Utjecaj pH vrijednosti podloge na sadržaj fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost smilja (Helichrysum italicum) u uvjetima in vitro

Brkljačić, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:641279

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Martina Brkljačić

Utjecaj pH vrijednosti podloge na sadržaj fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost smilja (*Helichrysum italicum*) u uvjetima *in vitro*

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Utjecaj pH vrijednosti podloge na sadržaj fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost smilja (*Helichrysum italicum*) u uvjetima *in vitro*

Martina Brkljačić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Primorsko smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) je biljka iz porodice glavočika (*Asteraceae*). Raste u mediteranskom i submediteranskom podneblju na kamenjarima i kamenjarskim pašnjacima. U RH je na popisu zaštićenih biljnih vrsta. Još od antičkog doba poznato je po svojim antibakterijskim i antifungalnim svojstvima. U literaturi najčešće spominjani spojevi koji smilju daju ljekovita svojstva su fenolni spojevi. To su sekundarni metaboliti sa snažnom antioksidacijskom aktivnošću. Izlaganje biljke stresnim uvjetima dovodi do povećane produkcije toksičnih derivata kisika, u koje spadaju i slobodni radikali. Biljke su razvile učinkovite obrambene mehanizme koji ih štite od destruktivnih oksidativnih reakcija. U taj su mehanizam uključeni i fenolni spojevi koji sprječavaju oštećenja unutar biljnih stanica uzrokovana slobodnim radikalima i štetnim okolišnim utjecajima. Ova svojstva fenolnih spojeva primjenjuju se u medicini te kozmetičkoj i prehrambenoj industriji.
Cilj ovog istraživanja je utvrditi kako različite pH vrijednosti hranjive podloge utječu na količinu fenolnih spojeva te na antioksidacijsku aktivnost smilja uzgojenog u uvjetima *in vitro*. Za istraživanje sam koristila izdanke smilja uzgojenog u uvjetima *in vitro* na podlogama različite pH vrijednosti. U biljnom tkivu je nakon liofilizacije određena količinu antocijana, ukupnih fenola i tanina te flavonoida. Određen je i antioksidacijski kapacitet smilja.
Najveći udio ukupnih fenola, tanina i flavonoida imaju biljke uzgajane na MS podlogama pH vrijednosti 8, dok najveći udio antocijana imaju biljke uzgajane na MS podlogama pH vrijednosti 7. Najveći dio ukupnih fenola u primorskom smilju čine tanini, slijede ih flavonoidi, a antocijana ima najmanje. Najjaču antioksidacijsku aktivnost pokazuju biljke uzgajane na MS podlogama pH vrijednosti 8.

(33 stranice, 9 slika, 1 tablica, 52 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: primorsko smilje, fenolni spojevi, antioksidacijska aktivnost, *Helichrysum italicum*, vrijednost pH

Voditelj: Prof. dr. sc. Branka Pevalek-Kozlina
Neposredni voditelj: Dr. sc. Marija Babić

Ocjenitelji:

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology Graduation Thesis

Effect of medium pH value on the content of phenolic compounds and antioxidant activity of immortele (*Helichrysum italicum*) *in vitro*

Martina Brkljačić

Rooseveltovtrg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Immortelle (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) is a plant from the family of daisies (Asteraceae). It grows in the mediterranean and sub-mediterranean climate on rocky terrain and in rocky pastures. It is on the list of protected species in the Republic of Croatia. Since ancient times, it has been known for its antibacterial and antifungal properties. In literature, phenolic compounds are the most frequently cited compounds which give immortelle its medicinal properties. These are secondary metabolites with potent antioxidant activity. Exposing plants to stressful conditions results in the increased production of toxic oxygen derivatives, which include free radicals. Plants have developed effective defense mechanisms which protect them from destructive oxidative reactions. Phenolic compounds are included in this mechanisms and they prevent damage within the plant cells which are caused by free radicals and harmful environmental impacts. These properties of the phenolic compounds are applied in medicine as well as in cosmetic and food industries.
The aim of this study is to determine how the different media pH values affects the amount of phenolic compounds and the antioxidant activity of *Helichrysum italicum* grown *in vitro*. For this research I used sprouts of *Helichrysum italicum* grown *in vitro* on media with different pH values. After lyophilization, the amount of anthocyanins, total phenolics, tannins as well as flavonoids were assessed in plant tissue. The antioxidant capacity of immortelle was also determined.
Plants grown on MS media with a pH value of 8 had the highest amount of total phenols, tannins and flavonoids and plants grown on medium witha pH value of 7had the largest amountof anthocyanins . Most of the total phenols in the immortele are tannins followed by the flavonoids and a small amount of anthocyanins. The strongest antioxidant activity was shown in plants grown on MS media with a pH value of 8.

(33 pages, 9 figures, 1 table, 52 references, original: in Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: immortelle, phenolic compounds, antioxidant activity**,** *Helichrysum italicum*, pH value

Supervisor: Prof. dr. sc. Branka Pevalek-Kozlina

Assistant Supervisor: Dr. sc. Marija Babić

Reviewers:

Thesis accepted:

SADRŽAJ:

1. UVOD 1
1.1. SMILJE 1
1.2. FENOLNI SPOJEVI 3
1.2.1. Flavonoidi 3
1.2.2. Tanini 4
1.3. OKSIDACIJSKI STRES 4
1.3.1. Antioksidacijski sustav obrane 4
1.3.2. Metode određivanja antioksidacijskog potencijala 5
1.3.2.1. Metoda ABTS 5
1.3.2.2. Metoda DPPH 6
1.3.2.3. Metoda FRAP 6
1.4. UZGOJ BILJAKA U KULTURI *in vitro* 6
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 7
3. MATERIJALI I METODE 8
3.1 BILJNI MATERIJAL 8
3.1.1. Uvođenje smilja u kulturu *in vitro* 8
3.1.2. Umnožavanje smilja u uvjetima *in vitro* 10
3.2. METODE 10
3.2.1. Priprema ekstrakata biljnog tkiva 10
3.2.2. Određivanje udjela antocijana 11
3.2.3. Određivanje udjela ukupnih fenola 12
3.2.4. Određivanje udjela tanina 12
3.2.5. Određivanje udjela flavonoida 13
3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta 14
3.2.6.1. Metoda ABTS 14
3.2.6.2. Metoda DPPH 15
3.2.6.3. Metoda FRAP 15
3.2.7. Statistička obrada podataka 16
4. REZULTATI 17
4.1. Razvoj eksplantata na hranjivim podlogama 17
4.2. Udio antocijana u tkivu 19
4.3. Udio ukupnih fenola u tkivu 20
4.4. Udio tanina u tkivu 21

4.5. Udio flavonoida u tkivu 22
4.6. Antioksidacijska svojstva ekstrakata listova smilja 23
5. RASPRAVA 26
6. ZAKLJUČAK 29
7. LITERATURA 30

1. UVOD

1.1. SMILJE

Primorsko smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) (Slika 1.) je aromatični grm iz porodice glavočika (*Asteraceae*), visine 30-70 cm (Galbany-Casals i sur., 2011). Rod *Helichrysum* ima više od tisuću vrsta od kojih većina nastanjuje mediteranske prostore Europe (Morone-Fortunato i sur., 2010, Perrini i sur., 2009). Ime roda dolazi od grčkih riječi „helios“ što znači „sunce“ i „chryos“ što znači „zlato“, što označava žutu boju cvijeta tipičnu za ovaj rod (Perrini i sur., 2009). Vrsta *Helichrysum italicum* raste u mediteranskom i submediteranskom podneblju, na kamenjarima i kamenjarskim pašnjacima, a u RH je prema Pravilniku o proglašavanju divljih svojti zaštićenima i strogo zaštićenima na popisu zaštićenih biljnih vrsta (NN: 99; 14.8.2009.). Kserofitska je biljka koja se može naći na širokom rasponu nadmorskih visina, od razine mora do 2200 m (Galbany-Casals i sur., 2011; Nostro i sur., 2001; Perrini i sur., 2009), a cvjeta tijekom svibnja i lipnja (Bianchini i sur., 2009).

Slika 1. Primorsko smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don; fotografija preuzeta s internet stranice http://www.dottorperuginibilli.it/aromaterapia1/160-elicriso-helicrisum-angustifolium-h-italicum)

Ljekovita svojstva biljaka iz roda *Helichrysum* spominju se još od doba prije Krista. U djelu „Historia Plantarum“ iz 2.-3. stoljeća prije Krista grčki filozof Theophrastus spominje kako se *„Heleochrysos“* može koristiti za liječenje opeklina i uboda/ugriza otrovnih životinja (Scarborough, 1978). U tradicionalnoj uporabi cvatovi i listovi primorskog smilja koriste se za olakšavanje dišnih, kožnih i probavnih problema, za brže zacjeljivanje rana, kao antimikrobno sredstvo itd., zbog čega je ovo postala jedna od najistraživanijih vrsta roda *Helichrysum*. Za povoljno djelovanje esencijalnih ulja primorskog smilja na zacjeljivanje rana, ublažavanje hematoma i sl. Schnaubelt (1999) navodi da su „učinci toliko uvjerljivi da nikada nisu naišli na kritike unatoč izostanku potvrđenih podataka o njihovoj učinkovitosti“. Blažeković i sur. (2006) su utvrdili da su nadzemni dijelovi primorskog smilja potencijalni izvor tvari s antibakterijskim i antifungalnim svojstvima. Dokazano je da primorsko smilje nepovoljno utječe na bakterije roda *Streptococcus*. Ekstrakt smilja u dietil-eteru inhibira rast vrste *Streptococcus aureus* (Nostro i sur., 2001). Etanolni ekstrakt primorskog smilja inhibira rast bakterija *Streptococcus mutans* (Nostro i sur., 2004), bakterije odgovorne za stvaranje karijesa. Ferrazzano i sur. (2011) to djelovanje pripisuju flavonoidima. Inhibitorno djelovanje esencijalnog ulja primorskog smilja na gljivicu *Candida albicans* utvrdili su Mastelić i sur. (2005), a tu aktivnost pripisuju terpenoidnim spojevima. Appendino i sur. (2007) su otkrili da acetonski ekstrakt primorskog smilja, tj. njegov najaktivniji spoj arzinol, reducira replikaciju virusa HIV-1. Kao učinkovite antiviralne spojeve Nostro i sur. (2003) navode i flavonoide iz cvijeta smilja čiji se ekstrakt u dietil-eteru pokazao kao učinkovit protiv Herpes Simplex virusa. Svi ovi spojevi spadaju u skupinu fenolnih spojeva, što navodi na zaključak da su upravo isti zaslužni za većinu ljekovitih svojstava primorskog smilja.

