

UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
AGRONOMSKI FAKULTET U ČAČKU

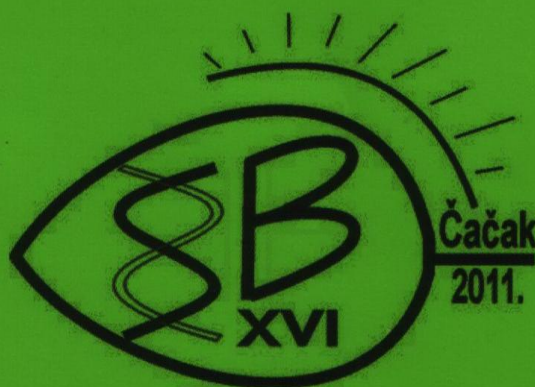


UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF AGRONOMY ČAČAK

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 Kurčubić,

Tehnički urednik:

prof. dr Nikola Bokan

Kompjuterska obrada i slog:

Dušan Marković, dipl. ing.

Tiraž: 150 primeraka

Štampa:

Štamparija „Svetlost“ Čačak

ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST, SADRŽAJ FENOLNIH JEDINJENJA I KONCENTRACIJA FLAVONOIDA U EKSTRAKTIMA BILJKE *Teucrium polium* L.

M. S. Stanković, Marina Topuzović¹,
Slavica Solujić, Neda Nićiforović, V. Mihailović²

Izvod: Antioksidativna aktivnost, koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida utvrđeni su spektrofotometrijskim metodama u ekstraktima biljke *Teucrium polium* L. Za analize je korišćeno pet različitih ekstrakata dobijenih ekstrakcijom vodom, metanolom, acetonom, etil acetatom i petrol etrom. Koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja je određena pomoću Folin-Ciocalteu reagensa i dobijene vrednosti su u opsegu od 17.99 do 124.92 mg GA/g ekstrakta. Koncentracija flavonoida u ekstraktima biljke *T. polium* je u opsegu od 6.97 do 78.82 mg RU/g ekstrakta. Antioksidativna aktivnost je određena *in vitro* pomoću DPPH reagensa. Najveću antioksidativnu aktivnost ispoljava vodeni i metanolni ekstrakt. Dobijene vrednosti pokazuju da su neki ekstrakti biljke *T. polium* veoma bogat izvor fenolnih jedinjenja sa snažnom antioksidativnom aktivnošću.

Ključne reči: *Teucrium polium* L., antioksidativna aktivnost, fenolna jedinjenja, flavonoidi;

Uvod

Teucrium polium L. (Lamiaceae) je višegodišnja biljka sa umereno razgranatim stablom visine od 10 do 40 cm i listovima koji su sedeći, ovalno-izduženi i nauzubljeni. Cvetovi bele do svetlo roze boje, organizovani su u dihazijume koji su gusto grupisani pri samom vrhu izdanka. *T. polium* naseljava krčnjačke kamenjare, suve brdske livade i šikare mediteranske i submediteranske oblasti (Diklić, 1974).

Veoma je poznata i intenzivno korišćena lekovita biljka u narodnoj medicini i farmaciji. Čajevi, tinkture i ulja se koriste kao pomoćno sredstvo u lečenju hipertenzije, dijabetesa i bolesti digestivnih organa. Farmakološki aktivne supstance *T. polium* ispoljavaju antibiotsku i antikancerogenu aktivnost.

Mnoga patološka stanja u ljudskom organizmu kao što su ateroskleroza, artritis, Alchajmerova bolest, kancer i dr. mogu biti posledica štetnog efekta slobodnih radikala. ROS i RNS kao najčešće vrste prooksidanata nastaju tokom normalnog metabolizma ili dejstvom UV zračenja i različitih polutanata (Pham-Huy i sar., 2008). Štetne posledice narušene antioksidativno-prooksidativne ravnoteže mogu biti u velikoj meri sprečene unosom antioksidativnih supstanci. Antioksidansi mogu biti sintetičkog porekla i veliki

¹ Institut za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Srbija, (mstankovic@kg.ac.rs).

² Institut za hemiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Srbija.

broj sekundarnih metabolita izolovanih iz biljaka, kao što su raznovrsna fenolna jedinjenja (Mandal i sar., 2009).

Antioksidansi poreklom iz biljaka imaju veliku prednost u odnosu na sintetske zbog svog prirodnog porekla. Korišćenje prirodnih antioksidanasa iz biljaka ne izaziva pojavu neželjenih efekata, dok je za sintetske antioksidanse utvrđen genotoksični efekat (Kahl i Kappus, 1993).

