



**UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU**



Aleksandra Mišan

**ANTIOKSIDANTNA SVOJSTVA LEKOVITOG
BILJA U HRANI**

-doktorska disertacija-

Novi Sad, 2009.

Ova doktorska disertacija je urađena na Institutu za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, u okviru projekta finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije: „Razvoj prehrambenih proizvoda za grupe potrošača sa posebnim zahtevima i potrebama“, ev. br. 20068, dok su određivanja vezana za antioksidativna svojstva, elektron spin rezonantnom spektroskopijom, vršena na katedri za organsku hemiju Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu.

Tokom izrade i pisanje ovog rada, imala sam sreće da sarađujem sa mnogo divnih ljudi koji su mi pomogli da se suočim sa svim izazovima. Ovom prilikom želim da im se zahvalim:

- mentoru **dr Nedi Mimici-Dukić**, redovnom profesoru PMF-a u Novom Sadu, na svesrdnoj pomoći, korisnim savetima i podršci koju mi je pružila tokom izrade ove disertacije.
- **dr Dubravki Štajner**, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, na interesovanju, kao i stručnim savetima u toku pisanja rada.
- **dr Jasni Čanadanović-Brunet**, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, kao i **mr Vesni Tumbas** na pomoći kod određivanja antioksidantnih svojstava primenom elektron spin rezonantne spektroskopije.
- **dr Kseniji Kuhajdi**, redovnom profesoru PMF-a u Novom Sadu, kao i **dr Đorđu Psodorovu**, naučnom saradniku Instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu na interesovanju koju su pokazali za ovaj rad.
- **Slavici Sančanin i Katici Slavici**, tehničkim saradnicima Instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu na saradnji i pruženoj pomoći tokom eksperimentalne faze rada.
- **Oliveri Šimurini**, dipl. ing. kao i **Petru Grbiću**, tehničkom saradniku Instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu na pomoći kod formulacije recepture i izradi keksa za eksperimentalni rad.
- kolektivu Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ iz Beograda, na obezbeđenom biljnom materijalu.
- nosiocu projekta **dr Marijani Sakač**, naučnom saradniku Instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, kao i svim mojim kolegama sa Instituta, na interesovanju koju su pokazali za ovaj rad, a posebno **dr Anamariji Mandić** i **dr Žarku Kevrešanu** na razumevanju, podršci i iskrenom prijateljstvu.

Svojoj porodici dugujem neizmernu zahvalnost na podršci, razumevanju i strpljenju.

Autor

Sadržaj

1	UVOD	1
2	OPŠTI DEO	6
2.1	BIOSINTEZA SEKUNDARNIH BIOMOLEKULA.....	7
2.1.1	Put mevalonske kiseline.....	8
2.1.2	Metabolički put šikimske kiseline.....	12
2.1.3	Acetogeninski put biosinteze	14
2.1.4	Biosinteza flavonoida.....	17
2.2	LEKOVITE BILJKE - HEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST	19
2.2.1	<i>Rhamnus frangula</i> L. (Rhamnaceae)- krušina.....	19
2.2.1.1	Hemijski sastav.....	20
2.2.1.2	Biološka i farmakološka aktivnost	21
2.2.1.3	Antrahinoni kao antioksidanti i oksidanti.....	22
2.2.2	<i>Mentha x piperita</i> L. (Lamiaceae) – pitoma nana ili menta	23
2.2.2.1	Hemijski sastav.....	24
2.2.2.2	Biološka i farmakološka aktivnost	27
2.2.2.3	Antioksidantna aktivnost.....	28
2.2.3	<i>Betula pendula</i> Roth. (Betulaceae) – breza	29
2.2.3.1	Hemijski sastav.....	30
2.2.3.2	Biološka i farmakološka funkcija	31
2.2.3.3	Antioksidantna aktivnost	32
2.2.4	<i>Carum Carvi</i> L. (Apiaceae) - kim	33
2.2.4.1	Hemijski sastav.....	33
2.2.4.2	Biološka i farmakološka funkcija	35
2.2.4.3	Antioksidantna aktivnost	36
2.2.5	<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) A.W. Nym. ex Hill (Apiaceae) - peršun	37
2.2.5.1	Hemijski sastav.....	38
2.2.5.2	Biološka i farmakološka aktivnost	40
2.2.5.3	Antioksidantna aktivnost	40
2.3	ANTIOKSIDANTI	41
2.3.1	Slobodni radikali i oksidativni procesi.....	41
2.3.2	Lipidna peroksidacija.....	41
2.3.3	Antioksidanti	44
2.3.3.1	Antioksidantni enzimi	45
2.3.3.2	Neenzimski antioksidanti	47

2.3.4	Trendovi u proučavanju prirodnih antioksidanata.....	50
2.4	FUNKCIONALNA HRANA.....	51
2.4.1	Razvoj koncepta funkcionalne hrane	51
2.4.2	Definicija funkcionalne hrane	52
2.4.3	Funkcionalne komponente biljnog porekla	53
2.4.4	Funkcionalne komponente životinjskog porekla.....	59
2.4.5	Zdravstvene izjave	59
2.4.6	Biomarkeri	60
3	MATERIJAL I METODE.....	62
3.1	MATERIJAL	63
3.1.1	Biljni materijal	63
3.1.2	Hemikalije i reagensi	65
3.2	METODE	66
3.2.1	Postupak ekstrakcije i termičkog tretmana biljnog materijala.....	66
3.2.2	Aplikacija biljnih sirovina i ekstrakata u keks	66
3.2.3	Ispitivanje hemijskog sastava.....	67
3.2.3.1	Određivanje ukupnih fenolnih jedinjenja u biljnim ekstraktima (Metoda po Folin-Ciocalteu).....	67
3.2.3.2	Određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima (Metoda po Markhamu).....	68
3.2.3.3	HPLC analiza etanolnih ekstrakata lekovitog bilja.....	69
3.2.4	Ispitivanje antioksidantne aktivnosti	71
3.2.4.1	ESR spektralna analiza uticaja biljnih ekstrakata na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala.....	71
3.2.4.2	ESR spektralna analiza uticaja biljnih ekstrakata na stvaranje i hidroksil radikala	72
3.2.4.3	Određivanje "skevindžer" aktivnosti na DPPH' radikale	72
3.2.4.4	Određivanje Fe ³⁺ /Fe ²⁺ redoks kapaciteta (FRAP)	74
3.2.4.5	Određivanje Fe ²⁺ helatacione aktivnosti.....	75
3.2.4.6	Određivanje antioksidantne aktivnosti β-karoten metodom	76
3.2.5	Ispitivanje oksidativnih promena na lipidima u keksu	79
3.2.5.1	TBA test za određivanje stepena lipidne peroksidacije u keksu.....	79
3.2.5.2	Metoda za određivanje peroksidnog broja u keksu	81
3.2.6	Statistička obrada podataka.....	81
4	REZULTATI I DISKUSIJA.....	82
4.1	HEMIJSKI SASTAV BILJNIH SIROVINA	83
4.1.1	Prinosi ekstrakcije etanolom	83

4.1.2	Sadržaj ukupnih rastvorljivih fenola u etanolnim ekstraktima	84
4.1.3	Sadržaj ukupnih flavonoida u etanolnim ekstraktima	86
4.1.4	HPLC analiza etanolnih ekstrakata biljaka	88
4.1.4.1	HPLC analiza etanolnog ekstrakta pitome nane	92
4.1.4.2	HPLC analiza etanolnog ekstrakta krušine	96
4.1.4.3	HPLC analiza etanolnog ekstrakta breze	96
4.1.4.4	HPLC analiza etanolnog ekstrakta kima	97
4.1.4.5	HPLC analiza etanolnog ekstrakta peršuna	97
4.1.4.6	HPLC analiza etanolnog ekstrakta komercijalnog preparata Vitalplant®	98
4.2	ANTIOKSIDANTNA AKTIVNOST ETANOLNIH EKSTRAKATA	
	ISPITIVANIH BILJNIH DROGA	101
4.2.1	ESR spektralna analiza uticaja biljnih ekstrakata na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala	101
4.2.2	ESR spektralna analiza uticaja biljnih ekstrakata na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala (SA _{OH})	104
4.2.3	"Skevindžer" aktivnost na DPPH [·] radikale	108
4.2.4	Fe ³⁺ /Fe ²⁺ redoks kapacitet (FRAP)	111
4.2.5	Fe ²⁺ helataciona aktivnost	114
4.2.6	Antioksidantna aktivnost određena β-karoten metodom	117
4.3	ANTIOKSIDANTNA AKTIVNOST KOMERCIJALNOG PREPARATA	
	VITALPLANT® U KEKSU	122
5	ZAKLJUČAK	129
6	LITERATURA	138
7	PRILOG	166

1 Uvod

Oksidativna degradacija masti i ulja u hrani dovodi do promene mirisa i ukusa, čime se narušava njen nutritivni i senzorni kvalitet, obzirom na potencijalnu toksičnost nastalih jedinjenja (Gordon, 2001). Iz navedenog razloga je neophodno dodavati antioksidante tokom tehnološkog procesa prerade. Postoji osnovana sumnja da su najčešće korišćeni sintetički antioksidanti BHT (2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol) i BHA (smeša izomera 2-*terc*-butil-4-hidroksianizola i 3-*terc*-butil-4-hidroksianizola) toksični, dok su prirodni antioksidanti, kao što su α -, β -, γ - i δ -tokoferol, skupi i manje efikasni (Moure i sar., 2001). Potreba zamene sintetičkih antioksidanata prirodnim, kao i zahtevi potrošača za upotrebom "prirodnih" aditiva u hrani, inicirali su intenzivna ispitivanja antioksidantne aktivnosti sirovih i prečišćenih ekstrakata biljnog materijala. Prva sistematska istraživanja na 32 začinske biljke ukazala su da skoro sve poseduju antioksidativna svojstva (Chipault i sar., 1952, 1955, 1956).

Upotreba aromatičnih i začinskih biljaka kao prirodnih konzervanasa datira još iz preantičkih i antičkih vremena. Naime, još su stari narodi zapazili da dodavanje začina ne samo da poboljšava ukus i miris hrane već i sprečava njeno kvarenje i produžava održivost namirnica. Kasnija istraživanja dokazala su da začinske biljke sadrže supstance sa izraženim baktericidnim i fungicidnim delovanjem (etarska ulja) kao i supstance sa snažnim antioksidantnim delovanjem, koje se najčešće pripisuje jedinjenjima fenolne strukture (Mimica-Dukić, 2003).

Primena lekovitih i aromatičnih biljaka u prehrambenoj industriji doživela je ekspanziju u poslednjih desetak godina, posebno od kada je kao svetski trend u ishrani uvršćena tkz. "funktionalna hrana", koja pored nutritivnih, poseduje i lekovita svojstva. Moderne prehrambene tehnologije već koriste začinske i lekovite biljke u proizvodnji mesa i mesnih prerađevina, mlečnih i pekarskih proizvoda.

Da bi se mogli klasifikovati kao dijetetski suplementi i aditivi, fitonutrijenti moraju biti zdravstveno bezbedni. U ovu grupu jedinjenja ubrajaju se etarska ulja, kao smeše isparljivih netoksičnih supstanci i fenolna jedinjenja različitih struktura. U kombinaciji, ove

supstance ispoljavaju antimikrobne i antioksidantne efekte na hranjivom supstratu, a generalno pozitivno deluju na ukupno zdravstveno stanje konzumenata. Ove uslove ispunjavaju dole navedene poznate začinske i lekovite biljke.

Peršun (*Petroselinum crispum* (Mill.) A.W. Nym. ex Hill, Apiaceae) je aromatična biljka koja se učestalo koristi u kulinarstvu i u terapijske svrhe. Sveže i osušeno lišće, koren, plod i seme ove biljke koristi se u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji za proizvodnju začina, etarskih ulja i droga. Ova biljka upotrebljava se kao karminativ, diuretik, hipertenziv, hipotenziv, stomahik, abortificijent i kao nutritivno sredstvo. Ona sadrži velike količine flavona apigenina, koji je prvenstveno prisutan u formi apiina (7-O-apiosida). Literaturni podaci ukazuju na pozitivne efekte konzumiranja peršuna, odnosno na pozitivnu korelaciju između unosa peršuna i porasta aktivnosti superoksid dizmutaze i katalaze, kao i na smanjenje oksidacije proteina kod ispitivanih volontera (Nielsen i sar., 1999; Robbers i Tyler, 1999; Kreydiyyeh i Usta, 2002).

Krušina (*Rhamnus frangula* L., Rhamnaceae) je žbunasta biljka poreklom iz Evrope i zapadne Azije. U medicini se upotrebljava kao laksativ u obliku čajeva, tableta ili ekstrakata. Hemijski je klasifikovana kao antrahinonska biljka. Njeni glavni sastojci su antrahinonski glikozidi, flavonoidi i tanini. Antrahinoni i srodna jedinjenja ispoljavaju inhibitorni efekat na oksidaciju linolne kiseline. Emodin poseduje sposobnost inhibicije stvaranja superoksid anjon radikala, koja je u rangu aktivnosti kvercetina (Van den Gorkom i sar., 1999; Thomson, 1997).

Menta ili pitoma nana (*Mentha x piperita* L., Lamiaceae) je dobijena veštačkom selekcijom (hibrid *Mentha aquatica* L. x *Mentha spicata* L.) i gaji se širom sveta (Scora i Chang, 1997). Osušeno lišće nane od davnina se koristi za spravljanje čajeva koji se koriste kod lečenja prehlada, zubobolja i stomaknih tegoba. Etarsko ulje nane ima široku primenu u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Ono sadrži mentol, menton, mentil estre i druge monoterpenske derivate. Veliki broj literaturnih podataka ukazuje na jedinstvene antioksidativne osobine mente. Veliku sposobnost deaktivacije DPPH^{*} radikala korišćenjem ekstrakata mente naučnici dovode u vezu sa visokim sadržajem fenolnih kiselina i flavonoida. Sve biljke iz familije Lamiaceae odlikuju se značajnim sadržajem ruzmarinske kiseline (Guédon i Pasquier, 1994; Areias i sar., 2001; Triantaphyllou i sar., 2001; Mimica-Dukić i sar., 2003; Božin i sar., 2006; Božin i sar., 2006; Mimica-Dukić i sar., 2004; Mimica-Dukić i Božin, 2007; Mimica-Dukić i Božin, 2008).

Kim (*Carum carvi* L., Apiaceae) je dvogodišnja biljka prijatnog mirisa. Aromatično seme se upotrebljava za začinjavanje hleba, kolača, ribe, kobasica, sireva, supa, dok se lišće može dodavati salatama i supama. Kim se kao lekovita biljka koristi za stimulisanje varenja i digestije. Ulje kima poseduje baktericidno dejstvo. Glavni sastojak etarskog ulja ploda je karvon (50-60%) (Bellakhdar, 1997).

Obična breza (*Betula pendula* Roth., Betulaceae) od davnina se koristi u tradicionalnoj medicini. Koriste se kora, list, pupoljci, biljni sok, u formi čaja, ekstrakta, etarskog ulja itd. Ona se primenjuje kod lečenja urinarnog trakta, bolesti kože, infekcija i upala. Osim toga, etarska ulja breze su našla široku primenu u kozmetičkoj industriji, zahvaljujući prijatnom mirisu. Različita fitohemijska istraživanja breze ukazuju na visok sadržaj fenola, flavonoida, tanina, saponina, glikozida, sterola i terpenskih derivata (Hegnauer, 1964; Pokhilo i Uvarova, 1988; Guenther, 1975; Demirci i sar., 2000a,b, Demirci i Basser, 2003).

Kod izbora prirodnog aditiva velika pažnja mora se posvetiti prirodi supstrata na kome se ispituje antioksidativna aktivnost. Tako je npr. vrlo visoka aktivnost ruzmarina i žalfije dokazana u slanini, dok karanfilić ispoljava najveću aktivnost u emulziji ulje-voda (Madsen i Bertelsen, 1995).

Održivost kvaliteta krekeri, keksa i biskvita od velikog je interesa zbog njihove široke upotrebe i relativno dugog roka trajanja. Dokazano je da u biskvitima, dodatak prečišćenih ekstrakata majorana, mente i bosiljka efikasno sprečava oksidaciju lipida u poređenju sa efektom BHA (Bassiouny i sar., 1990). Smatra se da antioksidativna svojstva variraju u zavisnosti od kompleksnih interakcija između različitih faktora, uključujući tip i koncentraciju aktivnih komponenti potencijanog antioksidanta i prirodu ispitivanog matriksa hrane (Madsen i Bertelsen, 1995; Schwarz i sar., 2001). Takođe se mora uzeti u obzir i termički tretman primenjen u proizvodnji pekarskih ili brašneno-konditorskih proizvoda.

Polazeći od pretpostavke da bi dodavanje opisanih začinskih i lekovitih biljaka u konditorske proizvode značajno unapredilo njihov kvalitet (nutritivni i lekoviti potencijal i održivost proizvoda), a uzimajući u obzir sve napred navedene relevantne faktore u okviru ove doktorske disertacije postavljeni su sledeći **ciljevi**:

- ◆ Da se izvrši detaljna analiza fenolnih komponenata u etanolnim ekstraktima ploda peršuna, kore krušine, lista mente, ploda kima i lista obične breze, pre i nakon hidrolize.
- ◆ Da se ispituju antioksidantne aktivnosti etanolnih ekstrakata navedenih biljaka pre i nakon termičke obrade, kao i ekstrakta smeše radi utvrđivanja sinergističkog efekta komponenata.
- ◆ Da se ispita sposobnost i kapacitet pulvisa i ekstrakta komercijalnog preparata na bazi smeše gore pomenutih biljaka, da vrše inhibiciju oksidacije lipida u ispitivanom prehrambenom proizvodu.

U skladu sa postavljenim ciljevima, definisani su i **zadaci**:

- ◆ Hemijska analiza ispitivanih biljnih ekstrakata:
 - Kvantitativno određivanje i identifikacija fenolnih komponenata biljaka u etanolnim ekstraktima primenom spektrofotometrijskih i metoda tečne hromatografije (HPLC).
- ◆ Ispitivanje antioksidativne aktivnosti etanolnih ekstrakata bilja, na osnovu:
 - određivanja Fe (III)-Fe (II) redoks kapaciteta (FRAP),
 - određivanja Fe (II) helatacione sposobnosti,
 - spektrofotometrijskog određivanja "skevindžer" aktivnosti na DPPH[•] radikale,
 - ESR "spin trap" spektroskopskog određivanja "skevindžer" aktivnosti na [•]OH i O₂^{-•} radikale,
 - antioksidantne aktivnosti u sistemu β-karoten-linolna kiselina.
- ◆ Inhibicija oksidacije lipida u ispitivanom matriksu na osnovu:
 - rezultata hidroperoksidnog testa,
 - određivanja TBA reaktivnih supstanci,
 - određivanja "skevindžer" aktivnosti na DPPH[•] radikale.

2 Opšti deo

2.1 BIOSINTEZA SEKUNDARNIH BIOMOLEKULA

Istorija upotrebe biljaka u lečenju tesno je povezana sa istorijom i razvojem ljudskog društva. Najstariji pisani pomen o upotrebi lekovitog bilja za izradu lekova i za lečenje pronađen je na sumerskoj glinenoj pločici iz Nipura staroj skoro 5000 godina. Ona sadrži 12 recepata za izradu lekova u kojima se pominje preko 250 različitih biljaka. Kineska knjiga o korenju i travama “Pen Tsao”, od Shen Nunga napisana oko 2900 god. p.n.e., koju neki farmakoistoričari smatraju najstarijom farmakopejom na svetu, daje opis 365 biljnih droga, od kojih se mnoge i danas upotrebljavaju.

Prema podacima iz Biblije i svete jevrejske knjige Talmuda, prilikom različitih obreda koji su pratili lečenje, kao i za kađenje, korišćene su mirisne smole, najčešće mira (Myrrha) i tamjan (Olibanum). U indijskim svetim knjigama, Vedama, spominje se lečenje biljem, kojim je ova zemlja bogate i raskošne flore obilovala. Mnoge začinske biljke poreklom su iz Indije: morski oraščić, biber, karanfilić i druge. Oslanjajući se na Homerove epove “Ilijadu” i “Odiseju”, nastale oko 800.god. p.n.e., saznajemo za 63 biljne vrste iz minojske, mikenske i egipatsko-asirske farmakoterapije. Neke od njih dobile su imena prema mitološkim likovima iz ovih epova, kao na primer oman (*Inula helenium* L., Asteraceae), nazvan u čast lepe Helene oko koje je vođen trojanski rat. Za biljke iz roda *Artemisia*, za koje se verovalo da vraćaju snagu i čuvaju zdravlje, naziv je izveden iz korena grčke reči artemis, što znači zdrav ili čio. One su nazvane po čuvenoj karijskoj carici Artemisi, koja je i sama mnogo istraživala i gajila lekovite biljke.

Neke biljne vrste su zbog lekovitosti i široke upotrebe prerasle u svete biljke, kao što je to slučaj sa crnim i belim lukom, u koje su se zaklinjali egipatski lekaroapotekari, a lukovice ovih biljaka stavljali su kao darove u grobnice kraljeva. Zahvaljujući jakoj aromi, koristili su ih u magijskim obredima, za teranje zlih duhova, mada su u osnovi toga, i ne znajući, koristili dezinfekciona i antibiotska svojstva sumpornih jedinjenja (Parojčić i Stupar, 2003).

Zahvaljujući naučnim saznanjima, danas je poznato da je medicinski značaj lekovitog bilja u uskoj vezi sa sadržajem sekundarnih biomolekula, od kojih neki ispoljavaju izrazito snažne farmakološke efekte. Sekundarni biomolekuli biljaka, gledano sa ekološke strane, nastali su evolucijom kao komponente hemijske odbrane biljaka od drugih biljnih vrsta, insekata i životinja (Gurib-Fakim, 2006).

Iako je do danas izolovano više od 1500 sekundarnih biomolekula iz biljaka, smatra se da je to manje od 10% hemijskih supstanci biljnog sveta. Karakteristika metabolizma sekundarnih biomolekula je vrlo visoka složenost biosintetskih puteva, koji su višefazni i uključuju veći broj enzima, multienzimskih sistema, regulatora ovih enzima, i njihovu ćelijsku organizaciju. Najznačajniji biosintetski putevi sekundarnih biomolekula obuhvataju:

- Put mevalonske kiseline, kojim nastaju izoprenoidi (steroidi i terpenoidi).
- Metabolički put šikimske kiseline, kojim nastaju fenolna jedinjenja i aromatične aminokiseline.
- Biosintezu iz acetata (acetogeninski put), kojim nastaju masne kiseline, voskovi, fosfolipidi, eikosanoidi, poliketidi (antrahinoni, aflatoksin, makrolidi), poliketidi mešovitog porekla (flavonoidi).
- Divergentni putevi biosinteze azotnih jedinjenja (alkaloida) iz aminokiselina.

2.1.1 Put mevalonske kiseline

Terpeni (terpenoidi, izopreni) predstavljaju najbrojniju grupu sekundarnih metabolita biljaka, čija je zajednička karakteristika da nastaju od aktivnih C5-jedinica, tj. "aktivnog izoprena": izopentenilpirofosfata (IPP) i njegovog izomera dimetilalilpirofosfata (DMAPP) (Zhang i Demain, 2005).

Na slici 2.1. je prikazana biosinteza dimetilalilpirofosfata (DMAPP) i izopentenilpirofosfata (IPP) iz acetil-CoA. Biosinteza osnovne C-5 jedinice terpena počinje Claisen-ovom kondenzacijom dva molekula acetil-CoA, iz kojih uz pomoć enzima acetil-CoA acetiltransferaze nastaje acetoacetyl-CoA. Kondenzacijom acetoacetyl-CoA s jednim molekulom acetyl-CoA- β -hidroksi- β -metil-glutaril-CoA, pod dejstvom hidrosimetilglutaril-CoA sintaze nastaje hidrosimetilglutaril-CoA, iz koga potom, pod dejstvom HMG-CoA reduktaze, preko MVA-tiohemiacetala, nastaje mevalonska kiselina (MVA). Fosforilovanjem mevalonske kiseline, pod dejstvom mevalonat kinaze i fosfomevalonat kinaze nastaje mevalonat-3-fosfat-5-pirofosfat, čijom dekarboksilacijom, pod dejstvom mevalonat-5-difosfatdekarboksilaze nastaje izopentenil-pirofosfat (IPP), iz koga pod dejstvom izomeraze nastaje dimetilalilpirofosfat (DMAPP) (Okada i sar., 2008).

L. Ružička je 1925. godine sa Ingoldom utvrdio tzv. “izoprensko pravilo”, po kom su izoprenske jedinice u terpenima vezane po principu glava-rep (Nobelova nagrada 1939. godine). Drugim rečima, DMAPP predstavlja početnu jedinicu na koju se adira IPP (Rohdich i sar., 2000) (**Slika 2.2**). Ovakvim povezivanjem (glava-rep) nastaju fosforilovani (C5)_n alkoholi i to:

- geranilpirofosfat (GPP) kao prekursor monoterpena sa C10,
- farnezilpirofosfat (FPP) kao prekursor seskviterpena sa C15,
- geranilgeranilpirofosfat (GGPP) kao prekursor diterpena sa C20,
- geranilfarnezilpirofosfat (GFPP) kao prekursor sesterpena sa C25.

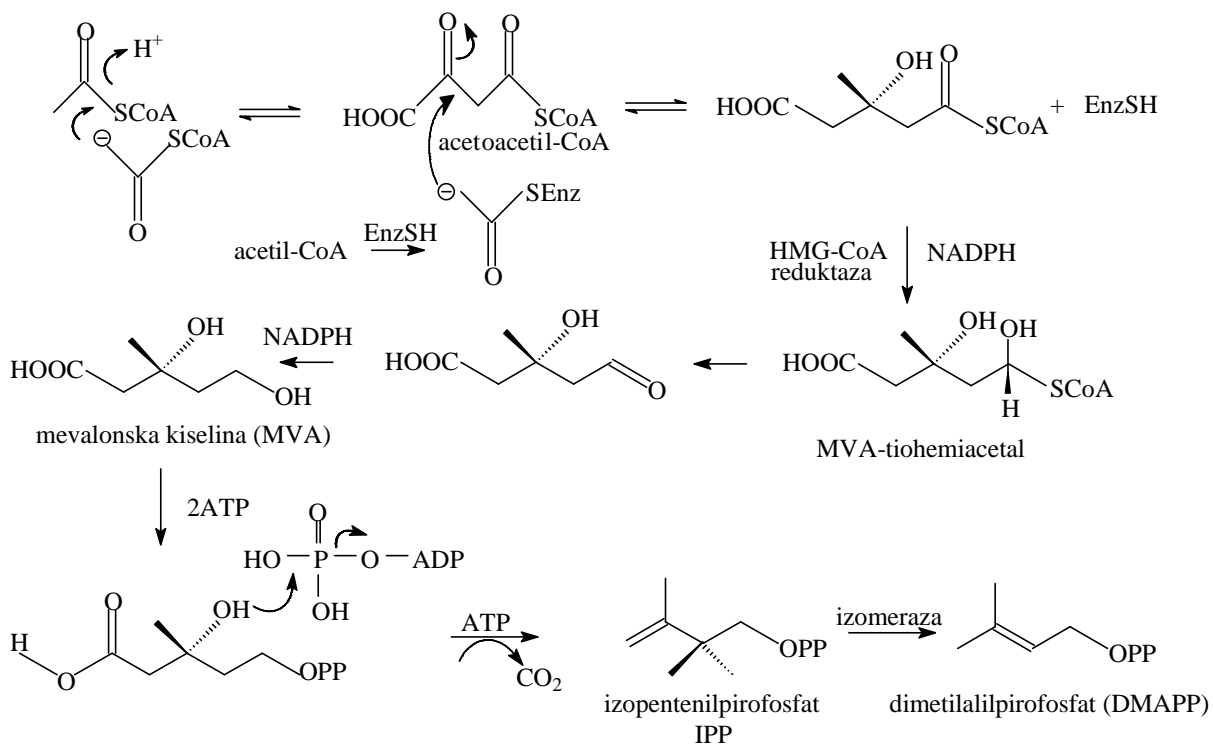
Naknadnim reakcijama ciklizacije, uvođenjem različitih funkcionalnih grupa i reorganizacijom molekula, dolazi do stvaranja ogromnog broja različitih jedinjenja u okviru svake klase terpenoida (Zhang i Demain, 2005).

Na osnovu broja ugljenikovih atoma osnovnog skeleta prirodni terpeni su podeljeni na:

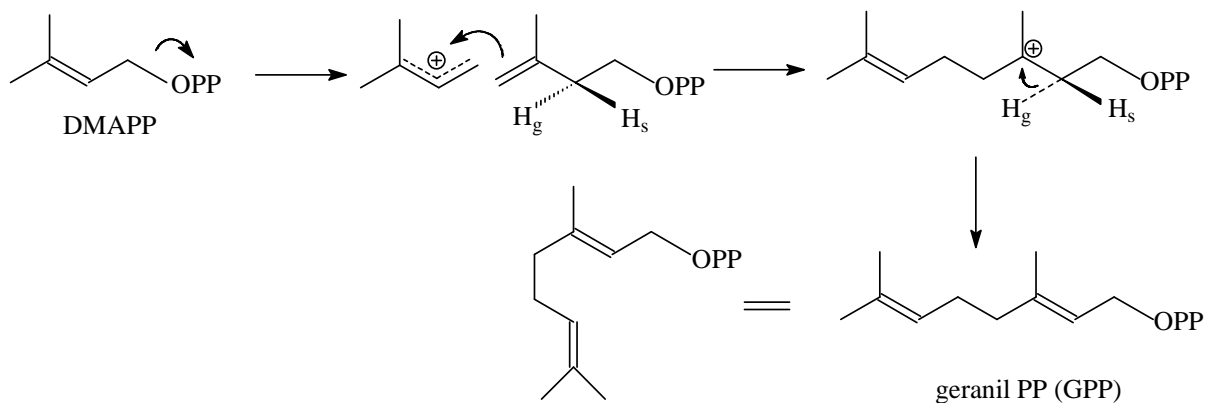
- monoterpene:
 - regularne (isparljivi monoterpeni su sastojci etarskog ulja i oleorezina, a neisparljivi monoterpeni su iridoidi, aglikoni gorkih heterozida i valepotrijati),
 - iregularne (javljaju se u piretrinima),
- seskviterpene (isparljivi seskviterpeni su sastojci etarskih ulja, a neisparljivi se najčešće javljaju u obliku seskviterpenskih laktona),
- diterpene (sastojci su smola, a javljaju se i kao alkaloidi),
- triterpene (sastojci su smola, a javljaju se i kao slobodni, kao sapogenini saponozida i aglikoni heterozida),
- tetraterpene (karotenoidi),
- politerpene (prave gume, kaučuk).

Na slici 2.3. su prikazani primeri jedinjenja nastalih biosintetskim putem mevalonske kiseline, kao predstavnici različitih klasa terpenoida. Inače, u biljkama, terpenoidi se javljaju kao slobodna jedinjenja, heterozidi, saponozidi, odnosno kao isparljivi sastojci biljaka.

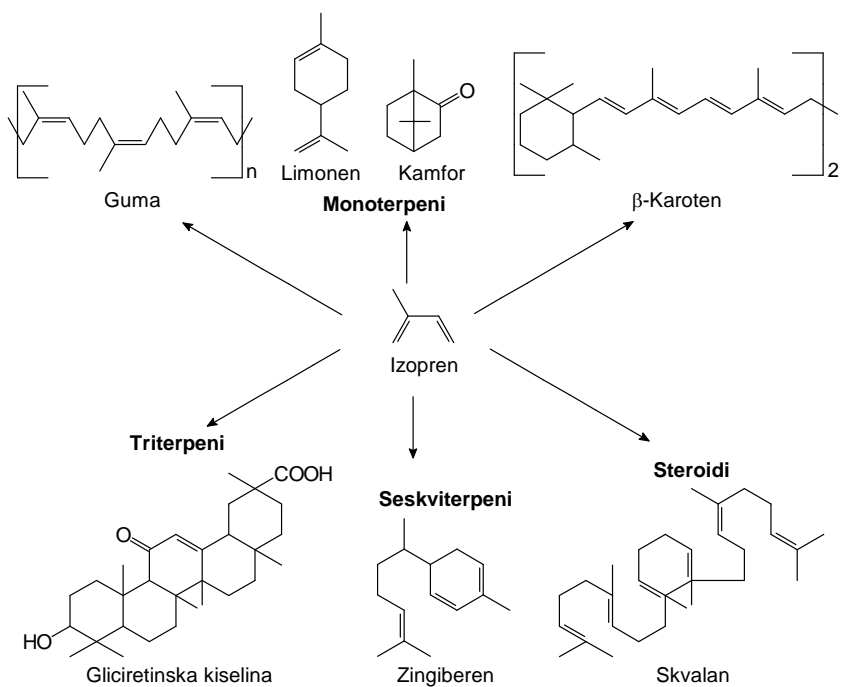
Takođe, terpenški molekuli (sekologanin) su uključeni u sintezu i sastavni su deo molekula nekih alkaloida (emetin, rezerpin...). Mnoga jedinjenja terpenške prirode poseduju značajnu farmakološku aktivnost i nosioci su lekovitosti droga (Zhang i Demain,2005).



Slika 2.1. Biosinteza dimetilalilpirofosfata (DMAPP) iz acetil-CoA.



Slika 2.2. Biosinteza geranil-pirofosfata (GPP) kuplovanjem izoprenskih jedinica po principu “glava-rep“.

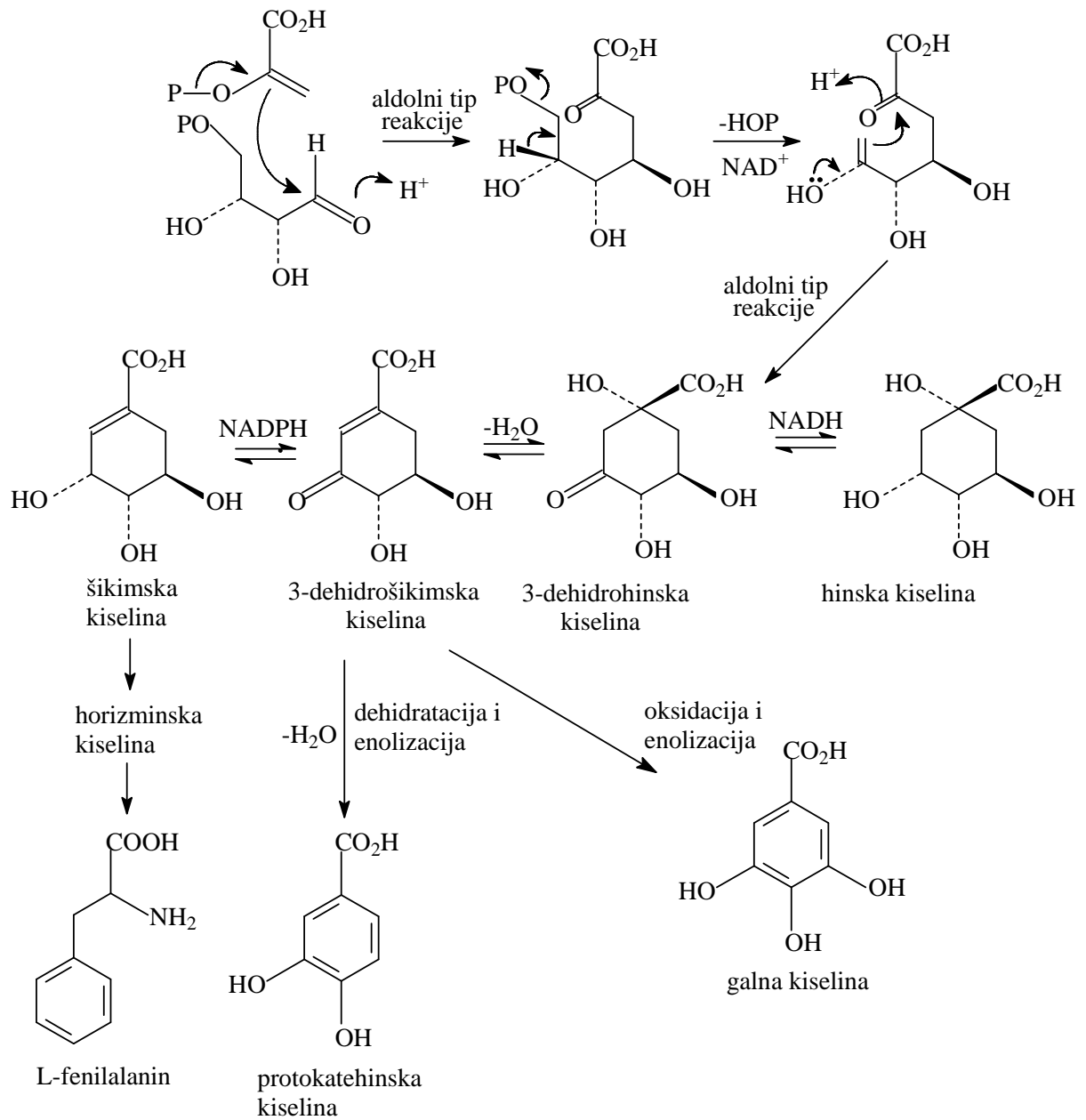


Slika 2.3. Primeri jedinjenja nastalih biosintetskim putem mevalonske kiseline, kao predstavnici različitih klasa terpenoida.

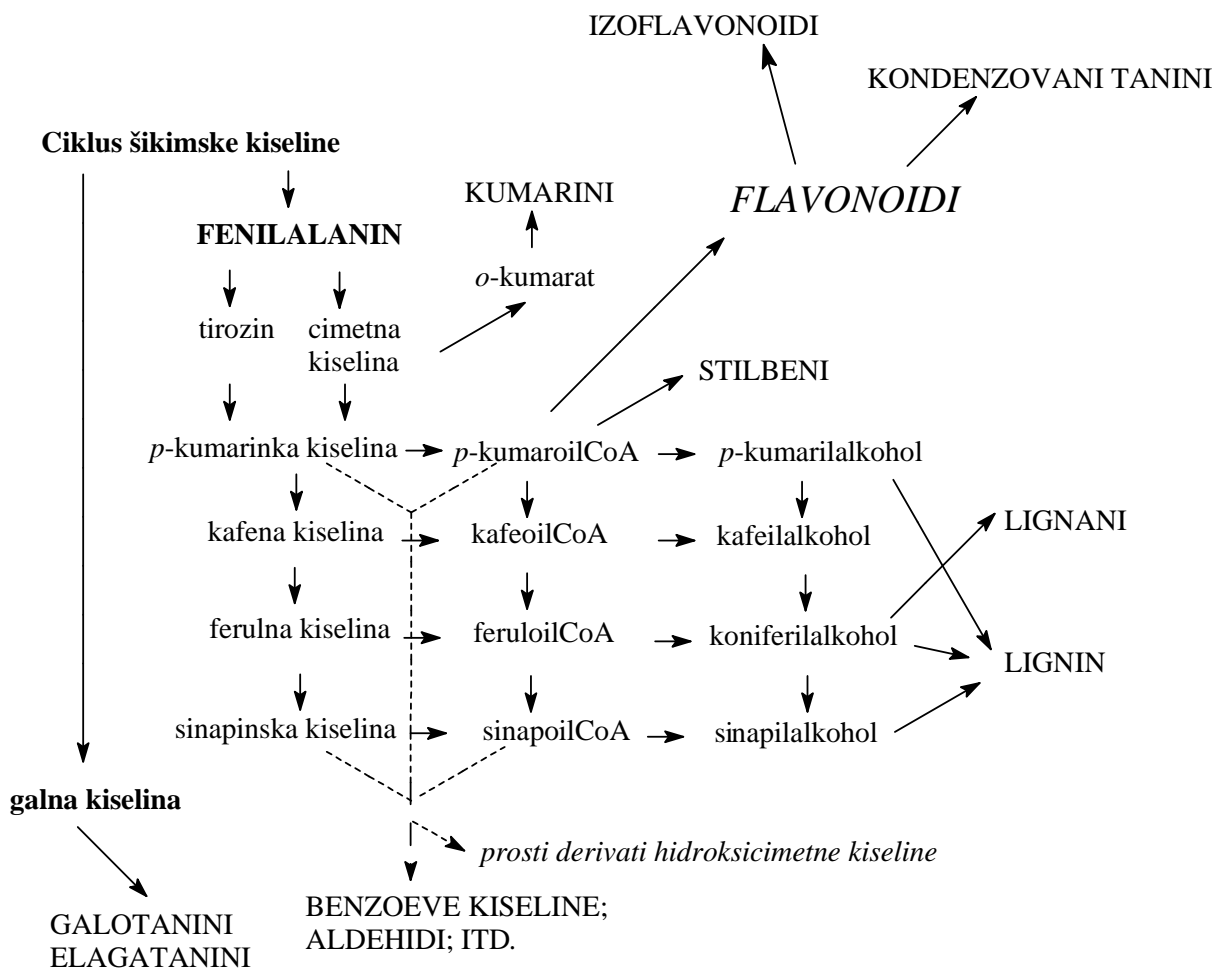
2.1.2 Metabolički put šikimske kiseline

Biljne fenole kao hemijska jedinjenja karakteriše najmanje jedan aromatični prsten (C₆) za koji je vezana jedna ili više hidroksilnih grupa. U biljkama je do danas identifikovano više hiljada fenolnih jedinjenja.

Metabolički put šikimske kiseline predstavlja glavni hemizam biosinteze fenolnih jedinjenja u biljkama, pri čemu pored nastajanja aromatičnih aminokiselina kao međuproizvoda nastaje galna, protokatehinska i cimetna kiselina (**Slika 2.4.**). Ciklus počinje reakcijom fosfoenolpiruvata (PEP) i D-eritroza-4-fosfata u kojoj nastaje 3-dezoksi-D-arabino-7-fosfat-heptulosonska kiselina (DAHP). Nizom veoma složenih biohemijskih reakcija nastaje šikimska kiselina iz koje nastaje fenilalanin (Dewick, 2002). Fenilalanin, nastao tokom ciklusa šikimske kiseline, deaminacijom u prisustvu fenilalaninamoniumliaze daje cimetnu kiselinu, koja se dalje transformiše do ostalih C₆-C₃ fenilpropanoida, kumarinske, kafene, ferulne i sinapinske kiseline i njihovih derivata (Parr i Bolwell, 2000) (**Slika 2.5.**). Kumarini nastaju iz cimetne kiseline preko *trans*-2 kumarinske kiseline, ciklizacijom koja obuhvata neenzimsku transformaciju prirodnog *trans*-oblika u *cis*-izomer. Redukcijom ferulne kiseline nastaje koniferil alkohol, važan prekursor lignina.



Slika 2.4. Biosinteza fenolnih jedinjenja ciklusom šikimske kiseline.



Slika 2.5. Šematski prikaz porekla različitih fenolnih jedinjenja iz jednostavnih fenilpropanoida.

2.1.3 Acetogeninski put biosinteze

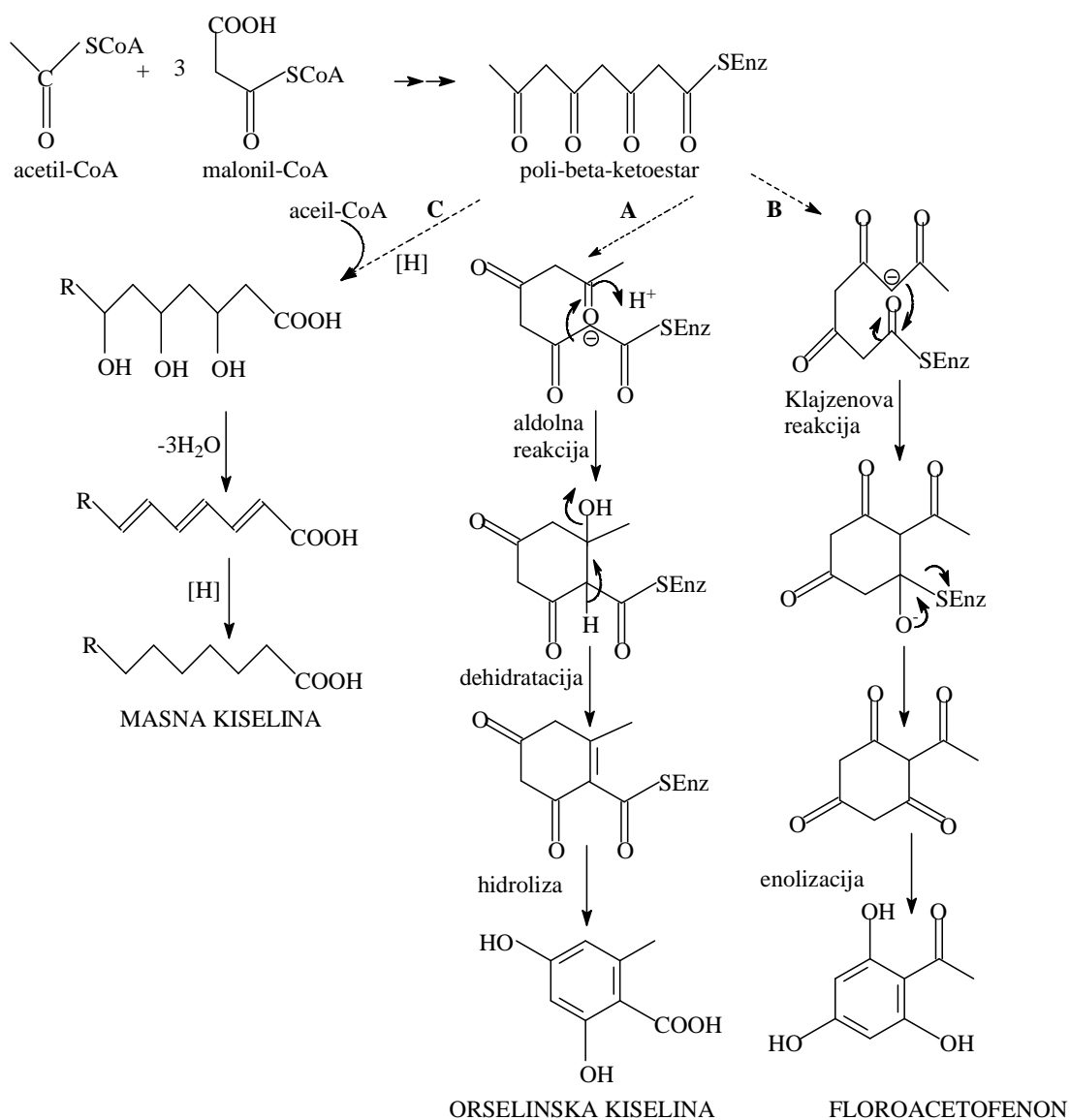
Osim metaboličkim putem šikimske kiseline, fenolna jedinjenja u biljkama mogu nastati i acetogeninskim putem. Na ovaj način nastaju hromoni, izokumarini, orcinoli, depsidi, depsidoni, ksantoni, hinoni.

Malonil-CoA nastaje karboksilovanjem acetil-CoA pod dejstvom acetil-CoA karboksilaze. Kondenzacijom jednog molekula acetil-CoA sa tri molekula malonil-CoA, nizom reakcija katalizovanih enzimima, nastaje poli-beta-ketoestar (**Slika 2.6.**)

Poli-beta-ketoestar, nastao iz četiri acetatne jedinice, može da se uvija na dva načina, A i B. Kod uvijanja tipa A jonizacija α -metilenske grupe omogućava aldolnu adiciju na C-

atomu udaljenom za šest mesta u lancu, dajući tercijarni alkohol. Dehidracijom nastaje alken, a dalja enolizacija je favorizovana zbog nastajanja aromatičnog prstena. Hidrolizom tioestarske grupe nastaje orselinska kiselina.

Kod uvijanja tipa B, nastali poliketoestar dozvoljava Klajzenovu reakciju, koja završava odvajanjem tioestarske grupe. Enolizacijom cikloheksatriona nastaje floroacetofenon (Shen, 2003).

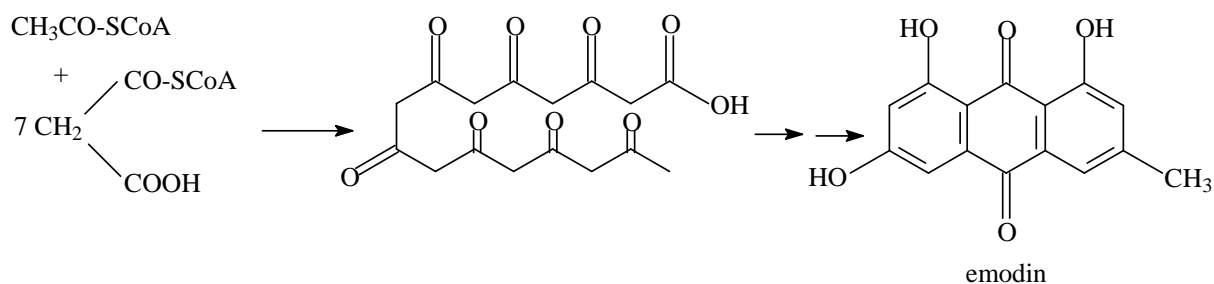


Slika 2.6. Acetogeninski put: biosinteza orselinske kiseline i floroactofena.

Poli-beta-ketoestar, može se redukovati i do masnih kiselina (reakcioni put C). U tom slučaju kondenzacija sa molekulima acetyl-CoA se može nastaviti do niza od 16 ili 18 C-atoma (palmitinska ili stearinska kiselina).

Korišćenjem acetata sa obeleženim ^{14}C -atomom je dokazano da acetogeninskim putem nastaju i poliketidi (antrahinoni, aflatoksini, makrolidi) (Bick i Rhee, 1965).

Emodin je tipičan poliketidni antrahinon, koji je ujedno i široko rasprostranjen u gljivama i lišajevima, kao i u višim biljkama gde je do sada identifikovan u 17 familija (Rhamnaceae, Liliaceae, Vitaceae, Actinidiaceae...) (Izhaki, 2002). Sa stanovišta biosinteze, emodin je ključni intermedijer pri biosintezi velikog broja jedinjenja, kao što su monomerni i dimerni antrahinoni, ksantoni i benzofenoni (Chen i sar., 1992). Tokom biosinteze emodina, nastaje emodinantron kao C16 ciklizacioni proizvod oktaketometilenskog intermedijera, koji se oksidacijom konvertuje do emodina (**Slika 2.7.**) (Chen i sar., 1992). Osim na ovaj način, hinoni u biljkama mogu nastati i putem mevalonske i horizminske kiseline, kao i putem 4-hidroksibenzojeve kiseline (Chen i sar., 1992).



Slika 2.7. Biosinteza emodina poliketidnim putem.

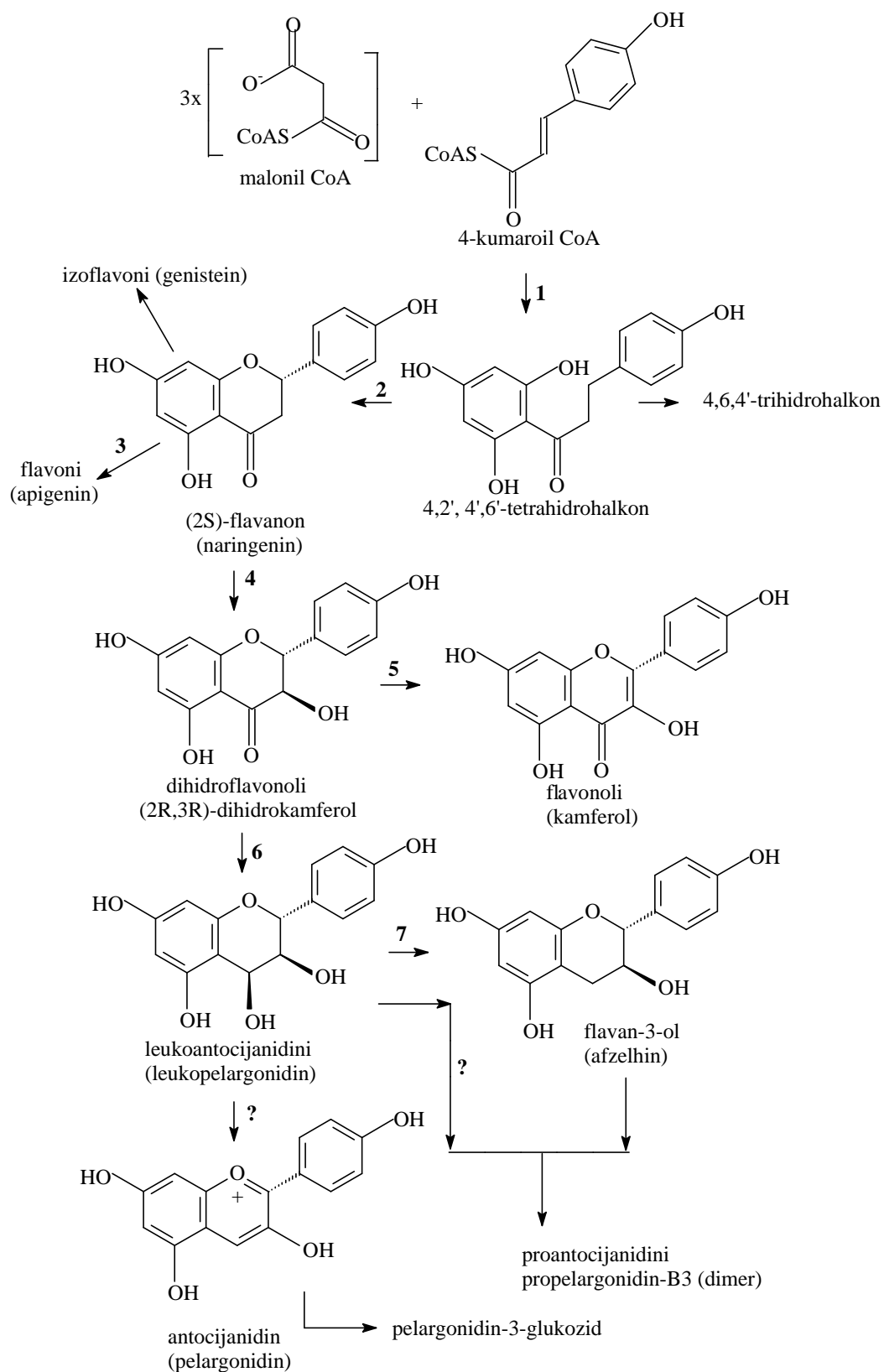
2.1.4 Biosinteza flavonoida

Flavonoidi su zbog mnogobrojnih funkcija u prirodi i široke rasprostranjenosti u biljnom svetu da sada najbolje proučeni sekundarni molekuli biljaka. Od ukupnog ugljenika kojeg biljke iskoriste u fotosintezi, 2% ulazi u sastav flavonoida i njihovih derivate. Iako 40 do 50% mahovina i lišajeva sintetizuje flavonoide, oni se uglavnom nalaze u biljkama mlađim od 460 miliona godina i što je evolutivni stadijum biljne vrste viši veća je i tendencija biosinteze flavonoida (Mimica-Dukić, 1992).

Flavonoidi nastaju mešovitim biosintetskim putem. Prsten A i C nastaju acetogeninskim putem, a prsten B putem šikimske kiseline. Prvi prekursori tokom biosinteze flavonoida su nestabilni halkoni, koji izomerizacijom daju odgovarajuće flavanone (**Slika 2.8.**). Daljim složenim biohemijskim reakcijama, u prisustvu tri različite oksigenaze, nastaju i ostale grupe flavonoida (Lea i Leegood, 1999).

Strukturna raznolikost flavonoida rezultat je brojnih modifikacija osnovne skeletne strukture koje su uslovljene reakcijama hidrogenacije, hidroksilacije, O-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezivanja neorganskog sulfata i glikolizacijom hidroksilnih grupa (O-glikozidi) ili flavonoidnog jezgra (C-glikozidi) (Mimica-Dukić, 1992).

Metabolički putevi sekundarnih biomolekula su izuzetno složeni. Najčešće objedinjuju više različitih mehanizama koji se međusobno prepliću. Enzimi uključeni u ove mehanizme uglavnom su pod uticajem spoljašnjih faktora, a putevi regulacije ovih enzima danas predstavljaju značajno područje naučnih istraživanja, budući da su mnogi produkti sekundarnog metabolizma biljaka od vrlo velike važnosti, posebno za farmaceutsku i prehrambenu industriju (Zhang i Demain, 2005).