1.2. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi su spojevi u kojima je hidroksidna skupina povezana s benzenskim prstenom. Ta skupina naziva se fenolna skupina i, iako veoma raznoliki po svom kemijskom sastavu, sadrže ju svi fenolni spojevi. Biljke proizvode brojne fenolne spojeve. Oni se ubrajaju u sekundarne metabolite, spojeve koji nemaju ulogu u primarnom metabolizmu, no unatoč tome njihova je uloga neobično važna za biljke jer sudjeluju u mehaničkoj potpori, obrani od herbivornih organizama, privlačenju oprašivača i rasprostranjivača plodova, redukciji rasta susjednih biljaka i dr. (Pevalek-Kozlina, 2003). U fenolne spojeve spadaju fenolne kiseline, flavonoidi, tanini i drugi spojevi. Često su smješteni u vakuoli u obliku glikozida ili estera šećera, a poznati su po svom biološkom djelovanju, između ostalog, i kao jaki antioksidansi (Kähkönen i sur., 1999).

Ovi spojevi koriste se kao konzervansi, germicidi, antiseptici i dezinficijensi (Denninston i Topping, 2008), a jako su važni i zbog svoje potencijalne uloge u prevenciji raka i bolesti srca (Rhuikar i sur., 2011). Pourmourad i sur. (2006) su ustanovili povezanost ukupnog udjela fenola i flavonoida s antioksidacijskom aktivnošću ljekovitog bilja uzgajanog u uvjetima *in vitro* što bi se moglo pokazati korisnim za buduća istraživanja vezana uz rješavanje problema koji uključuju oštećenja tkiva slobodnim radikalima.

1.2.1. Flavonoidi

Flavonoidi su najveća i najproučavanija skupina fenolnih spojeva, među kojima su flavoni, flavonoli, antocijani, katehini i izoflavoni (Jamison, 2003). Vrlo su važni za normalan rast biljke, obranu protiv infekcija i ozljeda te pigmentaciju. Ovi spojevi također pokazuju protuupalno, protualergeno i antimikrobno djelovanje (Rhuikar i sur., 2011).

Antocijani su flavonoidni pigmenti koji cvjetovima, listovima i plodovima daju crveno, ružičasto i plavo obojenje sudjelujući tako u primamljivanju životinja koje oprašuju cvjetove i rasprostranjuju sjemenke. Na boju antocijana utječe broj hidroksilnih i metoksilnih skupina na prstenu, prisutnost metala (Fe i Al), prisutnost flavona i flavonskih pigmenata te pH vrijednost vakuole (Pevalek-Kozlina, 2003).

1.2.2. Tanini

Tanini su široko rasprostranjeni fenolni polimeri u mnogim biljnim vrstama, a imaju važnu ulogu u zaštiti od herbivora. Oporog su okusa te često djeluju kao otrovi koji reduciraju rast i preživljavanje herbivora (Close i McArthur, 2002). Zajedničko svojstvo svih tanina je da vežu proteine životinjske kože (kolagene), povećavaju otpornost na toplinu, vodu i mikrobe. U biljkama nalazimo kondenzirane tanine i tanine koji se koji se mogu hidrolizirati.

1.3. OKSIDACIJSKI STRES

Izlaganje stresnim uvjetima u biljkama potiče pojačano stvaranje toksičnih derivata kisika kao što su vodikov peroksid (H_2O_2), singletni kisik ($_1O_2$), superoksidni (O_2^-) i hidroksilni (·OH) radikal. To su kemijski nestabilni spojevi koji mogu uzrokovati oštećenja stanica poput peroksidacije lipidnih membrana, oštećenja DNA, enzima i dr. (Aiyegoro i Okoh, 2009) te tako nepovoljno utjecati na rast i razvoj biljke. Nepovoljni okolišni uvjeti koji najčešće uzrokuju stres su visoke i niske temperature, nedostatak ili suvišak vode u tlu, povišeni salinitet, povišena koncentracija teških metala, promjene pH vrijednosti tla, intenzitet svjetlosti te manjak kisika u tlu. Obzirom da su biljke sesilni organizmi, one se moraju prilagoditi na promjene okolišnih uvjeta. Većina biljaka uslijed prethodnog izlaganja stresnim uvjetima može povećati otpornost na stres i aklimatizirati se na nepovoljne uvjete. Takva aklimatizacija je različita od adaptacije koja podrazumijeva genetski uvjetovanu otpornost koja je rezultat selekcije tijekom mnogo generacija (Pevalek-Kozlina, 2003).

1.3.1. Antioksidacijski sustav obrane

Budući da se reaktivni oblici kisika razlikuju po mjestu nastanka u stanici, reaktivnosti, topivosti i mogućnosti difuzije, biljci je potreban kompleksan antioksidacijski sustav obrane koji uključuje enzimske i neenzimske mehanizme (Elstner, 1982; Smirnoff, 1993). Enzimski mehanizmi obrane uključuju aktivnost antioksidacijskih enzima superoksid dismutaze, katalaze i peroksidaza. Za regeneraciju molekula antioksidansa potreban je niz enzima. Uz njih postoje i enzimi za uklanjanje štetnih produkata lipidne peroksidacije (Blokhina i sur., 2003). Neenzimski mehanizmi obuhvaćaju antioksidanse male molekulske mase kao što su askorbat, glutation, fenoli i tokoferol. Antioksidansi su tvari koje sprječavaju

oksidaciju drugih tvari, a u biološkim sustavima služe za neutralizaciju slobodnih radikala. Svi antioksidansi imaju sposobnost stabilizacije nesparenih elektrona i neutralizacije potencijalno štetnog djelovanja slobodnih radikala, a da pri tome sami ne postaju nestabilni.

1.3.2. Metode određivanja antioksidacijskog potencijala

Metode ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)), DPPH (2,2-difenil-pikrilhidrazil), FRAP (Ferric reducing ability of plasma) i ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) su najčešće korištene metode za određivanje antioksidacijskog kapaciteta u uvjetima *in vitro*. Preporučuje se kombinacija barem dvije od ovih metoda da bi se dobila pouzdana slika o antioksidacijskom kapacitetu biljke (Perez-Jimenez i sur., 2008). U ovom radu kombinirane su metode ABTS, DPPH i FRAP.

1.3.2.1. Metoda ABTS

Metoda ABTS temelji se na inaktivaciji radikal kationa 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) ili skraćeno ABTS radikal kationa, pri čemu dolazi do gubitka njegove plavo-zelene boje. Otopinu ABTS radikal kationa potrebno je kemijski ili enzimski oksidirati nekoliko sati prije analize. U ovom radu za oksidaciju otopine ABTS-a korištena je otopina kalijevog persulfata, pri čemu nastaje karakteristično plavo-zeleno obojenje s maksimumom apsorpcije na valnim duljinama od 645, 734 ili 815 nm (Re i sur., 1999).

Oksidirani radikal kation reducira se pomoću proton-donirajućeg antioksidansa, a ova metoda primjenjiva je i na lipofilne i na hidroksilne antioksidanse. Kako antioksidans reducira radikal-kation, tako dolazi do gubitka njegovog karakteristično plavo-zelenog obojenja zbog čega se smanjuje i apsorbancija na promatranoj valnoj duljini.

1.3.2.2. Metoda DPPH

Metoda DPPH je jedna od najkorištenijih metoda za određivanje antioksidacijske sposobnosti ekstrakta da reducira slobodni radikal. Temelji se na redukciji alkoholne otopine DPPH radikala (2,2-difenil-pikrilhidrazil radikal) u prisutnosti antioksidansa pri čemu dolazi do tvorbe neradikalnog oblika DPPH (DPPH-H). DPPH radikal maksimalno apsorbira valnu duljinu od 517 nm, a što je veći stupanj njegove pretvorbe u neradikalni oblik to je manja vrijednost apsorbancije (Awah i sur., 2012).

1.3.2.3. Metoda FRAP

Metoda FRAP (Ferric reducing ability of plasma) temelji se na redukciji Fe^{3+}-TPTZ reagensa u plavi Fe^{2+}-TPTZ u redoks-kolorimetrijskoj reakciji u kojoj se, pri niskim pH vrijednostima, ioni Fe^{3+} reduciraju do iona Fe^{2+} koji pokazuju maksimalnu apsorbanciju pri valnoj duljini od 539 nm (Benzie i Strain, 1999). Prema tome, za razliku od ostale dvije metode, viši antioksidacijski potencijal ekstrakta rezultira povećanjem vrijednosti apsorbancije.

1.4. UZGOJ BILJAKA U KULTURI *in vitro*

Uzgoj biljaka u kulturi *in vitro* je metoda kojom se u sterilnim uvjetima mogu uzgojiti biljke iz različitih biljnih dijelova: protoplasta, pojedinih stanica, tkiva ili organa. Takav uzgoj u određenim uvjetima može rezultirati umnažanjem stanica, regeneracijom pojedinih organa ili čitave biljke. Koristi se za povećanje biljne biomase, dobivanje složenih biljnih proizvoda sekundarnih metabolita (mirisi, boje, lijekovi i dr.) te očuvanje ugroženih rijetkih biljnih vrsta i biljnog genofonda (Moyo i sur, 2011).

Postoji mnogo različitih tipova kulture *in vitro* koje se imenuju prema organu ili tkivu koje se uvodi u kulturu, npr. kultura stanica, kultura sjemena, kultura protoplasta, kultura kalusa, kultura izdanaka itd. U ovom radu korištena je kultura izdanaka.

