



Универзитет у Нишу
Природно–математички факултет

Јелена Младеновић

**Екстракти поврћа *Allium porrum* L., *Daucus carota* L.,
Capsicum annuum L. и *Lycopersicon esculentum* Mill.:
хемијски састав, антиоксидационо, антимикумно и
антиканцерогено деловање и њихова примена**

-Докторска дисертација-

Ниш, 2014.



University of Niš

Faculty of Natural Sciences and Mathematics

Jelena Mladenović

Extracts of the vegetable species *Allium porum* L., *Daucus carota* L., *Capsicum annuum* L. and *Lycopersicon esculentum* Mill.: chemical composition, antioxidant, antimicrobial and anticarcinogenic activities, and their applications

PhD Thesis

Niš, 2014.

Ментор:

Др Блага Радовановић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу

Чланови комисије:

1. Др Милорад Цакић, редовни професор Технолошког факултета Универзитета у Нишу
2. Др Весна Николић, редовни професор Технолошког факултета Универзитета у Нишу
3. Др Дејан Марковић, редовни професор Технолошког факултета Универзитета у Нишу
4. Др Радош Павловић, редовни професор Агрономског факултета Универзитета у Крагујевцу



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Јелена Д. Младеновић
Ментор, МН:	Блага Радовановић
Наслов рада, НР:	Екстракти поврћа <i>Allium porrum</i> L., <i>Daucus carota</i> L., <i>Capsicum annuum</i> L. и <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.: хемијски састав, антиоксидационо, антимикробно и антиканцерогено деловање и њихова примена
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	српски и енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2014.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО:	6 поглавља; 120 стр.; 26 табела; 50 слика
Научна област, НО:	хемија
Научна дисциплина, НД:	Органска хемија и биохемија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	Етанолни екстракти сорте поврћа <i>Allium porrum</i> L., <i>Capsicum annuum</i> L., <i>Daucus carota</i> L. и <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., хемијски састав, фенолна једињења, HPLC анализа, антиоксидациона, антимикробна и антиканцерогена активност екстраката, анализа земљишта, инклузија кверцетина и 2-хидроксипропил-β-циклодекстрина, карактеризација.
УДК	581.192 : 635.1/.8 (615.076 + 615.277) : 635.1/.8
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	

Извод, ИЗ:

У раду је испитана биохемијска активност етанолних екстраката сорте поврћа *Allium porum* L., *Daucus carota* L., *Capsicum annuum* L., *Lycopersicon esculentum* Mill. у функцији концентрација фенолних једињења. Праћени су агрохемијски услови земљишта за гајење изабраних сорти поврћа у току 2010 и 2011 године. Хемијска анализа је извршена спектроскопским методама, а фенолни састав је одређен HPLC анализом. Редослед антиоксидативне активности екстраката испитиваних узорача поврћа је у сагласности са концентрацијама фенолних једињења: *A. porum* L. > *D. Carota* L. > *C. annuum* L. > *L. esculentum* Mill. Корелационом анализом је потврђена корелација између антиоксидативне активности испитиваних екстраката и нађених концентрација за укупне феноле (0,9739) и укупних флавоноида (0,7317). HPLC анализом је детектована највећа концентрација доминантног флавоноида – кверцетина у екстрактима стабла празилука *Allium porum* L. (4,561 mg/g). Утврђено је да код свих испитиваних екстраката антимикуробно деловање налази се у опсегу концентрација од 19,53 µg/mL до 312,5 µg/mL, што представља добру антимикуробна активност у односу на стандарних антибиотика амграсин (за бактерије) и кетоконазол (за гљиве). Испитан ниво цитотоксичности у *in vitro* условима на RD, Hep2c и L2OB ћелије је показао да етанолни екстракт празилука *Allium porum* L. испуњава NC1 критеријум и то у концентрацијама од 100 µg/mL, где за 50 % смањује преживљавање туморских ћелија. Због потенцијалне примене у фармацији извршено је инклудовање кверцетина, као доминантне фенолне компоненте у испитиваним екстрактима са 2-хидроксипропил-β-циклодекстрином. Карактеризација насталог инклузионог комплекса је извршена FT-IC-ом, ¹H NMR-ом и дифракционом XRD анализом. Његова фотостабилност је испитана на 300 nm, применом фотохемијског реактора са UV-B лампама.

Датум прихватања теме, ДП: 24.9.2012.

Датум одбране, ДО: }

Чланови комисије, КО: Председник:
Члан:
Члан, ментор:

Образац Q4.09.13 - Издање 1



ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Jelena D. Mladenović
Mentor, MN :	Blaga Radovanović
Title, TI :	Extracts of the vegetable species <i>Allium porrum</i> L., <i>Daucus carota</i> L., <i>Capsicum annuum</i> L. and <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.: chemical composition, antioxidant, antimicrobial and anticarcinogenic activities, and their applications
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	1998
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	6 chapters; 120 pages; 26 tables; 50 figures
Scientific field, SF :	Chemistry
Scientific discipline, SD :	Organic Chemistry and Biochemistry
Subject/Key words, S/KW :	Ethanollic extracts of the vegetable species <i>Allium porrum</i> L., <i>Capsicum annuum</i> L., <i>Daucus carota</i> L., and <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., chemical composition, phenolics, HPLC analysis, antioxidant, anti-microbial and anti-cancer activity of the extracts, soil analysis, the inclusion of quercetin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, characterization.
UC	581.192 : 635.1/.8 (615.076 + 615.277) : 635.1/.8
Holding data, HD :	library
Note, N :	

Abstract, AB :	This thesis examined the potential biochemical activity of ethanolic extracts from the vegetable species <i>Allium porum</i> L., <i>Daucus carota</i> L., <i>Capsicum annuum</i> L., and <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. for the concentration of phenolic compounds. Agrochemical properties of the soil used for the cultivation of the selected vegetable varieties were monitored in 2010 and 2011; Chemical analysis is performed by spectroscopic methods, a phenolic composition was determined by HPLC analysis. The antioxidant activity of the test plant extracts was found to be in the following order: <i>A. porrum</i> L. > <i>D. Carota</i> L. > <i>C. annuum</i> L. > <i>L. esculentum</i> Mill., corresponding clearly with the concentrations of phenolic compounds. Correlation analysis showed a good correlation between antioxidant activity and total phenolic (0.9739) and flavonoid (0.7317) contents. HPLC analysis detected the highest concentration of dominant flavonoids - quercetin in extracts of leek <i>Allium porrum</i> L. stem (4.561 mg/g). The measured values for the antimicrobial activity of the test extracts were in the concentration range of 19.53-312.5 µg/mL, suggesting good antimicrobial activity compared to the standard antibiotic amracin (against bacteria) and ketoconazole (against fungi). Cytotoxicity to <i>RD</i> , <i>Hep2c</i> and <i>L2OB</i> cells under <i>in vitro</i> conditions was assessed. Results suggest that the <i>NCI</i> criterion was satisfied only by the ethanolic extract of <i>Allium porrum</i> L. at a concentration of 100 µg/mL, with a 50% reduction in tumor cell survival. Because of potential applications in the pharmaceutical inclusion quercetin was performed, as a predominant component in the phenolic extracts tested with the 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin. Characterization of the inclusion complex formed is performed FT IC, ¹ H NMR analysis and XRD diffraction. Its fotostavilnost was assayed at 300 nm, using the photochemical reactor with a UV-B lamps.
Accepted by the Scientific Board on, ASB :	24.9.2012.
Defended on, DE :	
Defended Board, DB :	President: Member: Member, Mentor:

Образац Q4.09.13 - Издање 1

Ова докторска дисертација је рађена у лабораторији Природно-математичког факултета у Нишу, лабораторијама Технолошког факултета у Лесковцу, Универзитета у Нишу, биохемијској лабораторији Агрономског факултета у Чачку, Универзитета у Крагујевцу, Института за Мултидисциплинарна истраживања, Универзитета у Београду и Института за вирусологију, вакцине и серуме (Торлак) у Београду

*Пријатна ми је дужнос да, пре свега, изразим захвалност свом ментору
Проф. др Благи Радовановић за предложену тему ове докторске
дисертације, као и члановима комисије за помоћ при њеној реализацији.
За неизмерну подршку и велико разумевање захваљујет се својој породици,
пријатељима и колегама*

Скраћенице:

AAS- атомски апсорпциони спектрофотометар

ALP – алкална фосфатаза

ALT – аланин аминотрансфераза

AST - аспартат аминотрансфераза

ATCC – American Type Culture Collection

ATP – аденозин трифосфат

CAT – каталаза

CFU – colony-forming units

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO – диметилсулфоксид

DNK – деоксирибонуклеинска киселина

DPPH - 1,1-дифенил-2-дипикрилхидразил радикал

DTT – дитиотритол

ECACC – European Collection of Cell Cultures

FT IC– Инфрацрвена спектрофотометрија са Fourier-ovom трансформацијом

GPx - глутатион пероксидаза

GR – глутатион редуктаза

GST – глутатион

¹H-NMR– нуклеарна магнетна резонанца

HPLC – течна хроматографија високих резолуција (раздвајања)

HPβ-CD – 2-хидроксипропил β-циклодекстрин

LC₅₀ - концентрација која убија 50% ћелија

LDH – лактат дехидрогеназа

MDK - максимално дозвољена количина

MEM – Minimum Essential Medium

MHB – Mueller Hinton buljon

MIC – минимална инхибиторна концентрација

MS – масена спектроскопија

MTT - [3-(4,5-диметилтиазол-2-ол)-2,5-дифенилтетразолијум бромид]

NADPH – никотинамид динуклеотид фосфат (редуковани облик)

NCCLS – The National Committee for Clinical Laboratory Standards

OD – оптичка густина

RNK – рибонуклеинска киселина

XRD –дифракција X-зрака

САДРЖАЈ

1. УВОД	2
2. ОПШТИ ДЕО	4
2.1. Увод.....	5
2.2. ОСНОВНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ПОВРЋА.....	6
2.2.1. Хемијски састав поврћа.....	7
2.2.2. Значај поврћа.....	8
2.2.3. Основне карактеристике испитиваних врста поврћа.....	9
2.2.3.1. Парадајз (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.).....	9
2.2.3.2. Паприка (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	10
2.2.3.3. Мрква (<i>Daucus carota</i> L.).....	11
2.2.3.4. Празилук (<i>Allium porrum</i> L.).....	12
2.3. СЕКУНДАРНИ МЕТАБОЛИТИ БИЉАКА.....	13
2.3.1. Фенолна једињења.....	15
2.3.2.1. Фенолне киселине.....	17
2.3.2.2. Флавоноиди.....	18
2.3.2.2.1. Биосинтеза флавоноида.....	20
2.3.3. Антиоксидациона активност фенолних једињења.....	25
2.3.3.1. Полифенолна једињења у људској исхрани.....	27
2.3.4. Биохемијска активност испитиваних врста поврћа.....	28
2.4. ИНКЛУЗИОНИ КОМПЛЕКСИ ФЕНОЛНИХ ЈЕДИЊЕЊА СА ЦИКЛОДЕКСТРИНИМА.....	29
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	31
3.1. МАТЕРИЈАЛ И АПАРАТУРА.....	32
3.1.1. Хемикалије и реагенси.....	32
3.1.2. Апаратура.....	32
3.1.3. Биљни материјал.....	33
3.1.3.1. Основне карактеристике испитиваног хибрида парадајза Сеф Ф ₁	33
3.1.3.2. Основне карактеристике паприке сорте Дора.....	33
3.1.3.3. Основне карактеристике мркве сорта Нантес СП-80.....	34
3.1.3.4. Основне карактеристике празилука сорта Шампион.....	34
3.2. МЕТОДЕ АНАЛИЗЕ.....	34
3.2.1. Методе анализе земљишта.....	34
3.2.1.1. Одређивање активне киселости земљишта.....	34
3.2.1.2. Одређивање супституционе киселости земљишта.....	34
3.2.1.3. Одређивање слободног СаСО ₃ у земљишту.....	35
3.2.1.4. Одређивање садржаја хумуса земљишта.....	35
3.2.1.5. Одређивање садржаја укупног азота у земљишту применом <i>Kjeldahl</i> -ове методе.....	35
3.2.1.6. Одређивање садржаја амонијум лактатног Р ₂ О ₅ и К ₂ О земљишта применом <i>Egner-Riehm</i> - ове методе.....	35
3.2.1.7. Одређивање садржаја калцијума и магнезијума у земљишту.....	36
3.2.1.8. Одређивање нитратног азота у земљишту.....	36
3.2.2. Методе анализе хемијског састава поврћа.....	36
3.2.2.1. Одређивање укупне суве материје.....	36
3.2.2.2. Метода одређивања протеина применом <i>Kjeldahl</i> -ове методе.....	36
3.2.2.3. Метода одређивања угљених хидрата по <i>Bertran</i> -у.....	37
3.3. АНАЛИЗА УЗОРАКА ПОВРЋА.....	37
3.3.1. Екстракција узорака испитиваних врста поврћа.....	37
3.3.1.1. Припрема узорака.....	37
3.3.1.2. Екстракција узорака у <i>Soxlet</i> – овом апарату.....	37
3.3.1.3. Ултразвучна екстракција узорака.....	38
3.3.2. Одређивање садржаја укупних фенолних једињења у испитиваним екстрактима поврћа.....	38
3.3.3. Одређивање садржаја флавоноида у испитиваним екстрактима поврћа.....	38
3.3.4. Одређивање фенолних једињења у испитиваним екстрактима поврћа применом <i>HPLC</i> анализе.....	39
3.3.5. Одређивање антиоксидационе активности испитиваних екстраката поврћа у <i>in vitro</i> условима.....	40
3.3.5.1. Одређивања укупног антиоксидационог капацитета испитиваних екстраката поврћа.....	40
3.3.5.2. Одређивање антиоксидативне активности <i>DPPH</i> методом.....	41
3.3.6. Одређивање антимикуробне активности испитиваних екстраката поврћа у <i>in vitro</i> условима.....	42
3.3.6.1. Засејавање култура на косу чврсту подлогу.....	42
3.3.6.2. Припремање суспензије (инокулума) спора одређене концентрације.....	43

3.3.6.3. Одређивање антимикуробне активности испитиваних екстраката поврћа микродилуционом методом у <i>in vitro</i> условима.....	44
3.3.7. Одређивање цитотоксичне активности испитиваних екстраката поврћа варијабилним МТТ тестом у <i>in vitro</i> условима.....	45
3.4. ИНКЛУЗИОНО КОМПЛЕКСИРАЊЕ КВЕРЦЕТИНА СА 2-ХИДРОКСИПРОПИЛ-β-ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ	46
3.4.1. Припрема физичке смеше и инклузионог комплекса	46
3.4.2. Методе за испитивање фотостабилности инклузионог комплекса кверцетина: HP- β -CD.....	46
3.4.2.1. Испитивање фотостабилности инклузионог комплекса кверцетин: HP- β -CD применом HPLC анализе	46
3.4.2.2. Праћење фотостабилности инклузионог комплекса кверцетин: HP- β -CD применом фотохемијског реактора	46
3.4.3. Методе карактеризације инклузионог комплекса кверцетин: HP- β -CD.....	47
3.4.3.1. FT-IC спектроскопска карактеризација инклузионог комплекса кверцетин: HP- β -CD	47
3.4.3.2. ¹ H-NMR карактеризација инклузионог комплекса кверцетин: HP β -CD.....	47
3.4.3.3. Рентгено структурна (X- ray) карактеризација инклузионог комплекса кверцетин: HP- β -CD.....	48
3.5. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА	48
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	49
4.1. АНАЛИЗА АГРОЕКОЛОШКИХ УСЛОВА ГАЈЕЊА ПОВРЋА	50
4.2. АНАЛИЗА ХЕМИЈСКОГ САСТАВА ИСПИТИВАНИХ ЕКСТРАКАТА ПОВРЋА	52
4.3. ОПТИМАЛНИ УСЛОВИ ЕКСТРАКЦИЈЕ ИЗАБРАНИХ СОРТИ ПОВРЋА	55
4.4. АНАЛИЗА ФЕНОЛНИХ ЈЕДИЊЕЊА ИЗАБРАНИХ СОРТИ ПОВРЋА	56
4.4.1. Спектроскопска анализа укупних фенола и флавоноида у испитиваним екстрактима поврћа ...	56
4.5. HPLC АНАЛИЗА ФЕНОЛНИХ ЈЕДИЊЕЊА У ИСПИТИВАНИМ ЕКСТРАКТИМА ПОВРЋА	60
4.6. АНТИОКСИДАЦИОНА АКТИВНОСТ ИСПИТИВАНИХ ЕКСТРАКАТА ПОВРЋА	69
4.7. АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ ИСПИТИВАНИХ ЕКСТРАКАТА ПОВРЋА	73
4.8. АНТИКАНЦЕРОГЕНА АКТИВНОСТ ИСПИТИВАНИХ ЕКСТРАКАТА ПОВРЋА.....	77
4.9. ПОТЕНЦИЈАЛНА ПРИМЕНА ФЕНОЛНИХ КОМПОНЕНАТА ИСПИТИВАНИХ ЕКСТРАКАТА ПОВРЋА	79
4.9.1. Фотостабилност инклузионог комплекса кверцетин:2-хидроксипропил- β -циклодекстрина.....	80
4.9.2. Спектроскопска карактеризација комплекса кверцетина:2-хидроксипропил - β -циклодекстрина	82
5. ЗАКЉУЧАК.....	89
6. ЛИТЕРАТУРА.....	94
SUMMARY	107
БИОГРАФИЈА	108

„Храна треба да буде лек, а лек – храна“

Хипократ

1. УВОД

Повезаност човека и биљака дотира од његовог постанка. Користио их је из свог окружења у почетку инстиктом, а затим својим искуством. Осим примене у исхрани констатовао је и њихову лековиту вредност. Овакав аспект примене биљака развијао се кроз цивилизације и у данашње време прерастао у посебну грану медицинских наука, односно алтернативну медицину и фитофармацију. Много биљака, претежно воће и поврће су предмет изучавања неколико научних дисциплина са циљем да се користе као фармаколошки ресурси и омогуће добијања нових синтетичких лекова (*Della Loggia, 2000*). Познато је да различите активне компоненте изоловане из биљака се користе као ксенобиотици, антибиотици, антикоагуланти, антинеопластици, антиинфективни, антимулагени, хепатопротекторни, антиалергијски и цитотоксични лекови, као инхибитори ензима, антикоагуланси итд. (*Chun-Mao Lin u cap., 2002; Gündüz u cap., 2008*). Данас се зна да 60% антиинфективних агенаса које се налазе на тржишту, су супстанце природног порекла (*Rates, 2001*).

Различите врсте поврћа које се користе у исхрани свакодневно, садрже различите активне компоненте које имају биолошко деловање. Између осталих, сматра се да фенолна једињења могу да представљају могућу циљну групу са антиоксидативним и антимикуробним својствима, која учествују у инхибицији оксидације и врше заштиту организма (*Kähkönen u cap., 1999*).

Полазећи од наведених чињеница и сам циљ истраживања у оквиру ове докторске дисертације био је испитивање фенолног састава, антиоксидационог, антимикуробног и антиканцерогеног деловања екстраката одабраних врста поврћа: *Allium porrum* L., *Daucus carota* L., *Capsicum annuum* L. и *Lycopersicon esculentum* Mill., произведена у Централној Србији, Моравички округ, општина Чачак. Такође, у раду је испитан и хемијски састав земљишта на коме је поврће гајено. Због могућности практичне примене у фармацеутској и прехранбеној индустрији, испитана је и инклузиона способност неких фенолних компонената које су доминантне у испитиваним екстрактима са циклодекстринским носачима.

2. ОПШТИ ДЕО

2.1. Увод

Фенолна једињења са антиоксидативним особинама представљају значајну компоненту која доприноси благотворном деловању воћа, поврћа и других биљних врста на људско здравље. Њихова способност да утичу на болести које су повезане са оксидативним стресом до данас још увек није довољно разјашњена (*Hollman u cap., 1995; Halliwell u Gutteridge, 1999; Štefan u cap., 2007*).

Са фармаколошког становишта, фенолна једињења поседују широк спектар фармаколошке активности, као што је: антиоксидативна, антибактеријска, антиинфламаторна, антиалергијска, антимулагена, антивирусна, антинеопластична, анти тромботична и др. Посебна пажња се посвећује њиховом потенцијалу у заштити и превенцији од кардиоваскуларних и канцерогених болести, с обзиром да епидемиолошке студије указују да поседују протективни ефекат у односу на развој ових болести (*Basile u cap., 2000; Croft, 1999; Keli u cap., 1996; Lea u Leegod, 1999*).

Тако на пример, у појединим истраживањима је утврђено да већи унос кверцетина и катехина утиче на нижи морталитет од коронарних болести, док повећани садржај камферола, нарингенина и хисперидина у исхрани утиче на смањење цереброваскуларних оболења (*Halliwell, 1995; Kujundžid, 2002; Moyer u cap., 2005*).

Познато је да катехин и деривати катехина, олигомерни проантоцијанидини и кверцетин користе се у превенцији и лечењу канцера, астме, болести јетре и катаракте. Такође, утврђено је смањење појаве дијабетеса типа 2 уколико се у исхрани уносе већи садржаји кверцетина и мирицетина (*Lampberth, 2004*).

Биљке су носиоци различитих група биолошки активних једињења и са аспекта фармацеутске примене, посебну важност чине њихови екстракти. Процес екстракције је веома битан и може се извршити различитим поступцима са задатком да се не мења хемијски састав полазног биљног материјала и да се добије оптимални принос. Екстракти биљака који се користе у фармацији добијају се екстракцијом етанола и могу да садрже до 70% сувог остатка (*Kumpulainen, 2001*). Ови екстракти су комплексне смеше различитих органских једињења, између осталих и полифенолних једињења, која настају реакцијама секундарног метаболизма биљака и највећи број њих испољава различите видове биохемијске активности.

Од биљних екстаката формулисано је више од 70% лекова које се користе у традиционалној медицини и више од 50% лекова који се користе у класичној медицини. Конкретно у терапији канцера користи се преко 60% лекова који су базирани на биљним

продуктима, тј. њиховим секундарним метаболитима (*Gharavi u cap., 2007*).

Последњих година интензивно се испитују полифенолна једињења природног порекла због њихових антиоксидативних, антиинфламаторних, антимулагених, антиканцерогених, антибактеријских, вазодилаторних особина, антипролиферативних и антивиралних својстава као и њихове способности да мењају функцију неких кључних ћелијских ензима (*Chun-Mao, 2002*).

Полифенолна једињења спадају, заједно са α -токоферолом и β -каротеном, у групу неензимских антиоксиданата. Антиоксидативна активност ових једињења резултат је њихове способности да се понашају као доноси водоника, уз формирање стабилног феноксил радикала (*Tandon u cap., 1995*).

Полифенолни антиоксиданти и друга једињења са антиоксидативним дејством, присутни у биљним препаратима врше неутрализацију слободних радикала због чега су значајни у превенцији (*Arts u cap., 2000; King u cap., 1962; Mladenovic u cap., 2011; Radovanovic u cap., 2012; Shahidi, 1992; Takasaki u cap., 1995; Yan u cap., 2006*).

2.2. Основне карактеристике поврћа

Биљни свет карактерише огроман број различитих врста, од којих се у поврће убраја 1200 врста, а гаји се око 600 врста. У нашој земљи у производњи је заступљено око 50 врста поврћа, од тога највећи привредни значај има око 25 врста, док се остале гаје на појединим локалитетима на мањим површинама у баштенској производњи (*Ђуровка, 2008*). Увођење нових врста у производњу ограничено је агроколошким условима гајења, традицијом, ниском продуктивношћу, тржиштем и профитабилношћу производње. Поврће чини велики број врста код којих се за исхрану користе различити биљни органи и вегетативни и генеративни од корена до семена, било у свежем стању или у виду разних прерађевина.

Поврће се може делити на више начина, али је најважнија подела према употребној вредности, односно јестивим деловима и органима биљке који се користе у исхрани. На основу ове поделе поврће је сврстано у неколико групација, и то:

1. *Плодовито поврће*, код којих се плод користи у исхрани, у које спадају: Парадајз, паприка, плави патлиџан, краставац, лубеница, диња, тикве, грашак, боранија, бамија, кукуруз шећерац.
2. *Лиснато поврће*, код ове групе поврћа у исхрани се користе листови као појединачни и/или сакупљени у розету, односно главицу. Изузетно код купусњача

карфиола, броколе и артичоке у исхрани се користи цваст, а код келерабе и задебљали део стабла (јабучица). У ову групу се убрајају: Купуси, кељ, кељ пупчар, карфиол, брокола, келераба, салате, спанаћ, ендивија, блитва, першун и целер лишћар, мирођија, артичока, радич-цикорија, маслачак, зеље.

3. *Луковичасто поврће*, представља лукове повртарске врсте са најширим ареалом распрострањености, код којих се у исхрани користи лист у младом стању биљке, лажно стабло и касније луковица као подземни орган, где се депонују хранљиве материје. Овде спадају: Црни лук, бели лук, празилук, аљма, влашац, сремуш.
4. *Коренасто-кртоласто поврће*, код ових врста поврћа у исхрани се користи подземни део, односно задебљали корен или стабло у којима се акумулирају резервне хранљиве материје. У ову групацију се убрајају: Мрква, першун, паштрнак, целер, цвекла, роткве, ротквица, кромпир, чичока, рен, шпаргла.

2.2.1. Хемијски састав поврћа

Поврће је разноврсно по свом хемијском саставу, али основни елементи сваког биљног организма, а тиме и поврћа су угљеник, кисеоник и водоник. Релативно ниска енергетска вредност поврћа, огледа се у изузетно малим количинама масти и значајним количинама угљених хидрата и беланчевина.

У поврћу је присутан комплекс шећера (глукоза,сахароза, фруктоза) скроб и др. сложених угљених хидрата. Поврће у себи садржи есенцијалне састојке за људски организам, тј. важни и незаменљиви комплекс материја у биолошком смислу које се не могу у организму продуктовати из неких других намирница. У такве есенцијалне материје спадају: витамини (С, В, каротен); минералне соли алкалне реакције, које у организму одржавају киселинско-алкалну равнотежу; низ органских једињења (јабучна, винска, лимунска киселина, фенолна једињења); ензими који стварају оптималну средину неопходну за функционисање целокупног организма.

Многе врсте поврћа не заостају за хлебом и млеком по садржају беланчевина, што је важно при оцењивању њихове протеинске вредности. Сматра се да поврће, нарочито у свежем стању, представља важан извор витамина. У поврћу највише има витамина С (у паприци, купусу, спанаћу, кељу, келераби, кромпиру, лиснатом поврћу). Паприка је велики извор витамина С (чили паприка има 140 mg/100g витамина С). Поврће је богато витамином А, нарочито га има у кељу, спанаћу, мркви, парадајзу, зеленој салати, купусу,

целеру и витамином В, кога у највишим концентрацијама има у кељу, купусу, спанаћу, грашку, кромпиру, парадајзу. Поред ових витамина у поврћу се налазе и витамин Е и К и извесна мала количина витамина D. Значај витамина је у томе што су они неопходни за одржавање нормалног здравља у доба развоја и раста организма. Витамини су потребни у малим количинама, али њихов недостатак изазива различите поремећаје у организму као што је авитаминоза (www.zdravaishrana.net).

У многим врстама поврћа налазе се знатне количине органских киселина (јабучна, лимунска, винска и др.) и алкалне соли. Поврће својим органским киселинама и алкалним солима регулише кисело – алкалну равнотежу организма, која је потребна за нормалан рад ћелија.

У поврћу се налазе и етерска уља и гликозиди. Те материје делују вишеструко: поправљају укус хране, надражују органе за варење, тако да постају активнији, освежавају и делују дијететски. Важан део поврћа су целулоза, хемицелулоза, пектинске и друге сложене угљено-хидратне компоненте, које због своје волуминизности обезбеђују ситост организма (www.brendovisrbije.com).

2.2.2. Значај поврћа

Највећу биолошку и нутритивну вредност има свеже поврће, првенствено као извор витамина и минералних материја. Поврће не изазива битније подизање шећера у крви, не доприноси претварању угњених хидрата у масти и повећању телесне тежине.

Иако је значај поврћа у исхрани дуго био потцењиван, он је порастао открићем улоге витамина и минералних соли. Свакодневним конзумирањем довољне количине поврћа обезбеђује се нормалан раст, развој и функционисање људског организма. У исхрани не треба узимати исту врсту поврћа током дужег времена, већ треба тежити разноврсној биљној храни, којом се обезбеђују све потребне минералне соли, витамини и биокатализатори. Савремена наука о исхрани сматра да је неопходно да дневни оброк човека обухвата 400 – 500 g разног поврћа, што препоручује и Светска здравствена организација. У нашој земљи употреба поврћа по глави становника је недовољна и износи око 150 g и поред чињенице да смо познати као произвођачи поврћа код нас потрошња поврћа још увек има сезонски карактер (www.siepa.sr.gov.yu).

У савременој медицини се сматра да се неке врсте поврћа могу употребљавати као лековита средства, и то директно, или се из њих издвајају активни састојци од којих се справљају извесни лекови. Међу лековите биљке спадају: бели лук, рен, сремун, паприка, плави патлиџан, першун и друге (www.zdravaishrana.net).

2.2.3. Основне карактеристике испитиваних врста поврћа

2.2.3.1. Парадајз (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Парадајз је једна од економски најзначајнијих повртарских врста, са веома широким ареалом распрострањености. У условима континенталне климе парадајз је једногодишња зељаста дикотиледона биљка, припада групи пловоитог поврћа и фамилији *Solanaceae*. Порекло парадајза везано је за приобалну андску зону која обухвата Перу, Еквадор и Чиле одакле је мигрирао у Мексико где је доместификован и након открића Америке пренет у Европу, а у наше крајеве стиже преко Италије и Турске.

У зависности од раста стабла, постоје различити типови од ниских до високих биљака чија се висина креће од 50 cm па до неколико метара.

Парадајз плодове формира сукцесивно на цветним гранчицама, које се јављају на интернодијама по висини стабла. Плод је орган који се користи у исхрани и који у ботаничком смислу представља сочну бобицу различите величине, облика и грађе, све у зависности од сорте. Према наводима (*Павловић, 1997*) маса плода код већине сорти претежно се креће од 100-200 грама са варирањем до 1 грама код дивљих сродника, па чак и до 1 Kg код сорти изразито крупних пловоа. Облик плода креће се од пљоснатог преко округластог, издужено цилиндричног, крушкастог и шљиволиког, па чак и до коцкастог облика, који се ретко среће. Унутрашњост плода испуњена је са 2-10 комора, где се налази и плацента са семеном. Сорте ситнијих пловоа имају глатку површину, а код крупноплодох сорти она може бити и ребраста. Плод је најчешће црвене боје покожице, затим ружичасте, жуто наранџасте, а куриозитет је и појава црне боје пловоа.

Хранљива улога парадајза првенствено се огледа у његовим лековитим особинама, садржи антиоксидансе који делују на слободне радикале и спречавају њихово штетно деловање на људски организам (*Младеновић и сар., 2014; Ђуровић и сар., 2011*). Пловои парадајза представљају једини извор ликопена, а са својим богатством садржаја каротиноида (β -каротен, ликопен), витамина (посебно витамин C), минерала, флавоида и фенолне киселине, утичу на пролиферацију канцерогених ћелија, а делују превентивно и на

кардиоваскуларне болести, па се за парадајз сматра да је "чувар" срца и крвних судова. Ликопен је један од каротеноида који природно представља боју плодова парадајза, лако се асимилира у организму и спада у најјаче антиоксидансе у односу на све каротеноиде и може предупредити оштећења ћелија које су последица инфракта и рака.

Великој улози парадајза у светским размерама доприноси и податак да се његова потрошња статистички евидентира у 164 земље света и да је друга најпродаванија намирница на светском тржишту, одмах иза банана (*Здравковић и сар., 2012*).



Слика 1. Парадајз (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

2.2.3.2. Паприка (*Capsicum annuum* L.)

Паприка представља веома важну повртарску врсту због високе хранљиве и биолошке вредности и многостране употребе у исхрани и прерађивачкој индустрији, са великим привредним значајем за нашу земљу. Води порекло из тропских делова Америке, типична је топлољубива врста, а у нашим климатским условима узгаја се као једногодишња култура. Припада групацији плодовитог поврћа и фамилији *Solanaceae* са великом заступљеношћу у производњи и на отвореном пољу и у заштићеном простору.

Плод паприке у ботаничком смислу је полусочна бобица, богат угљеним хидратима посебно глукозом и органским киселинама (јабучна и лимунска), од чијег односа зависи и сам укус плодова. Поред тога садржи значајне количине витамина С и В групе и висок проценат минералних соли.

Плод паприке по својој биолошкој вредности, сврстава се међу најквалитетније поврће, користи се у свежем стању или прерађен топлим и/или хладним поступком. Плод је различитог облика боје и величине глатке или наборане површине у зависности од сорте (*Гвозденовић, 2004*).



Слика 2. Паприка (*Capsicum annuum* L.)

2.2.3.3. Мрква (*Daucus carota* L.)

Мрква води порекло од дивљих форми које расту као самоникли коров у областима средње Европе и западне Азије одакле се њено гајење као културне форме проширило по целом свету, са највећим површинама у Кини и Русији. Ботанички мрква је двогодишња врста, у првој години образује лисну розету и задебљали корен који се користи у исхрани, а у другој години генеративне органе цвет, плод и семе.

Мрква има широку и разноврсну употребу у исхрани људи, као корисно и здраво поврће богато витаминима и минералним солима. У исхрани се користи задебљали корен мркве током читаве године у свежем стању или прерађен сушењем као зачин, замрзнут, конзервисан, у виду сокова, као дечија храна или у козметици. Корен је велике хранљиве вредности садржи доста шећера, витамина и минералних метерија, посебно калијума, калцијума, гвожђа и бора.

У погледу витаминског састава посебну улогу има богатство витамина β -каротена и витамина Е, витамина В₁ и В₂ и др. Последњих година све већи значај у исхрани добијају и мркве других боја корена, осим наранџасте, као што су жута, роза, црвена, љубичаста и црна. Они су извор и у њима се налази право богатство бојених материја антоцијана, ликопена, каротена, као и значајне количине витамина С и Е, пектина, лигнина и хемицелулозе. Поред наведеног велики значај корена огледа се и у садржају етарских уља, која мркви дају карактеристичан укус и мирис (Павловић, 2002).



Слика 3. Мрква (*Daucus carota* L.)

2.2.3.4. Празилук (*Allium porrum* L.)

Празилук је пореклом из области Средоземља и веома је стара цењена биљка још код старих народа због своје хранљивости и лековитости. Његов значај у исхрани највише се огледа у периоду коришћења током читаве зиме и пролећа, када нема другог свежег поврћа и када представља драгоцен извор витамина и минералних материја.

Празилук је специфичног нежног укуса са високим садржајем каротена и витамина С, који се повећава (и до 50%) чувањем током зиме, јер се акумулирају у лажно стабло. Празилук је типична двогодишња биљка код које се у исхрани користе листови и "лажно стабло" испод њих, који се формирају у првој години, док се у другој години образују генеративни органи и семе (Поповић, 1991).



Слика 4. Празилук (*Allium porrum* L.)

2.3. Секундарни метаболити биљака

Биолошки активна једињења се налазе скоро у свим деловима биљних органа: листа, цвета, семена, корена и плода. Примарни метаболити у биљкама утичу на структурну функцију саме биљке, док секундарни метаболити утичу на међућелијско функционисање биљке и репродукцију унутар биљке (*Cliford, 1999; Хартман, 2007*).

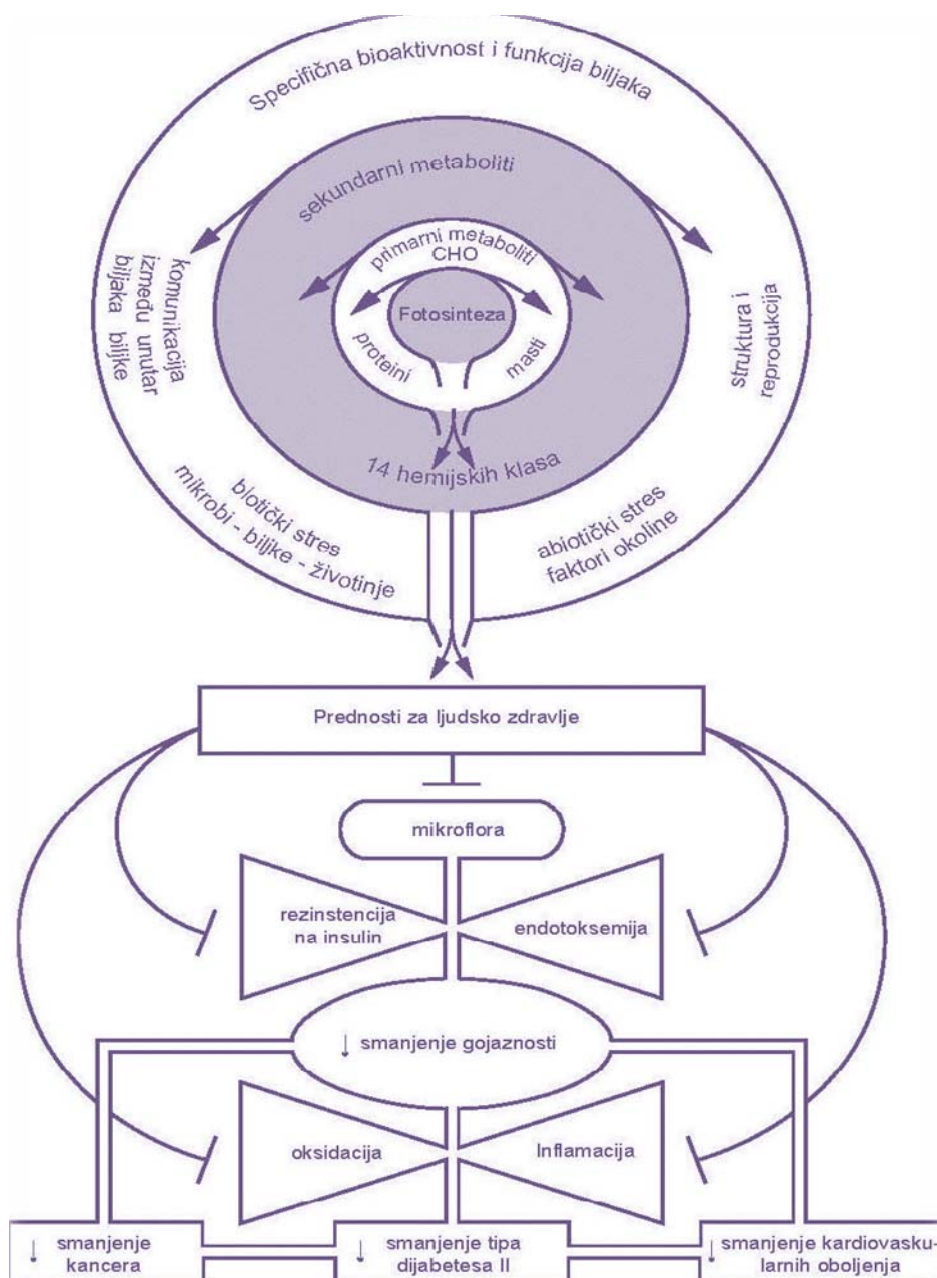
У примарне метаболите биљака спадају: угљени хидрати, масти, нуклеинске киселине и протеини (*WCRF/AICR, 2008*).