Slika 2.8. Biosinteza flavonoida u biljkama.

2.2 LEKOVITE BILJKE - HEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST

2.2.1 *Rhamnus frangula* L. (Rhamnaceae)- krušina

Krušina, u narodu još poznata i kao trušljika, je listopadno drvo u obliku žbuna, visine 3-6 m, poreklom iz Evrope i zapadne Azije. Listovi su naizmjenični, izduženo eliptični, dugački 12-13 cm, široki 7 cm. Liska je pri vrhu naglo sužena, zašiljena ili zaobljena, sa klinolikom ili zaobljenom osnovom, sa celim obodom, na naličju sa izraženom perastom nervaturom. Cvetovi su sitni, zvonasti, neugledni i belo zeleni. Cveta u maju i junu. Plodovi su okrugli, oko 7 mm u prečniku, najpre zeleni, potom crveni i najzad crni.

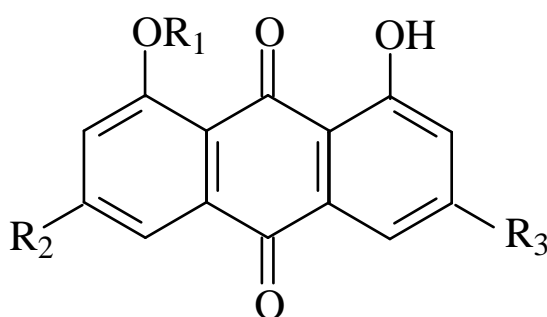


Kora je glatka i sjajna, crna ili sivo mrka i karakteristično ukrašena mnogobrojnim vodoravnim, svetlim, beličastim lenticelama. Krušina se lako gaji, najbrže i najjednostavnije vegetativnim putem: mladicama, mladim grančicama, slično zovi, vrbi i jablanu. Kora (*Frangulae cortex*) se skida sa mladih stabala i debljih grana krajem zime i početkom proleća pre nego što krušina olista i odmah se suši. Iseku se u vrpce dugačke oko 30 cm i ljušte. Dozvoljeno je skinuti maksimalno 30% kore sa biljke. Do sledećeg sakupljanja treba da prođu najmanje tri godine. Pre upotrebe kora krušine treba da odstoji godinu dana. Čuva se u jutanim vrećama.

Frangula se daje u obliku tečnog ili suvog ekstrakta ili dekokta (5 do 25 g na pola litra vode) kao pouzdan laksativ (Evans, 1996; Bruneton, 1999), naročito protiv hroničnog zatvora. Njen ukus je manje neperijatan od puršijane, zbog čega je bolesnici rađe uzimaju. Prave se čajevi za bol u predelu srca, nagomilavanje vazduha u želucu ili crevima, kolike u žučnoj kesii, izostale menstruacije i protiv hroničnog zatvora (Blumenthal i sar.,2000).

2.2.1.1 Hemijski sastav

Krušina je klasifikovana kao antrahinonska biljka, čiji udeo varira od 3 do 7% (Van den Gorkom i sar., 1999; Thomson, 1997). Najznačajniji antrahinoni krušine su glukofrangulini A i B (bis-glikozidi) kao i monoglikozidi frangulin A (emodin-6-*O*-ramnozid) i frangulin B (emodin-6-*O*-apiozid). Pored ovih zastupljeni su i emodin, rein, hrizofanol i aloe-emodin, kao i njihovi glikozidi (Gao i sar., 2009) (**Slika 2.9.**). Osim toga, kao sastavne komponente prisutni su i diantroni, flavonoidi i tanini, kao i male količine alkaloida (frangulanin i franganin).



Aglikoni			
R₁	R₂	R₃	Naziv
H	OH	CH ₃	Emodin
H	H	CH ₃	Hrizofanol
H	OCH ₃	CH ₃	Fiscion
H	H	CH ₂ OH	Aloe-emodin
H	H	COOH	Rein
Glikozidi			
glukoza	OH	CH ₃	Emodin 8- <i>O</i> -glukozid
H	O-ramnoza	CH ₃	Frangulin A
glukoza	O-ramnoza	CH ₃	Glukofrangulin A
H	O-apioza	CH ₃	Frangulin B
glukoza	O-apioza	CH ₃	Glukofrangulin B

Slika 2.9. Antrahinonska jedinjenja krušine.

U svežoj kori krušine antrahinonski glikozidi se nalaze u redukovanoj formi, u obliku antron *O*-glikozida, za koje je dokazano da nakon oralne primene dovode do niza neželjenih efekata. Kako bi se omogućila njihova oksidacija, neophodno je da kora krušine odstoji najmanje godinu dana. Tokom perioda stajanja od godinu dana dolazi i do delimične

razgradnje glukofrangulina do frangulina ili emodin 8-*O*-glukozida, kao i do slobodnog aglikona emodina.

2.2.1.2 Biološka i farmakološka aktivnost

Antrahinonske biljne droge se od davnina koriste kao laksativi. Purgativni efekat antrahinona je uslovljen postojanjem hidroksilnih grupa u položaju 1 i 8 aromatičnog prstena (Paneitz i Westendorf, 1999). Antrahinon glikozidi se ne apsorbiraju u crevima sisara, već se transportuju do debelog creva, gde se pod dejstvom bakterijskih β -glikozidaza vrši oslobađanje aglikona, kao i njihova redukcija do antrona i antranola, koji se delimično apsorbiraju. Ne postoje precizni podaci o daljoj distribuciji antrahinon aglikona po organima, ali je dokazano da se njihova ekskrecija vrši putem urina u vidu glukuronida ili sulfata. Derivati 1,8-dihidroksi-antracena ispoljavaju najsnažniji laksativni efekat. *Frangulae cortex* spada u stimulatívne laksative. Dokazano je da antrahinoni stimulišu pokretljivost creva, kao i da sprečavaju resorpciju vode i elektrolita (Na^+ , Cl^-) u epitelne ćelije creva. Istovremeno dolazi i do sekrecije vode u lumenu creva zbog porasta permeabilnosti epitela debelog creva (Rauwald 1998; Mueller i sar., 1999; Van der Gorkom et al, 1999).

Veliki broj podataka ukazuje na raznovrsnu biološku aktivnost emodina, koji utiče na imuni i vazomotorni sistem, na razne metaboličke procese kao i na interakcije između biljka i životinja (Trial i Dimond 1979; Wells i sar., 1975). Molekularni mehanizmi delovanja u većini slučajeva nisu poznati ili su podaci kontradiktorni (Izhaki, 2002).

Tako, na primer, Huang i sar. (1992) ukazuju na imunosupresivnu, dok Boik (1995) ukazuje na imunostimulativnu aktivnost emodina. Goel i sar. (1991), Dwivedi i sar. (1988) i Chang i sar. (1996) emodinu pripisuju antiinflamatornu i analgetičnu, dok Westendorf i sar. (1990), Mueller i Stopper (1999) i Van den Gorkom i sar. (1999) emodinu pripisuju mutagenu i genotoksičnu aktivnost.

Chang i sar. (1999) su utvrdili da emodin može da vrši reparaciju štete na DNA uzrokovane UV-zračenjem.

Takođe, postoje i relevantni naučni dokazi za postojanje laksativne (de Witte, 1993; Rauwald, 1998; Van den Gorkom i sar., 1999), diuretične (Zhou i Chen, 1988), vazorelaksativne (Huang i sar., 1991), kardiostimulativne (Dwivedi i sar., 1988), antitumor (Koyama i sar., 1988; Su i sar., 1995 ; Sun i sar., 2000) aktivnosti emodina. Osim toga pokazano je da emodin vrši indukciju kontrakcije mišića (Cheng i Kang, 1998), da je

inhibitor protein tirozin kinaze (Jayasuriya i sar., 1992), da je depresant centralnog nervnog sistema (Dwivedi i sar., 1988; Ram i sar., 1994), kao i da potpomaže oslobađanje kalcijuma u ćelije mozga (Lin i Jin, 1995).

Pojedini naučni dokazi ukazuju da emodin smanjuje sadržaja lipida i poboljšava rad jetre (Boik 1995; Yutao i sar., 2000). Veliki broj radova svedoči i o antimikrobnoj aktivnosti emodina, koja uključuje antibakterijsku, antifungalnu, antiparazitsku i antiviralnu aktivnost (Anke i sar., 1980; Kawai i sar.,1984 ; Le Van, 1984; Barnard i sar., 1992; Singh i sar., 1992; Wang, 1993; Wang i Chung,1997).

2.2.1.3 Antrahinoni kao antioksidanti i oksidanti

Literaturni podaci vezani za antioksidantna svojstva antrahinona su takođe kontradiktorni. Poznato je da fotoekscitacijom antrahinoni prelaze u pobuđeno tripletno stanje (Levin i Kuzmin, 1987) koje može izazvati oksidacione promene na DNA i RNA (Armitage i sar., 1994). Pokazano je da transferom elektrona sa NADH mogu nastati antrahinon anjon radikali, koji mogu izazvati nastajanje superoksid anjon radikala i vodonik peroksida (Reszka i sar., 1988). Osim toga, prenosom energije iz tripletnog stanja, antrahinoni mogu izazvati i nastanak singlet kiseonika.

Suprotno ovome, pokazano je da emodin poseduje sposobnost inhibicije stvaranja superoksid anjon radikala, koja je u rangu aktivnosti kvercetina (Ng i sar., 2003), kao i da antrahinoni inhibišu peroksidaciju linolne kiseline (Yen i sar., 2000). U svojim naučnim radovima Yuan i Gao (1997) i Yen i sar. (2000) takođe ukazuju na antioksidantna svojstva antrahinona.

2.2.2 *Mentha x piperita* L. (Lamiaceae) – pitoma nana ili menta

Dobijena veštačkom selekcijom (hibrid *Mentha aquatica* L. x *Mentha spicata* L.), pitoma nana je višegodišnja zeljasta biljka jakog i oštrog mirisa sa snažnim rizomima. Stabljike su uspravne, visoke 30-100 cm, razgranate i četvorouglaste, često crvenkaste. Agregati cvasti su isprekidani, klasoliki ili glavičasti. Cvetovi su ljubičasti, sterilni (obično su prašnici abortirali). Cveti od aprila do juna. Listovi su dugački 3-9 cm, jajastokopljasti, tanki, sa gornje strane tamnozeleni, a sa donje bleđi, pri dnu se sužavaju u drške dugačke do 1 cm.



Po obodu su nejednako zupčasti. Glavni nerv je vrlo istaknut. Nana je vrlo mirisna, osobito list, jer u njemu ima najviše etarskog ulja, od čega uglavnom i potiču lekovitost i prijatan miris ove biljke. Nana se gaji širom sveta (Scora i Chang, 1997), a kod nas, naročito u Banatu, Bačkoj i centralnoj Srbiji. Kao i ostali hibridi, i pitoma nana se ne razmnožava semenom, nego samo vegetativnim putem: stalonima. Kad se jednom primi, nana se, slično jagodi, brzo širi i pokrije zemlju mnogobrojnim izdancima izraslim iz razgranatih podzemnih stabala, rizoma. Suviše mlada nana daje ulje slabog kvaliteta s malo mentola, a mnogo mentona. Precvetala biljka daje manje ulja i lošijeg kvaliteta (Jančić i sar., 1995). Menta se gaji uglavnom radi lista (*Menthae piperitae folium*) i stabljike s listovima (*Menthae piperitae herba*), odnosno etarskog ulja (*Menthae piperitae aetheroleum*). Etarsko ulje se dobija destilacijom sveže herbe nane.

Tradicionalno, pitoma nana se upotrebljava kao prijatan, blag i neškodljiv lek za umirivanje, protiv gasova, nadimanja i grčeva, protiv teškog varenja. Kao stomahik, nana ulazi u sastav čajeva za lečenje žuči. Nanino ulje ima slaba anestetička svojstva i prijatan miris koji osvežava, zbog čega se upotrebljava i protiv gađenja i povraćanja. Rastvor ulja u alkoholu koristi se protiv bolova od neuralgije, reumatizma i nazeba. Mentol draži nerve u koži, lako isparava i zbog toga hladi. Pitoma nana je potpuno neškodljiva, korisna je protiv

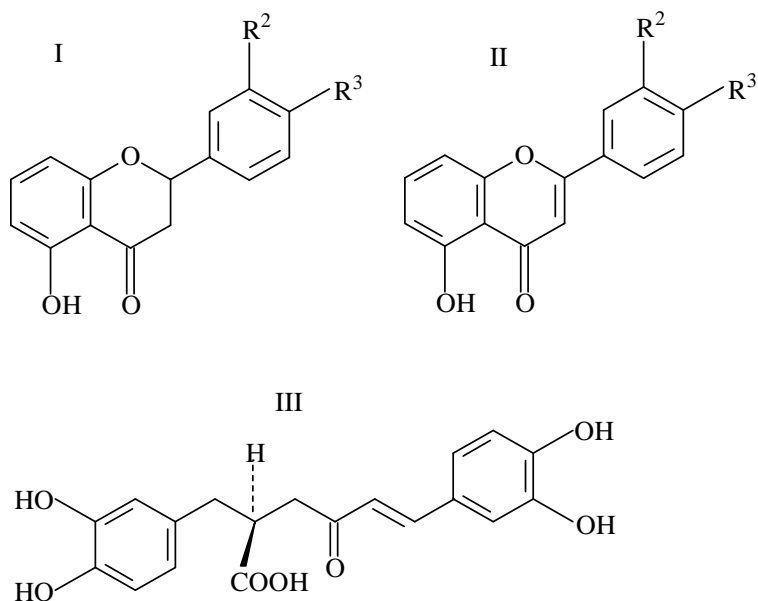
mučnine tokom putovanja, što je od posebnog značaja za osobe s poremećenim varenjem, grčevima, neprijatnim zadahom iz usta (Bisset i Wichtl, 2001).

2.2.2.1 Hemijski sastav

Biljka sadrži oko 1,25 % etarskog ulja, a od toga 50 do 90 % je mentol i 5 do 20 % menton. Rohloff (1999) je došao do zaključka da se sadržaj mentola, mentil acetata i neomentola povećava kod starijih, dok je sadržaj mentona i izomentona veći kod mlađih biljaka. Tokom biosinteze komponenata etarskog ulja pitome nane (**Slika 2.10.**) geranilpirofosfat se transformiše u (-)-limonen, iz koga preko (-)-izopiperitenona nastaje pulegon, iz koga može nastati menton i/ili mentofuran (Dey and Harbone, 1997; Croteau i sar., 2000; Davis i sar., 2005). Iz mentona nastaje neomentol i mentol, koji se esterifikacijom transformiše u mentil acetat (Murray, 1972).

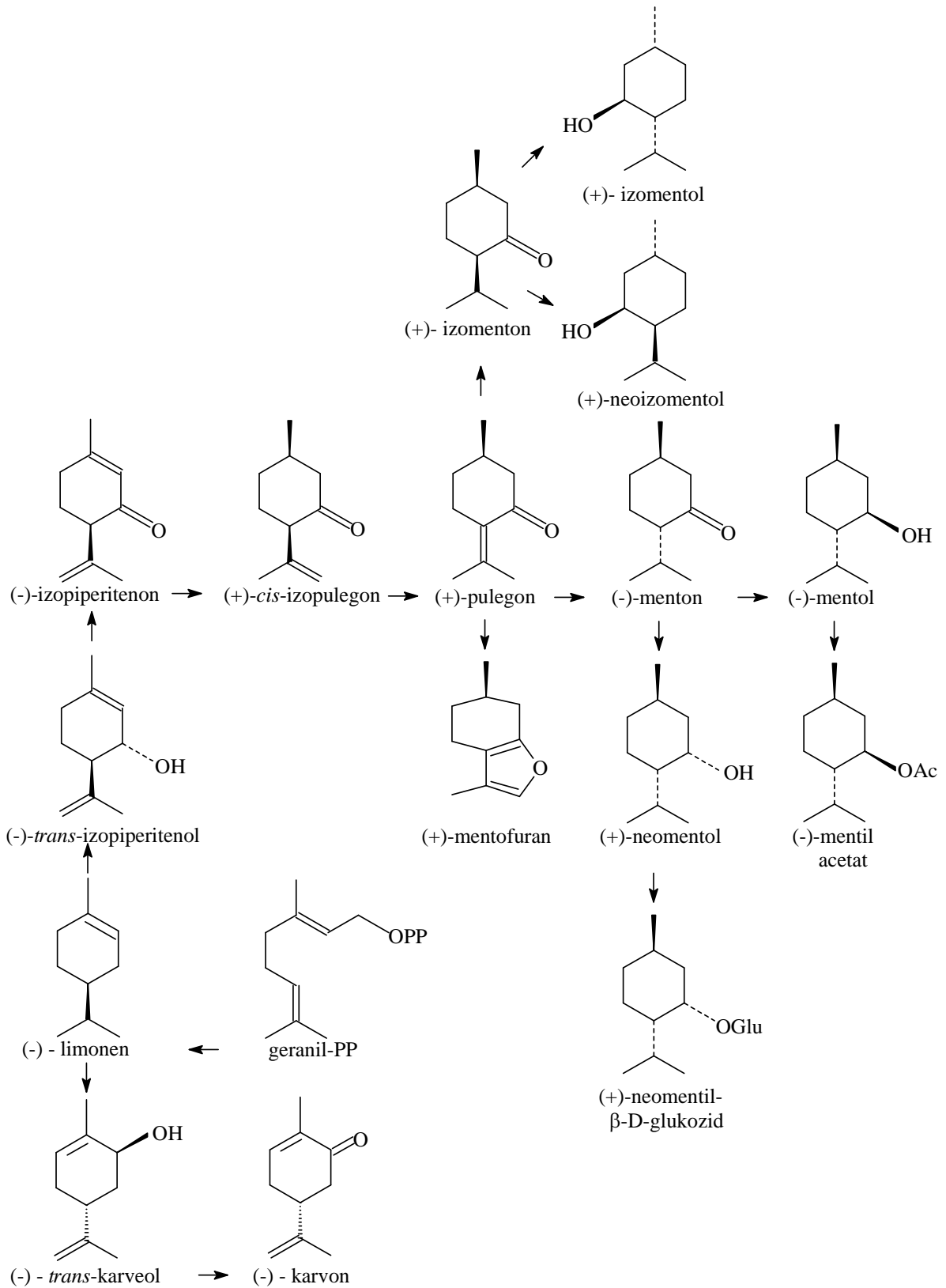
Sastav etarskog ulja u velikoj meri zavisi od geografskih i klimatskih uslova sredine, faze prikupljanja biljnog materijala, kao i od načina sušenja i destilacije (Marotti i sar., 1993; Mimica-Dukić i sar., 2003; Scavroni i sar., 2005).

Poznato je da vrste roda *Metha* sadrže veliki broj jedinjenja uključujući fenil propanoide (Triantaphyllou i sar., 2001; Areias i sar., 2001; Guédon i Pasquier, 1994), aglikone u formi glikozida ili acilovane flavonoide (Areias i sar., 2001; Guédon i Pasquier, 1994; Voirin i Bayet, 1992; Voirin i sar., 1994), kao i steroidne glikozide (Ali i sar., 2002). Fecka i Turek (2007) su analizom fenolnih jedinjenja lista pitome nane ustanovili veliki sadržaj kafene kiseline i njenih derivata, kao što su litospermična, ruzmarinska i hlorogenska kiselina i metil rozmarinat, čiji sadržaj dostiže vrednost i do 7%. Flavonoidi pitome nane su zastupljeni u obliku lipofilnih polisupstituisanih flavon glikozida (*O*-metilovani apigenin i luteolin) i kao flavon i flavanon glikozida, čiji sadržaj ponekad doseže i do 17% (Mimica-Dukić i Božin, 2008). Dorman i sar. (2003) su ustanovili da su najzastupljenija fenolna jedinjenja pitome nane eriocitrin (eriodiktol-7-*O*-rutinozid), luteolin-7-*O*-glikozid i ruzmarinska kiselina (**Slika 2.11.**). Osim toga utvrdili su i prisustvo kafene kiseline i naringenin-7-*O*-glikozida, dok su slobodne aglikone apigenin, luteolin i eriodiktol pronašli tek u tragu.



Jedinjenje	Aglikon	R ¹	R ²	R ³
eriocitrin	I	O-rutinoza	OH	OH
eriodiktol 7-O-glukozid	I	O-glukoza	OH	OH
luteolin 7-O-rutinozid	II	O-rutinoza	OH	OH
narirutin	I	O-rutinoza	H	OH
hesperidin	I	O-rutinoza	OH	OCH ₃
izoroifolin	II	O-rutinoza	H	OH
diozmin	II	O-rutinoza	OH	OCH ₃
ruzmarinska kiselina	III			

Slika 2.11. Fenolna jedinjenja pitome nane (Guédon i Pasquier, 1994).



Slika 2.10. Biosintetski put komponenata etarskog ulja pitome nane.

2.2.2.2 Biološka i farmakološka aktivnost

Etarsko ulje nane pokazuje snažnu antimikrobnu aktivnost prema velikom broju patogenih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, kao i prema različitim sojevima plesni (Mimica-Dukić i sar., 2003; Mimica-Dukić i Božin, 2008). Antimikrobna aktivnost uključuje i snažno delovanje protiv vrlo rezistentnih bakterija, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhi* za koje je poznato da su vrlo otporne čak i na delovanje sintetskih preparata. Osim toga etarsko ulje nane pokazuje i fungicidno i fungistatsko delovanje naročito prema vrsti *Candida albicans* (Gulluce i sar., 2007). Postoje naučni dokazi da mentol može pružiti zaštitu i od *Herpes simplex* virusa (Schuhmacher i sar., 2003).

Osim antimikrobne aktivnosti etarsko ulje nane, mentol i njegovi derivati pokazuju i značajnu insekticidnu aktivnost, naročito protiv komaraca (Samarasekera i sar., 2008).

Etarsko ulje pitome nane utiče na fiziologiju gastrointestinalnog trakta, pa se shodno tome može uspešno primenjivati kao antispazmolitik prilikom tretiranja pacijenata barijumovom kašom u dijagnostičke svrhe, kao i kod pacijenata sa dispepsijom (Melzer i sar., 2004; Mizuno i sar., 2006).

Tradicionalna upotreba pitome nane, kao i upotreba u zvaničnoj medicini je u uskoj vezi i sa velikim sadržajem fenolnih jedinjenja. Dokazano je da fenolna jedinjenja nane, prisutna u ekstraktima i čajevima, takođe ispoljavaju antimikrobnu aktivnost (Fuchs i sar., 1999).

Ispitivanja su pokazala da ruzmarinska kiselina ispoljava antioksidantnu, antiinflamatornu, antimutagenu, antibakterijsku, i antiviralnu aktivnost (Parnham i Kesselring, 1985). Antiinflamatorna svojstva se pripisuju inhibiciji lipoksigenaza i ciklooksigenaza, kao i inhibiciji čitave kaskade reakcija (Parnham i Kesselring, 1985). Takođe, pretpostavlja se da ruzmarinska kiselina igra vrlo važnu ulogu u biljkama prilikom njihove odbrane od virusnih i bakterijskih infekcija, kao i od predatora. Pretpostavlja se da ruzmarinska kiselina poseduje i antikancerogenu funkciju, kao i mnoga druga jedinjenja iz klase fenola. Antioksidantna svojstva i vrlo niska toksičnost ovog biomolekula ga čine izuzetno atraktivnim za prehrambenu industriju (Petersen i Simmonds, 2003).

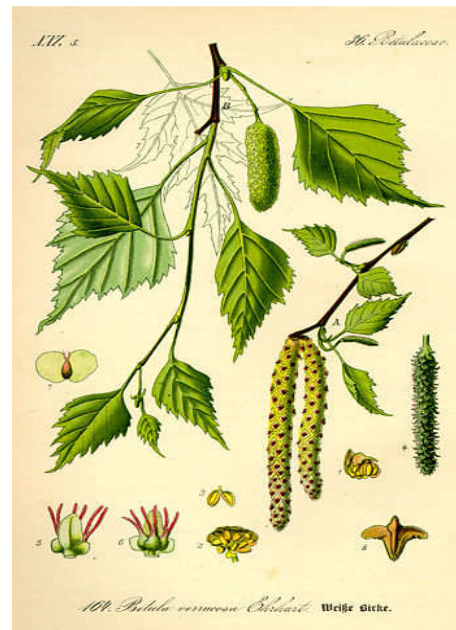
2.2.2.3 Antioksidantna aktivnost

Etarsko ulje ne samo pitome nane, već i ostalih vrsta roda *Mentha* pokazuje značajnu antioksidantnu aktivnost. Iako mehanizam delovanja do sada još nije utvrđen, smatra se da antioksidantna aktivnost potiče od prisustva monoterpenskih ketona i aldehida ili fenolnih supstanci (Mimica-Dukić i sar., 2003; Bozin i sar., 2006; Bozin i sar., 2006; Mimica-Dukić i sar., 2004; Mimica-Dukić i Božin, 2007; Mimica-Dukić i Božin, 2008).

Antioksidantna svojstva fenolnih jedinjenja pitome nane su potkrepljena velikim brojem naučnih dokaza (Mimica-Dukic et al., 1994; Fuchs i sar., 1999; Kanatt et al., 2007). Fenolna jedinjenja mente deluju kao “skevindžeri“ slobodnih radikala, helatori jona metala i vrše inhibiciju lipidne peroksidacije. Osim toga dokazano je da ova jedinjenja podižu i intracelularni antioksidantni status, povećavajući koncentraciju redukovanoog glutaciona i aktivnost superoksid dizmutaze (Berdowska i sar., 2007). Rezultati *in vitro* i *in vivo* studija ukazuju na veliki nivo zaštite ekstrakata nane protiv štete izazvane radioaktivnim zračenjem, lipidne peroksidacije, kao i oštećenja na DNA (Jagetia, 2007).

2.2.3 *Betula pendula* Roth. (Betulaceae) – breza

Breza je listopadno drvo, visoko do 30 m, sa vitkim stablom koje se pruža gotovo do vrha krošnje i tankim visećim grančicama. Prečnik stabla u donjem delu može biti do 60 cm. Kod mladih izdanaka kora je crvenkasto smeđa. Kora stabla i grana, dok su mlade, je bela i ljušti se u horizontalnim trakama, kasnije u donjem delu je crna i duboko vertikalno ispucala. Listovi su goli na dugim peteljka. U početku su malo lepljivi, trouglasto jajasti ili trouglasto romboidni, pri osnovi široko klinasti, na vrhu zašiljeni, po obodu dvostruko testerasti. Cveta od aprila do maja, paralelno sa listanjem.



Breza je široko rasprostranjena na području Evrope, kao i na području jugozapadne Azije, na planinama severne Turske i Kavkaza, gde često obrazuje čiste brezove šumice. Takođe, rasprostranjena je i na području Kanade. Za uspešno uzgajanje breze potrebna je hladnija klima, sa povremenim snežnim padavinama. Obzirom da je koren breze relativno plitak, breza zahteva navodnjavanje prilikom sušnog perioda i najbolje uspeva na direktnom suncu ili prošaranoj hladovini (Madaus, 1988; Brendler i sar., 2003).

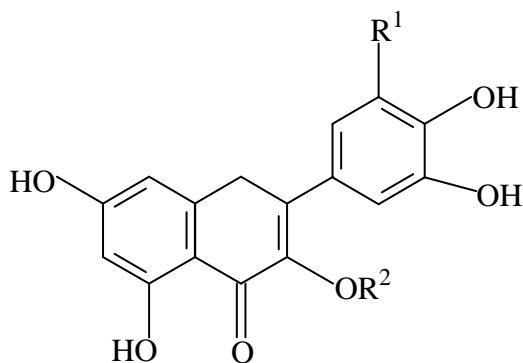
Kao lekoviti delovi biljke, koriste se sok, rese, listovi i kora. Sok se vadi krajem februara i marta, a lišće (*Betulae folium*) se bere za vreme cele vegetacije. Droga je svojstvenog mirisa, gorkog i oporog ukusa. Kora (*Betulae cortex*) se prikuplja u proleće i jesen. Lisni pupoljci (*Betulae gemmae*) sadrže mnogo eteričnog ulja (oko 4%), ali ne i vitamina C, koga ima u listovima. Etarsko ulje pupoljaka povoljno deluje na disajne puteve. Takođe se koristi i ulje dobijeno iz smole sa kore (*Betulae pix*).

List i pupoljci upotrebljavaju se kao diuretici i antiseptici urogenitalnih puteva, najčešće u obliku infuza. List breze je jedan od najboljih biljnih lekova za lečenje mokraćnih puteva, jer ima antibakterijsku moć. Spremaju se čajevi za lečenje zapaljenja mokraćnih kanala, reumatizma, i zapaljenja bubrega sa povišenim pritiskom. Zahvaljujući

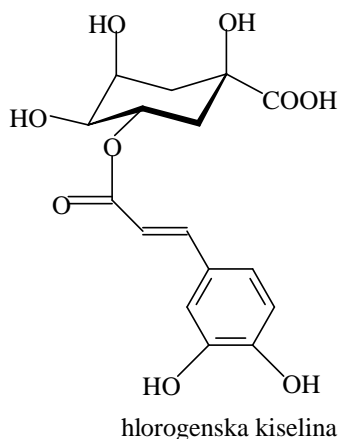
karakterističnom prijatnom mirisu, proizvodi od breze, kao što je etarsko ulje, nalaze veliku primenu u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji (Lawless, 1992; Arctander, 1960).

2.2.3.1 Hemijski sastav

Različitim fitohemijskim istraživanjima breze potvrđeno je da ona sadrži raznovrsne biomolekule, uglavnom iz klase biljnih fenola. Breza je klasifikovana kao flavonoidna biljka, jer njihov sadržaj doseže i do 3%. Dominantni flavonoid breze je hiperozid, a osim njega u brezi su zastupljeni i kvercitrin, miricetin digalaktozid i drugi glikozidi, kao i lipofilni flavonski metilestri. Takođe, poznato je da breza sadrži i značajnu količinu hlorogenske kiseline, fenolkarbonskih kiselina i tanina (Hegnauer, 1964; Pokhilo i Uvarova, 1988; Guenther, 1975; Demirci i sar., 2000^{a,b}, Demirci i Bassar, 2003).



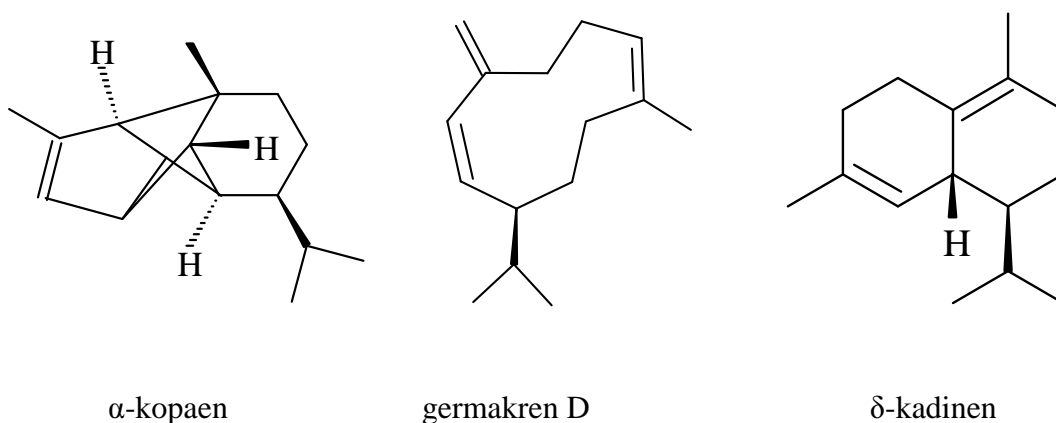
kvercetin	$R^1 = H$	$R^2 = H$
hiperozid	$R^1 = H$	$R^2 = \text{galaktozil}$
kvercitrin	$R^1 = H$	$R^2 = \text{ramnozil}$
miricetin-digalaktozid	$R^1 = OH$	$R^2 = \text{digalaktozil}$



Slika 2.12. Najznačajnija fenolna jedinjenja breze.

Na slici 2.12. su prikazana najznačajnija fenolna jedinjenja breze. Ossipov i sar. (1996) su osim hlorogenske, neo hlorogenske, galne kiseline, (+) katehina, glikozida kvercetina i miricetina u ekstraktima breze utvrdili i prisustvo niza drugih niskomolekularnih fenolnih jedinjenja.

Demirci i sar. (2004) su analizom etarskog ulja breze utvrdili prisustvo 53 komponente, od čega su najzastupljenije komponente bili seskviterpenski ugljovodonici: α -kopaen, germakren D i δ -kadinen (**Slika 2.13.**).



Slika 2.13. Najzastupljeniji seskviterpeni etarskog ulja breze dobijenog hidrodestilacijom iz lisnih pupoljaka breze.

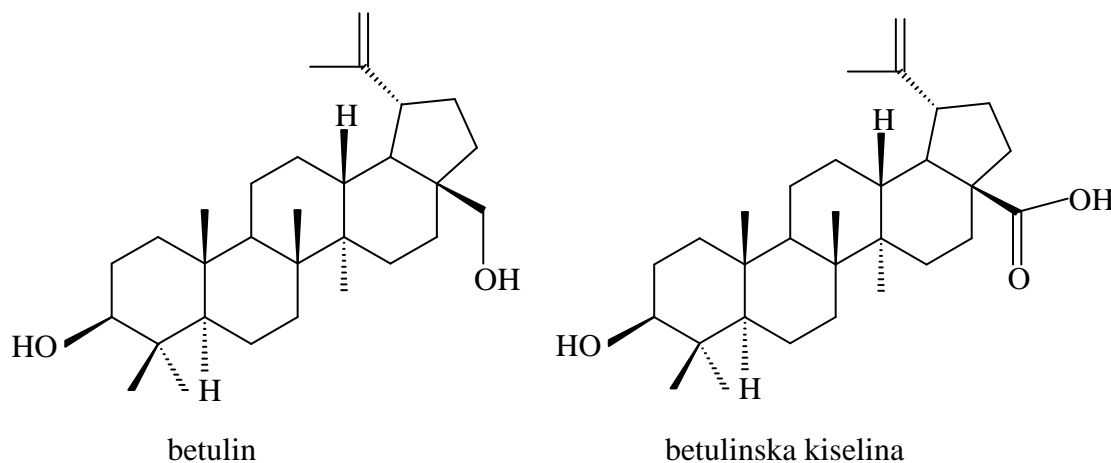
Osim seskviterpenskih ugljovodonika, u listovima breze su zastupljeni i triterpeni lupanskog i domaranskog tipa (Rickling i Glombitza, 1993). Pojednim istraživanjima je utvrđeno da su najzastupljenije komponente etarskog ulja breze lupanski triterpeni, betulenoli (Vershnyak i Stepen 1992; Demirci i sar., 2000^b; Demirci i Baser, 2003).

Najzastupljenija komponenta ekstrakta kore breze je triterpen betulin, sa udelom od 30% u suvom ekstraktu (**Slika 2.5.**) (Green i sar., 2007). Uloga ovog biomolekula u biljci nije poznata, ali je poznato da se on može konvertovati u betulinsku kiselinu, jedinjenje sa velikom biološkom aktivnošću (**Slika 2.14.**).

2.2.3.2 Biološka i farmakološka funkcija

Istraživanja ukazuju na postojanje antivirusne, antimalarične, antiinflamatorne kao i antikancer aktivnosti betulinske kiseline (Chowdhury i sar., 2002).

Pokazano je da je betulinska kiselina selektivni inhibitor humanog melanoma, korišćenjem *in vitro* i *in vivo* testova (Ji i sar., 2002), kao i da indukuje apoptozu kod nastanka ove bolesti (Schmidt i sar., 1997). Takođe, utvrđeno je da je betulinska kiselina aktivna protiv neuroektodermalnog i malignog tumora mozga, karcinoma jajnika, ćelija leukemije HL-60 (Wick i sar., 1999; Ji i sar., 2002; Zuco i sar., 2002).



Slika 2.14. Najzastupljenija triterpenska jedinjenja kore breze, betulin i betulinska kiselina.

Damaranski triterpeneni izolovani iz listova breze: damar-24-ene-3 α ,12 β ,20(S)-triol, damar-24-ene- α ,17 α ,20(S)-triol, damar-23-ene-12 β ,20(S),25-triol-3-on, damar-24-ene-3 α ,12 β ,17 α ,20(S)-tetraol i damar-25-ene-3 α ,12 β ,17 α ,20(S),24 ξ -pentaol pokazuju snažno citotoksično delovanje, koje se dovodi u vezu sa njihovom sposobnošću da menjaju strukturu ćelijske membrane (Prokof'eva i sar., 2002).

Imunoterapija polenom breze se potencijalno može koristiti za ublažavanje alergijskih tegoba kod pacijenata alergičnih na polen trave (Cirla i sar., 2003).

2.2.3.3 Antioksidantna aktivnost

Osim navedenog, dokazana je i velika antioksidantna aktivnost vodenih ekstrakata breze, koja se dovodi u vezu sa visokim sadržajem jedinjenja iz klase fenola: kvercetin 3-rutinozida (rutina), kvercetin 3-galaktozida (hiperina), kvercetin 3-glukuronida, kvercetin 3-arabinopiranozida, kvercetin 3-arabinofuranozida, kvercetin 3-ramnozida i miricetin 3-galaktozida (Trouillas i sar., 2003).

2.2.4 *Carum Carvi* L. (Apiaceae) - kim

Kim je dvogodišnja biljka sa uglastom i razgranatom stabljikom. Listovi su dvostruko perasti, a mnogi sitni listići su pršljenastog oblika. Koren kima je beo oblika šargarepe. Cvetovi su bele boje, skupljeni u štitac. Plod je duguljast i rebrast. Ima pet uzdužnih rebara u čijim udubljenjima su smešteni uljni kanali. Miris ploda jako je aromatičan. Ukus je aromatičan, prijatan i greje. Koren ima ista, ali nešto blaže izražena svojstva mirisa i ukusa. Raste kao samonikla biljka na livadama. S obzirom na veliku potražnju uzgaja se u vrtovima i na oranicama.



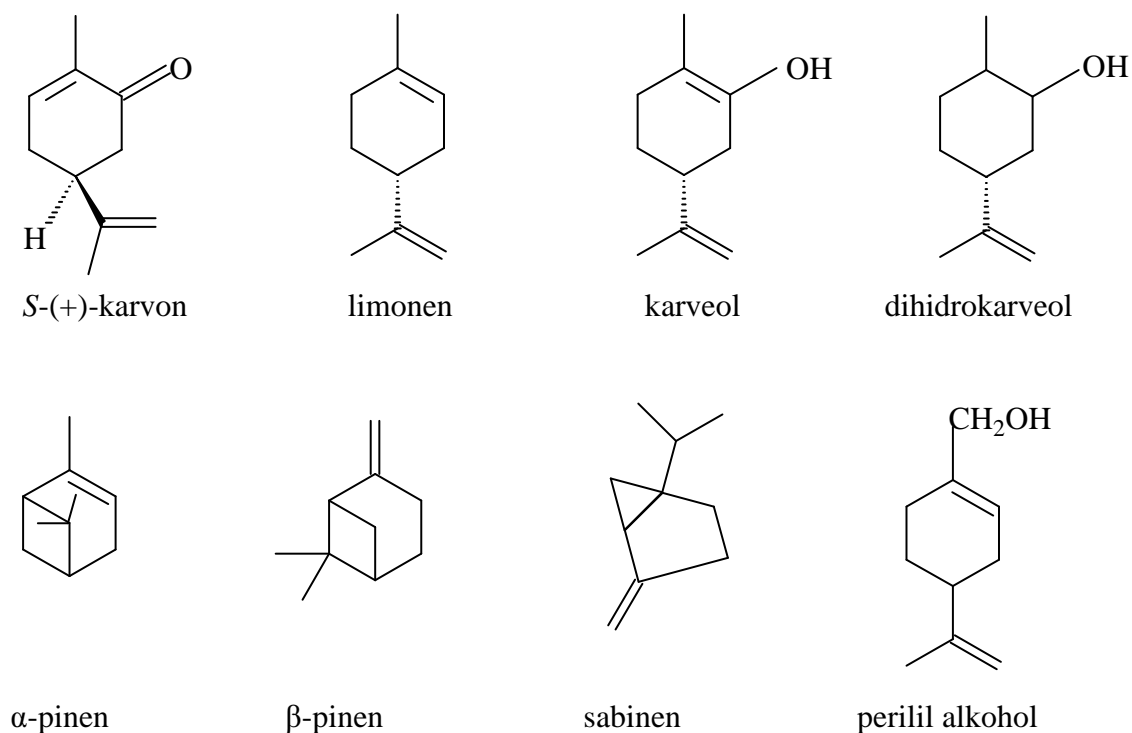
Biljka vodi poreklo iz centralne Evrope ili Azije. Danas se najviše uzgaja u Finskoj, Holandiji, istočnoj Evropi i Nemačkoj, kao i u severnoj Africi, najviše u Egiptu. U jesen, u vreme sazrevanja, bere se plod, a u proleće i koren.

Kim ima lagano podražajna svojstva, greje, jača želudac, pospešuje probavu i izlučivanje mokraćne. Kim se posebno preporučuje ženama, jer pospešuje menstruaciju i smiruje grčeve materice, olakšava porođajne bolove i sam porođaj, pospešuje izlučivanje za vreme dojenja (Holtmann i sar., 2003; Madisch i sar., 2004; Thompson Coon i Ernst 2002). Vodeni ekstrakt kima se koristi kao aperitiv, umirujuće sredstvo, karminativ, diuretik, spasmolitik i afrodizijak (Bellakhdar, 1997), dok se biljni ekstrakti i etarsko ulje koriste i kao antiulcerogeni agensi (Khayyal i sar., 2001).

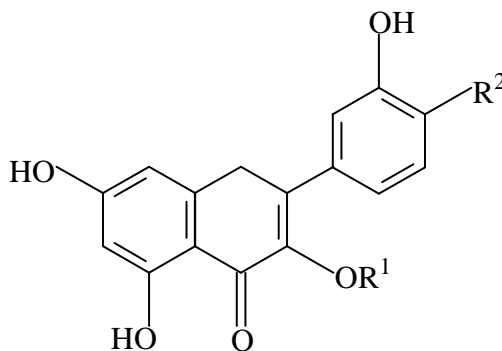
2.2.4.1 Hemijski sastav

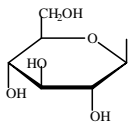
Plod kima sadrži od 25 do 35% azotnih jedinjenja, od 13 do 21% lipida sa masnokiselinskim sastavom: palmitinska 3,6%; oleinska 60,7%; linolna 19,6% i petroselinska 17,0%, od 13 do 19% vlakana i vlage od 9-13% (Sedlakova i sar., 2001). Osim toga, u plodu kima je prisutno od 3% do 7% etarskog ulja. Glavni sastojci ulja su karvon (50 do 85%) i limonen (20 do 30%). Ostale komponente: karveol, dihidrokarveol, α - i β -pinen, sabinen i perilil alkohol su od manjeg značaja (**Slika 2.15.**).

Najzastupljenije fenolne komponente kima su glikozidi kemferola i kvercetina (Suhaj i sar., 2006), od kojih je izokvercitrin, sa sadržajem od oko 80 mg/kg suve materije, dominantno jedinjenje (Slika 2.16.). Wojdyło i sar. (2007) su kvantitativnom analizom kima, nakon enzimske hidrolize, identifikovali kafenu kiselinu, neohlorogensku kiselinu, ferulnu kiselinu i izoramnetin kao glavne fenolne komponente. Osim navedenih jedinjenja u kimu su zastupljeni i kumarini, kao što su 5- i 8-psoraleni, umbeliferon, herniarin i skopoletin (Daniel, 2006).



Slika 2.15. Najzastupljenija jedinjenja etarskog ulja kima.



R ₁	R ₂	
H	OH	kvercetin
	OH	izokvercitrin
H	H	kemferol

Slika 2.16. Primeri flavonoida zastupljenih u plodu kima.

2.2.4.2 Biološka i farmakološka funkcija

Eksperimentalni podaci ukazuju na to da kim poseduje antitumorsku (Zheng i sar., 1992), antiproliferativnu (Nakano i sar., 1998), antihiperглиkemičnu (Eddouks i sar., 2004) i antimikrobnu aktivnosti (Iacobellis i sar., 2005). Razzaghi-Abyaneh i sar. (2006) su ustanovili i inhibitornu aktivnost etarskog ulja kima za produkciju aflatoksina od strane *Aspergillus parasiticus*. Lahlou i sar. (2007) su naučno potvrdili činjenicu, odavno poznatu u tradicionalnoj medicini, da vodeni ekstrakt kima poseduje diuretičnu aktivnost.

Osim toga, ispitivanjem pojedinačnih komponenti etarskog ulja, postoje dokazi predkliničkih ispitivanja da limonen inhibira stvaranje kancera mlečnih žlezda (Homburger i sar., 1971; Elegbede i sar., 1986; Haag i sar., 1992). Mehanizam delovanja limonena i ostalih terpenoida nije poznat, ali postoje dokazi da limonen izaziva programiranu smrt ćelije (Shi i Gould, 1997).

Kim ima široku primenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Veliki broj radova se bavi ispitivanjem metabolizma monoterpena kima. Na osnovu rezultata *in vivo* eksperimenata se pretpostavlja da se oba enantiomera karvona u organizmu metabolišu u dihidrokarvonsku kiselinu, karvonsku kiselinu i uroterpenolon (Engel, 2001). Pokazano je da i

(4*R*,6*S*)-(-)-karveol takođe nastaje kao metabolit, ali u značajno manjoj količini, redukcijom karvona sa NADPH. Istim mehanizmom se i (4*S*)-(+)-karvon redukuje do (4*S*,6*S*)-(+)-karveola (Jager i sar., 2000). Smatra se da se ove reakcije u najvećem delom odvijaju u jetri, uz učešće Cyt P450 oksidaze i (+)-*trans*-karveol dehidrogenaze.

Kim je svoju primenu našao i u poljoprivredi. Wawrzyniak i Lamparski (2006) su utvrdili da se vodeni ekstrakt kima može koristiti za tretiranje krompira, kao “repellent“ protiv krompirove zlatice. Osim toga, *S*-(+)-karvon se već intenzivno koristi za sprečavanje prevremenog klijanja krompira (De Carvalho i Da Fonseca, 2006), dok je za *R*-(-)-karvon pokazano da deluje kao “repellent“ za komarce. Trenutno je u postupku ispitivanje zahteva da se *R*-(-)-karvon registruje kao pesticid. Ispitivanje vrši EPA (US Environmental Protection Agency, EPA, 2009).

2.2.4.3 Antioksidantna aktivnost

Zheng i Wang (2001) su u svojoj studiji, koja je obuhvatala 39 lekovitih i začinskih biljaka, utvrdili da vodeni ekstrakt kima poseduje značajnu antioksidantnu aktivnost na osnovu ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay) testa. Wojdyło i sar. (2007) su antioksidantnu aktivnost kima dokazali na osnovu njegove sposobnosti da uklanja ABTS[•] (2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) i DPPH[•] (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikale, kao i na osnovu njegovog Fe³⁺/Fe²⁺ redoks kapaciteta. Hinneburg i sar. (2006) su takođe utvrdili antioksidantnu aktivnost ekstrakta kima dobijenog hidrodestilacijom, koju povezuju sa sadržajem kvercetin i kemferol glikozida prisutnim u ekstraktu.

2.2.5 *Petroselinum crispum* (Mill.) A.W. Nym. ex Hill (Apiaceae) - peršun

Peršun je dvogodišnja biljka prijatnog mirisa iz familije štitonoša (Apiaceae), koja može da naraste u visinu od 30 cm do 70 cm. Ima karakterističan beli, tanak i repast koren. Listovi mu izbijaju iz niske stabljike i različitog su oblika. Cvetni venčić je žuto zelene boje. Postoji više sorti peršuna, ali bi se podela mogla odrediti na osnovu toga da li se uzgajaju za dobijanje korena ili listova. Precizno vođenom naučnom selekcijom se kod pojedinih sorti povećavala bujnost listova



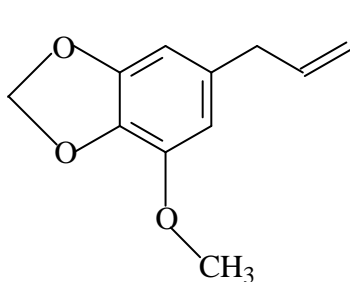
ili se povećavala zapremina korena, već prema tome šta je bio cilj. Upotreba peršuna seže daleko u prošlost. Tako je poznato da se koristio u staroj Grčkoj i u doba Rimskog carstva. Zabeleženo je takođe da je u Britaniju stigao tek u 16 veku. Prilikom prvih klasifikacija od strane botaničara je bilo zabeleženo nekoliko vrsta peršuna, međutim u novije doba se dokazalo da su to samo varijeteti jedne osnovne sorte. Peršun je biljka koja je poreklom sa bliskog istoka da bi se raširila po celoj Evropi, a prvi kolonisti su je odneli i u Ameriku gde je takođe dobro prihvaćena i gde je veoma popularna. Uglavnom gde god ima peršuna, veoma je popularan i ljudi ga rado koriste (Simon i Quinin, 1988). U proleće i jesen se kopa koren. Seme se sakuplja neposredno pre sazrevanja, a cela biljka kad je u cvatu.

Koristi se za poboljšanje cirkulacije, za probleme mokraćnih kanala (čaj), za umirenje nerava, za otklanjanje naduvenosti, za ublažavanje bolova, za pročišćavanje krvi, a pomaže stvaranje crvenih krvnih zrnaca. Blagotvoran je za otklanjanje groznice, upala očiju, bolesti bubrega, sunčane mrlje i jetrene mrlje na koži, za ubode i ujede insekata i srčane tegobe. Seme takođe ima lekovita svojstva, jer sadrži eterična ulja od kojih lekovito dejstvo ima apiol, miristicin i terpeni. Esencijalna ulja peršuna stimulišu uterus, povećavaju količinu mokraće, smanjuju infekciju urinarnog trakta i uništavaju bakterije. Upotrebljava se kao karminativ, diuretik, hipertenziv, hipotenziv, stomahik, abortificijent i nutritivno sredstvo (Robbers i Tyler, 1999; Kreydiyyeh i Usta, 2002).

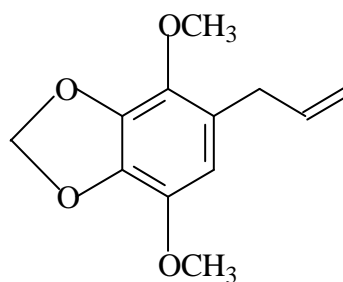
2.2.5.1 Hemijski sastav

Peršun je izuzetno bogat mineralima i vitaminima. Po sadržaju vitamina C daleko premašuje limun i pomorandžu - u 100 g peršunovog lista ima 166 mg vitamina C. Sadrži puno i provitamina A i grupu B vitamina, čak i B12 vitamina. Od minerala, kojih u 100 g lista ima 1630 mg, najviše sadrži kalijum (1000 mg), gvožđe (8 mg), kalcijum (245 mg), fosfor (128 mg), magnezijum, mangan i bakar. Kao i drugo zeleno povrće, nadzemni deo biljke je bogat hlorofilom, flavonoidima i vitaminima, a naročito obiluje vitaminom C. Koren sadrži proteine, vitamine, minerale, flavonoide i druge korisne sastojke (Peter, 2009).

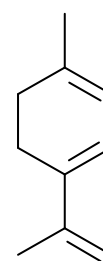
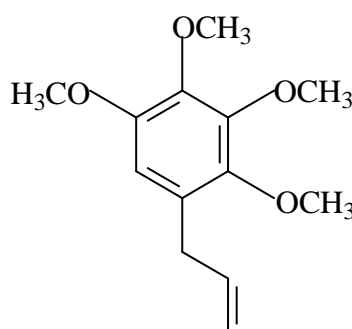
U zavisnosti od porekla i varijeteta, plod peršuna sadrži od 2-6%, dok koren sadrži oko 0,5% etarskog ulja (Wichtl, 1994). Simon i sar., (1984) su ispitivanjem etarskog ulja peršuna utvrdili da su glavne komponente 1,3,8-*p*-mentatrien, miristicin, β -felandren i mircen, dok su Zhang i sar. (2006) pronašli da su miristicin, apiol, α -pinen i β -pinen i aliltetrametoksibenzen najzastupljenije komponente (**Slika 2.17.**).



miristicin

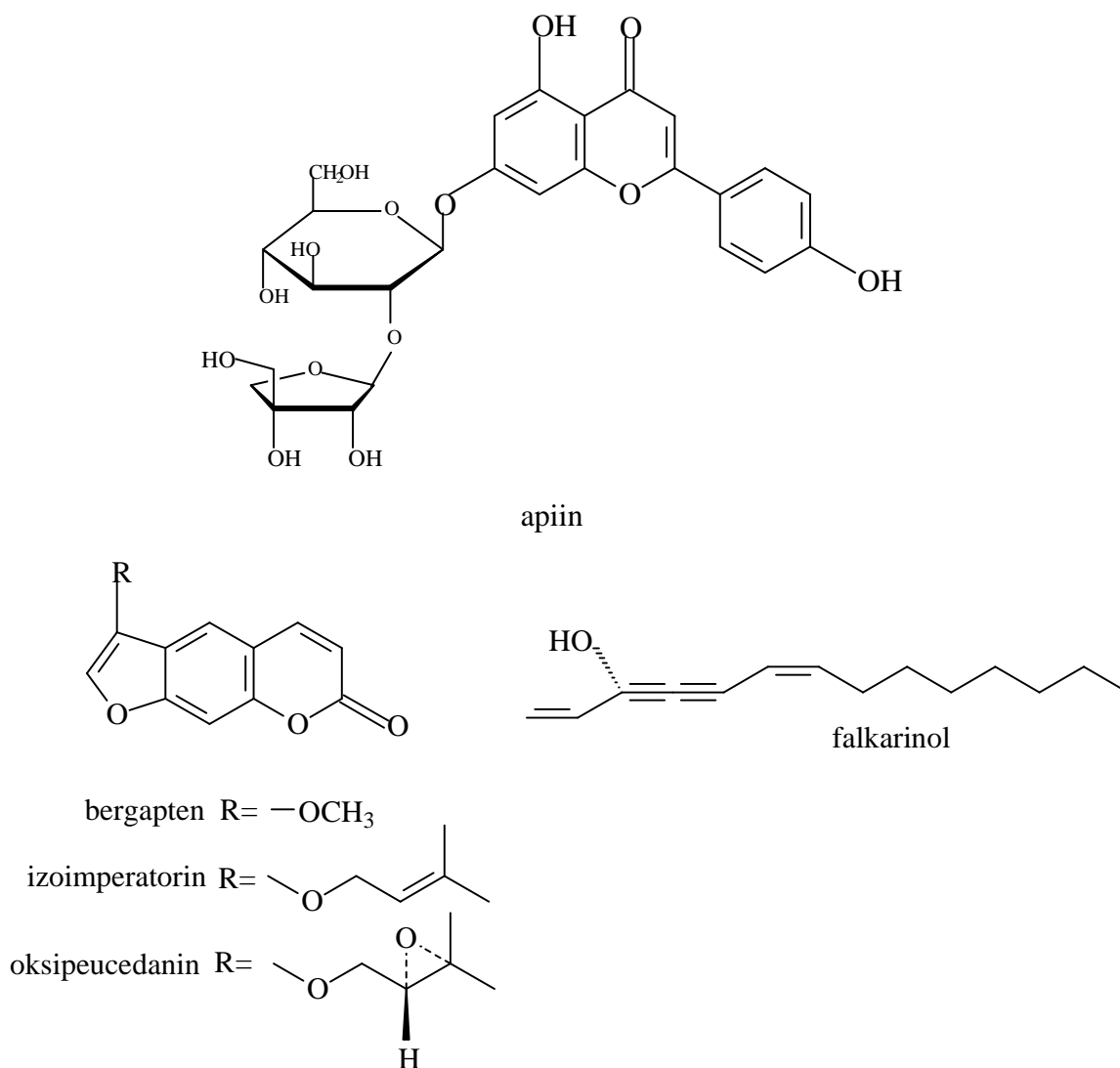


apiol

1,3,8-*p*-mentatrien

aliltetrametoksibenzen

Slika 2.17. Najzastupljenija jedinjenja etarskog ulja peršuna.