Osnovni cilj predstavljenog istraživanja je da se korišćenjem standardnih spektrofotometrijskih metoda utvrdi sadržaj fenolnih jedinjenja i koncentracija flavonoida u različitim biljnim ekstraktima vrste *T. polim.* kao i ispitivanje antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata u *in vitro* uslovima, korišćenjem standardnog model sistema.

Materijal i metode rada

Biljni materijal i priprema biljnih ekstrakata

Nadzemni delovi biljke *T. polium* prikupljeni su sa lokaliteta Suva planina u jugoistočnoj Srbiji u Avgustu mesecu 2000. godine (pozicija: 43°19'14.82" N, 22°10'21.42" E, nadmorska visina: 302.00 m, ekspozicija: Zapad, geološka podloga: krečnjak). Uzorkovani biljni materijal je osušen na temperaturi od 20 °C na tamnom promajnom mestu. Pripremljeni biljni materijal (10 g) ekstrahovan je sa 200 ml rastvarača (voda, metanol, etil-acetat, aceton, petrol etar) pomoću Soxhlet aparature. Posle 24h izvršena je filtracija filter papirom Whatman No.1, i supernatant uparen na rotacionom vakuum uparivaču.

Određivanje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja

Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja određivan je spektrofotometrijskom metodom (Singleton i sar., 1999). Uzorci za analizu pripremljeni su dodavanjem 0.5 ml metanolnog rastvora ekstrakta koncentracije 1 mg/ml, 2.5 ml 10% Folin-Ciocalteu reagensa i 2.5 ml 7.5% NaHCO₃. Uzorci su inkubirani 15 min na temperaturi od 45 °C. Apsorbanca je određivana spektrofotometrom na talasnoj dužini $\lambda_{\max} = 765$ nm. Za svaku analizu pripremljena su tri uzoka i dobijena srednja vrednost apsorbance.

Određivanje koncentracije flavonoida u biljnim ekstraktima

Sadržaj flavonoida u ispitivanim biljnim ekstraktima određivan je spektrofotometrijskom metodom (Quettier i sar., 2000). Uzorci su pripremljeni mešanjem 1 ml metanolnog rastvora ekstrakta koncentracije 1 mg/ml i 1 ml 2% rastvora AlCl₃ rastvorenog u metanolu. Uzorci su inkubirani 1 h na sobnoj temperaturi. Apsorbanca je određivana spektrofotometrom na talasnoj dužini $\lambda_{\max} = 415$ nm. Za svaku analizu pripremljena su tri uzoka i dobijena srednja vrednost apsorbance.

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata

Sposobnost neutralizacije 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala ispitana je spektrofotometrijskom metodom od autora Tekao i sar. (1994) sa modifikacijama datim od autora Kumarasamy i sar. (2007). Za svaki ekstrakt, počev od koncentracije 1 mg/ml metanolnog rastvora pripremljena je serija razblaženja u koncentracijama od 500, 250,

125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.90, 1.99, 0.97 µg/ml. Uzorci su pripremljeni mešanjem 1ml rastvora ekstrakta i 1 ml rastvora DPPH koncentracije 80 µg/ml. Uzorci su inkubirani 30 min na sobnoj temperaturi. Apsorbanca je određivana spektrofotometrom na talasnoj dužini $\lambda_{\max} = 517$ nm. Za svaku analizu pripremljena su tri uzoka i dobijena srednja vrednost apsorbance. Procenat inhibicije određen je pomoću jednacine 1.

