

UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
AGRONOMSKI FAKULTET U ČAČKU



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF AGRONOMY ČAČAK

XVI SAVETOVANJE O BIOTEHNOLOGIJI

sa međunarodnim učešćem

- ZBORNİK RADOVA -



Vol. 16. (18), 2011.

Čačak, 4 - 5. Mart 2011. godine

CIP - Katalogizacija u publikaciji
Narodna biblioteka Srbije, Beograd

63(082)

60(082)

SAVETOVANJE o biotehnologiji sa međunarodnim
učešćem (16 ; 2011 ; Čačak)

Zbornik radova / XVI savetovanje o
biotehnologiji sa međunarodnim učešćem,
Čačak, 4-5. mart 2011. godine ; [organizator]
Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet
u Čačku = [organized by] University of
Kragujevac, Faculty of Agronomy, Cacak. -
Čačak : Agronomski fakultet, 2011 (Čačak :
Svetlost). - 668 str. : graf. prikazi, tabele
; 24 cm

Radovi na srp. i engl. jeziku. - Tiraž 150. -
Napomene uz tekst. - Bibliografija uz svaki
rad. - Abstracts.

ISBN 978-86-87611-15-3

1. Agronomski fakultet (Čačak)

a) Poljoprivreda - Zbornici

b) Biotehnologija - Zbornici

COBISS.SR-ID 182201356

XVI SAVETOVANJE O BIOTEHNOLOGIJI
sa međunarodnim učešćem

- Zbornik radova -
Vol. 16. (18), 2011.

ORGANIZATOR I IZDAVAČ:

Agronomski fakultet, Čačak

Organizacioni odbor:

prof. dr Nikola Bokan, prof. dr Drago Milošević,
prof. dr Goran Dugalić, prof. dr Radojica Đoković, dr Mirča Balan doc.

Programski odbor:

prof. dr Dragutin Đukić, dr Radoslav Cerović, prof. dr Miroslav Spasojević,
prof. dr Aleksandar Paunović, Snežana Pašalić, prof. dr. Snežana Bogosavljević-Bošković,
prof. dr Tomo Milošević, prof. dr Vladeta Stevović, prof. dr Leka Mandić,
prof. dr Milena Đurić, prof. dr Milica Cvijović, prof. dr Gordana Šekularac, prof. dr Nikola
Bokan, dr Mirče Balan, dr Vladimir Kurćubić,

Tehnički urednik:

prof. dr Nikola Bokan

Kompjuterska obrada i slog:

Dušan Marković, dipl. ing.

Tiraž: 150 primeraka

Štampa:

Štamparija „Svetlost“ Čačak

ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST TRI BILJNE VRSTE RODA *VERBASCUM*

Neda Nićiforović, V. Mihailović, M. Mladenović,
Slavica Solujić, M. Stanković¹, Dragana Ivanović²

Izvod: Cilj rada je da se ispita količina fenola i flavonoida, kao i antioksidativna aktivnost metanolskih ekstrakata biljaka *Verbascum phlomoides* L., *Verbascum thapsus* L. i *Verbascum nigrum* L. iz roda *Verbascum* (Scrophulariaceae) kao potencijalnih izvora prirodnih antioksidanasa/ konzervanasa. Najveća količina fenola od 96,5 mg GA/g identifikovana je u ekstraktu biljke *V. thapsus* a najveća količina flavonoida od 45.6 mg RU/g identifikovana je u ekstraktu biljke *V. nigrum*. Visok nivo ukupne antioksidativne aktivnosti koja iznosi 445.5 mg AA/g i DPPH „skevindžer” aktivnost od $IC_{50}=63.7 \mu\text{g/mL}$ pokazao je ekstrakt biljke *V. thapsus*.

Ključne reči: *Verbascum*, ukupni fenoli, flavonoidi, antioksidativna aktivnost

Uvod

Ukoliko se zanemari kvarenje pod dejstvom mikroorganizama, pogoršanje kvaliteta hrane koje se dešava prilikom prerade i skladištenja, dovodi se u vezu sa prisustvom kiseonika i oksidativnim procesima (Lin i sar., 2006). Ove reakcije su često katalizovane jonima gvožđa i bakra, odigravaju se različitim mehanizmima i najčešće daju slobodne radikale. Pri oksidativnim procesima može doći do degradacije svih biomolekula, ali uglavnom su to lipidi, ugljeni hidrati i proteini (Hinneburg i sar., 2006). Promene izazvane kiseonikom i tragovima metala najčešće uslovljavaju nepoželjne promene u boji, ukusu i aromi; smanjuju hranljivu vrednost namirnice, a u određenim slučajevima deluju i toksično na čoveka (Vereš, 1991).

