



**UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET**

Mr Jelena V. Živković

**Farmakološki aktivne supstance kestena
(*Castanea sativa* Mill.)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

NOVI SAD, 2009.

Ova doktorska disertacija je urađena u laboratoriji za Hemiju i tehnologiju farmaceutskih proizvoda Katedre za biotehnologiju i farmaceutsko inženjerstvo Tehnološkog Fakulteta Univerziteta u Novom Sadu.

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru dr Zoranu Zekoviću, redovnom profesoru Tehnološkog Fakulteta u Novom Sadu. Zahvaljujem se dr Ibrahimu Mujiću, redovnom profesoru Biotehničkog fakulteta u Bihaću na pruženoj nesebičnoj pomoći u toku izrade disertacije, kao i dr Žiki Lepojeviću, redovnom profesoru Tehnološkog Fakulteta u Novom Sadu na korisnim sugestijama. Veliku zahvalnost dugujem dr Goranu Nikoliću, vanrednom profesoru i prodekanu za nastavu Medicinskog fakulteta u Nišu – Odsek za Farmaciju na podršci i razumevanju. Veliku zahvalnost dugujem i dr Ivanu Spasojeviću iz Centra za multidisciplinarna istraživanja iz Beograda na pomoći u izradi teze.

Najiskrenije se zahvaljujem osoblju laboratorije za Hemiju i tehnologiju farmaceutskih proizvoda Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu dipl. ing. Senki Vidović i Slavici Ostojić, laboratorijskom tehničaru, na velikoj pomoći oko realizacije doktorske teze.

Svima onima koji su na bilo koji način doprineli izradi ove doktorske disertacije, najtoplije se zahvaljujem.

Autor

UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj
RBR

Identifikacioni broj
IBR

Tip dokumentacije
TD Monografska publikacija

Tip zapisa
TZ Tekstualni štampani materijal

Vrsta rada
VR Doktorska disertacija

Autor
AU Jelena V. Živković

Mentor
MN Prof. dr Zoran P. Zeković

Naslov rada
NR FARMAKOLOŠKI AKTIVNE SUPSTANCE KESTENA
(*Castanea sativa* Mill.)

Jezik publikacije
JP Srpski (latinica)

Jezik izvoda
JI Srpski/engleski

Zemlja publikovanja
ZP Srbija

Uže geografsko područje
UGP Vojvodina

Godina
GO 2009.

Izdavač
IZ Autorski reprint

Mesto i adresa:

| | |
|---|--|
| MA | Tehnološki fakultet, Bulevar Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad |
| Fizički opis rada | |
| FO | 8 poglavlja, 137 stranica, 247 lit. citata, 46 tabela, 42 slike, 3 šeme |
| Naučna oblast: | |
| NO | Tehničko-tehnološke nauke |
| Naučna disciplina: | |
| ND | Farmaceutsko inženjerstvo i tehnologija |
| Predmetna odrednica/Ključne reči | <i>Castanea sativa</i> Mill., ekstrakcija, |
| PO | ukupni fenoli, antioksidativna aktivnost, lipidna peroksidacija, <i>in vitro</i> antioksidativna aktivnost, antimikrobna aktivnost |
| UDK | |
| Čuva se | |
| ČU | Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1, Srbija |
| Važna napomena | |
| VN | Nema |
| Izvod/Abstrakt | |
| I/A | <p>Upotrebom 50% etanola i 50% acetona kao ekstragensa izvršena je ekstrakcija delova ploda kestena: srž ploda, braon spoljna kora ploda, crvena unutrašnja kora ploda, ceo plod (bez ježevica), kao i drveta: lišće, resa, ježevica, stara i mlada kora stabla. Ispitivani su pitomi kesten, lovranski marun i kalemljeni italijanski marun. Nakon određivanja prinosa suvog ekstrakta, primenom standardnih spektrofotometrijskih metoda određen je sadržaj fenolnih jedinjenja, flavonoida i kondenzovanih tanina. Iako je primenom 50% acetona kao ekstragensa dobijen veći prinos fenolnih materija, flavonoida i kondenzovanih tanina, za proizvodnju ekstrakata se preporučuje 50% etanol kao ekstragens, jer obezbeđuje sasvim zadovoljavajuće rezultate, a prihvatljiviji je sa aspekta znatno niže toksičnosti.</p> <p>Ekstrakt lista lovranskog maruna i rese pitomog kestena roda 2007. godine štite eritrocite od hemolize izazvane H₂O₂.</p> <p>Glavne komponente hidrolizata nakon metanolizacije ekstrakata su dimetil estar dehidrodigalne kiseline i metil estar dilaktona elaginske i valoneinske kiseline. Kvantitativnom LC/MS i HPLC/DAD analizom najveći sadržaj elagitanina je utvrđen za ekstrakt ježevica (170,6 mg/g ekstrakta).</p> <p>Izvršeno je ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata u</p> |

odnosu na 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), hidroksi ($\cdot\text{OH}$) i superoksidni anjon ($\cdot\text{O}_2^-$) radikale. Kapacitet ekstrakata za transformaciju organskih hidrofilnih radikala, ispitan kao sposobnost redukcije spin probe Tempon je najveći za ekstrakt rese pitomog kestena ($A = 18,1\%$), dok ekstrakti lista pitomog kestena i mlade kore drveta ispoljavaju slabu aktivnost. Ispitivanje protektivnog delovanja ekstrakata u odnosu na UV zračenje određeno je kao sposobnost uklanjanja $\cdot\text{OH}$ i $\cdot\text{O}_2^-$ radikala nastalih nakon zračenja. Ekstrakti koji ispoljavaju pozitivne, ali relativno niske RI vrednosti za proizvodnju obe vrste radikala $\cdot\text{OH}$ i $\cdot\text{O}_2^-$ su spoljna braon kora lovranskog maruna, resa sa kalemljenog italijanskog maruna i list lovranskog maruna. Negativne RI vrednosti dobijene za ostale ekstrakte ukazuju na prooksidativnu aktivnost u vodenom rastvoru izloženom UV zračenju. Ekstrakti rese, lista i ježevica ispoljavaju aktivnost u cilju preveniranja/otklanjanja lipidne peroksidacije membrane eritrocita.

Ispitivanjem *in vitro* antioksidativne aktivnosti primenom MTT testa je utvrđeno da ekstrakti rese i ježevica pitomog kestena i lista lovranskog maruna imaju izuzetno visoku antioksidativnu aktivnost u ćeliji. Naročito je povoljna činjenica da deluju u niskim koncentracijama (0,02 mg/ml). Antimikrobna aktivnost ekstrakata *C. sativa* određena je u odnosu na (G+) bakterije: *S. aureus*, *S. lutea*, *B. cereus*, *L. lactis ssp. lactis*, *M. pyrogenes var. albus*, kao i na (G-) bakterije: *P. mirabilis* i *S. typhimurium*. Značajnu antimikrobnu aktivnost daju ekstrakti kore drveta, ježevica i spoljne braon kore ploda. Ekstrakti srži ploda i celog ploda nisu ispoljili antimikrobnu aktivnost. Postoji značajna i jako značajna korelacija između antimikrobne aktivnosti ekstrakata, kao i antimikrobne i antioksidativne aktivnosti u odnosu na superoksid anjon radikale. Ekstrakti lista, ježevica, spoljne braon i unutrašnje crvene kore ploda, kao i kore drveta *C. sativa* Mill. dobijeni primenom 50% etanola kao ekstragensa predstavljaju značajan izvor komponenata sa farmakološkim delovanjem u cilju smanjenja nivoa oksidativnog stresa, poseduju visok kapacitet sprečavanja lipidne peroksidacije, deluju u pravcu preveniranja/otklanjanja lipidne peroksidacije i zaštite membrane eritrocita, imaju visoku *in vitro* antioksidativnu aktivnost, a ispoljavaju i značajnu antimikrobnu aktivnost.

Datum prihvatanja teme od strane NN Veća

DP

18.03.2008. godine

Datum odbrane:

DO

2009. godina

Članovi komisije

KO

Predsednik: dr Žika Lepojević, red. prof. Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

Član: dr Zoran Zeković, red. prof. Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

Član: dr Ibrahim Mujić, red. prof. Biotehničkog fakulteta u Bihaću

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number

ANO

Identification number

INO

Document type

DT

Monographic publication

Type of record

TR

Textual material, printed

Contents code

CC

PhD thesis

Author

AU

Jelena V. Živković

Menthor

MN

Prof. dr Zoran P. Zeković

Title

TI

PHARMACOLOGICALY ACTIVE SUPSTANCES OF
SWEET CHESTNUT (*Castanea sativa* Mill.)

Language of text

LT

Serbian (Roman alphabet)

Language of abstract:

LA

Serbian/English

Country of publication

CP

Serbia

Locality of publication

LP

Vojvodina

Publication year

PY

2009.

Publisher

PU

Author's reprint

| | |
|---|--|
| Publishing place PP | Faculty of Technology, Bulevar Cara Lazara 1 21000 Novi Sad |
| Physical description PD | 8 chapters, 137 pages, 247 references, 46 tables, 42 figures, 3 shemes |
| Scientific field SF | Tehnickal-technological sciences |
| Scientific discipline SD | Pharmaceutical technology and science |
| Subject/Key words SX | <i>Castanea sativa</i> Mill., extraction, total phenolics, antioxidant activity, lipid peroxidation, <i>in vitro</i> antioxidant activity, antimicrobial activity |
| UC | |
| Holding data HD | Library of Faculty of Technology, 21000 Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1, Serbia |
| Note N | None |
| Abstrakt AB | <p>Parts of chestnut such as: seeds (without spiny burs), peeled chestnut, red internal seed coat and brown seed coat, as well as parts of the trees: leaf, catkin, spiny burs, young and old chestnut bark have been extracted by 50% ethanol and 50% acetone as an extragent. Three cultivars of <i>Castanea sativa</i> Mill.: sweet chestnut, Lovran's marrone and grafted Italian marrone were examined. After determination of the yield of dry extract, the content of total phenolic compounds, flavonoids and condensed tannins are determined by application of standard spectrophotometrics methods. Although, the highest content of total phenolics, flavonoids and condensed tannins are obtained by 50% acetone as extragents, for production of extracts 50% ethanol is more suitable, regards much lower toxicity.</p> <p>Extracts of the leaf of Lovran's marrone and catkin of sweet chestnut native in 2007, protect erythrocytes from hemolysis provoked by H₂O₂.</p> <p>Dehydrodigallic acid dimethyl ester, ellagic acid and valoneic acid dilactone methyl ester are the main compounds in all hydrolysates after methanolisation. The highest content of ellagitannin was detected in extract of spiny burs (170.6 mg/g extract), by application of quantitative LC/MS and</p> |

HPLC/DAD analysis.

The examination of antioxidant activity of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), hydroxyl ($\cdot\text{OH}$) and superoxide ($\cdot\text{O}_2^-$) radicals have been done. Capacity of extracts for removal of organic, hydrophilic radicals, examined as potential of reduction of spin probe Tempon is highest in extract of catkin of sweet chestnut (A = 18.1%), while extracts of catkin, leaf and spiny burs almost have no antioxidative activity. The evaluation of UV-protective activity of extracts is determined as capacity for removal of $\cdot\text{OH}$ and O_2^- radicals generated after irradiation. Extracts which showed positive, but relative low RI values for production of both radical species, OH and $\cdot\text{O}_2^-$ radicals, are brown seed coat of Lovran's marrone, catkin of grafted Italian marrone and leaf of Lovran's marrone. Negative RI values obtained for other extracts show that these have prooxidative activity in aqueous solution exposed to UV radiation. Extracts of catkin, leaf and spiny burs expressed activity to prevent/remove lipid peroxidation in the membrane of erythrocytes.

Examination of antioxidant activity *in vitro* by application of MTT test have been detected especially high antioxidant activity of extracts of catkin, spiny bur of sweet chestnut and leaf of Lovran's marrone in the cell. Particularly is favorable that extracts acting in low concentration (0.02 mg/ml). Antimicrobial activity of extracts of *C. sativa* was determined against Gram-positive bacteria: *S. aureus*, *S. lutea*, *B. cereus*, *L. lactis ssp. lactis*, *M. pyrogenes var. albus*, as well as Gram-negative bacteria: *P. mirabilis* and *S. typhimurium*. The significant antimicrobial activity shows extracts of bark, spiny burs and brown seed coat. Extracts of peeled chestnut and seeds didn't show any antimicrobial activity. The very significant and significant correlation existed between antimicrobial activity of extracts, as well as antimicrobial activity and scavenging of $\cdot\text{O}_2^-$ radical. Extracts of leaf, spiny burs, brown seed coat and red internal seed coat, as well as bark of *C. sativa* Mill. produced by 50% ethanol as extract represent important resource of components with pharmacological activity in reducing level of oxidative stress, possess high activity to prevent/remove lipid peroxidation and protection of the membrane of erythrocytes, have high *in vitro* antioxidant activity, and also express significant antimicrobial activity.

Accepted by the Scientific Board on
ASB

18th March 2008

Defended on
DE

2009

**Thesis defend board
DB**

Chairman: Dr Žika Lepojević, Full Professor, Faculty of Technology, Novi Sad

Member: Dr Zoran Zeković, Full Professor, Faculty of Technology, Novi Sad

Member: Dr Ibrahim Mujić, Full Professor, Faculty of Biotechnology, Bihać

SADRŽAJ

| | Strana |
|---|--------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. OPŠTI DEO | 2 |
| 2.1. POLIFENOLI | 2 |
| 2.1.1. Tipovi polifenola | 2 |
| 2.1.2. Polifenoli u hrani | 9 |
| 2.1.3. Metabolizam flavonoida | 9 |
| 2.2. SLOBODNI RADIKALI | 9 |
| 2.2.1. Oksidacija | 9 |
| 2.2.2. Reaktivne kiseonične vrste – ROS | 10 |
| 2.2.3. Slobodni radikali nastali tokom lipidne peroksidacije | 11 |
| 2.2.4. Oksidativni stres i starenje | 13 |
| 2.3. ANTIOKSIDANSI I ANTIMIKROBNI AGENSI | 13 |
| 2.3.1. Antioksidansi | 13 |
| 2.3.2. Antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja | 14 |
| 2.3.3. EPR tehnika | 16 |
| 2.3.4. Antimikrobna aktivnost fenolnih jedinjenja | 18 |
| 2.4. BILOŠKA I FARMAKOLOŠKA AKTIVNOST FENOLNIH JEDINJENJA | 19 |
| 2.5. METODE ZA ODREĐIVANJE FENOLNIH JEDINJENJA | 21 |
| 2.5.1. Priprema uzorka | 21 |
| 2.5.1.1. Ekstrakcija | 21 |
| 2.5.1.2. Ultrazvučna ekstrakcija | 21 |
| 2.5.1.3. Hidroliza | 22 |
| 2.5.2. Kolorimetrijske metode za analizu fenolnih jedinjenja | 22 |
| 2.5.3. HPLC analiza | 25 |
| 2.6. METODE ODREĐIVANJA EPR TEHNIKOM | 26 |
| 2.6.1. DPPH radikali | 26 |
| 2.6.2. Hidroksi radikali | 27 |
| 2.6.3. Superoksidni anjon radikali | 28 |
| 2.6.4. Kapacitet uklanjanja lipidne peroksidacije | 28 |
| 2.6.5. Organski hidrofilni radikali | 28 |
| 2.6.6. Protektivni efekat u odnosu na UV zračenje | 29 |
| 2.7. ERITROCITI KAO MODELI ZA ISPITIVANJE STEPENA OKSIDATIVNOG OŠTEĆENJA | 29 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.8. | TEST VIJABILNOSTI (MTT) | 30 |
| 2.9. | METODA ZA ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI..... | 31 |
| 2.10. | <i>Castanea sativa</i> Mill. | 31 |
| 2.10.1. | Botanički opis. | 31 |
| 2.10.2. | Najvažnije sorte. | 33 |
| 2.10.3. | Hemijski sastav. | 35 |
| 2.10.4. | Kesten kao lekovita biljka. | 38 |
| 3. | REZULTATI I DISKUSIJA | 39 |
| 3.1. | DOBIJANJE I ISPITIVANJE HEMIJSKOG SASTAVA EKSTRAKATA KESTENA. | 39 |
| 3.1.1. | Srednji prečnik čestica i prinos suvog ekstrakta kestena. | 39 |
| 3.1.2. | Određivanje fenolnih jedinjenja, flavonoida i kondenzovanih tanina. | 42 |
| 3.1.2.1. | Standardni dijagram za određivanje ukupnih fenola. | 42 |
| 3.1.2.2. | Standardni dijagram za određivanje ukupnih flavonoida. | 43 |
| 3.1.2.3. | Standardni dijagram za određivanje kondenzovanih tanina vanilin testom. | 44 |
| 3.1.2.4. | Standardni dijagram za određivanje kondenzovanih tanina kiselim butanolnim testom. | 44 |
| 3.1.3. | Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida. | 45 |
| 3.1.4. | Sadržaj ukupnih kondenzovanih tanina. | 48 |
| 3.1.5. | Korelaciona analiza. | 51 |
| 3.2. | ODREĐIVANJE KAPACITETA EKSTRAKATA U ZAŠTITI ERITROCITA OD HEMOLIZE. | 52 |
| 3.3. | ODREĐIVANJE FENOLNIH JEDINJENJA HPLC ANALIZOM. | 52 |
| 3.3.1. | HPLC/DAD analiza sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja. | 52 |
| 3.3.2. | HPLC/ DAD i LC/MS analiza. | 53 |
| 3.4. | ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA. | 61 |
| 3.4.1. | Transformacija DPPH radikala. | 62 |
| 3.4.2. | Transformacija hidroksi radikala. | 63 |
| 3.4.3. | Korelaciona analiza. | 66 |
| 3.4.4. | Transformacija superoksidnog anjon radikala. | 66 |
| 3.4.5. | Kapacitet ekstrakata za uklanjanje lipidne peroksidacije. | 68 |
| 3.4.6. | Kapacitet ekstrakata za transformaciju organskih hidrofilnih radikala. ... | 71 |
| 3.4.7. | Transformacija hidroksi radikala i superoksid anjon radikala generisanih UV zračenjem. | 72 |
| 3.5. | UTICAJ EKSTRAKATA NA PREVENIRANJE/UKLANJANJE LIPIDNE PEROKSIDACIJE MEMBRANE ERITROCITA. | 74 |
| 3.6. | UTICAJ EKSTRAKATA NA ZAŠTITU MEMBRANSKOG INTEGRITETA ERITROCITA MERENJEM SADRŽAJA KALIJUMA. | 75 |

| | | |
|----------|---|----|
| 3.7. | IN VITRO ANTIOKSIDATIVNA SVOJSTVA EKSTRAKATA KESTENA..... | 76 |
| 3.7.1. | STZ/ALX/SNP izazvan dijabetes tip I (<i>Diabetes mellitus</i>-tip I)..... | 77 |
| 3.8. | ISPITIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA..... | 78 |
| 3.8.1. | Korelaciona analiza..... | 81 |
| 4.0. | EKSPERIMENTALNI DEO..... | 83 |
| 4.1. | DOBIJANJE EKSTRAKATA KESTENA..... | 83 |
| 4.1.1. | Priprema biljnog materijal..... | 84 |
| 4.1.2. | Ekstrakcija..... | 84 |
| 4.2. | SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE..... | 85 |
| 4.2.1. | Određivanje ukupnih fenola..... | 85 |
| 4.2.2. | Određivanje ukupnih flavonoida..... | 85 |
| 4.2.3. | Određivanje kondenzovanih tanina vanilin testom..... | 86 |
| 4.2.4. | Određivanje kondenzovanih tanina kiselim butanolnim testom..... | 86 |
| 4.2.4.1. | Prečišćavanje ekstrakta kestena na Sephadex-u LH 20 i dobijanje kondenzovanih tanina..... | 86 |
| 4.2.5. | Spektrofotometrijsko određivanje kapaciteta ekstrakata u zaštiti eritrocita od hemolize izazvane vodonik peroksidom..... | 87 |
| 4.3. | HPLC ANALIZA..... | 88 |
| 4.3.1. | HPLC/DAD analiza za kvantitativno određivanje ukupnih fenolnih materija..... | 88 |
| 4.3.2. | HPLC/ DAD i LC/MS analiza..... | 88 |
| 4.4. | ISPITIVANJE EKSTRAKATA KESTENA EPR SPEKTRALNOM ANALIZOM..... | 89 |
| 4.4.1. | Transformacija DPPH radikala..... | 89 |
| 4.4.2. | Transformacija hidroksi radikala..... | 90 |
| 4.4.3. | Transformacija superoksidnog anjon radikala..... | 91 |
| 4.4.4. | Kapacitet ekstrakata za uklanjanje lipidne peroksidacije..... | 91 |
| 4.4.5. | Kapacitet ekstrakata na transformaciju organskih hidrofilnih radikala..... | 92 |
| 4.4.6. | Transformacija hidroksi radikala i superoksid anjon radikala generisanih UV zračenjem..... | 92 |
| 4.5. | PREVENIRANJE/UKLANJANJE LIPIDNE PEROKSIDACIJE MEMBRANE ERITROCITA..... | 93 |
| 4.6. | ISPITIVANJE ZAŠTITE MEMBRANSKOG INTEGRITETA ERITROCITA MERENJEM SADRŽAJA KALIJUMA..... | 93 |
| 4.7. | ODREĐIVANJE VIJABILNOSTI RIN-5F ĆELIJA POMOĆU MTT TESTA .. | 94 |

| | Strana |
|---|--------|
| 4.8. MIKROBIOLOŠKA METODA | 94 |
| 4.8.1. Disk-difuziona metoda – metoda za skrining | 94 |
| 4.9. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA | 95 |
| 5.0. ZAKLJUČCI | 96 |
| 6.0. PRILOG | 100 |
| 6.1. HPLC/DAD HROMATOGRAMI EKSTRAKATA KESTENA | 100 |
| 6.2. HPLC/MS HROMATOGRAMI EKSTRAKATA KESTENA | 103 |
| 6.3. EPR SPEKTRI TRANSFORMACIJE DPPH RADIKALA | 114 |
| 6.4. EPR SPEKTRI TRANSFORMACIJE HIDROKSI RADIKALA | 116 |
| 6.5. EPR SPEKTRI TRANSFORMACIJE SUPEROKSIDNOG ANJON RADIKALA | 119 |
| 6.6. EPR SPEKTRI TRANSFORMACIJE HIDROKSI RADIKALA I SUPEROKSID ANJON RADIKALA GENERISANIH UV ZRAČENJEM ... | 121 |
| 6.7. IN VITRO PROVERA ANTIOKSIDATIVNOG KAPACITETA | 122 |
| 7. LITERATURA | 123 |
| 8. BIOGRAFIJA | 137 |



1. UVOD

Od oko 250 oficinalnih lekovitih supstanci, 11% su biljnog porekla, a veliki broj lekova se dobija iz prirodnih sirovina. Utvrđeno je da su 60% antineoplastičnih i antiinfektivnih agenasa koje su na tržištu, supstance prirodnog porekla¹. Prirodni proizvodi postaju vodeće komponente koje omogućuju dizajn i racionalno planiranje novih lekova biomimetičkom razvojnom sintezom, kao i razvojem i otkrićem novih terapijskih mogućnosti poznatih komponenti.

Pitomi kesten *Castanea Sativa* Mill., odnosno seme kestena se u terapiji primenjuje za tretman srčanih smetnji, a lišće se koristi za lečenje suvog kašlja i dijareje². Infuz suvog lista kestena (*Extractum Castanea fluidum*) se od davnina koristi kao efikasno sredstvo protiv paroksizmalnog i konvulzivnog kašlja, kao što je veliki kašalj, kao i kod drugih iritabilnih i ekcitolabilnih stanja respiratornih organa³. Utvrđeno je da poseduje izraženu *in vitro* antibakterijsku aktivnost⁴.

U okviru ove doktorske disertacije postavljen je zadatak da se ispita ekstrakcija i sastav farmakološki aktivnih supstanci pitomog kestena, kao i mogućnost primene kestena i ekstrakata kestena u terapiji i dijetetskim proizvodima prehrambene industrije. Planirana istraživanja imaju za cilj da ova biljna vrsta, do sada korišćena prevashodno za ishranu, kao gorivo i za dobijanje taninskog ekstrakta, dobije jednu sasvim novu, farmakoterapijsku primenu. Detaljno su prikazane osobine i delovanje fenolnih komponenti kestena, kao moguće ciljne grupe jedinjenja sa antioksidativnim i antimikrobnim svojstvima, koja učestvuju i u inhibiciji lipidne peroksidacije.

Istraživanja obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom su podeljena u više delova:

1. Izbor ekstragenasa i odgovarajućeg tehnološkog postupka za dobijanje ekstrakata različitih delova ispitivanih kultivara kestena;
2. Kvantitativno i kvalitativno određivanje fenola i drugih komponenata sadržanih u ekstraktima spektrofotometrijskim, HPLC/UV i LC/MS analizama;
3. Antioksidativna aktivnost dobijenih ekstrakata u odnosu na stabilne 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikale (DPPH), reaktivne hidroksi i peroksi radikale;
4. Kapacitet ekstrakta kestena za uklanjanje organskih, hidrofилnih radikala, sprečavanje lipidne peroksidacije i zaštite od UV zračenja;
5. Delovanje ekstrakata u zaštiti membranskog integriteta eritrocita izloženih H₂O₂, prevenciji/sprečavanju lipidne peroksidacije membrana izloženih H₂O₂ i zaštite eritrocita pod uticajem H₂O₂;
6. *In vitro* antioksidativna aktivnost odabranih ekstrakata primenom MTT testa;
7. Antimikrobna aktivnost ekstrakata u odnosu na odabrane sojeve bakterija i kvasaca primenom disk-difuzione metode;
8. Na osnovu dobijenih rezultata izvršen je izbor ekstrakata sa najboljim farmakološkim delovanjem, odnosno dela *C. sativa* Mill. sa najviše farmakoterapijskih komponenti, a to su ekstrakti rese, lista, ježevica, spoljne braon i unutrašnje crvene kore ploda, kao i kore drveta.

2. OPŠTI DEO

Fenolna jedinjenja sa antioksidativnim osobinama predstavljaju značajnu komponentu koja doprinosi blagotvornom delovanju voća i povrća na ljudsko zdravlje. Njihova sposobnost da utiču na bolesti koje su povezane sa oksidativnim stresom do danas još uvek nije dovoljno razjašnjena.

Flavonoidi obuhvataju veliki broj jedinjenja sadržanih u biljkama, koje se u tradicionalnoj i istočnjačkoj medicini koriste već više od hiljadu godina⁵. Sa farmakološkog stanovišta, ova jedinjenja poseduju zavidan spektar biohemijske i farmakološke aktivnosti. Različiti flavonoidi ispoljavaju antioksidativne, antibakterijske, antiinflamatorne, antialergijske, antimutagene, antivirusne, antineoplastične, anti-trombotične i vazodilatorne osobine⁶. Najizrazitiji je antioksidativni i antiinflamatorni efekat ovih jedinjenja. Aktivni su kod hroničnih inflamatornih i alergijskih bolesti, raka dojke i kardiovaskularnih bolesti⁷. Posebna pažnja se posvećuje njihovom potencijalu u zaštiti i prevenciji od kardiovaskularnih bolesti, s obzirom da epidemiološke studije ukazuju da flavonoidi poseduju protektivni efekat u odnosu na razvoj ovih bolesti⁸.

Deo pozitivnog efekta upotrebe voća i povrća u ishrani se može pripisati flavonoidima⁹. Tokom "Zutphen Elderly Study", u okviru "Seven Countries Study", ispitivanju koje je izvršeno u Finskoj, utvrđeno je da je unos flavonoida obrnuto srazmeran mortalitetu od koronarnih bolesti. U drugom istraživanju je zaključeno da veći unos kvercetina utiče na niži mortalitet od koronarnih bolesti. Učestalost cerebrovaskularnih bolesti je manja kada se u ishrani poveća sadržaj kemferola, naringenina i hisperidina.

Katehin i derivati katehina, oligomerni proantocijanidini, kvercetin, flavonoglikozidi izolovani iz ginka, kao i drugi, koriste se u prevenciji i tretmanu kardiovaskularnih bolesti, kancera, astme, bolesti jetre i katarakte¹⁰. Zabeležen je trend smanjenja pojave dijabetesa tipa 2 ukoliko se unose veći sadržaji kvercetina i miricetina¹¹.

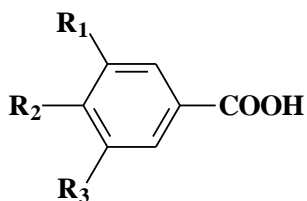
2.1. POLIFENOLI

U višim biljkama je identifikovano nekoliko hiljada molekula sa polifenolnom strukturom (više hidroksilnih grupa vezanih za aromatične prstenove), dok ih jestive biljke sadrže nekoliko stotina. Ovi molekuli su sekundarni metaboliti biljaka, a učestvuju u zaštiti od UV zračenja i napada patogenih mikroorganizama.

2.1.1. Tipovi polifenola

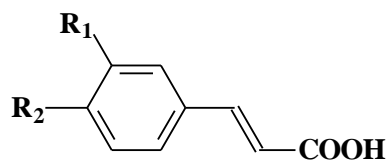
U zavisnosti od broja fenolnih prstenova u svojoj strukturi, kao i od strukturnih elemenata koji međusobno povezuju prstenove polifenoli se dele na fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane¹² (slika 1).

Derivati hidroksibenzojeve kiseline



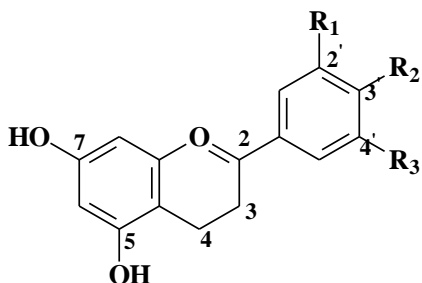
$R_1=R_2=OH$; $R_3=H$: Protokatehinska kiselina
 $R_1=R_2=R_3=OH$: Galna kiselina

Derivati cimetne kiseline

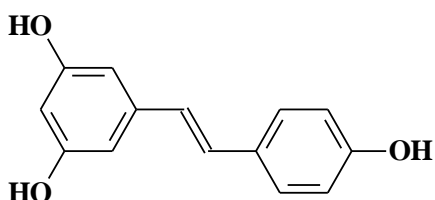


$R_1=OH$, $R_2=H$: Kumarna kiselina
 $R_1=R_2=OH$: Kafena kiselina
 $R_1=OCH_3$, $R_2=OH$: Ferulna kiselina

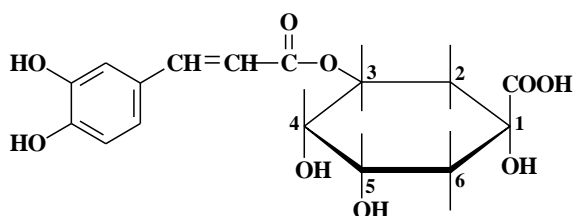
Flavonoidi



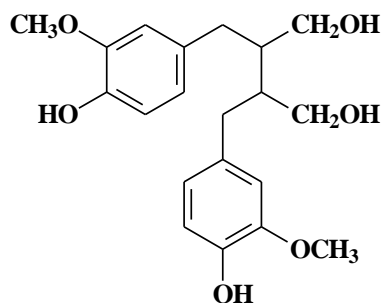
Stilbeni (rezveratrol)



Hlorogenska kiselina



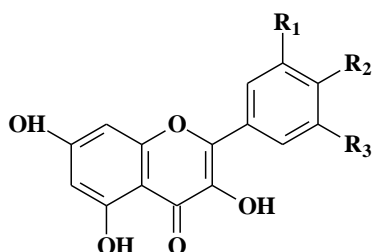
Lignani (sekoizolaricirezinol)



Slika 1. Hemijske strukture polifenola

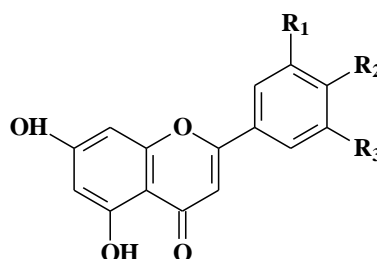
Flavonoidi uobičajene strukture se sastoje od dva aromatična prstena A i B (slika 3), međusobno povezana sa 3 ugljenikovih atoma koji formiraju prsten C. U zavisnosti od tipa strukture, dele se u 6 podklasa: flavonoli, flavoni, izoflavoni, flavanoni, antocijanidini i flavanoli (katehini i proantocijanidini)⁷ (slika 2).

Flavonoli



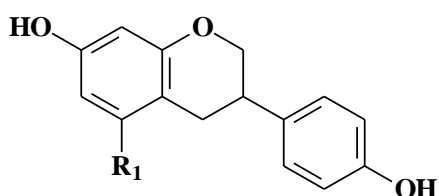
R₁=OH; R₂=R₃=OH : Kemferol
R₁=R₂=OH; R₃=H : Kvercetin
R₁=R₂=R₃=OH : Miricetin

Flavoni



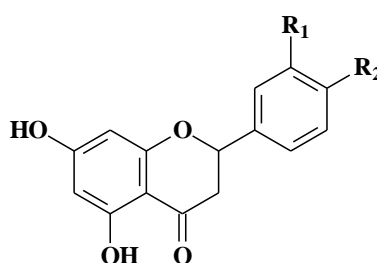
R₁=H; R₂=OH, R₃=H : Apigenin
R₁=R₂=OH, R₃=H : Luteolin

Izoflavoni



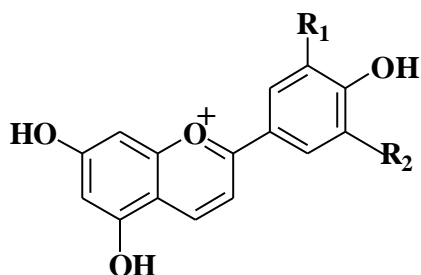
R₁=H : Daidženin
R₁=OH : Genistein

Flavanoni



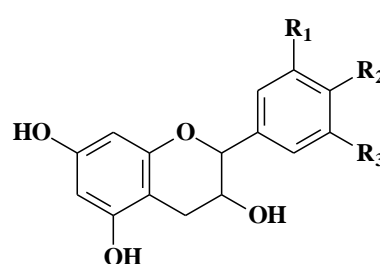
R₁=H; R₂=OH : Naringenin
R₁=R₂=OH: Eriodiktiol
R₁=OH; R₂=OCH₃: Hisperidin

Antocijanidini



R₁=R₂=H : Pelargonidin
R₁=H; R₂=H : Cijanidin
R₁=R₂=OH : Delfinidin
R₁=OCH₃ ; R₂=OH : Petunidin
R₁=R₂=OCH₃ : Malvidin

Flavanoli

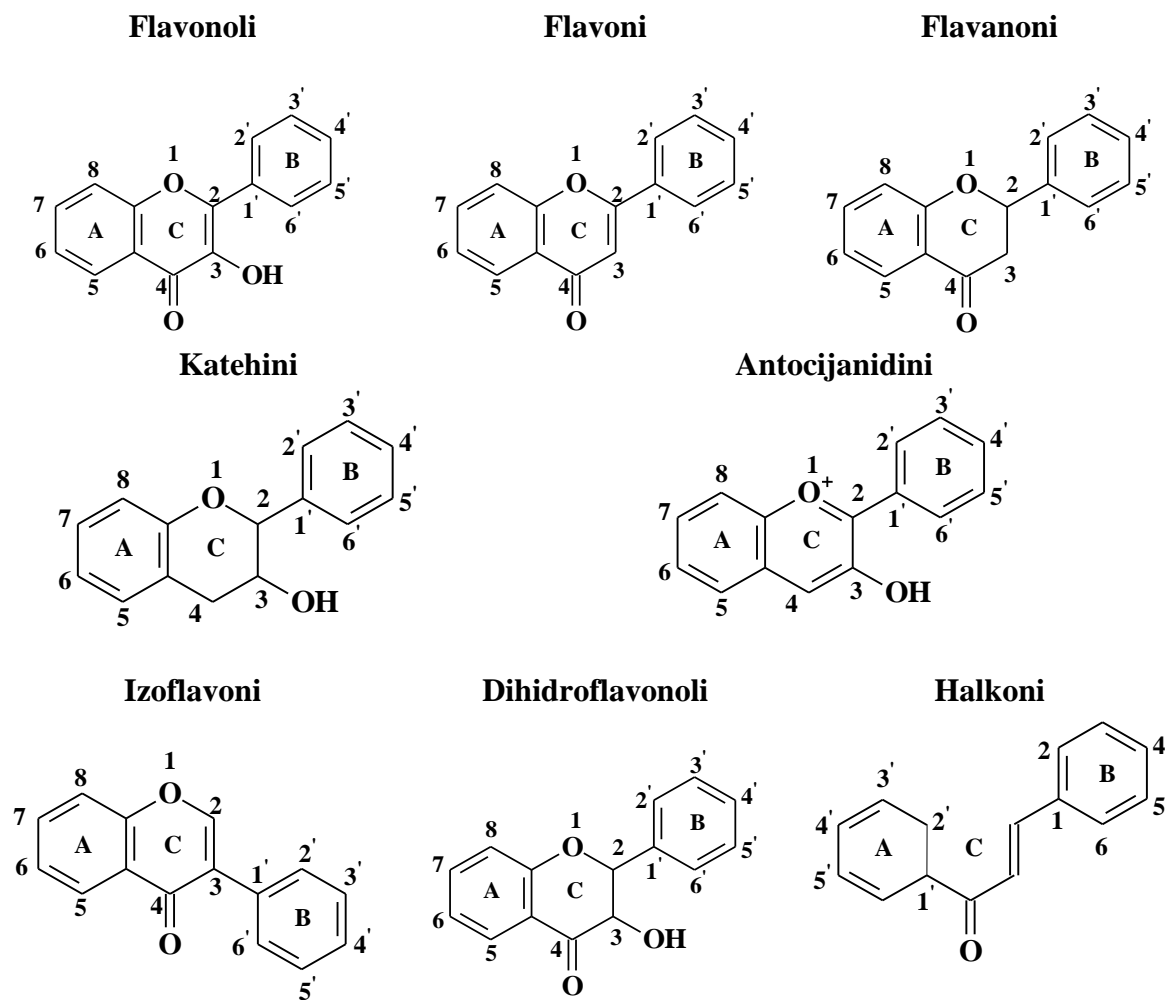


R₁=R₂=OH; R₃=H : Katehin
R₁=R₂=R₃=OH : Galokatehin

Slika 2. Hemijske strukture flavonoida

Pored toga, polifenoli se vezuju sa različitim ugljenim hidratima i organskim kiselinama. Drugi autori¹³ dele flavonoide na 8 različitih klasa (flavonoli, flavani, flavanoni, katehini, antocijanidini, izoflavoni, dihidroflavonoli i halkoni), na osnovu

razlika u osnovnoj molekularnoj strukturi (slika 3). Strukturne razlike se prvenstveno ispoljavaju na prstenu sa oznakom C. Flavonoli, dihidroflavonoli, katehini i antocijanidini imaju hidroksilnu grupu na položaju 3. Veza između C atoma u položaju C-2 i C-3 u prstenu C je kod flavanona, katehina i dihidroflavonola zasićena.



Slika 3. Strukturne formule različitih klasa flavonoida

Sva jedinjenja slična flavonoidima imaju B prsten na poziciji C-2 povezan za C prsten, izuzev izoflavona kod kojih je prsten B povezan sa C prstenom na položaju C-3. Katehini i antocijanidini nemaju keto grupu u položaju C-4.

Fenolne kiseline se dele na derivate hidroksibenzoeve i cimetne kiseline (slika 1). Čaj je značajan izvor galne kiseline, tako da sveže lišće čaja sadrži 4,5 g galne kiseline/kg¹⁴. Hidroksibenzoeva kiselina u slobodnoj i esterifikovanoj formi detektovana je samo u nekim višim biljkama. Cimetne kiseline su više zastupljene u odnosu na hidroksibenzovnu kiselinu, i čine ih: *p*-kumarna, kafena, ferulna i sinapinska kiselina. Kafena i kininska kiselina formiraju hlorogensku kiselinu, koje ima u mnogim tipovima voća, a u većoj koncentraciji se nalazi u kafi (jedna šoljica sadrži 70-350 mg hlorogenske kiseline)¹⁵. Cimetna kiselina je pronađena u svim delovima voća, a najveći sadržaj ove kiseline je određen u spoljašnjem omotaču zrelog ploda¹⁶. Kafena kiselina, u slobodnom i esterifikovanom obliku je najviše zastupljena fenolna

kiselina i čini od 75 do 100% ukupnog sadržaja derivata cimetine kiseline u svom voću, a odavno je izolovana iz kafe. Ferulna kiselina je dominantna fenolna kiselina u zrnima žitarica, njenom najvažnijem izvoru¹⁷.

Flavonoli predstavljaju najrasprostranjenije flavonoide u hrani. Glavni predstavnici ove grupe jedinjenja su kvercetin i kemferol, kojih ima u hrani u relativno niskim koncentracijama (15–30 mg/kg). Crveno vino, kao i čaj sadrže više od 45 mg flavonola/l. Ove komponente su prisutne u glikozidnoj formi, povezane sa šećernom jedinicom, obično glukozom i ramnozom, ali mogu zastupljeni i drugi šećeri (kao galaktoza, arabinoza, ksiloza, glukuronska kiselina). Voće sadrži od 5 do 10 različitih flavonolnih glikozida¹⁰.

Flavoni su manje zastupljeni flavonoidi u voću i povrću. Uglavnom su to glukozida luteolina i apigenina. Značajnije količine flavona su određene u peršunu i celeru. Žitarice sadrže glikozide flavona¹⁸.

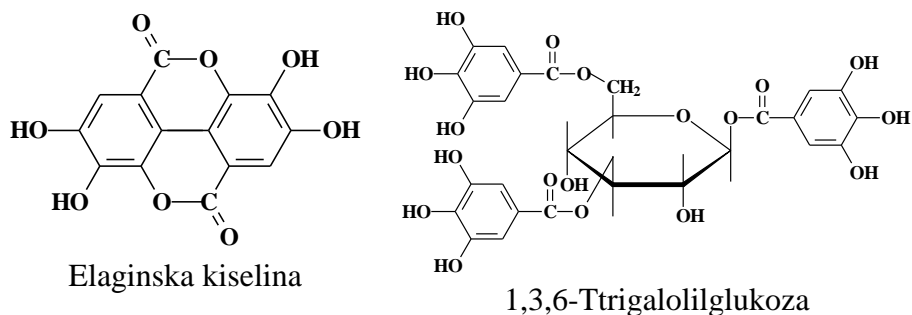
Flavanoni su detektovani u paradajzu i nekim aromatičnim biljkama, kao što je menta, a prisutni su u većim koncentracijama u citrus voću. Glavni aglikoni su naringenin u grejpfrutu, hisperidin u pomorandžama, eriodiktiol u limunu. Flavanoni su uglavnom u formi glikozida sa disaharidima u položaju C-7¹⁹.

Izoflavoni su flavonoidi koji su strukturno slični estrogenima. Iako nisu steroidi, oni poseduju hidroksilne grupe u položaju C-7 i C-4' u konfiguraciji koja je slična sa hidroksilnim grupama estradiolnog molekula. Ovo doprinosi pseudohormonalnim karakteristikama ovih molekula, uključujući i sposobnost da se vežu za estrogenske receptore, tako da su klasifikovani kao fitoestrogeni. Izoflavoni se nalaze uglavnom u leguminozama. Soja i proizvodi od soje predstavljaju glavni izvor izoflavona u ljudskoj ishrani. Ovi proizvodi sadrže genistein, daidžein i glicitin, uglavnom prisutnim u odnosu 1:1:0,2. Soja sadrži između 580 mg i 3.800 mg izoflavona/kg, dok sojino mleko sadrži od 30 do 175 mg/l²⁰.

Flavanoli se nalaze u monomernoj formi (katehini) i polimernoj formi (proantocijanidini). Katehin je detektovan u mnogim vrstama voća, a kajsija, koja sadrži 250 mg/kg ovog jedinjenja, je najbogatija ovom komponentom. Takođe su prisutni i u crvenom vinu (više od 300 mg/l), a i zeleni čaj i čokolada ih sadrže u većoj količini²¹. Katehin i epikatehin su najvažniji flavanoli u voću, dok su galokatehin, epigalokatehin i epigalokatehin-galat pronađeni u nekim vrstama semenja i leguminoza, kao i u grožđu, a najveće količine se nalaze u čaju²². Za razliku od drugih klasa flavonoida, flavanoli se ne nalaze u glikozidnoj formi. Epikatehini iz čaja su izuzetno stabilni kada su izloženi zagrevanju, samo 15% ovih supstanci se razlaže tokom 7 sati kuvanja u ključaloj vodi na pH 5²³.

Tanini čine kompleksnu grupu u prirodi rasprostranjenih polimera, čiju je tačnu hemijsku strukturu teško definisati. Termin **tanin** se originalno koristi za opisivanje biljnih komponenti koje formiraju stabilne komplekse sa kolagenom iz kože, a poznate su po adstringentnom delovanju. U pitanju su polifenolni metaboliti, čija je molekulska masa veća od 500, sa osobinom da talože želatin i druge proteine iz rastvora²⁴, a pronađeni su u skoro svakom delu biljke, kori, drvetu, lišću, plodu i korenu. Na osnovu strukture, dele se na dve grupe, **hidrolizovane** i **kondenzovane tanine**.

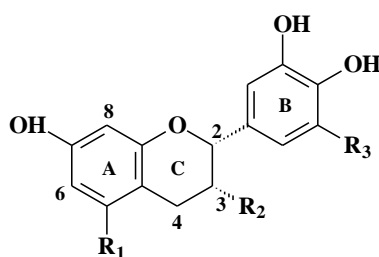
Hidrolizovani tanini su estri šećera i fenolnih kiselina ili derivata fenolnih kiselina. Čine ih galotanini, koji hidrolizom u prisustvu alkalija daju galnu kiselinu, kao jedini fenolni deo, i mnogo više rasprostranjeni elagitanini, koji pored galne kiseline daju i jedan od njenih derivata – elaginsku kiselinu (dimer galne kiseline) (slika 4).



Slika 4. Struktura osnovnih jedinica hidrolizovanih tanina

Kondenzovani tanini se depolimerizuju delovanjem jake kiseline, dajući pigment antocijanidin i druge proizvode, pa je **proantocijanidini** drugi naziv za kondenzovane tanine. Proantocijanidini (PA) ili leukocijanidini, obuhvataju grupu polihidroksilnih flavan-3-ol oligomera i polimera, povezanih C-C vezom između flavonolnih jedinica u položaju C-4 i C-8 (ili C-6) (B tip proantocijanidina) (slike 5 i 6). Step en polimerizacije varira od 50 flavonolnih molekula²⁵, a poznati su kondenzovani tanini sa molekulskom masom većom od 30.000. Kondenzovani tanini su najčešće prisutni u biljnom tkivu, sastoje se od katehina ili epikatehina, a mogu u svojoj strukturi sadržavati i estre galne kiseline.

Monomer katehina ima hiralne centre na C-2 i C-3 prstena C. Zapažene su varijacije u stereochemiji ovog položaja kod prirodnih tanina, međutim, one malo utiču na većinu metoda za određivanje tanina. Supstituenti R_1 , R_2 i R_3 na slici 5, imaju značajan uticaj na reaktivnost tanina. Kada je OH grupa esterifikovana galnom kiselinom u pitanju je epigalokatehin galat ($R_1=R_2=OH$, $R_3=O$ -galoil), glavni polifenolni sastojak zelenog čaja. Prisustvo galatnih estara može znatno menjati biološke karakteristike kondenzovanih tanina²⁶.

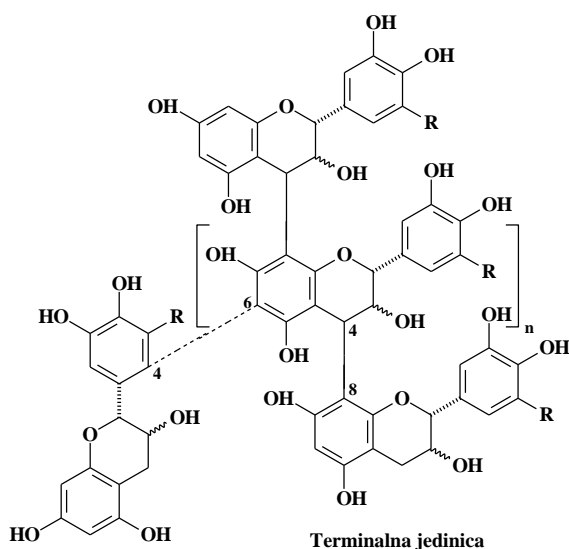


| R_1 | R_2 | R_3 | Jedinjenje |
|-------|-------|-------|------------------|
| OH | H | OH | proantocijanidin |
| OH | H | OH | prodelfinidin |
| H | H | H | profisetinidin |
| H | H | OH | prorobinetidin |

Slika 5. Osnovna jedinica kondenzovanih tanina

Ukoliko je $R_1=R_2=OH$ i $R_3=H$ struktura odgovara (-)-epikatehinu, a kada je $R_1=OH$, $R_3=H$, a $R_2=O$ - galoil nastaje katehin galat.

Oksidativna kondenzacija između flavonolnih monomera se najčešće odvija u položajima C-4 i C-8, ali može obuhvatiti i položaje C-4 i C-6 monomera (slika 6), kao i druge položaje.



Slika 6. Model struktura kondenzovanih tanina

Ako je R=H ili OH, struktura odgovara procijanidinu ili prodelfinidu. Veza C-4→C-6 (isprekidana linija) je interflavanska veza.

Tokom formiranja kompleksa sa salivatornim proteinima, kondenzovani tanini su odgovorni za adstringentnost voća, kao i čokolade²⁷. Teško je odrediti tačan sadržaj proantocijanidina u hrani, jer oni poseduju različite strukture i molekulske mase. Taninske droge imaju pored adstringentnog, antiseptično i antimikrobno delovanje. Dekokti i tinkture se koriste kao antidijaroici. Tanini su antidoti (protivotrovi) za mnoge teške metale i biljne toksične sastojke. Laboratorijska istraživanja potvrdila su uglavnom inhibitorno delovanje taninskih molekula na brojne enzime, kao što su 5-lipooksigenaza, angiotenzin konvertujući enzim, hijauluronidaza i dr.

Antocijanini su pigmenti rastvoreni u ćelijskom soku, vakuolama i epidermalnom tkivu cveća i voća, i daju im ružičastu, crvenu, plavu i ljubičastu boju²⁸. Postoje u različitim hemijskim formama, kako obojenim, tako i bezbojnim, u zavisnosti od pH vrednosti. Cijanidin je najzastupljeniji antocijanidin u hrani, a njegova količina je proporcionalna intenzitetu boje. Antocijani su uglavnom pronađeni u pokožici, izuzev kod pojedinih vrsta crvenog voća kod koga se nalaze i u mesu (višnje i jagode). Vino sadrži od 200 do 350 mg/l antocijanina, koji se transformišu u različite kompleksne strukturne forme tokom procesa sazrevanja vina²⁹.

Lignani se sastoje od dve fenilpropanske jedinice (slika 1). Najbogatiji resurs je seme, a manje bogati lignanima su neke alge, leguminozne biljke, žitarice (tritikale i pšenica) i povrće (luk, asparagus, šargarepa)³⁰. Druge žitarice, bobice, voće i pojedino povrće sadrži tragove pojedinih lignana, ali je koncentracija u semenu lana oko 1.000 puta veća od koncentracije u drugoj hrani³¹.

Stilbeni su pronađeni samo u malim količinama u hrani. Rezveratrol, koji ispoljava antikancerogeni efekat, analiziran je kod proučavanja lekovitih biljaka, i u niskim koncentracijama detektovan u crvenom vinu (0,3–7 mg/l aglikona i 15 mg/l glikozida)³².

2.1.2. Polifenoli u hrani

Postoje nepotpuni podaci o količini polifenola koja se dnevno konzumira. Ovi podaci su dobijeni na osnovu analize glavnih aglikona (nakon hidrolize njihovih glikozida i estara) u hrani koja se najčešće koristi u ishrani. Kuhnau³³ je 1976. godine preračunao da je unos flavonoida u Americi oko 1 g/dan i sastoji se od 16% flavonola, flavona i flavanona, 17% antocijana, 20% katehina i 45% biflavona. Flavonoli su najviše istraživani, i utvrđeno je da se ova jedinjenja unose 20–25 mg/dan u Americi, Danskoj i Holandiji³⁴. U Italiji, vrednosti se kreću od 5 to 125 mg/dan, sa srednjom vrednošću od 35 mg/dan³⁵. Flavanoni se u sličnoj ili većoj meri konzumiraju kao flavonoli, sa srednjom vrednošću od 28,3 od 35 mg/dan hisperidina u Finskoj³⁶. Istraživanje dnevne potrošnje antocijanina u Finskoj, zemlji u kojoj se za ishranu dosta koristi bobičasto voće je polazalo da iznosi 82 mg/dan antocijanina, a u nekim slučajevima i 200 mg/dan³⁷.

Može se zaključiti da ukoliko se tokom dana konzumira nekoliko porcija voća i povrća, ukupan unos polifenola verovatno premašuje 1 g/dan, a sa druge strane teško je sprovesti dijetu koja je u potpunosti oslobođena polifenola.

2.1.3. Metabolizam flavonoida

Flavonoidi, povezani sa jednim ili više molekula šećera su glikozidi flavonoida, dok su u slobodnoj formi nazvani aglikoni. S izuzetkom flavanola (katehina i proantocijanidina), flavonoidi se nalaze u biljkama uglavnom u formi glikozida³⁸. Sposobnost da se proizvedu specifični metaboliti flavonoida, zavisi od specifičnosti mikroflore debelog creva³⁹.

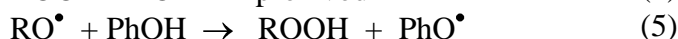
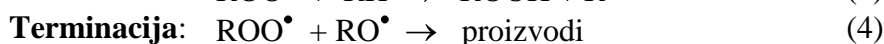
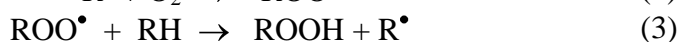
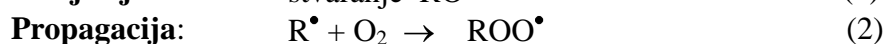
Biovarijabilnost flavonoida je relativno niska, zahvaljujući sporij apsorpciji i brzij eliminaciji. Kako se flavonoidi brzo i ekstezivno metabolišu, biološka aktivnost metabolita nije uvek ista kao početnih komponenti. Maksimalna koncentracija izoflavona i flavanona u plazmi ne premašuje 10 $\mu\text{mol/l}$ nakon *per os* primene. Maksimalna koncentracija antocijanina, flavanola i flavonola u plazmi izmerena posle uzimanja čaja je uglavnom manja od 1 $\mu\text{mol/l}$ ⁵.

Enzimi intestinalnih mikroorganizama hidrolizuju glikozide flavonoida do njihovih konstituenasa aglikona i šećera⁴⁰. Većina aglikona se zatim metaboliše uz pomoć mikroorganizama, dok se zanemarljiv deo apsorbuje u formi aglikona⁴¹.

2.2. SLOBODNI RADIKALI

2.2.1. Oksidacija

Reakcija molekulskog kiseonika sa organskim molekulima pod umerenim uslovima obično ukazuje na autooksidaciju, što se može prikazati šemom 1.



gde je (RH) organski supstrat, (ROOH) organski peroksid, a (PhOH) fenol

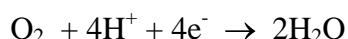
Šema 1. Mehanizam oksidacije organskih molekula

Reakcija (1) se odvija brzo, dok je reakcija (4) znatno sporija. Sve organske supstance koje su izložene delovanju vazduha, podležu oksidativnoj degradaciji. Usporavanje ove degradacije se vrši dodavanjem malih količina antioksidanasa. Fenolna jedinjenja su polazne supstance mnogih antioksidanasa koji su u komercijalnoj upotrebi. Njihova aktivnost raste sa sposobnošću da vežu peroksi radikal (ROO^\bullet), koji omogućuje lančanu reakciju, doniranjem fenolnog atoma vodonika (reakcija 5). Navedena reakcija je mnogo brža u odnosu na napad organskog supstrata od strane peroksi radikala (reakcija 3).

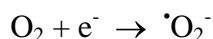
2.2.2. Reaktivne kiseonične vrste

Naziv **reactive oxygen species** (ROS) je zajednički za radikale sa centralno postavljenim elektronom na kiseoniku, kao što su superoksidni anjon radikal (O_2^-), hidroperoksi radikal ($\text{O}_2\text{H}^\bullet$) i hidroksi (OH^\bullet) radikal, tako i za neradikalske vrste koje sadrže kiseonik, napr. vodonik peroksid (H_2O_2), singlet kiseonik ($^1\text{O}_2$), hipohlorna kiselina (HOCl) i ozon (O_3).

Kiseonik je snažno oksidaciono sredstvo. Reakcija potpune redukcije kiseonika ima veliki redukcijski potencijal (približno 0,8 V), iako je za nju potrebna i velika energija aktivacije⁴². Iz ovih razloga reakcije, kao što su reakcije respiratornog lanca u mitohondrijima, relativno je teško postići:



Molekul kiseonika u osnovnom stanju ima dva nesparena elektrona. Redukcijom nastaje superoksidni anjon radikal (O_2^-), a zatim superoksidni anjon O_2^{2-} , koji protonovanjem prelazi u vodonik peroksid (H_2O_2):



Superoksidni radikal je u vodenim medijumima, kao što je citoplazma, slab oksidans, a mnogo je snažnije redukciono sredstvo koje može redukovati komplekse sa gvožđem, kao što je citohrom c⁴³.

Hidroksiperoksidni radikal ($\text{O}_2\text{H}^\bullet$) jače je redukciono sredstvo i oksidans od superoksidnog radikala, kada je prisutan u malim količinama pri pH vrednosti 7,4.

Vodonik peroksid nastaje kao proizvod delovanja urat oksidaze, glukoza oksidaze, D-aminokiselinske oksidaze ili superoksid dismutaze (SOD). Ovaj molekul lako prolazi kroz ćelijsku membranu, a u prisutvu jona prelaznih metala stvara vrlo reaktivne slobodne radikale. Razgrađuje se delovanjem katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPx), kao i pojedinih drugih peroksidaza.

U unutrašnjosti ćelije slobodni kiseonikovi radikali mogu nastati u toku uobičajenih ćelijskih procesa ili mogu biti indukovani određenim egzogenim supstancama. Načini generisanja superoksidnog radikala dele se na enzimske (u toku katalitičkih reakcija NADPH oksidaze, NADPH-P450 reduktaze, ksantin oksidaze, superoksid dismutaze), ćelijske (radom makrofaga, leukocita, u respiratornom lancu, delovanjem mikrozomalne oksigenaze), a može nastati i delovanjem okruženja (UV- i X-zraci, toksične kemikalije, aromatična nitro jedinjenja). UV zračenje izaziva formiranje OH^\bullet iz vode i O_2^- iz rastvorenog kiseonika, putem foto-indukovane ekscitacije⁴⁴.

Superoksidnom ($\cdot\text{O}_2^-$) radikal se pripisuje kako pozitivna, tako i negativna biološka funkcija, dok hidroksil radikal ($\cdot\text{OH}$) deluje isključivo negativno, zbog svoje visoke reaktivnosti⁴². $\cdot\text{OH}$ se pretežno stvara putem disproporcije H_2O_2 , u reakciji oksidacije jona Fe^{2+} uz pomoć vodonik peroksida. Oba reaktanta (Fe^{2+} i H_2O_2) su prisutni kako u fiziološkim, tako i u patofiziološkim uslovima. Superoksid se spontano emituje iz mitohondrija.

Nastali H_2O_2 u prisustvu jona gvožđa i bakra daje reaktivne hidroksilne radikale i/ili hipohlornu kiselinu (HOCl) u prisustvu Cl^- jona, čije nastajanje katalizira enzim mijeloperoksidaza⁴⁵.

Određivanje aktivnosti mijeloperoksidaze može poslužiti kao pokazatelj infiltracije leukocita na mestu upale⁴⁶. Stvaranje radikala u unutrašnjosti mitohondrija nastaje kao posledica nedostatka elektrona koji prelaze na kiseonik, redukujući se pritom do $\cdot\text{O}_2^-$.

Hidroksi radikali nastaju enzimski (neradikalnim putem, odnosno delovanjem glikolat oksidaze, acetyl-Co oksidaze, NADPH oksidaze, ureat oksidaze i drugim), kao i dismutacijom superoksidnog radikala (radikalni put). Singletni kiseonik ($^1\text{O}_2$) nema svojstva radikala, međutim vrlo je reaktivan zbog spinskih osobina (ima dva nesparena elektrona paralelnih spinova). Uz reaktivne kiseonikove vrste, veliku važnost imaju i reaktivna azotova jedinjenja, od kojih su najvažniji azotmonoksidni radikal $\text{NO}\cdot$ i azotdioksidni radikal $\text{N}_2\text{O}\cdot$. ROS imaju centralnu ulogu u delovanju raznih stranih supstanci (napr. ksenobiotika), a njihov povećan sadržaj je uglavnom povezan sa raznim formama oštećenja tkiva⁴⁷. Povećano stvaranje ROS-a može biti prvi pokazatelj progresije ili sekundarna posledica prilikom oštećenja tkiva. Kontrolisano stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta ima veoma važnu ulogu u različitim fiziološkim procesima, kao što su receptorima-posredovani signalni putevi i imuni odgovor⁴⁸.