Секундарни метаболити биљака могу се сврстати у четрнаест основних класа једињења (табела 1) и претпоставља се да постоји преко 200.000 хемијских структура које синтетишу биљке (*Wink, 2003*).

Табела 1. Класе секундарних метаболита

Класа
1.Алкалоиди
2.Амини
3.Цијаногени гликозиди
4.Дитерпени
5.Флавоноиди
6.Глукоинолати
7.Монотерпени
8.Непротеинске аминокиселине
9.Фенилпропани
10. Полиацетилени
11. Поликетони
12. Сесквитерпени
13.Тертратерпени
14. Тритерпени, сапонини, стероли

Принцип деловања секундарних метаболита је приказан на слици 5:



Слика 5. Интеграција метаболита биљака у превенцији хроничних обољења (Wink, 2003)

Биљке везују угљендиоксид током процеса фотосинтезе и користе угљеник за синтезу примарних и секундарних метаболита. С обзиром на то да примарни метаболити, на пример, угљени хидрати, протеини и липиди, обезбеђују структурне и функционалне компоненте биљкама, секундарни метаболити се користе за комуникацију, репродукцију, одбрану, итд. Највише хроничних обољења на које могу утицати примарни и секундарни метаболити биљака су: канцер, кардиоваскуларна обољења, дијабетес и гојазност,

обољења која изазивају 60% леталног исхода у свету. На патогенезу ових обољења утичу метаболички процеси који зависе од биљних метаболита: метаболизам глукозе, хронична инфламација, повећана ћелијска оксидација и хронична ендотоксемија (*Thomson и Thomson, 2010*).

2.3.1. Фенолна једињења

Фенолна једињења представљају широко распрострањену хетерогену групу секундарних биљних метаболита и једну од најважнијих класа природних антиоксиданаса. То су супстанце које у структури имају један или више ароматичних прстенова са једном или више хидроксилних група и обично се деле на фенолне киселине, флавоноиде, стилбене, кумарине и танине (*Liu, 2004; Verrmeris и Nicholson, 2006*).

Фенолна једињења могу бити у слободном облику или чешће у облику гликозида са различитим шећерним остацима или у облику комплекса са органским киселинама, аминима, липидима, угљеним хидратима и другим полифенолним једињењима. За биолошку активност је заслужан искључиво агликонски део молекула.

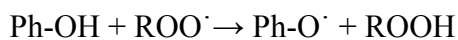
Фенолна једињења у биљкама нису равномерно распоређена на нивоу ткива, ћелијском и субћелијском нивоу. Нерастворни феноли су саставни део ћелијског зида, док се растворни феноли налазе унутар ћелијских вакуола. На нивоу ткива, површински слојеви садрже већи ниво фенола од оних који се налазе у њиховим средишњим деловима. Феноли ћелијског зида, као што су лигнини и хидроксициметна киселина, повезани су различитим ћелијским компонентама. Ова једињења доприносе механичкој отпорности ћелијског зида, имају регулаторну улогу у расту и морфогенези биљке, као и у реакцији на стрес и патогене (*Izhaki, 2002; Naczk, 2004*).

Акумулација полифенолних једињења у биљкама варира у зависности физиолошког стања биљке (*Biswas и сар., 2009; Bravo, 1998; Macheix и сар., 1990; Harborne, 1994*). Бројна истраживања потврђују да је концентрација полифенолних једињења мања у зрелом плоду, осим код црвених плодова код којих се флавоноиди и антоцијани акумулирају на крају сазревања (*Britton, 1983; Macheix и сар., 1990*).

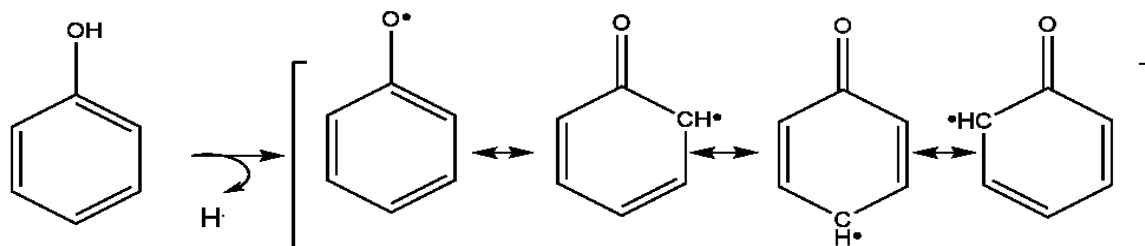
У биљним организмима полифеноли обављају низ функција које имају велики утицај на екофизиологију биљака: делују као антиоксиданси, антимикуробни агенси, фоторецептори, визуелни атрактанти неких инсеката важних за опрашивање цветова, као заштита биљних ткива од прекомерног UV-зрачења (*Fang и сар., 2002; Heim и сар., 2002; Pietta, 2000*).

Природни извори полифенолних једињења могу бити зачинско и лековито биље, воће, грожђе, поврће, житарице, цвеће и њихови производи (*Naczk и Shahidi, 2006*).

Полифенолна једињења се сматрају најзначајнијим једињењима који поседују антиоксидативну активност, као резултат њихове способности да буду донори водоника слободним радикалима (нпр. у реакцији оксидације липида) након чега настају мање реактивни феноксил радикали:



Релативно велика стабилност феноксил радикала се објашњава делокализацијом електрона (слика 6):



Слика 6. Стабилизација феноксил радикала резонанцијом (Heijnen, 2001)

Стабилизација феноксил радикала могућа је и његовим купловањем са слободнорадикалским врстама карактеристичним за реакције оксидације липида, при чему настају релативно стабилне нерадикалске врсте (Duh *u cap.*, 1999).

Да би се полифенолна једињења дефинисала као антиоксиданси морају да задовољавају два основна услова:

1. Први услов је да присутни у малим концентрацијама у субстрату могу да одложе, успоре или спрече деловање слободних радикала (Halliwell *u Gutteridge*, 1995) и
2. Други услов је да новонастали радикал (радикал настао након деловања антиоксиданса) мора да буде стабилан (Shahidi *u Wanasudara*, 1992).

Полифенолна једињења у односу на антиоксидативно деловање су мултифункционална, што значи да делују као редукујући агенси, донори водоника и имају способност хелирања метала (Rice *u cap.*, 1995).

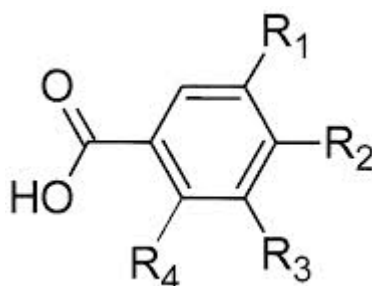
Полифенолна једињења обухватају велику групу једињења различите структуре, али у екстрактима поврћа најзаступљеније су фенолне киселине и флавоноиди.

2.3.2. Фенолна једињења присутна у екстрактима поврћа

2.3.2.1. Фенолне киселине

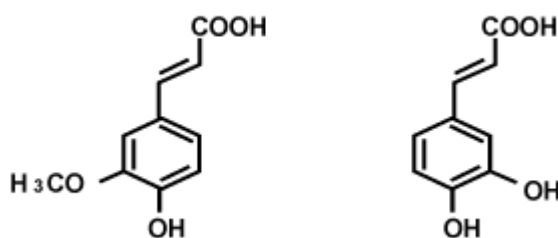
Фенолне киселине се могу поделити на две основне групе:

- ✓ Деривате бензоеве киселине (слика 7) и
- ✓ Деривате циметне киселине (слика 8).



- ($R_4=OH$, $R_1=R_2=R_3=H$) Салицилна киселина
 ($R_2=OH$, $R_1=R_3=R_4=H$) p-Хидроксибензоева киселина
 ($R_1=R_2=OH$, $R_3=R_4=H$) Протокатехинска киселина
 ($R_1=OCH_3$, $R_2=OH$, $R_3=R_4=H$) Ванилинска киселина
 ($R_1=R_2=R_3=OH$, $R_4=H$) Гална киселина
 ($R_1=R_3=OCH_3$, $R_2=OH$, $R_4=H$) Сирингична киселина

Слика 7. Структура фенолних киселина: деривати бензоеве киселине



Ферулна киселина

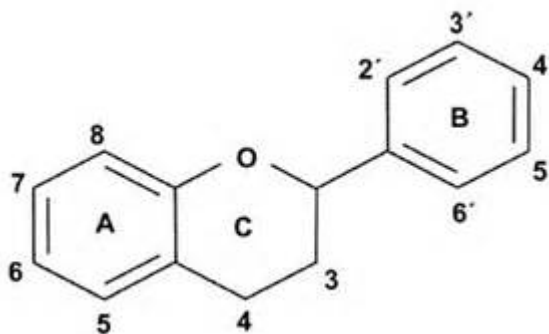
Кафена киселина

Слика 8. Структуре фенолних киселина: деривати циметне киселине

Кроз бројна истраживања антиоксидативне активности фенолних киселина доказана је повезаност хемијске структуре једињења са активношћу. Антиоксидативна активност расте са повећањем броја хидроксилних група, па деривати дихидроксибензојеве киселине имају већу антиоксидативну активност у односу на деривате хидроксибензојеве киселине. Гална киселина, као 3,4,5-трихидроксибензојева киселина, има јаче антиоксидативно деловање од деривата дихидроксибензојеве киселине, што је у складу са претходном тврдњом, и сматра се да је дериват бензојеве киселине са најјачим антиоксидативним деловањем. Монохидроксибензојеве киселине са хидроксилном групом у *ortho* и *para* положају не показују антиоксидативну активност, односно немају особину Н-донора. За разлику од њих *m*-хидроксибензојева киселина поседује антиоксидативну активност. Увођење метилenske групе између ароматичног прстена и карбоксилне групе смањује утицај карбоксилне групе, чиме се готово удвостручује антиоксидативна активност (*Rice u cap., 1995; Sosulski u cap., 1982*). У најчешће присутне фенолне киселине испитиваних екстраката убрајају се гална киселина, протокатехинска, *p*-дихидроксибензојева, ванилинска, хлорогенска, кумаринска, сиригинска, ферулна.

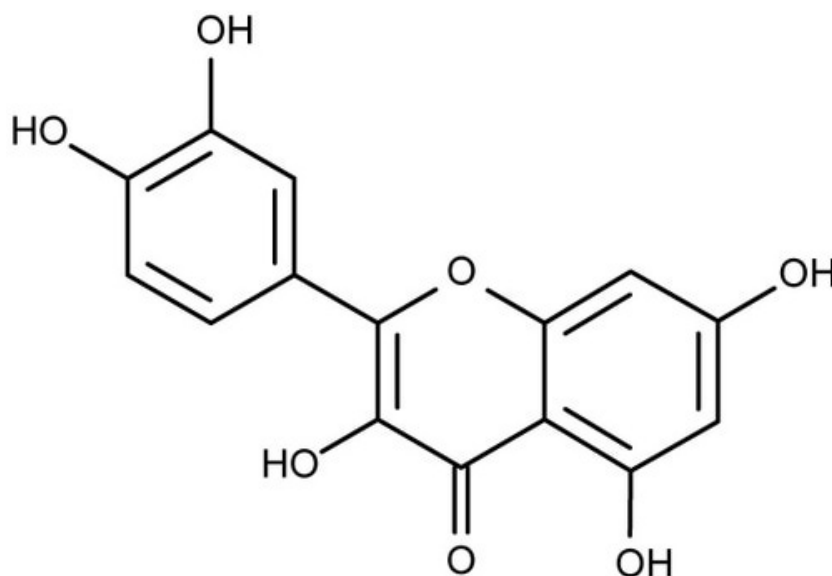
2.3.2.2. Флавоноиди

Флавоноиди представљају најзначајнију групу фенолних једињења. Основни структурни скелет флавоноида чине 15 атома угљеника у основној C₆-C₃-C₆ структури, од којих девет припада бензопиранском прстену (бензенски прстен А кондензован са пиранским прстеном С), а осталих шест угљеникових атома чине бензенски прстен В повезан са бензопиранским прстеном на позицији С-2 (флаволи, флавоноли, флавоноли, дихидрофлаволи, флавани и антоцијанидини), на позицији С-3 (изофлаволи) и на позицији С-4 (неофлаволи). Хемијска структура флавоноида може да се базира и на C₁₅ скелету са хромановим прстеном за који је везан бензенски прстен у положајима најчешће 2, ређе 3 или 4.



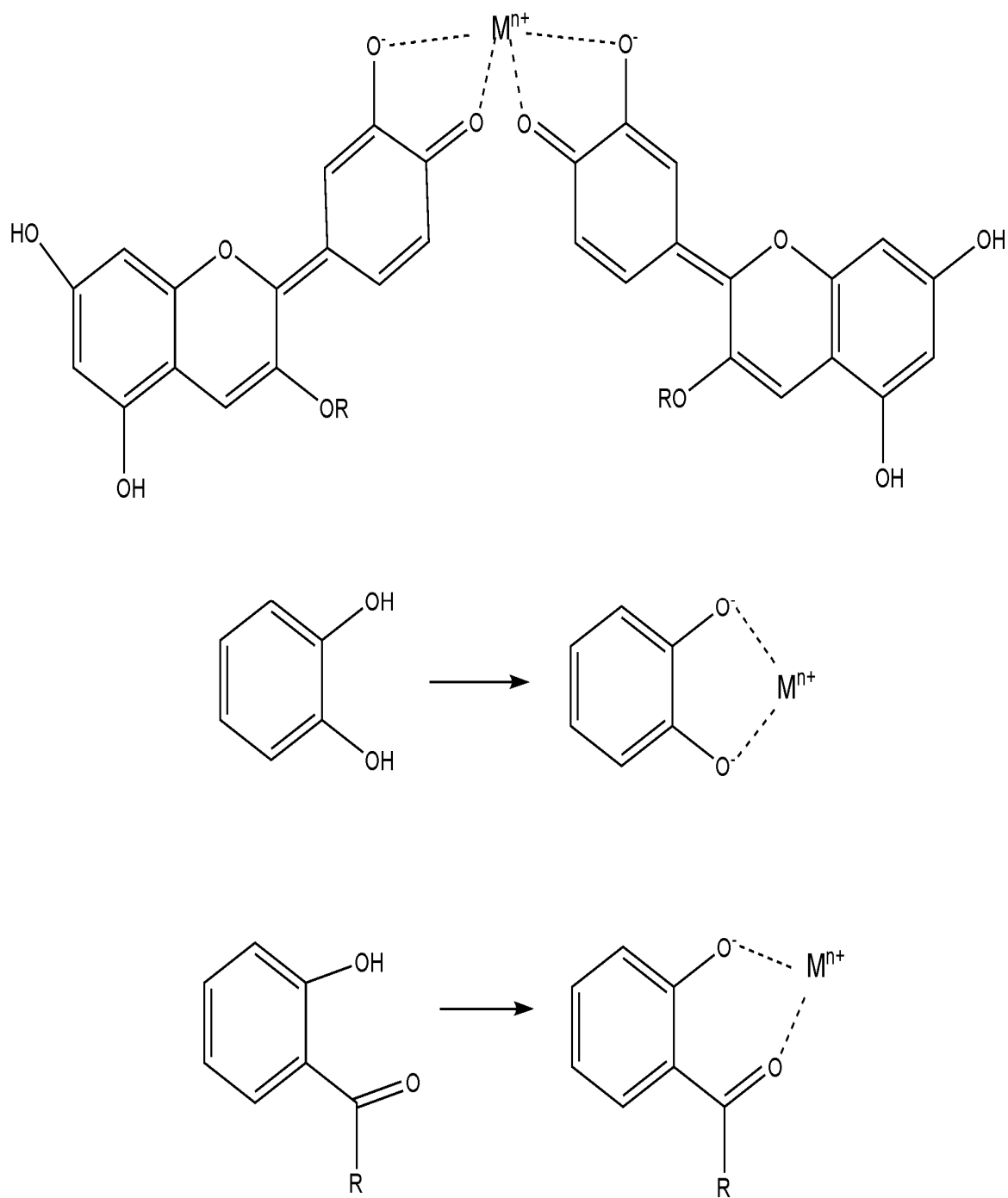
Слика 9. Хемијска структура флавоноида

Класе флавоноида међусобно се разликују према оксидационом статусу хетероцикличног прстена и позицији везивања В-прстена. Прекурсор у синтези флавоноида је кумарил-Со-А. Између различитих класа флавоноида постоје одређени односи, који омогућавају биолошку трансформацију једних облика у друге. Флавоноли су веома распрострањени у поврћу и јављају се најчешће као гликозиди, а могу да буду и ко пигменти антоцијана у цветним латицама и лишћу виших биљака. Познато је преко 100 флавонолних агликона, а најраспрострањенији је кверцетин (слика 10).



Слика 10. Структура кверцетина

Утврђено је да су флавоноидна једињења ефикасни хватачи супероксид анјон и пероксил радикала, да имају инхибиторни ефекат на процес липидне пероксидације, као и способност хелирања метала. Као и у случају фенолних киселина, антиоксидативно деловање једињења ове групе зависи од структурних карактеристика. Феноли су погодни супстрати у реакцијама хелатизације са јонима метала (Fe, Cu) (слика 11), (*Hertog u sar., 1993; Duh u sar., 1999*). Особина метал-хелатизујућег ефекта флавоноида је потенцијално важна за патолошка стања, када је присутан вишак гвожђа или бакра, али није познато да флавоноиди и њихови метаболити функционишу као хелатизујући агенси у *in vivo* условима.



Слика 11. Механизам хелатизације фенолних једињења са металним јонима, према *Vermerris u Nicholson (2006)*.

2.3.2.2. 1. Биосинтеза флавоноида

Флавоноиди, повезани са једним или више молекула шећера представљају гликозиди флавоноида, док се у слободној форми називају агликони (*Heijen u cap., 2001; Setchell u cap., 2002; Wink, 2003*). Утврђено је да ензими микроорганизама хидролизују гликозиде флавоноида до њихових конституената: агликона и шећера (*Gugler u cap., 1975; Hempel u*

Bohm, 1996). Већина агликона се затим метаболише уз помоћ микроорганизама, док се занемарљив део апсорбује у форми агликона (*Havsteen, 2002; Hollman и сар., 1995*).

Биоваријабилност флавоноида је релативно ниска, захваљујући спорој апсорпцији и брзој елиминацији. Максимална концентрација изофлавона и флаванона у плазми не прелази 10 mol/L (*Hertog и сар., 1992*).

Постоје различити путеви биосинтезе флавоноида у биљкама. Неки од њих су:

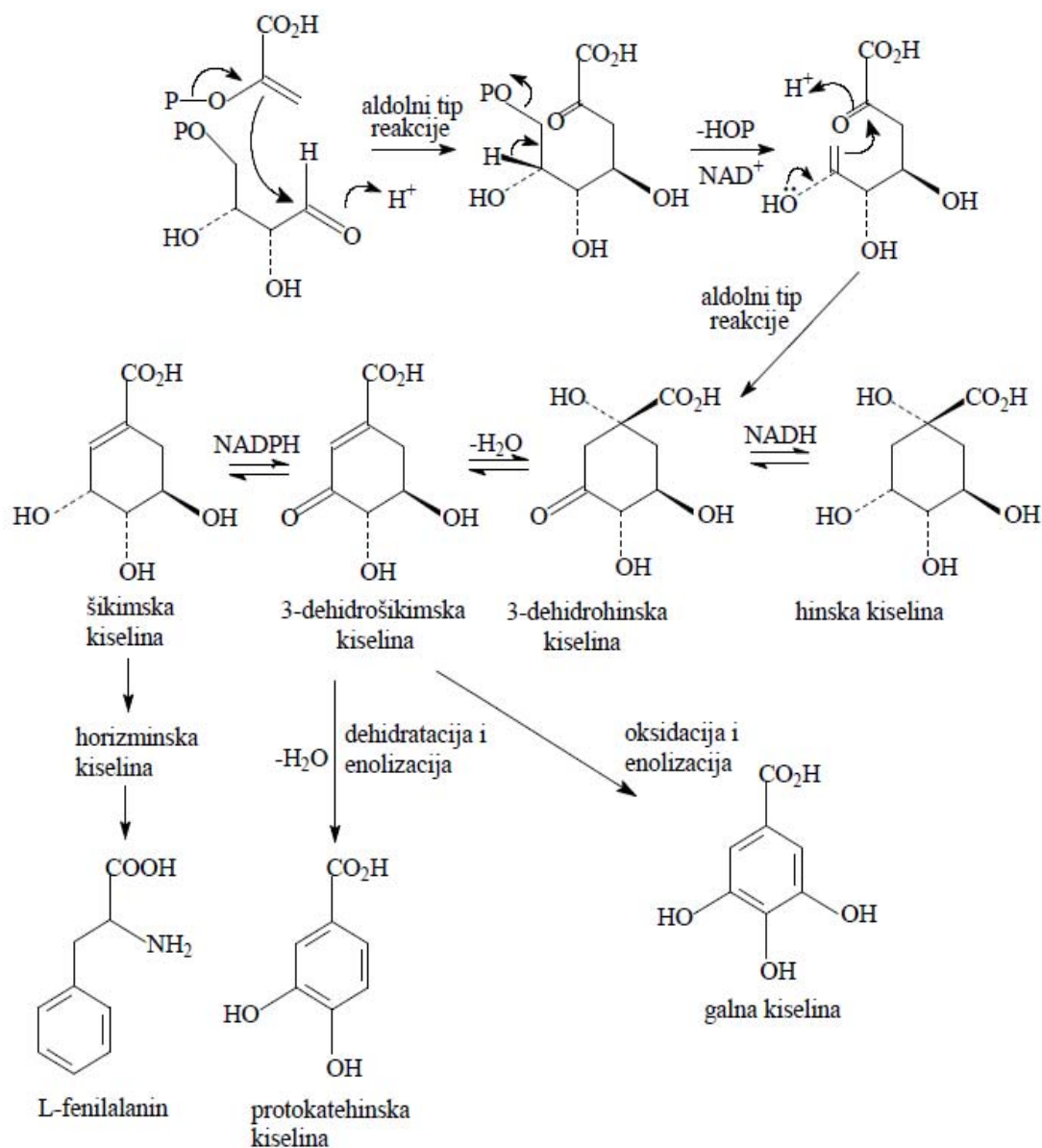
- Биосинтеза преко шикиминске киселине (фенилпропански пут биосинтезе)
- Ацетогенински пут биосинтезе
- Биосинтетско порекло флавоноида

- Фенилпропански пут биосинтезе

Метаболички пут шикимске киселине или фенилпропански пут биосинтезе фенолних једињења у биљкама води до стварања галне, протокатехинске и циметне киселине (слика 12). Циклус почиње реакцијом фосфоенолпирувата (PEP) и *D*-еритроза-4-фосфата у којој настаје 3-дезокси-*D*-арабино-7-фосфат-хептулосонска киселина (*DAHP*).

Низом веома сложених биохемијских реакција настаје шикимска киселина из које настаје фенилаланин (*Dewick, 2002*).

Фенилаланин, деаминацијом у присуству фенилаланинамониумлиазе даје циметну киселину, која се даље трансформише до осталих C₆–C₃ фенилпропаноида, кумарне, кофеинске, ферулне и синапинске киселине и њихових деривата (*Parr и Bolwell, 2000*).



Слика 12. Биосинтеза фенолних једињења циклусом шикимске киселине (Dewick, 2002)

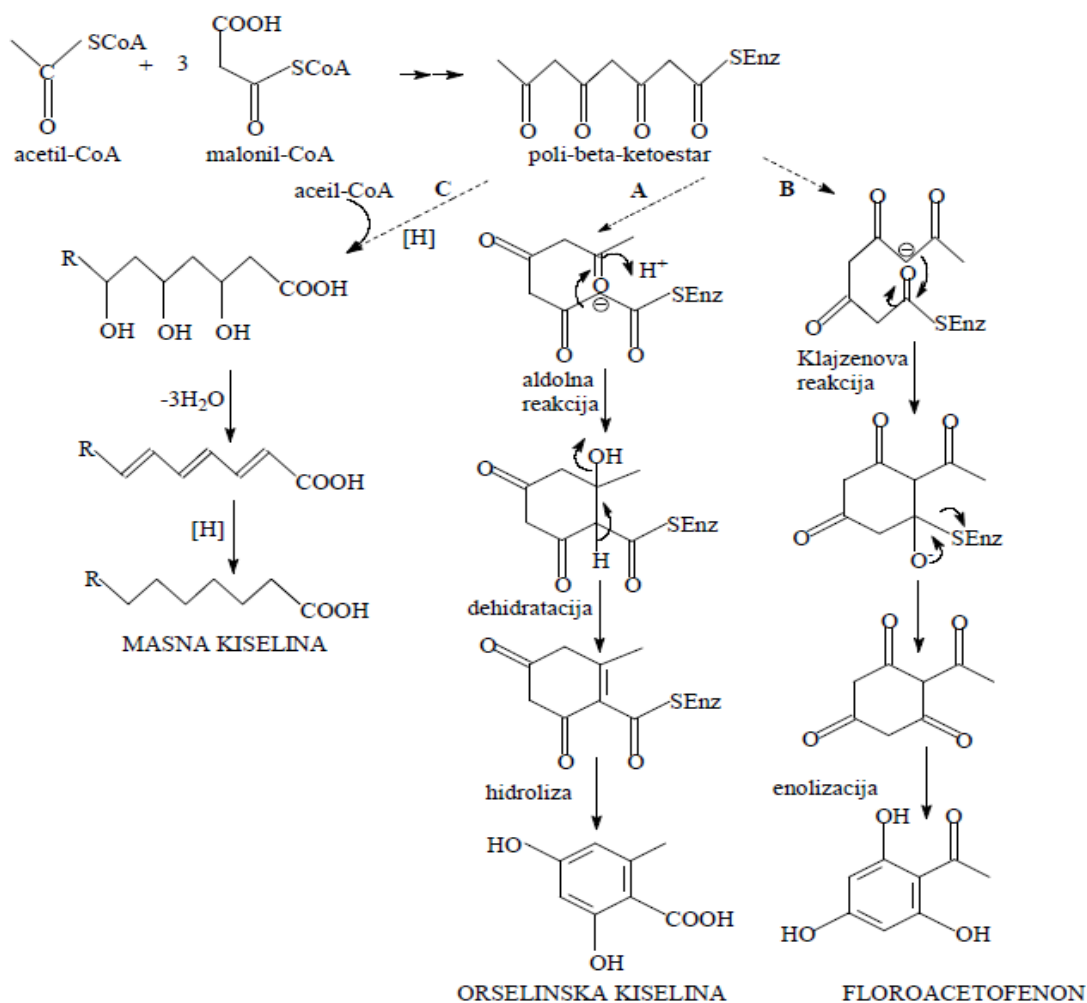
Кумарини настају из циметне киселине преко транс-2 кумаринске киселине, циклизацијом која обухвата неензимску трансформацију природног *транс*-облика у *цис*-изомер. Редукцијом ферулне киселине настаје кониферил алкохол, важан прекурсор лигнина.

- Ацетогенински пут биосинтезе

Фенолна једињења, хормони, изокумарини, ксантони, хинони у биљкама могу настати и ацетогенинским путем биосинтезе (слика 13).

Малонил-*CoA* настаје карбоксиловањем ацетил-*CoA* под дејством ацетил-*CoA* карбоксилазе. Кондензацијом једног молекула ацетил-*CoA* са три молекула малонил-*CoA*,

низом реакција катализованих ензимима, настаје поли- β -кетоестар. Поли- β -кетоестар, настао из четири ацетатне јединице, може да се увија на два начина (реакциони путеви А и В). Код увијања типа А јонизација 2-метилenske групе омогућава алдолну адицију на атому удаљеном за шест места у ланцу, дајући терцијарни алкохол. Дехидратацијом настаје алкен, а даља енолизација је фаворизована због настајања ароматичног прстена. Хидролизом тиоестарске групе настаје орселинска киселина. Код увијања типа Б, настали поликетоестар дозвољава Клајзенову реакцију, која се завршава одвајањем тиоестарске групе. Енолизацијом циклохексатриона настаје флороацетофенон (*Shen, 2003*).



Слика 13. Ацетогенински пут биосинтезе орселинске киселине и флороацетофенона (*Shen, 2003*)

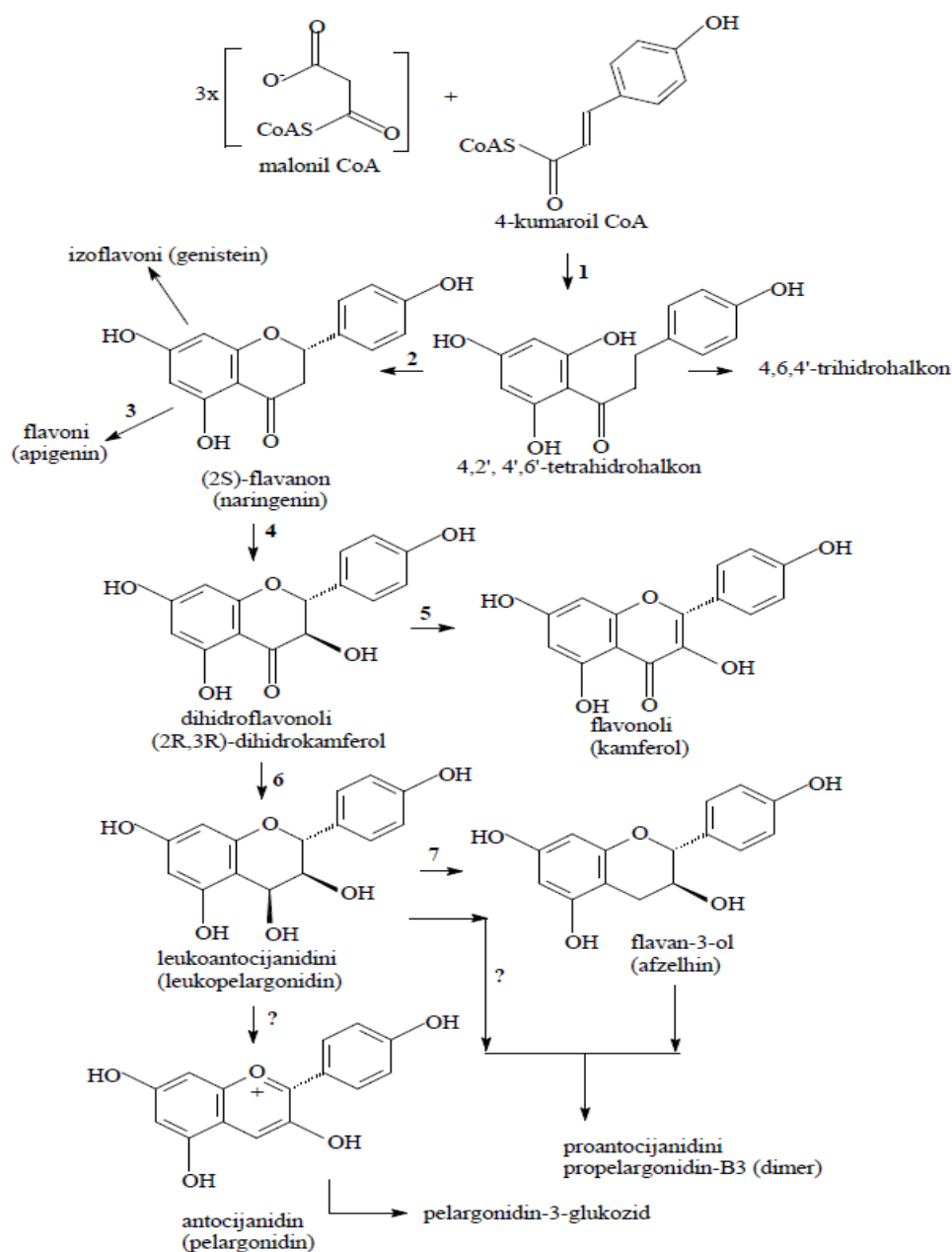
Поли- β -кетоестар, може се редуковати и до масних киселина (реакциони пут С). У том случају кондензација са молекулима ацетил-*CoA* се може наставити до низа од 16 или 18 С атома (палмитинска или стеаринска киселина). Коришћењем ацетата са обележеним

C^{14} -атомом је доказано да ацетогенинским путем настају и антрахинони, афлатоксини и друга једињења (Vick u Rhee, 1965).

- Биосинтетско порекло флавоноида

Флавоноиди настају мешовитим биосинтетским путевима. Тако на пример, прстен А и С настају ацетогенинским путем, а прстен В путем шикимске киселине (Mimica-Dukic, 1992).

Први прекурсори током биосинтезе флавоноида су нестабилни халкони, који изомеризацијом дају одговарајуће флаваноне (слика 14):



Слика 14. Биосинтетско порекло флавоноида (Zhang u Demain, 2005).

2.3.3. Антиоксидациона активност фенолних једињења

У многим *in vitro* истраживањима установљен је антиоксидациони потенцијал фенолних једињења (Ariga и Hamano, 1990; Hodnick и сар., 1988; Hsu и сар., 2008; Keer и сар., 1972; Lin и сар., 2006; Namiki, 1990; Nishikawa, 2004; Rice-Evans и сар., 1995). Утврђено је да њихова способност да делују као антиоксиданси зависи од степена коњугације, броја и распореда супституената (функционалних група) и молекулске масе (Voutilainen и сар., 2001).

Флавоноиди са највише хидроксилних група се најлакше оксидују. Утврђено је да степен полимеризације код флавоноида је у позитивној корелацији са способношћу "scavenging" слободних радикала.

Разматрањем везе структура – антиоксидационо деловање флавоноида утврђена је важност присуства незасићења на прстену С које омогућава делокализацију и стабилизацију арилоксил радикала (Heijnen и сар., 2001; Takao и сар., 1994).

Такође, хидроксилна група у положају С3 и њен положај у близини кето групе у положају С4, су неопходни предуслови за максималну ефикасност "scavenging" радикала (Amarowicz и сар., 2004; Blasa и сар., 2010; Blois, 1958; Harman, 1956; Itharat и сар., 2004; Jovanović и сар., 1995; Shahidi и Wanasundara, 1992).

Монофенолни прстен В није ефикасан донор водоника. Његова антиоксидациона активност је максимална када је супституисан са две хидроксилне групе у *ortho*-положају (Yanishlieva и сар., 2006). Присуство треће хидроксилне групе на прстену В не доводи до повећања ефикасности, изузев у случају катехина. Утицај који антиоксидативној активности дају хидроксилне групе у прстену А је од значаја уколико нема дихидроксилне структуре у В прстену (Buchachenko, 1963; Rice-Evans и сар., 1996).

Утврђено је да *O*-метилација хидроксилног супституента углавном инактивира антиоксидативну активност флавоноида (Cao и сар., 1997; Croft, 1999).

Такође, сматра се да 3-гликозилација флавоноида редукује активност у односу на одговарајуће агликоне (Horia и Heinonen, 1999).

Middleton и сарадници (2000), су дали опште структурне карактеристике флавоноида које доприносе најјефикаснијој "scavenging" активности (табела 2).

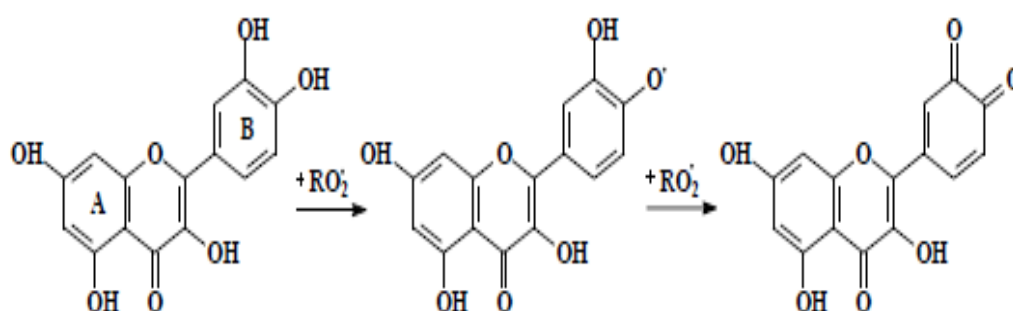
Табела 2. Делови флавоноидне структуре који доприносе ”scavening” слободних радикала

✓ Катехол - <i>o</i> -дихидроксилна група у прстену В доприноси повећаној ”scavening” способности;
✓ Пирогалол - трихидроксил група у прстену В катехола, као код мирицетина, даје већу активност;
✓ Двострука веза C2-C3 у С прстену повећава активност, јер доприноси стабилности произведеног фенокси радикала;
✓ 4-оксокето група у положају 4 прстена С, поготово када је повезана са двоструком везом, повећава ”scavening” активност делокализацијом електрона у прстену В;
✓ 3-ОН група прстена С даје изузетно јаке ”scavening” способности.
✓ 5-ОН и 7-ОН група могу допринети ”scavening” потенцијалу у неким случајевима.

Претпоставља се да је најефикаснија комбинација двоструке везе C2-C3 и оксокето групе у положају 4, након катехол групе у прстену В.