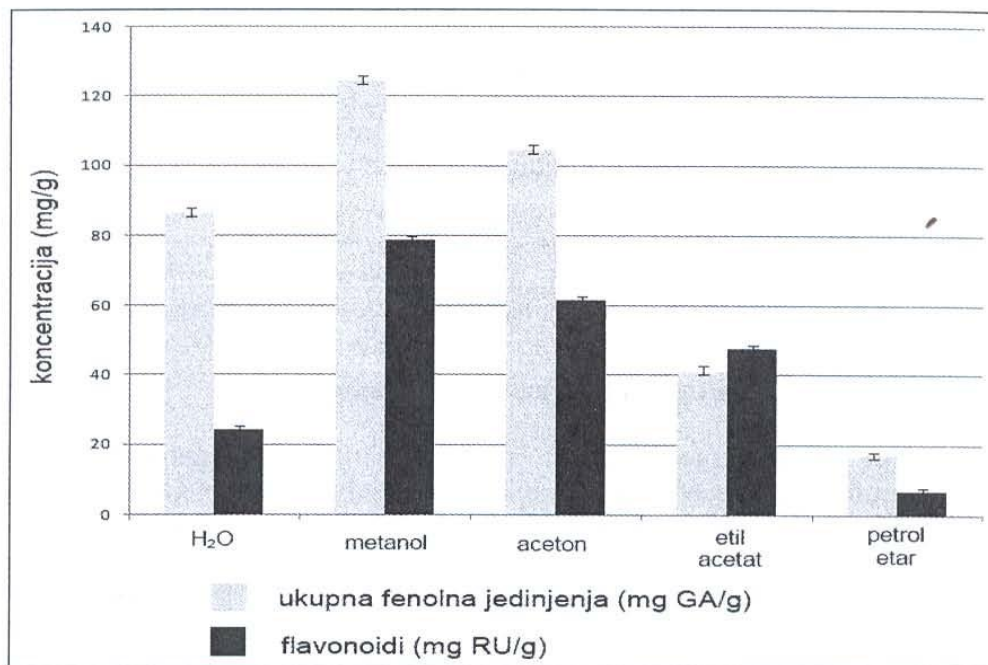
$$\% \text{ inhibicije} = \left(\frac{A \text{ kontrole} - A \text{ uzorka}}{A \text{ kontrole}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Rezultati istraživanja i diskusija

Koncentracija fenolnih jedinjenja u ispitivanim biljnim ekstraktima korišćenjem Folin-Ciocalteu reagensa izražena je kao ekvivalent galne kiseline. Dobijene vrednosti za koncentraciju ukupnih fenolnih jedinjenja predstavljene su u mg GA/g ekstrakta (Grafikon 1.). Dobijene vrednosti su u opsegu od 17.19 do 124.62 mg GA/g ekstrakta. Najveća koncentracija fenolnih jedinjenja je u metanolnom i acetonskom, dok je najmanja u petroletarskom ekstraktu.

Koncentracija flavonoida predstavljena je kao ekvivalent rutina i izražena kao mg RU/g ekstrakta (Grafikon 1). Koncentracija flavonoida u ekstraktima biljke *T. polium* je u opsegu od 6.97 do 78.82 mg RU/g ekstrakta. Najveća koncentracija flavonoida izmerena je u metanolnom dok je u acetonskom i etil-acetatnom ekstraktu utvrđena umerena koncentracija a najmanja je u vodenom i petrol etarskom ekstraktu.

Koncentracija fenolnih jedinjenja u biljnim ekstraktima vrste *T. polium* zavisi od tipa ekstrakta, odnosno, polarnosti rastvarača korišćenog za ekstrakciju. Ekstrakti dobijeni korišćenjem polarnijih rastvarača imaju veću koncentraciju fenolnih jedinjenja (Grafikon 1). Visoka rastvorljivost fenolnih jedinjenja u polarnim rastvaračima omogućava visoku koncentraciju ovih jedinjenja u ekstraktima dobijenim korišćenjem polarnih rastvarača za ekstrakciju (Zhou i Yu, 2004). Na osnovu dobijenih rezultata za koncentraciju ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida utvrđeno je da je metanol najefikasniji rastvarač za ekstrakciju ove grupe jedinjenja iz biljnog materijala vrste *T. polium*.



Graf. 1. Koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida u biljnim ekstraktima *T. polium*.

Graf. 1. Total phenolic content and flavonoid concentrations of T. polium extracts.

Antioksidativna aktivnost pet različitih ekstrakata vrste *T. polium* predstavljena je kao IC_{50} vrednosti ($\mu\text{g/ml}$) (Tabela 1). Paralelno sa ispitivanjem antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata istom metodom su dobijene vrednosti za hlorogensku kiselinu čije su vrednosti upoređene sa vrednostima za antioksidativnu aktivnost biljnih ekstrakata.

Najveću sposobnost neutralizacije DPPH radikala ispoljavaju vodeni i metanolni ekstrakt koji pri koncentraciji od 56.40, odnosno, 59.37 neutrališu 50% slobodnih radikala. Približnu aktivnost ispoljava etil-acetatni ekstrakt čija IC_{50} vrednost iznosi 63.30 $\mu\text{g/ml}$. Najmanja sposobnost inhibicije DPPH radikala evidentirana je za petrol etarski ekstrakt i IC_{50} vrednost za ovaj ekstrakt nije utvrđena. U poređenju sa IC_{50} za hlorogensku kiselinu, vodeni i metanolni ekstrakti *T. polium* ispoljavaju najjaču sposobnost neutralizacije DPPH radikala.