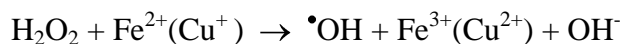
Nasuprot tome, neizbalansirano stvaranje stabilnih radikala visoko je korelisano sa mnogim patofiziološkim bolestima, kao što su neurodegenerativne i maligne bolesti, *diabetes mellitus* i druge. Neki od najpoznatijih negativnih efekata povećanog stvaranja ROS-a u biološkim sistemima obuhvataju peroksidaciju membranskih lipida, oksidativno oštećenje nukleinskih kiselina i šećera, kao i oksidaciju sulfhidrilnih i drugih grupa u proteinima⁴⁹. Za slobodne radikale koji imaju kiseonik u strukturi se smatra da su sposobni da iniciraju i propagiraju kancerogenezu. Postoji povećan interes za ispitivanje uloge ROS-a kod arterioskleroze, šloga, oštećenja miokarda, trauma, artritisa, kancera, kao i sumarnog uticaja ovih vrsta na starenje organizma⁵⁰.

2.2.3. Slobodni radikali nastali tokom lipidne peroksidacije

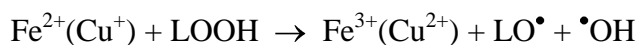
ROS mogu indukovati lipidnu peroksidaciju koja raskida membranski integritet. Poznato je da lipidna peroksidacija korelira sa smanjenjem membranske fluidnosti⁵¹. Promene u fluidnosti utiču na osobine i funkciju ćelijske membrane, kao što su rast ćelija, prenos signala, permeabilnost, transportni sistem, funkcionisanje receptora ili enzimsku aktivnost⁵².

Gvožđe ima zadatak prenosa elektrona između kisonika i bioloških molekula⁵³. Oksidacija organskih jedinjenja u prisustvu gvožđa i vodonik peroksida naziva se Fenton-ovom hemijom, u čast H. J. H. Fenton-a koji je u XIX veku sproveo istraživanja vezana za oksidaciju vinske kiseline⁵⁴.

Hidroksi radikal ($\cdot\text{OH}$), jedan od najsnažnijih poznatih oksidanasa, može nastati Fenton-ovom reakcijom:



Gvožđe može reagovati i sa lipidnim hidroperoksidima (LOOH), dajući reaktivne lipidne alkoksil radikale $\text{LO}\cdot$ koji dalje učestvuju u lipidnoj oksidaciji:

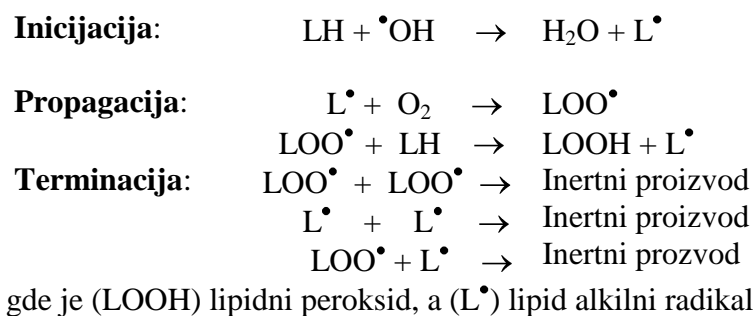


Gvožđe je neposredno povezano sa lipidnom peroksidacijom, a ta pojava je praćena povećanjem malondialdehida (MDA) i drugih reaktivnih jedinjenja sa tiobarbiturnom kiselinom (TBARS)⁵⁵. Unos velikih količina gvožđa i bakra dovodi do degenerativnih bolesti mozga i razvoja tumora, a zabeležene su i promene u aktivnosti superoksid dismutaze⁴². Za neke flavonoide je utvrđeno da inhibiraju kako enzimsku, tako i neenzimsku lipidnu peroksidaciju. Flavonoidi, kao što je kvercetin, mogu suprimirati lipidnu peroksidaciju u model sistemima⁵⁶ i nekim biološkim sistemima, kao što su mitohondrije, mikrozomi⁵⁷, hloroplasti⁵⁸ i eritrociti⁵⁹.

Lipozomi se često koriste kao dobri modeli membrana, ali se ne može potpuno poistovetiti prirodna ćelijska membrana i lipozomi. To su samoformirajuće koloidne čestice, slične strukture i sastava kao što je ćelijska membrana⁵⁷. Lipozomi su sferne vezikule prečnika od 10 do 1.000 nm. Prednost u ispitivanju oksidacije lipida je što se uticaj slobodnih radikala može ispitati bez hemijskih sistema za proizvodnju reaktivnog oblika kiseonika. Opseg inhibicije enzimske aktivnosti je pozitivno korelisan sa brojem hidroksilnih grupa u izoflavonskom jezgru. Ispitujući inhibitorno delovanje na lipidnu peroksidaciju mikrozoma jetre pacova⁶⁰ utvrđeno je da su 6,7-dihidroksilni izoflavoni više od 80 puta aktivniji u poređenju sa α -tokoferolom.

Pri dodatku lipidnim radikalima, ROS može reagovati sa drugim biomolekulima i formirati organske hidrofilne radikale (kao napr. askorbil radikal, semihinon, itd). Lipidna peroksidacija se može inhibirati flavonoidima koji deluju kao jaki "skevendžeri" superoksidnog radikala ($\cdot\text{O}_2^-$)⁶¹ i gase singlet kiseonik ($^1\text{O}_2$). Kada je samostalno prisutan u sistemu, $\cdot\text{O}_2^-$ nije sposoban da inicira lipidnu peroksidaciju, dok $\cdot\text{HO}_2$ (protonovana forma $\cdot\text{O}_2^-$) ispoljava dejstvo u izolovanim polinezasićenim masnim kiselinama⁵⁰.

Značaj $^1\text{O}_2$ u lipidnoj peroksidaciji je zanemarljiva. Inicijacija lipidne peroksidacije može biti indukovana $\cdot\text{OH}$ i slobodnim radikalima metalnih jona (kao što su napr. feril i feril kompleksi). "Skevendžing" $\cdot\text{OH}$ molekulima flavonoida umanjuje lipidnu peroksidaciju. Reakcioni mehanizam hidroksi radikala ($\cdot\text{OH}$) i masnih kiselina (LH) je prikazan na šemi 2.



Šema 2. Mehanizam lipidne peroksidacije

Lipidna peroksidacija može biti sprečena u inicijalnoj fazi “skevendžingom“ slobodnih radikala, dok se lančana reakcija (propagacija) može zaustaviti peroksi-radikalnim “skevendžinzima“, kao što su fenolne komponente.

2.2.4. Oksidativni stres i starenje

Hearman⁶² je 1956. godine utvrdio da autooksidacija deluje na čoveka (i druge sisare), a teoriju je nazvao slobodno-radikalnom teorijom starenja. Po njoj, starenje nastaje kao rezultat endogenih kiseoničnih slobodnih radikala, koji se stvaraju tokom normalnog procesa metabolizma razaranjem strukture biopolimera, što rezultuje oštećenjem ćelija. Tako je uspostavljena mehanicistička veza između metaboličkih procesa i starenja. Pre jednog stoleća zapaženo je da životinje koje imaju brži metabolizam imaju kraći životni vek. Analize su pokazale da je stvaranje slobodnih radikala, pre nego nivo metaboličkih procesa, u većoj korelaciji sa dugovečnošću.

Ravnoteža između stvaranja slobodnih radikala i antioksidativne odbrane određuje nivo oksidativnog stresa. Prilikom nastanka stresa, odbrana organizma zavisi od sposobnosti ćelija da se suprostave stresu i obnove oštećene molekule⁶³. Ukoliko je oksidativni stres važan za starenje, tada će svi faktori koji povećavaju otpornost na stres, delovati u pravcu sprečavanja starenja i dovesti do produženja života. Nakon višegodišnjih istraživanja je utvrđeno da životni vek sisara ne može biti značajno produžen antioksidansima, ali srednja vrednost trajanja života može porasti. Sa ovog stanovišta, teorija slobodno-radikalnog starenja⁶⁴ ukazuje da su slobodni radikali uključeni u etiologiju i razvoj mnogih hroničnih bolesti, koje dovode do skraćenja prosečnog životnog veka. Za čoveka, ove hronične bolesti su pre svega arterioskleroza, emfizem i rak. Od antioksidanasa se očekuje da predstavljaju ključne komponente zaštite ćelija od oštećenja, delujući na sakupljanje slobodnih radikala i tako umanjujući u izvesnom stepenu bolest.

2.3. ANTIOKSIDANSI I ANTIMIKROBNI AGENSI

2.3.1. Antioksidansi

Antioksidansi su supstance koje u malim koncentracijama u odnosu prema supstratima dovode do odlaganja ili inhibicije oksidacije supstrata.

Delovanje antioksidansa može se opisati sledećim mehanizmima, uklanjanjem:

- kiseonika, ili uticajem na smanjivanje koncentracija kiseonika;
- metalnih jona;
- ciljnih ROS-a kao superoksida ili vodonik peroksida;
- slobodnih radikala;
- singletnog kiseonika.

Membranski antioksidansi se svojim lipofilnim delovima integrišu u membranske sisteme, delujući u njima lokalno (tabela 1). Najpoznatiji antioksidansi su vitamini A, E i β -karoten. Ove prirodne supstance su važne u prevenciji kancera i kardiovaskularnih bolesti⁶⁵. Detoksikacija ROS-a u ćelijama se obezbeđuje kako enzimskim, tako i neenzimskim sistemima koji čine antioksidativni odbrambeni sistem. Enzimski sistem obuhvata intenzivno proučavane enzime, kao što su SOD, katalaza, glutathion peroksidaza, kao i glutathion regenerišuće enzimske sisteme⁶⁶. Neki enzimski sistemi kao SOD i katalaza, specifično deluju na ROS, dok drugi enzimski

sistemi redukuju tiole. Neenzimski antioksidansi su manje specifični, a mogu da gase i druge radikale, kako organske, tako i neorganske

Tabela 1. Membranski antioksidansi

| Membranski antioksidans | Delovanje |
|-------------------------|---|
| Vitamin E | Antioksidativno delovanje ostvaruje kidanjem lanaca |
| β-Karoten | Ima sposobnost uklanjanja singletnog kiseonika i slobodnih radikala |
| Koenzim Q | Ima antioksidativno delovanje u respiratornom lancu |

Neenzimski antioksidansi se dele na rastvorljive u vodi i u mastima, u zavisnosti da li su reaktivniji u vodenoj fazi ili u lipofilnom regionu ćelijske membrane. Hidrofilni antioksidansi uključuju askorbinsku kiselinu i urat. Ubihinon retinoidi, karotenoidi i tokoferol (vitamin E), predstavljaju neke od antioksidanasa rastvorljivih u mastima⁴⁹.

Plazma proteini, glutation, urat, ubihinon i drugi endogeni antioksidansi, kao što su askorbinska kiselina, karotenoidi, retinoidi, flavonoidi i tokoferol, konstituišu neke sastojke antioksidanasa u hrani (tabela 2).

Tabela 2. Niskomolekularni endogeni i hidrofilni antioksidansi

| Antioksidans | Delovanje |
|--------------|---|
| Glutation | Uklanja radikale, učestvuje u konjugaciji, regeneraciji askorbata i kao koenzim |
| Vitamin C | Uklanja slobodne radikale doniranjem elektrona, pri čemu nastaje slabo reaktivan askorbilni radikal |
| Polifenoli | Uklanjaju slobodne radikale i vežu metalne jone |
| Bilirubin | Uklanja peroksidne radikale |
| Urat | Uklanja radikale i veže metalne jone |
| Glukoza | Uklanja hidroksi radikale |
| Selen | Koenzim glutacione peroksidaze |

Ove komponente imaju potencijal za gašenje i "skevendžing" različitih radikala (sa centralno postavljenim kiseonikom, centralno postavljenim ugljenikom, alkoksil, peroksil i fenoksil radikali) i ROS-a. Neki antioksidansi se mogu obnavljati uz pomoć enzimskih sistema, kao i pod uticajem drugih, neenzimskih antioksidativnih sistema⁶⁷.

2.3.2. Antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja

Biljni polifenoli se ne smatraju uvek pravim antioksidansima, ali je u mnogim *in vitro* istraživanjama ustanovljen antioksidativni potencijal fenolnih materija u vodenoj fazi, "skevendžing" radikala, kao i pojačanje rezistentnosti prema oksidaciji lipoproteina male gustine, koji ukazuju na patogenezu u slučaju koronarnih bolesti⁶⁸. Smatra se da se deo antioksidativnog potencijala mnogih vrsta voća i bobica može pripisati polifenolnim komponentama.

Sposobnost monomernih fenola da deluju kao antioksidansi zavisi od stepena konjugacije, broja i rasporeda susptitueneta (funkcionalnih grupa) i molekulske mase. Flavonoidi sa najviše hidroksilnih grupa se najlakše oksiduju⁶⁹.

Za jednostavne flavonoidne oligomere stepen polimerizacije je u pozitivnoj korelaciji sa sposobnošću "skevendžinga" slobodnih radikala. Flavonoidi su veoma efikasni "skevendžeri" slobodnih radikala u *in vitro* uslovima⁷⁰. Razmatranjem veze struktura-delovanje flavonoida, poređenjem antioksidativne aktivnosti kvercetina, katehina i cijanidina, utvrđena je važnost prisustva nezasićenja na prstenu C (slika 3), koje omogućava delokalizaciju i stabilizaciju ariloksil radikala⁷¹. OH grupa u položaju C-3 i njen položaj u blizini keto grupe u položaju C-4, su neophodni preduslovi za maksimalnu efikasnost "skevendžinga" radikala⁷².

Slabiji antioksidativni potencijal katehina (slike 2 i 3) se može pojačati do kvercetina sa dvostrukom vezom C2-C3 i okso funkcionalnom grupom, estarskom vezom OH grupe u položaju C-3 galne kiseline, i OH grupom u položaju C-5' B prstena⁷³. Iz ovih razloga je (-)-epigalokatehin-3-O-galat jedan od najefikasnijih "skevendžinga" superoksidanog radikala⁷⁴. Monofenolni prsten B nije efikasan donor vodonika. Njegova antioksidativna aktivnost je maksimalna kada je supstituisan sa dve hidroksilne grupe u *orto*-difenolnom rasporedu. Prisustvo treće OH grupe na prstenu B ne dovodi do povećanja efektivnosti, izuzev u slučaju katehina. Uticaj koji antioksidativnoj aktivnosti daju hidroksilne grupe u prstenu A je od značaja ukoliko nema dihidroksilne strukture u B prstenu⁷⁵. *O*-metilacija hidroksilnog supstituenta uglavnom inaktivira antioksidativnu aktivnost flavonoida⁷⁶. 3-glikozilacija flavonoida takođe redukuje aktivnost u odnosu na odgovarajuće aglikone⁷⁷. 3',4'-ortodihidroksil konfiguracija prstena B i keto grupa 4, kao i OH grupa u položaju 3 na prstenu C, doprinose optimumu antioksidativne aktivnosti.

Middleton i sar.¹² su dali opšte strukturne karakteristike flavonoida koje doprinose najefikasnijoj "skevendžing" aktivnosti (tabela 3).

Tabela 3. Karakteristike flavonoidne strukture koja obezbeđuje najefikasniju radikal "skevendžing" aktivnost

Katehol - *o*-dihidroksilna grupa u prstenu B doprinosi povećanoj "skevendžing" sposobnosti;

Pirogalol - trihidroksil grupa u prstenu B katehola, kao kod miricetina, daje veću aktivnost. Dvostruka veza C2-C3 u C prstenu povećava aktivnost, jer doprinosi stabilnosti proizvedenog fenoksi radikala;

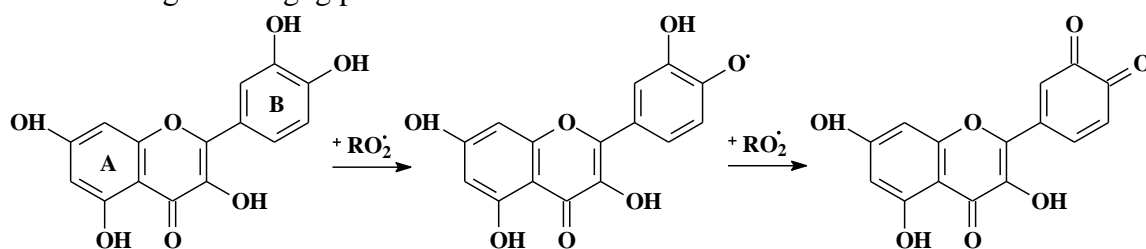
4-okso-keto grupa u položaju 4 prstena C, pogotovo kada je povezana sa dvostrukom vezom, povećava "skevendžing" aktivnost delokalizacijom elektrona u prstenu B;

3-OH grupa prstena C daje izuzetno jake "skevendžere". Verovatno je najefikasnija kombinacija dvostruke veze C2-C3 i okso grupe u položaju 4 odmah nakon katehol grupe;

5-OH i 7-OH grupa mogu doprineti "skevendžing" potencijalu u nekim slučajevima.

U istraživanjima Uri-ja⁷⁸ sposobnost flavonoida da inaktiviraju organske peroksil radikale se može uporediti sa uobičajeno korišćenim fenolnim antioksidansima, BHT (butilovani hidroksitoluen) i BHA (butilovani hidroksianizol). Mehanizam dvo-elektronske peroksil radikalske reakcije sa 3',4' i 2',5'-dihidroksiflavonolima i građenje odgovarajućih hinona je prikazan na slici 7. Prva

jedno-elektronska oksidacija daje flavonoidni fenoksi radikal, sa naknadnim "skevendžingom" drugog peroksi radikala.



Slika 7. Mehanizam reakcije flavonoida i peroksi radikala

Kao posledica ove reakcije organski peroksil radikal selektivno napada B prsten 3',4'-dihidroksiflavonoida, što važi i za 2',5'-dihidroksiflavonoide.

Antioksidativne osobine fenolnih kiselina imaju važnu ulogu u stabilnosti hrane, kao i u antioksidativnim odbrambenim mehanizmima bioloških sistema⁷⁹. Monohidroksilne benzojeve kiseline su veoma slabi antioksidansi, samo *m*-hidroksibenzoeva kiselina ima antioksidativnu aktivnost. Aktivnost značajno raste kod dihidroksilnih supstituisanih kiselina čiji antioksidativan odgovor zavisi od položaja hidroksilnih grupa u prstenu. Galna kiselina je najbolji antioksidans od svih hidroksibenzojevih kiselina⁷⁹. Aktivnost može porasti sa metoksilacijom supstituenata, dok formiranje glikozida sa karboksilnim grupama nema uticaja na ove osobine. Antioksidativna aktivnost monofenola u mastima raste proporcionalno sa jednim ili dva metoksi substituenta na *o*-poziciji u odnosu na hidroksilnu grupu⁸⁰.

Utvrđeno je da su tanini ili polimerni polifenoli potentniji antioksidansi u poređenju sa jednostavnim monomernim fenolima⁸¹ i da poseduju malu, ili da uopšte ne poseduju pro-oksidativnu aktivnost, dok su mnogi mali fenolni molekuli pro-oksidantni. Kada se tanini upotrebljavaju kao biološki antioksidansi mora se imati u vidu uticaj ovih materija na digestiju, jer poseduju potencijal umanjavanja svarljivosti hranljivih materija⁸².

2.3.3. EPR tehnika

Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy - EPR spektroskopija je savremena i precizna spektroskopska analitička tehnika koja se može koristiti za praćenje fizičkih i hemijskih procesa, kao i za određivanje strukture paramagnetnih supstanci. EPR spektroskopija se koristi u mnogim naučnim oblastima, fizici, biologiji i medicini. U hemiji ova metoda je našla veoma raznovrsnu primenu⁸³, pogodna je za praćenje oksido-redukcionih procesa, slobodnoradikalskih reakcija, uključujući ispitivanje kinetike reakcije, molekulske ekscitacije, slobodnoradikalskih reakcija u organskoj hemiji. Ova tehnika omogućava direktnu detekciju slobodnih radikala.

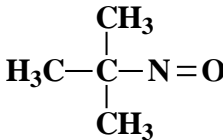
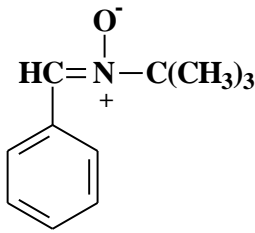
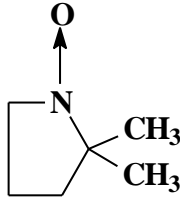
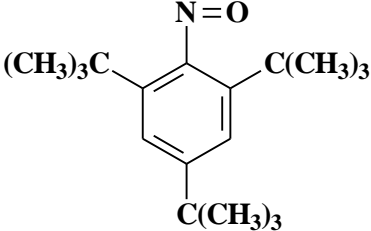
EPR spektroskopija je primenljiva za sve paramagnetne sisteme koji imaju zbirni elektron spinski moment različit od 0. Karakteriše je velika osetljivost (10^{-12} mol/l), mala masa uzorka i nedestruktivno delovanje. Za EPR spektralnu analizu slobodnih radikala je neophodno poznavanje prirode ispitivanih slobodnoradikalskih vrsta, odnosno da li su u pitanju relativno stabilni slobodni radikali (dugog vremena života) ili relativno nestabilni slobodni radikali (kratkog vremena života). Potrebno je

poznavati konstante brzina reakcija koje se odvijaju, kao i da li je u sistemu prisutan rastvarač⁸⁴.

Ova tehnika se koristi za utvrđivanje aktivnosti antioksidanasa, kao i za njihovu lokalizaciju unutar lipozoma⁸⁵. Ispitivanja antioksidativnih radikala EPR tehnikom obezbeđuje podatke o delokalizaciji elektrona u antioksidansu, koji su u korelaciji sa antioksidativnim osobinama. EPR se takođe može koristiti za praćenje gubitka inteziteta signala DPPH[•], u cilju detektovanja brzine kojom radikali antioksidansima oduzimaju fenolni vodonik (koji zato prigušuje EPR signal), a zatim dolazi do formiranja antioksidantnog radikala.

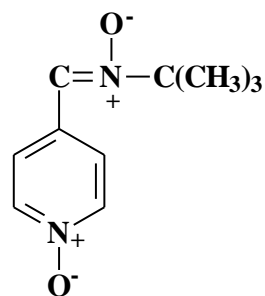
EPR spektralna analiza relativno stabilnih radikala uglavnom ne zahteva posebnu pripremu uzorka i dodatnu aparaturu. Nestabilni slobodni radikali imaju vrlo kratko vreme života, pa je njihova detekcija praktično nemoguća. Oni se mogu detektovati samo ukoliko im se na poseban način, tokom dužeg perioda potrebnog za EPR analizu, koncentracija održava konstantnom. Jedna od najčešće primenjivanih metoda je „Spin trapping“ metoda. Po ovoj metodi se nestabilni radikali hvataju pomoću određenih ogranskih jedinjenja, tzv. „spin trapova“ i nastaju stabilni radikali, tzv. „spin adukti“ koji se mogu detektovati EPR spektroskopijom. Najčešće korišćeni „spin trapovi“ su prikazani u tabeli 4.

Tabela 4. „Spin trapovi“

| Naziv | Skraćenica | Struktura |
|---|------------|--|
| <i>tert</i> -Nitrozobutan | tNB |  |
| <i>N-tert</i> -butil- α -fenilnitron | PNB |  |
| 5,5-Dimetil-1-pirolin-N-oksid | DMPO |  |
| 2,4,6-Tri- <i>tert</i> -butilnitrozobenzen | BNB |  |

**α -(4-Piridil-1-
oksid)-N-*terc*-
butil-nitron**

4-POBN



2.3.4. Antimikrobna aktivnost fenolnih jedinjenja

Stolećima se preparati koji sadrže flavonoide koriste kao glavni aktivni konstituensi preparata za lečenje bolesti⁸⁶. Lekovita svojstva propolisa su pominjana još u Starom Zavetu, a prepisivao ga je i Hipokrat (460-377 p.n.e.) u Staroj Grčkoj za lečenje rana i čira. Smatra se da su za antimikrobne osobine propolisa odgovorni flavonoidi galangin i pinocembrin⁸⁷.

Flavonoidi se sintetišu u biljkama kao odgovor na mikrobiološke infekcije⁸⁸. Zbog toga ne iznenađuje da ova jedinjenja poseduju i u *in vitro* uslovima antimikrobnu aktivnost u odnosu na širok spektar mikroorganizama⁸⁹. Najviše su ispitivane antibakterijske i antifungalne osobine, a utvrđena je i izvesna antivirusna aktivnost ovih komponenti⁹⁰.

Veza struktura-aktivnost u slučaju flavonoida je kontradiktorna. Naime, manje polarne komponente, kao što su flavonoidi bez fenolnih grupa u prstenu B, su manje aktivni u odnosu na flavonoide sa OH grupama⁹¹. U slučaju meticilin-rezistentnih bakterija *Streptococcus aureus*, alifatični bočni lanac na flavonskom prstenu A (položaj C-6 ili C-8) čini molekul lipofilnijim i povećava antibakterijsku aktivnost u poređenju sa nesupstituisanim flavonima⁹². Fenolne komponente toksično deluju u odnosu na mikroorganizme, a mehanizam delovanja obuhvata inhibiciju oksidovanih komponenti, kao i moguću reakciju sa sulfhidrilnim grupama, kroz više nespecifičnih reakcija sa proteinima⁹³. Utvrđeno je da je aktivnost flavonoida rezultat njihove sposobnosti da se kompleksiraju sa ekstracelularnim i rastvorljivim proteinima i daju komplekse sa bakterijskim ćelijskim zidom.

Za antibakterijsku aktivnost u odnosu na *S. aureus* i *Proteus vulgaris* potreban je 3',4',5'-trihidroksi prsten B, kao i slobodna OH grupa u položaju C-3⁹⁴. Puupponen-Pimiä i sar.⁹⁵ su utvrdili široku antimikrobnu aktivnost ispitivanih flavonoida u odnosu na *Lactobacillus* i *Escherichia coli*. Katehini iz čaja, posebno (+)-galokatehin i (-)-epigalokatehin, inhibiraju rast *Streptococcus mutans* (izazivači karijesa zuba)⁹⁶. Pored ove bakterijske vrste, katehini inhibiraju u *in vitro* uslovima *Vibrio cholerae* O1, *Shigella*, kao i neke druge bakterije i mikroorganizme⁹⁷.

(-)-Epigalokatehin poseduje antibakterijsku aktivnost u odnosu na *Staphylococcus epidermidis* (G+), *Proteus vulgaris* (G-) i *S. aureus* (G+). Katehin izolovan iz *Camellia sinensis*, deluje na *Shigella spp.* u netoksičnim koncentracijama⁹⁸. Lipofilni flavonoidi (metoksilovani) ne poseduju delovanje u odnosu na mikroorganizme⁹⁹. Glikozidi kvercetina i kvercetagetina nemaju izraženo delovanje u odnosu na neke patogene mikroorganizme¹⁰⁰.

Scalbert¹⁰¹ je utvrdio da tanini ispoljavaju inhibitorno delovanje na filamenozne alge, kvasce i bakterije. Procijanidini inhibiraju rast (G-) bakterije *Pseudomonas maltophilia*¹⁰². Kondenzovani tanini su takođe aktivni u odnosu na (G+) *Streptococcus mutans*¹⁰³, dok su galokatehini aktivni protiv G(+) i G(-)

bakterija¹⁰⁴. Utvrđeno je da se kondenzovani tanini vezuju za ćelijski zid bakterija preživara, sprečavajući rast i aktivnost proteaza¹⁰⁵. Iako su tanini poznati kao antimikrobni agensi, postoje neke vrste bakterija koje mogu rasti na materijalu bogatom taninima¹⁰¹, razvijanjem rezistencije u odnosu na antimikrobne komponente tanina.

Galna kiselina i njeni metil estri ispoljavaju jasan inhibitorni efekat na nekoliko veoma opasnih intestinalnih bakterija¹⁰⁵, a za šest drugih jednostavnih fenolnih kiselina je utvrđeno da su aktivni protiv različitih bakterija i plesni¹⁰⁶. Vanilinska i kafena kiselina u potpunosti inhibiraju rast α -toksina koji stvaraju *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*. Za antimikrobnu aktivnost meda utvrđeno je da su potencijalno značajne prisutne fenolne kiseline¹⁰⁷.

2.4. BIOLOŠKA I FARMAKOLOŠKA AKTIVNOST FENOLNIH JEDINJENJA

Fenoli prevazilaze očekivanja u tretmanu pojedinih bolesti, zahvaljujući glavnim karakteristikama samog fenolnog jezgra, kao što su:

- kompleksiranje sa metalnim jonima (Fe, Mn, Va, Cu, Al, Ca);
- antioksidativna aktivnost i "skevendžing" radikala;
- mogućnost da grade komplekse sa drugim molekulima, kao što su proteini i polisaharidi.

Metalni joni (gvožđe i bakar), mogu katalizovati stvaranje slobodnih radikala. Sposobnost flavonoida da helatizira (veže) metalne jone je utvrđena u *in vitro* uslovima¹⁰⁹. U organizmu su Fe i Cu uglavnom vezani za proteine, pa je tako ograničeno njihovo delovanje u stvaranju slobodnih radikala. Osobina metal-helatizirajućeg efekta flavonoida je potencijalno važna za patološka stanja, kada je prisutan višak gvožđa ili bakra, ali nije poznato da flavonoidi i njihovi metaboliti funkcionišu kao helatizirajući agensi u *in vivo* uslovima. Fiziološka i farmakološka delovanja polifenolnih materija¹¹⁰ su data u tabeli 5.

Tabela 5. Fiziološka i farmakološka delovanja fenolnih supstanci

| Delovanje |
|--|
| Anthelmintičko delovanje |
| Moluscidno delovanje |
| Baktericidno delovanje |
| Antihepatoksično delovanja |
| Stimulacija jodiranja fagocitnih ćelija |
| Inhibicija humane imunodeficientne replikacije virusa (HIV) |
| Inhibicija humanog simpleks virusa (HSV) |
| Inhibicija glukozil transferaze <i>Streptococcus mutans</i> -a (dentalnog karijesa) |
| Inhibicija autooksidacije askorbata (zeleni čaj) |
| Inhibicija lipooksigenazno zavisne peroksidacije "francuski paradoks" |
| Katalizovanje antitumor aktivnosti: citotoksični efekat, inhibicija rasta tumora, inhibicija ornitin dekarboksilaznog odgovora |
| Inhibicija ksantin oksidaze i monoamino oksidaze |

Mnoga *in vitro* istraživanja su ukazala na antioksidativni potencijal fenolnih materija u vodenoj fazi, kao i pojačanje rezistentnosti prema oksidaciji lipoproteina niske gustine, što predstavlja patogenezu kod koronarnih bolesti⁶⁸. S obzirom da je dokazana evidentna inhibicija oksidacije LDL-a i stvaranja krvnih ugrušaka delovanjem flavonoida, smatra se da redovna upotreba hrane i pića koja sadrže flavonoide može zaštititi od arteroskleroze i tendencije ka trombozi¹¹¹. Međutim, iako

početne hipoteze potvrđuju biološke efekte flavonoida kao antioksidanasa, raspoloživi rezultati dobijeni na ćelijskim kulturama ukazuju da su mnogi biološki efekti flavonoida povezani sa promenom signalnih puteva ćelija¹¹².

Kalcijum je odgovoran za regulaciju širokog opsega ćelijskih procesa. Paradoksalno, ali iako je sposoban da stimuliše mnoge ćelijske procese, u isto vreme je izrazito toksičan. Utvrđeno je da povećani sadržaj kalcijuma može dovesti do različitih patoloških procesa, uključujući hipertenziju, arterosklerozu i moguće neurološke poremećaje, kao što su depresija i manična depresija¹¹³. Homeostaza kalcijuma je regulisana ekstracelularnim ciklusom, koji kontroliše protok kalcijuma između citosola i intracelularnih skladišta u sarkoplazmatičnom retikulumu¹¹⁴.

Hipertenzija je uobičajena posledica povišenog intracelularnog nivoa kalcijuma. Limfocitni citosolni kalcijum je znatno povišen kod hipertenzivnih pacijenata¹¹⁵. Platelarna aktivacija koja dovodi do tromboze i miokardičnih oštećenja je takođe rezultat slobodnog citoplazmatičnog kalcijuma. Hronična insuficijencija bubrega, kao i neka oštećenja endokrinih žlezdi¹¹⁶, su povezana sa povećanim bazalnim nivoom citosolnog Ca^{2+} u hepatocitima¹¹⁷. Abnormalnosti u homeostazi kalcijuma impliciraju na niz bolesti CNS-a, demenciju i Alchajmerovu bolest¹¹⁸.

Za flavonoid kvercetin je utvrđeno da ima spazmolitičko delovanje na glatki aortni mišić pacova¹¹⁹, kao i inhibitorno delovanje na intestinalni motilitet kod miševa¹²⁰. Oba efekta se mogu objasniti antagonističkim delovanjem kalcijuma. Upoređivanjem flavonola i flavona, ustanovljeno je da katehin ispoljava najmanju osetljivost na kontraktilni odgovor indukovani vazokonstriktorima¹²¹. Flavoni i fenilmetani imaju jasan inhibitorni efekat na protok kalcijuma, dok kafena kiselina, ferulna kiselina i flavonoidi povećavaju unos Ca^{2+} u ćeliju. Inhibitorni efekat je smanjen glikozidacijom flavonoida.

Vaskularne endotelne ćelije su važne za kardiovaskularni sistem, jer proizvode azot-oksidi koji pojačava arterijsku relaksaciju (vazodilataciju). Arterijska vazodilatacija koja rezultuje endotelnom proizvodnjom azot-oksida, nazvana je endotelno - zavisna vazodilatacija. Dva kontrolisana klinička istraživanja su pokazala da dnevna konzumacija 4-5 šolja crnog čaja u toku jedne nedelje, značajno poboljšava endotelno zavisnu vazodilataciju kod pacijenata sa koronarnim arterijskim bolestima, kao i kod pacijenata sa blago povišenim serumskim holesterolom. Endotelni azot-oksidi inhibira adheziju i agregaciju krvnih ugrušaka⁶.

Tanini nemaju metaboličku ulogu¹⁸, ali u poslednjoj dekadi posebna pažnja se posvećuje antimutagenim i antitumorogenim osobinama ovih jedinjenja, posebno taninske kiseline¹²². Utvrđena je obrnuta proporcionalnost između unosa povrća i voća i raka pluća¹²³, kao i upotrebe luka u ishrani i raka želuca¹²⁴. Kuntz i sar.¹²⁵ su utvrdili da polifenoli mogu imati značajnu ulogu u prevenciji raka debelog creva blokiranjem hiper-proliferacije epitela potpomažući apoptozu. Li i sar.¹²⁶ su utvrdili da izoflavon genistein inhibira ćelije raka dojke, indukuje apoptozu, reguliše ekspresiju gena i ima potencijal za delovanje kod metastaza kancera. Genistein i naringenin inhibiraju proliferaciju ćelija raka, u zavisnosti od vremena i primenjene doze¹²⁷. Ciljna mesta za farmakološko delovanje flavonoida su još uvek nedovoljno poznata, ali postoje indikacije da flavonoidi deluju kao inhibitori kinaza¹²⁸.

2.5. METODE ZA ODREĐIVANJE FENOLNIH JEDINJENJA

2.5.1. Priprema uzorka

Priprema uzorka obuhvata ekstrakciju fenolnih materija, ultrazvučnu ekstrakciju i hidrolizu biljnog materijala ili dobijenih ekstrakata.

2.5.1.1. Ekstrakcija fenolnih materija

Ekstrakcija fenolnih materija iz biljnog materijala je uslovljena njihovom hemijskom strukturom, primenjenom metodom ekstrakcije i rastvaračem, veličinom čestica, kao i prisustvom supstanci koje reaguju sa fenolima¹²⁹. Hemijske strukture fenolnih materija se razlikuju, a ove supstance ispoljavaju sklonost da reaguju sa ugljenim hidratima, proteinima i drugim komponentama i obrazuju komplekse, koji mogu biti slabo rastvorljivi¹³⁰. Ekstrakti biljnog materijala se sastoje od više klasa fenolnih jedinjenja sa različitim rastvorljivošću u primenjenim rastvaračima. Rastvorljivost zavisi od tipa (polarnosti) upotrebljenog rastvarača, stepena polimerizacije fenolnih materija, kao i interakcije sa drugim sastojcima i formiranja kompleksa. Zbog toga ne postoji jedinstvena ili u potpunosti zadovoljavajuća procedura koja je primenljiva za ekstrakciju fenolnih materija.

Najčešće se kao ekstragensi koriste metanol, etanol, aceton, voda, etil-acetat i u manjoj meri, propanol, dimetilformamid i njihove kombinacije¹³¹. Vreme ekstrakcije može biti od 1 min¹³² do 24 sata. Duža ekstrakcija ujedno povećava mogućnost oksidacije fenolnih materija, ukoliko se ne primeni neki redukcionni agens¹³³. Deshpande¹³⁴ je utvrdio da je optimalno vreme ekstrakcije za fenolne materije u suvom grašku 50-60 min. Efikasnost ekstrakcije je uslovljena i odnosom mase uzorka i zapremine primenjenog rastvarača. Naczki i sar.¹³⁵ su ustanovili da se povećanjem ovog odnosa povećava i prinos ekstrahovanih kondenzovanih tanina.

2.5.1.2. Ultrazvučna ekstrakcija

Ekstrakcija koja primenjuje ultrazvuk u cilju intenzifikacije procesa se često zove sonifikacija i predstavlja upotrebu visoko-frekventnog ultrazvuka u operaciji ekstrakcije supstanci iz biljnog materijala. Tip primenjene metode ekstrakcije zavisi od prirode polaznog materijala, odnosno da li je u pitanju biljni materijal¹³⁶ ili životinjska tkiva¹³⁷.

Ultrazvuk proizvodi razaranje ćelija, redukovanje veličine čestica i prolaz ultrazvučnog talasa kroz čvrst materijal, što dovodi do veće dodirne površine između čvrste i tečne faze, kao i boljeg kontakta rastvarača sa komponentama u poređenju sa tradicionalnim metodama ekstrakcije¹³⁸. Ekstrakcija ultrazvukom je brži proces u poređenju sa tradicionalnim laboratorijskim metodama, kao što su napr. maceracija i Soxhlet ekstrakcija, zbog razaranja čestica u biljnom materijalu¹³⁹, a moguće je dobiti isti prinos kao i primenom mikrotalasne ekstrakcije. Njena primena se preporučuje za ekstrakciju supstanci sa manjom molekulskom masom¹³⁶, dok u slučaju ekstrakcije velikih molekula, kao što su napr. DNA ili proteini, mogu nastati poteškoće. Tokom procesa sonifikacije se može generisati dosta toplote, tako da komponente koje su osetljive na toplotu (kao proteini), zahtevaju primenu hlađenja¹⁴⁰.

Tipičan proces podrazumeva ekstrakciju ultrazvukom usitnjenog ispitivanog materijala sa rastvaračem u vremenskom periodu od 0,5 do 2 sata. Ekstrakcija biljnog

materijala primenom ultrazvuka je dala veoma dobre rezultate, a primenjuju se i u industrijskim procesima za dobijanje komponenata sa farmakološkim delovanjem¹⁴¹.

2.5.1.3. Hidroliza

Izvršena su mnoga ispitivanja i identifikacije estara fenolnih kiselina u biljnom materijalu, s obzirom na izuzetnu raznovrsnost ovih derivata. Hidroliza estara do karboksilnih kiselina pojednostavljuje analizu i daje fenolni profil kiselina¹³⁰. Step en kisel o-bazne hidrolize glikozida zavisi od jačine baze-kiseline, prirode šećera i položaja za koji je vezan za flavonoidni nukleus. Tako se glukuronidi opiru kisel o j hidrolizi, dok se u poređenju sa njima glukozidi brže razgrađuju. Hidroliza često prethodi HPLC analizi.

Postoje dva načina za hidrolizu estara, kisel a hidroliza i saponifikacija. U trećoj, manje primenjivanoj tehnici koriste se enzimi (esteraze), odnosno enzim ska hidroliza.

Kisela hidroliza predstavlja tretiranje uzorka sa neorganskim kiselinama, kao što je HCl, u prisustvu vode ili alkohola kao rastvarača, a na temperaturi ključanja ili ispod nje. Koristi se HCl koncentracije 1 - 2 mol/l, a vreme reakcije je od 30 min do 1 sata¹⁴². Basile i sar.⁴ preporučuju sulfatnu kiselinu koncentracije 3 mol/l, vreme ekstrakcije 2 sata na temperaturi od 95°C. Proizvodi hidrolize imaju veoma blizak ili praktično identičan UV spektar.

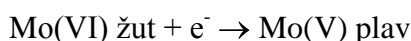
Saponifikacija obuhvata tretiranje uzorka sa rastvorom NaOH, koncentracija od 1 do 4 mol/l. Većina reakcija propisuje sobnu temperaturu, a reakciono vreme varira od 15 min do 8 časova¹⁴³.

Enzimi (pektinaze, celulaze, amilaze) se koriste za hidrolizu veza između šećera i fenolnih kiselina, uz oslobađanje fenolnih kiselina (uglavom ferulne i *p*-kumarne kiseline). Slobodne kiseline se dobijaju hidrolizom veze između acetalne i hemiacetalne grupe šećera i hidroksilne grupe aromatičnog prstena fenolnih kiselina¹⁴⁴.

2.5.2. Kolorimetrijske metode za analizu fenolnih jedinjenja

Folin-Ciocalteu (FC) metodom se određuje sadržaj ukupnih fenola u biljnom materijalu. Metod se zasniva na redukujućoj sposobnosti hidroksinih grupa. Folin-Ciocalteu reagens nije specifičan, jer kao i Folin-Denis reagens detektuje sve fenolne OH grupe supstanci prisutnih u ekstraktima, uključujući i one koji se nalaze u ekstraktibilnim proteinima¹²⁹. FC predstavlja poboljšanu i unapređenu verziju Folin-Denis testa, jer manje interferira sa nefenolnim jedinjenjima od originalnog metoda.

Originalni FC metod potiče iz 1927. godine, od hemijske metode kojom se određuje sadržaj tirozina¹⁴⁵. Metoda se sastoji u oksidaciji fenola sa molibdo-volframskim reagensom uz formiranje obojenog proizvoda koji ima apsorpcioni maksimum na talasnoj dužini 745-750 nm.

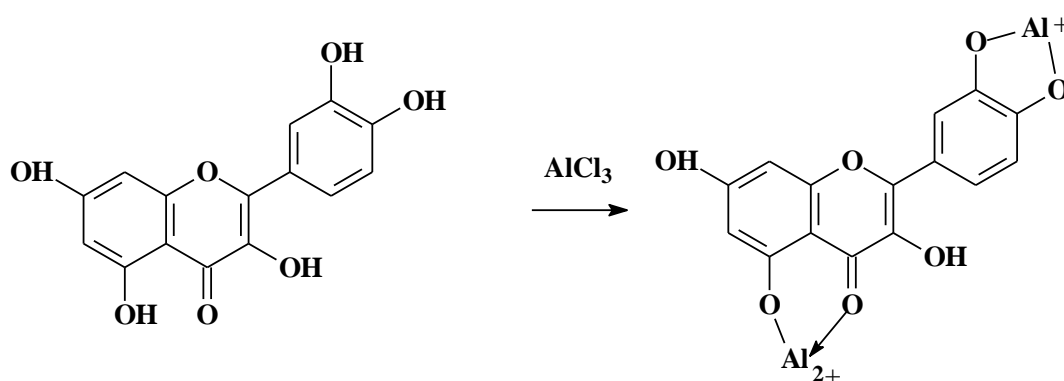


Reakcija je spora i u kisel o j sredini nedovoljno specifična, pa su Singleton i Rossi 1965.¹⁴⁶ godine razvili FC metod sa molibdo-fosfo-volframskim heteropolianjon reagesom koji je specifičniji za fenole i daje obojeni proizvod na 765 nm. Određivanje se sastoji u formiranju polimernog jona sa fosfor-molibdatskom (H₃PMo₁₂O₄₀) i fosforo-volframatovom (H₃PW₁₂O₄₀) kiselinom. Polifenolna

jedinjenja se oksiduju ovim reagensom, a sam reagens se redukuje u smešu volfram-oksida (W_8O_{23}) i molibden-oksida (Mo_8O_{23}). Stvorena hromofora postaje intezivno plave boje, a intezitet obojenosti je srazmeran koncentraciji polifenolnih supstanci. Struktura kompleksa još uvek nije tačno određena, a mehanizam same reakcije nije dovoljno razjašnjen.

Uslovi koji obezbeđuju pouzdanost i ponovljivost rezultata analize su: odgovarajući odnos alkalija i FC reagensa, optimalno reakciono vreme i temperatura, određivanje na talasnoj dužini od 765 nm i upotreba galne kiseline kao standarda¹⁴⁶.

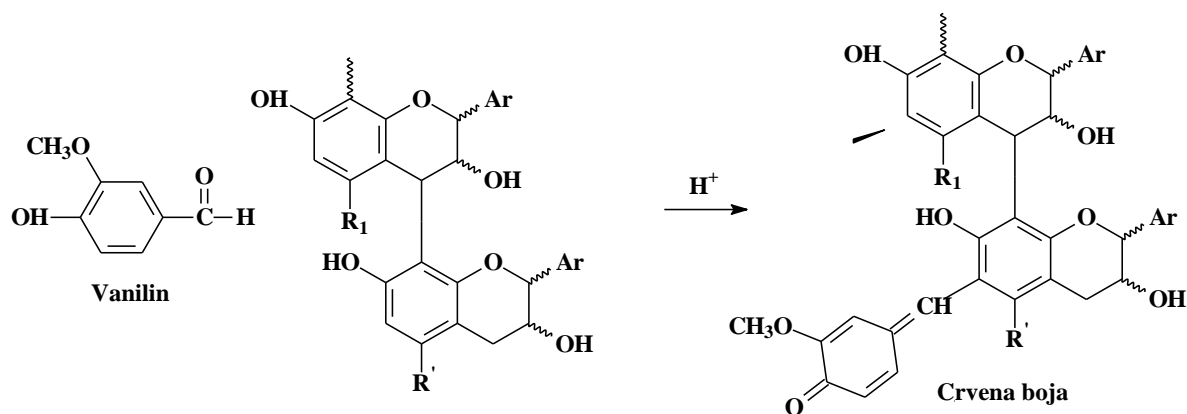
Obrazovanje kompleksa fenolnih jedinjenja i Al(III)-jona se koristi za spektrofotometrijska određivanja ukupne kafene kiseline, flavonoida i tanina. Jedna od modifikacija alumunijum(III)-hlorid određivanja predstavlja reakciju fenola sadržanih u ekstraktu sa natrijum-nitritom, praćenu formiranjem flavonoid-alumunijum kompleksa (slika 8).



Slika 8. Obrazovanje kompleksa kvercetina sa alumunijumom

Vanilin test se često koristi za određivanje kondenzovanih tanina, zbog svoje osetljivosti, specifičnosti i jednostavnosti¹⁴⁷. Vanilin reaguje samo sa flavan-3-olima, ili sa terminalnim grupama proantocijanidina. Metoda je osetljiva i specifična za flavan-3-ole, dihidrohalkone i proantocijanidine¹⁴⁸. Prednost u odnosu na redoks metode (FC metod), koje detektuju sve prisutne fenolne grupe, ogleda se u specifičnosti u odnosu na mali broj flavanola i dihidrohalkona koji imaju jednostruku vezu u poziciji C-2, C-3 i slobodnu *meta* orijentisanu hidroksilnu grupu na prstenu B^{149,150}. Ova metoda kombinovana sa kiselim butanolnim određivanjem, obezbeđuje definisanje stepena polimerizacije, i već dugo se koristi kao standardna kolorimetrijska metoda za određivanje flavanola¹⁵¹.

Mehanizam hemijske reakcije je prikazan na slici 9. Za uspeh reakcije je od značaja primenjeni rastvarač, priroda i koncentracija kiseline, vreme i temperatura reakcije, kao i tip referentnog standarda¹⁵². Najčešće se kao standard koristi katehin, iako neki autori preporučuju upotrebu unutrašnjeg standarda, prečišćenog tanina iz materijala koji se ispituje, na isti način kao kod kiselog butanolnog testa¹⁴⁹. Druga osobina je da je ovaj test nedovoljno specifičan, tako da će svaki pogodno supstituisani monomerni flavanol reagovati primenom ove metode²⁶.

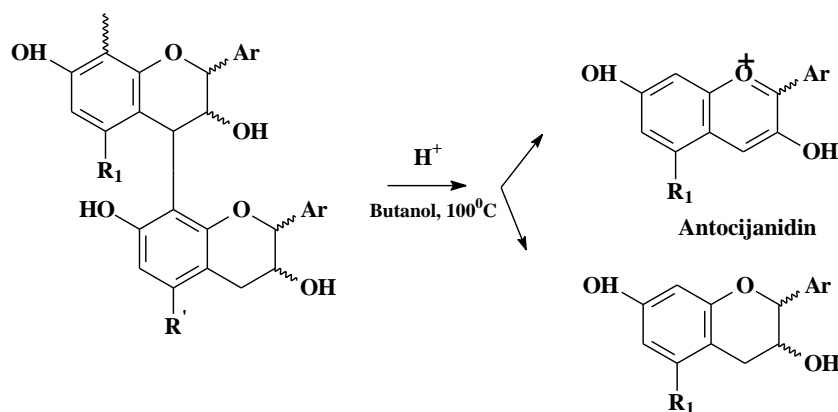


Slika 9. Hemijske reakcije vanilin testa za kondenzovane tanine

Vrh strelice označava drugo potencijalno mesto vezivanja (slika 9). Reaktivnost proantocijanidina (PA) sa molekulima od biološkog značaja ima značajne nutritivne i fiziološke posledice. Brojne fenolne hidroksilne grupe vode ka fomiranju kompleksa sa proteinima, metalnim jonima i drugim molekulima, kao što su polisaharidi¹⁵³.

Proantocijanidini

Kiseli butanolni test se koristi za određivanje sadržaja kondenzovanih tanina (proantocijanidina - PA)¹⁵⁴. Iako je test jednostavan, daje dobru indicaciju na prisustvo kondenzovanih tanina, putem kiselo-katalizovane depolimerizacije kondenzovanih tanina i dobijanja crvenih pigmenata antocijanidina (slika 10). Preciznost reakcije zavisi od više faktora. Hemijske karakteristike tanina, kao što su broj i položaj OH grupa i interflavanska veza, kao i način oksidacije, utiču na intezitet boje. Prisustvo vode u reakcionoj smeši značajno smanjuje intenzitet boje i treba je ukloniti pre određivanja. Nezavisnost rezultata od temperature se obezbeđuje termostatiranjem reagenasa, standarda i uzorka na vodenom kupatilu (30°C), pre početka rada. Utvrđeno je da jon Fe^{3+} predstavlja najefikasniji prelazni metal koji katalizuje formiranje boje u butanol-HCl reakciji. Idealan odnos reagenasa koji se dodaju uzorku je kiselina : butanol = 6 : 1. Izbor standarda predstavlja problem zbog raznovrsnosti kondenzovanih tanina i nedostataka prikladnih standarda za njihovu kvantifikaciju. Da bi se minimizirao problem korišćenja neprikladnog standarda, preporučuje se upotreba standarda izolovanog iz biljnog materijala²⁶. Najveća tačnost se postiže kada su prisutne polimerne interflavanske strukture. Treba napomenuti da pri ovom određivanju hidrolizovani tanini ne reaguju.



Slika 10. Hemijske reakcije kiselog butanolnog testa

Reakcija obuhvata oksidaciju, a terminalna jedinica ne daje obojeni antocijanidin.

Sephadex se koristi za razdvajanje nepolimernih i polimernih fenola (tanini). Jednostavnim hromatografskim metodom (hromatografija u koloni) upotrebom Sephadex LH-20 nepolimerni fenoli se eluiraju sa gela 95% etanolom. Naknadnim eluiranjem sa 50% acetonom se kvantitativno dobijaju polimerni fenoli.

2.5.3. HPLC analiza

High Pressure Liquid Chromatography (HPLC), odnosno tečna hromatografija pod visokom pritiskom je jedna od najviše korišćenih metoda za analizu biljnih fenola¹⁵⁵. HPLC tehnika se široko koristi, kako za razdvajanje, tako i za određivanje fenolnih komponenti. HPLC kombinuje prednosti simultane separacije i u većini slučajeva kvantifikacije bez prethodne derivatizacije.

Fenolne materije se obično analiziraju korišćenjem različitih vrsta detektora, kao što su: UV-VIS detektori sa fotodiodnim nizom (PDA), diodnim nizom (DAD), kao i UV fluorescentni detektori. Intezivna upotreba detektori sa fotodiodnim nizom se može pripisati sposobnošću dobijanja jedno-linijskog spektra bez primene tehnika za zaustavljanje protoka. Fluorescentna detekcija doprinosi senzitivnosti i selektivnosti analize flavonoida. Romani i sar.¹⁵⁶ su poredili tačnost koju pružaju različite vrste detektora, pulsni voltametrijski, amperometrijski biosenzorni i DAD. Utvrđena je prednost HPLC/DAD tehnike u pogledu preciznosti i tačnosti određivanja fenolnih materija. Primena DAD detektora obezbeđuje skeniranje celog UV-VIS područja od 210 do 650 nm. Za određivanje prirodnih proizvoda je od velikog značaja različitost njihovih maksimuma apsorpcije. Antocijanidini i antocijanini se određuju u rasponu talasnih dužina od 515 do 520 nm, dok se za glikozide flavanona koristi talasna dužina od 280 nm, a 313 nm za polimetoksilovane flavone. Flavonoidi se generalno detektuju između 245 i 350 nm. Za HPLC analizu aglikona flavonoida je neophodno prethodno izvršiti kiselu hidrolizu¹⁵⁷.

Uslovi određivanja i primenjene mobilne faze su različite za određivanje antocijanina, flavonona, flavanola, flavan-3-ola, flavona, proantocijanidina i fenolnih kiselina¹⁵⁸. U tabeli 6 su date neke od HPLC metoda za određivanje različitih klasa fenolnih materija u hrani.

HPLC/masena spektrometrija (MS), obezbeđuje obilje podataka o strukturi supstanci¹⁶² uz dobro razdvajanje i osetljivost¹⁶³. Ova tehnika se koristi i za strukturno određivanje fenolnih komponenti¹²⁹. Potencijal LC/MS određivanja katehina u čaju i biološkim matriksima je veliki, s obzirom na veliku selektivnost koju obezbeđuje maseni spektrometar kao detektor. Međutim, ovaj metod ima i neka ograničenja prilikom analize supstanci kao što su: korišćenje smeše prethodno frakcionisanih katehina za analizu, nisku osetljivost (~5–30 mg analita neophodnih za analizu), nemogućnost razdvajanja i analize (–)-galokatehin galata, strukturnog diastereoizomera jednog od najviše proučavanih katehina, (–)-epigalokatehin galata¹⁶³. Glikolizidi flavonoida se mogu odrediti nedestruktivnim pristupom uz primenu ove tehnike.

Tabela 6. HPLC procedure za određivanje različitih klasa fenolnih materija u hrani

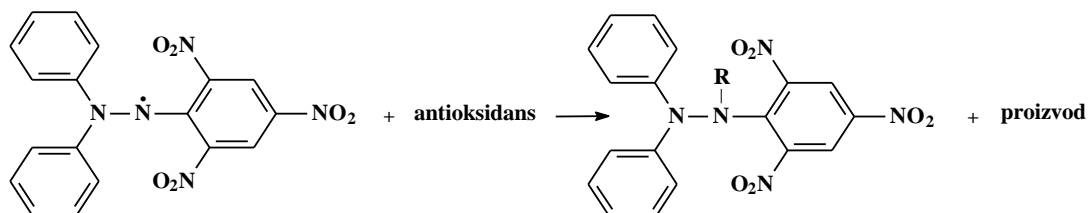
| Hrana | Žuti i zeleni francuski grašak | Propolis | Kikiriki |
|-------------------------|---|--|---|
| Fenolne materije | Flavoni i flavonoli | Fenolne kiseline, flavoni, flavanoni, flavanoli | Rezveratrol |
| Priprema uzorka | Ekstrakcija hloroformom, uklanjanje hloroforma i karotenoida, sušenje, ekstrakcija 70% metanolom, uparavanje metanola, prečišćavanje fenolnih materija upotrebom poliamidnih ketridža, filtracija | Rastvaranje u etanolu, alkalna hidroliza, acidifikacija, ekstrakcija fenolnih materija etil acetatom, uparavanje, rastvaranje u etanolu | Ekstrakcija 80% etanolom, centrifugiranje, semi-purifikacija Al ₂ O ₃ : silika gel 60R ₁₈ (1:1) |
| Stacionarna faza | LiChrospher 100 RP-18 (250 x 4,5 mm), kuplovana sa pretkolumnim (4 x 4 mm) pakovana sa istom stacionarnom fazom | Lichrosorb RP18 (200 x 3 mm, 7 μm) kuplovana sa C ₁₈ pretkolumnom | RP Vydac C ₁₈ (150 x 4,5 mm) |
| Mobilna faza | (A) Acetonitril; (B) 2% acetatna kiselina u vodi; gradijent: 10–30% A u B, 0–35 min; 30–45% A u B, 35–37 min; 45% A u B, 37–42 min; 45–10% A u B, 42–44 min | a) H ₂ O sa pH 2,6 podešenim dodavanjem H ₃ PO ₄ ; (B) acetonitril; gradijent: 0–9% B u A, 0–12 min; 9–13% B u A, 12–20 min; 13–40% B u A, 20–40 min; 40–70% B u A, 40–60 min; 70% B u A, 60–85 min | (A) Acetonitril; (B) 0,1% TFA (trifluoracetatna kiselina); gradijent: 0% A u B, 0–1 min; 0–15% A u B, 1–3 min; 15–27% A u B, 3–23 min; 27–100% A u B, 23–28 min |
| Referenca | ¹⁵⁹ Hempel i Bohm, 1996. | ¹⁶⁰ Siess i sar., 1996. | ¹⁶¹ Sanders i sar., 2000. |

2.6. METODE ODREĐIVANJA EPR TEHNIKOM

2.6.1. DPPH radikali

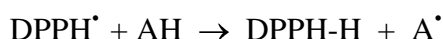
1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal predstavlja stabilni organski azotov radikal, kao i jedan od najviše korišćenih primarnih standarda u EPR spektrometriji¹⁶⁴. Poznato je da DPPH reaguje sa merkaptanima, aminima, fenolima, kiselinama, aromatičnim ugljovodonicima, što se u velikoj meri koristi u analitičkoj praksi za titrimetrijsko kvantitativno i semi-kvantitativno određivanje ovih supstanci. Pored toga, DPPH ima primenu i kao "skevendžer" slobodnih radikala^{165,166}, kao i za određivanje efikasnosti (G-vrednosti) grešaka nastalih u čvrstoj fazi nakon primene visoko-energetskog zračenja. Upotreba DPPH za ispitivanje kapacita prirodnih antioksidanasa za "skevendžing" slobodnih radikala, predložen je od strane Blois-a¹⁶⁷

1958. godine. Za razliku od slobodnih radikala generisanih u laboratoriji, kao što su superoksidni i hidroksi, upotreba stabilnih slobodnih radikala ima prednost, jer nije pod uticajem sporednih reakcija, kao što je helatiziranje sa metalima i enzimska inhibicija, koju izazivaju aditivi. Redukcija DPPH radikala se obično prati merenjem intenziteta EPR signala. Struktura DPPH radikala je ilustrovana reakcijom DPPH sa antioksidansima i prikazana je na slici 11.



Slika 11. Struktura DPPH i mehanizam reakcije sa antioksidansima

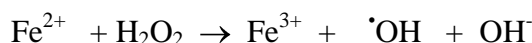
Antioksidansi različitim hemijskim transformacijama redukuju stabilne DPPH radikale u DPPH-H sledećim reakcionim mehanizmom:



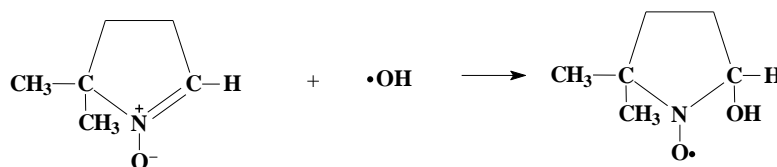
Hemijske promene prikazane hemijskom reakcijom se mogu odrediti spektrofotometrijski ili EPR spektrometrijski, direktnim merenjem koncentracije DPPH radikala.