Antioksidansi su redukujuće supstance koje održavaju redoks potencijal na niskom nivou, inhibiraju slobodne radikale i sprečavaju ili zaustavljaju lančane reakcije usled kojih bi nastala jedinjenja koja bi nepoželjno uticala na određene karakteristike namirnice (Vereš, 1991). Upotreba sintetičkih antioksidanasa dovedena je u vezu sa zdravstvenim rizicima, što je rezultiralo strogim propisima za upotrebu sintetičkih antioksidanasa (Hettiarachchy i sar., 1996). U novije vreme interes za prirodne antioksidanse značajno raste, mnoge naučno-istraživačke studije ukazuju na veću efikasnost i zdravstvenu bezbednost prirodnih antioksidanata izolovanih iz biljaka (Yanishlieva i sar., 2006).

Od davnina, začinsko i lekovito bilje je dodavano različitim vrstama hrane radi poboljšanja ukusa i antioksidativnog kapaciteta. Biljke su bogat izvor prirodnih antioksidanasa, u koje spadaju tokoferoli, vitamin C, karotenoidi i biljni fenoli (Shahidi,

¹ Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Srbija (nmeda@kg.ac.rs)

² Institut za javno zdravlje Kragujevac, Nikole Pašića 1, 34000 Kragujevac, Srbija

1997). Mnoga istraživanja govore o vezi antioksidativne aktivnosti prirodnih proizvoda sa količinom prisutnih fenolnih jedinjenja (Velioglu i sar., 1998)

Rod *Verbascum* je najveći rod iz familije Scrophulariaceae sa preko 250 vrsta rasprostranjenih širom sveta. U Srbiji rastu 23 vrste (Sarić, 1992). *Verbascum* je rod divizma u narodu poznat i kao beloperka, divlji tabak, svećnik, lepuh, žutocvet, vučji rep.

Cilj ovog rada je da se ispita antioksidativna aktivnost biljaka *Verbascum phlomoides* L. (svećnjak), *Verbascum thapsus* L. (velika divizma) i *Verbascum nigrum* L. (crna divizma) određivanjem ukupne antioksidativne aktivnosti i DPPH „skevindžer“ aktivnosti metanolskih ekstrakata odabranih biljaka. Određene su i količine ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida.

Materijal i metode rada

Biljni materijal i priprema ekstrakata

Biljni materijal je sakupljen na različitim lokacijama u Srbiji u septembru 2010. godine. *V. nigrum* L.: Crna Bara, Zasavica; *V. thapsus* L.: Trgovište, dolina reke Pčinje; *V. phlomoides* L.: Ploče, Suva planina. Osušen biljni materijal je ekstrahovan metanolom, dobijeni ekstrakt je filtriran i koncentrovan pod vakuumom.

Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja

Količina ukupnih fenola određena je Folin–Ciocalteu metodom (Singleton i sar., 1999). Biljni ekstrakti su razblaženi do koncentracije od 1 mg/mL i 0,5 mL ekstrakta pomešano je sa 2,5 mL Folin–Ciocalteu reagensa (prethodno desetostruko razblaženog) i 2 mL NaHCO₃ (7.5%). Nakon 15 min stajanja na 45 °C merena je apsorbanca na 765 nm, u odnosu na slepu probu. Ukupni fenoli su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline (mg GA/g ekstrakta). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri analizirana uzorka.

Određivanje sadržaja flavonoida

Ukupna količina flavonoida određena je po metodi koju su opisali Brighente i sar. (2007). Zapremina od 0,5 mL 2% aluminijum hlorida (AlCl₃) u metanolu pomešana je sa istom zapreminom metanolnog rastvora ekstrakta. Nakon 1 h stajanja na sobnoj temperaturi, apsorbanca uzoraka su merene na 415 nm na spektrofotometru u odnosu na slepu probu uzorka. Ukupni flavonoidi su izraženi kao ekvivalenti rutina (mg RU/g ekstrakta). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri analizirana uzorka.

Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti

Ukupna antioksidativna aktivnost dobijenih ekstrakata određena je metodom pomoću fosfomolibdena (Prieto i sar., 1999). Metoda se zasniva na redukciji Mo (VI) do Mo (V) pomoću antioksidanasa pri čemu dolazi do formiranja fosfat/Mo (V) kompleksa u kiseloj sredini. 0,3 mL uzorka ekstrakta (1 mg/mL) pomeša se sa 3 mL rastvora reagensa (0,6 M sumporna kiselina, 28 mM natrijum fosfat i 4 mM amonijum molibdat). Dobijene smeše inkubiraju se na 95 °C u toku 90 minuta. Nakon hlađenja uzoraka do sobne temperature, meri se apsorbanca na 695 nm na spektrofotometru u odnosu na slepu probu. Kod slepe probe umesto ekstrakta dodaje se metanol (0,3 mL).

