.94	4.91	4.89	4.92	0.03
Brokoli K												
0.3125	1.402	1.4	1.516	1.257			104.56	104.41	113.06	93.74		
0.625	1.26	1.261	1.182	1.109			93.97	94.04	88.15	82.71		
1.25	1.003	0.387	0.528	0.286			74.80	28.86	39.38	21.33		
2.5	0.076	0.078	0.083	0.07			5.67	5.82	6.19	5.22		
5	0.089	0.087	0.089	0.094			6.64	6.49	6.64	7.01		
kontrola	1.335	1.236	1.301	1.284	1.395	1.341						
						IC50	1.29	0.97	1.02	0.87	1.04	0.18
Karifol K												
0.3125	0.889	1.061	1.191	1.165			66.71	79.62	89.37	87.42		
0.625	0.656	0.611	0.63	0.602			49.23	45.85	47.28	45.17		
1.25	0.624	0.606	0.654	0.633			46.82	45.47	49.08	47.50		
2.5	0.195	0.134	0.127	0.126			14.63	10.06	9.53	9.46		
5	0.117	0.125	0.129	0.125			8.78	9.38	9.68	9.38		
kontrola	1.343	1.31	1.333	1.305	1.429	1.333						
						IC50	0.82	0.71	0.75	0.71	0.74	0.05
Keleraba K												
0.3125	1.296	1.271	1.297	1.381			97.25	95.38	97.33	103.63		
0.625	1.255	1.354	1.377	1.295			94.18	101.60	103.33	97.18		
1.25	1.082	1.125	1.104	1.042			81.19	84.42	82.84	78.19		
2.5	0.653	0.671	0.628	0.652			49.00	50.35	47.13	48.93		
5	0.66	0.556	0.657	0.635			49.53	41.72	49.30	47.65		
kontrola	1.343	1.31	1.333	1.305	1.429	1.333						

Kelj K										
0.3125	1.282	1.258	1.272	1.237			96.20	94.40	95.45	92.82
0.625	1.202	1.164	1.124	1.11			90.20	87.35	84.34	83.29
1.25	0.498	0.524	0.466	0.319			37.37	39.32	34.97	23.94
2.5	0.08	0.069	0.082	0.07			6.00	5.18	6.15	5.25
5	0.105	0.087	0.097	0.093			7.88	6.53	7.28	6.98
kontrola	1.343	1.31	1.333	1.305	1.429	1.333				
Crveni kupus K										
0.3125	1.404	1.276	1.349	1.376			105.36	95.75	101.23	103.25
0.625	1.363	1.268	1.251	1.311			102.28	95.15	93.87	98.38
1.25	1.138	1.154	1.088	1.149			85.40	86.60	81.64	86.22
2.5	0.541	0.496	0.521	0.58			40.60	37.22	39.10	43.52
5	0.158	0.161	0.162	0.155			11.86	12.08	12.16	11.63
kontrola	1.343	1.31	1.333	1.305	1.429	1.333				
							2.15	2.09	2.09	2.26
									2.15	0.08
Beli kupus K										
0.3125	1.333	1.21	1.277	1.402			98.22	89.16	94.10	103.31
0.625	1.329	1.302	1.251	1.383			97.93	95.94	92.18	101.91
1.25	1.463	1.36	1.421	1.43			107.80	100.21	104.71	105.37
2.5	1.34	1.123	1.24	1.302			98.74	82.75	91.37	95.94
5	0.65	0.463	0.507	0.678			47.90	34.12	37.36	49.96
kontrola	1.394	1.348	1.244	1.354	1.436	1.357				
						IC ₅₀	3.99	2.91	3.31	4.75
									3.74	0.81
Kineski kupus K										
0.3125	1.456	1.356	1.389	1.516			107.29	99.92	102.35	111.71
0.625	1.634	1.469	1.398	1.56			120.40	108.24	103.01	114.95
1.25	1.689	1.459	1.495	1.569			124.45	107.51	110.16	115.61
2.5	1.625	1.584	1.51	1.521			119.74	116.72	111.26	112.08

5	1.613	1.452	0.967	1.171			118.85	106.99	71.25	86.29
kontrola	1.394	1.348	1.244	1.354	1.436	1.357				

KRATKA BIOGRAFIJA

Svetlana Bošković je rođena 12.03.1970. godine u Rumi gde je završila osnovnu i deo srednje škole, a potom školovanje nastavlja u Sremskoj Mitrovici. Nakon završetka srednje škole upisuje se na Prirodno-matematički fakultet, Univerziteta u Novom Sadu, na odsek za hemiju, smer profesor hemije gde studije završava 1994. godine.