Slika 2.18. Jedinjenja zastupljena u peršunu.

Peršun sadrži velike količine flavona apigenina, koji je prvenstveno prisutan u formi apiina (7-*O*-apiosida) (**Slika 2.18.**) (Justesen i sar., 1998). Osim toga, naročito u korenu peršuna su zastupljeni furanokumarini, od kojih dominira bergapten, izoimperatorin i oksipeucedanin (Wichtl, 1994) (**Slika 2.18.**). Manderfeld i sar. (1997) su ispitivanjem kumarina u peršunu utvrdili da se svojim sadržajem ističu psoralen i 8-metoksipsoralen, dok su 5-metoksipsoralen i izopimpinelin prisutni u manjoj količini. U korenu peršuna zastupljen je i polinezasićeni alkohol falkarinol (Wichtl, 1994) (**Slika 2.18.**).

2.2.5.2 Biološka i farmakološka aktivnost

Postoje dokazi da apigenin ima antikancerogena (Wei *i sar.*, 1989; Birt *i sar.*, 1997), antiinflamatorna (Lee *i sar.* 1993) i antimutagena (Kuo *i sar.* 1992) svojstva. Zheng *i sar.* (1998) su ukazali na kancer hemoprotektivnu ulogu miristicina, izolovanog iz etarskog ulja peršuna.

Pokazano je da furanokumarini peršuna poseduju antimikrobna svojstva, odnosno da inhibiraju rast *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *Escherichia coli* O157:H7, *E. coli* Bs-1 i *E. Carotovora* (Manderfeld *i sar.*, 1997).

Peršun se tradicionalno upotrebljava kao pomoćno lekovito sredstvo prilikom tretiranja dijabetesa. Özçelik *i sar.* (2001) su ispitivali hipoglikemijsku aktivnost peršuna i ustanovili da on sprečava porast koncentracije šećera u krvi.

2.2.5.3 Antioksidantna aktivnost

Nielsen *i sar.* (1999) su ukazali na pozitivne efekte konzumiranja peršuna, odnosno na pozitivnu korelaciju između unosa peršuna i porasta aktivnosti superoksid dizmutaze i katalaze, kao i na smanjenje oksidacije proteina kod ispitivanih volontera u biološkom testu. Gazzani (1994) je utvrdio antioksidantnu aktivnost peršuna u kikiriki ulju pod različitim termičkim tretmanima. Wong *i Kits* (2006) su ispitivanjema *in vitro* antioksidantne aktivnosti peršuna ustanovili antioksidantnu aktivnost metanolnih i vodenih ekstrakata, kao i značajnu "skevindžer" aktivnost etarskog ulja. Zhang *i sar.* (2006) su utvrdili antioksidantnu aktivnost etarskog ulja peršuna, koju dovode u vezu sa sadržajem apiola.

2.3 ANTIOKSIDANTI

2.3.1 Slobodni radikali i oksidativni procesi

Slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli, koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi. Nespareni elektroni su uzrok njihove visoke i neselektivne reaktivnosti. Većina slobodnih radikala su kratkoživeći i veoma lako podležu monomolekularnim i bimolekularnim reakcijama razlaganja (Halliwell i Gutteridge, 1999). Slobodni radikali nastaju: termolizom, elektromagnetnom radijacijom, redoks reakcijama, enzimskim procesima i hemijskim procesima (Acworth, 2003). Među najreaktivnije hemijske vrste ubrajaju se slobodni radikali, ali i neradikalni oblici koji su također oksidacioni agensi i lako se konvertuju u radikale. Najvažnije reaktivne vrste kiseonika (reactive oxygen species – ROS) su prikazane u tabeli 2.1.

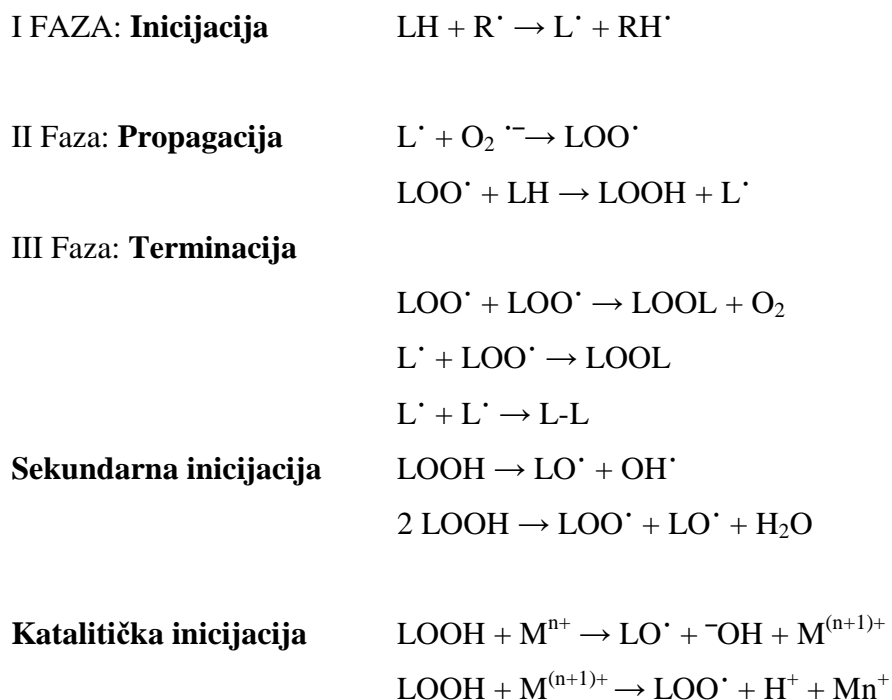
Tabela 2.1. Najvažnije reaktivne slobodnoradikalne i neradikalne vrste kiseonika (Halliwell i Whiteman, 2004).

SLOBODNI RADIKALI	NERADIKALSKI OBLICI
<i>Reaktivne kiseonične vrste (ROS)</i>	
Superoksid anjon radikal, $O_2^{\cdot-}$	Vodonik peroksid, H_2O_2
Hidroksil radikal, $\cdot OH$	Hipobromna kiselina, $HOBr$
Hidroperoksil radikal, HO_2^{\cdot}	Hipohlorna kiselina, $HOCl$
Peroksil radikal, RO_2^{\cdot}	Ozon, O_3
Singletni kiseonik, $^1\Sigma^+O_2$	Singletni kiseonik, $^1\Delta_g O_2$
Alkoksil radikal, RO^{\cdot}	Organski peroksidi, $ROOH$
Ugljendioksidni radikal, $CO_2^{\cdot-}$	Peroksinitrit, $ONOO^-$
Ugljenmonoksidni radikal, $CO^{\cdot-}$	Peroksinitritna kiselina, $ONOOH$

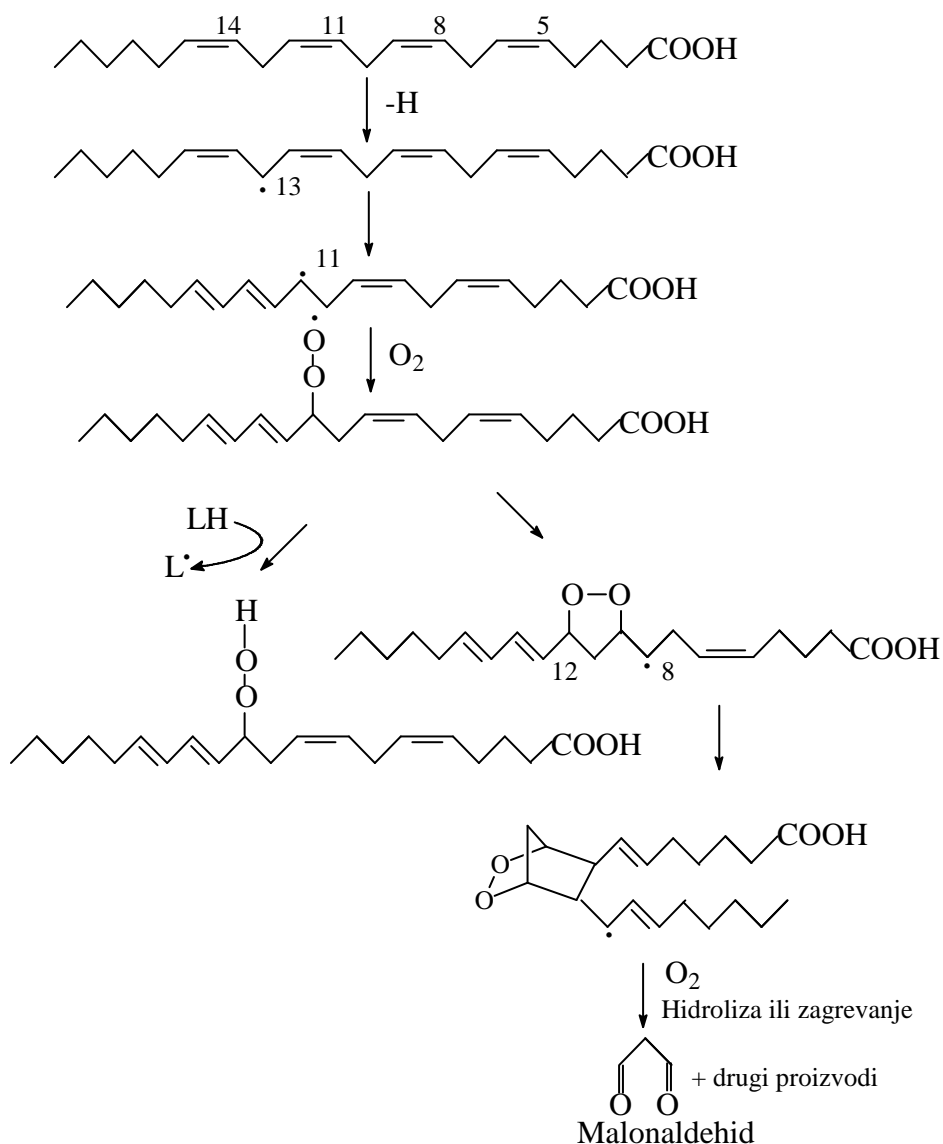
2.3.2 Lipidna peroksidacija

Kiseonikovi slobodni radikali reaguju sa širokim spektrom biomolekula, izazivajući na njima promene, odnosno oštećenja. Reagujući sa lipidima, oni izazivaju oksidativnu destrukciju nezasićenih, odnosno polinezasićenih masnih kiselina, poznatu kao proces lipidne peroksidacije (Cheeseman, 1993). Ovom procesu podležu kako lipidi u biosistemima, tako i

lipidi u hrani. Osnovni supstrat za oksidativno oštećenje lipida predstavljaju polinezasićene masne kiseline u fosfolipidima i glikolipidima, kao i holesterol u biološkim membranama. Lipidna peroksidacija se u biološkim sistemima može odigravati enzimskim (pod dejstvom lipooksigenaza) i neenzimskim putem. Ukoliko se oksidacija odvija u prisustvu atmosferskog kiseonika naziva se autooksidacija. Mehanizam kompleksne lančane reakcije lipidne oksidacije odvija se u tri faze (Yanishlieva-Maslarova, 2001).

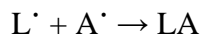
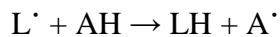
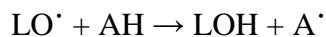
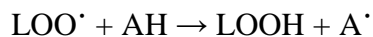


Nastajanje malonildialdehida tokom oksidacije lipida predstavlja osnovu često primenjivanog TBA testa, kojim se određuje stepen oksidacije lipida u biološkim i prirodnim sistemima (Guillén-Sans i Guzmán-Chozas, 1998) (**Slika 2.19.**).



Slika 2.19. Mehanizam nastajanja hidro-peroksida, cikličnih peroksida, kao i malonildialdehida tokom oksidacije arahidonske kiseline.

Lančana reakcija autooksidacije se može zaustaviti antioksidantima (AH), koji uklanjaju slobodne radikale (LOO^\bullet , LO^\bullet i L^\bullet) i time ometaju fazu propagacije. "Skevindžeri" radikala obično predaju jedan elektron nesprenom elektronu slobodnog radikala i redukuju ga. Fenolna jedinjenja su veoma aktivna u ovom pogledu.

REAKCIJE INHIBICIJE LIPIDNE OKSIDACIJE:**2.3.3 Antioksidanti**

Antioksidanti su supstance koje, prisutne u malim količinama u odnosu na supstrat koji je podložan oksidaciji (lipidi, proteini, ugljeni hidrati, DNK), značajno inhibiraju ili potpuno sprečavaju njihovu oksidaciju.

Delovanje antioksidanata zasniva se na njihovoj sposobnosti da (Aruoma, 1996):

- deluju kao "skevindžeri" slobodnih radikala, odnosno donori elektrona ili H-atoma;
- kompleksiraju jone metala, sprečavajući njihovu katalitičku funkciju u procesima razgradnje lipidnih hidro-peroksida i nastanku slobodnih radikala;
- razgrađuju hidro-perokside lipida, transformišući ih u neradikalske vrste npr. (alkohole);
- sprečavaju dejstvo singletnih oblika kiseonika;
- inhibiraju neke enzime;
- pokazuju sinergističke efekte;
- redukuju neka jedinjenja;

Masti, ulja i hrana koja sadrži lipide se zagrevanjem ili dugotrajnim skladištenjem kvare, jer pod navedenim uslovima podležu degradacionim procesima. Glavni procesi koji se pri tome odigravaju su reakcije oksidacije lipida i razlaganje oksidacionih proizvoda, koji rezultuju smanjenjem nutritivne vrednosti, senzornog kvaliteta i na kraju, bezbednosti hrane usled formiranja potencijalno toksičnih jedinjenja. Usporavanje ovih procesa oksidacije je važno kako za proizvođače tako i za potrošače.

Oksidacija prehrambenih proizvoda se može inhibirati pakovanjem u modifikovanu atmosferu, korišćenjem niskih temperatura, inaktivacijom enzima koji katališu oksidaciju, sniženjem pritiska kiseonika i korišćenjem odgovarajućeg pakovanja (Yanishlieva-Maslarova, 2001).

U cilju zaštite od oksidacije koriste se specifični aditivi koji inhibiraju oksidaciju, antioksidanti. Ova jedinjenja se veoma razlikuju po hemijskoj strukturi i imaju različite mehanizme delovanja.

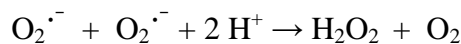
Najvažniji mehanizam antioksidativne aktivnosti je reakcija jedinjenja koja inhibiraju oksidaciju sa lipidnim slobodnim radikalima, pri čemu nastaju neaktivni proizvodi. Ova jedinjenja su pravi antioksidanti. Oni obično reaguju sa peroksil ili alkoksil slobodnim radikalima, koji nastaju razlaganjem lipidnih hidroperoksida. Drugi inhibitori stabilišu lipidne perokside, sprečavajući njihovo razlaganje na slobodne radikale.

Prvi antioksidanti koji su se koristili za konzervisanje hrane su bili začini. Oni su međutim zamenjeni sintetskim supstancama koje su jeftinije, utvrđene čistoće i poseduju ujednačenija antioksidativna svojstva. Najčešće korišćeni sintetski antioksidanti koji se koriste u prehrambenim proizvodima su butilovani hidroksianizol (BHA), butilovani hidroksitoluen (BHT), propilgalat (PG) i terc-butilhidrohinon (TBHQ). Zbog toksikoloških razloga prekomerna upotreba sintetskih antioksidanata je dovedena u pitanje, a zahtevi potrošača su usmereni ka korišćenju prirodnih antioksidanata (Moure i sar., 2001).

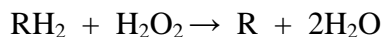
2.3.3.1 Antioksidantni enzimi

Detoksifikacija enzimima je moguća ukoliko je konstanta brzine kiseonične vrste veoma niska, najmanje reda $k-1$. Zbog toga reakcije u kojima učestvuju $\cdot\text{OH}$, 1O_2 , $\text{RO}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$, $\text{HOO}\cdot$ nisu katalizovane enzimima, jer su one veoma brze ($k \gg 10^8$). Ove reakcije su katalizovane biomolekulima koji služe kao "skevindžeri" slobodnih radikala i razbijači (quencheri) aktiviranih oblika kiseonika. Od antioksidantnih enzima do danas su najviše proučeni superoksid dizmutaza, katalaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza, glutation-S-transferaza.

Superoxid dizmutaza (superoxid: superoksid oksidoreduktaza; EC 1.15.1.1) je multienzimski sistem koji postoji kod svih aerobnih organizama. Katalizuje dizmutaciju superoksid anjon radikala do molekuskog kiseonika i vodonik peroksida.

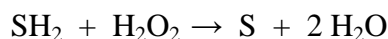


Katalaza (H_2O_2 : H_2O_2 oksidoreduktaza, EC 1.11.1.6) je tetramerni hem enzim koji se nalazi u svim aerobnim organizmima i ima ulogu da brzo razgrađuje H_2O_2 . Pokazuje dvostruku funkciju u zavisnosti od koncentracije H_2O_2 . Pri niskim koncentracijama H_2O_2 ($<10^{-6}$ mol/dm³) katalaza deluje peroksidazno i oksiduje veliki broj donora vodonika (etanol, askorbinska kiselina...).



Pri visokim koncentracijama supstrata katalaza vrši dizmutaciju H_2O_2 izuzetno velikom brzinom.

Peroksidaze (EC 1.11.1.7) su grupa enzima koja vrši razgradnju H_2O_2 uz oksidaciju supstrata koji mogu biti veoma raznovrsni.



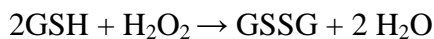
Njihova aktivnost se najčešće ispituje u ćelijskim ekstraktima uz pomoć veštačkih supstrata gvajakola, benzidina i o-dianizdina. Oni se u prisustvu H_2O_2 i peroksidaza oksiduju pri čemu nastaju obojeni proizvodi (Capeillè-Blandin, 1998; Auchère i Capeillè-Blandin, 1999). Mnogi supstrati ovih peroksidaza koji deluju u *in vivo* uslovima nisu otkriveni.

Glutation reduktaza (EC 1.6.4.2) je flavoprotein koji katalizuje redukciju oksidovanog glutationa (GSSG) u redukovani oblik (GSH) u prisustvu NADPH.



Glutation peroksidaza (glutation: vodonik peroksid oksidoreduktaza, EC 1.11.1.9) je familija enzima, koja u aktivnom centru sadrži selen i koja kao supstrat koristi redukovani

glutathion GSH, a koja katalizuje redukciju vodonik peroksida do vode, ili redukciju organskih peroksida do odgovarajućih alkohola.



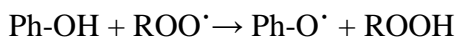
Glutathion S-transferaze (EC 2.5.1.18) su enzimi koji katalizuju vezivanje glutathiona preko sulfhidrilnih grupa za elektrofilne centre hidrofobnih molekula. Na ovaj način molekuli postaju lakše rastvorljivi u vodi i lakše se transportuju do vakuole ili apoplasta. Među supstratima ovih enzima se nalaze neki sekundarni biomolekuli biljaka kao i veliki broj ksenobiotika. Ovi enzimi su odgovorni za detoksifikaciju elektrofilnih i veoma citotoksičnih proizvoda lipidne peroksidacije izazvane oksidativnim stresom (Polidoros i Scandalios, 1999).

2.3.3.2 Neenzimski antioksidanti

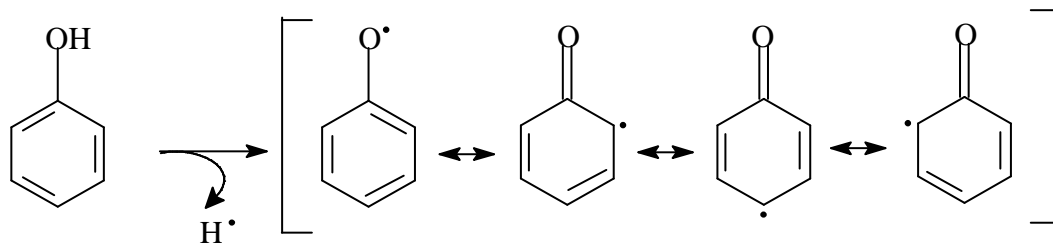
α -Tokoferol, glavni sastojak liposolubilnog vitamina E, je jedan od najznačajnijih prirodnih antioksidanata u ćelijskim membranama i lipoproteinima. Reakcije α -tokoferola sa peroksi-radikalima, perhidroksi-radikalima i singlet kiseonikom su osnova njegove antioksidantne uloge (**Slika 2.20.**).

β -Karoten, jedan od najrasprostranjenijih karotena u biljnom svetu, deluje kao hvatač tiil-, nitroksid- i sulfenil radikala, sposobnih da iniciraju peroksidaciju lipida, pri čemu nastaju β -karoten-katjon-radikali i radikal adukti (nastali interakcijom β -karotena i radikala) (Everett i sar., 1996).

Fenolna jedinjenja ili polifenoli, u svojoj strukturi sadrže aromatični prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa (Croft, 1999). Smatra se da je antioksidantna aktivnost fenola prvenstveno rezultat njihove sposobnosti da budu donori vodonika, nakon čega nastaju manje reaktivni fenoksil radikali:

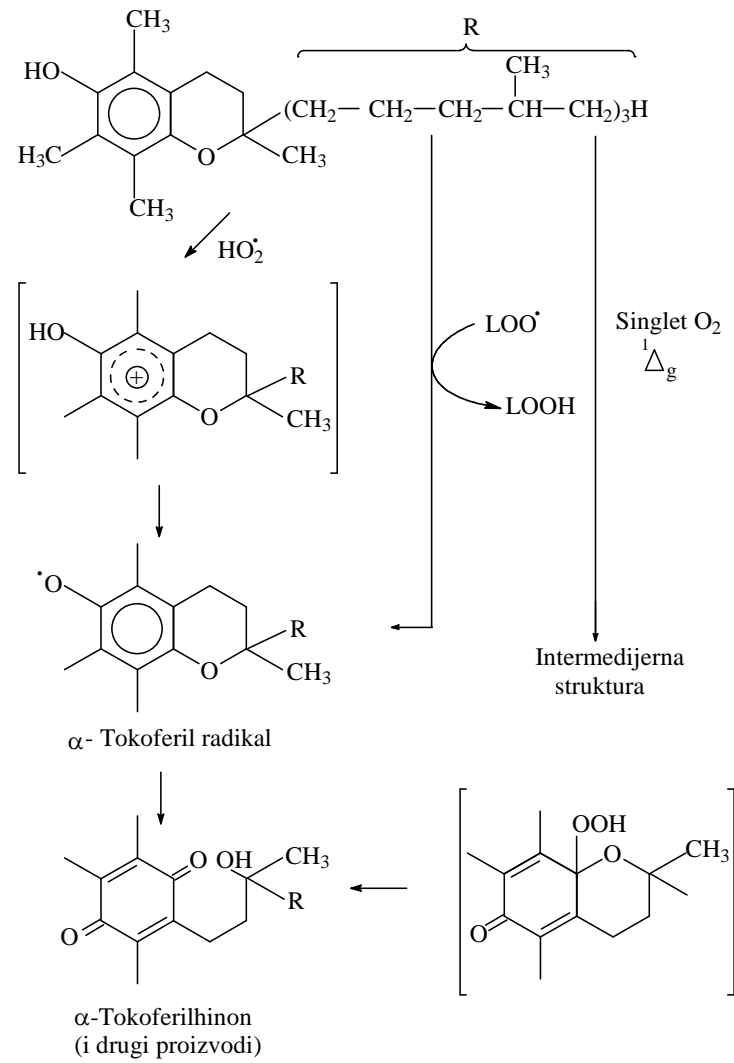


Relativno velika stabilnost fenoksil radikala se objašnjava delokalizacijom elektrona, uz postojanje više rezonantnih formi (**Slika 2.16.**).



Slika 2.21. Rezonantna stabilizacija fenoksil radikala.

Osim pomenutog mehanizma, biljni fenoli mogu i heliranjem jona metala sprečiti njihovo katalitičko dejstvo u produkciji ROS (Duh i sar., 1999).



Slika 2.20. Mehanizam antioksidativnog delovanja α -tokoferola.

2.3.4 Trendovi u proučavanju prirodnih antioksidanata

Prirodni antioksidanti se u velikom broju slučajeva dobijaju iz biljaka, te se bezuslovno smatraju bezbednim za upotrebu. Opšte gledano, mogućnosti univerzalne primene prirodnog antioksidanta su ograničene, jer je teško predvideti efikasnost svakog antioksidanta u određenom prehrambenom proizvodu (Yanishlieva-Maslarova, 2001).

Polje budućih istraživanja bi moglo biti ispitivanje interakcija između antioksidanta i nutritivnih komponenti u hrani. Fundamentalno poznavanje i razumevanje mehanizma antioksidativne aktivnosti bi mogao biti prvi korak u određivanju optimizacije upotrebe prirodnog antioksidanta. Ispitivanje ponašanja antioksidanata na povišenim temperaturama, prilikom prženja, kao i iznalaženje novih prirodnih antioksidanata koji bi mogli naći primenu u prehrambenim proizvodima, je moguće polje izučavanja prirodnih antioksidanata (Chung, 1997). Toksikološka proučavanja, zakonski propisi primene i standardizacija prirodnih antioksidanata nisu sistematizovani. Predložene su metode i protokoli za procenu i standardizaciju prirodnih antioksidanata (Becker i sar., 2004).

2.4 FUNKCIONALNA HRANA

2.4.1 Razvoj koncepta funkcionalne hrane

Do relativno nedavno, ljudi su svoju hranu dobijali direktno iz prirode. Tek je u poslednjih stotinu godina tehnologija preuzela glavnu reč i od izvornih namirnica razvijen je neograničen broj prehrambenih proizvoda. Trend proizvodnje "funkcionalne hrane" ili hrane koja poseduje povoljno dejstvo na zdravlje uz adekvatno nutritivno delovanje, temelj je razvoja moderne prehrambene industrije širom sveta.

Smatra se da je moderni koncept funkcionalne hrane začet u Japanu 1984. godine, ali shvatanje hrane kao leka zasigurno nije novijeg datuma. Otac medicine, Hipokrat, postavio je ovu hipotezu još pre 2500 godina, a drevne istočnjačke civilizacije tradicionalno vezuju pojedine namirnice sa specifičnim učincima na zdravlje.

Ipak, filozofija "hrane kao leka" nepravedno je zanemarena tokom 19. veka zbog procvata moderne terapije lekovima. Važna uloga ishrane u prevenciji bolesti i unapređenju zdravlja ponovo dolazi u prvi plan početkom 20. veka. To je doba bilo u znaku mnogih revolucionarnih otkrića, poput otkrića vitamina i brojnih bolesti koje su nastajale kao rezultat deficita određenih nutrijenata.

Nutrijenti dodati u osnovnu hranu mogu povećati unos određenog nutrijenta čak i na nivou cele populacije. Upravo je obogaćivanje hrane ključnim nutrijentima na početku dvadesetog veka odgovorno za iskorenjivanje bolesti poput gušavosti, rahitisa, beri – beri-a i pelagre. Jodirana so može se smatrati jednim od prvih "funkcionalnih proizvoda" i kao takva spada u "funkcionalne proizvode prve generacije" .

Sedamdesetih godina prošlog veka žarište interesa se naglo pomerilo sa deficita nutrijenata na prekomernu telesnu masu. Začetke "potrošačkog društva" koje ima svoje korene u tom vremenu danas osećamo u punom zamahu. Brojke govore same za sebe, jer se smatra da u proseku 30–50% zapadnjačke populacije ima problem sa prekomernom telesnom masom, a svi podaci ukazuju da idemo ka globalnoj epidemiji gojaznosti. Druga generacija "funkcionalnih proizvoda" se pojavila kao reakcija na preveliku zastupljenost zasićenih masnoća i šećera u ishrani. Ti proizvodi su imali smanjen sadržaj tih sastojaka.

Tokom sedamdesetih i osamdesetih godina prošlog veka identifikovan je čitav niz fiziološki aktivnih supstanci poreklom iz biljaka i životinja (fitohemikalija i zoohemikalija), s potencijalno povoljnim delovanjem na prevenciju i terapiju hroničnih bolesti.

Na početku 21. veka, uprkos obilju koje vlada u razvijenim zemljama, suočeni smo s brojnim izazovima, poput povećanja cena medicinskih usluga, produženog životnog veka, novih naučnih saznanja i razvoja novih tehnologija što sve rezultira promenom životnog stila. Nutricionizam, kao nauka 21. veka, usmerava se ka pružanju optimalne ishrane u skladu s modernim životnim stilom, fiziološkim funkcijama, pa čak i genetskim nasleđem čoveka.

Na putu ka optimalnoj ishrani, što predstavlja ambiciozni i dugoročni cilj, "funkcionalna hrana" čini se novim, interesantnim i stimulativnim konceptom. Ovaj koncept trebao bi biti sagrađen na čvrstim naučnim temeljima, a pritom treba biti prepoznat i prihvaćen od strane potrošača (Leach, 1989; Kuhn, 1998; Wrick, 1995).

2.4.2 Definicija funkcionalne hrane

Savremena nauka o ishrani podrazumeva multidisciplinarni pristup. Istraživačkim radom na polju biologije ćelije, biohemije, fiziologije, patologije i novih tehnologija u industriji hrane, stvorena je nova disciplina "nauka o funkcionalnoj hrani".

Funkcionalna hrana se može posmatrati kao treća generacija hrane sa pozitivnim efektom na zdravlje, iako trenutno ne postoji opšte prihvaćena definicija ovog termina, kako ni u Evropi tako ni u SAD. Razlog tome leži u činjenici da je ovaj termin potpuno nepoznat u zakonskoj regulativi koja se odnosi na proizvodnju i preradu hrane, što u velikoj meri komplikuje aktivnosti vezane za proizvodnju, kontrolu kvaliteta, izradu deklaracija i zdravstvenih izjava ("health claims"), marketing i distribuciju ovih proizvoda.

U ovom trenutku, Japan je zemlja koja ima najpotpuniji regulatorni sistem vezan za funkcionalnu hranu, koji jasno definiše proceduru kojom prehrambeni proizvod dobija oznaku FOSHU (Foods for Specified Health Use) (Arai, 1996).

Usled nepostojanja adekvatnih definicija, često nastaje i velika konfuzija oko upotreba termina funkcionalna hrana i nutraceutikali, koji se često koriste kao sinonimi. Reč nutraceutikal je prevod engleske reči - nutraceutical, koja je nastala kombinovanjem reči nutrition - ishrana i pharmaceutical - farmaceutski, a odnosi se na komponente hrane koje ispoljavaju farmakološko delovanje. Drugim rečima, funkcionalna hrana je prehrambeni

proizvod, dok su nutraceutikali, koncentрати dobijeni iz prehrambenih proizvoda, koji se često prodaju kao pilule, kapsule, tinkture, itd (Gurib-Fakim, 2006).

Veliki broj naučnih institucija je predložio definicije termina funkcionalna hrana. The Institute of Medicine's Food and Nutrition Board (IOM/FNB, 1994) definiše funkcionalnu hranu kao "hranu, ili komponentu hrane, koja uz svoju osnovnu nutritivnu namenu može da obezbedi i dodatnu zdravstvenu dobrobit".

Tržište nutraceutika, suplemenata i svih ostalih proizvoda koji se nalaze negde na granici hrane i leka raste iz dana u dan. Teško je odrediti čvrste granice između konvencionalne, funkcionalne hrane, organski proizvedene hrane, suplemenata, nutraceutika, gde čak i naučnici otežano barataju ovim pojmovima.

Stoga se u široki koncept funkcionalne hrane može ubrojiti:

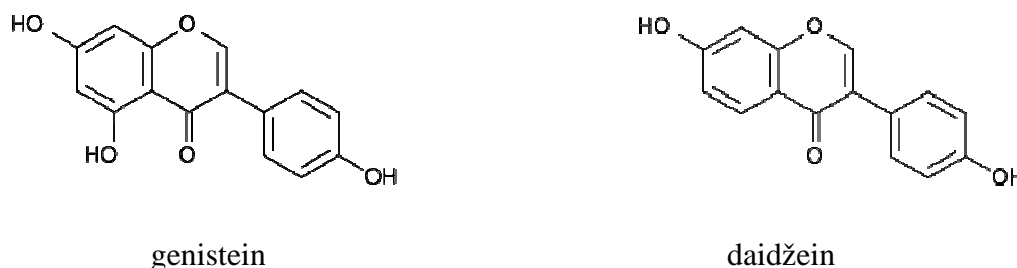
- prirodno nutritivno vredna hrana;
- hrana koja je obogaćena funkcionalnim sastojcima;
- hrana iz koje su uklonjene određene supstance;
- hrana u kojoj su izmenjena svojstva pojedinih komponenata;
- hrana u kojoj je bioraspoloživost jedne ili više komponenata modifikovana;
- sve kombinacije navedenih mogućnosti.

2.4.3 Funkcionalne komponente biljnog porekla

Ovas: Ovas je žitarica izuzetno bogata dijetnim vlaknima, koja se posebno kao značajan izvor β -glukana, intenzivno proučava. Postoje mnogobrojni naučni dokazi da konzumiranje ove biljne vrste može uticati na smanjenje ukupnog i LDL (low density lipoprotein) holesterola, čime se indirektno smanjuje verovatnoća od nastanka koronarnih bolesti. Razmatrajući relevantne naučne dokaze, obezbeđene kroz 37 nezavisnih kliničkih testova na ljudima, FDA (the Food and Drug Administration) je 1997. nagradila prvu zdravstvenu izjavu, specifičnu za prehrambeni proizvod ovas (DHHS/FDA, 1997) (Di Luzio, 1983; Czop i Austen, 1985; Goldman, 1988; Hasler, 1998).

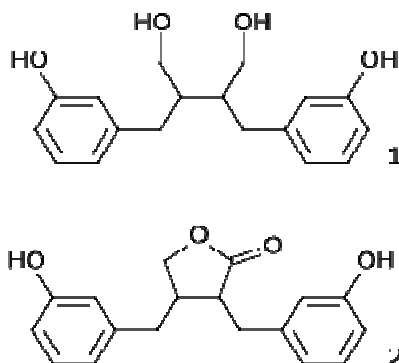
Soja: Soja je 1990-ih bila u žiži interesovanja naučnika ne samo zbog činjenice da je bogat izvor visokovrednih proteina, već i zbog dokaza da ima preventivnu i terapijsku ulogu kod razvoja kardiovaskularnih oboljenja, kancera i osteoporoze (Anderson and Garner, 1997).

Efekat konzumiranja soje na smanjenje ukupnog holesterola kod ljudi je potvrđen nizom ispitivanja (Anderson i sar., 1995) i dovodi se u vezu sa sadržajem izoflavona genisteina i daidžeina (Potter, 1998) (**Slika 2.22.**). Međutim, istraživanjima Nestle i sar. (1997) i Hodgson i sar. (1998), pozitivan efekat izoflavona na smanjenje holesterola nije utvrđen.



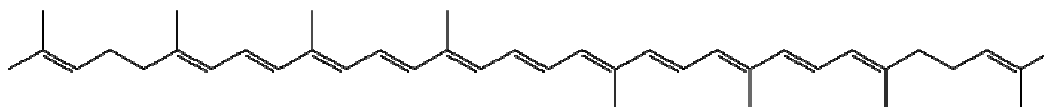
Slika 2.22. Izoflavoni soje genistein i daidžein.

Laneno seme: U poređenju sa ostalim uljaricama, laneno seme sadrži najviše (57%) ω -3 masnih kiselina. U novije vreme se mnogo pažnje poklanja i ispitivanju lignana lanenog semena, za koje je pokazano da se pod dejstvom crevne mikroflore transformišu u enterodiol i enterolakton (Setchell i sar., 1981) (**Slika 2.23.**). Pošto su i enterodiol i enterolakton po strukturi slični estrogenim hormonima i pokazuju slabu estrogenu i antiestrogenu aktivnost, smatra se da mogu imati ulogu kod prevencije nastanka hormon-zavisnih tumora (Thompson i sar., 1991; Thompson, 1995).



Slika 2.23. Lignani sisara: enterodiol (1) i enterolakton (2).

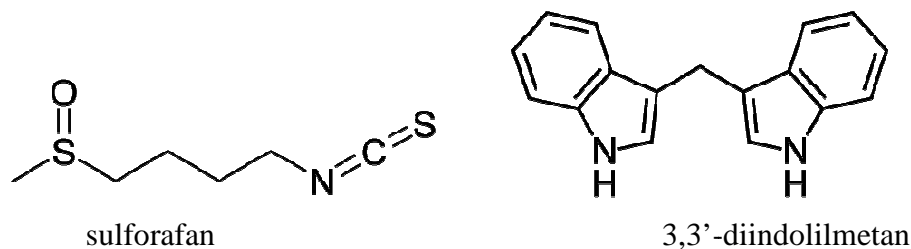
Paradajz: Zahvaljujući visokom sadržaju likopena, paradajz privlači veliku pažnju istraživača, jer je dokazano da se konzumiranjem ovog karotenoida (**Slika 2.24.**) smanjuje verovatnoća od nastanka kancera prostate (Giovannucci i sar., 1995), kancera dojke (Clinton, 1998), kože i verovatno karcinoma pluća (Li i sar., 1997). Istraživanjem mehanizma delovanja likopena, došlo se do pretpostavke da je antioksidantna aktivnost likopena odgovorna za ispoljavanje njegovog dejstva. Smatra se da je likopen najaktivniji "quencher" singlet kiseonika u biološkim sistemima (Di Mascio i sar., 1989).



Slika 2.24. Karotenoid paradajza, likopen.

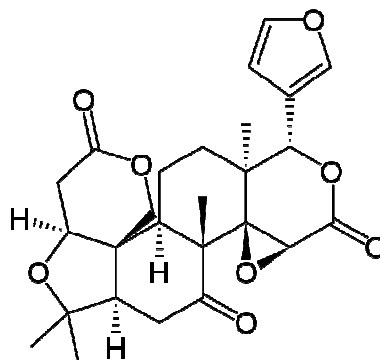
Beli luk: Beli luk (*Allium sativum*) je verovatno biljka o kojoj se najviše piše u naučnoj literaturi (Nagourney, 1998; Štajner i sar., 2008; Štajner i Popović, 2009), obzirom na mnogobrojne farmakološke efekte koje ispoljava, uključujući kancer hemopreventivnu, antibiotsku, anti-hipertenzivnu, kao i pozitivne efekte na smanjenje holesterola (Srivastava i sar., 1995).

Brokoli i druge biljke iz familije kupusa: Epidemiološke studije ukazuju na vezu između konzumiranja biljaka iz familije kupusa i smanjenog rizika od nastanka kancera (Verhoeven i sar., 1996). Antikancer aktivnost kupusnjača se dovodi u vezu sa velikim sadržajem glukozinolata, jedinjenja za koje je dokazano da ih sadrže sve biljke ove familije. Mirozinaza je biljni enzim koji vrši hidrolizu glukozinolata, pri čemu između ostalih produkata, nastaju i izotiocijanati i indoli. Iako se ispostavilo da veliki broj sintetskih izotiocijanata ispoljava antikancer delovanje (Hecht, 1995), velika pažnja se posvećuje ispitivanju sulforafana, izotiocijanata iz brokolija (**Slika 2.25.**). Osim ovog jedinjenja, 3,3'-diindolilmetan je takođe jedinjenje za koje je pokazano da poseduje antikancer aktivnost, a nastaje u digestivnom traktu iz indol-3-karbinola, koji osim kod brokolija, zastupljen i kod dugih biljaka ove familije (Gong i sar., 2006).



Slika 2.25. Antikancerogena jedinjenja iz brokolija.

Citrusno voće: Veliki broj epidemioloških studija ukazuju na kancer protektivni efekat citrusnog voća. Iako je odavno poznato da narandže, limun i grejpfrut sadrže značajne količine vitamina C, folata i vlakana, Hasegawa i Miyake (1996) antikancer aktivnost citrusnog voća dovode u vezu sa sadržajem limonoida (**Slika 2.26.**).

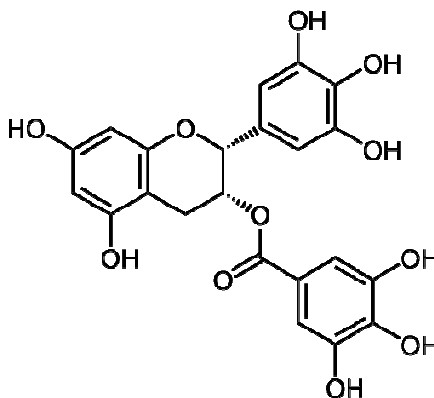


Slika 2.26. Limonin-limonoid koji se nalazi u semenu narandže i limuna.

Brusnica: Još je 1914. godine uočeno da sok od brusnice pomaže u lečenju urinarnih infekcija. Avorn i sar. (1994) je to i potvrdio kliničkim testovima. Počev od 2002. godine velika pažnja se poklanja ispitivanju sposobnosti fenolnih komponenti brusnice da vrše prevenciju nastanka kancera (Ferguson i sar., 2006; Neto, 2007), obzirom da se brusnica, u poređenju sa drugim voćem, značajno ističe sadržajem biljnih fenola (Vinson i sar., 2001). Tanini brusnice su efikasni u sprečavanju nastanka dentalnog plaka, čime sprečavaju nastanak gingivitisa.

Čaj: Po potrošnji, čaj je napitak drugi na svetu, odmah iza vode. Velika pažnja je posvećena ispitivanju fenolnih jedinjenja, a pogotovu zelenog čaja. Fenolna jedinjenja sačinjavaju i do 30% suve materije zelenog čaja (Harbowy i Balentine, 1997). Utvrđeno je da

su glavne fenolne komponente zelenog čaja katehini: epigalokatehin-3-galat, epigalokatehin, epikatehin-3-galat i epikatehin (**Slika 2.27.**). Rezultati pojedinih istraživanja konzumiranja zelenog čaja dovode u vezu sa smanjenim rizikom od nastanka kardiovaskularnih i malignih oboljenja (Cabrera i sar., 2006).



Slika 2.27. Najznačajnije fenolno jedinjenje zelenog čaja: epigalokatehin-3-galat.

Grožđe i vino: Termin "francuski paradoks" se odnosi na činjenicu da ljudi u Francuskoj relativno retko oboljevaju od kardiovaskularnih bolesti, uprkos činjenici da im je ishrana bogata zasićenim mastima. Ovu pojavu je prvi put uočio irski lekar Samuel Black 1819. godine (Wikipedia). Kasnije je Masquelier otkrio da su proantocijanidini, najzastupljeniji polifenoli u crnom vinu kao i u semenu grožđa, moćni antioksidanti zaslužni za pozitivan efekat vina na zdravlje ljudi. Proantocijanidini malih molekulskih masa se zadržavaju u tkivima i plazmi 7-10 dana i pokazuju antioksidativne osobine, što se po mehanizmu razlikuje od ostalih antioksidanata rastvorljivih u vodi. Nasuprot ovim, polikondenzovani proantocijanidini visokih molekulskih masa su veoma snažni "skevindžeri" peroksil radikala, ali se oni ne apsorbuju, niti su biološki iskoristivi. Međutim, oni pokazuju antioksidativnu aktivnost u digestivnom traktu i štite lipide, proteine i ugljene hidrate od oksidativnih promena tokom varenja (Hagerman i sar., 1998).

Lekovito bilje: Proizvodi na bazi lekovitog bilja pokrivaju 25% tržišta dijetetskih suplemenata. Veoma je teško, usled nepostojanja adekvatne zakonske regulative, napraviti jasnu granicu između dijetetskog suplementa i funkcionalne hrane. Fitofarmaceutici su proizvodi koji sadrže hemijsko jedinjenje, ili češće smešu jedinjenja, koja pojedinačno ili u kombinaciji deluju na ljudski organizam u cilju prevencije nastanka različitih oboljenja,

tretiranja bolesti ili u cilju očuvanja zdravlja. Proizvodi u vidu infuza, dekokta ili alkoholnog ekstrakta su tradicionalni način konzumiranja fitofarmaceutika. Potrošači svake godine troše milione dolara na ove proizvode, ali zapravo malo znaju o tome šta kupuju. Vrlo često se preporučena doza istog suplementa razlikuje od proizvođača do proizvođača, a zapravo se malo zna o mehanizmu njihovog delovanja. Osim toga, treba imati na umu da su sekundarni biomolekuli biljaka, gledano sa ekološke strane, nastali evolucijom kao komponente hemijske odbrane biljaka od drugih biljnih vrsta, insekata i životinja. Evolutivno nastali kao otrovi, sekundarni biomolekuli lekovitog bilja ne moraju uvek biti apsolutno neškodljivi po ljudsko zdravlje (Gurib-Fakim, 2006).

U EU i SAD postoji snažna tendencija da se, kao i kod funkcionalne hrane, tržište ovih proizvoda zakonski uredi. Takođe postoji i velika potreba za standardizacijom ovih proizvoda, u cilju iznalaženja njihove optimalne doze.

Prirodni antioksidanti: Veliki broj naučnih radova antioksidantnu aktivnost voća i povrća, lekovitog bilja i začina povezuje sa sadržajem biljnih fenola. Unos fenola putem ishrane povezan je sa smanjenjem rizika za nastanak niza različitih oboljenja (Cabrera i sar., 2006). Dokazano je da fenoli štite lipide seruma od oksidacije, glavnog uzroka nastanka ateroskleroze. Osim navednog, postoje i relevantni naučni dokazi o antikancerogenom delovanju biljnih fenola (Birt i sar., 2001).

Buduća istraživanja bi trebalo usmeriti u pravcu izučavanja inhibitornih/aktivacionih efekata na ključne enzime koji su uključeni u patogenezu ateroskleroze i kancera, kao i na proučavanje mehanizama pomoću kojih fenoli utiču na ekspresiju gena.

U cilju kreiranja funkcionalnih proizvoda neophodna su dodatna istraživanja koja bi objasnila ne samo molekularne mehanizme pozitivnog efekta fenola na zdravlje ljudi, već i kompleksne interakcije u samom matriksu koje uslovljavaju stepen bioraspoloživosti biljnih fenola iz hrane (Yanishlieva-Maslarova, 2001).

2.4.4 Funkcionalne komponente životinjskog porekla

Iako je većina supstanci za koje je dokazano da povoljno deluju na zdravlje poreklom iz biljnih sirovina, postoji i veliki broj fiziološki aktivnih materija u namirnicama životinjskog porekla.

Riba: Riblje ulje je bogat izvor ω -3 masnih kiselina, za koje je dokazano da imaju značajnu ulogu u sprečavanju nastanka kardiovaskularnih bolesti (Albert i sar., 1998).

Mlečni proizvodi: Danas ne postoji sumnja u funkcionalnost mlečnih proizvoda. Poznato je da su oni najbolji izvor kalcijuma, čijim unosom se sprečava nastanak osteoporoze i verovatno raka creva. Danas se velika pažnja poklanja ispitivanju fermentisanih mlečnih proizvoda, kao značajnog izvora probiotika (Oberreuther-Moschner i sar., 2004).

Govedina. Antikancerogena masna kiselina, poznata kao konjugovana linolna kiselina (CLA) je prvi put izolovana 1987. godine iz pečenog goveđeg mesa (Ha i sar., 1987). Termin CLA se odnosi na smešu pozicionih i geometrijskih izomera linolne kiseline (18:2 n-6), kod koje su dvostruke veze konjugovane, umesto da postoje razdvojene metilenskom grupom.

2.4.5 Zdravstvene izjave

Zdravstvene izjave, (engl. health claims) koje se mogu istaći na funkcionalnim namirnicama moraju biti zasnovane na naučnim dokazima, biti istinite i ne smeju da dovode u zabludu potrošača. U SAD uobičajene izjave koje prate ovu vrstu namirnica, mogu se svrstati u dve kategorije:

(1) Izjave o odnosu strukture i funkcije (engl. structure and function claims), moraju da budu istinite i da ne dovode u zabludu potrošača. Ove izjave ne moraju da budu odobrene od strane FDA.

(2) Zdravstvene izjave (engl. health claims ili disease-specific claim) moraju da budu autorizovane od FDA i da poseduju značajnu naučnu potvrdu (Hill-ovi kriterijumi).

Prema Vodiču Evropskog Saveta za naučnu verifikaciju zdravstvenih izjava za funkcionalnu hranu, neophodno je rangiranje dokaza različitih tipova studija koje podržavaju zdravstvenu izjavu.

Najčešće studije su:

1. eksperimentalne humane studije (kliničke ili interventne studije)
 - a) randomizovane kontrolisane interventne studije
 - b) delimično kontrolisane interventne studije
2. opservacione humane studije (epidemiološke studije)
 - a) prospektivne kohortne studije
 - b) retrospektivne kohortne studije
 - c) studije slučaja (uvek retrospektivne)
3. biohemijske, celularne ili studije na životinjama.

2.4.6 Biomarkeri

U Evropi je 1999. uspostavljen konsenzus poznat kao "Scientific Concepts of Functional Foods in Europe" (FUFOSE). Konsenzus dokument FUFOSE koncepta daje radnu definiciju funkcionalne hrane, a poseban akcenat stavlja na kritičnu procenu naučno potvrđenih rezultata o pozitivnom delovanju određenih nutrijenata i komponenata hrane na pojedine funkcije organizma.

Hrana se može smatrati funkcionalnom ukoliko je naučno potvrđeno da pozitivno utiče na određene funkcije u organizmu, pored njenog uobičajenog nutritivnog dejstva, a u smislu promocije zdravlja i smanjenja rizika pojave bolesti. Funkcionalna hrana uvek mora biti u obliku hrane, a pozitivan efekat na zdravlje mora da se ispolji konzumiranjem uobičajene količine hrane.

Da bi se ilustrovaao koncept funkcionalne hrane i njen značaj u unapređenju zdravlja potrebno je pokazati koji su to specifični nutrijenti i komponente hrane koje ciljano pozitivno deluju na određene fiziološke funkcije organizma (Aswell, 2002).

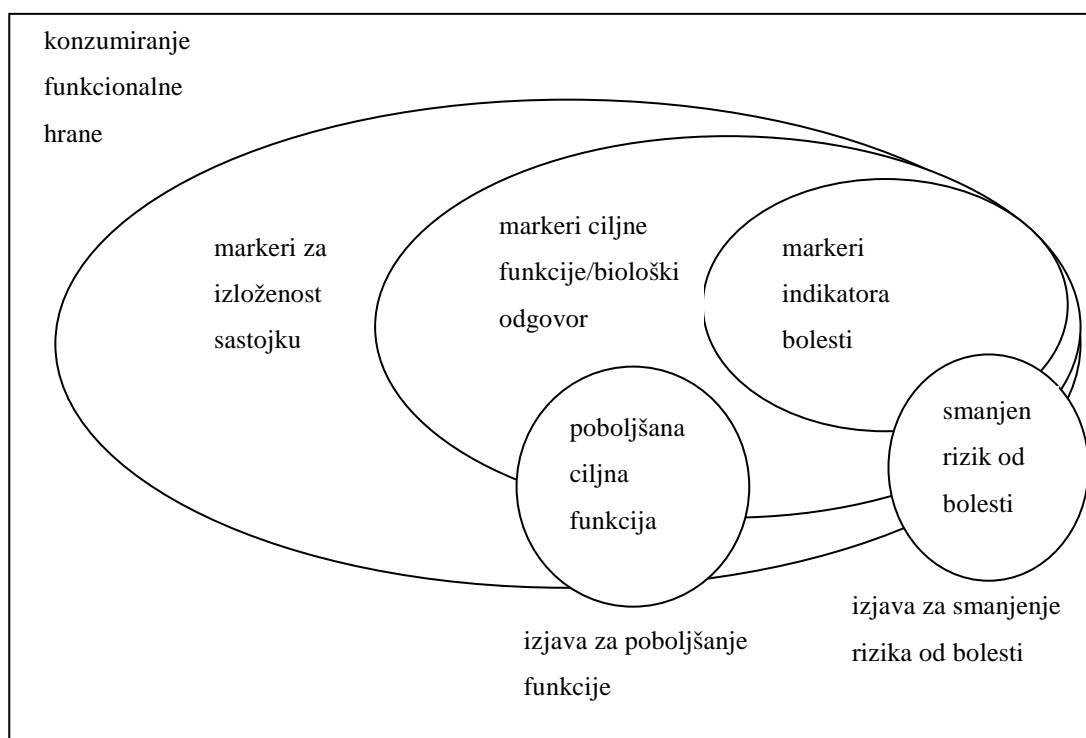
Biomarker može biti svaki parametar koji ukazuje na promenu u biohemijskom procesu, strukturi ili funkciji, a koja je rezultat interakcije između biološkog sistema i komponente hrane (Milner, 2000).

Dobar biomarker mora biti merljiv, validan, reproduktivan, senzitivan i specifičan. Postoji nekoliko klasa biomarkera (**Slika 2.28.**).

1. Markeri izloženosti, na osnovu koji se procenjuje digestibilnost, fermentabilnost, apsorpcija ili biološka raspoloživost.

2. Markeri ciljane funkcije ili biološkog odgovora, kao što su promene u telesnim tečnostima, nivoi metabolita, proteina ili enzima, ili markeri koji se odnose na promenu određene fiziološke funkcije (maksimalna mišićna snaga, maksimalni utrošak kiseonika, i sl).

3. Markeri poboljšanja zdravstvenog stanja i/ili smanjenja rizika od bolesti. Ovde se radi o merenju biološkog procesa (određivanje sadržaja hemoglobina kod anemija, ili debljine zida krvnog suda u slučaju kardiovaskularnog oboljenja). Markeri mogu bio biohemijski (promena enzima) ili fiziološki (promena funkcije nekog organa).



Slika 2.28. Naučna osnova za zdravstvene izjave (FUFOSE Consensus).

Razvoj koncepta funkcionalne hrane i nova saznanja o bioaktivnim komponentama, mehanizmima njihovog delovanja, kao i otkrivanje novih i pouzdanih biomarkera doprineće boljem razumevanju načina na koji hrana utiče na zdravlje pojedinca, uvažavajući njegov genetski potencijal.

3 Materijal i metode

Eksperimentalni deo ove disertacije urađen je u laboratorijama Instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, dok su određivanja vezana za antioksidativna svojstva, elektron spin rezonantnom (ESR) spektroskopijom, vršena na katedri za organsku hemiju Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu.

3.1 MATERIJAL

3.1.1 Biljni materijal

Biljne sirovine korišćene u radu, prikazane u tabeli 3.1., su proizvodi Instituta za proučavanje lekovitog bilja “Dr Josif Pančić” iz Beograda. Sirovine su obezbeđene delom iz spontane flore, a delom iz plantažne proizvodnje u zavisnosti od vrste, a kontrolisane su prema važećim propisima u ovoj oblasti. Ulazna kontrola svih biljnih sirovina obuhvatila je: utvrđivanje indentiteta, kontrolu senzornih svojstava, određivanje stepena čistoće (vlaga, pepeo, sitne primese), vrednovanje (određivanje sadržaja aktivnih materija) i ispitivanje zdravstvene ispravnosti (**Tabele 3.2. i 3.3.**).

Tabela 3.1. Biljne sirovine korišćene u radu

Uzorak	Vrsta	Organ	Droga
List pitome nane	<i>Mentha x piperita</i> L.	List	<i>Menthae piperitae folium</i>
Plod peršuna	<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) A.W. Nym. ex Hill	Plod	<i>Petroselini fructus</i>
Plod kima	<i>Carum carvi</i> L.	Plod	<i>Carvi fructus</i>
Kora krušine	<i>Rhamnus frangula</i> L.	Kora	<i>Frangulae cortex</i>
List breze	<i>Betula pendula</i> Roth.	List	<i>Betulae folium</i>
Vitalplant [®]	smeša (<i>Frangulae cortex</i> (35 %), <i>Menthae piperitae folium</i> (20%), <i>Carvi fructus</i> (20 %), <i>Petroselini fructus</i> (25 %))		

Tabela 3.2. Karakteristike biljnih droga koje su korišćene u radu.