Kao standard korišćena je askorbinska kiselina (AA), a ukupna antioksidativna aktivnost izražena je u miligramima AA /po gramu suvog ekstrakta.

Određivanje DPPH „skevindžer” aktivnosti

DPPH „skevindžer” aktivnost određena je po metodi koju su opisali Kumarasamy i saradnici (2007). DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal) rastvoren je u metanolu u koncentraciji 80 g/mL. Napravljene su serije dvostrukih razblaženja uzoraka od osnovnog rastvora koncentracije 1 mg/ml. Rastvori uzoraka i DPPH' su zatim pomešani u jednakom odnosu (po 2 mL od svakog) i takva smeša ostavljena je 30 min na sobnoj temperaturi, u mraku, nakon čega je merena apsorbancija na 517 nm. Askorbinska kiselina i BHT su korišćeni kao referentni standardi. Pripremljena je i kontrola koja, umesto rastvora uzorka, sadrži 2 mL metanola. DPPH „skevindžer” aktivnost izračunata je po jednačini:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_k - A_u}{A_k} \cdot 100$$

gde su: A_k – koncentracija kontrole; A_u – koncentracija uzorka.

Vrednost IC_{50} , koja se definiše kao koncentracija ispitivanog uzorka koja redukuje koncentraciju DPPH radikala za 50%, izražena kao g/mL ekstrakta, izračunata je preko sigmoidne „dose-response” krive postupkom nelinearne regresije, korišćenjem softvera za analizu podataka Origine 8.

Rezultati istraživanja i diskusija

Rezultati određivanja ukupnih fenolnih jedinjenja dati su u Tabeli 1. Najveća količina ukupnih fenola određena je u metanolnom ekstraktu biljke *V. thapsus* i iznosi 96,5 mg GA/g ekstrakta, dok je kod biljaka *V. nigrum* i *V. phlomoides* identifikovana količina od 82,1 mg GA/g i 80,5 mg GA/g. Najveća količina flavonoida određena je u metanolnom ekstraktu biljke *V. nigrum* i iznosi 45,6 mg RU/g, dok su u ekstraktima biljaka *V. phlomoides* i *V. thapsus* nađene duplo manje količine koje iznose 22,8 mg RU/g, odnosno 21,9 mg RU/g.

Rezultati ukupne antioksidativne aktivnosti određeni fosfomolibdenskom metodom predstavljeni su u Tabeli 1. Najveći ukupni antioksidativni kapacitet pokazuje metanolni ekstrakt biljke *V. thapsus* sa 445,5 mgAA/g, a neznatno nižu aktivnost pokazuju ekstrakti biljaka *V. nigrum* (356,0 mgAA/g) i *V. phlomoides* (312,9 mgAA/g), što je u saglasnosti sa rezultatima ukupne količine fenolnih jedinjenja. Redosled aktivnosti biljaka prema rezultatima za količinu fenolnih jedinjenja i rezultatima za ukupnu antioksidativnu aktivnost je sledeći: *V. thapsus* > *V. nigrum* > *V. phlomoides*, što je u potpunoj saglasnosti sa naučnim radovima koji potvrđuju međuzavisnost antioksidativne aktivnosti i količine fenolnih jedinjenja prisutnih u biljci (Velioglu i sar., 1998; Burns i sar., 2000; Prior i sar., 1998).

Jedinjenja koja mogu da doniraju protone ili elektrone DPPH' radikalima mogu se smatrati antioksidansima i „sakupljačima” slobodnih radikala. Antioksidanti u reakciji sa DPPH' radikalima vrše njihovu redukciju do žuto obojenog difenilpikrilhidrazina, što

dovodi do smanjenja apsorbancije na 517 nm. Step en dekol orizacije ljubičaste boje DPPH ukazuje na „skevindžer” potencijal ispitivanog antioksidansa. Rezultati određivanja „skevindžer” potencijala ispitivanih ekstrakata predstavlj eni su u Tabeli 2. Sva tri ispitivana biljna ekstrakta pokazuju visoku sposobnost redukcije DPPH radikala, u komparaciji sa standarnim antioksidansima. Bolju aktivnost pokazuju metanolski ekstrakti biljaka *V. thapsus* ($IC_{50}=63,7$ g/mL) i *V. phlomoides* ($IC_{50}=65,9$ g/mL), dok je metanolski ekstrakt *V. nigrum* pokazao nešto slabiju aktivnost, iako sadrži najveću količinu flavonoida.