U zadnjih nekoliko godina berba smilja postala je izrazito popularna, a unatoč restrikcijskim mjerama, raste broj ilegalnih berača što bi moglo dovesti do smanjenja populacije, možda čak i nestanka ove biljke na našim prostorima. Upravo bi uzgoj *in vitro* za potrebe destilerija koje otkupljuju ilegalno ubrano smilje mogao biti rješenje ovog problema.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovih istraživanja bio je utvrditi pri kojim pH vrijednostima hranjive podloge smilje u uvjetima *in vitro* ima najviši udio fenolnih spojeva te pokazuje najsnažniju antioksidacijsku aktivnost. S obzirom na činjenicu da je smilje na popisu zaštićenih biljnih vrsta u RH te da se uvelike koristi u pripremi dodataka prehrani, lijekova i kozmetičkih proizvoda ova istraživanja mogu doprinijeti njegovom očuvanju.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 BILJNI MATERIJAL

Istraživanje sam provela na smilju (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don). Smilje iz komercijalnog uzgoja uvela sam u kulturu *in vitro*.

3.1.1. Uvođenje smilja u kulturu *in vitro*

Vrhove izdanaka smilja iz komercijalnog uzgoja odrezala sam na veličinu od oko 3 cm. Tako pripremljene eksplantate sterilizirala sam u laminaru (komori s horizontalnim strujanjem sterilnog zraka) prema sljedećoj proceduri:

5 min inkubacija u otopini Izosana (2 % w/v)

5 min ispiranje u sterilnoj destiliranoj vodi

5 min inkubacija u otopini vodikova peroksida (6 % v/v)

3 x 5 min ispiranje u sterilnoj destiliranoj vodi

Sterilizirane eksplantate posušila sam na sterilnom filtar papiru i nakon sušenja nasadila na hranjivu podlogu MS (Murashige i Skoog, 1962; Tablica 1), uz dodatak 30 g dm^{-3} saharoze. pH vrijednost hranjive podloge podesila sam na 5,8 uz dodatak 0,1 M KOH ili 0,1 M HCl. Nakon dodatka agara (γ = 8 g dm^{-3}) hranjivu podlogu sam raspodijelila u staklene epruvete (20 mL/epruveta), začepila vatom i aluminijskom folijom. Epruvete s hranjivom podlogom te metalni pribor (pincete, skalpeli, aluminijske folije) potreban za rad sterilizirala sam u autoklavu pri 0,15 MPa i 120 °C, u trajanju od 18 minuta. Kuhanje i sterilizaciju hranjivih podloga izvodila sam najmanje jedan dan prije presađivanja biljaka da bi se hranjive podloge ohladile na sobnu temperaturu. Sterilizirane hranjive podloge sam do uporabe čuvala u sterilnoj komori. Biljke su rasle u klima komori u uvjetima dugog dana (16 sati svjetlosti, 8 sati tame) pod umjetnom rasvjetom fluorescentnih svjetiljki (80 µE s^{-1} m^{-2}; 80 µmol fotona m^{-2} s^{-1}) i konstantnoj temperaturi 24 ± 2 °C.

Tablica 1. Sastav hranjive podloge MS (Murashige i Skoog, 1962).

	MS	
MAKROELEMENTI	**γ** (mg dm^{-3})	**c** (mmol dm^{-3})
KNO_3	1900	18,80
NH_4NO_3	1650	20,60
$CaCl_2$ x 2 H_2O	440	2,99
KH_2PO_4	170	1,25
$MgSO_4$ x 7 H_2O	370	1,50
MIKROELEMENTI	**γ** (mg dm^{-3})	**c** (mmol dm^{-3})
H_3BO_3	6,2	100,0
$CoCl_2$ x 6 H_2O	0,025	0,1
KI	0,83	5,0
Na_2MoO_4 x 2 H_2O	0,25	1,0
$CuSO_4$ x 5 H_2O	0,025	0,1
$MnSO_4$ x 4 H_2O	22,3	100,0
$ZnSO_4$ x 7 H_2O	8,6	29,9
ŽELJEZO	**γ** (mg dm^{-3})	**c** (mmol dm^{-3})
$FeSO_4$ x 7 H_2O	27,8	100,0
Na_2EDTA	37,3	100,0
ORGANSKI DODACI	**γ** (mg dm^{-3})	**c** (mmol dm^{-3})
glicin	2,0	26,6
m-inozitol	100,0	500,0
nikotinskakiselina	0,5	4,1
piridoksin·HCl	0,5	2,4
tiamin·HCl	0,1	0,3

3.1.2. Umnožavanje smilja u uvjetima *in vitro*

Prethodno razmnožene eksplantate smilja nasadila sam na hranjivu podlogu MS bez dodatka regulatora rasta ili uz dodatak različitih koncentracija regulatora rasta benzil aminopurina (BA) i indol-3-maslačne kiseline (IBA):

1. Kontrola (hranjiva podloga MS + 0)
2. MS + 1 mg dm^{-3} BA
3. MS + 1 mg dm^{-3} BA + 0,2 mg dm^{-3} IBA
4. MS + 1 mg dm^{-3} BA + 0,5 mg dm^{-3} IBA

Već u prvoj supkulturi najbolja se pokazala podloga MS s 1 mg dm^{-3} BA i 0,5 mg dm^{-3} IBA, pošto su biljke koje su rasle na toj podlozi imale veći broj listova i zdraviji izgled. Daljnje umnožavanje nastavila sam na toj podlozi. Presađivanje biljaka na hranjivu podlogu izvodila sam u laminaru, a u svaku epruvetu sa svježom hranjivom podlogom nasađivala sam po jedan zdravi i veličinom ujednačen izdanak. Dovoljan broj izdanaka za izvođenje pokusa dobiven je nakon još dvije supkulture.

Izdanke za pokus nasađivala sam na hranjive podloge istog sastava (MS + 1 mg dm^{-3} BA + 0,5 mg dm^{-3} IBA), ali različitih pH vrijednosti. pH vrijednosti prilagodila sam dodatkom 0,1 M HCl ili 0,1 M KOH na 4, 5, 6, 7, 8 i 9. Nakon 4 tjedna uzgoja uzorkovala sam biljni materijal te ga liofilizirala.

.

3.2. METODE

3.2.1. Priprema ekstrakata biljnog tkiva

Biljni materijal sam liofilizirala u etanolu kako bi se očuvao kemijski sastav i intaktnost biljnog materijala tijekom cijelog pokusa. Takav liofilizirani materijal koristila sam za daljnja istraživanja.

U klimatiziranoj prostoriji u prethodno ohlađenom porculanskom tarioniku homogenizirala sam 20 mg liofiliziranog biljnog tkiva u 750 µL ohlađenog 50 %-tnog etanola. Dobiveni homogenat prelila sam u označenu i ohlađenu Eppendorf epruvetu od 1,5 mL (na ledu). Tada sam u tarionik dodala još 750 µL 50 %-tnog etanola radi ispiranja ostatka homogenata te ostatak nadolila u istu Eppendorf epruvetu i ostavila da se inkubira na sobnoj temperaturi 30 minuta. Dobiveni uzorak sam centrifugirala 10 min na 12000 *g* pri temperaturi

od 4 °C. Supernatant sam prelila u čiste graduirane Eppendorf epruvete te nadopunila 50 %-tnim etanolom do oznake 1,5 mL. Ovako dobivene uzorke koristila sam za određivanje ukupnih fenola, tanina, flavonoida i antocijana te antioksidacijskog kapaciteta smilja.

3.2.2. Određivanje udjela antocijana

Količinu antocijana odredila sam prilagođenom metodom prema Paiva i sur. (2003). U Eppendorf epruvetu otpipetirala sam 500 µL ekstrakta, 500 µL 50 %-tnog etanola i 84 µL 37 %-tne HCl (konačna koncentracija HCl-a u smjesi je 1 M) te priređenu smjesu inkubirala 30 minuta u termobloku na 60 °C. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu smjesu sam ulila u kivete i izmjerila apsorbanciju smjese pri 537 nm pomoću UV/VIS spektrofotometra. Prilikom pripreme smjese za slijepu probu umjesto ekstrakta dodala sam 500 µL 50 %-tnog etanola.

Sadržaj antocijana izrazila sam kao mg ekvivalenata cijanidin-3-glukozida po gramu liofiliziranog uzorka, a izračunala sam ga prema sljedećem izrazu:

$$[\text{antocijani}] = \frac{A_{537} \times \text{F.R.} \times Mr \times V \times 1000}{\varepsilon \times l \times m_{ST}} \; [\text{mg}_{EC3G} / \text{g}_{ST}]$$

A_{537} = apsorbancija pri valnoj duljini 537 nm

V = volumen reakcijske smjese = 1 ml

F.R. = faktor razrjeđenja = 2

ε = ekstincijski koeficijent cijanidin-3-glukozida (C3G) = 26900 mM^{-1} cm^{-1}

Mr = molekulska masa cijanidin-3-glukozida (C3G) = 449,2 g mol^{-1}

duljina optičkog puta = 1 cm

m_{ST} = masa suhe tvari uzorka = 0,02 g

EC3G = ekvivalenti cijanidin-3-glukozida

3.2.3. Određivanje udjela ukupnih fenola

Udio ukupnih fenola odredila sam metodom prema Singleton-u i sur. (1999). U Eppendorf epruvetu otpipetirala sam 1580 µL vode, 20 µL ekstrakta i 100 µL *Folin–Ciocalteu* reagensa. Nakon kratkog miješanja na vorteks miješalici u dobivenu smjesu sam dodala 300 µL 1,88 M Na_2CO_3. Uzorke sam promiješala na miješalici te inkubirala 60 min u termobloku na temperaturi od 45 °C. U tom su periodu uzorci poprimili plavu boju. Uzorke sam prelila u kivete i izmjerila apsorbanciju na 765 nm. U smjesu za slijepu probu sam umjesto ekstrakta dodala sam 20 µL 50 %-tnog etanola.