У неким истраживањима способност флавоноида да инактивирају органске пероксил радикале се упоређује са коришћеним фенолним антиоксидансима: бутиловани хидрокситолуен (ВНТ) и бутиловани хидроксианизол (ВНА) (*Uri, 1961*).

Механизам дво-електронске пероксил радикалске реакције са 3',4' и 2',5'-дихидрокси-флавонолима и грађење одговарајућих хинона је приказан на следећој слици :



Слика 15. Механизам реакције флавоноида и перокси радикала

Антиоксидативне особине фенолних киселина имају важну улогу у стабилности хране, (*Halliwell u Guteridge, 1999; Macheix u Fleuriet, 1998*).

Утврђено је да је гална киселина најбољи антиоксиданс од свих хидроксибензоєвих киселина (*Macheix u Fleuriet, 1998*).

2.3.3.1. Полифенолна једињења у људској исхрани

Квантитативно одређивање фенолних једињења представља аналитички изазов собзиром да је процењено да постоји преко милион ових једињења, који се у биљкама налазе у облику гликозида, са великом разноврсношћу у броју, врсти и начину везивања шећерних остатака (*Dakeru cap., 2008; Dallenbach-Tölke u cap., 1987; Harnly u cap., 2006*). У литератури је заступљен велики број радова који се односе на испитивање састава фенола многих биљних врста (*Gao u cap., 2009; Ossipov u cap., 1996; Sakakibara u cap., 2003; Voirin u cap., 1999*).

Постоје непотпуни подаци о количини полифенола која се дневно конзумира. Ови подаци су добијени на основу анализе главних агликона (након хидролизе њихових гликозида и естара) у храни која се најчешће користи у исхрани (*Hinneburg u cap., 2006; Kuhnai, 1976; Kumarasamy u cap., 2007; Lakenbrink u cap., 1996; Macheix u Fleuriet, 1998; Randolph, 2004; Zhang u cap., 2005*).

Самсон је 1976. године прерачунао да је унос флавоноида у САД око 1 g/дан и састоји се од 16% флавонола, флавона и флаванона, 17% антоцијана, 20% катехина и 45% бифлавонола. Флавоноли су највише истраживани, и утврђено је да се ова једињења уносе 20–25 mg/дан у САД, Данској и Холандији (*Sampson u cap., 2002*).

У Италији, вредности се крећу од 5 то 125 mg/дан, са средњом вредношћу од 35 mg/дан (*Pietta, 2000*). Флаванони се у сличној или већој мери конзумирају као флавоноли, са средњом вредношћу од 28,3 од 35 mg/дан хисперидина у Финској (*Kumpulainen, 2001*). Истраживање дневне потрошње антоцијанина у Финској, земљи у којој се за исхрану доста користи бобичасто воће је показало да износи 82 mg/дан антоцијанина, а у неким случајевима и 200 mg/дан (*Heinonen, 2001*).

Може се закључити да уколико се током дана конзумира неколико порција воћа и поврћа, укупан унос полифенола вероватно премашује 1 mg/дан, а са друге стране тешко је спровести дијету која је у потпуности ослобођена полифенола.

2.3.4. Биохемијска активност испитиваних врста поврћа

Биохемијска активност различитих екстраката многих биљних врста изазива велико интересовање, како у многим фундаменталним наукама, тако и у медицини, фармацеутској, козметичкој и прехранбеној индустрији.

Доказано је да фенолни секундарни метаболити биљака показују широк спектар фармаколошких активности (*Boivin u cap., 2009; Bracht u cap., 2006; De Flora u cap., 2005; Gurib u Rewiev, 2006; Half u cap., 2009; Harbone u Williams, 2000; Macheix u cap., 1990; Stevanović u Janković, 2001; Stevanović u Vasić., 1995; Sutradhar u cap., 2006*).

Потврђено је да фенолне киселине инхибирају одређене ензимске системе, од којих је најзначајније деловање инхибиција липидне пероксидазе и због тога налазе употребу као антиоксиданси и антиинфламаторни агенси (*Krinsky u cap., 1996; Kumarasamy u cap., 2007*).

In vitro цитотоксична испитивања неких биљних екстраката показују да могу да се користе као антинеопластици тј. супстанце које инхибирају раст и развој абнормалне масе ткива (*neoplasm*) и доводе до лечења карцинома (*Brielmann u cap., 2006; Decker u Lohmann-Matthes, 1988; Ercisli u cap., 2008; Felter, 2000; Gharavi u cap., 2007; Shahidi u cap., 1995; Shukla u cap., 1992; Sies, 1985; Riss u Morales, 2000; Thompson, 1995*).

Познато је да фенолна једињења показују јаке антимицробне особине према патогеним микроорганизмима. Сматра се да је механизам дејства фенолних једињења на нивоу ћелијске мембране микроорганизма, односно долази до поремећаја функционисања цитоплазматичне мембране, што се огледа у ометању проласка протона, протока електрона, активног транспорта и коагулацији ћелијског садржаја (*Sikkema u cap., 1995*).

Истраживања су показала да унос 400 mg калијума дневно (чаша сока од парадајза има га знатно више) је довољно да смањи ризик од шлога за 40 %. Познато је да парадајз утиче на регулацију метаболизма (због велике концентрације витамина С), повољно делује код болести јетре, панкреаса, реуме итд. Парадајз, због садржаја фолних киселина помаже при лечењу малокрвности. Због знатног садржаја и осталих биолошких активних компонената сматра се као природни лек против старења (www.pks.komora.net).

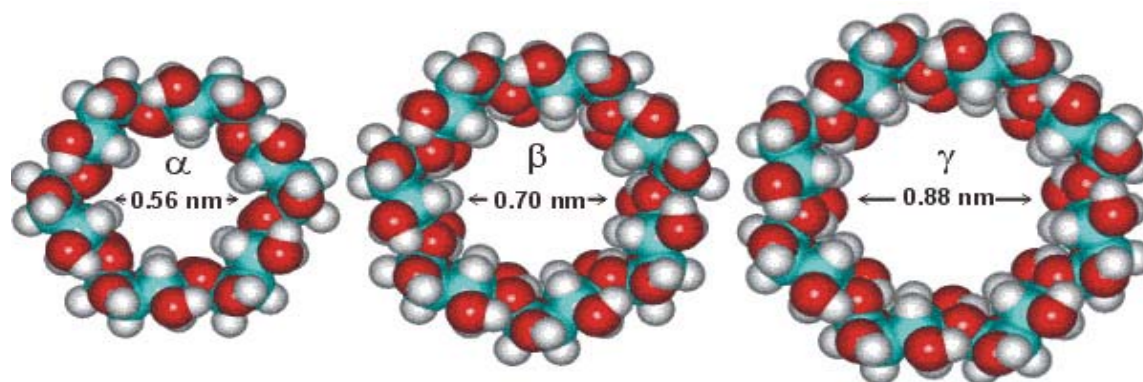
Познато је да паприка помаже очувању вида и делује против разних врста инфекција. Витамин С, присутан у паприци подиже имунитет, док витамин В₆ помаже нервном систему. Претпоставља се да β-каротен, ликопен и остала фармаколошка једињења која су присутна у црвеној паприци помажу при заштити од канцера дојке и јајника (www.pks.komora.net).

Празилук садржи доста воде (86%), а мало калорија, тако да је погодан за дијеталну исхрану, као диуретик за чишћење организма. Познато је да празилук садржи β -каротен и повољно делује на организм код алергије, анемије, астме, артериосклерозе, кардиоваскуларних болести, бронхитиса, гојазности, депресије, камена у бубрегу, проблема са штитном жлездом, реуме итд. (www.hranakaolek.rs). Редовно конзумирање мркве: смањује ризик од možданог удара за 40 посто, штити вид, побољшава изглед коже, чисти организм (www.pks.komora.net).

2.4. Инклузиони комплекси фенолних једињења са циклодекстринима

Један од основних недостатака многих фармацутских препарата је мала растворљивост у води и/или остелјивост на светлост (фотодеградација). Због тога често је терапијска доза већа од ефективне дозе што резултира смањеном биолошком расположивошћу лека у организму, при оралној употреби. У новија истраживања из области синтезе самоорганизованих материјала, укључују се и студије о контролисаном ослобађању биоактивних супстанци, познато под термином "систем испоруке лекова" (*Liu и сар., 1999; Mihaela и сар., 2002*). Последњих година се интензивно проучавају инклузиони комплекси фармацеутско активних компонената и циклодекстрина који се користе и као „носачи лекова“. Настајање инклузионих комплекса зависи од величине и облика молекула „госта“ и од димензија шупљина које формирају молекули „домаћина“. Циклодекстрини су макроциклични олигосахариди. У формирању инклузионих комплекса најчешће су коришћени α -, β - и γ -циклодекстрини, који се састоје од 6, 7, и 8 глукосидних јединица, респективно (слика 16). Карактеришу се прстенастом структуром која резултира постојањем шупљина. Како расте број глукосидних јединица, расте и дијаметар прстена и шупљине унутар њега. Настао инклузиони комплекс између фармацеутске активне компоненте и циклодекстрина је фармацеутски прихватљив, јер су повезани водоничним везама и Ван дер Валсових силама (*Nikolić и сар., 2010*).

Секундарне хидроксилне групе (ОН-2 и ОН-3) су на широј, а примарне (ОН-6) на ужој страни цилиндричног молекула. Јака водонична веза постоји између ОН-2 и ОН-3 групе, при чему се ОН-3 група понаша као донор протона. Однос јачина водоничних веза код циклодекстрина је следећи: α -CD < β -CD < γ -CD.



Слика 16. Типови циклодекстрина (Knežević, 2006)

ОН-6 групе такође могу да се повезују водоничним везама са доње стране цикличног молекула, али су ове везе дестабилизоване диполарним ефектима, лако се распадају у води и обично их нема у кристалима циклодекстрина (Cannava *u cap.*, 2010; Koontz *u cap.*, 2009). Са спољне стране, најчешће се налазе хидроксилне групе, а у унутрашњости молекула су атоми водоника. У воденом раствору ове хидрофобне шупљине садрже 3 (α -CD), 7 (β -CD) или 9 (γ -CD) слабо везаних молекула воде. Њихова густина у шупљинама је мала, а оне су довољно велике да приме још молекула. Према томе, циклодекстрини могу да вежу неполарне алифатичне и ароматичне молекуле активне компоненте, одговарајућих димензија. Они се вежу у односу 1:1, 2:1 и 1:2, што зависи од гостујућег молекула (Koontz *u cap.*, 2009). Молекули циклодекстрина формирају мрежасту структуру са шупљинама, чије димензије пречника су од 0,5 до 0,9 nm, довољно велике да приме молекуле „госта“ – фармацеутски активне компоненте. Осим основних циклодекстрина у фармацеутској индустрији се све чешће користе њихови деривати. Они могу бити припремљени хемијском или ензимском реакцијом. Сви деривати циклодекстрина граде "молекулска инклузиона једињења". Због добре растворљивости у води, боља је биолошка расположивост активне компоненте; продужени век трајања; смањен непријатан мирис и укус и смањени споредни ефекти фармацеутског препарата, због мањих унетих количина у организам. Због ових особина инклузиони комплекси са β -циклодекстрином имају велику примену у фармацеутској индустрији (Fang *u cap.*, 2010; Hsu *u cap.*, 2008). Кверцетин, биохемијски активан флаваноид који има значајну улогу у регулацији метаболичких процеса у људском организму, познато је да има ограничену фотостабилност. Због тога, су била од интереса даља истраживања о могућностима његовог инклузионог комплексирања са циклодекстринима.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. Материјал и апаратура

3.1.1. Хемикалије и реагенси

1,1-дифенил-2-пикрилхидразил радикал (DPPH), Folin-Ciocalteu-ов реагенс, бутиловани хидрокситолуен(ВНТ),3-(4,5-диметилтиазол-2-ол)-2,5-дифенилтетразолијумбромид (МТТ) и 2-хидроксипропил- β -циклодекстрин из Sigma Aldrich, Taufkirhen, Немачка; кверцетин из Merck Chemicals Ltd., Notingem, Велика Британија; рузмаринска киселина, хлорогенска киселина, гална киселина, кафена киселина, протокатехинска киселина, *p*-дихидроксибензоева киселина, ванилинска киселина, сиригична киселина, ферулна киселина, циметна киселина, рутин, апигенин, нарингенин, су произведени од Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Немачка; метанол, мравља киселина и остали реагенси су HPLC чистоће (*gradient grade*) из Merck, Darmstadt, Немачка, целулозна мембрана 0.45 μm (Econofilters, Agilent Technologies, Немачка).

3.1.2. Апаратура

Спектрофотометријска мерења узорака извршена су применом UV-VIS спектрофотометра MA9523-SPEKOL 211 (Iskra, Horjul, Словенија). Ултразвучна екстракција је рађена у ултразвућној кади, Brason B-220 ultrasonic bath (Smith-Kline Company, USA).

Анализа земљишта је рађена на атомском спектрофотометру - AAS (Varian SpectrAA 600), USA, и рН метру Lab 860, Schott, Немачка. Фосфор је одређен колориметријски Chroma meter Konica Minolta cr-400, USA, а калијум пламенофотометријски, Plamenfotometar PFP7, Jenway, UK, азот је одређен *Kjeldahl*-овом апаратуром за дестилацију 1003, Tecator, Канада.

Анализа фенолних једињења је извршена на HPLC апарату Agilent са DAD (Diode Array Detector) детектором и низом диода (Milford, MA, USA) на колони Agilent, Eclipse XDB-C18, димензија 4,6 x 50, пречника честица 1,8 μm (Milford, MA, USA). За карактеризацију инклузионих комплекса употребљена је колона ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6x250 mm, 5 μm) из Agilent Technologies, USA. Цитотоксичност је одређена на Mikroplate Reader-у, BMG Labtech, Немачка.

Анализа инклузионих комплекса је извршена на FT-IC спектрофотометру Bomem Hartmann-Braun MB-serie, Канада. Карактеризација комплекса је извршена снимањем на

¹H-NMR спектрометру Bruker AC 250 E NMR, Немачка и на дифрактометру Phillips PW1030, Немачка.

Испитивање фотостабилности инклузионог комплекса је извршено на фотохемијском реактору “Rayonet”, Немачка.

3.1.3. Биљни материјал

Веgetациони огледи са одабраним врстама поврћа парадајза, паприке, мркве и празилука, изведени су у сезонама 2010. и 2011. године током пролећних циклуса гајења ових врста. Гајење је обављено у заштићеним просторима типа пластеника без допунског загревања, на локалитету Трбушани, околина Чачак, Моравички округ.

Током вегетационих периода испитиваних врста примењиване су стандардне мере неге усева гајених врста поврћа. У фази технолошке зрелости поврћа обављена је берба плодова парадајза и паприке, односно вађење задебљалог корена мркве и стабла празилука. Након узорковања биљни материјал је припрељен за даљи поступак испитивања и анализирања.

3.1.3.1. Основне карактеристике испитиваног хибрида парадајза Сеф Ф₁

Хибрид парадајза Сеф Ф₁ је домаће селекције из Института за повртарство у Смедеревској Паланци. Биљка је високог раста, раног сазревања, чврстих плодова масе 150-180 g, који не поседују „зелену крагну“. У погледу отпорности поседује високу толеранцију према пламењачи, отпоран према зеленом увенућу и вирусу мозаика дувана. Хибрид је високе родности, погодан за гајење на отвореном пољу и у заштићеном простору (<http://www.institut-palanka.co.rs/>).

3.1.3.2. Основне карактеристике паприке сорте Дора

Паприка сорте Дора је селекционисана у Институту за повртарство у Смедеревској Паланци, средње рана сорта, веома дугих и крупних плодова у типу капије. Плод је светложуте боје у технолошкој и интензивно црвене у ботаничкој зрелости, меснат, двострано спљоштен, тако да се веома лако термички обрађује и лако љушти. Може се користити за свежу употребу и све видове прераде, у повољним условима гајења даје веома високе приносе (<http://www.institut-palanka.co.rs/>).

3.1.3.3. Основне карактеристике мркве сорта Нантес СП-80

Мрква сорте Нантес СП-80 је домаћа селекција из Института за повртарство у типу Нантеса средње раног стасавања, средње бујности. Задебљали корен је просечне дебљине око 3 cm, цилиндричан до благо конусан, средње дужине 14-16 cm, затупљен на врху. Слој коре или флоема је наранџасто обојен и нешто светлији од слоја сржи-ксилема, са већим учешћем слоја коре. Приносна сорта, без већих захтева за услове успевања (<http://www.institut-palanka.co.rs/>).

3.1.3.4. Основне карактеристике празилука сорта Шампион

Празилук сорте Шампион је селекционисан у Институту за повртарство у Смедеревској Паланци, преваходно намењена за индустријску прераду, али се користи и у свежеј стању. Дужина лажног стабла креће се од 35 до 40 cm, дебљине 4,0 - 4,5 cm. Дужина вегетационог периода ове сорте износи 170-180 дана (<http://www.institut-palanka.co.rs/>).

3.2. Методе анализе

3.2.1. Методе анализе земљишта

Узорци земљишта за хемијске анализе узети су у пластенику, пре заснивања производње испитиваних врста поврћа, са две дубине и то 0-20 cm и 20-40 cm, са неколико места по утврђеном распореду. Након тога је направљен просечан узорак на коме су вршене анализе (Убавић и Богдановић, 1999).

3.2.1.1. Одређивање активне киселости земљишта

Измери се 10 g узорка земљишта и стави у чашу од 50 cm³. Затим се пипетом дода 25 cm³ дестиловане воде и врши се повремено мешање у току 30 минута. Након тога се рН метром одреди вредност активне киселости испитиваног земљишта (Џамић и сар., 1996).

3.2.1.2. Одређивање супституционе киселости земљишта

Измери се 10 g узорка земљишта и стави у чашу од 50 cm³. Затим се пипетом дода 25 cm³ 1 mol/dm³ KCl и врши се повремено мешање у току 30 минута. Након тога на рН-метру се одреди вредност супституционе киселости земљишта (Џамић и сар., 2000).

3.2.1.3. Одређивање слободног CaCO_3 у земљишту

Измери се 0,5 g узорка земљишта и пренесе у стаклену бочицу у којој се урони епрувета напуњена до 2/3 са 10% HCl . Након завршене деградације, изврши се одређивање запремина ослобођеног CO_2 , као и температура и атмосферски притисак (*Џамић и сар., 2000*).

Садржај CaCO_3 се израчунава помоћу једначине:

$$A = B \times 2,272 \cdot 0,0001 \times K_{\text{hig}} \times 100 / C$$

A - садржај CaCO_3 у земљишту

K_{hig} - коефицијент за суво земљиште

C - маса ваздушно сувог земљишта узетог за анализу (g).

3.2.1.4. Одређивање садржаја хумуса земљишта

Одређивање садржаја хумуса састоји се у оксидацији органских материја земљишта помоћу 0,1 mol/dm³ KMnO_4 до CO_2 . Садржај ослобођеног CO_2 се одређује индиректно, мерењем потрошене количине оксидационог средства (KMnO_4).

Помоћу коефицијента 1,72 израчунава се количина угљеника у земљишту (*Џамић и сар., 2000*).

3.2.1.5. Одређивање садржаја укупног азота у земљишту применом *Kjeldahl*-ове методе

Одмери се 0,5 g узорка земљишта (димензије зрна не сме да је веће од 0,5 mm) и квантитативно пренесе у *Kjeldahl*-ову тиквицу. Дода се 5 cm³ смеше фенола и концентроване H_2SO_4 . Након разарања врши се дестилација микрометодом у *Kjeldahl*-овој апаратури. Ослобођени амонијак се скупља у балону са 0,1 mol/dm³ H_2SO_4 , а вишак киселине се титрује са 0,1 mol/dm³ NaOH (*Џамић и сар., 2000*).

$$\%N = (a_{\text{C}_{\text{H}_2\text{SO}_4}} - b_{\text{C}_{\text{NaOH}}}) \times 14 \times 100/m$$

3.2.1.6. Одређивање садржаја амонијум лактатног P_2O_5 и K_2O земљишта применом *Egner-Riehm* - ове методе

Одређивање лако приступачног калијума и фосфора се састоји у његовој екстракцији применом тзв. „Al-раствора“ који је по саставу 0,1 mol/dm³ амонијум лактата и 0,4

mol/dm³ сирћетне киселине. У екстракту фосфор се одређује колориметријски, а калијум пламенофотометријски (Џамић и сар., 2000).

3.2.1.7. Одређивање садржаја калцијума и магнезијума у земљишту

Калцијум и магнезијум се одређују применом атомске апсорпционе спектрофотометрије. Најпре се изврши екстракција узорка (2,0 g узорка у 33 cm³ CH₃COONH₄), екстракт центрифугира у току 5 минута при 2000 обртаја/мин и након тога чиста течност се пребаци у нормални суд од 100 cm³. Поступак се понови још два пута. Од добијеног екстракта узима се 2 cm³ и пренесе у нормални суд од 50 cm³, дода се 1 cm³ раствора SrCl₂, разбажи до 50 cm³ и чита вредност апсорпције за Са и Mg на атомском спектрофотометру (Џамић и сар., 2000).

3.2.1.8. Одређивање нитратног азота у земљишту

Направи се екстракт земље (раствор за екстракцију је смеша 100g CH₃COONa у 500cm³ дестиловане воде и 30 cm³ ледене сирћетне киселине) и допуни до 1000 cm³ дестилованом водом. Узима се 0,5 cm³ екстракта земљишта, пренесе на порцуланску плочу и дода 2 cm³ дифениламина. Након 2 минута екстракт добије плаву боју и на основу познате табеле изврши се одређивање нитрата (Џамић и сар., 2000).

3.2.2. Методе анализе хемијског састава поврћа

3.2.2.1. Одређивање укупне суве материје

Укупна сува материја сачињава целокупну количину материје из узорка, која не испарава под дефинисаним условима. Процент суве материје у поврћу се одређује сушењем на 105 °C, до константне масе. После хлађења у ексикатору из разлике маса пре и после сушења и познате масе узорка, прерачуна се проценат суве материје (Џвијовић и Аћамовић, 2005).

3.2.2.2. Метода одређивања протеина применом *Kjeldahl*-ове методе

Биљни материјал се спали, минерализује, са концентрованом H₂SO₄, а онда се бистар садржај пренесе у нормални суд од 100 cm³. Одпипетира се 20 cm³ аликвота у семимикро апарат за дестилацију по Parnes-Vagneru. Испод кондензатора се у пријемни суд постави

стандардни раствор H_2SO_4 , који везује ослобођени амонијак услед разградње протеина, вишак киселине се титрује стандардним раствором NaOH (Цвијовић и Аћамовић, 2005).

$$\% \text{ азота} = (K - B/2) \times 0,0014 \times 100/2m$$

$$\% \text{ протеина} = \% \text{ азота} \times 6,25$$

3.2.2.3. Метода одређивања угљених хидрата по Вертран-у

Овом методом одређују се сви угљени хидрати са слободним полуацеталним групама, који редукују металне јоне (Cu^{2+} до Cu^+ из реагенса Бертранд I ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)). Количина насталог бакар (I)-оксида је еквивалентна количини шећера. Раствором Бертранда III ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) раствара се настали талог бакар (I)-оксида при чему поново прелази у бакар (II), а гвожђе (III) се редукује до гвожђе (II). У киселиј средини настали гвожђе (II) јони се оксидишу са еквивалентном количином KMnO_4 у гвожђе (III), а манган (VII) прелази у манган (II). На основу количине утрошеног KMnO_4 из табеле се очита одговарајућа количина шећера (Цвијовић и Аћамовић, 2005).

3.3. Анализа узорака поврћа

3.3.1. Екстракција узорака испитиваних врста поврћа

3.3.1.1. Припрема узорака

У фази технолошке зрелости испитиваних врста поврћа извршено је убирање, а потом сушење узоркованог биљног материјала: листа и стабла празилука *Allium porum* L., плодова паприке *Capsicum annuum* L., парадајза *Lycopersicon esculentum* Mill. и задебљалог корена мркве *Daucus carota* L.

3.3.1.2. Екстракција узорака у Soxlet – овом апарату

Након уситњавања помоћу цилиндричне дробилице, суви биљни материјал екстрахован је појединачно у Soxlet – овом апарату. Пре тога је извршено одмашћивање екстракцијом са петролетром (40°C). Екстракција је извршена етанолом на температури кључања растварача (78°C) у току 3 часа (до престанка издвајања обојеног екстракта). Добијени

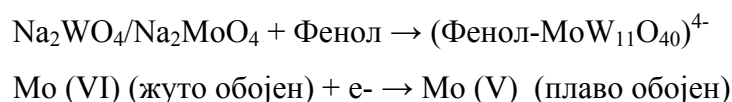
екстракти су чувани 24^h на собној температури, а након тога је ивршено упаравање на ротационом вакум упаривачу на температури од 40°C, све до добијања суве материје. Суви екстракти су одлажени у тамне, стаклене бочице где су чувани за даља испитивања.

3.3.1.3 Ултразвучна екстракција узорака

Након уситњавања помоћу цилиндричне дробилице, извршена је екстракција етанолом сувог биљног материјала у времену од 1h, користећи Brason B-220 ултразвучно купатило, а онда је извршено одмашћивање узорака екстракцијом са петролетром (40°C). Добијени екстракти су чувани 24^h на собној температури, а након тога је ивршено упаравање на ротационом вакум упаривачу на температури од 40°C, све до добијања суве материје. Суви екстракти су одлажени у тамне, стаклене бочице где су чувани за даља испитивања.

3.3.2. Одређивање садржаја укупних фенолних једињења у испитиваним екстрактима поврћа

Количина укупних фенола одређена је *Folin–Ciocalteu* –овом методом (*Singleton et al., 1999*) која је заснована на мерењу редукујућег капацитета полифенолних једињења:

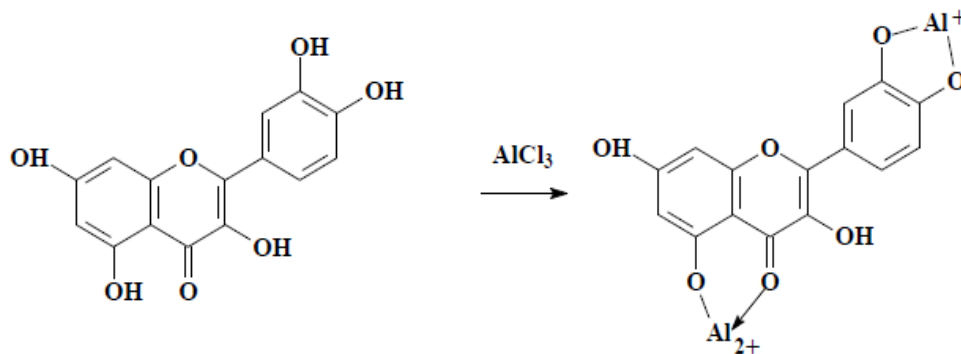


У биљним екстрактима који су разблажени до концентрације од 1 mg/mL и 0,5 mL екстракта помешано је са 2,5 mL *Folin–Ciocalteu* реагенса (претходно десетоструко разблаженог) и 2 mL NaHCO₃ (7.5%). Реакциона смеша се загрева 15 min на 45 °C и након тога се мери апсорбанца на 765 nm, у односу на слепу пробу. Укупни феноли су изражени као милиграм еквивалената галне киселине по граму екстракта (mg GA/g екстракта). Резултати су изражени као средња вредност три анализирана узорка.

3.3.3. Одређивање садржаја флавоноида у испитиваним екстрактима поврћа

Укупна количина флавоноида одређена је по методи коју су описали *Brighente u cap. (2007)*. Запремина од 0,5 mL 2% алуминијум хлорида (AlCl₃) у метанолу помешана је са истом запремином метанолног раствора екстракта. Реакциона смеша се чува 60 min на собној

температури, а након тога апсорбанце су мерене на 415 nm у односу на слепу пробу узорка. Укупни флавоноиди су изражени као милиграм еквивалената рутине по граму екстракта (mg RU/g екстракта). Резултати су изражени као средња вредност три анализирана узорка.



Слика 17. Образовање комплекса кверцетина са алуминијумом

3.3.4. Одређивање фенолних једињења у испитиваним екстрактима поврћа применом HPLC анализе

Анализирани екстракти су припремљени растварањем у смеси метанола и 1% мравље киселине у води у односу 50:50, v/v. Пре ињектовања сви раствори су профилирани кроз филтере са величином пора 0,45 μm (Agilent, регенерисана целулоза). Ињектирана је запремина од 5 μL раствора, аутоматски, коришћењем аутосамплер-а. Колона је термостатирана на температури од 30 $^{\circ}\text{C}$. Примењене су две мобилне фазе, А (метанол) и Б (формалдехид), при брзини протока од 1 mL/min са следећим профилом градијената: првих 6,2 минута до 85% Б, затим до следећих 8 минута до 75% Б, до 13 и до 15 минута до 61% Б, затим 20 минута до 40% Б, потом 25 минута до 0% Б, до 25 минута је *stop time* а до 10 минута је *post time*. Прикупљање података и спектрална потврда пика извршени су применом Agilent Empower 2 softver-а. Коришћењем стандарда извршена је идентификација пикова у хроматограмима.

3.3.5. Одређивање антиоксидационе активности испитиваних екстраката поврћа у *in vitro* условима

3.3.5.1. Одређивања укупног антиоксидационог капацитета испитиваних екстраката поврћа

Укупни антиоксидациони капацитет се одређује фосфомолибденском методом (*Prieto и сар.*, 1999). Метода се заснива на редукцији Мо(VI) до Мо(V) након додавања потенцијалног антиоксиданта и формирању фосфомолибденског комплекса тамно-зелене боје, у киселој средини.

Поступак. Припреми се серија раствора екстракта и аскорбинске киселине концентрације 1000 µg/mL у метанолу. У серију од осам епрувета дода се по 1 mL раствора метанола након чега се у прву епрувету дода 1 mL полазног раствора тестираног екстракта, односно аскорбинске киселине, предходно наведене концентрације. Након мешања, пипетом узима се 1 mL раствора из прве епрувете и преноси у другу. Надаље се сукцесивним двоструким разблаживањем добија серија раствора тестираних екстракта, односно аскорбинске киселине, концентрација 3,901 – 500 µg/mL.

Раствори тестираних екстраката (100 µL), односно аскорбинске киселине, различитих концентрација, одмере се у епрувете и комбинују са 1 mL раствора реагенса који садржи 0,6 М сумпорну киселину, 28 mM натријум фосфат и 4 mM аминијум молибдат. Након мешања, раствори се инкубирају на температури од 95°C у току 90 минута и оставе да се охладе на собној температури. Исти поступак се примењује и за бланко раствор, који уместо 100 µL екстракта садржи 100 µL метанола. Апсорбанца добијених раствора, у односу на бланко пробу, мерена је на собној температури на спектрофотометру. Вредност апсорбанце је средња вредност три мерења.

Резултати укупног антиоксидативног капацитета се изражавају као број еквивалената аскорбинске киселине. Из једначине праве која се формира након мерења апсорбанце аскорбинске киселине као стандарда, добија се функционална зависност концентрације аскорбинске киселине у односу на апсорбанцу. Једначина праве има следећи облик:

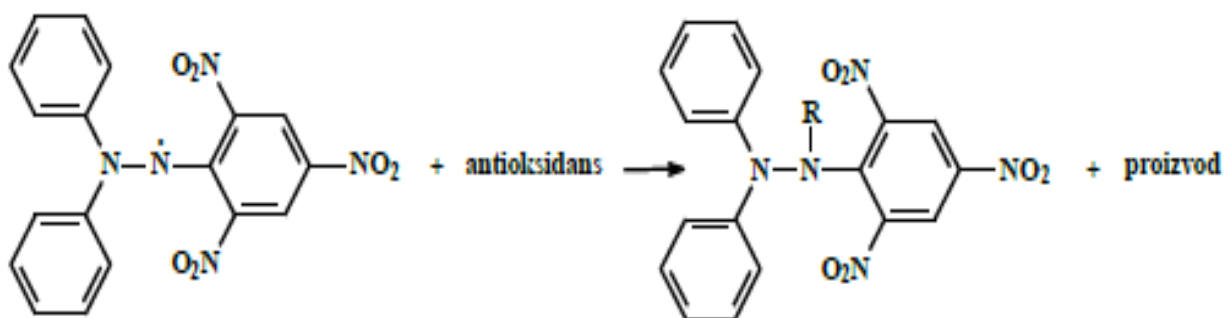
$$Y_i = AX_i + B$$

где су: Y_i концентрације раствора аскорбинске киселине, A нагиб праве, X_i апсорбанце инкубираних раствора аскорбинске киселине, B одсечак праве на Y оси. Линеарна регресија за раствор аскорбинске киселине извршена је помоћу статистичког софтвера

OriginPro 8. Када се измерене вредности апсорбанци испитиваних раствора унесу у једначину линеарне регресионе анализе, израчунава се антиоксидациони капацитет као број $\mu\text{g/mL}$ еквивалената аскорбинске киселине.

3.3.5.2. Одређивање антиоксидативне активности DPPH методом

1,1-Дифенил-2-пикрилхидразил (DPPH) радикал (слика 18) реагује са антиоксидансима тј. фенолним једињењима из испитиваних екстраката и настаје стабилно једињење које се може спектрофотометријски регистровати на 517 nm:



Слика 18. Структура DPPH и механизам реакције са антиоксидансима

Поступак: Припреми се серија раствора екстраката, стандарда аскорбинске киселине (AA) и бутиловани хидрокситолуена (ВНТ) концентрације $1000 \mu\text{g/mL}$ у метанолу. Пре извођења експеримента припреми се свеж раствор 1,1-дифенил-2-пикрил-хидразида (DPPH) концентрације $80 \mu\text{g/mL}$. Раствор радикала се до употребе чува у фриџеру, у нормалном суду обавијеном алуминијумском фолијом. У осам епрувета се одмери по 2 mL метанола. У прву епрувету се дода 2 mL полазног раствора тестираног екстракта, односно стандарда, аскорбинске киселине и бутилованог хидрокситолуена. Потом се биретом из прве епрувете узима 2 mL измешаног раствора и пребацује у другу епрувету. Даљим сукцесивним разблажењем се припремају серије раствора концентрације 3.901 – 500 $\mu\text{g/mL}$. У сваки од разблажених раствора дода се по 2 mL раствора DPPH а после 30 минута и 60 минута мери умањење апсорбанце раствора на таласној дужини од 517 nm, у односу на бранко пробу. Процент инхибиције се израчунава по формули:

$$\text{IC (\%)} = [(A_{\text{бланко раствор}} - A_{\text{изорак}}) / A_{\text{бланко раствор}}] \times 100$$

Истовремено, резултати антиоксидационе активности DPPH методом представљени су и као IC_{50} вредности, односно концентрације тестираног једињења које смањују полазну концентрацију слободне радикалске врсте за 50%.

Конструисана је зависност процента инхибиције у односу на концентрацију испитиваних екстраката и унета у статистички софтвер OriginPro 8.

3.3.6. Одређивање антимикуробне активности испитиваних екстраката поврћа у *in vitro* условима

За одређивање антимикуробне активности извршен је низ припремних поступака као што су: припрема одређених хранљивих подлога, пресејавање култура на косом агару у циљу добијања култура одређене старости, као и пресејавање култура на измењену подлогу додатком одређене концентрације испитиваног екстракта биљке. Наведени припремни поступци комплетно су урађени према предвиђеном протоколу публикованом од стране Националног комитета за клиничке лабораторијске стандарде САД (енг. *National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS*) (*NCCLS, 1990*).

3.3.6.1. Засејавање култура на косу чврсту подлогу

Засејавање култура на хранљиве подлоге јесте процес преношења микроорганизама из њихове природне средине на хранљиву подлогу и врши се у циљу умножавања микроорганизама, њихове идентификације и испитивања осетљивости микроорганизама на антибиотике и хемиотерапеутике.

На припремљену косу хранљиву подлогу се засејавају одговарајуће културе. Засејавање се може извршити бактериолошком петљом или иглом а у посебним случајевима микропипетом, у зависности од врсте узорка. Основни предуслов јесте потпуна стерилност која се постиже у стерилној комори. Радна површина се пре засејавања дезинфикује апсолутним етанолом. Простор за пресејавање култура се претходно стерилише UV лампом у периоду од 24 сата. Додатна стерилност постиже се и пресејавањем култура близу пламеника. Засејавање се врши бактериолошком езом која се сукцесивно стерилише у пламену до усијања и потапањем у раствор апсолутног етанола пре и након засејавања. Коси агар се засејава на површини косине. Прилоком уношења културе езом, најпре се дотакне капљица воде на дну косог агара која се кондензовала при хлађењу подлоге. Потом се извлачењем езе из епрувете по површини косине потезом у облику изувијане линије унета култура распореди по подлози. Бактерије се инкубирају 24 часа на 37°C, док се гљиве развијају 72 сата на истој температури. Искоришћене старе културе се након пресејавања денатуришу и стерилишу.

3.3.6.2. Припремање суспензије (инокулума) спора одређене концентрације

Густина инокулума је важан параметар при формирању антибиограма јер представља концентрацију културе на којој се тестира антибиотик. Препоручено је да она износи 1×10^4 - 1×10^6 CFU/mL за бактерије и 1×10^3 - 1×10^4 CFU/mL за гљиве (енг. *Colony forming unit, CFU*). Већом густином се скраћује лаг фаза, односно фаза развића, док превише брз раст смањује зоне инхибиције (*NCCLS, 1990*). Један од начина одређивања густине тест суспензије је коришћење нефелометрије или спектрофотометрије. Овом методом се густина инокулума одређује McFarland-овим стандардима. Припрема ових стандарда се врши мешањем одређене запремине 1% сумпорне киселине и 1,175% баријум хлорида да би се добио раствор баријум сулфата специфичне оптичке густине. Најчешће коришћен McFarland-ов стандард је 0,5 McFarland (99,5 mL 1% сумпорне киселине и 0,5 mL баријум хлорида) (табела 3). По припреми се стандард разлије у тест епрувете и затвори. Епрувете се чувају у мраку на собној температури а стандард одговара турбидитету суспензије спора од $1,5 \times 10^8$ CFU/mL (*NCCLS, 2002*). На основу зависности турбидитета суспензије и концентрације спора, у експерименту се прави суспензија спора жељене концентрације.