Tabela 1. Količina ukupnih fenola, flavonoida i ukupna antioksidativna aktivnost metanolskih ekstrakata biljaka *V. phlomoides*, *V. thapsus* i *V. nigrum*

Table 1. Total phenolic content, flavonoid content and total antioxidant capacity of *V. phlomoides*, *V. thapsus* and *V. nigrum* methanol extracts

Biljka Plant	Ukupna količina fenola Total phenolic content (mgGA/g)	Količina flavonoida Flavonoid content (mgRU/g)	Ukupna antioksidativna aktivnost Total antioxidant capacity (mgAA/g)
<i>V. phlomoides</i>	80,5	22,8	312,9
<i>V. thapsus</i>	96,5	21,9	445,5
<i>V. nigrum</i>	82,1	45,6	356,0

Tabela 2. DPPH „skevindžer” aktivnost metanolskih ekstrakata biljaka *V. phlomoides*, *V. thapsus* i *V. nigrum*

Table 2. DPPH scavenging activity of *V. phlomoides*, *V. thapsus* and *V. nigrum* methanol extracts

IC_{50} (μg/mL)	<i>V. phlomoides</i>	<i>V. thapsus</i>	<i>V. nigrum</i>	AA	BHT
	65,9	63,7	73,8	6,0	16,0

Zaključak

U svetlu prezentovanih eksperimentalnih rezultata, može se zaključiti da su biljke *V. thapsus*, *V. phlomoides* i *V. nigrum* dobri izvori sekundarnih metabolita koji pokazuju značajan nivo antioksidativne aktivnosti. To je dovoljan razlog da se nastave dalja ispitivanja, u smislu identifikacije kvantitavno najzastupljenijeg jedinjenja, sa visokim antioksidativnim potencijalom. Takođe, takvo jedinjenje bilo bi predmet *in vivo* eksperimenta, u cilju određivanja njegove primene kao potencijalnog antioksidansa u prehranbenim proizvodima.

Napomena: Istraživanja u ovom radu deo su Star projekta AAP 024 koji finansira Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije.

Literatura

- Brighente I.M.C., Dias M., Verdi L.G., Pizzolatti M.G. (2007) Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharmaceutical Biology*, 45: 156–161
- Burns J., Gardner P.T., O'Neil J., Crawford S., Morecroft I., McPhail D.B., Lister C., Matthews D., MacLean M.R., Lean M.E.J., Duthie G.G., Crozier A. (2000) Relationship among Antioxidant Activity, Vasodilation Capacity, and Phenolic Content of Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 220–230
- Hettiarachchy N.S., Glenn K.C., Gnanaesbandam R., Johnson M.G. (1996) Natural antioxidant extracts from fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*) for ground beef patties. *Journal of Food Science*, 61: 516–519
- Hinneburg, I., Dorman H.J.D., R. Hiltunen (2006) Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices, *Food Chemistry*, 97: 122–129.
- Kumarasamy Y., Byres M., Cox P.J., Jaspars M., Nahar L., Sarker S.D. (2007) Screening seeds of some Scottish plants for free-radical scavenging activity. *Phytotherapy Research* 21: 615–621.
- Lin C.H., Wei Y.T., Chou C.C. (2006) Enhanced antioxidative activity of soybean koji prepared with various filamentous fungi, *Food Microbiology*, 23 (7): 628–633.
- Prieto P., Pineda M., Aguilar M., (1999) Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E1. *Analytical Biochemistry*, 269: 337–341.
41. 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. (1998) Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 2686–2693
- Sarić M. R. (ed.) (1974). *Flora Srbije*. SANU, Beograd.
- Shahidi F. (1997) *Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications*. p.4. Champaign, USA: AOCS Press
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent oxidants and antioxidants. *Methods in Enzymology*, 299: 152–178.
- Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L., Oomah B.D. (1998) Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4113–4117
- Vereš M. (1991) *Osnovi konzerviranja namirnica*. Beograd, Srbija: Naučna knjiga
- Yanishlieva N.V., Marinova E., Pokorny J. (2006) Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108: 776–793

THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THREE PLANT SPECIES OF THE *VERBASCUM* GENUS

Neda Nićiforović, V. Mihailović, M. Mladenović,
Slavica Solujić, M. Stanković¹, Dragana Ivanović²

Abstract

The aim of this study was to examine the total phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of methanol extracts of plants *Verbascum phlomoides* L., *Verbascum thapsus* L. and *Verbascum nigrum* L. of the genus *Verbascum* (Scrophulariaceae) as a potential sources of natural antioxidants/preservatives. The highest total phenolic content was found in *V. thapsus* (96.5 mg GA/g), whereas the largest amount of flavonoids was present in *V. nigrum* methanolic extract (45.6 mg RU). The highest total antioxidant capacity (445.5 mg AA/g), as well as DPPH scavenging activity ($IC_{50}=63.7 \mu\text{g/mL}$) was determined for *V. thapsus* methanolic extract.

Key words: *Verbascum*, total phenolics, flavonoids, antioxidant

¹ Faculty of Science; University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia (nneda@kg.ac.rs)

² Institute for Public Health, Kragujevac, Nikole Pašića 1, 34000 Kragujevac, Serbia