Udio ukupnih fenola sam odredila koristeći baždarnu krivulju s poznatim koncentracijama galne kiseline (Singleton i sur., 1999) prema sljedećoj formuli:

$$[\text{ukupni fenoli}] = \frac{A_{735} \times F.R. \times V}{\varepsilon \times l \times m_{ST}} \; [mg_{EGK}/g_{ST}]$$

A_{735} = apsorbancija pri valnoj duljini 735 nm

V = volumen reakcijske smjese = 2 ml

F.R. = faktor razrjeđenja = 1

ε = 1,1656 $mM^{-1}\,cm^{-1}$

l = duljina optičkog puta = 1 cm

m_{ST} = masa suhe tvari uzorka = 0,02 g

EKE = ekvivalenti galne kiselline

3.2.4. Određivanje udjela tanina

Udio tanina odredila sam modificiranom metodom po Singleton-u i sur. (1999) uz dodatak 10 mg polivinilpolipirolidona (PVPP). Odvagala sam 10 mg PVPP i stavila ga u Eppendorf epruvetu, dodala 100 µL vode i 100 µL ekstrakta te kratko promiješala na vorteks

miješalici kako bi se PVPP otopio. Smjesu sam inkubirala 1 sat pri sobnoj temperaturi (24 °C) te zatim centrifugirala na 15 000 *g* u trajanju od 10 min. Dobiveni supernatant prelila sam u čiste Eppendorf epruvete.

U novu Eppendorf epruvetu otpipetirala sam 1580 µL vode, dodala 60 µL ekstrakta iz prethodnog koraka (ekstrakt bez tanina) i 100 µL *Folin–Ciocalteu* reagensa. Nakon kratkog miješanja na miješalici u dobivenu smjesu sam dodala 300 µL 1,88 M Na_2CO_3. Uzorke sam promiješala na miješalici te inkubirala 60 min u termobloku na temperaturi od 45 °C. U tom su periodu uzorci poprimili plavu boju. Prelila sam ih u kivete i izmjerila apsorbanciju na 765 nm. U smjesu za slijepu probu sam umjesto ekstrakta dodala 60 µL 50 %-tnog etanola.

Iz ovog mjerenja sam odredila udio slobodnih fenola (većinom fenolnih kiselina) bez tanina. Udio tanina sam odredila tako što sam od udjela ukupnih fenola oduzela udio slobodnih fenola.

3.2.5. Određivanje udjela flavonoida

Sadržaj flavonoida odredila sam metodom po Pourmorad i sur. (2006). U Eppendorf epruvetu dodala sam 100 µL ekstrakta, 20 µL 10 %-tne otopine $AlCl_3$, 500 µL 1 M K-acetata i 380 µL vode. Nakon miješanja na vorteks miješalici i 30 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi u uzorcima sam izmjerila apsorbanciju pri valnoj duljini od 420 nm. U smjesu za slijepu probu sam umjesto ekstrakta dodala 100 µL 50 %-tnog etanola.

Koncentraciju flavonoida u svakom uzorku izračunala sam na temelju baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije niza otopina kvercetina poznatih koncentracija. Rezultate sam izrazila u mg/g_{ST}

$$[\text{flavonoidi}] = \frac{A_{420} \times F.R. \times V}{\varepsilon \times l \times m_{ST}} \left[mg_{EK} / g_{ST} \right]$$

A_{420} = apsorbancija pri valnoj duljini 420 nm

V = volumen reakcijske smjese = 1 ml

F.R. = faktor razrjeđenja = 1

$\varepsilon = 7{,}0979\ mM^{-1}\ cm^{-1}$

l = duljina optičkog puta = 1 cm

m_{ST} = masa suhe tvari uzorka = 0,02 g

EK = ekvivalenti kvercetina

3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta koristila sam metode ABTS, DPPH i FRAP.

3.2.6.1. Metoda ABTS

Metoda ABTS temelji se na „gašenju“ ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) radikal-kationa prema Re i sur. (1999).

U Eppendorf epruvetu otpipetirala sam 5 µL ekstrakta i 1 mL ABTS radikal-kationa te nakon 6 minuta smjesu ulila u kivetu i pomoću UV/VIS spektrofotometra izmjerila apsorbanciju pri valnoj duljini od 734 nm. Prilikom pripreme smjese za slijepu probu umjesto ekstrakta dodala sam 5 µL 50 %-tnog etanola, a umjesto ABTS radikal-kationa 1 mL 96 %-tnog etanola. U kontrolnu Eppendorf epruvetu (A_0) otpipetirala sam 1 mL ABTS radikal-kationa i 5 µL 50 %-tnog etanola.

Postotak inhibicije ABTS radikala izračunala sam prema formuli (Shirwaikar i sur., 2006):

$$\%\,\text{inhibicije} = \frac{(A_0 - A_x)}{A_0} \times 100$$

A_0 = apsorbancija kontrole (ABTS radikal bez ekstrakta)

A_x = apsorbancija uzorka (ABTS radikal + ekstrakt)

3.2.6.2. Metoda DPPH

Metoda DPPH temelji se na redukciji alkoholne otopine DPPH radikala (2,2-difenil-pikrilhidrazil radikal) u prisutnosti antioksidansa ili radikala pri čemu dolazi do tvorbe neradikalnog oblika DPPH (DPPH-H) (Awah i sur., 2012).

U Eppendorf epruvetu otpipetirala sam 950 μL otopine DPPH u etanolu i 50 μL ekstrakta. Nakon miješanja na vorteks miješalici, smjesu sam inkubirala 30 min na sobnoj temperaturi, potom prelila u kivetu i pomoću UV/VIS spektrofotometra izmjerila apsorbanciju pri valnoj duljini od 734 nm. Prilikom pripreme smjese za slijepu probu umjesto ekstrakta dodala sam 50 μL 50 %-tnog etanola, a umjesto otopine DPPH 950 μL 96 %-tnog etanola. U kontrolnu Eppendorf epruvetu (pozitivna kontrola) otpipetirala sam 950 μL 0,1 mM otopine DPPH u etanolu i 50 μL 50 %-tnog etanola.

Postotak inhibicije DPPH radikala izračunala sam prema formuli:

$$\%\,\text{inhibicije} = \frac{(A_0 - A_x)}{A_0} \times 100$$

A_0 = apsorbancija kontrole (DPPH radikal bez ekstrakta)

A_x = apsorbancija uzorka (DPPH radikal + ekstrakt)

3.2.6.3. Metoda FRAP

Metoda FRAP temelji se na redukciji Fe^{3+}-TPTZ reagensa u plavi Fe^{2+}-TPTZ u redoks-kolorimetrijskoj reakciji (Benzie i Strain, 1999).

Svježe pripremljeni FRAP reagens inkubirala sam 30 min na temperaturi od 37 °C te potom u Eppendorf epruvetu otpipetirala 990 μL FRAP reagensa i 10 μL ekstrakta. Zatim sam smjesu ulila u kivetu i pomoću UV/VIS spektrofotometra izmjerila apsorbanciju pri valnoj duljini od 593 nm. Prilikom pripreme smjese za slijepu probu umjesto ekstrakta dodala sam 10 μL 50 %-tnog etanola, a umjesto FRAP reagensa 990 μL 96 %-tnog etanola. U kontrolnu Eppendorf epruvetu otpipetirala sam 990 μL FRAP reagensa i 10 μL 50 %-tnog etanola.

Postotak redukcije Fe^{3+}-TPTZ reagensa izračunala sam prema formuli:

$$\%\,\text{inhibicije} = \frac{(A_x - A_0)}{A_x} \times 100$$

A_0 = apsorbancija kontrole (Fe^{3+}-TPTZ radikal bez ekstrakta)

A_x = apsorbancija uzorka (Fe^{3+}-TPTZ radikal + ekstrakt)

3.2.7. Statistička obrada podataka

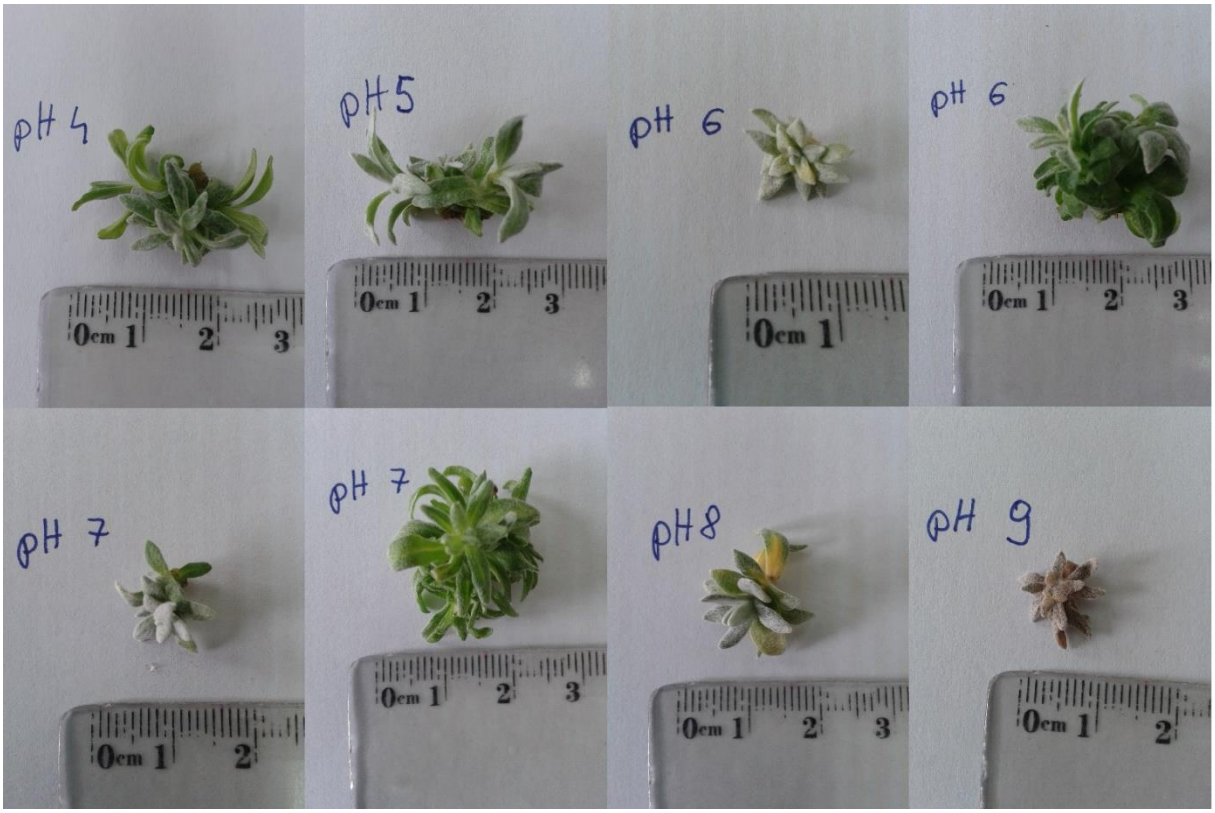
Pri obradi podataka koristila sam računalni program Microsoft Excel 2007. Usporedba dobivenih rezultata provedena je analizom varijance (one-way ANOVA) te Tuckey HSD testom pomoću računalnog programa STATISTICA 12 (StatSoftInc., SAD). Statistički značajnim podacima smatrala sam one rezultate koji se razlikuju na razini $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. RAZVOJ EKSPLANTATA NA HRANJIVIM PODLOGAMA

Na eksplantatima smilja uzgojenim na hranjivoj podlozi MS bez regulatora rasta razvili su se svi vegetativni organi: korijen, stabljika i listovi (bez nastanka kalusnog tkiva). Na hranjivoj podlozi s dodatkom regulatora rasta se na bazi izdanaka redovito razvijalo kalusno tkivo. Od 4 kombinacije koncentracija regulatora rasta najbolja diferencijacija u vegetativne organe dobivena je na hranjivoj podlozi MS uz dodatak BA 1 mg dm^{-3} i IBA 0,5 mg dm^{-3}, uz najmanju količinu kalusnog tkiva na bazi izdanaka. Obzirom da su izdanci na toj podlozi bili najzdraviji te imali veći broj listova koristila sam ju u daljnjim istraživanjima.