2.6.2. Hidroksi radikali

U cilju ispitivanja antioksidativne aktivnosti EPR tehnikom u odnosu na hidroksi radikale, primenjuje se Fenton-ov reakcioni sistem za generisanje ovih radikala:



Nastali reaktivni $\bullet\text{OH}$ radikali u prisustvu spin trapa DMPO (5,5-dimetil-pirolin-N-oksida), (formiraju stabilne nitroksid radikale, odnosno DMPO-OH spin adukte (slika 12).

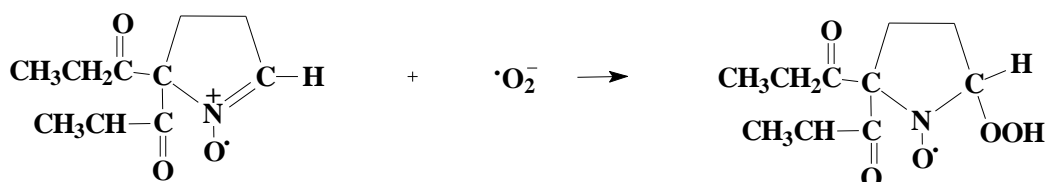


Slika 12. Formiranje hidroksi adukta sa DMPO

Stabilni DMPO-OH spin adukti imaju relativno dugo vreme života, pa su pogodni za detekciju EPR tehnikom.

2.6.3. Superoksidni anjon radikali

Spin trap DMPO se koristi već duže vreme za vezivanje kiseonika u biološkim sistemima. Glavni nedostatak ovog spin trapa je što se DMPO superoksidni adukt (DMPO/OOH) spontano i brzo razgrađuje do DMPO hidroksilnog adukta (DMPO/OH) i kao proizvod nastaje superoksidni anjon radikal¹⁶⁸. Istraživanja su pokazala da su određivanja superoksida EPR tehnikom uz upotrebu spin trapa DMPO ograničana zbog veoma kratkog vremena poluživota superoksidnog spin adukta DMPO/OOH (50 s na pH vrednosti 7)¹⁶⁹. Da bi se prevazišao ovaj problem, koristi se fosforilovan analog DMPO koji se označava kao DEPMPO (5-(dietoksifosforil)-5-metil-1-pirolin-N-oksid). Za razliku od DMPO/OOH, DEPMPO superoksidni adukt (DEPMPO/OOH) se ne razgrađuje do DEPMPO/OH. Spin trap DEPMPO stvara superoksidni adukt koji ima poluvreme života od skoro 15 minuta¹⁷⁰. Superoksidni anjon radikali generisani hipoksantin/ksantin-oksidaza sistemom (HX/XO), reaguju sa spin trapom DEPMPO i formiraju DEPMPO/OOH adukte (slika 13).

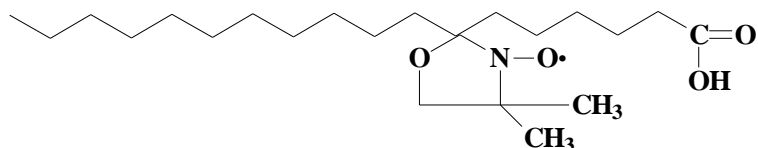


Slika 13. Formiranje superoksid adukta sa DEPMPO

2.6.4. Kapacitet uklanjanja lipidne peroksidacije

Reaktivne kiseonične vrste sposobne su da indukuju lipidnu peroksidaciju. Intenzivna lipidna peroksidacija u biološkim membranama dovodi do gubitka fluidnosti, opadanja vrednosti membranskog potencijala, povećanja permeabilnosti prema H^+ i drugim jonima, pa može dovesti do rupture ćelije i otpuštanja njenog sadržaja⁴³. Aktivnost antioksidanasa u prevenciji i/ili otklanjanju lipidne peroksidacije lipozoma testira se upotrebom Fenton-ove reakcije u cilju stvaranja $\cdot OH$ radikala. Ovi radikali mogu efikasno da izazovu peroksidaciju.

EPR tehnika i membranska spin proba 7-doksilstearat (2-(5-karboksipentil)-2-andecil-4,4-dimetiloksazolidin-3-oksildimetiloksazolidin-3-oksil), odnosno (7-DS) (slika 14) se koristi za procenu smanjenja membranske fluidnosti¹⁷¹.

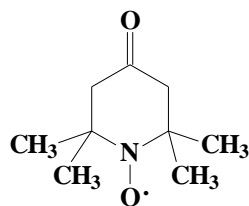


Slika 14. Struktura 7-DS

2.6.5. Organski hidrofilni radikali

ROS može da reaguje sa biomolekulima i formira organske hidrofilne radikale. Zato je potrebno ispitati sposobnost uklanjanja ovakvih reaktivnih vrsta. Kao

model komponenta za ispitivanje organskih radikala koristi se hidrofилна spin proba (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-N-oksil-4-on), odnosno Tempon (slika 15).



Slika 15. Struktura Tempon-a

Ova metoda je slična nespecifičnoj spektrofotometrijskoj metodi koja se često koristi za određivanje antioksidativne aktivnosti nekih supstanci i ekstrakata u kojoj se prate promene UV/VIS spektra. Međutim, EPR metoda daje znatno preciznije rezultate¹⁷². Antioksidativni kapacitet se određuje merenjem smanjenja amplitude signala Tempon-a koji izazivaju ekstrakti u odnosu na amplitudu signala netretiranog uzorka. Za Tempon je poznato da se pozicionira isključivo sa spoljašnje strane membrane. Kompleksna kinetika redukcije Tempon-a pokazuje da membrana poseduje sistem za istovremenu proizvodnju superoksid i hidroksi radikala.

2.6.6. Protektivni efekat u odnosu na UV zračenje

Koncentracija slobodnih radikala se povećava primenom zračenja (UV ili jonizujućeg) ili stabilizacijom na niskim temperaturama¹⁷³. Tako UV radijacija može da izazove stvaranje $\cdot\text{OH}$ od vode i $\cdot\text{O}_2^-$ iz rastvorenog kiseonika u vodenim rastvorima¹⁷⁴. Starenje kože, kao i razvoj nekih bolesti kože (melanom) je u korelaciji sa neizbalansiranim stvaranjem slobodnih radikala u ćelijama kože. Jurkiewicz i Buettner¹⁷⁵ su utvrdili upotrebom EPR spin trap tehnike *in situ* spin trap adukt, nakon izlaganja UV radijaciji kože čoveka. Istraživanje potencijalnih UV-protektivnih komponenti i smeša je od velikog značaja. Protektivni kapacitet se može ispitati sposobnošću antioksidanasa da otklone slobodne radikale ($\cdot\text{OH}$ i $\cdot\text{O}_2^-$) iz vodenih rastvora, koji su izloženi UV zračenju.

2.7. ERITROCITI KAO MODELI ZA ISPITIVANJE STEPENA OKSIDATIVNOG OŠTEĆENJA

Kod nekih patofizioloških stanja eritrociti su izloženi povećenom sadržaju vodonik peroksida. Tako u slučaju protromboze, H_2O_2 nastaje aktiviranjem leukocita¹⁷⁶ i krvnih pločica¹⁷⁷. Visoke doze ROS-a stvaraju se tokom infekcija¹⁷⁸, imunog odgovora organizma, upala¹⁷⁹, auto-imunih bolesti¹⁸⁰ i stanja ishemije/reperfuzije¹⁸¹. Vodonik peroksid može proći ćelijske membrane sa susednih tkiva u kojima se dešava neki patološki proces oksidativnog napada i/ili su mitohondrije oštećene i dospeti u krv¹⁸².

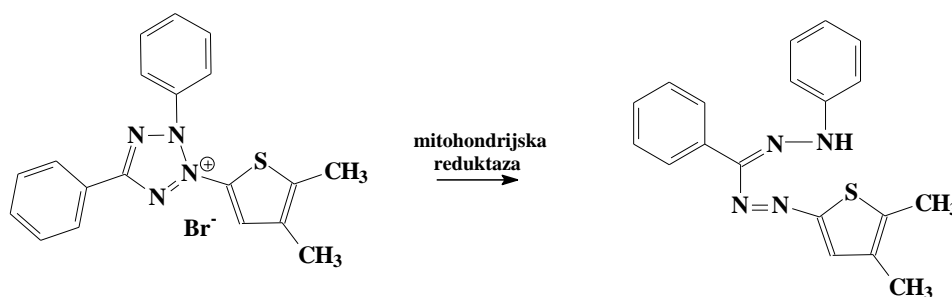
Eritrociti su kontinualno izloženi dejstvu velikih koncentracija kiseonika, kao i čestim varijacijama u pritisku kiseonika, a kako hemoglobin sadrži gvožđe, može podleći oksidativnom stresu kroz Fenton-ovu, Haber-Weiss-ovu¹⁸³ i druge reakcije, kao što je auto-oksidacija hemoglobina¹⁸⁴. Zbog ovih intracelularnih faktora, eritrociti su opremljeni specifičnim antioksidativnim sistemom sastavljenim od glutation-peroksidaze i katalaze¹⁸⁵ koji uklanjaju vodonik peroksid i superoksid dismutazu koja

dizmutira superoksid. Kao posledica toga, glavna meta za egzogeni H_2O_2 u peroksidima nije intracelularni deo eritrocita, već pre svega membrana. Iako vodonik peroksid može proći membranu, može reagovati i sa mastima, izazivajući peroksidaciju i oksidativno oštećenje. Smatra se da H_2O_2 izaziva smanjenje membranske fluidnosti¹⁸⁶. Oštećenje membrane eritrocita se može odraziti kao nedostatak nekih celularnih konstituenasa¹⁸⁷, kao što je K^+ . U finalnom stadijumu oštećenja, eritrociti će podleći hemolizi, što se detektuje prisustvom hemoglobina i dezoksihemoglobina u plazmi.

Pored direktnog interesovanja za ispitivanje efekata izazvanih H_2O_2 na eritrocitima kao glavnim nosiocima kiseonika, kao i razvojem preparata za antioksidativnu odbranu, eritrociti se intezivno koriste i za ispitivanje oksidativnog oštećenja, sa posebnim naglaskom na oštećenje ćelijske membrane¹⁸⁸. Dobijeni rezultati u ispitivanju antioksidativnog oštećenja izazvanog na membranama eritrocita se mogu iskoristiti za razumevanje procesa koji se dešavaju na membranama ćelija drugih organizama. Ukoliko su antioksidansi sposobni da zaštite membranu eritrocita, mogu da zaštite i druga tkiva.

2.8. TEST VIJABILNOSTI (MTT)

MTT test je je laboratorijski test i standardni kolorimetrijski metod određivanja preživljavanja i proliferacije ćelija sisara. Koristi se žuta tetrazolijum so MTT [3-(4,5-dimetiazol-2-il)-2,5-dipheniltetrazolijum-bromid], koju u fazi proliferacije metabolički razgrađuje mitohondrijska sukcinat dehidrogenaza, dajući ljubičasti formazonski proizvod (slika 16). Na taj način se detektuje aktivnost enzima u redukciji MTT-a do formazona¹⁸⁹.



Slika 16. Redukcija MTT-a do formazona

MTT test se koristiti i za određivanje citotoksičnosti potencijalnih medicinskih agenasa i drugih toksičnih materijala. Povećanje ćelijske toksičnosti rezultuje metaboličkom disfunkcijom koja se ogleda opadanjem vrednosti u testu. Ovaj test detektuje žive, a ne mrtve ćelije, a generisani signal zavisi od stepena aktivacije ćelija.

Glavne prednosti kolorimetrijskog određivanja su brzina, preciznost i odsustvo primene radioizotopa. Tokom rada se ne vrši ispiranje. Efekat testa je posebno naglašen u prisustvu fetalnog seruma govečeta. Da bi se povećala rastvorljivost nerastvornog ljubičastog proizvoda (formazona), dodaje se solubilizirajući rastvor, obično dimetil sulfoksid (DMSO), acidifikovani etanolni rastvor ili rastvor deterdženta (natrijum-dodecil sulfata u razblaženoj hloridnoj kiselini), pri čemu

formazon prelazi u obojeni rastvor. Apsorbancija ovog obojenog rastvora se meri na spektrofotometru (obično između 500 i 600 nm) ili ELISA čitaču.

2.9. METODA ZA ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI

Disk difuzioni metod karakteriše jednostavnost, osetljivost, efikasnost i pouzdanost¹⁹⁰. Prečnik inhibicije je direktno proporcionalan koncentraciji antibiotika. Primena ove metode je moguća za ispitivanje antimikrobne aktivnosti različitih ekstrakata, a ne samo antibiotika.

2.10. *Castanea sativa* Mill.

Evropski **pitomi kesten** (lat. *Castanea sativa* Miller) je drvo iz porodice **bukvi** (*Fagaceae*), u kojoj se nalaze bukva i hrast.

2.10.1. Botanički opis



Vrste iz ove porodice su šumsko drveće, sa jednostavnim, naizmenično poređanim listovima i cvetovima koji su obično skupljeni u rese. Semenke nekih vrsta su jestive i bogate hranjivim materijama, i koriste se u ishrani još od davnih vremena. Pitomi kesten je listopadno drvo visine 20-30 m, sa obimom stabla i do 2 m. Krošnja je gusta i dobro razvijena, a dostiže starost i do 500 godina. Kora drveta je glatka, crvenkastosive do sivocrne boje¹⁹¹. **Listovi** su naizmenični, duguljasto lancetasti, krupno nazubljeni, dužine peteljke do 5 cm, dužine 10-30 cm i širine 3-6 cm, s istaknutim žilama sa donje strane.

Prašnički cvetovi stoje u žućkastim čupercima u grupama od po 3 ili više, i formiraju 10-30 cm duge uspravne i isprekidane rese. **Tučkovi** cvetova, koji su obavijeni zelenkastom opnom, stoje u zajedničkoj kupoli, i obično se razvijaju u tri ploda, retko kao jedan. Kesten se oprašuje vetrom ili pomoću insekata, u zavisnosti od vlažnosti vazduha. Veličina zrna polena je mala (14-18 μm), što omogućava da se polen transportuje do udaljenosti od 100 km¹⁹².



Ježevice su loptaste, kožaste i gusto pokrivene igličastim bodljama, opadaju u oktobru. Masa ploda iznosi **10-25 g**, a od 1 do 3 ploda se nalazi u ježevici¹⁹³. **Plodovi** pitomog kestena su veliko skrobno orašasto voće, pokriveni kožastom, tamnosmeđom, sjajnom, adstringentnom membranom nazvanom pelikula. Debljina varira od tanke kao papir do relativno tankog drvenastog tkiva, a plodovi su polukruglasti ili zaobljeno pljosnati.



Ponekad pelikula ulazi unutar mesa i cepa kotiledone, što otežava ljuštenje. Veličina ploda, stepen odvajanja ježevice od ljuske, lakoća odvajanja ljuske i pelikula, kao i aroma, veoma su važni parametri kvaliteta ploda. Kesten je seme, koje se gaji kao drvo. Kestenovo drvo može godišnje da rodi do 200 kg plodova. Koristi se u kuvanom (pečenom) obliku, a ima primenu i u konditorskoj industriji.

Od kestena se pravi delikates "*marrone glacé*" koji je skuplji od čokolade. Kesten se suši i proizvodi se brašno od kestena. Veoma je značajna namirnica u Kini, Japanu i Severnoj Evropi, pa ga zato zovu "**hlebno drvo**"¹⁹⁴. Naziv kesten je dobio po mestu **Kastano** u Grčkoj¹⁹⁵. Smatra se da je postojbina pitomog kestena Mala Azija, a u Evropu je prenet još u V. veku p.n.e., prvo u Grčku, a zatim u Italiju i Španiju.



U Aziji se japanski kesten *C. crenata* gaji još od XI veka, dok se kineski kesten *C. molissima* gaji od pre 6.000 godina. U Evropi raste kao samoniklo šumsko drvo ili kao kultivisan, pa se pretpostavlja da je kesten u Evropi autohton¹⁹⁶, a najviše je rasprostranjen u Sredozemlju. Postoji drvo veoma sličnog imena i ploda kao pitomi kesten, koje često izaziva zabunu. Radi se o tzv. **divljem kestenu** (lat. *Aesculus hippocastanum*) koji botanički nije srodan pitomom kestenu, a plodovi nemaju prijatan ukus i nisu jestivi.



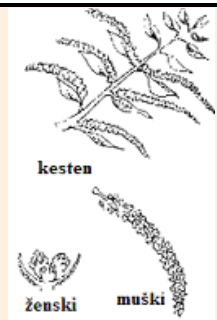
muški cvet



ženski cvet




resa (muški cvetovi)



Slika 17. Izgled cveta kestena


U tabeli 7 su dati taksonomski podaci vezani za kesten.

Tabela 7. Taksonomija *C. sativa*

|  | Carstvo | <i>Plantae</i> | Biljno |
|---|------------------------------|-----------------------|---------------------|
| | Potcarstvo | <i>Tracheobionta</i> | vaskularne biljke |
| | Superodeljak | <i>Spermatophyta</i> | semenjače |
| | Odeljak | <i>Magnoliophyta</i> | cvetnice |
| | Klasa | <i>Magnoliopsida</i> | dikotiledone biljke |
| | Potklasa | <i>Hamamelididae</i> | |
| | Red | <i>Fagales</i> | |
| | Familija | <i>Fagaceae</i> | familija bukvi |
| | Rod | <i>Castanea</i> Mill. | kesten |
| Vrsta | <i>Castanea sativa</i> Mill. | evropski kesten | |

Kesten pripada rodu *Castanea* sa 9 vrsti (tabela 8), od kojih su četiri komercijalno najvažnije: *C. sativa*, *C. dentata*, *C. mollissima* i *C. crenata*¹⁹⁷ (slika 18).

Tabela 8. Vrste roda *Castanea*

|  | Vrste | |
|--|----------------------------|-----------------|
| | <i>Castanea alnifolia</i> | |
| | <i>Castanea crenata</i> | japanski kesten |
| | <i>Castanea dentata</i> | američki kesten |
| | <i>Castanea henryi</i> | henrijev kesten |
| | <i>Castanea mollissima</i> | kineski kesten |
| | <i>Castanea ozarkensis</i> | |
| | <i>Castanea pumila</i> | |
| | <i>Castanea sativa</i> | evropski kesten |
| <i>Castanea seguinii</i> | | |

2.10.2. Najvažnije sorte

Castanea crenata

Japanski kesten je prirodno nastanjen u Japanu, Kini i Koreji, manje je bujnosti, ali je krupniji od evropskog. Drvo raste do 15 m visine. Rezistentno je na većinu poznatih biljnih bolesti, međutim ukus ploda je inferiorniji u odnosu na druge sorte. Drvo je manje visine u odnosu na *C. dentata*, sa veličinom ploda koja se nalazi između *C. dentata* i *C. sativa*. Plod je veliki i sa grubom teksturom. Posедуje izvesno pomanjkanje ukusa u odnosu na druge vrste kestena. Razvijeno je nekoliko varijeteta, a samo drvo po svojoj teksturi i formi nije zadovoljavajuće za proizvodnju drveta¹⁹⁸. U tabeli 9 su date karakteristike najvažnijih sorti kestena.

Tabela 9. Osobine sorti kestena

| Vrsta | Uobičajeno ime | Visina (m) | Veličina jezgra | Aroma jezgra | Rezistentnost na <i>Cryphonectria parasitica</i> |
|---------------------|-----------------|------------|-----------------|--------------|--|
| <i>C. crenata</i> | japanski kesten | 12-18 | varira | loša | srednja |
| <i>C. dentata</i> | američki kesten | 18-30 | mala | izvrsna | loša |
| <i>C. molissima</i> | kineski kesten | 9-15 | srednja | dobra | veoma visoka |
| <i>C. sativa</i> | evropski kesten | 18-24 | velika | dobra | veoma niska |

Castanea dentata

Američki kesten je nastanjen u Apačkim planinama od država Džordžija i Mejn do Mičigena u Americi. Dostiže visinu od 30 m, obim drveta 80-150 cm. Jezgra su mala i pokrivena tankom, svetlom paperjastom opnom (77 jezgara/kg). U ježevici ih ima 2-3. Osetljiv je prema endotivnom raku kore kestena - *Cryphonectria parasitica* (raniji naziv *Endothia parasitica*), dok je otporan prema korenastoj gljivi, mastiljavoj bolesti (*Phytophthora cambivora*). Plod je slađi i sa finijom strukturom u odnosu na *C. crenata*¹⁹⁹.



Američki - kineski - japanski - evropski

Slika 18. Izgled ploda različitih vrsta kestena

Castanea molissima

Kineski kesten raste u Kini i Koreji, najniže je drvo roda *Castanea*, dostiže visinu do 12 m. Prirodno je nastanjen u severnoj i zapadnoj Kini. Srednje veličine jezgra (66 jezgara/kg), dobrog kvaliteta. Daje plodove u ranoj dobi (trogodišnje), a plodovi su ukusniji od ostalih vrsta. Najrezistentnije je vrsta u odnosu na *Cryphonectria parasitica* i *Phytophthora cambivora*²⁰⁰.

Castanea sativa

Evropski kesten prirodno raste u planinskim predelima zapadne Azije, Evrope i Severne Afrike. Jako je tolerantan na uslove gajenja i kada uslovi nisu adekvatni. Plod je znatno veći od američkog kestena. Kvalitet orašice se jako razlikuje, u zavisnosti od varijeteta.

Pored čistih vrsta, gaje se i pojedini hibridi različitih vrsta. Među pojedinim vrstama i kultivarima postoje razlike u prinosu, nutritivnoj vrednosti, kao i drugim osobinama. **Marun** je velika, oplemenjena sorta pitomog kestena nastala kalemljenjem plemkama maruna. U Hrvatskoj ga ima mnogo po obroncima Učke, najviše u okolini Lovrana i Opatije, pa se u ovim krajevima još naziva i "lovranski marun"²⁰¹. Za lovranski marun se smatra da je dobijen ukrštanjem divljeg kestena i sadnica koje su lovranski mornari doneli iz neke od zemalja Dalekog istoka, najverovatnije Japana. Marun je izgledom veći, svetlije ljuske, koja se lako odvaja, i slađi je od običnog kestena. U Italiji su maruni posebna sorta, sa plodovima odličnog kvaliteta, čija su stabla jako zahtevna i manje produktivna u odnosu na "obične" vrste kestena.

Kesten ima izuzetne hortikulturene mogućnosti za proizvodnju jestivog orašastog voća *Castanea* vrste. Pored toga, predstavlja izvor drveta i drugih šumskih proizvoda važnih za zaštitu čovekove sredine, kao što su uređenje prostora i zaštitu zemljišta od erozije.

Vrste koje se koriste za jelo su:

- *C. sativa* (**evropski** \cong **španski** \cong **slatki kesten**);
- *C. mollissima*, najvažnija vrsta za proizvodnju plodova;
- *C. crenata*, koji daje velike plodove.

Svetska godišnja proizvodnja kestena iznosi 540.000 t. Najveću proizvodnju kestena u svetu imaju Južna Koreja 119.790 t (*C. crenata*) i Kina 118.000 t (*C. mollissima*). U Evropi su najveći proizvođači: Italija sa 78.420 t, zatim Turska 70.000 t, Portugalija 20.000 t i Francuska 12.600 t¹⁹⁴.

2.10.3. Hemijski sastav

Plod kestena kao hrana ima visoku energetska vrednost (200 kcal/100 g pečenog kestena). Međutim, to je i dalje mnogo niži sadržaj kalorija u odnosu na drugo suvo orašasto voće, koje sadrži oko 600 kcal/100 g²⁰². Plodovi oraha, lešnika i badema, kao glavni sastojak imaju masno ulje, dok je glavni sastojak kestena skrob. Pored toga, u kestenu ima šećera, blizu 4% proteina, oko 2% masti, a svega oko 5 mg% vitamina C.

Za razliku od većine voća koja daju pulpu (jabuke, kajsije), sadržaj vode u kestenu je nizak, iznosi 52,9% u svezem i 10% u suvom kestenu, dok je sadržaj vode u jabuci 84,8% (tabela 10). Svež kesten ima visoku energetska vrednost (160 kcal/100 g), zadovoljavajući sadržaj hranljivih vlakana (7-8%), izuzetan sadržaj ugljenih hidrata (oko 35%), visok sadržaj proteina i nizak sadržaj masti¹⁹⁴.

Tabela 10. Hemijski sastav ploda kestena

| Komponenta | Sirov | Suv | Pečen | Kuvan | Brašno |
|---------------------------------|-------|------|-------|-------|--------|
| Jestivi deo (%) | 81 | 100 | 82 | 88 | 100 |
| Voda (%) | 52,9 | 10,1 | 42,4 | 63,3 | 11,4 |
| Energetska vrednost (kcal/100g) | 160 | 287 | 200 | 120 | 343 |
| Hranljivi elementi (g/100 g) | | | | | |
| Ugljeni hidrati | 34,0 | 57,8 | 39 | 24,4 | 63,3 |
| Šećeri | 9,6 | 16,1 | 10,7 | 7,5 | 23,6 |
| Skrob | 24,4 | 41,7 | 28,3 | 16,9 | 40 |
| Hranljiva vlakna (g/100 g) | | | | | |
| Ukupna | 7,3 | 13,8 | 8,3 | 5,4 | 14,2 |
| Rastvorljiva | 0,6 | 1,1 | 0,7 | 0,6 | 1 |
| Nerastvorljiva | 6,7 | 12,7 | 7,6 | 4,8 | 13,2 |
| Proteini (g/100 g) | 3,2 | 6 | 3,7 | 2,5 | 6,1 |
| Masti (g/100 g) | 1,8 | 3,4 | 2,4 | 1,3 | 3,7 |

Sadržaj ugljenih hidrata (šećera i skroba), dominira u odnosu na druge hranjive sastojke (34 g/100 g). Skrob je prisutan u značajnom iznosu (24,4 g/100g), što ga u poređenju sa sirovim krompirom (15,9 g/100 g) i pasuljem (19,5 g/100 g), čini glavnim izvorom skroba u ishrani²⁰³. Upotreba kestena je znatno manja u odnosu na krompir, pasulj i druge mahunarke. Kako ugljene hidrate kestena uglavnom čine polisaharidi (skrob se razgrađuje do glukoze pre nego što se asimilira), to ograničava upotrebu jednostavnih šećera, posebno saharoze, na 7-8% ukupnog energetskeg unosa. Zbog toga je kesten izvrstan izvor energije, pogotovo kod stanja iscrpljenosti i stresa, a ne preporučuje se dijabetičarima. Alergije na laktozu, naročito kod dece, su sve češće, pa se kao alternativno rešenje preporučuje kestenovo brašno²⁰⁴. Monosaharidi daju kesteni karakterističan sladak ukus. Generalno, voće sa visokim sadržajem skroba zahteva pečenje ili kuvanje, da bi tekstura i aroma došli do punog izražaja.

Biljna vlakna (7,3 g/100 g), sastoje se od nerastvornog dela, koji preovlađuje u odnosu na rastvoran. Ovaj parametar je važan za strukturne osobine semena, koje ga čine prihvatljivim za upotrebu. Vlakna se sastoje uglavnom od polisaharida koji se ne mogu asimilirati u telu, međutim znatno pomažu u prevenciji intestinalnih problema, dok u isto vreme snižavaju sadržaj holesterola. Kesten je veoma lako svarljiv. Sadržaj proteina (3,2 g/100 g), ekvivalentan je sadržaju proteina u mleku. Proteini su najvišeg kvaliteta, jer sadrže esencijalne amino kiseline, triptofan i lizin, kao i amino kiseline koje sadrži sumpor, metionin i cistin. Uporediv je sa sadržajem proteina u jajima, gde je njihov odnos u idealnoj ravnoteži²⁰⁵. Tako kesten izvrsno upotpunjuje one materije koje nedostaju povrću.

Orašasto voće je izuzetno bogato u mastima, međutim kesten ima relativno nizak sadržaj masti (1,8-2 g/100 g), što ga čini idealnim za primenu u dijetama gde se preporučuje visok sadržaj ugljenih hidrata, a nizak sadržaj masti, kao i u cilju smanjenja rizika nastajanja raka i kardiovaskularnih bolesti. Iako je sadržaj masti nizak, njihov sastav je jako kvalitetan. Kesten ima nizak sadržaj "loših" zasićenih masti i dosta "dobrih" nezasićenih masti. Ne sadrži holesterol, a dragocen je izvor esencijalnih masnih kiselina (posebno linolne kiseline), koja je značajna u prevenciji srčanih oboljenja²⁰⁶.

U tabeli 11 su date nutritivne vrednosti kestena u poređenju sa jabukom.

Tabela 11. Nutritivan sastav ploda kestena u poređenju sa jabukom (/100 g sveže mase)

| Sastojak | Kesten | Jabuka |
|---------------------|--------|--------|
| Voda (%) | 52,5 | 84,8 |
| Proteini (g) | 2,9 | 0,2 |
| Masti (g) | 1,5 | 0,6 |
| Ugljeni hidrati (g) | 42,1 | 14,1 |
| Tiamin (mg) | 0,22 | 0,03 |
| Riboflavin (mg) | 0,22 | 0,02 |
| Niacin (mg) | 0,6 | 0,1 |
| Kalcijum (mg) | 27 | 7 |
| Fosfor (mg) | 88 | 10 |
| Gvožđe (mg) | 1,7 | 0,3 |
| Natrijum (mg) | 6 | 1 |
| Kalijum (mg) | 454 | 110 |

Kesten ima visok sadržaj kalijuma, elementa koji doprinosi mišićnoj kontrakciji i radu srca. Druge mineralne materije su prisutne u manjoj meri (kalcijum, magnezijum, gvožđe i fosfor) (tabela 12). Sadržaj hidrosolubilnih vitamina (B₁ i B₂) je mali.

Tabela 12. Mikroelementi kestena (mg/100 g sveže mase)

| Tip | K | Fe | Ca | P | Tiamin vitamin B ₁ | Riboflavin vitamin B ₂ | Niacin | Vitamin A |
|---------------|-----|-----|----|-----|----------------------------------|--------------------------------------|--------|--------------|
| Kesten sirov | 395 | 0,9 | 30 | 81 | 0,08 | 0,28 | 1,1 | 0 |
| Kesten suv | 738 | 1,9 | 56 | 131 | 0,2 | 0,5 | 2,1 | 0 |
| Kesten brašno | 847 | 3,2 | 50 | 164 | 0,2 | 0,4 | 1,0 | 0 |

Sirov oljušten kesten ima mali sadržaj flavonoida. Sadržaj flavonoida u sirovom oljuštenom kestenu iznosi 0,01 mg/100 g (+)-katehina i (+)-galokatehina, dok ostali flavan-(3)-oli, (-)-epikatehin, (-)-epikatehin 3-galat, (-)-epigalokatehin i (-)-epigalo-katehin 3-galat nisu detektovani.²⁰⁷

2.10.4. Kesten kao lekovita biljka



U *Hilandarskom medicinskom kodesku* broj 517 (XV vek), koji se smatra prvim medicinskim delom kod Srba, odnosno prvom srpskom farmakopejom, pominje se upotreba kestena. U delu o zaraznim bolestima se preporučuje rekonvalescentima, da nakon zaraznih bolesti uzimaju, radi jačanja, hranu od plodova kestena sa limunom i pomorandžom.

Drvo, kora i ježevica imaju visok procenat tanina, pa služe kao adstrigensi i odlično sredstvo protiv katara pluća. Sa 10% vlage, kora drveta sadrži oko 6,8%, a drvo 13,4% tanina²⁰⁸. Tonik kore *C. pumila* se koristi kao okrepljujuće sredstvo i adstrigens²⁰⁹. Od svih domaćih sirovina za dobijanje taninskog ekstrakta, pitomi kesten je najekonomičniji, jer sadrži najviše taninskih materija²¹⁰.



Listovi i kora deluju antiinflamatorno, kao ekspektoransi i tonici²¹¹. **Seme** se koristi u pedijatriji za tretman gastroenteritisa i primene dijete bez glutena²¹². Još se u Srednjem veku sveže seme koristilo za tretman srčanih smetnji²¹³.

Lišće se koristi u vidu infuza, ekstrakta i tinkture. Prikuplja se juna i jula kada je u najboljem stanju i suši. Može se koristiti i sveže. Lišće je bez mirisa, ali adstrigentnog ukusa. Infuz dobijen od suvog lišća (*Extractum Castanea fluidum*) deluje efikasno na iritabilno i ekscitirajuće stanje respiratornog nerva i protiv upale grla^{214, 215}.



U listu kestena, pored tanina ima i pektina, fitosterina, flabofena, kao i drugih supstanci. Veoma značajan sastojak lista je vitamin K, jer pospešuje zaustavljanje krvarenja²¹⁶. Lišće se koristiti i za tretman reumatizma, u slučaju manjih bolova u leđima, kao i ukočenosti mišića i zglobova. Čaj od kestena je odlično sredstvo protiv katara pluća i bronhijalne astme. Infuz od 1 kašike suvog lišća i 1 dl ključale vode se uzima 3-5 puta dnevno, po 1 kašika. Smatra se da je velika efikasnost čaja rezultat prisustva kodeina²¹². Ekstrakti lišća kestena imaju osim izraženog antibakterijskog efekta⁴ i dobar antioksidativni potencijal⁸³. Allona i sar.²¹⁷ su utvrdili antifungalnu aktivnost kestena u odnosu na *Tricoderma viride*.

Ispitujući lekovite biljke koje se tradicionalno koriste u Italiji za lečenje životinja²¹⁸, Viegi i sar.²¹⁹ navode upotrebu *C. sativa* u ishrani svinja, da bi one bile robusnije i izdržljivije.

3. REZULTATI I DISKUSIJA

U okviru ove disertacije, radi ispunjavanja prethodno postavljenih zadataka, bilo je neophodno izvršiti karakterizaciju polaznog biljnog materija, delova ploda kestena: oljušten kesten, tj. srž ploda, braon spoljna i crvena unutrašnja kora ploda, ceo plod (bez ježevica), kao i drveta: lišća, rese, ježevice, stare i mlade kora stabla. Pored toga, trebalo je raspolagati odgovarajućim analitičkim metodama za određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava dobijenih ekstrakata kestena.

Iz ovih razloga istraživanja obuhvaćena ovom disertacijom su podeljena na sledeće segmente:

- dobijanje ekstrakata kestena ekstrakcijom različitih delova ploda i drveta upotrebom 50% etanola i 50% acetona kao ekstragensa, određivanje srednjeg prečnika čestica i prinosa suvog ekstrakta, utvrđivanje hemijskog sastava, primena standardnih spektrofotometrijskih metoda za određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja, flavonoida i kondenzovanih tanina;
- određivanje kapaciteta ekstrakata u zaštiti eritrocita od hemolize;
- kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih materija HPLC/DAD i HPLC/MS analizom;
- EPR-a ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata u odnosu na DPPH, hidroksi i superoksid anjon radikale, kapacitet ekstrakata za uklanjanje lipidne peroksidacije, transformaciju organskih hidrofilnih radikala, kao i transformaciju hidroksi i superoksid anjon radikala generisanih UV zračenjem;
- uticaj ekstrakata na preveniranje/uklanjanje lipidne peroksidacije membrane eritrocita, kao i uticaj ekstrakata na zaštitu membranskog integriteta eritrocita merenjem sadržaja kalijuma, upotrebom EPR tehnike;
- *in vitro* antioksidativna svojstva ekstrakata;
- ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata.

Analizom dobijenih rezultata istraživanja izdvojeni su ekstrakti sa značajnim farmakološkim delovanjem, odnosno definisan je deo pitomog kestena sa najviše farmakoterapijskih komponenti. Pored toga, predložen je pogodan tehnološki postupak za dobijanje kvalitetnog proizvoda.

3.1. DOBIJANJE I ISPITIVANJE HEMIJSKOG SASTAVA EKSTRAKATA KESTENA

Nakon pripreme biljnog materijala, određivanja srednjeg prečnika čestica i ekstrakcije, izvršene su hemijske i instrumentalne analize dobijenih ekstrakata *C. sativa*.

3.1.1. Srednji prečnik čestica i prinos suvog ekstrakta kestena

Rezultati prinosa suvog ekstrakta, za tri ispitivana kultivara kestena roda 2006. godine su dati u tabelama 13, 14 i 15. Detaljna ispitivanja su izvršena na pitomom

kestenu, a za druga dva kultivara su ispitivani samo pojedini delovi ploda i drveta. Izbor vrste i najpovoljnije koncentracije ekstragensa izvršen je u skladu sa literaturnim podacima¹²⁹⁻¹³¹.

Tabela 13. Prinos suvog ekstrakta za pitomi kesten (rod 2006. godine)

| Delovi kestena | Ekstragens | |
|------------------------------|--------------------------------|-------------|
| | 50% ac* | 50% et** |
| | Prinos suvog ekstrakta, %(m/m) | |
| Ceo plod*** | 14,94±0,086 | 7,09±0,091 |
| Srž ploda | 13,70±0,075 | 12,79±0,092 |
| Spoljna braon kora ploda | 3,30±0,045 | 3,30±0,083 |
| Crvena unutrašnja kora ploda | - | 6,79±0,077 |
| Resa | 25,09±0,939 | 10,04±0,046 |
| List | 19,83±0,083 | 4,94±0,038 |
| Mlada kora drveta | 12,48±0,079 | 7,84±0,073 |
| Stara kora drveta | 8,17±0,069 | 3,40±0,089 |
| Ježevice | 7,50±0,076 | 1,82±0,066 |

*ac - aceton

**et - etanol

***ceo plod – srž ploda + crvena unutrašnja + spoljna braon kora ploda

Tabela 14. Prinos suvog ekstrakta za lovranski marun (rod 2006. godine)

| Delovi kestena | Ekstragens | |
|------------------------------|--------------------------------|-------------|
| | 50% ac | 50% et |
| | Prinos suvog ekstrakta, %(m/m) | |
| Ceo plod | 8,28±0,096 | 5,78±0,066 |
| Srž ploda | 15,38±0,107 | 5,51±0,096 |
| Spoljna braon kora ploda | 3,38±0,054 | 7,13±0,034 |
| Crvena unutrašnja kora ploda | 15,45±0,093 | 13,32±0,096 |
| List | 23,22±0,124 | 7,03±0,063 |

Tabela 15. Prinos suvog ekstrakta za kalemljeni italijanski marun (rod 2006. godine)

| Delovi kestena | Ekstragens | |
|----------------|--------------------------------|-------------|
| | 50% ac | 50% et |
| | Prinos suvog ekstrakta, %(m/m) | |
| Ceo plod | 8,21±0,096 | 6,68±0,035 |
| Resa | 33,56±0,172 | 10,58±0,078 |
| List | 22,08±0,110 | 6,18±0,045 |

Srednji prečnik čestica se kreće od 0,18 mm za list pitomog kestena i crvenu unutrašnju kora ploda lovanskog maruna do 0,40 mm za spoljnu braon koru ploda pitomog kestena.

U zavisnosti od dela kestena prinos suvog ekstrakta primenom 50% acetona kao ekstragensa iznosi od 3,30% za spoljnu braon koru ploda pitomog kestena, do 33,56% za resu kalemljenog italijanskog maruna. Za ekstrakte dobijene ekstrakcijom sa 50% etanolom, najmanji prinos suvog ekstrakta (1,82%) je određen za ježevice, dok je najveći prinos 13,32% dobijen za crvenu unutrašnju kora ploda lovanskog maruna.

U tabeli 16 je dat procentualni sastav ploda pitomog kestena i lovanskog maruna.

Tabela 16. Sastav ploda kestena (rod 2006. godine)

| Delovi ploda | Kultivari | |
|------------------------------|----------------------|-----------------|
| | Pitomi kesten | Lovranski marun |
| | Sastav ploda, %(m/m) | |
| Srž ploda | 68,9±0,319 | 70,45±0,521 |
| Spoljna braon kora ploda | 24,41±0,107 | 21,03±0,178 |
| Crvena unutrašnja kora ploda | 6,68±0,047 | 8,52±0,065 |
| Kora (spoljna + unutrašnja) | 31,1±0,077 | 29,55±0,122 |

Odnos srži i kore ploda pitomog kestena i lovanskog maruna je sličan (70% : 30%).

Prinosi suvog ekstrakta rese i lista ispitivanih kultivara kestena roda 2007. godine, dati su u tabeli 17. Uzorci su usitnjeni do sitnog i vrlo sitnog praška (veličina čestica se kreće od 0,25 mm za list pitomog kestena i kalemljenog italijanskog maruna do 0,32 mm za resu pitomog kestena).

Tabela 17. Srednji prečnik čestica i prinos suvog ekstrakta (rod 2007. godine)

| Delovi kestena | Ekstragens | |
|-------------------------------------|--------------------------------|-------------|
| | 50% ac | 50% et |
| | Prinos suvog ekstrakta, %(m/m) | |
| Pitomi kesten | | |
| Resa | 23,53±0,121 | 9,33±0,045 |
| List | 22,78±0,098 | 14,19±0,063 |
| Lovranski marun | | |
| Resa | 9,70±0,054 | 7,67±0,039 |
| List | 17,88±0,087 | 5,01±0,073 |
| Kalemljeni italijanski marun | | |
| List | 24,53±0,015 | 13±0,036 |

Upotrebom 50% acetona kao ekstragensa, najmanji prinos suvog ekstrakta (9,70%) dobijen je za resu lovanskog maruna, a najveći (24,53%) za list kalemljenog italijanskog maruna. Za uzorke dobijene 50% etanolom, prinos suvog ekstrakta se kreće od 5,01% za list lovanskog maruna do 14,19% za list pitomog kestena.

Prinosi suvog ekstrakta su veći upotrebom 50% acetona kao ekstragensa u odnosu na 50% etanol.

Utvrđen je sledeći redosled prinosa suvog ekstrakta u zavisnosti od analiziranog dela kestena, uz primenu oba ekstragensa:

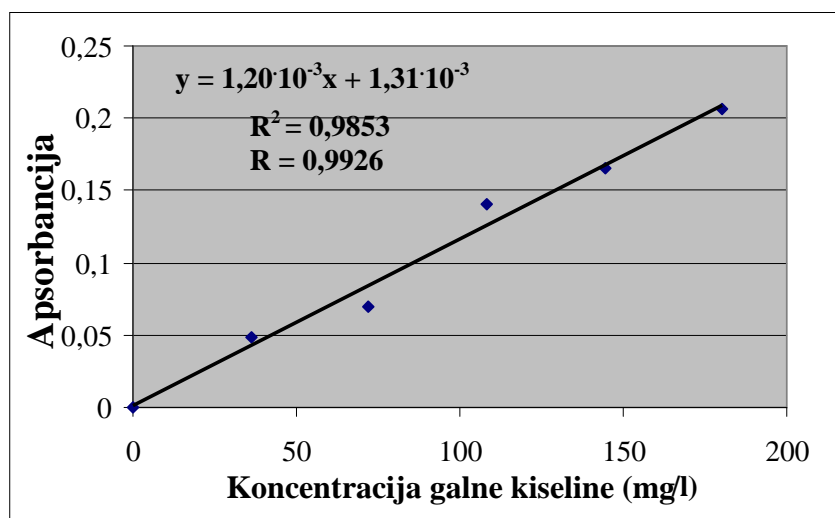
resa > list > srž ploda > ceo plod > crvena unutrašnja kora ploda > mlada kora drveta > stara kora drveta > spoljna braon kora ploda > ježevice.

3.1.2. Određivanje ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida i kondenzovanih tanina

U dobijenim ekstraktima ispitivanih delova *C. sativa* određeni su sadržaji ukupnih fenola, flavonoida i kondenzovanih tanina primenom spektrofotometrijskih metoda^{129, 145-154}.

3.1.2.1. Standardni dijagram za određivanje ukupnih fenola

U cilju određivanja sadržaja ukupnih fenola izrađen je standardni dijagram zavisnosti apsorbancije od koncentracije galne kiseline (slika 19).



Slika 19. Standardni dijagram za galnu kiselinu

Na osnovu dobijenih vrednosti apsorbancija i prikazane jednačine, sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (X_1) je izražen kao ekvivalent galne kiseline (GAE), u mg GAE/g suvog ekstrakta.

$$X_1 = \frac{A - 1,31 \cdot 10^{-3}}{1,20 \cdot 10^{-3}} \quad (6)$$

gde je:

X_1 - sadržaj ukupnih fenola u uzorku, sračunat kao mg GAE/g suvog ekstrakta;

A – apsorbancija rastvora.

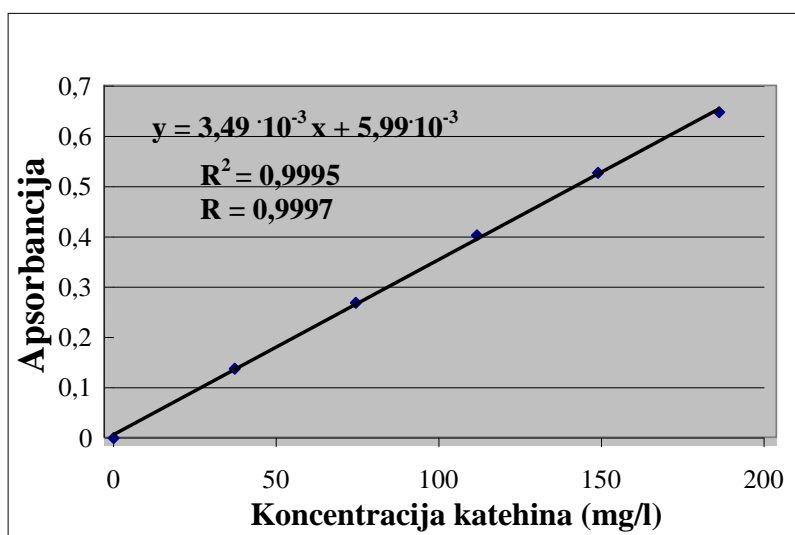
Ispitivani ekstrakti *C. sativa* rastvoreni su u metanolu u finalnoj koncentraciji 1 mg/ml.

Sadržaj ukupnih fenola u drogi (Y_1), izražen kao mg GAE/100 g droge, se dobija kada se sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u uzorku (X_1) pomnoži sa prinosom suvog ekstrakta (Y):

$$Y_1 = X_1 \cdot Y \quad (7)$$

3.1.2.2. Standardni dijagram za određivanje ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida je određen iz standardnog dijagrama zavisnosti apsorbancije od koncentracije (+)-katehina (slika 20).



Slika 20. Standardni dijagram za katehin

Na osnovu dobijenih vrednosti apsorbancija i prikazane jednačine izračunat je sadržaj ukupnih flavonoida (X_2) i izražen kao ekvivalent katehina (CE) u mg CE/g suvog ekstrakta:

$$X_2 = \frac{A - 5,99 \cdot 10^{-3}}{3,49 \cdot 10^{-3}} \quad (8)$$

gde je:

X_2 – sadržaj ukupnih flavonoida u uzorku, sračunat kao mg CE/g suvog ekstrakta;

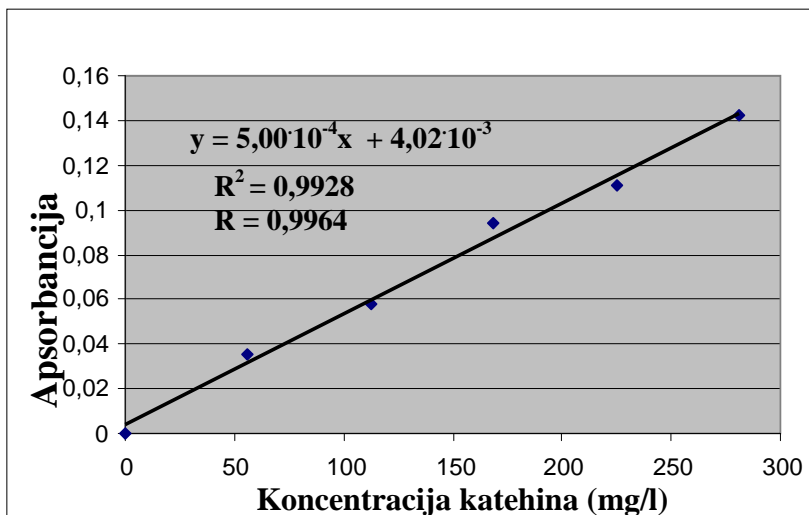
A – apsorbancija rastvora.

Kada se sadržaj ukupnih flavonoida u uzorku (X_2) pomnoži sa prinosom suvog ekstrakta (Y), dobija se sadržaj ukupnih flavonoida (Y_2), izražen kao mg CE/100 g droge:

$$Y_2 = X_2 \cdot Y \quad (9)$$

3.1.2.3. Standardni dijagram za određivanje kondenzovanih tanina vanilin testom

U cilju određivanja sadržaja kondenzovanih tanina primenom vanilin testa izrađen je standardni dijagram zavisnosti apsorbancije od koncentracije katehina (slika 21).



Slika 21. Standardni dijagram za katehin (vanilin test)

Na osnovu dobijenih vrednosti apsorbancija i prikazane jednačine, sadržaj kondenzovanih tanina (X_3) je izražen kao ekvivalent katehina (CE), u mg CE/g suvog ekstrakta:

$$X_3 = \frac{A - 4,02 \cdot 10^{-3}}{5,00 \cdot 10^{-4}} \quad (10)$$

gde je:

X_3 – sadržaj kondenzovanih tanina u uzorku, izražen kao mg CE/g suvog ekstrakta;

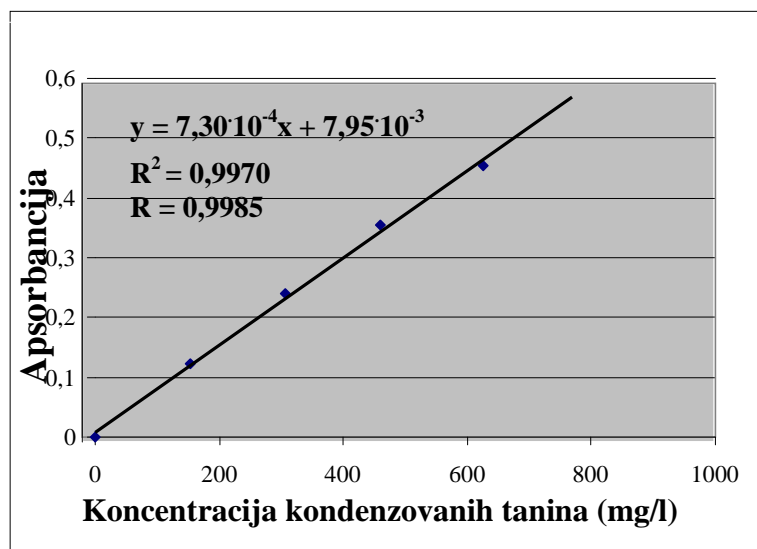
A – apsorbancija rastvora.

Sadržaj kondenzovanih tanina dobijen vanilin testom (X_3) se množi sa prinosom suvog ekstrakta (Y) i dobija se sadržaj kondenzovanih tanina (Y_3), izražen u mg CE/100 g droge:

$$Y_3 = X_3 \cdot Y \quad (11)$$

3.1.2.4. Standardni dijagram za određivanje kondenzovanih tanina kiselim butanolnim testom

Kondenzovani tanini – proantocijanidini, korišćeni za izradu standardnog dijagrama za kiselu butanolni test (slika 22), dobijeni su iz ekstrakta lista kestena prečišćavanjem sa 50% acetonom na koloni sa Sephadex-om.



Slika 22. Standardni dijagram za kondenzovane tanine – proantocijanidine (kiseli butanolni test)

Sadržaj kondenzovanih tanina (X_4) izražen kao ekvivalent kondenzovanih tanina (CT), u mg CT/g suvog ekstrakta se dobija na osnovu vrednosti apsorbancija i prikazane jednačine:

$$X_4 = \frac{A - 7,95 \cdot 10^{-3}}{7,30 \cdot 10^{-4}} \quad (12)$$

gde je:

- X_4 – sadržaj kondenzovanih tanina u uzorku, izražen kao mg CT/g suvog ekstrakta;
- A – apsorbancija rastvora.

Množenjem sadržaja kondenzovanih tanina u uzorku (X_4) sa prinosom suvog ekstrakta (Y), dobija se sadržaj kondenzovanih tanina (Y_4) u drogi, izražen u mg CT/100 g droge:

$$Y_4 = X_4 \cdot Y \quad (13)$$

3.1.3. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida

Za kultivare kestena roda 2006. godine, prinos ukupnih fenola i flavonoida je dat u tabelama 18, 19 i 20.

Tabela 18. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u različitim delovima pitomog kestena (rod 2006. godine)

| Delovi kestena | Ekstragens | | | | | |
|---------------------------------|---------------------------|------------|-------------------------------|------------|---|--------|
| | 50% ac | 50% et | 50% ac | 50% et | 50% ac | 50% et |
| | Sadržaj fenola (%GAE)* | | Sadržaj flavonoida (%CE)** | | Ukupni flavonoidi Ukupni fenoli x100 (%) | |
| Ceo plod | 1,22±0,104 | 0,42±0,067 | 0,49±0,046 | 0,17±0,008 | 40 | 40 |
| Srž ploda | 1,00±0,093 | 0,59±0,029 | 0,02±0,009 | 0,07±0,003 | 2,0 | 11,86 |
| Spoljna braon kora ploda | 1,07±0,109 | 1,19±0,126 | 0,43±0,086 | 0,65±0,021 | 40,18 | 54,62 |
| Crvena unutrašnja kora ploda | - | 2,82±0,063 | - | 1,44±0,096 | - | 51,06 |
| Resa | 10,16±0,291 | 3,28±0,154 | 2,45±0,157 | 0,60±0,031 | 24,11 | 18,29 |
| List | 6,89±0,194 | 1,40±0,011 | 1,50±0,073 | 0,33±0,008 | 21,77 | 23,57 |
| Mlada kora drveta | 5,38±0,201 | 3,00±0,078 | 1,38±0,059 | 0,75±0,069 | 25,65 | 25,00 |
| Stara kora drveta | 3,21±0,247 | 1,70±0,097 | 2,12±0,046 | 0,69±0,056 | 66,04 | 40,58 |
| Ježevice | 1,06±0,086 | 0,49±0,023 | 0,67±0,025 | 0,13±0,017 | 63,20 | 26,53 |

*%GAE – g galne kiseline/100 g droge

**%CE – g katehina/100 g droge

Tabela 19. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u različitim delovima lovranskog maruna (rod 2006. godine)

| Delovi kestena | Ekstragens | | | | | |
|---------------------------------|--------------------------|------------|-----------------------------|------------|---|--------|
| | 50% ac | 50% et | 50% ac | 50% et | 50% ac | 50% et |
| | Sadržaj fenola (%GAE) | | Sadržaj flavonoida (%CE) | | Ukupni flavonoidi Ukupni fenoli x100 (%) | |
| Ceo plod | 0,93±0,086 | 0,67±0,045 | 0,50±0,034 | 0,16±0,010 | 53,76 | 23,88 |
| Srž ploda | 0,60±0,045 | 0,11±0,009 | 0,02±0,008 | 0,02±0,011 | 3,33 | 18,18 |
| Spoljna braon kora ploda | 1,53±0,073 | 3,24±0,023 | 0,87±0,092 | 1,06±0,056 | 56,86 | 32,71 |
| Crvena unutrašnja kora ploda | 6,08±0,175 | 6,16±0,145 | 2,03±0,074 | 1,62±0,099 | 33,39 | 26,29 |
| List | 11,05±0,252 | 2,43±0,056 | 2,26±0,049 | 0,61±0,024 | 20,45 | 25,10 |

Tabela 20. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u različitim delovima kalemljenog italijanskog maruna (rod 2006. godine)

| Delovi kestena | Ekstragens | | | | | |
|-------------------|--------------------------|------------|-----------------------------|------------|---|--------|
| | 50% ac | 50% et | 50% ac | 50% et | 50% ac | 50% et |
| | Sadržaj fenola (%GAE) | | Sadržaj flavonoida (%CE) | | Ukupni flavonoidi Ukupni fenoli x100 (%) | |
| Ceo plod | 0,82±0,045 | 0,41±0,031 | 0,38±0,043 | 0,24±0,032 | 46,34 | 58,53 |
| Resa | 11,42±0,056 | 3,96±0,012 | 2,19±0,069 | 0,83±0,056 | 19,18 | 20,96 |
| List | 6,45±0,079 | 1,71±0,065 | 1,68±0,085 | 0,42±0,039 | 26,04 | 24,56 |

Sadržaj ukupnih fenola dobijen upotrebom 50% acetona kao ekstragensa se kreće od 0,60 %GAE za ekstrakt srži ploda lovranskog maruna do 11,42 %GAE za resu kalemljenog italijanskog maruna. Korišćenjem 50% etanola kao ekstragensa, najmanji sadržaj ukupnih fenola je dobijen za srž ploda lovranskog maruna (0,11 %GAE), a najveći (3,96 %GAE) za resu kalemljenog italijanskog maruna.

Najmanji sadržaj ukupnih flavonoida uz ekstragens 50% aceton (0,02 %CE) ima srž ploda pitomog kestena i lovranskog maruna, a najveći (2,45 %CE) resa pitomog kestena. Sadržaj ukupnih flavonoida (ekstragens 50% etanol) se kreće od 0,02 %CE za srž ploda lovranskog maruna do 1,62 %CE za crvenu unutrašnju koru ploda lovranskog maruna.

Rezultati sadržaja ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima kestena, roda 2007. godine su dati u tabeli 21.

Tabela 21. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u različitim delovima kultivara kestena (rod 2007. godine)

| Delovi kestena | Ekstragens | | | | | |
|-------------------------------------|--------------------------|-------------|-----------------------------|------------|---|--------|
| | 50% ac | 50% et | 50% ac | 50% et | 50% ac | 50% et |
| | Sadržaj fenola (%GAE) | | Sadržaj flavonoida (%CE) | | Ukupni flavonoidi Ukupni fenoli x100 (%) | |
| Pitomi kesten | | | | | | |
| Resa | 9,79±0,096 | 3,98±0,011 | 2,67±0,069 | 0,96±0,013 | 27,27 | 24,12 |
| List | 8,16±0,102 | 4,03±0,035 | 1,99±0,043 | 1,51±0,075 | 24,39 | 37,46 |
| Lovranski marun | | | | | | |
| Resa | 6,96±0,061 | 3,43±0,079 | 0,75±0,043 | 0,62±0,016 | 10,76 | 18,08 |
| List | 4,49±0,081 | 2,55±0,063 | 1,82±0,045 | 0,72±0,033 | 40,53 | 28,23 |
| Kalemljeni italijanski marun | | | | | | |
| List | 15,22±0,106 | 4,42 ±0,059 | 3,48±0,055 | 1,10±0,046 | 22,86 | 24,89 |

Najmanji odnos ukupni flavonoidi/ukupni fenoli je dobijen za ekstrakt srži pitomog kestena (2%), a najveći za staru koru drveta 66,04% i ježevice 63,20% (u svim slučajevima je kao ekstragens korišćen 50% aceton). Srž ploda kestena ima niske vrednosti odnosa ukupnih flavonoida/ukupnih fenola (tabele 18 i 19). Poznato je da sirov oljušten kesten sadrži malo flavonoida²⁰⁷. Veće vrednosti odnosa ukupni flavonoidi/ukupni fenoli su dobijene za staru koru drveta, spoljnu braon koru i crvenu

unutrašnju koru ploda. Za ekstrakte čvrstih delova su pored visokih ukupnih flavonoida dobijene i veće vrednosti ukupnih fenola. Veći prosečan sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i odnosa ukupni flavonoidi/ukupni fenoli je dobijen upotrebom 50% acetona kao ekstragensa u poređenju sa 50% etanolom.

Na osnovu dobijenih rezultata može se ustanoviti sledeći redosled sadržaja ukupnih fenola i flavonoida (primenom oba ekstragensa):

crvena unutrašnja kora ploda > resa > list > mlada kora drveta > stara kora drveta > spoljna braon kora ploda > ceo plod > ježevica > srž ploda.

Poređenjem sadržaja ukupnih fenola i flavonoida odgovarajućih uzorka roda 2006. i 2007. godine utvrđeno je da su veće vrednosti dobijene 2007. godine u odnosu na 2006. godinu primenom oba ekstragensa. Flavonoidi se formiraju u biljci i učestvuju u svetloj fazi fotosinteze tokom koje katalizuju prenos elektrona¹². Sinteza flavonoida se može stimulisati UV zračenjem, interakcijama izazvanim mikroorganizmima, ali i hemijski stres može biti stimulans. Na stvaranje fenolnih materija utiču pored svetlosti, temperatura, zemljište i drugi faktori.

3.1.4. Sadržaj ukupnih kondenzovanih tanina

Sadržaj ukupnih kondenzovanih tanina za ekstrakte kestena roda 2006. godine je dat u tabelama 22, 23 i 24.