Magistraske studije upisuje 1997. godine na departmanu za biohemiju, a 2003. godine stiče akademski naziv magistra biohemijskih nauka. Od 1996. godine je radila u nekoliko srednjih škola u Rumi, a u periodu 2009-2013. godine je bila zaposlena i na Fakultetu za zaštitu životne sredine na Univerzitetu Edukons, gde je radila prvo kao saradnik, a potom bila angažovana kao asistent u nastavi iz dva predmeta. Autor je i koautor više radova i saopštenja prezentovanih na domaćim i međunarodnim konferencijama i bila je angažovana na jednom projektu podržanog od strane Pokrajinskog sekretarijata za nauku. Koristi engleski i italijanski jezik. Živi u Rumi, gde je trenutno zaposlena u Gimnaziji „Stevan Puzić“.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:

RB

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije:

Monografska dokumentacija

TD

Tip zapisa:

Tekstualni štampani materijal

TZ

Vrsta rada:

Doktorska disertacija

VR

Autor:

mr Svetlana Bošković

AU

Mentor:

dr Neda Mimica-Dukić

MN

Naslov rada:

Fitohemijski sastav, lekoviti potencijal i senzorne karakteristike sorti vrsta *Brassica oleracea* L. i *Brassica rapa* L. (Brassicaceae) iz organskog i konvencionalnog sistema proizvodnje.

NR

Jezik publikacije:

Srpski

JP

Jezik izvoda:

Srpski/engleski

JI

Zemlja publikovanja:

Srbija

ZP

Uže geogr. područje:

Vojvodina

UGP

Godina:

2016.

GO

Izdavač:

Autorski reprint

IZ

Mesto i adresa:

Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića

MA

Fizički opis rada: Broj poglavlja: 8. Strana: 171 . Lit. Citata: 178. Tabela: 39.

FO Slika: 35. Grafika:/ Priloga:1

Naučna oblast: Hemija

NO

Naučna disciplina: Biohemija

ND

Predmetna odrednica/ključne reči *B. oleracea*, *B. rapa*, brokoli, karfiol, keleraba, kelj, crveni kupus, beli kupus, kineski kupus, organski, konvencionalni, antioksidanti, antimikrobna aktivnost, citotoksičnost

PO

UDK

Čuva se: Biblioteka Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, PMF Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad

ČU

Važna napomena: -

VN

Izvod:

IZ

U ovom radu su ispitani hemijski sastav i biološka aktivnost vrsta *Brassica oleracea* i *Brassica rapa* poreklom iz organskog i konvencionalnog sistema proizvodnje. Ispitivanja hemijskog sastava su obuhvatila određivanje volatilnih komponenata primenom headspace GC-MS tehnike, kvalitativnu analizu sokova ispitivanih vrsta pomoću LC-DAD-MS/MS tehnike, kvantifikaciju odabranih fenolnih jedinjenja pomoću LC-MS/MS tehnike i spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih glukozinolata, fenola i flavonoida i sadržaja ukupnih monomernih antocijana. Biološka aktivnost povrća je ispitana određivanjem antioksidantnog potencijal, antimikrobne i antitumorske aktivnosti sokova. Dobijeni rezultati pokazuju da su glavne volatilne komponente ispitivanih vrsta degradacioni proizvodi masnih kiselina i organosumpornih jedinjenja od kojih neke od identifikovanih komponenata predstavljaju ključne mirisne komponente. Na osnovu njihove distribucije nije bilo moguće utvrditi uticaj sistema proizvodnje na miris i ukus ispitivanih vrsta. Pomoću LC-DAD-MS/MS i LC-MS/MS tehnike je utvrđeno prisustvo primarnih metabolita, slobodnih hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina, derivate hinske kiseline sa hidroksicimetnim kiselinama, glikozida flavonola, biflavonoida, i kumarina u sokovima ispitivanih vrsta. Pored toga u svim sokovima su

bili prisutni kondenzacioni proizvodi degradacionih proizvoda indolnih glukozinolata sa askorbinskom kiselinom- askorbigen i metoksiaskorbigen. U sokovima crvenog kupusa su bili prisutni antocijani. Najveći sadržaj ukupnih glukozinolata je određen u brokoliju, dok je crveni kupus sadržao najveći sadržaj ukupnih fenola ukupnih flavonoida kao i hinske kiseline. Crveni kupus je bio varijetet koji je ispoljio najviši antioksidantni kapacitet u svim primenjenim testovima, brokoli i karfiol su ispoljili najjaču antimikrobnu aktivnost, dok je kelj bio varijetet sa najjačim antitumorskim delovanjem. Na osnovu analize hemijskog sastava i biološke aktivnosti vrsta *B. oleracea* i *B. rapa* može se zaključiti da u zavisnosti od primenjenog tipa proizvodnje mogu biti poboljšane neke od karakteristika ispitivanih vrsta i da je uticaj sistema proizvodnje značajan za pojedine varijetete, a nikako za celu vrstu. U konačnom obliku može se zaključiti da bi potencijalna kombinacija sokova crvenog kupusa, brokolija, karfiola i kelja mogla ostvariti značajno hemopreventivno i hemoterapeutsko delovanje, ispoljavajući istovremeno antioksidantnu, antimikrobnu i antitumorsku aktivnost.