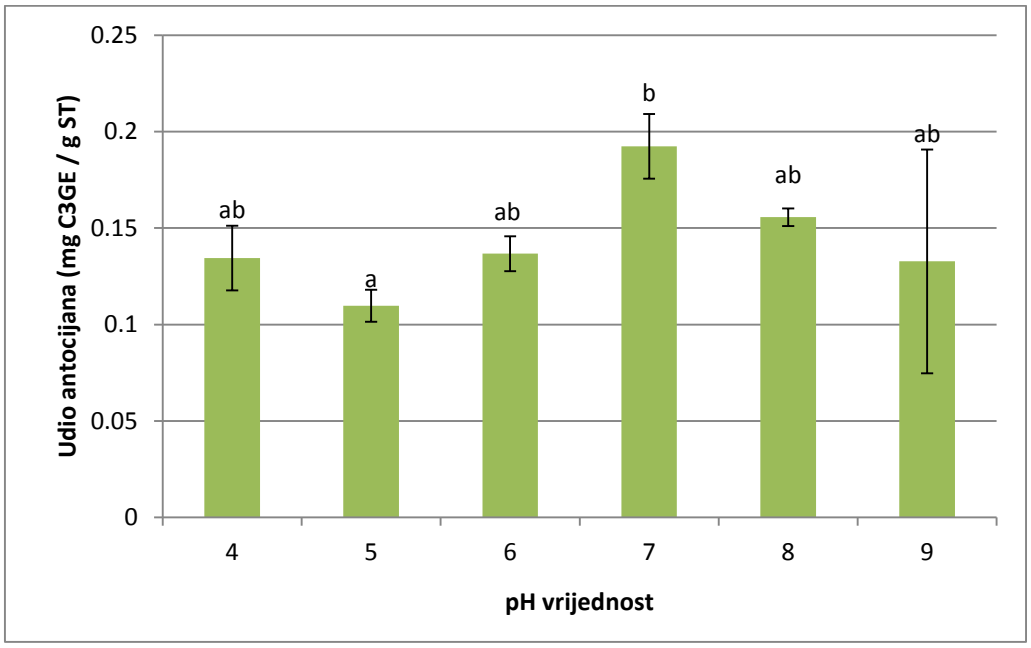
Tijekom dvije supkulture biljke su presađivane na hranjivu podlogu istog osnovnog sastava (MS + 1 mg dm^{-3} BA + 0,5 mg dm^{-3} IBA), ali s različitim pH vrijednostima (4, 5, 6, 7, 8, 9). Izdanci su najbolje rasli na podlogama kojima je pH vrijednosti bila podešena na 4 i 5, a sličan izgled imala je i polovica izdanaka koje su rasle na podlogama pH vrijednosti 6 i 7. Ostali izdanci koji su rasli na podlogama pH vrijednosti 6 i 7 bili su manji i bljeđe boje koja je mjestimično prelazila u žutu, slično kao i jedinke koje su rasle na podlozi pH vrijednosti 8. Izdanci koji su nasađeni na podlogu pH vrijednosti 9 vrlo su slabo rasle, a tkivo je pokazivalo znakove nekroze smeđe boje (Slika 2).



Slika 2. Izdanci smilja nakon 4 tjedna uzgoja na hranjivim podlogama MS + 1 mg dm^{-3} BA + 0,5 mg dm^{-3} IBA različitih pH vrijednosti.

4.2. UDIO ANTOCIJANA U TKIVU

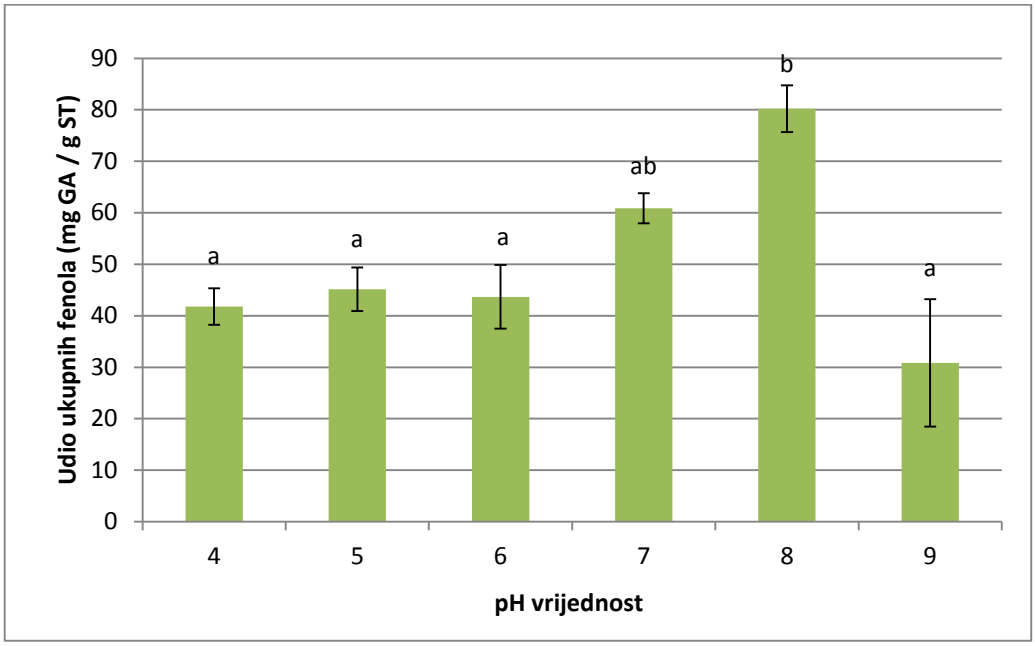
U listovima smilja uzgojenog na hranjivoj podlozi MS + 1 mg dm^{-3} BA + 0,5 mg dm^{-3} IBA pH vrijednosti 7 uočen je najveći udio antocijana, iako se ta vrijednost statistički značajno ne razlikuje od vrijednosti izmjerenih u listovima biljaka uzgojenih pri drugim istraživanim pH vrijednostima. Statistički značajno se razlikuju samo vrijednosti izmjerene u listovima biljaka uzgojenih pri pH vrijednostima 5 i 7 (Slika 3).



Slika 3. Udio antocijana u biljkama nakon 4 tjedna uzgoja na hranjivim podlogama MS + 1 mg dm^{-3} BA + 0,5 mg dm^{-3} IBA različitih pH vrijednosti. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 7 replika ± standardna pogreška, osim u slučaju pH 9 gdje su bile samo 2 replike. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$).

4.3. UDIO UKUPNIH FENOLA U SMILJU

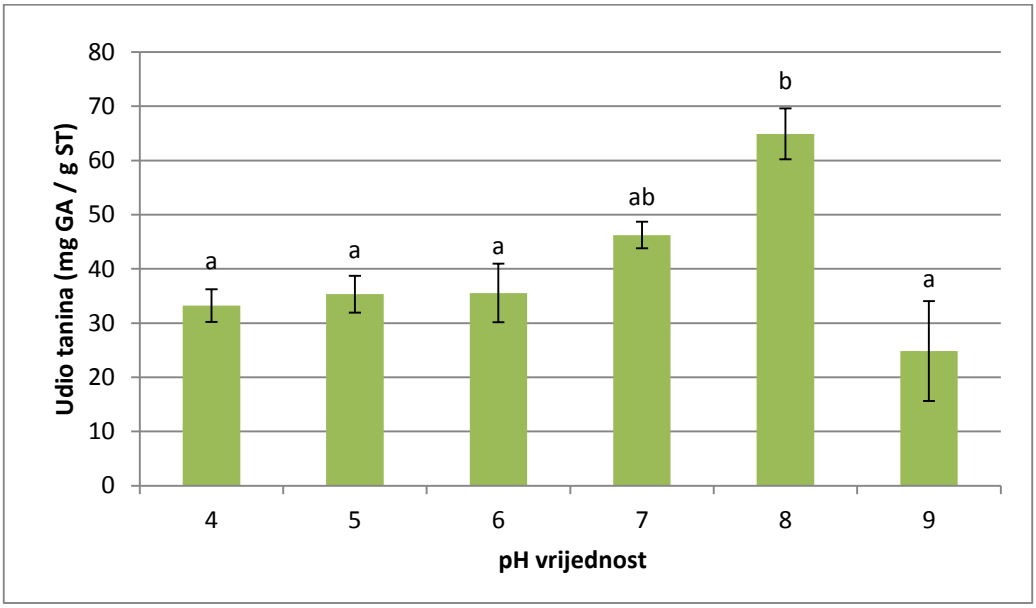
U listovima smilja uzgojenog na hranjivoj podlozi MS + 1 mg dm^{-3} BA + 0,5 mg dm^{-3} IBA pH vrijednosti 8 uočen je najveći udio ukupnih fenola, a ta vrijednost se statistički značajno razlikuje od vrijednosti udjela ukupnih fenola u biljkama uzgajanim na pH vrijednostima 4, 5, 6 i 9 (Slika 4).