Tabela 22. Sadržaj kondenzovanih tanina u različitim delovima pitomog kestena (rod 2006. godine)

| Delovi kestena | Ekstragens | | | |
|------------------------------|----------------------------|-------------|-----------------------------|------------|
| | 50% ac | 50% et | 50% ac | 50% et |
| | Kondenzovani tanini (%CE)* | | Kondenzovani tanini (%CT)** | |
| Ceo plod | 0,87±0,052 | 0,39±0,022 | 2,75±0,059 | 0,88±0,023 |
| Srž ploda | 0 | 0 | 0,09±0,018 | 0 |
| Spoljna braon kora ploda | 2,29±0,087 | 2,78±0,093 | 2,88±0,054 | 1,67±0,058 |
| Crvena unutrašnja kora ploda | - | 15,29±0,282 | - | 3,12±0,085 |
| Resa | 0,35±0,020 | 0,49±0,042 | 2,35±0,084 | 0,95±0,082 |
| List | 0 | 0 | 0,93±0,037 | 0,08±0,007 |
| Mlada kora drveta | 6,64±0,069 | 3,91±0,063 | 4,15±0,091 | 1,89±0,081 |
| Stara kora drveta | 1,51±0,074 | 0,76±0,045 | 1,89±0,063 | 0,58±0,034 |
| Ježevica | 0,09±0,007 | 0 | 0,25±0,009 | 0,08±0,008 |

*%CE – g katehina/100 g droge – vanilin test

**%CT – g kondenzovanih tanina/100 g droge

Tabela 23. Sadržaj kondenzovanih tanina u različitim delovima lovranskog maruna (rod 2006. godine)

| Delovi kestena | Ekstragens | | | |
|------------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|-------------|
| | 50% ac | 50% et | 50% ac | 50% et |
| | Kondenzovani tanini (%CE) | | Kondenzovani tanini (%CT) | |
| Ceo plod | 1,63±0,083 | 0,32±0,020 | 1,62±0,081 | 0,97±0,022 |
| Srž ploda | 0 | 0 | 0,08±0,008 | 0,04±0,005 |
| Spoljna braon kora ploda | 3,09±0,073 | 8,64±0,216 | 3,03±0,081 | 5,63±0,104 |
| Crvena unutrašnja kora ploda | 27,29±0,164 | 23,93±0,154 | 6,13±0,108 | 11,37±0,094 |
| List | 0 | 0 | 0,78±0,023 | 0,07±0,006 |

Tabela 24. Sadržaj kondenzovanih tanina u različitim delovima kalemljenog italijanskog maruna (rod 2006. godine)

| Delovi kestena | Ekstragens | | | |
|----------------|---------------------------|------------|---------------------------|------------|
| | 50% ac | 50% et | 50% ac | 50% et |
| | Kondenzovani tanini (%CE) | | Kondenzovani tanini (%CT) | |
| Ceo plod | 1,11±0,067 | 0,83±0,045 | 1,88±0,049 | 0,74±0,053 |
| Resa | 2,34±0,077 | 0,44±0,021 | 1,42±0,076 | 1,46±0,039 |
| List | 0 | 0 | 2,89±0,083 | 0,11±0,032 |

Korišćenjem vanilin testa kondenzovani tanini nisu detektovani u ekstraktima lista i srži ploda ispitivanih kultivara, uz primenu oba ekstragensa. Najveći prinos kondenzovanih tanina vanilin testom dobijen je za ekstrakt crvene unutrašnje kore ploda lovranskog maruna 27,29 %CE (50% aceton), odnosno 23,93 %CE, kada je 50% etanol primenjen kao ekstragens.

Najmanji prinos kondenzovanih tanina određen kiselim butanolnoim testom uz primenu 50% acetona kao ekstragensa iznosi 0,08 %CT za srž ploda, dok je najveći dobijen za crvenu unutrašnju koru ploda lovranskog maruna (6,13 %CT). Kiselim butanolnim testom kondenzovani tanini nisu detektovani u ekstraktu (ekstragens 50% etanol) srži ploda pitomog kestena, a najveći prinos ovih jedinjenja (11,37%CT) dobijen je za crvenu unutrašnju koru ploda lovranskog maruna.

Primenom vanilin testa kondenzovani tanini nisu detektovani u ekstraktima lista i rese roda 2007. godine. Rezultati prinosa kondenzovanih tanina dobijeni primenom kiselog butanolnog testa su dati u tabeli 25.

Tabela 25. Sadržaj kondenzovanih tanina u različitim delovima kultivara kestena (rod 2007. godine)

| Delovi kestena | Ekstragens | |
|-------------------------------------|------------|------------|
| | 50% ac | 50% et |
| Kondenzovani tanini (%CT) | | |
| Pitomi kesten | | |
| Resa | 2,66±0,070 | 0,96±0,029 |
| List | 1,99±0,061 | 1,00±0,032 |
| Lovranski marun | | |
| List | 1,76±0,059 | 0,29±0,014 |
| Resa | 0,74±0,034 | 0,62±0,028 |
| Kalemljeni italijanski marun | | |
| List | 3,48±0,081 | 1,10±0,037 |

Najmanji prinos kondenzovanih tanina određen je za ekstrakt rese lovranskog maruna (0,74 %CT), a najveći (3,48 %CT) za list kalemljenog italijanskog maruna (ekstragens 50% aceton). Kada se za ekstrakciju koristi 50% etanol, najmanji prinos kondenzovanih tanina je dobijen za ekstrakt lista lovranskog maruna (0,29 %CT), dok najveći ima list kalemljenog italijanskog maruna (1,10 %CT).

Primenom 50% acetona kao ekstragensa određen je veći prinos kondenzovanih tanina, upotrebom oba testa. Vanilin testom je dobijen veći prinos kondenzovanih tanina (izražen kao %CE) u odnosu na prinos kondenzovanih tanina dobijen kiselim butanolnim testom (izražen kao %CT).

Vanilin test je zasnovan na reakciji egzo tipa u kojoj *meta* supstituisani prsten flavanola formira hromoforu, a broj flavanola je proporcionalan apsorbciji rastvora. Iako se dosta koristi za određivanje kondenzovanih tanina (proantocijanidina) ovaj metod nije specifičan za PA. Svaki pogodno supstituisani flavonoid reaguje, uključujući i "monomer" kondenzovanih tanina katehin dajući obojeni proizvod, pa se katehin koristi kao standard u određivanju¹⁵³. Kiseli butanolni test je zasnovan na endo tipu reakcije depolimerizacije kondenzovanih tanina u butanolu koja je katalizovana hloridnom kiselinom. Stvara se crveno obojeni proizvod - antocijanidin koji se određuje spektrofotometrijski. Za standardizovanje ove metode korišćen je proantocijanidin dobijen iz ekstrakta lista kestena.

Zbog razlika koje postoje između ove dve metode, kao i različitih standarda (katehina i kondenzovanih tanina) rezultati određivanja za kondenzovane tanine dobijeni vanilin i kiselim-butanolnim testom se uglavnom dosta razlikuju.

Na osnovu dobijenih rezultata primenom vanilin i kiselog butanolnog testa može se ustanoviti sledeći redosled sadržaja kondenzovanih tanina (važi za oba ekstragensa):

crvena unutrašnja kora ploda > mlada kora drveta > stara kora drveta > spoljna braon kora ploda > ceo plod > ježevice > resa > srž ploda > list.

Veći prinosi kondenzovanih tanina određeni kiselim butanolnim testom su dobijeni kod ekstrakata roda 2006. godine u odnosu na 2007. godinu uz primenu oba ekstragensa.

3.1.5. Korelaciona analiza

Korelacija između prinosa suvog ekstrakta, ukupnih fenola, flavonoida i kondenzovanih tanina je data u tabeli 26. Analizom su obuhvaćeni rezultati uzoraka roda 2006. i 2007. godine.

Tabela 26. Korelacija između prinosa suvog ekstrakta, sadržaja ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i kondenzovanih tanina

| Parametar | Sadržaj fenola (%GAE) | Sadržaj flavonoida (%CE) | Kondenzovani tanini (%CE) |
|--------------------------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------------|
| Prinos suvog ekstrakta (%m/m) | 0,81* (50% ac) | 0,69** (50% ac) | 0,64* (50% et) |
| | 0,65* (50% et) | | |
| Sadržaj flavonoida (%CE) | 0,89* (50% ac) | n.s.** | n.s.** |
| | 0,78* (50% et) | | |
| Kondenzovani tanini (%CT) | 0,64* (50% et) | n.s. | 0,73* (50% ac) |
| | | | 0,92* (50% et) |

* Korelacija je značajna na nivou 0,01

** n.s. - nije signifikantno ($P > 0,05$)

Veoma značajna korelacija ($P < 0,01$) utvrđena je između: prinosa suvog ekstrakta i ukupnih fenola, ukupnih fenola i ukupnih flavonoida, kao i kondenzovanih tanina određenih vanilin i kiselim butanolnim testom kod ekstrakata dobijenih upotrebom oba ispitivana ekstragensa.

Upotrebom 50% etanola kao ekstragensa utvrđena je veoma značajna razlika između ukupnih flavonoida i kondenzovanih tanina određenih vanilin testom ($r = 0,64$), kao i između ukupnih flavonoida i kondenzovanih tanina određenih kiselim butanolnim testom.

Između prinosa suvog ekstrakta i ukupnih flavonoida (ekstragens 50% aceton) je takođe utvrđena veoma značajna korelacija ($P < 0,01$). Između ostalih određivanja nije utvrđena signifikantna korelacija ($P > 0,05$).

Iako su zapažene razlike u prinosu kondenzovanih tanina dobijenih uz pomoć dva testa, između njih je utvrđena veoma značajna korelaciona zavisnost.

S obzirom da fenolne materije i flavonoidi predstavljaju materije sa raznovrstnim farmakološkim delovanjem, veoma signifikantna zavisnost između prinosa suvog ekstrakta i ukupnih fenola, kao i prinosa suvog ekstrakta i ukupnih flavonoida je važan parametar za proizvodni proces dobijanja ekstrakata kestena sa primenom u dijeti i terapiji.

Sva dalja istraživanja su vršena na ekstraktima kestena dobijenim upotrebom 50% etanola kao ekstragensa. Etanol kao ekstragens obezbeđuje sasvim zadovoljavajuće rezultate, a prihvatljiviji je sa aspekata znatno niže toksičnosti u odnosu na 50% aceton.

3.2. ODREĐIVANJE KAPACITETA EKSTRAKATA U ZAŠTITI ERITROCITA OD HEMOLIZE

Rezultati za nivo hemolize izazvan dodatkom 3 mmol/l H₂O₂ u prisustvu ekstrakata kestena su dati u tabeli 27. Kompletna hemoliza eritrocita inkubiranih u vodi 30 minuta uzima se kao 100% hemolize. Nivo ekstracelularnog hemoglobina i dezoksihemoglobina se izračunava na osnovu merenja apsorbancija na 540 nm i 560 nm.

Tabela 27. Nivo hemolize indukovane dodatkom 3 mmol/l H₂O₂ u prisustvu ekstrakata kestena

| | | Talasna dužina (nm) | |
|--|--------------------------------------|--------------------------|-----------|
| | | 540 | 560 |
| Kontrola | | Hemoliza (%) ± SD | |
| Eritrociti (netretirani) | | 0,6±0,002 | 0,5±0,001 |
| Eritrociti (tretirani sa H ₂ O ₂) | | 1,1±0,001 | 1,1±0,002 |
| Rod | Delovi kestena | | |
| (godina) | | | |
| 2006. | Resa kalemljenog italijanskog maruna | 1,0±0,001 | 0,9±0,001 |
| | List lovranskog maruna | 0,8±0,001 | 1,0±0,003 |
| | Ježevice | 1,0±0,001 | 0,9±0,001 |
| 2007. | Resa lovranskog maruna | 1,2±0,003 | 1,1±0,001 |
| | List lovranskog maruna | 0,7±0,003 | 0,6±0,002 |
| | Resa pitomog kestena | 0,9±0,003 | 0,8±0,001 |

Pod primenjenim eksperimentalnim uslovima (30 minutna inkubacija), tretman sa H₂O₂ navedene koncentracije izaziva nizak stepen hemolize. Ekstrakti lista lovranskog maruna i rese pitomog kestena roda 2007. godine štite eritrocite od hemolize. Sa druge strane ekstrakti kestena roda 2006. godine ispoljavaju manji kapacitet zaštite. S obzirom da je došlo do veoma blage hemolize, stepen zaštite nije jako izražen.

3.3. ODREĐIVANJE FENOLNIH JEDINJENJA HPLC ANALIZOM

3.3.1. HPLC/DAD analiza sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja

Hidroliza glikozida do aglikona je jedan od praktičnih metoda za određivanje flavonoida u hrani. Resa i list sva tri ispitivana kultivara kestena su podvrgnuti kiselj hidrolizi. Nakon toga izvršena je HPLC/DAD analiza sadržaja ukupnih fenolnih materija. Pored toga, ekstrakt rese pitomog kestena je analiziran bez prethodne kisele hidrolize (tabela 28).

Najveći sadržaj fenolnih materija određen za ekstrakt rese pitomog kestena (0,083 %RE), a najmanji za resu kalemljenog pitomog kestena (0,021 %RE). Dobijeni HPLC hromatogrami su prikazani na slici P1a-f u Prilogu.

Tabela 28. Sadržaj fenola i flavonoida u ekstraktima kultivara kestena

| Delovi kestena | Sadržaj fenola (%GAE)* | Sadržaj flavonoida (%CE)** | Sadržaj fenola HPLC (mg RE/g SE)*** | Sadržaj fenola HPLC (%RE)**** |
|---|------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| Pitomi kesten | | | | |
| Resa | 0,082±0,004 | 0,077±0,015 | 284,57±0,89 | 0,083±0,015 |
| List | 0,240±0,009 | 0,105±0,007 | 176,82±0,52 | 0,065±0,003 |
| Lovranski marun | | | | |
| List | 0,116±0,010 | 0,038±0,006 | 144,59±0,55 | 0,057±0,019 |
| Kalemljeni italijanski marun | | | | |
| Resa | 0,074±0,010 | 0,014±0,003 | 95,56±0,32 | 0,021±0,007 |
| List | 0,061±0,008 | 0,015±0,008 | 187,63±0,97 | 0,041±0,022 |
| Pitomi kesten resa (bez hidrolize) | 3,28±0,154 | 0,60±0,031 | 39,39±0,18 | 0,395±0,043 |

*%GAE – g galne kiseline/100 g droge

**%CE – g katehina/100 g droge

***mg RE/g SE – mg rutina/g suvog ekstrakta

****%RE – g rutina/100 g droge

Veoma značajna korelacija ($P < 0,01$) je utvrđena između: ukupnih fenola (HPLC) i ukupnih flavonoida ($r = 0,996$), ukupnih fenola (FC metod) i ukupnih flavonoida ($r = 0,994$), ukupnih fenola (HPLC) i ukupnih fenola (FC metod) ($r = 0,989$).

Dobijeni rezultati ukazuju da je FC metod pogodan za analizu fenolnih materija ekstrakata kestena.

3.3.2. HPLC/DAD i LC/MS analiza

Metodama LC/MS i HPLC/DAD analize izvršena su ispitivanja sastava hidrolizata ekstrakata *C. sativa* i dobijeni rezultati su dati u tabelama 29a i 29b.

Tabela 29a. Rezultati HPLC/DAD analize

| Redni broj pika | t_R (min) | Naziv komponente | λ_{max} (nm) | Rod 2006. godine | | |
|-----------------|----------------|---|--------------------------------|---|------------------------------|--------------------------------|
| | | | | Resa kalemljenog italijanskog maruna | List lovranskog maruna | Ježevica pitomog keštena |
| | | | | Sadržaj (mg/ g SE) | | |
| 1 | 8,61 | Elagitanin | 254, 374 | 4,1±0,4 | 7,5±0,5 | 8,9±0,5 |
| 2 | 9,15 | Derivat galne kiseline | 220, 272 | 5,4±0,5 | 4,0±0,5 | nd* |
| 3 | 9,53 | Derivat galne kiseline | 218, 276 | 5,1±0,4 | 13,2±0,8 | 11,9±0,8 |
| 4 | 10,00 | Metil galat | 218, 272 | 36,3±1,2 | 40,7±1,2 | 30,8±1,2 |
| 5 | 10,40 | Derivat galne kiseline | 222, 272 | 5,9±0,5 | 4,5±0,2 | nd |
| 6 | 11,39 | Derivat galne kiseline | 216, 276 | 3,6±0,2 | 8,8±0,5 | 8,8±0,5 |
| 7 | 12,00 | Elagitanin | 224, 268sh** | 3,2±0,2 | 4,8±0,3 | 2,9±0,2 |
| 8 | 13,02 | Elagitanin | 224, 268 sh | 5,4±0,4 | 6,3±0,4 | 4,5±0,4 |
| 9 | 15,16 | Flavogaloińska kiselina | 218, 256, 298, 366 | 3,1±0,4 | 7,2±0,4 | 9,3±0,5 |
| 10 | 17,92 | Derivat galne kiseline | 216, 276 | 0,7±0,1 | 2,7±0,2 | 1,8±0,2 |
| 11 | 18,21 | Metil estar flavogaloińska kiselina | 218, 256, 298, 366 | 1,5±0,2 | 2,8±0,2 | 3,5±0,2 |
| 12 | 18,53 | Derivat protokatehinske kiselina | 278, 344 | 2,1±0,2 | 2,5±0,2 | 2,7±0,2 |
| 13 | 21,16 | Dimetil estar dehidrodigalne kiselina | 224, 272 | 100,5 ±1,8 | 63,1±1,5 | 6,3±0,5 |
| 14 | 22,34 | Elaginska kiselina | 254, 368 | 53,9±1,2 | 52,1±1,2 | 84,1±1,2 |
| 15 | 24,91 | Metil estar dilaktona valoneinske kiselina | 220, 254, 302, 364 | 35,8±1,2 | 61,7±1,5 | 73,7±1,7 |
| 16 | 27,84 | Kvercetin | 202, 256, 372 | 7,9±0,5 | 5,7±0,4 | 12,7±0,7 |
| 17 | 28,41 | Metil estar <i>p</i> -kumarne kiselina | 228, 298, 310 | 8,7±0,4 | 16,6±0,8 | 20,5±0,8 |
| 18 | 29,72 | Kemferol | 196, 222 | 3,1±0,2 | 4,1±0,4 | 7,4±0,5 |
| 19 | 30,2 | Izohromatin | 226 sh, 306 sh, 326 sh, 370 | 5,0±0,5 | 4,0±0,3 | 4,0±0,4 |
| | | Elaginska kiselina i njeni derivati (9, 11, 14, 15) | | 94,3±1,0 | 123,8±1,1 | 170,6±1,3 |
| Σ | | Derivati galne kiseline (4, 13) | | 136,8±1,0 | 103,8±1,2 | 37,1±0,67 |
| | | Jedinjenja sa flavonoidnom strukturom (16, 18 i 19) | | 16±0,7 | 13,5±0,5 | 13,8±0,9 |

* nd – nije detektovano

** "sh" – shoulder ≅ rame ≅ pik nije jasan

Nastavak tabele 29a. Rezultati HPLC/DAD analize

| Redni broj pika | t_R (min) | Naziv komponente | λ_{max} (nm) | Rod 2007. godine | | |
|-----------------|----------------|---|--------------------------------|------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| | | | | List lovranskog maruna | Resa domaćeg pitomog kestena | Resa lovranskog maruna |
| | | | | Sadržaj (mg/g SE) | | |
| 1 | 8,61 | Elagitanin | 254, 374 | 10,5±0,5 | 3,5±0,2 | 6,5±0,5 |
| 2 | 9,15 | Derivat galne kiseline | 220, 272 | 2,1±0,2 | 5,1±0,5 | 5,1±0,5 |
| 3 | 9,53 | Derivat galnekiseline | 218, 276 | 5,7±0,5 | 3,8±0,2 | 6,4±0,5 |
| 4 | 10,00 | Metil galat | 218, 272 | 41,4±1,2 | 43,7±1,4 | 31,1±1,2 |
| 5 | 10,40 | Derivat galne kiseline | 222, 272 | 2,5±0,2 | 5,7±0,4 | 6,1±0,5 |
| 6 | 11,39 | Derivat galne kiseline | 216, 276 | 5,0±0,5 | 2,9±0,2 | 6,1±0,5 |
| 7 | 12,00 | Elagitanin | 224, 268 sh | 4,3±0,2 | 3,9±0,4 | 6,5±0,5 |
| 8 | 13,02 | Elagitanin | 224, 268 sh | 3,0±0,2 | 4,5±0,4 | 7,8±0,3 |
| 9 | 15,16 | Flavogaloinska kiselina | 218, 256, 298, 366 | 3,3±0,2 | 3,9±0,4 | 5,8±0,4 |
| 10 | 17,92 | Derivat galne kiseline | 216, 276 | 1,1±0,2 | 0,7±0,1 | 1,5±0,2 |
| 11 | 18,21 | Metil estar flavogaloinske kiseline | 218, 256, 298, 366 | 2,9±0,2 | 1,4±0,2 | 1,7±0,2 |
| 12 | 18,53 | Derivat protokatehinske kiseline | 278, 344 | 2,6±0,2 | 1,7±0,2 | 2,2±0,2 |
| 13 | 21,16 | Dimetil estar dehidrodigalne kiseline | 224, 272 | 41,8±1,3 | 73,2±1,6 | 67,0±1,2 |
| 14 | 22,34 | Elaginska kiselina | 254, 368 | 84,0±1,2 | 45,7±1,2 | 59,1±1,2 |
| 15 | 24,91 | Metil estar dilaktona valoneinske kiseline | 220, 254, 302, 364 | 49,0±1,2 | 32,8±1,2 | 41,3±1,3 |
| 16 | 27,84 | Kvercetin | 202, 256, 372 | 5,5±0,5 | 11,5±0,7 | 2,5±0,2 |
| 17 | 28,41 | Metil estar <i>p</i> -kumarne kiseline | 228, 298, 310 | 12,6±0,8 | 19,0±0,8 | 13,6±0,8 |
| 18 | 29,72 | Kemferol | 196, 222 | 2,9±0,2 | 7,3±0,5 | 2,0±0,2 |
| 19 | 30,2 | Izohromatin | 226 sh, 306 sh, 326 sh, 370 | 2,2±0,2 | 16,1±0,7 | 2,5±0,2 |
| | | Elaginska kiselina i njeni derivati (9, 11, 14, 15) | | 139,2±0,9 | 83,8±1,3 | 107,9±1,0 |
| | | Derivati galne kiseline (4, 13) | | 82,9±0,8 | 116,9±1,6 | 98,1±0,86 |
| Σ | | Jedinjenja sa flavonoidnom strukturom (16, 18 i 19) | | 10,6±0,9 | 34,9±0,9 | 7±0,3 |

Tabela 29b. Rezultati HPLC/DAD analize

| Redni broj pika | t_R (min) | Naziv komponente | λ_{max} (nm) | Rod 2006. godine | | | Rod 2007. godine | |
|-----------------|----------------|---|--|----------------------------|---|---------------------------------------|---------------------------------------|---|
| | | | | List pitomog kestena | List kalemljenog italijanskog maruna | Resa domaćeg pitomog kestena | List domaćeg pitomog kestena | List kalemljenog italijanskog maruna |
| | | | | Sadržaj (mg/g SE) | | | | |
| 1 | 8,39 | Elagitanin | 254, 374 | t | t | 0,5±0,1 | 0,2±0,1 | t |
| 2 | 8,94 | Derivat galne kiseline | 220, 272 | t | t | 2,5±0,1 | 0,8±0,1 | t |
| 3 | 9,28 | Derivat galne kiseline | 218, 276 | 1,6±0,1 | 2,1±0,1 | 2,5±0,1 | 2,9±0,1 | 0,6±0,1 |
| 4 | 9,8 | Metil galat | 218, 272 | 8,9±0,1 | 11,5±0,1 | 14,4±0,1 | 9,3±0,1 | 11,8±0,1 |
| 5 | 10,18 | Derivat galne kiseline | 222, 272 | t | t | 4,1±0,1 | 0,9±0,1 | t |
| 6 | 11,09 | Derivat galne kiseline | 216, 276 | t | 0,6±0,1 | 0,5±0,1 | 0,6±0,1 | t |
| 7 | 11,67 | Elagitanin | 224, 268 sh | 0,6±0,1 | t | 1,9±0,1 | 0,6±0,1 | t |
| 8 | 12,65 | Elagitanin | 224, 268 sh | 1,0±0,1 | 1,8±0,1 | 2,1±0,1 | 2,4±0,1 | 3,9±0,1 |
| 9 | 14,87 | Flavogaloinska kiselina | 218, 256, 298, 366 | 0,1±0,1 | 0,1±0,1 | 0,7±0,1 | 1,3±0,1 | t |
| 10 | 17,92 | Derivat galne kiseline | 216, 276 | nd | nd | nd | nd | nd |
| 11 | 18,21 | Metil estar flavogaloinske kiseline | 218, 256, 298 | nd | nd | nd | nd | nd |
| 12 | 18,53 | Derivat protokatehinske kiseline | 278, 344 | nd | nd | nd | nd | nd |
| 13 | 20,68 | Dimetil estar dehidrodigalne kiseline | 224, 272 | 15,2±0,3 | 12,7±0,2 | 43,9 ±0,3 | 16,0±0,2 | 20,5±0,3 |
| 14 | 21,98 | Elaginska kiselina | 254, 368 | 20,2±0,3 | 18,0±0,3 | 13,7±0,3 | 10,8±0,1 | 21,6±0,3 |
| 15 | 24,72 | Metil estar dilaktone valoneinske kiseline | 220, 254, 302, 364 | 14,8±0,2 | 14,9±0,3 | 10,5±0,3 | 9,8±0,1 | 8,9±0,1 |
| 16 | 27,68 | Kvercetin | 202, 256, 372 | 1,0±0,1 | 1,9±0,1 | 0,3±0,1 | t | 0,6±0,1 |
| 17 | 28,21 | Metil estar <i>p</i> -kumarne kiseline | 228, 298, 310 | 2,7±0,1 | 5,0±0,1 | 1,5±0,1 | 3,6±0,1 | 3,2±0,1 |
| 18 | 29,58 | Kemferol | 264, 368 | t | 0,5±0,1 | 0,2±0,1 | t | t |
| 19 | 29,98 | Izohromatin | 254, 266 sh, 306 sh, 326 sh, 370 | t | t | 0,2±0,1 | t | t |
| | | Elaginska kiselina i njeni derivati (9, 11, 14, 15) | | 35,1±0,3 | 33,0±0,4 | 24,9±0,4 | 21,9±0,2 | 30,5±0,3 |
| Σ | | Derivati galne kiseline (4, 13) | | 24,1±0,4 | 24,2±0,7 | 58,3±0,6 | 25,3±0,3 | 32,3±0,3 |
| | | Jedinjenja sa flavonoidnom strukturom (16, 18 i 19) | | 1,0±0,1 | 2,4±0,6 | 0,6±0,1 | t | 0,6±0,1 |

t – tragovi

U slučajevima kada struktura komponenata nije nedvosmisleno određena, komponente su definisane kao elagitanini (komponente **1**, **7** i **8**), derivati galne kiseline (komponente **2**, **3**, **5**, **6** i **10**) ili derivat protokatehinske kiseline (komponenta

12). Za ove komponente (izuzev za komponente 7 i 8) prikazane su verovatne strukture.

Na osnovu izvršenih analiza, strukture identifikovanih komponenti u ekstraktima *C. sativa* su prikazane na slici 23a-c.

Elagitanini iz različitih biljaka poseduju visok antioksidativni kapacitet, a deluju inhibitorno na inicijaciju i razvoj kancerogeneze²²⁰. Elagitanini su sastojci svakodnevnog dijete, a netoksični su nakon dugotrajnog konzumiranja²²¹. Elagitanini se ne apsorbuju u nepromenjenom obliku, već se metabolišu dejstvom intestinalne mikroflore do elaginske kiseline i njenih derivata²²². Metaboliti elagitanina imaju dugo vreme polu-života u krvnoj plazmi. Derivati elagitanina ispoljavaju visok antioksidativni potencijal elagitanina i deluju blagotvorno kao sastojci dijete kod patofizioloških stanja povezanih sa oksidativnim stresom.

Poznato je da su glavni sastojci ekstrakata *C. sativa* kompleksni, a sastoje se od hidrolizovanih tanina, kao što su elagitanini i galotanini²²³. U cilju simulacije metabolizma tanina u intestinumu čoveka i olakšane analize, ekstrakti *C. sativa* su podvrgnuti metanolizaciji.

Tačna merenja masa molekularnih i fragmentiranih jona komponenata su dobijena na (TOF) "time-of-flight" masenom spektrometru na pozitivnom i negativnom polarnom modu. Rezultati LC/MS analize su sumarno dati u tabelama 30a i 30b.

Tabela 30a. Rezultati LC/MS analize

| Redni broj pika | Pozitivan mod | | Negativan mod | | |
|-----------------|-----------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|---|
| | Detektovana jonska vrsta | Molekulska masa | Detektovana jonska vrsta | Molekulska masa | Molekulska formula |
| 1 | M+H, M+Na, 2M+H | 596,0414 | M-H, 2M-H | 596,0429 | C ₂₇ H ₁₆ O ₁₆ |
| 2 | M+H, M+Na, M+K | 352,0428 | M-H | 352,0430 | C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ |
| 3 | M+H, M+Na, M+K, 2M+Na, 2M+K | 498,1002 | M-H, 2M-H | 498,1013 | C ₂₁ H ₂₂ O ₁₄ |
| 4 | M+H, M+Na, M+K | 184,0367 | M-H, 2M-H | 184,0377 | C ₈ H ₈ O ₅ |
| 5 | M+H, M+Na, M+K | 352,0433 | M-H | 352,0432 | C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ |
| 6 | M+H, M+Na, M+K, 2M+Na | 498,1008 | M-H, 2M-H | 498,1008 | C ₂₁ H ₂₂ O ₁₄ |
| 7 | M+2H, M+Na, | 1130,1081 | M-2H | 1130,1063 | C ₅₀ H ₃₄ O ₃₁ |
| 8 | M+2H, M+H, M+Na, M+K | 1116,0927 | M-2H | 1116,0909 | C ₄₉ H ₃₂ O ₃₁ |
| 9 | M+H, M+Na, 2M+H, 2M+Na | 470,0127 | M-H, 2M-H | 470,0118 | C ₂₁ H ₁₀ O ₁₃ |
| 10 | M+H, M+Na, M+K | 498,1006 | M-H | 498,1004 | C ₂₁ H ₂₂ O ₁₄ |
| 11 | M+H, M+Na, M+K, 2M+Na | 484,0275 | M-H | 484,0269 | C ₂₂ H ₁₂ O ₁₃ |
| 12 | M+H, M+Na | 306,0376 | M-H, 2M-H | 306,0374 | C ₁₄ H ₁₀ O ₈ |
| 13 | M+H, M+Na, M+K | 366,0585 | M-H | 366,0585 | C ₁₆ H ₁₄ O ₁₀ |
| 14 | M+H, M+Na, M+K, 2M+Na | 302,0060 | M-H | 302,0060 | C ₁₄ H ₆ O ₈ |
| 15 | M+H, 2M+H | 484,0271 | M-H, 2M-H | 484,0289 | C ₂₂ H ₁₂ O ₁₃ |
| 16 | M+H | 302,0423 | M-H, 2M-H | 302,0421 | C ₁₅ H ₁₀ O ₇ |
| 17 | M+H, M+Na | 178,0626 | M-H | 178,0631 | C ₁₀ H ₁₀ O ₃ |
| 18 | M+H, M+Na | 286,0478 | M-H | 286,0474 | C ₁₅ H ₁₀ O ₆ |
| 19 | M+H | 316,0575 | M-H | 316,0582 | C ₁₆ H ₁₂ O ₇ |

Tabela 30b. Rezultati LC/MS analize

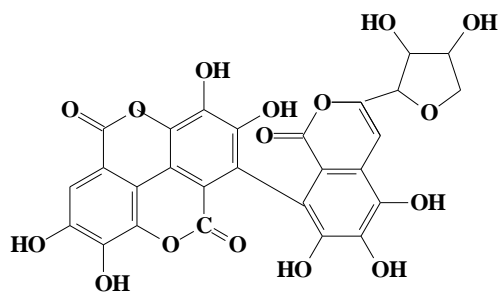
| Redni broj pika | Pozitivan mod | | Negativan mod | | |
|-----------------|-----------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|---|
| | Detektovana jonska vrsta | Molekulska masa | Detektovana jonska vrsta | Molekulska masa | Molekulska formula |
| 1 | M+H, M+Na, 2M+H | 596,0414 | M-H, 2M-H | 596,0429 | C ₂₇ H ₁₆ O ₁₆ |
| 2 | M+H, M+Na, M+K | 352,0428 | M-H | 352,0430 | C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ |
| 3 | M+H, M+Na, M+K, 2M+Na, 2M+K | 498,1002 | M-H, 2M-H | 498,1013 | C ₂₁ H ₂₂ O ₁₄ |
| 4 | M+H, M+Na, M+K | 184,0367 | M-H, 2M-H | 184,0377 | C ₈ H ₈ O ₅ |
| 5 | M+H, M+Na, M+K | 352,0433 | M-H | 352,0432 | C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ |
| 6 | M+H, M+Na, M+K, 2M+Na | 498,1008 | M-H, 2M-H | 498,1008 | C ₂₁ H ₂₂ O ₁₄ |
| 7 | M+2H, M+Na, | 1130,1081 | M-2H | 1130,1063 | C ₅₀ H ₃₄ O ₃₁ |
| 8 | M+2H, M+H, M+Na, M+K | 1116,0927 | M-2H | 1116,0909 | C ₄₉ H ₃₂ O ₃₁ |
| 9 | M+H, M+Na, 2M+H, 2M+Na | 470,0127 | M-H, 2M-H | 470,0118 | C ₂₁ H ₁₀ O ₁₃ |
| 13 | M+H, M+Na, M+K | 366,0585 | M-H | 366,0585 | C ₁₆ H ₁₄ O ₁₀ |
| 14 | M+H, M+Na, M+K, 2M+Na | 302,0060 | M-H | 302,0060 | C ₁₄ H ₆ O ₈ |
| 15 | M+H, 2M+H | 484,0271 | M-H, 2M-H | 484,0289 | C ₂₂ H ₁₂ O ₁₃ |
| 16 | M+H | 302,0423 | M-H, 2M-H | 302,0421 | C ₁₅ H ₁₀ O ₇ |
| 17 | M+H, M+Na | 178,0626 | M-H | 178,0631 | C ₁₀ H ₁₀ O ₃ |
| 18 | M+H, M+Na | 286,0478 | M-H | 286,0474 | C ₁₅ H ₁₀ O ₆ |
| 19 | M+H | 316,0575 | M-H | 316,0582 | C ₁₆ H ₁₂ O ₇ |

Dominantna vrsta registrovana na pozitivnom modu za većinu komponenta je $[M+H]^+$ pseudomolekularni jon. Za neke od njih prisutan je takođe $[2M-H]^-$ adukt. U većini slučajeva su prisutni $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[2M+Na]^+$ i $[2M+K]^+$ adukti natrijuma i kalijuma. Sve identifikovane komponente ispoljavaju kvazi-molekularni jon $[M-H]^-$ na negativnom modu, a u nekim slučajevima potvrđena je molekulska masa $[2M-H]^-$ jona.

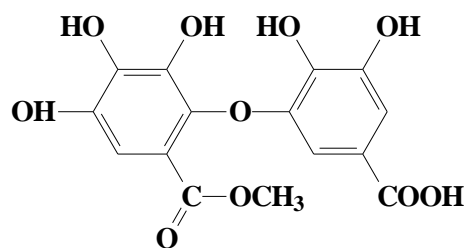
Za elagitanine veće molekulske mase **7** i **8**, dodatno su zapažene dvostruko naelektrisane $[M+2H]^{2+}$ i $[M-2H]^{2-}$ vrste. Pored toga, spektralni podaci dobijeni na UV/VIS detektoru sa fotodiodnim nizom omogućuju konačno određivanje mnogih struktura. UV/VIS maksimumi karakteristični za različite klase polifenolnih komponenata su upoređeni sa onima iz literaturnih podataka^{224,225}.

Izvršeno je kvantitativno određivanje komponenata upotrebom HPLC/DAD metode merenjem apsorbancija na 280 nm. Sadržaj svih ispitivanih komponenata je dobijen na osnovu površine integrala, korišćenjem kalibracione jednačine za galnu kiselinu. HPLC hromatogrami su prikazani na slici P2a-k (u Prilogu), a sadržaj 19 detektovanih komponenata je dat u tabelama 29a i 29b. Ekstrakt ježevica ima najveći sadržaj elagitanina (170,6 mg/g) (tabela 30a).

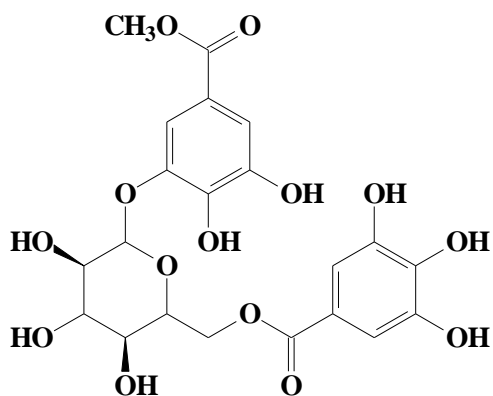
Identifikovane komponente se mogu klasifikovati u elaginsku kiselinu i njene derivate (9, 11, 14, 15), koji predstavljaju proizvode nastale od elagitanina, derivate galne kiseline (4, 13), zatim tri flavonoidne strukture (16, 18 i 19), kao i na metil estar kumarne kiseline (17). Glavne komponente hidrolizata nakon metanolizacije su dimetil estar dehidrodigalne kiseline, kao i metil estar dilaktone elaginske i valoneinske kiseline.



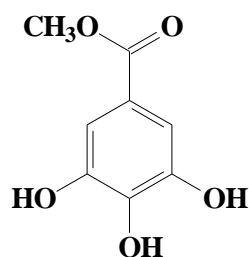
Verovatna struktura 1



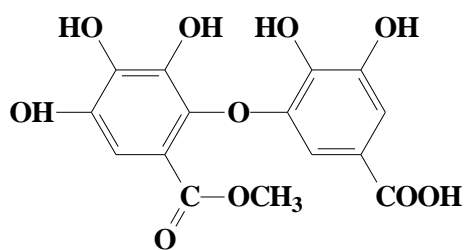
Verovatna struktura 2*



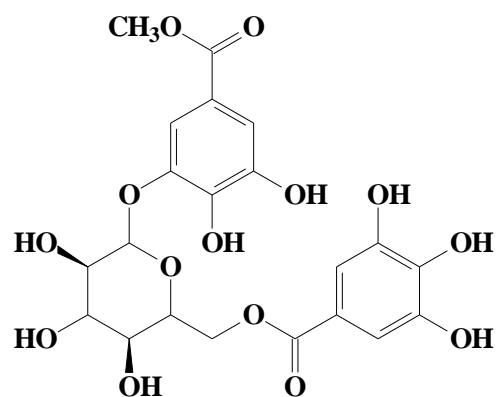
Verovatna struktura 3**



4



Verovatna struktura 5*

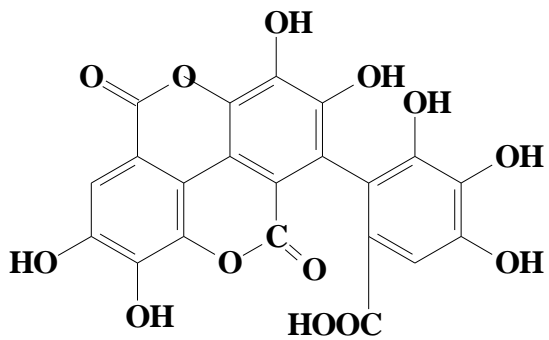


Verovatna struktura 6**

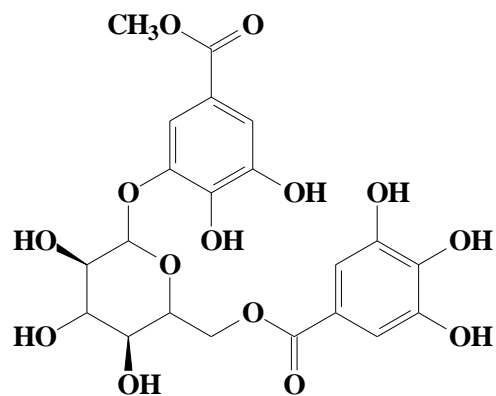
* 2 i 5 su izomeri, pa je predložena ista formula

** 3, 6 i 10 su izomeri (predložena je ista formula)

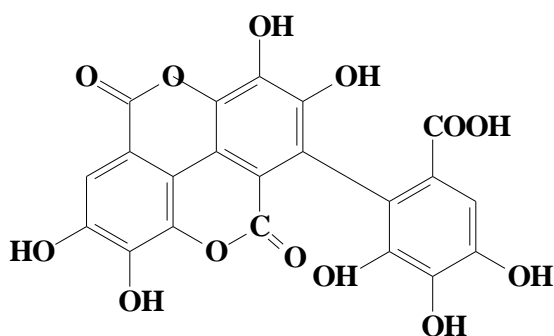
Slika 23a. Strukture različitih identifikovanih komponenti



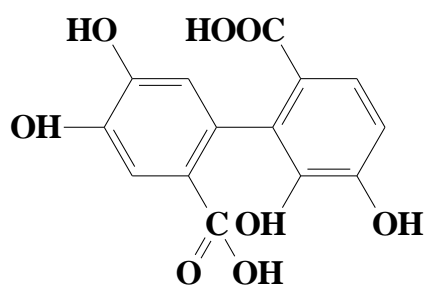
9



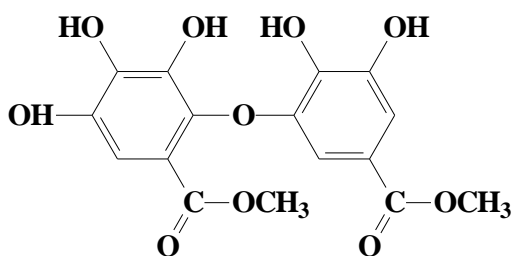
Verovatna struktura 10**



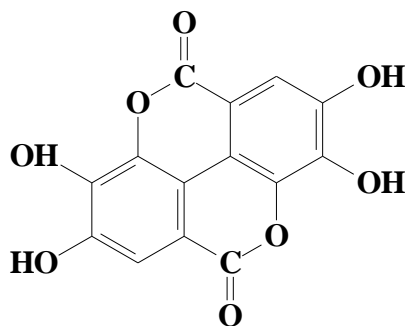
11



Verovatna struktura 12

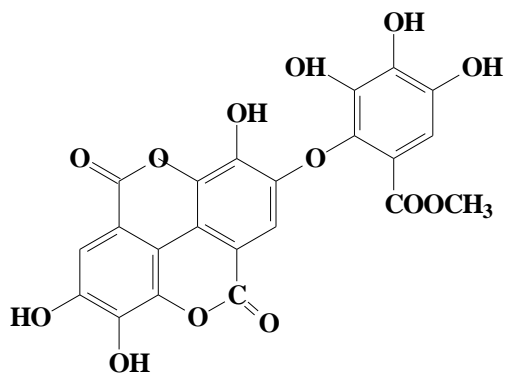


13

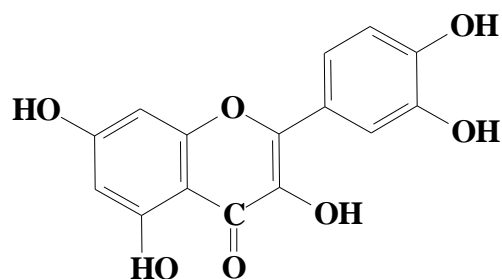


14

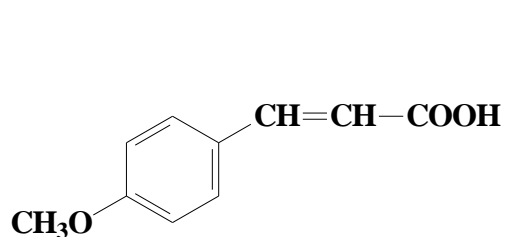
Slika 23b. Strukture različitih identifikovanih komponenti



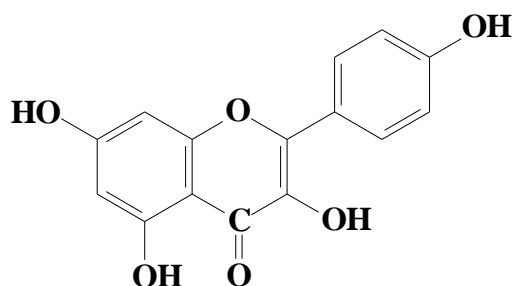
15



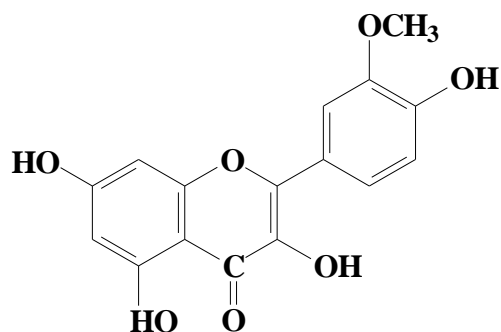
16



17



18



19

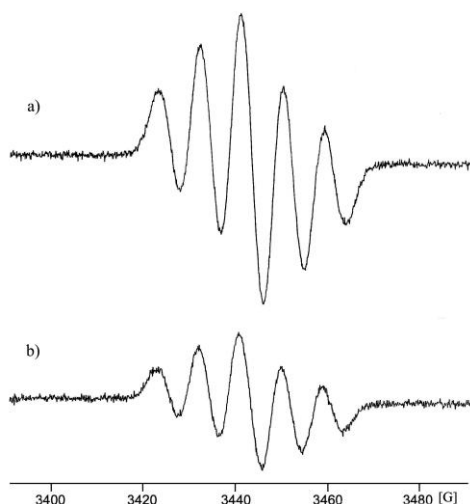
Slika 23c. Strukture različitih identifikovanih komponenti

3.4. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA KESTENA

Ispitana je antioksidativna aktivnost ekstrakata *C. sativa* u odnosu na transformaciju DPPH, hidroksi i superoksidnog anjon radikala, kapacitet ekstrakata za uklanjanje lipidne peroksidacije, transformacije organskih hidrofilnih radikala i transformacije radikalskih vrsta generisanih UV zračenjem.

3.4.1. Transformacija DPPH radikala

EPR spektar stabilnog DPPH radikala se lako može prepoznati po blanku (slepoj probi) koja ima 5 linija relativnog odnosa inteziteta 1:2:3:2:1 i hiperfine konstante kuplovanja $a_N = 9,03\text{G}$ (slika 24a). Hiperfina struktura EPR spektra stabilnih DPPH radikala potiče od interakcije nesparenog elektrona i dva ^{14}N atoma, sa spinskim kvantim brojem $I=1$.



Slika 24. a. EPR spektar DPPH radikala bez dodavanja ekstrakta (slepa proba)

b. EPR spektar DPPH radikala sa dodatkom ekstrakta rese pitomog kestena

(Koncentracija DPPH radikala je $11,8 \times 10^{-4} \text{ mmol/dm}^3$, ekstrakt rese je dodat u koncentraciji od 0,2 mg/ml, rastvoren u vodi)

U tabeli 31 su rezultati za antioksidativnu aktivnost (AA) u odnosu na DPPH radikale ekstrakata različitih kultivara i delova *C. sativa*, rastvorenih u vodi u koncentraciji 0,2 mg/ml. Ekstrakt rese pitomog kestena ispoljio je najveću antioksidativnu aktivnost AA = 37,50% (slika 24b). U isto vreme, ovaj ekstrakt poseduje i visok sadržaj ukupnih fenolnih komponenti, i to 3,28 %GAE (tabela 18). Visoka antioksidativna aktivnost je takođe utvrđena za ekstrakte spoljne braon kore lovranskog maruna (AA = 36,52%) i lista kalemljenog italijanskog maruna (AA = 29,96%). Ceo plod kestena i srž ploda nisu ispoljili antioksidativnu aktivnost. Dobijene vrednosti za antioksidativnu aktivnost srži, ploda i spoljne braon kore su povezane sa sastavom ploda pitomog kestena, gde srž ploda učestvuje sa 69,9%, a spoljna braon kora sa 24,41% (tabela 16).

Tabela 31. Antioksidativna aktivnost u odnosu na DPPH radikale

| Delovi kestena | DPPH aktivnost (%) \pm SD |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| Pitomi kesten | |
| Ceo plod | 0 |
| Srž ploda | 0 |
| Spoljna braon kora ploda | 21,43 \pm 0,23 |
| Resa | 37,50 \pm 0,96 |
| List | 21,43 \pm 0,78 |
| Stara kora drveta | 21,74 \pm 0,35 |
| Ježevice | 1,19 \pm 0,07 |
| Lovranski marun | |
| Spoljna braon kora ploda | 36,52 \pm 1,13 |
| List | 15,48 \pm 0,08 |
| Kalemljeni italijanski marun | |
| Resa | 9,56 \pm 0,09 |
| List | 29,96 \pm 0,78 |

Istraživanja Yokozawe i sar.²²⁶ su pokazala da tanini i neki flavonoidi ispoljavaju aktivnost u odnosu na DPPH radikale i da je aktivnost u tesnoj vezi sa njihovom hemijskom strukturom. Sa porastom broja galoil grupa, molekulske mase i *orto*-hidroksidnih grupa u strukturi raste aktivnost tanina, a broj i pozicija hidroksilnih grupa predstavljaju važnu karakteristiku flavonoida za "hvatanje" slobodnih radikala.

Na slikama P3a-1 (u Prilogu) prikazani su spektri DPPH radikala nastalih u prisustvu 0,2 mg/ml ispitivanih ekstrakata rastvorenih u vodi.

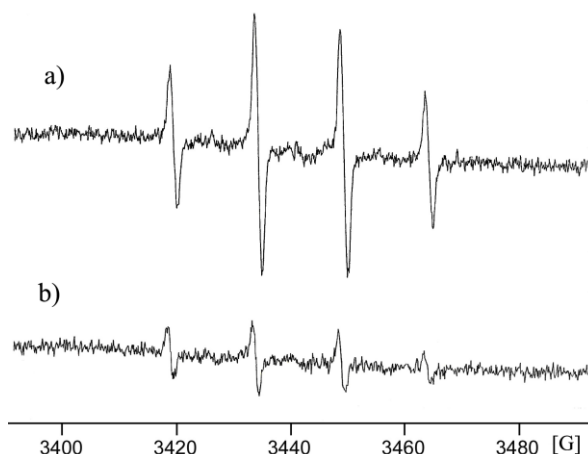
U svim slučajevima nema promene u obliku EPR spektra, ali je relativan intezitet EPR signala redukovan dodatkom *C. sativa* ekstrakata (slike P3d-1). EPR spektar celog ploda (slika P3b) i srži kestena (slika P3c) su identični slepoj probi (slika P3a), jer je antioksidativna aktivnost ovih ekstrakata u odnosu na DPPH radikale jednaka 0.

3.4.2. Transformacija hidroksi radikala

Ispitan je kapacitet različitih ekstrakata *C. sativa* Mill. za inhibiciju hidroksilnih radikala generisanih u Fenton-ovoj reakciji ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$). Od svih kiseoničnih radikala, hidroksi radikali su najreaktivniji i indukuju ozbiljna oštećenja okolnih biomolekula²²⁷.

Na slici 25 su prikazani EPR spektri DMPO-OH spin adukta snimanih 5 min nakon mešanja slepe probe sa 0,2 mg/ml ispitaivanih ekstrakata kestena rastvorenih u vodi (aparatus I).

Kako je prikazano na slici 25a, reakcija Fe^{2+} i H_2O_2 u prisustvu spin trap agensa DMPO generiše 1:2:2:1 kvartet linija u EPR spektru sa hiperfinom strukturom i konstantom kuplovanja a_N i $a_H=14,9$ G.



Slika 25. a. EPR spektar DMPO-OH spin adukta slepe probe (blank)
b. EPR spektar DMPO-OH spin adukta ekstrakta stare kore kestena rastvorenog u vodi.

(Slepa proba je dobijena mešanjem 2 ml 0,8 mol/dm³ DMPO, 0,2 ml 10 mol/dm³ H₂O₂, 0,2 ml 10 mmol/dm³ Fe²⁺ i 0,2 ml vode. Ekstrakt stare kore je dodat rastvoren u vodi u finalnoj koncentraciji od 0,2 mg/ml. EPR spektri su snimani 5 minuta nakon dodavanja reagenasa)

Antioksidativna aktivnost u odnosu na hidroksi radikale ispitivanih ekstrakata je data u tabeli 32.

Tabela 32. Antioksidativna aktivnost ekstrakata kestena roda 2006. godine u odnosu na OH radikale

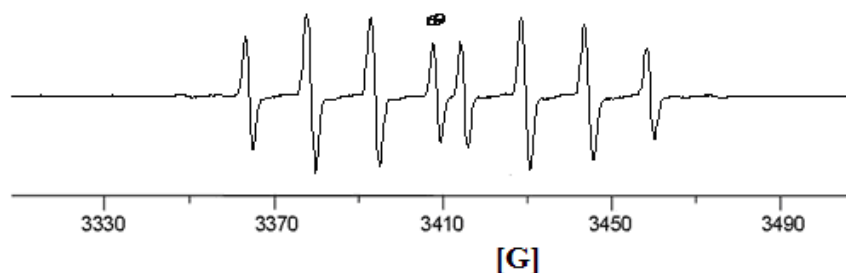
| Delovi kestena | OH aktivnost (%) ± SD |
|-------------------------------------|-----------------------|
| Pitomi kesten | |
| Ceo plod | 5,45±0,31 |
| Srž ploda | 0 |
| Spoljna braon kora ploda | 21,82±0,93 |
| Resa | 43,64±1,72 |
| List | 0 |
| Stara kora drveta | 68,18±2,43 |
| Ježevice | 1,82±0,08 |
| Lovranski marun | |
| Spoljna braon kora ploda | 56,36±2,51 |
| List | 5,45±0,07 |
| Kalemljeni italijanski marun | |
| Resa | 59,09±1,78 |
| List | 48,18±1,32 |

EPR spektar DMPO-OH spin adukta formiran u prisustvu ekstrakata stare kore drveta kestena je dat na slici 25b sa najvećom "skevendžing" radikalskom aktivnošću koja iznosi AA = 68,18% (tabela 32). Visoka "skevendžing" radikalska aktivnost je

ispoljena i za resu kalemljenog italijanskog maruna (AA = 59,09%) (slika P4l) i spoljnu braon kore lovranskog maruna (AA = 56,36%) (slika P4i). Antioksidativna aktivnost u odnosu na OH radikale nije detektovana za ekstrakt srži kestena (slika P4c), kao i lista kestena (slika P4f). Niska vrednost antioksidativne aktivnosti je određena za ceo plod kestena (AA = 5,45%) (slika P4b).

Porast hidroksi radikalske "skevendžing" aktivnosti se može objasniti osobinom tanina da helatiziraju gvožđe.

Karakterističan EPR signal za DEPMPO/OH adukt dobijen u Fenton-ovoj reakciji (aparati II) je prikazan na slici 26.



Slika 26. EPR signal DEPMPO adukta \cdot OH radikala generisanog u Fenton-ovoj reakciji
(Označen je DEPMPO/OH pik čija se amplituda određuje)

EPR spektar DEMPO/OH spin adukta snimanog 5 min nakon kombinovanja 28 mmol/l DEPMPO, 2 mmol/l H_2O_2 , 0,075 mmol/l $FeSO_4$ i 0,2 ml Fe^{2+} i vode (blank) je prikazan u Prilogu, na slici P5a. Na slikama P5b-f (u Prilogu) su prikazani EPR spektri DEMPO/OH spin adukta snimanog 5 minuta nakon dodavanja ekstrakata koncentracije 0,2 mg/ml prethodno rastvorenih u vodi.

U tabeli 33 su dati rezultati za antioksidativnu aktivnost u odnosu na hidroksi radikale ekstrakata rese i lista roda 2007. godine.

Tabela 33. Spособnost ekstrakata kestena roda 2007. da redukuju stvaranje \cdot OH radikala u Fenton-ovoj reakciji

| Delovi kestena | RI (%) \pm SD |
|-------------------------------------|-----------------|
| Pitomi kesten | |
| Resa | 20 \pm 0,03 |
| List | 29 \pm 0,04 |
| Lovranski marun | |
| Resa | 23 \pm 0,03 |
| List | 34 \pm 0,02 |
| Kalemljeni italijanski marun | |
| List | 33 \pm 0,03 |

Svi ekstrakti su ispoljili "skevendžing" \cdot OH radikala, ali u različitoj meri. Ekstrakti rese ispoljavaju niže vrednosti antioksidativne aktivnosti u poređenju sa ekstraktima lista.

3.4.3. Korelaciona analiza

Izvršena je korelaciona analiza između sadržaja ukupnih fenola, flavonoida, kondenzovanih tanina, kao i antioksidativne aktivnosti u odnosu na DPPH i hidroksi radikale (aparati I) (tabela 34). Analizom su obuhvaćeni ekstrakti dobijeni od kestena roda 2006. godine.

Tabela 34. Korelacija između sadržaja ukupnih fenola, flavonoida, kondenzovanih tanina i antioksidativne aktivnosti u odnosu na DPPH i OH radikale

| Parametar | Sadržaj fenola (%GAE) | Sadržaj flavonoida (%CE) | DPPH aktivnost (%) |
|---------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------|
| Sadržaj fenola (%GAE) | | 0,83** | 0,60* |
| Sadržaj flavonoida (% CE) | | | 0,66* |
| OH aktivnost (%) | 0,68* | 0,76** | 0,60* |
| Kondenzovani tanini (%CE) | n.s.*** | 0,67* | n.s. |
| Kondenzovani tanini (%CT) | n.s. | 0,73** | n.s. |

* Korelacija je značajna na nivou 0,05

** Korelacija je značajna na nivou 0,01

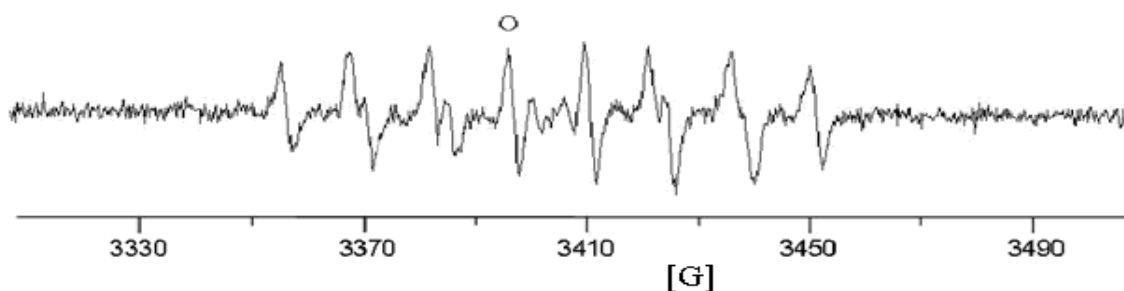
*** n.s. - nije signifikantno ($P > 0,05$)

Veoma značajna korelacija ($P < 0,01$) je utvrđena između sadržaja fenola i flavonoida, sadržaja flavonoida i OH antioksidativne aktivnosti, kao i sadržaja flavonoida i kondenzovanih tanina određenih kiselim butanolnim testom. Značajna korelacija ($P < 0,05$) je utvrđena između sadržaja fenola i OH aktivnosti, sadržaja fenola i DPPH aktivnosti, sadržaja flavonoida i DPPH aktivnosti, kao i između sadržaja flavonoida i kondenzovanih tanina određenih vanilin testom.

Između ostalih određivanja nije ustanovljena signifikantna korelaciona zavisnost ($P > 0,05$).

3.4.4. Transformacija superoksidnog anjon radikala

Karakterističan EPR signal dobijen u HX/XO sistemu upotrebom DEPMPO je prikazan na slici 27.



Slika 27. EPR signal DEPMPO adukta dobijen u HX/XO sistemu

(Na spektru je označena linija DEPMPO/OOH signala čija se amplituda određuje)

Slab signal DEPMPO/OH adukta se takođe može zapaziti u vidu dva mala centralna signala, ali on ne utiče na amplitudu i oštrinu dve centralne linije koje potiču od DEPMPO/OOH signala.

Svi ispitivani ekstrakti ispoljili su izrazitu "skevendžing" aktivnost u odnosu na $\cdot\text{O}_2^-$ radikale (tabela 35). Karakteristični spektri slepe probe i ekstrakata su prikazani na slikama P6 i P7 (u Prilogu).