Datum prihvatanja teme od

strane NN veća:

DP

Datum odbrane: 2016

DO

Članovi komisije:

(Naučni stepen/ime i prezime/zvanje/fakultet)

KO

Predsednik: dr Sonja Đilas, redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

Mentor: dr Neda Mimica-Dukić, redovni profesor PMF-a u Novom Sadu

Član: dr Đorđe Malenčić, redovni profesor Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu

Član: dr Ivana Beara, vanredni profesor PMF-a u Novom Sadu

Član: dr Dragana Četojević-Simin, naučni savetnik Instituta za onkologiju, Medicinski fakultet u Novom Sadu

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type:

Monograph type

DT

Type of record:

Printed text

TR

Content code:

PhD Thesis

CC

Author:

Svetlana Bošković, MSc

AU

Mentor:

dr Neda Mimica-Dukić

MN

Title:

The phytochemical composition, healing potential and sensory characteristics of cultivars of *Brassica oleracea* L. i *Brassica rapa* L. species (Brassicaceae) from organic and conventional cropping systems.

NR

Language of text:

Serbian

LT

Language of abstract:

Serbian/English

LA

Country of publication:

Serbia

CP

Locality of publication:

Vojvodina

LP

Publication year:

2016.

PY

Publisher:

Author's reprint

PU

Publishing place:

Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3

PP

Physical description: Chapters: 8. Pages: 171. References: 178. Tables 39:
PD Figures: 35 Graphs:/ Additional lists: 1

Scientific field: Chemistry

SF

Scientific discipline: Biochemistry

SD

Subject/key words *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, broccoli,
UC cauliflower, kohlrabi, Savoy cabbage, red cabbage,
white cabbage, Nappa cabbage, organic,
conventional, antioxidants, antimicrobial activity,
cytotoxicity

UDK

Holding data: Department of Chemistry, Biochemistry and
HD Environmental Protection (Library), University of Novi
Sad Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 3,
Novi Sad

Note: -

N

Abstract: Chemical composition and biological activity of *Brassica*
AB *oleracea* and *B. rapa* species were investigated in the present work. Investigation of chemical composition encompassed determination of volatile compounds by headspace GC-MS technique, qualitative analysis of juices of investigated vegetables by LC-DAD-MS/MS technique, quantification of selected phenolic compounds by LC-MS/MS technique and spectrophotometric determination of total content of glucosinolates, phenolic compounds and flavonoids and total content of monomeric anthocyanes. Biological activity of vegetables was investigated by determination of antioxidant capacity, antimicrobial and antitumorogenic effect of juices. Obtained results showed that main volatile compounds were degradation products of fatty acids and organo-sulphur compounds among which some of the identified components were the key aroma compounds. Based on their distribution it was not possible to evaluate influence of cropping system on aroma and taste of investigated species. By LC-DAD-MS/MS and LC-MS/MS techniques, it was determined the presence of primary metabolites, free

hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids, derivatives of quinic acid and hydroxycinnamic acids, flavonol glucosides, biflavonoids and a coumarin in juices of the investigated species. Furthermore, condensation products of degradation products of indole glucosinolates with ascorbic acid- ascorbigen and metoxiascorbigen were present in all juices. Anthocyanes were present in juices of red cabbage. The highest total content of glucosinolates was determined in broccoli, while red cabbage had the highest total phenolic content, total flavonoid content, as well as content of quinic acid. Red cabbage was a variety that showed the highest antioxidant capacity measured by different assays. Broccoli and cauliflower expressed the highest antimicrobial potential, while Savoy cabbage was a variety with the highest antitumor effect. Investigation of chemical composition and biological activity showed that applied cropping conditions may be useful for improving some of the characteristics of investigated species and significance of cropping system only for particular varieties, but not for the whole species in general. As the conclusion, potential combination of juices of red cabbage, broccoli, cauliflower and Savoy cabbage could be potent chemopreventive and chemotherapeutic agent, expressing simultaneously antioxidant, antimicrobial and antitumor activity.

Accepted by the scientific board on:

ASB

Defended: 2016

DE

Thesis defend board:

(Degree/name/surname/title/faculty)

DB

Chairperson: dr Sonja Đilas, Full professor, Faculty of technology,
University of Novi Sad

Mentor: dr Neda Mimica-Dukić, Full professor, Faculty of
Sciences, University of Novi Sad

Member: dr Đorđe Malenčić, Full professor, Faculty of
Agriculture, University of Novi Sad

Member: dr Ivana Beara, assistant professor, Full professor,
Faculty of Sciences, University of Novi Sad

Member:

dr Dragana Četojević-Simin, Research Associate,
Oncology Institute of Vojvodina, Medical Faculty,
University of Novi Sad