Naziv droge	Senzorne karakteristike	Sadržaj vlage (%)	Sadržaj pepela (%)	Sadržaj etarskih ulja (%)
<i>Frangulae cortex</i>	Odgovara Ph. Eur.	9,30	5,31	-
<i>Menthae piperitae folium</i>	Odgovara Ph. Eur.	12,03	10,87	2,26
<i>Carvi fructus</i>	Odgovara Ph. Eur.	5,73	4,95	2,35
<i>Petroselini fructus</i>	Odgovara Ph. Eur.	3,38	9,86	1,90
<i>Betulae folium</i>	Odgovara Ph. Eur.	8,94	9,46	-

Mlevenje i prosejavanje pojedinačnih biljnih sirovina obavljeno je uz korišćenje odgovarajuće opreme (mlin, sejalice) i na taj način su biljne sirovine prerađene i usitnjene do veličine čestice od 3 mm.

Tabela 3.3. Karakteristike komercijalnog preparata Vitalplant[®].

Parametar	Vitalplant [®] pulvis
Sadržaj vlage (%)	7,91
Sadržaj pepela (%)	6,71
Granulacija	0,75
Dodatne analize*	Odgovara Ph. Eur.

* mikrobiološki kvalitet, ostaci pesticida, sadržaj mikotoksina, radioaktivnost.

3.1.2 Hemikalije i reagensi

Linolna kiselina (99%), β -karoten (95%), Tween 40, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH[·]), natrijumova so 5,6-difenil-3-(2-piridil)-1,2,4-triazin-4',4''-disulfonske kiseline (Ferrozine), trihlorsirćetna kiselina (TCA), Folin-Ciocalteau's reagent, butilovani hidroksitoluen (BHT), 5,5-dimetil-pirolin-N-oksid (DMPO), ruzmarinska kiselina, hlorogenska kiselina, galna kiselina, rutin, α -tokoferol, apigenin, *trans*-cimetna kiselina i luteolin su proizvedeni kompanije Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Germany, dok su metanol HPLC čistoće (gradient grade), mravlja kiselina za HPLC, kao i kvercetin pribavljeni iz kompanije Merck, Darmstadt, Germany.

Svi ostali reagensi i hemikalije upotrebljeni u eksperimentalnom radu bili su analitičke čistoće, poreklom od različitih proizvođača. Ultračista voda je dobijena u laboratoriji, korišćenjem sistema Millipore, Elix UV i Simplicity Water Purification System-a.

3.2 METODE

3.2.1 Postupak ekstrakcije i termičkog tretmana biljnog materijala

Biljni ekstrakti su dobijeni postupkom maceracije, pri čemu je biljni materijal ekstrahovan smešom etanol:voda (80:20, v/v), u odnosu 1:10 (w/v), tokom 24 h uz povremeno mućkanje. Nakon izvršene ekstrakcije i filtriranja kroz kvalitativnu filter hartiju, rastvarač je uparen na rotacionom vakuum uparivaču do suva, pri temperaturi ne većoj od 40 °C. Prinos osušenog ekstrakta je izračunat na osnovu merenja mase suvog ostatka i izražen u procentima.

Dobijeni biljni ekstrakti su ponovo rastvoreni u smeši etanol:voda (80:20, v/v) i kvantitativno preneti u odmerni sud, koji je dopunjen do crte ekstragensom. Jednake porcije svakog ekstrakta su preneti u dva nova odmerna suda, pri čemu je prvi dopunjen do crte, a drugi je izložen termičkom tretmanu, na ključalom vodenom kupatilu, u trajanju od 15 min (Arabshahi-D i sar., 2007). Nakon hlađenja je i ovaj sud dopunjen do crte.

Ovim postupkom je za svaku biljnu komponentu dobijen ekstrakt i termički tretiran ekstrakt.

3.2.2 Aplikacija biljnih sirovina i ekstrakata u keks

Osnovna receptura za pripremu testa, odnosno receptura kontrolnog uzorka obuhvatila je: 600 g belog brašna (Tip 500), 180 g šećera, 300 g hidrogenizovanog biljnog ulja i potrebnu količinu vode (~ 24 g). Testo je istanjeno do debljine od 5 mm, i isečeno u pravougaone komade, smešteno na aluminijumski pleh u kom se peklo 10 min na 180°C.

Keksovi su pripremljeni u dve serije: sa dodatkom biljne smeše Vitalplant[®], i sa dodatkom etanolnog ekstrakta biljne smeše Vitalplant[®], dobijenog na način opisan u 3.2.1. Svaka serija je obuhvatila tri nivoa supstitucije. U prvom slučaju, keksovi su pripremljeni sa dodatkom biljne smeše na nivou 2%, 4% i 6% supstitucije pšeničnog brašna. Odnosno, receptura kontrolnog uzorka je izmenjena dodatkom 12, 24 i 36 g biljne smeše.

Druga serija je obuhvatila supstituciju pšeničnog brašna ekstraktima, dobijenim iz identičnih količina biljnog materijala upotrebljnih u seriji jedan. Drugim rečima, za pripremu keksova serije dva formulaciji kontrolnog keksa dodati su ekstrakti dobijeni iz 12, 24 i 36 g

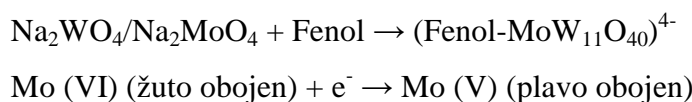
biljne mešavine, po postupku opisanom u 3.2.1. U daljem tekstu ovi keksovi su označeni kao keksovi sa dodatkom 2%, 4% i 6% ekstrakta.

Keksovi su čuvani tokom 6 nedelja u aluminijumskoj foliji, na sobnoj temperaturi.

3.2.3 Ispitivanje hemijskog sastava

3.2.3.1 Određivanje ukupnih fenolnih jedinjenja u biljnim ekstraktima (Metoda po Folin-Ciocalteu)

Metoda po Folin-Ciocalteu (FC metoda) je zasnovana na merenju redukujućeg kapaciteta polifenolnih jedinjenja, čijom disocijacijom nastaje proton i fenoksidni anjon, koji redukuje Folin-Ciocalteu reagens do plavo obojenog jona (Fenol-MoW₁₁O₄₀)⁴⁻:



Rastvori i reagensi:

1. 20% Na₂CO₃ : 3 g Na₂CO₃ rastvoreno je uz zagrevanje u 12 ml vode.
2. Folin-Ciocalteu reagens
3. Standardni rastvor galne kiseline.

Određivanje:

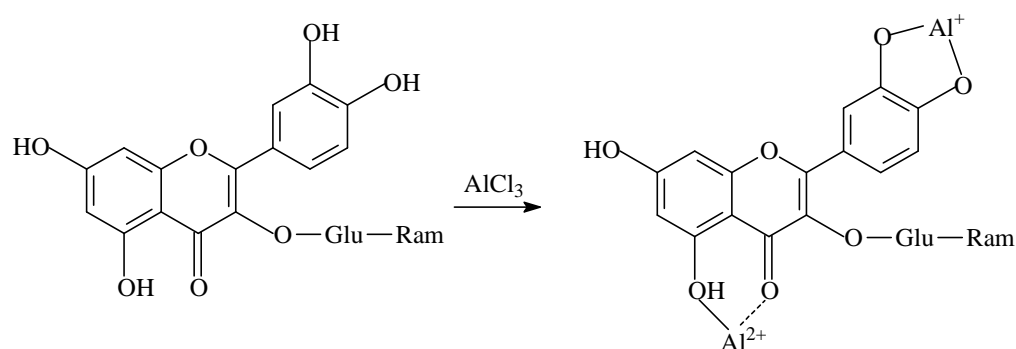
Reakciona smeša je pripremljena mešanjem: 0,1 ml etanolnog rastvora ekstrakta, 7,9 ml destilovane vode, 0,5 ml Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 ml 20% Na₂CO₃. Uporedo je pripremljena slepa proba: 8 ml destilovane vode, 0,5 ml Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 ml 20% Na₂CO₃. Nakon 2 h izmerenu su apsorbance na $\lambda = 750$ nm (spektrofotometar Jenway 6405 UV/Vis) (Singleton i sar., 1999.)

Na osnovu izmerenih apsorbanci, sa kalibracione krive standardnog rastvora galne kiseline određena je masena koncentracija (mg/ml) polifenolnih jedinjenja, korišćenjem dobijene jednačine prave ($c = 97.107 \times A + 0.0101$, $r^2 = 0,9984$), a zatim je sadržaj

polifenolnih jedinjenja u biljnom materijalu izražen kao ekvivalent galne kiseline (mg galne kiseline/g ekstrakta ili biljnog materiala).

3.2.3.2 Određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima (Metoda po Markhamu)

Flavonoidi i flavonglikozidi imaju osobinu da sa metalima daju odgovarajuće metalo-komplekse. Naročito je važan Al^{3+} kompleks (**Slika 3.1**).



Slika 3.1. Struktura rutina i njegov kompleks sa aluminijumom.

Rastvori i reagensi:

- Rastvor za ekstrakciju: U 14 ml MeOH se doda 5 ml H_2O i 1 ml cc CH_3COOH
- Reagens AlCl_3 : Rastvori se 13,3 mg $\text{AlCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ i 40 mg CH_3COONa u 10 ml H_2O .
- Standardni rastvor rutina: 50 mg rutina je rastvoreno u metanolu, preneto u odmernu tikvicu od 50 ml koja je dopunjena do crte. Iz ovog rastvora je pripremljena serija razblaženja pomoću koje je konstruisana kalibraciona kriva.

Priprema ekstrakata:

Etanolni ekstrakti dobijeni po proceduri opisanoj u 3.2.1. su razblaženi rastvorom za ekstrakciju u odmernoj tikvici od 25 ml.

Spektrofotometrijsko određivanje:

U 5 ml ekstrakta dodato je 1 ml vode i 2,5 ml reagensa AlCl_3 . Paralelno je pripremljena i slepa proba: 3,5 ml vode i 5 ml ekstrakta (bez dodavanja AlCl_3). Apsorbanca radne (Ar) i slepe probe (As) su očitane na $\lambda_{\text{max}} = 430 \text{ nm}$ (spektrofotometar Jenway 6405 UV/Vis).

Na osnovu razlike apsorbanci radne i slepe probe ($\Delta = \text{Ar} - \text{As}$) sa kalibracione krive rutina, koja je pripremljena u sedam tačaka ($m (\mu\text{g}) = 0,002 \times A - 0,0016$, $r^2 = 0,9998$) određena je masena koncentracija flavonoida u ekstraktu, a potom je preračunat i sadržaj flavonoida u biljnom materijalu i izražen u %.

3.2.3.3 HPLC analiza etanolnih ekstrakata lekovitog bilja

Sadržaj fenolnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima lekovitog bilja, dobijenih po postupku 3.2.1. je određen tehnikom tečne hromatografijom visoke rezolucije (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) na aparatu HPLC Agilent 1200 serije. Korišćena je kolona Agilent, Eclipse XDB-C18, $1,8 \mu\text{m}$, $4,6 \times 50 \text{ mm}$.

Detekcija razdvojenih pikova je izvršena pomoću detektora sa serijom dioda (Diode Array Detector, DAD) na 280, 330 i 350 nm, a absorpcioni spektri komponenata su snimljeni u opsegu od 190 do 400 nm, R 500/100 nm.

U cilju razdvajanja 17 komponenti u jednoj analizi, razvijena je metoda. Kao mobilna faza korišćen je sistem rastvarača: A – metanol (HPLC gradient grade) i B – 1% mravlja kiselina u ultračistoj vodi (v/v). Razdvajanje komponenti je izvedeno primenom sledećeg linearnog gradijenta: 0-10 min, 10 -25 % A; 10-20 min, 25 - 60 % A; 20-30 min, 60-70 % A. Završetak analize, odnosno “stop time“ je podešen na 45 min, nakon čega je koloni ostavljeno vreme da se uravnoteži na početne uslove 10% A, time što je “post time“ podešen na 10 min. Protok mobilne faze je iznosio 1 ml/min. Injektovano je 5 μl rastvora uzorka, automatski, korišćenjem autosampler-a. Kolona je termostatirana na temperaturi od 30 °C.

Za HPLC određivanja su korišćeni rastvori etanolnih ekstrakata biljaka masnih koncentracija 10,0 -15,0 mg/ml, pripremljeni rastvaranjem u smeši metanola i 1% mravlja kiselina u vodi u odnosu 50:50. Pre injektovanja svi rastvori su profiltrirani kroz filtere sa veličinom pora 0,20 μm (Nylon filters, Rotilabo-Spritzenfilter 13 mm, Roth, Karlsruhe, Nemačka).

U cilju analize aglikona izvršena je kisela hidroliza etanolnih ekstrakata biljaka. Hidroliza je vršena nakon rastvaranja suvog ostatka u 20 ml 62,5% metanola i dodatka 5 ml, 6 mol/dm³ HCl, 2h uz refluks na 90°C. Nakon isteka vremena sadržaj je prenet u odmerni sud od 50 ml i dopunjen metanolom do crte, pri čemu je masena koncentracija etanolnih ekstrakata iznosila oko 8 mg/ml.

Fenolne komponente prisutne u uzorcima su identifikovane poređenjem njihovih retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenom i spektrom standarda za svaku komponentu. Korišćeni su standardi: galne kiseline, ružmarinske kiseline, ferulne kiseline, protokatehinske kiseline, hlorogenske kiseline, kafene kiseline, vanilinske kiseline, siringične kiseline, *trans* cimetne kiseline, kvercetin, rutina, apigenin, naringenin, luteolin, kemferol, miricetin i aloe-emodin.

Za potvrdu identifikacije komponente je utvrđena i čistoća pika. Kvantifikacija komponentata je izvršena metodom spoljašnjeg standarda. Za svaki pojedinačni standard je pripremljen osnovni rastvor standarda masene koncentracije 1,0 mg/ml, rastvaranjem u metanolu. Od ovog rastvora je pripremljena serija razblaženih rastvora standarda masenih koncentracija u opsegu 0,002 – 0,030 mg/ml.

Konstruisana je kalibraciona kriva, za svaki standard, na osnovu dobijenih površina pikova u zavisnosti od masene koncentracije standarda. Iz dobijene jednačine linearne zavisnosti izračunate su masene koncentracije komponenti u uzorcima.

3.2.4 Ispitivanje antioksidantne aktivnosti

3.2.4.1 ESR spektralna analiza uticaja biljnih ekstrakata na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala

Rastvor koji sadrži superoksid anjon radikale je napravljen rastvaranjem KO_2 / kraun-etar (10 mM / 20 mM) u bezvodnom dimetilsulfoksidu (DMSO). Reakciona smeša se sastojala od 5 μl ove smeše, 500 μl osušenog DMSO i 5 μl rastvora DMPO u dimetilsulfoksidu (2 M). Uticaj biljnih ekstrakata na formiranje DMPO-OOH adukata je ispitivan dodavanjem biljnih ekstrakata u obliku DMF rastvora, u opsegu od 0,001-2,00 mg/ml.

Pripremljene smeše su nakon toga prenete u kvarcnu kivetu za vodene rastvore ER-160FT, i 2 min nakon mešanja, snimljeni su spektri na EMX Bruker (Rheinstetten, Germany) spektrometeru, korišćenjem TE_{102} šupljine, pri sledećim uslovima: modulacija polja 100 kHz, amplituda modulacije 4,00 G, jačina struje 1×10^4 , vremenski opseg merenja 327,68 ms, vremenska konstanta 40,96 ms, centar polja 3440 G, ukupan opseg merenja 100 G, frekvencija mikrotalasa 9,64 GHz, snaga 20 mW, temperatura 23 °C.

“Skevindžer“ aktivnost na superoksid anjon radikale ($\text{SAO}_2^{\cdot -}$) je definisana:

$$\% \text{SAO}_2^{\cdot -} = 100 \times (h_0 - h_x) / h_0$$

gde su:

h_0 - visina drugog pika ESR signala DMPO-OOH spin adukta slepe probe

h_x - visina drugog pika ESR signala DMPO-OOH spin adukta probe sa ekstraktima.

Konstruisana je zavisnost između $\text{SAO}_2^{\cdot -}$ u procentima i koncentracije rastvora ekstrakta u cilju određivanja vrednosti IC_{50} , izražene u mg ekstrakta/ml. IC_{50} vrednost je definisana kao ona masena koncentracija ekstrakta neophodna da inhibira nastajanje DMPO-OOH spin adukta za 50% u odnosu na kontrolu (Severino i sar., 2009).

3.2.4.2 ESR spektralna analiza uticaja biljnih ekstrakata na stvaranje i hidroksil radikala

Hidroksil radikali su dobijeni Fentonovom reakcijom, a detektovani primenom "spin trapping" tehnike, u model sistemu koji je dobijen mešanjem 200 μ l FeCl₂ koncentracije 0,3 mM, 200 μ l H₂O₂ koncentracije 2 mM, 200 μ l N,N-dimetilformanida (DMF) i 200 μ l DMPO koncentracije 112 mM, kao "spin trap-a" (slepa proba). Uticaj biljnih ekstrakata na količinu hidroksil radikala stabilizovanih u prisustvu DMPO je ispitivan dodavanjem biljnih ekstrakata rastvorenih u DMF, u opsegu od 0,005-0,200 mg/ml. ESR spektri su snimani, nakon reakcionog perioda od 2,5 min, na spektrometru Bruker 300E (Rheinstetten, Germany), pri sledećim uslovima: amplituda modulacije 0,512 G, jačina struje 1×10^4 , vremenska konstanta 81,92 ms, vremenski opseg merenja 163,84 ms, centar polja 3440,00 G, ukupan opseg merenja 100 G, frekvencija mikrotalasa 9,64 GHz, snaga 20 mW, temperatura 23 °C.

“Skevindžer“ aktivnost na hidroksil radikal (SA_{OH}) definisana je kao:

$$\% SA_{OH} = 100 \times (h_0 - h_x) / h_0$$

gde su:

h₀- visina drugog pika ESR signala DMPO-OH spin adukta slepe probe

h_x- visina drugog pika ESR signala DMPO-OH spin adukta probe sa biljnim ekstraktima.

Konstruisana je zavisnost između SA_{OH} u procentima i koncentracije rastvora ekstrakta u cilju određivanja vrednosti IC₅₀, izražene u mg ekstrakta/ml. IC₅₀ vrednost je definisana kao ona masena koncentracija ekstrakta neophodna da inhibira nastajanje DMPO-OH spin adukta za 50% u odnosu na kontrolu (Ćetković i sar., 2008).

3.2.4.3 Određivanje "skevindžer" aktivnosti na DPPH` radikale

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH`) je stabilan radikal sa maksimumom apsorpcije na 517 nm. Antioksidanti, donori vodonika u reakciji sa DPPH` radikalima vrše njihovu redukciju do žuto obojenog difenilpikrilhidrazina, što dovodi do smanjenja apsorpcije na 517 nm.

Priprema ekstrakata:

Etanolni biljni ekstrakti dobijeni po proceduri opisanoj u 3.2.1. su razblaženi metanolom, tako da je svaki pripremljen u četiri koncentracije u opsegu od 0,03 do 1 mg ekstrakta/ml. Metanolni ekstrakti keksa su pripremani u četiri koncentracije, ekstrakcijom ~ 2,5 g, 5 g, 7,5 g i 10 g samlevenog keksa sa 40 ml metanola tokom 24 h, na sobnoj temperaturi (Fan i sar., 2007). Kao referentne supstance u ovom testu su korišćeni etanolni rastvori komercijalnih antioksidanata BHT-a i α -tokoferola, pri koncentraciji od 0,100 mg/ml.

Rastvori i reagensi:

Rastvor 90 μ M DPPH \cdot : 22,5 ml 0,4 mM DPPH \cdot (Mr= 394.32), 0,01577 g DPPH \cdot je odmereno u odmernu tikvicu od 100 ml i dopunjeno sa 95 % MeOH do crte.

Spektrofotometrijsko određivanje:

Kontrola je pripremljena tako što je u epruvetu koja sadrži 3 ml metanola dodat 1 ml rastvora DPPH \cdot (90 μ M). Radna proba je pripremljena mešanjem 0,1 ml ekstrakta, 2,9 ml metanola i 1 ml rastvora DPPH \cdot (90 μ M). Reakciona smeša je ostavljena na tamnom mestu, na sobnoj temperaturi, 60 min. Absorbanca je očitana na 515 nm (spektrofotometar Jenway 6405 UV/Vis), a kao referentni rastvor je korišćen metanol. "Skevindžer" aktivnost na DPPH \cdot radikale (% RSC) je određena na osnovu jednačine:

$$\% \text{ RSC} = 100 - (A_{\text{uz}} \times 100 / A_{\text{kont}})$$

gde je:

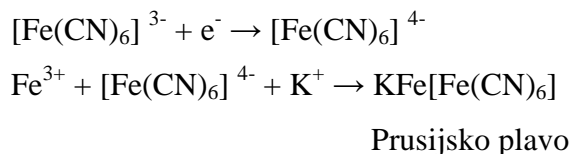
A_{uz} - apsorbance uzorka,

A_{kont} - apsorbance kontrole.

IC₅₀ vrednost je definisana kao masena koncentracija pri kojoj je neutralisano 50 % radikala, a dobijena je računski iz jednačine linearne regresije (Espin i sar., 2000).

3.2.4.4 Određivanje $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ redoks kapaciteta (FRAP)

$\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ redoks kapacitet je pokazatelj sposobnosti antioksidanta da predaje elektron. Određivanje se zasniva na reakciji:



Intenzitet plave boje očitana na 700 nm je upravo proporcionalan redukcionoj moći.

Priprema ekstrakata:

Etanolni biljni ekstrakti dobijeni po proceduri opisanoj u 3.2.1. su razblaženi etanolom, tako da je svaki priprnmljen u četiri masene koncentracije u opsegu od 0,030 do 10,0 mg ekstrakta/ml. Kao kotrola je korišćen rastvor butilovanog hidroksitoluena (BHT), koji je pripremljen takođe u četiri masene koncentracije (0,0051-0,24 mg/ml).

Rastvori i reagensi:

1. $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1 %)
2. Na - fosfatni pufer 0,2 M pH 6,6: 9,9968 g Na_2HPO_4 i 15,552 g NaH_2PO_4 je rastvoreno u odmernoj tikvici od 1 l, koja je dopunjena vodom do crte.
3. TCA- trihlorsirćetna kiselina, 10%
4. FeCl_3 - 0,1%

Spektrofotometrijsko određivanje:

Ispitivani ekstrakti (0,5 ml) su dodati u 2,5 ml fosfatnog pufera 0,2 M pH 6,6 i 2,5 ml rastvora $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (u šlifovanim epruvetama). Slepa proba je sadržala 0,5 ml etanola, 2,5 ml fosfatnog pufera 0,2 M pH 6,6 i 2,5 ml rastvora $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Sadržaj je inkubiran 20 min na 50 ° C, u vodenom kupatilu. Nakon hlađenja, u epruvete je dodato po 2,5 ml 10% TCA. U

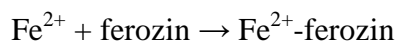
nove epruvete je odmereno po 2,5 ml supernatanta, 2,5 ml dest.vode i 1 ml 0,1% rastvora FeCl_3 .

Apsorbanca je merena na 700 nm (spektrofotometar Jenway 6405 UV/Vis). Na osnovu dobijenih vrednosti za četiri koncentracije, za svaki ispitani uzorak se konstruiše zavisnost $A_{700\text{ nm}}$ od koncentracije (Oyaizu, 1986; Juntachote i Berghofer, 2005).

IC_{50} vrednost je definisana kao masena koncentracija pri kojoj je vrednost $A_{700\text{ nm}}$ jednaka 0,500, a dobijena je računski iz jednačine linearne regresije (Mišan i sar., 2009).

3.2.4.5 Određivanje Fe^{2+} helatacione aktivnosti

Određivanje helatacione aktivnosti se zasniva na sposobnosti antioksidanta da vrši inhibiciju stvaranja kompleksa Fe^{2+} -ferozin:



apsorbuje na 562 nm

Niža apsorbanca na 562 nm odgovara većoj helatacionoj aktivnosti ekstrakta.

Priprema ekstrakata:

Etanolni ekstrakti dobijeni po proceduri opisanoj u 3.2.1. su razblaženi etanolom, tako da je svaki pripremljen u četiri koncentracije u opsegu od 0,080 do 2,00 mg ekstrakta/ml. Kao kontrola je korišćen rastvor dinatrijum etilendiamintetraacetat dihidrata ($\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$), koji je pripremljen u šest koncentracija od 0.003-0,015 mg/ml.

Rastvori i reagensi:

1. ferozin 5 mM, $M_r = 492,46$: priprema se rastvaranjem 0,2462 g ferozina u 100 ml vode.
2. 2 mM FeSO_4 , $M_r = 278,01$: priprema se rastvaranjem 0,0556 g $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ u 100 ml vode.
3. Na_2EDTA : priprema se rastvaranjem 0,0150 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$ u 100 ml vode. Dobijeni rastvor je dalje razblažen 10, 20, 40 i 50 puta.

Spektrofotometrijsko određivanje:

Radna proba je pripravljena tako što je u epruvetu dodat 1 ml ekstrakta ili rastvora Na₂EDTA, 3,7 ml dejonizovane vode, 0,1 ml rastvora FeSO₄ i 0,2 ml rastvora ferozina. Kontrola je pripravljena na isti način, osim što je umesto ekstrakta pipetirano 1 ml etanola.

Da bi se izvršila korekcija apsorbance koja potiče od ekstrakta, za svaki uzorak je pripravljena i slepa proba, kod koje je umesto 0,2 ml rastvora ferozina pipetirano 0,2 ml vode. Pripravljene rastvori su inkubirani 20 min na sobnoj temperaturi, nakon čega je očitana apsorbanca na 562 nm (spektrofotometar Jenway 6405 UV/Vis).

Helataciona aktivnost se računa po formuli:

$$Ha (\%) = (1 - ((A_{562 \text{ nm}} \text{ uzorka} - A_{562 \text{ nm}} \text{ slepe probe}) / A_{562 \text{ nm}} \text{ kontrole})) \times 100$$

Na osnovu dobijenih vrednosti za četiri koncentracije, za svaki ispitani uzorak se konstruiše zavisnost $A_{562 \text{ nm}}$ od koncentracije (Decker i Welch 1990; Juntachote i Berghofer, 2005).

IC₅₀ vrednost je definisana kao masena koncentracija koja odgovara helatacionoj aktivnosti od 50%, a dobijena je računski iz jednačine linearne regresije.

3.2.4.6 Određivanje antioksidantne aktivnosti β-karoten metodom

Antioksidantna aktivnost biljnih ekstrakata je određena na osnovu oksidativne degradacije β-karotena u emulziji β-karoten-linolna kiselina (Moure i sar., 2000), koja je praćena spektrofotometrijski i kolorimetrijski na ELISA čitaču.

Priprema ekstrakata:

Etanolni ekstrakti dobijeni po proceduri opisanoj u 3.2.1. su razblaženi metanolom, tako da je svaki pripravljen u četiri koncentracije u opsegu od 0,800 do 8,00 mg ekstrakta/ml. Kao kontrola je korišćen rastvor butilovanog hidroksitoluena (BHT), koji je pripravljen takođe u četiri koncentracije (0,005-0,510 mg/ml).

Rastvori i reagensi:

1. Emulzija β -karotena i linolne kiseline: 2 mg β -karotena je rastvoreno u 10 ml hloroforma i 1 ml tog rastvora je pomešan sa 20 mg linolne kiseline i 200 mg Tween 40 u odmernoj tikvici od 50 ml. Hloroform je odstranjen u struji azota. Ostatak je dopunjen destilovanom vodom do crte.
2. Emulzija linolne kiseline za slepu probu: 20 mg linolne kiseline i 200 mg Tween 40 je odmereno u odmernu tikvicu od 50 ml i dopunjeno vodom do crte.

Spektrofotometrijsko određivanje:

Ispitivani ekstrakti (0,2 ml) su dodati u 5 ml emulzije β -karotena i linolne kiseline (u šlifovanim epruvetama). Kontrola je sadržala 0,2 ml vode i 5 ml emulzije β -karotena i linolne kiseline. Apsorbanca je očitana odmah po dodatku ekstrakata u emulziju na 470 nm (spektrofotometar Jenway 6405 UV/Vis), i to očitavanje je označeno kao $t=0$. Nakon toga, epruvete su smeštene u vodeno kupatilo na 50 °C i apsorbanca je očitana ponovo nakon 120 min.

Slepa proba, koja se koristila za podešavanje nule spektrofotometra, se sastojala od 0,2 ml vode i 5 ml emulzije linolne kiseline za slepu probu.

Brzina degradacije β -karotena je izračunata na osnovu kinetike jednačine prvog reda po sledećoj formuli:

$$\ln(a/b) \times 1/t = \text{brzina degradacije uzorka}$$

gde su:

\ln - prirodni log

a - vrednost apsorbance (470 nm) u $t = 0$ min

b - vrednost apsorbance (470 nm) u $t = 120$ min

t - vreme (min).

Antioksidantna aktivnost (AOA) je izražena kao % inhibicije u odnosu na kontrolu, koristeći jednačinu (Al-Saikhan i sar., 1995):

$$AOA = (v_k - v_u) \times 100 / v_k$$

gde su:

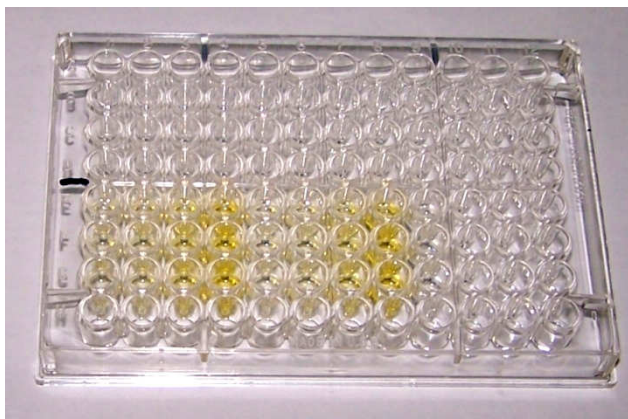
v_k - brzina degradacije kontrole

v_u - brzina degradacije uzorka.

IC_{50} vrednost je definisana kao masena koncentracija potrebna da izvrši inhibiciju degradacije β -karotena 50 % u odnosu na kontrolu, pri postavljenim eksperimentalnim uslovima, a dobijena je računski iz jednačine linearne regresije.

Kolorimetrijsko određivanje:

200 μ l rastvora iz šlifovanih epruveta pripremljenih za spektrofotometrijsko određivanje je preneto u plastične "bunariće" prikazane na slici 3.2., koji su preneti u Thermo Electron Corporation Multiscan Ascent ELISA čitač. Program na uređaju je podešen tako da se inkubacija na 50°C tokom 120 min vrši u struji toplog vazduha, kao i da se očitavanje apsorbance vrši na filteru od 450 nm, u vremenu $t = 0$ min i $t = 120$ min. Na osnovu dobijenih očitavanja je na identičan način kao i kod spektrofotometrijskog određivanja izračunata IC_{50} vrednost za svaki ekstrakt.

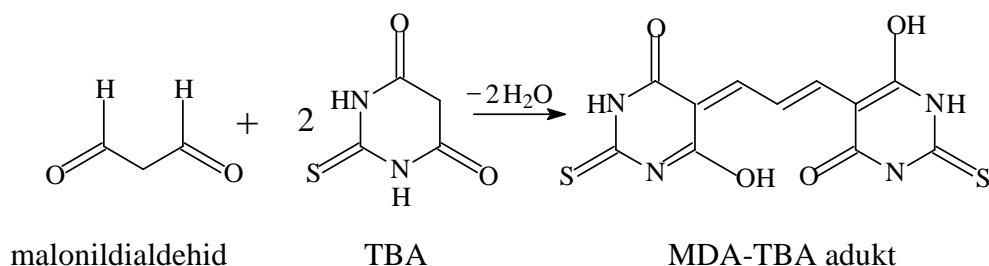


Slika 3.2. Izgled "bunarića" sa reakcionim smešama ekstrakta u različitim koncentracijama, nakon inkubacije od 120 min.

3.2.5 Ispitivanje oksidativnih promena na lipidima u keksu

3.2.5.1 TBA test za određivanje stepena lipidne peroksidacije u keksu

TBA (Tiobarbiturna kiselina, TBA) test je zasnovan na spektrofotometrijskom određivanju ružičasto obojenog kompleksa koji nastaje nakon reakcije malonildialdehida (MDA) sa dva molekula TBA. Test je primenjen u cilju određivanja stepena lipidne peroksidacije u uzorcima keksa sa dodatkom lekovitog bilja i ekstrakata lekovitog bilja, opisanih u poglavlju 3.2.2.



Slika 3.3. Reakcija stvaranja MDA-TBA adukta.

U radu je korišćen modifikovani TBA test (Hodges i sar., 1999; Fan, 2002) za uzorke koji sadrže interferirajuće supstance.

Priprema ekstrakata:

U šlifovane erlenmajere od 100 ml je odmereno oko 0,5 g uzorka keksa, koji je predhodno samleven, zatim je dodato 25 ml smeše etanol:voda (80:20, v/v). Ekstrakcija TBA-reaktivnih supstanci je vršena na ultrazvučnom kupatilu 5 min. Filtriranjem kroz kvalitativnu filter hartiju dobijeni su ekstrakti koji su direktno korišćeni u daljem radu.

Rastvori i reagensi:

1. etanol:voda 80:20, v/v
2. reagens A (20 % TCA (w/v) +0.01% BHT) je pripremljen odmeravanjem 80 g trihlorsirćetne kiseline (TCA) i 0.04 g butilovanog hidroksitoluena (BHT), i rastvaranjem u 400 ml vode.
3. reagens B (20 % TCA (w/v) + 0.01% BHT + 0.69% TBA) je pripremljen odmeravanjem 1,3 g TBA u odmerni sud od 200 ml i dopunjavanjem istog reagensom A do crte.

Spektrofotometrijsko određivanje:

Slepa proba je pripremljena mešanjem 2 ml reagensa A sa 2 ml reagensa B u epruveti sa šlifovanim zapašaćem. Za svaki uzorak je pripremljena kontrola, koja se sastojala iz 2 ml ekstrakta i 2 ml reagensa A. Radna proba je pripremljena mešanjem 2 ml ekstrakta i 2 ml reagensa B.

Pripremljeni rastvori su inkubirani 30 min u vodenom kupatilu, na 70° C, nakon čega su centrifugirani na 3000 g 10 min ili filtrirani, ukoliko je bilo potrebno.

Očitavanje apsorbance je vršeno na 532, 440 i 600 nm (spektrofotometar Jenway 6405 UV/Vis).

Količina MDA u ekstraktu je računata na osnovu jednačine:

$$(\text{Abs}_{532+\text{TBA}} - \text{Abs}_{600+\text{TBA}}) - (\text{Abs}_{532-\text{TBA}} - \text{Abs}_{600-\text{TBA}}) = \mathbf{A}$$

$$(\text{Abs}_{440+\text{TBA}} - \text{Abs}_{600+\text{TBA}}) \times 0,0571 = \mathbf{B}$$

$$\text{MDA (nmol ml}^{-1}\text{)} = ((\mathbf{A} - \mathbf{B}) / 157000) 10^6$$

gde su:

- $\text{Abs}_{532+\text{TBA}}$ – apsorbanca radne probe na 532 nm
- $\text{Abs}_{600+\text{TBA}}$ – apsorbanca radne probe na 600 nm
- $\text{Abs}_{440+\text{TBA}}$ – apsorbanca radne probe na 440 nm
- $\text{Abs}_{532-\text{TBA}}$ – apsorbanca kontrole na 532 nm
- $\text{Abs}_{600-\text{TBA}}$ – apsorbanca kontrole na 600 nm

3.2.5.2 Metoda za određivanje peroksidnog broja u keksu

Peroksidni broj u uzorcima keksa sa dodatkom lekovitog bilja i ekstrakata lekovitog bilja, opisanih u poglavlju 3.2.2., je određen jodometrijski, u potpunosti prema metodi A.O.C.S. (Official Method Cd 8-53), polazeći od 5,0 g uzorka mlevenog keksa. Ovom metodom se određuju peroksidi i slični produkti nastali oksidacijom masti, koji oksiduju KJ pod datim reakcionim uslovima. Peroksidni broj (P_x), izražen u miliekvivalentima peroksida u 1000 g uzorka, se izračunava prema sledećoj jednačini:

$$P_x = \frac{(S - B) \cdot N \cdot 1000}{w}$$

gde su :

S - zapremina rastvora $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ utrošenog za titraciju uzorka, u ml;

B - zapremina rastvora $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ utrošenog za titraciju slepe probe, u ml;

N - koncentracija standardnog rastvora $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, u mol/l;

w - masa uzorka za ispitivanje, u gramima.

Standardni rastvor $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ koncentracije 0,1 mol/dm³ je pripremljen i standardizovan po metodi A.O.A.C. Method #942.27.

3.2.6 Statistička obrada podataka

Svi eksperimenti su izvedeni u najmanje tri ponavljanja, a rezultati predstavljani kao srednja vrednost. Određena je standardna devijacija (SD). Za pojedine parametre je urađena analiza varijanse, koeficijenti korelacije između parametara, kao i Duncan-ov test višestrukih intervala. Podaci su obrađeni primenom softverskog paketa Microsoft Excel for Windows i StatSoft Statistica (data analysis software system), version 7.1.

4 Rezultati i diskusija

4.1 HEMIJSKI SASTAV BILJNIH SIROVINA

4.1.1 Prinosi ekstrakcije etanolom

U cilju ekstrakcije biljnih fenola i drugih antioksidanata, najčešće se koriste tri ekstrakcione tehnike: ekstrakcija rastvaračima, ekstrakcija na čvrstoj fazi (solid-phase extraction) i superkritična ekstrakcija. Količina biljnih fenola u ekstraktu, kao i sastav ekstrakta u velikoj meri zavisi od načina ekstrakcije, kao i tipa i polarnosti rastvarača (Moller i sar., 1999). Jedinjenja iz klase biljnih fenola se veoma razlikuju po svojoj kiselosti i polarnosti, od izuzetno hidrofobnih do hidrofilnih. pKa vrednosti ovih jedinjenja variraju od 8 do 12, dok se njihovi podeoni koeficijenti za sistem ulje:voda kreću od 6×10^{-4} do 1,5 (Rodis i sar., 2002).

Prirodni antioksidanati iz lekovitog bilja i začina se najčešće ekstrahuju metanolom (Suhaj, 2006). Antocijani se najčešće ekstrahuju na hladno, metanolom ili amil-alkoholom koji sadrži malu količinu kiseline. Takođe, pokazalo se da je metanol i najefikasniji ekstragens za katehine, dok se najbolji prinosi proantocijanidina dobijaju sa 70% acetonom. Ollanketo i sar. (2002), su utvrdili da se antioksidanti žalfije najefikasnije ekstrahuju toplom vodom pod povišenim pritiskom, zatim maceracijom sa 70% etanolom, potom hidrodestilacijom i na kraju ultrazvukom sa metanolom kao ekstragensom. Keinänen (1993) je poredio kratkotrajnu ekstrakciju na hladno, ekstrakciju po Soxlet-u i ekstrakciju uz refluks lista breze, različitim rastvaračima. Rastvarače: aceton, metanol i etanol je koristio kao apsolutne i u smeši sa vodom (80% etanol, metanol i aceton). Isti autor je pokazao da je ekstrakcija rastvaračima koji sadrže vodu efikasnija od ekstrakcije apsolutnim rastvaračima i zaključio da je ekstrakcija na hladno 80% etanolom najbolje kompromisno rešenje između efikasnosti i bezbednosti rastvarača.

U ovom radu izbor rastvarača za ekstrakciju, smeše etanol:voda (80:20, v/v), je prvenstveno izvršen na osnovu niske toksičnosti, a zatim na osnovu pretpostavljene efikasnosti.

Tabela 4.1. Prinosi ekstrakcije izraženi u %.

Uzorak	Prinos ekstrakta (%, vrednost \pm SD)
List pitome nane	17,2 \pm 0,750
Kora krušine	22,0 \pm 0,890
List breze	26,1 \pm 0,820
Plod kima	19,5 \pm 0,730
Plod peršuna	11,6 \pm 0,620
Vitalplant [®]	17,3 \pm 0,540

U Tabeli 4.1. su prikazani dobijeni prinosi ekstrakata. Dobijene vrednosti su se kretale oko 20%, pri čemu je list breze dao najveći, a plod kim najmanji prinos.

Nešto veće prinose ekstrakcije za peršun (19,6%) i kim (24,2%) dobili su Hinneburg i sar. (2006) pri čemu se njihov ekstrakcioni postupak zasnivao na hidrodestilaciji. U našem predhodnom eksperimentu, prilikom ekstrakcije Vitalplant[®] biljne mešavine 96% etanolom, prinos ekstrakcije je iznosio 10,07% (Mišan i sar., 2007). Dorman i sar. (2003) su nakon hidrodestilacije, dobili prinos ekstrakta mente od 332 mg/g suve materije.

4.1.2 Sadržaj ukupnih rastvorljivih fenola u etanolnim ekstraktima

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja sadržaja ukupnih rastvorljivih fenola u etanolnim ekstraktima, termički netretiranim i tretiranim, pripremljenim kao što je opisano u poglavlju 3.2.1., prikazani su u tabeli 4.2. Dobijeni rezultati preračunati su i na masu polaznog uzorka. Rezultati su prikazani u tabeli 4.3.

Folin-Ciocalteou metoda za određivanje sadržaja ukupnih rastvorljivih fenola zasnovana je na redukcionalnoj sposobnosti fenolnih hidroksilnih grupa. Nedostatak metode je njena nedovoljna specifičnost, jer se biljni fenoli detektuju sa različitom osetljivošću. U ovom radu, sadržaj ukupnih rastvorljivih fenola u ispitivanim ekstraktima je izražen kao ekvivalent galne kiseline (GAE).

Tabela 4.2. Sadržaj ukupnih fenola u etanolnim ekstraktima, izražen u GAE.

Uzorak	Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu	
	netretiran	termički tretiran
	(%, vrednost \pm SD)	(%, vrednost \pm SD)
List pitome nane	18,4 \pm 0,001 ^g	18,7 \pm 0,310 ^g
Kora krušine	6,6 \pm 0,080 ^f	16,6 \pm 0,080 ^f
List breze	13,9 \pm 0,360 ^d	15,3 \pm 0,290 ^e
Plod kima	2,89 \pm 0,020 ^a	3,01 \pm 0,110 ^a
Plod peršuna	7,13 \pm 0,860 ^c	6,32 \pm 0,140 ^b
Vitalplant [®]	13,2 \pm 0,950 ^b	12,8 \pm 0,840 ^b

Brojevi označeni različitim slovima (^{a, b}) u koloni se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, $p < 0,05$.

Korišćenjem Duncan-ovog testa višestrukih intervala (Tabela 4.2.) jasno se uočavaju razlike između sadržaja ukupnih rastvorljivih fenola u etanolnim ekstraktima uzoraka. Najmanji sadržaj biljnih fenola u ekstraktu utvrđen je kod kima, dok je najveći sadržaj dobijen kod pitome nane. Svi uzorci se na nivou ekstrakta signifikantno razlikuju.

Termičkim tretmanom u većini slučajeva ne dolazi do značajne promene na nivou ekstrakta (Tabela 4.2.), osim u slučaju breze i peršuna. Porast u sadržaju fenola tokom termičkog tretmana bi se mogao objasniti hemijskim promenama u strukturi fenola, dok bi smanjenje moglo biti posledica njihove direktne degradacije (Nicoli i sar., 1999).

Ako se razlike razmatraju na nivou uzorka biljnog materijala, uzimajući u obzir statističke parametre, krušina i breza su uzorci sa najvećim sadržajem biljnih fenola, dok je kim i ovog puta uzorak sa najmanjim sadržajem.

Dobijene vrednost sadržaja ukupnih biljnih fenola su uporedive sa literaturnim podacima. Nakon ekstrakcije metanolom, Muchuweti i sar. (2007) su dobili vrednost sadržaja ukupnih fenola za peršun od oko 8,00 mg GAE/g uzorka, dok su znatno niži sadržaj od nas, dobili kod mente (~12,00 mg GAE/g uzorka). Liu i sar. (2008) su ekstrakcijom mente, 60% etanolom, takođe dobili niži sadržaj fenola (13,17 \pm 0,04 mg GAE/g uzorka), dok su Dorman i sar. (2003) nakon hidrodestilacije nane izmerili vrednost od 230,8 mg GAE /g ekstrakta, veći sadržaj ukupnih fenola u odnosu na naš rezultat. Nakon hidrodestilacije kima, Hinneburg i sar. (2006) su dobili veći sadržaj fenola u ekstraktu (37,4 \pm 0,04 mg GAE/g ekstrakta), dok su kod peršuna izmerili manji sadržaj (29,2 \pm 0,44 mg GAE/g ekstrakta).

Tabela 4.3. Sadržaj ukupnih fenola etanolnih ekstrakata biljaka, preračunat na masu polaznog uzorka, izražen u GAE.

Uzorak	Sadržaj ukupnih fenola u uzorku	
	netretiran (%, vrednost \pm SD)	termički tretiran (%, vrednost \pm SD)
List pitome nane	3,18 \pm 0,001 ^e	3,22 \pm 0,050 ^e
Kora krušine	3,66 \pm 0,020 ^f	3,66 \pm 0,020 ^f
List breze	3,61 \pm 0,090 ^f	4,00 \pm 0,070 ^g
Plod kima	0,563 \pm 0,005 ^a	0,586 \pm 0,020 ^a
Plod peršuna	0,830 \pm 0,100 ^c	0,735 \pm 0,017 ^b
Vitalplant [®]	1,14 \pm 0,080 ^d	1,11 \pm 0,070 ^d

Brojevi označeni različitim slovima (^{a, b}) u koloni se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, $p < 0,05$.

Varijacije sadržaja fenolnih jedinjenja biljaka su posledica delovanja velikog broja faktora, koji pored genetskih, uključuju i područje kultivacije kao i mnogobrojne faktore životne sredine (Dorman i sar., 2003).

4.1.3 Sadržaj ukupnih flavonoida u etanolnim ekstraktima

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja sadržaja ukupnih flavonoida u etanolnim ekstraktima, termički ne tretiranim i tretiranim, pripremljenim kao što je opisano u poglavlju 3.2.1., prikazani su u tabeli 4.4. Dobijeni rezultati preračunati su i na masu polaznog uzorka. Rezultati su prikazani u tabeli 4.5.

Sadržaj ukupnih flavonoida u etanolnim ekstraktima se kretao od 0,510 do 2,05%, pri čemu je ekstrakt Vitalplant[®] biljne mešavine bio najbogatiji flavonoidima, dok je ekstrakt peršuna imao najmanji sadržaj.

Statistički parametri ukazuju na to da se svi ispitani ekstrakti značajno razlikuju u pogledu sadržaja flavonoida, kao i na to da termički tretman dovodi do njihovog značajnog smanjenja u svim slučajevima osim kod peršuna.

Ukoliko se sadržaj ukupnih flavonoida razmatra na nivou biljnog uzorka, svojim najvećim sadržajem se ističe breza i biljna mešavina Vitalplant[®], dok značajnost razlike

između mente i kima ovom metodom nije uočena. Takođe, peršun je pokazao najmanji sadržaj ukupnih flavonida i na nivou uzorka.

Tabela 4.4. Sadržaj ukupnih flavonoida u etanolnim ekstraktima, izražen u ekvivalentima rutina.

Uzorak	Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktu	
	netretiran (%, vrednost \pm SD)	termički tretiran (%, vrednost \pm SD)
List pitome nane	1,97 \pm 0,037 ^{gh}	1,51 \pm 0,300 ^e
Kora krušine	1,33 \pm 0,200 ^{cd}	1,04 \pm 0,010 ^b
List breze	1,43 \pm 0,004 ^{de}	1,30 \pm 0,060 ^c
Plod kima	1,78 \pm 0,070 ^f	0,610 \pm 0,140 ^a
Plod peršuna	0,510 \pm 0,010 ^a	0,550 \pm 0,050 ^a
Vitalplant [®]	2,05 \pm 0,060 ^h	1,90 \pm 0,050 ^{fg}

Brojevi označeni različitim slovima (^{a, b}) u koloni se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, $p < 0,05$.

Imajući u vidu veliku raznovrsnost jedinjenja koja spadaju u klasu flavonoida, kao i činjenicu da se većina nalazi vezana u obliku glikozida, teško je pronaći idealnu metodu za određivanje njihovog ukupnog sadržaja. Kao i u slučaju metode za određivanje ukupnih fenola i ova metoda pokazuje nejednaku selektivnost prema jedinjenjima ove klase, jer pozitivnu reakciju daju samo ona jedinjenja koja imaju dostupne *o*-dihidroksifenolne, 3-hidroksihromonske, 5-hidroksihromonske i *o*-hidroksikarbonilne funkcionalne grupe. Publikovan je veliki broj metoda za određivanje flavonoida. U novije vreme, sve više se insistira na primeni hromatografskih metoda (Merken i Beecher 2000; Sakakibara i sar., 2003).

Veliki broj istraživanja ukazuje da uslovi gajenja i kasnijeg tretiranja biljnih sirovina u značajnoj meri utiče na sadržaj flavonoida. Pokazano je da je sadržaj flavonoida direktno zavisao od UV zračenja i koncentracije CO₂ (Caldwell i sar., 2005; Daniel i sar., 1999).

Uzimajući u obzir sve varijacije, velike razlike u sadržaju ukupnih flavonoida koje se sreću u literaturi za slične uzorke, nisu začuđujuće. Ipak, u prvom redu je sadržaj i sastav flavonoida genetski uslovljen.

Tabela 4.5. Sadržaj ukupnih flavonoida etanolnih ekstrakata biljaka, preračunat na biljni uzorak, izražen u ekvivalentima rutina.

Uzorak	Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorku	
	netretiran	termički tretiran
	(%, vrednost \pm SD)	(%, vrednost \pm SD)
List pitome nane	0,341 \pm 0,006 ^f	0,261 \pm 0,005 ^d
Kora krušine	0,292 \pm 0,050 ^e	0,229 \pm 0,002 ^c
List breze	0,375 \pm 0,001 ^g	0,338 \pm 0,014 ^f
Plod kima	0,346 \pm 0,013 ^f	0,118 \pm 0,027 ^b
Plod peršuna	0,059 \pm 0,002 ^a	0,063 \pm 0,006 ^a
Vitalplant [®]	0,355 \pm 0,010 ^{fg}	0,329 \pm 0,008 ^f

Brojevi označeni različitim slovima (^{a, b}) u koloni se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, $p < 0,05$.

4.1.4 HPLC analiza etanolnih ekstrakata biljaka

Kvantitativno određivanje fenolnih jedinjenja samo po sebi predstavlja analitički izazov s obzirom da je procenjeno da postoji preko milion ovih jedinjenja, koja se u biljkama nalaze u obliku glikozida, sa velikom raznovrsnošću u broju, vrsti i načinu vezivanja šećernih ostataka (Herrmann, 1976; Wollenweber i Dietz, 1981).

Objavljen je veliki broj HPLC metoda za određivanje fenolnih jedinjenja u biljnim matriksima. U osnovi, one su prilagođene određivanju sadržaja najzastupljenijih fenola u jednoj biljnoj vrsti ili određenog broja jedinjenja ove klase u raznovrsnim matriksima (Harnly i sar., 2006).

U literaturi je zastupljen veliki broj radova koji se odnose na ispitivanje sastava fenola breze, peršuna, pitome nane, kima kao i antrahinona krušine (Dallenbach-Tölke i sar., 1987; Ossipov i sar., 1996; Voirin i sar., 1999; Sakakibara i sar., 2003; Gao i sar., 2009).

U pogledu analize flavonoida, objavljeni su radovi sa metodama koje pokrivaju pet klasa flavonoida (Merken i Beecher 2000; Sakakibara i sar., 2003). U oba slučaja, kvantifikacija je urađena nakon hidrolize glikozida na osnovu komparacije sa dostupnim eksternim standardima aglikona. Merken i Beecher (2000) su objavili metod za razdvajanje 17 aglikona, predstavnika pet klasa fenola. Flavonoidi su nakon ekstrakcije podvrgnuti kiseloj

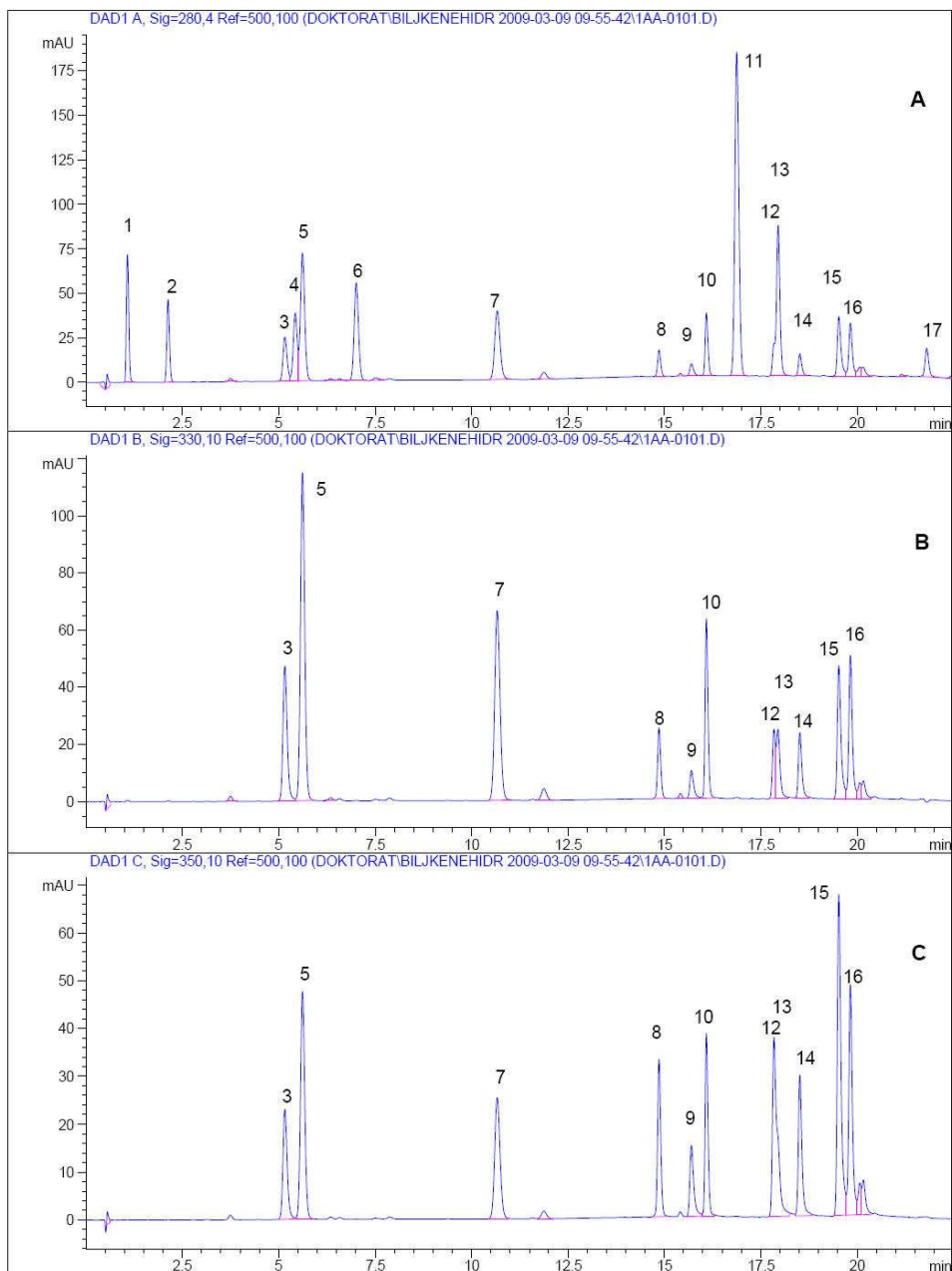
hidrolizi u metanolu uz refluks. Aglikoni su zatim razdvojeni na HPLC uz DAD detekciju. Pomenuti autori su takođe došli do zaključka da hidroliza delimično dovodi i do degradacije aglikona. Merken i sar. (2001) su primenili kinetički metod pseudo prvog reda u cilju određivanja flavona, flavonola i antocijana. Degradacija flavanona i flavan-3-ola je bila suviše brza da bi se odredila ovom metodom, te je stoga njihovo određivanje vršeno bez hidrolize.