Tabela 35. Relativna inhibicija $\cdot\text{O}_2^-$ radikala proizvedenih u HX/XO sistemu indukovanom ekstraktima kestena

| Delovi kestena | RI (%) \pm SD |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Pitomi kesten | |
| Ceo plod | 67 \pm 0,05 |
| Srž ploda | 54 \pm 0,01 |
| Spoljna braon kora ploda | 70 \pm 0,03 |
| Crvena unutrašnja kora ploda | 53 \pm 0,05 |
| Resa | 70 \pm 0,04 |
| List | 73 \pm 0,06 |
| Mlada kora drveta | 75 \pm 0,04 |
| Stara kora drveta | 77 \pm 0,07 |
| Ježevice | 79 \pm 0,03 |
| Lovranski marun | |
| Ceo plod | 20 \pm 0,02 |
| Srž ploda | 45 \pm 0,04 |
| Spoljna braon kora ploda | 77 \pm 0,01 |
| Crvena unutrašnja kora ploda | 75 \pm 0,05 |
| List | 80 \pm 0,03 |
| Kalemljeni italijanski marun | |
| Ceo plod | 25 \pm 0,04 |
| Resa | 85 \pm 0,04 |
| List | 86 \pm 0,04 |

Iako svi ekstrakti ispoljavaju signifikantnu antioksidativnu aktivnost u odnosu na uklanjanje $\cdot\text{O}_2^-$ radikala, najefikasniji su ekstrakti lista (RI = 86) i rese kalemljenog italijanskog maruna (RI = 85), kao i lista lovranskog maruna (RI = 80) i ježevica (RI = 79).

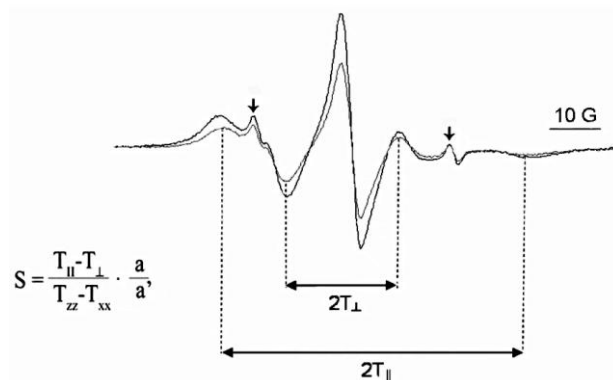
Za razliku od njih, ekstrakt celog ploda lovranskog maruna (RI = 20), srži lovranskog maruna (RI = 45), celog ploda kalemljenog italijanskog maruna (RI = 25), kao i ekstrakti celog ploda i srži pitomog kestena ispoljavaju znatno nižu antioksidativnu aktivnost.

Utvrđen je sledeći redosled RI aktivnosti ispitivanih ekstrakata u odnosu na $\cdot\text{O}_2^-$ radikale:

resa > list > ježevice > stara kora drveta > spoljna braon kora ploda > mlada kora drveta > crvena unutrašnja kora ploda > srž ploda > ceo plod.

3.4.5. Kapacitet ekstrakata za uklanjanje lipidne peroksidacije

Kapacitet ekstrakata da prevenira ili uklanja lipidnu peroksidaciju lipozoma je testiran korišćenjem Fenton-ove reakcije u kojoj se stvara $\cdot\text{OH}$, koji efikasno izaziva peroksidaciju. Iz spektra 7-DS-a koji se inkorporira u lipozome određuje se parametar reda S koji je recipročno proporcionalan membranskoj fluidnosti.



Slika 28. EPR spektar lipozoma obeleženih 7-DS-om (Tamno: lipozomi tretirani $\cdot\text{OH}$ radikalima; svetlo: netretirani lipozomi); S: parametar; $2T_{\parallel}$: spoljašnje hiperfino kuplovanje; $2T_{\perp}$: unutrašnje hiperfino kuplovanje; a: izotropna hiperfina konstanta kuplovanja kristala [$a = 1/3(T_{xx} + T_{yy} + T_{zz})$]; a' : izotropna hiperfina konstanta kuplovanja membrane [$a' = 1/3(T_{\parallel} + 2T_{\perp})$]; T_{xx} , T_{yy} , T_{zz} : hyperfine konstante (za 7-DS, uzima se da je $T_{xx} = T_{yy} = 6,1 \text{ G}$, $T_{zz} = 32,4 \text{ G}$) (Slika pokazuje kako se $2T_{\parallel}$ i $2T_{\perp}$: određuju za netretirane lipozome. Dve bliske linije (vertikalne linije) potiču od 7-DS u rastvoru)

Tabela 36 daje vrednosti za parametar reda (S) za: i) čiste lipozome, ii) lipozome izložene Fenton-ovom sistemu, iii) lipozome pomešane sa ekstraktima kestena i iv) lipozome pomešane sa ekstraktima kestena izložene Fenton-ovom sistemu.

Tabela 36. Parametar S lipozoma i lipozoma pomešanih s ekstraktom kestena roda 2006. godine, određen upotrebom EPR-a i spin probe 7-DS

| | | | S ± SD |
|-------------------------------------|-------------------------------|-------|---------------|
| Kontrola | Netretirani lipozomi | (i) | 0,590±0,002 |
| | Tretirani lipozomi | (ii) | 0,609±0,004 |
| Delovi kestena | | | |
| Pitomi kesten | | | |
| Ceo plod | Netretirani lipozomi/ekstrakt | (iii) | 0,621±0,002 |
| | Tretirani lipozomi/ekstrakt | (iv) | 0,619±0,010 |
| Srž ploda | nt ^{**} | | 0,595±0,004 |
| | t [*] | | 0,587±0,005 |
| Spoljna braon kora ploda | nt | | 0,613±0,003 |
| | t | | 0,611±0,003 |
| Crvena unutrašnja kora ploda | nt | | 0,612±0,003 |
| | t | | 0,617±0,003 |
| Resa | nt | | 0,590±0,004 |
| | t | | 0,601±0,002 |
| List | nt | | 0,610±0,004 |
| | t | | 0,604±0,003 |
| Mlada kora drveta | nt | | 0,620±0,005 |
| | t | | 0,619±0,003 |
| Stara kora drveta | nt | | 0,597±0,002 |
| | t | | 0,597±0,004 |
| Ježevice | nt | | 0,579±0,002 |
| | t | | 0,587±0,010 |
| Lovranski marun | | | |
| Ceo plod | nt | | 0,612±0,004 |
| | t | | 0,621±0,002 |
| Srž ploda | nt | | 0,606±0,002 |
| | t | | 0,620±0,005 |
| Spoljna braon kora ploda | nt | | 0,604±0,007 |
| | t | | 0,603±0,009 |
| Crvena unutrašnja kora ploda | nt | | 0,606±0,007 |
| | t | | 0,603±0,009 |
| List | nt | | 0,592±0,003 |
| | t | | 0,588±0,003 |
| Kalemljeni italijanski marun | | | |
| Resa | nt | | 0,598±0,005 |
| | t | | 0,606±0,003 |
| List | nt | | 0,593±0,002 |
| | t | | 0,597±0,002 |

* t – tretirani

** nt – netretirani

Merenjem parametra reda S za čiste lipozome i lipozome izložene Fenton-ovom sistemu određuje se stepen smanjenja membranske fluidnosti izazvan od strane $\cdot\text{OH}$ radikala stvorenih u Fenton-ovom sistemu. Merenjem S za netretirane lipozome pomešane sa ekstraktima utvrđuje se da li komponente u ekstraktima izazivaju promenu membranske fluidnosti. Dobijene vrednosti ukazuju na mehanizam zaštite od peroksidacije, kao i neke druge moguće primene ekstrakata.

Iz tabele 36 se može videti da većina ekstrakata kestena ispoljava aktivnost.

Ekstrakt mlade kore drveta i celog ploda pitomog kestena izaziva signifikantno smanjenje membranske fluidnosti kod lipozoma koji nisu tretirani u Fenton-ovoj reakciji (uzorci koji nisu izloženi $\cdot\text{OH}$), dok ekstrakti celog ploda lovranskog maruna, crvene unutrašnje kore i spoljne braon kore lovranskog maruna, crvene unutrašnje kore, braon spoljne kore i lista pitomog kestena ispoljavaju smanjenje koje nije tako izrazito. Ekstrakt rese pitomog kestena, celog ploda i srži lovranskog maruna ne ispoljava sposobnost zaštite lipozoma od peroksidacije.

Promene u fluidnosti kod netretiranih lipozoma ukazuje da se neke komponente iz ekstrakata celog ploda, lista i ježevica ugrađuju u membranu. Lipofilne komponente ekstrakata menjaju fluidnost lipozoma i prvenstveno uklanjaju lipidne radikale unutar membrane. Drugi ekstrakti najverovatnije preveniraju lipidnu peroksidaciju uklanjanjem $\cdot\text{OH}$ radikala iz rastvora. Smanjenje membranske fluidnosti izazvane ekstraktom ježevica se može uzeti u razmatranje za njegovu dalju primenu u dijeti i terapiji kod hipertenzije.

Rezultati dobijeni za ekstrakte kestena roda 2007. godine su prikazani u tabeli 37.

Tabela 37. Parametar (S) lipozoma i lipozoma pomešanih sa ekstraktom kestena roda 2007. godine, određen upotrebom EPR-a i spin probe 7-DS

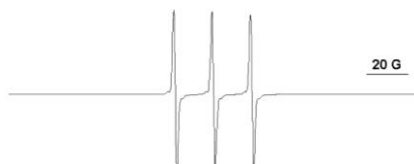
| | | S ± SD |
|-------------------------------------|----------------------|-------------|
| Kontrola | Netretirani lipozomi | 0,600±0,005 |
| | Tretirani lipozomi | 0,616±0,002 |
| Delovi kestena | | |
| Pitomi kesten | | |
| Resa | n | 0,593±0,002 |
| | t | 0,605±0,010 |
| List | n | 0,599±0,004 |
| | t | 0,599±0,003 |
| Lovranski marun | | |
| Resa | n | 0,603±0,002 |
| | t | 0,606±0,002 |
| List | n | 0,605±0,004 |
| | t | 0,605±0,005 |
| Kalemljeni italijanski marun | | |
| List | n | 0,621±0,002 |
| | t | 0,616±0,004 |

Ekstrakt rese pitomog kestena (tabela 37) neznatno povećava fluidnost kod netretiranih lipozoma i prevenira lipidnu peroksidaciju, što treba uzeti u obzir u daljim ispitivanjima. Ekstrakt lista kalemljenog italijanskog maruna izaziva signifikantno smanjenje membranske fluidnosti lipozoma koji nisu izloženi Fenton-ovom sistemu. Poređenjem ekstrakata rese i lista roda 2006. i 2007. godine zapaža se da ekstrakti

kestena roda 2006. godine neznatno smanjuju membransku fluidnost kod netretiranih lipozoma, dok ekstrakt rese kalemljenog italijanskog maruna roda 2007. godine ispoljava izrazito smanjenje membranske fluidnosti kod netretiranih lipozoma.

3.4.6. Kapacitet ekstrakata za transformaciju organskih hidrofilnih radikala

Ispitivanje sposobnosti ekstrakta kestena da reaguje sa organskim hidrofilnim radikalima izvršena je korišćenjem hidrofilne probe Tempon. Na slici 29 je prikazan karakterističan EPR signal u vodenom rastvoru Tempon-a. Prilikom merenja se određuje amplituda središnjeg pika.



Slika 29. EPR spektar spin probe Tempon-a u vodenom rastvoru

Kapacitet za uklanjanje Tempon-a (model komponente za organske, hidrofilne radikale) je ispoljen u slučaju skoro svih ispitivanih ekstrakata kestena (tabela 38).

Tabela 38. Sposobnost redukcije spin probe Tempon ekstrakata kestena rod 2006. god.

| Delovi kestena | AA (%) \pm SD |
|-------------------------------------|------------------|
| Pitomi kesten | |
| Ceo plod | 0,4 \pm 0,002 |
| Srž ploda | 4,6 \pm 0,001 |
| Spoljna braon kora ploda | 5,9 \pm 0,002 |
| Crvena unutrašnja kora ploda | 8,3 \pm 0,004 |
| Resa | 18,1 \pm 0,002 |
| List | 0,2 \pm 0,002 |
| Mlada kora drveta | 0,5 \pm 0,001 |
| Stara kora drveta | 7,0 \pm 0,006 |
| Ježevica | 8,4 \pm 0,004 |
| Lovranski marun | |
| Ceo plod | 2,1 \pm 0,002 |
| Srž ploda | 1,8 \pm 0,002 |
| Spoljna braon kora ploda | 12,6 \pm 0,002 |
| Crvena unutrašnja kora ploda | 4,3 \pm 0,003 |
| List | 4,1 \pm 0,003 |
| Kalemljeni italijanski marun | |
| Resa | 9,1 \pm 0,004 |
| List | 7,1 \pm 0,005 |

Ekstrakti rese pitomog kestena (A = 18,1%) i spoljne braon kore lovranskog maruna (A = 12,6%) ispoljavaju najveću antioksidativnu aktivnost u pogledu redukcije spin probe Tempon. Visoke vrednosti ispoljavaju i ekstrakt rese kalemljenog italijanskog maruna, crvena unutrašnja kora pitomog kestena i ježevica. Ekstrakti lista pitomog kestena i mlade kore drveta ispoljavaju minimalnu aktivnost.

U tabeli 39 su dati rezultati dobijeni za ekstrakte kestena roda 2007. godine.

Tabela 39. Spособnost redukcije spin probe Tempon ekstrakata kestena rod 2007. god.

| Delovi kestena | AA (%) \pm SD |
|-------------------------------------|-----------------|
| Pitomi kesten | |
| Resa | 5,1 \pm 0,002 |
| List | 2,5 \pm 0,001 |
| Lovranski marun | |
| Resa | 7,3 \pm 0,003 |
| List | 4,5 \pm 0,003 |
| Kalemljeni italijanski marun | |
| List | 2,4 \pm 0,002 |

Ekstrakti rese ispoljavaju veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na organske hidrofilne radikale u poređenju sa ekstraktima lista.

Na osnovu dobijenih rezultata za kapacitet ekstrakata na transformaciju organskih hidrofilnih radikala (Tempon), određen je sledeći redosled aktivnosti analiziranih ekstrakata:

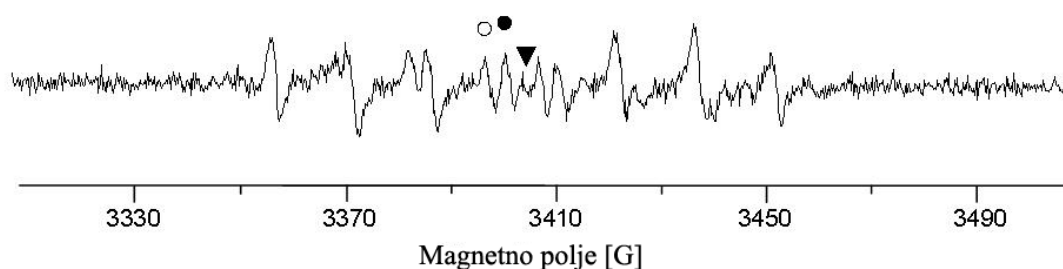
resa > spoljna braon kora ploda > crvena unutrašnja kora ploda > ježevice > stara kora drveta > list > srž ploda > ceo plod > mlada kora drveta.

Ekstrakti rese pitomog kestena i lista kalemljenog italijanskog maruna roda 2006. godine ispoljavaju veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na odgovarajuće uzorke roda 2007. godine, dok je za ekstrakte lista pitomog kestena i lovranskog maruna roda 2007. godine zabeležena veća aktivnost u odnosu na 2006. godinu

3.4.7. Transformacija hidroksi radikala i superoksid anjon radikala generisanih UV zračenjem

Ispitivanje protektivnog delovanja ekstrakata na UV zračenje ispituje se sposobnošću uklanjanja $\cdot\text{OH}$ i $\cdot\text{O}_2^-$ radikala nastalih nakon zračenja.

Na slici 30 je prikazan karakterističan kombinovani spektar DEPMPO/OH i DEPMPO/OOH adukta, dobijen u vodenom rastvoru izloženom UV zračenju.



Slika 30. EPR signal dobijen UV zračenjem vodenog rastvora ekstrakta srži pitomog kestena

Krugom je označen pik DEPMPO/OOH adukta čija se amplituda meri. Popunjenim krugom označen je karakterističan pik za DEPMPO/OH adukt. Trouglom je označen signal oksidovanog hidroksilamina generisanog UV zračenjem indukovanim razgradnjom DEPMPO.

Karakteristični spektri dobijeni za slepu probu i vodene rastvore suvih ekstrakata dodavane u koncentraciji (0,2 mg/ml) su prikazani na slici P8 (u Prilogu).

Analiza UV protektivne aktivnosti ekstrakata je složena zbog dodatnog signala oksidovanog hidroksilamina koji se stvara razgradnjom DEPMPO indukovanim UV zračenjem²²⁸. Nepoželjni signal (najjintezivniji u slepoj probi) (slika P8) značajno se preklapa sa spektrima DEPMPO/OH i DEPMPO/OOH adukta, što dovodi do teškoća u određivanju amplitude pika. Zapaženo delovanje ukazuje da ekstrakti obezbeđuju zaštitu spin trapa od degradacije izazvane UV zračenjem.

U tabeli 40 su dati rezultati za relativnu inhibiciju u odnosu na UV zračenje izazvano stvorenim $\cdot\text{OH}$ i $\cdot\text{O}_2^-$ radikalima indukovanim u ekstraktima kestena.

Tabela 40. Relativna inhibicija $\cdot\text{OH}$ i $\cdot\text{O}_2^-$ radikala indukovana ekstraktima kestena (rod 2006. godine)

| Delovi kestena | RI ($\cdot\text{OH}$) \pm SD | RI ($\cdot\text{O}_2^-$) \pm SD |
|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| Pitomi kesten | | |
| Ceo plod | 16 \pm 0,05 | -119 \pm 0,10 |
| Srž ploda | -5 \pm 0,02 | -150 \pm 0,12 |
| Resa | 18 \pm 0,02 | -12 \pm 0,02 |
| List | 8 \pm 0,03 | -6 \pm 0,02 |
| Stara kora drveta | -18 \pm 0,03 | -19 \pm 0,05 |
| Ježevica | -13 \pm 0,03 | -69 \pm 0,09 |
| Lovranski marun | | |
| Spoljna braon kora ploda | 21 \pm 0,04 | 12 \pm 0,05 |
| List | 21 \pm 0,02 | 25 \pm 0,05 |
| Kalemljeni italijanski marun | | |
| Resa | 29 \pm 0,02 | 12 \pm 0,05 |
| List | 34 \pm 0,09 | -31 \pm 0,02 |

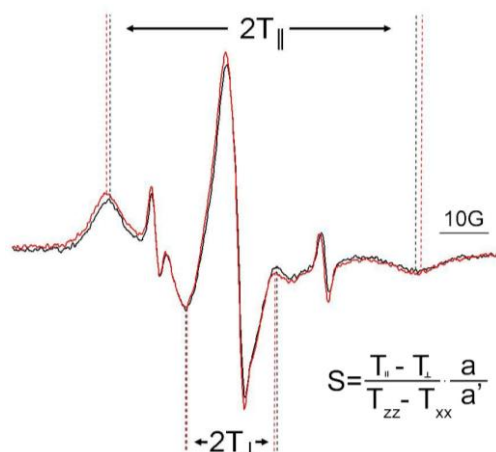
Tri ekstrakta poseduju pozitivne RI vrednosti za relativnu inhibiciju u odnosu na obe vrste radikala, $\cdot\text{OH}$ i $\cdot\text{O}_2^-$ i to: spoljna braon kora lovranskog maruna (RI ($\cdot\text{OH}$) = 21; RI ($\cdot\text{O}_2^-$) = 12), resa sa kalemljenog italijanskog maruna (RI ($\cdot\text{OH}$) = 29; RI ($\cdot\text{O}_2^-$) = 12) i list lovranskog maruna (RI ($\cdot\text{OH}$) = 21; RI ($\cdot\text{O}_2^-$) = 25).

Negativne RI vrednosti dobijene za ostale ekstrakte ukazuju da oni ispoljavaju prooksidativnu aktivnost u vodenom rastvoru izloženom UV zračenju. Zapažena prooksidativna aktivnost, kao i veoma slaba antioksidativna aktivnost navedenih ekstrakata sa pozitivnim vrednostima RI u odnosu na oba ispitana radikala, ukazuju da se oni ne mogu koristiti u cilju UV zaštite. Visoka senzitivnost ekstrakata srži ploda pitomog kestena, ježevica i celog ploda pitomog kestena u odnosu na UV zračenje uslovljava da se one drže dalje od svetlosti u cilju sprečavanja razgradnje.

3.5. UTICAJ EKSTRAKATA NA PREVENIRANJE/UKLANJANJE LIPIDNE MEMBRANE ERITROCITA

Kapacitet ekstrakata *C. sativa* je u odnosu na zaštitu membrane eritrocita od lipidne peroksidacije i promene fluidnosti ispitan je upotrebom EPR-a.

Na slici 31 je prikazan karakterističan spektar netretiranih eritrocita i eritrocita tretiranih H₂O₂ i obeleženih 7-DS-om.



Slika 31. EPR spektar eritrocita obeleženih sa 7-DS-om (Crna boja – netretirani eritrociti; crvena boja – eritrociti izloženi 3 mmol/l H₂O₂ nakon perioda inkubacije od 30 minuta); S: parametar. 2T_{||}: spoljašnje hiperfino kuplovanje. 2T_⊥: unutrašnje hiperfino kuplovanje; a: izotropna hiperfina konstanta kuplovanja kristala [$a = 1/3(T_{xx} + T_{yy} + T_{zz})$]; a': izotropna hiperfina konstanta kuplovanja membrane [$a' = 1/3(T_{||} + 2T_{\perp})$]; T_{xx}, T_{yy}, T_{zz}: hyperfine konstante (za 7-DS, uzima se da je T_{xx} = T_{yy} = 6,1 G, T_{zz} = 32,4 G)²²⁹
Dve bliske linije (vertikalne linije) potiču od 7-DS u rastvoru.

Na slici 31 se može zapaziti povećanje parametra reda S utvrđenim za eritrocite tretirane H₂O₂. U tabeli 41 su date vrednosti parametra reda S.

Tabela 41. Parametar reda S netretiranih eritrocita i eritrocita tretiranih H₂O₂ u prisustvu ekstrakata kestena upotrebom spin probe 7-DS

| | | Uzorak | S ± SD |
|----------------------|--------------------------------------|----------------------------|-------------|
| Kontrola | | Netretirani eritrociti | 0,753±0,005 |
| | | Tretirani eritrociti | 0,776±0,006 |
| Rod (godina) | Delovi ploda | | |
| 2006. | Resa kalemljenog italijanskog maruna | Netretirani eritrociti + e | 0,752±0,009 |
| | | Tretirani eritrociti + e | 0,757±0,006 |
| | List lovranskog maruna | Netretirani eritrociti + e | 0,753±0,005 |
| | | Tretirani eritrociti + e | 0,752±0,004 |
| 2007. | Ježevice | Netretirani eritrociti + e | 0,761±0,005 |
| | | Tretirani eritrociti + e | 0,760±0,005 |
| | Resa lovranskog maruna | Netretirani eritrociti + e | 0,761±0,008 |
| | | Tretirani eritrociti + e | 0,765±0,014 |
| | List lovranskog maruna | Netretirani eritrociti + e | 0,760±0,014 |
| | | Tretirani eritrociti + e | 0,758±0,015 |
| Resa pitomog kestena | Netretirani eritrociti + e | 0,749±0,007 | |
| | Tretirani eritrociti + e | 0,758±0,011 | |

e – ekstrakt

Tretirani eritrociti su izloženi dejstvu 3 mmol/l H₂O₂. Utvrđeno je da svi ispitivani ekstrakti štite membrane od lipidne peroksidacije. Najslabije delovanje je zapaženo za ekstrakte pitomog kestena roda 2006. godine. Kako razlika između parametra reda S za netretirane eritrocite i eritrocite tretirane H₂O₂ nije statistički značajana, može se zaključiti da svi ispitivani ekstrakti ispoljavaju antioksidativnu aktivnost dovoljnu da preveniraju/otklone lipidnu peroksidaciju membrane eritrocita.

3.6. UTICAJ EKSTRAKATA NA ZAŠTITU MEMBRANSKOG INTEGRITETA MERENJEM SADRŽAJA KALIJUMA

U tabeli 42 su dati rezultati efluksa kalijuma, koji je izazvan izlaganjem kontrole i ekstrakata dejstvu 3 mmol/l rastvora H₂O₂ nakon 30 min.

Efluks se dobija oduzimanjem [K⁺]_{netretirani} od [K⁺]_{tretirani}. Kontrolni eksperiment je postavljen određivanjem razlike u koncentraciji kalijuma između tretiranog i netretiranog uzorka eritrocita.

Tabela 42. Efluks kalijuma iz eritrocita izloženih H₂O₂

| Uzorak | Efluks (mmol/l) ± SD | |
|-----------------|--------------------------------------|------------|
| Kontrola | 4,35±0,018 | |
| Rod | Delovi kestena | |
| (godina) | | |
| | Resa kalemljenog italijanskog maruna | 0,39±0,01 |
| | List lovranskog maruna | 5,80±0,02 |
| 2006. | Ježevica | 1,67±0,006 |
| | Resa lovranskog maruna | 0,96±0,009 |
| | List lovranskog maruna | 0,46±0,022 |
| 2007. | Resa pitomog kestena | 0,75±0,019 |

Može se zapaziti da H₂O₂ utiče na membranu eritrocita izazivajući povećanje efluksa K⁺ (kontrola). Efluks K⁺ nije statistički značajan u slučaju eritrocita izloženih H₂O₂ u prisustvu ekstrakata rese kalemljenog italijanskog maruna, kao i u slučaju sva tri ekstrakta kestena roda 2007. god. To ukazuje da ovi ekstrakti štite membranu eritrocita. Ekstrakt lista lovranskog maruna (rod 2006. godine) ne štiti integritet membrane, s obzirom da je efluks kalijuma isti kao i u kontrolnom uzorku. Ekstrakt ježevica daje manju vrednost efluksa kalijuma u odnosu na kontrolu, pa ne obezbeđuje zaštitu eritrocita kao gore navedeni ekstrakti. Ekstrakti lista lovranskog maruna potiču od istog kultivara, ali iz različitih godina. Ekstrakt kestena (rod 2007. godine) poseduje veći sadržaj ukupnih fenola i flavonoida (tabela 21), i ovaj ekstrakt štiti eritrocite, a odgovarajući ekstrakt iz prethodne godine sa manjim sadržajem ovih supstanci (tabela 19) ne deluje u smislu zaštite. Fenoli i flavonoidi predstavljaju potencijalno aktivne supstance u eritrocitima u odnosu na oksidativno oštećenje.

S obzirom da svi ekstrakti pokazuju dobar kapacitet u preveniranju lipidne peroksidacije (tabela 37 i 38) gubitak aktivnosti za ekstrakte lista lovranskog maruna (2006. god.) i ježevica, ne bi trebalo da utiče na efekat indukovan kod membranskih lipida. Delovanje H₂O₂ ide u pravcu disfunkcije nekih membranskih proteina kao što su K⁺/Na⁺ ATP-aze²³⁰, ili čak može povećati propustljivost membrane eritrocita u odnosu na K⁺.

3.7. IN VITRO ANTIOKSIDATIVNA SVOJSTVA EKSTRAKATA KESTENA

Dijabetes nastaje kao posledica propadanja i disfunkcije β-ćelija pankreasa, što rezultuje smanjenom ili obustavljenom proizvodnjom insulina. Ovim putem organizam razvija netoleranciju ka glukozi što dovodi do dijabetesa. Obzirom da je *Diabetes mellitus* definisan kao stanje pojačanog oksidativnog stresa, veoma je važno uvesti ćeliju u ekvilibrijum⁴².

U cilju uspostavljanja model-sistema dijabetesa, β-ćelije pankreasa (Rin-5F) su inkubirane sa streptozotocinom (STZ), aloksanom (ALX) i Na-nitroprusidom (SNP). STZ i ALX su poznati izazivači dijabetesa koji učestvuju u formiranju slobodnih radikala izazivajući oštećenje DNK, proteina, lipida i drugih molekula u ćeliji. Od stepena oštećenja i ćelijske sposobnosti da odgovori na indukovan stimulan zavisi i stepen smrtnosti ćelija²³¹.

Sposobnost balansiranja poremećenog oksidativnog stanja praćena je analizom ćelijskog preživljavanja pomoću MTT testa na Rin-5F ćelijama, nakon istovremenog tretmana sa dijabetogenim agensima i ekstraktima kestena.

3.7.1. STZ/ALX/SNP izazvan dijabetes tip I (*Diabetes mellitus-tip I*)

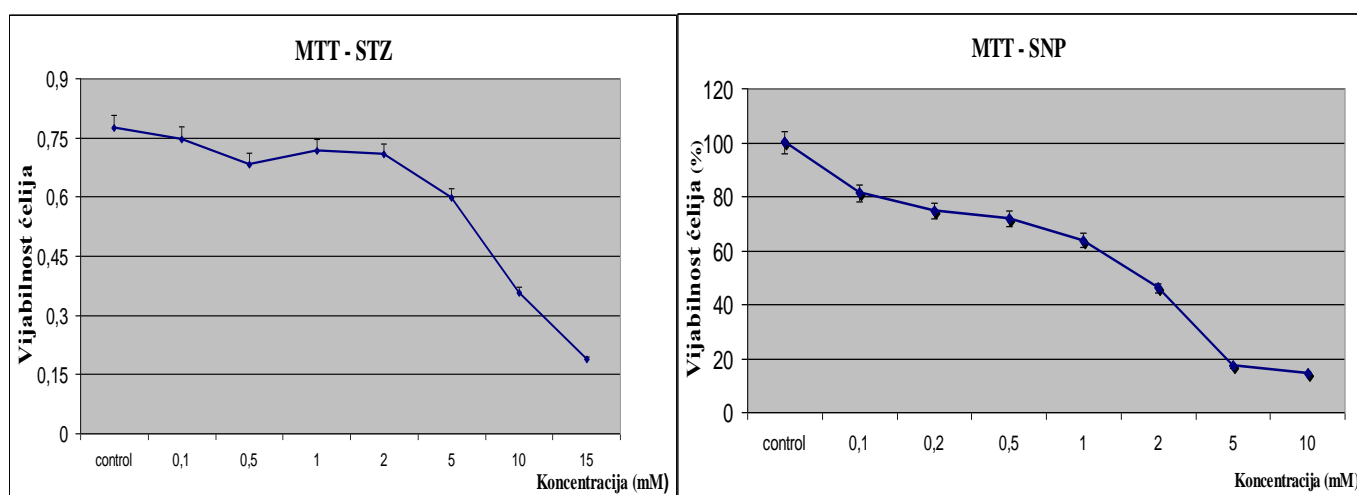
Analizirane su kontrolne Rin-5F ćelije, zatim ćelije sa indukovanim dijabetesom primenom STZ-a ili SNP-a i Rin-5F ćelije koje su pre tretmana sa izazivačima dijabetesa inkubirane sa ekstraktima kestena. Inkubacija sa odabranim ekstraktima traje sve vreme u toku kojeg su ćelije izložene dejstvu dijabetogenih agenasa-STZ/SNP. U tabeli 43 su dati delovi dva kultivara kestena i njihove oznake u okviru ovih ispitivanja.

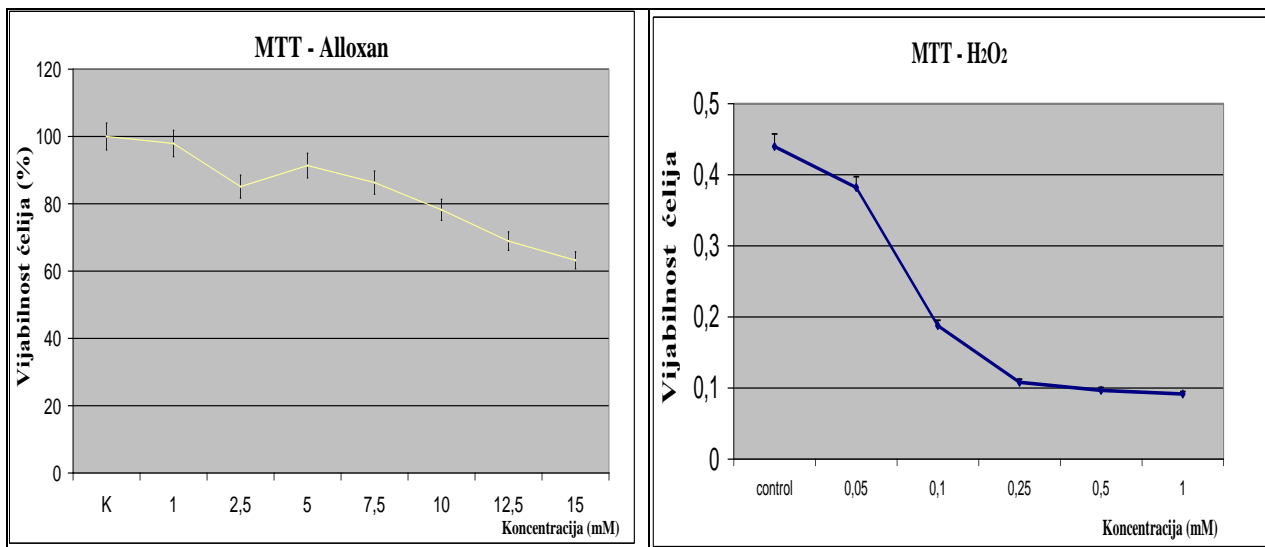
Tabela 43. Uzorci na kojima je rađeno *in vitro* antioksidativno ispitivanje

| Delovi kestena | Oznaka uzorka |
|------------------------|---------------|
| Pitomi kesten | |
| Resa | Ekstrakt 15 |
| Ježevice | Ekstrakt 32 |
| Lovranski marun | |
| List | Ekstrakt 23 |

Primenom dijabetogenih agenasa (STZ, ALX) u rastućim koncentracijama dobijena je opadajuća kriva ćelijskog preživljavanja (slika 32). Dijabetogenim stanjem se smatra kada je manje od 60% ćelija vijabilno. Primenom STZ-a u koncentraciji od 5 do 10 mmol/l dovodi do razvijanja modela dijabetesa, dok ALX deluje u koncentraciji od 15 mmol/l, što je nefiziološka doza, koja ne dovodi do razvijanja dijabetesa. SNP je klasičan egzogeni donor azot monoksida (NO).

U pripremi eksperimenta SNP je korišćen u cilju potvrde mehanizma dejstva STZ-a. SNP dovodi do dijabetogenog stanja u koncentraciji od 1 mmol/l. H₂O₂ je korišćen kao pozitivna kontrola samog testa i ćelijske smrti, rastvaran u je vodi a primenjene su sledeće koncentracije: 0, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 i 1 mmol/l.





Slika 32. Test vijabilnosti (MTT) urađen na β -ćelijama pankreasa nakon tretmana ćelija sa dijabetogenim agensima – STZ, ALX i SNP-a (H_2O_2 je korišćen kao pozitivna kontrola ćelijske smrti)

STZ u ćeliji *in vivo* pokreće nekoliko destruktivnih mehanizama među kojima su posebno značajni citotoksična metilacija DNK i stvaranje $\cdot OH$ i NO radikala. Pretpostavlja se da glavni signal destrukcije β -ćelija pankreasa potiče od sposobnosti STZ-a da formira NO radikal. Stoga STZ - indukovani dijabetes predstavlja veoma pogodan eksperimentalni sistem za proučavanje komplikacija u dijabetesu, kao što su ćelijska oštećenja i smrt.

Izvršena je analiza ekstrakata kestena (tabela 43) u *in vitro* u kulturi Rin-5F ćelija. Ćelije su istovremeno inkubirane sa ekstraktima i sa STZ ili SNP-om, koji dovode do poremećaja oksidativnog statusa ćelije. Svaki ekstrakt je korišćen u koncentraciji od 0,02 mg/ml, koja je u DPPH testu dovela do oko 80% redukcije DPPH²³² (što je mera antioksidativne funkcije, tj. funkcije "skevendžinga" slobodnih radikala).

Inkubacija ekstrakata i dijabetogenih agenasa sa Rin-5F ćelijama je trajala 24 h. Nakon toga su rađeni testovi vijabilnosti (MTT-test), prikazani na slici P9 (u Prilogu).

Ekstrakti rese i ježevica pitomog kestena i lista lovranskog maruna imaju izuzetno visoku antioksidativnu aktivnost u ćeliji. Naročito je povoljna činjenica da su delotvorni u niskim koncentracijama (oko 0,02 mg/ml). Ekstrakti rese pitomog kestena i lista lovranskog maruna su slični po antioksidativnom kapacitetu i za nijansu bolji od ekstrakta ježevica.

Askorbinska kiselina (AA), odnosno vitamin C je korišćena u koncentraciji 250 $\mu mol/l$ kao kontrola. AA se pokazala kao blago toksična u kombinaciji sa većim koncentracijama dijabetogenih agenasa – STZ i SNP-a.

3.8. ISPITIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA

Antimikrobna aktivnost suvih ekstrakata *C. sativa* i standarda rastvorenih u 30% etanolu je prikazana u tabelama 44 i 45.

Tabela 44. Antimikrobna aktivnost ekstrakata *C. sativa* i referentnih standarda

| Delovi kestena | Mikroorganizmi | | | |
|-------------------------------------|------------------------------|----------------------|------------------------|--------------------------|
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Sarcina lutea</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Proteus mirabilis</i> |
| ZI* | | | | |
| Pitomi kesten | | | | |
| Ceo plod | NI** | NI | NI | NI |
| Srž ploda | NI | NI | NI | NI |
| Spoljna braon kora ploda | 9,67 ± 0,58 | 7,33 ± 0,58 | 9,33 ± 0,58 | 10 ± 0 |
| Resa | 15,33 ± 0,58 | 13,66 ± 0,58 | 10 ± 0 | 11,33 ± 0,47 |
| List | 14 ± 4,89 | 11 ± 1 | 10 ± 0 | 12 ± 0 |
| Stara kora drveta | 14,67 ± 0,58 | 9,33 ± 0,58 | 10 ± 0 | 11 ± 0 |
| Ježevice | 9,33 ± 0,58 | 10 ± 0 | 10 ± 1 | 11,33 ± 0,47 |
| Lovranski marun | | | | |
| Spoljna braon kora ploda | 10 ± 0 | 10,33 ± 0,58 | 10,67 ± 0,59 | 10,33 ± 0,58 |
| List | 16 ± 3,46 | 13 ± 1 | 10,33 ± 0,58 | 12,66 ± 0,47 |
| Kalemljeni italijanski marun | | | | |
| Resa | 16,67 ± 0,58 | 15,66 ± 0,58 | 9,33 ± 0,58 | 12 ± 0 |
| List | 14 ± 1,73 | 9 ± 1 | 9,67 ± 0,58 | 11,33 ± 0,47 |
| Standardi | | | | |
| Amoksicilin | 27,3 ± 1,15 | 55,0 ± 1,0 | 29,0 ± 0 | 26,33 ± 0,57 |
| Penicilin | 30,3 ± 2,25 | 37,7 ± 0,49 | 34,0 ± 0 | 34,33 ± 0,57 |

*ZI se izražava kao srednja vrednost ± SD (mm)

**NI – nema inhibicije

Svi ispitivani ekstrakti su ispoljili aktivnost u odnosu na gram pozitivne bakterije: *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus cereus*, *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Micrococcus pyrogenes var. albus*, kao i na gram negativne bakterije *Proteus mirabilis* i *Salmonella typhimurium*. Samo je ekstrakt lista sva tri ispitivana kultivara ispoljio antimikrobnu aktivnost u odnosu na kvasac *Rhodotorula*.

Najveća aktivnost ekstrakata je utvrđena u odnosu na bakterije *M. pyrogenes var. albus*, *S. aureus* i *S. typhimurium*, a ekstrakti su najmanje aktivni u odnosu na kvasac *Rhodotorula*. Resa i list svih ispitivanih kultivara daju maksimalnu antimikrobnu aktivnost. Ekstrakti rese i lista ispitivanih kultivara kestena poseduju visok sadržaj fenola i flavonoida (tabele 18, 19 i 20). Visoku aktivnost ispoljavaju i ekstrakti stare kore drveta, ježevice i spoljne braon kore ploda.

Sa druge strane, ceo plod i srž ploda pitomog kestena (sa izuzetkom *L. lactis ssp. lactis*) ne ispoljava antimikrobnu aktivnost. To je uglavnom rezultat visokog sadržaja ugljenih hidrata, pre svega skroba¹⁹³, koji su zastupljeni u sastavu ploda (tabela 10).

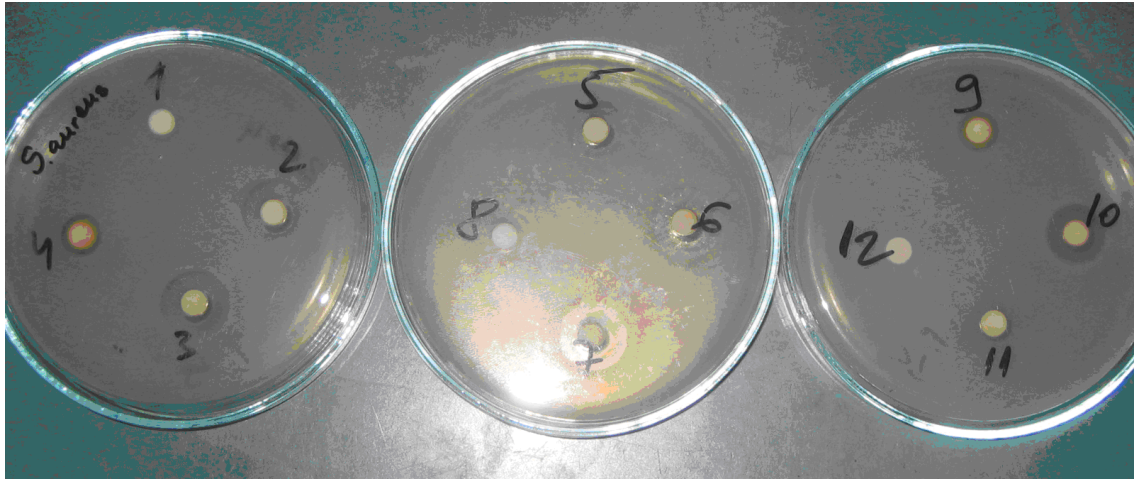
Tabela 45. Antimikrobna aktivnost ekstrakata *C. sativa* i referentnih standarda

| Delovi kestena | Mikroorganizmi | | | |
|-------------------------------------|---------------------------------------|---|-------------------------------|--------------------|
| | <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> | <i>Micrococcus pyrogenes var. albus</i> | <i>Salmonella typhimurium</i> | <i>Rhodotorula</i> |
| ZI | | | | |
| Pitomi kesten | | | | |
| Ceo plod | 10,67 ± 1,53 | NI | NI | NI |
| Srž ploda | NI | NI | NI | NI |
| Spoljna braon kora ploda | 15 ± 2,5 | 12,33 ± 1,15 | NI | NI |
| Resa | 10,33 ± 0,72 | 15,5 ± 2,59 | 17,82 ± 0,78 | NI |
| List | 14,5 ± 2,5 | 14,33 ± 1,15 | 13,67 ± 0,88 | 12 ± 1,58 |
| Stara kora drveta | 12,33 ± 1,53 | 13,67 ± 0,58 | 11,65 ± 0,55 | |
| Ježevice | 10 ± 1 | 14,16 ± 1,25 | 15,83 ± 1,82 | |
| Lovranski marun | | | | |
| Spoljna braon kora ploda | 11,33 ± 2,08 | 12,67 ± 2,08 | 11,5 ± 0,53 | NI |
| List | 11,5 ± 0,84 | 16,33 ± 0,58 | 17,83 ± 1,19 | 15 ± 0 |
| Kalemljeni italijanski marun | | | | |
| Resa | 9,0 ± 0 | 17,83 ± 2,25 | 18,59 ± 1,12 | NI |
| List | 14 ± 1,73 | 14,33 ± 1,15 | 12,47 ± 0,61 | 12,33 ± 0,58 |
| Standardi | | | | |
| Amoksicilin | 8 ± 0 | 36 ± 0,58 | 16 ± 0 | |
| Penicilin | 12 ± 0,58 | 52 ± 0 | 15 ± 0 | |
| Ketokonazol | | | | 25 ± 0 |
| Nistatin | | | | 18 ± 0 |
| Amfotericin B | | | | 10,3 ± 0,58 |

Najveću aktivnost ekstrakti su ispoljili u odnosu na *M. pyrogenes var. albus*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *L. lactis ssp. lactis*, a najmanju u odnosu na kvasac *Rhodotorula*.

Ispitivani delovi kestena ispoljavaju jaku antibakterijsku aktivnost u odnosu na *Staphylococcus aureus*, jednu od gram pozitivnih bakterija čestog izazivača kvarenja hrane. Nekada slabo rasprostranjen, danas čini 50% svih *S. aureus* izolata, a karakteristična je rezistencija ovog soja na antibiotik meticilin, detektovana kod nekih sojeva *S. aureus*.

Na slici 33 je prikazano ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata *C. sativa* u odnosu na inokulat *S. aureus*.



Slika 33. Antimikrobna aktivnost ekstrakata *C. sativa* u odnosu na *S. aureus* (1-11: ekstrakti; 12 kontrola)

Rauha i sar.²³³ su pokazali da je rast *S. aureus* efikasno inhibiran flavonima, flavonolima i naringeninom, što ukazuje da flavonoidi u kestenu predstavljaju potencijalno aktivne antimikrobne supstance. Flavonoidi se sintetišu u biljkama kao odgovor na mikrobiološke infekcije. Zbog toga ne iznenađuje da ova jedinjenja poseduju i u *in vitro* uslovima antimikrobnu aktivnost u odnosu na širok spektar mikroorganizama²³⁴. Sa punim uvažavanjem prirodnih proizvoda, generalno je prihvaćeno da fitohemikalije predstavljaju manje potentne anti-infektivne agense u odnosu na agense mikrobiološkog porekla, kao što su antibiotici²³⁵.

Ispitivani uzorci ekstrakata *C. sativa* nisu ispoljili aktivnost u odnosu na bakterije *Escherichia coli* (G-) i *Enterococcus gallinarum* (G+), kao i kvasce *Saccharomyces cerevisiae* i *Candida albicans*.

Ispitivani soj *E. coli* ima najmanju aktivnost u odnosu na antibiotike koji se u ovim istraživanjima koriste kao referentni standardi: Amoksicilin ($21,33 \pm 1,15$ mm) i Penicilin (10 ± 0 mm). Izostanak aktivnosti ekstrakata u odnosu na patogenu bakteriju *E. coli* se može objasniti visokom rezistentnošću ovog soja u odnosu na ove antibiotike i samim tim na ispitivane ekstrakte. Iako ekstrakti nisu ispoljili aktivnost u odnosu na *E. coli*, ispoljili su aktivnost u odnosu na ostale gram negativne bakterije, *P. mirabilis* i *S. typhimurium*, što ukazuje da struktura ćelijskog zida nije od presudnog značaja za aktivnost ekstrakata.

3.8.1. Korelaciona analiza

Rezultati korelacione analize između antimikrobne i antioksidativne aktivnosti u odnosu na superoksid anjon radikale su dati u tabeli 46.

Signifikantna korelacija ($r = 0,65$) je ustanovljena između antimikrobne aktivnosti ekstrakta u odnosu na *L. lactis ssp. lactis* i *B. cereus*, kao i antimikrobne aktivnosti ekstrakta u odnosu na *L. lactis ssp. lactis* i *P. mirabilis* ($r = 0,63$). U svim ostalim slučajevima je ustanovljena jako signifikantna korelacija ($P < 0,01$)

Tabela 46. Korelacija između antimikrobne aktivnosti i antioksidativne aktivnosti u odnosu na superoksid anjon radikale

| Parametar | <i>L. lactis ssp. lactis</i> | <i>M. pyrogenes var. albus</i> | <i>S. typhimurium</i> | <i>S. aureus</i> | <i>S. lutea</i> | <i>P. mirabilis</i> | Sadržaj fenola (%GAE) | O ₂ ⁻ aktivnost (%) |
|---|------------------------------|--------------------------------|-----------------------|------------------|-----------------|---------------------|-----------------------|---|
| <i>M. pyrogenes var. albus</i> | n.s. ^{***} | | | | | | 0,65* | |
| <i>S. typhimurium</i> | n.s. | 0,84** | | | | | 0,66* | |
| <i>S. aureus</i> | n.s. | 0,96** | 0,84** | | | | 0,69* | |
| <i>S. lutea</i> | n.s. | 0,96** | 0,91** | 0,94** | | | 0,78** | |
| <i>B. cereus</i> | 0,65* | 0,97** | 0,74** | 0,89** | 0,89** | 0,98** | n.s. | 0,74* |
| <i>P. mirabilis</i> | 0,63* | 0,90** | 0,80** | 0,94** | 0,93** | | n.s. | |
| O ₂ ⁻ aktivnost (%) | 0,60* | 0,80** | 0,72* | 0,76** | 0,73* | 0,78** | n.s. | |

*Korelacija je značajna na nivou 0,05

**Korelacija je značajna na nivou 0,01

***n.s. - nije signifikantno (P > 0,05)

Sadržaj ukupnih fenola je u veoma značajnoj korelaciji sa antimikrobnom aktivnosti ekstrakata u odnosu na *S. lutea* ($r = 0,78$). Utvrđena je značajna korelacija ($P < 0,05$) između ukupnih fenola i antimikrobne aktivnosti ekstrakata u odnosu na *S. aureus* ($r = 0,69$), antimikrobne aktivnosti ekstrakata u odnosu na *S. typhimurium* ($r = 0,66$) i antimikrobne aktivnosti ekstrakata u odnosu na *M. pyrogenes var. albus* ($r = 0,65$).

Veoma signifikantna korelacija ($P < 0,01$) utvrđena je između antimikrobne aktivnosti ekstrakata u odnosu *M. pyrogenes var. albus* i antioksidativne aktivnosti u odnosu na $\cdot\text{O}_2^-$ radikale ($r = 0,80$), antimikrobne aktivnosti ekstrakata u odnosu na *P. mirabilis* i antioksidativne aktivnosti u odnosu na $\cdot\text{O}_2^-$ radikale ($r = 0,78$). U svim ostalim slučajevima je utvrđena signifikantna korelacija ($P < 0,05$).

4.0. EKSPERIMENTALNI DEO

Proizvođač galne kiseline monohidrata i (+)-katehin monohidrata je Fluka A.G., a Sephadex-a LH-20 Pharmacia Fine, Chemicals, Uppsala, Sweden. Galna kiselina (98%) za HPLC, L- α -fosfatidilholin, ksantin, ksantin oksidaza i DPPH su proizvedeni u Sigma, St. Louis, MO, USA, a K₃EDTA u Vacuette EDTA, Greiner Bio-One, Austria. Acetonitril i metanol, LiChrosolv, čistoće za hromatografiju i vanilin su proizvedeni u Merck (Darmstadt, Germany). Trolox je proizveden u Aldrich (Milw, WI, USA). 7-DS i Tempon u Molecular Probes (Junction City, OR, USA). Proizvođač H₂O₂ je Renal, Budapest, Hungary, a FeSO₄ je Merck, Darmstadt, Germany. Spin-trapovi DMPO i DEPMPO su proizvodi Alexis Biochemical (Lausen, Switzerland), DEPMPO je prečišćen i testiran na hidroksilaminske nečistoće. Za Mueller-Hinton agar proizvođač je Difco, Detroit, MI, USA, a za Sabouraud dekstrozni agar Merck, Darmstadt, Germany. Proizvođač streptozotocina je MP Biomedicals, USA, dok je proizvođač Aloxana (Cat. No. A7413-10G), N-nitroprusida (Cat. No. 228710-5G), boje (MTT) (Cat. No. M5655-1G) i RPMI 1640 medijuma (Cat. No. E15-848) Sigma St. Louis, MO, USA. Svi drugi reagensi i hemikalije upotrebljeni u eksperimentalnom radu bili su analitičke čistoće (p.a.).

Teflonske epruvete su proizvedene u Zeus industries, Raritan, USA, a Petri kutije u HiMedia[®], Mumbai, India. Filteri su proizvedeni u Rotilabo–Spritzenfilter, Roth, Karlsruhe, Germany.

Za ekstrakciju je korišćeno vodeno kupatilo Branson model b-220 Smith-Kline Company (50/60 Hz, 125 W). Spektrofotometrijska određivanja rađena su na spektrofotometru Hewlett Packard 8452A. EPR određivanja su izvršena na EPR spektrometru Bruker 300E i Varian E104-A spektrometru opremljenom sa X-trakom (9,51 GHz). Snimanje na Varian E104-A spektrometru izvršeno je korišćenjem EW softvera (Scientific Software, Bloomington, IL, USA). Sadržaj kalijuma je određen korišćenjem PFP7 plamenog fotometra (Dunmow, England, UK). HPLC određivanja su izvršena na HP1090 (Hewlett-Packard Company, Avondale, PA, USA) sa DAD detektorom (kolona i pretkolona Zorbax SB-C18, proizvođača Agilent, USA) i na Agilent 1200 HPLC/DAD, USA, povezanim sa Agilent MSD TOF, USA. LC/MS analiza je izvršena na Agilent MSD TOF kuplovanom za Agilent 1200. *In vitro* antioksidativna svojstva su određena na ELISA 96-well plate reader (Behring, FR Germany).

4.1. DOBIJANJE EKSTRAKATA KESTENA

Opisan je postupak pripreme delova kestena za analizu i postupka ekstrakcije sa dva ekstragensa (50% etanol i 50% aceton).

4.1.1. Priprema biljnog materijala

Uzorkovanje kestena vršeno je prikupljanjem plodova iz četiri opštine Unsko-sanskog kantona (Bužim, Velika Kladuša, Cazin i Bosanska Krupa). Izabrana su tri najrasprostranjenija kultivara: pitomi kesten, kalemljeni italijanski marun i lovranski marun. Uzorkovanje je izvršeno u sezoni sazrevanja, od sredine septembra do kraja oktobra 2006. i 2007. godine. Nakon toga je u laboratoriji metodom četvrtanja²³⁶ dobijen reprezentativni uzorak. Analizirani su pojedini delovi ploda: oljušten kesten, odnosno srž ploda, braon spoljna kora ploda, crvena unutrašnja kora ploda, ceo plod (bez ježevica), lišće, resa, ježevica, stara i mlada kora stabla. Pitomi kesten je detaljno analiziran, dok su za ostala dva kultivara izabrani samo pojedini delovi (ceo plod, list, resa).

Delovi kestena su u laboratorijskom mlinu samleveni za dalju analizu. Srednji prečnik čestica (d) je određen primenom seta sita (Erweka, Germany) po postupku jugoslovenske farmakopeje²³⁷. Određivanje se vrši tako što se usitnjena droga prenese na set sita (prvo sito na setu, odozgo na dole je ono kroz koje prolazi celokupna masa usitnjene droge), stavi poklopac i seje 20 minuta²³⁸.

Nakon toga meri se masa dela droge (na situ sa manjim prečnikom otvora) i izračunava maseni procenat frakcije (m). Srednji prečnik čestica (d) izračunava se primenom sledeće jednačine:

$$\frac{100}{d} = \sum \left(\frac{m_i}{d_i} \right) \quad (14)$$

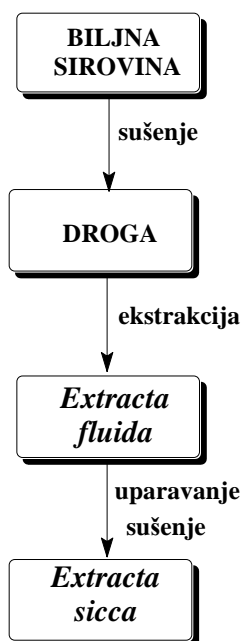
gde je:

m_i - maseni procenat i-te frakcije (%);

d_i – srednji prečnik i-te frakcije (mm).

4.1.2. Ekstrakcija

Uzorak droge (50,0 g) se prenese u erlenmajer sa šlifom i doda 50% etanol (250 ml), pri čemu je odnos droge i ekstragensa 1 : 5 (m:V). Opisani postupak ekstrakcije je u slučaju primene 50% acetona kao ekstragensa u potpunosti isti, s tim što je odnos droge i rastvarača 1:10. Erlenmajeri su tarirani i izvršena je ekstrakcija primenom ultrazvuka (30 min). Nakon provere mase i dodavanja eventualno otparenog rastvarača, izvršena je filtracija, pri čemu je dobijen tečni ekstrakt. Tačno odmerena zapremina dobijenog ekstrakta (100 ml) se prenese u tarirani balon i rastvarač ukloni primenom rotacionog vakuum uparivača na temperaturi od 40°C do suva, i precizno izmeri masa suvog ostatka. Postupak dobijanje suvog ekstrakta je prikazan na šemi 3. Na osnovu dobijene mase suvog ekstrakta (SE) izračunava se prinos ekstrakcije Y (g SE/100 g droge), odnosno % (m/m). Dobijeni suvi ekstrakti su čuvani u frižideru u staklenim bočicama.



Šema 3. Blok šema dobijanja suvog ekstrakta (*Extracta sicca*)

4.2. SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE

Opisani su postupci standardnih kolorimetrijskih metoda za određivanje ukupnih fenola, flavonoida i kondenzovanih tanina primenjenih za analizu uzoraka.

4.2.1. Određivanje ukupnih fenola

Određivanje ukupnih fenola se vrši metodom po Folin-Ciocalteu¹⁴⁶. Rastvor ispitivanih ekstrakata u metanolu (0,1 ml) koncentracije 1 mg/ml ili standarda galne kiseline se prenese u epruvetu i doda 7,9 ml destilovane vode, 0,5 ml Folin-Ciocalteu reagesa i 1,5 ml 20% Na₂CO₃ (4 g anhidrovanog Na₂CO₃ se rastvori uz zagrevanje (70°C) u 16 ml destilovane vode). Za slepu probu se umesto ekstrakta u epruvetu doda 0,1 ml destilovane vode i ponovi prethodno opisani postupak.

Nakon inkubacije od 2 h na sobnoj temperaturi, meri se apsorbancija na talasnoj dužini od 765 nm. Ukupni fenoli su izraženi kao ekvivalent galne kiseline, GAE/100 g uzorka²³⁹.

Za formiranje standardnog dijagrama galne kiseline se u normalni sud (10 ml) odmeri 2, 4, 6 ili 8 ml standardnog rastvora galne kiseline monohidrata (200 mg/l) i dopuni do crte metanolom. U epruvetu se prenese po 0,1 ml prethodno pripremljenih standardnih rastvora, a u poslednju epruvetu se odmeri 0,1 ml standardnog rastvora galne kiseline monohidrata. Nakon dodavanja reagenasa po prethodno opisanoj proceduri i inkubacije, meri se apsorbancija na talasnoj dužini od 765 nm.

4.2.2. Određivanje ukupnih flavonoida

Određivanje ukupnih flavonoida je izvršeno kolorimetrijskom metodom primenom aluminijum-hlorida²⁴⁰. Rastvori ekstrakta u metanolu (1 ml) ili standardnog

rastvora (+)-katehina: 20, 40, 60, 80 ili 100 mg/l, se prenesu u normalni sud od 10 ml u kome se nalazi 4 ml destilovane vode i 0,3 ml 5% natrijum-nitrita. Nakon 5 minuta, doda se 0,3 ml 10% rastvora $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, a posle 6 minuta još 2 ml NaOH (1 mol/l) i normalni sud dopuni do crte destilovanom vodom. Rastvor se promućka i apsorbancija se meri na talasnoj dužini od 510 nm.

4.2.3. Određivanje kondenzovanih tanina vanilin testom

Zapremina od 0 do 1 ml (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ili 1 ml) standardnog rastvora katehina u metanolu (300 mg/l) se prenese u epruvete, a zatim se do 1 ml dopune apsolutnim metanolom. Na opisani način pripreme se po 2 paralelne probe standardnih rastvora¹⁵¹. Jednom setu epruveta se doda 5 ml vanilin reagensa (1% vanilin u metanolu : 4% HCl u metanolu = 1:1 (V:V)), rastvor se priprema neposredno pre određivanja, a drugom setu 5 ml 4% HCl u metanolu. Između dodavanja ovih reagenasa potrebno je da prođe ne više od 1 minut.

Epruvete se inkubiraju na vodenom kupatilu 20 minuta (30°C). Vrednosti apsorbancija uzorka se takođe mere u 1 minutnom intervalu na talasnoj dužini od 500 nm. Apsoorbancija slepe probe (metanolni rastvor ekstrakta kome nije dodat vanilin reagens, a sadrži 4% HCl u metanolu) se oduzima od apsorbancije uzorka koji sadrži vanilin reagens.

Po 1 ml metanolnog rastvora ekstrakta (1 mg/ml) se prenese u 2 epruvete, tako da svaki uzorak ima svoju slepu probu. Nakon primene prethodno opisanog postupka i inkubacije, meri se apsorbancija.