Slika 4. Udio ukupnih fenola u biljkama nakon 4 tjedna uzgoja na hranjivim podlogama MS + 1 mg dm^{-3} BA + 0,5 mg dm^{-3} IBA različitih pH vrijednosti. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 6 replika ± standardna pogreška, osim u slučaju pH 9 gdje su bile samo 2 replike. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$).

4.4. Udio tanina u tkivu

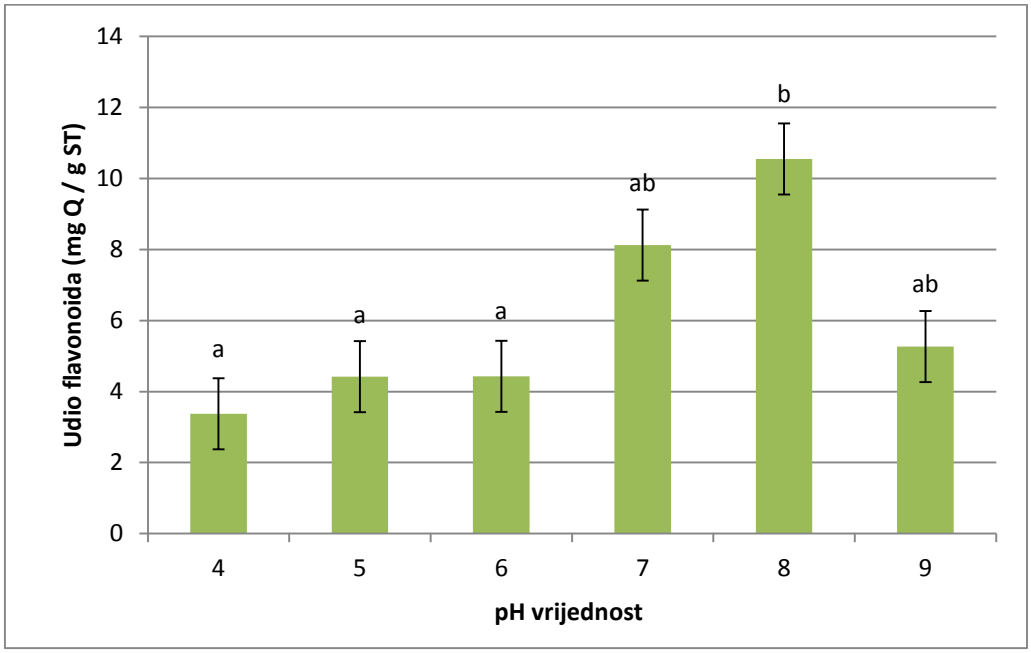
U listovima smilja uzgojenog na hranjivoj podlozi MS + 1 mg dm^{-3} BA + 0,5 mg dm^{-3} IBA pH vrijednosti 8 uočen je najveći udio tanina, a ta vrijednost se statistički značajno razlikuje od vrijednosti udjela tanina u biljkama uzgajanim na pH vrijednostima 4, 5, 6 i 9 (Slika 5).



Slika 5. Udio tanina u biljkama nakon 4 tjedna uzgoja hranjivim podlogama MS + 1 mg dm^{-3} BA + 0,5 mg dm^{-3} IBA različitih pH vrijednosti. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 6 replika ± standardna pogreška, osim u slučaju pH 9 gdje su bile samo 2 replike. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$).

4.5. UDIO FLAVONOIDA U TKIVU

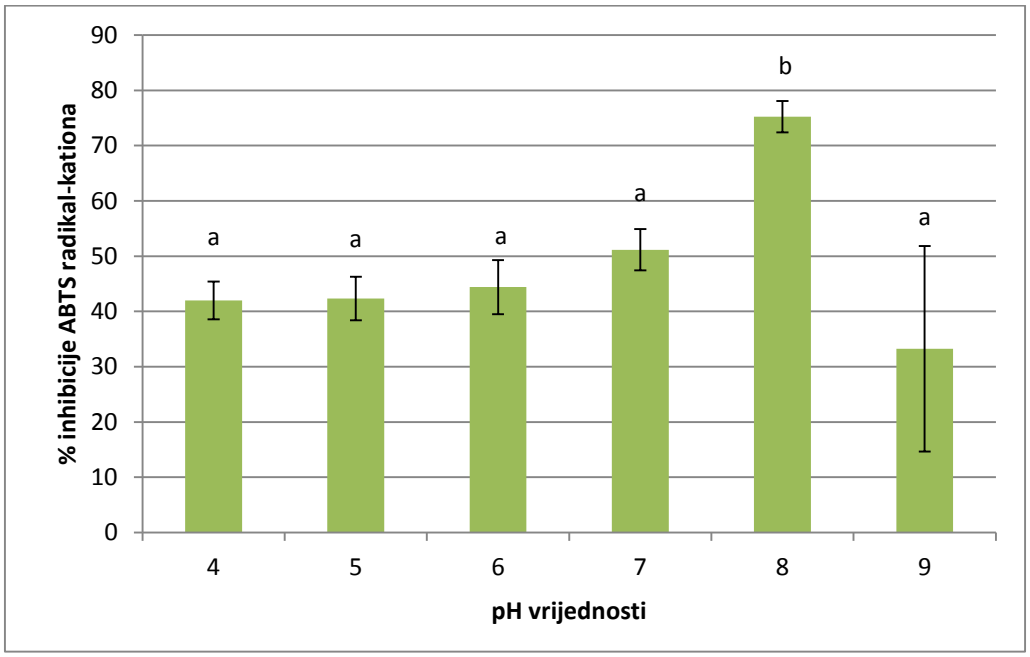
U listovima smilja uzgojenog na hranjivoj podlozi MS + 1 mg dm^{-3} BA + 0,5 mg dm^{-3} IBA pH vrijednosti 8 uočen je najveći udio flavonoida, a ta vrijednost se statistički značajno razlikuje od vrijednosti udjela antocijana u biljkama uzgajanim na pH vrijednostima 4, 5 i 6 (Slika 6).



Slika 6. Udio flavonoida u biljkama nakon 4 tjedna uzgoja hranjivim podlogama MS + 1 mg dm^{-3} BA + 0,5 mg dm^{-3} IBA različitih pH vrijednosti. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 5 replika ± standardna pogreška, osim u slučaju pH 9 gdje su bile samo 2 replike. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$).

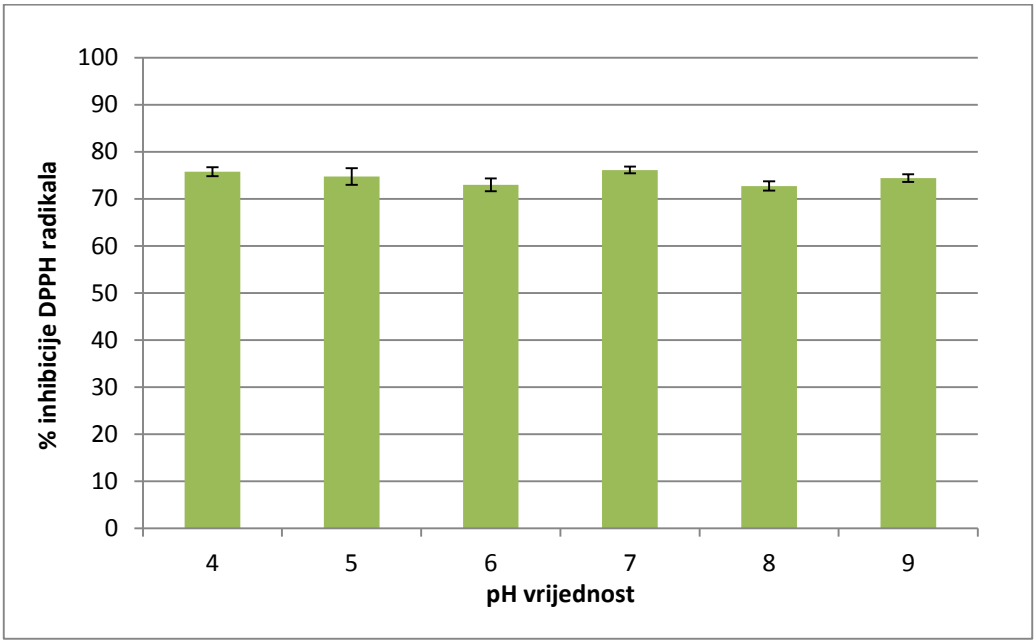
4.6. ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA EKSTRAKATA LISTOVA SMILJA

Metodom ABTS utvrđen je najviši antioksidacijski potencijal ekstrakata listova biljaka uzgojenih na hranjivoj podlozi MS + 1 mg dm^{-3} BA + 0,5 mg dm^{-3} IBA pH vrijednosti 8 koji se statistički značajno razlikuje od ostalih tretmana (Slika 7).



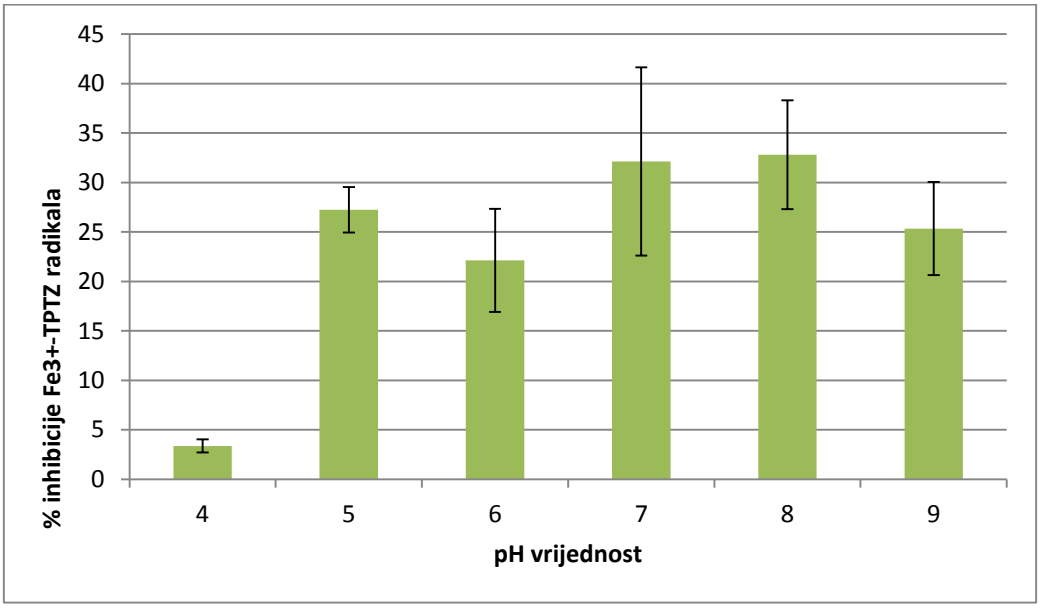
Slika 7. Postotak inhibicije ABTS radikal-kationa u biljkama nakon 4 tjedna uzgoja na hranjivim podlogama MS + 1 mg dm^{-3} BA + 0,5 mg dm^{-3} IBA različitih pH vrijednosti. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 5 replika ± standardna pogreška, osim u slučaju pH 9 gdje su bile samo 2 replike. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$).