Табела 3. Оптичка густина у функцији густине инокулума

Стандард	Густина инокулума $\times 10^6$ CFU/mL	Оптичка густина на 550 nm (E)
0,5	150	0,125
1	300	0,250
2	600	0,500
3	900	0,700
4	1200	1,000
5	1500	1,250

У епрувету у којој се налази пресејана култура одређене старости (24 часа старе културе бактерија и 72 сата старе културе гљива), додаје се стерилна дестилована вода. Култура се раствара све док боја раствора не постане потпуно мутна и тек тада 1 mL концентроване суспензије се пребацује у чисту епрувету са металним затварачем и дода 5 mL стерилне дестиловане воде. Спектрофотометријски се мери оптичка густина на 550 nm, при чему се врши додавање стерилисане дестиловане воде или нативног раствора микроорганизама у циљу добијања $A_{550 \text{ nm}} = 0,045$ за бактерије и $A_{550 \text{ nm}} = 0,03$ за гљиве. Тиме се постиже да густина суспензије спора буде $5,6 \times 10^6$ CFU/mL за бактерије и 3×10^4 CFU/mL за гљиве. Припремљена суспензија спора чува се у фрижидеру до извођења експеримента.

3.3.6.3. Одређивање антимикуробне активности испитиваних екстраката поврћа микродилуционом методом у *in vitro* условима

За одређивање антимикуробне активности испитиваних екстраката поврћа микродилуционом методом су укључене следеће *грам*-позитивне бактерије: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus mirabilis* ATCC 14153 и *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *грам*-негативне бактерије: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Proteus vulgaris* ATCC 13315 и гљиве: *Candida albicans* ATCC 10231 и *Aspergillus niger* ATCC 16404. Идентификација испитиваних микроорганизама потврђена је од стране Лабораторије за микологију Одсека за микробиологију Института Торлак у Београду, Србија.

Поступак. Антимикуробна активност биљних екстраката према различитим врстама *грам*-позитивних и *грам*-негативних бактерија, као и гљива, односно одређивање минималне инхибиторне концентрације (MIC) може се утврдити применом микродилуционе методе (NCCLS, 1990). Микроорганизми који се користе могу се комерцијално добавити од ATCC (American Type Culture Collection). Разблажења екстракта се припремају у течном Mueller Hinton бујону (МНВ), почевши са 50 μl 1% v/v раствора екстракта у диметилсулфоксиду (DMSO) плус 50 μl МВН. Раствори екстракта се серијски разблажују (1:1) у МНВ у једном низу отвора микроплоче са 96 отвора. Овакав поступак даје разблажења екстракта, таква да је концентрација у отворима једног реда микроплоче: 2500, 1250, 625, 313, 156, 78, 39 и 19.5 $\mu\text{g/mL}$. У сваки отвор се затим додаје бактеријска култура у приближној концентрацији 1.5×10^8 CFU/mL (colony-forming units). Микроплоче се инкубирају на 37°C 24 h, а након тог периода може се одредити MIC. То је најмања концентрација екстракта код које није примећено замућење, односно најмања концентрација тестираног екстракта која је зауставила (инхибирала) раст микроорганизама. Осим праћења замућења у отворима микроплоче, MIC се може одредити и коришћењем реагенса који мењају боју у зависности од степена раста микроорганизама (на пример, реагенс resazurin за бактерије). Комерцијални антибиотици (amrascin за бактерије и ketokonazol за гљиве) су коришћени као позитивна контрола, док је негативна контрола DMSO. По истеку 24 сата развоја бактерија и 72 сата за гљиве, на температури од 38°C, вредности минималне инхибиторске концентрације уочавају се визуелно, након додавања реагенса resazurin-a (0,02 mL 0,05% раствора) као индикатора, променом боје раствора из плаве у љубичасту. Минимална инхибиторска концентрација биће концентрација последње јаме у експерименту у којој није дошло до промене боје индикатора (Satyajit *u cap.*, 2007.)

3.3.7. Одређивање цитотоксичне активности испитиваних екстраката поврћа варијабилним МТТ тестом у *in vitro* условима

За одређивање цитотоксичне активности испитиваних екстарата поврћа укључене су туморске ћелије, гајене на наведеним подлогама:

- Нер2 (подлога: MEM Eagle/5% FCS) - хумана ћелијска линија (human larynx carcinoma),
- RD (подлога: MEM Eagle/10% FCS) – хумана ћелијска линија (rhabdomyosarcoma) и
- L2OB (подлога: MEM Eagle/10% FCS) – мишија туморска фибробластна линија.

МТТ тест цитотоксичности. Суспензија ћелија густине 10^4 засејане су у микротитар плоче са 96 отвора и остављене да се инкубирају на 37 °C и 5% CO₂, у инкубатору. Након 24 часа инкубације медијум је замењен са 100 µL медијума, који садржи различите концентрације етанолских екстраката поврћа (25, 50, 100, 250, 500, 750 и 1000 µg/mL). Контролним ћелијама је додат свеж медијум без екстракта. 48 часа након третмана вијабилност ћелија је одређивана МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолијум бромид) тестом цитотоксичности (*Mosmann, 1983.*). Тест се заснива на бојеној реакцији митохондријског ензима дехидрогеназа из живих ћелија са МТТ-еом. По завршенку инкубације ћелија са етанолним екстрактима додат је МТТ (у финалној концентрацији од 5 mg/mL) у сваки бунарић, и плоча је инкубирана 2-4 h на 37 °C. Обојени кристали створеног формаза су растворени са 150 µL DMSO-а. Апсорбанца је мерена на 570 nm на Mikroplate Reader-у. Процент варијабилних ћелија је одређиван као однос апсорбанци третираних ћелија и контролних ћелија помножен са 100. Приказани резултати су добијени из три независна експеримента.

3.4. Инклузионо комплексирање кверцетина са 2-хидроксипропил- β -циклодекстрином

3.4.1. Припрема физичке смеше и инклузионог комплекса

Припрема физичке смеше између кверцетина и 2-хидроксипропил- β -циклодекстрина је извршено мешањем кверцетина и 2-хидроксипропил- β -циклодекстрина (HP- β -CD) у молском односу 1:1. Инклузион комплекс је добијен када се кверцетин (151 mg) и 2-хидроксипропил- β -циклодекстрин (770 mg) суспендују у 96% етанолу (150 cm³) и мешају на собној температури у току 24 h. Након упаравања на вакуум упаривачу на 60 °C до запремине око 5 cm³, суше се у ексикатору до константе масе на температури од 25 °C.

3.4.2. Методе за испитивање фотостабилности инклузионог комплекса кверцетина: HP- β -CD

3.4.2.1. Испитивање фотостабилности инклузионог комплекса кверцетин: HP- β -CD применом HPLC анализе

Фотостабилност кверцетина и инклузионог комплекса кверцетина: HP- β -CD одређивана је применом RP-HPLC методе (*Савић и сар., 2013*). Анализа је изведена изократским елуирањем са протоком од 1,0 mL/min. Метанол је коришћен као мобилна фаза, који је филтриран кроз 0.45 μ m филтер пре убризгавања у колону. Запремина узорка је била 20 μ L, а таласна дужина детекције 370 nm. Раздвајање је изведено на температури од 35 °C.

3.4.2.2. Праћење фотостабилности инклузионог комплекса кверцетин: HP- β -CD применом фотохемијског реактора

Инклузиони комплекс (10,70 mg) и кверцетин (1,75 mg) пренесени су у нормални суд од 25 mL и растворени у мобилној фази (метанолу). Овако припремљени раствори подвргнути су UV зрачењу у току различитих временских интервала (0, 5, 15, 30, 60, 90 min) у цилиндричан фотохемијски реактор "Rayonnet" са 8 симетрично постављене UV-V лампе који има максимум емисије на 300 nm. Узорци су озрачени у кварцним ћелијама

постављене на кружном ротирајућем држачу. Након зрачења су сонификовани 15 мин, филтрирани кроз целулозну мембрану 0,45 μm (Econofilters, Agilent Technologies, Germany) и аликвот од 20 μL је ињектован у HPLC систем (*Савић и сар., 2013*).

3.4.3. Методе карактеризације инклузионог комплекса кверцетин: HP- β -CD

3.4.3.1. FT-IC спектроскопска карактеризација инклузионог комплекса кверцетин: HP- β -CD

FT-IC спектри узорака снимљени су техником танких транспарентних таблета, направљених од калијум бромида (150 mg KBr и по 0,1 mg узорака), након вакумирања и пресовања под притиском од око 200 MPa. На овакав начин је извршена FT-IC анализа кверцетина, инклузионог комплекса кверцетина: HP - β -CD и одговарајуће физичке смеше: кверцетина са 2-хидроксипропил- β -циклодекстрином. За све узорке снимања су вршена у области таласних бројева од 4000 до 400 cm^{-1} на FT-IC спектрофотометру Bomem Hartmann & Braun MB-series. Спектри су обрађени применом софтвера Win-Bomem Easy (*Капор и сар., 2010; Николић и сар., 2012*).

3.4.3.2. $^1\text{H-NMR}$ карактеризација инклузионог комплекса кверцетин: HP β -CD

$^1\text{H-NMR}$ спектри инклузионог комплекса, кверцетина и 2-хидроксипропил- β -циклодекстрина снимљени су на Bruker AC 250 E NMR спектрометру са радном фреквенцијом 250 MHz у стакленој кивети пречника 5 mm на собној температури пулсном методом са вишеструким понављањем пулсева. Као растварач коришћена је деутерисана вода, D_2O и DMSO (*Николић и сар., 2012*).

3.4.3.3. Рентгено структурна (X- ray) карактеризација инклузионог комплекса кверцетин: НР-β-CD

X-ray анализа урађена је при следећим условима: узорци су озрачени монохроматским CuK_α зрачењем и анализирани под углом 2θ између 3 и 60° са кораком $0,05^\circ$ и временом задржавања по кораку 2 s. У току снимања коришћени су напон и јачина струје $U=40$ kV и $I=15$ mA, респективно (Николић и сар., 2012).

3.5. Статистичка обрада података

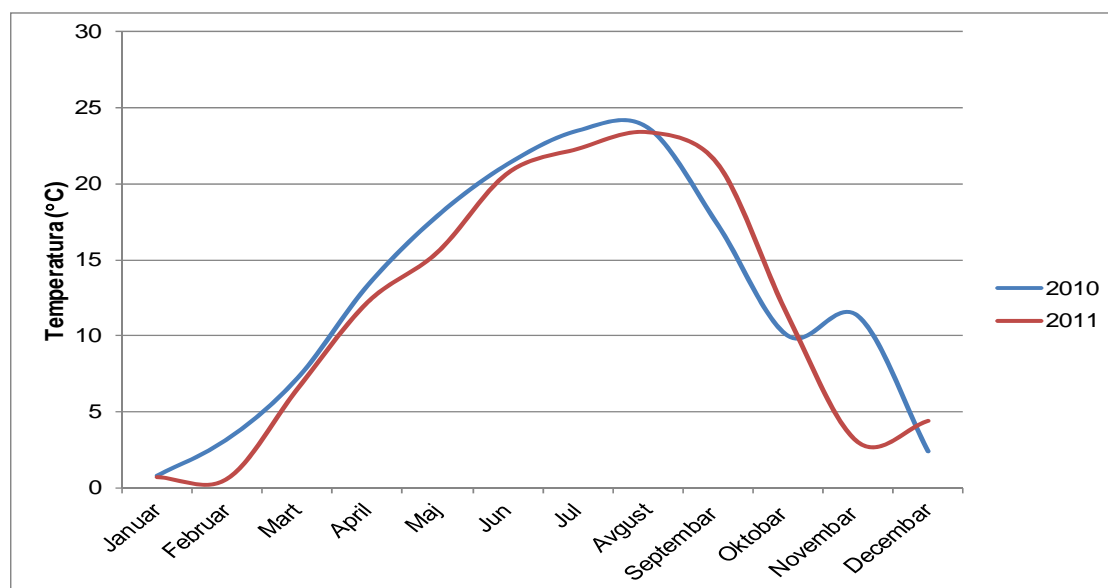
Резултати су представљени као средња вредност \pm стандардна девијација три детерминације. Статистичке анализе извршене су помоћу Студентовог t -теста и једносмерне анализе варијансе. Вишеструко поређење средина утврђено је применом теста најмање значајне разлике (LSD). Вредност вероватноће од $0,05$ сматрана је значајном. Сва израчунавања извршена су применом статистичког програма (SPSS, verzija 11.0). Вредности IC_{50} израчунате су помоћу нелинеарне регресионе анализе са сигмоидалне криве односа доза-одговор.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. Анализа агроеколошких услова гајења поврћа

Испитиване врсте поврћа: празилук *Allium porum* L., паприка *Capsicum annuum* L., парадајз *Lycopersicon esculentum* Mill. и мрква *Daucus carota* L. гајене су на локалитету Трбушани - Чачак, Моравички округ, у заштићеном простору типа пластеника, без допунског загревања у коме су температурни услови директно зависили од спољне температуре ваздуха (слика 19).

На основу кретања средњих дневних температура у годинама испитивања запажа се да је пролећни циклус 2010. године био са повољнијим температурним условима у односу на исти период 2011. године. Природне падавине нису праћене, јер нису утицале на стање усева обзиром да је гајење обављено у заштићеном простору, где је вршено само наводњавање по потреби, зависно од стања усева.



Слика 19. Средње дневне температуре за 2010. и 2011. годину

Земљиште биљкама служи да се у њему учврсте и укорене и да из њега користе неопходне хранљиве материје и воду. Отуда се сматра да је земљиште средина изузетно важна у масовној биљној производњи. Ако је земљиште, односно обрадиви слој растресит, плодан са израженом микрофлором, повољном реакцијом, довољном влагом, и уз примену добре технологије, биљке ће дати максимум приноса, што је крајњи циљ сваке производње (Поповић, 1991).

Анализе земљишта на ком су гајене изабране врсте поврћа, показала је да је земљиште тежег механичког састава, типа смонице, тамније боје, богато хумусом и спада у

потенцијално најплоднија земљишта. На основу добијених резултата извршених агрохемијских анализа (табеле 4, 5 и 6, слика 20), утврђено је да земљиште има висок садржај хумуса 5,2 % у слоју 0 - 20 cm и 1,9 % у слоју 20 - 40 cm; укупног азота од 0,28 % у слоју од 0 - 20 cm и 0,11 % у слоју 0 - 20 cm; лакоприступачног фосфора (50,2 mg/100g), калијума (136 mg), калцијума (995 mg) и магнезијума (85 mg).

Табела 4. Физичке особине анализираног земљишта

Дубина профила (cm)	Песак >0,2 (%)	Песак 0,2-0,02 (%)	Прах 0,02 - 0,02 (%)	Глина <0,002 (%)	Укупни садржај (%)	Укупни садржај (%)
					Песак	Глина
0-20	1,23	29,77	31,0	38,00	31,00	69,00
20-40	0,10	24,40	22,50	53,00	24,50	75,50

Табела 5. Агрохемијска анализа земљишта

Дубина профила (cm)	pH	Хумус (%)	C (%)	N (%)	Однос C/N	P ₂ O ₅ (%)	K ₂ O (%)
0-20	6,10	5,20	3,0	0,28	11,0:1	0,34	0,63
20-40	6,40	1,90	1,1	0,11	9,6:1	0,15	0,59

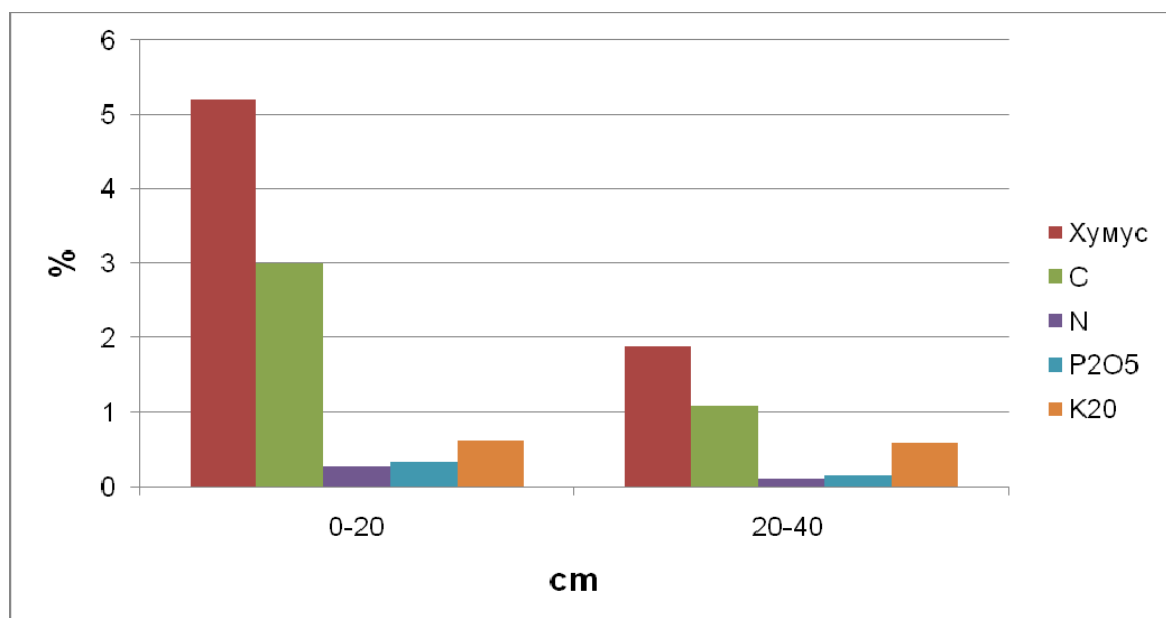
На основу резултата испитивања киселости земљишта утврђено је да је ово земљиште повољно за производњу поврћа, посебно парадајза јер pH вредности су у интервалу од 6,10 у слоју од 0 - 20 cm до 6,40 у слоју 20 - 40 cm (Павловић, 1997).

На основу добијених резултата укупне анализе земљишта стање плодности земљишта изабране локације за гајење испитиваних врста поврћа је задовољавајуће и на тај начин је постигнут максимални ефекат на њихову производњу. Коренов систем испитиваних врста поврћа највећим делом образује се и налази у плићем ораничном слоју дубине до 20 cm, тако да је на основу извршених анализа он имао на располагању довољне количине приступачних хранива за неометан раст и развој и формирање вегетативних и генеративних биљних органа. Садржај свих испитиваних хранива управо је и био већи у

овом слоју у односу на дубљи слој од 20-40 cm, у коме показује тенденцију опадања (слика 20).

Табела 6. Агрохемијска анализа земљишта

Дубина профила (cm)	NH ₄ mg/100g	NO ₃ mg/100g	P ₂ O ₅ mg/100g	K ₂ O mg/100g	Ca mg/100g	Mg mg/100g	Ca/Mg	K/Mg
0-20	3,3	12,2	50,2	136,0	995,0	85,0	7,1:1	0,3:1
20-40	1,8	4,3	3,6	33,4	1059,0	43,0	15,1:1	0,2:1



Слика 20. Агрохемијска анализа земљишта на две дубине

4.2. Анализа хемијског састава испитиваних екстраката поврћа

У току две године (2010. и 2011.) праћен је хемијски састав јестивих делова изабраног поврћа. Добијени резултати (табеле 7 – 10, слика 21) указују да за испитиване сорте поврћа била је повољнија 2010. година. Ово се може приписати вишим средњим дневним температурама у току 2010. године током пролећног циклуса гајења који су утицали на веће концентрације испитиваних хемијских параметара. На основу резултата хемијског

састава плода паприке утврђено је да се садржај суве материје кретао од 6,5% у 2011. години док је у 2010. био повећан и износио је 8,7%. Плод парадајза садржао је више суве материје у 2010.години 6,0% у односу на 2011. годину где је износио 5,0%. Садржај суве материје код празилука такође је био виши у 2010. години 13,2%, док је у 2011. био 12,1%. Задебљали корен мркве имао је за 0,8% већи садржај суве материје у 2010. у односу на 2011. годину.

Табела 7. Хемијски састав плода паприке (*Capsicum annuum* L.)

Хемијски састав плода паприке, (g/100 g с.б.м.)	2010.	2011.
Сува материја	8,7 ± 0,2	6,5 ± 0,3
Протеини	1,4 ± 0,4	1,2 ± 0,8
Угљени хидрати	3,4 ± 0,1	3,0 ± 0,2

Табела 8. Хемијски састав плода парадајза (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Хемијски састав плода парадајза, (g/100 g с.б.м.)	2010.	2011.
Сува материја	6,0 ± 0,3	5,0 ± 0,7
Протеини	1,0 ± 0,4	0,8 ± 0,5
Угљени хидрати	4,0 ± 0,2	3,5 ± 0,4

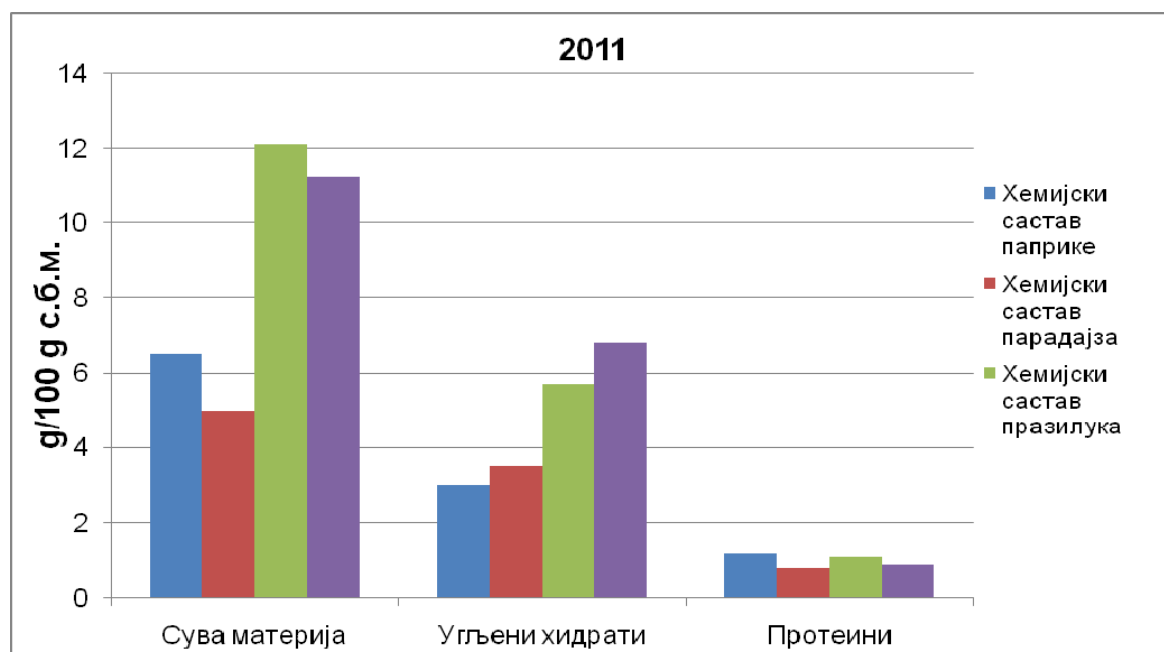
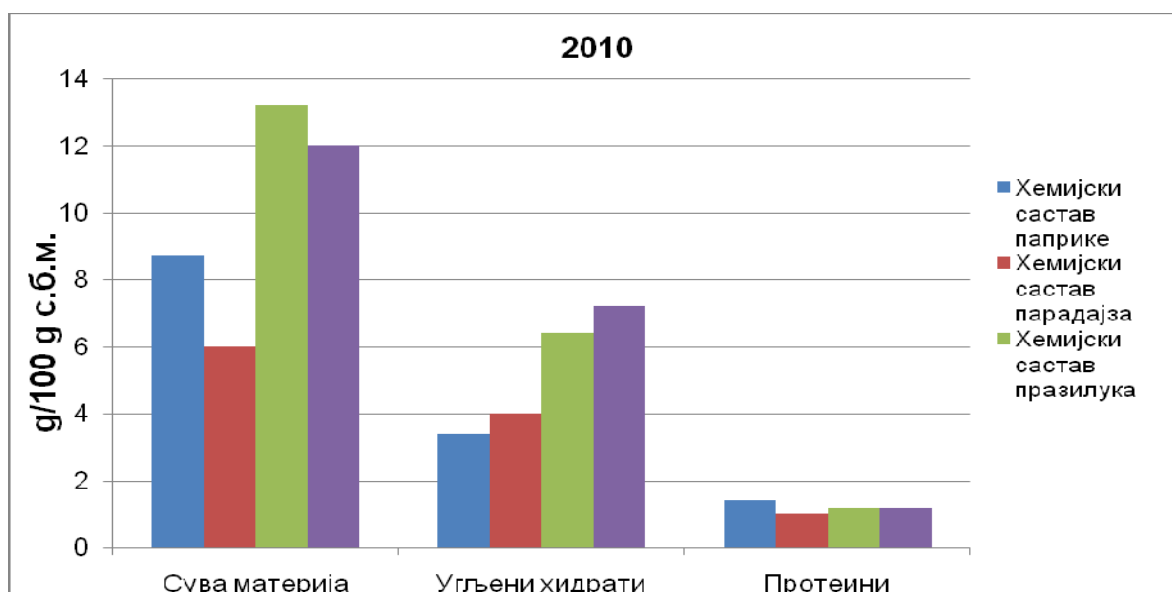
Табела 9. Хемијски састав празилука (*Allium porrum* L.)

Хемијски састав празилука, (g/100 g с.б.м.)	2010.	2011.
Сува материја	13,2 ± 0,8	12,1 ± 0,7
Протеини	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,1
Угљени хидрати	6,4 ± 0,7	5,7± 0,4

Табела 10. Хемијски састав задебљалог корена мркве (*Daucus carota* L.)

Хемијски састав мркве, (g/100 g с.б.м.)*	2010.	2011.
Сува материја	12,0 ± 0,9	11,2 ± 0,7
Протеини	1,2 ± 0,2	0,9 ± 0,7
Угљени хидрати	7,2 ± 0,7	6,8 ± 0,5

*суви биљни материјал



Слика 21. Хемијски састав испитиваних екстраката поврћа по годинама испитивања

4.3. Оптимални услови екстракције изабраних сорти поврћа

Екстракција изабраних сорти поврћа је урађена применом две екстракционе методе: екстракцијом у *Soxlet* – овом апарату и ултразвучном екстракцијом.

Екстракцијом у *Soxlet* – овом апарату добијено је: из 100 g сушеног биљног материјала листа прازیлука (*Allium porum* L.) 9,24 g суве материје; из 100 g стабла прازیлука (*Allium porum* L.) добијено је 8,71g суве материје, из 100g корена мркве (*Daucus carota* L.) добијено је 12,44 g суве материје, из 100g плода паприке (*Capsicum annuum* L.) добијено је 8,43 g, док из 100 g плода парадајза (*Lycopersicon esculentum* Mill.) добијено је 6,87 g суве материје (табела 11).

Табела 11. Садржај суве материје *Soxlet* – овом екстракцијом

Биљни материјал	Сува материја, g/100g с.б.м.
лист <i>Allium porum</i> L.	9,24 ± 0,21
стабло <i>Allium porum</i> L.	8,71 ± 0,12
<i>Daucus carota</i> L.	12,44 ± 0,32
<i>Capsicum annuum</i> L.	8,43 ± 0,12
<i>Lycopers. esculentum</i> Mill.	6,87 ± 0,45

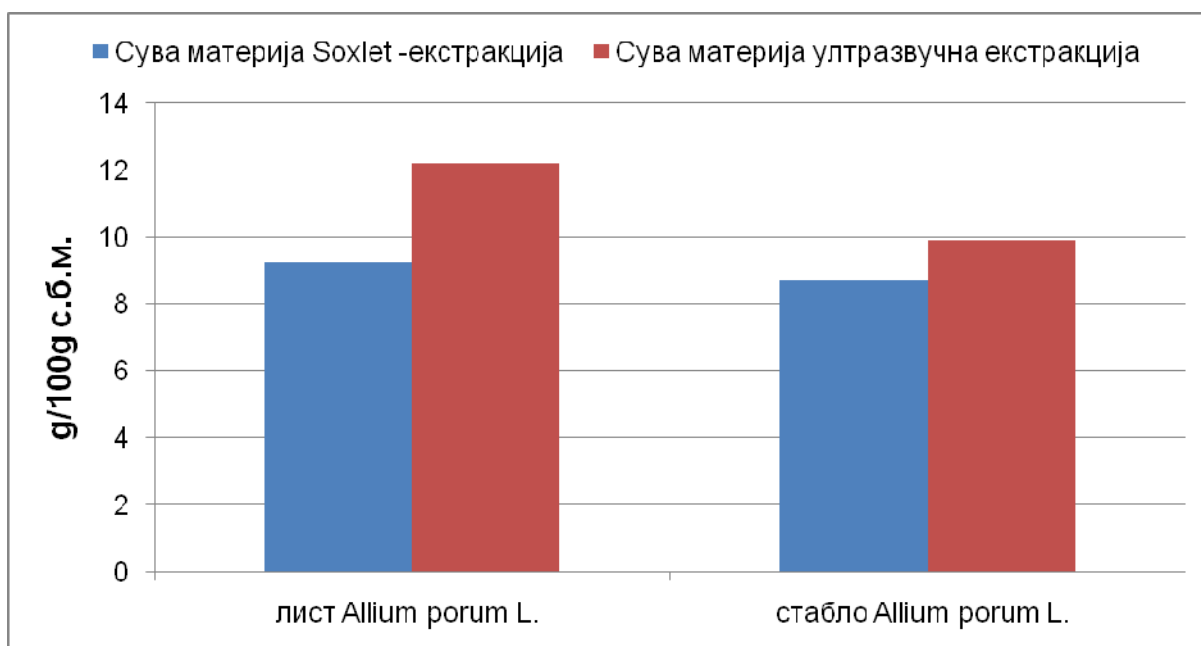
На основу ултразвучне екстракције листа и стабла прازیлука (*Allium porum* L.) добијено је: из 100 g сушеног биљног материјала листа (*Allium porum* L.) 12,21g суве материје; из 100 g стабла (*Allium porum* L.) добијено је 9,89g суве материје (табела 12).

Табела 12. Садржај суве материје ултразвучном екстракцијом екстракцијом

Биљни материјал	Сува материја, g/100g с.б.м.
лист <i>Allium porum</i> L.	12,21 ± 0,25
стабло <i>Allium porum</i> L.	9,89 ± 0,13

На основу резултата добијених за екстракте листа и стабла прازیлука, са две екстракционе методе, можемо закључити да је ултразвучна екстракција погоднији екстракциони поступак, јер време трајања екстракције је краће и количина добијене суве материје је

већа. Узорци листа празлука (*Allium porum* L.) су за 24,51% дали већи проценат суве материје ултразвучном екстракцијом, док узорци стабла празлука (*Allium porum* L.) за 11,94% у односу на садржај суве материје добијене Soxlet – овом методом (слика 22).



Слика 22. Садржај суве материје из листа и стабла празлука, екстракцијом по Soxlet –у и ултразвучном екстракцијом

4.4. Анализа фенолних једињења изабраних сорти поврћа

Због познатог биохемијског деловања фенолних једињења у природним узорцима посебан осврт је дат анализи фенолних једињења праћењем њиховог садржаја у две године 2010. и 2011.

4.4.1. Спектроскопска анализа укупних фенола и флавоноида у испитиваним екстрактима поврћа

Анализа добијених вредности за концентрацију укупних растворљивих фенола одређена је спектрофотометријском *Folin-Ciocalteu*-овом методом и изражена као еквивалент галне киселине (GAE), бројне вредности су приказане у табели 13.

Упоредном анализом утврђено је да највећу количину укупних фенола садржи етанолни екстракт празлука (*Allium porrum* L.) који износи 93,34 mg GA/g док екстракт паприке (*Capsicum annuum* L.), парадајза (*Lycopersicon esculentum* Mill.) и мркве (*Daucus carota* L.)

имају укупне феноле у количини од 48,26 mg GA/g односно 32,95mg GA/g, односно 50,41 mg GA/g, респективно, што је око 5 % мање фенола у поређењу са екстрактом празилука, што је у сагласности са литературним подацима за ове врсте поврћа (*Илић и сар., 2007*).

Имајући у виду велику разноврсност једињења која спадају у класу флавоноида, као и чињеницу да се већина налази везана у облику гликозида, тешко је пронаћи идеалну методу за одређивање њиховог укупног садржаја. Као и у случају методе за одређивање укупних фенола и ова метода показује неједнаку селективност према једињењима ове класе, јер позитивну реакцију дају само она једињења која имају доступне *o*-дихидрокси фенолне, 3-хидрокси- и 5-хидрокси хромонске као и *o*-дихидрокси карбонилне групе (*Gorinstein и сар., 2009; Merken и Beecher, 2000; Sakakibara и сар., 2003*).

Укупан садржај фенола и флавоноида праћен је у две сезоне 2010. и 2011. (табела 13, слика 23). На основу резултата испитивања, уочавамо да је садржај испитиваних фенолних једињења генерално био већи у 2010. години. Највећу разлику у садржају укупних фенола показују екстракти мркве *Daucus carota* L. (50,41 mg GAE/g у 2010. односно 38,47 mg GAE/g у 2011.) и паприке *Capsicum annum* L. 48,26 mg GAE/g односно 35,63 mg GAE/g. Садржај флавоноида за обе године испитивања је показао највећу разлику такође код екстракта мркве (*Daucus carota* L.). Узорци мркве из 2010. године су имали већи садржај флавоноида за 5,05 mg RE/ g у односу на узорке мркве из 2011. године. Екстракти поврћа се међусобно разликују у садржају укупних фенола од 32,95 до 50,41 mg GAE/g, у повољнијој 2010. години.

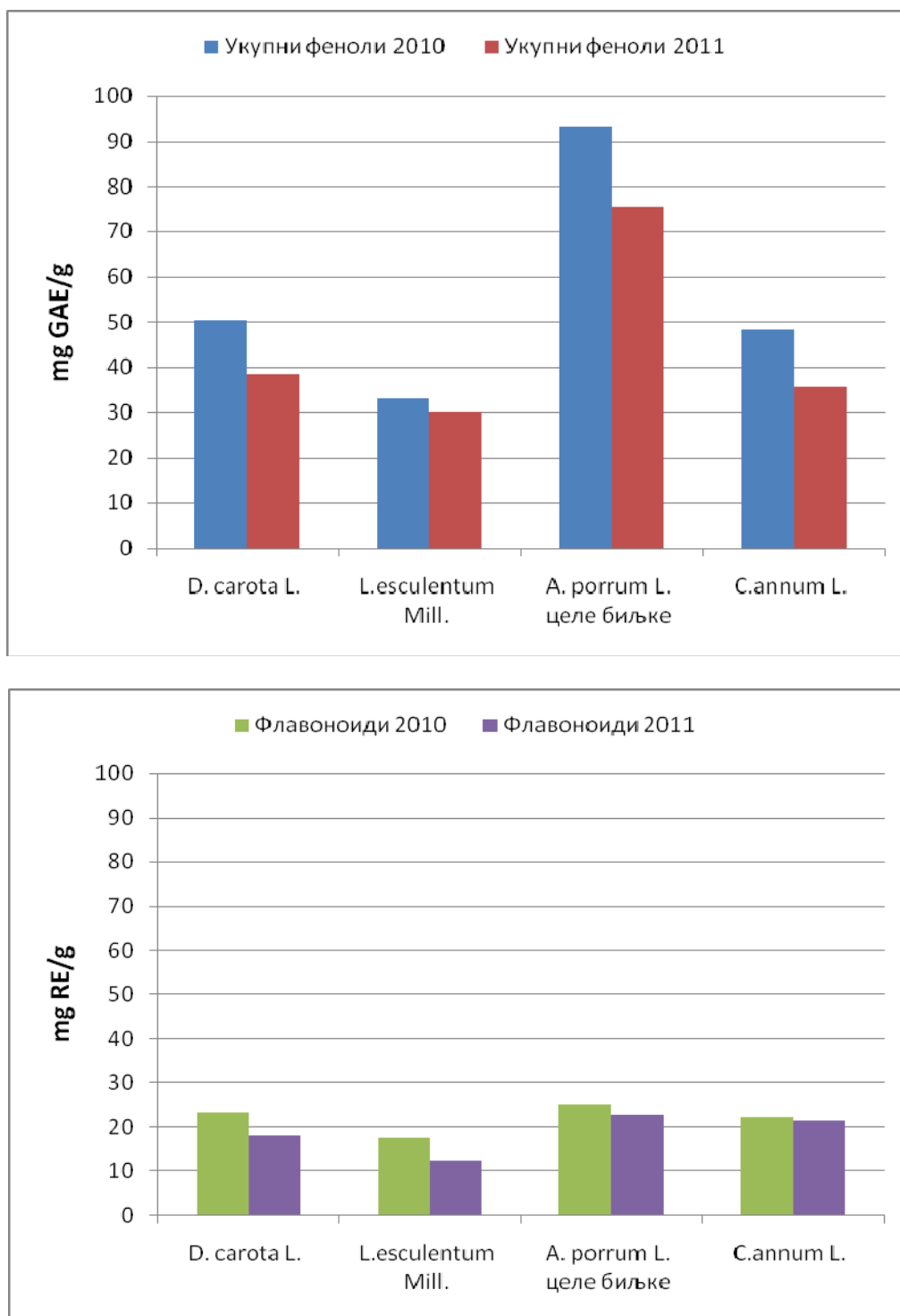
Редослед садржаја укупних фенола и флавоноида у испитиваним екстрактима поврћа је следећи:

празилук > мрква > паприка > парадајз

Табела 13. Садржај укупних фенола и флавоноида у испитиваним екстрактима поврћа у 2010. и 2011. години

Биљ. материјал	Укуп. феноли (mg GAE/g) 2010.	Флавоноиди (mg RE/g) 2010.	Укупни феноли (mg GAE/g) 2011.	Флавоноиди (mg RE/g) 2011.
<i>D. carota</i> L.	50,41 ± 0,02*	23,18 ± 0,54	38,47 ± 0,02	18,12 ± 0,55
<i>L. esculentum</i> Mill.	32,95 ± 0,65	17,43 ± 0,38	30,07 ± 0,65	12,32 ± 0,55
<i>A. porrum</i> L. целе биљке	93,34 ± 0,34	25,14 ± 0,32	75,45 ± 0,55	22,58 ± 0,35
<i>C. annum</i> L.	48,26 ± 0,69	22,24 ± 0,55	35,63 ± 0,55	21,42 ± 0,55

*Резултати су представљени као средња вредност најмање три експеримента



Слика 23. Садржај укупних фенола и флавоноида у испитиваним екстрактима поврћа у 2010. и 2011. години

Више средње дневне температуре у току 2010. године током пролећног циклуса гајења су утицале на веће концентрације свих испитиваних хемијских параметара.