4.2.4. Određivanje kondenzovanih tanina kiselim butanolnim testom

U epruvete se doda 6 ml kiselog butanolnog reagensa (n-butanol : cc. HCl = 95 : 5 (V:V)) i 1 ml metanolnih rastvora ekstrakata koncentracije 1 mg/ml. Doda se 0,2 ml gvožđe reagensa (0,5 g $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4) \times 12 \text{H}_2\text{O}$ se rastvori u 25 ml rastvora HCl (2 mol/l)) i uzorak se promeša. Epruvete se zatvore staklenim zatvaračem i stave na ključalo vodeno kupatilo (50 min). Nakon hlađenja, apsorbancija se meri na talasnoj dužini od 550 nm. Od dobijene vrednosti se oduzima apsorbancija slepe probe koja sadrži 1 ml rastvarača (metanol), kiseli butanol reagens i gvožđe reagens²⁴¹.

Standardizacija metode se vrši odgovarajućim proantocijanidinom, dobijenim iz ekstrakta kestena prečišćavanjem preko Sephadex-a LH 20, rastvorenim u metanolu u koncentraciji 1 mg/ml.

4.2.4.1. Prečišćavanje ekstrakta kestena na Sephadex-u LH 20 i dobijanje kondenzovanih tanina

Kolona dimenzija 1 cm x 17,8 cm se napuni Sephadex-om LH 20 (3 g liofiliziranog Sephadex-a se doda u 100 ml 95% etanola). Zatim se Sephadex-u dodaje etanol da bi se formirao stabilan sloj. Na kolonu se nanosi uzorak ekstrakta kestena (100 mg suvog ekstrakta u 5 ml 95% etanola). Za odvajanje nepolimernih fenolnih materija, kolona se prvo eluira 95% etanolom. Brzina eluiranja je 0,2 ml/min. Eluat se sakuplja u označene epruvete, do zapremine 5 ml, sve dok ispoljava pozitivnu reakciju na Prussian plavo.

Prussian blue test: Za ovaj test uzorku (0,1 ml) se doda po 1 ml 0,02 mol/l FeCl_3 rastvorenog u 0,1 mol/dm HCl i 1 ml 0,016 mol/l $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, kao i 5 ml vode. Prisustvo fenolnih komponenata se detektuje obrazovanjem plave boje²⁴².

Prikupljene frakcije istog sastava se spoje i rastvarač u potpunosti ukloni na rotacionom vakuum uparivaču ($T=40^\circ\text{C}$). Na ovaj način su dobijeni nepolimerni fenoli.

Eluiranjem kolone 50% acetonom se dobijaju frakcije koje sadrže tanine (polimerne fenole). Acetonske frakcije se spoje i aceton se ukloni na vakuum uparivaču. Obe frakcije (netaninski fenoli i proantocijanidini) se osuše do konstantne mase u sušnici, zatim se izmeri njihova masa i kvantitativno se prenesu u staklene bočice koje se do ispitivanja čuvaju u frižideru.

4.2.5. Spektrofotometrijsko određivanje kapaciteta ekstrakata u zaštiti eritrocita od hemolize izazvane vodonik peroksidom

Stepen zaštite membranskog integriteta je određen u zavisnosti od mere kojom ekstrakti mogu da spreče hemolizu eritrocita. Eritrociti izloženi intenzivnom ili produženom oksidativnom stresu, mogu podleći hemolizi, koja se može detektovati prisustvom hemoglobina i dezoksihemoglobina u plazmi.

U cilju određivanja relativnog stepena hemolize, meri se vrednost apsorbanacija na talasnim dužinama od 540 nm i 560 nm. Na ovim talasnim dužinama hemoglobin i dezoksihemoglobin ispoljavaju maksimum apsorbanacije¹⁸⁸. Pod normalnim uslovima, hemoglobin i dezoksihemoglobin se ne nalaze u plazmi, tako da njihovo prisustvo predstavlja indikator da je došlo do hemolize. Izvesni mali stepen hemolize se dešava i kod netretiranih eritrocita, kao posledica mehaničkih oštećenja u toku manipulacije uzorcima.

Sveža krv je uzeta od tri zdrava volontera (starosti od 23 do 35 godina). U epruvete u kojima se nalazi 0,072 ml 7,5% rastvor K_3EDTA kao antiokoagulans, unese se 3 ml krvi. Sveža krv je prethodno tri puta isprana izotoničnim rastvorom fosfatnog pufera (NaCl 8,8 g/l, Na_2HPO_4 1,2 g/l, NaH_2PO_4 0,43 g/l, pH je podešen na 7,4 primenom 1 mol/l HCl), a zatim je izvršeno centrifugiranje na 3500 x g (10 min, 23°C). Hematokrit sveže krvi je 40%, a pre inkubacije je u svim uzorcima postignut isti hematokrit. U svim istraživanjima je H_2O_2 dodat do finalne koncentracije od 3 mmol/l. Uzorci bez H_2O_2 se koriste kao slepe probe.

Eritrociti tretirani sa H_2O_2 koji ne sadrže ekstrakte služe kao kontrola. Za svaki ekstrakt je pripremljeno dva tipa uzorka, sa i bez vodonik peroksida. Finalne koncentracije ekstrakata su bile 0,2 mg/ml. Svi uzorci su inkubirani 30 minuta na 37°C . Nakon inkubacije uzorci su pomešani sa 10 puta većom zapreminom fosfatnog pufera u cilju uklanjanja H_2O_2 i centrifugirani na 3500 x g (10 min, 20°C).

Dobijeni supernatant je razblažen 100 puta, nakon čega se određuje apsorbanacija na navedenim talasnim dužinama. Stepem hemolize se izražava u procentima (%), tako da apsorbanacija u uzorcima u kojima je postignuta kompletna liza eritrocita predstavlja 100% hemolize. Za pripremu uzoraka sa kompletnom hemolizom, eritrociti su inkubirani 30 minuta sa vodom umesto fosfatnog pufera.

4.3. HPLC ANALIZA

Za kvantitativno određivanje ukupnih fenolnih materija je primenjen HPLC uređaj HP1090, dok je kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih materija izvršena primenom Agilent MSD TOF kuplovanim sa HPLC uređajem Agilent 1200.

4.3.1. HPLC/DAD analiza za kvantitativno određivanje ukupnih fenolnih materija

Odmeri se 5 g uzoraka i doda 50 ml H₂SO₄ (pH=3). Izvrši se kisela hidroliza, zagrevanjem balona sa povratnim kondenzatorom na ključalom vodenom kupatilu u toku 2 h. Nakon filtracije, 20 ml vodenog ekstrakta se ekstrahuje (2 x 10 ml etil-acetata) u levku za odvajanje. Spojeni etil-acetatni ekstrakti se upare do suva na rotacionom vakuum uparivaču.

HPLC analiza je izvršena upotrebom tečnog hromatografa HP1090 sa DAD detektorom. Korišćena je kolona na obrnutoj fazi (Zorbax SB-C18, 3,0 x 250 mm, 5 μm), koja je zaštićena pretkolonom (Zorbax SB-C18, 4,6 x 12,5 mm, 5 μm). Detekcija je izvršena na 277 nm, a apsorpcioni spektar komponenata je sniman u intervalu od 210 do 400 nm. Gradijent mobilne faze je formiran varijacijom odnosa mobilne faze A (1% sirćetna kiselina u vodi, V/V) i mobilne faze B (acetonitril). HPLC separacija je izvršena sledećim linearnim gradijentom: 0-10 min, 80% A; 10-40 min, 60% A; 40-80 min, 40% A; 80-130 min 50% A. Kolona je uravnotežena na početne uslove sa 95% A, 10 min. Brzina protoka mobilne faze je 0,30 ml/min. Analiza je izvršena na sobnoj temperaturi (22°C). Uzorak (rastvor hidrolizovanog ekstrakta ili standard rutin) je injektovan mikrošpicem (10 μl). Suvi ekstrakt *C. sativa* dobijen nakon kisele hidrolize je rastvoren u smeši metanol : voda = 2 : 3 (V/V). Svi rastvori su filtrirani pre injektovanja u HPLC sistem, kroz filter veličine otvora pora 0,45 μm.

4.3.2. HPLC/ DAD i LC/MS analiza

Suvi ekstrakt (100 mg) se rastvori u 1 ml metanola i doda 2 ml 3% HCl (u metanolu). Normalni sud sa reakcionom smešom se zatvori i stavi na ključalo vodeno kupatio u toku 2 h. Nakon hlađenja, rastvor se razblaži deset puta i injektuje u HPLC/DAD i LC/MS sistem.

HPLC/DAD analiza

HPLC analiza hidrolizovanih ekstrakata je izvršena primenom uređaja Agilent 1200 serije sa RR Zorbax Eclipse Plus C18 kolonom (150 x 4,6 mm, 1,8 μm). Mobilna faza A je 0,2% mravlja kiselina u vodi, a mobilna faza B je acetonitril. Injektovana zapremina uzorka je 1 μl, a protok mobilne faze 0,95 ml/min, sa programom gradijenta: 0-20 min 5-16% B, 20-28 min 16-40% B, 28-32 min 40-70% B, 32-36 min 70-99% B, 36-45 min 99% B, 45-46 min 99,5% B. UV-VIS detekcija je na talasnim dužinama 230, 280 i 320 nm. Kvantitativna analiza je zasnovana na merenju površine dobijenih pikova standardnih rastvora uz korišćenje standardnog dijagrama galne kiseline, odnosno na osnovu zavisnosti površine pika od mase galne kiseline i odgovarajuće jednačine, u koncentracionom opsegu od 0,1 do 1,0 mg/ml.

LC/MS analiza

LC/MS analiza je izvršena na aparatu Agilent MSD TOF kuplovanim sa Agilent 1200 HPLC aparatom, upotrebom iste kolone i programom gradijenta kao i u HPLC/DAD analizi. Analize mase molekula i fragmentiranih jona je izvršena na osnovu masenih spektara dobijenih upotrebom Agilent ESI-MSD (TOF) "time-of-flight" masenog spektrometra na pozitivnom i negativnom polarnom modu. Protok gasa (N_2) je $12 \text{ dm}^3/\text{min}$; pritisak nebulizatora 45 psig; temperatura gasa je 350°C . Za ESI analizu, parametri su bili: kapilarni napon, 4.000 V; fragmentor, 140 V; skimer, 60 V; Oct RF V 250 V, za pozitivan i negativan mod. Opseg je od 100 to 2.000 m/z .

4.4. ISPITIVANJE EKSTRAKATA KESTENA EPR SPEKTRALNOM ANALIZOM

EPR spektri su za određivanja DPPH i hidroksi radikala snimani na EPR spektrometru Bruker 300E (aparatus je označen oznakom I).

Sva ostala EPR određivanja rađena su na Varian E104-A EPR spektrometru opremljenom sa X-trakom (9,51 GHz) (aparatus je označen oznakom II). Za pojedine uzorke su na ovom aparatu rađena i ispitivanja hidroksi radikala.

4.4.1. Transformacija DPPH radikala

Analiza na aparatu I

Stabilni DPPH slobodni radikali ispitivani su u reakcionoj smeši koja se dobija mešanjem 200 μl vode i 600 μl 0,4 mmol/l rastvora DPPH (slepa proba). Uticaj ekstrakata na transformaciju DPPH radikala analiziran je u rastvoru koji se dobija mešanjem: x μl 1% vodenog rastvora kestena, (200-x) μl vode i 600 μl 0,4 mmol/l vodenog rastvora DPPH. Svaki uzorak je inkubiran 20 minuta na sobnoj temperaturi (20°C), a zatim su izvršena merenja primenom aparata I sa vremenom skeniranja od 4 minute.

Za ispitivanje uticaja ekstrakata na stvaranje i transformaciju DPPH radikala, ekstrakti su rastvoreni u destilovanoj vodi u koncentraciji od 1 mg/ml i dodavani u Fenton-ov model sistem u koncentraciji od 0,2 mg/ml. Paralelno je ispitivan uticaj sintetičkog antioksidansa BHA na transformaciju DPPH radikala, pri istim koncentracijama.

Smeša je intezivno mešana u toku 2 minuta i prenetu u Bruker-160 FC kvarcnu kivetu za vodene rastvore. EPR spektri su snimani pri sledećim uslovima: frekvencija modulacije, 100 kHz; amplituda modulacije, 0,256 G; vremenska konstanta, 40,96 ms; vremenski opseg merenja, 327,68 ms; centar polja, 3.440,00 G; ukupan opseg merenja, 100,00 G; frekvencija mikrotalasnog područja, 9,45 GHz; jačina struje, 2×10^4 ; snaga mikrotalasnog područja, 20 mW; temperatura merenja, 23°C . U svim eksperimentima korišćena je ultra-čista voda čija je otpornost 18 M Ω . Svi eksperimenti su rađeni u tri ponavljanja i rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

Antioksidativna aktivnost (AA_{DPPH}) ekstrakata definisana je sledećim izrazom:

$$A_{\text{DPPH}} = \frac{h_o - h_x}{h_x} 100 \quad (\%) \quad (15)$$

gde je: h_o - visina drugog pika EPR signala slepe probe;
 h_x - visina drugog pika EPR signala uzorka sa ekstraktom.

4.4.2. Transformacija hidroksi radikala

Analiza na aparatu I

U Fenton-ovom model sistemu, koji je dobijen mešanjem 200 μl 10 mmol/l $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 200 μl 80 mmol/l DMPO i 200 μl 10 mmol/l H_2O_2 ispitano je nastajanje hidroksi radikala nakon reakcionog perioda od 5 min. Finalne koncentracije ekstrakata iznosile su 0,2 mg/ml.

Ispitan je i uticaj komercijalnog antioksidansa BHA, pri koncentracijama 0,1, 0,2 i 0,3 mg/ml, na stvaranje i transformaciju hidroksi radikala.

EPR spektralna određivanja hidroksi radikala u svim ispitivanim model sistemima koji su se nalazili u Bruker ER-160 FC kvarcnoj kivetu za vodene rastvore, izvršena su na EPR spektrometru I pri sledećim radnim karakteristikama: frekvencija modulacije, 100 kHz; amplituda modulacije, 0,521 G; vremenska konstanta, 81,92 ms; vremenski opseg merenja, 327,68 ms; centar polja, 3.440,00 G; ukupan opseg merenja, 100,00 G; frekvencija mikrotalasnog područja, 9,64 GHz; jačina struje, $2,00 \times 10^5$; snaga mikrotalasnog područja, 20 mW; temperatura merenja, 23°C .

Antioksidativna aktivnost (A_{OH}) ekstrakta definisana je jednačinom:

$$A_{\text{OH}} = \frac{h_o - h_x}{h_x} 100 \quad (\%) \quad (16)$$

gde je: h_o - visina drugog pika EPR signala slepe probe;
 h_x - visina drugog pika EPR signala uzorka sa ekstraktom ili BHA.

Analiza na aparatu II

Tipičan EPR spin trapping eksperiment se odvija na sledeći način²⁴³: a) željeni radikal se proizvodi u radikal generišućem sistemu i njegova koncentracija se određuje na osnovu amplitude EPR signala koji potiče od spin trap adukta koji se formira trappingom radikala, b) isti eksperiment se ponavlja nakon dodavanja ispitivanog ekstrakta koji je "skevendžer" ispitivanih slobodnih radikala, što bi trebalo da izazove smanjenje inteziteta EPR signala, s obzirom da ekstrakt uklanja određenu količinu proizvedenih radikala.

Sposobnost ispitivanog ekstrakta da ukloni radikale se ispituje na osnovu razlike amplituda između EPR signala trapovanog radikala u radikal – generišućem sistemu, sa i bez dodavanja ispitivanog ekstrakta. Rezultati se predstavljaju kao relativno smanjenje stvaranja radikala, odnosno kao relativna inhibicija (RI):

$$\text{RI} = \frac{P_{\text{rgs}} - P_{\text{rgs+e}}}{P_{\text{rgs}}} 100 \quad (\%) \quad (17)$$

gde je: P_{rgs} - pik amplitude (radikal generišući sistem);

$P_{\text{rgs+e}}$ - pik amplitude (radikal generišući sistem + ekstrakt).

Sposobnost ekstrakata da izvrše "skevendžing" $\cdot\text{OH}$ radikala je ispitana upotrebom Fenton-ove reakcije kao " $\cdot\text{OH}$ proizvođačkog" sistema. Za Fenton-ovu reakciju je korišćen rastvor dobijen kombinovanjem 2 mmol/l H_2O_2 i 0,075 mmol/l FeSO_4 za stvaranje $\cdot\text{OH}$, a korišćen je spin-trap DEPMPO u finalnoj koncentraciji od 28 mmol/l. DEPMPO reaguje sa $\cdot\text{OH}$ i formira DEPMPO/OH adukt. Finalna koncentracija ekstrakta (prethodno rastvorenih u vodi) je 0,2 mg/ml. Uzorci bez dodatog ekstrakta se koriste kao slepa proba.

EPR spektri su snimani na sobnoj temperaturi, pri sledećim uslovima: frekvencija modulacije, 100 kHz; amplituda modulacije, 2,0 G; vremenska konstanta, 32 ms; centar polja, 3.410,00 G; ukupan opseg merenja, 200,00 G; snaga mikrotalasnog područja, 10 mW. Uzorci su prebačeni u gas-permeabilne teflonske epruvete. Merenja su izvršena uz primenu kvarcnih kapilara u koje su postavljene teflonske epruvete. Snimanje je izvršeno 2 minuta nakon početka reakcije, a trajalo je 4 minuta.

4.4.3. Transformacija superoksidnog anjon radikala

Superoksidni anjon radikali su generisani u ksantin (1,6 mmol/l)/ksantin oksidaza (6 IU/ml) (X/XO) sistemu, rastvorenom u vodi visoke čistoće (18 M Ω). Finalna koncentracija DEPMPO je 28 mmol/l. Vreme inkubacije je 2 minuta.

Za ispitivanje uticaja ekstrakata na stvaranje i transformaciju superoksidnog anjon radikala, ekstrakti su rastvoreni u destilovanoj vodi u koncentraciji od 1 mg/ml i dodavani u sistem u finalnoj koncentraciji od 0,2 mg/ml. Uzorak koji ne sadrži ekstrakt je služio kao kontrola. Sposobnost ispitivanih ekstrakata da vežu radikale ispitana je na osnovu razlike amplituda između EPR signala radikala u spin-trapu i u radikal-generišućem sistemu, sa i bez dodavanja ispitivanog ekstrakta. Rezultati su prikazani kao antioksidativna aktivnost (AA) korišćenjem sledeće jednačine:

$$AA = \frac{h_o - h_x}{h_x} 100 (\%) \quad (18)$$

gde su h_o i h_x amplitude karakterističnih linija u EPR spektru, dobijenih sa kontrolom, odnosno sa uzorkom koji sadrži ekstrakt.

EPR spektri su snimani pri istim prethodno opisanim uslovima za transformaciju hidroksi radikala (aparati II).

4.4.4. Kapacitet ekstrakata za uklanjanje lipidne peroksidacije

Ispitivanje sposobnosti ekstrakata u prevenciji i/ili otklanjanju lipidne peroksidacije lipozoma testirano je upotrebom Fenton-ove reakcije u stvaranju $\cdot\text{OH}$ radikala, za koje je poznato da efikasno izazivaju peroksidaciju. EPR spin probing tehnika i membranska spin proba (7-DS) je upotrebljena za procenu smanjenja membranske fluidnosti, za koju se zna da korelira sa lipidnom peroksidacijom⁴⁵. Spin

probe daju sopstveni signal u EPR spektru za razliku od spin trapova koji daju signal tek u formi spin adukta.

Na osnovu spektra 7-DS ugrađenog u liposome izvršeno je izračunavanje parametra reda (S), koji je obrnuto proporcionalan membranskoj fluidnosti²⁴⁴ Za pripremu lipozoma, hloroformski rastvor L- α -fosfatidilholina uparen je do suva u vakuumu. Zatim je dodat fosfatni pufer (Na_2HPO_4 1,2 g/l, NaH_2PO_4 0,43 g/l, pH vrednost 7,4) da bi se dobila koncentracija od 125 mmol/l lipida i suspenzija je homogenizovana na vortex-u 5 minuta. Ekstrakti su rastvoreni u puferu do finalne koncentracije od 0,2 mg/ml (finalna koncentracija lipida je 100 mmol/l). U kontrolnom uzorku se umesto ekstrakta nalazi pufer u istoj zapremini. Uzorcima je zatim dodata radikal-generišuća smeša sačinjena od 0,5 mmol/l H_2O_2 i 0,075 mmol/l FeSO_4 . Reakcija je trajala 20 minuta, a zatim je dodata 10 puta veća zapremina fosfatnog pufera da bi se reakcija zaustavila. Uzorci su centrifugirani 10 min (10.000 o/min) i supernatant je odbačen. Lipozomi su rastvoreni u puferu, rastvor dodat 7-DS -u i nakon toga homogenizovan.

Kontrolni uzorak je tretiran na isti način, ali bez izlaganja radikal-generišućem sistemu (spin proba)/(membranski lipid)²⁴⁵ u odnosu 1:200.

EPR spektri su snimani pri istim uslovima kao za transformaciju hidroksi radikala (aparati I i II).

4.4.5. Kapacitet ekstrakata na transformaciju organskih hidrofilnih radikala

Za određivanja kapaciteta ekstrakata za transformaciju organskih radikala koristi se hidrofilna spin proba Tempon, koja se ugrađuje u ćelijsku membranu za razliku od 7-DS. Finalna koncentracija Tempon-a u uzorku je 0,1 mmol/l, a finalna koncentracija ekstrakta 0,2 mg/ml. Svaka proba je inkubirana 20 minuta, a zatim je izvršeno merenje sa 4 minutnim vremenom skeniranja na sobnoj temperaturi (20°C).

EPR spektri su snimani pri istim uslovima kao za transformaciju hidroksi radikala (aparati I i II).

Izmerena je amplituda sredine pika upotrebom EPR signala i antioksidativna aktivnost (AA) svakog uzorka je dobijena korišćenjem jednačine:

$$AA = \frac{A_{sp} - A_e}{A_{sp}} 100 \quad (\%) \quad (19)$$

gde su A_{sp} i A_e amplituda središnjeg pika slepe probe i amplituda središnjeg pika uzorka sa ekstraktom.

4.4.6. Transformacija hidroksi radikala i superoksid anjon radikala generisanih UV zračenjem

Mogući protektivni kapacitet ekstrakata u odnosu na UV zračenje ispituje se sposobnošću "skevendžinga" slobodnih radikala ($\cdot\text{OH}$ i $\cdot\text{O}_2$), nastalih izlaganjem UV zračenju. Kontrolni uzorak, vodeni rastvor DEMPO (28 mmol/l), izložen je UV zračenju. Zračenje je izvršeno u UV reaktoru (snage 1.000 W) i trajalo je 10 minuta. Ekstrakti su rastvoreni do finalne koncentracije od 0,2 mg/ml i izloženi UV zračenju na isti prethodno opisani način za kontrolni uzorak. Nakon inkubacije, uzorci su

prebačeni u teflonske epruvete i izvršena su EPR određivanja pri istim uslovima kao za transformaciju hidroksi radikala (aparati I i II).

UV protektivna aktivnost se može izraziti kao relativna inhibicija (RI), na sledeći način:

$$RI = \frac{P_v - P_e}{P_v} 100 \quad (\%) \quad (20)$$

gde je: P_v - pik amplitude (voda);

P_e - pik amplitude (ekstrakt).

4.5. PREVENIRANJE/UKLANJANJE LIPIDNE PEROKSIDACIJE MEMBRANE ERITROCITA

Glavna meta napada egzogenog H_2O_2 u eritrocitima nije intracelularna sredina, već češće membrana eritrocita. Kako H_2O_2 može proći membranu, on takođe poseduje sposobnost reagovanja sa mastima izazivajući peroksidaciju i oksidativna oštećenja. Utvrđeno je da H_2O_2 izaziva smanjenje membranske fluidnosti¹⁸⁵.

Priprema uzorka je identična kao za spektrofotometrijsko određivanje kapaciteta ekstrakata u zaštiti eritrocita od hemolize izazvane vodonikom peroksidom, s tim što se za ovu metodu superatant uklanja. Eritrociti se rastvaraju u dvostrukoj zapremini fosfatnog pufera. Etanolni rastvor 7-DS koji se koristi kao spin proba se nanese na zidove epruvete. Nakon uparavanja etanola, doda se uzorak ekstrakta do finalne koncentracije od 0,2 mg/ml i epruveta blago promućka. 7-DS se dodaje eritrocitima tako da se dobije optimalan odnos spin-obeleživač/membranski lipid²³⁰, koji iznosi oko 1:100.

Zatim se pristupa snimanju EPR spektra, pri istim uslovima kao za transformaciju hidroksi radikala (aparati I i II).

4.6. ISPITIVANJE ZAŠTITE MEMBRANSKOG INTEGRITETA ERITROCITA MERENJEM SADRŽAJA KALIJUMA

Sposobnost neke supstance da zaštiti membranski integritet eritrocita izloženih oksidativnom stresu se može odrediti merenjem sadržaja kalijuma, koji je dobar indikator koegzistentnosti i funkcionalnosti membrane eritrocita.

Efluks jona K^+ u odsustvu stimulansa stvara potencijalnu razliku kroz ćelijsku membranu. Veličina potencijala kroz ćelijsku membranu zavisi od ravnotežnog potencijala za K^+ i selektivne permeabilnosti membrane ćelije za K^+ . Sve dok je intraćelijska aktivnost K^+ mnogo veća od ekstraćelijske, ravnotežni potencijal za K^+ je osetljiviji na ekstraćelijske promene²⁴⁶ aktivnosti K^+ . Oštećenje membrane se može reflektovati oslobađanjem konstituenasa ćelije, kao što je kalijum.

Određivanje zaštite membranskog integriteta je izvršena ispitivanjem da li ekstrakti kestena mogu da preveniraju efluks kalijuma. Sadržaj kalijuma je određen plamenom fotometrijom.

Eritrociti su tretirani na isti način kako je objašnjeno u prethodnom eksperimentu, izuzev što nakon 30 minutnog perioda inkubacije, uzorci nisu prani. Centrifugiranje je obavljeno na 3500 x g (10 min, 20°C) i dobije se supernatant u kome se određuje sadržaj K^+ upotrebom PFP7 plamenog fotometra.

Supernatant je razblažen 100 puta da bi se dobile koncentracija kalijuma u opsegu detekcije plamenog fotometra, i meren je ekstracelularni kalijum. Efluks kalijuma povezan sa gubitkom membranskog integriteta izazvanog vodonik peroksidom se preračunava na osnovu koncentracije kalijuma u supernatantu za uzorke koji su tretirani sa H₂O₂ i netretiranih uzoraka. S obzirom da ekstrakt kestena može sadržavati kalijum i uticati na eritrocite membrane, ekstrakt se dodaje i netretiranom uzorku.

4.7. ODREĐIVANJE VIJABILNOSTI RIN-5F ČELIJA POMOĆU MTT TESTA

Izvršeno je uspostavljanje model-sistema dijabetesa u kulturi β-ćelija pankreasa (Rin-5F) upotrebom STZ, ALX i SNP.

Rin-5F ćelije su uzgajane u RPMI 1640 medijumu koji je obogaćen albuminom govečeta iz seruma, 10% glutaminom i koktelom antibiotika (penicilin/streptomycin). Medijum je menjan svaki treći dan, a ćelije pasažirane u trenutku dostizanja 70% konfluentnosti suda u kome se uzgajaju.

- STZ je rastvoren u RPMI medijumu i korišćen na Rin-5F ćelije u seriji koncentracija: 0, 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10 i 15 mmol/l
- ALX je rastvoren u RPMI medijumu i korišćen u koncentracijama: 0, 1, 2, 5, 7,5, 10 i 15 mmol/l
- SNP je rastvoren u vodi, a primenjene su sledeće koncentracije: 0, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5 i 10 mmol/l.

Navedeni izazivači dijabetogenog stanja inkubirani su sa Rin-5F ćelijama 24 h. Ćelije su potom isprane u PBS-u, tripsinizovane, sakupljene centrifugiranjem 1000 x g (5 min, 20°C) i korišćene u daljim eksperimentima. Vijabilnost Rin-5F ćelija praćena je pomoću MTT testa²⁴⁷. Boja MTT (2,5 mg/5 ml RPMI medijuma) nanese se na tretirane i kontrolne Rin-5F ćelije. Inkubacija traje u mraku na sobnoj temperaturi 2 h. Boja lako prodire u viabilne ćelije. Vizualizacija se vrši rastvaranjem MTT-om fiksiranih ćelija u dimetil-sulfoksidu (DMSO)-u. Nakon rastvaranja vidljiva ljubičasta boja se očitava u ELIZA čitaču korišćenjem filtera od 570 nm.

4.8. MIKROBIOLOŠKA METODA ISPITIVANJA

Muzejske kulture referentnih sojeva mikroorganizama i izolata, čuvane u frižideru na temperaturi od 4°C uz redovno presejavanje, su za ispitivanje antimikrobne aktivnosti biljnih ekstrakata fiziološki aktivirane dvostrukim pasažiranjem po Mueller-Hinton agaru (MHA) za bakterije, ili Sabouraud-dextrose agaru za kvasce.

4.8.1. Disk-difuziona metoda – metoda za skrining

Nakon pasažiranja od referentnih kultura je pripremljena suspenzija u 9 ml fiziološkog rastvora. Broj ćelija u suspenziji je procenjen McFarland nefelometrom i prema potrebi pripremljena serija razređenja tako da broj ćelija u suspenziji za inkulaciju podloge nije manji od 1 x 10⁷ cfu/ml (cfu ≅ colony forming unit). Po 1 ml ove suspenzije je homogenizovan sa 9 ml otopljene i ohlađene (do 45°C) podloge

koje su odmah razlivene u Petri kutije prečnika 10 cm i ostavljene da želiraju. Po očvrstloj podlozi postavljeni su sterilni diskovi prečnika 6 mm.

U aseptičnim uslovima na diskove je naneto po 10 µl *Castanea sativa* ekstrakata koncentracije 10 mg/ml rastvorenih u 30% etanolu.

Petri kutije su inkubirane 48 h u termostatu na temperaturi od 37°C za bakterije ili 25°C za kvasce, nakon čega su izmerene zone inhibicije oko diskova (ZI, uključujući disk) i izražene u mm sa preciznošću od 0,1 mm. Prisustvo ove zone potvrda je antimikrobne aktivnosti ekstrakta.

Kao referentne supstance korišćeni su sledeći antibiotici: penicilin (10 U/disc), amoksicilin (25 µg/disc), kao i antimikotici: ketokonazol (25 µg/disc), nistatin (100 U/disc) i amfotericin B (100 U/disc) Bioanalyse[®], Ankara, Turska.

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti kestena, upotrebljeni su sledeći sojevi bakterija i kvasaca: *Sarcina lutea* (ATCC 9341, (G+) bakterija), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, (G+) bakterija), *Bacillus cereus* (ATCC 10876, (G+) bakterija), *Proteus mirabilis* (ATCC 35659, (G-) bakterija), *Escherichia coli* (ATCC 25922, (G-) bakterija), *Lactococcus lactis ssp. lactis* (B-4449, (G+) bakterija), *Micrococcus pyrogenes var. albus* ((G+) bakterija, izolat iz prirodne sredine), *Enterococcus gallinarum* ((G+) bakterija, izolat iz prirodne sredine), *Salmonella typhimuri* (ATCC 14028, (G-) bakterija), *Saccharomyces cerevisiae* (112, Hefebank Weihenstephan, kvasac), *Candida albicans* (ATCC 10231, kvasac), *Rhodotorula* (izolat iz prirodne sredine, kvasac).

Bakterije i kvasci su deo kolekcije Mikrobiološke laboratorije Tehnološkog fakuleta Univerziteta u Novom Sadu.

Paralelno sa antimikrobnim ispitivanjem ekstrakata *C. sativa*, ispitan je i čist rastvarač u smislu ispoljavanja eventualne antimikrobne aktivnosti.

Napomena: ATCC- American Type of Collection Cultures

4.9. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Svi eksperimenti su rađeni u tri ponavljanja, a rezultati predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška. Svi podaci dobijeni u ispitivanjima obrađeni su pomoću softverskog paketa Microsoft Excel 2000 (CORREL statistička funkcija). Pearson-ov korelacioni test je upotrebljen za određivanje korelacije između promenljivih. Nivo značajnosti definisan je kao $P \leq 0,05$.

5. ZAKLJUČCI



1. Najveći prinos suvog ekstrakta je dobijen za resu kalemljenog italijanskog maruna (33,56%) primenom 50% acetona, dok je primenom 50% etanola kao ekstragensa najveći prinos suvog ekstrakta 13,32% dobijen za crvenu unutrašnju koru ploda lovranskog maruna. Najmanji prinos suvog ekstrakta (1,82%) je određen za ježevice (50% etanol) i spoljnu braon koru ploda pitomog kestena (3,30%) (50% aceton). U zavisnosti od analiziranog dela kestena utvrđen je sledeći redosled prinosa suvog ekstrakta (važi za oba ekstragensa): resa > list > srž ploda > ceo plod > crvena unutrašnja kora ploda > mlada kora drveta > stara kora drveta > spoljna braon kora ploda > ježevice. Iako se radi o dva različita kultivara, odnos srži i kore ploda pitomog kestena i lovranskog maruna je sličan (70% : 30%).
2. Primenom spektrofotometrijskih metoda utvrđeno je da ekstrakt rese kalemljenog italijanskog maruna ima najveći sadržaj ukupnih fenola (11,42 %GAE) (ekstragens 50% aceton), dok je najmanji sadržaj dobijen za srž ploda lovranskog maruna (0,11 %GAE) (50% etanol). Najveći sadržaj ukupnih flavonoida je određen za resu pitomog kestena (2,45 %CE), ekstragens 50% aceton, a najmanji 0,02%CE za srž ploda pitomog kestena (50% etanol). Definisan je sledeći redosled sadržaja ukupnih fenola i flavonoida u analiziranim ekstraktima: crvena unutrašnja kora ploda > resa > list > mlada kora drveta > stara kora drveta > spoljna braon kora ploda > ceo plod > ježevice > srž ploda. Najveći sadržaj kondenzovanih tanina je određen u ekstraktu crvene unutrašnje kore ploda lovranskog maruna 27,29 %CE (50% aceton), odnosno 23,93 %CE, kada je 50% etanol primenjen kao ekstragens. Sadržaj kondenzovanih tanina primenom kiselog butanolnog testa je najveći (11,37 %CT) u uzorku crvene unutrašnje kore ploda lovranskog maruna (ekstragens 50% etanol), a kondenzovani tanini nisu detektovani u ekstraktu srži ploda pitomog kestena (50% etanol). Na osnovu rezultata sadržaja kondenzovanih tanina dobija se sledeći redosled ispitivanih ekstrakata (važi za oba ekstragensa): crvena unutrašnja kora ploda > mlada kora drveta > stara kora drveta > spoljna braon kora ploda > ceo plod > ježevice > resa > srž ploda > list.
3. Utvrđena je veoma značajna korelacija ($P < 0,01$) između prinosa suvog ekstrakta i ukupnih fenola, ukupnih fenola i ukupnih flavonoida, kao i kondenzovanih tanina određenih vanilin i kiselim butanolnim testom za ekstrakte dobijene upotrebom oba ekstragensa. Iako je primenom 50% acetona kao ekstragensa dobijen veći sadržaj fenolnih materija, flavonoida i kondenzovanih tanina, za proizvodnju ekstrakata se preporučuje 50% etanol kao ekstragens, jer obezbeđuje sasvim zadovoljavajuće rezultate, a prihvatljiviji je sa aspekata znatno niže toksičnosti. Sva dalja istraživanja su vršena na ekstraktima kestena dobijenim upotrebom 50% etanola kao ekstragensa.

4. Ekstrakt lista lovranskog maruna i rese pitomog kestena roda 2007. godine štite eritrocite od hemolize izazvane H_2O_2 , ali ova zaštita nije izražena, jer je došlo do veoma blage hemolize. Ekstrakti kestena roda 2006. godine ispoljavaju manji kapacitet zaštite.
5. Primenom HPLC/DAD analize najveći sadržaj fenolnih materija je određen za ekstrakt rese pitomog kestena (284,57mg RE/g ekstrakta) odnosno 0,083 %RE. Utvrđena je jako značajna korelacija ($r = 0,989$) između rezultata HPLC/DAD metode za određivanje ukupnih fenola i spektrofotometrijske metode za određivanje ukupnih fenola (FC) metod, što pokazuje da je FC metod pogodan za analizu fenolnih materija ekstrakata kestena. Kvalitativnom i kvantitativnom analizom hidrolizata *C. sativa* dobijenog nakon metanolizacije ekstrakata, metodama LC/MS i HPLC/DAD analize, identifikovana su: elaginska kiselina i njeni derivati, jedinjena sa flavonoidnom strukturom, kao i metil ester *p*-kumarne kiseline. Glavne komponente hidrolizata nakon metanolizacije su dimetil ester dehidrodigalne kiseline i metil ester dilaktona elaginske i valoneinske kiseline. Kvantitativnom HPLC/DAD analizom najveći sadržaj elagitanina je utvrđen za ekstrakt ježevica (170,6 mg/g ekstrakta). Derivati elagitanina imaju dugu postojanost unutar tela, delujući sa prolongiranim antioksidativnim efektom. Ova činjenica ukazuje da elagitanini iz ekstrakata *C. sativa* predstavljaju značajne komponente u ishrani kod patofizioloških stanja povezanih sa antioksidativnim stresom.
6. Najveća antioksidativna aktivnost u odnosu na 1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikale (AA = 37,50%) je dobijena za ekstrakt rese pitomog kestena, kod koga je određen i visok sadržaj ukupnih fenolnih komponenti (3,28 %GAE). Antioksidativna aktivnost u odnosu na DPPH radikale je visoka za ekstrakt spoljne braon kore lovranskog maruna (AA = 36,52%) i lista kalemljenog italijanskog maruna (AA = 29,96%). Ceo plod kestena i srž ploda nisu ispoljili antioksidativnu aktivnost. Dobijene vrednosti za antioksidativnu aktivnost srži, ploda i spoljne braon kore su povezane sa sastavom ploda pitomog kestena, gde srž ploda učestvuje sa 69,90%, a spoljna braon kora sa 24,41%. Utvrđena je značajna korelacija ($P < 0,05$) između sadržaja fenola i DPPH aktivnosti. Ekstrakt stare kore drveta kestena ispoljava najveću "skevendžing" radikalnu aktivnost u odnosu na hidroksi ($\dot{O}H$) radikale (AA = 68,18%). Visoka "skevendžing" aktivnost utvrđena je za resu kalemljenog italijanskog maruna (AA = 59,09%) i spoljnu braon koru lovranskog maruna (AA = 56,36%). Antioksidativna aktivnost za ekstrakt srži kestena je jednaka 0, a niska vrednost je određena za ceo plod kestena (AA = 5,45%). Veoma značajna korelacija ($P < 0,01$) je utvrđena između sadržaja flavonoida i OH antioksidativne aktivnosti, dok je između sadržaja fenola i OH antioksidativne aktivnosti određena značajna korelacija.
7. Svi analizirani ekstrakti ispoljavaju signifikantnu antioksidativnu aktivnost u odnosu na uklanjanje superoksidnih anjon (\dot{O}_2^-) radikala, a kao najefikasniji su se pokazali ekstrakti lista (RI = 86) i rese kalemljenog italijanskog maruna (RI = 85), kao i lista lovranskog maruna (RI = 80) i ježevica (RI = 79). Najmanja antioksidativna aktivnost u odnosu na superoksid anjon radikale je određena za ekstrakt celog ploda lovranskog maruna (RI = 20). Redosled relativne inhibicije (RI) aktivnosti ispitivanih ekstrakata u odnosu na \dot{O}_2^- radikale je sledeći: resa >

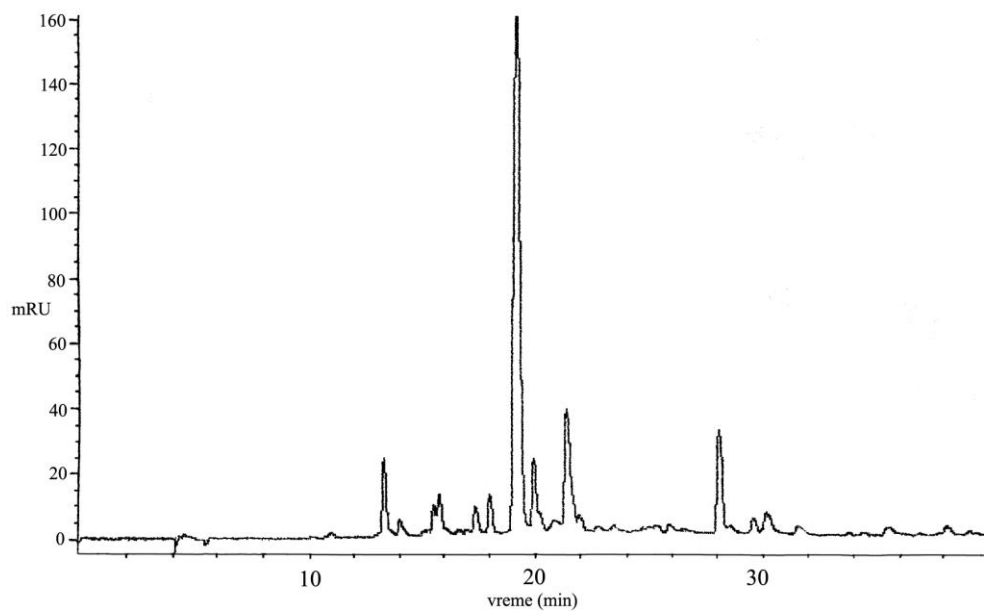
list > ježevica > stara kora drveta > spoljna braon kora ploda > mlada kora drveta > crvena unutrašnja kora ploda > srž ploda > ceo plod. Ispitivanjem kapaciteta ekstrakata za uklanjanje lipidne peroksidacije utvrđeno je da većina ispitivanih ekstrakata ispoljava aktivnost. Ekstrakt mlade kore drveta i celog ploda pitomog kestena izaziva signifikantno smanjenje membranske fluidnosti kod lipozoma koji nisu tretirani u Fenton-ovoj reakciji, dok ekstrakti celog ploda lovranskog maruna, crvene unutrašnje kore i spoljne braon kore ploda lovranskog maruna izazivaju smanjenje koje nije tako izrazito. Ekstrakti rese pitomog kestena, celog ploda i srži lovranskog maruna ne ispoljavaju sposobnost zaštite lipozoma od peroksidacije.

8. Kapacitet ekstrakata za transformaciju organskih hidrofilnih radikala, ispitan kao sposobnost redukcije spin probe Tempon-a je najveći za ekstrakt rese pitomog kestena ($A = 18,10\%$) i spoljnu braon koru lovranskog maruna ($A = 12,60\%$). Ekstrakti lista pitomog kestena i mlade kore drveta imaju veoma malu aktivnost. U pogledu kapaciteta za transformaciju organskih hidrofilnih radikala (Tempon), ustanovljen je sledeći redosled aktivnosti analiziranih ekstrakata: resa > spoljna braon kora ploda > crvena unutrašnja kora ploda > ježevica > stara kora drveta > list > srž ploda > ceo plod > mlada kora drveta. Ispitivanje protektivnog delovanja ekstrakata u odnosu na UV zračenje određeno je kao sposobnost uklanjanja $\cdot\text{OH}$ i $\cdot\text{O}_2^-$ radikala nastalih nakon zračenja. Ekstrakti koji ispoljavaju pozitivne, ali relativno niske RI vrednosti za proizvodnju obe vrste radikala $\cdot\text{OH}$ i $\cdot\text{O}_2^-$ su spoljna braon kora lovranskog maruna ($\text{RI}(\cdot\text{OH}) = 21$; $\text{RI}(\cdot\text{O}_2^-) = 12$), resa sa kalemljenog italijanskog maruna ($\text{RI}(\cdot\text{OH}) = 29$; $\text{RI}(\cdot\text{O}_2^-) = 12$), kao i list lovranskog maruna ($\text{RI}(\cdot\text{OH}) = 21$; $\text{RI}(\cdot\text{O}_2^-) = 25$). Negativne RI vrednosti dobijene za ostale ekstrakte ukazuju na prooksidativnu aktivnost u vodenom rastvoru izloženom UV zračenju. Na osnovu prooksidativne aktivnosti, kao i slabe antioksidativne aktivnosti navedenih ekstrakata sa pozitivnim vrednostima RI u odnosu na oba ispitana radikala, može se zaključiti da se ispitivani ekstrakti *C. sativa* ne mogu koristiti u cilju UV zaštite.
9. Ekstrakti rese, lista i ježevica ispoljavaju aktivnost u cilju preveniranja/otklanjanja lipidne peroksidacije membrane eritrocita, jer dobijena razlika između parametra reda S za netretirane eritrocite i eritrocite tretirane sa H_2O_2 nije statistički značajna. Efluks K^+ nije statistički značajan u slučaju eritrocita izloženih H_2O_2 u prisustvu ekstrakata rese kalemljenog italijanskog maruna, kao i za sva tri ekstrakta kestena (rese i lista) roda 2007. god. To ukazuje da ovi ekstrakti poseduju sposobnost zaštite membrane eritrocita. Ekstrakt ježevica daje manju vrednost efluksa kalijuma u odnosu na kontrolu, pa ne obezbeđuje zaštitu eritrocita.
10. Ispitivanjem *in vitro* antioksidativne aktivnosti primenom MTT testa je utvrđeno da ekstrakti rese i ježevica pitomog kestena, kao i lista lovranskog maruna imaju izuzetno visoku antioksidativnu aktivnost u ćeliji. Naročito je povoljna činjenica da su delotvorni u niskim koncentracijama (oko $0,02 \text{ mg/ml}$). Ekstrakti rese pitomog kestena i lista lovranskog maruna su slični po antioksidativnom kapacitetu i za nijansu bolji od ekstrakta ježevica.

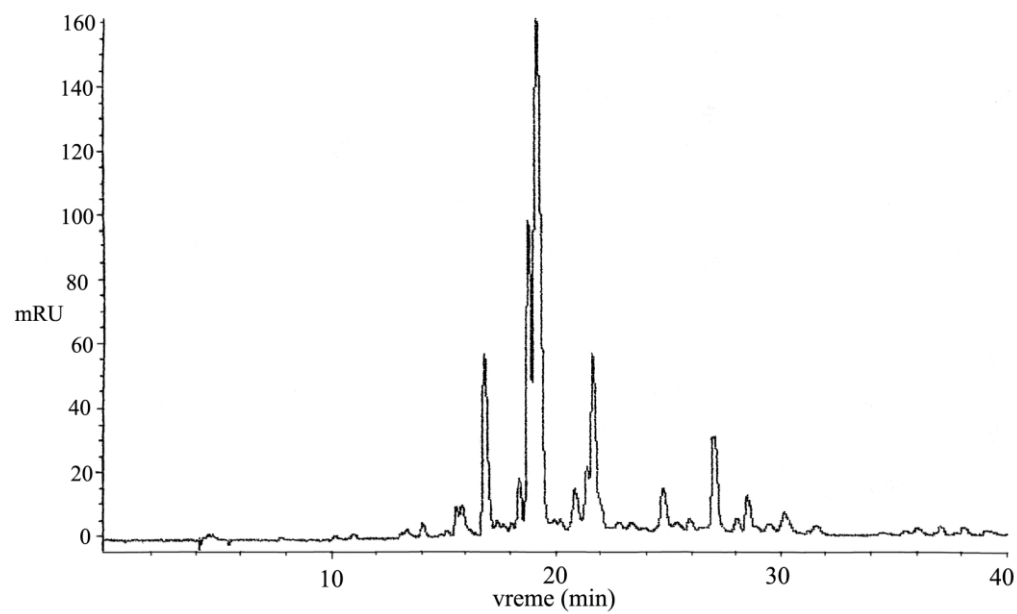
11. Antimikrobna aktivnost ekstrakata *C. sativa* određena je u odnosu na (G+) bakterije: *S. aureus*, *S. lutea*, *B. cereus*, *L. lactis ssp. lactis*, *M. pyrogenes var. albus*, kao i na (G-) bakterije: *P. mirabilis* i *S. typhimurium*. Najveću antimikrobnu aktivnost ispoljavaju ekstrakti rese i lista, koji imaju i visok sadržaj fenola i flavonoida. Značajnu antimikrobnu aktivnost daju ekstrakti kore drveta, ježevica i spoljne braon kore ploda. Ekstrakti srži ploda i celog ploda nisu ispoljili antimikrobnu aktivnost. Postoji značajna i jako značajna korelacija između antimikrobne aktivnosti ekstrakata, kao i antimikrobne i antioksidativne aktivnosti u odnosu na superoksid anjon radikale.
12. Ekstrakti lista, ježevica, spoljne braon i unutrašnje crvene kore ploda, kao i kore drveta *C. sativa* Mill. dobijeni primenom 50% etanola kao ekstragensa predstavljaju značajan izvor komponenata sa farmakološkim delovanjem u cilju smanjenja nivoa oksidativnog stresa, poseduju visok kapacitet sprečavanja lipidne peroksidacije, deluju u pravcu preveniranja/otklanjanja lipidne peroksidacije i zaštite membrane eritrocita, imaju visoku *in vitro* antioksidativnu aktivnost, a ispoljavaju i značajnu antimikrobnu aktivnost.

6. PRILOG

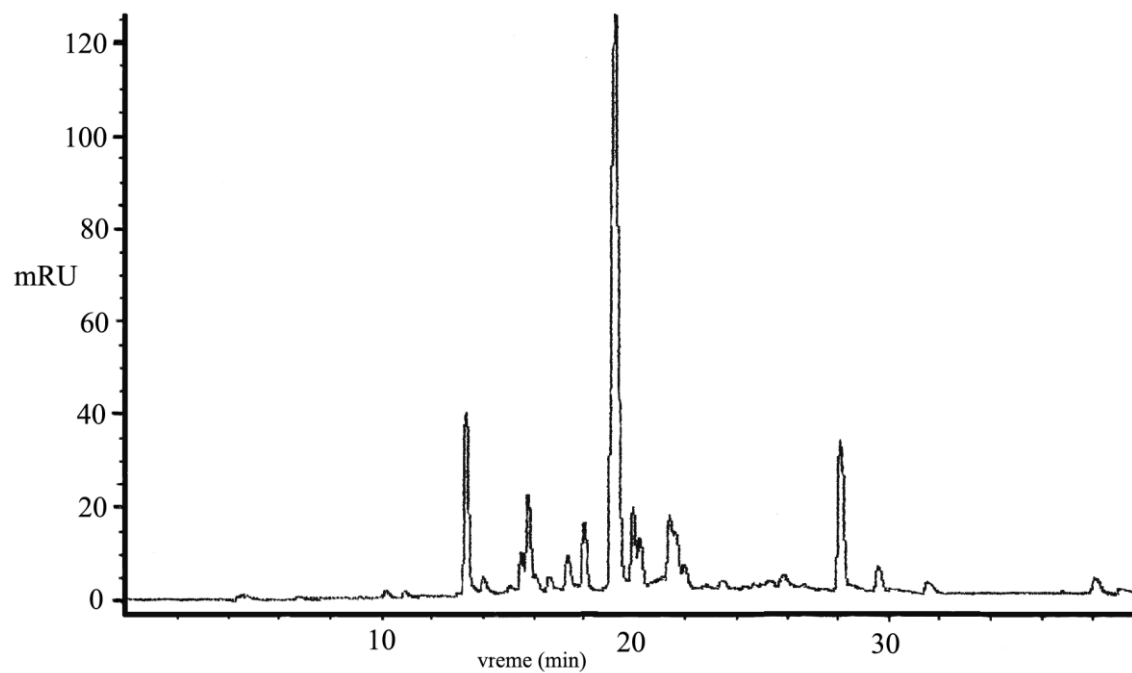
6.1. HPLC/DAD HROMATOGRAMI EKSTRAKATA KESTENA



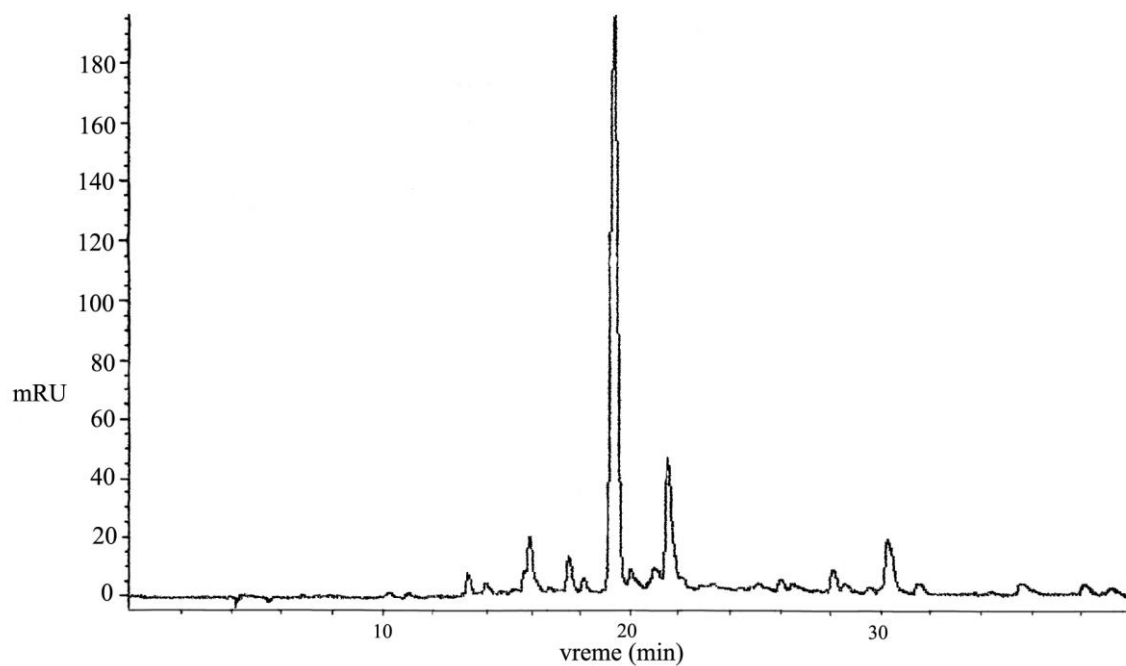
Slika P1a. List pitomog kestena



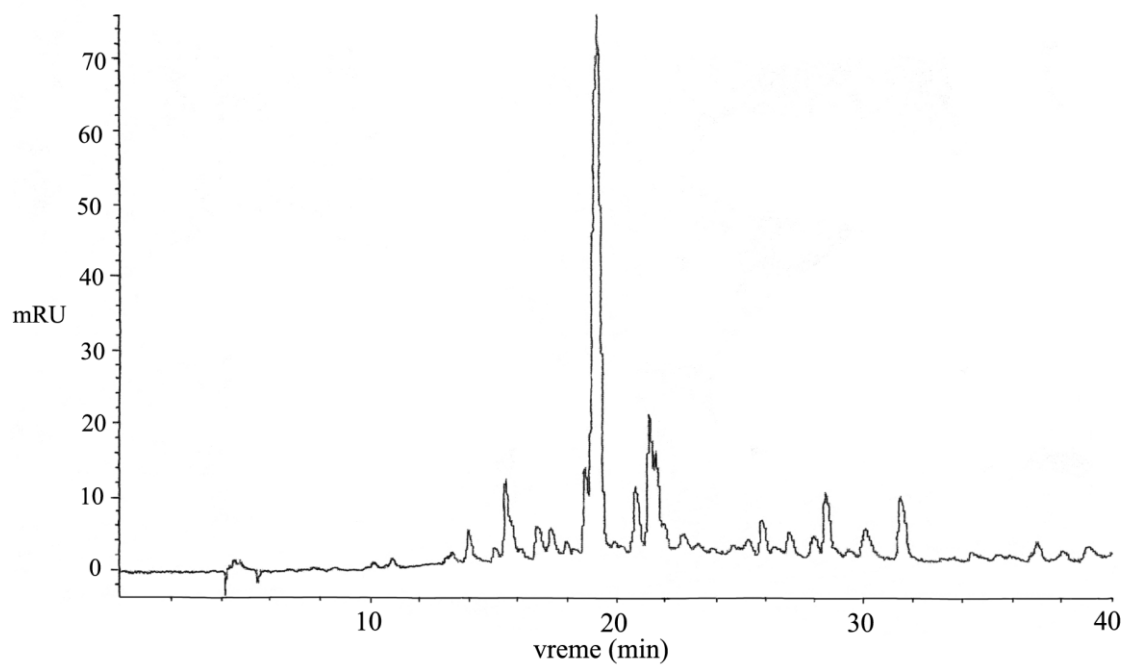
Slika P1b. Resa pitomog kestena



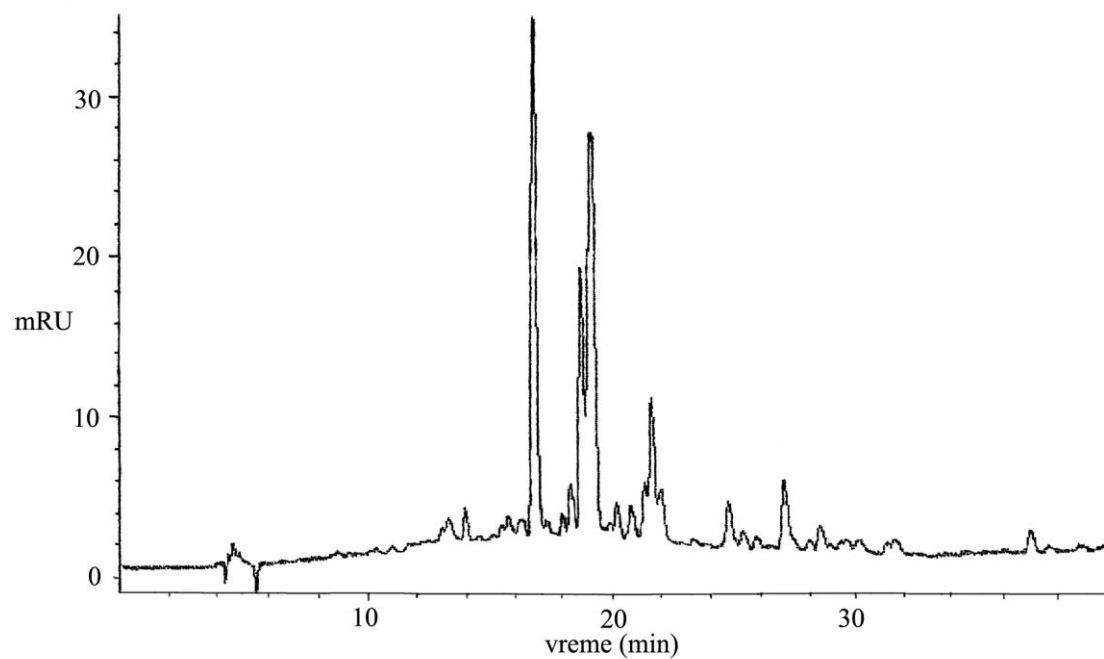
Slika P1c. List lovranskog maruna



Slika P1d. List kalemljenog italijanskog maruna



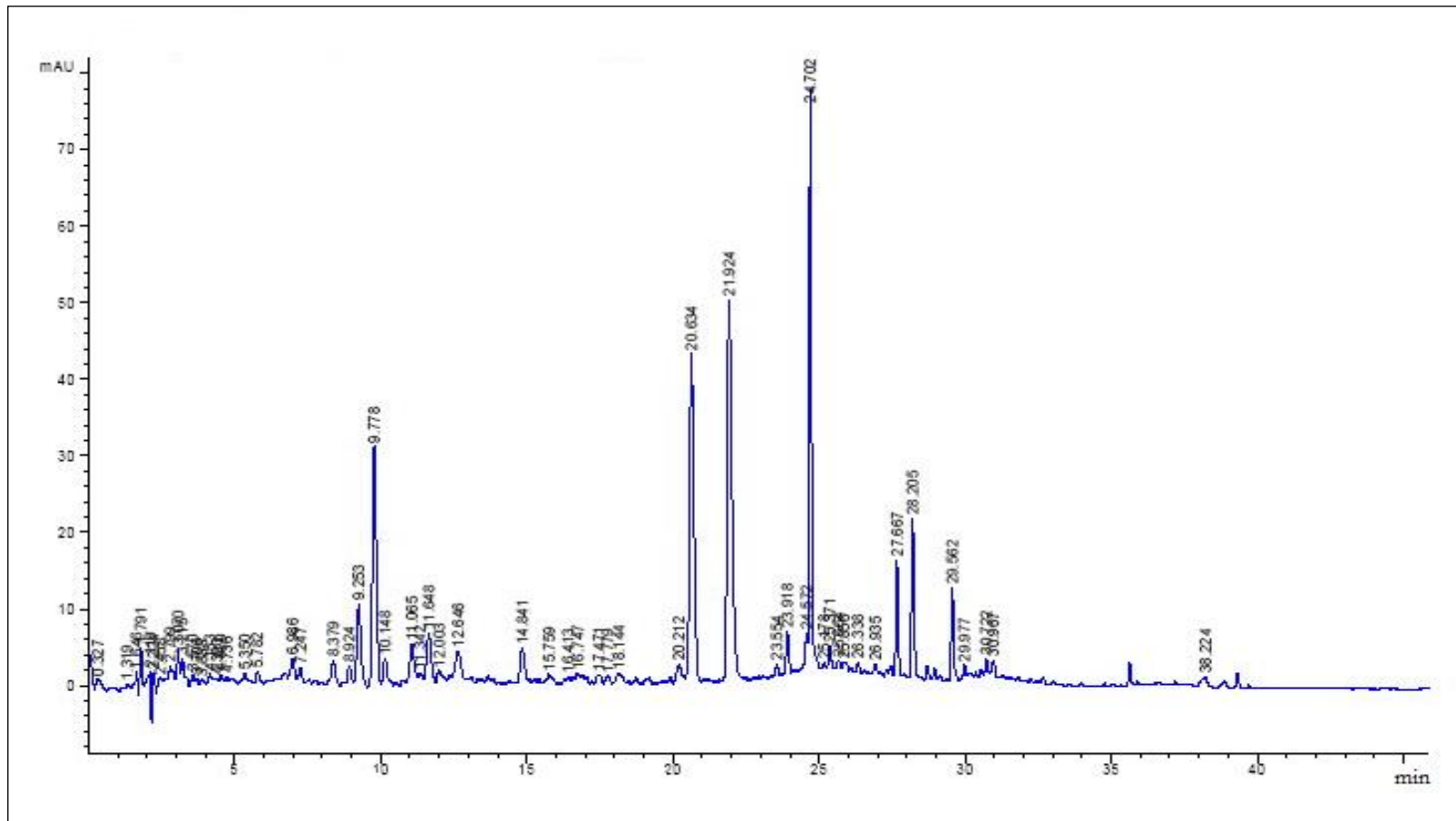
Slika P1e. Resa kalemljenog italijanskog maruna