Imajući u vidu radove ovih autora, u našoj laboratoriji smo razvili HPLC metod primenljiv za razdvajanje fenolnih jedinjenja u svim ispitivanim ekstraktima. Razdvajanje komponenata je vršeno iz etanolnih ekstrakata biljaka i hidrolizata, pripremljenih kao što je opisano u poglavlju 3.2.5. Na slici 4.1. je prikazan hromatogram smeše standarda na 280, 330 i 350 nm.

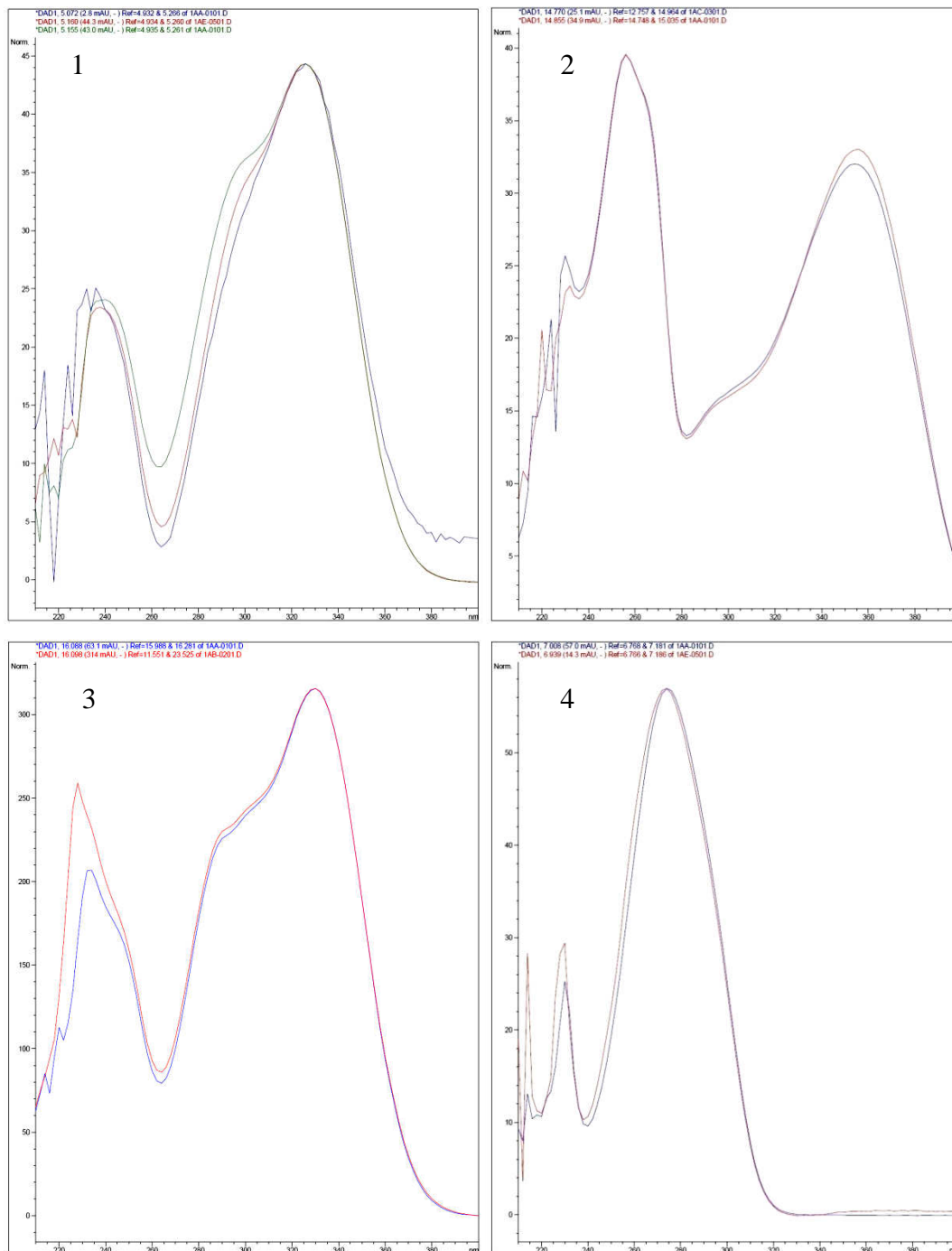
Redosled eluiranja komponenti pri opisanim hromatografskim uslovima je: galna kiselina, protokatehinska kiselina, kafena kiselina, vanilinska kiselina, hlorogenska kiselina, siringična kiselina, ferulna kiselina, rutin, miricetin, ruzmarinska kiselina, *trans*-cimetna kiselina, kvercetin, naringenin, luteolin, kemferol, apigenin i aloe-emodin. Razdvajanje ovih komponenti je postignuto za 22 min.

Identifikacija slobodnih fenolnih kiselina i aglikona u ekstraktima i hidrolizatima je vršena na osnovu poređenja retencionih vremena i spektara, na 280, 330 i 350 nm sa odgovarajućim vrednostima dobijenim za standard (**Slika 4.2.**). Na slikama 4.3.-4.5. u Prilogu dati su apsorpcioni spektri ostalih kvantifikovanih jedinjenja.

Kvantifikacija je vršena metodom eksternog standarda, pri čemu je za svako dostupno jedinjenje konstruisana kalibarciona kriva u četiri tačke. Stepennost linearosti konstruisanih krivih je bio izuzetno velik ($R^2 > 0,9995$).



Slika 4.1. Hromatogram smeše standarda: A-na 280 nm, B-330 nm i C-350 nm. Redosled eluiranja jedinjenja: 1-galna kiselina, 2- protokatehinska kiselina, 3-kafena kiselina, 4-vanilinska kiselina, 5-hlorogenska kiselina, 6-siringična kiselina, 7-ferulna kiselina, 8-rutin, 9-miricetin, 10-ruzmarinska kiselina, 11- *trans*-cimetna kiselina, 12-kvercetin, 13-naringenin, 14-luteolin, 15-kemferol, 16-apigenin i 17-aloe-emodin



Slika 4.2. Primeri preklapanja spektara standarda i uzorka: 1-rutina (nehidrolizovani ekstrakt kima), 2-ruzmarinske kiseline (nehidrolizovani ekstrakt mente), 3-siringične kiseline (hidrolizovani ekstrakt krušine), 4-kafene kiseline (nehidrolizovani i hidrolizovani ekstrakt breze).

Kao što se može videti sa hromatograma (**Slika 4.1.**), svi ispitani standardi imaju odziv na 280 nm, gde smo postigli uspešno razdvajanje svih komponenti, osim kvercetina i

naringenina. Taj problem smo prevazišli njihovim određivanjem na 330 nm, gde su i oni uspešno razdvojeni i detektovani.

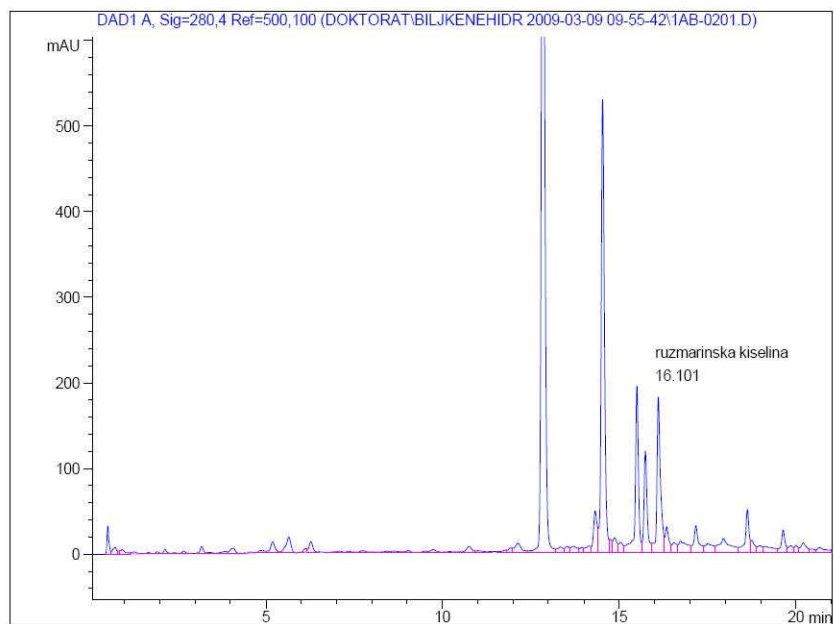
U tabelama 4.6. i 4.7. su prikazani rezultati kvantitativnog sastava fenolnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima, pre i nakon hidrolize.

4.1.4.1 HPLC analiza etanolnog ekstrakta pitome nane

U etanolnom ekstraktu pitome nane utvrđeno je i kvantifikovano prisustvo kafene kiseline, hlorogenske kiseline, rutina, ruzmarinske kiseline, kao i slobodnih aglikona: kvercetina, naringenina, luteolina i apigenina. U poređenju sa ostalim kvantifikovanim jedinjenjima, svojim sadržajem se ističe ruzmarinska kiselina. Nakon hidrolize (**Tabela 4.7.**), dolazi do porasta u sadržaju svih pomenutih jedinjenja usled raskidanja glikozidnih veza, osim u slučaju kafene kiseline, koja se verovatno delimično degradira pri primenjenim eksperimentalnim uslovima hidrolize.

Poznato je da vrste roda *Mentha* sadrže širok spektar fenolnih jedinjenja uključujući fenil propanoide (Guédon i sar., 1994; Triantaphyllou i sar., 2001; Areias i sar., 2001), kao i flavonoide u formi aglikona, glikozida i acilovanih derivata (Voirin i Bayet 1992; Voirin i sar., 1994). Najznačajnije fenolne komponente pitome nane su eriocitrin (eriodiktol-7-*O*-rutinosid), luteolin-7-*O*-glukozid i ruzmarinska kiselina (Dorman i sar., 2003). Areias i sar. (2001) je pronašao da su najzastupljenije komponente u vodenom ekstraktu pitome nane glikozid eriocitrin i ruzmarinska kiselina, koji čine od 59-67% ukupnih fenola. Triantaphyllou i sar. (2001) je saopštio da vodeni ekstrakt pitome nane sadrži vezane fenolne kiseline, slobodnu ruzmarinsku kiselinu, kao i 3- i 5- glikozide flavonoida.

Naši rezultati su u saglanoosti sa rezultatima navedenih autora. Na hromatogramu etanolnog ekstrakta pitome nane pre hidrolize (**Slika 4.6.**) se jasno uočava izraženi pik ruzmarinske kiseline, dok eriocitrin i ostale glikozide u ekstraktu nismo mogli da kvantifikujemo, usled nedostatka odgovarajućih standarda.



Slika 4.6. Hromatogram etanolnog ekstrakta pitome nane.

Tabela 4.6. Sadržaj fenolnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima, izražen u mg/g ekstrakta.

	List pitome nane	Kora krušine	List breze	Plod kima	Plod peršuna	Vitalplant®
galna kiselina	-	0,203 ± 0,011	0,175 ± 0,024	-	0,248 ± 0,009	0,233 ± 0,013
protokatehinska kiselina	-	0,507 ± 0,020	0,284 ± 0,021	0,108 ± 0,007	0,106 ± 0,012	0,438 ± 0,025
kafena kiselina	1,86 ± 0,033	1,14 ± 0,040	0,634 ± 0,042	2,10 ± 0,460	0,283 ± 0,029	0,768 ± 0,020
vanilinska kiselina	-	1,53 ± 0,012	-	-	-	-
hlorogenska kiselina	0,73 ± 0,017	0,328 ± 0,008	0,390 ± 0,012	0,152 ± 0,012	-	0,241 ± 0,018
siringična kiselina	-	1,17 ± 0,020	-	-	-	0,516 ± 0,011
ferulna kiselina	-	-	0,247 ± 0,029	-	-	0,547 ± 0,016
rutin	2,18 ± 0,500	-	1,24 ± 0,040	1,21 ± 0,105	-	0,926 ± 0,011
miricetin	-	-	-	-	-	-
ruzmarinska kiselina	12,4 ± 0,92	-	-	0,164 ± 0,025	-	5,69 ± 0,023
<i>trans</i> -cimetna kiselina	-	-	-	-	0,087 ± 0,002	-
kvercetin	0,843 ± 0,022	-	-	-	-	3,43 ± 0,120
naringenin	1,46 ± 0,230	-	-	-	-	-
luteolin	3,58 ± 0,181	-	-	-	0,549 ± 0,013	0,797 ± 0,054
kemferol	-	-	-	-	0,356 ± 0,011	-
apigenin	0,445 ± 0,019	-	0,288 ± 0,010	-	0,291 ± 0,047	1,96 ± 0,012
aloe-emodin	-	1,23 ± 0,011	-	-	-	1,03 ± 0,012

Tabela 4.7. Sadržaj fenolnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima nakon hidrolize, izražen u mg/g ekstrakta.

	List pitome nane	Kora krušine	List breze	Plod kima	Plod peršuna	Vitalplant [®]
galna kiselina	-	0,156 ± 0,021	18,2 ± 0,385	-	11,6 ± 0,452	0,284 ± 0,002
protokatehinska kiselina	-	0,845 ± 0,011	0,839 ± 0,112	-	0,466 ± 0,021	1,25 ± 0,010
kafena kiselina	0,914 ± 0,05	2,26 ± 0,012	0,576 ± 0,030	1,54 ± 0,260	2,26 ± 0,130	1,34 ± 0,012
vanilinska kiselina	-	-	-	-	-	-
hlorogenska kiselina	1,66 ± 0,29	0,353 ± 0,021	0,295 ± 0,026	1,32 ± 0,032	-	0,885 ± 0,050
siringična kiselina	-	1,47 ± 0,102	-	-	-	-
ferulna kiselina	-	0,886 ± 0,021	0,655 ± 0,022	0,52 ± 0,017	-	0,677 ± 0,020
rutin	-	-	-	-	-	-
miricetin	5,37 ± 0,380	0,723 ± 0,012	6,02 ± 0,320	-	-	1,37 ± 0,017
ruzmarinska kiselina	17,5 ± 0,970	-	-	0,200 ± 0,085	-	4,93 ± 0,062
<i>trans</i> -cimetna kiselina	-	-	-	-	0,155 ± 0,008	-
kvercetin	14,9 ± 0,954	1,68 ± 0,020	7,43 ± 0,348	4,36 ± 0,025	0,817 ± 0,011	4,21 ± 0,050
naringenin	3,56 ± 0,220	5,00 ± 0,210	-	-	-	-
luteolin	13,6 ± 0,281	2,32 ± 0,120	-	-	0,559 ± 0,019	4,57 ± 0,062
kemferol	-	-	0,643 ± 0,027	6,33 ± 0,213	2,99 ± 0,026	1,06 ± 0,032
apigenin	3,56 ± 0,26	1,97 ± 0,080	0,667 ± 0,060	-	5,02 ± 0,012	6,49 ± 0,012
aloe-emodin	-	3,48 ± 0,240	-	-	-	2,21 ± 0,20
Σ	61,1	21,2	27,9	14,3	23,9	29,3

4.1.4.2 HPLC analiza etanolnog ekstrakta krušine

U etanolnom ekstraktu krušine identifikovana su i kvantifikovana sledeća jedinjenja: galna kiselina, protokatehinska kiselina, kafena kiselina, vanilinska kiselina, hlorogenska kiselina, siringična kiselina, kao i aloe-emodin. Nakon hidrolize, utvrđeno je i prisustvo ferulne kiseline, miricetina, kvercetina, naringenina, luteolina i apigenina. Usled hidrolize, dolazi do porasta sadržaja svih jedinjenja, osim u slučaju galne i vanilinske kiseline, čije se prisustvo nakon hidrolize nije moglo detektovati. Hromatogrami ekstrakta krušine pre i nakon hidrolize prikazani su u Prilogu (Slika 4.7.).

Poznato je da su antrahinoni i njihovi glikozidi glavni konstituenti kore krušine. Obzirom na veliki farmakološki značaj ove biljke, njihov sastav je relativno dobro proučen (Gao i sar., 2009) . Najznačajniji antrahinoni krušine su: emodin, rein, hrizofanol i aloe-emodin, kao i njihovi glikozidi, pri čemu frangulin A (emodin-6-*O*-ramnozid) i frangulin B (emodin-6-*O*-apiozid) čine najzastupljenije komponente. Osim toga, saopšteno je da frangula sadrži i diantrone, flavonoide i tanine (Bradley, 1992; Wichtl i Bisset, 1994; Newall i sar., 1996; ESCOP, 1997).

4.1.4.3 HPLC analiza etanolnog ekstrakta breze

U etanolnom ekstraktu lista breze kvantitativno su određena sledeća jedinjenja: galna kiselina, protokatehinska kiselina, kafena kiselina, hlorogenska kiselina, ferulna kiselina, rutin i apigenin. Nakon hidrolize utvrđeno je prisustvo i miricetina, kvercetina, kemferola, kao i porast u sadržaju apigenina. Povećanje u sadržaju jedinjenja usled hidrolize je uočeno i u slučaju galne kiseline, kao i protokatehinske kiseline, dok je do smanjenje sadržaja, kao i u slučaju pitome nane došlo kod kafene kiseline. Nakon hidrolize neznatno je smanjen i sadržaj hlorogenske kiseline. Veliko povećanje u sadržaju galne kiseline nakon hidrolize se može objasniti hidrolizom galotanina. Hromatogrami ekstrakta breze pre i nakon hidrolize prikazani su u Prilogu (Slika 4.8.).

Analizom fenolnog sastava ekstrakata breze do sada je utvrđeno postojanje sledećih fenolnih jedinjenja: kvercetin 3-rutinozida (rutina), kvercetin 3-galaktozida (hiperina), kvercetin 3-glukuronida, kvercetin 3-arabinopiranozida, kvercetin 3-arabinofuranozida, kvercetin 3-ramnozida i miricetin 3-galaktozida (Dallenbach-Tölke i sar., 1986). Prisustvo miricetin 3-digalaktozida, metilovanih flavona (acacetina i apigenin 7,4'-dimetil etra), kao i

različitih fenolnih kiselina je takođe poznato (Hänsel and Hörhammer, 1954; Pawlowska, 1980). Ossipov i sar. (1996) su osim hlorogenske, neo hlorogenske, galne (+) katehina, glikozida kvercetina i miricetina utvrdili i prisustvo niza drugih niskomolekularnih fenola.

4.1.4.4 HPLC analiza etanolnog ekstrakta kima

Naši rezultati ispitivanja etanolnog ekstrakta kima su ukazali na prisustvo protokatehinske kiseline, kafene, hlorogenske, rutina i ruzmarinske kiseline, čiji je sadržaj kvantifikovan. Nakon hidrolize protokatehinska kiselina nije detektovana, dok je sadržaj kafene kiseline smanjen, kao i u slučaju nane i breze. Hromatogrami ekstrakta kima pre i nakon hidrolize prikazani su u Prilogu (**Slika 4.9.**).

Kvantifikovane količine kemferola i kvercetina su u skladu sa literaturnim podacima, gde je navedeno da su najzastupljenije fenolne komponente kima glikozidi kemferola i kvercetina (Suhaj i sar., 2006). Wojdyło i sar. (2007) su kvantitativnom analizom kima, nakon enzimске hidrolize, identifikovali kafenu kiselinu, neohlorogensku kiselinu, ferulnu kiselinu i izoramnetin kao glavne fenolne komponente.

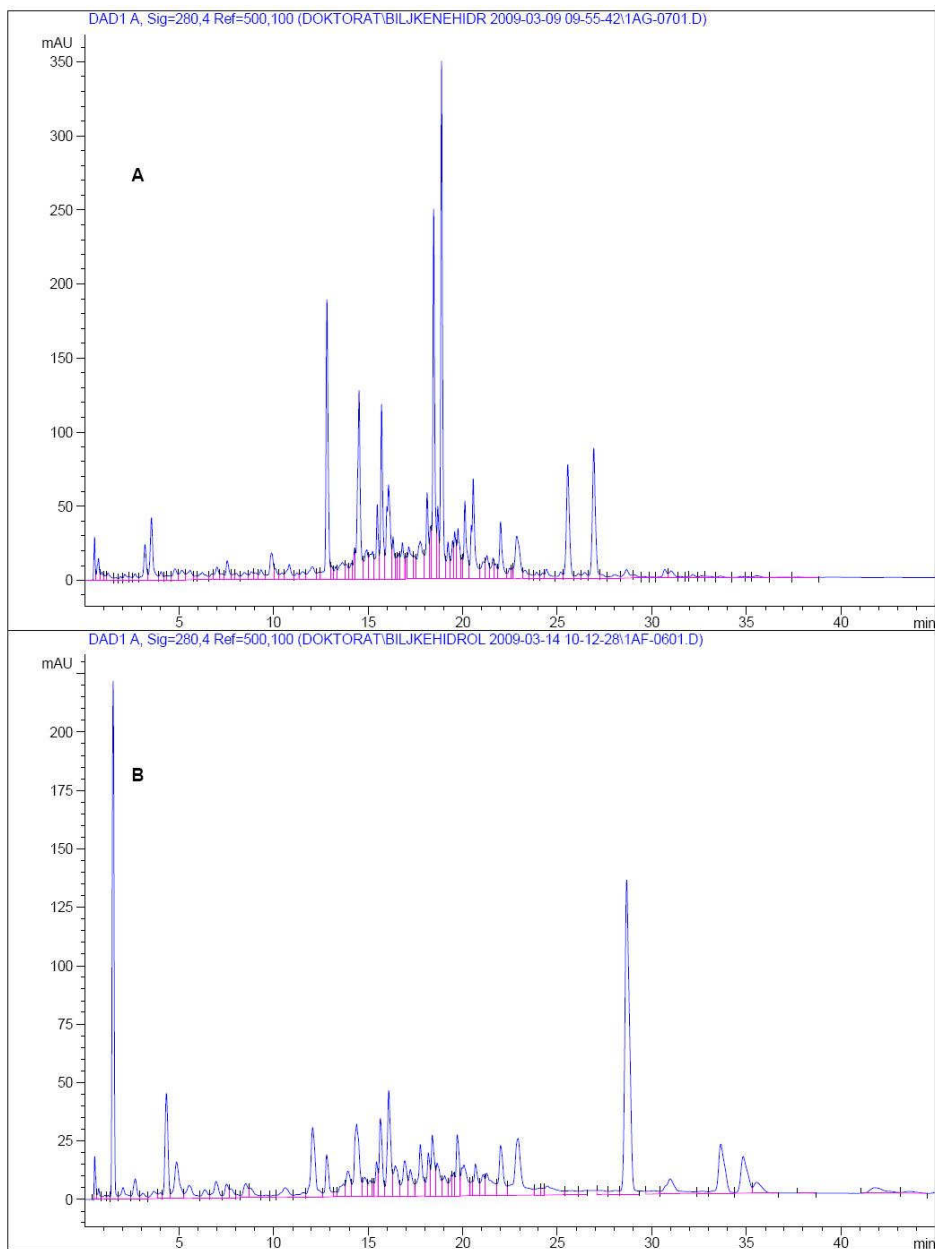
4.1.4.5 HPLC analiza etanolnog ekstrakta peršuna

Kvantitativnom analizom sastava fenolnih jedinjenja etanolnog ekstrakta peršuna utvrdili smo prisustvo: galne kiseline, protokatehinske kiseline, kafene kiseline, *trans*-cimetne kiseline, luteolina, kemferola i apigenina. Nakon hidrolize, utvrđeno je i prisustvo kvercetina, kao i porast u sadržaju svih ispitanih komponenti, a naročito apigenina. Porast u sadržaju galne kiseline nakon hidrolize se može objasniti hidrolizom galotanina, kao i u slučaju breze. Hromatogrami ekstrakta peršuna pre i nakon hidrolize prikazani su u Prilogu (**Slika 4.10.**).

Sakakibara i sar. (2003) su utvrdili da su glavne fenolne komponente peršuna apigenin i kemferol glikozidi, što je u saglasnosti sa našim rezultatima. Shan i sar. (2005) su saopštili da su glavne fenolne komponente peršuna apigenin, kafena, *p*-kumarinska i ferulna kiselina, pri čemu prisustvo kemferola nisu detektovali.

4.1.4.6 HPLC analiza etanolnog ekstrakta komercijalnog preparata Vitalplant®

Analizom biljne mešavine Vitalplant® utvrđeno je prisustvo velikog broja jedinjenja, čije je prisustvo dokazano u pojedinačnim biljnim komponentama (Tabele 4.6. i 4.7.).

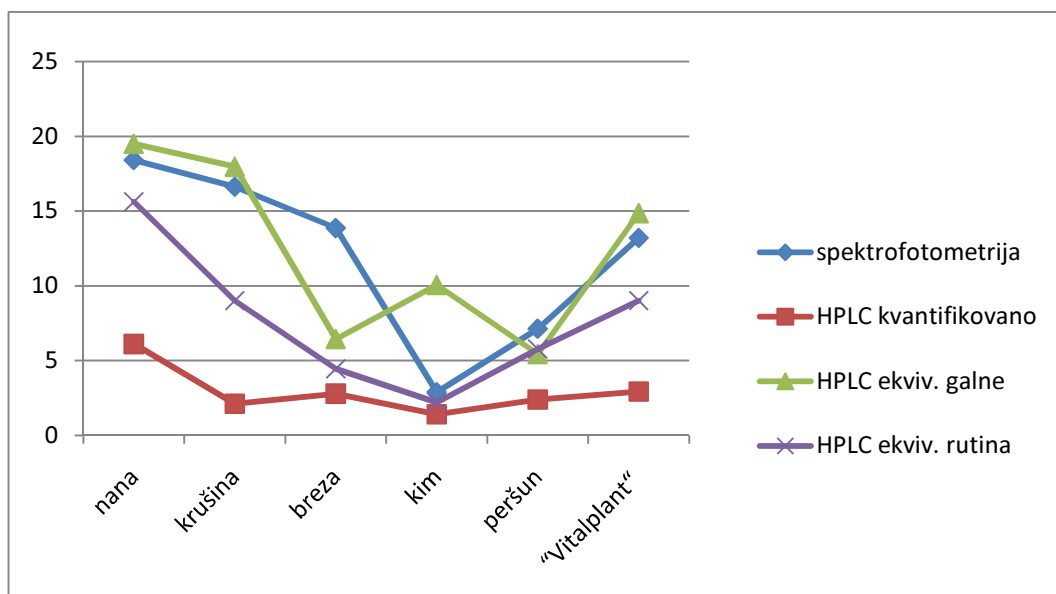


Slika 4.11. Hromatogrami etanolnog ekstrakta komercijalnog preparata Vitalplant® na 280 nm, A-pre hidrolize i B-nakon hidrolize.

Imajući u vidu kompleksnost smeše, komponente prisutne u suviše niskim koncentracijama je bilo teško kvantifikovati. Na slici 4.11. je prikazan hromatogram mešavine Vitalplant® pre i nakon hidrolize.

Obzirom na limitirani broj dostupnih standarda, ukupan sadržaj fenola je određen izražavanjem ukupne površine pikova na 280 nm i 350 nm, preko ekvivalenata galne kiseline, odnosno rutina.

Na slici 4.12. su prikazani rezultati određivanja ukupnih fenola spektrofotometrijski u ekvivalentima galne kiseline, kao suma svih kvantifikovanih jedinjenja određenih HPLC metodom (**Tabela 4.7.**), na osnovu ukupne površine pikova HPLC određivanja na 280 nm koja je izražena u ekvivalentima galne kiseline i na osnovu ukupne površine pikova HPLC određivanja na 350 nm izražene u ekvivalentima rutina.



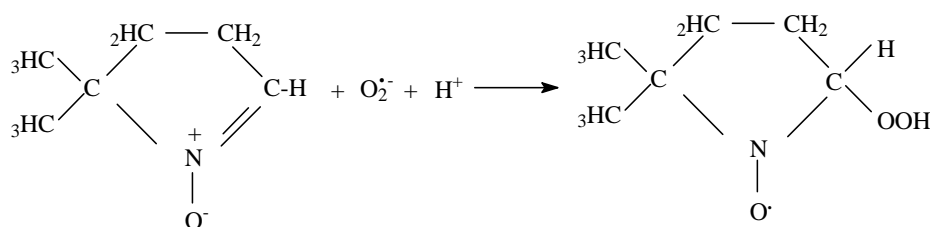
Slika 4.12. Rezultati određivanja ukupnih fenola: spektrofotometrijski u ekvivalentima galne kiseline; kao suma svih kvantifikovanih jedinjenja određenih HPLC metodom; na osnovu ukupne površine pikova HPLC određivanja na 280 nm koja je izražena u ekvivalentima galne kiseline; na osnovu ukupne površine pikova HPLC određivanja na 350 nm izražene u ekvivalentima rutina.

Poređenjem ukupnog sadržaja fenola dobijenih spektrofotometrijski i HPLC metodom u ekvivalentima galne kiseline dobijaju se uporedive vrednosti, istog reda veličine iako korelacija nije signifikantna za $p < 0,05$. Mandić i sar. (2005) su poređenjem rezultata određivanja sadržaja fenola u ekstraktima semenki grožđa, na identičan način, dobili signifikantno značajnu pozitivnu korelaciju između serija podataka, ali su sve vrednosti dobijene spektrofotometrijski bile 6 puta veće od rezultata HPLC određivanja. Rezultati HPLC određivanja u ekvivalentima rutina, u značajnoj su korelaciji sa sumom kvantifikovanih jedinjenjima određenih HPLC metodom ($r=0,88$; $p < 0,05$).

4.2 ANTIOKSIDANTNA AKTIVNOST ETANOLNIH EKSTRAKATA ISPITIVANIH BILJNIH DROGA

4.2.1 ESR spektralna analiza uticaja biljnih ekstrakata na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala

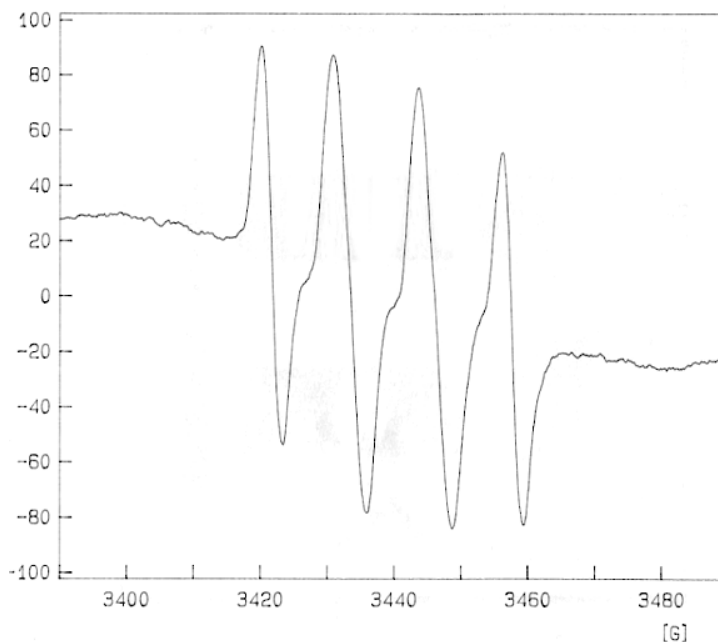
U cilju određivanja "skevindžer" aktivnosti biljnih ekstrakata na superoksid anjon radikale, $O_2^{\cdot-}$ su generisani u sistemu K_2O / 18-kraun-6-etar. Nestabilni $O_2^{\cdot-}$ radikali u prisustvu "spin trapa" DMPO formiraju stabilne nitroksid radikale, odnosno DMPO-OOH "spin adukte", sledećim reakcionim mehanizmom:



Na slici 4.13. prikazan je spektar DMPO-OOH "spin adukta" slepe probe nastalog u sistemu K_2O /18-kraun-6-etar.

Nastajanje DMPO-OOH "spin adukta" u ispitivanom model sistemu je potvrđeno izračunatim konstantama hiperfinog cepanja $a_N=14,3$ G, $a_H^\beta=11,7$ G i $a_H^\gamma=1,26$ G.

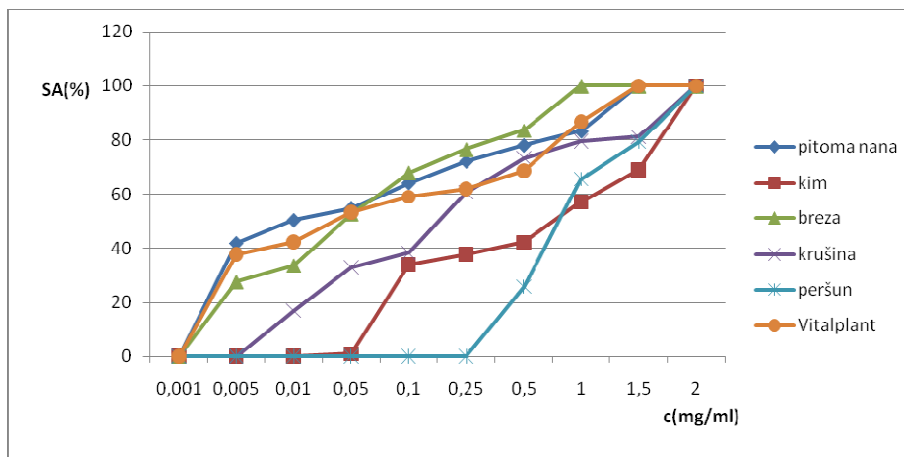
Poređenjem intenziteta ESR signala DMPO-OOH "spin adukata" slepe probe i uzoraka, utvrđeno je da pripremljeni etanolni ekstrakti u opsegu ispitivanih masenih koncentracija, od 0,001 do 2,00 mg/ml, imaju inhibitorni efekat na stvaranje $O_2^{\cdot-}$ ili učestvuju u njihovoj transformaciji (**Slika 4.14.**). Ovo se zaključuje na osnovu smanjenja intenziteta ESR signala DMPO-OOH "spin adukta" u njihovom prisustvu.



Slika 4.13. ESR spektar DMPO-OOH "spin adukta" slepe probe nastalog u sistemu K_2O / 18-kruna-6-etar.

Dodatak ekstrakata u masenoj koncentraciji 0,001 mg/ml, kod svih ispitanih uzoraka je nedovoljan da izazove inhibitorski efekat na stvaranje $O_2^{\cdot-}$ radikala, dok su svi ekstrakti primenjeni u koncentraciji od 2,00 mg/ml izvršili potpunu inhibiciju stvaranja DMPO-OOH "spin adukta", odnosno ispoljili $SAO_2^{\cdot-}$ od 100%. Pri masenoj koncentraciji od 1,50 mg/ml, ekstrakti pitome nane, preparata Vitalplant[®] i breze su takođe pokazali inhibitorski efekat od 100%.

Izračunate vrednosti IC_{50} (mg/ml), u odnosu na ekstrakt (mg ekstrakta/ml) i u odnosu na polazni biljni materijal (mg biljnog materijala/ml), za ispitane biljne ekstrakte prikazane su u tabeli 4.8. Najmanju IC_{50} vrednost, odnosno najveću aktivnost u ovom testu, pokazao je ekstrakt pitome nane. Statistički značajna razlika između ekstrakta pitom nane, ekstrakta breze i komercijalnog preparata Vitalplant[®] nije utvrđena. Najmanju aktivnost u ovom testu je pokazao uzorak peršuna.



Slika 4.14. "Skevindžer" aktivnost biljnih etanolnih ekstrakata na superoksid anjon radikale, u koncentracionom opsegu od 0,001-2,00 mg ekstrakta/ml.

Signifikantno nižu aktivnost u ovom testu u odnosu na polazni biljni materijal su imali jedino uzorci kima i peršuna, u poređenju sa ostalim ispitanim uzorcima koji se međusobno nisu razlikovali.

Biljna mešavina Vitalplant[®] je u ovom testu pokazala veliku "skevindžer" aktivnost, kako u odnosu na ekstrakt tako i u odnosu na biljni materijal, koja se može objasniti sinergističkim delovanjem komponenti koje je sačinjavaju.

Osim navedenog, dobijene IC₅₀ vrednosti su u statistički značajnoj korelaciji sa sadržajem ukupnih fenola određenih spektrofotometrijski ($r=-0,89$, $p<0,05$). Ovo je u skladu sa mišljenjem velikog broja autora, koji antioksidantnu aktivnost pripisuju delovanju biljnih fenola.

Murcia i sar. (2004) su ispitivanjem "skevindžer" aktivnosti začina na superoksid anjon radikale utvrdili relativnu visoku aktivnost ekstrakata pitome nane, koja je bila veća od ekstrakta muskatnog oraščića, ali manja od aktivnosti ekstrakta cimeta. Guo i sar. (1999) su ispitivali "skevindžer" aktivnost katehina zelenog čaja na superoksid anjon radikale, primenom ESR spektroskopije, i ustanovili da su katehini sa tri hidroksilne grupe u *o*-položaju u prstenu B aktivniji od katehina koji sadrže *o*-dihidroksilnu grupu u prstenu B. Padmini i sar. (2008) su poredili antioksidantnu aktivnost crnog čaja i čaja od nane, pri čemu su značajno veću "skevindžer" aktivnost na superoksid anjon radikale utvrdili kod crnog čaja. Jun i sar. (2003) su ispitivali "skevindžer" aktivnost vodenih ekstrakata 32 biljke na

superoksid anjon radikale primenom ESR spektroskopije, pri čemu su ustanovili da kim poseduje relativno slabu aktivnost u odnosu na biljke familije Lamiaceae.

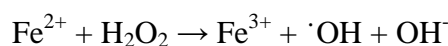
Tabela 4.8. "Skevindžer" aktivnost etanolnih ekstrakata na superoksid anjon radikale, izražena preko IC_{50} vrednosti, u odnosu na ekstrakt (mg ekstrakta/ml) i u odnosu na polazni biljni materijal (mg biljnog materijala/ml).

Uzorak	ekstrakt	biljni materijal
	IC_{50} (mg/ml)	IC_{50} (mg/ml)
List pitome nane	$0,016 \pm 0,009^a$	$0,094 \pm 0,054^a$
Kora krušine	$0,177 \pm 0,001^b$	$0,804 \pm 0,006^a$
List breze	$0,049 \pm 0,004^a$	$0,186 \pm 0,015^a$
Plod kima	$0,752 \pm 0,008^c$	$3,86 \pm 0,043^b$
Plod peršuna	$0,840 \pm 0,051^d$	$7,76 \pm 0,990^c$
Vitalplant [®]	$0,041 \pm 0,005^a$	$0,201 \pm 0,068^a$

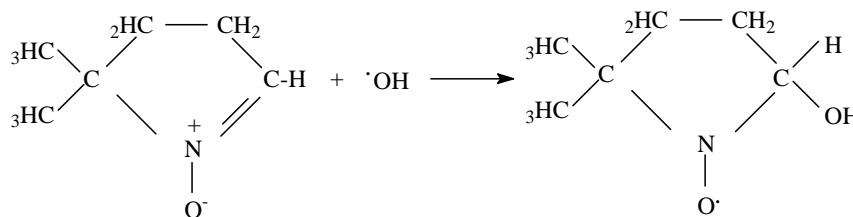
Brojevi označeni različitim slovima (^{a, b}) u koloni se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, $p < 0,05$.

4.2.2 ESR spektralna analiza uticaja biljnih ekstrakata na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala (SA_{OH})

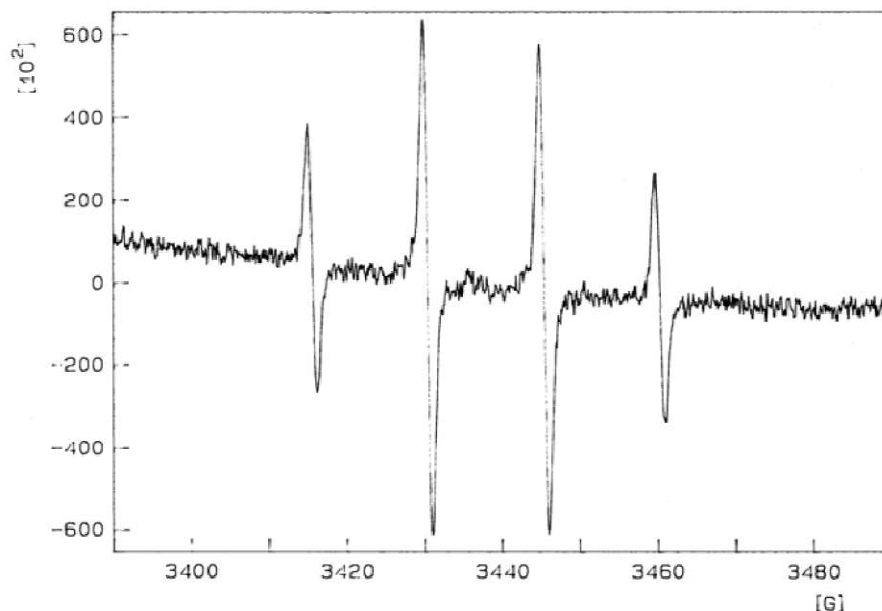
U cilju određivanja "skevindžer" aktivnosti biljnih ekstrakata na slobodne hidroksil radikale, pripremljen je Fentonov reakcioni sistem za njihovo generisanje:



Nastali reaktivni $\cdot OH$ radikali u prisustvu "spin trapa" DMPO formiraju stabilne nitroksid radikale, odnosno DMPO-OH "spin adukte", sledećim reakcionim mehanizmom:



Na slici 4.15. prikazan je spektar DMPO-OH "spin adukta" slepe probe nastalog u Fentonovom model sistemu.

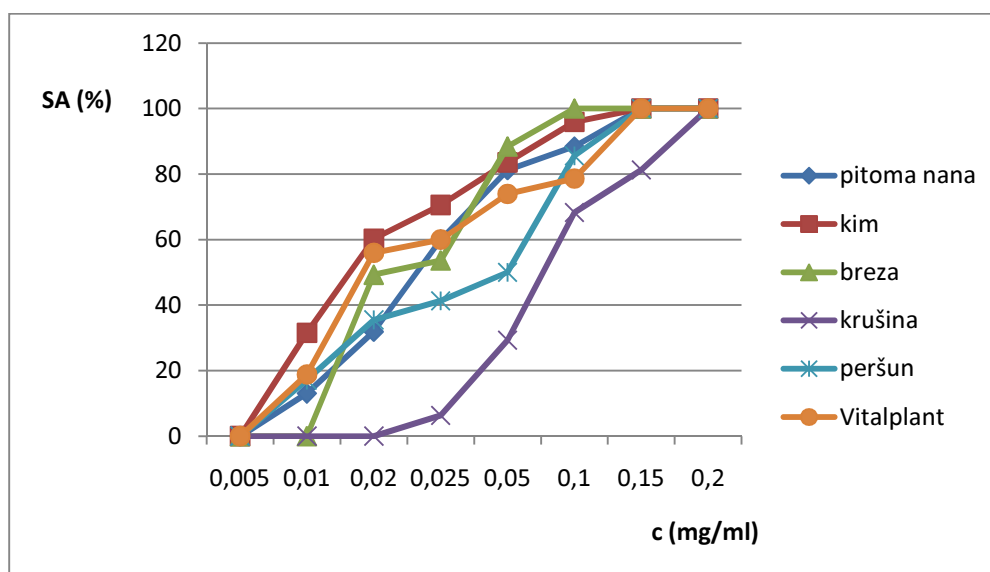


Slika 4.15. ESR spektar DMPO-OH "spin adukta" slepe probe nastalog u Fentonovom model sistemu.

Hiperfina struktura je predstavljena sa četiri linije relativnog inteziteta 1:2:2:1 i istih konstanti hiperfinog cepanja za jedan ^{14}N -atom ($I=1$) $a_{\text{N}}=14,9$ G i za jedan ^1H -atom ($I=1/2$) $a_{\text{H}}=14,9$ G.

Poređenjem intenziteta ESR signala DMPO-OH "spin adukata" slepe probe i uzoraka, utvrđeno je da pripremljeni etanolni ekstrakti u opsegu ispitivanih masenih koncentracija, od 0,005 do 0,200 mg/ml, imaju inhibitorni efekat na stvaranje $\cdot\text{OH}$ ili učestvuju u njihovoj transformaciji (**Slika 4.16.**), što se zaključuje na osnovu smanjenja intenziteta ESR signala DMPO-OH "spin adukta" u njihovom prisustvu.

Dodatak ekstrakata masene koncentracije 0,005 mg/ml, kod svih ispitanih uzoraka je nedovoljan da izazove inhibitorni efekat na stvaranje $\cdot\text{OH}$ radikala, dok su svi ekstrakti primenjeni u koncentraciji od 0,200 mg/ml izvršili potpunu inhibiciju stvaranja DMPO-OH "spin adukta", odnosno ispoljili SA_{OH} od 100%. Pri masenoj koncentraciji od 0,150 mg/ml svi uzorci, osim ekstrakta krušine, su takođe pokazali inhibitorni efekat od 100%. U ovom testu krušina je uzorak koji je i pri svim ostalim koncentracijama pokazao najslabiju aktivnost.



Slika 4.16. Antioksidantna aktivnost etanolnih ekstrakata na hidroksil radikal, u koncentracionom opsegu od 0,005-0,200 mg ekstrakta/ml.

Izračunate vrednosti IC_{50} (mg/ml) u odnosu na ekstrakt (mg ekstrakta/ml) i u odnosu na polazni biljni materijal (mg biljnog materijala/ml) prikazane su u tabeli 4.9. Najveću aktivnost u ovom testu, u odnosu na ekstrakt, imao je uzorak kima, dok je uzorak breze, na nivou polaznog biljnog materijala, imao najveću aktivnost.

Statistički parametri ukazuju na to da između uzoraka pitome nane, breze, kima i komercijalnog preparata Vitalplant[®] ne postoje značajne razlike, kako u odnosu na ekstrakt tako i u odnosu na polazni biljni materijal.

Interesantna činjenica je visoka aktivnost biljne mešavine Vitalplant[®], koja je na nivou ekstrakta odmah iza uzorka kima. Dobijena veća aktivnost ovog uzorka, od one koja bi se mogla očekivati kada se uzme u obzir sastav smeše, se može pripisati sinergističkom delovanju komponenti koje potiču od različitih biljaka.

Ćetković i sar., 2008 su ispitivali "skevindžer" aktivnost tropa jabuke na hidroksil radikale, i ustanovili značajnu pozitivnu korelaciju između sadržaja rutina i SA_{OH} . Madsen i sar. 1996 su dokazali SA_{OH} biljaka familije Lamiaceae, pri čemu, kao ni mi, nisu pronašli pozitivnu korelaciju dobijenih rezultata sa sadržajem ukupnih fenola. Rice-Evans i sar., 1996 su dokazali da inhibitorni efekat fenolnih kiselina zavisi od broja hidroksilnih grupa u molekulu. Fenolne kiseline sa *o*-dihidroksi grupama, kao što su hlorogenska i kafena,

doprinosu višim vrednostima SA_{OH}. Flavonoidi sa *o*-dihidroksi grupama u prstenu B, i 3-OH grupom u prstenu C i/ili 5-OH grupom u prstenu A sa 4-okso funkcionalnom grupom u C prstenu flavonola, i fenolne kiseline sa *o*-dihidroksi strukturom mogu ispoljiti svoju antioksidantnu aktivnost heliranjem metala tokom Fentonove reakcije (Morel i sar., 1994).

Tabela 4.9. "Skevindžer" aktivnost etanolnih ekstrakata biljaka na hidroksil radikale, izražena preko IC₅₀ vrednosti, u odnosu na ekstrakt (mg ekstrakta/ml) i u odnosu na polazni biljni materijal (mg biljnog materijala/ml).

Uzorak	ekstrakt	biljni materijal
	IC ₅₀ (mg /ml)	IC ₅₀ (mg/ml)
List pitome nane	0,026 ± 0,003 ^a	0,145 ± 0,022 ^a
Kora krušine	0,080 ± 0,006 ^c	0,365 ± 0,027 ^b
List breze	0,021 ± 0,000 ^a	0,081 ± 0,001 ^a
Plod kima	0,016 ± 0,001 ^a	0,084 ± 0,003 ^a
Plod peršuna	0,043 ± 0,010 ^b	0,371 ± 0,081 ^b
Vitalplant [®]	0,019 ± 0,001 ^a	0,110 ± 0,008 ^a

Brojevi označeni različitim slovima (^{a, b}) u koloni se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, $p < 0,05$.

4.2.3 "Skevindžer" aktivnost na DPPH[•] radikale

Metoda na DPPH[•] radikale se široko primenjuje pri određivanju "skevindžer" aktivnosti prema dugoživećim radikalima. Antioksidanti reaguju sa stabilnim DPPH[•] radikalima i transformišu ih u 1,1-difenil-2-(2,4,6-trinitrofenil)-hidrazin. Nivo dekolracije rastvora DPPH[•] radikala ukazuje na "skevindžer" potencijal antioksidantnih jedinjenja (Liu i sar., 2004).

U cilju određivanja "skevindžer" aktivnosti na DPPH[•] radikale, etanolni ekstrakti su razblaženi metanolom tako da je svaki pripremljen u četiri masene koncentracije u opsegu od 0,03 do 1,00 mg ekstrakta/ml. Kao referentne supstance u ovom testu su korišćeni etanolni rastvori komercijalnih antioksidanata BHT-a i α -tokoferola, pri koncentraciji od 0,100 mg/ml.

U svim ispitanim uzorcima sa porastom koncentracije povećava se "skevindžer" aktivnost. Dobijena je linearna zavisnost između koncentracije i "skevindžer" aktivnosti na DPPH[•] radikal, u ispitanom koncentracionom opsegu (**Tabela 4.10.**).

Tabela 4.10. Jednačine linearne zavisnosti "skevindžer" aktivnosti na DPPH[•] radikale (%RSC) i masene koncentracije (c) netretiranih i termički tretiranih ekstrakata.

Uzorak	netretiran ekstrakt		termički tretiran ekstrakt	
	jednačina prave	koeficijent linearnosti (R ²)	jednačina prave	koeficijent linearnosti (R ²)
List pitome nane	y=327,5x-6,5809	0,9999	y=346,15x-7,4446	0,9999
Kora krušine	y=40,071x+1,0671	0,9989	y=46,919x+0,9517	0,9965
List breze	y=81,338x-1,4422	0,9992	y=88,864x-3,7443	0,9938
Plod kima	y=24,148x-0,7284	0,9953	y=28,146x-1,7965	0,993
Plod peršuna	y=9,3145x+0,3415	0,9968	y=10,94x-2,3912	0,9992
Vitalplant [®]	y=55,529x-0,2674	0,9999	y=59,443x+0,3266	0,9994

U cilju poređenja ekstrakata za svaki je izračunata IC₅₀ vrednost, a rezultati su predstavljeni u tabeli 4.11.

Najmanje IC₅₀ vrednosti su dobijene za etanolni ekstrakt pitome nane, koje ukazuju na najveću "skevindžer" aktivnost u ovom testu, dok su najveće vrednosti dobijene za ekstrakte

peršuna. U poređenju sa komercijalnim antioksidantima, za koje su dobijene vrednost "skevindžer" aktivnosti na DPPH[•] radikale od 74,6% i 78,1%, svi ispitani ekstrakti imaju nižu "skevindžer" aktivnost.

Uvažavajući rezultate Duncan-ovog testa višestrukih intervala, jasno se uočavaju značajne razlike u "skevindžer" aktivnosti između ispitanih biljaka. Statistički podaci ukazuju i na to da termički tretman ne dovodi do smanjenja "skevindžer" aktivnosti.

Tabela 4.11. "Skevindžer" aktivnost biljnih etanolnih ekstrakata na DPPH[•] radikale, izražena preko IC₅₀ vrednosti.

Uzorak	DPPH [•] aktivnost ekstrakta	
	netretiran	termički tretiran
	IC ₅₀ (mg/ml) ± SD	IC ₅₀ (mg/ml) ± SD
List pitome nane	0,172 ± 0,002 ^b	0,167 ± 0,003 ^b
Kora krušine	1,18 ± 0,210 ^c	0,920 ± 0,180 ^{ac}
List breze	0,632 ± 0,005 ^{ab}	0,580 ± 0,016 ^{ab}
Plod kima	2,06 ± 0,137 ^d	1,82 ± 0,045 ^d
Plod peršuna	4,65 ± 0,820 ^e	4,79 ± 0,005 ^e
Vitalplant [®]	0,893 ± 0,022 ^{ac}	0,792 ± 0,076 ^{ac}

Brojevi označeni različitim slovima (^{a, b}) u koloni se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, $p < 0,05$.

Preračunavanjem dobijenih vrednosti na biljni materijal (**Tabela 4.12.**), jedino se ekstrakti kima i peršuna statistički razlikuju u odnosu na ostale uzorke.

Tabela 4.12. "Skevindžer" aktivnost biljnih etanolnih ekstrakata na DPPH[•] radikale, preračunata na biljni uzorak, izražena preko IC₅₀ vrednosti.

Uzorak	DPPH [•] aktivnost biljnog uzorka	
	netretiran	termički tretiran
	IC ₅₀ (mg/ml) ± SD	IC ₅₀ (mg/ml) ± SD
List pitome nane	0,997 ± 0,010 ^a	0,969 ± 0,015 ^a
Kora krušine	5,358 ± 0,954 ^a	4,175 ± 0,820 ^a
List breze	2,42 ± 0,019 ^a	2,226 ± 0,062 ^a
Plod kima	10,6 ± 0,703 ^b	9,36 ± 0,229 ^b
Plod peršuna	40,0 ± 7,05 ^c	39,59 ± 2,776 ^c
Vitalplant [®]	5,156 ± 0,130 ^a	4,57 ± 0,44 ^a

Brojevi označeni različitim slovima (^{a, b}) u koloni se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, $p < 0,05$.

Statističkom analizom dobijenih rezultata, ustanovili smo i značajnu pozitivnu korelaciju između sadržaja ukupnih flavonoida i "skevindžer" aktivnosti na DPPH[•] radikale ($r=0,94$; $p < 0,05$), kao i između "skevindžer" aktivnosti na superoksid anjon radikala i "skevindžer" aktivnosti na DPPH[•] radikale ($r=0,94$; $p < 0,89$). Korelacija između sadržaja ukupnih fenola i "skevindžer" aktivnosti na DPPH[•] radikale je bila pozitivna, ali ne i statistički značajna. Veliki broj autora je korelacijom pomenutih parametara utvrdio statistički značajnu pozitivnu zavisnost, prilikom ispitivanja različitih biljnih uzoraka (Dorman i sar., 2003; Dorman i sar., 2004; Miliauskas i sar., 2004).

Fenglin i sar. (2004) su objavili rezultate ispitivanja "skevindžer" aktivnosti na DPPH[•] radikale vodeno-metanolnih ekstrakata za preko 300 lekovitih biljaka. Od toga su za 56 ispitanih uzoraka dobili IC₅₀ vrednosti ispod 0,500 mg uzorka/ml ekstrakta. Pomenuti autori "skevindžer" aktivnost na DPPH[•] radikale biljaka pripisuju prisutnim flavonoidima i taninima u ekstraktu. Chen i sar. (2004) su pronašli da su hlorogenska i kafena kiselina najaktivnije uklanjaju DPPH[•] radikale kod čička, kao i to da je njihova aktivnost u istom testu približno ista, a veća od aktivnosti α -tokoferola. Ovi autori su ustanovili i neznatno smanjenje "skevindžer" aktivnosti na DPPH[•] radikale prilikom termičkog tretmana, koje pripisuju degradaciji hlorogenske kiseline.

4.2.4 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ redoks kapacitet (FRAP)

Redoks aktivnost se često koristi u cilju ispitivanja elektron-donorskog kapaciteta antioksidanata, kao jednog od najznačajnijih mehanizama njihovog delovanja (Yildirim i sar., 2001).

U cilju određivanja redoks kapaciteta, kao i kod ispitivanja "skevindžer" aktivnosti na DPPH[·] radikal etanolni ekstrakti su razblaženi, tako da je svaki pripremljen u četiri koncentracije u opsegu od 0,030 do 10,0 mg ekstrakta/ml. Kao referentna supstanca, sintetički antioksidant BHT je takođe testiran u četiri koncentracije u koncentracionom opsegu od 0,005 do 0,200 mg/ml.

U svim ispitanim uzorcima sa porastom koncentracije povećava se apsorbanacija na 700 nm, odnosno redoks kapacitet. U ispitanom koncentracionom opsegu je dobijena linearna zavisnost između koncentracije i redoks kapaciteta, (**Tabela 4.13.**).

U cilju poređenja rezultata, korišćenjem jednačina linearne regresije izračunate su IC_{50} vrednosti za svaki ekstrakt, a rezultati su predstavljeni u tabeli 4.14.