Из тих разлога у даља испитивања коришћени су узорци поврћа из 2010. године.

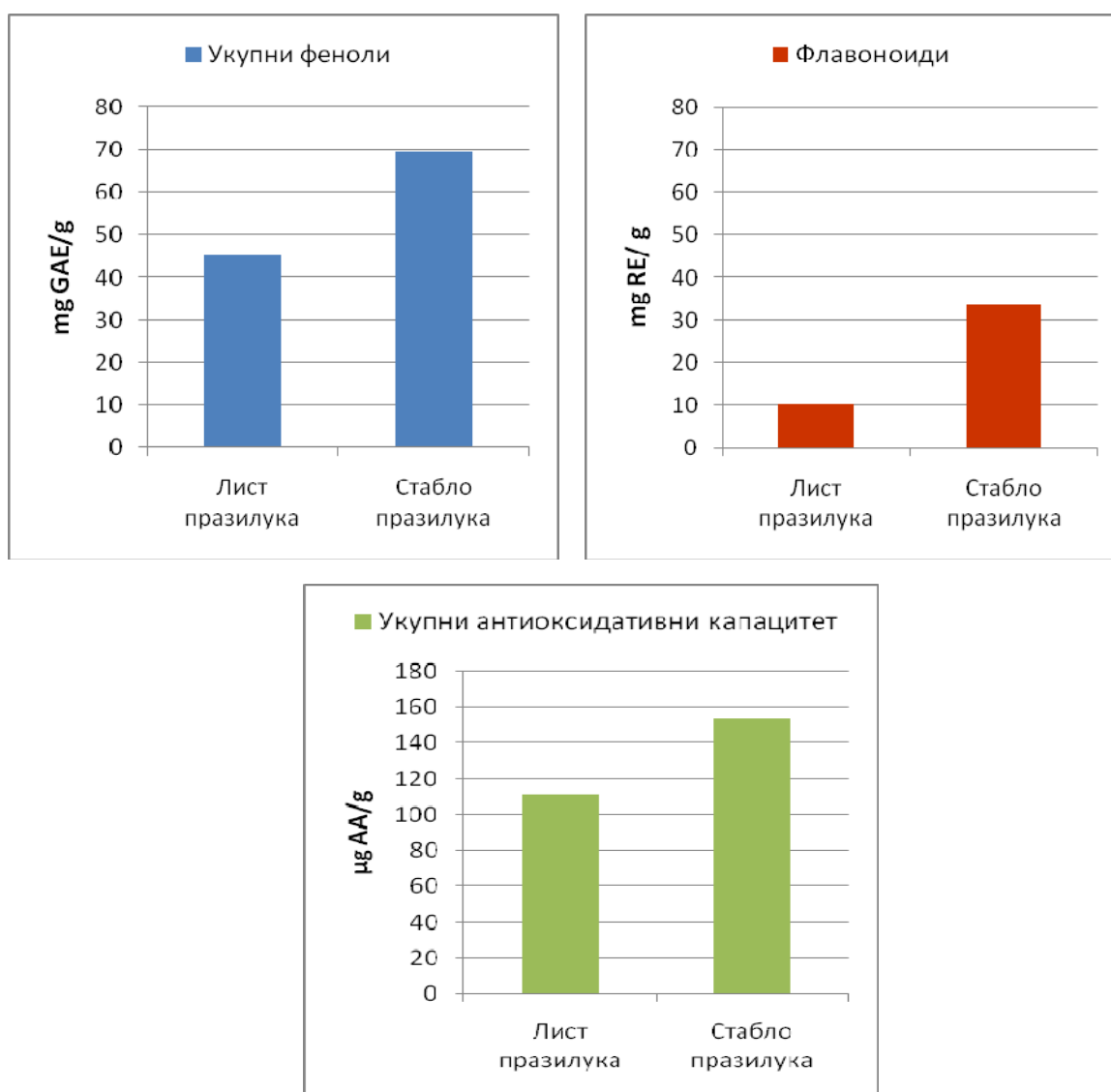
Изражена већа разлика у садржају укупних фенолних једињења екстракта празилука и осталих испитиваних екстраката поврћа, навела нас је да испитамо садржаје укупних

фенола, флавоноида и укупни антиоксидативни капацитет празилука и то посебно стабла и посебно листа (табела 14, слика 24).

Табела 14. Укупни феноли, флавоноиди и укупни антиоксидативни капацитет у етанолним екстрактима листа и стабла празилука (*Allium porrum* L.)

Биљ. материјал	Укупни феноли (mg GAE/g)	Флавоноиди (mg RE/ g)	Укупни антиоксидативни капацитет ($\mu\text{g AA/g}$)
Лист празилука	45,39 \pm 2,52	10,24 \pm 2,84	111,3 \pm 3,18
Стабло празилука	69,46 \pm 1,65	33,53 \pm 2,51	153,80 \pm 8,03 *

*Резултати су представљени као средња вредност најмање три експеримента



Слика 24. Укупни феноли, флавоноиди и укупни антиоксидативни капацитет у етанолским екстрактима листа и стабла празилука (*Allium porrum* L.)

Анализа добијених резултата је показала да екстракт стабла празилука садржи 52,57% фенола и 48,01% више флавоноида од екстракта парадајза, код кога су утврђене најниже вредности садржаја фенола и флавоноида. Добијене вредности су у корелацији са антиоксидационим капацитетом.

4.5. HPLC анализа фенолних једињења у испитиваним екстрактима поврћа

Идентификација и квантификација фенолних компонената присутних у екстрактима изабраних врста поврћа извршена је применом HPLC DAD методе (*Romani и сар., 2000*). Применом интерног стандарда.

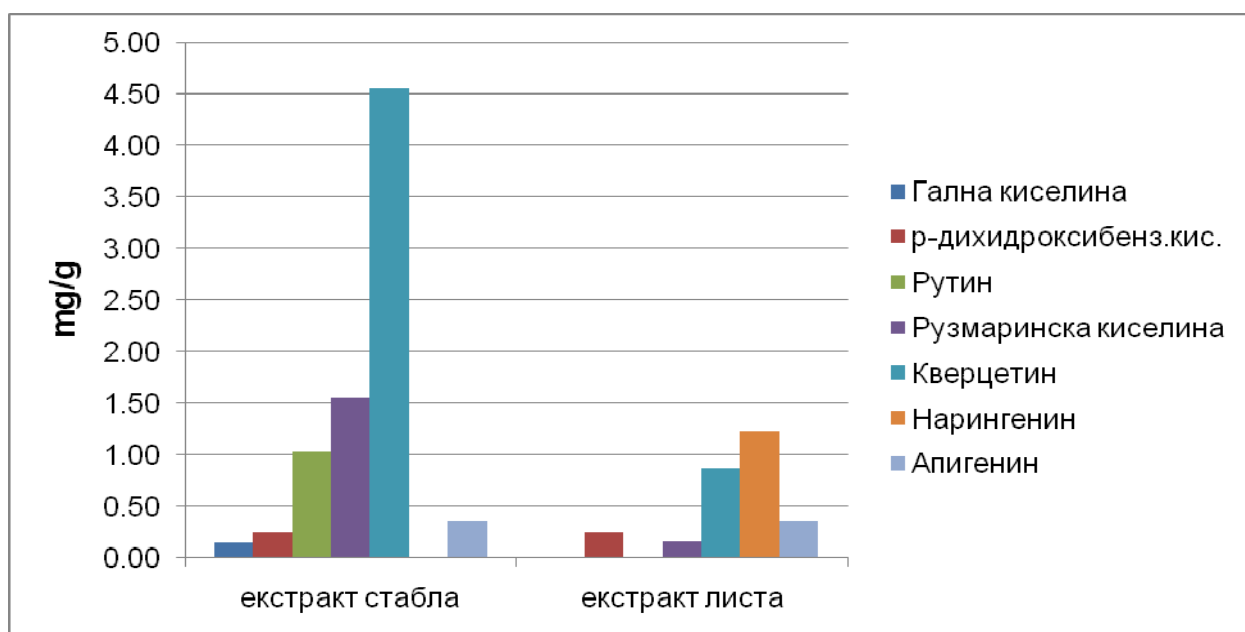
Квантитативном анализом етанолног екстракта стабла празилука (*Allium porum* L.) (табела 15, слика 26) утврђено је присуство следећих фенолних једињења : 1-гална киселина, 2-протокатехинска киселина, 3-*p*-дихидроксибензоева киселина, 4-кафена киселина, 5-ванилинска киселина, 6-хлорогенска киселина, 9-рутин, 11-рузмаринска киселина, 13-кверцетин, 16-апигенин. HPLC хроматограм на слици 26 је показао присуство седам фенолних киселина од којих најдоминантније су рузмаринска и *p*-дихидроксибензоева киселина. Од присутних флавоноида најдоминантнија компонента је кверцетин са 4,561 mg/g у односу на остала фенолна једињења чија је количина испод 2 mg/g сувог екстракта.

HPLC анализа листа празилука (*Allium porum* L.) је показала присуство следећих фенолних киселина: 3-*p*-дихидроксибензоева киселина, 6- хлорогенска киселина, 11-рузмаринска киселина и следећих флавоноида: 13-кверцетин, 14-нарингенин, 16-апигенин (табела 15, слика 27). Од присутних флавоноида најдоминантнија компонента је нарингенин 1,234 mg/g, сувог екстракта.

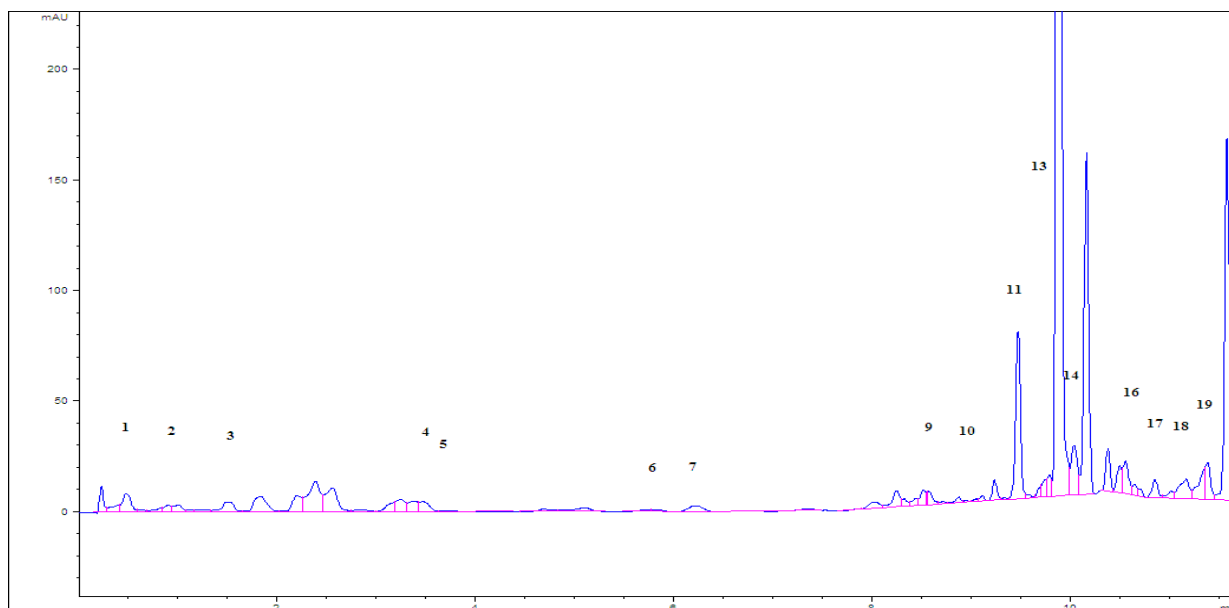
Поређењем резултата HPLC анализа екстракта листа и стабла празилука (*Allium porum* L.) указују да екстракт стабла празилука садржи већи број идентификованих фенолних једињења , као и већу количину кверцетина у стаблу 4,561 mg/g него у листу 0,876 mg/g (слика 25). Садржај рузмаринске киселине доминантнији је у стаблу (1,561 mg/g) него у екстракту листа (0,167 mg/g). Већи антиоксидативни капацитет екстракта стабла у односу на екстракт листа, је у корелацији са саставом. Нарингенин који је доминантни флавоноид код екстракта листа празилука (1,234 mg/g), највероватније је одговоран за биолошке активности овог екстракта.

Табела 15. Квалитативни и квантитативни састав фенолних компонената екстракта стабла и листа празилука (*Allium porrum* L.)

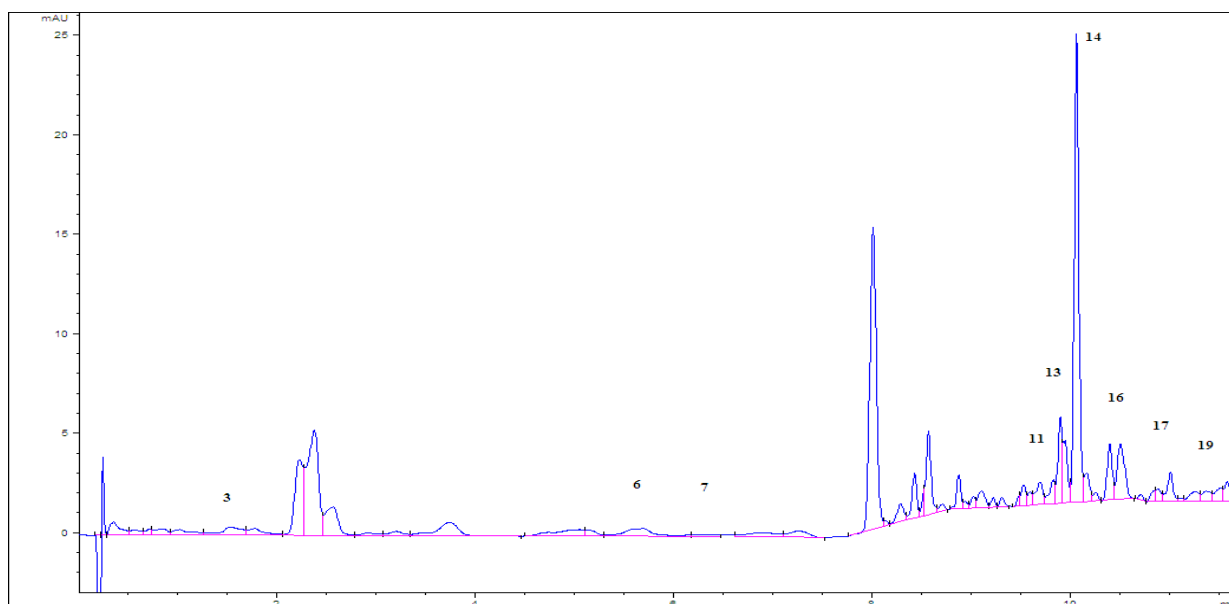
Број компоненте	Компонента	екстракт стабла, (mg/g)	екстракт листа, (mg/g)
1	Гална киселина	0,154 ± 0,023	-
2	Протокатехинска киселина	0,102 ± 0,002	-
3	<i>p</i> -дихидроксибензоева киселина	0,255 ± 0,078	0,255 ± 0,003
4	Кафена киселина	0,085 ± 1,025	-
5	Ванилинска киселина	0,104 ± 1,002	-
6	Хлорагенска киселина	0,083 ± 0,006	0,109 ± 0,072
9	Рутин	1,039 ± 0,058	-
11	Рузмаринска киселина	1,561 ± 0,174	0,167 ± 0,054
13	Кверцетин	4,561 ± 1,062	0,876 ± 0,134
14	Нарингенин	-	1,234 ± 0,125
16	Апигенин	0,360 ± 0,012	0,360 ± 0,023



Слика 25. Квалитативни и квантитативни састав фенолних компонената екстракта стабла и листа празилука (*Allium porrum* L.)



Слика 26. HPLC хроматограм етанолног екстракта стабла (*Allium porrum* L.). Нотирани пикови одговарају датим једињењима: 1-гална киселина, 2-протокатехинска киселина, 3-*p*-дихидроксибензоева киселина, 4-кафена киселина, 5-ванилинска киселина, 6- хлорогенска киселина, 9-рутин, 11-рузмаринска киселина, 13-кверцетин, 16-апигенин.



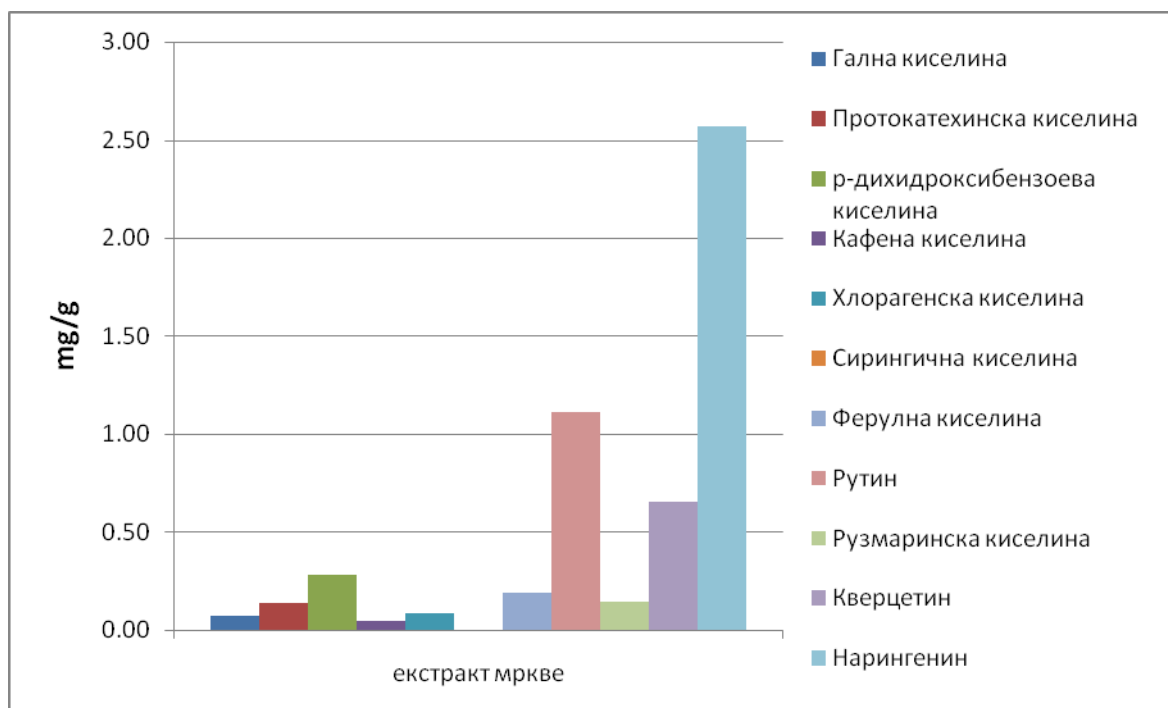
Слика 27. HPLC хроматограм етанолног екстракта листа *Allium porrum* L. Нотирани пикови одговарају датим једињењима: 3-*p*-дихидроксибензоева киселина, 6- хлорогенска киселина, 11-рузмаринска киселина, 13-кверцетин, 14-нарингенин, 16-апигенин.

Квантитативни и квалитативни састав етанолног екстракта мркве (*Daucus carota* L.), дати су у табели 16 и на слици 29.

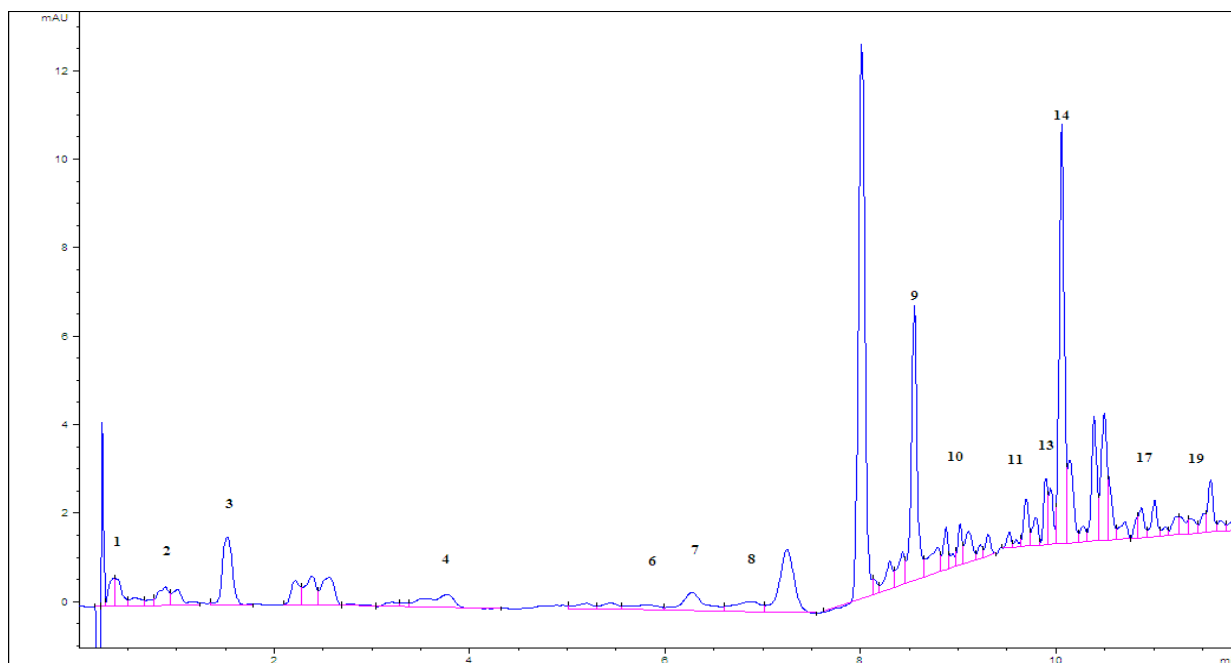
На основу добијених хроматограма екстракта мркве (*Daucus carota* L.) утврђено присуство следећих фенолних једињења: 1-гална киселина, 2-протокатехинска киселина, 3-*p*-дихидроксибензоева киселина, 4-кафена киселина, 6- хлорогенска киселина, 7- сиригична киселина, 8-ферулна киселина, 9-рутин, 11-рузмаринска киселина, 13-кверцетин, 14-нарингенин. Најдоминантније компоненте јесу флавоноиди нарингенин (2,567 mg/g) и рутин (1,111 mg/g).

Табела 16. Квалитативни и квантитативни састав фенолних компонената екстракта мркве (*Daucus carota* L.)

Број компоненте	Компонента	екстракт мркве, (mg/g)
1	Гална киселина	0,072 ± 0,002
2	Протокатехинска киселина	0,136 ± 0,007
3	<i>p</i> -дихидроксибензоева киселина	0,283 ± 0,005
4	Кафена киселина	0,047 ± 0,003
6	Хлорагенска киселина	0,083 ± 0,002
7	Сиригична киселина	0,005 ± 0,001
8	Ферулна киселина	0,187 ± 0,005
9	Рутин	1,111 ± 0,003
11	Ружмаринска киселина	0,147 ± 0,009
13	Кверцетин	0,654 ± 0,015
14	Нарингенин	2,567 ± 0,011



Слика 28. Квалитативни и квантитативни састав фенолних компонента екстракта мркве (*Daucus carota* L.)



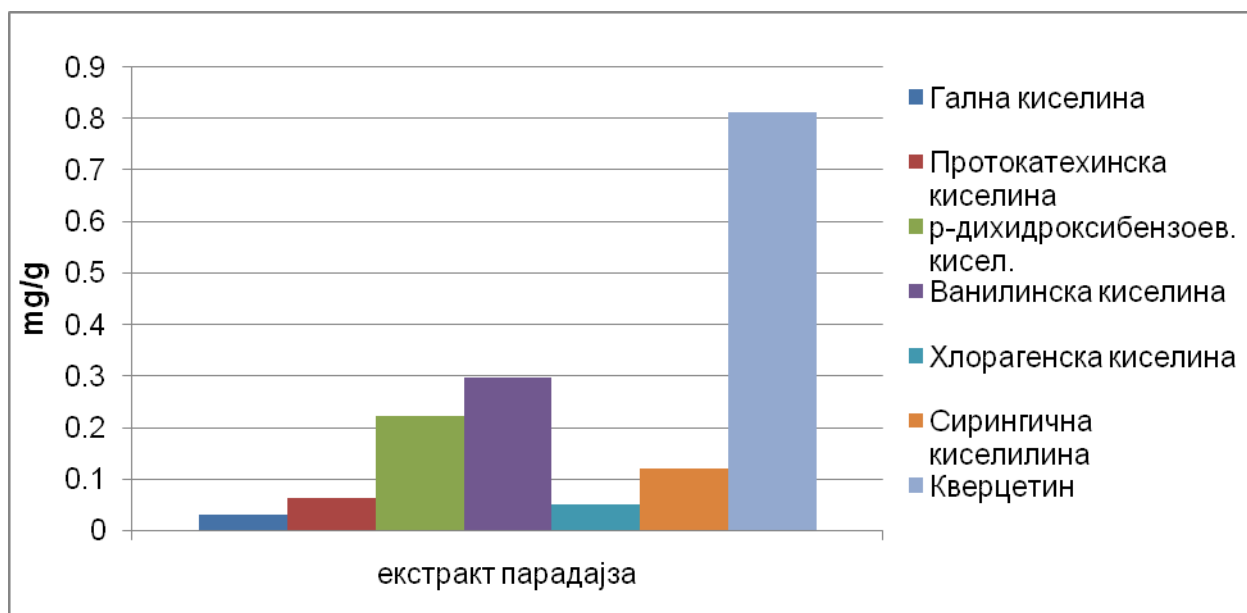
Слика 29. HPLC хроматограм етанолног екстракта *Daucus carota* L. Нотирани пикови одговарају датим једињењима: 1-гална киселина, 2-протокатехинска киселина, 3-p-дихидроксибензоева киселина, 4-кафена киселина, 6- хлорогенска киселина, 7-сирингична киселина, 8-ферулна киселина, 9-рутин, 11-рузмаринска киселина, 13-кверцетин, 14-нарингенин.

Квалитативном и квантитативном анализом екстракта парадајза (*Lycopersicon esculentum* Mill.) утврђено је присуство следећих фенолних једињења: 1-гална киселина, 2-протокатехинска киселина, 3-*p*-дихидроксибензоева киселина, 5-ванилинска киселина, 6-хлорогенска киселина, 7-сирингична киселина, 13-кверцетин.

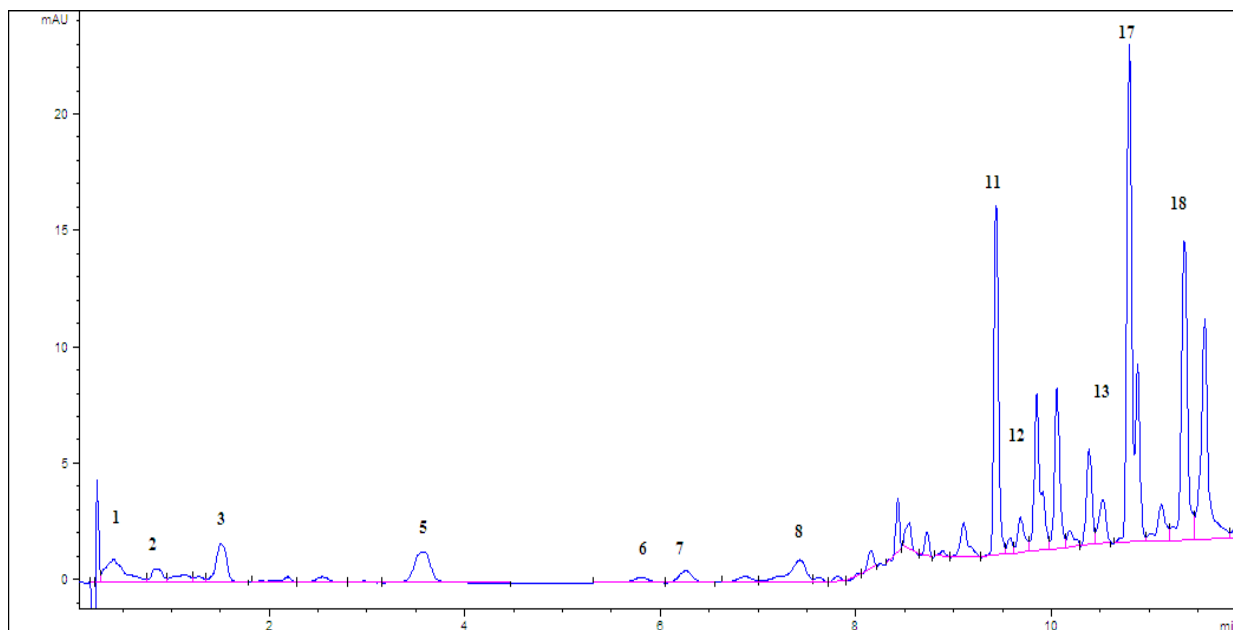
Доминантна компонента је флавоноид кверцетин (0,811 mg/g), (табела 17, слике 30 и 31).

Табела 17. Квалитативни и квантитативни састав фенолних компонената екстракта парадајза (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Број компоненте	Компонента	Екстракт парадајза, (mg/g)
1	Гална киселина	0,030 ± 0,001
2	Протокатехинска киселина	0,061 ± 0,002
3	<i>p</i> -дихидроксибензоева киселина	0,221 ± 0,005
5	Ванилинска киселина	0,295 ± 0,002
6	Хлорогенска киселина	0,049 ± 0,001
7	Сирингична киселина	0,119 ± 0,008
13	Кверцетин	0,811 ± 0,001



Слика 30. Садржај фенолних киселина и флавоноида у етанолном екстракту парадајза (*Lycopersicon esculentum* Mill.)



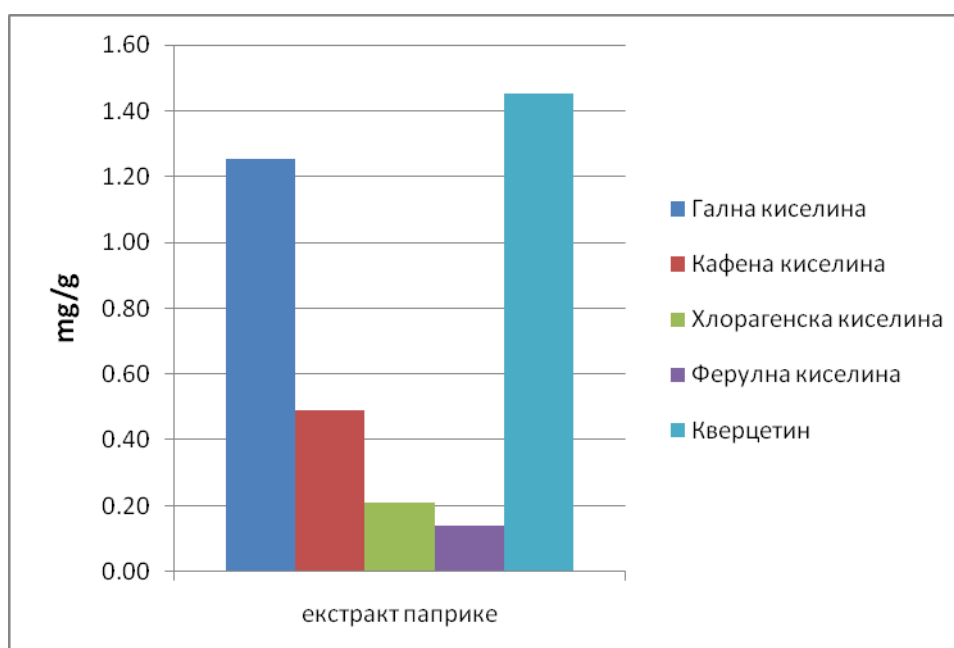
Слика 31. HPLC хроматограм етанолног екстракта парадајза (*Lycopersicon esculentum* Mill.) . Нотирани пикови одговарају датим једињењима: 1-гална киселина, 2-протокатехинска киселина, 3-*p*-дихидроксибензоева киселина, 5-ванилинска киселина, 6-хлорогенска киселина, 7-сирингична киселина, 13-кверцетин.

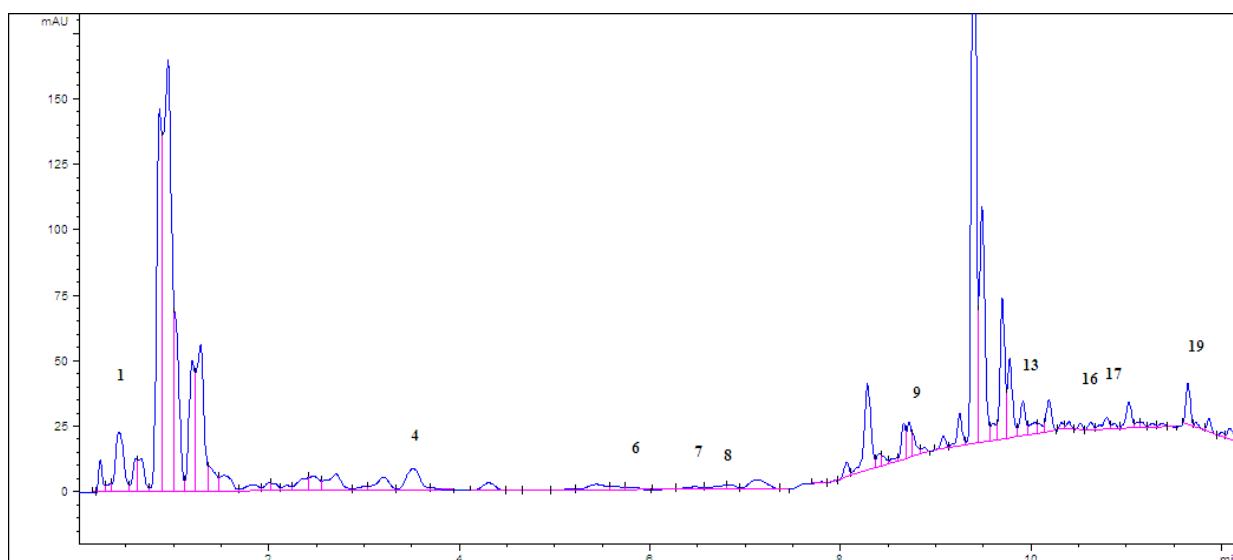
Квалитативна и квантитативна анализа етанолног екстракта паприке (*Capsicum annuum* L.) показује присуство следећих фенолних једињења: 1-гална киселина, 4-кафена киселина, 6-хлорогенска киселина, 8- ферулна киселина, 13-кверцетин.

На основу хроматограма уочено је да је од фенолних киселина доминантна гална киселина (1,252 mg/g), а код флавоноида доминантна компонента је кверцетин (1,453 mg/g), (табела 18, слике 32 и 33).

Табела 18. Квалитативни и квантитативни састав фенолних компонената екстракта паприке (*Capsicum annuum* L.)

Број компоненте	Компонента	екстракт паприке, (mg/g)
1	Гална киселина	1,252 ± 0,134
4	Кафена киселина	0,492 ± 0,002
6	Хлорагенска киселина	0,209 ± 0,001
8	Ферулна киселина	0,141 ± 0,009
13	Кверцетин	1,453 ± 0,105

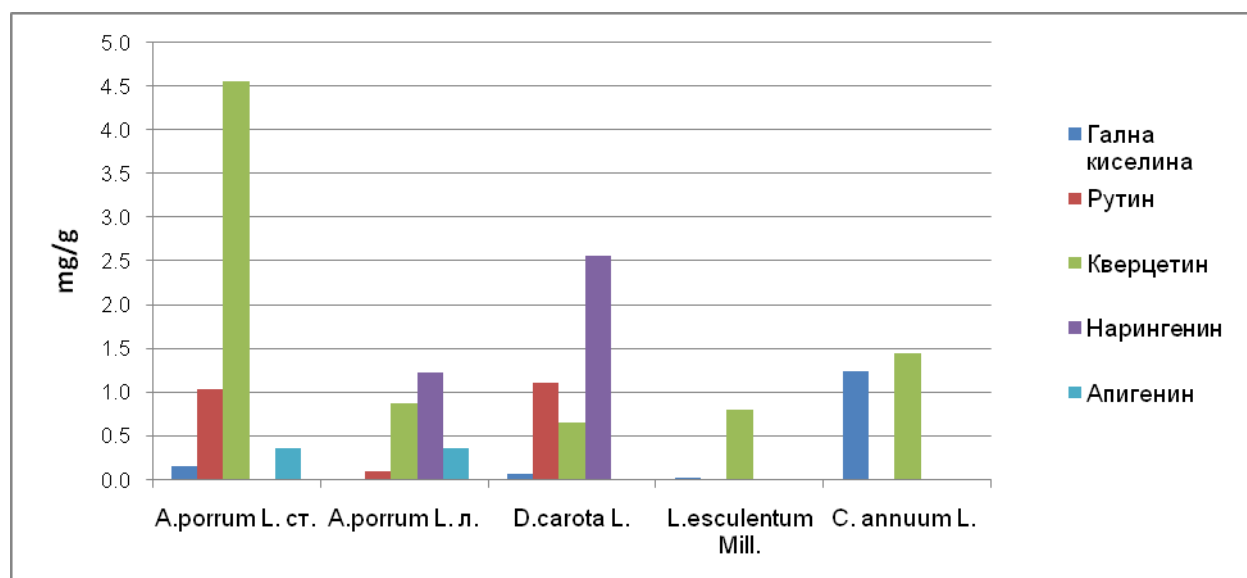
**Слика 32.** Квалитативни и квантитативни састав фенолних компонената етанолног екстракта паприке (*Capsicum annuum* L.)



Слика 33. HPLC хроматограм етанолног екстракта паприке (*Capsicum annuum* L.)