Tabela 1. Antioksidativna aktivnost ekstrakata predstavljena kao IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$).

Table 1. Antioxidant activity of plants extracts presented as IC_{50} values ($\mu\text{g/ml}$).

tip ekstrakta	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
voda	56.40 \pm 1.25 ¹
metanol	59.37 \pm 1.98
aceton	63.30 \pm 2.01
etil - acetat	622.96 \pm 3.18
petrol etar	>1000
hlorogenska kiselina	11.65 \pm 0.52

¹srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija

Primenom rastvarača različite polarnosti postiže se ekstrakcija antioksidativnih supstanci različite hemijske strukture. U mnogobrojnim istraživanjima kvantitativnog sastava biljnih ekstrakata utvrđeno je prisustvo visoke koncentracije fenolnih jedinjenja u ekstraktima dobijenim korišćenjem polarnih rastvarača (Čanadanović i sar., 2008). Ekstrakti koji ispoljavaju najveću antioksidativnu aktivnost (Tabela 1) sadrže najveću koncentraciju fenolnih jedinjenja.

Zaključak

Ispitivanjem različitih biljnih ekstrakata vrste *T. polium* utvrđena je visoka koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja. Vodeni i metanolni ekstrakt ispoljavaju visoku antioksidativnu aktivnost koja je vezi sa visokom koncentracijom fenolnih jedinjenja. *T. polium* predstavlja potencijalni izvor prirodnih antioksidativnih supstanci visoke vrednosti.

Napomena: Istraživanja u ovom radu deo su projekta koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (III 41010).

Literatura

- Čanadanović B.J., Četković G., Đilas S., Tumbas V., Bogdanović G., Mandić A., Markov S., Cvetković D., Čanadanović V. (2008). Radical scavenging, antibacterial and antiproliferative activities of *Melissa officinalis* L. extracts. *J. Med. Food*, 11, 133-143.
- Diklić N. (1974). In: Flore de la Republique Socialiste de Serbie VI (Josifović M, Eds.). Acad. Serb. Sci. & Arts, Belgrade (in Serbian), 349-357.
- Kahl R., Kappus H. (1993). Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. *Z. Lebensm Unters Forsch*, 196, 329-338.
- Katalinić V., Miloš M., Kulišić T., Jukić M. (2004). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem*, 94, 550-557.
- Kumarasamy Y., Byres M., Cox P.J., Jasapars M., Nahar L., Sarker S.D. (2007). Screening seeds of some Scottish plants for free-radical scavenging activity. *Phytother. Res*, 21, 615-621.
- Quettier D.C., Gressier B., Vasseur J., Dine T., Brunet C., Luyckx M.C., Cayin J.C., Bailleul F., Trotin F. (2000). Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*F. esculentum* Moench) hulls and flour. *J. Ethnopharmacol*, 72, 35-42.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela R.R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methots Enzymol*, 299, 152-178.
- Tekao T., Watanabe N., Yagi I., Sakata K. (1994). A simple screening method for antioxidant and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 1780-1783.
- Zhou K., Yu L. (2004). Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *LWT*, 37, 717-721.

**ANTIOXIDANT ACTIVITY, TOTAL PHENOLIC CONTENT
AND FLAVONOID CONCENTRATIONS
OF EXTRACTS FROM *Teucrium polium* L.**

M. S. Stanković, Marina Topuzović,
Slavica Solujić, Neda Nićiforović, V. Mihailović

Abstract -

Antioxidant activity, total phenolic content and flavonoid concentration were determined by spectrophotometric methods in *Teucrium polium* L. extracts. Water, methanolic, acetone, ethyl acetate and petroleum ether extract were analyzed. The concentration of total phenolic compounds was determined by Folin-Ciocalteu reagent and the obtained values ranged from 17.99 to 124.92 mg GA/g of extract. The concentrations of flavonoids in plant extracts of *T. polium* ranged from 6.97 to 78.82 mg RU/g of extract. Antioxidant activity was determined *in vitro* using the DPPH reagent. The highest antioxidant activity exhibited water and methanolic extract. The obtained values show that some extracts of *T. polium* are very rich source of phenolic compounds with strong antioxidant activity.

Key words: *Teucrium polium* L., antioxidant activity, phenolic compounds, flavonoids;