Metodom DPPH ustanovljeno je da se antioksidacijski potencijal ekstrakata listova biljaka uzgojenih na hranjivoj podlozi MS + 1 mg dm^{-3} BA + 0,5 mg dm^{-3} IBA kreće oko 75 % i ne postoji statistički značajna razlika antioksidacijske aktivnosti u odnosu na promjenu pH vrijednosti podloge (Slika 8).



Slika 8. Postotak inhibicije DPPH u biljkama nakon 4 tjedna uzgoja na hranjivim podlogama MS + 1 mg dm^{-3} BA + 0,5 mg dm^{-3} IBA različitih pH vrijednosti. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 5 replika ± standardna pogreška, osim u slučaju pH 9 gdje su bile samo 2 replike. Nema statistički značajnih razlika ($P \leq 0,05$).

Metodom FRAP utvrđen je najviši antioksidacijski potencijal ekstrakata listova biljaka uzgojenih na hranjivim podlogama MS + 1 mg dm^{-3} BA + 0,5 mg dm^{-3} IBA pH vrijednosti 7 i 8, ali ne postoji statistički značajna razlika antioksidacijske aktivnosti u odnosu na podloge ostalih istraženih pH vrijednosti (Slika 9).



Slika 9. Postotak inhibicije Fe^{3+}-TPTZ radikala u biljkama nakon 4 tjedna uzgoja hranjivim podlogama MS + 1 mg dm^{-3} BA + 0,5 mg dm^{-3} IBA različitih pH vrijednosti. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost od najmanje 5 replika ± standardna pogreška, osim u slučaju pH 9 gdje su bile samo 2 replike. Nema statistički značajnih razlika ($P \leq 0,05$).

5. RASPRAVA

Spoznaja da kemijski sastav esencijalnog ulja podvrste *Helicrysum italicum* subs. *italicum* ovisi o svojstvima tla na kojem su biljke uzgajane (Bianchini i sur., 2009) potaknula me na istraživanje ovisnosti sadržaja fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti smilja uzgajanog na hranjivoj podlozi MS s različitim pH vrijednostima.

U mojim pokusima najbolji izgled imali su eksplantati koji su rasli na MS podlogama pH vrijednosti 4 i 5, što je i za očekivati jer je ova biljka indikator kiselih tala (http://hirc.botanic.hr/fcd/DetaljiFrame.aspx?IdVrste=12377&taxon=Helichrysum+italicum+(Roth)+G.Don). Ipak, analiza etanolnih ekstrakata primorskog smilja pokazala je da najveći udio fenolnih spojeva i antioksidacijska svojstva pokazuju biljke uzgajane na MS podlogama pH vrijednosti 8. S obzirom na pH vrijednost prirodnog staništa primorskog smilja, rast u uvjetima viših pH vrijednosti ovoj biljci predstavlja stres, što je rezultiralo pojačanom proizvodnjom fenolnih spojeva. Fenolni spojevi su raznovrsni sekundarni metaboliti koji uključuju mnogobrojne skupine kemijskih spojeva poput flavonoida i tanina, a biološku aktivnost pokazuju kroz različite mehanizme. Rosa i sur. (2007) navode kako su za antioksidacijska svojstva smilja zaslužni acetofenoni, floroglucinoli i pironi, među kojima su i dokazali antioksidacijsku aktivnost arzinola, metilarzinola, helipirona i rosifoliola. Ovo istraživanje pokazuje najveći udio ukupnih fenola po gramu suhe tvari u jedinkama koje su uzgajane na MS podlogama pH vrijednosti 8, što se statistički značajno razlikuje od podataka dobivenih za tretmane 4, 5, 6 i 9, a ukoliko usporedimo brojčane podatke sa slike 4 i slike 5 vidi se da oko 80 % ukupnih fenola čine tanini. Rezultati za udio tanina po gramu suhe tvari prate isti trend, tj. udio tanina također je najviši u jedinkama koje su uzgajane na MS podlogama pH vrijednosti 8 te se ta vrijednost statistički značajno razlikuje od onih za jedinke uzgajane na podlogama pH vrijednosti 4, 5, 6 i 9. Tanini djeluju kroz specifične reakcije s enzimima, sekvestraciju željeza, i dr. (Scalbert, 1991). Biljke koje sadrže tanine koriste se u ublažavanju probavnih problema poput dizenterije i dijareje (Dharmandada, 2003), što ide u prilog tradicionalnoj uporabi smilja za ublažavanje ovih poteškoća. Također, Li i sur. (2003) otkrili su važnost biološke aktivnosti tanina u prevenciji i liječenju kancerogenih oboljenja.

I flavonoidi slijede trend, tj. udio flavonoida također je najviši u jedinkama koje su uzgajane na MS podlogama pH vrijednosti 8 uz razliku da se tretman 8 statistički značajno razlikuje od ostalih tretmana, a njihov udio u ukupnim fenolima kreće se 10-15 %. Širok raspon bioloških aktivnosti flavonoida uključuje antimikrobna, protuupalna, analgetička, antialergena, antioksidativna svojstva i dr. Također, smanjuju rizik od kancerogenih oboljenja

i ublažavaju tegobe vezane uz menopauzu (Hodek i sur., 2002), a smatra se i da smanjuju rizik od koronarnih bolesti (Rice-Evans i sur., 1996). Suzgec i sur. (2005) izolirali su flavonoide iz vrste *Helichrysum compactum* među kojima su luteolin, kempferol, naringenin, apigenin, kvercetin te njihovi O-glukozidi.

Najmanji udio po gramu suhe tvari u istraživanim fenolnim spojevima imali su antocijani, kojih najviše ima u jedinkama uzgajanim na MS podlogama pH vrijednosti 7, ali ta se vrijednost statistički značajno razlikuje jedino od vrijednosti za jedinke uzgajane na podlogama pH vrijednosti 5. Ipak, antocijani pridonose ljekovitim svojstvima smilja pojačavajući njegovo antioksidacijsko (Wang i sur., 1997) i protuupalno (Borissova i sur., 1994) djelovanje te djelujući pozitivno na imunološki sustav (Bub i sur., 2003).

Antioksidacijska aktivnost ovih spojeva važna je za prevenciju bolesti povezanih s oksidacijskim oštećenjima membrana, proteina i DNA (Fergusion, 2001). Prema tome, ljekovita svojstva biljaka koje se od davnina koriste u narodu, među kojima je i primorsko smilje, moglo bi se pripisati upravo antioksidacijskoj aktivnosti. Biljke koje pokazuju antioksidacijsku aktivnost pokazuju aktivnost vezanja slobodnih radikala (Das i Pereira, 1990) i na taj način njihova uporaba djeluje pozitivno na prirodni antioksidacijski obrambeni mehanizam smanjujući time vjerojatnost za razvoj bolesti čijem razvoju pogoduju slobodni radikali, a neke od tih su dijabetes, bolesti jetre i bubrega te degenerativne bolesti (Parr i Bolwell, 2000). Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva već je dokazana (Van Acker i sur., 2006, Kähkönen i sur., 1999, Kim i sur., 2011, Pourmorad i sur., 2006) zbog čega sam očekivala da će najjača antioksidacijska svojstva pokazati upravo oni ekstrakti koji su imali najviši udio fenolnih spojeva. Rezultati ovog istraživanja pokazuju postojanje antioksidacijske aktivnosti etanolnih ekstrakata primorskog smilja, ali samo je metoda ABTS dala statistički značajan pokazatelj ovisnosti antioksidacijske aktivnosti o pH vrijednosti podloge. Ovom metodom ustanovljeno je da najjači antioksidacijski potencijal imaju biljke koje su rasle na podlogama pH vrijednosti 8, a taj podatak se statistički značajno razlikuje od vrijednosti za ostale tretmane. Postotak inhibicije ABTS radikal-kationa ekstrakata biljaka koje su rasle na podlogama pH vrijednosti 8 iznosi oko 75 %, dok se ostale vrijednosti kreću do najviše 50ak %. Metoda DPPH pokazala je da je antioksidacijska aktivnost smilja podjednako visoka, bez obzira na pH vrijednost podloge na kojoj su biljke rasle, a postotak inhibicije također iznosi oko 75 %. Odstupanje od ove dvije metode pokazuje metoda FRAP koja ukazuje na velik raspon antioksidacijske aktivnosti te nema statistički značajnog podatka koji bi prednost dao određenoj pH vrijednosti podloge. Wang i sur. (1998) u svom radu navode kako spojevi koji reduciraju ABTS radikal-kation možda ne posjeduju sposobnost redukcije DPPH radikala, što

bi moglo objasniti nepodudarnost ovih rezultata. Također, ovaj podatak implicira na sposobnost smilja da reducira različite slobodne radikale što povećava njegova ljekovita svojstva. Metoda FRAP također pokazuje najjaču antioksidacijsku aktivnost ekstrakata jedinki koje su rasle na podlogama pH vrijednosti 7 i 8, ali varijacije u rezultatima su velike te ne postoji statistički značajna razlika među rezultatima. Uz to, postotak redukcije željeza(III) ne prelazi 35 %.