Нотирани пикови одговарају датим једињењима: 1-гална киселина, 4- кафена киселина, 6- хлорогенска киселина, 8- ферулна киселина, 13-кверцетин.

Упоредиваљем добијених вредности укупних фенолних киселина и флавоноида у испитиваним екстрактима поврћа на основу HPLC хроматограма уочено је да су најдоминантније компоненте : гална киселина, рутин, кверцетин, нарингенин и апигенин (слика 34).



Слика 34. Квалитативни и квантитативни састав доминантних фенолних компонента свих испитиваних екстраката поврћа

Квалитативна и квантитативна анализа екстраката одређена применом HPLC методе потврђује заступљеност кверцетина код свих етанолних екстраката поврћа али у битно различитим количинама. Највећу концентрацију садржи екстракт стабла празилука (*Allium porrum* L.), (4,561 mg/g), затим екстракт паприке (*Capsicum annum* L.), (1,453 mg/g), а још мање количине садрже екстракти листа празилука (*Allium porrum* L.), (0,876 mg/g), екстракт парадајза (*Lycopersicon esculentum* Mill.), (0,811 mg/g), док најмању количину садржи екстракт мркве (*Daucus carota* L.), (0,654 mg/g).

4.6. Антиоксидациона активност испитиваних екстраката поврћа

Антиоксидациона активност фенолних једињења је последица њиховог редокс потенцијала, могућношћу хелатизације метала или „хватања” радикалног кисеоника (*Xu и сар., 2010*).

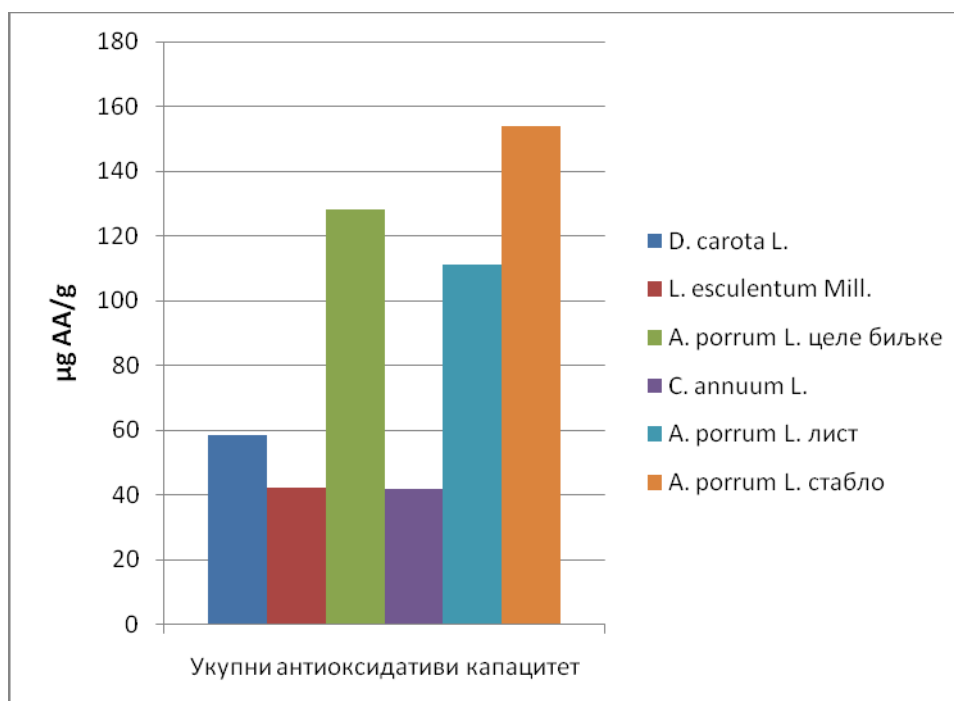
Многа истраживања су посвећена повезаности антиоксидативне активности биљних производа са концентрацијом присутних фенолних једињења (*Veliogly и сар., 1998*). У том циљу извршена је спектрофотометријска анализа укупне антиоксидативне активности испитиваних екстраката поврћа, применом фосфомолибденске и DPPH методе.

Добијени резултати су приказани у табели 19 и на слици 35. Резултати укупне антиоксидативне активности се приказују као број $\mu\text{g/mL}$ еквивалената аскорбинске киселине, резултати антиоксидационе активности DPPH методом представљени су као IC_{50} вредности, односно концентрације тестираног једињења које смањују полазну концентрацију слободне радикалске врсте за 50%.

Табела 19. Антиоксидативна активност испитиваних екстраката поврћа

Екстракт	IC ₅₀ (µg/mL) DPPH активност	Укупни антиоксидативи капацитет (µg AA/g)
<i>D. carota</i> L.	15,45 ± 0,55	58,51 ± 1,18
<i>L. esculentum</i> Mill.	17,41 ± 0,32	42,21 ± 0,72
<i>A. porrum</i> L. целе биљке	10,28 ± 1,02	128,02 ± 0,72
<i>C. annuum</i> L.	13,79 ± 0,69	41,74 ± 1,05
<i>A. porrum</i> L. лист	7,28 ± 0,43	111,3 ± 3,18
<i>A. porrum</i> L. стабло	5,15 ± 0,31	153,80 ± 8,03*
Аскорбинска киселина	6,05 ± 0,34	-
ВНТ	15,61 ± 1,26	-

*Резултати су представљени као средња вредност најмање три експеримента.



Слика 35. Укупна антиоксидативни капацитет испитиваних екстраката поврћа

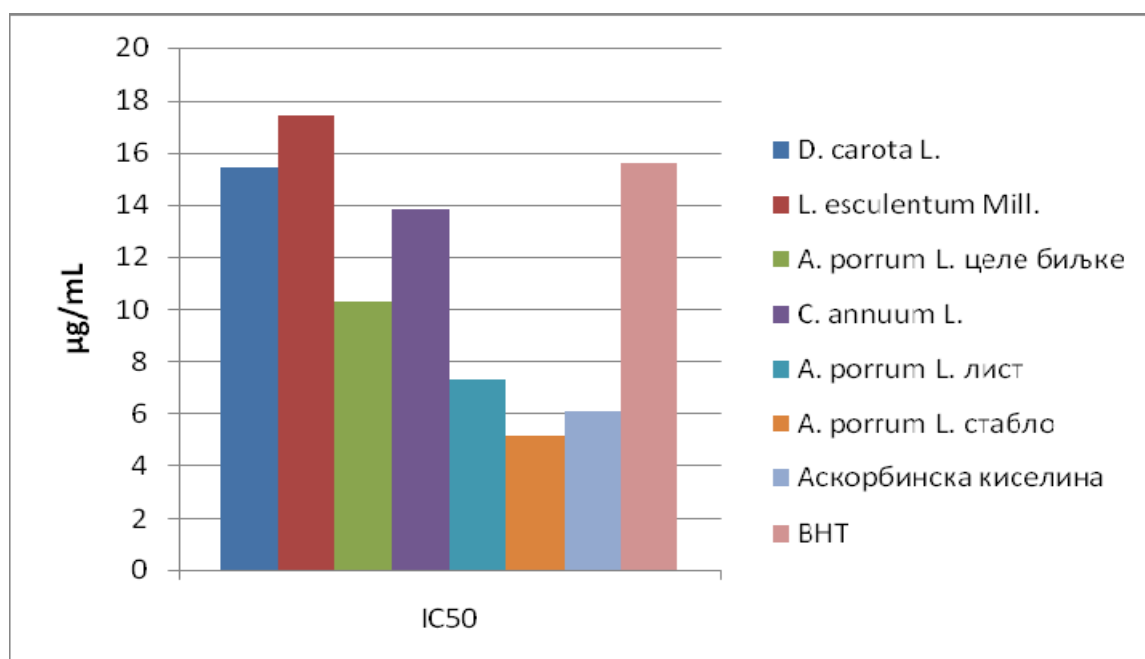
Као што је познато, уколико је IC₅₀ вредност мања, активност антиоксиданата је израженија. Добијене IC₅₀ вредности за антиоксидативну активност стандарда тј

аскорбинске киселине $IC_{50}= 6,05 \mu\text{g}/\text{mL}$ и за ВНТ-а је $IC_{50}=15,61 \mu\text{g}/\text{mL}$ (табела 19 и слика 36).

Док IC_{50} вредности испитиваних екстраката показују да екстракт празилука (*Allium porrum* L.), има најмању вредност ($10,28 \mu\text{g}/\text{mL}$), а екстракт паприке (*Capsicum annuum* L.), има највећу вредност IC_{50} ($13,79 \mu\text{g}/\text{mL}$).

На основу најбољих резултата, укупног антиоксидативног капацитета и укупне антиоксидативне активности екстракта празилука (*Allium porrum* L.), упоредили смо екстракте стабла и листа празилука и видели да највеће антиоксидативне активности показује екстракт стабла празилука. Редослед антиоксидативне активности свих испитаваних екстраката поврћа, је следећи:

празилук(стабло) > празилук(лист) > празилук(цела биљка) > паприка > мрква > ВНТ
> парадајз



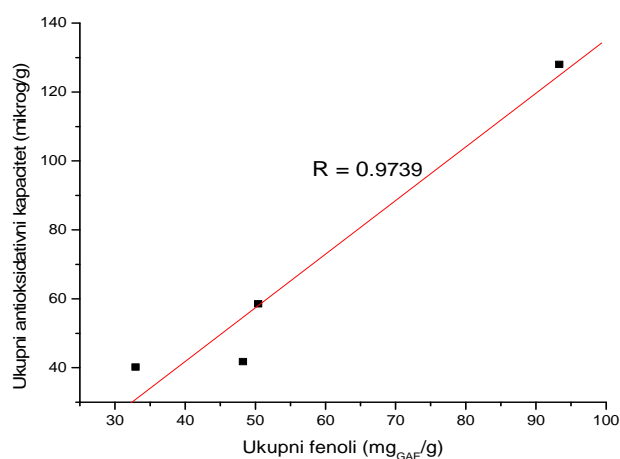
Слика 36. Вредности антиоксидативне активности испитиваних екстраката поврћа

Применом корелационе анализе испитивана је корелација између одређених концентрација укупних фенола и укупних флавоноида са укупним антиоксидационим потенцијалом испитиваних узорка поврћа. На основу вредности из табеле 20 добијене су корелациони индекси 0,9739 за корелацију са укупним фенолима и 0,7317 за корелацију са укупним флавоноидима, што указују на веома добру корелацију (слика 37).

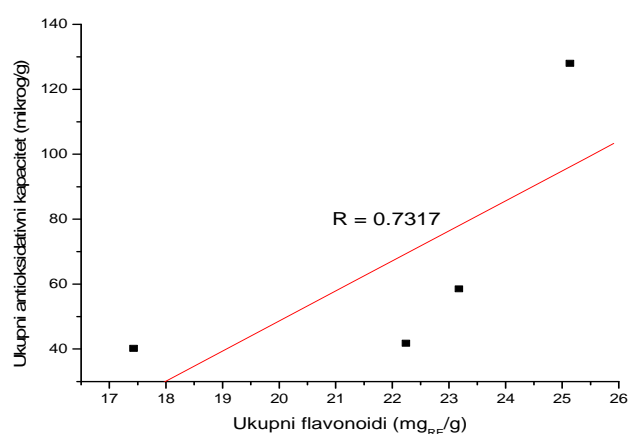
Табела 20. Укупни феноли, флавоноиди и укупни антиоксидативни капацитет у испитиваним екстрактима поврћа

Екстракт	Укупни феноли (mg GAE/g)	Флавоноиди (mg RE/g)	Укупни антиоксидативни капацитет (AA), (µg/g)
<i>D. carota</i> L.	50,41 ± 0,02	23,18 ± 0,54	58,5 ± 1,18
<i>L. esculentum</i> Mill.	32,95 ± 0,65	17,43 ± 0,38	40,2 ± 0,72
<i>A. porrum</i> L. (целе биљке)	93,34 ± 0,34	25,14 ± 0,32	128,0 ± 0,72
<i>C. annuum</i> L.	48,26 ± 0,69	22,24 ± 0,55	41,74 ± 1,05*

* Резултати су представљени као средња вредност најмање три експеримента.



(A)



(B)

Слика 37. Корелационе зависности између укупних фенола (A) и укупних флавоноида (B) са укупним антиоксидативним капацитетом испитиваних узорака поврћа

Редослед антиоксидативног капацитета свих испитиваних екстраката поврћа је следећи:

парадајз < паприка < мрква < празилук (цела биљка) < празилук (лист)
< празилук(стабло)

Ови резултати су у сагласности са научним радовима који потврђују међузависност антиоксидативне активности и количине фенолних једињења присутних у испитиваним екстрактима (*Veliogly u cap.*, 1998; *Beninger u Hosfield.*, 2003; *Prior u cap.*, 1998).

4.7. Антимикробна активност испитиваних екстраката поврћа

Познато је да фенолна једињења токсично делују на неке микроорганизме, а механизам деловања обухвата инхибицију оксидованих компоненти, као и могућу реакцију са сулфхидрилним групама кроз више неспецифичних реакција са протеинима (*Aziz u cap.*, 1998; *Kuntz u sar.*, 1999).

У овом раду, применом микро-дилуционе методе одређена је минимална инхибиторна концентрација, за све испитиване етанолне екстракте поврћа. На овај начин одређене су најниже концентрације екстраката испитиваног поврћа које спречавају раст тестираних микроорганизама. У табелама 21, 22 и на сликама 38 и 39 приказани су резултати добијених вредности антимикробне активности испитиваних екстраката поврћа: *Capsicum annuum* L., *Daucus carota* L., *Lycopersicon esculentum* Mill. и *Allium porrum* L. за грам-позитивне бактерије: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus mirabilis* ATCC 14153 и *Bacillus subtilis* ATCC 6633; грам-негативне бактерије: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Proteus vulgaris* ATCC 13315 и гљиве: *Candida albicans* ATCC 10231 и *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Резултати показују антимикробну активност етанолних екстраката поврћа *Capsicum annuum* L., *Daucus carota* L. и *Lycopersicon esculentum* Mill. у опсегу концентрација од 19,53 µg/mL до 312,5 µg/mL, што представља добру антимикробну активност у односу на стандардни антибиотик *amracin* (за бактерије) и *ketokonazol* (за гљиве).

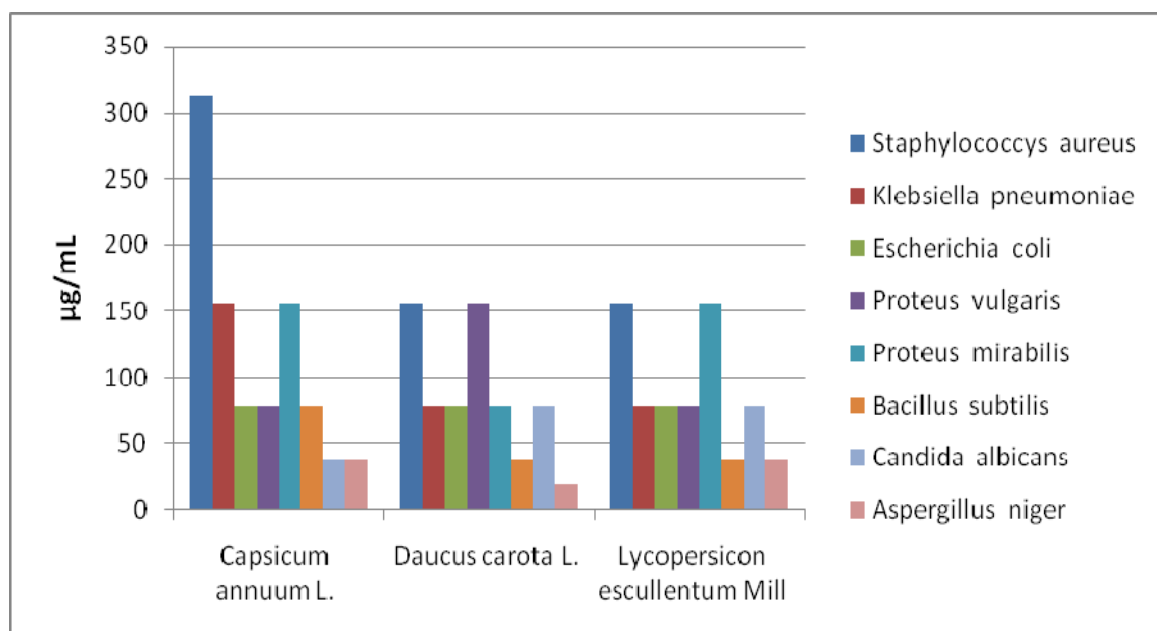
Етанолни екстракт *Capsicum annuum* L. је показао најјачу активност на гљиве *Aspergillus niger* и *Candida albicans* са MIC=31,25 µg/mL а најмању осетљивост према грам-позитивној бактерији *Staphylococcus aureus* MIC=312,5 µg/mL.

Етанолни екстракт *Daucus carota* L. је показао најјачу активност на гљиву *Aspergillus niger* са MIC=19,53 µg/mL, док је незнатно мању активност показао на грам-позитивној бактерији *Bacillus subtilis* са MIC=39,10 µg/mL.

Етанолни екстракт *Lycopersicon esculentum* Mill. је најјачу активност показао према бактеријама *Bacillus subtilis* и гљиву *Aspergillus niger* са MIC=39,10 µg/mL, а умерено јако антимикубно дејство је показао према грам-негативним бактеријама *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* и гљиву *Candida albicans* MIC=78,12 µg/mL. Такође, најмању активност је показао према грам-позитивним бактеријама *Proteus mirabilis* и *Staphylococcus aureus* са MIC=156,21 µg/mL у односу на стандарни антибиотик. Дакле, у поређењу са стандарним антибиотицима (MIC од 0,97 до 1,95 µg/mL), екстракти испитиваних узорака поврћа су показали јаку до умерено јаку антимикубну активност са MIC вредностима најнижим од 19,53 µg/mL за изабране ATCC сојеве.

Табела 21. Минимална инхибиторна концентрација (MIC) етанолних екстраката испитиваног поврћа

Микро-организми	MIC µg/mL				
	<i>Capsicum annuum</i> L.	<i>Daucus carota</i> L.	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	Amracin	Ketokonazol
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	312,5	156,25	156,25	0,97	/
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	156,5	78,12	78,12	0,49	/
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	78,2	78,12	78,12	0,97	/
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	78,12	156,25	78,12	0,49	/
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14153	156,25	78,12	156,25	0,49	/
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	78,12	39,10	39,10	0,24	/
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	39,10	78,12	78,12	/	1,95
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	39,10	19,53	39,10	/	0,97



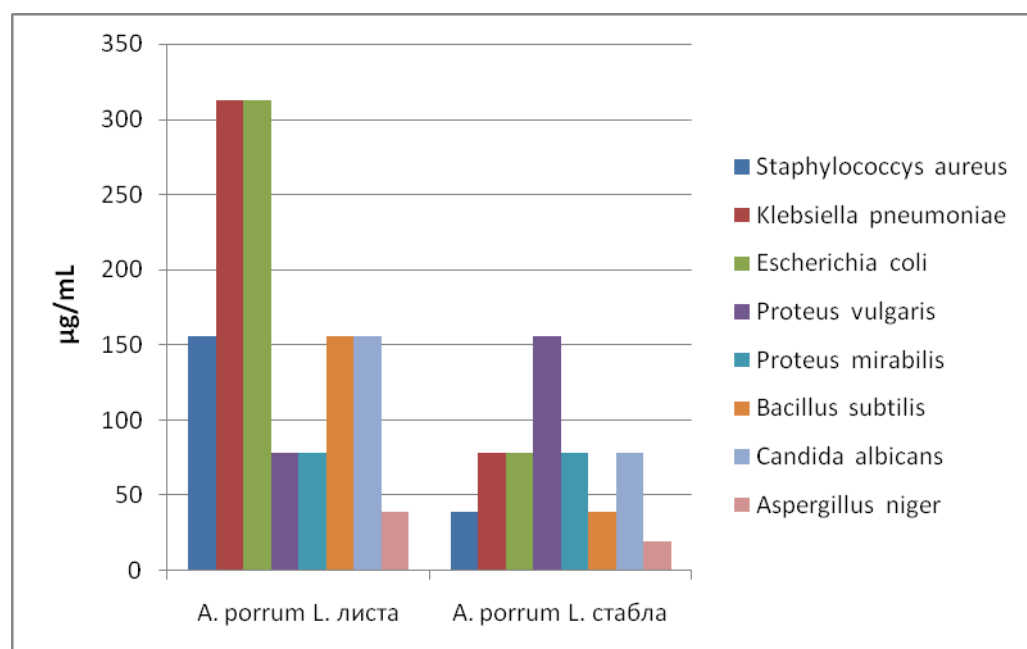
Слика 38. Вредности MIC ($\mu\text{g/mL}$) антимикуробне активности испитиваних екстраката

Добијени резултати антимикуробне активности екстракта стабла празилука (*Allium porrum* L.) показују најјаче антимикуробно дејство на гљиве *Aspergillus niger* са MIC=19,53 $\mu\text{g/mL}$, и на грам-позитивне бактерије *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* са MIC=39,10 $\mu\text{g/mL}$.

Најслабије дејство је показао на сојеве бактерија *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* и гљиву *Candida albicans* MIC=78,125 $\mu\text{g/mL}$. Етанолни екстракт листа празилука је показао нешто слабије антимикуробно дејство него екстракт стабла празилука, најјаче антимикуробно деловање је испољио код гљиве *Aspergillus niger* MIC=39,10 $\mu\text{g/mL}$. А скоро десет пута слабије је деловао на грам-негативну бактерију *Klebsiella pneumoniae* MIC=312,5 $\mu\text{g/mL}$.

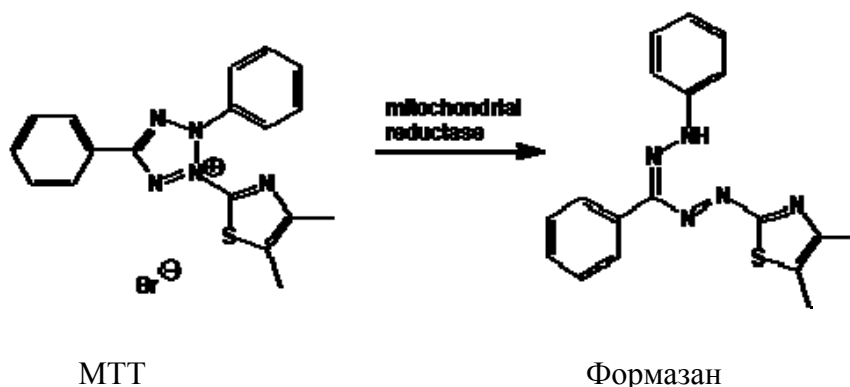
Табела 22. Минимална инхибиторна концентрација екстраката листа и стабла празилука (*A. porrum* L.)

МИС $\mu\text{g/mL}$				
Микро организми	<i>A. porrum</i> L. Листа	<i>A. porrum</i> L. Стабла	Amracin	Ketokonazol
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	156,25	39,10	0,97	/
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	312,51	78,12	0,49	/
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	312,50	78,12	0,97	/
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	78,12	156,25	0,49	/
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14153	78,12	78,12	0,49	/
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	156,25	39,11	0,24	/
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	156,25	78,12	/	1,95
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	39,10	19,53	/	0,97

**Слика 39.** Вредности МИС ($\mu\text{g/mL}$) антимикуробне активности испитиваних екстраката листа и стабла празилука (*A. porrum* L.)

4.8. Анतिकанцерогена активност испитиваних екстраката поврћа

Постоји велики број биљних врста које су као извор антитуморских једињења коришћене у третманима или превенцији канцера (Reddyu cap., 2003). Из тог разлога извршена је цитотоксична анализа одабраних узорака поврћа. У том циљу биле су коришћене туморске линије: Hep2 (подлога: MEM Eagle / 5% FCS) хумана целијска линија - карцином хуманог ларинкса, RD (подлога: MEM Eagle / 10% FCS) – хумана ћелијска линија миосаркома, L2OB (подлога: MEM Eagle / 10% FCS) – мишијаа туморска фибробластна линија. Резултати цитотоксичности екстраката поврћа (*Capsicum annuum* L., *Daucus carota* L., *Lycopersicon esculentum* Mill и *Allium porrum* L.) цитотоксичности у *in vitro* условима на RD, Hep2c и L2OB ћелије су приказани у табели 23. Као контрола су коришћене саме нестимулисане ћелије, ћелије у култури чији је раст 100%. Цитотоксични ефекат екстракта је изражен као IC₅₀ вредност (концентрација која инхибира 50% ћелијског раста). У нашим експериментима је употребљен реагенс МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ол)-2,5-дифенилтетразолијум бромид] који се у присуству животно способне ћелије редукује у плаво обојен производ формазан (слика 40), (Gharavi u cap., 2007).



Слика 40. Редукација МТТ-а митохондријалном редуктазом до формазана (Gharavi u cap., 2007)

Сви испитивани екстракти показују цитостатичко деловање, а екстракт празилука може бити кандидат за терапеутску употребу. Редослед антиканцерогене активности испитиваних екстракта поврћа је следећи :

празилук > мрква > парадајз > паприка

На основу добијених резултата само етанолни екстракт празилука (*Allium porrum* L.) испуњава *NCI* критеријум и то у концентрацијама од 100 $\mu\text{g/mL}$ за 50 % смањује преживљавање туморских ћелија (табела 23, слика 41).

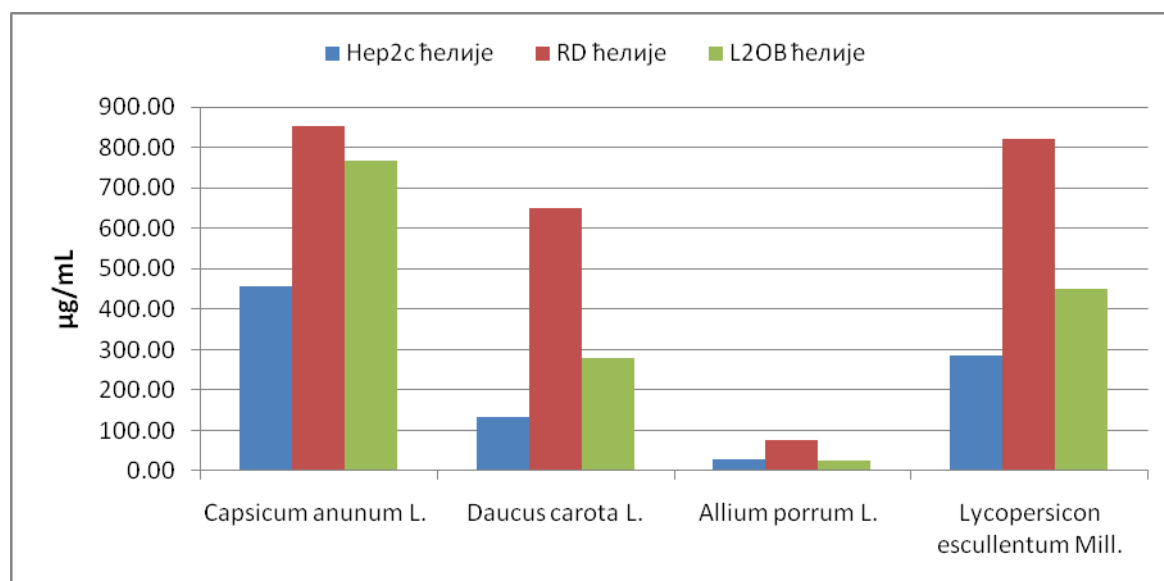
Од три испитиване ћелијске линије испитивање је показало да је *Allium porrum* L., екстракт био најделотворнији на *L2OB* ћелије (25,89 $\mu\text{g/mL}$) и на *Hep2c* ћелијама (27,18 $\mu\text{g/mL}$) и инхибиторски активан према *RD* ћелијама (76,95 $\mu\text{g/mL}$). Овај екстракт има на основу квантитативне анализе фенолних једињења највећи садржај кверцетина, у односу на остале испитиване екстракте поврћа.

Цитотоксична анализа показује да је инхибиторни ефекат етанолног екстракта паприке (*Capsicum annuum* L.) био најнижи код свих испитиваних ћелија. Овај екстракт има значајнији инхибиторни ефекат на раст/преживљавање тестираних ћелија само при употреби већих концентрација од 100 $\mu\text{g/mL}$.

Даља испитивања су показала да тек при употреби етанолног екстракта паприке (*Capsicum annuum* L.) у концентрацијама већим од 300 $\mu\text{g/mL}$ долази до смањења броја *L2OB* и *Hep2c* ћелија за више од 50% у односу на одговарајуће позитивне контроле.

Табела 23. Вредности IC_{50} (μM) за 48 h деловања испитиваних екстраката поврћа на *Hep2*, *RD* и *L2OB* ћелија, одређен МТТ тестом

IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			
Екстракт	<i>Hep2c</i> ћелије	<i>RD</i> ћелије	<i>L2OB</i> ћелије
<i>Capsicum annuum</i> L.	456,75 \pm 56,78	853,76 \pm 12,03	765,78 \pm 1,59
<i>Daucus carota</i> L.	132,65 \pm 24,76	650 \pm 78,91	278,65 \pm 67,89
<i>Allium porrum</i> L.	27,18 \pm 0,88	76,95 \pm 11,45	25,89 \pm 0,67
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	285,37 \pm 8,59	820,56 \pm 63,21	450,67 \pm 12,25
<i>NCI</i> критеријум	< 30		



Слика 41. Вредности IC_{50} (μM) за 48 h деловања испитиваних екстраката поврћа на *Hep2*, *RD* и *L2OB* ћелија, одређен MTT тестом

4. 9. Потенцијална примена фенолних компонената испитиваних екстраката поврћа

На основу добијених резултата утврђено је да испитивани екстракти поврћа показују биохемијску активност: антиоксидациону, антимикуробну и антиканцерогену активност и могу се користити у превенцији и лечењу многих болести.

Потенцијална употреба као фармацеутски препарат може се очекивати од екстракта празилука (*Allium porrum* L.), јер је једини испунио *NCI* критеријум. Као доминантна флавоноидна компонента је кверцетин у свим испитиваним екстрактима посебно у екстракту стабла празилука (*Allium porrum* L.). Кверцетин је познат по антиканцерогеном деловању, па је од интереса било да се испита могућност његове фармацеутске примене.

Да би смо повећали фотостабилност кверцетина, омогућили бољу растворљивост и апсорпцију у организму, извршено је његово инклузионо комплексирање са растворљивим и нешкодљивим „носачем“ као што је 2-хидроксипропил- β -циклодекстрин. Извршена је карактеризација добијеног комплекса FT-IC, $^1\text{H-NMR}$ спектроскопијом, дифракцијом X-зрака и испитана је фотостабилност комплекса.

4.9.1. Фотостабилност инклузионог комплекса кверцетин:2-хидроксипропил- β -циклодекстрина

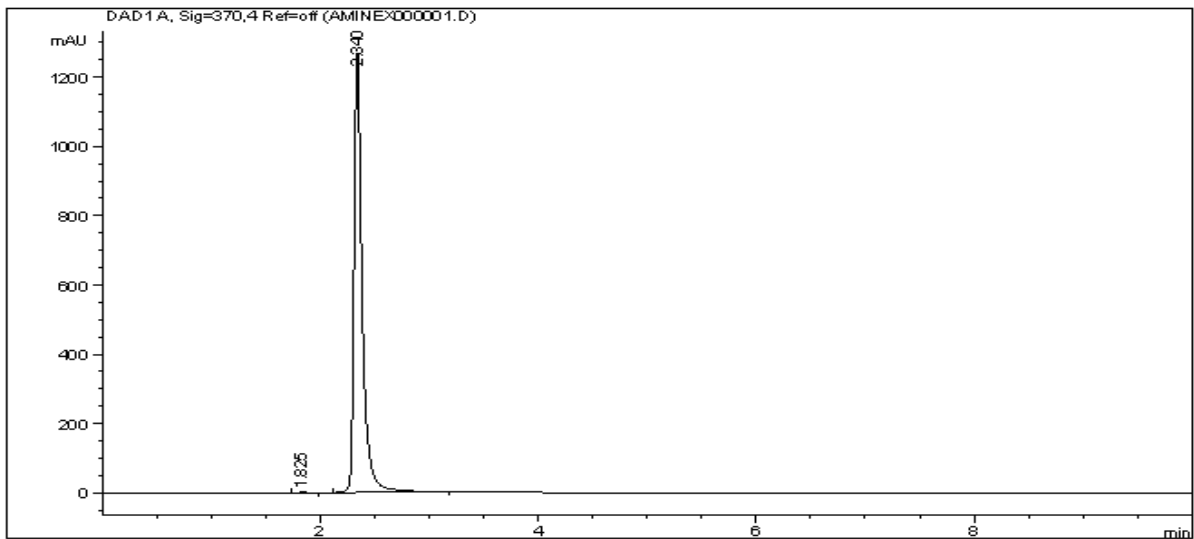
Извршено је озрачивање комплекса концентрације 428,14 $\mu\text{g/mL}$ и чисте компоненте кверцетин концентрације 70 $\mu\text{g/mL}$ UV лампама ($\lambda=300\text{ nm}$) у фотореактору.

Промена у концентрацији испитиваних узорака је праћена HPLC методом (слике 42, 43, 44 и 45). На основу добијених хроматограма, примећене су промене у концентрацији оба узорака након 90 min зрачења.

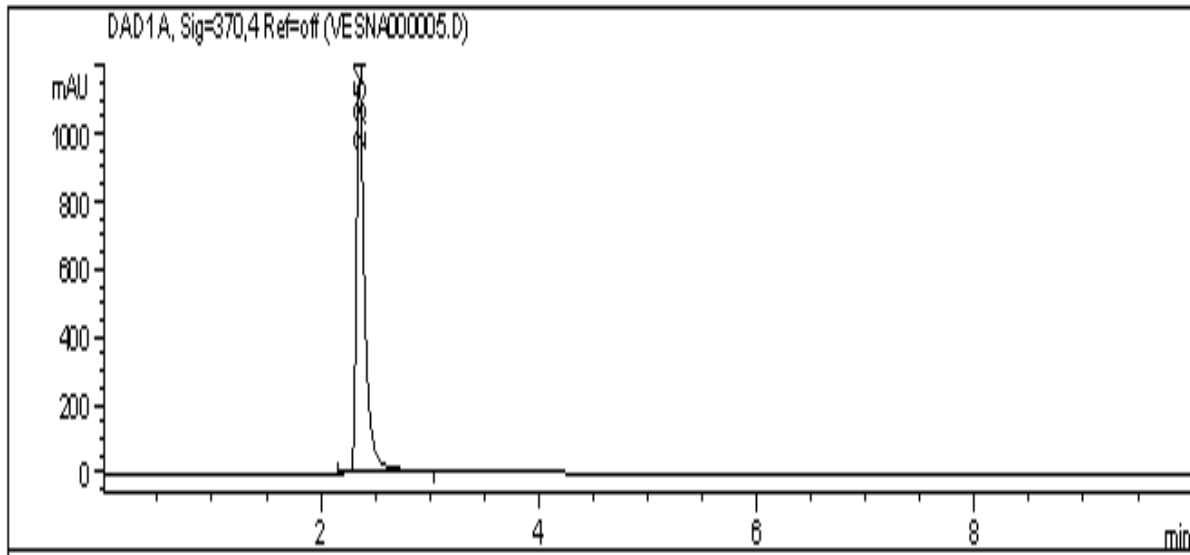
Упоредивањем добијених резултата уочава се већа фотостабилност комплекса, односно 85,6% концентрације кверцетина је остала непромењена унутар комплекса у поређењу са кверцетином у чистој компоненти, 79,6% (табела 24). Нарочито је велика разлика у фотостабилности у првих 5 min, концентрација кверцетина се смањила за 2,5%, а кверцетина који није комплексиран за 11,7% што указује да је 2-хидроксипропил- β -циклодекстрина одговарајући „носач“ активне компоненте као што је кверцетин и да може допринети заштити од фотодеградације.