Najmanju IC_{50} vrednost ekstrakta, odnosno najveći redoks kapacitet, pokazali su uzorci pitome nane., kao i kod ispitivanja "skevindžer" aktivnosti na DPPH[·] radikal. Osim navedenog, poredak uzoraka je gotovo identičan kao i u testu na DPPH[·] radikal, sa tom razlikom što su u ovom testu ekstrakti peršuna bili aktivniji od uzoraka kima.

U poređenju sa IC_{50} vrednošću dobijenoj za BHT ($0,120 \pm 0,006$ mg/ml), svi ekstrakti su pokazali niži redoks kapacitet.

Tabela 4.13. Jednačine linearne zavisnosti redoks kapaciteta i masene koncentracije (c) netretiranih i termički tretiranih ekstrakata.

Uzorak	netretiran ekstrakt		termički tretiran ekstrakt	
	jednačina prave	koeficijent linearnosti (R ²)	jednačina prave	koeficijent linearnosti (R ²)
List pitome nane	y=0,7388+0,0461x	0,9994	y=0,7273x+0,0484	0,9999
Kora krušine	y=0,2361x+0,0411	0,9970	y=0,2453x+0,0381	0,9962
List breze	y=0,4131x-0,0534	0,9983	y=0,4369x-0,0704	0,9999
Plod kima	y=0,0887x+0,0311	0,9980	y=0,101x+0,023	0,9934
Plod peršuna	y=0,1038x+0,0086	0,9995	y=0,1085x+0,015	0,9997
Vitalplant [®]	y=0,3352x+0,0287	0,9964	y=0,3365x+0,0312	0,9970

Uvažavajući rezultate Duncan-ovog testa višestrukih intervala, jasno se uočavaju značajne razlike između redoks kapaciteta ispitanih uzoraka, sa izuzetkom ekstrakata breze i Vitalplant[®] koji se nisu među sobom razlikovali. Termički tretman ne dovodi do značajnih promena u redukcionoj aktivnosti.

Preračunavanjem dobijenih vrednosti na biljni materijal (**Tabela 4.15.**), statistički značajne razlike između uzoraka pitome nane, breze i Vitalplant[®] ne postoje. Izražene na ovaj način, IC₅₀ vrednosti imaju međusobno identičan poredak kao i kod testa na DPPH· radikale (r=0,913; p<0,05). Osim navedenog dobijeni rezultati su i u visoko značajnoj korelaciji sa "skevindžer" aktivnosti na superoksid anjon radikale (r=0,980; p<0,05). Statistički parametri takođe ukazuju i na to da je povećanje u redoks kapacitetu kod uzoraka kima i peršuna nakon termičkog tretmana značajno.

Tabela 4.14. Redoks kapacitet biljnih etanolnih ekstrakata, izražen preko IC₅₀ vrednosti.

Uzorak	Redoks kapacitet biljnog ekstrakta	
	netretiran	termički tretiran
	IC ₅₀ (mg/ml) ± SD	IC ₅₀ (mg/ml) ± SD
List pitome nane	0,677 ± 0,108 ^{bc}	0,612 ± 0,015 ^b
Kora krušine	1,76 ± 0,370 ^d	1,69 ± 0,389 ^d
List breze	1,07 ± 0,028 ^a	0,996 ± 0,021 ^{ac}
Plod kima	5,27 ± 0,034 ^g	4,93 ± 0,187 ^{fg}
Plod peršuna	4,68 ± 0,098 ^{ef}	4,38 ± 0,158 ^e
Vitalplant [®]	1,27 ± 0,257 ^a	1,27 ± 0,224 ^a

Brojevi označeni različitim slovima (^{a, b}) u koloni se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, $p < 0,05$.

Tabela 4.15. Redoks kapacitet etanolnih ekstrakata biljaka, preračunat na biljni uzorak, izražen preko IC₅₀ vrednosti.

Uzorak	Redoks kapacitet biljnog uzorka	
	netretiran	termički tretiran
	IC ₅₀ (mg/ml) ± SD	IC ₅₀ (mg/ml) ± SD
List pitome nane	3,927 ± 0,627 ^a	3,55 ± 0,086 ^a
Kora krušine	7,99 ± 1,68 ^b	7,67 ± 1,77 ^b
List breze	4,09 ± 0,110 ^a	3,82 ± 0,083 ^a
Plod kima	27,1 ± 0,174 ^d	25,4 ± 0,962 ^c
Plod peršuna	40,2 ± 0,845 ^f	37,6 ± 1,36 ^e
Vitalplant [®]	4,88 ± 0,985 ^a	4,89 ± 0,860 ^a

Brojevi označeni različitim slovima (^{a, b}) u koloni se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, $p < 0,05$.

Smatra se da su askorbinska kiselina, fenolne kiseline, redukovani glutation, fenolne kiseline i flavonoidi najznačajnije redukujuće supstance u biljnim tkivima (Meir i sar., 1995). Ovo je u skladu sa našim podacima, jer smo statističkom analizom dobijenih rezultata, ustanovili i značajnu pozitivnu korelaciju između sadržaja ukupnih fenola određenih spektrofotometrijski i redoks kapaciteta ($r=0,94$; $p < 0,05$).

Dudonné i sar. (2009) su ispitivanjem antioksidantne aktivnosti 30 biljaka, različitim testovima, takođe ustanovili značajnu korelaciju između redoks kapaciteta i sadržaja ukupnih fenola određenih spektrofotometrijski.

4.2.5 Fe²⁺ helataciona aktivnost

Reakcijom ferozina sa jonima Fe²⁺ nastaje kompleks Fe²⁺-ferozin, ljubičaste boje. U prisustvu antioksidanta, helirajućeg agensa, nastanak kompleksa je inhibiran, što rezultira slabljenjem inteziteta ljubičaste boje (Hazra i sar., 2008).

U cilju određivanja helatacione aktivnosti, kao i kod predhodna dva testa, etanolni ekstrakti su razblaženi, tako da je svaki pripremljen u četiri koncentracije u opsegu od 0,080 do 2,00 mg ekstrakta/ml. Kao referentna supstanca, EDTA je testirana u šest masenih koncentracija, u koncentracionom opsegu od 0,003 do 0,075 mg/ml.

U svim ispitanim uzorcima sa porastom koncentracije dolazi do smanjenja apsorbancije na 562 nm, odnosno povećanja helatacione aktivnosti. Dobijena je linearna zavisnost između koncentracije i helatacione aktivnosti, u ispitanom koncentracionom opsegu za sve uzorke (**Tabela 4.16.**).

U cilju poređenja rezultata, korišćenjem jednačina linearne regresije izračunate su IC₅₀ vrednosti za svaki ekstrakt, a rezultati su predstavljeni u tabeli 4.17.

Najveća helataciona aktivnost, odnosno najniža IC₅₀ vrednost dobijena je za ekstrakt pitome nane, dok je najveća IC₅₀ vrednost u ovom testu dobijena za ekstrakt krušine. Statistički gledano, ostali uzorci se međusobno ne razlikuju u velikoj meri. Iako relativno bliske, dobijene IC₅₀ vrednosti su oko deset puta veće od IC₅₀ vrednosti dobijene za EDTA (0,054 ± 0,002 mg/ml).

Termički tretman kod svih ispitanih uzoraka dovodi do smanjenja helatacione aktivnosti, pri čemu su statistički značajne razlike između tretmana dobijene jedino za ekstrakt krušine.

Tabela 4.16. Jednačine linearne zavisnosti helatacione aktivnosti i masene koncentracije (c) netretiranih i termički tretiranih biljnih ekstrakata.

Uzorak	netretiran ekstrakt		termički tretiran ekstrakt	
	jednačina prave	koeficijent linearnosti (R ²)	jednačina prave	koeficijent linearnosti (R ²)
List pitome nane	y=44,888x+24,084	0,9481	y=47,219x+18,789	0,9715
Kora krušine	y=17,93x+24,647	0,9840	y=10,558x+23,15	0,8974
List breze	y=34,459x+19,635	0,9212	y=33,062x+20,156	0,9289
Plod kima	y=28,876x+16,567	0,9703	y=25,707x+16,925	0,9884
Plod peršuna	y=75,924x+1,3045	0,9725	y=74,718x+1,9129	0,9996
Vitalplant®	y=48,87x+0,5624	0,9967	y=38,273x+12,578	0,9860

Preračunavanjem dobijenih IC₅₀ vrednosti na masu uzorka, uzorci pitome nane i breze poseduju veću helatacionu aktivnost od ostalih uzoraka, koji se međusobno statistički značajno ne razlikuju (**Tabela 4.18.**).

Tabela 4.17. Helataciona aktivnost etanolnih ekstrakata biljaka, izražena preko IC₅₀ vrednosti.

Uzorak	Helataciona aktivnost ekstrakta	
	netretiran	termički tretiran
	IC ₅₀ (mg/ml) ± SD	IC ₅₀ (mg/ml) ± SD
List pitome nane	0,435 ± 0,180 ^b	0,570 ± 0,095 ^{ab}
Kora krušine	1,39 ± 0,100 ^d	2,90 ± 0,122 ^e
List breze	0,602 ± 0,060 ^{ab}	0,650 ± 0,083 ^{ab}
Plod kima	1,05 ± 0,099 ^{acd}	1,22 ± 0,077 ^{cd}
Plod peršuna	0,583 ± 0,053 ^{ab}	0,702 ± 0,009 ^{abc}
Vitalplant®	0,983 ± 0,037 ^{abcd}	1,05 ± 0,109 ^{acd}

Brojevi označeni različitim slovima (^{a, b}) u koloni se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, $p < 0,05$.

Tabela 4.18. Helataciona aktivnost etanolnih ekstrakata biljaka, preračunata na biljni uzorak, izražena preko IC₅₀ vrednosti

Uzorak	Helataciona aktivnost biljnog uzorka	
	netretiran	termički tretiran
	IC ₅₀ (mg/ml) ± SD	IC ₅₀ (mg/ml) ± SD
List pitome nane	2,52 ± 0,146 ^b	3,30 ± 0,549 ^{bc}
Kora krušine	6,31 ± 0,454 ^a	13,2 ± 0,373 ^d
List breze	2,31 ± 0,380 ^b	2,49 ± 0,200 ^b
Plod kima	5,37 ± 0,507 ^{ac}	6,26 ± 0,394 ^a
Plod peršuna	5,01 ± 0,452 ^{ac}	6,03 ± 0,079 ^a
Vitalplant [®]	5,68 ± 0,214 ^a	6,09 ± 0,627 ^a

Brojevi označeni različitim slovima (^{a, b}) u koloni se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, $p < 0,05$.

Poznato je da joni Fe²⁺ mogu inicirati reakciju lipidne peroksidacije Fentonovom reakcijom ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\cdot$), kao i ubrzati razgradnju lipidnih peroksida, u pravcu stvaranja peroksi i alkoksi radikala koji dalje vrše propagaciju (Halliwell, 1991). Stoga se smatra se da je helatacija jedan od vrlo značajnih mehanizama antioksidantne aktivnosti (Duh i sar., 1999). U skladu sa navedenim, očekivalo bi se postojanje pozitivne korelacije između "skevindžer" aktivnosti na hidrosil radikale i helatacione aktivnosti. Naši rezultati ukazuju na postojanje pozitivne korelacije ($r=0,54$; $p < 0,05$), ali ona nije bila statistički značajna.

Smatra se da su flavonoidi najznačajnije helirajuće supstance u biljnim tkivima (Cook i Samman, 1996; Kessler i sar., 2003). U ovom radu pozitivna korelacija između sadržaja ukupnih fenola, kao i ukupnih flavonoida i helatacione aktivnosti nije nađena. Ebrahimzadeh i sar. (2008) takođe nisu pronašli pozitivnu korelaciju između ovih parametara, ali su kao i mi za ekstrakt pitome nane u svojim ispitivanjima dobili najveći sadržaj ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, kao i helatacione aktivnosti.

Hinneburg i sar. (2006) su u okviru određivanja antioksidantne aktivnosti ekstrakata odabranih začina, dobijenih hidrodestilacijom, vršili i određivanje helatacione aktivnosti ekstrakata peršuna i kima. Dobijene vrednosti su izražene u ekvivalentima EDTA, te stoga kao apsolutne nisu uporedive sa našim. Pored ovog, navedeni autori su dobili oko dva puta veću helatacionu aktivnost ekstrakta peršuna u odnosu na aktivnost ekstrakta kima. Wong i

sar. (2006) su ustanovili veću helatacionu aktivnost metanolnog ekstrakta peršuna u odnosu na vodeni, pri čemu su obe vrednosti bile veće od vrednosti dobijene za EDTA.

4.2.6 Antioksidantna aktivnost određena β -karoten metodom

Antioksidantna aktivnost (AOA) biljnih ekstrakata je određena na osnovu oksidativne degradacije β -karotena u emulziji β -karoten-linolna kiselina, koja je praćena spektrofotometrijski i kolorimetrijski na ELISA čitaču.

Do oksidacije β -karotena dolazi tokom slobodnoradikalske reakcije sa lipidnim radikalima, prilikom čega β -karoten gubi dvostruke veze, što dovodi do gubitka hromofore. Dodatkom antioksidanta u sistem, sprečava se apstrakcija vodonika iz dialilnih metilenskih grupa linolne kiseline, čime se indirektno sprečava oksidacija β -karotena (Kennedy i Liebler, 1991; Tsuchihashi i sar., 1995; Takada i sar., 2006).

U cilju određivanja AOA, kao i u prethodnim testovima, ekstrakti su razblaženi tako da su dobijene četiri koncentracije, u opsegu od 0,800 do 8,00 mg ekstrakta/ml. Rezultati su prikazani u Prilogu (**Slika 4.17.-4.19.**). Kao kontrola je korišćen rastvor butilovanog hidroksitoluena (BHT) koji je pripremljen takođe u četiri koncentracije (0,005-0,510 mg/ml).

U tabeli 4.19 su prikazane IC_{50} vrednosti etanolnih ekstrakata biljaka, dobijene iz jednačina linearne regresije, na osnovu spektrofotometrijskog određivanja AOA.

U ovom testu, najveću antioksidantnu aktivnost je imao ekstrakt krušine, dok je najmanju ispoljio ekstrakt kima. Statistički podaci ukazuju na to da se ekstrakti breze i komercijalnog preparata Vitalplant[®] međusobno značajno ne razlikuju. Takođe, velike razlike ne postoje ni između ekstrakata peršuna i pitome nane. U poređenju sa BHT-om, za koji je dobijena IC_{50} vrednost od $0,054 \pm 0,009$ mg/ml, svi ekstrakti su ispoljili značajno nižu AOA.

Termičkim tretmanom, do značajnog smanjenja AOA dolazi jedino kod uzoraka pitome nane i krušine.

Ako se dobijene vrednosti preračunaju na masu polaznog uzorka, dobijaju se rezultati prikazani u tabeli 4.20.

Tabela 4.19. AOA aktivnost etanolnih ekstrakata biljaka, određena spektrofotometrijski, izražena preko IC_{50} vrednosti kao mg ekstrakta/ml.

Uzorak	AOA aktivnost ekstrakta	
	netretiran	termički tretiran
	IC_{50} (mg/ml) \pm SD	IC_{50} (mg/ml) \pm SD
List pitome nane	6,71 \pm 0,160 ^{ef}	8,01 \pm 0,606 ^h
Kora krušine	1,38 \pm 0,188 ^c	1,60 \pm 0,142 ^c
List breze	5,68 \pm 0,270 ^{ab}	5,87 \pm 0,609 ^{bd}
Plod kima	9,12 \pm 0,233 ^g	9,66 \pm 0,096 ^g
Plod peršuna	6,32 \pm 0,037 ^{de}	6,85 \pm 0,047 ^f
Vitalplant®	5,61 \pm 0,543 ^{ab}	5,21 \pm 0,200 ^a

Brojevi označeni različitim slovima (^{a, b}) u koloni se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, $p < 0,05$.

Izražene na ovaj način, IC_{50} vrednosti svih uzoraka se međusobno statistički značajno razlikuju, pri čemu najveću antioksidantnu aktivnost ima uzorak krušine, a najnižu uzorak peršuna, dok su razlike između tretmana manje izražene. Termičkim tretmanom, do značajnog smanjenja AOA dolazi jedino kod uzoraka pitome nane i peršuna.

Antioksidantna aktivnost (AOA) biljnih ekstrakata praćena je i kolorimetrijski na ELISA čitaču. Rezultati su prikazani u Prilogu (Slika 4.17.-4.19.). Osim razlike u tehnici praćenja, inkubacija na 50°C u ovom slučaju se vrši u struji toplog vazduha, a sva očitavanja se vrše automatski. Poređenjem dobijenih rezultata (Tabele 4.19.-4.22.) može se uočiti da su vrednosti slične, međutim značajna korelacija između serija rezultata ne postoji.

Tabela 4.20. AOA aktivnost etanolnih ekstrakata biljaka, preračunata na biljni uzorak, određena spektrofotometrijski, izražena preko IC_{50} vrednosti kao mg (biljnog materijala)/ml.

Uzorak	AOA aktivnost biljnog uzorka	
	netretiran	termički tretiran
	IC_{50} (mg/ml) \pm SD	IC_{50} (mg/ml) \pm SD
List pitome nane	38,9 \pm 0,929 ^c	46,5 \pm 3,51 ^a
Kora krušine	6,25 \pm 0,855 ^b	7,24 \pm 0,643 ^b
List breze	21,8 \pm 1,03 ^c	22,5 \pm 2,37 ^c
Plod kima	49,6 \pm 0,493 ^a	49,6 \pm 0,493 ^a
Plod peršuna	54,7 \pm 0,679 ^f	60,5 \pm 2,85 ^g
Vitalplant [®]	32,4 \pm 3,14 ^d	30,1 \pm 1,16 ^d

Brojevi označeni različitim slovima (^{a, b}) u koloni se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, $p < 0,05$.

Tabela 4.21. AOA aktivnost etanolnih ekstrakata biljaka, određena na ELISA čitaču, izražena preko IC_{50} vrednosti kao mg ekstrakta/ml.

Uzorak	AOA aktivnost ekstrakta	
	netretiran	termički tretiran
	IC_{50} (mg/ml) \pm SD	IC_{50} (mg/ml) \pm SD
List pitome nane	6,23 \pm 0,569 ^{de}	5,52 \pm 0,355 ^d
Kora krušine	2,63 \pm 0,409 ^b	2,70 \pm 0,337 ^b
List breze	8,23 \pm 1,38 ^a	7,31 \pm 0,735 ^a
Plod kima	8,21 \pm 0,046 ^a	7,63 \pm 0,281 ^a
Plod peršuna	7,54 \pm 0,494 ^a	8,10 \pm 0,132 ^a
Vitalplant [®]	4,13 \pm 0,076 ^c	3,49 \pm 0,628 ^{bc}

Brojevi označeni različitim slovima (^{a, b}) u koloni se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, $p < 0,05$.

U kolorimetrijskom određivanju, najveću AOA aktivnost je imao ekstrakt krušine, kao i kod spektrofotometrijskog određivanja, dok su najmanju ispoljili ekstrakti kima, breze i peršuna, koji se međusobno nisu razlikovali. Komercijalni preparat Vitalplant[®] je i u ovom testu po aktivnosti bio na drugom mestu. Osim navedenog, na osnovu rezultata ovog testa,

termički tretman ne dovodi do značajne promene u AOA aktivnosti (**Tabela 4.21.**). Značajno je napomenuti da je na ovaj način za BHT dobijena znatno veća IC_{50} vrednosti od $0,273 \pm 0,028$ mg/ml, koja je takođe, znatno niža od svih dobijenih vrednosti za ekstrakte.

Ako se dobijeni rezultati preračunaju na masu uzorka (**Tabela 4.22.**) interesantna je činjenica smanjenja u AOA usled termičkog tretmana kod uzorka peršuna, što se pokazalo i kod spektrofotometrijskog određivanja.

U poređenju sa ostalim testovima primenjenim u ovom radu, AOA u sistemu β -karoten-linolna kiselina je test sa najslabijom ponovljivošću. Razlike u rezultatima dobijenim na osnovu spektrofotometrijskog i kolorimetrijskog praćenja ukazuju na to da uslovi sredine u velikoj meri utiču na dinamiku procesa oksidacije. Korišćenje ELISA čitača, u cilju praćenja promena, u velikoj meri omogućava automatizaciju samog procesa, čime se može eliminisati niz grešaka prilikom manipulacije uzorkom.

Tabela 4.22. AOA aktivnost etanolnih ekstrakata biljaka, preračunata na biljni uzorak, određena na ELISA čitaču, izražena preko IC_{50} vrednosti kao mg (biljnog materijala)/ml.

Uzorak	AOA aktivnost biljnog uzorka	
	netretiran	termički tretiran
	IC_{50} (mg/ml) \pm SD	IC_{50} (mg/ml) \pm SD
List pitome nane	$36,1 \pm 0,355^{bf}$	$32,0 \pm 3,30^{ab}$
Kora krušine	$11,9 \pm 1,85^c$	$12,3 \pm 1,53^c$
List breze	$31,5 \pm 5,28^{ab}$	$28,0 \pm 2,82^{ae}$
Plod kima	$42,2 \pm 0,238^g$	$39,2 \pm 1,44^{fg}$
Plod peršuna	$61,78 \pm 6,01^h$	$68,8 \pm 1,61^i$
Vitalplant [®]	$23,9 \pm 0,440^{de}$	$20,1 \pm 3,63^d$

Brojevi označeni različitim slovima (^{a, b}) u koloni se signifikantno razlikuju kada se koristi Duncan-ov test višestrukih intervala, $p < 0,05$.

Konačno, uzimajući u obzir sve rezultate određivanja AOA, može se zaključiti da je krušina uzorak sa najvećom aktivnošću u ovom testu, dok je peršun uzorak sa najmanjom aktivnošću. Svi uzorci pokazuju znatno nižu aktivnost u odnosu na BHT, a termičkim tretmanom se jedino statistički značajno smanjuje antioksidantna aktivnost uzorka peršuna.

Poređenjem dobijenih rezultata sa rezultatima ostalih testova, statistički značajna korelacija nije uspostavljena. Hassimotto i sar. (2005), takođe, nisu uspeali da uspostave

korelaciju između sadržaja ukupnih fenola, vitamina C i AOA, sugerišući da je antioksidantna aktivnost u ovom testu rezultat kombinovanog delovanja različitih jedinjenja, koja imaju sinergistički ili antagonistički efekat.

Chaillou i Nazareno, 2006 su ispitali antioksidantnu aktivnost različitih fenolnih jedinjenja u sistemu β -karoten-linolna kiselina, pri čemu su linolnu kiselinu selektivno oksidovali enzimatski, pomoću lipoksigenaze. Od 18 ispitanih fenolnih jedinjenja, kvercetin i sinapinska kiselina su pokazali najveću aktivnost. Sveobuhvatniju studiju su sprovedi Burda i Oleszek, 2001, u kojoj su ispitali antioksidantnu aktivnost 42 flavonoida, pri čemu su oksidaciju linolne kiseline vršili termički. Oni su došli do zaključka da samo flavonoli sa slobodnom –OH grupom u položaju C-3 pokazuju značajnu aktivnost.

Naši rezultati ukazuju da je antrahinonima bogata krušina najbolji antioksidant od svih ispitanih biljaka u ovom testu. Choi i sar. (2000) su ustanovili da emodin i alaternin (2-hidroksiemodin) uspešno vrše inhibiciju oksidacije linolne kiseline, tiocijanatnim testom. Yen i sar. (2000) su ispitali antioksidantnu aktivnost antrahinona i antrona u različitim sistemima. Inibiciju peroksidacije linolne kiseline ispitani antioksidanti, u koncentraciji od 200 ppm, vrše u sledećem poretku: BHA (96%), antron (95%), alizarin (93%)>aloe-emodin (78%)>rein (71%)>emodin (36%)>antrahinon (8%).

4.3 ANTIOKSIDANTNA AKTIVNOST KOMERCIJALNOG PREPARATA VITALPLANT® U KEKSU

Oksidacija lipida u prehrambenim proizvodima dovodi do promene u funkcionalnim i senzornim karakteristikama i smanjuje njihovu održivost. U cilju sprečavanja užegnutosti lipida u hrani, najčešće se koriste sintetički antioksidanti. Postoji osnovana sumnja da su najčešće korišćeni sintetički antioksidansi BHT (butilovani hidroksitoluen) i BHA (butilovani hidroksianisol) toksični, dok su prirodni antioksidansi, kao što su α, β, γ i δ tokoferol, skupi i manje efikasni (Moure i sar., 2001).

Usporavanje procesa lipidne peroksidacije u prehrambenim proizvodima se efikasno može sprovesti primenom prirodnih antioksidanata kao što su biljni ekstrakti i začini. Biljke iz familije Lamiaceae, u koje spadaju ruzmarin, žalfija, timijan, origano i nana su pokazale potencijalno veliku mogućnost zbog prisustva komponenti koje mogu inhibirati lipidnu oksidaciju, a najefikasnijim su se pokazali ruzmarin i žalfija (Bravo, 1998; Pokorny i sar., 2001).

Sa stanovišta razvoja kardiovaskularnih bolesti, konzumiranje keksa i sličnih proizvoda se ne preporučuje zbog toga što ono dovodi do povećanog unosa zasićenih i transnezasićenih masnih kiselina, za koje je dokazano da podižu nivo LDL-holesterola u krvi, a samim tim i povećavaju rizik od nastanka ovih bolesti (Mensik i sar., 2003).

Sa druge strane, popularnost ovih proizvoda je izuzetno velika, zbog njihove relativno niske cene, velike raznovrsnosti i relativno dugog roka trajanja (Gandhi i sar., 2001).

Zadnjih godina, velika pažnja se poklanja dizajniranju funkcionalnih dodataka pekarskim proizvodima u cilju postizanja smanjenog rizika od nastanka različitih bolesti. Pekarski proizvodi se obogaćuju fitosterolima, α -tokoferolom, β -karotenom (Quilez i sar., 2005), kao i prehrambenim vlaknima, kao što je β -glukan ili psilium (Jenkins i sar., 2000).

Biljna mešavina Vitalplant® je ciljno komponovana na bazi biljnih droga za koje je poznato da blagotvorno deluju na digestivni trakt. Imajući u vidu dokazana antioksidantna svojstva mešavine različitim direktnim i indirektnim testovima, u okviru istraživanja u ovom radu je ispitana i antioksidantna aktivnost biljne mešavine Vitalplant® u keksu.

U ogledu koji je trajao šest nedelja, praćene su promene na lipidima MDA testom, kao i "skevindžer" aktivnost keksa na DPPH[•] radikale, svakih sedam dana. Obzirom da je poznato

da način primene antioksidanta (pulvis ili ekstrakt), metod i vreme dodavanja mogu znatno uticati na efikasnost antioksidanta u hrani (Reddy i sar., 2005), u ovom radu smo biljnu mešavinu Vitalplant[®] dodavali u vidu pulvisa i ekstrakta u različitim udelima. U okviru eksperimenta, praćene su promene između uzoraka kontrolnog keksa, keksa sa dodatkom 2%, 4% i 6% pulvisa i keksa sa dodatkom 2%, 4% i 6% ekstrakta.

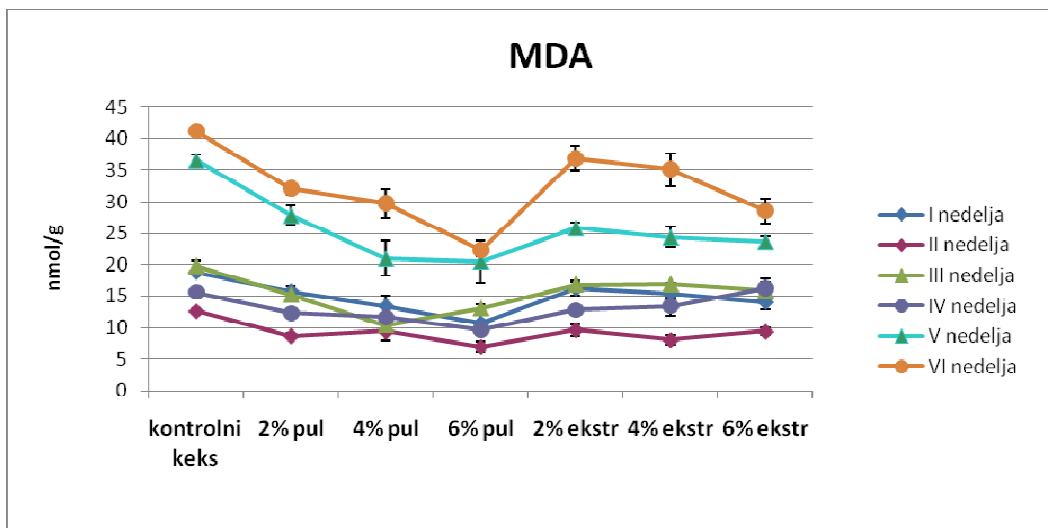
Na slici 4.20. je prikazana promena u količini MDA u ovim uzorcima, tokom perioda skladištenja od 6 nedelja.

Glavni proizvodi autooksidacije lipida tokom inicijalne faze ovog procesa su hidroperoksidi, te smo u ovom radu pokušali da pratimo peroksidni broj koji ukazuje na rane oksidativne promene. Međutim, tokom procesa skladištenja od 6 nedelja ni na jednom uzorku nismo uspeli da dokažemo pozitivne promene zbog nedovoljne osetljivosti ovog testa. TBA test (3.2.3.7.), mnogo osetljiviji u odnosu na hidroperoksidni, je indikator kasnih oksidativnih promena na lipidima. Malonildialdehid (MDA), glavni degradacioni proizvod lipidnih peroksida, je korišćen kao marker za određivanje stepena lipidne peroksidacije.

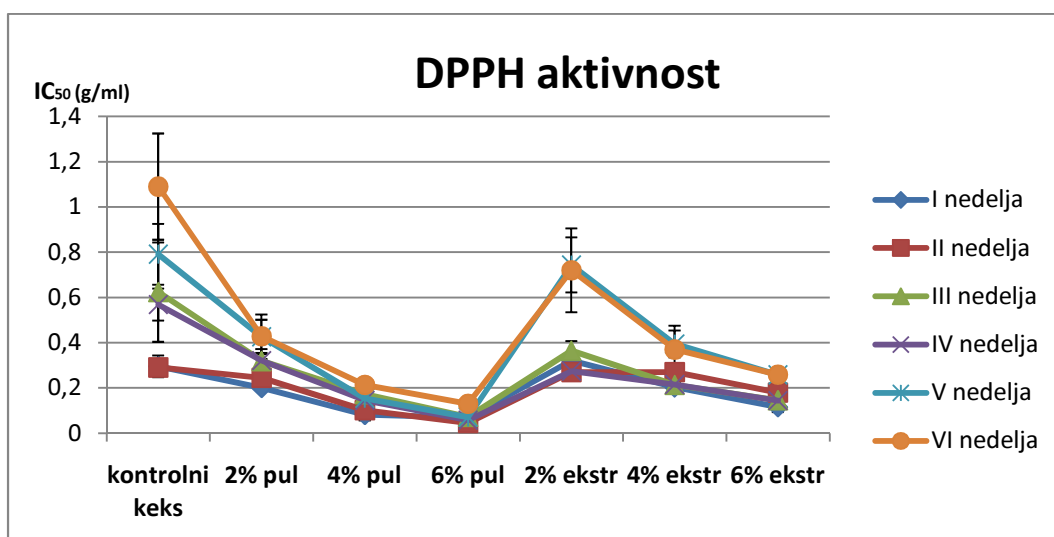
Kao što se može uočiti sa slike 4.20. tokom prve četiri nedelje količina MDA je relativno niska u svim uzorcima, manja od 20 nmol (MDA)/g uzorka. Vrednosti MDA dobijene za drugu nedelju su najniže u odnosu na ostale vrednosti. Takođe, osim činjenice da je kontrolni uzorak u odnosu na ostale imao najveću MDA vrednost, jasan poredak između uzoraka tokom prve četiri nedelje ne postoji.

Tokom pete nedelje dolazi do skoro dvostrukog porasta u MDA vrednosti kod svih uzoraka. Znatno veću MDA vrednost u odnosu na ostale je imao uzorak kontrolnog keksa, pri čemu je sudeći po poretku uzoraka, pulvis upravo proporcionalno svom udelu bio efikasniji u sprečavanju oksidacije lipida u odnosu na primenjene ekstrakte.

Tokom šeste nedelje dolazi do daljeg porasta u količini MDA kod svih uzoraka, pri čemu je poredak među njima identičan. Dobijeni rezultati ukazuju na to da je antioksidativna delotvornost biljne mešavine Vitalplant[®] upravo proporcionalna primenjenom udelu, jer se dodavanjem pulvisa dodaje više antioksidanata u odnosu na ekstrakt koji je dobijen iz identične količine pulvisa.



Slika 4.20. Količina MDA u uzorcima keksa: kontrolni keks; keks sa 2% pulvisa (2% pul); keksa sa 4% pulvisa (4% pul); keks sa 6% pulvisa (6% pul); keks sa 2% ekstrakta (2% ekstr); keks sa 4% ekstrakta (4% ekstr); keks sa 6% ekstrakta (6% ekstr), tokom perioda skladištenja od 6 nedelja.



Slika 4.21. "Skevindžer" aktivnost na DPPH radikale, izražena preko IC_{50} vrednosti, uzoraka keksa: kontrolni keks; keks sa 2% pulvisa (2% pul); keksa sa 4% pulvisa (4% pul); keks sa 6% pulvisa (6% pul); keks sa 2% ekstrakta (2% ekstr); keks sa 4% ekstrakta (4% ekstr); keks sa 6% ekstrakta (6% ekstr), tokom perioda skladištenja od 6 nedelja.

U cilju određivanja "skevindžer" aktivnosti na DPPH[•] radikale, metanolni ekstrakti keksa su pripremani na način opisan u poglavlju 3.2.4.3., tako da je svaki pripreman u četiri masene koncentracije u opsegu od 0,063 do 0,250 g keksa/ml, svakih sedam dana, tokom šest nedelja eksperimenta. Na osnovu dobijenih vrednosti, konstruisana je zavisnost između "skevindžer" aktivnosti na DPPH[•] radikale i masene koncentracije keksa za svaki uzorak, svake nedelje. U svim ispitanim uzorcima sa porastom koncentracije povećava se antioksidantna aktivnost. U ispitanom koncentracionom opsegu dobijena je linearna zavisnost između koncentracije i "skevindžer" aktivnosti na DPPH[•] radikale, za svaki uzorak tokom celog perioda skladištenja. Na osnovu jednačina linearne regresije izračunate su IC₅₀ vrednosti za svaki uzorak, a rezultati su predstavljeni na slici 4.21.

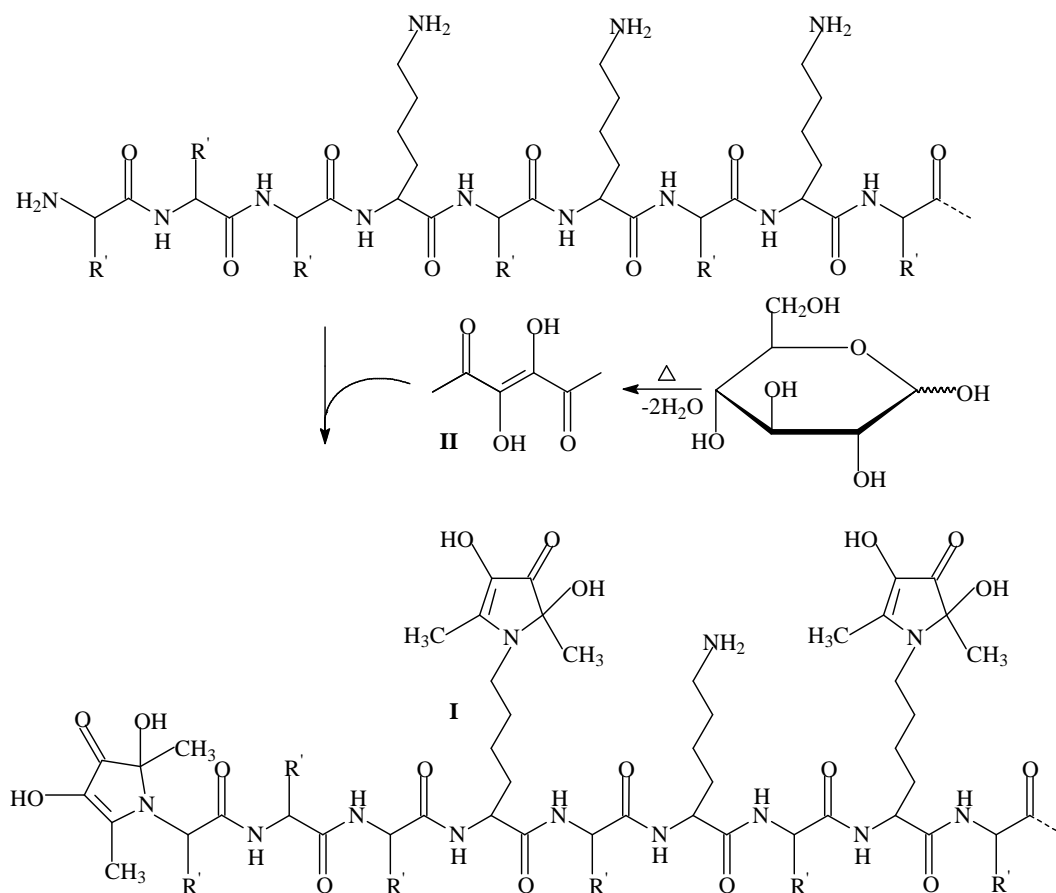
Kao što se može videti sa slike 4.21., prve nedelje eksperimenta, uzorak kontrolnog keksa je imao IC₅₀ vrednost od $0,296 \pm 0,048$ g/ml, veću od IC₅₀ vrednosti svih ostalih uzoraka. Najmanju IC₅₀ vrednost, odnosno najveću "skevindžer" aktivnost na DPPH[•] radikale je imao uzorak keksa sa 6% pulvisa, koja je iznosila $0,115 \pm 0,022$ g/ml. Dobijene IC₅₀ vrednosti za prvu nedelju imaju sledeći poredak: kontrola > keks sa 2% ekstrakta > keks sa 4% ekstrakta > keks sa 2% pulvisa > keks sa 6% ekstrakta > keks sa 4% pulvisa > keks sa 6% pulvisa.

IC₅₀ vrednosti dobijene za drugu nedelju su gotovo identične kao i vrednosti dobijene za prvu nedelju ako se uzmu u obzir i dobijene standardne devijacije za svaki uzorak. Poređenjem vrednosti dobijenih za treću i prvu nedelju uočava se porast IC₅₀ vrednosti kod svih uzoraka, pri čemu je on u slučaju kontrolnog keksa bio najveći, 2,11 puta, dok je kod keksa sa 6% pulvisa, za treću nedelju, dobijen porast od svega 3,18%. Poredak IC₅₀ vrednosti uzoraka dobijenih za treću nedelju je nešto izmenjen u odnosu na prvu i drugu: kontrola > keks sa 2% ekstrakta > keks sa 2% pulvisa > keks sa 4% ekstrakta > keks sa 6% ekstrakta > keks sa 4% pulvisa > keks sa 6% pulvisa, i takav i ostaje do kraja eksperimenta.

Tokom pete nedelje se uočava značajno povećanje IC₅₀ vrednosti, naročito kod kontrolnog uzorka i uzorka keksa sa 2% ekstrakta. Ovo povećanje se može tumačiti gubitkom antioksidanata u procesu lipidne peroksidacije, naročito ako se uvažavaju i rezultati dobijeni u predhodnom MDA testu (**Slika 4.20.**). Statističkim poređenjem rezultata dva testa za petu i šestu nedelju dobijene su signifikantno značajne korelacije, za petu nedelju $r=0,77$; $p<0,05$, a za šestu nedelju $r=0,85$; $p<0,05$.

Dobijeni rezultati ukazuju i na to da i sam kontrolni uzorak keksa poseduje antioksidantnu aktivnost. Ovo se može pripisati proizvodima Majlarove reakcije (MRP), za koje je pokazano da poseduju antioksidantna svojstva (Yilmas i Toledo, 2005), da deluju kao redukcionim agensima (Hayase i sar., 1996), da poseduju helirajuća svojstva (Wijewickreme i Kitts, 1998) i da deluju kao hvatači slobodnih radikala (Monti i sar., 1999). Majlarova reakcija je kompleksna kaskada neenzimskih reakcija koja se odvija između ugljenih hidrata i proteina tokom pečenja (**Slika 4.22.**) (Jing i Kitts, 2000). Na osnovu molekulske mase MRP se mogu podeliti na jedinjenja sa molarnom masom manjom od 300 Da i braon polimere koji sadrže azot, melanoidine (Friedman, 1996). Manzocco i sar. (2001) ukazuju na značaj melanoidina za održivost termički tretiranih prehrambenih proizvoda.

Poznato je da do gubitaka antioksidanata može doći tokom procesa proizvodnje i skladištenja, a posebno prilikom termičkog tretmana (Jonsson, 1991). U predhodnim *in vitro* testovima nije dokazano značajno smanjenje u antioksidantnoj aktivnosti biljnih komponenti, kao ni mešavine Vitalplant[®] prilikom termičkog tretmana, na osnovu čega se indirektno može zaključiti da ni proces pečenja keksa značajno ne utiče na antioksidantnu aktivnost biljne mešavine Vitalplant[®]. Reddy i sar. (2005) su ispitivali uticaj dodatka ekstrakata dobijenih iz *Emblica officinalis*, *Moringa oleifera* i *Vitis vinifera* na antioksidantnu aktivnost i oksidativnu stabilnost keksa. U pogledu termičkog tretmana pomenuti autori su došli do identičnog zaključka.



Slika 4.22. Majlarova reakcija: reakciona šema nastajanja pronil-L-lizina (I) iz proteina i glukoze, preko intermedijera acetilformoina (II).

Ispitivanje antioksidantne aktivnosti lekovitog bilja i začina u prehrambenim proizvodima je u žiži interesovanja velikog broja naučnika, pri čemu se većina objavljenih rezultata odnosi na ispitivanja na rafinisanom ulju (Chang i sar., 1978; Tsimidou i sar., 1995; Hopia i sar., 1996; Frankel i sar., 1997; Huang i Frankel, 1997). Izvestan broj objavljenih radova se odnosi na ispitivanje antioksidantnih svojstava začina u mesu (Shahidi i sar., 1995; El-Alim i sar., 1999; Aguirrezábal i sar., 2000), dok se relativno mali broj radova odnosi na mogućnost primene začina i lekovitog bilja u keksu.

Među njima, Ochi i sar. (1994) su dokazali da 2% etanolni ekstrakt zrna kafe usporava razvoj užglosti keksa prilikom skladištenja, dok su Bassiouny i sar. (1990) dokazali antioksidantna svojstva prečišćenih etarskih ekstrakata biljaka *Majorana hortensis*, *Mentha viridis*, *Mentha piperita* i *Ocimum basilicum* u pekarskim proizvodima. Lean i Mohamed

(1999) su ispitivali antioksidantna i antimikrobna svojstva kurkume, *Cymbopogon citratus*, *Piper betle*, karanfilića, lista crnog bibera i *Garcinia atriviridis* u keksu. Došli su do zaključka da kurkuma ima najizraženija antimikrobna i antioksidantna svojstva, dok je list crnog bibera imao prooksidativno dejstvo.

Konačno, uvažavajući rezultate oba test, može se zaključiti da dodatak biljne mešavine Vitalplant[®], upravo proporcionalno primenjenoj koncentraciji, dovodi do povećanja antioksidantne aktivnosti keksa i smanjenja stepena lipidne peroksidacije. Rezultati ukazuju i na to da je pulvis efikasniji u sprečavanju lipidne peroksidacije i u većoj meri povećava "skevindžer" aktivnost na DPPH[·] radikale u odnosu na etanolni ekstrakt koji je dobijen iz identične količine pulvisa. Osim toga, dobijeni rezultati ukazuju i na veliku oksidativnu stabilnost svih uzoraka keksa tokom prve četiri nedelje skladištenja, koja se može dovesti u vezu sa antioksidantnim delovanjem proizvoda Majlarove reakcije, za koje je dokazano da nastaju prilikom pečenja keksa.

5 Zaključak

U ovom radu je izvršeno kvantitativno određivanje i identifikacija fenolnih komponenata etanolnih ekstrakata ploda peršuna (*Petroselinum fructus*), kore krušine (*Frangulae cortex*), lista pitome nane (*Mentha piperitae folium*), ploda kima (*Carvi fructus*) i lista breze (*Betulae folium*), kao i komercijalnog preparata Vitalplant® ((*Frangulae cortex* (35 %), *Mentha piperitae folium* (20%), *Carvi fructus* (20 %), *Petroselinum fructus* (25 %)), primenom spektrofotometrijskih metoda određivanja sadržaja ukupnih fenola i flavonoida, kao i HPLC/DAD tehnike u cilju identifikacije fenolnih komponenti.

U nastavku istraživanja ispitivana je antioksidantna aktivnosti etanolnih ekstrakata primenom direktnih, ESR "spin trap" spektroskopskih metoda određivanja "skevindžer" aktivnosti na superoksid anjon i hidroksil radikale, i indirektnih, spektrofotometrijskih testova za određivanje "skevindžer" aktivnosti na DPPH[•] radikale, redoks potencijala i helatacione aktivnosti, kao i antioksidantne aktivnosti u sistemu β-karoten-linolna kiselina.

Osim navedenog, deo istraživanja je posvećen ispitivanju termičke stabilnosti ekstrakata navedenih biljaka i komercijalnog preparata Vitalplant® radi sticanja uvida u mogućnost njihove primene u pekarskim i konditorskim proizvodima.

U poslednjoj fazi rada, izvršeno je određivanje sposobnosti pulvisa i etanolnog ekstrakta komercijalnog preparata Vitalplant® da inhibiraju oksidaciju lipida u keksu, primenom spektrofotometrijskih testova "skevindžer" aktivnosti na DPPH[•] radikale i MDA testa.

Na osnovu dobijenih rezultata se mogu izvesti sledeći zaključci:

- Nakon ekstrakcije smešom etanol:voda (80:20, v/v) prinosi ekstrakcije se kreću oko 20%, pri čemu breza daje najveći, a kim najmanji prinos.
- U pogledu sadržaja ukupnih fenola, signifikantne razlike među uzorcima postoje, pri čemu je kim ($2,89 \pm 0,020\%$) uzorak sa najmanjim sadržajem, dok je pitoma nana ($18,4 \pm 0,001\%$) uzorak sa najvećim sadržajem fenola u ekstraktu. Na nivou polaznog uzorka biljnog materijala, krušina ($3,66 \pm$

0,020%) i breza ($3,61 \pm 0,090\%$) su uzorci sa najvećim sadržajem biljnih fenola, dok je kod kima ($0,563 \pm 0,005\%$) utvrđen najmanji sadržaj. Termičkim tretmanom u većini slučajeva ne dolazi do značajne promene u sadržaju ukupnih fenola, osim u slučaju breze, gde je primećen blagi porast, i peršuna, gde je sadržaj neznatno smanjen. Porast u sadržaju fenola tokom termičkog tretmana bi se mogao objasniti hemijskim promenama u strukturi fenola, dok bi smanjenje moglo biti posledica njihove direktne degradacije. Kvantitativni i kvalitativni sadržaj fenola zavisi od biljne vrste što verovatno uslovljava razliku u promenama tokom termičkog tretmana.

- Sadržaj ukupnih flavonoida u etanolnim ekstraktima se kretao od 0,510 do 2,05%, pri čemu je ekstrakt Vitalplant[®] biljne mešavine bio najbogatiji flavonoidima, dok je ekstrakt peršuna imao najmanji sadržaj. Statistički parametri ukazuju na to da se svi ispitani ekstrakti značajno razlikuju u pogledu sadržaja flavonoida, kao i na to da termički tretman dovodi do njihovog značajnog smanjenja, u svim slučajevima osim kod peršuna. Ispitane biljke se međusobno razlikuju po kvantitativnom i kvalitativnom sadržaju flavonoida što verovatno uslovljava razliku u promenama tokom termičkog tretmana.
- U etanolnom ekstraktu pitome nane utvrđeno je i kvantitativno određeno prisustvo kafene kiseline, hlorogenske kiseline, rutina, ruzmarinske kiseline, kao i slobodnih aglikona: kvercetina, naringenina, luteolina i apigenina. U poređenju sa ostalim kvantitativno određenim jedinjenjima, svojim sadržajem se ističe ruzmarinska kiselina. Nakon hidrolize, dolazi do porasta u sadržaju svih pomenutih jedinjenja usled raskidanja glikozidnih veza, osim u slučaju kafene kiseline, koja se verovatno delimično degradira pri primenjenim eksperimentalnim uslovima hidrolize.
- U etanolnom ekstraktu krušine identifikovana su i kvantitativno određena sledeća jedinjenja: galna kiselina, protokatehinska kiselina, kafena kiselina, vanilinska kiselina, hlorogenska kiselina, siringična kiselina, kao i aloemodin. Nakon hidrolize, utvrđeno je i prisustvo ferulne kiseline, miricetina, kvercetina, naringenina, luteolina i apigenina. Usled hidrolize, dolazi do

porasta sadržaja svih jedinjenja, osim u slučaju galne i vanilinske kiseline, čije se prisustvo nakon hidrolize nije moglo detektovati.

- U etanolnom ekstraktu breze kvantitativno su određena sledeća jedinjenja: galna kiselina, protokatehinska kiselina, kafena kiselina, hlorogenska kiselina, ferulna kiselina, rutin i apigenin. Nakon hidrolize utvrđeno je prisustvo i miricetina, kvercetina, kemferola, kao i porast u sadržaju apigenina. Povećanje u sadržaju jedinjenja usled hidrolize je uočeno i u slučaju galne kiseline, kao i protokatehinske kiseline, dok je do smanjenja sadržaja, kao i u slučaju mente, došlo kod kafene kiseline. Nakon hidrolize neznatno je smanjen i sadržaj hlorogenske kiseline. Veliko povećanje u sadržaju galne kiseline nakon hidrolize se može objasniti hidrolizom galotanina.
- Rezultati ispitivanja etanolnog ekstrakta kima su ukazali na prisustvo protokatehinske kiseline, kafene, hlorogenske, rutina i ruzmarinske kiseline, čiji je sadržaj kvantitativno određen. Nakon hidrolize protokatehinska kiselina nije detektovana, dok je sadržaj kafene kiseline smanjen, kao i u slučaju nane i breze. Kvantitativno određene količine kemferola i kvercetina su u skladu sa literaturnim podacima.
- Kvantitativnom analizom sastava fenolnih jedinjenja etanolnog ekstrakta peršuna, utvrdili smo prisustvo: galne kiseline, protokatehinske kiseline, kafene kiseline, *trans*-cimetne kiseline, luteolina, kemferola i apigenina. Nakon hidrolize, utvrđeno je i prisustvo kvercetina, kao i porast u sadržaju svih ispitanih komponenti, a pogotovu apigenina. Porast u sadržaju galne kiseline nakon hidrolize se može objasniti hidrolizom galotanina, kao i u slučaju breze.
- Analizom komercijalnog preparata Vitalplant[®] utvrđeno je prisustvo velikog broja jedinjenja, čije je prisustvo dokazano u pojedinačnim biljnim komponentama. Obzirom na kompleksnost smeše, komponente prisutne u suviše niskim koncentracijama je bilo teško kvantitativno odrediti.
- Poređenjem ukupnog sadržaja fenola dobijenih spektrofotometrijski i HPLC metodom u ekvivalentima galne kiseline dobijaju se uporedive vrednosti, istog reda veličine, iako korelacija nije signifikantna za $p < 0,05$.
- ESR spektralnom analizom utvrđeno je da pripremljeni etanolni ekstrakti u opsegu ispitivanih masenih koncentracija, od 0,001 do 2,00 mg/ml, imaju

inhibitorni efekat na stvaranje $O_2^{\cdot-}$ ili učestvuju u njihovoj transformaciji. Dodatak ekstrakata masene koncentracije 0,001 mg/ml, kod svih ispitanih uzoraka je nedovoljan da izazove inhibitorni efekat na stvaranje $O_2^{\cdot-}$ radikala, dok su svi ekstrakti primenjeni u masenoj koncentraciji od 2,00 mg/ml ispoljili SAo² od 100%. Pri masenoj koncentraciji od 1,50 mg/ml, ekstrakti pitome nane, preparata Vitalplant[®] i breze su takođe pokazali inhibitorni efekat od 100%. Najmanju IC₅₀ vrednost, odnosno najveću aktivnost u ovom testu pokazao je ekstrakt pitome nane, dok je najmanju aktivnost pokazao uzorak peršuna. Biljna mešavina Vitalplant[®] je u ovom testu pokazala veliku aktivnost, koja se može objasniti sinergističkim delovanjem komponenti koje je sačinjavaju. Dobijene IC₅₀ vrednost su u statistički značajnoj korelaciji sa sadržajem ukupnih fenola određenih spektrofotometrijski ($r=-0,89$, $p<0,05$). Ovo je u skladu sa mišljenjem velikog broja autora, koji "skevindžer" aktivnost pripisuju delovanju biljnih fenola.

- ESR spektralnom analizom utvrđeno je da pripremljeni etanolni ekstrakti u opsegu ispitivanih masenih koncentracija, od 0,005 do 0,200 mg/ml, imaju inhibitorni efekat na stvaranje $\cdot OH$ ili učestvuju u njihovoj transformaciji. Pri masenoj koncentraciji od 0,150 mg/ml svi uzorci, osim ekstrakta krušine, su takođe pokazali inhibitorni efekat od 100%. Dodatak ekstrakata masene koncentracije 0,005 mg/ml, kod svih ispitanih uzoraka je nedovoljan da izazove inhibitorni efekat na stvaranje $\cdot OH$ radikala, dok su svi ekstrakti primenjeni u masenoj koncentraciji od 0,200 mg/ml izvršili potpunu inhibiciju stvaranja DMPO-OH "spin adukta". U ovom testu krušina je uzorak koji je i pri svim ostalim koncentracijama pokazao najslabiju aktivnost. Najveću aktivnost u ovom testu, na nivou ekstrakta, imao je uzorak kima, dok je uzorak breze, na nivou polaznog biljnog materijala, imao najveću aktivnost. Visoka aktivnost komercijalnog preparata Vitalplant[®] se može pripisati sinergističkom delovanju komponenti koje potiču od različitih biljaka.
- U testu na DPPH \cdot radikale najmanja IC₅₀ vrednost je dobijena za etanolni ekstrakt pitome nane ($0,172 \pm 0,002$ mg/ml), dok je najveća vrednost dobijena za ekstrakte peršuna ($4,65 \pm 0,820$ mg/ml). U poređenju sa komercijalnim antioksidantima, BHT-om i α -tokoferolom, pri masenoj koncentraciji od 0,100

mg/ml, za koje su dobijene vrednosti od 74,6% i 78,1%, svi ispitani ekstrakti imaju nižu "skevindžer" aktivnost. Statistički podaci ukazuju na značajne razlike u "skevindžer" aktivnosti između ispitanih biljaka, ali termički tretman ne dovodi do smanjenja "skevindžer" aktivnosti. Ustanovljena je i značajna pozitivna korelacija između sadržaja ukupnih flavonoida i "skevindžer" aktivnosti na DPPH[·] radikale ($r=0,94$; $p<0,05$), kao i između "skevindžer" aktivnosti na superoksid anjon i DPPH[·] radikale ($r=0,94$; $p<0,89$). Korelacija između sadržaja ukupnih fenola i "skevindžer" aktivnosti na DPPH[·] radikal je pozitivna, ali ne i statistički značajna.