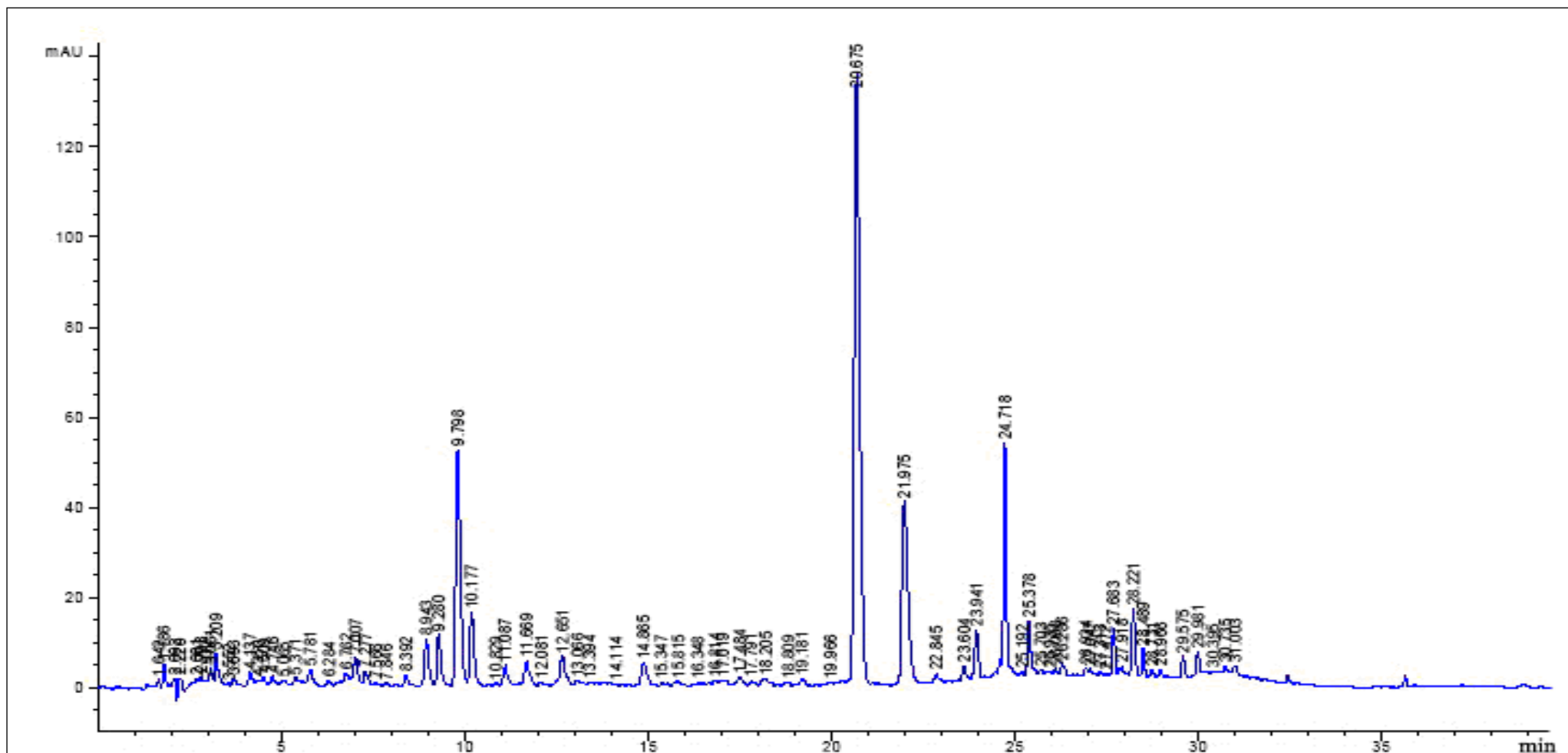
Slika P1f. Resa pitomog kestena (bez hidrolize)

Slika P1. HPLC/DAD hromatogrami ekstrakata

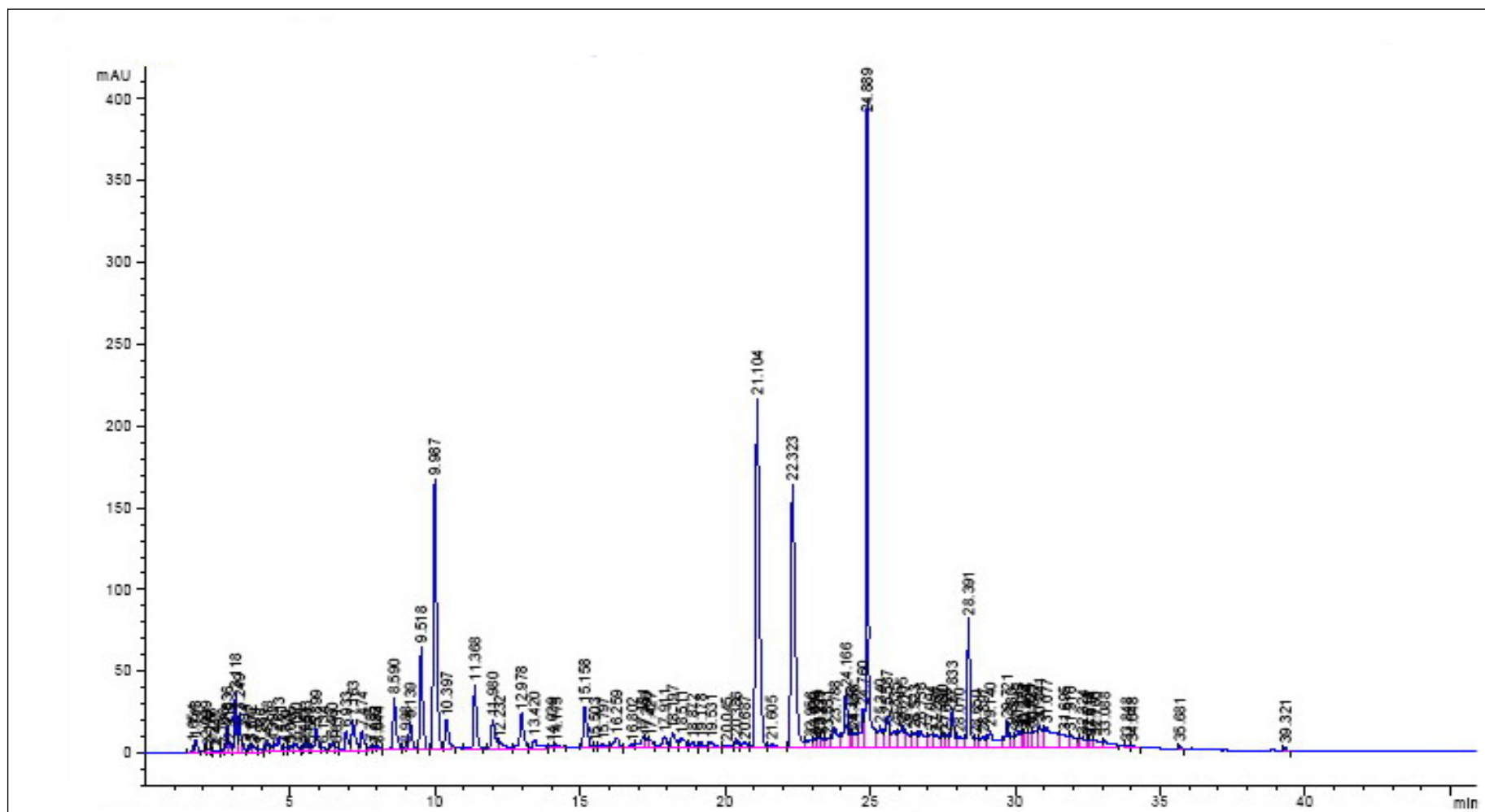
6.2. HPLC/MS HROMATOGRAMI EKSTRAKATA KESTENA



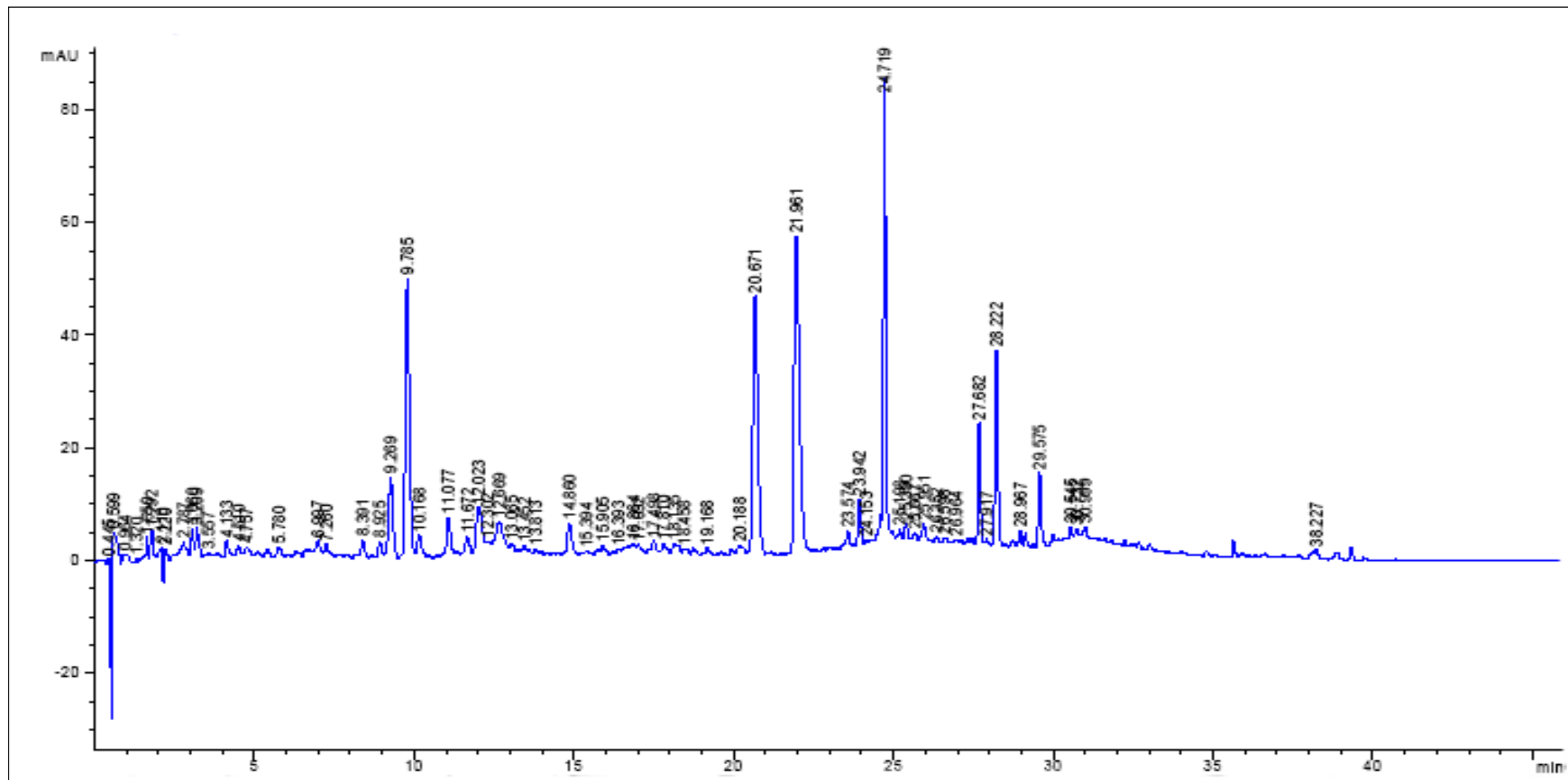
Slika P2a. List pitomog kestena (rod 2006. godine)



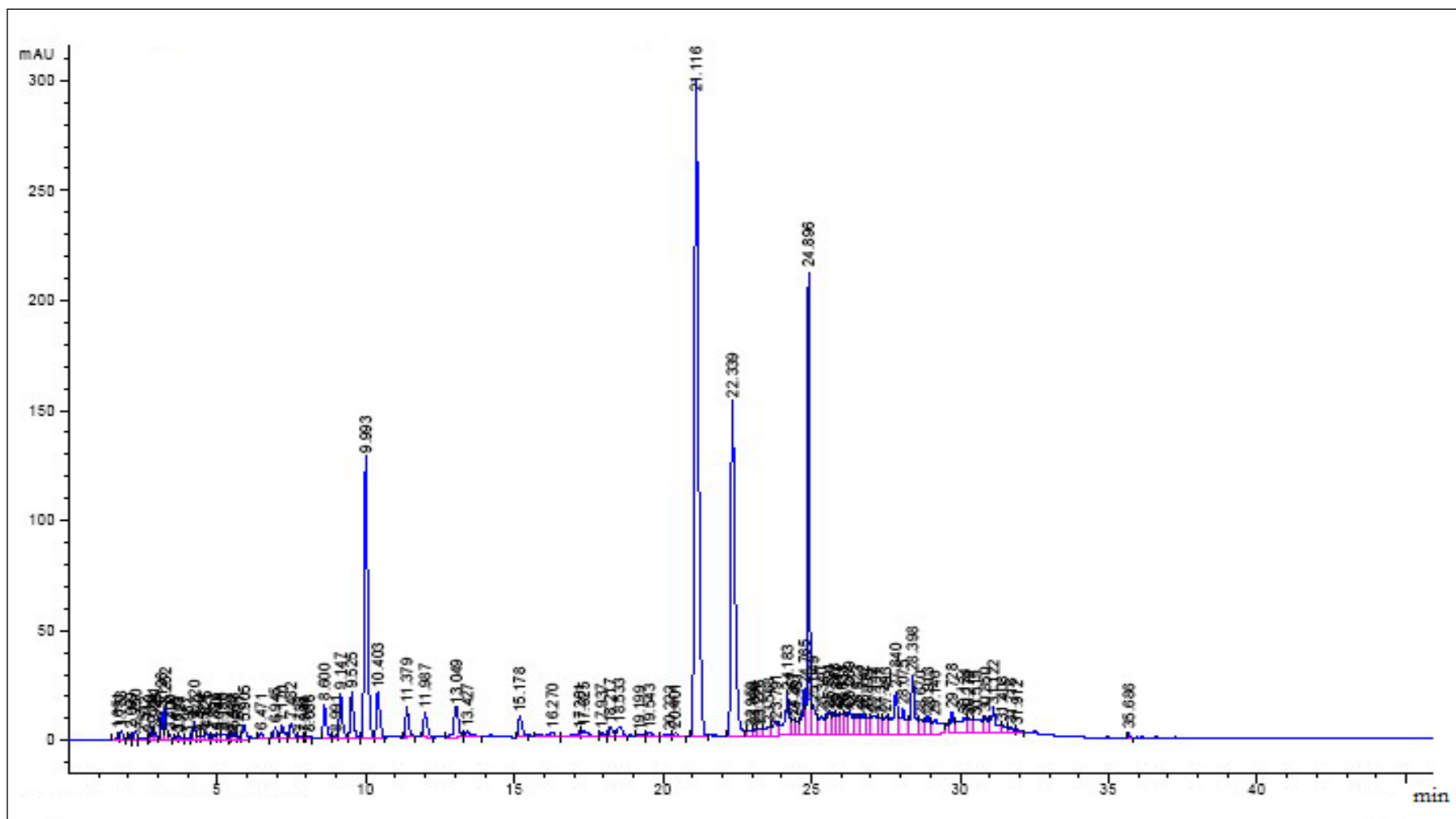
Slika P2b. Resa pitomog kestena (rod 2006. godine)



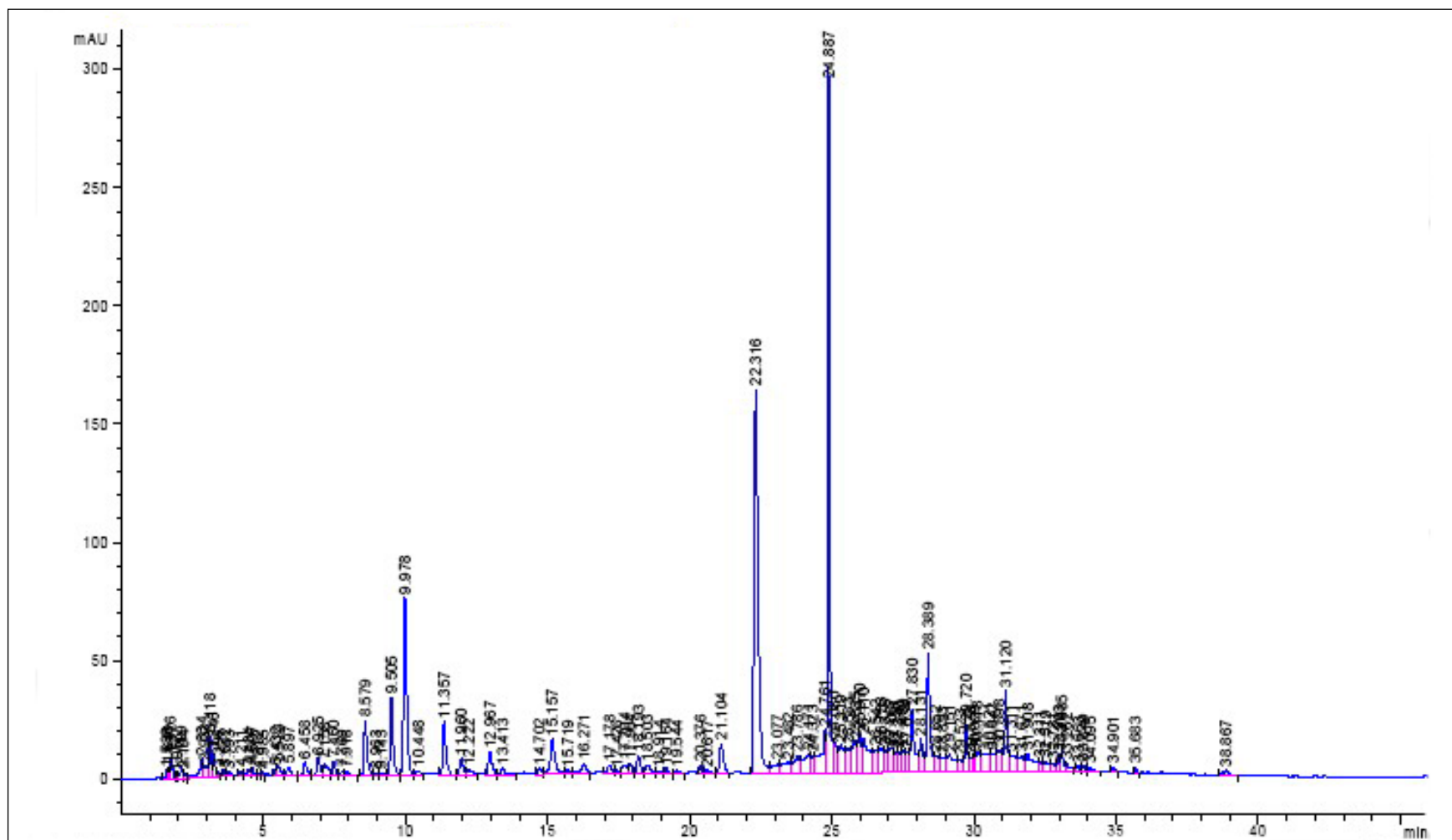
Slika P2c. List lovranskog maruna (rod 2006. godine)

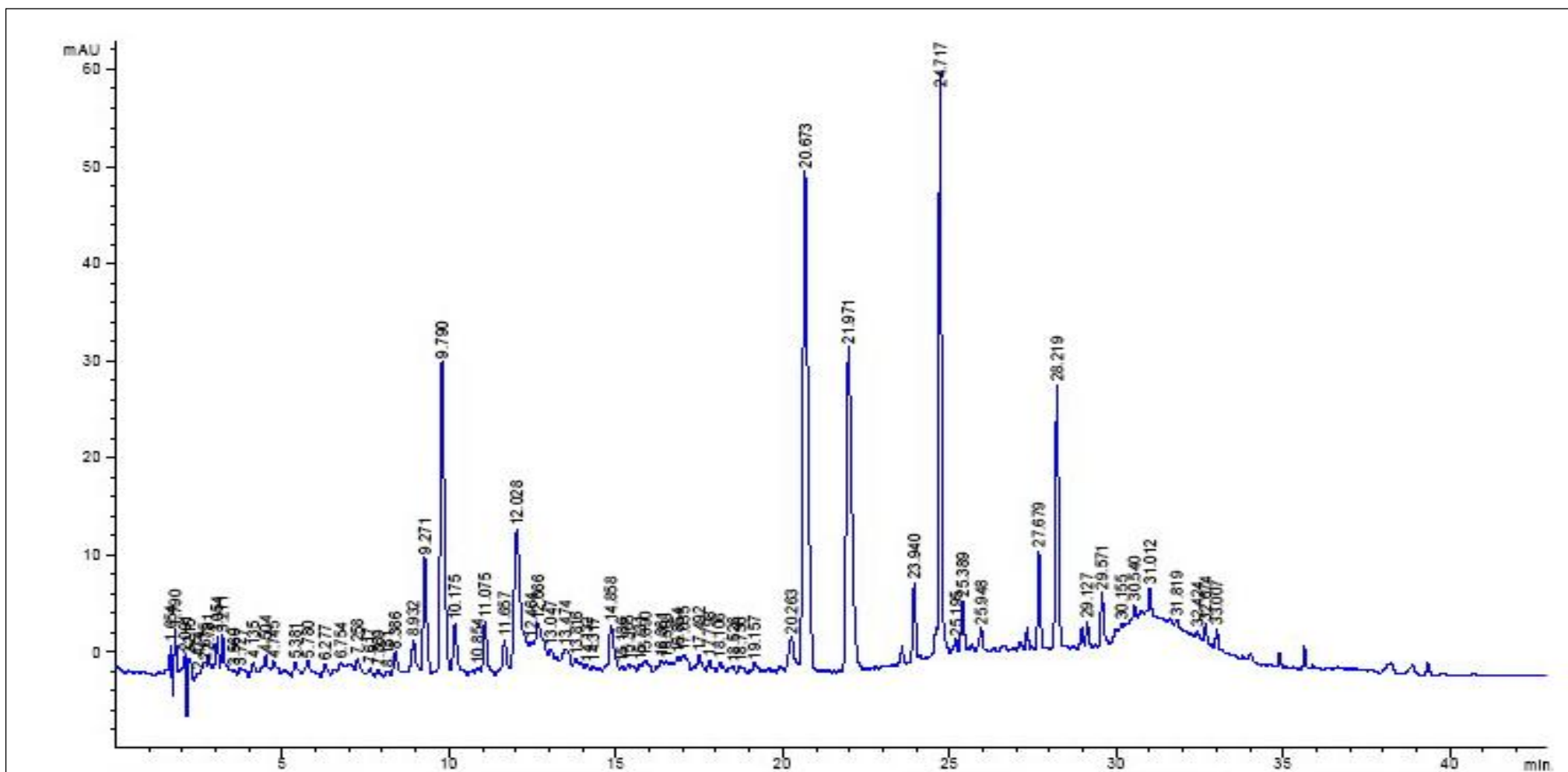


Slika P2d. List kalemljenog italijanskog maruna (rod 2006. godine)

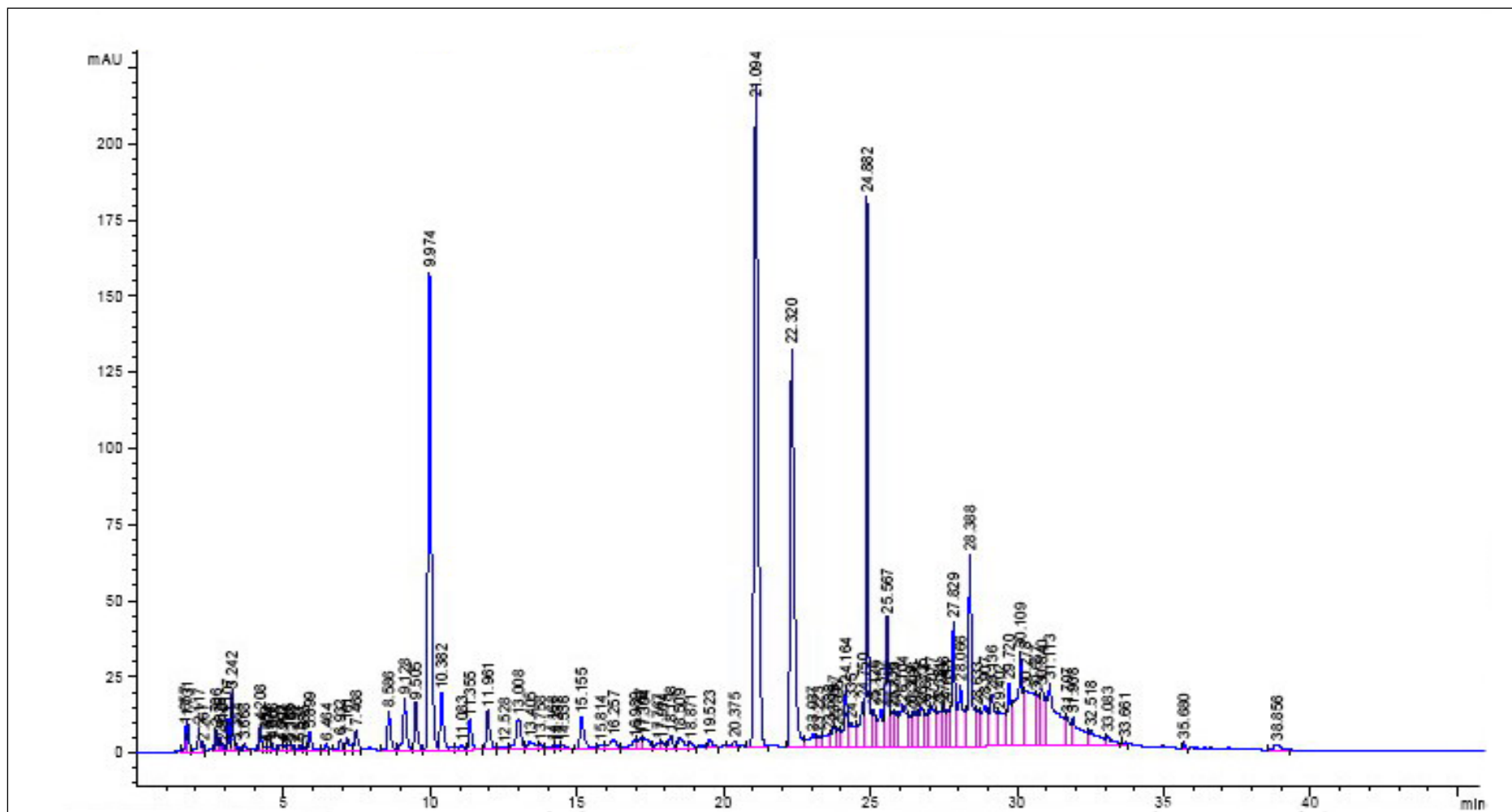


Slika P2e. Resa kalemljenog italijanskog maruna (rod 2006. godine)

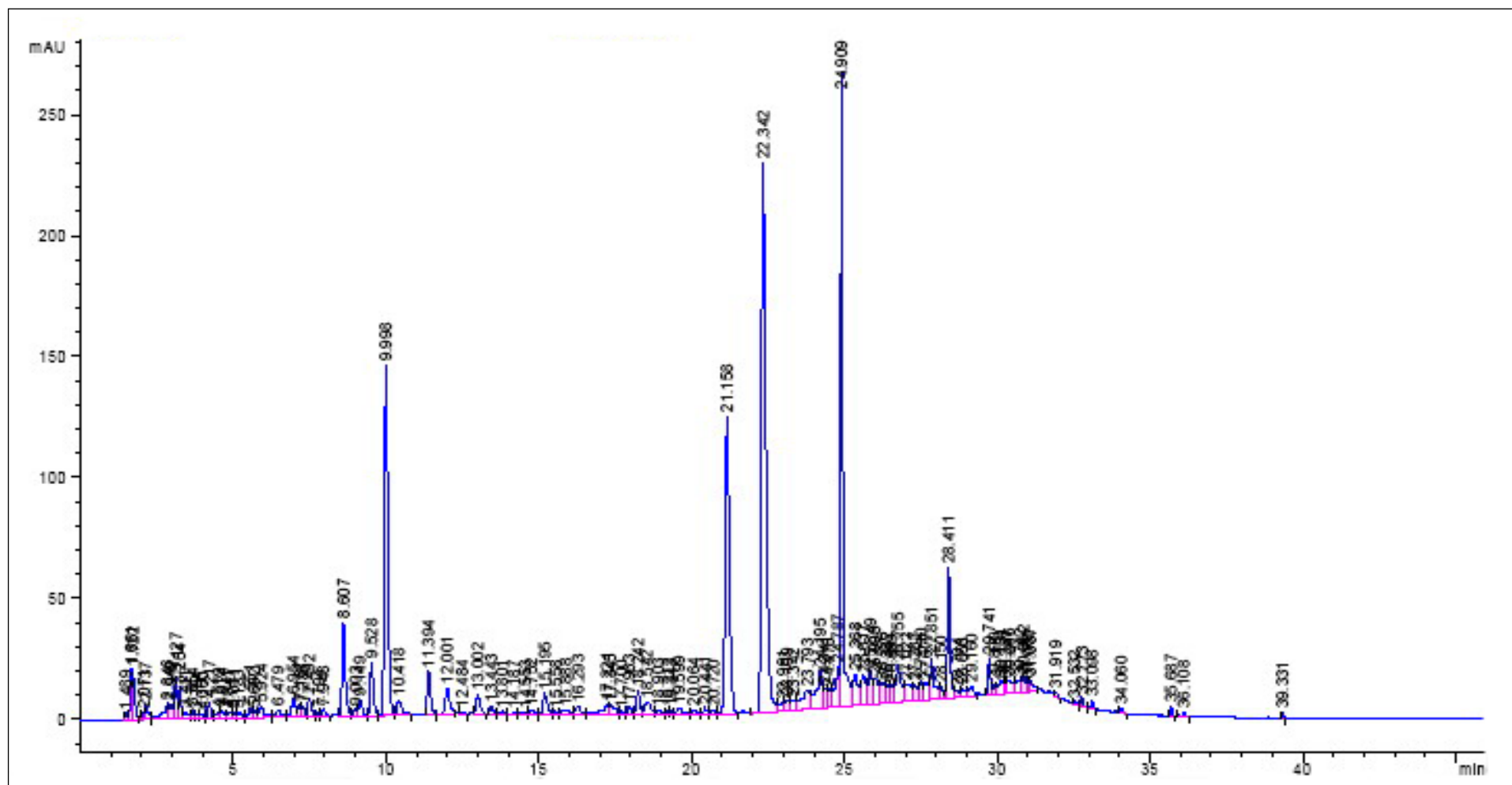




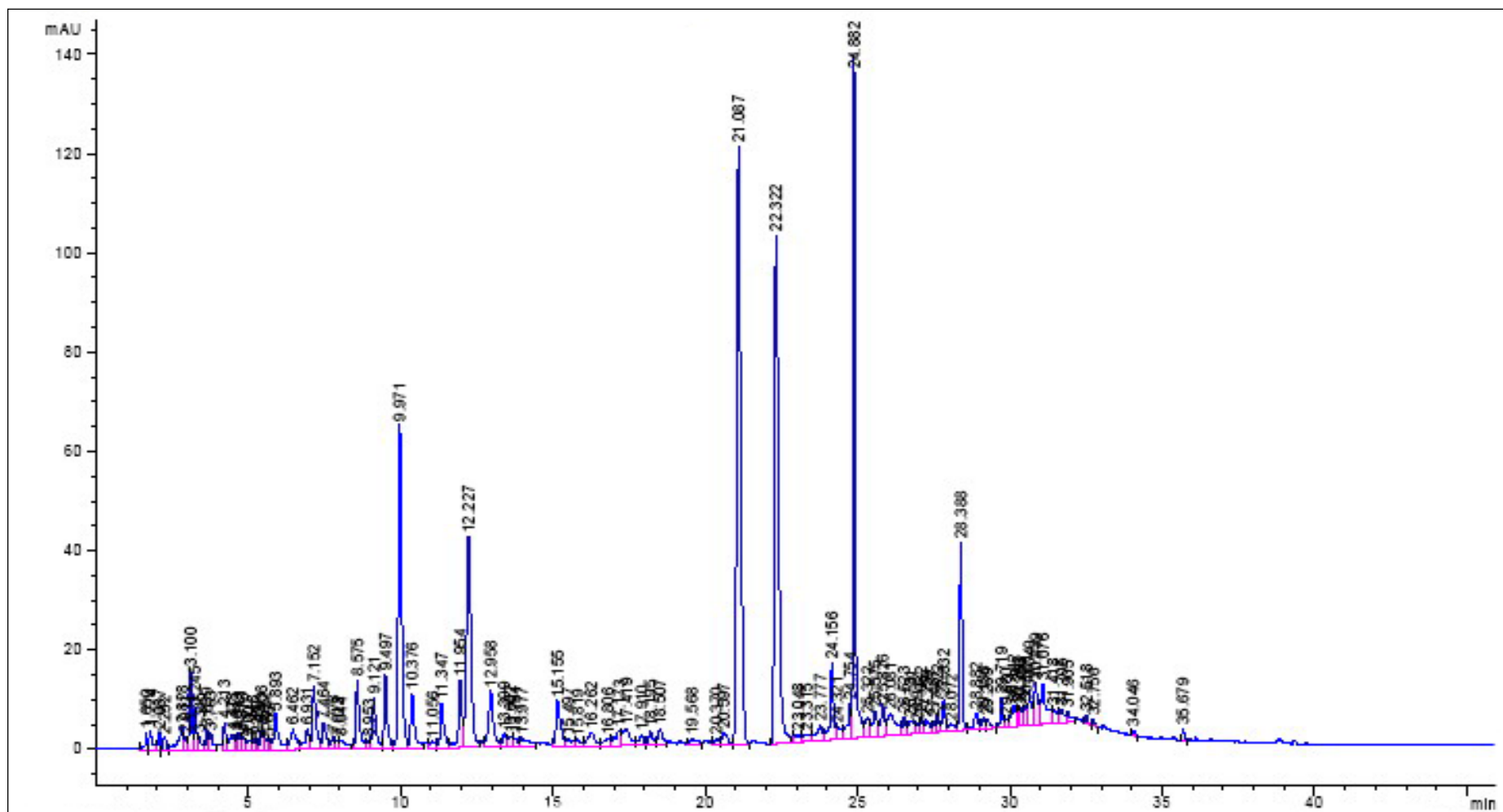
Slika P2g. List pitomog kestena (rod 2007. godine)



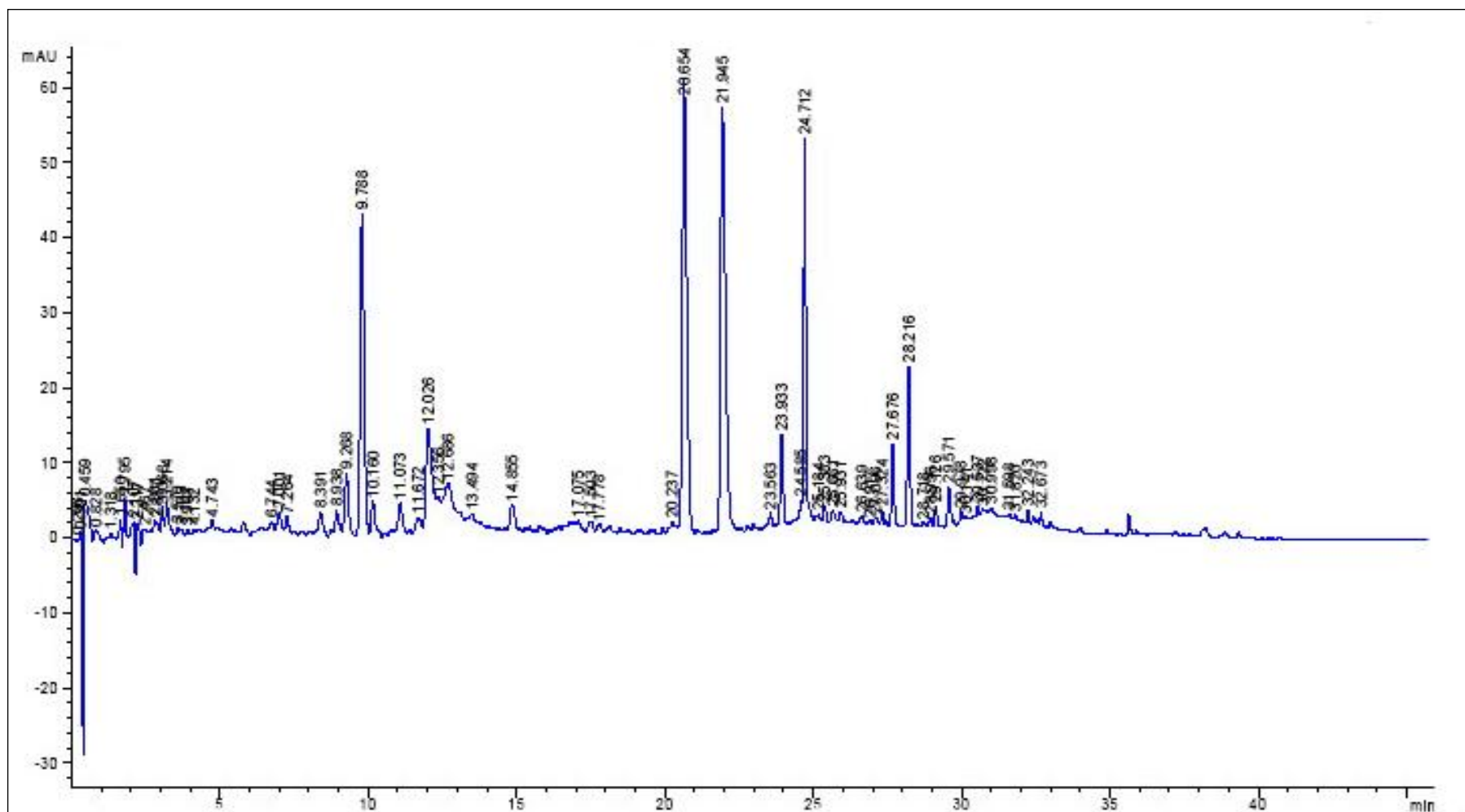
Slika P2h. Resa pitomog kestena (rod 2007. godine)



Slika P2i. List lovranskog maruna (rod 2007. godine)



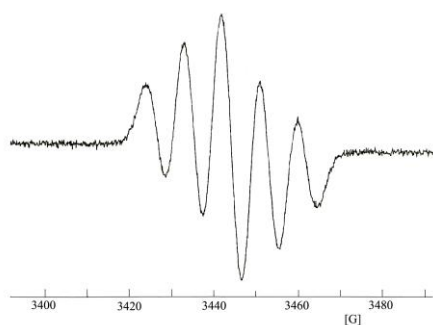
Slika P2j. Resa lovranskog maruna (rod 2007. godine)



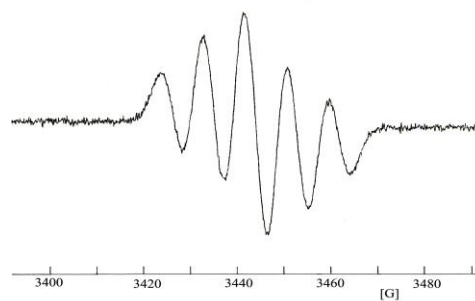
Slika P2k. List kalemljenog pitomog kestena (rod 2007. godine)

Slika P2. HPLC/MS hromatogrami ekstrakata

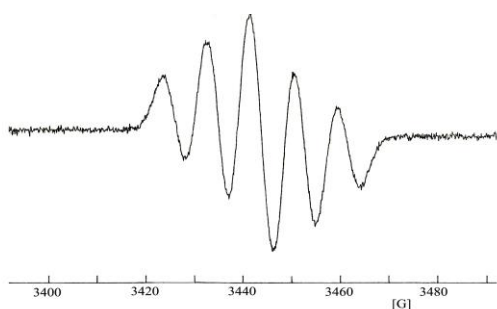
6.3. EPR SPEKTRI TRANSFORMACIJE DPPH RADIKALA



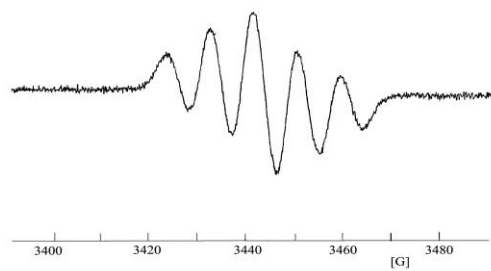
Slika P3a. Uzorak bez dodavanja ekstrakta (slepa proba)



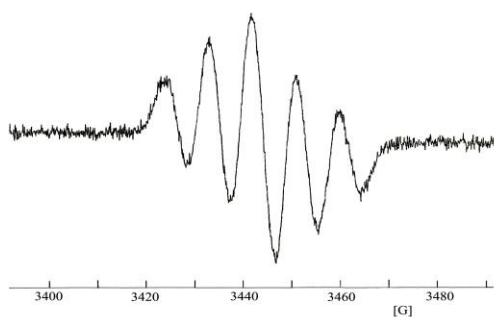
Slika P3b. Ekstrakt celog ploda pitomog kestena



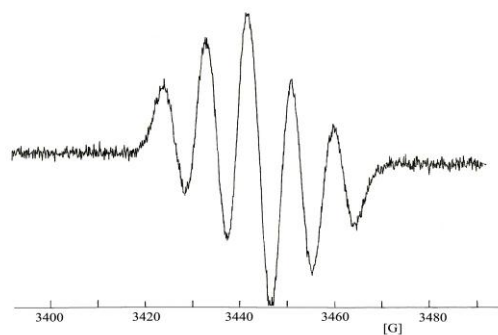
Slika P3c. Ekstrakt srži ploda ploda pitomog kestena



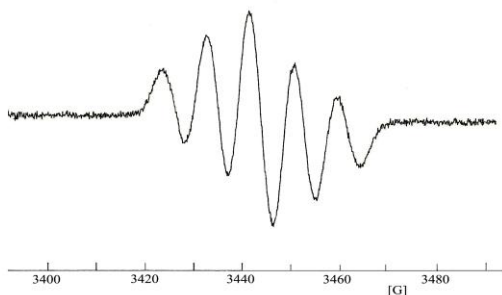
Slika P3d. Ekstrakt spoljne braon kore ploda pitomog kestena



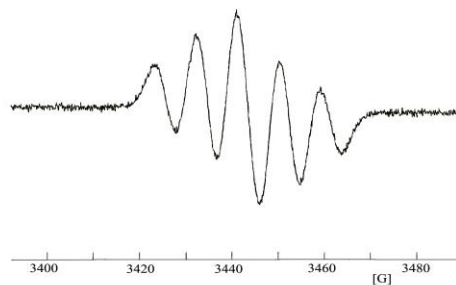
Slika P3e. Ekstrakt rese pitomog kestena



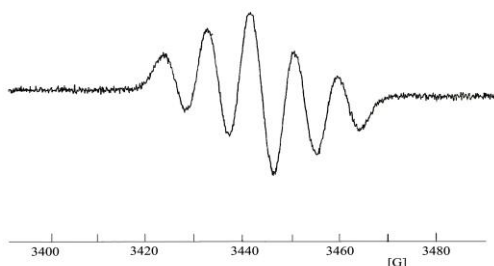
Slika P3f. Ekstrakt lista pitomog kestena



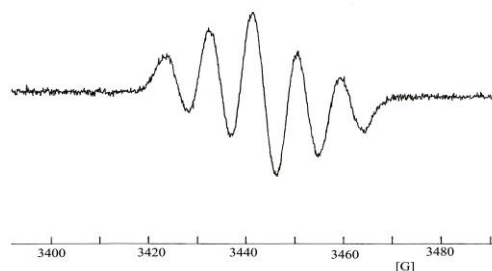
Slika P3g. Ekstrakt stare kore drveta



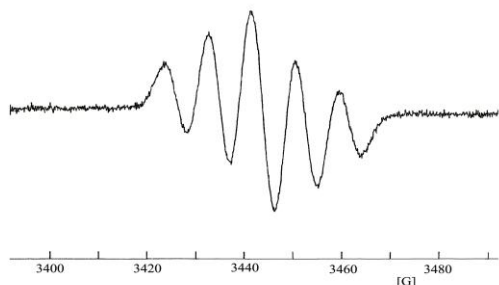
Slika P3h. Ekstrakt ježevica



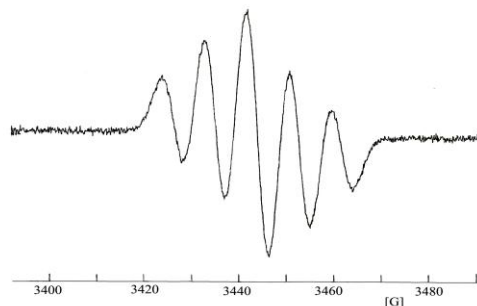
Slika P3. Ekstrakt spoljne braon kore ploda lovranskog maruna



Slika P3j. Ekstrakt lista kore ploda lovranskog maruna



Slika P3k. Ekstrakt lista kalemljenog italijanskog maruna

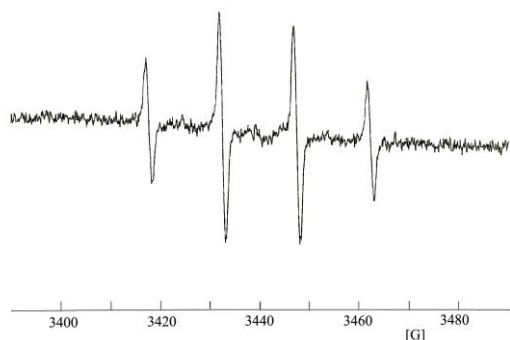


Slika P3l. Ekstrakt rese kalemljenog italijanskog maruna

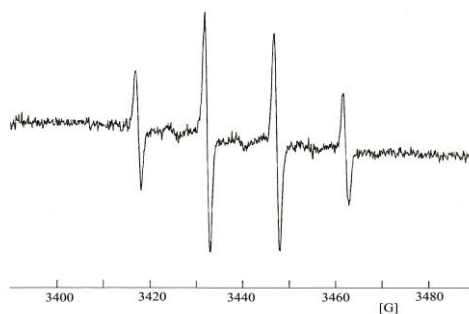
Slika P3. EPR spektar DPPH radikala

Na slici P3a je prikazan EPR spektar DPPH radikala uzorka bez dodavanja ekstrakta (slepa proba). Na slikama P3b-l su prikazani EPR spektri DPPH radikala identični slepoj probi kojima su dodati uzorci ekstrakta *C. sativa*.

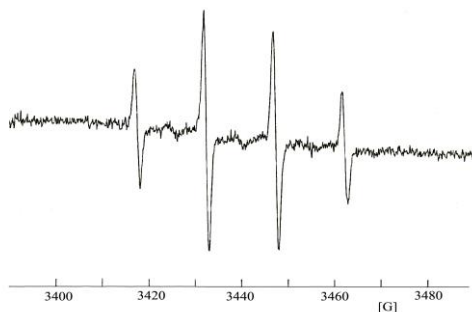
6.4. EPR SPEKTRI TRANSFORMACIJE HIDROKSI RADIKALA



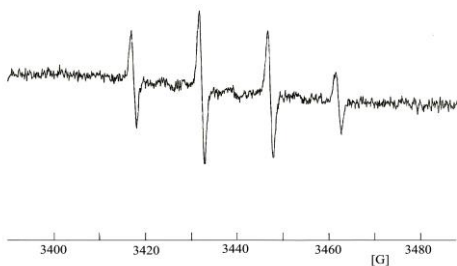
Slika P4a. Uzorak bez dodavanja ekstrakta (slepa proba)



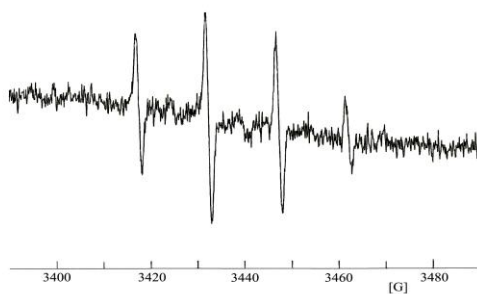
Slika P4b. Ekstrakt celog ploda pitomog kestena



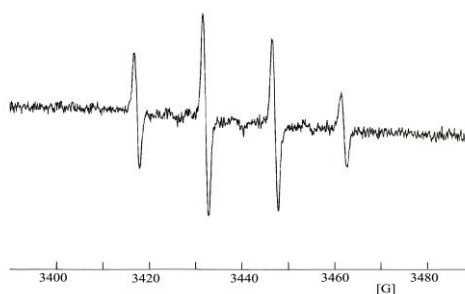
Slika P4c. Ekstrakt srži ploda pitomog kestena



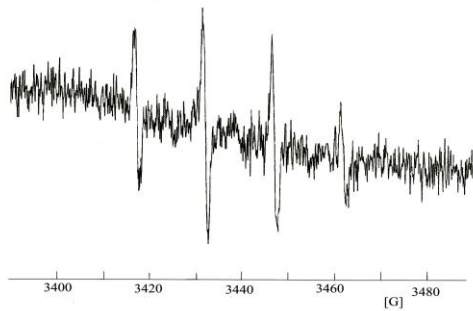
Slika P4d. Ekstrakt spoljne braon kore ploda pitomog kestena



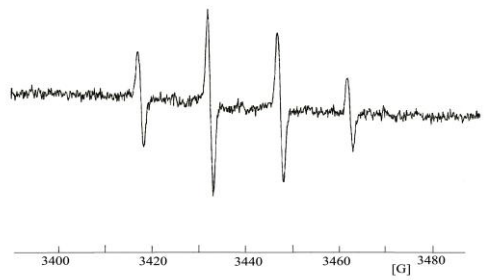
Slika P4e. Ekstrakt rese pitomog kestena



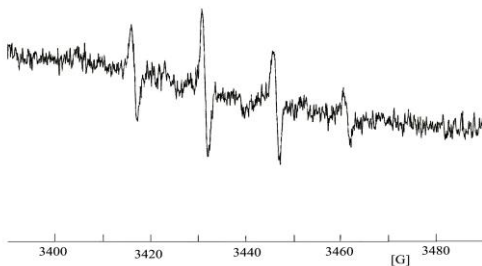
Slika P4f. Ekstrakt lista pitomog kestena



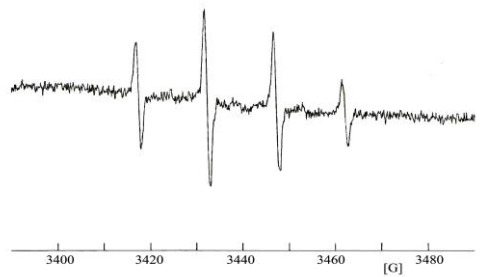
Slika P4g. Ekstrakt stare kore drveta



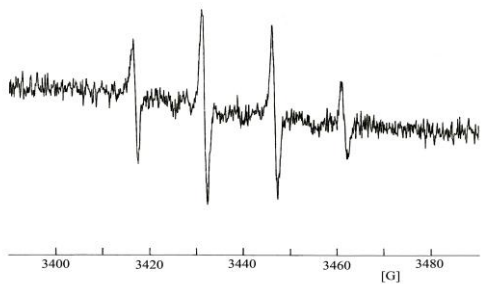
Slika P4h. Ekstrakt ježevica



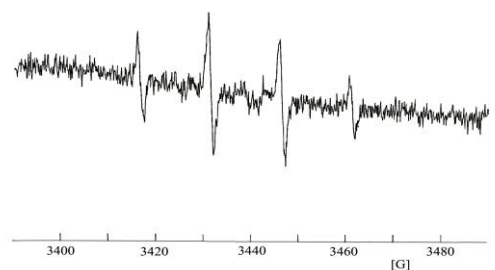
Slika P4i. Ekstrakt spoljne braon kore ploda lovranskog maruna



Slika P4j. Ekstrakt lista lovranskog maruna

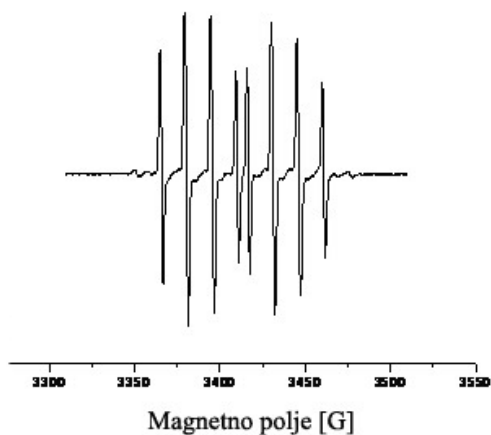


Slika P4k. Ekstrakt lista kalemljenog italijanskog maruna

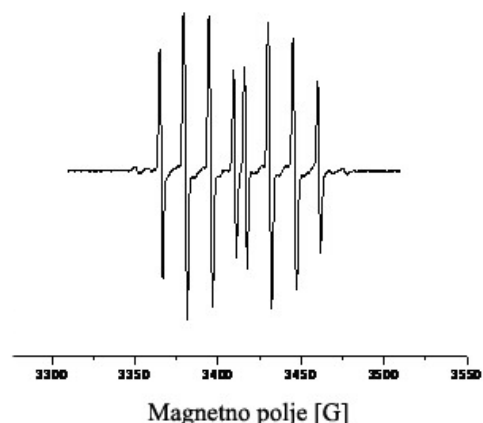


Slika P4l. Ekstrakt rese kalemljenog italijanskog maruna

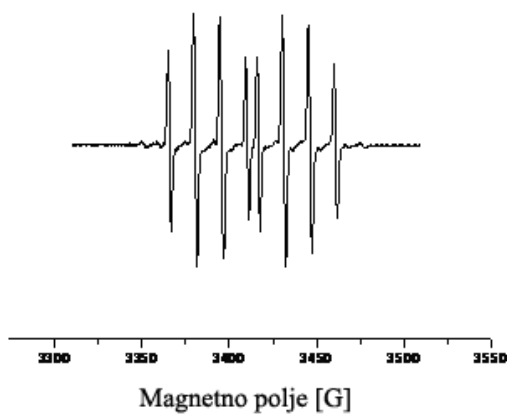
Slika P4. EPR spektar DMPO-OH spin adukta (rod 2006. godine) (aparati I)



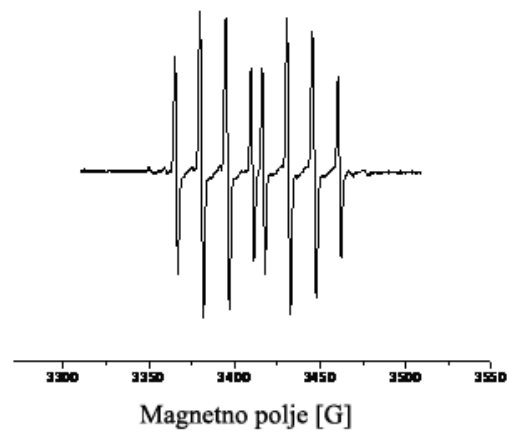
Slika P5a. Uzorak bez dodavanja ekstrakta (slepa proba)



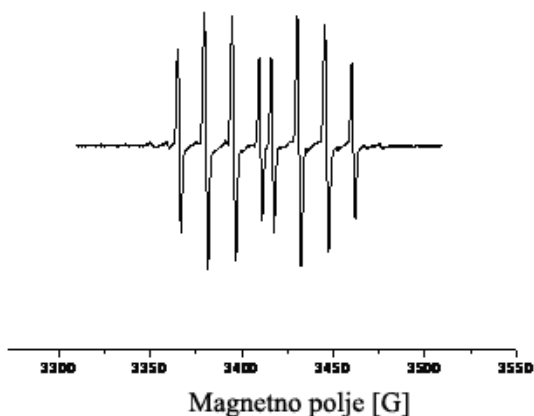
Slika P5b. Ekstrakt lista kalemljenog italijanskog maruna



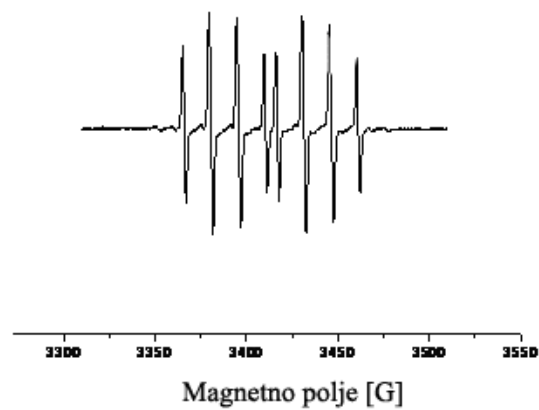
Slika P5c. Ekstrakt reše pitomog kestena



Slika P5d. Ekstrakt lista pitomog kestena



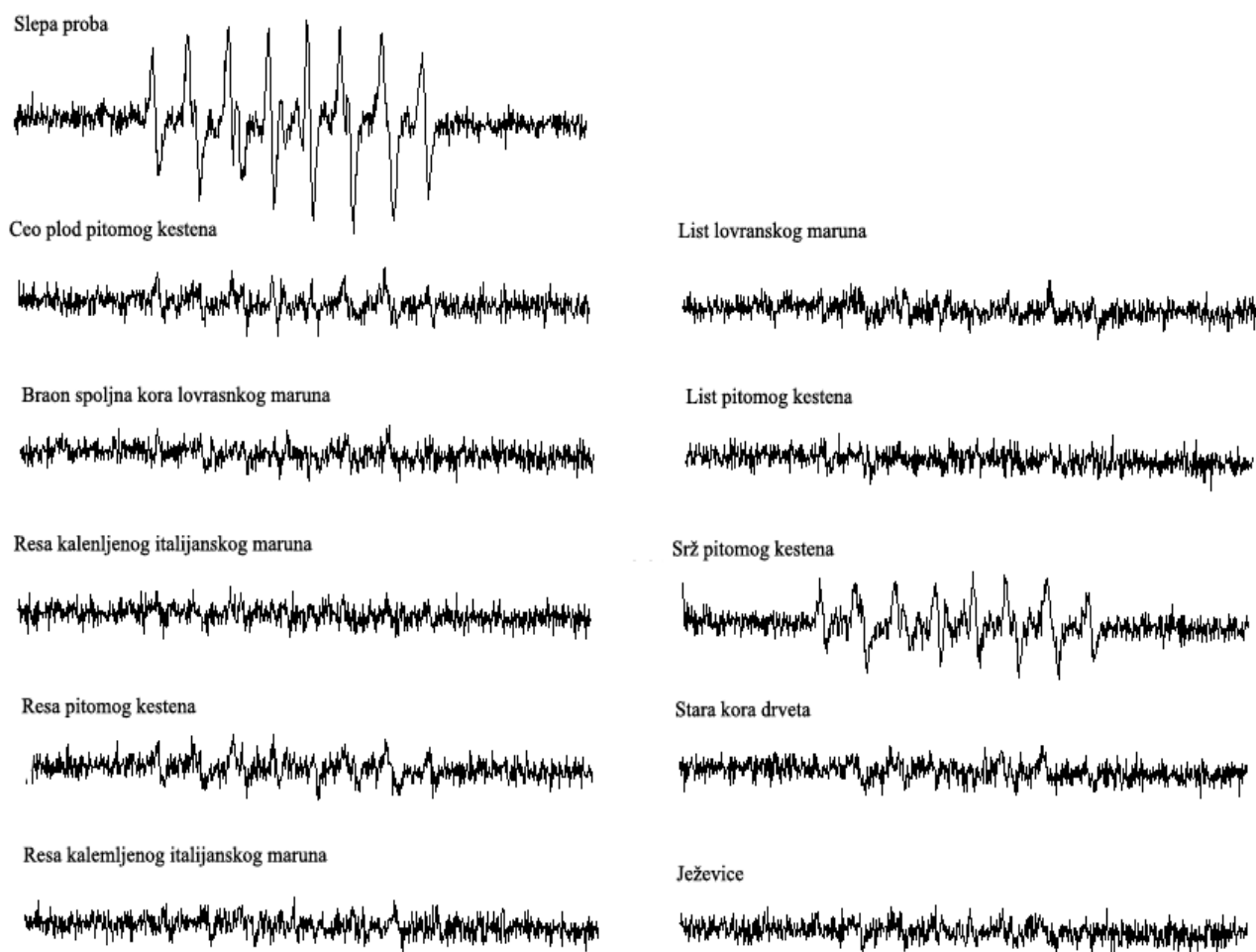
Slika P5e. Ekstrakt reše lovranskog maruna