S obzirom na dosadašnja saznanja, rezultate i činjenicu da su biljke smilja bolje rasle na podlozi pH vrijednosti 7 istraživanja bi se mogla usmjeriti na utvrđivanje optimalne pH vrijednosti podloge pri kojoj bi se postigao najbolji omjer količine biomase i udjela ljekovitih spojeva, te identifikaciju istih.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata provedenog istraživanja na primorskom smilju mogu zaključiti sljedeće:

- Najveći udio ukupnih fenola, tanina i flavonoida imaju biljke uzgajane na MS podlogama pH vrijednosti 8, dok najveći udio antocijana imaju biljke uzgajane na MS podlogama pH vrijednosti 7
- Najveći dio ukupnih fenola u primorskom smilju čine tanini, slijede ih flavonoidi, a antocijana ima najmanje
- Najjaču antioksidacijsku aktivnost pokazuju biljke uzgajane na MS podlogama pH vrijednosti 8

7. LITERATURA

Aiyegoro, O. A., Okoh, A. I. (2009): Phytochemical screening and polyphenolic antioxidant activity of aqueous crude leaf extract of *Helichrysum pedunculatum*, Int. J. Mol. Sci., 10, 4990-5001

Anonymus (2009): Pravilnik o proglašenju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim, Narodne novine, 99/09

Appendino, G., Ottino, M., Marquez, N., Bianchi, F., Giana, A., Ballero, M., Sterner, O., Fiebich, B. L., Munoz, E. (2007): Arzanol, an anti-inflammatory and anti-HIV-1 phloroglucinol alpha-Pyronefrom *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*, J. Nat. Prod. 70, 608–612

Awah, F. M., Uzoegwu, P. N., Oyugi, J. O., Rutherford, J., Ifeonu, P., Yao, X., Fehrmann, F., Fowke, K. R., Eze, M. O., (2012): Free radical scavenging activity, phenolic contents and cytotoxicity of selected Nigerian medicinal plants, Food Chem. 131, 1279–1286

Benzie, F. F. I. i Strain, J. J. (1996): The Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power", The FRAP Assay, Anal. Biochem. 239, 70-76

Bianchini, A., Santoni, F., Paolini, J., Bernardini, A. F., Mouillot, D., Costa, J. (2009): Partitioning the relative contributions of inorganic plant composition and soil characteristics to the quality of *Helichrysum italicum* subsp. *italicum* (Roth) G. Don fil. essential oil, Chem. Biodivers., 6, 1014–1033

Blažeković, B., Pepeljnjak, S., Stanić, G., Vladimir-Knežević, S. (2006.): Antimikrobni učinak primorskog smilja – *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don, Zdravstvena ekologija u praksi/ Haberle, Saša (ed)., Zagreb, HZJZ i dr, 221-222

Blokhina, O. Virolainen, E., Fagerstedt, K. V. (2003): Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a rewiew, Ann. Bot., 91, 179-194

Borissova, P., Valcheva, S., Belcheva, A. (1994): Anti-inflammatory effects of flavonoids in the natural juice from *Aronia melanocarpa*, rutin, and rutin-magnesium. Complex on an experimental model of inflammation induced by histamine and serotonin, Acta. Physiol. Pharmacol. Bulg., 20(1), 25-30

Bub, A., Watzl, B., Blockhaus, M., Briviba, K., Liegibel, U., Muller, H., Pool-Zobel, B. L., Rechkemmer, G. (2003): Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage, J. Nutr. Biochem., 14, 90-98

Close D. C., McArthur C. (2002): Rethinking the role of many plant phenolics – protection from photodamage not herbivores?, Oikos, 99, 166–172

Das, N. P., Pereira, T. A. (1990): Effect of flavonoids on thermal auto-oxidation of palm oil: structure activity relationship, J. Am. Oil Chem. Soc., 67, 255–258

Denninston, K. J., Topping J. J. (2008): Foundations of general, organic and biochemistry, McGraw-Hill, New York

Dharmananda, S. (2003): Gallnuts and the uses of Tannins in Chinese Medicine, ITM, Portland

Elstner, E. F. (1982): Oxygen activation and oxygen toxicity, Ann. Rev. Plant. Physiol., 33, 73-96

Fergusion, L.R. (2001): Role of plant polyphenols in genomic stability, Mutat. Res., 475, 89–111

Ferrazzano, G. F., Amato, I., Ingenito, A., Zarrelli, A., Pinto, G., Pollio, A., (2011.): Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review, Molecules, 16, 1486–1507

Galbany-Casals, M., Blanco-Moreno, J. M., Garcia-Jacas, N., Breitwieser, I., Smissen, R. D. (2011): Genetic variation in Mediterranean *Helichrysum italicum* (Asteraceae; Gnaphalieae): do disjunct populations of subsp. *microphyllum* have a common origin?, Plant Biol., 13, 678–687

Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M. (2002): Flavonoids-Potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochrome P450, Chemico-Biological Int., 139, 1–21

Jamison, J. R. (2003): Clinical guide to nutrition and dietary supplements in disease management, Churchill Livingstone, Philadelphia

Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, J. H., Rauha J. P., Pihlaja K., Kujala, T. S., Heinonen, M. (1999): Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, J. Agric. Food. Chem., 47, 3954-3962

Kim, I. S., Yang, M. R., Lee, O. H., Kang, S. N.(2011): Antioxidant activities of hot water extracts from various spices, Int. J. Mol. Sci., 12, 4120–31.

Li, H., Wang, Z., Liu, Y. (2003): Review in the studies on tannins activity of cancer prevention and anticancer, Zhong-Yao-Cai, 26, 444–448

Mastelić, J., Politeo, O., Jerković, I., Radošević, N. (2005): Composition and anti- microbial activity of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and terpenoid fractions, Chem. Nat. Compds., 41, 35–40

Morone-Fortunato, I., Montemurro, C., Ruta, C., Perrini, R., Sabetta, W., Blanco, A., Lorusso, E., Avato, P. (2010): Essential oils, genetic relationships and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm, Ind. Crops Prod., 32, 639–649

Moyo, M., Bairu, M. W., Amoo, S. O., Van Staden, J. (2011): Plant biotechnology in South Africa: Micropropagation research endeavours, prospects and challenges, S. Afr. J. Bot., 77(4), 996-1011

Murashige, T., Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant., 15(3), 473-497

Nostro, A., Bisignano, G., Angela Cannatelli, M., Crisafi, G., Paola Germano, M., Alonzo, V. (2001): Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*, Int. J. Antimicrob. Agents 17, 517–520

Nostro, A., Cannatelli, M. A., Marino, A., Picerno, I., Pizzimenti, F. C., Scoglio, M. E., Spataro, P. (2003): Evaluation of antiherpesvirus-1 and genotoxic activities of *Helichrysum italicum* extract, New Microbiol., 26, 125–128

Nostro, A., Cannatelli, M. A., Crisafi, G., Musolino, A. D., Procopio, F., Alonzo, V. (2004): Modifications of hydrophobicity, in vitro adherence and cellular aggregation of *Streptococcus mutans* by *Helichrysum italicum* extract, Lett. Appl. Microbiol., 38, 423–427

Paiva, Ê. A. S., SantosIsaias, R. M., Aguiar, V. F. H., SennaQueiroz, C. G. (2003): The influence of light intensity on anatomical structureand pigment contents of *Tradescantiapallida* (Rose) Hunt. Cv. *Purpurea* Boom (*Commelinaceae*) leaves, Braz. Arch. Biol. Techn., 46, 617-624

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

Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Díaz-Rubio, M. E., Serrano, J., Gońi, I. (2008): Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results, Food Res. Int., 41(3), 274–285

Perrini, R., Morone-Fortunato, I., Lorusso, E., Avato, P. (2009): Glands, essential oils and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *microphyllum* (Willd.), Nyman. Ind. Crops Prod., 29, 395–403

Pevalek-Kozlina B. (2003): Fiziologija bilja, Profil International, Zagreb

Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J., Shahabimajd, N. (2006): Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants, Afr. J. Biotechnol., 5(11), 1142-1145

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, Free Radic. Biol. Med., 26, 1231-1237

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. (1996): Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food, Biochem. Soc. Trans., 24, 790–795

Rosa, A., Deiana, M., Atzeri, A., Corona, G., Incani, A., Melis, M. P., Appendino, G., Dessi, M. A. (2007): Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activity of arzanol, a prenylated pyrone–phloroglucinol etherodimer from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*, Chem. Biol. Interact., 165(2), 117-126

Ruikar, A. D., Khatiwora, E., Ghayal, N. A., Misar, A. V., Mujumdar, A. M., Puranik, V. G., Deshpande, N. R. (2011): Studies on aerial parts of *Artemisia pallens* wall for phenol, flavonoid and evaluation of antioxidant activity, J. Pharm. Bioallied Sci., 3, 302-305

Scalbert, A. (1991): Antimicrobial properties of tannins, Phytochemistry 30, 3875–3883

Scarborough, J. (1978): Theophrastus on herbals and herbal remedies, J. Hist. Biol., 11, 353–385

Schnaubelt, K. (1999): Medical aromatherapy – healing with essential oils, 1st ed., Frogs Ltd, Berkeley

Shirwaikar, A., Shirwaikar, A., Rajendran, K., Punitha, I. S. (2006): In vitro antioxidant studies on the benzyl tetra isoquinoline alkaloid berberine, Biol. Pharm. Bull., 29(09), 1906-1910

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteureagent, Methods Enzymol., 299, 152-178

Smirnoff, N. (1993): The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation, New Phytol., 125, 27-58

Suzgec, S., Mericli, A. H., Houghton, P. J., Cubukcu, B. (2005): Flavonoids of *Helichrysum compactum* and their antioxidant and antibacterial activity, Fitoterapia, 76, 269-272

Van Acker, S. A. B. E., Van Den Berg, D. J., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Vader Vijgh, W. J. F., Bast, A. (1996): Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids, Free Radic. Biol. Med., 20, 331–342

Wang H., Cao G., Prior, R. L. (1997): Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins, J. Agric. Food Chem., 45, 304-309

Wang, M., Li, J., Rangarajan, M., Shao, Y., La Voie, E. J., Huang, T., Ho, C. (199.): Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*), J. Agric. Food Chem., 46, 4869–4873

http://hirc.botanic.hr/fcd/DetaljiFrame.aspx?IdVrste=12377&taxon=Helichrysum+italicum+(Roth)+G.Don

http://www.dottorperuginibilli.it/aromaterapia1/160-elicriso-helicrisum-angustifolium-h-italicum