- Ispitivanjem redoks potencijala, najmanja IC₅₀ vrednost ekstrakta dobijena je za uzorke pitome nane ($0,677 \pm 0,108$ mg/ml). U poređenju sa IC₅₀ vrednošću dobijenoj za BHT ($0,120 \pm 0,006$ mg/ml), svi ekstrakti su pokazali niži redoks potencijal. Preračunavanjem dobijenih vrednosti na biljni materijal, statistički značajne razlike između uzoraka pitome nane, breze i komercijalnog preparata Vitalplant[®] ne postoje. Izražene na ovaj način, IC₅₀ vrednosti imaju međusobno identičan poredak kao i kod testa na DPPH[·] radikale ($r=0,913$; $p<0,05$). Osim navedenog dobijeni rezultati su i u visoko značajnoj korelaciji sa "skevindžer" aktivnošću na superoksid anjon radikale ($r=0,980$; $p<0,05$). Statistički parametri takođe ukazuju i na to da je povećanje u redoks potencijalu kod uzoraka kima i peršuna nakon termičkog tretmana značajno.
- Najveća helataciona aktivnost dobijena je za ekstrakt pitome nane ($0,435 \pm 0,180$ mg/ml), dok je najveća IC₅₀ vrednost u ovom testu dobijena za ekstrakt krušine ($1,39 \pm 0,100$ mg/ml). Statistički gledano, ostali uzorci se međusobno ne razlikuju u velikoj meri. Iako relativno bliske, dobijene IC₅₀ vrednosti su oko deset puta veće od IC₅₀ vrednosti dobijene za EDTA ($0,054 \pm 0,002$ mg/ml). Termički tretman kod svih ispitanih uzoraka dovodi do smanjenja helatacione aktivnosti, pri čemu su statistički značajne razlike između tretmana dobijene jedino za ekstrakt krušine. Preračunavanjem dobijenih IC₅₀ vrednosti na masu uzorka, pitoma nana i breza su uzorci koji poseduju veću helatacionu aktivnost od ostalih uzoraka, koji se međusobno statistički značajno ne razlikuju. Pozitivna korelacije između "skevindžer" aktivnosti na hidrosil

radikale i helatacione aktivnosti ($r=0,54$; $p<0,05$) postoji, ali ona nije statistički značajna.

- Rezultati antioksidantne aktivnosti (AOA) u sistemu β -karoten-linolna kiselina, praćeni spektrofotometrijski, ukazuju na najveću antioksidantnu aktivnost ekstrakta krušine, a najmanju ekstrakta kima. Statistički podaci ukazuju na to da se ekstrakti breze i Vitalplant[®] biljne mešavine međusobno značajno ne razlikuju. Velike razlike ne postoje ni između ekstrakata peršuna i pitome nane. U poređenju sa BHT-om, za koji je dobijena IC_{50} vrednost od $0,054 \pm 0,009$ mg/ml, svi ekstrakti su ispoljili značajno nižu AOA. Termičkim tretmanom, do značajnog smanjenja AOA dolazi jedino kod uzoraka pitome nane i peršuna.
- Kolorimetrijskim praćenjem oksidativne degradacije β -karotena na ELISA čitaču, dobijaju se uporedive vrednosti, međutim značajna korelacija između serija rezultata ne postoji. U kolorimetrijskom određivanju, najveću AOA aktivnost je imao ekstrakt krušine, kao i kod spektrofotometrijskog određivanja, dok su najmanju ispoljili ekstrakti kima, breze i peršuna, koji se međusobno nisu razlikovali. Vitalplant[®] biljna mešavina je i u ovom testu po aktivnosti bila na drugom mestu. Termički tretman ne dovodi do značajne promene u AOA aktivnosti. Kolorimetrijski praćeno, za BHT je dobijena znatno veća IC_{50} vrednosti ($0,273 \pm 0,028$ mg/ml), koja je takođe, znatno niža od svih dobijenih vrednosti za ekstrakte. Uzimajući u obzir sve rezultate određivanja AOA, može se zaključiti da je krušina uzorak sa najvećom aktivnošću u ovom testu, dok je peršun uzorak sa najmanjom aktivnošću. Svi uzorci pokazuju znatno nižu aktivnost u odnosu na BHT, a termičkim tretmanom se jedino statistički značajno smanjuje antioksidantna aktivnost uzorka peršuna.
- Antioksidantna aktivnost komecijalnog preparata Vitalplant[®] u keksu, u ogledu koji je trajao šest nedelja, praćena je na osnovu promena na lipidima MDA testom, i "skevindžer" aktivnosti keksa na DPPH[•] radikale, svakih sedam dana. Biljna mešavina Vitalplant[®] dodavana je u vidu pulvisa i ekstrakta u različitim koncentracijama. Tokom prve četiri nedelje količina MDA je relativno niska u svim uzorcima, manja od 20 nmol (MDA)/g uzorka. Osim činjenice da je kontrolni uzorak u odnosu na ostale imao najveću MDA vrednost, jasan

poredak između uzoraka tokom prve četiri nedelje ne postoji. Tokom pete nedelje dolazi do skoro dvostrukog porasta u MDA vrednosti kod svih uzoraka. Znatno veću MDA vrednost u odnosu na ostale je imao uzorak kontrolnog keksa, pri čemu je sudeći po poretku uzoraka, pulvis upravo proporcionalno sadržaju bio efikasniji u sprečavanju oksidacije lipida u odnosu na primenjene ekstrakte. Tokom šeste nedelje dolazi do daljeg porasta u količini MDA kod svih uzoraka, pri čemu je poredak među njima identičan. Dobijeni rezultati ukazuju na to da je antioksidativna delotvornost biljne mešavine Vitalplant® upravo proporcionalna primenjenoj koncentraciji, jer se dodavanjem pulvisa dodaje više antioksidanata u odnosu na ekstrakt koji je dobijen iz identične količine pulvisa. Primenom testa na DPPH radikale, prve nedelje eksperimenta, uzorak kontrolnog keksa je imao IC_{50} vrednost od $0,296 \pm 0,048$ g/ml, veću od IC_{50} vrednosti svih ostalih uzoraka. Najmanju IC_{50} vrednost, odnosno najveću "skevindžer" aktivnost na DPPH radikale je imao uzorak keksa sa 6% pulvisa, koja je iznosila $0,115 \pm 0,022$ g/ml. Dobijene IC_{50} vrednosti za prvu nedelju imaju sledeći poredak: kontrola > keks sa 2% ekstrakta > keks sa 4% ekstrakta > keks sa 2% pulvisa > keks sa 6% ekstrakta > keks sa 4% pulvisa > keks sa 6% pulvisa. Tokom pete nedelje dolazi do značajnog povećanja IC_{50} vrednosti, naročito kod kontrolnog uzorka i uzorka keksa sa 2% ekstrakta. Ovo povećanje se može tumačiti gubitkom antioksidanata u procesu lipidne peroksidacije, naročito ako se uvažavaju i rezultati dobijeni u predhodnom MDA testu. Statističkim poređenjem rezultata dva testa za petu i šestu nedelju dobijene su signifikantno značajne korelacije, za petu nedelju $r=0,77$; $p<0,05$, a za šestu nedelju $r=0,85$; $p<0,05$. Rezultati ukazuju i na to da je pulvis efikasniji u sprečavanju lipidne peroksidacije i u većoj meri povećava "skevindžer" aktivnost na DPPH radikale u odnosu na etanolni ekstrakt koji je dobijen iz identične količine pulvisa. Osim toga, dobijeni rezultati ukazuju i na veliku oksidativnu stabilnost svih uzoraka keksa tokom prve četiri nedelje skladištenja, koja se može dovesti u vezu sa antioksidantnim delovanjem proizvoda Majlarove reakcije, za koje je dokazano da nastaju prilikom pečenja keksa.

- Uvažavajući rezultate oba test, može se zaključiti da dodatak biljne mešavine Vitalplant[®], upravo proporcionalno njenom sadržaju, dovodi do povećanja antioksidantne aktivnosti keksa i smanjenja stepena lipidne peroksidacije.

Rezultati ispitivanja antioksidantne aktivnosti biljnih sirovina ukazuju na to da sve ispitane biljne droge poseduju antioksidantnu aktivnost u svim primenjenim testovima. Osim po najvećem sadržaju ukupnih fenola, ekstrakti pitome nane se ističu i najvećom aktivnošću u većini primenjenih testova. Uzorak kima se ističe najmanjim sadržajem ukupnih fenola ali pokazuje najveći inhibitorski efekat na stvaranje $\cdot\text{OH}$ radikala. Krušina je uzorak sa najslabijim inhibitorskim efektom na stvaranje $\cdot\text{OH}$ radikala, ali pokazuje najveću AOA aktivnost u sistemu β -karoten-linolna kiselina. Ekstrakti lista breze pokazuju relativno visoku aktivnost u svim primenjenim testovima, dok su ekstrakti peršuna pokazali relativno slabu antioksidantnu aktivnost u odnosu na ostale uzorke. Komercijalni preparat Vitalplant[®] je pokazao relativno visoku antioksidantnu aktivnost u većini testova, koja se može pripisati sinergističkom delovanju komponenti koje je sačinjavaju.

Konačno, može se zaključiti da su ispitane biljne sirovine: peršun (*Petroselinum fructus*), krušina (*Frangulae cortex*), pitoma nana (*Mentha piperitae folium*), kim (*Carvi fructus*) i obična breza (*Betulae folium*), kao i komercijalni preparat Vitalplant[®] (*Frangulae cortex* (35 %), *Mentha piperitae folium* (20%), *Carvi fructus* (20 %), *Petroselinum fructus* (25 %)) bogat izvor jedinjenja iz klase fenola. Sve ispitane biljne droge poseduju antioksidantnu aktivnost, koja se značajno ne menja usled termičkog tretmana. Dodatak biljne mešavine Vitalplant[®], upravo proporcionalno njenom sadržaju, dovodi do povećanja antioksidantne aktivnosti keksa i smanjenja stepena lipidne peroksidacije. Dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost primene komercijalnog preparata Vitalplant[®] u cilju proizvodnje šire palete proizvoda, koji bi bili senzorno prihvatljivi od strane potrošača, a u isto vreme i potvrđeni u biološkim testovima kao funkcionalni.

6 Literatura

A.O.A.C. Method #942.27, *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th edn., AOAC International, Gaithersburg, 1997.

A.O.C.S. Method Cd 8-53, Peroxide Value, Sampling and Analysis of Commercial Fats and Oils, A.O.C.S. Official Method, Revised 1986.

Acworth, I.N. (2003) *The Handbook of Redox Biochemistry*. Eds. ESA, Inc., Chelmsford, USA.

Aguirrezábal M.M., Mateo J., Domínguez M.C., Zumalacárregui J.M. (2000) The effect of paprika, garlic and salt on rancidity in dry sausages. *Meat Sci.* 54(1), 77-81.

Albert C.M., Hennekens C.H., O'Donnell C.J., Ajani U.A., Carey V.J., Willett W.C., Ruskin J.N., Manson J.E. (1998) Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *J. Am. Med. Assoc.*, 279, 23-28.

Ali M. S., Saleem M., Ahmad W., Parvez M., Yamdagni R. (2002) A chlorinated monoterpene ketone, acylated β -sitosterol glycosides and a flavanone glycoside from *Mentha longifolia* (Lamiaceae). *Phytochemistry*, 59, 889–895.

Ali M.S., Saleem M., Ahmad W., Parvez M., Yamdagni R. (2002) A chlorinated monoterpene ketone, acylated β -sitosterol glycosides and a flavanone glycoside from *Mentha longifolia* (Lamiaceae). *Phytochemistry*, 52, 889-895.

Al-Saikhan, M.S., Howard, L.R., Miller, J.C.Jr. (1995) Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato (*Solanum Tuberosum* L.). *Journal of Food Science*, 60 (2), 341-347.

Anderson J.J.B., Garner S.C. (1997) The effects of phytoestrogens on bone. *Nutr. Res.*, 17, 1617-1632.

Anderson J.W., Johnstone B.M., Cook-Newell, M.E. (1995). Meta-analysis of the effects of soy protein in-take on serum lipids. *New Engl. J. Med.*, 333, 276- 282.

Anke H., Kolthoum I., Laatsch H. (1980) Metabolic products of microorganisms. 192. The anthraquinones of the *Aspergillus glaucus* group. II. Biological activity. *Archives of Microbiology*, 126, 231–236.

Arabshahi-D, S., Devi, D. V. Urooj, A. (2007) Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability. *Food Chemistry*, 100(3), 1100-1105.

Arai S. (1996) Studies on functional foods in Japan. State of the art. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60, 9-15.

Arctander S. (1960) *Perfume and Flavor Materials of Natural Origin*, Nevada Steffen Arctander Publication 96-100 (rep. 1982).

Areias F. M., Valentão P., Andrade P. B., Ferreres F., Seabra R. M. (2001) Phenolic fingerprint of peppermint leaves. *Food Chem.*, 73, 307–311.

Armitage B. A., Yu C., Devadoss C., Schuster G. B. (1994) Cationic anthraquinone derivatives as catalytic DNA phot nucleases: mechanisms for DNA damage and quinone recycling. *J Am Chem Soc.*, 116, 9847–9859.

Aruoma O. I. (1996) Assessment of potencial prooxidant and antioxidant actions. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 73, 1617-1625.

Auchère F., Capeillè - Blandin C. (1999) NADPH as a co-substrate for studies of the chlorinating activity of myeloperoxidase. *Biochem J.*, 343, 603-613.

Avorn J., Monane M., Gurwitz J.H., Glynn R.J., Choodnovskiy, I., Lipsitz L.A. (1994) Reduction of bacteriuria and pyuria after ingestion of cranberry juice - A reply. *J. Am. Med. Assoc.*, 272, 589-590.

Barnard D.L., Huffman J.H., Morris J.L., Wood S.G., Hughes B.G., Sidwell R.W. (1992) Evaluation of the antiviral activity of anthraquinones, anthrones and anthraquinone derivatives against human cytomegalovirus. *Antiviral Research*, 17, 63–77.

Bassiouny S. S., Hassanien F. R., Abd-El-Razik A. F., El-Kayati M. (1990) Efficiency of antioxidants from natural sources in bakery products. *Food Chem* (37), 297-305.

Becker E.M., Nissen L.R., Skibsted L.H. (2004) Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research & Technology.*, 219, 561-571.

Bellakhdar J. (1997) *La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle*, Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires, Edition Ibis Press, 150.

Berdowska I., Marcinkowska A., Zielinski B., Fecka I., Banas T. (2007) The effect of selected herb extracts on superoxide dismutase activity in Jurkat cells. *Adv Clin Exp Med*, 16, 361-364.

Bick I.R.C., Rhee C. (1965) Anthraquinone pigments from phomafoveata foister. *Biochem. J.*, 98, 112-116.

Birt D.F., Hendrich S., Wang W. (2001) Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, 90,157-177.

Birt D.F., Mitchell D., Gold B., Pour P., Pinch H.C. (1997) Inhibition of ultraviolet light-induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid. *Anticancer Research*, 17, 85–91.

Bisset N.G., Wichtl M. (Eds.) (2001) *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*. Boca Raton, London, New York, Washington D.C., CRC Press.

Blumenthal M., Goldberg A., Brinckmann J. (2000). *Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs*. Copyright American Botanical Council. Publ. by Integrative Medicine Communications, Newton, MA, 36-39.

Boik J. (1995) *Cancer and natural medicine*. Princeton, MN, USA, Oregon Medical Press.

Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Jovin E. (2007) Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 7879–7885.

Bozin B., Mimica-Dukic N., Simin N., Anackov G. (2006) Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 1822-1828.

Bradley R.P. (ed.) (1992). *British Herbal Compendium*, Vol. 1. Bournemouth: British Herbal Medicine Association. 99-101.

Bravo L., Saura-Calixto F. (1998) Characterization of dietary fiber and the *in vitro* indigestible fraction of grape pomace. *American Journal of Enology & Viticulture*. 49, 135-141.

Brendler T., Grünwald J., Jänicke C. (2003) *Herbal Remedies—Electronic Database*, Stuttgart Medpharm Scientific Publishers Version 5.

Bruneton J. (1999) *Pharmacognosy, phytochemistry, medical plants, 2nd edn*. Paris, France: Intercept Ltd. and Lavoisier Publishing.

Burda S., Oleszek W. (2001) Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2774-2779.

Cabrera C., Artacho R., Giménez R. (2006) Beneficial effects of green tea - a review. *J. Am. Coll. Nutr.*, 25, 79- 99.

Caldwell C. R., Britz, S. J., Mirecki R. M. (2005) Effect of temperature, elevated carbon dioxide, and drought during seed development on the isoflavone content of dwarf

soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] grown in controlled environments. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1125–1129.

Capeillè-Blandin, C. (1998) Oxidation of guaiacol by myeloperoxidase: a two-electron-oxidized guaiacol transient species as a mediator of NADPH oxidation. *Biochem J.*, 336, 395-404.

Ćetković G., Čanadanović-Brunet J., Đilas S., Savatović S., Mandić A., Tumbas V. (2008) Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. *Food Chem.*, 109, 340-347.

Chaillou L. L., Nazareno M. A. (2006) New method to determine antioxidant activity of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 8397-8402.

Chang L.C., Sheu H.M., Huang Y.S., Tsai T.R., Kuo K.W. (1999) A novel function of emodin. Enhancement of the nucleotide excision repair of UV- and cisplatin-induced DNA damage in human cells. *Biochemical Pharmacology*, 58, 49–57.

Chang S.S., Peterson R.J., Ho C.-T. (1978) Chemical reactions involved in the deep fat frying of foods. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 55, 718-722.

Cheeseman, K.H. (1993) Lipid peroxidation in biological systems. Halliwell, B., Aruoma, O.I. (eds.), *DNA and Free Radicals*, Ellis Harwood, London.

Chen F.A., Wu A.B., Chen C.Y. (2004) The influence of different treatments on the free radical scavenging activity of burdock and variations of its active components. *Food Chemistry*, 86(4), 479-484.

Chen Z.-G., Fujii, I. Ebizuka Y., Sankawa U. (1992) Emodin O-methyltransferase from *Aspergillus terreus*. *Arch Microbiol*, 158, 29-34.

Cheng Y.W., Kang J.J. (1998) Emodin-induced muscle contraction of mouse diaphragm and the involvement of Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum. *British Journal of Pharmacology*, 123, 815–820.

Chipault J.R., Mizuno G.R., Lundberg W.O. (1956) The antioxidant properties of spices in foods. *Food Technology*, 10, 209-211.

Chipault J.R., Mizuno G.R., Hawkins J.M., Lundberg W.O. (1952) The antioxidant properties of natural spices. *Food Research*, 17, 46-55.

Chipault J.R., Mizuno G.R., Lundberg W.O. (1955) Antioxidant properties of spices in oil-in-water emulsions. *Food Research*, 20, 443-448.

Choi J. S., Chung H. Y. , Jung H. A., Park H. J., Yokozawa T. (2000) Comparative evaluation of antioxidant potential of alaternin (2-hydroxyemodin) and emodin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (12), 6347-6351.

Chowdhury A.R., Mandal S., Mitra B., Sharma S., Mukhopadhyay S., Majumder H. K. (2002). Betulinic acid, a potent inhibitor of eukaryotic topoisomerase I: identification of the inhibitory step, the major functional group responsible and development of more potent derivatives. *Med Sci Monit.*, 8(7), 254-265.

Chung H.Y. (1997) Development of natural antioxidants stable at frying temperatures. *Korean Journal of Food Nutrition.*, 10, 564-573.

Cirla A.M., Cirla P.E., Parmiani S., i sar.(2003) A pre-seasonal birch/hazel sublingual immunotherapy can improve the outcome of grass pollen injective treatment in bisensitized individuals. A case-referent, two-year controlled study. *Allergol. Immunopathol. (Madr.)*, 31(1), 31-43.

Clinton S.K. (1998) Lycopene: Chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr. Rev.*, 56, 35-51.

Cook N.C., Samman S. (1996). Flavonoids- chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutr. Biochem.*, 7, 66-76.

Croft K.D. (1999) Antioxidant effects of plant phenolic compounds, *Antioxidants in Human Health*, Basu, T.K., Temple, N.J., Garg, M.L., (Eds.), CAB International.

Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G. (2000) Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.J. (eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, pp.1250-1318. ASPB, Rockville, USA.

Czop J.K., Austen K.F. (1985) A β -glucan inhibitable receptor on human monocytes: its identity with the phagocytic receptor for particulate activators of the alternative complement pathway. *J Immunol*, 134, 2588-2593.

Dallenbach-Tölke K., Nyiredy Sz., Gross, G. A., Sticher O. (1986) Flavonoid glycosides from *Betula pubescens* and *Betula pendula*. *J. Nut. Prod.*, 49, 1155-1156.

Dallenbach-Tölke K., Nyiredy Sz., Meier B., Sticher O. (1987) HPLC analysis of the flavonoid glycosides from *Betulae folium*. *Planta Med.*, 53, 189-192.

Daniel M. (2006) *Medicinal Plants: Chemistry and Properties*, Enfield, N.H. (ed.), Science Publishers, Inc., USA, pp. 70.

Daniel O. , Meier M. S. , Schlatter J. , Frischknecht P. (1999) Selected phenolic compounds in cultivated plants: ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides. *Environ. Health Perspect.*, 107, 109–114.

Davis E.M., Ringer K.L., McConkey M.E., Croteau R. (2005) Monoterpene metabolism. Cloning, expression, and characterization of menthone reductases from peppermint. *Plant Physiology*, 137(3), 873 - 881.

De Carvalho, C. C. C. R., Da Fonseca, M. M. R. (2006) Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. *Food Chemistry*, 95, 413-422.

de Witte P. (1993) Metabolism and pharmacokinetics of anthranoids. *Pharmacology*, 47, 86–97.

Decker, E.A., Welch, B. (1990) Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 674-677.

Demirci B., Baser K.H.C., Demirci F., Hamann M.T. (2000)^a New caryophyllene derivatives from *Betula litwinowii*. *J Nat Prod*, 63, 902-904.

Demirci B., Baser K.H.C. (2003) Essential oils from the buds of *Betula* spp. growing in Turkey. *Flavour Fragr J*, 18, 87-90.

Demirci B., Demirci F., Özek T., Baser K.H.C. (2000)^b Betulenols from *Betula* species, *Planta Medica*, 66, 490-493.

Demirci B., Paper D.H., Demirci F., K. Baser H.C., Franz G. (2004) Essential oil of *Betula pendula* Roth. buds. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 1(3), 301-303.

Dewick P.M. (2002) *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. Second Edition, John Wiley & Sons, New York, pp 121-123.

Dey P.M., Harbone J.B. (1997) *Plant Biochemistry*. Academic Press, San Diego, USA.

Di Luzio N.R.(1983) Immunopharmacology of glucan: a broad spectrum enhancer of host defense mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences*, 4, 344-347.

Di Mascio P., Kaiser S., Sies H. (1989) Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.*, 274, 532-538.

Dorman H.J.D., Bachmayer O., Kosar M., Hiltunen R. (2004) Antioxidant properties of aqueous extracts from selected *Lamiaceae* species grown in Turkey. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 762-770.

Dorman H.J.D., Kosar M., Kahlos K., Holm Y., Hiltunen R. (2003) Antioxidant properties of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4563-4569.

Dudonné S., Vitrac X., Coutière P., Woillez M., Mérillon J.M. (2009) Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J. Agric. Food Chem.*, 57(5), 1768-1774.

Duh P.D., Tu Y.Y., Yen G.C. (1999) Antioxidant activity of water extract of Harg Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebnes wiss Technol*, 32,269-277.

Dwivedi S.P.D., Pandey V.B., Shah A.H., Rao Y.B. (1988) Chemical constituents of *Rhamnus procumbens* and pharmacological actions of emodin. *Phytotherapy Research*, 2, 51–53.

Ebrahimzadeh M. A., Pourmorad F., Bekhradnia A. R. (2008) Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran, *African Journal of Biotechnology* 7(18), 3188-3192.

Eddouks M., Lemhadri A., Michel J.-B. (2004) Caraway and caper: potential anti-hyperglycaemic plants in diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.*, 94, 143–148.

El-Alim S.S.L.A., Lugasi A., Hovari J., Dworschak E. (1999) Culinary herbs inhibit lipid oxidation in raw and cooked minced meat patties during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79 (2), 277-285.

Elegbede J.A., Elson C E., Tanner M.A., Qureshi A., Gould M.N. (1986) Regression of rat mammary tumors following dietary d-limonene. *J. Natl. Cancer Inst.*, 76, 323-325.

Engel W. (2001) In vivo studies on the metabolism of the monoterpenes S-(+)- and R-(-)-carvone in humans using the metabolism of ingestion-correlated amounts (MICA) approach. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (8), 4069-4075.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (2009). Pesticide Products; Registration Application. *Federal Register* 74 (41), 9396-9397.

ESCOP. 1997. "Frangulae cortex." *Monographs on the Medical Uses of Plant Drugs*. Exter, U.K. European Scientific Cooperative on Phytotherapy.

Espin, J.C., Soler-Rivas, C., Wichers, H.J. (2000) Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food. Chem.*, 48, 648-656.

European Pharmacopoeia, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France.

Evans W.C. (1996) *Treas and evans pharmacognosy, 4th edn* . London, UK: W.B. Saunders Company.

Everett S.A., Dennis M.F., Patel K.B., Maddix S., Kundu S.C., Willson R.L. (1996) Scavenging of nitrogen dioxide, thiyl and sulfonyl free radicals by the nutritional antioxidant β -carotene. *J. Biol. Chem.*, 271, 3988-3994.

Fan, L. Zhang, S., Yu, L., Ma, L. (2007) Evaluation of antioxidant property and quality of breads containing *Auricularia auricula* polysaccharide flour. *Food Chemistry*, 101(3), 1158-1163.

Fan, X. (2002) Measurement of malonaldehyde in apple juice using GC-MS and a comparison to the thiobarbituric acid assay. *Food Chemistry*, 77, 353-359.

Fecka I., Turek S. (2007) Determination of water-soluble polyphenolic compounds in commercial herbal teas from Lamiaceae: peppermint, melissa and sage. *J Agric Food Chem*, 55, 10908-10917.

Fenglin H., Ruili L., Bao H., Liang M. (2004) Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants . *Fitoterapia*, 75(1), 14-23.

Ferguson P.J., Kurowska E.M., Freeman D.J., Chambers A.F., Koropatnick J. (2006). In vivo inhibition of growth of human tumor lines by flavonoid fractions from cranberry extract. *Nutr Cancer*, 56 (1), 86-94.

Frankel E.N., Huang S.W., Aeschbach R. (1997) Antioxidant activity of green teas in different lipid systems. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 1309-1315.

Friedman, M. (1996) Nutritional value of proteins from different food sources: A Review. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 6-29.

Fuchs S., Beck T., Burkardt S., Sandvoss M., Mosandl A. (1999) Biogenetic studies in *Mentha x piperita*. L. Deuterium-labeled monoterpene ketones: synthesis and stereoselective analysis. *J Agric Food Chem*, 47, 3053-3057.

Gandhi A. P., Kotwaliwale N., Kawalkar J., Srivastav D. C., Parihar V. S., Nadh P. R. (2001) Effect of incorporation of defatted soyflour on the quality of sweet biscuits. *Journal of Food Science and Technology*, 38, 502-503.

Gao X.Y., Jiang Y., Lu J., Tu P.F. (2009) One single standard substance for the determination of multiple anthraquinone derivatives in rhubarb using high-performance liquid chromatography-diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 1216 (11), 2118-2123.

Gazzani G. (1994) Anti and prooxidant activity of some dietary vegetables. *Riv. Sci. Aliment.*, 23, 413–420.

Giovannucci E., Ascherio A., Rimm E.B., Stampfer M.J., Colditz G.A., Willett W.C. (1995) Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 87, 1767-1776.

Goel R.K., Das Gupta G., Ram S.N., Pandey V.B. (1991) Antiulcerogenic and antiinflammatory effects of emodin, isolated from *Rhamnus triquerta* wall. *Indian Journal of Experimental Biology*, 29, 230–232.

Goldman R. (1988) Characteristics of the b-glucan receptor of murine macrophages. *Exp Cel Res*, 174, 481-490.

Gong Y., Sohn H., Xue L., Firestone G.L., Bjeldanes L.F. (2006) 3,3'-Diindolylmethane is a novel mitochondrial H(+)-ATP synthase inhibitor that can induce p21(Cip1/Waf1) expression by induction of oxidative stress in human breast cancer cells. *Cancer Res.*, 66(9), 4880–4887.

Gordon M. H. (2001) The development of oxidative rancidity in foods. In: Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (Eds.), *Antioxidants in Food*. CRC Press, Boca Raton, Boston, New York, Washington, USA, 7-68.

Green B., Bentley M.D., Chung B.Y., Lynch N.G., Jensen B.L. (2007) Isolation of betulin and rearrangement to allobetulin: A Biomimetic Natural Product Synthesis. *Journal of Chemical Education*, 84(12), 1985-1987.

Guédon D. J., Pasquier B. P. (1994) Analysis and distribution of flavonoid glycosides and rosmarinic acid in 40 *Mentha x piperita* clones. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 679–684.

Guenther E. (1975) *The Essential Oils; Vol. 2*, Huntington, New York Robert E. Krieger, Publishing Co, 264-265.

Guillén-Sans R., Guzmán-Chozas M. (1998) The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 38, 315-330.

Gulluce M., Sahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A., Ozkan H. (2007) Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils

and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chem.*, 103(4), 1449-1456.

Guo Q., Zhao B., Shen S., Hou J., Hu J., Xin W. (1999) ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1427, 13-23.

Gurib-Fakim, A. (2006) Review: Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 2-93.

Ha Y.L., Grimm N.K., Pariza M.W. (1987) Anticarcinogens from fried ground beef: Health-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, 8,1881-1887.

Haag J. D., Lindstrom M. J., Gould M. N. (1992) Limonene-induced regression of mammary carcinomas. *Cancer Res.*, 52, 4021-4026.

Hagerman A.E., Riedl K.M., Jones G.A., Sovik K.N., Ritchard N.T., Hartzfeld P.W., Riechel T.L. (1998) High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*. 46, 1887–1892.

Halliwell B. (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med*, 91(3C),14S-22S.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon, Press, Oxford, 3rd ed.

Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*. 142, 231-255.

Hänsel R., Hörhammer L. (1954) Comparative investigations on the flavonoid glycosides of Betulaceae species. *Arch. Pharm.*, 287, 117-126.

Harbowy M.E., Balentine D.A. (1997) Tea Chemistry. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 16, 415-480.

Harnly J. M., Doherty R.F., Beecher, G.R., Holden J. M., Haytowitz D.B., Bhagwat S., Gebhardt S. (2006) Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (26), 9966-9977.

Hasegawa S., Miyake M. (1996) Biochemistry and biological functions of citrus limonoids. *Food Rev. Intl.*, 12, 413-435.

Hasler C.M. (1998) A new look at an ancient concept. *Chem. Industry Feb.*, 2, 84-89.

Hasler C.M. (1998) Functional foods: Their role in disease prevention and health promotion. *Food Technology*, 52(2),57-6.

Hassimotto N.M., Genovese M.I., Lajolo F.M. (2005) Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *J. Agric. Food Chem.*, 53(8), 2928-2935.

Hayase F., Shibuya T., Sato J., Yamamoto M. (1996) Effects of oxygen and transition metals on the advanced Maillard reaction of proteins with glucose. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 60(11), 1820–1825.

Hazra B., Biswas S., Mandal N. (2008) Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8, 63-73.

Hecht S.S. (1995) Chemoprevention by isothiocyanates. *J. Cell. Biochem. Suppl.*, 22, 195-209.

Hegnauer R. (1964) *Chemotaxonomie der Pflanzen. Vol. 3*: Basel Birkhäuser Verlag, 256-269.

Herrmann K., (1976) Flavonols and flavones in food plants: a review. *J. Food Technol.*, 11, 433–448.

Hinneburg I., Dorman H.J.D., Hiltunen, R. (2006) Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chem.*, 97, 122-129.

Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K. (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207, 604-611.

Hodgson J.M., Puddey I.B., Beilin L.J., Mori T.A., Croft, K.D. (1998) Supplementation with isoflavonoid phytoestrogens does not alter serum lipid concentrations: A randomized controlled trial in humans. *J. Nutr.*, 128, 728-732.

Holtmann G., Haag S., Adam B., Funk P., Wieland V., Heydenreich C.-J. (2003) Effects of a fixed combination of peppermint oil and caraway oil on symptoms and quality of life in patients suffering from functional dyspepsia. *Phytomedicine* 10, 56–57.

Homburger F., Treger A., Boger E. (1971) Inhibition of murine subcutaneous and intravenous benzo(a)pyrene carcinogenesis by sweet orange oils and d-limonene. *Oncology*, 25, 1-20.

Hopia A.I., Huang S.W., Schwarz K., German B., Frankel E.N. (1996). Effect of different lipid systems on antioxidant activity of rosemary constituents. Carnosol and carnosic acid with and without α -tocopherol. *J. Agril. Food Chem.*, 44, 2030-2036.

Huang H.C., Chang J.H., Tung S.F., Wu R.T., Foegh M.L., Chu S.H. (1992) Immunosuppression effect of emodin, a free radical generator. *European Journal of Pharmacology*, 211, 359–364.

Huang H.C., Chu S.H., Chao-Lee P.D. (1991) Vasorelaxants from Chinese herbs, emodin and scoparone, possess immunosuppressive properties. *European Journal of Pharmacology*, 198, 211–213.

Huang S.W., Frankel E.N. (1997) Antioxidant activity of tea catechins in different lipid systems. *J. Agril. Food Chem.*, 45, 3033-3038.

Iacobellis N.S., Lo Cantore P., Capasso F., Senatore F. (2005) Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 57–61.

IOM/NAS (1994) Opportunities in the nutrition and food sciences. (P.R. Thomas and R. Earl eds.), Institute of Medicine/National Academy of Sciences, National Academy Press, Washington, D.C. pp. 109.

Izhaki I. (2002) Emodin – a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. *New Phytologist*, 155(2), 205-217.

Jager W., Mayer M., Platzer P., Reznicek G., Dietrich H., Buchbauer G. (2000) Stereoselective metabolism of the monoterpene carvone by rat and human liver microsomes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52, 191-197.

Jagetia G.C. (2007) Radioprotective potential of plants and herbs against the effects of ionizing radiation. *J Clin Biochem Nutr*, 40, 74-81.

Jančić, R., Stošić, D., Mimica Dukić, N., Lakušić, B. (1995). *Aromatične biljke Srbije*, NIP Dečje novine, Beograd-Gornji Milnovac.

Jayasuriya H., Koonchanok N.M., Geahlen R.L., McLaughlin J.L., Chang C.J. (1992) Emodin, a protein tyrosine kinase inhibitor from *Polygonum cuspidatum*. *Journal of Natural Products* 55, 696–698.

Jenkins D.J., Kendall C.W., Axelsen M., Augustin L.S.A., Vuksan V. (2000) Viscous and nonviscous fibres, nonabsorbable and low glycaemic index carbohydrates, blood lipids and blood heart disease. *Current Opinions in Lipidology*, 11, 49-56.

Ji, Z.N., Ye W.C., Liu G.G., Hsiao W.L. (2002) 23-Hydroxybetulinic acid-mediated apoptosis is accompanied by decreases in bcl-2 expression and telomerase activity in HL-60 Cells. *Life Sciences*, 72 (1), 1–9.

Jing H., Kitts D.D. (2000) Comparison of the antioxidative and cytotoxic properties of glucose-lysine and fructose-lysine Maillard reaction products. *Food Research International*, 33, 509–516.

Jonsson I. (1991) Thermal degradation of carotenoids and influence of their physiological function. In M. Freidman (Ed.) *Nutrition & Toxicological Consequences of Food Processing*. New York, USA, Plenum press, pp 75-82.

Juntachote, T., Berghofer E. (2005) Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of holy basil and galangal. *Food Chemistry*, 92, 193-202.

Justesen U., Knuthsen P., Leth T. (1998) Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by HPLC with photodiode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 799, 101–110.

Justesen U., Knuthsen P., Leth T. (1998) Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*, 799(1-2), 101-110.

Kanatt S.R., Chander R., Sharma A. (2007) Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chem*, 100, 451-458.

Kawai K., Kato T., Mori H., Kitamura J., Nozawa Y. (1984) A comparative study on cytotoxicity and biochemical properties of anthraquinone mycotoxins modin and skyrin from *Penicillium islandium*. *Toxicology Letters*, 20, 155–160.

Keinänen M. (1993) Comparison of methods for the extraction of flavonoids from birch leaves (*Betula pendula* Roth.) carried out using high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1986–1990.

Kennedy T. A., Liebler D. C. (1991) Peroxy radical oxidation of β -carotene: formation of β -carotene epoxides. *Chem. Res. Toxicol.* 4, 290-295.

Kessler M., Ubeaud G., Jung L. (2003) Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.*, 55, 131-142.

Khayyal M.T., El-Ghazaly M.A., Kenawy S.A., Seif-El-Nasr M., Mahran L.G., Kafafi Y.A., Okpanyi S.N. (2001) Antiulcerogenic effect of some gastrointestinally acting plant extracts and their combination. *Arzneimittelforschung*, 51, 545–553.

Koyama M., Kelly T.R., Watanabe K.A. (1988) Novel type of potential anticancer agents derived from chrysophanol and emodin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 31, 283–284.

Kreydiyyeh S.I., Usta J. (2002). Diuretic effect and mechanism of action of parsley. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 353-357.

Kuo M.L., Lee K.C., Lin J.K. (1992) Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by apigenin, tannic acid, ellagic acid and indole-3-carbinol in the Salmonella and CHO systems. *Mutation Research*, 270, 87–95.

Lahlou S.A., Tahraoui Z., Israili Z., Lyoussi B. (2007) Diuretic activity of the aqueous extracts of *Carum carvi* and *Tanacetum vulgare* in normal rats. *J Ethnopharmacol.*, 110, 458-463.

Lawless J. (1992) *The Encyclopaedia of Essential Oils*, Longmead Element Books Ltd, 59-60.

Le Van T. (1984) Emodin a fungal metabolite and the effects of emodin on the growth of some soil microorganisms. *Acta Agraria et Silvestria Seriea Agraria*, 23, 235–242.

Lea P.J., Leegood R.C. (1999) *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Chichester.

Leach H.M. (1989) Popular diets and anthropological myths. *N Z Med J*, 102, 474–477.

Lean L.P., Mohamed S. (1999) Antioxidative and antimycotic effects of turmeric, lemon-grass, betel leaves, clove, black pepper leaves and *Garcinia atriviridis* on butter cakes. *J Sci Food Agric*, (79), 1817-1822.

Lee S.J., Son K.H., Chang H.W., Do J.C., Jung K.Y., Kang S.S., Kim H.P. (1993) Antiinflammatory activity of naturally occurring flavone and flavonol glycosides. *Archives of Pharmacology Research*, 16, 25–28.

Levin P. P., Kuzmin V. A. (1987) Triplet exciplexes in the photochemistry of quinones. *Russ.Chem.Rev.*, 56, 527-557.

Li Y., Elie M., Blaner W.S., Brandt-Rauf P., Ford J. (1997) Lycopene, smoking and lung cancer. *Proc. Am. Assoc.. Cancer Res.* 38, 113 (abstract #758).

Lin X.Z., Jin Z.H. (1995). Effects of sennosides, rhubarb polysaccharides and emodin on the cytoplasmic free calcium in isolated rat brain cells. *Yaoxue Xuebao*, 30, 307–310.

Liu H., Qiu N., Ding H., Yao R. (2008) Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses. *Food Research International*, 41, 363–370.

Liu J.K., Hu L., Dong Z.J., Hu Q (2004) DPPH radical scavenging activity of ten natural p-terphenyl derivatives obtained from three edible mushrooms indigenous to China. *Chemistry & Biodiversity*, 1, 601-605.

Madaus G. (1988) *Lehrbuch der Biologischen Heilmittel, Vol 4*, Ravensburg Mediamed Verlag .

Madisch A., Holtmann G., Mayr G., Vinson B., Hotz J. (2004) Treatment of functional dyspepsia with a herbal preparation: a double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter trial. *Digestion*, 69, 45–52.

Madsen H. L., Nielsen B. R., Bertelsen G., Skibsted L. H. (1996) Screening of antioxidative activity of spices. A comparison between assays based on ESR spin trapping and electrochemical measurement of oxygen consumption. *Food Chem.*, 57, 331–337.

Madsen H.L., Bertelsen G., (1995) Spices as antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 271–277.

Manderfield M.M., Schafer H.W., Davidson P.M., Zottola E.A. (1997) Isolation and identification of antimicrobial furocoumarins from parsley. *Journal of Food Protection*, 60, 72–77.

Mandić A., Đilas S., Četković G., Čanadanović-Brunet J., Tumbas V. (2008) Polyphenolic composition and antioxidant activities of grape seed extract. *International Journal of Food Properties*, 11(4), 713-726.

Manzocco L., Calligaris S., Mastrocola D., Nicoli M.C., Lericci C.R. (2001) Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends Food Sci. Technol*, 11, 340–346.

Markham, K.R. (1989) Flavones, flavonols and their glycosides, In: J.B. Harborne and P.M. Dey (Eds.), *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, London, pp. 193–237.

Marotti M., Dellacecca V., Piccaglia R., Giovanelli E. (1993) Effect of harvesting stage on the yield and essential oil composition of peppermint (*Mentha x piperita* L.). *Acta Hortic.*, 344, 370-379.

Meir S., Kanner J., Akiri B., Hadas S. P. (1995) Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1813–181.

Melzer J., Rosch W., Reichling J., Brignoli R., Saller R. (2004) Metaanalysis: phytotherapy of functional dyspepsia with the herbal drug preparation STW 5 (Iberogast). *Aliment Pharmacol Ther*, 20, 1270-87.

Mensik R.P., Zock P.L., Kester A.D.M., Katan M.B. (2003) Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr* May, 77 (5), 1146-115.

Merken H. M., Beecher G. R. (2000) Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent aglycones. *J. Chromatogr. A*, 897, 177–184.

Merken H. M., Merken C. D., Beecher G. R. (2001) Kinetics method for the quantitation of anthocyanidins, flavonols, and flavones in foods. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2727–2732.

Miliauskas G., Venskutonis P. R., Van Beek T. A. (2004) Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.*, 85, 231-237.

Milner J.A. (2000) Functional foods: the US perspective. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6), 1654S-1659S.

Mimica-Dukić N. (1992) Ispitivanje sekundarnih biomolekula u nekim vrstama roda *Mentha*, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.

Mimica-Dukić N. (2003) Aromatic plants as dietary supplements in human health. *La Phytotherapie Europeenne*, 14, 13-18.

Mimica-Dukić N., Božin B. (2007) Essential oils from Lamiaceae species as promising antioxidant and antimicrobial agents. *Natural Product Communications*, 2(4), 445-452.

Mimica-Dukić N., Božin B. (2008) *Mentha* L. species (Lamiaceae) as promising sources of bioactive secondary metabolites. *Current Pharmaceutical Design*, 14, 3141-3150.

Mimica-Dukić N., Božin B., Samojlik I., Mihalović B., Matavulj M. (2003) Antimicrobial and antioxidant properties of three *Mentha* species essential oils. *Planta Med.*, 69, 413–419.

Mimica-Dukić N., Božin B., Soković M., Simin N. (2004) Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 2485-2489.

Mimica-Dukic N., Budimcevic M., Mihajlovic B., Gasic O. (1994) Antioxidant activity of plant phenolics. Flavonoids and phenolic acids. *J Serb Chem Soc*, 59, 823-828.

Mišan, A., Šimurina, O., Psodorov, Đ., Sakač, M., Sedej, I., Mandić, A., Kevrešan, Ž. (2009) Evaluation of antioxidant activity of medical plant extracts and their application in biscuits, In: D. Mihailović, M. Vojinović-Miloradov (Eds.) *Environmental, Health and Humanity Issues in the Down Danubian Region, Multidisciplinary Approaches*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, pp. 165-171.

Mizuno S., Kato K., Ono Y., Yano K., Kurosaka H., Takahashi A., Abeta H., Kushiro T., Miyamoto S., Kurihara R., Hiki N., Kaminishi M. (2006) Oral peppermint oil is a useful antispasmodic for doublecontrast barium meal examination. *Gastroenterol Hepatol*, 21, 1297-301.

Moller, J.K.S., Madsen, H.L., Aaltonen, T., Skibsted, L.H. (1999) Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. *Food Chemistry*, 64, 215-219.

Monti S.M., Ritieni A., Graziani G., Randazzo G., Mannina L., Segre A.L., Fogliano V. (1999) LC-MS analysis and antioxidative efficiency of Maillard reaction products from a lactose-lysine model system. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1506-1513.

Morel I., Lescoat G., Cillard P., Cillard J. (1994) Role of flavonoids and iron chelation in antioxidant action. *Methods Enzymol.*, 234, 437-443.

Moure A., Cruz J.M., Franco D., Domínguez J.M., Sineiro J., Domínguez H., Núñez M. J., Parajó J.C. (2001) Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* 72, 145-171.

Muchuweti M., Kativu E., Mupure C.H., Chidewe C., Ndhala A.R., Benhura M.A.N (2007) Phenolic composition and antioxidant properties of some spices. *Am. J. Food Technol.*, 2(5), 414-420.

Mueller S.O., Stopper H. (1999) Characterization of the genotoxicity of anthraquinones in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1428, 406-414.

Murcia M.A., Egea I., Romojaro F., Parras P., Jiménez A.M., Martínez-Tomé M. (2004) Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives. Influence of irradiation procedure. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (7), 1872-1881.

Murray M.J. (1972) Genetic observations on Mentha oil biogenesis. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, 44, 24-31.

Nagourney R.A. (1998) Garlic: Medicinal food or nutritious medicine? *J. Medicinal Food*, 1, 13-28.

Nakano Y., Matsunaga H., Saita T., Mori M., Katano M., Okabe H. (1998) Antiproliferative constituents in Umbelliferae plants II. Screening for polyacetylenes in some Umbelliferae plants, and isolation of panaxynol and falcarindiol from the root of *Heracleum moellendorffii*. *Biol. Pharm. Bull.*, 21, 257–261.

Nestle P.J., Yamashita T., Sasahara T., Pomeroy S., Dart A., Komesaroff P., Owen A., Abbey M. (1997) Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17, 3392-3398.

Neto C.C. (2007) Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Mol Nutr Food Res*, 51 (6), 652–664.

Newall, C.A., Anderson, L.A., Phillipson, J.D. (1996) *Herbal Medicines: A Guide for Health-Care Professionals*. London: The Pharmaceutical Press.

Ng T.B., Liu F., Lu Y., Cheng C.H.K., Wang Z. (2003) Antioxidant activity of compounds from medical herb *Aster tataricus*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 136, 109-115.

Nicoli M. C., Anese M., Parpinel, M. (1999) Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 10 (3),94-100.

Nielsen S.E., Young J.F., Daneshvar B., Lauridsen S.T., Knuthsen P., Sandström B., Dragsted L.O. (1999). Effect of Parsley (*Petroselinum crispum*) intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects. *British Journal of Nutrition* 81, 447-455.

Oberreuther-Moschner D.L., Jahreis G., Rechkemmer G., Pool-Zobel B.L. (2004) Dietary intervention with the probiotics *Lactobacillus acidophilus* 145 and *Bifidobacterium longum* 913 modulates the potential of human faecal water to induce damage in HT29clone19A cells. *Br J Nutr*, 91, 925–932.

Ochi T., Otsuka Y., Aoyama M., Maruyama T., Niiya I. (1994) Studies on the improvement of antioxidant effect of tocopherols. XXV. Synergistic effects of several components of coffee beans in cookies. *J Jpn Oil Chem Soc* (43),719-723.

Okada K., Kasahara H., Yamaguchi S., Kawaide H., Kamiya Y., Nojiri H., Yamane H. (2008) Genetic evidence for the role of isopentenyl diphosphate isomerases in the mevalonate pathway and plant development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 49(4), 604-616.

Ollanketo M., Peltoketo A., Hartonen K., Hiltunen R., Riekkola, M.-L. (2002) Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by pressurized hot water and conventional methods: antioxidant activity of the extracts. *European Food Research and Technology*, 215, 158-163.

OSSIPOV V., NURMI K., LOPONEN J., HUKKIOJA E., PIHLAJA K. (1996) HPLC separation and identification of phenolic compounds from leaves of *Betula pubescens* and *Betula pendula*. *J. Chromatogr.*, 721, 59–68.

Oyaizu, M. (1986) Studies on products of browning reaction – Antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucoamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.

Özçelik F., Yarat A., Yanardag R., Tunali T., Özsoy Ö., Emekli N., Üstüner A. (2001) Limited effects of parsley (*Petroselinum crispum*) on protein glycation and glutathione in lenses of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmaceutical Biology*, 39(3), 230-233.

Padmini E., Prema K., Geetha B. V., Rani M. U. (2008) Comparative study on composition and antioxidant properties of mint and black tea extract. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(10), 1887-1895.

Paneitz A., Westendorf J. (1999) Anthranoid contents of rhubarb (*Rheum undulatum* L.) and other *Rheum* species and their toxicological relevance. *European Food Research and Technology*, 210, 97–101.

Parnham M.J., Kesselring K. (1985). Rosmarinic acid. *Drugs of the Future*, 10, 756-757.

Parojčić D., Stupar D. (2003) Istorijski osvrt na lekovito bilje i njegovu upotrebu u farmakologiji. *Timočki medicinski glasnik*, 28(3-4), 101-109.

Parr A.J., Bolwell, G.P. (2000) Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J Sci. Food Agric.* 80, 985-1012.

Pawlowska L. (1980) Flavonoids in the leaves of Polish species of the genua *Betula* L. I. The flavonoids of *B. pendula* Roth. *B. obscura* Kot. leaves. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 49, 281-296.

Peter K.V. (2009) *Handbook of herbs and spices: Volume 2*, Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington, Cambridge, UK.

Petersen M., Simmonds M.S.J. (2003) Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62, 121-125.

Pokhilo N.D., Uvarova N.I. (1988) Isoprenoids of *Betula* species. *Chem Nat Comp*, 3, 273-285.

Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. *Antioxidants in Food*. Woodhead Publishing Ltd., England and CRC Press LLC, USA, 2001.

Polidoros A.N., Scandalios J.G. (1999) Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiol. Plant.*, 106, 112-120.

Potter S.M. (1998) Soy protein and cardiovascular disease. The impact of bioactive components in soy. *Nutr. Rev.*, 56(8), 231-235.

Prokof'eva N. G., Anisimov M. M., Kiseleva M. I, Rebachuk N. M., Pokhilo N. D. (2002) Cytotoxic activity of dammarane triterpenoids from birch leaves. *Biology Bulletin*, 29(6), 525–529.

Quílez J., Ruiz J. A., Brufau G., Rafecas M. (2006) Bakery products enriched with phytosterols, α -tocopherol and β -carotene. Sensory evaluation and chemical comparison with market products. *Food Chem.*, 94(3), 399-405.

Ram S.N., Pandey V.B., Dwivedi S.P.D., Goel R.K. (1994) Further constituents of *Rhamnus triquetra* and CNS activity of emodin. *Fitoterapia*, LXV, 275–278.

Rauwald H.W. (1998) Herbal laxatives: influence of anthrones-anthraquinones on energy metabolism and ion transport in a model system. In: Lawson LD, Bauer R. (Eds.) *Phytomedicines of Europe, chemistry and biological activity*. Washington, DC, USA: American Chemical Society, pp. 97–116.

Razzaghi-Abyaneh M., Shams-Ghahfarokhi M., Rezaee M.-B., Jaimand K., Alinezhad S., Saberi R., Yoshinari T. Chemical composition and antiaflatoxic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. *Food Control*, In press.

Reddy V., Urooj A., Kumar A. (2005) Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application in biscuits. *Food Chem.*, 90, 317-321.

Reszka. K., Kolodziejczyk. P., Tsoungas. P. G. and Lown. J. W. (1988) Photosensitization by antitumor agents-6. Production of superoxide radical and hydrogen

peroxide during illumination of diaminoanthracenediones in the presence of NADH in aqueous solutions. An EPR study. *Photochem. Photobiol.*, 47, 625-633.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.*, 20(7), 933-956.

Rickling B., Glombitza K.-W. (1993) Saponins in the leaves of birch? Hemolytic dammarane triterpenoid esters of *Betula pendula*. *Planta medica*, 59(1), 76-79.

Robards K., Prenzler P., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.*, 66, 401-436.

Robbers J.E., Tyler V.E. (1999). *Tylers' Herbs of Choice. The Therapeutic Use of Phytochemicals*. Haworth Herbal Press, New York.

Rodis P.S., Karathanos V.T., Mantzavinou A. (2002) Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 596-601.

Rohdich F., Wungsintaweekul J., Lüttgen H., Fischer M., Eisenreich W., Schuhr C. A., Fellermeier M., Schramek N., Zenk M.H, Bacher A. (2000) Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase from tomato. *PNAS*, 97(15), 8251-8256.

Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H., Kanazawa K. (2003) Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 571-581.

Samarasekera R., Weerasinghe I.S., Hemalal K.D.P. (2008) Insecticidal activity of menthol derivatives against mosquitoes. *Pest Manag Sci*, 64, 290-295.

Scarpati M., Oriente G. (1958) Isolation and constitution of rosmarinic acid from *Rosmarinus officinalis*. *Ric. Sci.*, 28, 2329-2333.

Scavroni J., Fernandes Boaro C.S., Mayo Marques M.O., Ferreira L.C. (2005) Yield and composition of the essential oil of *Mentha piperita* L. (*Lamiaceae*) grown with biosolid. *Braz. J. Plant Physiol.*, 17(4), 345-352.

Schmidt M.L., Kuzmanoff K.L., Ling-Indeck L., Pezzuto J.M. (1997) Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines. *European Journal of Cancer*, 33 (12), 2007-2010.

Schuhmacher A., Reichling J., Schnitzler P. (2003) Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped herpes simplex virus type 1 and type 2 *in vitro*. *Phytomedicine*, 10, 504-10.

Schwarz K., Bertelsen G., Nissen L.R., Gardener P.T., Heinonen M.I., Hopia A., Huynh-Ba T., Lambelet P., McPhail D., Skibsted L.H., Tijburg L. (2001) Investigation of

plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research and Technology*, 212, 319–328.

Scora R.W., Chang A.C. (1997) Essential oil quality and heavy metal concentrations of peppermint grown on a municipal sludge-amended soil. *J. Environ. Qual.* 26, 975-979.

Sedlakova J., Kocourkova B., Kuban V. (2001) Determination of essential oils content and composition in caraway (*Carum Carvi* L.). *Czech J. Food Sci.*, 19(1), 31-36.

Setchell K.D.R., Lawson A.M., Borriello S.P., Harkness R., Gordon H., Morgan D.M.L, Kirk D.N., Adlercreutz H., Anderson L.C., Axelson M. (1981) Lignan formation in man -microbial involvement and possible roles in relation to cancer. *Lancet*, 2, 4-7.

Severino J.F., Goodman B.A., Kay C.W.M., Stolze K., Tunega D., Reichenauer T.G., Pirker K.F. (2009). Free radicals generated during oxidation of green tea polyphenols: Electron paramagnetic resonance spectroscopy combined with density functional theory calculations. *Free Radical Biology and Medicine* 46(8), 1076-1088.

Shahidi F., Pegg R.B., Salemi Z.O.(1995) Stabilization of meat lipids with ground spices. *Journal of Food Lipids*, 2(3), 145-153.

Shan B., Cai Y.Z., Sun M., Corke H. (2005) Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J Agric Food Chem.*, 53(20), 7749-7759.

Shen B. (2003) Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(2), 285-295.

Shi W., Gould M. N. (1997) The anticancer monoterpene perillyl alcohol causes a decrease in cellular cyclin D1 levels contributing to an early G1 arrest in mammary cells. *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.*, 38, 263.

Simin J.E., Quinin J. (1988) Characterization of essential oil of parsley. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 467-472.

Simon J.E., Chadwick A.F., Cracker L.E. (1984) Herbs: An Indexed Bibliography, 1971-1980. : *The Scientific Literature on Select Herbs, and Aromatic and Medicinal Plants of the Temperate Zone.*: Elsevier, Hamden, CT, Shoestring Press, Amsterdam, New York.

Singh U.P., Singh K.P., Singh S.P., Ram V.B. (1992) Effect of emodin isolated from *Rhamnus triquetra* on spore germination of some fungi. *Fitopatologia Brasileira*, 17, 420–422.

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's reagent. *Methods Enzymology*, 299, 152-178.

Srivastava K.C., Bordia A., Verma, S.K. (1995) Garlic (*Allium sativum*) for disease prevention. *S. Afr. J. Sci.*, 91, 68-77.

Štajner D., Igić R., Popović B.M., Malenčić Đ. (2008) Comparative study of antioxidant properties of wild growing and cultivated *Allium* species. *Phytother Res*, 22(1), 113 -117.

Štajner D., Popović B. (2009) Comparative study of antioxidant capacity in organs of different *Allium* species. *Cent Eur J Biol*, 4(2), 224-228.