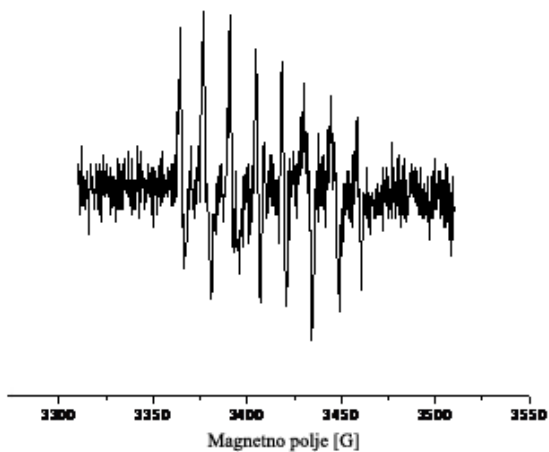
Slika P5f. Ekstrakt lista lovranskog maruna

Slika P5. EPR spektar DEMPO/OH spin adukta (rod 2007. godine) (aparati II)

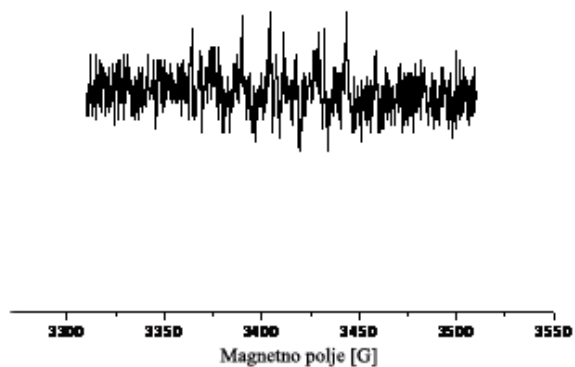
6.5. EPR SPEKTRI TRANSFORMACIJE SUPEROKSIDNOG ANJON RADIKALA



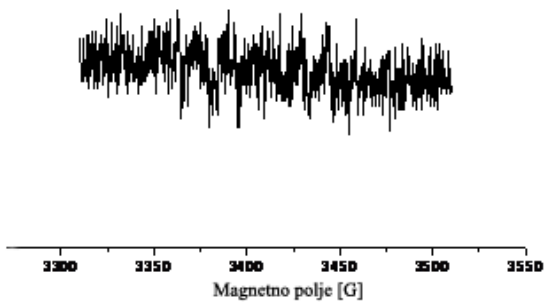
Slika P6. EPR spektri DEMPO adukta slepe probe i ekstrakata dobijeni u HX/XO sistemu



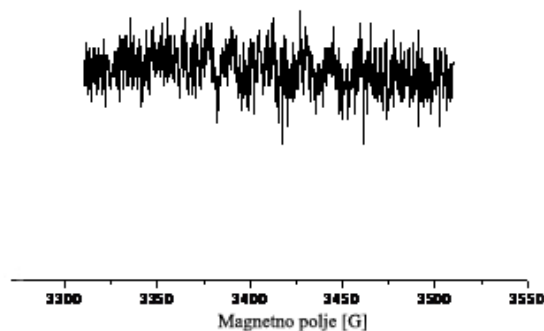
Slika P7a. Slepa proba



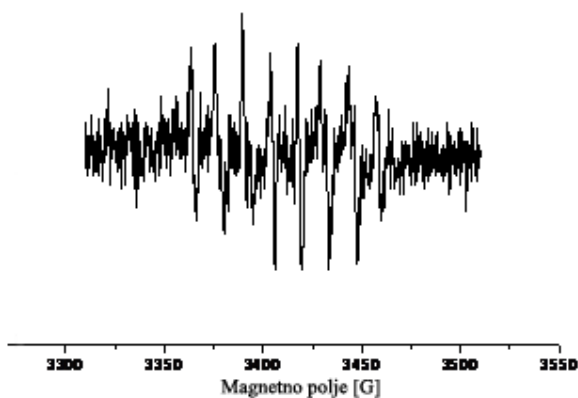
Slika P7b. Ekstrakt crvene unutrašnje kore ploda pitomog kestena



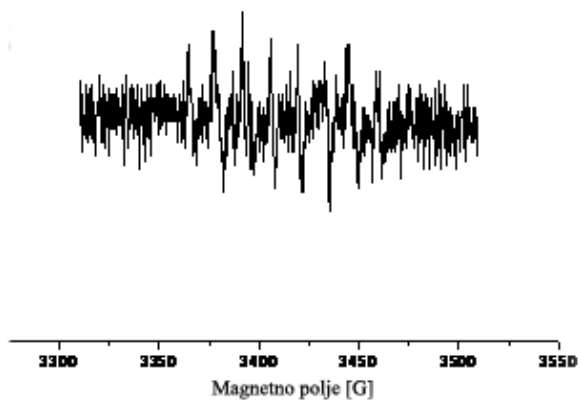
Slika P7c. Ekstrakt braon spolje kore ploda pitomog kestena



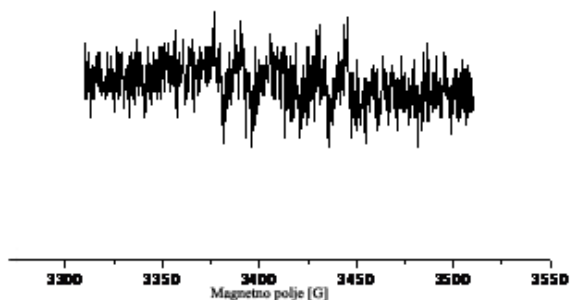
Slika P7d. Ekstrakt mlade kore drveta



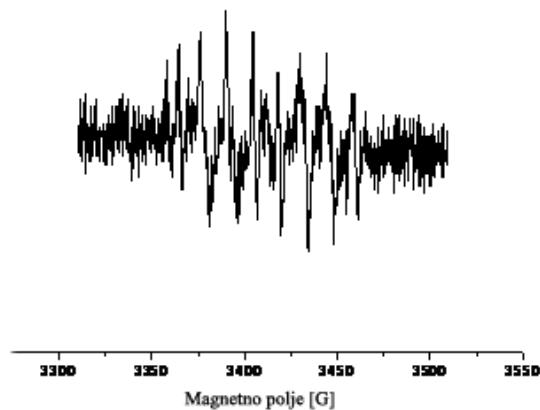
Slika P7e. Ekstrakt celog ploda lovranskog maruna



Slika P7f. Ekstrakt srži ploda lovranskog maruna



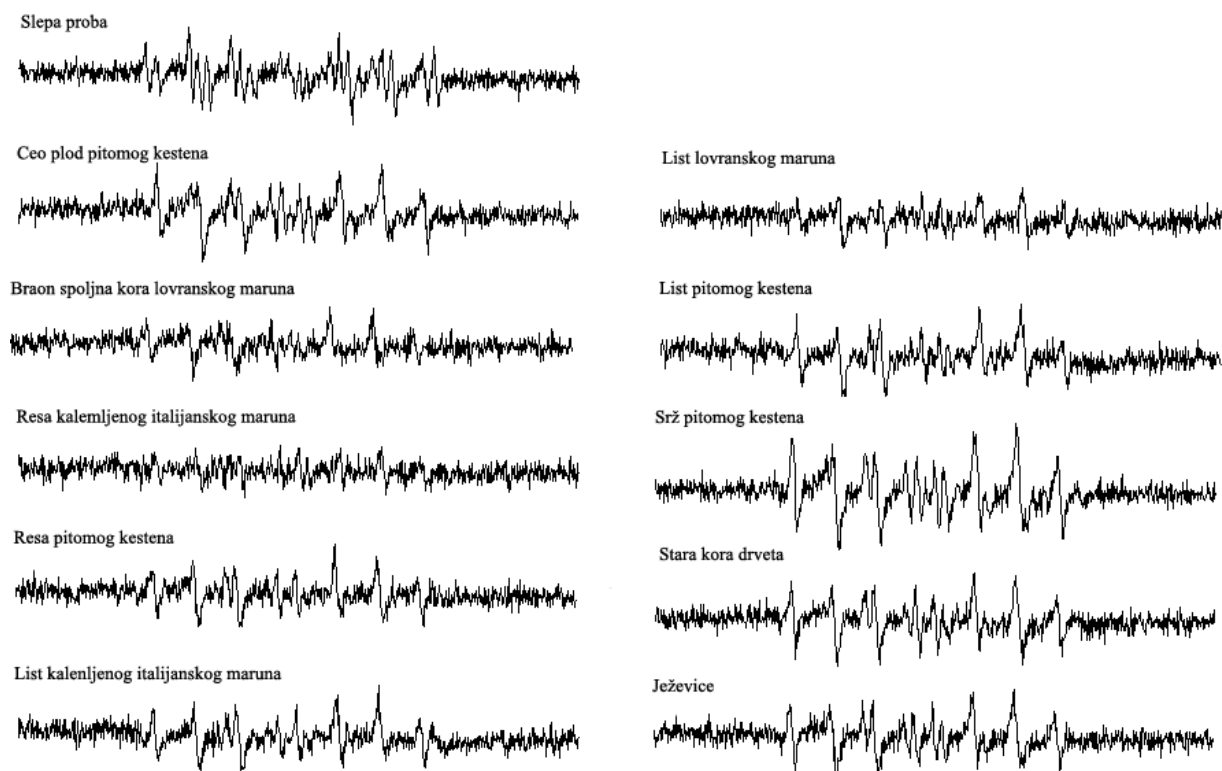
Slika P7g. Ekstrakt crvene unutrašnje kore ploda lovranskog maruna



Slika P7h. Ekstrakt celog ploda kalemljenog italijanskog maruna

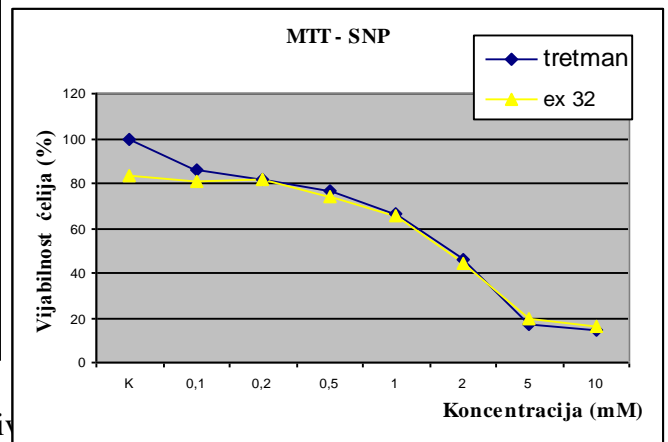
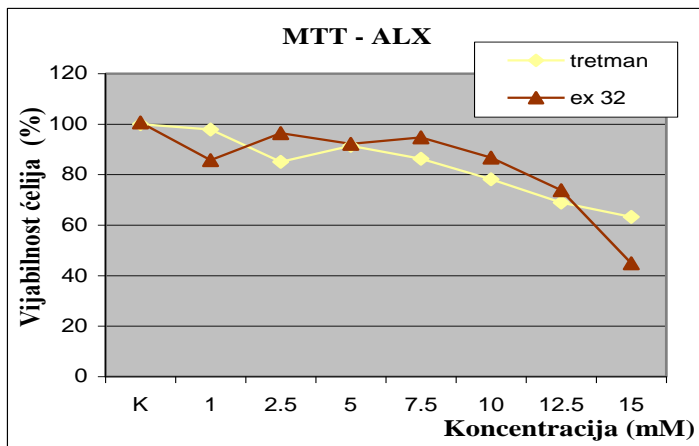
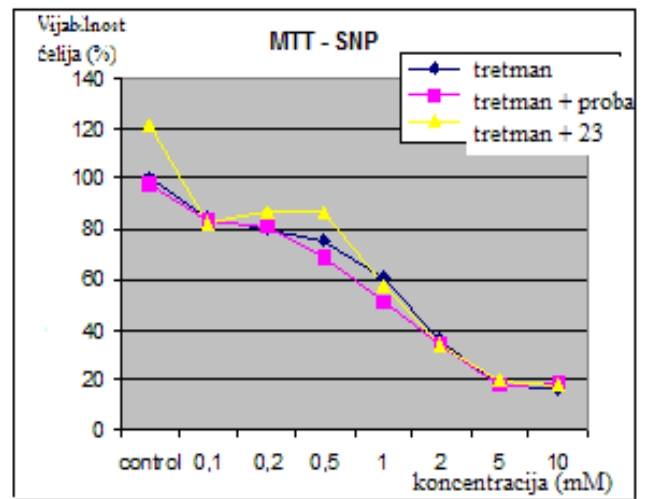
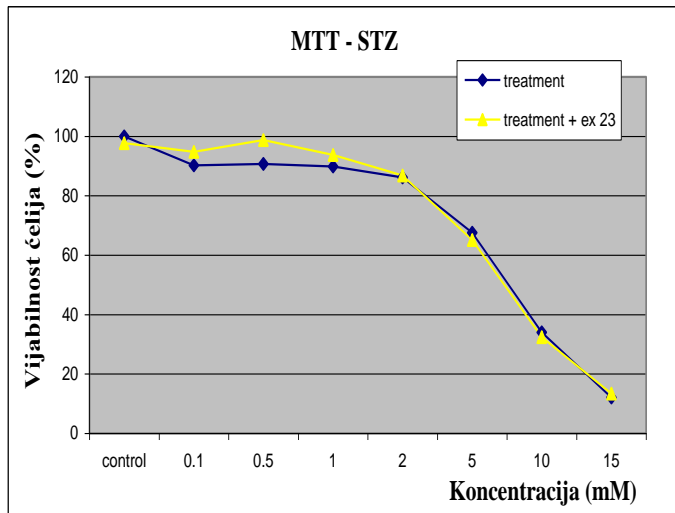
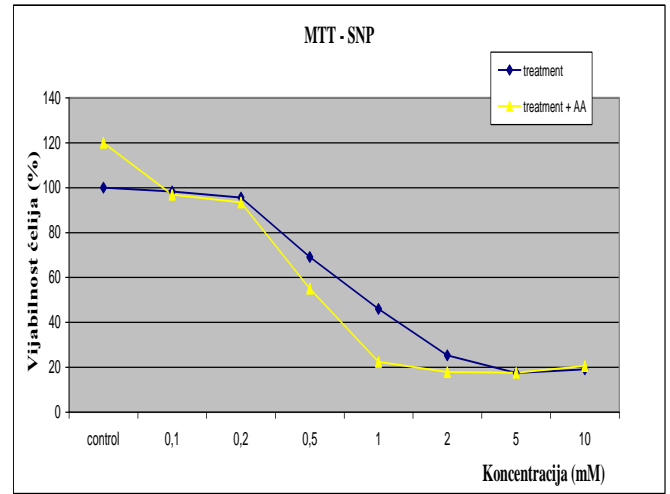
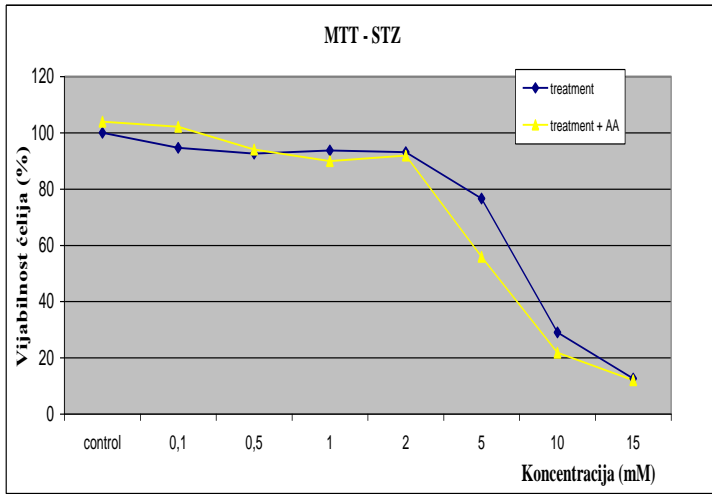
Slika P7. EPR spektri DEMPO adukta dobijeni u HX/XO sistemu (aparati II)

6.6. EPR SPEKTRI TRANSFORMACIJE HIDROKSI RADIKALA I SUPEROKSID ANJON RADIKALA GENERISANIH UV ZRAČENJEM



Slika P8. EPR signal dobijen UV zračenjem vodenog rastvora ekstrakta kestena

6.7. IN VITRO PROVERA ANTIOKSIDATIVNOG KAPACITETA



Slika P9. In vitro provera antioksidativnog kapaciteta

7. LITERATURA

1. Rates, S.M.K. : Plants as source of drugs, *Toxicon* 39, 603–613 (2001).
2. Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M.: Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 3954-3962 (1999).
3. Felter, H.W.: *The Eclectic Materia Medica, Pharmacology and Therapeutics*, (1922).
4. Basile, A., Sorbo, S., Giordano, S., Ricciardi, L., Ferrara, S., Montesano, D., Castaldo Cobianci, R., Vuotto, M. L., Ferrara, L.: Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves, *Fitoterapia* 71 (Suppl. 1), S110-116 (2000).
5. Hertog, M.G.L., Hollmann, P.C.H., Venema, D.P. (1992): Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits, *J. Agric. Food Chem.* 40(9), 1591-1598 (1992).
6. Fine, A. M.: Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications, *Altern Med Rev* 5(2), 144 (2000).
7. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L.: Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Journal of Clinical Nutrition* 79 (5), 727-747 (2004).
8. Ness, A.R., Powles, J.W.: Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review, *Int J Epidemiol* 26, 1–13 (1997).
9. Howard, B.V., Kritchevsky, D.: Phytochemicals and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association, *Circulation* 95, 2591–2593 (1997).
10. Onyilagha, J., Grotewold, E.: The biology and structural distribution of surface flavonoids, *Recent Res. Devel. Plant Sci* 2, (2004).
11. Anthony, M.S., Clarkson, T.B., Bullock, B.C., Wagner, J.D.: Soy protein versus soy phytoestrogens in the prevention of diet-induced coronary artery atherosclerosis of male cynomolgus monkeys, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 2524–2531 (1997).
12. Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C.: The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacol Rev* 52, 673–751 (2000).
13. Harborne, J.B., Williams, C.A.: Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry* 55, 481–504, (2000).
14. Shahidi, F., Naczk, M.: *Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications*, PA, Technomic Publishing Co Inc, Lancaster (1995).
15. Clifford, M.N.: Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden, *J Sci Food Agric* 79, 362–372 (1999).
16. Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J.: *Fruit phenolics*, FL, CRC Press, Boca Raton (1990).

17. Sosulski F, Krygier K, Hogge L.: Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3, Composition of phenolic acids in cereal and potato flours, *J Agric Food Chem* 30, 337–340 (1982).
18. King, H.G.C.: Phenolic compounds of commercial wheat germ, *J Food Sci* 27, 446-454 (1962).
19. Tomas-Barberan, F., Clifford, M.: Flavanones, chalcones and dihydrochalcones-nature, occurrence and dietary burden, *J Sci Food Agric* 80, 1073–1080 (2000).
20. Cassidy, A., Hansley, B., Lamuela-Raventos, R.M.: Isoflavones, lignans and stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health, *J Sci Food Agric* 80, 1044-1062 (2000).
21. Lakenbrink, C., Lapczynski, S., Maiwald, B., Engelhardt, U.H.: Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages, *J Agric Food Chem* 48, 2848-2852 (1996).
22. Arts, I.C.W., van de Putte, B., Hollman, P.C.H.: Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands, 1, Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods, *J Agric Food Chem* 48, 1746-1751 (2000).
23. Zhu, Q.Y., Zhang, A.Q, Tsang, D., Huang, Y. Chen, Z.Y.: Stability of green tea catechins, *J Agric Food Chem* 45, 4624–4628 (1997).
24. Mehansho, H, Butler, L.G., Carlson, D.M.: Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: interactions, induction and defense mechanisms, *Ann Rev Nutr* 7, 423-440 (1987).
25. Wünsch, P., del Vedovo, S., Rosset, J., Smiley, M.: The tannin granules from ripe carob pod, *Lebens Wiss Technol* 17, 351-354 (1984).
26. Hagerman, A.E., Butler, L.G.: Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin, *J.Chem. Ecol.* 15, 1795-1810 (1989).
27. Santos-Buelga, C., Scalbert, A.: Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health, *J Sci Food Agric* 80, 1094–1117 (2000).
28. Mazza, G., Maniati, E.: Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains, FL, CRC Press, Boca Raton (1993).
29. Clifford, M.N.: Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden, *J Food Sci Agric* 80, 1063-1072 (2000).
30. Thompson, L.U., Robb, P., Serraino, M., Cheung, F.: Mammalian lignan production from various foods, *Nutr Cancer* 16, 43–52 (1991).
31. Adlercreutz, H., Mazur, W.: Phyto-oestrogens and Western diseases, *Ann Med* 29, 95–120 (1997).
32. Bertelli, A., Bertelli, A.A.E., Gozzini, A., Giovannini, L.: Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity, *Drugs Exp Clin Res* 24, 133–138 (1998).
33. Kuhnau, J.: The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition, *World Rev Nutr Diet* 24, 117–191 (1976).
34. Sampson, L., Rimm, E., Hollman, P.C., de Vries, J.H., Katan, M.B.: Flavonol and flavone intakes in US health professionals, *J Am Diet Assoc* 102, 1414–1420 (2002).
35. Pietta, P., Simonetti, P., Roggi, C.: Dietary flavonoids and oxidative stress. In: Kumpulainen, J.T., Salonen, J.T.: Natural antioxidants and food quality in atherosclerosis and cancer prevention, Royal Society of Chemistry, London, 249-255 (1996).
36. Kumpulainen, J.T.: Intake of flavonoids, phenolic acids and lignans in various populations. In: Voutilainen, S., Salonen, J.T: Third international conference on

- natural antioxidants and anticarcinogens in food, health, and disease (NAHD), Kuopion Yliopisto, Finland, Helsinki, 24 (2001).
37. Heinonen, M.: Anthocyanins as dietary antioxidants. In: Voutilainen, S., Salonen, J.T.: Third international conference on natural antioxidants and anticarcinogens in food, and disease (NAHD), Kuopion Yliopisto, Finland, Helsinki, 25 (2001).
 38. Williamson, G.: Common features in the pathways of absorption and metabolism of flavonoids, In: Meskin, M.S., Davies, A.J., Lewis, D.S., Randolph, R.K., eds. *Phytochemicals: Mechanisms of Action*, CRC Press, Boca Raton, pp.21-33 (2004).
 39. Setchell, K.D., Brown, N.M., Lydeking-Olsen, E.: The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones, *J Nutr.* 132 (12), 3577-3584 (2002).
 40. Gugler, R.M., Leschik, M., Dengler, H.J.: Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses, *European Journal of Clinical Pharmacology* 9, 229-234 (1975).
 41. Hollman, P.C., de Vries, J.H., van Leeuwen, S.D., Mengelers, M.J., Katan, M.B.: Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers, *American Journal of Clinical Nutrition* 62, 1276-1282 (1995).
 42. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.: *Free Radicals in Biology and Medicine* 3rd ed. New York: Oxford University Press, pp.140-184 (1999).
 43. Štefan, L., Tepšić, T., Zavidčić, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R.: Lipidna peroksidacija uzroci i posledice, *Medicina* 43, 84-93 (2007).
 44. Nishikawa, H.: Radical generation on hydroxyapatite by UV irradiation, *Materials Lett* 58, 14-16 (2004).
 45. Lampberth, J.D.: NOX enzymes and the biology of the reactive oxygen, *Nat Rev Immunol* 4, 181-189 (2004).
 46. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.: The definition and measurement of antioxidants in biological systems, *Free Radic Biol Med* 18, 125-126 (1995).
 47. Halliwell, B.: Drug antioxidant effects, *Drugs* 42, 569–605 (1991).
 48. Dröge, W.: Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol Rev* 82, 47-95 (2002).
 49. Sies, H., Krinsky, N.I.: The present status of antioxidant vitamins and beta-carotene, *Am J Clin Nutr* 62, 1229–1300 (1995).
 50. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.: Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview, *Methods Enzymol* 186, 1–85 (1990).
 51. Rosen, G.M., Barber, M.J., Rauckman, E.J.: Disruption of erythrocyte membranous organization by superoxide, *J Biol Chem* 258, 2225-2228 (1983).
 52. Zicha, J., Kunes, J., Devynck, M.A.: Abnormalities of membrane function and lipid metabolism in hypertension, *Am J Hypertens* 12, 315–331(1999).
 53. Miller, D.M., Buettner, G.R., Aust, S.D.: Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions, *Free Radic Biol Med* 8 (1), 95-108 (1990).
 54. Fenton, H.J.H.: Oxidation of tartaric acid in presence of iron, *J Chem Soc* 65, 899-910 (1896).
 55. Domitrović, R., Tota, M., Milin, Č.: Oxidative stress in mice: effects of dietary corn oil and iron, *Biol Trace Elem Res* 113(2), 177-191 (2006).
 56. Letan, A.J.: The relation of structure to antioxidant activity of quercetin and some of its derivatives, II. Secondary (metal-complexing) activity, *J Food Sci* 31, 395–399 (1966).

57. Bindoli, A., Cavallini, L., Siliprandi, N.: Inhibitory action of silymarin on lipid peroxide formation in rat liver mitochondria and microsomes, *Biochem Pharmacol* 26, 2405–2409 (1977).
58. Takahama, U.: Suppression of lipid photoperoxidation by quercetin and its glycosides in spinach chloroplasts, *Photochem Photobiol* 38, 363–367 (1983).
59. Sorata, Y., Takahama, U., Kimura, M.: Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin, *Biochim Biophys Acta* 799, 313–317 (1984).
60. Jha, H. C., von Recklinghausen, G., Zilliken, F.: Inhibition of in vitro microsomal lipid peroxidation by isoflavonoids, *Biochem Pharmacol* 34, 1367–1369 (1985).
61. Baumann, J., Wurm, G., von Bruchhausen, V.F.: Prostaglandin synthetase inhibition by flavonoids and phenolic compounds in relation to their $\cdot\text{O}_2^-$ scavenging properties, *Arch Pharm* 313, 330–337 (1980).
62. Harman, D.J.: Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *J. Geontol.* 11, pp. 298 (1956).
63. Finkel, T., Holbrook N. J.: Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, *Nature* 408, 239 (2000).
64. Pryor, W.A.: In *Modern Biological Theories of Aging* (Warner, H. R. Butler, R. N., Sprott R. L.), Raven, New York, pp. 89 (1987).
65. Krinsky, N.I, Peacocke, M., Russell, R.M.: Antioxidant vitamins, cancer, and cardiovascular disease, *N Engl J Med* 335, 1066–1077 (1996).
66. Sies, H.: *Oxidative Stress*, Academic Press, London (1985).
67. Kandaswami, C., Middleton, E.: Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids, in *Free Radicals in Diagnostic Medicine*, Armstrong Ded, Plenum Press, New York pp. 351–376 (1994).
68. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B.: The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, *Free Rad. Res.* 22(4), 375-383 (1995).
69. Hodnick, W.F., Milosavljevic, E. B., Nelson, J. H., Pardini, R. S.: Electrochemistry of flavonoids, *Biochem. Pharmacol.* 37, 2607-2611 (1988).
70. Ariga, T., Hamano, M.: Radical scavenging action and its mode in procyanidins B-1 and B-3 from azuki beans to peroxy radicals, *Agric. Biol. Chem.* 54, 2499-2504 (1990).
71. Heijnen, C.G., Haenen, G.R., van Acker, F.A., van der Vijgh, W.J., Bast, A.: Flavonoids as peroxy nitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups, *Toxicol In Vitro* 15 (1), 3-6 (2001).
72. Shahidi, F., Wanasundara, P.K.: Phenolic antioxidants, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32 (1), 67-103 (1992).
73. Salah, N., Miller, N.J., Pahanga, G., Tijuburg, L., Bolwell, G.P., Rive Evans, C. : Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants, *Arch. Biochem. Biophys.* 322 (2), 339- 346 (1995).
74. Jovanović, S.V., Hara, Y., Steenken, S., Simic, M.G.: Antioxidant potential of gallic catechins, A pulse radiolysis and laser photolysis study, *J. Am. Chem. Soc.* 117(39), 9881-9888 (1995).
75. Rice-Evans, C.A., Miller, N., Paganga, G.: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (7), 933-956 (1996).

76. Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L.: Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, *Free Radic. Biol. Med.* 22 (5), 749-760 (1997).
77. Hopia, A., Heinonen, M.: Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76 (1), 139-144 (1999).
78. Uri, N.: In : *Autoxidation and Antioxidants*; Lundberg, W. O., Ed., Interscience: London, pp. 133-169 (1961).
79. Macheix, J.-J. and Fleuriet, A.: Phenolic acids in fruits, In: *Flavonoids in health and disease*, Rice-Evans, C.A., Packer, L. Eds. Marcel Dekker Inc., New York, pp 35-59 (1998).
80. Castelluccio, C., Paganga, G., Melikian, N., Bolwell, G.P., Pridham, J., Samson, J. and Rive-Evans, C.: Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants, *FEBS Lett.* 368 (1), 188-192 (1995).
81. Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, A.G., Sovik, K.N., Ritchard, N.T., Hartzfeld, P.W., Riechel, T.L.: High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants, *J. Agric. Food Chem.* 46, 1887-1892 (1998).
82. Salunkhe, D. K., Chavan, J. K., Kadam, S. S.: *Dietary tannins: Consequences and remedies*, CRC Press, Boca Raton, FL (1990).
83. Calliste, C.A., Trouillas, P., Allais, D.P., Simon, A., Duroux, J.L.: Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviours of seven plants, *J. Agr. Food Chem.* 49, 3321-3327. (2001).
84. Čađanović-Brunet, J.: *Kiseonikovi slobodni radikali i prirodni antioksidansi*, Zadužnina Andrejević, Beograd, s.36 (1998)
85. Rappoport, Z.: *The Chemistry of Phenols, Part 1*, John Wiley & Sons, Jerusalem, pp.140-144 (2003).
86. Havsteen, B.: Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency, *Biochem Pharmacol* 32, 1141–1148 (1983).
87. Grange, J.M., Davey, R.W.: Antibacterial properties of propolis (bee glue), *J R Soc Med* 83, 159–160 (1990).
88. Dixon, R.A., Dey, P.M., Lamb, C.J.: Phytoalexins: Enzymology and molecular biology, *Adv. Enzymol.* 55, 100-136 (1983).
89. Recio, M.C., Ríos, J.L., Villar, A.: A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988, *Phytother. Res.* 3(4), 117-125 (1989).
90. Benevente-García, O., Catillo, J., Marin, F.R., Ortuño, A., Del Río, J.A.: Uses and properties of Citrus flavonoids, *J. Agric. Food Chem.* 45 (12), 4505-4515 (1997).
91. Chabot, S., Bel-Rhild, R., Chênevert, R., Piché, Y.: Hyphal growth promotion in vitro of the mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂-enriched conditions, *New Phytol.* 122 (3), 461-467 (1992).
92. Tsuchiya, H., Sato, M., Mizazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T., Iinuma, M.: Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillinresistant *Staphylococcus aureus*, *J. Ethnopharmacol.* 50 (1), 27- 34 (1996).

93. Mason, T.L., Wasserman, B.P.: Inactivation of red beet betaglucan synthase by native and oxidized phenolic compounds, *Phytochemistry* 26, 2197–2202 (1987).
94. Mori, A., Nishino, C., Enoki, N., Tawata, S.: Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*, *Phytochemistry* 26 (8), 2231-2234 (1987).
95. Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Oksmancaldentey, K.M.: Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries, *J. Appl. Microbiol.* 90 (4), 494-507 (2001).
96. Sakanaka, S., Kim, M., Taniguchi, M., Yamamoto, T.: Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium, *Agric. Biol. Chem.* 53(9), 2307-2311 (1989).
97. Toda, M., S., Okubo, R., Ohnishi, Shimamura., T.: Antibacterial and bactericidal activities of Japanese green tea, *Jpn. J. Bacteriol.* 45, 561–566 (1989).
98. Vijaya, K., Ananthan, S., Nalini, R.: Antibacterial effect of theaflavin, polyphenon 60 (*Camellia sinensis*) and *Euphorbia hirta* on *Shigella* spp., a cell culture study, *J. Ethnopharmacol.* 49 (2), 115-118 (1995).
99. Mendoza, L., Wilkens, M. and Urzúa, A.: Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae), *J. Ethnopharmacol.* 58 (2), 85-88 (1997).
100. Tereschuk, M.L., Riera, M.V.Q., Castro, G.R., Abdala, L.R.: Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. *J. Ethnopharmacol.* 56 (3), 227-232 (1997).
101. Scalbert, A.: Antimicrobial properties of tannins, *Phytochemistry* 30, 3875–3883 (1991).
102. Waage, S.K., Hedin, P.A., Grimley, E.: A biologically-active procyanidin from *Machaerium floribundum*, *Phytochemistry* 23(12), 2785-2787 (1984).
103. Hada, S., Kakuchi, N., Hattori, M., Namba, T.: Identification of antibacterial principles against *Streptococcus mutans* and inhibitory principles against glucosyltransferase from the seed of *Areca catechu* L., *Phytother. Res.* 3 (4), 140-144 (1989).
104. Nishiawa, K., Nakata, I., Kishida, A., Ayer, W.A., Browne, L.M.: Some biologically active tannins of *Nuphar variegatum*, *Phytochemistry* 29 (8), 2491-2494 (1990).
105. Jones, G.A., McAllister, T.A. Muir, A. D., Cheng, K.J.: Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1374–1378 (1994).
106. Ahn, Y.J., Lee, C.O., Kweon, J.H., Ahn, A.W., Park, J.H.: Growth-inhibitory effects of *Galla Rhois* derived tannins on intestinal bacteria, *J. Appl. Microbiol.* 84(3), 439-443 (1998).
107. Aziz, N.H., Farag, S.E., Mousa, L.A.A., Abo-Zaid, M.A.: Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds, *Microbios* 93 (374), 43-54 (1998).
108. Wahdan, H.A.L.: Causes of the antimicrobial activity of honey, *Infection* 26 (1), 26-31 (1998).
109. Mira, L., Fernandez, M.T., Santos, M., Rocha, R., Florencio, M.H., Jennings, K.R.: Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity, *Free Radic Res* 36 (11), 1199-1208 (2002).

110. Haslam, E. : Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action, *J. Nat. Prod.* 59, 205-215 (1996).
111. Mojžošová, G., Kuhta, M.: Dietary Flavonoids and Risk of Coronary Heart Disease, *Physiol. Res.* 50, 529-535 (2001).
112. Williams, R.J., Spencer, J.P., Rice-Evans, C.: Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med.* 36 (7), 838-849 (2004).
113. Berridge, M.J.: A general survey of the mechanism and control of intestinal fluid transport, *Scand. J. Gastroenterol.* 18 (Suppl.87), 43-49 (1984).
114. Katz, A.M.: Molecular biology of calcium channels in the cardiovascular system, *Am. J. Cardiol.* 80 (9A), 171- 221 (1997).
115. Riviera, A., Conlin, P.R., Williams, G.H., Canessa, M.L.: Elevated lymphocyte cytosolic calcium in a subgroup of essential hypertensive subjects, *Hypertension* 28 (2), 213-218 (1996).
116. Locker, F.G., Silverberg, S.J., Bilezikian, J.P.: Optimal dietary calcium intake in primary hyperparathyroidism, *Am. J. Med.* 102 (6), 543-550 (1997).
117. Klin, M., Smogorzewski, M., Massry, S.G.: Chronic renal failure increases cytosolic Ca^{2+} of hepatocytes, *Am. J. Physiol.* 269 (1, Pt.1), 103-109 (1995).
118. Ikegaya, Y., Yoshida, M., Saito, H., Nishiyama, N.: Epileptic activity prevents synapse formation of hippocampal mossy fibers via L-type calcium channel activation in vitro, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280 (1), 471-476 (1997).
119. Morales, M.A., Lozoya, X.: Calcium-antagonist effects of quercetin on aortic smooth muscle, *Planta Med.* 60 (4), 313-317 (1994).
120. Meli, R., Autore, G., di Carlo, G., Capasso, F.: Inhibitory action of quercetin on intestinal transit in mice, *Phytother. Res.* 4 (5), 201- 202 (1990).
121. Duarte, J., Pérez Vizcaíno, F., Utrilla, P., Jiménez, J., Tamargo, J., Zarzuelo, A.: Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships, *Gen. Pharmacol.* 24 (4), 857-862 (1993) .
122. Mukhtar, H., Das, M., Khan, W.A., Wang, Z.Y., Bik, D.P., Bickers, D.R.: Exceptional activity of tannic acid among naturally occurring plant phenols in protecting against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene - benzo(a)pyrene-3-methylcholanthrene and N-methyl-N-nitrosourea-induced skin tumorigenesis in mice, *Can. Res.* 48 (9), 2361-2365 (1988).
123. Voorrips, L.E., Goldbohm, R.A., Verhoeven, D.T., van Poppel, G.A., Sturmans, F., Hermus, R.J., vanden Brandt, P.A.: Vegetable and fruit consumption and lung cancer risk in the Netherlands Cohort Study on diet and cancer (Abstr.), *Cancer Causes & Control* 11 (2), 101-115 (2000).
124. Dorant, E., van den Brandt, P.A., Goldbohm, R.A., Sturmans, F.: Consumption of onions and a reduced risk of stomach carcinoma, *Gastroenterology* 110 (1), 12-20 (1996).
125. Kuntz, S., Wenzel, U., Daniel, H.: Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines *Eur J. Nutr* 38 (3), 133 (1999).
126. Li, Y., Bhuiyan, M., Sarkar, F. H.: Induction of apoptosis and inhibition of c-erbB-2 in MDA-MB-435 cells by genistein, *Int. J. Oncol.* 15(3), 525 (1999).
127. Harmon, A.W., Harp, J.B.: Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis, *Am. J. Physiol Cell Physiol* 280, 807 (2001).
128. Geahlen, R. L., Koonchanok, N. M., McLaughlin, J. L., Pratt, D. E.: Inhibition of protein-tyrosine kinase activity by flavanoids and related compounds, *J. Nat. Prod* 52, 982 (1989).

129. Naczki, M., Shahidi, F.: Extraction and analysis of phenolics in food, *Journal of Chromatography A* 1054, 95–111 (2004).
130. Robbins, R.: Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology, *J. Agric. Food Chem.* 51, 2866-2887 (2003).
131. Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Ryan, D.: Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits, *Analyst* 125, 989-1009 (2000).
132. Price, M.L. Butler, L.G.: Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain, *J. Agric. Food Chem* 25(6), 1268– 273 (1977).
133. Khanna, S.K., Viswanatham, P.N., Krishnan P.S and Sanwai, G.G. : Extraction of total phenolics in the presence of reducing agents, *Phytochemistry* 7(9), 1513-1517 (1968),
134. Deshpande, S.S.: Investigation of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.): microstructure, processing and antinutrients, Ph.D. thesis, University of Illinois, Champaign, IL, (1985).
135. Naczki, M., Shahidi, F., Sullivan, A.: Recovery of rapeseed tannins by various solvent systems, *Food Chem* 45, 51-54 (1992).
136. Hromadkova, Z., Ebringerova, A., Valachovic, P.: Ultrasound-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from the roots of valerian (*Valeriana officinalis* L), *Ultrasonics Sonochem* 9, 37–44 (2002).
137. Posyniak, A., Zmudzki, J., Semeniuk, S.: Effects of the matrix and sample preparation on the determination of fluoroquinolone residues in animal tissues, *Journal of Chromatography A* 914, (1-2) (2001).
138. Li, H., Chen, B., Yao, S.: Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*), *Ultrasonics Sonochemistry* 12, 295–300 (2005).
139. Cseke, L, Kirakosyan, A., Kaufman, P., Warber, S., Duke, J., Brielmann, H.: *Natural Products from Plants*, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, (2006).
140. Salisova, M., Toma, S., Mason, T.J.: Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from *Salvia officinalis*, *Ultrasonics Sonochem* 4, 131–134 (1997).
141. Romdhane, M., Gourdon, C.: Investigation in solid–liquid extraction: influence of ultrasound, *Chemical Engineering Journal* 87 (1), 11-19 (2005).
142. Escarpa, A., González, M. C.: Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods, *Anal. Chim. Acta* 427, 119-127 (2001).
143. Torres, A. M., Mau-Lastovicka, T., Rezaaiyan, R.: Total phenolics and high performance liquid chromatography of phenolic acids in avocado, *J. Agric. Food Chem* 35, 921-925 (1987).
144. Meyer, A. S., Jepsen, S. M., Sørensen, N. S.: Enzymatic release of antioxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace, *J. Agric. Food Chem.* 46, 2439-2446 (1998).
145. Folin, O.: Tyrosine and tryptophan determinations in proteins, *J. Biol. Chem.* 73, 672-649 (1927).
146. Singleton, V.L., Rossi, J.A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol.Vitic.* 16, 144-158 (1965).

147. Deshpande, S. S., Cheryan, M., Salunkhe, D. K: Tannin analysis of food products, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 24, 401-449 (1986).
148. Gupta, R. K., Haslam, E.: Vegetable tannins structure and biosynthesis, In *Polyphenols in Cereals and Legume.*, ed. J. H. Hulse, Ottawa, pp. 15-24 (1980).
149. Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M., Spranger, I.: Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins, *J.Agric.Food Chem.* 46, 4267-4274 (1998).
150. Sarkar, S. K., Howarth, R. E.: Specificity of the vanillin test for flavanols, *J. Agric. Food Chem* 24, 317-320 (1976).
151. Price, M.L., Van Scoyoc, S., Butler, L.G.: A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26 (5), 1214-1218 (1978).
152. Scalbert, A.: Quantitative methods for the estimation of tannins in the plant tissues, In: Hemingway, R.W. Laks.P.E. (Eds), *Plant polyphenols: Synthesis, Properties, Significance*, Plenum Press, New York (1992).
153. Schofield, P., Mbungua, D.M., Pell, A.N.: Analysis of condensed tannins: a review, *Animal Feed Science and Technology* 91, 21-40 (2001).
154. Butler, L. G.: Effects of condensed tannin on animal nutrition. In *Chemistry and Significance of Condensed Tannins*; Hemingway, R. W., Karchesy, J. J., Eds.; Plenum Press, New York, 391-402 (1989).
155. Robards, K., Antolovich, M.: Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: A review, *Analyst* 122(2), 11R-34R (1997).
156. Romani, A., Minunni, M., Mulinacci, N., Pinelli, P., Vincleri, F.F. : Comparison among differential pulse voltammetry, amperometric biosensor, and HPLC/DAD analysis for polyphenol determination, *J. Agric. Food Chem.* 48, 1197-1203 (2000).
157. Merken, H.M., Beecher, G.R.: Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *J Agric Food Chem* 48, 577-599 (2000).
158. Senter, S.D., Robertson, J.A., Meredith, F.I.: Phenolic Compounds of the Mesocarp of Cresthaven Peaches during Storage and Ripening, *J. Food Sci.* 54, 1259-1268 (1989).
159. Hempel J., Bohm, H.: Quality and quantity of prevailing flavonoids of yellow and green French beans (*Phaseolus vulgaris* L.), *J. Agric. Food Chem* 44, 2114-2116 (1996).
160. Siess, M.H. Le Bon, A.M., Canivenc-Lavier, M.C., Amiot, M.J., Sabatier, S., Aubert, S.Y, Suschetet, M.: "Flavonoids in Honey and Propolis", *J. Agric. Food Chem* 44, 2297 -2301(1996)
161. Sanders, T.H., McMichael, R.W., Hendrix, K.W.: Occurrence of resveratrol in edible peanuts, *J. Agric. Food Chem.* 48, 1243-1246 (2000).
162. Covey, T.R., Lee, E.D., Bruins, A.P., Henion, J.D.: Liquid chromatography / mass spectrometry, *Anal. Chem.* 58 (14), 1451A-1461A(1986).
163. Dalluge, J.J., Nelson, B.C., Thomas, J.B., Welch, M.J., Sander, L.C.: Capillary liquid chromatography/electrospray mass spectrometry for the separation and detection of catechins in green tea and human plasma. *Mass Spectrom.* 11, 1753 (1997).
164. Yordanov, N.D.: Is our knowledge about the chemical and physical properties of DPPH enough to consider it as a primary standard for quantitative EPR spectrometry, *Appl Magn Res* 10, 339 (1996).
165. Ueda, H., Kuri, Z., Shida, S.: Electron-Spin-Resonance Studies of DPPH Solutions, *J Chem Phys* 36, 1676 (1962).

166. Buchachenko, A.L.: *Stabilnije Radikali*, AN USSR (1963).
167. Blois, M. S.: Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Science*, 181, 1199-1200 (1958).
168. Bačić, G., Mojović, M.: EPR Spin Trapping of Oxygen Radicals in Plants, A Methodological Overview, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1048, 230–243 (2005).
169. Roubaud, V., Sankarapandia, S., Kuppusamy, P., Tordob, P., Zweier, J.: Quantitative Measurement of Superoxide Generation Using the Spin Trap 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl- 1-pyrroline-N-oxide, *Analytical Biochemistry* 247 (2), 404-411 (1997).
170. Stolze, K., Udilova, N., Nohl, H.: Spin trapping of lipid radicals with DEPMPO-derived spin traps: detection of superoxide, alkyl and alkoxy radicals in aqueous and lipid phase, *Free Radical Biology and Medicine* 29 (10), 1005-1014 (2000).
171. Lorin, A., Flore, C., Thomas, A., Brasseur, R.: Les liposomes: description, fabrication et applications, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 8 (3), 163–176 (2004).
172. Mojović, M. Spasojević, I. Vuletić, M. Vučinić, Ž. Bačić G.: An EPR spin-probe and spin-trap study of the free radicals produced by plant plasma membranes, *J. Serb. Chem. Soc.* 70 (2) , 177–186 (2005).
173. Stopka, P., Křížova, J., Káfuňková, E.: EPR application in medicine and biology, *Chem. Listy* 99, 182-184 (2005).
174. Nishikawa, H.: Radical generation on hydroxyapatite by UV irradiation, *Materials Lett*; 58, 14-16 (2004).
175. Jurkiewicz, B.A., Buettner, G.R.: EPR Detection of Free Radicals in UV-Irradiated Skin: Mouse Versus Human, *Photochemistry and Photobiology* 64(6), 918-922 (1996).
176. Rowe, G.T., Eaton, L.R., Hess, M.L.: Neutrophil-derived, active oxygen species-mediated cardiovascular dysfunction, *J Vol Cell Cardiol* 16, 1075–1079 (1984).
177. Krötz, F., Sohn, H.Y., Pohl, U.: Reactive oxygen species: Players in the platelet game, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1988–1996 (2004).
178. Bullen, J., Griffiths, E., Roger, H.: Sepsis: The critical role of iron, *Microbes and Infection* 2, 409-415 (2000).
179. Sundaresan, M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Irani, K, Finkel, T.: Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction, *Science* 270, 296–299 (1995).
180. Lane, N.: A unifying view of ageing and disease: the double-agent theory, *J Theoret Biol* 225, 531–540 (2003).
181. Gao, Y.J., Hirota, S., Zhang, D,W, Janssen, L.J., Lee, R.M: Mechanisms of hydrogen-peroxide-induced biphasic response in rat mesenteric artery, *Br J Pharm* 138, 1085–1092 (2003).
182. Lin, M.T., Beal, M.F.: Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Nature* 443, 787–795 (2006).
183. Halliwell, B.: Reactive Species and Antioxidants, Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life, *Plant Phys* 141, 312–322 (2006).
184. Winterbourn, C. : Oxidative reactions of hemoglobin, *Methods Enzymol* 186, 265– 272 (1990).
185. Watanabe, H, Kobayashi, A., Yamamoto, T.: Alternations of human erythrocyte membrane fluidity by oxygen-derived free radicals and calcium, *Free Rad Biol Med* 8, 507-514 (1990).

186. Gambhir, K.K., Agarwal, V.R.: Potassium efflux: A simple method to determine intactness of erythrocytes, *J. Natl. Med. Assoc.* 82, 565-570 (1990).
187. Van der Zee, J., Dubbelman, T.M.A.R., Van Steveninck, J. *Biochim. Biophys. Acta* 818, 38-44 (1985).
188. Tsuda, K., Kimura, K., Nishio, I.: Leptin improves membrane fluidity of erythrocytes in humans via a nitric oxide-dependent mechanism - an Electron Paramagnetic Resonance investigation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 672-681 (2002).
189. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods* 65 (1-2), 55-63 (1983).
190. Davis, W.W., Stout, T.R.: Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay I. Factors Influencing Variability and Error, *Appl Microbiol.* 22(4), 659-665 (1971).
191. http://sh.wikipedia.org/wiki/Pitomi_kestn
192. Rushforth, K.: *Trees of Britain and Europe*, Collins, London, pp.89 (1999).
193. Ertürk, Ü., Mert, C., Soylu, A.: Chemical Composition of Fruits of Some Important Chestnut Cultivars, *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49, (2):183-188 (2006).
194. Bounous, G., Botta, R., Beccaro, G.: The chestnut: the ultimate energy source. Nutritional value and alimentary benefits, *Nucis - Information Bulletin of the Research Network on Nuts (FAO-CIHEAM)* 9, 44-50 (2000).
195. Mujić, I., Alibabić, V., Ibrahimpašić, J., Jahić, S., Muslimović, D.: Characteristics of the Chestnut From Una Sana Canton in Comparison to Other Chestnut Varieties and the Influence of Different Preservation Techniques on Nutritive Values, *Acta Hort.* 768, 359-366 (2008).
196. Muratović, A., Kurtović, M., Jerebica, Dž.: *Voćarstvo*, Studentska štamparija Univerziteta Sarajevo, Sarajevo, pp.34 (1999).
197. Maurer, W.D., Fernández – Lopez, J.: Establishing an international sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill) provenance test: preliminary steps. *Forest Snow and Landscape Research* 763, 482 – 486 (2001).
198. Vossen, P.: *Chestnut Culture in California*, (2000), <http://anracatalog.usdavis.edu>.
199. <http://ncnatural.com/NCNatural/trees/chestnut.html>
200. <http://ipm.ppws.vt.edu/griffin/accfcast.html>
201. <http://www.pp-ucka.hr/>
202. Hedrick, U. P.: *Sturtevant's Edible Plants of the World*, Dover Publications, Dover (1972).
203. Pizzoferrato, L., Rotilio, G., Paci, M.: Modification of Structure and Digestibility of Chestnut Starch upon Cooking: A Solid State ¹³C CP MAS NMR and Enzymatic Degradation Study, *J. Agric. Food Chem.* 47, 4060-4063 (1999).
204. Grassi, G., Mastronicola, M., Parente, A.: *Atti del Covegno nazionale sul cestagno, Cison di Valmarino, Il tempo delle castagne* 575 (1997).
205. Burennett, M.S.: The grainzhet grown on a tree. Reprinted from "Chestnutworks", Portland, Oregon: 12-15. Connor W.E. (1997): The beneficial effects of omega-4-fatty acids: cardiovascular disease and neuro-development, *Current opinion in Lipidology* 8, 1-3 (1998).
206. Connor, W.E.: The beneficial effects of omega-4-fatty acids: cardiovascular disease and neuro-development, *Current opinion in Lipidology* 8, 1-3 (1997).

207. USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods Release 2.1, 2007
208. Uphof, J. C.: Dictionary of Economic Plants. Weinheim, Berlin (1959).
209. Culbreth, D.M.: A Manual of Materia Medica and Pharmacology (1927).
210. Hadrović, H.: Proučavanje pitomog kestena na području SAP Kosova u cilju stvaranja baze za njegovu selekciju, Peć, s.10-11 (1977).
211. Grieve. A.: Modern Herbal, Penguin, London (1984).
212. Romussi, G., Mosti, L., Cafaggi, S.: Glycoside und depside aus den blaettern von *Castanea sativa* Mill. Pharmazie 35 (10), 647-648 (1981).
213. Hiermann, A., Kedwani, S., Schramm, H.W., Seger, C.: A new pyrrole alkaloid from seeds of *Castanea sativa*, Fitoterapia 73, 22-27 (2002).
214. Ronnins, A.: Fluid Extracts of The New Pharmacopoeia, Botanical Medicine Monographs and Sundry (I) Vol55, pp.6 (1883).
215. Chevallier. A.: The Encyclopedia of Medicinal Plants, Dorling Kindersley, London (1996).
216. Liu, L., Zhou, J: Some Consideration on Chestnut Development in the 21th Century in China, Acta. Hort. 494, 85-88 (1998).
217. Allona, I., Collada, C., Casado, R., Paz-Ares, J., Aragoncillo, C.: Bacterial expression of an active class Ib chitinase from *Castanea sativa* cotyledons, Plant Mol Biol 32, 1171 (1996).
218. Guarrera, P.M.: Il patrimonio etnobotanico del Lazio. Regione Lazio Dipartimento di Biologia Vegetale, Roma, pp. 301(1994).
219. Viegi, L., Pieroni, A., Guarrera, P.M., Vangelisti, R.: A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank, Journal of Ethnopharmacology 89, 221–244 (2003).
220. Nepka, C., Asproдини, E., Kouretas, D.: Tannins, xenobiotic metabolism and cancer chemoprevention in experimental animals, Eur. J. Drug. Metabol. Pharmacol. 24, 183–189 (1999).
221. Cerda, B., Ceron J.J., Tomas-Barberan, F.A., Espin, J.C.: Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic, J Agric Food Chem (51), 3493–3501 (2003).
222. Pierpoint, W. S.: In Flavonoids in biology and medicine III, Current issues in flavonoids research; Das N. P., Ed., National University of Singapore, Singapore, pp. 55-78 (1990).
223. Zywicki, B., Reemtsma, T., Jekel, M. : Analysis of commercial vegetable tanning agents by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry and its application to wastewater, J. Chromatogr. A (970) 191–200 (2002).
224. Lin, L.Z i Harnly, J.M.: A Screening Method for the Identification of Glycosylated Flavonoids and Other Phenolic Compounds Using a Standard Analytical Approach for All Plant Materials, J. Agric. Food Chem. 55 (4), 1084 -1096 (2007).
225. Meyers, K.J., Swiecki, T.J., Mitchell, A.E.: Understanding the Native Californian Diet: Identification of Condensed and Hydrolyzable Tannins in Tanoak Acorns (*Lithocarpus densiflorus*), J. Agric. Food Chem. 54 (20), 7686 - 7691 (2006).
226. Yokozawa, T., Chen, C.P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G.I., Nishioka, I.: Study on the Inhibitory Effect of Tannins and Flavonoids against the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical - A newly found effect of hydrolysable-type tannin-containing crude drug and gallotannin, Biochemical Pharmacology 56 (2), 213-222 (1998).

227. Chance, B., Sies, H., Boveris, A.: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiological Reviews* 59, 527–605 (1979).
228. Jackson, S.K., Liu, K.J., Liu, M., Timmins, G.S.: Detection and removal of contaminating hydroxylamines from the spin trap DEPMPO, and re-evaluation of its use to indicate nitron radical cation formation and Sn1 reactions, *Free Rad Biol Med* 32, 228-232 (2002).
229. Johnson RM, Goyette G, Ravindranath Y, Ho YS. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes, *Free Rad Biol Med* 39, 1407-1417 (2005).
230. Hamill O.P. Potassium and chloride channels in red blood cells, In *Single-Channel Recording*, Eds Sakmann B and Neher E. Plenum Press, New York (1985).
231. Ogawa, A., S Terada, S. Kanayama, T., Masao, M., Morikawa, M., Kimuara, T., Yamaguchi, A., Sasaki, M., Yamada, H.: Improvement of Islet Culture with Sericin, *Journal of bioscience and bioengineering* 98 (3), 217–219 (2004).
232. Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., van Beek, T.A.: Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts, *Food Chemistry* 85, 231–237 (2004).
233. Rauha, JP., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kahkonen, M., Kujala, T, Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P.: Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds, *Int. J. Food. Microbiol.* 56, 3–12 (2000).
234. Dixon, R.A., Dey, P.M., Lamb, C.J.: Phytoalexins: Enzymology and molecular biology, *Adv. Enzymol.* 55, 100-136 (1983).
235. Yamada, H: Natural products of commercial potential as medicines, *Curr Opin Biotechnol* 2, 203–210 (1991).
236. Grujić i sar.: Kvalitet i analiza namirnica, Tehnološki fakultet u Banja Luci, pp. 56 (2001).
237. Pharmacopoea Jugoslavica. Editio quarta (Ph.Jug. IV), Savezni zavod za zaštitu zdravlja, Beograd, s. 77 (1984).
238. Lepojević, Ž.: Praktikum hemije i tehnologije farmaceutskih proizvoda, Zmaj, Novi Sad, 19-20 (2000).
239. Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M.: Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods in Enzymology* 299, 152-178 (1999).
240. Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W.: The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, *Food Chemistry* 64 (4), 555-559 (1999).
241. Porter, L.J, Histich, L.N, Chan, B.G.: The conversion of procyanidins and prodelfinidins to cyanidin and delphinidin, *Phytochemistry* 25, 233–230 (1986).
242. Graham, A.D.: Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. *J Agric Food Chem* 40, 801-805 (1992).
243. Dugan, L.L., Turetsky, D.M., Du, C., Lobner, D., Wheeler, M., Almlı, C.R.: Carboxyfullerenes as neuroprotective agents, *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 9434–9439 (1997).
244. Spasojević, I., Maksimović, V., Bačić, G.: 5-Fluorouracil effects on erythrocytes in relation to its cardiotoxicity: Membrane structure and functioning, *J. Chem. Inf. Model.* 25, 1680-1685 (2005).

245. Cooper, R.A.: Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease, *N Engl J Med* 297, 371–377 (1977)
246. Vander, A., Sherman, J., Luciano, D.: *Human Physiology: the mechanisms of body functions*, McGraw Hill (1998).
247. Park, Y.J., Ahn, H.J, Chang, H.K., Kim, J.Y. Huh, K.H., Kim, S.M., Kim, Y.S.: The RhoGDI- α /JNK signaling pathway plays a significant role in mycophenolic acid-induced apoptosis in an insulin-secreting cell line, *Cellular Signalling* 21, 356–364 (2009).

8. BIOGRAFIJA



Jelena Živković je rođena 4. februara 1971. godine u Nišu. Diplomirala je na Prirodnomatematickom fakultetu u Nišu, studijska grupa Hemija 1994. godine, sa prosečnom ocenom 9,00. Iste godine počela je sa radom u Institutu za istraživanja u poljoprivredi "Srbija", Centru za vinogradarstvo i vinarstvo u Nišu kao mladi talenat, stipendista Ministarstva za nauku i tehnologiju Republike Srbije i upisala poslediplomske studije na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu na odseku Tehnologija vina.

Godine 1997. unapređena je u rukovodioca Enološke laboratorije, a 1998. godine je odbranila magistarski rad na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu pod nazivom: "Prilog poznavanju acetaldehida u vinu", mentor prof. dr Nadežda Ružić. Prosečna ocena na poslediplomskim studijama je 9,67. Maja 2002. godine je unapređena u vršioca dužnosti direktora centra. Aktivno je učestvovala i na poslovima rukovođenja Sistemom kvaliteta i akreditacije Enološke laboratorije. Kao član US-Yugoslavia Young Scientist Exchange Program u organizaciji USDA-a boravila je 6 sedmica na Texas A&M University u Americi.

Autor i koautor je 54 rada, od kojih 4 rada objavljenih u časopisu međunarodnog značaja, 11 radova na skupovima međunarodnog značaja štampanih u celini, 5 radova u vodećem časopisu nacionalnog značaja, 5 radova u časopisu nacionalnog značaja, 12 radova saopštenih na skupovima nacionalnog značaja štampanih u celini i 17 radova saopštenih na skupu međunarodnog značaja štampanih u izvodu. Autor je udžbenika, Tomin Jasmina, Živković Jelena: Praktikum iz Farmaceutске hemije, Medicinski fakultet u Nišu (2006).

Izabrana je za asistenta 01.11.2008. godine na Medicinskom fakultetu u Nišu, Odseku za Farmaciju, a od 01.12.2004. godine izvodi praktičnu nastavu iz obaveznog predmeta nastavnog plana Farmacije, Farmaceutска hemija i Farmaceutска hemija II.