Табела 24. Фотодеградација ($\lambda=300\text{ nm}$) чистог кверцетина и инклузионог комплекса кверцетина:2-хидроксипропил- β -циклодекстрина

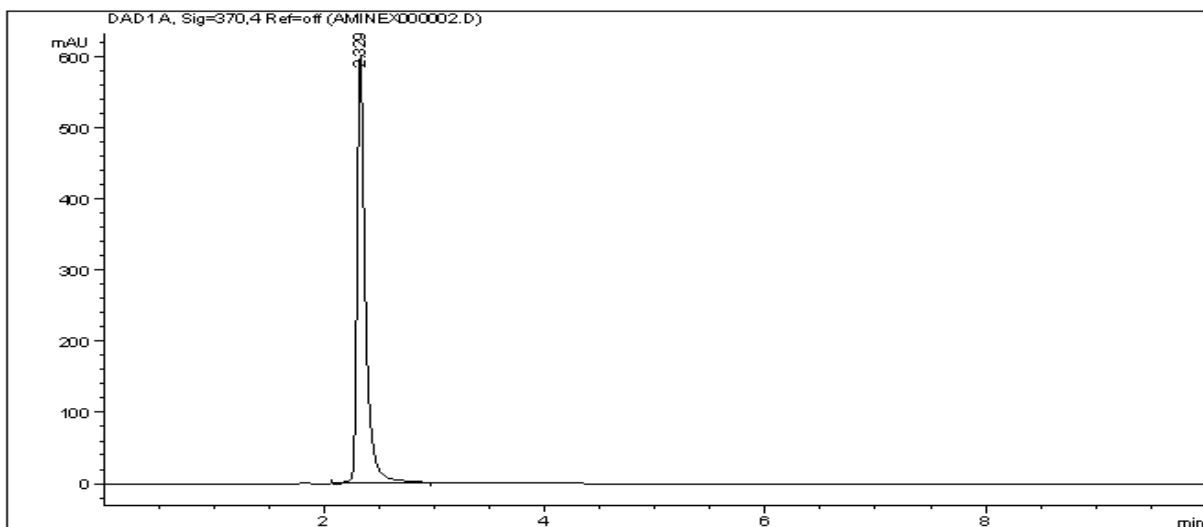
Време озрачивања	428,14 $\mu\text{g/mL}$	70 $\mu\text{g/mL}$
t, min	комплекс (%)	кверцетин (%)
0	100,0	100,0
5	97,5	88,3
15	96,2	86,6
30	95,1	86,4
60	94,5	83,2
90	85,6	79,7



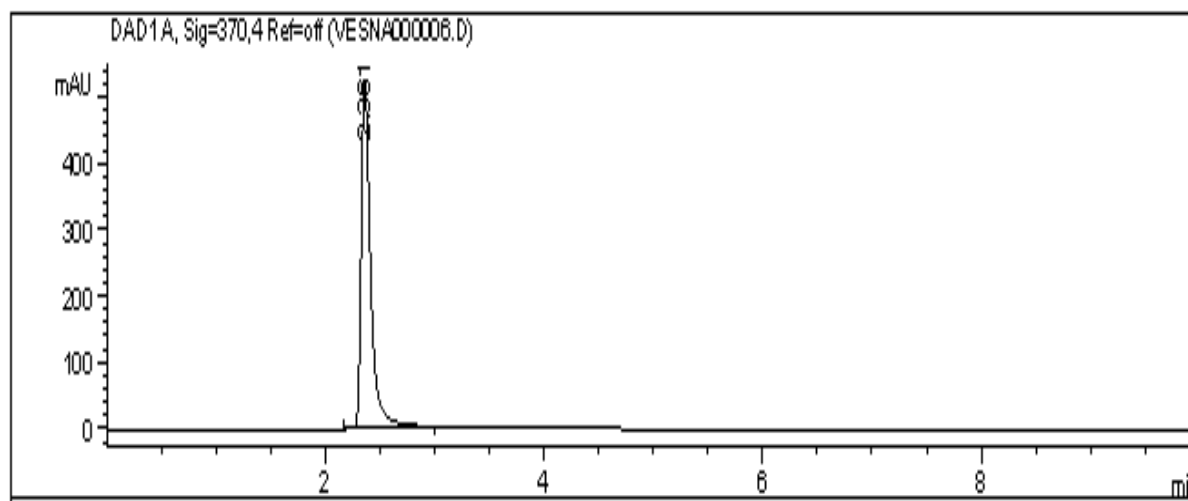
Слика 42. HPLC спектар стандарда кверцетина пре зрачења



Слика 43. HPLC спектар стандарда кверцетина након 90 min зрачења



Слика 44. HPLC спектар инклузионог комплекса кверцетина:2-хидроксипропил- β -циклодекстрина пре зрачења



Слика 45. HPLC спектар инклузионог комплекса кверцетина:2-хидроксипропил- β -циклодекстрина након 90 min зрачења

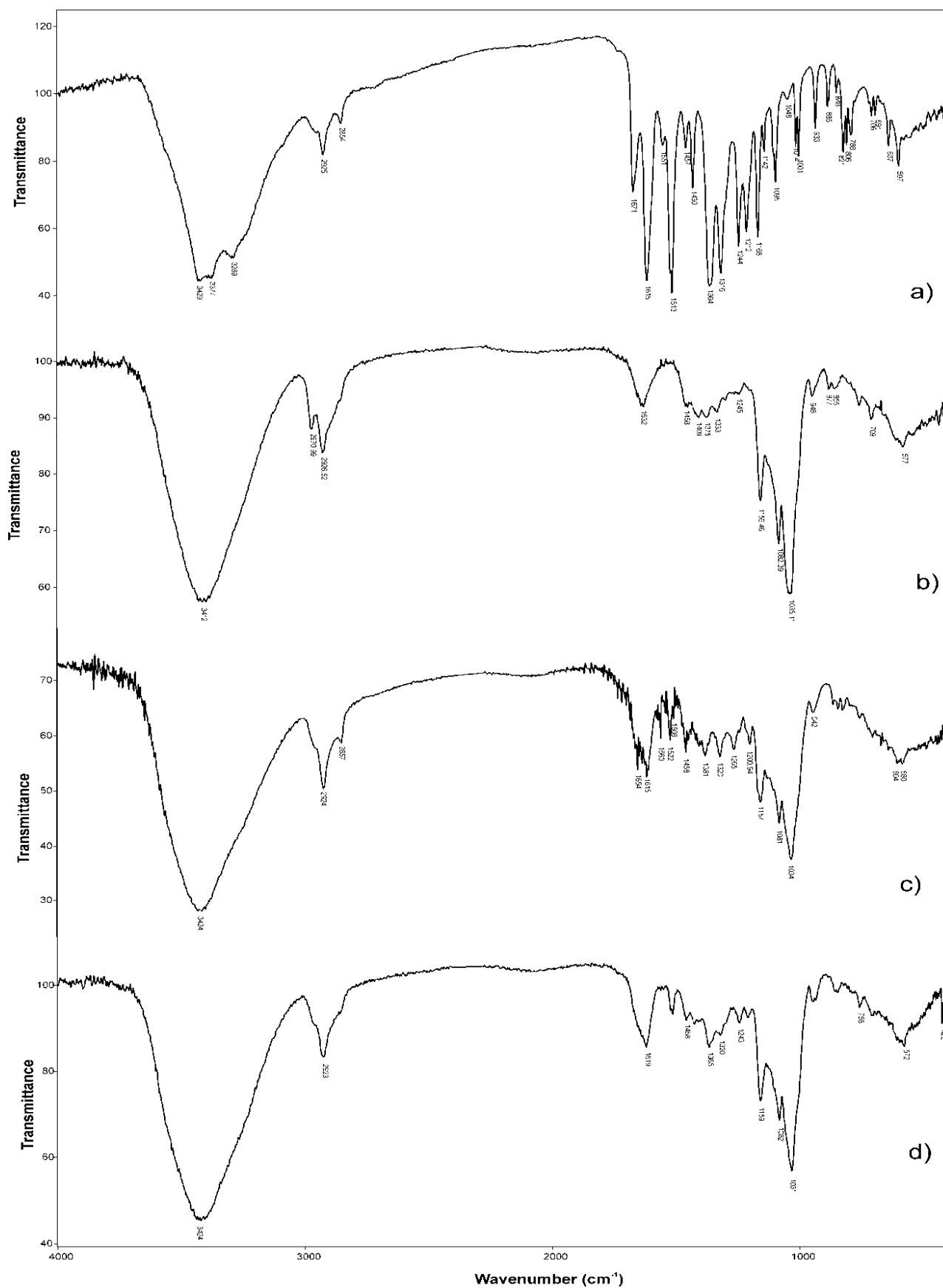
4.9.2. Спектроскопска карактеризација комплекса кверцетина:2-хидроксипропил - β -циклодекстрина

Карактеризација припремљеног комплекса и комплексирјућих агенаса, (2-хидроксипропил)- β -циклодекстрина и кверцетина извршена је применом FT-IC, $^1\text{H-NMR}$ и XRD методама.

Анализом FT-IC спектра кверцетина потврђена је његова структура присуством карактеристичних функционалних група, и то широке траке на 3429 cm^{-1} , 3377 cm^{-1} и 3289 cm^{-1} , које потичу од валентних вибрација (O-H) група, које су укључене у образовање интрамолекулских водоничних веза, највероватније са C=O групом из прстена. У прилог овакве асигнације трака говори и чињеница да се у области $\nu(\text{C=O})$ вибрација налазе две траке које према положају, интензитету и на основу литературних података треба приписати $\nu(\text{C=O})$. Интензивна трака на 1671 cm^{-1} припада валентној вибрацији $\nu(\text{C=O})$ "слободне" кето групе, док би траку на 1615 cm^{-1} требало приписати $\nu(\text{C=O})$ вибрацији која је укључена у образовање релативно јаке водоничне везе са OH групама у позицији 5 и 3, што показује велико снижење фреквенције група C=O и OH у валентној области. Ово указује на то да постоје два облика кверцетина у чврстом стању, доминантан са интраводоничним везама и други са слободном кето групом. У области деформационих трака на 1384 , 1330 , 1264 cm^{-1} и 1244 cm^{-1} постоје траке које потичу од мешаних вибрација $\nu(\text{C-O})$ и деформационих $\delta(\text{C-OH})$ које су интересантне за

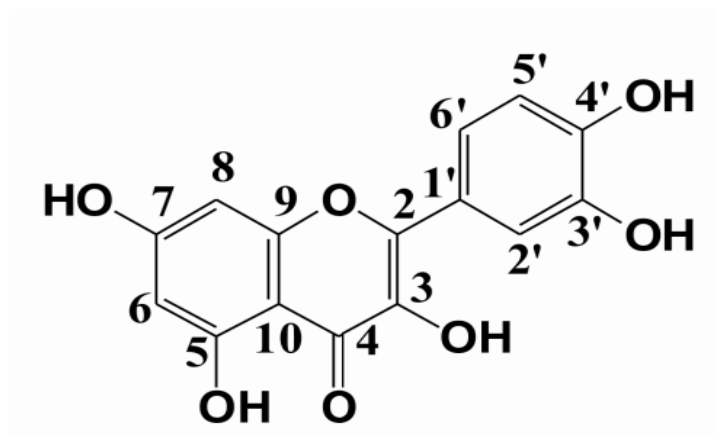
испитивање структурних промена односно евентуалног начина остваривања веза код инклузионог комплекса (слика 46).

Анализа FT-IC спектра комплекса показује да се комплексна трака из спектра кверцетина у области валенционих вибрација $\nu(\text{O-H})$ група изменила тиме што је изгубила превоје и постала једна трака са максимумом на 3429 cm^{-1} који потиче од вибрација (O-H) група присутних у структури 2-хидроксипропил- β -циклодекстрина. Изглед спектра у области валенционих вибрација $\nu(\text{C=O})$, код инклузионог комплекса је различит у односу на полазна једињења. Наиме у овој области у FT-IC спектру инклузионог комплекса налазе се две траке једна на око 1654 cm^{-1} и друга на 1615 cm^{-1} . Партнери ових вибрација у спектру кверцетина су како је раније наведено, 1671 cm^{-1} и 1615 cm^{-1} . Имајући у виду напред изнесену дискусију као и чињеницу да се фреквенција ниже фреквентне траке идући од кверцетина до комплекса не мења, већ фреквенција више фреквентне приписане $\nu(\text{C=O})$ вибрацији слободне C=O групе намеће се закључак да је њен ред, а тиме и фреквенција снижен јер је она укључена у образовање интрамолекулске водоничне везе са протоном ОН групе на C-3. Потврду оваквог закључка дају и промене у спектру у области $\nu(\text{C-O})$ и $\delta(\text{C-OH})$ вибрација идући од спектра кверцетина до комплекса. Наиме у спектру комплекса у односу на полазна једињења број, облик и интензитет трака је према очекивању изузев што је трака од $\delta(\text{C-OH})$ која је у спектру кверцетина на 1330 cm^{-1} померена у комплексу за око 10 јединица ка нижој фреквенцији. Овакав ефекат је очекиван уколико је протон ове групе укључен у образовање интермолекулске водоничне везе са C=O групом. Анализа FT-IC спектра указује на стварање инклузионог комплекса кверцетина са 2-хидроксипропил- β -циклодекстрином, на тај начин што се остварује водоникова веза између C=O групе из кверцетина и протона ОН на позицији C-3.



Слика 46. FT-IC спектар: а) кверцетина, б) 2-хидроксипропил-β-циклодекстрина, ц) инклузионог комплекса кверцетина:2-хидроксипропил-β-циклодекстрин, д) физичке смеше кверцетина и 2-хидроксипропил-β-циклодекстрина

Потврду резултата добијених методом FT-IC дала је и анализа $^1\text{H-NMR}$ спектра 2-хидроксипропил- β -циклодекстрина и инклузионог комплекса кверцетин:2-хидроксипропил- β -циклодекстрина. На слици 47 дата је структура кверцетина са означеним угљениковим атомима, а у табели 25 приказане су вредности δ на којима се јављају одговарајући протони у $^1\text{H-NMR}$ - спектру, док су на сликама 48 и 49 дати спектри.



Слика 47. Структура кверцетина са означеним угљениковим атомима

Табела 25. Вредности хемијских померања за водоникове протоне у молекулу кверцетина

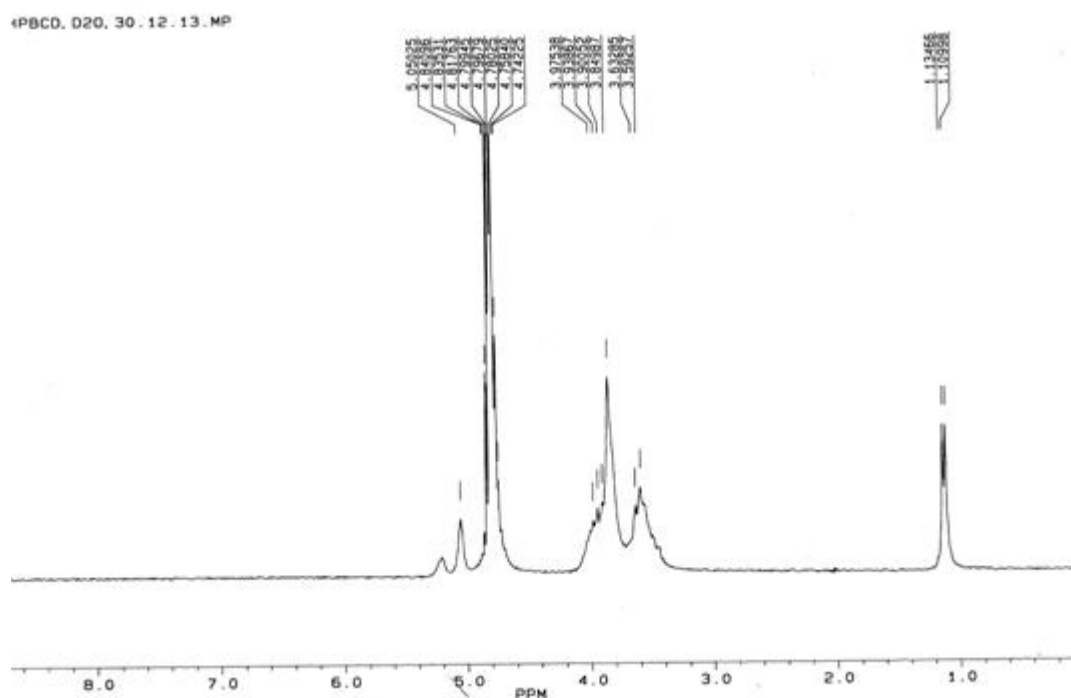
Протони, δ (ppm)	Кверцетин
H-3	9,44 (1H, s)
H-5	12,54 (1H, s)
H-6	6,22 (1H, s)
H-7	10,85 (1H, s)
H-8	6,44 (1H, d)
H-2'	7,71 (1H, d)
H-3'	9,37 (1H, s)
H-4'	9,66 (1H, s)
H-5'	6,92 (1H, d)
H-6'	7,57 (1H, dd)

У табели 26 дате су вредности за важна хемијска померања протона комплексирајућег агенса 2-хидроксипропил- β -циклодекстрина и комплекса кверцетин:2-хидроксипропил- β -циклодекстрин као и разлике у хемијским померањима за водоникове атоме који су учествовали у интеракцији при инклузији.

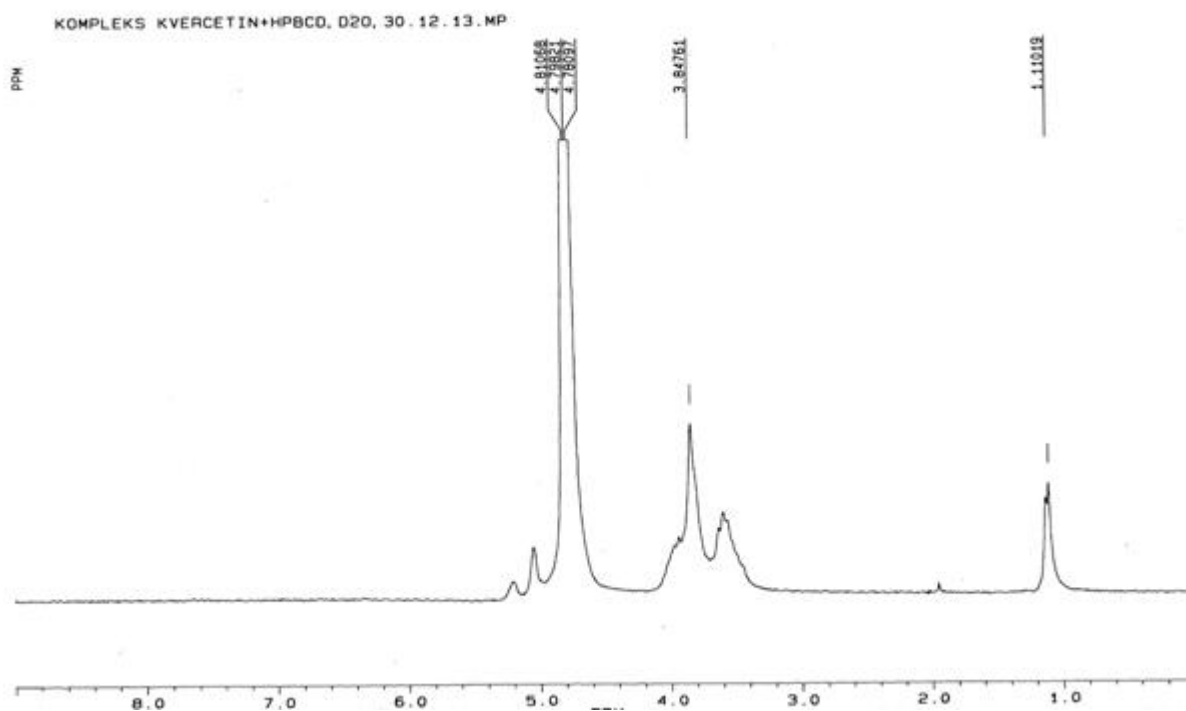
Табела 26. Важна хемијска померања (δ) за 2-хидроксипропил- β -циклодекстрина, инклузиони комплекс кверцетин:2-хидроксипропил- β -циклодекстрин и разлике у хемијским померањима ($\Delta\delta$)

δ (ppm)			
Протони	HP- β CD	HP- β CD комплекс	$\Delta\delta$
H-3	3,5926	3,5121	0,0850
H-5, H-6	3,8499	3,8476	0,0023
CH ₃	1,1347	1,1102	0,0245

На основу анализе $^1\text{H-NMR}$ резултата (табела 26) може се уочити да су при инклузији кверцетина у шупљину 2-хидроксипропил- β -циклодекстрина тј. при формирању инклузионог комплекса кверцетин:2-хидроксипропил- β -циклодекстрин, највише учествовали H-3 јер показују највећу разлику ($\Delta\delta=0,0850$), а затим CH₃ протони из молекула домаћина, док су H-5, H-6 протони имали незнатно учешће у формирању комплекса на шта указује мала вредност $\Delta\delta$, 0,0023.



Слика 48. $^1\text{H-NMR}$ - спектар 2-хидроксипропил- β -циклодекстрина

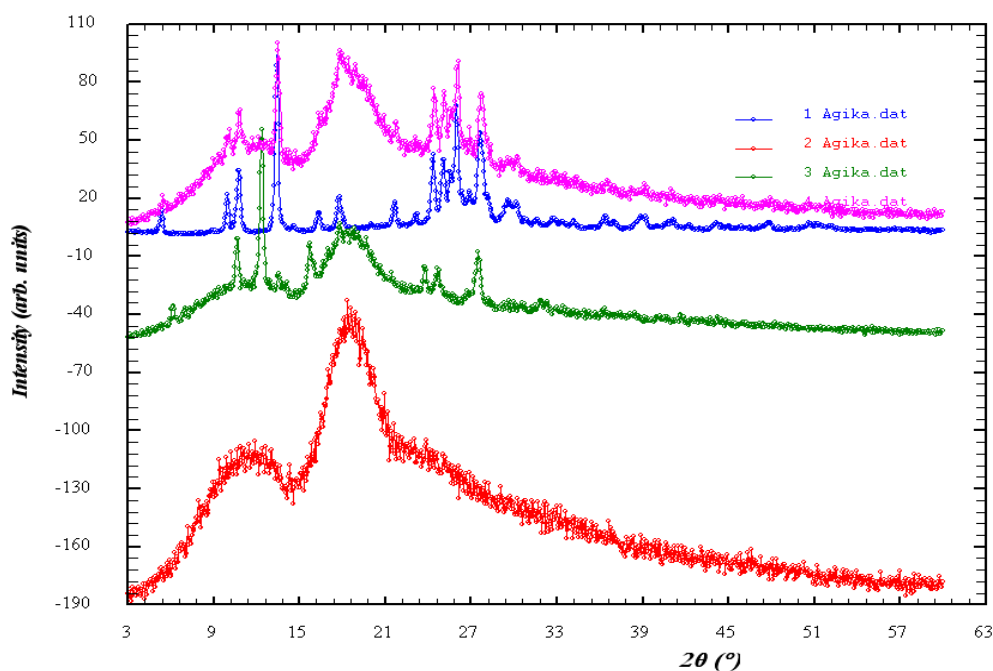


Слика 49. $^1\text{H-NMR}$ - спектар инклузионог комплекса кверцетина:2-хидроксипропил- β -циклодекстрин

На основу дифрактограма (слика 50) можемо уочити одсуство великих пикова кверцетина $2\theta = 13,52^\circ$, $2\theta = 25,9^\circ$ и $2\theta = 27,47^\circ$ у комплексу, као и приметно померање пикова $2\theta = 6,00^\circ$ ($5,32^\circ$), $2\theta = 10,56^\circ$ ($9,95^\circ$) и $2\theta = 12,31^\circ$ ($10,71^\circ$), и на већим угловима.

По Браговој теорији померање пикова ка већим угловима указује на смањење d међуравнинског растојања, које у случају инклузије значи да уграђени молекули мењају донекле кристалну решетку 2-хидроксипропил- β -циклодекстрина, за разлику од дифрактограма физичке смеше кверцетина и 2-хидроксипропил- β -циклодекстрина који немају таква померања.

XRD анализа такође потврђује да се извршило инклузино комплексирање кверцетина у молекулу 2-хидроксипропил- β -циклодекстрина.



Слика 50. Дифрактограми: кверцетина (1), 2-хидроксипропил- β -циклодекстрина (2), инклузионог комплекса кверцетин:2-хидроксипропил- β -циклодекстрин (3), физичке смеше кверцетина и 2-хидроксипропил- β -циклодекстрина (4)

Добијени резултати структурне анализе методама FT-IC, $^1\text{H-NMR}$ и XRD кверцетина, 2-хидроксипропил- β -циклодекстрина, инклузионог комплекса кверцетин:2-хидроксипропил- β -циклодекстрина и физичке смеше кверцетина и 2-хидроксипропил- β -циклодекстрина указују да је дошло до наглађивања комплекса као супрамолекулске структуре са нековалентним интеракцијама између молекула домаћина и госта.

5. ЗАКЉУЧАК

Циљ ове докторске дисертације је био да се испита хемијски састав етанолних екстраката сорти поврћа: *Capsicum annuum* L., *Daucus carota* L., *Lycopersicon esculentum* Mill. и *Allium porrum* L., са акцентом на концентрацију фенолних једињења, као и њихова биохемијска тј антиоксидациона, антимикуробна и антиканцерогена активност. На основу добијених резултата ових истраживања могу се извести следећи закључци:

- ✓ Праћењем агроеколошких услова гајења изабраних сорти поврћа у току две узастопне године (2010. и 2011.) и њихов утицај на хемијски и фенолни састав испитиваних узорака потврђено је да је пролећни циклус 2010. године био са повољнијим температурним условима у односу на исти период 2011. године.
- ✓ Спектроскопска анализа садржаја укупних фенола и укупних флавоноида у испитиваним екстрактима поврћа указује да сви екстракти садрже значајну концентрацију фенолних једињења, при чему највећи садржај фенола (93,34 mg GA/g) и флавоноида (25,14 mg RU/g) има етанолни екстракт празилука (*Allium porrum* L.). Редослед садржаја укупних фенола и флавоноида у испитиваним екстрактима поврћа је следећи: празилук > мрква > паприка > парадајз.
- ✓ Спектроскопско анализом садржаја укупних фенола и укупних флавоноида екстраката листа и стабла празилука (*Allium porrum* L.) уочавамо да су концентрације ових фенолних група много већи у екстрактима стабла (69,46 mg GAE/g и 33,53 mg RE/g), него у екстрактима листа (45,39 mg GAE/g и 10,24 mg RE/g) и то за 34,65% и 69,46%.
- ✓ Анализом HPLC дијаграма екстраката листа и стабла празилука (*Allium porrum* L.) примећујемо да екстракт стабла садржи фенолне компоненте у већој концентрацији. Тако, биолошки значајан кверцетин у екстракту стабла има 4,561 mg/g, а у екстракту листа 0,876 mg/g, док концентрација рузмаринске киселине у екстракту стабла је 1,561 mg/g, док у екстракту листа је 0,167 mg/g. Овакви податци су у сагласности за испитивањима и добијеним већим вредностима за антиоксидативни капацитет екстраката стабла и листа празилука (*Allium porrum* L.). Примећујемо да екстракт листа празилука садржи нарингенин (1,234 mg/g), који је највероватније одговоран за његово биолошко деловање.
- ✓ На основу добијених хроматограма екстракта мркве (*Daucus carota* L.) утврђено је присуство следећих фенолних једињења: гална киселина, протокатехинска киселина, *p*-дихидроксибензоева киселина, кафена киселина, хлорогенска киселина, сиригична киселина, ферулна киселина, рутин, рузмаринска киселина, кверцетин и нарингенин. Најдоминантније компоненте јесу флавоноиди нарингенин (2,567 mg/g) и рутин (1,111 mg/g).

- ✓ На основу хроматограма екстракта паприке (*Capsicum annuum L.*) уочено је да је од фенолних киселина доминантна гална киселина (1,252 mg/g), а од флавоноида доминантна компонента је кверцетин (1,453 mg/g).
- ✓ Квалитативном и квантитативном анализом фенолних компонената екстракта парадајза (*Lycopersicon esculentum Mill.*) утврђено је да је доминантни флавоноид кверцетин (0,811 mg/g).
- ✓ Квалитативна и квантитативна HPLC анализа свих етанолских екстраката поврћа потврђује присуство флавоноида – кверцетина, али у битно различитим количинама. Највећу количину садржи екстракт стабла празилука (*Allium porrum L.*), (4,561 mg/g), затим екстракт паприке (*Capsicum annuum L.*), (1,453 mg/g), нешто мање количине садрже екстракти листа празилука (*Allium porrum L.*), (0,876 mg/g), екстракт парадајза (*Lycopersicon esculentum Mill.*), (0,811 mg/g) и најмању количину садржи екстракт мркве (*Daucus carota L.*), (0,654 mg/g).
- ✓ Спектроскопским методама испитиван је укупни антиоксидативни капацитет екстраката поврћа и утврђено је да најјаче деловање имају екстракти празилука (*Allium porrum L.*), (128,0 µg AA/g), што је у сагласности са резултатима анализе фенолних једињења.
- ✓ Редослед антиоксидативне активности екстраката испитиваних узорака поврћа је исти као и редослед концентрација фенолних једињења: празилук > мрква > паприка > парадајз. Корелационом анализом утврђено је да постоји добра корелација између њихове антиоксидативне активности и нађених концентрација за укупне феноле (0,9739) и укупних флавоноида (0,7317).
- ✓ Антиоксидативна активност испитиваних екстраката, изражена у IC₅₀ вредностима је у сагласности са претходно датим вредностима у µg AA/g. Анализа је показала да IC₅₀ за екстракт празилука износи 10,28 µg/mL, за екстракт мркве је 15,45 µg/mL, за екстракт парадајза је 17,41 µg/mL, док за екстракт паприке је IC₅₀ = 13,79 µg/mL. Редослед антиоксидативне активности испитиваних екстраката изражен у IC₅₀ вредностима је следећи: празилук > паприка > мрква > ВНТ > парадајз.
- ✓ Резултати добијених вредности за антимикуробно деловање испитиваних екстраката поврћа (*Capsicum annuum L.*, *Daucus carota L.*, *Lycopersicon esculentum Mill.* и *Allium porrum L.*) према грам-позитивним бактеријама: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus mirabilis* ATCC 14153 и *Bacillus subtilis* ATCC 6633; грам-негативним бактеријама: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Proteus vulgaris* ATCC 13315 и гљивама: *Candida albicans* ATCC 10231 и *Aspergillus niger* ATCC 16404 показују да њихова антимикуробна

- активност се налази у опсегу концентрација од 19,53 $\mu\text{g/mL}$ до 312,5 $\mu\text{g/mL}$, што представља добру антимикуробна активност у односу на стандардни антибиотик amrascin и антимикуотик ketokonazol.
- ✓ Етанолни екстракт паприке (*Capsicum anunum* L.) је показао најјачу антимикуробну активност према гљивама *Aspergillus niger* и *Candida albicans* (MIC=31,25 $\mu\text{g/mL}$) а најмању осетљивост према *грам*-позитивној бактерији *Staphylococcus aureus* (MIC=312,5 $\mu\text{g/mL}$).
 - ✓ Етанолни екстракт мркве (*Daucus carota* L.) је показао најјачу антимикуробну активност према гљиви *Aspergillus niger* (MIC=19,53 $\mu\text{g/mL}$), док је незнатно мању активност показао на *грам*-позитивној бактерији *Bacillus subtilis* (MIC=39,10 $\mu\text{g/mL}$).
 - ✓ Етанолни екстракт парадајза (*Lycopersicon esculentum* Mill.) је најјачу антимикуробну активност показао према бактеријама *Bacillus subtilis* и гљиви *Aspergillus niger* (MIC=39,10 $\mu\text{g/mL}$), умерено јако антимикуробно дејство је показао и на *грам*-негативним бактеријама *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* и гљиву *Candida albicans* (MIC=78,12 $\mu\text{g/mL}$), а најмању активност је показао према *грам*-позитивним бактеријама *Proteus mirabilis* и *Staphylococcus aureus* (MIC=156,21 $\mu\text{g/mL}$), у односу на стандардни антибиотик.
 - ✓ На основу *in vitro* тестова за цитотоксичност код свих испитиваних ћелијских линија инхибиторни ефекат етанолног екстракта паприке (*Capsicum annuum* L.) је био најнижи и значајнији инхибиторни ефекат на раст/преживљавање тестираних ћелија уочен је само при употреби већих концентрација (преко 100 $\mu\text{g/mL}$). Док деловање на *Hep2c* и *L2OB* ћелија, односно смањење броја ћелија за више од 50% у односу на одговарајуће позитивне контроле, је уочено након третмана етанолног екстракта *Capsicum annuum* L. у концентрацијама већим од 300 $\mu\text{g/mL}$.
 - ✓ На основу добијених резултата може се закључити да само етанолни екстракт празилука (*Allium porrum* L.) испуњава *NCI* критеријум и то у концентрацијама од 100 $\mu\text{g/mL}$, где за 50 % смањује преживљавање туморских ћелија. Екстракт празилука је показао изразито цитолитичко дејство на *L2OB* и на *Hep2c* ћелије (IC_{50} вредност је била испод 30 $\mu\text{g/mL}$).
 - ✓ Са циљем практичне примене извршено је инклузионо комплексирање кверцетина и 2-хидроксипропил- β -циклодекстрина, као носача најактивније фармаколошке компоненте.
 - ✓ Упоређивањем добијених резултата уочава се већа фотостабилност добијеног инклузионог комплекса. Примећена је велика разлика у фотостабилности у првих

- 5 min озрађивања, концентрација кверцетина се смањила за 2,5% у комплексу, док кверцетин који није комплексиран је умањио концентрацију за 11,7%, што указује да је 2-хидроксипропил- β -циклодекстрин одговарајући носач за кверцетин и повећава његову фотостабилност.
- ✓ Анализа FT-IC спектра комплекса указује да је облик, број и интензитет трака према очекивању, изузев је трака од $\delta(\text{C-OH})$ која је у спектру кверцетина на 1330 cm^{-1} у спектру комплекса је померена за 10 јединица ка нижој фреквенцији. На основу анализе FT-IC спектра може се закључити да долази до настајање инклузионог комплекса кверцетина са 2-хидроксипропил β -циклодекстрином, на тај начин што се остварује водоникова веза између C=O групе из кверцетина и протона OH на позицији C-3 из молекуле домаћина.
 - ✓ На основу анализе $^1\text{H-NMR}$ -а може се видети да су при инклузији кверцетина у шупљину домаћина 2-хидроксипропил- β -циклодекстрина, највише учествовали H-3 (јер показују највећу разлику $\Delta\delta=0,0850$) и CH_3 протони из молекула домаћина, док су H-5, H-6 протони имали незнатно учешће у формирању комплекса на шта указује мала вредност $\Delta\delta, 0,0023$.
 - ✓ Дифракционом (XRD) анализом, такође је утврђено да су молекули кверцетина инклузионо улазе у кристалну решетку „домаћина“ 2-хидроксипропил- β -циклодекстрина.
 - ✓ Добијени резултати структурне анализе применом FT-IC, $^1\text{H-NMR}$ и дифракционом XRD-ом методом указују да је дошло до награђивања инклузионог комплекса кверцетин:2-хидроксипропил- β -циклодекстрина, као супрамолекулске структуре са нековалентним интеракцијама између молекула домаћина и госта.
 - ✓ На основу ових резултата може се закључити да испитивани екстракти одабраних врста поврћа (*Allium porrum* L., *Daucus carota* L., *Capsicum annuum* L. и *Lycopersicon esculentum* Mill.) јесу богати фармаколошко активним фенолним компонентама, нарочито кверцетином, које им дају изражено антиоксидативно, антимикуробно и антиканцерогено деловање и могу наћи примену, поред свакодневне употребе у људској исхрани и као активне супстанце у фармакологији, козметици и сл.

6. ЛИТЕРАТУРА

- Amarowicz R., Pegg R.B., Rahimi-Moghaddam P., Barl B., Weil J.A.: Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem.* 84: 551–562 (2004).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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):110-116 (2000).
- Beninger C.W.; Hosfield G.L. :Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7879–7883 (2003).
- Biswas M. K., Biswas A.K. Ghosh P.K., Haldar A.: Pentacyclic triterpenoid possessing analgesic and anti-inflammatory activities from the fruits of *Dregea volubilis*: *Oriental Pharm. Exp. Med.*, 9: 315-319 (2009).
- Bracht K., Boubakari R., Grünert R., Bednarski P.J.: Correlations between the activities of 19 antitumor agents and the intracellular GSH concentrations in a panel of 14 human cancer cell lines: Comparisons with the NCI data. *Anti-Cancer Drugs* 17:41–51(2006).
- Bravo L. : Polifenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr. Rev.* 56:317-333 (1998).
- Britton G.: *The Biochemistry of Natural Pigments*, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 1983.
- Brighente I.M.C., Dias M., Verdi L.G.: Pizzolatti, M.G. Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharm. Biol.*45:156–161(2007).
- Briellmann H.L., Setzer W. N., Kaufman P.B., Kirakosyan A., Cseke L. J. :*Natural Products from Plants*, Second ed., Taylor & Francis Group, Boca Raton, (2006).
- Blasa M., Gennari L., Angelino D., Ninfali P. :Fruit and vegetables antioxidants in health, U: *Bioactive foods in promoting health (fruits and vegetables)*, Watson, R.R., Preedy, V.R. (Ed.), Elsevier Inc., New York, : 37-58 (2010).

- Blois M. S.: Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Science*, 181:1199-1200 (1958).
- Bick I.R.C., Rhee C.: Anthraquinone pigments from *Phomafoveata foister*. *Biochem. J.*, 98:112-116 (1965).
- Boivin D, Lamy S, Lord-Dufour S, Jackson J, Beaulieu E, Côté M, Moghrabi A, Barrette S, Gingras D, Béliveau R.: Antiproliferative and antioxidant activities of common vegetables: A comparative study. *Food Chem.* 112: 374-380 (2009).
- Buchachenko, A.L.: *Stabilnije Radikali*, AN USSR (1963).
- 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).
- Cannava C., Crupib V., Ficarra P., Guardo M., Majolino D., Mazzaglia A.: Physico-chemical characterization of an amphiphilic cyclodextrin/genistein complex. *J. of Pharm. and Biom. Analysis*, 51: 1064–1068 (2010).
- Chun-Mao L., Chien-Tsu C., Hsiao-Hui L., Jen-Kun L.: Prevention of cellular ROS damage by isovitexin and related flavonoids. *Planta Med* 68: 365-367 (2002).
- Clifford M.N.: Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden, *J Sci Food Agric* 79:362–372 (1999).
- Croft K.D.: Antioxidant effects of plant phenolic compounds, *Antioxidants in Human Health*, Basu, T.K., Temple, N.J., Garg, M.L., (Eds.), CAB International Phenolic Compound Biochemistry By Wilfred Vermerris and Ralph Nicholson Published by Springer, P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands, 1999.
- Cvijović M. Aćamović-Đoković G.: *Praktikum iz Biohemije*, Čačak (2005).
- Daker M., Abdullah N., Vikineswary S., Goh P.C., Kuppusamy U.R. : Antioxidant from maize and maize fermented by *Marasmiellus* sp. as stabiliser of lipid-rich foods. *Food Chem.* 107: 1092–1098 (2008).
- Dallenbach-Tölke K., Nyiredy Sz., Meier B., Sticher O. : HPLC analysis of the flavonoid glycosides from *Betulae folium*. *Planta Med.*, 53: 189–192 (1987).
- Decker T., Lohmann-Matthes M.L. : A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 115 (1): 61–9 (1988).
- De Flora F., Ferguson R.L.: Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutat. Res.* 591: 8-15 (2005).
- Della Loggia R.: Topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* extracts. *Planta Med.* 56: 658 (2000).