Su H.Y., Cheng S.H., Chen C.C., Lee H. (1995) Emodin inhibits the mutagenicity and DNA adducts induced by 1-nitropyrene. *Mutation Research*, 329, 205–212.

Suhaj M. (2006) Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 531-537.

Sun M., Sakakibara H., Ashida H., Danno G., Kanazawa K. (2000) Cytochrom P4501A1-inhibitory action of antimutagenic anthraquinones in medical plants and the structure-activity relationship. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 64, 1373–1378.

Takada H., Kokubo K., Matsubayashi K., Oshima T. (2006) Antioxidant activity of supramolecular water-soluble fullerenes evaluated by β -carotene bleaching assay. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 70, 3088-3093.

Thompson Coon J., Ernst E. (2002) Systematic review: herbal medicinal products for non-ulcer dyspepsia. *Alimen. Pharmacol. Therap.*, 16, 1689–1699.

Thompson L.U. (1995) Flaxseed, lignans, and cancer. In: *Flaxseed in Human Nutrition*, (S. Cunnane and L.U. Thompson eds.) AOCS Press, Champaign, IL, pp. 219-236.

Thompson L.U., Robb P., Serraino M., and Cheung F. (1991) Mammalian lignan production from various foods. *Nutr. Cancer*, 16, 43-52.

Thomson R.H. (1997). *Naturally occurring quinines. IV. Recent advances*. London, UK: Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall.

Tilford, G.L. (1997) *Edible and Medicinal Plants of the West*, Missoula, Mont, Mountain Press Pub.

Trial H.T., Dimond J.B. (1979). Emodin in buckthorn: a feeding deterrent to phytophagous insects. *Canadian Journal of Entomology*, 111, 207–212.

Triantaphyllou K., Blekas G., Boskou D. (2001) Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species Lamiaceae. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 52, 313–317.

Triantaphyllou K., Blekas G., Boskou D. (2001) Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species Lamiaceae. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 52, 313-317.

Trouillas P., Calliste C.A., Allais D.P., Simon A., Marfak A., Delage C., Duroux J.L. (2003) Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chem*, 80(3), 399-407.

Tsimidou M., Papavergou E., Boskou D. (1995) Evaluation of oregano antioxidant activity in mackerel oil. *Food Research International*, 28(4), 431-433.

Tsuchihashi H., Kigoshi M., Iwatsuki M., Niki E. (1995) Action of β -carotene as an antioxidant against lipid peroxidation *Arch. Biochem. Biophys.* 323, 137-147.

Van den Gorkom B.A.P., de Vries E.G.E., Karrenbeld A., Kleibeuker J.H. (1999) Review article: anthranoid laxatives and their potential carcinogenic effects. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 13, 443–452.

Verhoeven D.T.H., Goldbohm R.A., van Poppel G., Verhagen H., van den Brandt P.A. (1996) Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 5, 733-748.

Vershnyak V.M., Stepen R.A. (1992) Contents and composition of essential oil from different organs of *Betula pendula* Roth. of Central Yakutia. *Rastitel'nye Resursy*, 28, 86-93.

Vinson J.A., Su X., Zubik L., Bose P. (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J Agric Food Chem.*, 49 (11), 5315–5321.

Voirin B., Bayet C. (1992) Developmental variations in leaf flavonoid aglycones of *Mentha x Piperita*, *Phytochemistry*, 31, 2299-2304.

Voirin B., Bayet C. (1992) Developmental variations in leaf flavonoid aglycones of *Mentha x piperita*. *Phytochemistry*, 31, 2299–2304.

Voirin B., Bayet C., Faure O., Jullien F. (1999) Free flavonoid aglycones as markers of parentage in *Mentha aquatica*, *M. citrata*, *M. spicata* and *M. x piperita*. *Phytochemistry*, 50(7), 1189-1193.

Voirin, B.; Saunois, A.; Bayet, C. (1994) Free flavonoid aglycones from *Mentha x piperita*: Developmental, chemotaxonomical and physiological aspects. *Biochem. Syst. Ecol.*, 22, 95–99.

- Wang H.H. (1993) Antitrichomonal action of emodin in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 40, 111–116.
- Wang W.H., Chung J.G. (1997) Emodin-induced inhibition of growth and DNA damage in the *Helicobacter pylori*. *Current Microbiology*, 35, 262–266.
- Wawrzyniak M., Lamparski R. (2006) Effect of *Umbelliferae* (*Apiaceae*) plant water extracts on Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) feeding and development. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 9(4), 23.
- Wei H., Tye L., Bresnick E., Birt D.F. (1989) Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice. *Cancer Research*, 50, 499–502.
- Wells J.M., Cole R.J., Kirksey J.W. (1975) Emodin, a toxic metabolite of *Apergillus wentii* isolated from weevil-damaged chestnuts. *Applied Microbiology*, 30, 26–28.
- Westendorf J., Marquardt H., Poginsky B., Dominiak M., Schmidt J., Marquardt H. (1990) Genotoxicity of naturally occurring hydroxyanthraquinones. *Mutation Research* 240, 1–12.
- Wichtl M. (1994) *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*. Medpharm, GmbH Scientific Publishers, Stuttgart, pp. 369-372.
- Wichtl, M., Bisset, N.G. (eds.). (1994). *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers. 208-211.
- Wick W., Grimm C., Wagenknecht B., Dichgans J., Weller M. (1999). Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289 (3), 1306–1312.
- Wijewickreme A. N., Kitts D.D. (1998) Metal chelating and antioxidant activity of model Maillard reaction products. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 434, 245-254.
- Wojdyło A., Oszmiański J., Czemerys R. (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105, 940-949.
- Wollenweber E., Dietz V. H. (1981) Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. *Phytochemistry*, 20, 869–932.
- Wong P. Y.Y., Kitts D.D. (2006) Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chem.*, 97, 505–515.

Wong P.Y.Y., Kitts D.D. (2006). Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chemistry*, 97, 505-515.

Wrick K.L. (1995) Consumer issues and expectations for functional foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 35, 167–173.

Yanishlieva-Maslarova, N.V. (2001) Inhibiting oxidation. *Antioxidants in food*. Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (eds.), CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, pp.23-70.

Yen G.C., Duh P.D., Chuang D.Y. (2000) Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone. *Food Chem.*, 70(4), 437-441.

Yildirim A., Mavi A., Kara A. (2001) Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. Extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4083-4089.

Yilmaz Y., Toledo R.T. (2005) Antioxidant activity of water soluble Maillard reaction products. *Food Chemistry* 93(2), 273-278.

Yuan Z., Gao R. (1997) Anti-oxidant actions of anthraquinonolines contained in *Rheum*. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, 7, 9–12.

Yun Y. S., Nakajima Y., Iseda E., Kunugi A. (2003) Determination of antioxidant activity of herbs by ESR, *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 44 (1),59-62.

Yutao Z., Dingguo L., Hongshan W., Zhirong W., Xin H., Qinfang X., Hanming L. (2000) Emodin on hepatic fibrosis in rats. *Chinese Medical Journal English Edition*, 113, 599–601.

Zhang H., Chen F., Wang X. (2006) Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum sativum*) oil and identification of its antioxidant constituents. *Food Research International*, 39, 833-839.

Zhang L., Demain A. L. (Eds.) (2005) *Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine*, Humana Press Inc., Totowa, New York, USA.

Zheng G., Kenney P.M., Lam L.K.T. (1992), Anethofuran, carvone, and limonene: potential cancer chemopreventive agents from dill weed oil and caraway oil. *Planta Med.* 58, 338–341.

Zheng G.Q., Kenney P.M., Zhang J., Lam L.K. (1992) Inhibition of benzo[a]pyrene-induced tumorigenesis by myristicin, a volatile aroma constituent of parsley leaf oil. *Carcinogenesis*, 13(10), 1921-1923.

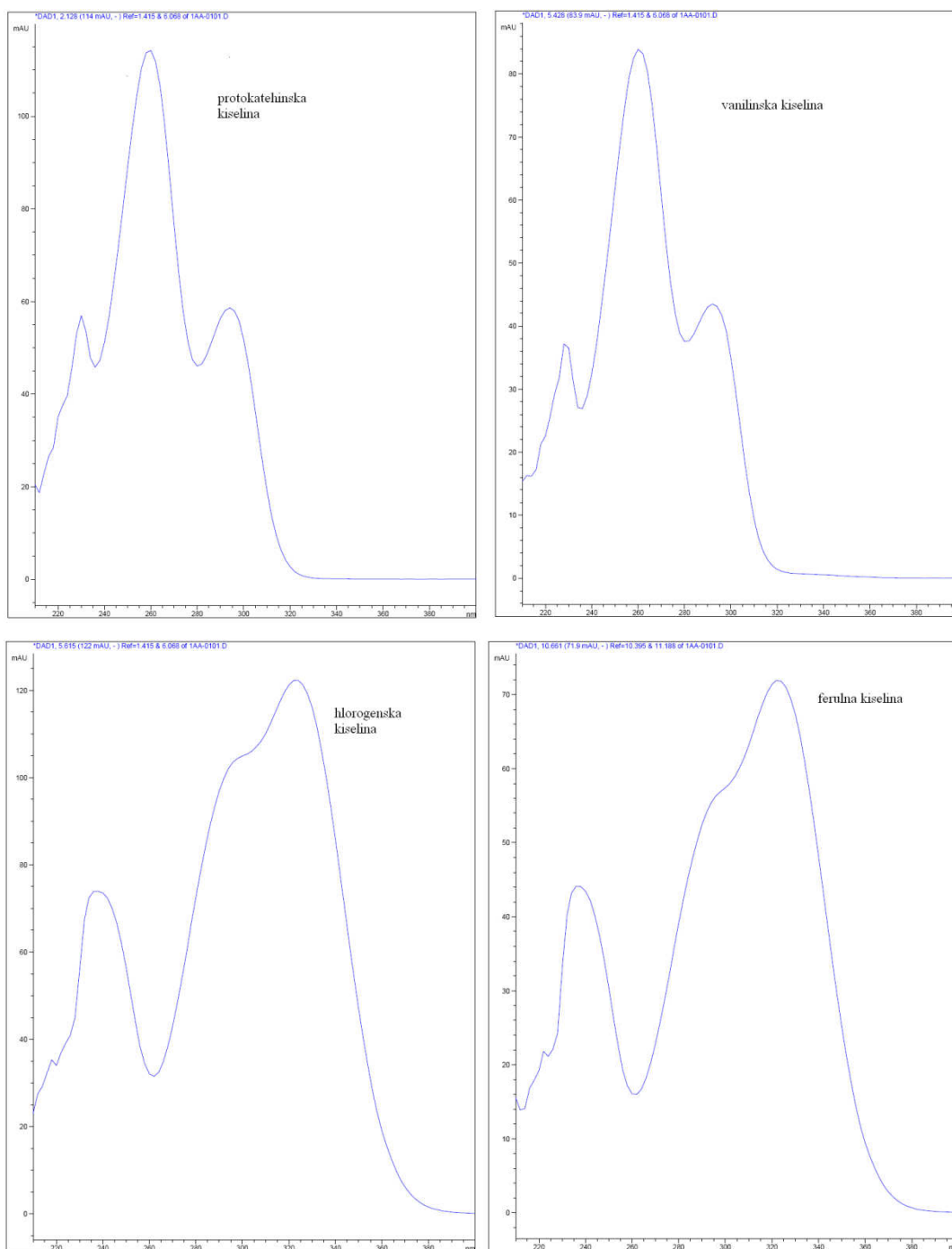
Zheng W., Wang S.Y. (2001) Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.*, 49(11), 5165-5170.

Zhou X.M., Chen Q.H. (1988) Biochemical study of Chinese rhubarb XXII. Inhibitory effect of anthraquinone derivatives on sodium-potassium-ATPase of a rabbit renal medulla and their diuretic action. *Acta Pharmacologica Sinica*, 23, 17–20.

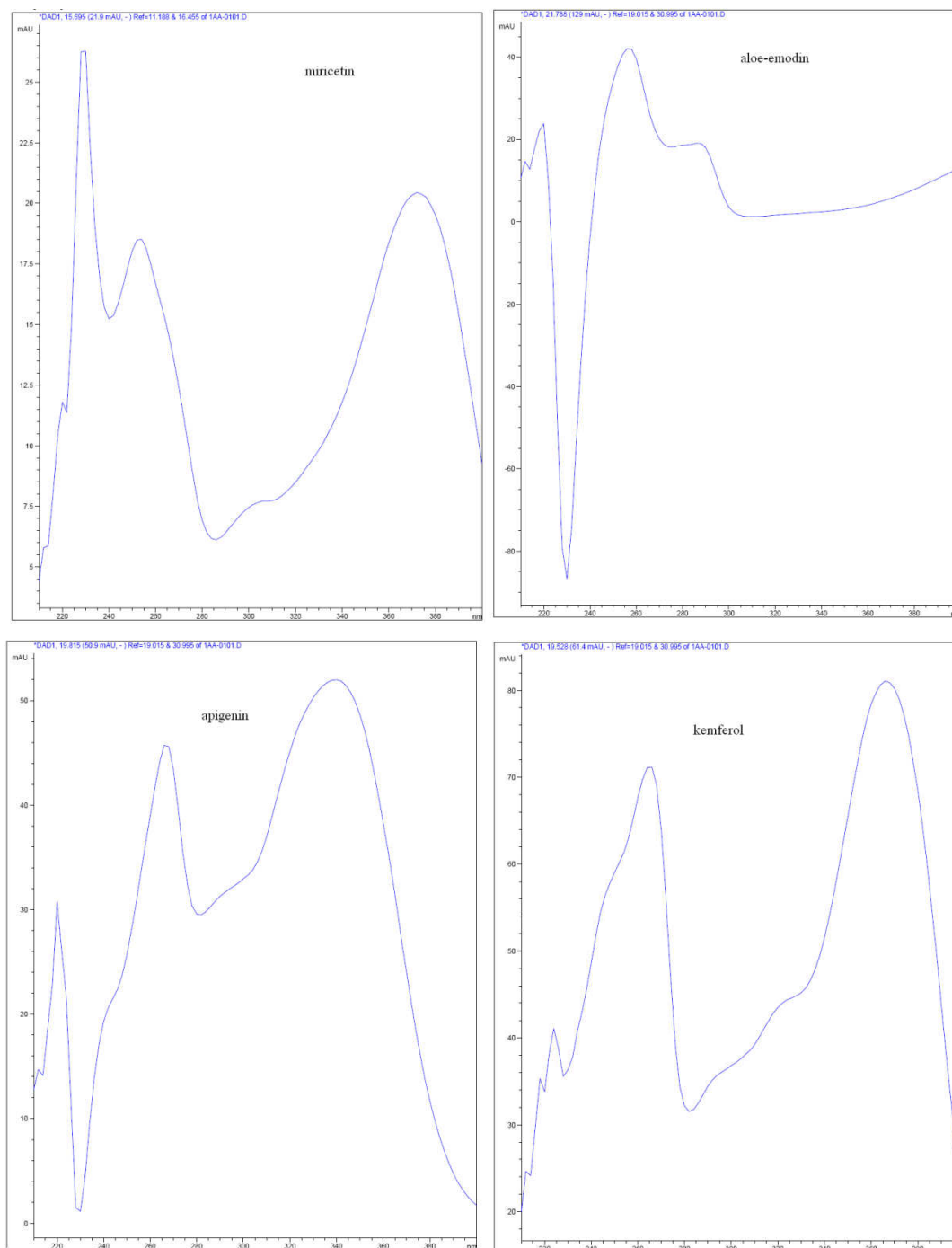
Zuco V., Supino R., Righetti S.C., Cleris L., Marchesi E., Gambacorti-Passerini C., Formelli F (2002). Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Letters* 175 (1), 17–25.

7 Prilog

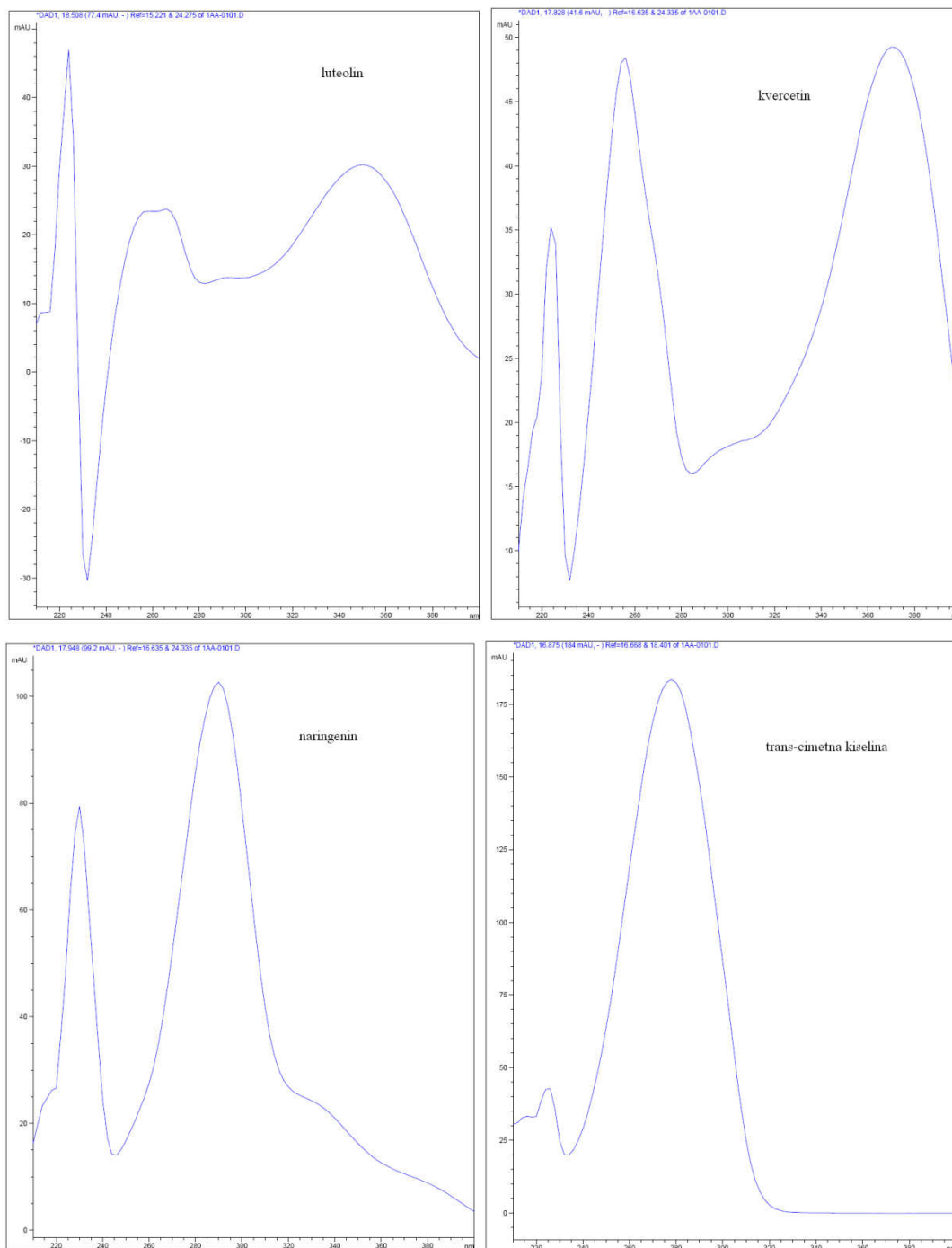
HPLC–DAD analiza



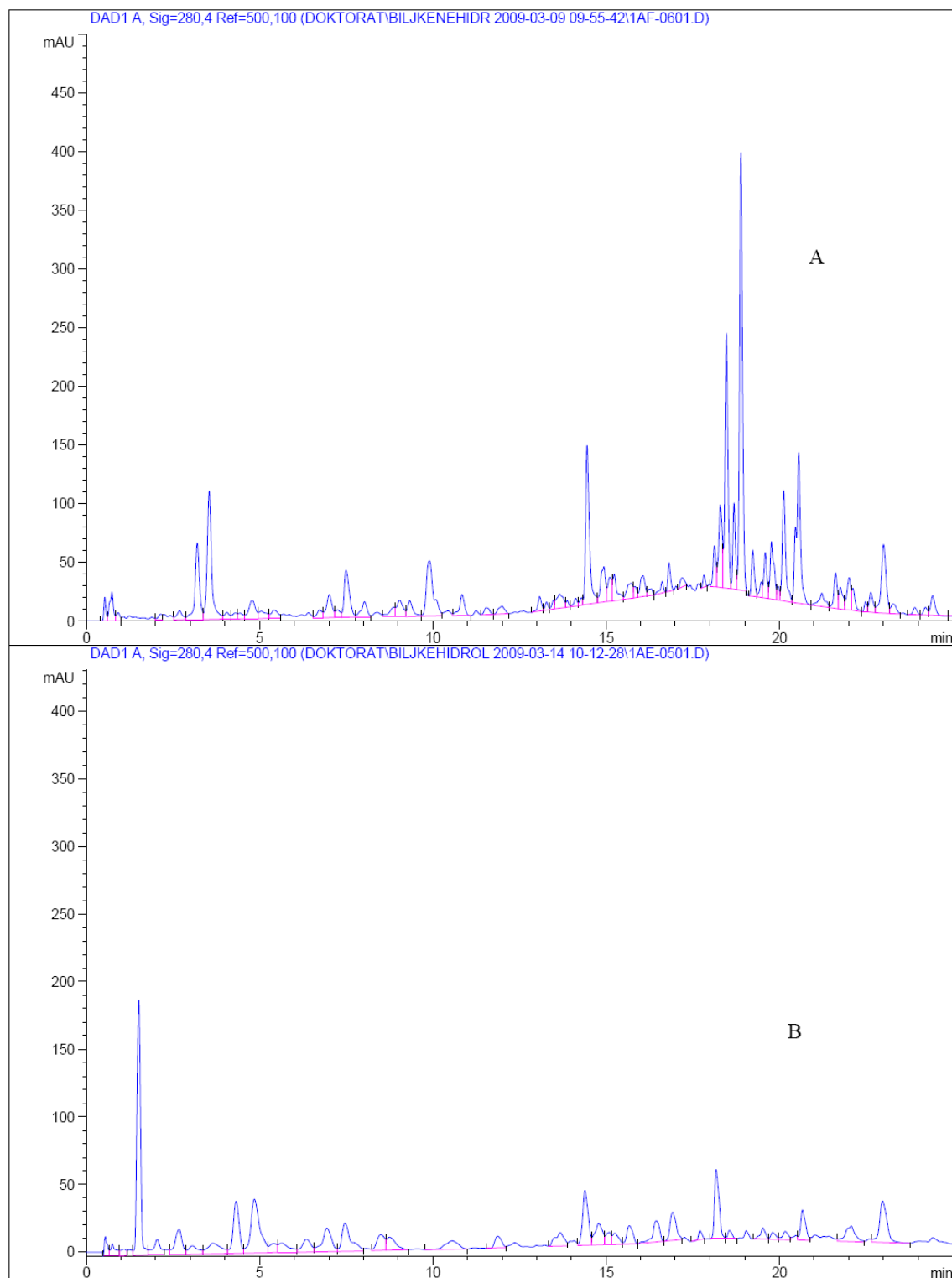
Slika 4.3. Apsorpcioni spektri protokatehinske, vanilinske, hlorogenske i ferulne kiseline.



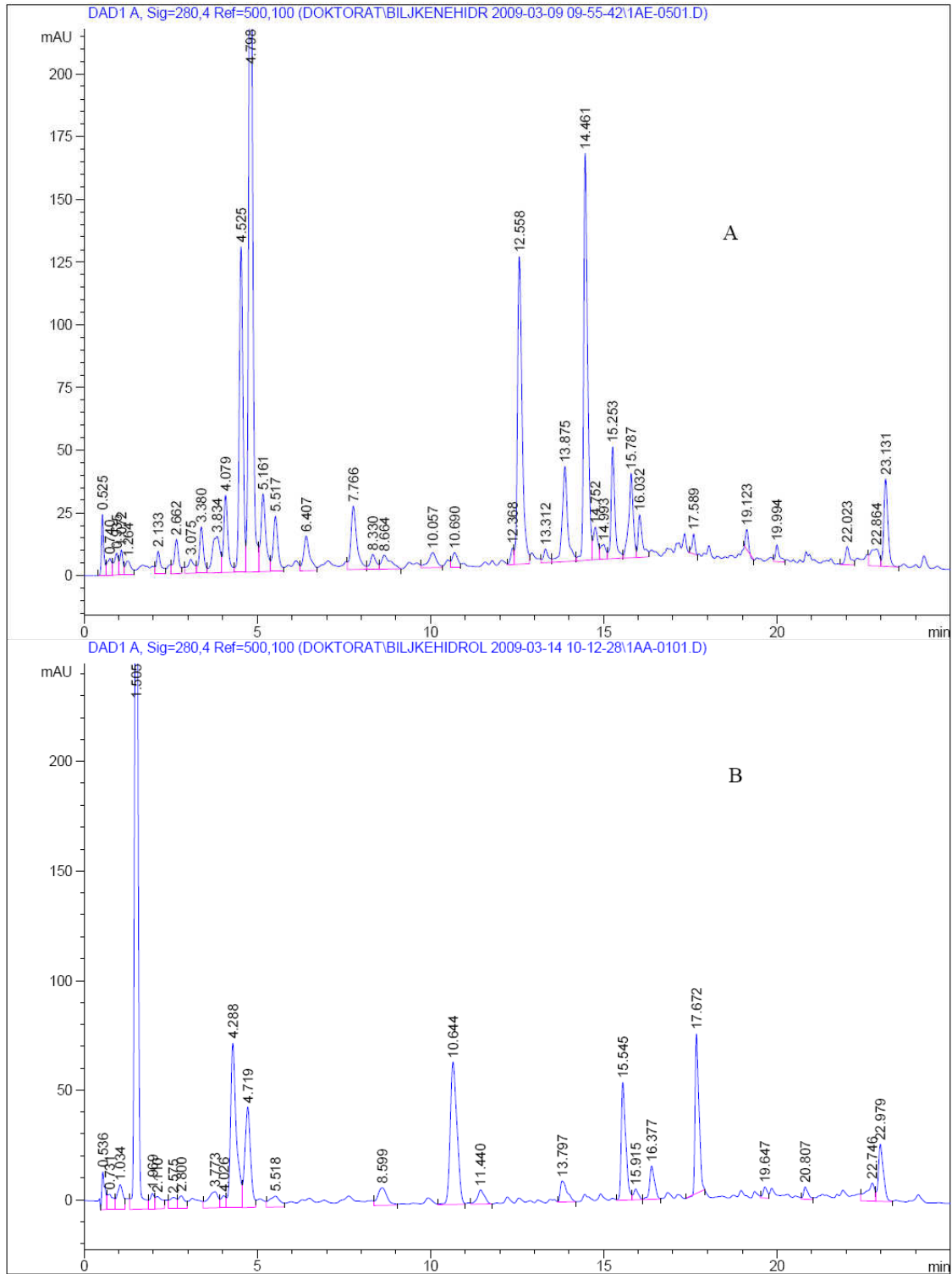
Slika 4.4. Apsorpcioni spektri miricetina, aloe-emodina, apigenina i kemferola.



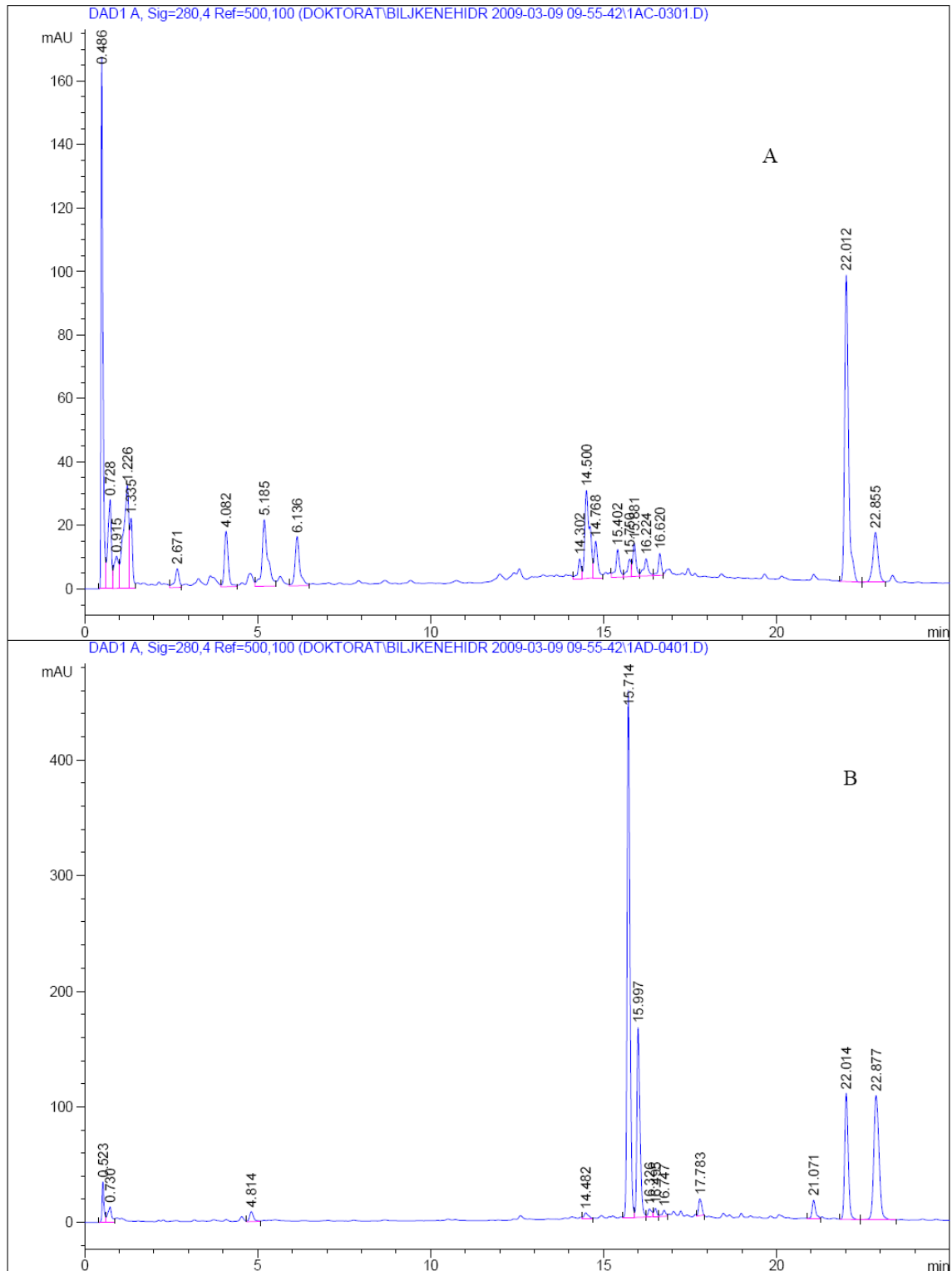
Slika 4.5. Apsorpcioni spektri luteolina, kvercetina, naringenina i trans-cimetne kiseline.



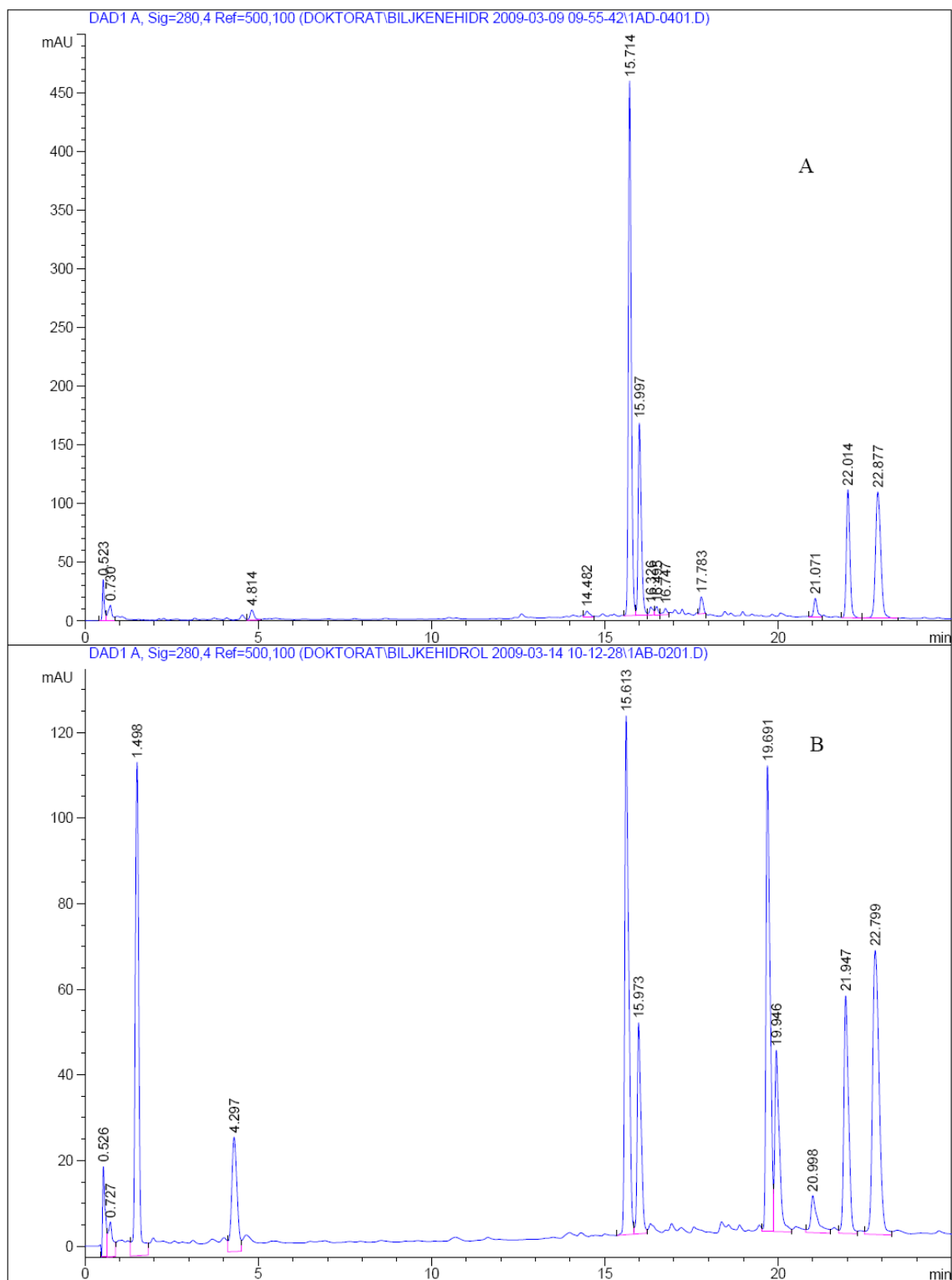
Slika 4.7. Hromatogram ekstrakta krušine na 280 nm: A-pre hidrolize; B-nakon hidrolize.



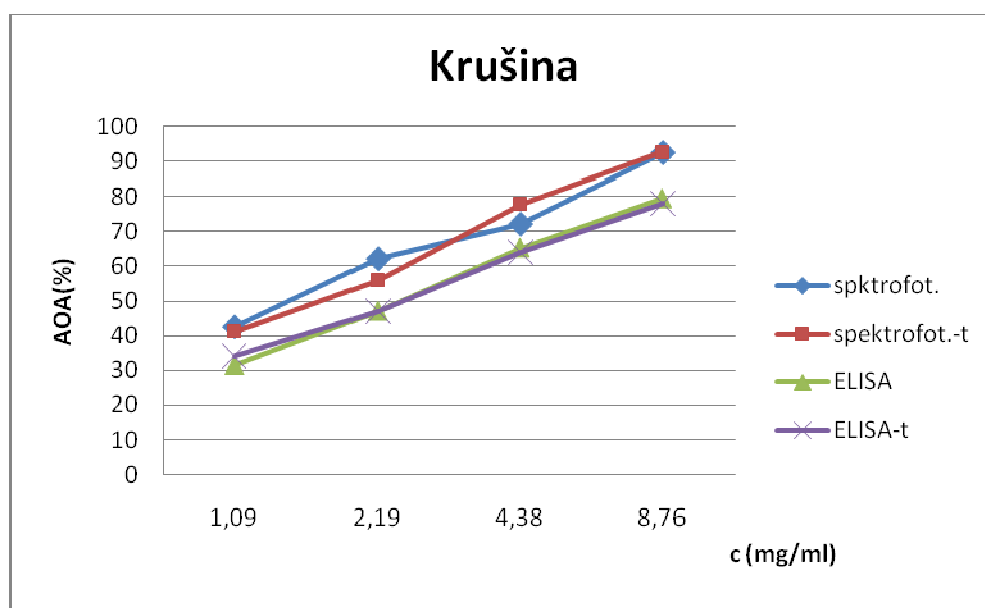
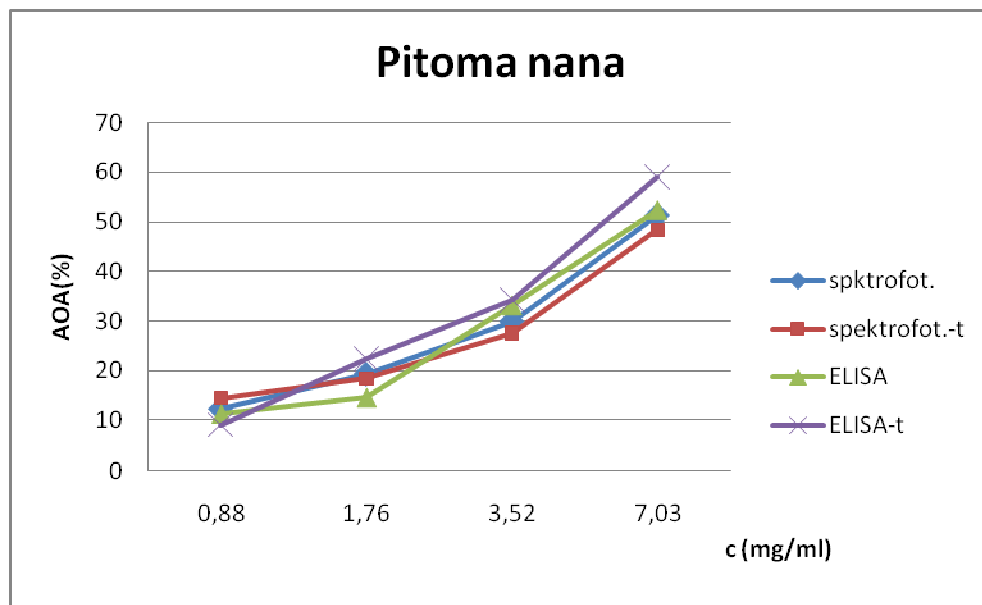
Slika 4.8. Hromatogram ekstrakta breze na 280 nm: A-pre hidrolize; B-nakon hidrolize.



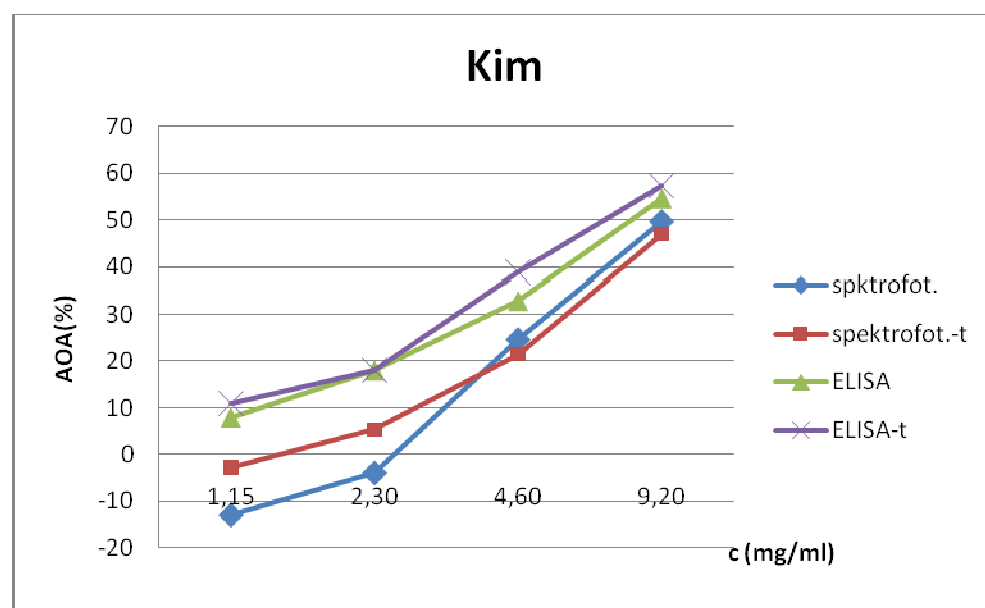
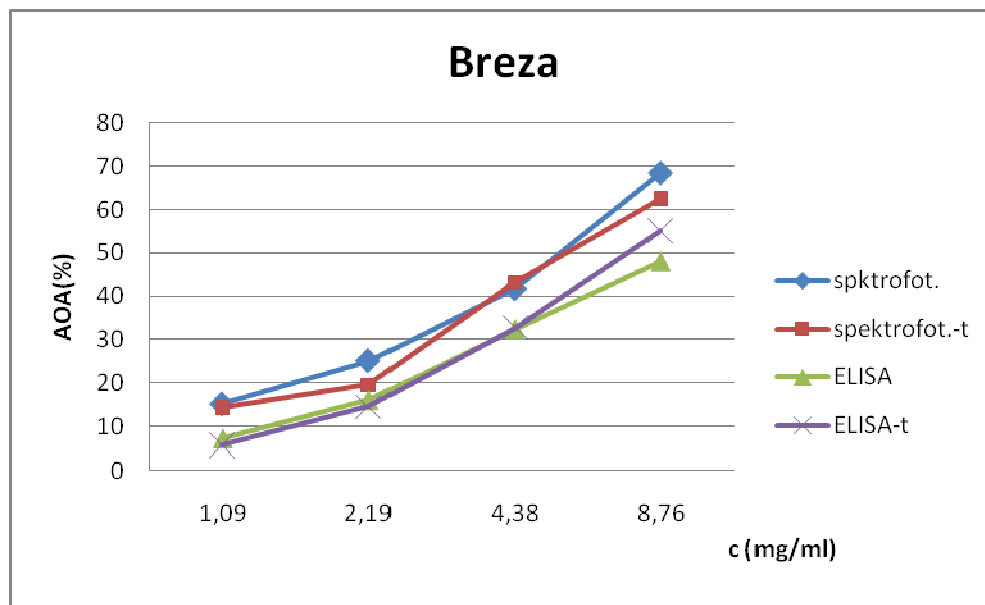
Slika 4.9. Hromatogram ekstrakta kima na 280 nm: A-pre hidrolize; B-nakon hidrolize.



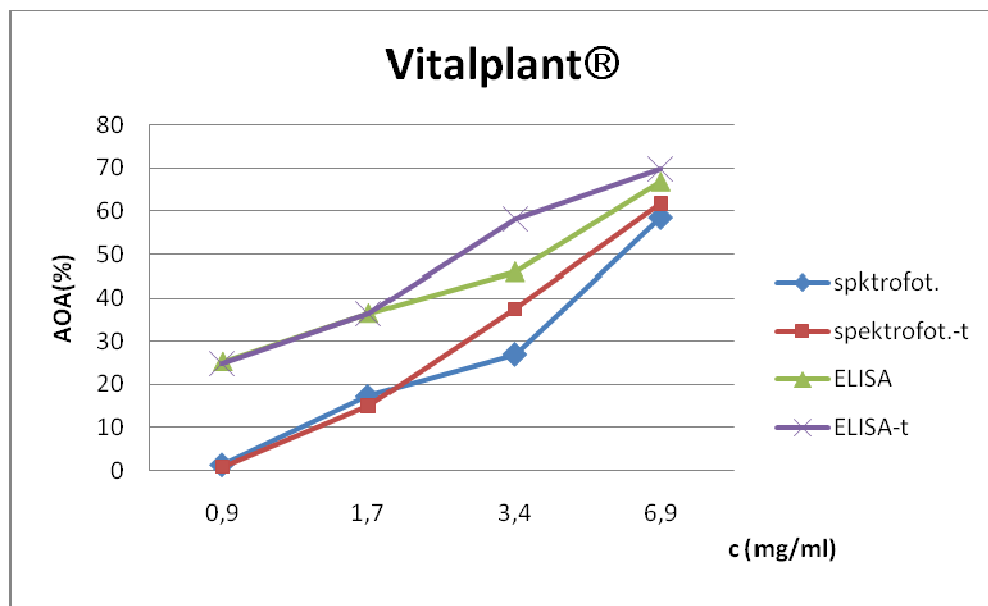
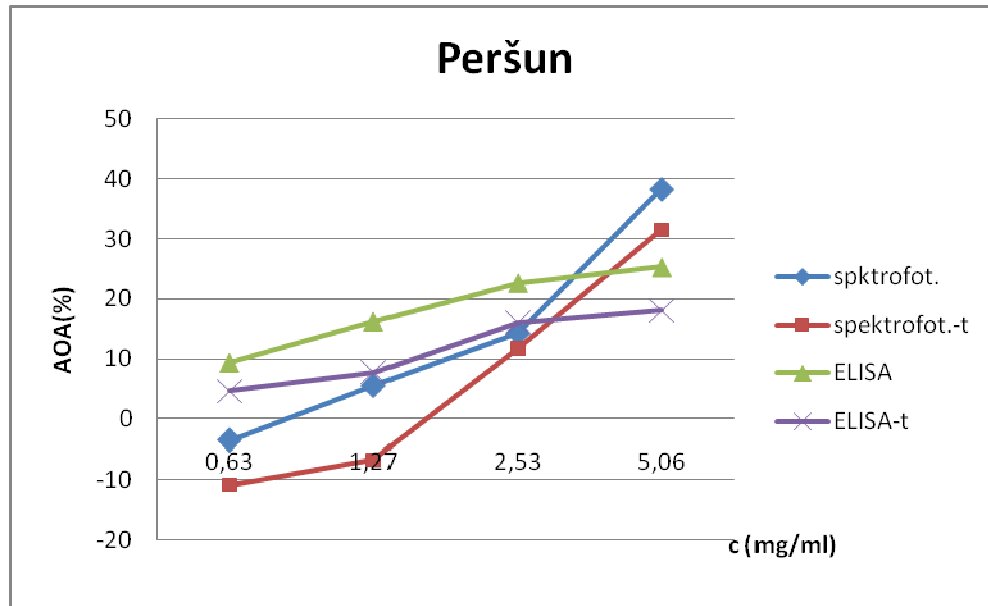
Slika 4.10. Hromatogram ekstrakta peršuna na 280 nm: A-pre hidrolize; B-nakon hidrolize.



Slika 4.17. Antioksidantna aktivnost (AOA) biljnih ekstrakata pitome nane i krušine: termički netretiranih, praćenih spektrofotometrijski (spektrofotom.); termički tretiranih, praćenih spektrofotometrijski (spektrofot.-t); termički netretiranih, praćenih kolorimetrijski (ELISA); termički tretiranih, praćenih kolorimetrijski (ELISA-t).



Slika 4.18. Antioksidantna aktivnost (AOA) biljnih ekstrakata breze i kima: termički netretiranih, praćenih spektrofotometrijski (spektrofotom.); termički tretiranih, praćenih spektrofotometrijski (spektrofotom.-t); termički netretiranih, praćenih kolorimetrijski (ELISA); termički tretiranih, praćenih kolorimetrijski (ELISA-t).



Slika 4.19. Antioksidantna aktivnost (AOA) biljnih ekstrakata peršuna i komercijalnog preparata Vitalplant®: termički netretiranih, praćenih spektrofotometrijski (spektrofotom.); termički tretiranih, praćenih spektrofotometrijski (spektrofotom.-t); termički netretiranih, praćenih kolorimetrijski (ELISA); termički tretiranih, praćenih kolorimetrijski (ELISA-t).

KRATKA BIOGRAFIJA

Aleksandra Mišan rođena je 23.09.1973. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Novom Sadu. 1992. godine upisala se na Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, odsek za hemiju, smer diplomirani hemičar. Diplomski rad pod nazivom „Selektivno 3 α -acetilovanje i esterifikovanje žučnih kiselina“ odbranila je 1996. godine, nakon čega je upisala poslediplomske studije iz Biohemije na istom fakultetu. Magistarski rad pod nazivom „Antioksidantni sistem pšenice“, odbranila je 2001. godine. Od 1997. do 1999. godine bila je angažovana na izvođenju vežbi iz predmeta Hemija i Biohemija na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu, dok je u periodu 1999. do 2000. godine vodila vežbe na predmetu Biohemija na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu. U periodu od 2001. do 2007. godine, bila je zaposlena u Zavodu za tehnologiju mesa na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu, gde je bila angažovana na poslovima kontrole kvaliteta namirnica.



Od 2007. godine Aleksandra Mišan je zaposlena na Institutu za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, u zvanju istraživača-saradnika, gde radi na mestu rukovodioca Naučnog centra za nutritivna svojstva i bezbednost hrane. Tokom svog istraživačkog rada, bila je angažovana na tri istraživačka projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, i na jednom međunarodnom FP7-REGPOT projektu. Član je Srpskog Hemijskog Društva. Koautor je 5 radova u časopisima međunarodnog značaja i oko 40 saopštenja na međunarodnim i domaćim skupovima.

U Novom Sadu, 20.08.2009.

Aleksandra Mišan

UNIVEZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska teza
Ime i prezime autora: AU	Mr Aleksandra Mišan
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Neda Mimica-Dukić, red. prof. PMF-a, Univerzitet u Novom Sadu.
Naslov rada: NR	Antioksidantna svojstva lekovitog bilja u hrani
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski / English
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2009.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3

Fizički opis rada: FO	(Broj poglavlja: 7/ Stranica: 176/ Referenci: 324/ Tabela: 26/ Slika: 46/ Priloga: 1)
Naučna oblast: NO	Hemija
Naučna disciplina: ND	Biohemija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	<i>Menthae piperitae folium</i> , <i>Petroselini fructus</i> , <i>Betulae folium</i> , <i>Carvi fructus</i> , <i>Frangulae cortex</i> , Vitalplant [®] , biljni fenoli, flavonoidi, DPPH [·] , ·OH, O ₂ ⁻ , redoks kapacitet, helataciona aktivnost, antioksidantna aktivnost, keks, lipidna peroksidacija.
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Departmana za hemiju, PMF, Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad
Važna napomena: VN	-
Izvod: IZ	U ovom radu je izvršeno kvantitativno određivanje i identifikacija biljnih fenola i flavonoida etanolih ekstrakata ploda peršuna (<i>Petroselini fructus</i>), kore krušine (<i>Frangulae cortex</i>), lista pitome nane (<i>Mentha piperitae folium</i>), ploda kima (<i>Carvi fructus</i>) i lista breze (<i>Betulae folium</i>), kao i komercijalnog preparata Vitalplant [®] (<i>Frangulae cortex</i> (35 %), <i>Mentha piperitae folium</i> (20%), <i>Carvi fructus</i> (20 %), <i>Petroselini fructus</i> (25 %)). U nastavku istraživanja ispitivana je antioksidantna aktivnosti etanolih ekstrakata primenom direktnih, ESR "spin trap" spektroskopskih metoda određivanja "skevindžer" aktivnosti na superoksid anjon i hidroksil radikale i indirektnih, spektrofotometrijskih testova za određivanje "skevindžer" aktivnosti na DPPH [·] radikale, redoks potencijala i helatacione aktivnosti, kao i antioksidantne aktivnosti u sistemu β-karoten-linolna kiselina. Osim navedenog, deo istraživanja je posvećen ispitivanju termičke stabilnosti ekstrakata navedenih biljaka i komercijalnog preparata Vitalplant [®] radi sticanja uvida u mogućnost njihove primene u pekarskim proizvodima. U poslednjoj fazi rada, izvršeno je određivanje

	<p>sposobnosti pulvisa i etanolnog ekstrakta komercijalnog preparata Vitalplant® da inhibiraju oksidaciju lipida u keksu, primenom spektrofotometrijskih testova "skevindžer" aktivnosti na DPPH' radikale i MDA testa.</p> <p>Ispitane biljne sirovine, kao i komercijalni preparat Vitalplant® su bogat izvor jedinjenja iz klase biljnih fenola. Sve ispitane biljne droge poseduju antioksidantnu aktivnost, koja se značajno ne menja usled termičkog tretmana. Dodatak biljne mešavine Vitalplant®, upravo proporcionalno njenom sadržaju, dovodi do povećanja antioksidantne aktivnosti keksa i smanjenja stepena lipidne peroksidacije.</p>
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	13.07.2005.
Datum odbrane: DO	2009.
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>predsednik: Dr Ksenija Kuhajda, red.prof. PMF-a, Univerzitet u NovomSadu.</p> <p>mantor: Dr Neda Mimica-Dukić, red. prof. PMF-a, Univerzitet u Novom Sadu.</p> <p>član: Dr Dubravka Štajner, red.prof. Poljoprivrednog fakulteta, Univerzitet u Novom Sadu.</p> <p>član: Dr Jasna Čanadanović-Brunet, red.prof. Tehnološkog fakulteta, Univerzitet u Novom Sadu.</p> <p>član: Dr Đorđe Psodorov, naučni saradnik, Institut za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, Univerzitet u Novom Sadu.</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Aleksandra Mišan, MSc
Mentor: MN	Dr Neda Mimica-Dukić, Full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad.
Title: TI	Antioxidant Properties of Medicinal Plants in Food
Language of text: LT	Serbian (Latin)
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Serbija
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2009.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3

Physical description: PD	(Chapters: 7/Pages176/ References: 324/ Tables: 26/ Figures: 46/ Additional lists: 1)
Scientific field SF	Chemistry
Scientific discipline SD	Biochemistry
Subject, Key words SKW	<i>Menthae piperitae folium</i> , <i>Petroselini fructus</i> <i>Betulae folium</i> , <i>Carvi fructus</i> , <i>Frangulae cortex</i> , Vitalplant [®] , plant phenolics, flavonoids, DPPH [·] , [·] OH, O ₂ ⁻ , reducing power, helating activity, antioxidant activity, cookies, lipid peroxidation.
UC	
Holding data: HD	Department of Chemistry (Library), Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad
Note: N	-
Abstract: AB	In this paper, quantitative determination and identification of plant phenolics and flavonoids of ethanolic extracts obtained from parsley fruit (<i>Petroselini fructus</i>), buckthorn bark (<i>Frangulae cortex</i>), mint leaves (<i>Mentha piperitae folium</i>), caraway fruit (<i>Carvi fructus</i>), birch leaves (<i>Betulae folium</i>), as well as from commercial preparation Vitalplant [®] (<i>Frangulae cortex</i> (35 %), <i>Mentha piperitae folium</i> (20%), <i>Carvi fructus</i> (20 %), <i>Petroselini fructus</i> (25 %)) was performed. In addition, antioxidant activity of ethanolic extracts was tested, by applying direct, ESR “spin trap“ spectroscopic methods for the determination of scavenging activity on superoxide anion and hydroxyl radicals, and indirect, spectrophotometric methods for the determination of DPPH [·] radical scavenging activity, reducing power, chelating activity and antioxidant activity in β-carotene-linoleic acid model system. Moreover, thermal stability of the ethanolic extracts was tested in order to get insight into possible application of the extracts in bakery products. Finally, the ability of the commercial preparation Vitalplant [®] , in the form of powder and extract, to inhibit oxidative changes of cookies was tested by applying spectrophotometric DPPH [·] radical scavenging and MDA tests.

	<p>According to obtained results, investigated plant samples, including commercial preparation Vitalplant[®], are rich source of plant phenolics. Investigated plant drugs possess antioxidant activity, which is not significantly changed after the thermal treatment. Cookie supplementation with commercial preparation Vitalplant[®] results in better oxidative stability of lipids and enhanced antioxidant activity of the cookies.</p>
<p>Accepted on Scientific Board on: AS</p>	<p>13.07.2005.</p>
<p>Defended: DE</p>	<p>2009.</p>
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>president: Dr Ksenija Kuhajda, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad. mentor: Dr Neda Mimica-Dukić, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad. member: Dr Dubravka Štajner, Full Professor, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad. member: Dr Jasna Čanadanović-Brunet, Full Professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad. member: Dr Đorđe Psodorov, Research Associate, Institute for Food Technology, University of Novi Sad.</p>