- Dewick P.M.: Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. Second Edition, John Wiley & Sons, New York, : 121-123 (2002).
- Djurovic M., Mladenović J., Radovanović B., Murtić S., Aćamović-Djoković G., Pavlović R., Bošković-Rakočević Lj.: Effect of liming on the molybdenum content in the root and leaf of tomato grown on pseudogley under controlled conditions, Af. J. of Biotech., 10(83) :19402-19406 (2011).
- Duh P.D., Tu Y.Y., Yen G.C. : Antioxidant activity of water extract of Harng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). LWT – Food Sc. and Tech., 32: 269-277 (1999).
- Djurovka M.: Gajenje povrća na otvorenom polju, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad (2008).
- Dzamic R., Stevanovic D., Jakovljevic M.: Praktikum iz Agrohemiје, Beograd (1996).
- Dzamic R., Stevanovic D. : Praktikum iz Agrohemiје, Beograd (2000).
- Ercisli S, Mustafa A., Ozlem O., Memnune S., Emine O.: Phenolic and antioxidant diversity among persimmon (*Diospyros kaki* L.) genotypes in Int. J. Food Sci. Nutr., 59(6): 477 – 482 (2008).
- Fang Y.Z., Yang S., Wu G. : Free radicals, antioxidants and nutrition. Nutrition, 18: 872-879 (2002).
- Fang F., Tang Y., Gao Z., Xu Q.: A novel regulatory mechanism of naringenin through inhibition of T lymphocyte function in contact hypersensitivity suppression. Bioch. and Bioph. Res. Communications, 397:163–169 (2010).
- Felter H.W.: The Eclectic Materia Medica, Pharmacology and Therapeutics (1922).
- Finkel T., Holbrook N. J.: Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, Nature 408: 239 (2000).
- Gao X.Y., Jiang Y., Lu J., Tu P.F.: One single standard substance for the determination of multiple anthraquinone derivatives in rhubarb using high-performance liquid chromatography-diode array detection. J. of Chromat. A, 1216 (11): 2118-2123 (2009).
- Gorinstein S., Yong-Seo P., Buk-Gu H., Namiesnik J., Leontowicz H., Leontowicz M., Kyung-Sik H., Ja-Yong C., Seong-Gook K.: A comparative study of phenolic compounds and antioxidant and antiproliferative activities in frequently consumed raw vegetables, E. Food Res. and Technology, 228, 6, :903-911 (2009).
- Gharavi N., Haggarty S., El-kadi A.O.S.: Chemoprotective and carcinogenic effects of tert-butylhydroquinone and its metabolites. Current Drug Metabolism 8(1): 1–7 (2007).
- Gugler, R.M., Leschik, M., Dengler, H.J.: Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses, E. J. of Clin. Phar. 9: 229-234 (1975).
- Gurib-Fakim, A., Review: Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine, 27:2-93 (2006).
- Gvozdrenović Dj., Takač A.: Paprika, Beograd (2004).

- Half E., Arber N.: Colon cancer, Preventive agents and the present status of chemoprevention. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 10: 211-219 (2009).
- Halliwell B., Gutteridge J.M.: The definition and measurement of antioxidants in biological systems, *Free Radic Biol Med* 18: 125-126 (1995).
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: *Free Radicals in Biology and Medicine* 3rd ed. New York: Oxford University Press: 140-184 (1999).
- Harborne J.B.: *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Chapman & Hall, Cambridge, United Kingdom, (1994).
- Harborne J.B., Williams C.A.: Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry* 55:481–504, (2000).
- Harman D.J.: Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *J. Geontol.* 11, : 298 (1956).
- Harnly J. M., Doherty R.F., Beecher G.R., Holden J. M., Haytowitz D.B., Bhagwat S., Gebhardt S. Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (26): 9966-9977, (2006).
- Hartmann T.: From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68: 2831-2846 (2007).
- Havsteen B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* 96: 67–202 (2002).
- Heijnen C.G., Haenen G.R., Van Acker F.A. Van der Vijgh W.J., Bast A.: Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups, *Toxicol In Vitro* 15 (1): 3-6 (2001).
- 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).
- Heijnen, C.G., Haenen, G.R., van Acker, F.A., van der Vijgh, W.J., Bast, A.: Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups, *Toxicol In Vitro* 15 (1), 3-6 (2001).
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J.: Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. N. Biochem.*, 13:572-584 (2002).
- Hertog M.G.L., Hollmann P.C.H., Venema D.P.: Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits, *J. Agric. Food Chem.* 40(9): 1591-1598 (1992).
- Hertog M.G.I., Feskens E.J.M., Hollman P.C.H., Katan M.B., Kromhout D.: Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart diseases. The Zutphen elderly study. *Lancet*, 342: 1007-1011(1993).

- Hinneburg I., Dorman H.J.D., Hiltunen R.: Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chem.* 97: 122–129 (2006).
- Hodnick W.F., Milosavljevic E. B., Nelson J. H., Pardini R. S.: Electrochemistry of flavonoids, *Biochem. Pharmacol.* 37: 2607-2611 (1988).
- 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, *A.J. of Clin. Nut.* 62:1276-1282 (1995).
- 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).
- Hsu C.K., Chiang B.H., Chen Y.S., Yang J.H., Liu C.L.: Improving the antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) sprout with trace element water. *Food Chem.* 108: 633-641(2008).
- Ilic Z., Elazar F., Mihal Dj., Martinovski Dj., Trajkovic R.: Fiziologija i tehnologija čuvanja povrća i voća, Novi Sad (2007).
- Itharat A., Houghton P., Eno-Amooguaye E., Burke P., Sampson J., Raman A.: In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plant used traditionally to treat cancer. *J. of Ethoph.* 90: 33-38 (2004).
- Izhaki I.: Emodin – a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. *New Phytologist*, 155(2), 205-217 (2002).
- 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).
- 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, *J. of Agric. and Food Chem.* 47: 3954-3962 (1999).
- Kapor A., Nikolić V., Nikolić Lj., Stanković M., Cakić M., Stanojević Lj., Ilić D.: Inclusion complexes of amlodipine besylate and cyclodextrins, *Cent. Eur. J. Chem.*, 8(4) :834–841(2010).
- Keli S.O., Hertog M.G., Feskens E.J., Kromhout D.: Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study, *Arch. of In. Med.*, 156:637- 642(1996).
- Kerr J.F., Wyllie A.H. Currie A.R. : Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239–57 (1972).
- King, H.G.C.: Phenolic compounds of commercial wheat germ, *J Food Sci* 27, 446-454 (1962).
- Knežević J.: Strukturno istraživanje inkluzionih kompleksa β-ciklodekstrina, Diplomski rad, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad (2006).

- Koontz J. L., Marcy J. E., O'Keefe S. F., Duncan S. E.: Cyclodextrin inclusion complex formation and solid-state characterization of the natural antioxidants oopherol and quercetin. *J. of Agr. and Food Chem.*, 57: 1162–1171(2009).
- Krinsky N.I, Peacocke M., Russell R.M.: Antioxidant vitamins, cancer, and cardiovascular disease, *N Engl J Med* 335: 1066–1077 (1996).
- Kuhnau J.: The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition, *World Rev Nutr Diet* 24:117–191 (1976).
- Kujundžid S.: Biohemijska ispitivanja biljnih vrsta familije Apiaceae, Magistarska teza, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad (2002).
- Kumarasamy Y., Byres M., Cox P.J., Jaspars M., Nahar L., Sarker S.D.: Screening seeds of some Scottish plants for free-radical scavenging activity. *Phytother. Res.* 21: 615-621(2007).
- Kumpulainen J.T.: Intake of flavonoids, phenolic acids and lignans in various populations. In: Voutilainen, S., Salonen, J.T: Third international conference on 125 natural antioxidants and anticarcinogens in food, health, and disease (NAHD), Kuopion Yliopisto, Finland, Helsinki, 24 (2001).
- 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).
- 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).
- Lampberth J.D.: NOX enzymes and the biology of the reactive oxygen, *Nat Rev Immunol* 4:181-189 (2004).
- Lea P.J., Leegood R.C.: *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Chichester (1999).
- Lin C.H., Wei Y.T., Chou C.C.: Enhanced antioxidative activity of soybean koji prepared with various filamentous fungi, *Food Mic.*, 23 (7): 628–633(2006).
- Liu J.K., Hu L., Dong Z.J., Hu Q. : DPPH radical scavenging activity of ten natural p-terphenyl derivatives obtained from three edible mushrooms indigenous to China. *Chemistry & Biodiversity*, 1: 601-605 (2004).
- Liu Y., Li B., Wada T., Inoue Y. : Novel o-phenylenediseleno bridged bis(cyclodextrin)s complexes with platinum(IV) and palladium(II) ions. *Supra. Chem.*, 10:279–285 (1999).
- Majer J., Grummt T., Uhl M., Knasmüller S.: Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment, *Acta Hydro. Hydrob.*, 33, 45-55 (2005).
- Macheix J.J., Fleuriet A., Billot J.: *Fruit phenolics*, FL, CRC Press, Boca Raton (1990).

- 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, 35-59 (1998).
- Merken H. M., Beecher G. R. : Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent aglycones. *J. Chromatogr. A*, 897:177–184 (2000).
- Mihaela M. P., Kees G., Gheorghe B., Mircea B., Dirk J. A., Rene P., Henk S.: Crystal structure of inclusion complex of β -cyclodextrin with mefenamic acid from high-resolution synchrotron powder-diffraction data in combination with molecular-mechanics calculation; *Acta Cryst.*: 1036-1043 (2002).
- 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).
- Mimica-Dukic N.: Ispitivanje sekundarnih biomolekula u nekim vrstama roda *Mentha*, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad(1992).
- Mladenović J., Mašković P., Pavlović R., Radovanović B., Aćamović Đ. G., Cvijović M.: Antioxidant activity of ultrasonic extracts of leek *Allium porrum* L. *Hem. ind.* 65 (4):473–477 (2011).
- Mladenović J., Radovanović B., Pavlović R., Aćamović –Đoković G.: Cytotoxicity and Biological Activity natural compounds of *Lycopersicon esculentum* Mill. *Oxi. Comm.*, No 2305/2014, 1, Vol 37(2014).
- Morales K.H., Ryan L., Kuo T.L., Wu M.M., Chen C.J.: Risk of internal cancers from arsenic in drinking water. *Environ. Health Per spect.*, 108: 655-661 (2000).
- Mosmann T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. of Immun. Meth.* 65: 55-63 (1983).
- Namiki M.: Antioxidants/antimutagens in food. *CRCCriticalReviews in Food Science*(1990).
- Naczki M., Shadidi F. : Extraction and analysis of phenolics in food. *J. of Chromatography A* 1054: 95-111 (2004).
- Naczki M., Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis, *J. of Pharm. and Biom. Analysis*, 41:1523-1542 (2006).
- NCCLS, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard NCCLS Publication M7/A2, Villanova, PA, USA, 1990b.
- NCCLS M/7-A2 standard for yeasts: Reference method for broth Dilution Antifungal susceptibility testing of Yeasts; Approved Standard-Second Edition. Pennsylvania, USA 2002.

- Nikolic V., Ilic D., Nikolic Lj., Stankovic M., Cakic M., Stanojevic Lj., Kapor A., Popsavin M.: The protection of Nifedipin from photodegradation due to complex formation with β -cyclodextrin. *Cent. Eur. J. Chem.* 8(4): 744–749 (2010).
- Nishikawa H.: Radical generation on hydroxyapatite by UV irradiation, *Materials Lett* 58: 14-16 (2004).
- Ossipov V., Nurmi K., Loponen J., Haukioja E., Pihlaja K.: HPLC separation and identification of phenolic compounds from leaves of *Betula pubescens* and *Betula pendula*. *J. Chromatogr.*, 721: 59–68 (1996).
- Parr A.J., Bolwell, G.P.: Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J. Sci. Food Agric.* 80: 985-1012 (2000).
- Pavlović R.: Uticaj različitih organskih đubriva i zeoplanta na kvalitet rasada i produktivnost paradajza gajenjem u plasteniku, *Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Beograd* (1997).
- Pavlović R., Jevđović R.: *Začinsko povrće, Zadužbina Andrejević, Beograd*(2002).
- Pietta P.G. : Flavonoids as antioxidants. *J. of Nat. Products*, 63:1035-1042(2000).
- Popović M.: *Povrtarstvo, Nolit, Beograd*(1991).
- Prieto P.; Pineda M.; Aguilar M.: Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* 269: 337–341(1999).
- Prior R.L., Cao G., Martin A., Sofic E., McEwen J., O'Brien C., Lischner N., Ehlenfeldt M., Kalt W., Krewer G., Mainland C.M.: Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species. *J. of Agric. and Food Chem.*, 46: 2686–2693(1998).
- Radovanović A., Jovancević B., Radovanovic B., Mihajlov K.T., Zvezdanovic J.: Antioxidant and antimicrobial potentials of Serbian red wines produced from international *Vitis vinifera* grape varieties, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92, 10, :2154–2161(2012).
- Randolph R.K.: *Phytochemicals: Mechanisms of Action, CRC Press, Boca Raton*, 21-33 (2004).
- Rates S.M.K.: Plants as source of drugs, *Toxicon* 39: 603–613 (2001).
- Reddy, G. S. N., Prakash, J. S. S., Srinivas, R., Matsumoto, G. I., Shivaji, S. : *Leifsonia rubra* sp. nov. and *Leifsonia aurea* sp. nov., psychrophiles from a pond in Antarctica. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 977–984(2003).
- 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).

- 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).
- 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).
- Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H., Kanazawa K.: Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J. Agric. Food Chem.*, 51:571–581(2003).
- 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).
- Satyajit D., Sarker L.N., Kumarasamy Y.: Microtitre plate based antibacterial assay incorporating resazurin as indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods.*, 42(4):321-324(2007).
- 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).
- Savic I. M., Nikolic V. D., Savic I. M., Nikolic L. B., Stankovic M. Z. : Development and validation of a new RP-HPLC method for determination of quercetin in green tea. *Journal of Analytical Chemistry*, 68(10): 906-911(2013).
- Shahidi F., Naczki M.: *Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications*, PA, Technomic Publishing Co Inc, Lancaster (1995).
- Shahidi F., Wanasundara P.K.: Phenolic antioxidants, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32 (1): 67-103 (1992).
- Shen B.: Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(2): 285-295(2003).
- Shukla B., Visen P.K.S., Patnaik G.K., Tripathi S.C., Srimal R.C., Dayal R., Dobhal P.C. : Hepatoprotective activity in the rat of ursolic acid isolated from eucalyptus hybrid. *Phytother. Res.*, 6 (2): 74-79(1992).
- Sies H.: *Oxidative Stress*, Academic Press, London (1985).
- Sikkema J., DeBont J. A., Poolman B.: Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microb. Reviews* 59: 201-222 (1995).
- Singleton V., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M.: Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299: 152–175 (1999).

- 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).
- Stevanović V., Vasić V.: Biodiverzitet Jugoslavije sa pregledom vrsta od međunaridnog značaja, *Ekolibri*, Beograd, Biološki fakultet, Beograd, 562 (1995).
- Stevanović B., Janković M.: *Ekologija biljaka*, NNK Internacional, Beograd, 514 (2001).
- Sutradhar R.K, Rahman A.M., Ahmad M., Bachar S.C., Saha A., Guha S.K. : Bioactive alkaloid from *Sida cordifolia* Linn. with analgesic and anti-inflammatory activities. *Iranian J. Pharmacol. Ther.* 5: 175-178 (2006).
- Štefan L., Tepšić T., Zavidic T., Urukalo M., Tota D., Domitrović R.: Lipidna peroksidacija uzroci i posledice, *Medicina* 43:84-93 (2007).
- Takao T., Watanabe N., Yagi I., Sakata K.: A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58: 1780-1783 (1994).
- Takasaki M., Konoshima T., Kozuka M., Tokuda H.: Anti-tumor-promoting activities of euglobals from *Eucalyptus* plants. *Biol. Pharm. Bull.*, 18 (3): 435-438 (1995).
- Tandon S.K., Chandra S. Gupta S., Jawahar L.: Pharmacological effects of alcoholic extract of *Eucalyptus citriodora* leaves. *Indian Vet. J.*, 72 (7): 762-764(1995).
- Thompson C.B.: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456–62 (1995).
- Thomson M.D., Thomson H.J.: Botanical diversity in vegetable and fruit intake: Potential health benefits, U: *Bioactive foods in promoting health (fruits and vegetables)*, Watson, R.R., Preedy, V.R. (Ed.), Elsevier Inc., New York: 37-58 (2010).
- Ubovic M., Bogdanovic D.: *Praktikum iz Agrohemiје*, Novi Sad (1999).
- Uri N.: In : *Autoxidation and Antioxidants*; Lundberg, W. O., Ed., Interscience: London: 133-169 (1961).
- Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L., Oomah B.D: Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4113–4117 (1998).
- Verrmeris W., Nicholson R.: *Phenolic compound biochemistry*. Springer: Netherlands (2006).
- Voirin B., Bayet C., Faure O., Jullien F.: Free flavonoid aglycones as markers of parentage in *Mentha aquatica*, *M. citrata*, *M. spicata* and *M. x piperita*. *Phytochem.*, 50(7):1189-1193 (1999).
- Voutilainen S., Salonen J.T.: Third international conference on natural antioxidants and anticarcinogens in food, and disease (NAHD), Kuopion Yliopisto, Finland, Helsinki, 25 (2001).

- WCRF/AICR (World Cancer Research Fund): Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: A global perspective. American Institute for Cancer Research, Washington (2008).
- Wink M.: Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochem.*, 64: 3-19 (2003).
- Xu F., Li L., Huang X., Cheng H., Wang Y., Cheng S.: Antioxidant and antibacterial properties of the leaves and stems of *Premna microphylla*. *J. Med. Plants Res.* 4(23): 2544-2550 (2010).
- Yan L.Y., Teng, L.T., Jhi T.J.: Antioxidant properties of Guava fruits: Comparison with some local fruits. *Sunway Ac. J.* 3:9-20 (2006).
- Yanishlieva N.V., Marinova E., Pokorny J.: Natural antioxidants from herbs and spices. *E. J. of Lipid Sc. and Tech.*, 108: 776–793 (2006).
- Zdravković, J., Marković, Ž., Pavlović, R., Zdravković, M.: *Paradajz, Monografija* (2012).
- Zhang L., Demain A L.: *Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine*, Humana Press Inc., Totowa, New York, USA (2005).
- www.hranakaolek.rs; www.institut-palanka.co.rs; www.pks.komora.net;

ИЗВОД

„Екстракти поврћа *Allium porum* L., *Daucus carota* L., *Capsicum annuum* L. и *Lycopersicon esculentum* Mill.: хемијски састав, антиоксидационо, антимикубно и антиканцерогено деловање и њихова примена“

Ова докторска дисертација је конципирана са циљем да испита потенцијалну биохемијску активност етанолних екстраката поврћа (*Allium porum* L., *Daucus carota* L., *Capsicum annuum* L., *Lycopersicon esculentum* Mill.) у функцији концентрација фенолних једињења.

У том циљу извршено је:

- Утврђивање агрохемијских услова земљишта за гајење изабраних сорти поврћа у току 2010 и 2011 године;
- Хемијска анализа изабраних етанолних екстраката поврћа, гајених у току 2010 и 2011 године;
- Спектроскопска анализа укупних фенола и укупних флавоноида у испитиваним етанолним екстрактима поврћа;
- HPLC анализа фенолних једињења присутних у испитиваним етанолним екстрактима поврћа;
- Одређивање антиоксидативне активности изабраних етанолних екстраката поврћа применом две спектрофотометријске методе;
- Успостављање корелације између антиоксидативне активности изабраних етанолних екстраката поврћа и концентрације укупних фенола и флавоноида;
- Одређивање антимикуробне активности изабраних етанолних екстраката поврћа према *грам*-позитивних и *грам*-негативних бактеријских сојева и гљива;
- Одређивање нивоа цитотоксичност изабраних етанолних екстраката поврћа у *in vitro* условима на *RD*, *Hep2c* и *L2OB* ћелије;
- Испитивање могућности њихове практичне примене, инклудовањем кверцетина, као доминантне фенолне компоненте у испитиваним екстрактима одабраних врста поврћа, у супрамолекуле са органским носачем, 2-хидроксипропил- β -циклодекстрином.

SUMMARY

“Extracts of the vegetable species *Allium porum* L., *Daucus carota* L., *Capsicum annuum* L. and *Lycopersicon esculentum* Mill.: chemical composition, antioxidant, antimicrobial and anticarcinogenic activities, and their applications“

This doctoral dissertation intends to evaluate the potential biochemical activity of ethanolic extracts from the vegetable species *Allium porum* L., *Daucus carota* L., *Capsicum annuum* L. and *Lycopersicon esculentum* Mill. for the concentration of phenolic compounds. To this end, the research involved the following:

- Assessment of the agrochemical properties of the soil used for the cultivation of selected vegetable varieties in 2010 and 2011;
- Chemical analysis of the selected ethanolic extracts of the test vegetables grown in 2010 and 2011;
- Spectroscopic analysis of total phenols and total flavonoids in the ethanolic extracts of selected vegetables;
- HPLC analysis of the phenolic compounds present in the ethanolic extracts of vegetables;
- Determination of antioxidant activity in the selected ethanolic extracts by two spectrophotometric methods;
- Establishing a correlation between antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents in the selected ethanolic extracts of the vegetables tested;
- Determination of the antimicrobial activity of the selected ethanolic extracts against *gram*-positive and *gram*-negative bacterial strains and fungi;
- Determination of the cytotoxicity of the selected ethanolic extracts from vegetables under *in vitro* conditions to *RD*, *Hep2c* and *L2OB* cells;
- Evaluation of their potential practical applications through the formation of supramolecular complexes between quercetin as the dominant phenolic component in the tested extracts from selected vegetable species and the organic carrier 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin.

БИОГРАФИЈА

Младеновић Јелена је рођена 25.3.1979. године у Лесковцу. Основну и средњу школу завршила је у Лесковцу са одличним успехом и Вуковим дипломама. На Природно-математичком факултету у Нишу на групи хемија дипломирала је 2003. године и стекла стручни назив дипломирани хемичар. Уписала је докторске студије 2008. год. на Природно-математичком факултету у Нишу.

Младеновић Јелена радила је као професор хемије у гимназији у Чачку и учествовала је у раду Регионалног центра за таленте као ментор за предмет хемија током школске 2007/2008. године.

Од 2008. године ангажована је као истраживач–приправник на истраживачком пројекту Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије. Исте године је изабрана за сарадника у настави за ужу научну област хемија на Агрономском факултету у Чачку, Универзитета у Крагујевцу, где успешно реализује вежбе на предметима Органска хемија и Биохемија. Од 2010. год. је изабрана у звање асистента за ужу научну област хемија на Агрономском факултету у Чачку.

Резултате досадашњег истраживачког рада је као аутор објавила у међународним научним часописима и саопштила на домаћим и међународним научним скуповима.

БИБЛИОГРАФИЈА

(M₂₂)

Pavle Mašković, Slavica Solujić, Vladimir Mihailović, Milan Mladenović, Milica Cvijović, **Jelena Mladenović**, Gordana Aćamović-Đoković and Vladimir Kurćubić: Phenolic Compounds and Biological Activity of *Kitaibelia vitifolia*, Journal of Medicinal Food,14(12): 1617-1623(2011).

Tomo Milosević, Nebojša Milošević, Ivan Glišić, **Jelena Mladenović** : Fruit quality attributes of blackberry grown under limited environmental conditions, Plant soil and environment,58(7) :322-327 (2012).

(M₂₃)

Jelena D. Mladenović, Pavle Z. Mašković, Radoš M. Pavlović, Blaga C. Radovanović, Gordana Aćamović-Đoković, Milica S. Cvijović: Antioxidant activity of ultrasonic extracts of leek *Allium porrum* L. Hemijska industrija 65(4): 473-477 (2011).

Pavle Z. Mašković, **Jelena D. Mladenović**, Milica S. Cvijović, Gordana Aćamović-Đoković, Slavica R. Solujić, Marija M. Radojković: Phenolic content, antioxidant and antifungal activities of acetic, ethanolic and petroleum ether extracts of *Hypericum perforatum* L. Hemijska industrija 65 (2): 159-164(2011).

M.Djurić, **J. Mladenović**, B.Radovanović, S.Murtić, G.Aćamović-Djoković, R.Pavlović and Lj.Bošković-Rakočević: Effect of liming on the molybdenum content in the root and leaf of tomato grown on pseudogley under controlled conditions, African Journal of Biotechnology, Vol. 10(83),DOI: 10.5897/ AJB11.1264, ISSN 1684-5315,137/160: 19402-19406 (2011).

M.Djurić, **J. Mladenović**, R.Pavlović, N.Murtić, S.Murtić, V.Milić and G.Šekularac: Aluminium content in leaf and root of oat (*Avena sativa* L.)grown on pseudogley soil, African Journal of Biotechnology,Vol. 10(77), DOI: 10.5897/ AJB11.156, ISSN 1684-5315, 137/160 : 17837-17840 (2011).

Tomo Milosević, Nebojša Milošević, Ivan Glišić, **Jelena Mladenović** : Fruit quality, phenolics content, and antioxidant capacity of new apricot cultivars from Serbia, Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus 11(5):3-15(2012).

Pavlović,R.,**Mladenović, Jelena**, Radovanović Blaga, Aćamović-Đoković Gordana, Zdravković Jasmina, Zdravković, M. Phenolic compounds and biological activity of *Capsicum annum* L. African Journal of Biotechnology,Vol.11(45), ISSN 1684-5315. DOI:10.5897/AJB12.980 :10446-10450. (2012).

Tomo Milosević, Nebojša Milošević, Ivan Glišić, **Jelena Mladenović**: Segregation of blackberry cultivars based on the fruit physico-chemical attributes. Tarım Bilimleri Dergisi – Journal of Agricultural Sciences, Vol(18) :100-109 (2012).

Jasmina M. Zdravković , Gordana S. Aćamović-Djoković, **Jelena D. Mladenović**, Radoš M. Pavlović, Milan S. Zdravković : Antioxidant Capacity and Contents of Phenols, Ascorbic Acid β -Carotene and Lycopene in Lettuce (Hemijska industrija 2013 OnLine-First Issue 0: 43-43,doi:10.2298/HEMIND130222043Z)(2014).

Jelena Mladenović*, Blaga Radovanović, Radoš Pavlović, Gordana Aćamović –Đoković: Cytotoxicity and Biological Activity natural compounds of *Lycopersicon esculentum* Mill.Oxidation Communications, No 2305/2014, book 1, Vol 37 (2014).

Jelena Mladenović*, Aleksandra Radovanović, Radoš Pavlović, Blaga Radovanović, Jasmina Zdravković, Gordana Aćamović-Đoković: Cytotoxicity and antimicrobial and antioxidant activity of *Daucus carota* L., *Lycopersicon lycopersicum* L. and *Capsicum annuum* L. Bulgarian Chemical Communications, No 3434/27.11.2013 (prihvaćen za štampu).

(M₅₁)

Pavlović, R., **Mladenović Jelena**, Zdravković Jasmina, Đurić Milena, Aćamović-Đoković Gordana, Zdravković, M.: Effect of lyophilization on changes in the mechanical and chemical composition of broccoli inflorescences. *Savremena poljoprivreda*, Novi Sad, vol. 61 special, 119-123. ISSN 0350-1205(2012).

(M₅₂)

Gordana Acamovic-Djokovic, Rados Pavlovic, **Jelena Mladenovic**, Milena Djuric: The Content of Vitamin C in Different Types of Lettuce Varieties. *Acta Agruculturae Serbica*, Vol. XVI 32: 83-89(2011).

(M₅₃)

Pavle Mašković, Milica Cvijović, Vladimir Kurčubić, Leka Mandić, Dragutin Đukić, Gordana Aćamović-Đoković, **Jelena Mladenović**, Jelena Pantović: Antimicrobial activities of chloroform, ethyl acetate and petroleum ether extracts of plant species *Seseli rigidum* W.K. *Acta Agruculturae Serbica*, Vol. XVII, 33:47-52(2011).

(M₃₃)

Radoš Pavlović, **Jelena Mladenović**, Gordana Aćamović-Đoković, Pavle Mašković, Jasmina Zdravković, Milan Zdravković: Ultrasonični ekstrakt mrkve kao prirodni antioksidans, *Proceedings, International Scientific Symposium of Agriculture, «Agrosym Jahorina 2011»*, UDK 66.061.1:633.43:66.094.3-097.8, ISBN 978-99938-670-9-8(2011).

Radoš Pavlović, **Jelena Mladenović**, Pavle Mašković, Gordana Aćamović-Đoković, Jasmina Zdravković: In vitro antimikrobna aktivnost mrkve kao potencijalni prirodni antioksidansi, *International Scientific Symposium of Agriculture, «Agrosym Jahorina 2011»*, (2011) UDK 633.43:66.061.1]:615.322(497.11), ISBN 978-99938-670-9-8(2011).

Pavlović, R., Mašković, P., **Mladenović Jelena**, Zdravković, Jasmina, Aćamović-Djoković Gordana, Zdravković, M., Cvikić, D. (2011): In Vitro Antimicrobial Activity of Ethanol Lettuce Extracts as a Potential Natural Conservancy. *22nd International symposium «Safe Food Production»*, *Proceedings*, Novi Sad, 417-419. ISBN: 978-86-7520-219-6 (2011).

Pavlović, R., **Mladenović Jelena**, Radovanović Blaga, Mašković P., Zdravković Jasmina: Antioxidants of vegetable—potential natural preservatives. *Elektronska knjiga, VIVUS*, 1st Scientific Conference on Agriculture, Environmentalism and Horticulture "Transmission of Innovations, Knowledge and Practical Experience into Everyday Practice", Naklo, Slovenia, 1-6. ISBN: 978-961-93153-3-0(2012).

Pavlović, R., Mašković, P., **Mladenović Jelena**, Aćamović-Đoković Gordana, Cvijović Milica, Radojković Marija, Solujić Slavica: Antimicrobial and determination of DPPH free radical scavenging activity of *Satureja hotensis* L. *Elektronska knjiga, VIVUS*, 1st Scientific Conference on Agriculture, Environmentalism and Horticulture "Transmission of Innovations, Knowledge and Practical Experience into Everyday Practice", Naklo, Slovenia, 1-9. ISBN: 978-961-93153-3-0(2012).

Pavlović, R., **Mladenović Jelena**, Radovanović Blaga, Mašković, P., Zdravković Jasmina: Antimicrobial activity of ethanol lettuce extracts as a potential natural conservancy. *Elektronska*

knjiga , VIVUS, 1st Scientific Conference on Agriculture, Environmentalism and Horticulture "Transmission of Innovations, Knowledge and Practical Experience into Everyday Practice", Naklo, Slovenia, 1-6. ISBN: 978-961-93153-2-3(2012).

Zdravkovic J. Pavlovic R., Maškovic P., **Mladenovic J.**, Aćamović-Đoković G., Đuric G., Pavlovic N.: Antibacterial activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) extract grown in plastic- and glass-houses. 5th Balkan symposium on Vegetable and Potatoes. 9-12. October, Tirana Albania (ISHS) Acta horticulture 960: 299-303(2012).

Radoš Pavlović, **Jelena Mladenović**, Blaga Radovanović, Pavle Mašković, Gordana Aćamović-Đoković: In vitro antimicrobial activity of ethanol tomato extracts, zbornik referatov, Biotechnical Centre Naklo, Slovenija, ISBN 978-961-93153-8-5:393-396(2013).

Radoš Pavlović, **Jelena Mladenović**, Blaga Radovanović, Pavle Mašković, Gordana Aćamović-Đoković: Biological Activity of Beetroot extracts, zbornik referatov, Biotechnical Centre Naklo, Slovenija, ISBN 978-961-93153-8-5:397-401(2013).

(M34)

P. Maškovic, N Niciforovic, S Solujic, N Manojlovic, M Cvijovic, **J Mladenovic**, G Acamovic Djokovic, M Radojkovic: Phytochemistry and biological activities of the ethanolic extract of *Onosma aucherianum*, Planta Medica (Meeting Abstract) 77 (12) 1432 DOI: 10.1055/s-0031-1282889, ISSN 0032-0943(2011).

Zdravković Jasmina, **Mladenović Jelena.**, Pavlović, R., Pavlović N., Pavlović Suzana., Zdravković M.: The effect of extracted parameters on the antimicrobial activity of beetroot. Book of Abstracts 22nd International Scientific-Expert Conference of Agriculture and Food Industry, Sarajevo, 178(2011).

Zdravković Jasmina, Marković, Ž., Mijatović Mirjana, Pavlović, R., **Mladenović Jelena**, Pavlović N., Zdravković M.: Tomato selection at the institute for vegetable crops, Smederevska Palanka- achievements and tendencies. Book of Abstracts 22nd International Scientific-Expert Conference of Agriculture and Food Industry, Sarajevo, 92(2011).

Pavlović R., **Mladenović J.**, Mašković P., Aćamović- Đoković G., Zdravković J. Antioxidant activity macerage and ultrasonic extracts of cabbage. Book of abstracts International symposium for agriculture and food „VII Symposium for vegetable and flower production“ 12-14. December 2012, Skopje, Republic of Macedonia. p.193(2012).

Pavlović R., **Mladenović J.**, Mašković P., Aćamović- Đoković G., Zdravković J. Biological activity of beetroot extracts. Book of abstracts International symposium for agriculture and food „VII Symposium for vegetable and flower production“ 12-14. December 2012, Skopje, Republic of Macedonia. p.194(2012).

Jasmina Zdravković, Zdenka Girek, Radoš Pavlović, Gordana Aćamović –Đoković, **Jelena Mladenović**, Milan Zdravković: Stare sorte i populacije paradajza kao potencijal u oplemenjivanju na povećan sadržaj likopena i β-karotena, II International Symposium and XVIII Scientific Conference of Agronomists of Republic of Srpska, Book of Abstracts, 237-238(2013).

Jasmina Zdravković, Radoš Pavlović, Gordana Aćamović –Đoković, **Jelena Mladenović**, Milan Zdravković: Antimikrobna aktivnost etanolnih ekstrakata nekih sorti paradajza, II International Symposium and XVIII Scientific Conference of Agronomists of Republic of Srpska, Book of Abstracts, 331-332(2013).

(M63)

Mladenović Jelena, Mašković, P., Radovanović Blaga, Pavlović, R., Aćamović-Đoković Gordana, Cvijović Milica: In vitro antioksidativna aktivnost etanolskog ekstrakta crnog luka. XVI Savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, Zbornik radova, vol.16(18), Čačak, 589-592. ISBN 978-86-87611-15-3(2011).

Pavlović, R., **Mladenović Jelena**, Radovanović Blaga, Aćamović-Đoković Gordana, Zdravković Jasmina, Zdravković, M: Antioxidant activity of tomato and pepper ethanol extracts. IX Simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj" sa međunarodnim učešćem, Zbornik radova Tehnološkog fakulteta, Leskovac, 19-24. ISSN: 0352-6542(2011).

Pavlović, R., **Mladenović Jelena**, Radovanović Blaga, Aćamović-Đoković Gordana, Zdravković Jasmina, Zdravković, M. Antimikrobna aktivnost etanolnih ekstrakata paradajza i paprike. IX Simpozijum "Savremene tehnologije i privredni razvoj", sa međunarodnim učešćem, Zbornik radova Tehnološkog fakulteta, Leskovac, 154-159. ISSN: 0352-6542(2011).

Mladenović Jelena, Pavlović, R., Radovanović Blaga, Mašković, P., Aćamović-Đoković Gordana: Biological activity of white cabbage *Brassica oleraceae* L. XVII Savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, Zbornik radova, vol.17(19), Čačak, 104-108. ISBN 978-86-87611-23-8(2012).

Mladenović Jelena, Pavlović, R., Radovanović Blaga, Mašković, P., Aćamović-Đoković Gordana: Antimicrobial and antioxidant activity extract broccoli. XVII Savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, Zbornik radova, vol.17(19), Čačak, 109-113. ISBN 978-86-87611-23-8(2012).

P.Mašković, Slavica Solujić, **Jelena Mladenović**, Milica Cvijović, Gordana Vićentijević-Marković, Gordana Aćamović-Đoković: Antimicrobial activities of chloroform, ethyl acetate and petroleum ether extracts of endemic plant species *Halacsya sendtneri* (L), XVI Savetovanje o biotehnologiji, Zbornik radova, Agronomski fakultet u Čačku, 4-5. mart 2011. vol.16(18): 599-604. ISBN 978-86-87611-13-9(2011).

Jasmina Zdravković, N.Pavlović, R.Pavlović, LJ.Bošković-Rakočević, M.Zdravković, M.Ugrinović, **J.Mladenović** : Promena sadržaja likopena i beta karotena u plodovima paradajza (*Lycopersicon esculentum* Mill.) u zavisnosti od mineralne ishrane, XVI Savetovanje o biotehnologiji, Zbornik radova, Agronomski fakultet u Čačku, 4-5. mart 2011. vol.16(18): 87-93. ISBN 978-86-87611-13-9(2011).

Jelena Mladenović, Radoš Pavlović, Blaga Radovanović, Gordana Aćamović-Đoković, Jasmina Zdravković, Pavle Mašković, Milica Cvijović : Sadržaj fenolnih jedinjenja i antimikrobna aktivnost ultrazvučnih ekstrakta prokelja (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*), XVIII savetovanje biotehnologije, Zbornik radova, Vol.18 (20) Čačak: 179-184 (2013).



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом
„Екстракти поврћа *Allium porum* L., *Daucus carota* L., *Capsicum annuum* L. и *Lycopersicon esculentum* Mill.: хемијски састав, антиоксидационо, антимикробно и антиканцерогено деловање и њихова примена“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни у целини, ни у деловима, није била предложена за добијање било које дипломе, према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Нишу, 18.02.2014.

Аутор дисертације: Јелена Д. Младеновић

Потпис докторанда:

Јелена Младеновић



Прилог 2.

**ИЗЈАВА О ИСЛОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКЕ
ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора:

Јелена Д. Младеновић

Студијски програм:

хемија

Наслов рада: „Екстракти поврћа *Allium porum* L., *Daucus carota* L., *Capsicum annum* L. и *Lycopersicon esculentum* Mill.: хемијски састав, антиоксидационо, антимикубно и антиканцерогено деловање и њихова примена“

Ментор:

Др Блага Радовановић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 18.02.2014.

Аутор дисертације:

Јелена Д. Младеновић

Потпис докторанда:



Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом: „Екстракти поврћа *Allium porum* L., *Daucus carota* L., *Capsicum annuum* L. и *Lycopersicon esculentum* Mill.: хемијски састав, антиоксидационо, антимикубно и антиканцерогено деловање и њихова примена“ која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, 18.02.2014.

Аутор дисертације: Јелена Д. Младеновић

Потпис докторанда: