Učinak saharoze na sadržaj fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet smilja (Helichrysum italicum (Roth) G. Don)

Horvat, Dino

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:217:547811

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

Dino Horvat

Učinak saharoze na sadržaj fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet smilja (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don)

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj je rad izrađen na Biološkom odsjeku, u Laboratoriju za fiziologiju bilja u Botaničkom zavodu Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Branke Pevalek-Kozlina, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

Zahvala:

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Branki Pevalek-Kozlina koja mi je omogućila svu potrebnu opremu i pomogla svojim savjetima pri izradi ovog diplomskog rada. Zahvaljujem dr. sc. Mariji Babić koja mi je uveliko pomogla prilikom odabira mentorice i svojim savjetima i zanimljivim praktikumima pobudila želju da radim svoj diplomski u Laboratoriju za fiziologiju bilja. Hvala svim članovima Laboratorija za fiziologiju bilja koji su na bilo koji način pomogli i doprinijeli izradi ovog rada.

Također, zahvaljujem svim svojim prijateljima i prijateljicama, koji su uvijek bili uz mene i bez kojih cijeli tijek mog studiranja ne bi prošao tako lako i zabavno.

Posebni zahvalnost iskazujem cijeloj svojoj obitelji koja me uvijek podržavala i upućivala na pravi put.

I na kraju, najveću zaslugu za ono što sam postigao pripisujem svojim roditeljima, koji su uvijek bili tu, bez obzira radilo se o teškim ili sretnim trenutcima i bez kojih sve što sam dosad postigao ne ni bilo moguće.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Učinak saharoze na sadržaj fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet smilja (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don)

Dino Horvat
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) je aromatični polugrm mediteranskog područja poznato po zlatno-žutim cvjetovima i lako prepoznatljivom mirisu. Ime roda Helichrysum, koje potječe od grčkih riječi helios, što znači sunce, i chryos, što znači zlato, daje do znanja kako vrste ovog roda imaju karakteristične cvatove svijetložute boje. U Hrvatskoj raste po kamenjarima, bušicima, na stjenovotom travnjacima, od obalnog do brdskog pojasa u području mediteranske i submediteranske klime. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utječe li povećanje koncentracije saharoze u hranjivoj podlozi na količinu fenolnih spojeva (ukupnih fenola, tanina, flavonoida i antocijana) i antioksidacijski kapacitet smilja. U istraživanju su korišeni samo listovi smilja koji su ekstrahirani pomoću 50 %-tnog etanola. Rezultati istraživanja pokazali su kako povećanje koncentracije saharoze u hranjivoj podlozi značajno povećava količinu svih fenolnih spojeva u listovima smilja što se može pripisati stimulirajućem učinku saharoze na enzim fenilalanin-amonij-lijazu (PAL) koji je glavni enzim u sintezi sekundarnih fenolnih metabolita u biljaka. Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata smilja korištene su metode ABTS, DPPH i FRAP. Porastom koncentracije saharoze, a time i povećanjem količine fenolnih spojeva u listovima smilja, povećavao se i antioksidacijski kapacitet smilja prema metodama ABTS i FRAP dok je metoda DPPH pokazala smanjenje antioksidacijske aktivnosti što se može objasniti stvaranjem vodikovih veza između otapala (etanol, voda) i povišene količine fenolnih spojeva koje su utjecale na smanjenu stopu reakcije između radikala i antioksidanasa (fenolnih spojeva) iz listova smilja.

(55 stranica, 14 slika, 1 tablica, 69 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: smilje, *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don, fenoli, tanini, flavonoidi, antocijani, antioksidacijski kapacitet, antioksidansi

Voditelj: Dr. sc. Branka Pevalek-Kozlina, red. prof.
Neposredni voditelj: Dr. sc. Marija Babić

Ocjenitelji:
Dr. sc. Branka Pevalek-Kozlina, red. prof.
Dr. sc. Ines Radanović, izv. prof.
Dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek, izv. prof.

Rad prihvaćen: 2. srpnja 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Effects of saccharose on flavonoid content and antioxidant capacity of immortelle (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don)

Dino Horvat
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Immortelle (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) is an aromatic semi-shrub of Mediterranean region known for its golden-yellow flowers and easily recognizable smell. Helichrysum genus name, which comes from the Greek words helios, meaning sun, and chryos, which means gold, makes it clear how the species of this genus have a distinctive blossoms light-yellow color. In Croatia immortelle grows at a rocky, busic, cliffy lawns, from coastal to mountainous zone in the mediterranean and sub-mediterranean climate. The aim of this study was to determine the influence of the increasing concentration of saccharose in the nutrient medium on the amount of phenolic compounds (total phenols, tannins, flavonoids and anthocyanins) and antioxidant capacity of immortelle. In this study only leaves of Immortelle were used. They were extracted using 50 % ethanol. The results showed that conclusive increase of saccharose concentration in the nutrient medium, significantly increased the amount of phenolic compounds in the immortelle leaves. That could be attributed to the stimulating effect of saccharose on enzyme phenylalanine-ammonia-lyase (PAL), a major enzyme in the synthesis of secondary phenolic metabolites in plants. ABTS, DPPH and FRAP assays were used to determine the antioxidant capacity of immortelle extracts. With increasing concentration of saccharose, and thus increasing amount of phenolic compounds in the immortelle leaves the antioxidant capacity was higher according to ABTS and FRAP assays. DPPH assay showed a decline in antioxidant activity which could be explained by the formation of hydrogen bonds between the solvent (ethanol and water) and elevated levels of phenolic compounds that have influenced on reduced rate of reaction between radicals and antioxidants (phenolic compounds) from the immortelle leaves.

(55 pages, 14 figures, 1 table, 69 references, original: in Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: Immortelle, *Helichrysum italicum* (Roth) g. Don, phenols, tannins, falvonoids, antocyanins, antioxidant capacity, antioxidants

Supervisor: Dr. Branka Pevalek-Kozlina, Prof.
Assistant Supervisor: Dr. Marija Babić

Reviewers:
Dr. Branka Pevalek-Kozlina, Prof.
Dr. Ines Radanović, Assoc. Prof.
Dr. Draginja Mrvoš-Sermek, Assoc. Prof.

Thesis accepted: July 2, 2015.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Sredozemno smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) 2
1.1.1. Morfološke značajke i rasprostranjenost 2
1.1.2. Uzgoj smilja 3
1.1.3. Kemijski sastav nadzemnih dijelova smilja 4
1.1.4. Biološki učinci ekstrakata smilja 7
1.2. Sekundarni biljni metaboliti 10
1.2.1. Fenolni spojevi 11
1.3. Oksidativni stres i antioksidacijski sustavi u biljaka 12
1.3.1. Nastanak reaktivnih kisikovih vrsta i prateći regulatorni mehanizmi 12
1.3.2. Antioksidacijski sustavi u biljaka 14
1.4. Metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta u uvjetima *in vitro* 17
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 18
3. MATERIJALI I METODE 19
3.1. BILJNI MATERIJAL 19
3.1.1. Sterilizacija biljnog tkiva i umnožavanje u uvjetima *in vitro* 19
3.1.2. Odabir odgovarajuće hranjive podloge za umnožavanje izdanaka smilja 21
3.1.3. Odabir koncentracije saharoze 21
3.2. METODE 22
3.2.1. Priprema biljnih ekstrakata 22
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola 23
3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje tanina 24
3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida 25
3.2.5. Spektrofotometrijsko određivanje antocijana 26
3.2.6 Spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijskog kapaciteta smilja 27
3.2.7. Statistička obrada podataka 31
4. REZULTATI 32
4.1. Kultura smilja u uvjetima *in vitro* 32
4.1.1. Uspostavljanje kulture i odabir odgovarajuće hranjive podloge 32
4.1.2. Učinak koncentracije saharoze na razvoj izdanaka smilja 32
4.2. Učinak koncentracije saharoze na udio fenolnih spojeva u listovima smilja 34

4.2.1. Udio ukupnih fenola 34
4.2.2. Udio tanina 35
4.2.3. Udio flavonoida 36
4.2.4. Udio antocijana 37
4.3. Učinak koncentracije saharoze na antioksidacijski kapacitet smilja 38
4.3.1. Metoda ABTS 38
4.3.2. Metoda DPPH 40
4.3.3. Metoda FRAP 42
5. RASPRAVA 44
6. ZAKLJUČAK 49
7. LITERATURA 50

1. UVOD

Smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) aromatični je polugrm mediteranskog područja koji svojim zlatnožutim cvatovima i opojnim mirisom privlači brojne znatiželjnike. Ime roda *Helichrysum*, koje potječe od grčkih riječi *helios*, što znači sunce, i *chryos*, što znači zlato, daje do znanja kako vrste ovog roda imaju karakteristične cvatove svijetložute boje (Perrini i sur., 2009). Rod *Helichrysum* (Miller) pripada porodici *Asteraceae* (glavočike) i uključuje oko 600 vrsta diljem svijeta. U Mediteranskom području zastupljeno je oko 25 autohtonih vrsta od kojih su u Hrvatskoj dokumentirane dvije: *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don (sredozemno smilje) te *Helichrysum arenarium* (L.) Moench (pješčano smilje) (Perrini i sur., 2010). Staništa koja naseljava uglavnom su suha, a tlo pjeskovito ili kamenito. Sve vrste roda *Helychrysum* su kserofiti te zahvaljujući svojim adaptacijama rastu u velikom rasponu nadmorskih visina; od razine mora do 1700 m.n.v. (Perrini i sur., 2009).

Ljekovita svojstva smilja poznata su još od antičkog doba. Jedan od prvih pisanih dokumenata u kojima se spominje smilje je „Historia Plantarum“ (3. - 2. st. pr. Kr.), grčkog filozofa Teofrasta u kojem se opisuje blagotvorno djelovanje smilja pomiješanog s medom na ugrize životinja i opekline (Scarbourgh, 1978). U narodnoj medicini cvjetovi i listovi smilja tradicionalno se koriste za olakšanje zdravstvenih tegoba poput alergija, prehlade, kašlja, poremećaja vezanih uz kožu, jetru i mokraćni mjehur, raznih infekcija i nesanice (Palmeira-de-Oliveira i sur., 2014).

Suvremena znanstvena istraživanja potvrđuju kako sekundarni metaboliti, a naročito eterično ulje smilja, imaju širok spektar biološkog djelovanja: protuupalno (Sala i sur., 2003, Appendino i sur., 2007), antialergijsko i antimikrobno (Nostro i sur., 2003), antioksidacijsko (Sala i sur., 2003), te antivirusno (Appendino i sur., 2007). Vrsta *Helichrysum italicum*, u nas poznatija pod nazivom sredozemno smilje, jedna je od najrasprostranjenijih i najviše istraživanih vrsta roda *Helichrysum* (Mastelić i sur., 2005).

1.1. Sredozemno smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don)

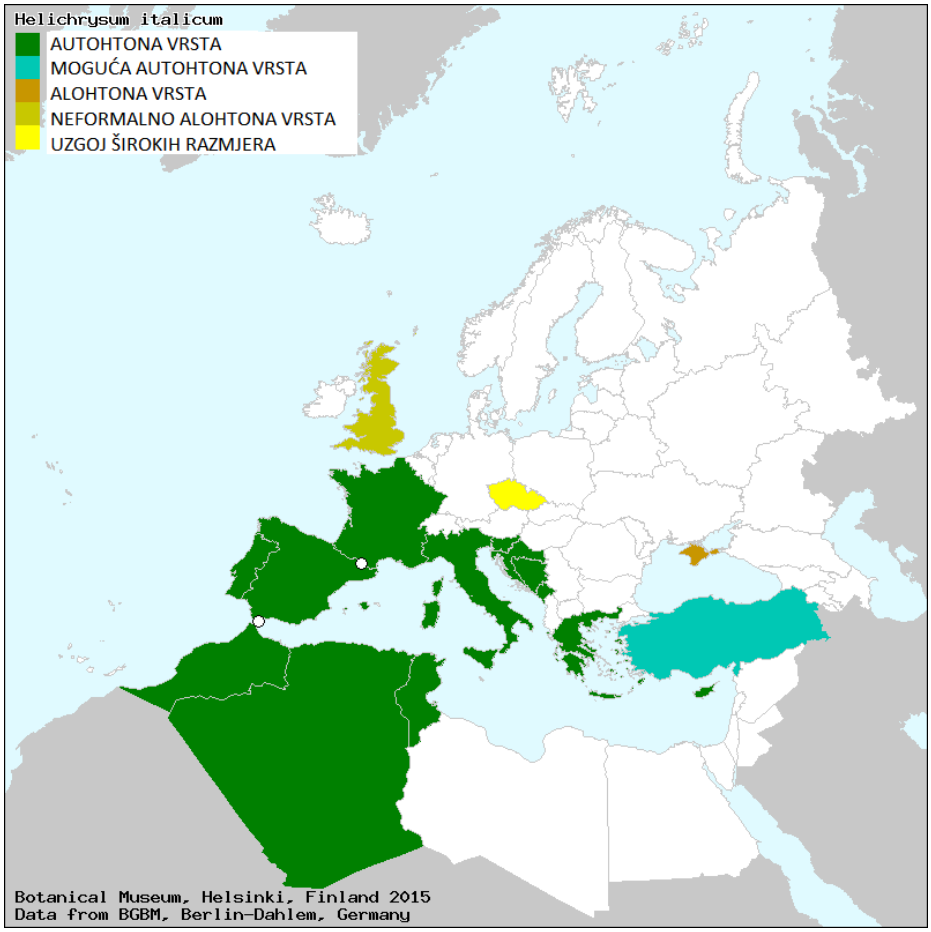
1.1.1. Morfološke značajke i rasprostranjenost

Sredozemno smilje (*Helichrysum italicum*) raste u obliku grma visine 30 do 70 cm. Na razgranatim stabljikama naizmjenično su raspoređeni uski šiljasti listići čvrste kutikule koji su s lica zeleni, a s naličja sivozeleni, prekriveni sitnim dlačicama. Donji listići pri osnovi biljke skupljeni su u rozetu. Deblja kutikula listova i guste dlačice na naličju koje štite puči u cilju smanjenja transpiracije te osiguravaju smilju prilagođenost na sušne uvjete staništa (kserofiti). Na vrhu stabljike, koja je također prekrivena dlačicama, sitni cvjetići skupljeni su u prepoznatljive žute cvatove koji cvatu od svibnja do kraja srpnja (Slika 1.). Cvatovi zadržavaju svoju žutu boju nakon cvatnje i sušenja, zbog čega su pod nazivom „besmrtno cvijeće“ (eng. *Immortelle*) u antičkoj Grčkoj korišteni za izradu vijenaca. Svaka stabljika završava cvatovima. Cvjetovi grma su ujednačene veličine jer su drške gornjih cvjetova kraće, a gornjih niže. Biljka je dvodomna. Muški cvjetovi su neugledni, cjevastog oblika. Nakon oplodnje cvjetovi brzo sazrijevaju. Plod je sitna roška (Pohajda i sur., 2015). Sjeme je duguljasto, crno, sitno, a 1 g sjemena sadrži 3300-3700 zrna. Podzemni izdanak smilja je razgranat i duboko prodire u tlo. Iz drvenastog vretenastog rizoma svake sezona razvija se više desetaka stabljika koje nose cvat. Brži protok vode osiguran je širim provodnim elementima u morfologiji ksilema (Stepanović i sur., 2009.).



Slika 1. Primorsko smilje (*Helichrysum italicum*) na svom prirodnom staništu (Preuzeto s http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a0/Helichrysum_italicum_ssp_serotinum_3.jpg)

Primorsko smilje je prirodno rasprostranjeno u zemljama Sredozemlja (Cipar, Grčka, Hrvatska, Italija, Francuska, Španjolska, Alžir i Maroko,Slika 2.). Najpoznatije prirodno nalazište je na francuskom otoku Korzici. Samoniklo raste na krševitom području, siromašnim pjeskovitim tlima ili na plitkim tlima napuštenih poljoprivrednih površina. Odgovara mu veća količina sunčevog zračenja, što određuje aromatična svojstva (Šalinović, 2007).



Slika 2. Rasprostranjenost sredozemnog smilja (*Helichrysum italicum*) na području Europe i sjeverne Afrike (Preuzeto s http://euromed.luomus.fi/euromed_map.php?taxon=416249&size=medium)

1.1.2. Uzgoj smilja

Smilje se razmnožava generativno sjemenom i vegetativno reznicama ili dijeljenjem busena. Kako se izravna sjetva sjemena ne preporuča, važno je proizvesti kvalitetne presadnice (Pohajda i Žutić, 2014). Proizvodnja presadnica iz sjemena uključuje njihov uzgoj tijekom ljeta u hladnim klijalištima. Prilikom ručne sjetve sjemena na 1 m^2 hladnog klijališta potrebno je 0,5 g sjemena, čija je klijavost 50 %. S hladnog klijališta površine 1 m^2 može se

dobiti 300-400 presadnica smilja (Pohajda i sur., 2015). Proizvodnja presadnica vegetativnim razmnožavanjem iz reznica može se odvijati u zaštićenom prostoru tijekom četiri do pet tjedana. Važno je da su reznice odabrani ovosezonski izbojci s dovoljno odrvenjelim baznim dijelom. Na gorenjem dijelu reznica dužine od 4 do 6 cm potrebno je ostaviti oko četiri listića, koji omogućuju proces fotosinteze. Ostale listiće potrebno je ukloniti u cilju osiguranja dovoljne količine energije za stvaranje korijena. Nakon što se napravi rez, reznice se stavljaju u pripremljeni supstrat. Prethodna primjena regulatora rasta (hormona) za zakorjenjivanje ovisi o tipu proizvodnje. Reznicama je važno osigurati dovoljno vlage i svjetlosti te zaštitu od prejakog sunčevog zračenja.

Mikrorazmnožavanje u uvjetima *in vitro* najkvalitetniji je i najsigurniji način razmnožavanja smilja koji se preporučuje i u komercijalnoj proizvodnji (Pohajda, 2014).

Kultura biljnih stanica, tkiva i organa je metoda kojom se u kontroliranim aseptičkim uvjetima omogućava rast i umnožavanje stanica, tkiva i organa na hranjivim podlogama. Uvjeti potrebni za poticanje rasta i razvoja, održavanje biljke u kulturi te regeneraciju biljaka različiti su za svaku biljnu vrstu. Za uspješnu mikropropagaciju najvažniji su odabir eksplatanata, sastav hranjive podloge te kontrolirani uvjeti. Prema metodi Perrini-a i sur. (2009), za mikropropagaciju smilja najprije je potrebno odabrati zdravu biljku (iz prirodnih izvora ili uzgojenu). Zatim se u sterilnim laboratorijskim uvjetima od matične biljke odvoje vršni pupovi veličine 4-5 mm koji se steriliziraju u 0,1 %-tnoj otopini $HgCl_2$ u trajanju od 15 minuta i operu u sterilnoj destiliranoj vodi. Eksplantati se nasađuju na hranjivu podlogu MS (Murashige i Skoog, 1962) uz dodatak agara, saharoze i regulatora rasta 6-benzilaminopurina (BA) i indol-3-octene kiseline (IBA). Vrijednost pH hranjive podloge se podesi između 5,6 i 5,8. Kulture se drže oko 35 dana na temperaturi od 21 ± 1 ºC u uvjetima dugog dana pod rasvjetom jačine 50 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$. Ova metoda osigurava najbolju proliferaciju eksplantata (Perrini i sur., 2009).

1.1.4. Kemijski sastav nadzemnih dijelova smilja

Biljke roda Helichrysum bogati su proizvođači sekundarnih metabolita uključujući flavonoide, acetofenone, floroglucinole, pirone, triterpene i seskviterpene (Rosa i sur., 2007). Brojna znanstevna istraživanja utvrdila su širok spektar strukturne raznolikosti njegovih sastavnica (Sala i sur., 2002; Sala i sur., 2003; Rosa i sur., 2007; Perrini i sur., 2010; De Feo i

sur., 2011). Prema Perrini-u i sur. (2010) nadzemni dijelovi smilja sadrže čak 62 različita kemijska spoja svrstanih u sljedeće skupine:

1. **Flavonoidi** (0,6 %) od kojih su najzastupljeniji:
    - apigenin, apigenin-7-O-glukozid, apigenin-7,4-di-O-glukopiranozid
    - gnafaliin
    - helikrizin A i helikrizin B
    - izosalipurpozid (kalkon odgovoran za žutu boju cvatova smilja)
    - kemferol-glukozid, kemferol-3-O-(6-O-trans-p-kumaroil)-β-glukopiranozid (tilirozid)
    - kvercetin-3-O-glukozid, kvercetin-3-O-rutinozid, kvercetin-3-O-glukopiranozid
    - luteolin-7-glukozid
    - naringenin i naringenin-5-O-glukozid
    - 3,5-dihidrokis-6,7,8-trimetoksi flavoni
    - 5,7-dihidroksiflavon (pinocembrin)

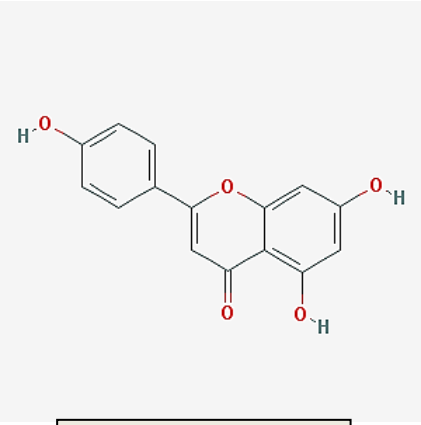
2. **Eterično ulje** (0,4 %) s glavnim sastavnicama:
    - α-pinen, α-cedren, α- i β-selinen, aromadendrin, β-kariofilen, limonen, α- i γ- kurkumen, nerol, neril acetat, geranil-acetat

3. **Fenolne kiseline** (0,03 % u slobodnom i 0,07 % u vezanom obliku):
    - dihidroksibenzojeva kiselina
    - kavena kiselina
    - p-kumarinska kiselina

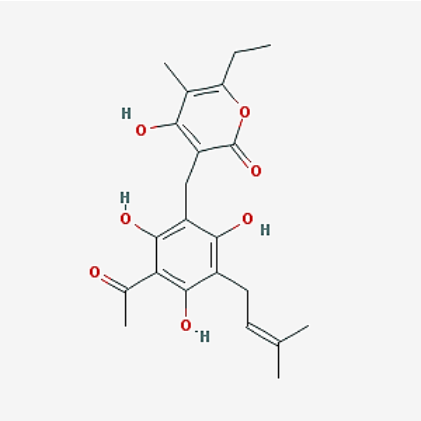
4. **Kumarini**:
    - eskuletin
    - umbeliferon
    - skopoletin

5. **Ostali:**
    a) **Triterpeni i steroli**: β-sitosterol glukoronoid, kampestrol, ursolna kiselina
    b) **Ftalidi**: 5-metoksi-7-hidroksiftalid i 5-metoski-7-hidroksiftalid-glukozid
    c) **Derivati α-pirona:** arenol, homoarenol i arzanol
    d) **Derivati floroglucinola i acetofenona:** bitalin A, 4-hidroksi-3-(3-metil-2-butenil) acetofenon
    e) **Tanini**

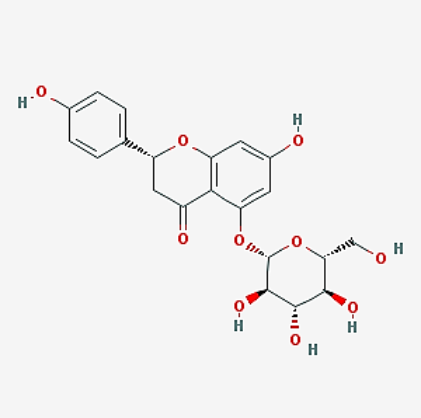
Sastav eteričnog ulja uvelike ovisi o okolišnim uvjetima u kojima se biljka nalazi, ali i o genotipu biljke (Perrini i sur., 2010). Ovi su autori podijelili esencijalno ulje smilja (*Helichrysum italicum* ssp. *italicum*) u tri različita kemotipa: (I) genotip bogat nerolom i njegovim esterima, (II) genotip bogat α- i β-selinenom i (III) genotip bogat γ-kurkumenom. Sastav eteričnog ulja smilja koje raste u Hrvatskoj istražili su Mastelić i sur. (2008). GC-MS analizom identificirali su 44 sastavnice od kojih su se isticali: α-pinen (12,8 %), 2-metilcikloheksil pentanoat (11,1 %), neril acetat (10,4%) i 1,7-di-epi-α-cedren (6,8 %).



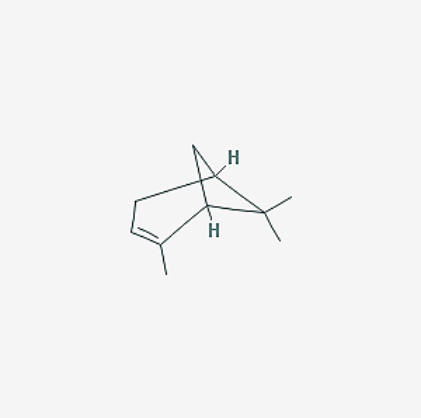
A. APIGENIN



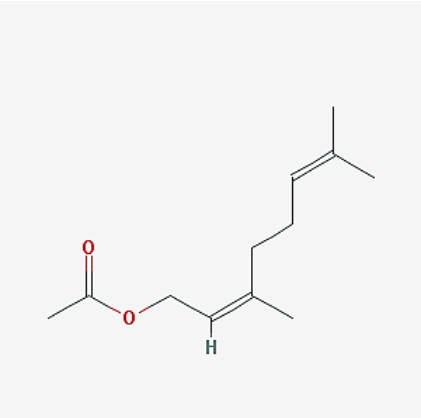
B. ARZANOL



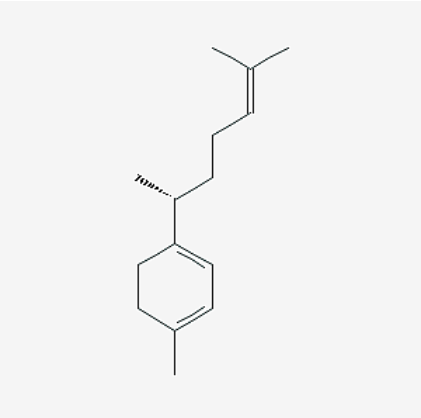
C. HELIKRIZIN A



D. α- PINEN



E. NERIL ACETAT



F. γ- KURKUMEN

Slika 3. Strukture flavonoidnih (A-C) i terpenoidnih (D-F) spojeva prisutnih u nadzemnim djelovima smilja (*Helichrysum italicum*) (Preuzeto s https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

1.1.5. Biološki učinci ekstrakata smilja

Protuupalno djelovanje

Protuupalno djelovanje smilja temelji se na inhibiciji sinteze i/ili aktivacije medijatora upale poput leukotriena, prostaglandina i enzima ciklooksigenaze (COX). Najuspješniji u smanjenju procesa upale su acetofenoni (aromatski ketoni) te flavonoidi (gnafaliin, pinocembrin i tilirozid). Flavonoidi gnafiliin (metoksiflavon) i pinocembrin (flavonon) pokazali su visoku stopu inhibicije leukotriena B_4 od čak 94 i 96 %. Gnafiliin, pinocembrin i tilirozid (flavonol acil-glukozid) smanjuju edem, uzrokovan kemijskim agensima u ženki miševa za više od 70 % (Sala i sur., 2003.) Appendino i sur. (2007) izvjestili su o protuupalnom djelovanju arzanola (2H-piran-2-on) izoliranog iz vrste *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*. Protuupalno djelovanje anzanola temelji se na inhibiciji produkcije faktora koji pokreću upalnu reakciju (interleukini-1, -6, i -8 (IL), faktor nekroze tumora α (TNFα), prostaglandini (PGE)). Istraživanja na ljudima proveli su Voinchet i Giraud-Robert (2007) koji su pratili zarastanje rana odnosno ožiljaka u pacijenata nakon plastične operacije prsnog koša. Pacijenti su dva puta dnevno oralno uzimali dvije kapi esencijalnog ulja smilja (*Helichrysum italicum* subsp. *serotinum*) u periodu od 3 mjeseca. S obzirom na kontrolnu grupu, koja nije uzimala esencijalno ulje smilja, u pacijenata koji su konzumirali ulje smilja zamjećena je značajna redukcija upalne reakcije, oteknuća i modrica.

Antimikrobno i antivirusno djelovanje

Zbog rastućeg problema otpornosti bakterija na sintetičke antibiotike ne iznenađuje i značajan porast istraživanja antimikrobne aktivnosti smilja. Brojni ekstrakti smilja (*Helichrysum italicum*) pokazali su inhibirajuće djelovanje na rast Gram-pozitivnih bakterija i njihovu virulenciju, dok su rezultati antimikrobne aktivnosti prema Gram-negativnim bakterijana slabije izraženi (Palmeira-de-Oliveira i sur., 2014). Nostro i sur. (2001) izvjestili su da dietil eterski ekstrakt smilja značajno smanjuje aktivnost enzima bakterije *Staphylococcus aureus*, naročito DNA-aze, lipaze, termonukleaze i koagulaze, te smanjuje mogućnost produkcije enterotoksina B i C. Etanolni ekstrak smilja pokazao se uspješnim u inhibiciji rasta bakterije *Streptococcus mutans*, jedne od glavnih uzročnika karijesa (Nostro i sur., 2004). Zaštitnički učinak etanolnog ekstrakta smilja pripisuje se flavonoidnim komponentama.

Istraživanjem učinka ekstrakta smilja na Gram-negativne bakterije, Lorenzi i sur. (2009) uočili su kako geraniol, alkohol iz skupine monoterpena, povećava osjetljivost bakterija na antibiotike prema kojima su iste prethodno pokazivale otpornost. Dodatak geraniola povećava učinak antibiotika na višestruko otporne sojeve vrsta *Enterobacter aerogenes, Escherichia coli, Acinetobacter baumanii* i *Pseudomonas aeruginosa*.

Antivirusnu aktivnost ekstrakta smilja istraživali su Appendino i sur. (2007). Tretirajući staničnu kulturu Jukat („besmrtna“ linija limfocita T koja se koristi u laboratorijskim istraživanjima) najprije HIV-1 virusom pa zatim acetonatnim ekstraktom arzanola izoliranog iz smilja, uočili su značajnu inhibiciju umnožavanja HIV-1 virusa u limfocitima T. Pokažu li spomenuta istraživanja uspjeh u kliničkim studijama, možemo se nadati novim, jeftinijim i manje toksičnim lijekovima (Palmeira-de-Oliveira i sur., 2014).

Antioksidacijsko djelovanje

Oksidativni stres definiran je kao neravnoteža u stvaranju slobodnih radikala i reaktivnih metabolita - reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) te njihove eliminacije pomoću zaštitnih mehanizama odnosno antioksidanasa. Ta neravnoteža uzrokuje oštećenja važnih biomolekula (lipida, ugljikohidrata, DNA) i staničnih struktura (Vladimir-Knežević i sur., 2011). Biljke i drugi organizmi razvili su širok spektar mehanizama za suočavanje s tim problemom (Arora i sur., 2002). Na različitim ekstraktima smilja provedena su brojna istraživanja u svrhu određivanja antioksidacijske aktivnosti (Czinner i sur., 2000, De Feo i sur., 2011, Poli i sur., 2003, Sala i sur., 2002, Sala i sur., 2003, Sun i sur., 2010).

Sala i sur. (2002) istraživali su antioksidacijsko djelovanje nadzemnih djelova smilja (*Helichrysum italicum*) pripremljenih ekstrakcijom metanolnog ekstrakta smilja. Pripremljenim ekstraktima testirana je anti-peroksidativna aktivnost na stanicama jetre miša, inhibicija DPPH• radikala i inhibicija superoksidnog radikala ($O_2^{\bullet -}$). U testu lipidne peroksidacije (enzimske i neenzimske) ekstrakt smilja pokazao je visoku anti-preoksidativnu aktivnost (>95 %). Antioksidacijska ativnost s obzirom na DPPH• radikal također je bila visoka (>89 %). Inhibicija superoksidnog radikala bila je izrazito niska.

Istraživanje antioksidacijske aktivnosti flavonoidnih sastavnica proveli su Sala i sur. (2003) na gnafiliinu, pinocembrinu i tilirozidu. Istražen je utjecaj ekstrakata spomenuth falvonoida na lipidnu peroksidaciju mikrosoma jetre štakora, stvaranje superoksidnih radikala i neutralizaciju DPPH• radikala u uvjetima *in vitro*. Kao najaktivniji, u svim se metodama

pokazao tilirozid. Značajno je inhibirao enzimatsku i neenzimatsku lipidnu peroksidaciju (>98 %), postotak inhibicije DPPH• radikala bio je 98 %, te je jedini od testiranih flavonoida značajno inhibirao superoksidni radikal.

Osim flavonoida značajan antioksidacijski potencijal imaju i druge sastavnice: arzanol, helipiron i α-piron-floroglucinol pokazali su visoku sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije, te značajnu redukciju oksidativnog stresa izazvanog malondialdehidom (MDA). Najaktivnijim se pokazao arzanol koji je lipidnu peroksidaciju smanjio za 90 %, a oksidativni stres u staničnoj kulturi VERO za 40 % (Rosa i sur., 2007).

1.2. Sekundarni biljni metaboliti

Sekundarni metaboliti obuhvaćaju širok spektar organskih spojeva koji nemaju nikakvu neposrednu ulogu u primarnom metabolizmu, ali imaju važnu ekološku funkciju jer predstavljaju zaštitu od herbivornih organizama i infekcije mikrobima. Osim toga služe i za primamljivanje oprašivača i životinja koje rasprostranjuju sjemenke te kao tvari koje posreduju u alelopatiji (Pevalek-Kozlina, 2003).

Danas je poznato oko 100 000 sekundarnih metabolita. Na temelju načina njihove biosinteze sekundarni se metaboliti mogu podjeliti u tri skupine: terpene, fenolne spojeve i metabolite koji sadrže dušik (Pevalek-Kozlina, 2003). Na biosintezu i sadržaj sekundarnih metabolita utječu promjene okolišnih uvjeta stoga mogu biti dobri pokazatelji biotičkih i abiotičkih stresnih uvjeta. Njihov sadržaj ovisi o tome u kojem se organu, tkivu ili stanici nalaze te se mijenja u ovisnosti o godišnjim dobima i starosti biljke (Ferrat i sur., 2003). Sekundarni metaboliti su važni i za čovjeka jer se zahvaljujući snažnoj biološkoj aktivnosti neki od njih mogu koristiti kao antitumorska, antivirusna i antibakterijska sredstva, neurotoksini i dr. (Mazid i sur., 2011).

1.2.1. Fenolni spojevi

Biljni fenoli heterogena su skupina sekundarnih metabolita, sveprisutnih u biljnom svijetu. To su spojevi koji imaju fenolnu tj. hidroksilnu skupinu na aromatskom prstenu. Neki od njih topivi su samo u organskim otapalima, neki u vodi, a neki su veliki, netopivi polimeri (Pevalek-Kozlina, 2003). Fenolni spojevi topivi u vodi nalaze se uglavnom u vakuoli biljne stanice, dok su netopivi uglavnom dio stanične stijenke. U biljnim stanicama imaju različite uloge kao što su održavanje strukture stanice, pigmentacija, privlačenje oprašivača, otpornost prema patogenima, odbijanje herbivora, te djeluju na rast i razvoj (Vladimir-Knežević i sur., 2011).

Fenolni spojevi se sintetiziraju u putu šikiminske i malonske kiseline. Put šikiminske kiseline sudjeluje u biosintezi većine biljnih fenola, dok je put malonske kiseline značajniji u bakterija i gljiva. Većina fenolnih spojeva nastaje iz aromatskih aminokiselina fenilalanina i tirozina. Ključni korak u sintezi je konverzija fenilalanina u cimetnu kiselinu eliminiranjem molekule amonijaka pomoću enzima fenilalanin-amonij-lijaze (PAL). Produkt fenilalanin-amonij-lijaze je *trans*-cimetna kiselina, jednostavan C_9 fenolni produkt poznat kao fenilpropan. Aktivnost PAL pod kontrolom je brojnih okolišnih i unutarnjih čimbenika, npr. prisutnosti regulatora rasta, svjetlosti, opskrbe hranjivim tvarima i gljivične infekcije. Na temelju svoje složenosti, biljni fenolni spojevi podijeljeni su na jednostavne fenolne spojeve, lignin, flavonoide i tanine (Pevalek-Kozlina, 2003).

1.3. Oksidativni stres i antioksidacijski sustavi u biljaka

Svi živi organizmi izloženi su različitim vrstama stresa koji mogu uzrokovati abiotički i biotički čimbenici. Kako biljke zbog svoje nepokretnosti imaju ograničene mehanizme za izbjegavanje stresa, razvile su različite mehanizme kojima se adaptiraju i/ili aklimatiziraju na promjene u okolišu. Zajednička značajka različitih vrsta stresa jest da potiču pojačanu proizvodnju reaktivnih oblika kisika (ROS) u biljnim tkivima. Reaktivni oblici kisika nastaju u biljnim tkivima i u nestresnim uvjetima ali u manjim količinama. U tom slučaju antioksidacijski obrambeni sustav pruža adekvatnu zaštitu od reaktivnih oblika kisika i slobodnih radikala (Asada i sur., 1987). U niskim koncentracijama ROS djeluju kao signalne molekule upozoravajući biljku na abiotičke i biotičke stresore (Wook i sur., 2011). Stresni uvjeti potiču povećanu proizvodnju toksičnih derivata kisika koji mogu oštetiti stanice i izazvati smrt a kao odgovor na to biljke povećavaju proizvodnju antioksidacijskih molekula. Zanimljivo je kako dijelovi biljne stanice u kojima nastaje najviše reaktivnih oblika kisika (npr. reakcijsko središte fotosistema i apoplastni prostor) imaju izrazito slabe zaštitne mehanizme (Arora i sur., 2002).

1.3.1. Nastanak reaktivnih oblika kisika i prateći regulatorni mehanizmi

Molekularni kisik produkt je oksidacije vode u fotosintetskom transportnom lancu elektrona. Međutim, u transportnom lancu elektrona kisik se može koristiti kao akceptor elektrona pri čemu nastaje superoksidni radikal ($O_2^{\bullet -}$). Kisik koji se ne koristi kao akceptor elektrona asimilira se tijekom fotorespiracije u fosfoglikolat. Obje reakcije (nastajanje fosfoglikolata i nastajanje superoksidnog radikala) imaju negativne i pozitivne učinke. Nastali superoksidni radikal zbog svojeg djelovanja mora biti eliminiran pomoću zaštitnih antioksidacijskih mehanizama, dok se fosfoglikolat mora oksidirati do fosfoglicerata (kako bi mogao ponovno ući u Calvinov ciklus), pri čemu dolazi do značajnog gubitka asimiliranog ugljika. Osim toga, oksidacijom fosfoglikolata u fosfoglicerat, nastaju značajne količine vodikova preoksida (H_2O_2) u peroksisomima. Iako se većina vodikova peroksida metabolizira u kisik i vodu djelovanjem enzima katalaze, dio čini neizbježnu štetu dekarboksilacijom keto-kiselina (Arora i sur., 2002).

Nastanak singletnog kisika ($^1O_2$) i zaštitni mehanizmi uklanjanja

Primarni izvor nastanka singletnog kisika je klorofil. Singletni kisik može nastati i kao produkt aktivnosti enzima lipooksigenaze. Kao i hidroksilni radikal (OH•), singletni je kisik izrazito destruktivan jer reagira s većinom biološki važnih molekula. Životni vijek singletnog stanja pobuđenog klorofila izrazito je kratak (10^{-13} sekundi), ali varira u različitim fiziološkim uvjetima. Primarna uloga pobuđivanja klorofila u viša energetska stanja jest prijenos energije ili elektrona. Osim pobuđivanja klorofila u singletno stanje, postoje još dva mehanizma kojima on prelazi u viša energetska stanja – fluorescencija i konverzija klorofila u tripletno stanje. Oba mehanizma u svom putu, u interakciji s kisikom, proizvode singletni kisik.

Tilakoidne membrane razvile su dva mehanizma zaštite od razarajućeg djelovanja singletnog kisika. Prvi mehanizam uključuje regulaciju fotosistema kako bi se minimizirala mogućnost pobuđivanja klorofila u tripletno stanje, dok drugi mehanizam uključuje brzo „gašenje“ tripletnog stanja klorofila i singletnog kisika pomoću „gasitelja“ vezanih na tilakoidnu membranu. Dva su glavna procesa koja smanjuju životni vijek pobuđenog singletnog stanja klorofila: prvi uključuje fotokemijski i elektronski prijenos energije u reakcijsko središte, dok drugi uključuje gubitak (rasipanje) viška enegije u obliku topline (Arora i sur., 2002).

Nastanak superoksidnog radikala ($O_2^{\bullet-}$) i zaštitni mehanizmi uklanjanja

Superoksidni radikal najčešće nastaje u kloroplastima u transportnom lancu eletrona kada se molekularni kisik koristi kao akceptor elektrona. Tok elektrona između fotosistema I (PSI) i fotosistema II (PSII) regulira redukcijsku sposobnost PSI za koju su odgovorni su feredoksini, proteini koji sadrže sumpor i željezo. Zbog negativnog elektokemijskog potencijala feredoksini mogu donirati elektron molekularnom kisiku, što rezultira nastankom superoksidnog radikala. Većina nastalog superoksidnog radikala se pomoću enzima superoksid-dismutaze (SOD) pretvara u molekularni kisik i vodikov peroksid koji se zatim pomoću katalaze razgrađuje do molekularnog kisika i vode. Osim uz pomoć SOD superoksidni radikal se spajanjem s vodikovim kationom spontano raspada na vodikov peroksid i molekularni kisik. Superoksidni radikal može nastati i u mitohondrijima tijekom prijenosa elektrona (Arora i sur., 2002).

Nastanak vodikovog peroksida (H_2O_2) i zaštitni mehanizmi uklanjanja

Vodikov peroksid nastaje djelovanjem enzima SOD na superoksidni radikal. Osim toga, vodikov peroksid nastaje i spontanom reakcijom superoksidnog radikala s H^+. U stanicama lista, katalaza (enzim koji razgrađuje vodikov peroksid do vode i kisika) je lokalizirana samo u peroksisomima i nije nađena u kloroplastima. Kako je difuzija vodikovog peroksida u peroksisome izrazito spora reakcija, mala se količina nastalog vodikovog peroksida katalizira pomoću katalaze dok se u kloroplastima vodikov peroksid uklanja djelovanjem peroksidaza.

Nastanak hidroksilnog radikala (OH•) i zaštitni mehanizmi uklanjanja

Vodikov peroksid (H_2O_2) i superoksidni radikal ($O_2^{\bullet -}$) relativno su slabo reaktivni, ali mogu formirati reaktivne vrste poput hidroksilnog radikala (OH•) koji djeluje izrazito razarajuće na stanične komponente. Hidroksidni radikal poznat je po reakcijama lipidne peroksidacije i oštećenja strukture DNA koje stanicu vode u smrt.

1.3.2. Antioksidacijski sustavi u biljaka

Biljke posjeduju izrazito učinkovite sustave obrane kojima se brane od razarajućeg djelovanja reaktivnih oblika kisika. Obrambeni sustav nije ograničen samo na intracelularni prostor već je u manjim količinama raspoređen i u apoplastnom prostoru (Arora i sur., 2002).

Superoksid dismutaza (SOD)

Enzim superoksid dismutaza pripada skupini metalo-enzimskih katalaza koje disproporcioniraju superoksidni radikal do molekularnog kisika i vodikovog peroksida (Scandalios, 1993). Superoksid dismutaza uklanja superoksidni anion i time smanjuje mogućnost nastanka hidroksilnog radikala. Tri su najpoznattija izoenzima SOD najčešće zastupljena u biljnim organizmima: Mn-SOD (mangan-SOD), Cu/Zn-SOD (bakar/cink-SOD) i Fe-SOD (željezo-SOD). Mn-SOD se uglavnom nalazi u mitohondrijima i peroksisomima, no nađena je i u nekim citosolnim frakcijama (Hernandez i sur., 1994). Cu/Zn-SOD se također nalazi u mitohondrijima i peroksisomima (Hamilton i sur., 1996) dok je Fe-SOD uglavnom lokalizirana u kloroplastima, te u manjim količinama u citosolu, mitohondrijima i peroksisomima (Gomez i sur., 1999).

Askorbinska kiselina (vitamin C) i askorbat peroksidaza

Askorbinska kiselina u visokim je koncentracijama prisutna u kloroplastima, citosolu, vakuoli i apoplastu stanica lista u obliku soli askorbata. Ona je jedan od najvažnijih antioksidanasa u biljkama s glavnom ulogom uklanjanja vodikovog peroksida (Foyer i Noctor, 1998). Oksidacija aksorbinske kiseline odvija se u dva koraka; u prvom koraku nastaje mono-dehidro-askorbat koji se, ako ne dođe do ponovne redukcije u askorbinsku kiselinu, disproporcionira na dehidro-askorbat i askorbinsku kiselinu. Peroksidazna aktivnost askorbat peroksidaze uglavnom se odvija u kloroplastima i citosolu (Chen i Asada, 1989).

U kloroplastima se, zajedno s enzimom SOD, askorbat peroksidaza nalazi u dva oblika: vezana za tilakoidne mebrane te u slobodnom obliku. Zajedničkim djelovanjem SOD i askorbat peroksidaze, superoksidni radikal disproporcionira se djelovanjem SOD u vodikov peroksid i molekularni kisik, a zatim se nastali vodikov peroksid peroksidaznom aktivnošću askorbat peroksidaze reducira do vode. Askorbinska kiselina se u toj reakciji oksidira u mono-dehidro-askorbat koji se zatim djelovanjem dvaju enzima regenerira (oksidira) natrag do askorbinske kiseline: prvi enzim je mono-dehidro-askorbat reduktaza koja koristi NADPH kako bi reducirala mono-dehidro-askorbat do askorbinske kiseline. Drugi enzim dehidro-askorbat reduktaza koja direktno reducira mono-dehidro-askorbat do askorbinske kiseline koristeći eletrone iz fotosistemskog transportnog lanca elektrona.

Regeneracija askorbinske kiseline dodatni je mehanizam regulacije elektronskog transporta u kloroplastima. Askorbinska kiselina nije samo jaki antioksidans, već je uključena i u aktivnost fotosistema II ovisnu o pH vrijednosti (Arora i sur., 2002).

Glutation i glutation reduktaza

Glutation odnosno glutamil cisteinil glicin (GSH) najznačajniji je niskomolekularni tiol u većine biljaka. Uloga glutationa je reducirati disulfidne mostove kako bi se zaštitile tiolne skupine enzima i regenenrirala askorbinska kiselina. Osim toga ima važnu ulogu u „gašenju“ singletnog kisika i hidroksilnog radikala. U nekim biljkama, npr. mahunarkama, glutation je u potpunosti zamijenjen drugom vrstom izoenzima – homoglutationom (glutamil cisteinil alanin). Kao disulfidni reducens, glutation detoksicira herbicide reakcijom konjugacije, bilo spontano ili pomoću jedne od mnoštva glutation-S-transferaza, te regulira ekspresiju gena kao odgovor na okolišni stres i napad patogena (Kunert i sur., 1993).

Također, glutation sudjeluje u regeneraciji askorbinske kiseline pomoću enzima dehidro-askorbat reduktaze (DHA). U reakciji regeneracije askorbata glutation (GSH) se oksidira do glutation disulfida (GSSG). Pomoću enzima glutation reduktaze glutation disulfid se reducira do glutationa u NADPH-ovisnoj reakciji. Glutation i glutation reduktaza uglavnom se nalaze u kloroplastima, mitohondrijima i citosolu biljne stanice (Gomez i sur., 1999).

α-tokoferol (vitamin E) i karotenoidi

α-tokoferol snažan je antioksidans vezan za staničnu membranu koju štiti od razarajućeg djelovanja singletnog kisika, lipidnih peroksida, te superoksidnog i hidroksilnog radikala. Askorbinska kiselina i α-tokoferol izrazito su učinkoviti antioksidansi budući da su u normalnim fiziološkim uvjetima relativno slabi donori elektrona (Arora i sur., 2002).

Karotenoidi su, kao jedni od najznačajnijih biljnih pigmenata, izrazito učinkoviti „gasitelji“ singletnog kisika. Pritom nastaje ekscitirani triplet karotenoida koji svoju energiju otpušta u obliku topline. Još važnija uloga karotenoida je njihova sposobnost da direktno primaju ekscitiranu energiju elektrona od tripletnog klorofila i otpuštaju ju u obliku topline čime direktno štite fotosintetski aparat od oštećenja (Pevalek-Kozlina, 2003).

1.4. Metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta u uvjetima *in vitro*

Prirodni antioksidansi, prisutni u voću, povrću i drugim biljnim ekstraktima, privukli su veliku pozornost konzumenata i znanstvene zajednice, budući da epidemiološka istraživanja upućuju kako česta konzumacija prirodnih antioksidanasa smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti i tumora (Temple, 2000). Porastom interesa za antioksidanse i njihov utjecaj na ljudsko zdravlje, raste i broj metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta njihovih prirodnih izvora. Jedne od najpopularnijih metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta u uvjetima *in vitro* su kolorimetrijske metode (Vladimir-Knežević i sur., 2011).

Kolorimetrijske metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta temelje se na redoks reakcijama sintetičkih radikala i antioksidanasa prisutnih u raznim biljnim vrstama pri čemu dolazi do promjene boje reakcijske smjese (Vladimir-Knežević i sur., 2011). Prema mehanizmu djelovanja, odnosno prema vrsti kemijske reakcije koja se odvija između radikala i antioksidansa, antioksidacijske se metode dijele na dvije vrste: (I) metode temeljene na transferu vodikovih atoma (metode HAT) i (II) metode temeljene na transferu (jednog) elektrona (metode ET). Upravo je zbog različitog mehanizma reakcije u određivanju antioksidacijskog kapaciteta određene biljne vrste ili kemijske sastavnice potrebno provesti barem dvije metode s različitim mehanizmom reakcije (Huang i sur., 2005).

Metoda ABTS pripada skupini metoda HAT. Temelji se na „gašenju“ plavozelenog radikal kationa 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonske kiseline ($ABTS^{\bullet+}$ radikal-kationa), koji se formira kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a (Re i sur., 1999).

Metoda DPPH također pripada skupini metoda HAT. Temelji se na „gašenju“ ljubičaste otopine DPPH• radikala (2,2-difenil-pikrilhidrazil radikala) u prisutnosti antioksidansa (AH ili AOH) ili drugog radikala (R•) pri čemu dolazi do tvorbe neradikalnog oblika DPPH-H ili DPPH-R (Awah i sur., 2012).

Metoda FRAP pripada skupini metoda ET budući da se mehanizam reakcije temelji na redukciji bezbojnog Fe^{III}-TPTZ (TPTZ − 2,4,6-tripiridil-*s*-tirazin) kompleksa u intenzivno plavi Fe^{II}-TPTZ kompleks pri niskim pH vrijednostima (3,6) (Benzie i Strain, 1999).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanje je utvrditi utječe li i kako koncentracija saharoze u hranjivoj podlozi na količinu fenolnih spojeva (ukupnih fenola, tanina, flavonoida i antocijana) i antioksidacijski kapacitet ekstrakata smilja. Budući da su fenolni spojevi poznati po svojim antioksidacijskim svojstvima, očekuje se da će količina fenolnih spojeva direktno utjecati na antioksidacijski kapacitet. Metode koje će se koristiti za određivanje antioksidacijskog kapaciteta su ABTS, DPPH i FRAP.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. BILJNI MATERIJAL

Istraživanje je provedeno na komercijalno nabavljenom smilju (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don). Nakon rezanja vrhova izdanaka i sterilizacije biljnog tkiva eksplantati su bili uvedeni u kulturu *in vitro*.

3.1.1. Sterilizacija biljnog tkiva i umnožavanje u uvjetima *in vitro*

Vrhovi izdanaka smilja odrezani su na veličinu od 3 cm te sterilizirani u laminaru (komori s horizontalnim strujanjem sterilnog zraka) sljedećim redoslijedom:

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

Sterilizirani i na filtar-papiru osušeni eksplantati smilja zatim su nasađeni na hranjivu podlogu MS (Murashige i Skoog, 1962). Sastav hranjive podloge te koncentracije potrebnih makroelemenata, mikroelemenata i organskih dodataka prikazani su u Tablici 1.

Hranjiva podloga bila je pripremljena dan ranije otapanjem 4,4 g smjese soli za pripremu MS (Sigma-Aldrich, SAD) u 900 mL vode. U tu je smjesu dodano i 30 g saharoze. Nakon što se sav sadržaj otopio pomoću pH-metra izmjerena je pH vrijednost otopine te je po potrebi pomoću 0,1 M KOH ili 0,1 M HCl podešena na vrijednost 5,8. Uslijedilo je dodavanje agara (8 g/L) i nadopunjavanje čaše do 1000 mL (1 L). Dobivena otopina od 1 L zagrijavana je do vrenja kako bi se otopio sav agar. Vruća otopina zatim je prelivena u staklene epruvete (20 ml po epruveti), koje su potom začepljene vatom i aluminijskom folijom. Epruvete s pripremeljnom hranjivom podlogom i sav metalni pribor (pincete, skalpeli, aluminijske folije) sterilizirani su u autoklavu na 124 ºC pri tlaku od 1,5 MPa. Sterilizirane hranjive podloge i pribor čuvani su u sterilnoj komori do korištenja.

Biljni materijal nasađen na hranjive podloge razvijao se 30 dana u klima-komori u uvjetima dugog dana (16 sati svjetlosti, 8 sati tame) pod bijelom fluorescentnom rasvjetom (60 μmol fotona m^{-2} s^{-1}) i temperaturi od 24 ± 2 ºC.

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

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	mg dm^{-3}	μmol 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	mg dm^{-3}	μmol dm^{-3}
$FeSO_4$ x 7 H_2O	27,8	100,0
Na_2EDTA	37,3	100,0
ORGANSKI DODACI	mg dm^{-3}	μmol dm^{-3}
glicin	2,0	26,6
m-inozitol	100,0	500,0
nikotinska kiselina	0,5	4,1
piridoksin·HCl	0,5	2,4
tiamin·HCl	0,1	0,3

Nakon faze razvoja od 30 dana odrezani su dobro razvijeni izdanci visine 0,5 do 1 cm te u laminaru presađeni na svježu hranjivu podlogu MS uz dodatak različitih koncentracija regulatora rasta:

1. Kontrola: MS bez dodataka regulatora rasta (MS0)
2. MS + 1 mg/L BA
3. MS + 1 mg/L BA + 0,2 mg/L IBA
4. MS + 1 mg/L BA + 0,5 mg/L IBA

Nakon svakog presađivanja odnosno nasađivanja biljnog materijala, pincete i skalpeli su sterilizirani uranjanjem u alkohol i spaljeni na plameniku, a aluminijske folije su promijenjene. Kako bi se spaljeni pribor stigao ohladiti korištena su tri seta pribora. Novonasađeni biljni razvijao se u klima komori 30 dana u ranije spomenutim uvjetima.

3.1.2. Odabir odgovarajuće hranjive podloge za umnožavanje izdanaka smilja

Nakon trideset dana uzgoja na četiri različite hranjive podloge odabrana je hranjiva podloga na kojoj se razvilo najviše izdanaka sa zdravim listovima. Najpogodnijom se pokazala podloga MS + 1 mg/L BA + 0,5 mg/L IBA te su izdanci smilja dalje nasađivanu na tu podlogu. Dovoljan broj izdanaka za izvođenje pokusa dobiven je nakon dvije supkulture na odabranoj hranjivoj podlozi.

3.1.3. Odabir koncentracije saharoze

Izdanci smilja nasađivani su na podloge MS + 1 mg/L BA + 0,5 mg/L IBA uz dodatak različitih koncentracija saharoze: 1, 2, 3, 4, 5 i 6 %. Nakon trideset dana uzgoja na podlogama s različitim koncentracijama saharoze biljno je tkivo uzorkovano i liofilizirano u liofilizatoru (Alfa 1-2, Christ, Njemačka) kako bi se očuvala intaknost tkiva i kemijski sastav. Liofilizirano tkivo je čuvano u zamrzivaču na -20 ºC do uporabe. Neposredno prije izvođenja pokusa listići su odvojeni od stabljike.

3.2. METODE

Metode korištene za određivanje fenolnih spojeva su spektrofotometijske metode za određivanje antocijana, tanina, ukupnih fenola i flavonoida. Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta smilja također su korištene spektrofotometrijske metode ABTS, DPPH i FRAP.

3.2.1. Priprema biljnih ekstrakata

Od liofiliziranog tkiva smilja pincetom su odvojeni listići. Ekstrakcija listića vršila se u klimatiziranoj prostoriji u prethodno ohlađenom tarioniku (4 ºC) koji je položen na zamrznuti uložak prijenosnog hladnjaka. U tarionik se dodalo 20 mg liofiliziranih listića i 750 µL ohlađenog (4 ºC) 50 %-tnog etanola. Nakon što se homogenizacijom pomoću tučka dobila jednolika smjesa, ista je prelivena u označenu plastičnu tubicu od 1,5 mL koja je stajala na zamrznutom ulošku prijenosnog hladnjaka. Tarionik i tučak potom su isprani sa 750 µL 50 %-tnog etanola kako bi se prikupili ostatci homogeniranog tkiva. Isti postupak ponovljen je sa svim uzorcima. Inkubacija pripremljenih uzoraka odvijala se 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon hlađenja (2 minute u zamrzivaču) uzorci su centrifugirani u stolnoj centifugi Sigma 3K18 na 12 000 g pri 4 ºC tijekom 10 minuta. Supernatanti su preliveni u označene graduirane Eppendorf plastične tubice od 1,5 mL. Ukoliko je bilo potrebno volumen supernatanta u plastičnoj tubici nadopunjen je 50 %-tnim etanolom do 1,5 mL. Dobiveni uzorci korišteni su za spektrofotometrijsko određivanje antocijana, tanina, ukupnih fenola i flavonoida te za određivanje antioksidacijskog kapaciteta smilja.

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

U Eppendorf plastične tubice volumena 2 mL otpipetirano je 1580 µL destilirane vode, 20 µL ekstrakta listova smilja i 100 µL Folin-Ciocalteu (FC) reagensa. U slijepu probu je umjesto 20 µL ektrakta dodano 20 µL 50 %-tnog etanola. Svaki je uzorak kratko promućkan na mućkalici prije nego što je u smjesu dodano 300 µL Na_2CO_3 koncentracije 1,88 mol/L. Uzorci su potom promiješani na mućkalici i inkubirani 60 minuta na 45 ºC u vodenoj kupelji (uzorci su poprimili svijetloplavu boju). Sadržaj ukupnih fenola određen je spektrofotometrijski prema modificiranoj metodi Singleton i sur. (1999) koja se temelji na mjerenju apsorbancije reakcijske smjese pri valnoj duljini od 765 nm spektrofotometrom (Specord, Analytic Jena, Njemačka). Koncentracija fenolnih spojeva izračunata je na temelju baždarnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancije serije otopina galne kiseline (3-hidroksibenzojeva kiselina) u rasponu koncentracija od 0,2 do 2 mmol/L. Maseni udio fenola izražen u miligramima ekvivalenata galne kiseline po gramu suhe tvari uzorka (mg_{GAE}/g_{DW}) izračunat je prema sljedećoj formuli:

$$[\text{udio ukupnih fenola}] = \frac{A_{765} \times \text{F.R.} \times V_{RS}}{\varepsilon \times l \times m_{DW}} \quad [mg_{GAE}/g_{DW}] \qquad (1)$$

A_{765} − apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm
V_{RS} − volumen reakcijske smjese
F.R. − faktor razrjeđenja
ε – ekstinkcijski koeficijent galne kiseline = 1,1656 $mM^{-1}\,cm^{-1}$
l − duljina optičkog puta
m_{DW} − masa suhe tvari uzorka
GAE – ekvivalenti galne kiseline

3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje tanina

Određivanje tanina temelji se na uklanjanju tanina iz uzorka pomoću polivinilpolipirolidona (PVPP) koji na sebe veže tanine (nastaje talog), a u supernatantu nakon centrifugiranja ostaju slobodne fenolne kiseline. U Eppendorf plastičnoj tubici od 1,5 mL odvagano je 10 mg PVPP-a i dodano 100 µL destilirane vode te 100 µL ekstrakta listova smilja. Svi uzorci su kratko promućkani na mućkalici. Nakon mućkanja uslijedila je faza inkubacije od 60 minuta na sobnoj temperaturi. Centrifugiranjem na 15 000 *g* u trajanju od 10 minuta tanini su zajedno s PVPP-om oboreni u talog. Supernatant je preliven u plastičnu tubicu kako bi se mogao koristiti za daljnji dio pokusa u kojem je u uzorku spektrofotometrijski određena količina slobodnih fenolnih kiselina. U Eppendorf plastičnu tubicu otipipetira se 1540 µL destilirane vode, 60 µL ekstrakta (supernatanta) iz prethodnog koraka i 100 µL Folin-Ciocalteu (FC) reagensa. U slijepu probu je umjesto 60 µL ekstrakta dodan ekvivakentni volumen 50 %-tnog etanola. Nakon mućkanja u svaki je uzorak dodano 300 µL Na_2CO_3 koncentracije 1,88 mol/L. Daljnji koraci (mućkanje, inkubacija, spektrofotometrijsko mjerenje) identični su onima u spektrofotometrijskom određivanju ukupnih fenola. Maseni udio slobodnih fenolnih kiseline izračunat je pomoću sljedeće formule:

$$[\text{udio ukupnih fenola}] = \frac{A_{765} \times \text{F.R.} \times V_{RS}}{\varepsilon \times l \times m_{DW}} \quad [mg_{GAE}/g_{DW}] \qquad (2)$$

A_{765} − apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm
V_{RS} − volumen reakcijske smjese
F.R. − faktor razrjeđenja
ε – ekstinkcijski koeficijent galne kiseline = 1,1656 mM^{-1} cm^{-1}
l − duljina optičkog puta
m_{DW} − masa suhe tvari uzorka
GAE – ekvivalenti galne kiseline

Maseni udio tanina dobiven je oduzimanjem masenog udjela ukupnih fenola i slobodnih fenolnih kiselina prema formuli:

udio tanina = udio ukupnih fenola − udio fenola bez tanina $[mg_{GAE}/g_{DW}]$

3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida

Uzorci za određivanje flavonoida pripremljeni su u Eppendorf plastičnoj tubici od 1,5 mL u koje je redom dodano: 100 µL ekstrakta listova smilja, 20 µL 10 %-tnog aluminijeva klorida ($AlCl_3$), 500 µL 1 mol/L kalijeva acetata (CH_3CH_2COOK) i 380 µL destilirane vode. U slijepu probu je umjesto ekstrakta dodana ekvivalentna količina 50 %-tnog etanola. Svi uzorci su kratko promućkani i inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi. Spektorofotometrijsko mjerenje provedeno je na valnoj duljini od 420 nm. Koncentracija flavonoida u uzorcima izračunata je na temelju baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije niza otopina kvercetina (2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksikromen-4-on) poznatih koncentracija (Pouromorad i sur. 2006). Rezultati su izraženi u miligramima ekvivalenata kvercetina po gramu suhe tvari uzorka (mg_{QE}/g_{DW}) prema sljedećoj formuli:

$$[\text{udio flavonoida}] = \frac{A_{420} \times F.R. \times V_{RS}}{\varepsilon \times l \times m_{DW}} \left[mg_{QE}/g_{DW}\right] \quad (3)$$

A_{420} − apsorbancija pri valnoj duljini 420 nm
V_{RS} − volumen reakcijske smjese
F.R. − faktor razrjeđenja
ε – ekstinkcijski koeficijent kvercetina = 7,0979 mM^{-1} cm^{-1}
l − duljina optičkog puta
m_{DW} − masa suhe tvari uzorka
QE – ekvivalenti kvercetina

3.2.5. Spektrofotometrijsko određivanje antocijana

Uzorci su pripremljeni u Eppendorf plastičnoj tubici od 1,5 mL u koje je dodano 500 µL ekstrakta listova smilja, 500 µL 50 %-tnog etanola i 84 µL 37 %-tne klorovodične kiseline. U slijepu probu je umjesto ekstrakta dodana ekvivalentna količina 50 %-tnog etanola. Inkubacija se odvija 30 minuta na 60 ºC u vodenoj kupelji. Spektrofotometrijsko mjerenje provedeno je na valnoj duljini od 573 nm (Paiva i sur. 2003). Koncentracija antocijana određena je koristeći ekstinkcijski koeficijent cijanidin-3-glukozida (C3GE) ε = 26 900 mM^{-1} cm^{-1} (Lee i sur. 2008) i molekulsku masu (484,8 $gmol^{-1}$). Dobiveni rezultati izraženi su u miligramima ekvivalenata cijanidin-3-glukozida po gramu suhe tvari uzorka (mg_{C3GE}/g_{DW}) prema sljedećoj formuli:

$$[\text{udio antocijana}] = \frac{A_{573} \times \text{F.R.} \times M_r \times V_{RS} \times 1000}{\varepsilon \times l \times m_{DW}} \quad \left[mg_{C3GE}/g_{DW}\right] \qquad (4)$$

A_{573} − apsorbancija pri valnoj duljini 573 nm
V_{RS} − volumen reakcijske smjese
F.R. − faktor razrjeđenja
ε – ekstinkcijski koeficijent cijanidin-3-glukozida = 26 900 mM^{-1} cm^{-1}
M_r(C3GE) – molekulska masa cijanidin-3-glukozida = 484,8 $gmol^{-1}$
l − duljina optičkog puta
m_{DW} − masa suhe tvari uzorka
C3GE – ekvivalenti cijanidin-3-glukozida

3.2.6 Spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijskog kapaciteta smilja

Metoda ABTS (2,2'-Azinobis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid)

Metoda ABTS zasniva se na „gašenju“ plavozelenog radikal kationa 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonske kiseline (ABTS•$^+$ radikal-kationa), koji se formira kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize (Re i sur. 1999). Otopina neradikalnog oblika ABTS-a pripremljena je otapanjem reagensa ABTS u destiliranoj vodi (konačna otopina imala je koncentraciju od 7 mmol/L). Neradikalna otopina ABTS-a izrazito je nestabilna te je tikvicu s reagensom potrebno omotati aluminijskom folijom i čuvati u tami. Kako bi se pripremila otopina radikalnog oblika ABTS-a (ABTS•$^+$), otopina reagensa ABTS oksidirana je otopinom kalijeva peroksodisulfata ($K_2S_2O_8$, 140 mmol/L) i ostavljena 12 sati u tami na sobnoj temperaturi. Na dan analize otopina radikala ABTS•$^+$ razrijeđena je 96 %-tnim etanolom do konačne koncentracije radikala ABTS•$^+$ od 1 %, tako da je apsorbancija te otopine iznosila 0,70 ± 0,02.

Uzorci za određivanje antioksidacijskog kapaciteta pripremljeni su miješanjem 5 µL ekstrakta listova smilja i 1 mL otopine radikala ABTS•$^+$ u Eppendorf plastičnoj tubici od 1,5 mL. Prije mjerenja uzoraka izmjerena je apsorbancija slijepe probe u koju je dodan 1 mL 96 %-tnog etanola i 5 µL 50%-tnog etanola. Kontrolno (A_0) mjerene (u Eppendorf platičnoj tubici pomješan je 1 mL otopine radikala ABTS•$^+$ i 5 µL 50 %-tnog etanola) također je provedeno prije mjerenja uzoraka. Apsorbancija uzoraka mjerena je točno 6 minuta nakon pripreme na valnoj duljini od 734 nm. Postotak inhibicije radikala ABTS•$^+$ izračunat je prema formuli (Shirwaikar i sur. 2006):

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100 \qquad (5)$$

A_0 – apsorbancija kontrole (bez ekstrakta smilja)

A_t – apsorbancija uzorka (s ekstraktom smilja)

Apsorbancija kontrole (A_0) i apsorbancija uzoraka (A_t) iz prethodnog mjerenja korišteni su za preračunavanje postotka inhibicije u ekvivalente galne kiseline (mg_{GAE}/g_{DW}). Prema jednadžbi baždarnog pravca dobivenog na temelju mjerenja apsorbancija otopina galne kiseline u rasponu od 0,2 do 2 mmol/L dobivena je jednadžba za preračunavanje postotaka inhibicije $ABTS^{\bullet+}$ radikala u udio ekvivalenata galne kiseline:

$$[\text{udio ekvivalenata galne kiseline}] = \frac{[(A_0 - A_t)-(b)] \times V_{RS}}{m_{DW} \times a} \quad \left[mg/g_{DW}\right] \qquad (6)$$

A_0 – apsorbancija kontrole (bez ekstrakta smilja)
A_t – apsorbancija uzorka (s ekstraktom smilja)
b – odsječak baždarnog pravca na osi y
V_{RS} − volumen reakcijske smjese
m_{DW} − masa suhe tvari uzorka
a – nagib baždarnog pravca

Metoda DPPH (2,2-Diphenyl-Picrylhydrazyl)

Metoda DPPH se temelji na redukciji alkoholne otopine radikala DPPH• (2,2-difenil-pikrilhidrazil radikala) u prisutnosti antioksidansa (AH) ili radikala (R•) pri čemu dolazi do tvorbe neradikalnog oblika DPPH (DPPH-H). Budući da radikal DPPH• apsorbira na valnoj duljini od 517 nm, njegovom pretvorbom u neradikalni oblik, uslijed reakcije s antioksidansom dolazi do smanjenja apsorbancije. Smanjenje apsorbancije proporcionalno je aktivnosti istraživanog antioksidansa (Awah i sur., 2012).

Uzorci su pripremljeni u Eppendorf plastičnim tubicama od 1,5 mL pipetiranjem 950 µL 0,1 mmol/L otopine DPPH pripremljene u 96 %-tnom etanolu i 50 µL ekstrakta listova smilja. Nakon miješanja na mućkalici, uzorci su ostavljeni 30 minuta na sobnoj temperaturi. Za vrijeme inkubacije uzoraka pripremljene su slijepa proba (950 µL 96 %-tnog etanola i 50 µL 50 %-tnog etanola u Eppendorf plastičnoj tubici od 1,5 mL) i kontrola (A_0) (950 µL otopine DPPH i 50 µL 50 %-tnog etanola u Eppendorf plastičnoj tubici od 1,5 mL). Prije mjerenja apsorbancije uzoraka na valnoj duljini od 517 nm izmjerene su apsorbancija slijepe probe i kontrole. Reakcija uklanjanja radikala DPPH• nakon 30 minuta popraćena je promjenom boje reakcijske smjese iz intenzivno ljubičaste u žutu. Postotak inhibicije radikala DPPH• izračunat je prema formuli (Awah i sur., 2012) :

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100 \qquad (7)$$

A_0 – apsorbancija kontrole (bez ekstrakta smilja)
A_t – apsorbancija uzorka (s ekstraktom smilja)

Kao i kod metode ABTS postotci inhibicije radikala DPPH• preračunati su pomoću jednadžbe (6) i jednadžbe baždarnog pravca dobivenog na temelju mjerenja apsorbancija otopina galne kiseline u rasponu od 0,1 do 0,5 mmol/L u miligrame galne kiseline po gramu suhe tvari uzorka (mg_{GAE}/g_{DW}).

Metoda FRAP (Ferric reducing/Antioxidant power)

Metoda FRAP zasniva se na redukciji Fe^{III}-TPTZ (TPTZ − 2,4,6-tripiridil-*s*-tirazin) kompleksa u intenzivno plavi Fe^{II}-TPTZ kompleks pri niskim pH vrijednostima (3,6). Otopina radnog reagensa FRAP pripremljena je dan prije spektrofotometrijskog mjerenja miješanjem 75 mL acetanog pufera (c = 300 mmol/L, pH 3,6), 7,5 mL TPTZ otopine (miješanjem 50 mL 40 mmol/L klorovodične kiseline i 159,4 mg TPTZ reagensa, c = 10 mmol/L) i 7,5 mL otopine željezova (III) klorida ($c(FeCl_3)$ = 20 mmol/L). Na dan mjerenja reagens je zagrijan u vodenoj kupelji na 37 ºC u trajanju od 30 minuta.

Uzorci su pripremljeni prema prilagođenoj metodi Benzie i Strain (1999): u Eppendorf plastičnim tubicama od 1 mL otpipetirano je 792 µL reagensa FRAP i 8 µL ekstrakta listova smilja. Apsorbancije pripremljenih uzoraka mjerene su nakon 4 minute pri valnoj duljini od 593 nm. Slijepa proba pripremljena je u Eppendrof plastičnoj tubici od 1 mL pipetiranjem 792 µL reagensa FRAP bez TPTZ-a (10 mL acetatnog pufera + 1 mL 40 mmol/L HCl + 1 mL $FeCl_3$) i 8 µL 50 %-tnog etanola te je zajedno s kontrolom (792 µL FRAP reagensa i 8 µL 50 %-tnog etanola) izmjerena njihova apsorbancija prije samih uzoraka. Postotak redukcije Fe^{III}-TPTZ-a u Fe^{II}-TPTZ izračunat je prema formuli:

$$\% \text{ redukcije} = \frac{A_x - A_0}{A_x} \times 100 \qquad (8)$$

A_x – apsorbancija uzorka (s ekstraktom smilja)
A_0 – apsorbancija kontrole (bez ekstrakta smilja)

Apsorbancija kontrole (A_0) i apsorbancija uzoraka (A_x) iz prethodnog mjerenja korišteni su za preračunavanje postotka redukcije u ekvivalente reduciranog željezova (II) kationa (Fe^{2+} kationa). Prema jednadžbi baždarnog pravca dobivenog na temelju mjerenja apsorbancija otopina željezova (II) sulfata heptahidrata ($FeSO_4 \times 7H_2O$) u rasponu od 3 do 5 mmol/L dobivena je sljedeća jednadžba za preračunavanje postotaka redukcije u ekvivalente željezova (II) kationa:

$$[\text{ekvivalenti } Fe^{2+} \text{ kationa }] = \frac{[(A_x - A_0)-(b)] \times V_{RS}}{m_{DW} \times a} \quad \left[mg_{Fe^{2+}}/g_{DW}\right] \qquad (9)$$

A_x – apsorbancija uzorka (s ekstraktom smilja)
A_0 – apsorbancija kontrole (bez ekstrakta smilja)
b – odsječak baždarnog pravca na osi y
V_{RS} − volumen reakcijske smjese
m_{DW} − masa suhe tvari uzorka
a – nagib baždarnog pravca

3.2.7. Statistička obrada podataka

Pri obradi podataka korišten je računalni program Microsoft Excel 2007. Usporedba dobivenih rezultata provedena je analizom varijance (one-way ANOVA) te naknadnim Tuckey HSD testom pomoću računalnog programa STATISTICA 12 (StatSoft Inc., SAD). Statistički značajnim podacima smatrani su rezultati koji se razlikuju na razini $P \leq 0,05$.

4. REZULTATI

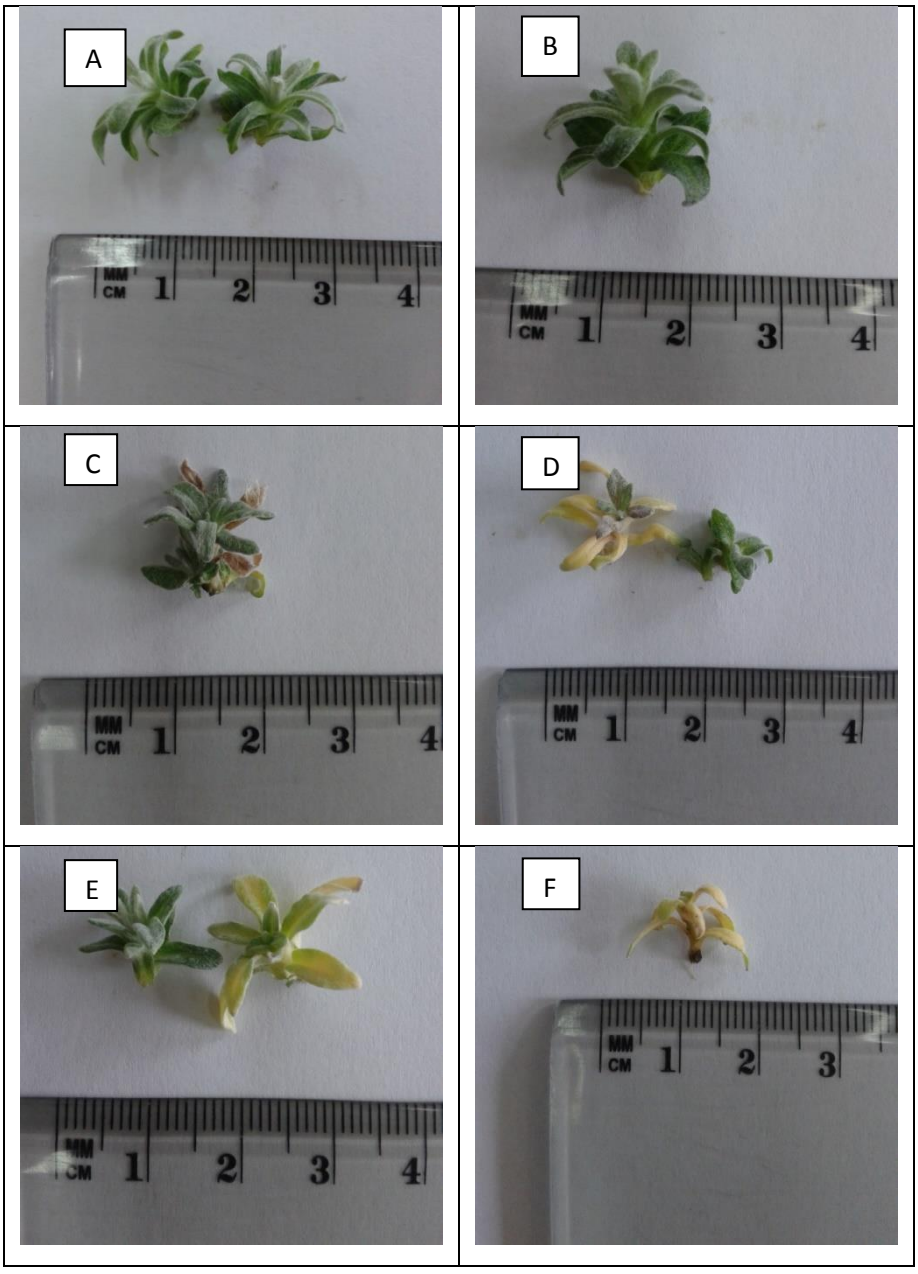
4.1. Kultura smilja u uvjetima *in vitro*

4.1.1. Uspostavljanje kulture i odabir odgovarajuće hranjive podloge

Primarni eksplatati smilja (vršni pupovi), uzimani od komercijalno nabavljene matične biljke, sterilizirani su i potom nasađeni na hranjivu podlogu MS bez ili s dodatkom regulatora rasta benzilaminopurina (BA) i indol-3-maslačne kiseline (IBA). Na hranjivoj podlozi bez dodatka regulatora rasta (MS0) iz pupova su se razvili svi vegetativni organi: korijen, stabljika i listovi bez nastanka kalusnog tkiva. Na hranjivim podlogama s dodatkom regulatora rasta redovito se razvijalo kalusno tkivo. Najbolja diferencijacija kalusnog tkiva u vegetativne organe dobivena je na podlozi s dodatkom 1 mg/L BA i 0,5 mg/L IBA gdje su se nakon 30 dana uzgoja razvili izdanci čije su rozete bile bogate listovima. Obzirom da su se na ovoj podlozi razvijali najbrojniji i najbolji izdanci odabrana je za daljne umnožavanje. Kroz dvije supkultutre dobivena je dovoljna količina biljnog materijala za daljnja istraživanja. Ostale hranjive podloge imale su manji broj izdanaka koji nisu bili zadovoljavajuće visine.

4.1.2. Učinak koncentracije saharoze na razvoj izdanaka smilja

Prethodno umnoženi izdanci nasađeni su na podlogu MS uz dodatak različitih koncentracija saharoze u rasponu od 1 % do 6 %. Izdanci koji su se razvijali na hranjivim podlogama s dodatkom 1 % do 3 % saharoze morfološki se nisu međusobno značajno razlikovali (Slika 4. A – C), dok su izdanci koji su se razvijali na hranjivim podlogama s dodatkom 4 % do 6 % saharoze bili nižeg rasta, a listovi su povećanjem koncentracije saharoze vidljivo gubili zelenu boju i prelazili u zelenožutu (Slika 4. D – F). Nakon 30 dana uzgoja na hranjivim podlogama, izdanci su bili odijeljeni od kalusnog tkiva te liofilizirani u liofilizatoru.

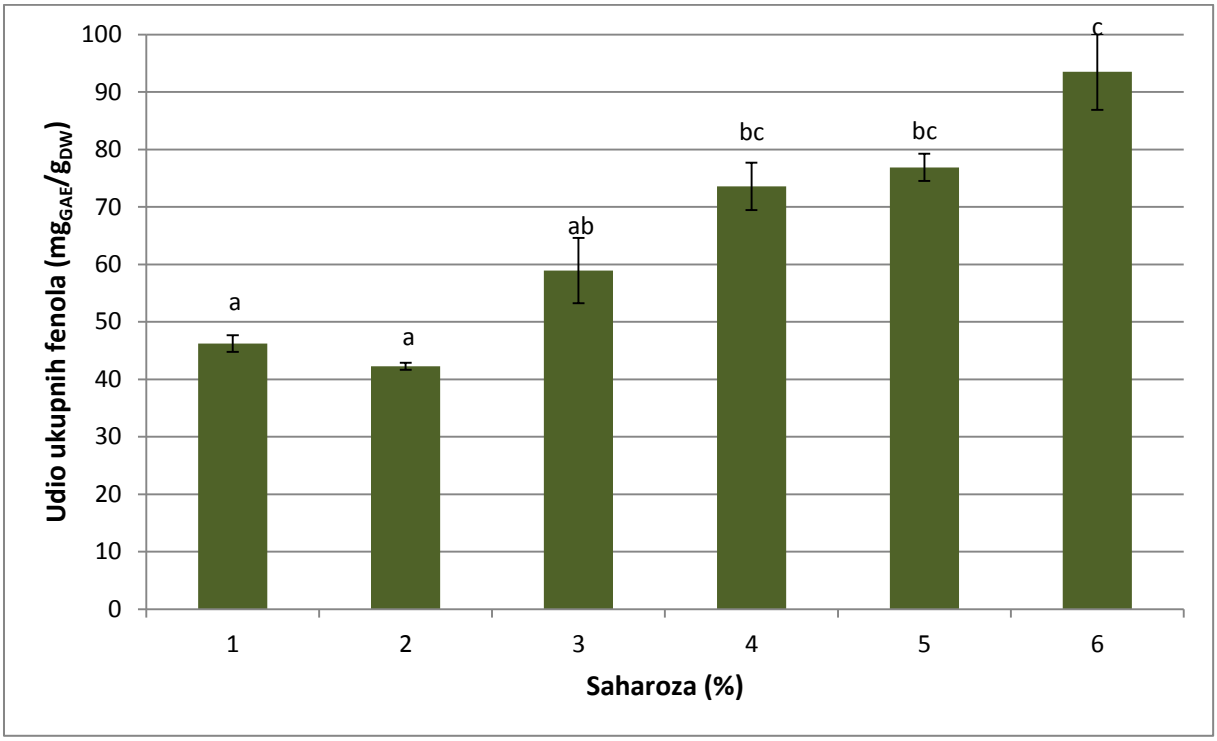


Slika 4. Biljni materijal nakon 30 dana uzgoja na hranjivoj podlozi (MS + BA 1 mg/L + IBA 0,5 mg/L) s dodatkom (A) 1 % saharoze, (B) 2 % saharoze, (C) 3 % saharoze, (D) 4 % saharoze, (E) 5 % saharoze, (F) 6 % saharoze.

4.2. Učinak koncentracije saharoze na udio fenolnih spojeva u listovima smilja

4.2.1. Udio ukupnih fenola

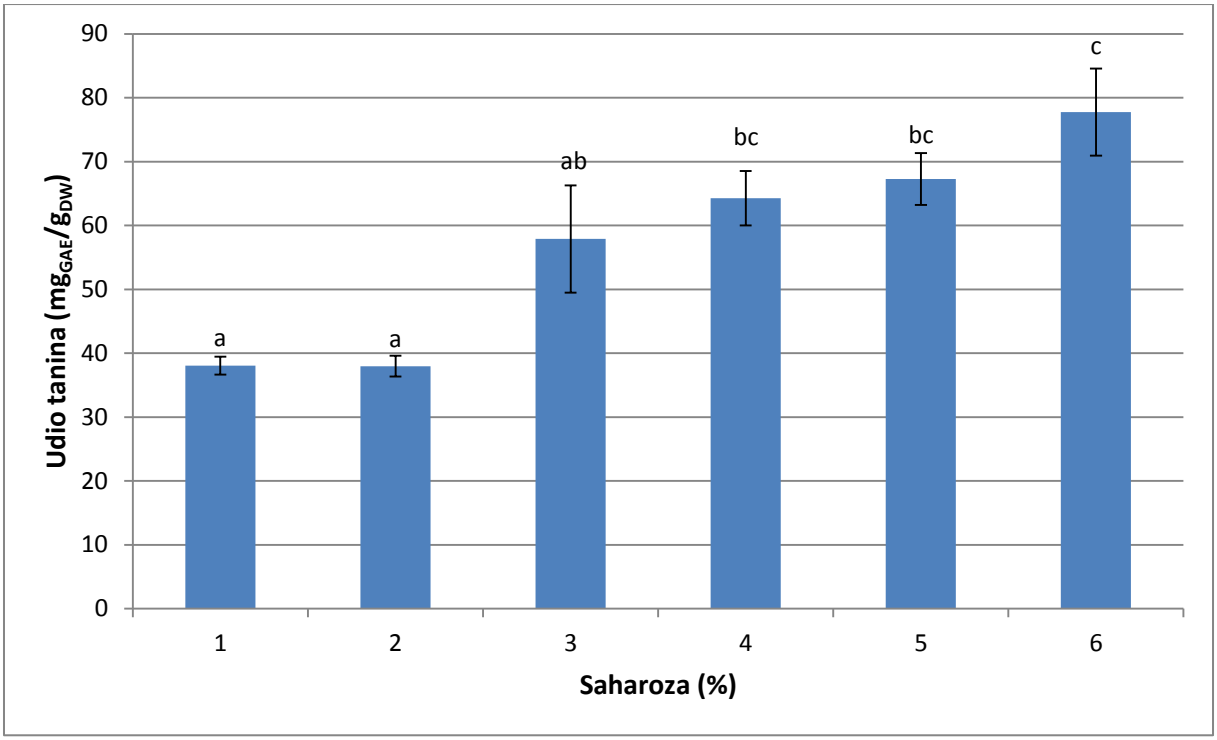
Udio ukupnih fenola u listovima smilja uzgojenog u uvjetima *in vitro* povećava se s porastom koncentacije saharoze u hranjivoj podlozi. Najniži udio ukupnih fenola zabilježen je u biljkama uzgojenim na hranjivoj podlozi s dodatkom 2 % saharoze (42,26 mg_{GAE} /g_{DW}), dok je najviši sadržaj (93,50 mg_{GAE}/g_{DW}) izmjeren u biljkama uzgojenim na podlozi s dodatkom 6 % saharoze. Tretmani od 1 % do 3 % saharoze međusobno ne pokazuju značajanu promjenu sadržaja ukupnih fenola u listovima smilja. Isto tako, nije uočena značajnija razlika u sadržaju ukupnih fenola u tretmanima 4 % do 6 % saharoze (Slika 5.). Značajan porast sadržaja ukupnih fenola u odnosu na listove uzgojene na dvije najniže koncentracije saharoze uočava se tek na tretmanima sa 4 % do 6 % saharoze.



Slika 5. Udio ukupnih fenola (mg_{GAE}/g_{DW}) u smilju uzgojenom u uvjetima *in vitro*. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti najmanje četiri replike ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima (a, b, c) međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$).

4.2.2. Udio tanina

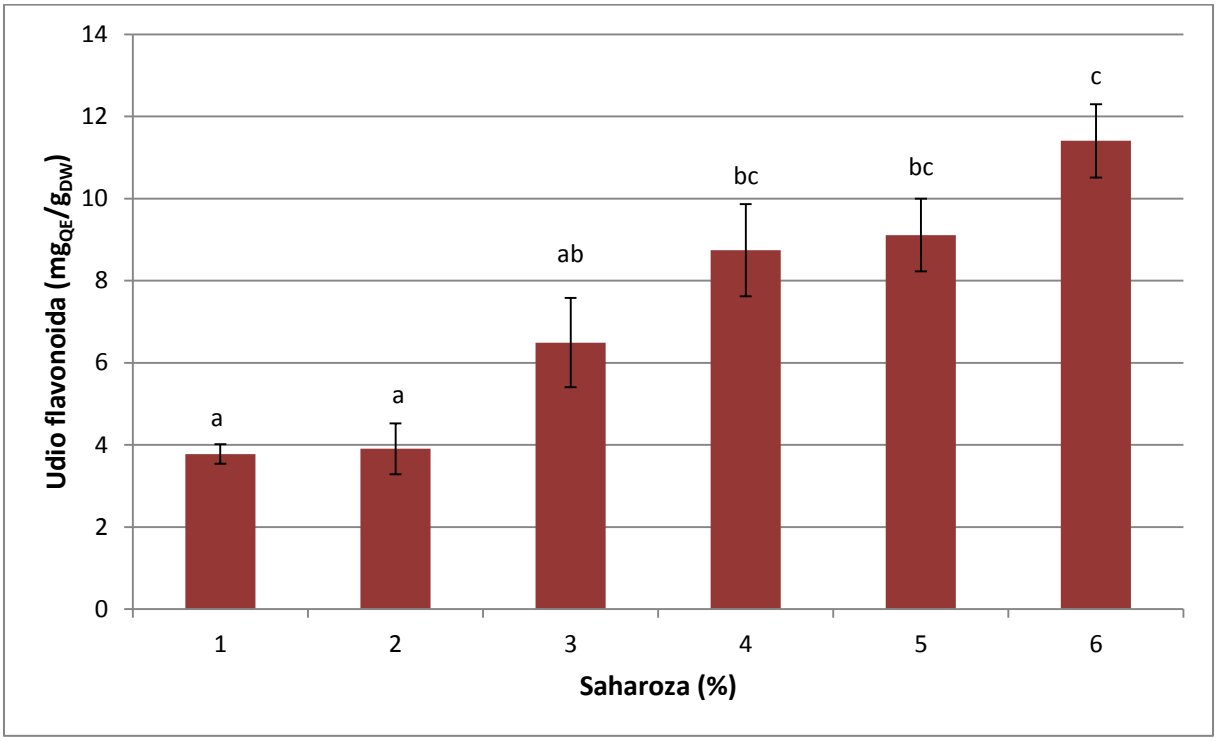
Udio tanina u listovima smilja raste s porastom koncentracije saharoze u hranjivoj podlozi. Najniža vrijednost udjela tanina izmjerena je u biljkama uzgojenim na podlozi s 2 % saharoze (37,98 mg_{GAE} /g_{DW}), dok je najviša vrijednost udjela tanina izmjerena u biljkama uzgojenim na podlozi sa 6 % saharoze (77,75 mg_{GAE} /g_{DW}). Na podlogama od 1 % do 3 % saharoze udio tanina se međusobno nije značajno razlikovao, a to je isto opaženo na podlogama sa 4 % do 6 % saharoze (Slika 6.). Kao i kod ukupnih fenola, značajniji porast udjela tanina uočava se tek u biljaka uzgojenih na hranjivoj podlozi sa 4 % saharoze.



Slika 6. Udio tanina (mg_{GAE}/g_{DW}) u smilju uzgojenom u uvjetima *in vitro*. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti najmanje četiri replike ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima (a, b, c) međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$).

4.2.3. Udio flavonoida

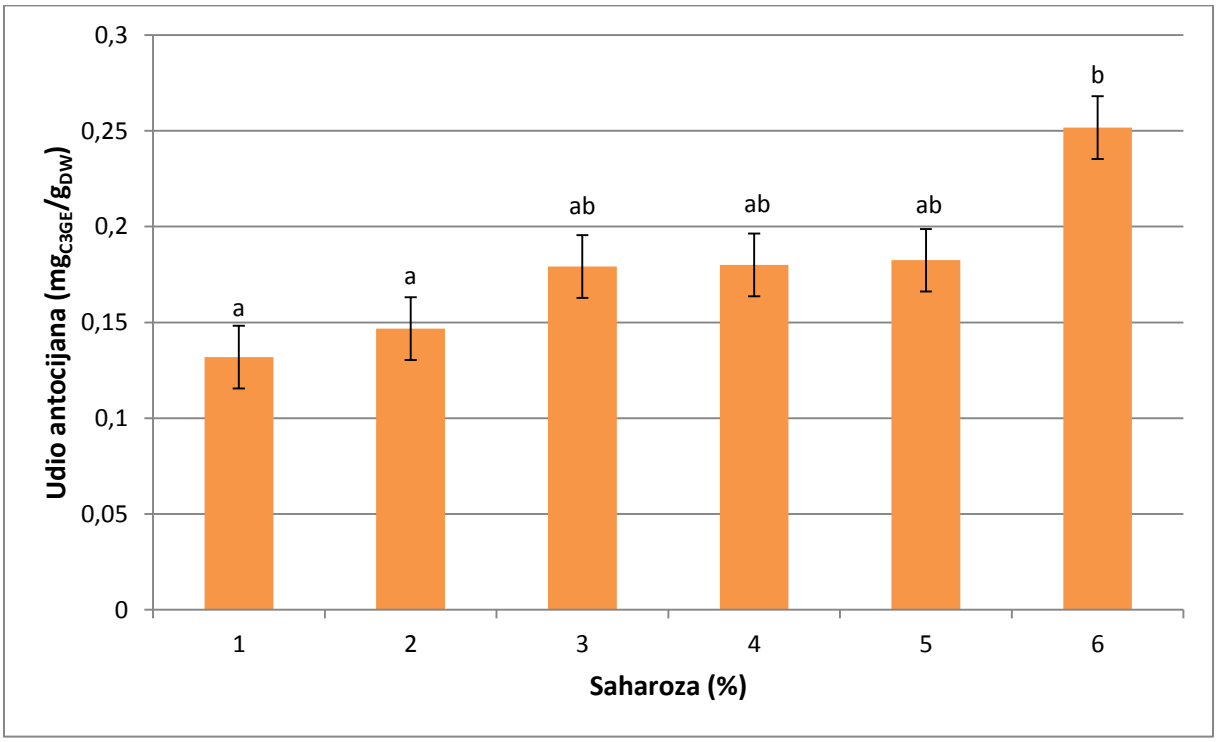
Udio flavonoida u listovima smilja kontinuirano raste s porastom koncentracije saharoze u hranjivoj podlozi. Najniža vrijednost udjela flavonoida izmjerena je u biljkama uzgojenim na hranjivoj podlozi s 1 % saharoze (3,77 mg_{QE} /g_{DW}), dok je najviša vrijednost izmjerena na 6 % saharoze (11,40 mg_{QE}/g_{DW}). Udio flavonoida nije se međusobno značajno razlikovao na podlogama s dodatkom 1 % do 3 % saharoze, te na podlogana sa 4 % do 6 % saharoze (Slika 7.). Uspoređujući udjele flavonoida u biljkama uzgojenim na dvije najniže koncentracije saharoze (1 i 2 %), s udjelom flavonoida u biljkama uzgojenim na podlogama koje su sadržavale više koncentracije saharoze uočljiv je značajan porast na podlogama s 5 % i 6 % saharoze. Udio flavonoida je u tretmanu sa 6 % saharoze čak 3,023 puta veći od tretmana s 1 % saharoze. Flavonoidi su u listovima smilja zastupljeni u količini oko 8,4 puta manjoj od količine tanina.



Slika 7. Udio flavonoida (mg_{QE} /g_{DW}) u smilju uzgojenom u uvjetima *in vitro*. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti najmanje četiri replike ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima (a, b, c) međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$).

4.2.4. Udio antocijana

Udio antocijana najniži je od ostalih izmjerenih fenolnih spojeva (tanina i flavonoida). U listovima smilja udio antocijana kontinuirano raste s porastom koncentracije saharoze u hranjivoj podlozi. Najniža vrijednost udjela antocijana izmjerena je u biljkama uzgojenim na 1 % saharoze (0,132 mg_{C3GE} /g_{DW}), a najviša vrijednost u biljkama uzgojenim na hranjivoj podlozi sa 6 % saharoze (0,251 mg_{C3GE} /g_{DW}). Zanimljivo je da u tkivu listova smilja na podlogama s 1 % do 5 % saharoze nije bilo značajne promjene udjela antocijana. Također, na koncentracijama saharoze od 3 % do 5 % uočen je kontinuiran porast udjela antocijana koji nije bio statistički značajan. Statistički značajan porast udjela antocijana uočen je samo između biljaka uzgojenih na hranjivoj podlozi s dodatkom dvije najniže koncentracije saharoze (1 i 2 %) i one s dodatkom 6 % saharoze (Slika 8).

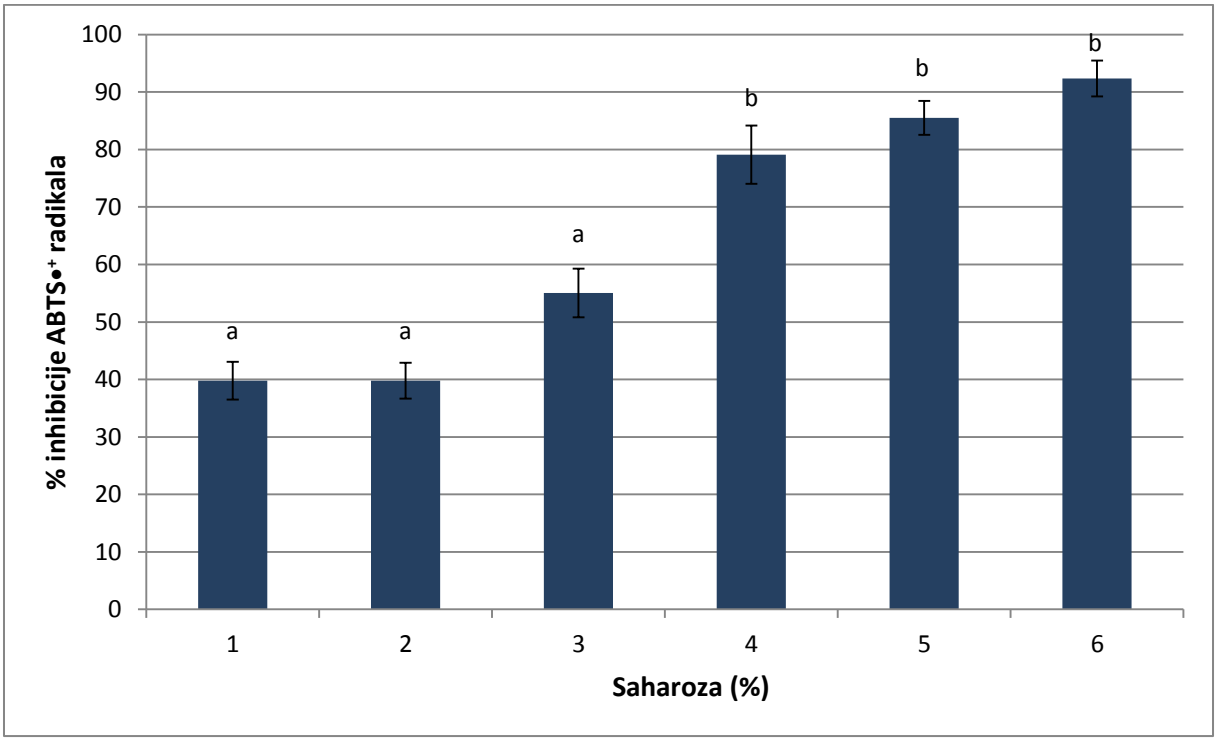


Slika 8. Udio antocijana (mg_{C3GE}/g_{DW}) u smilju uzgojenom u uvjetima *in vitro*. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti najmanje četiri replike ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima (a, b, c) međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$).

4.3. Utjecaj koncentracije saharoze na antioksidacijski kapacitet smilja

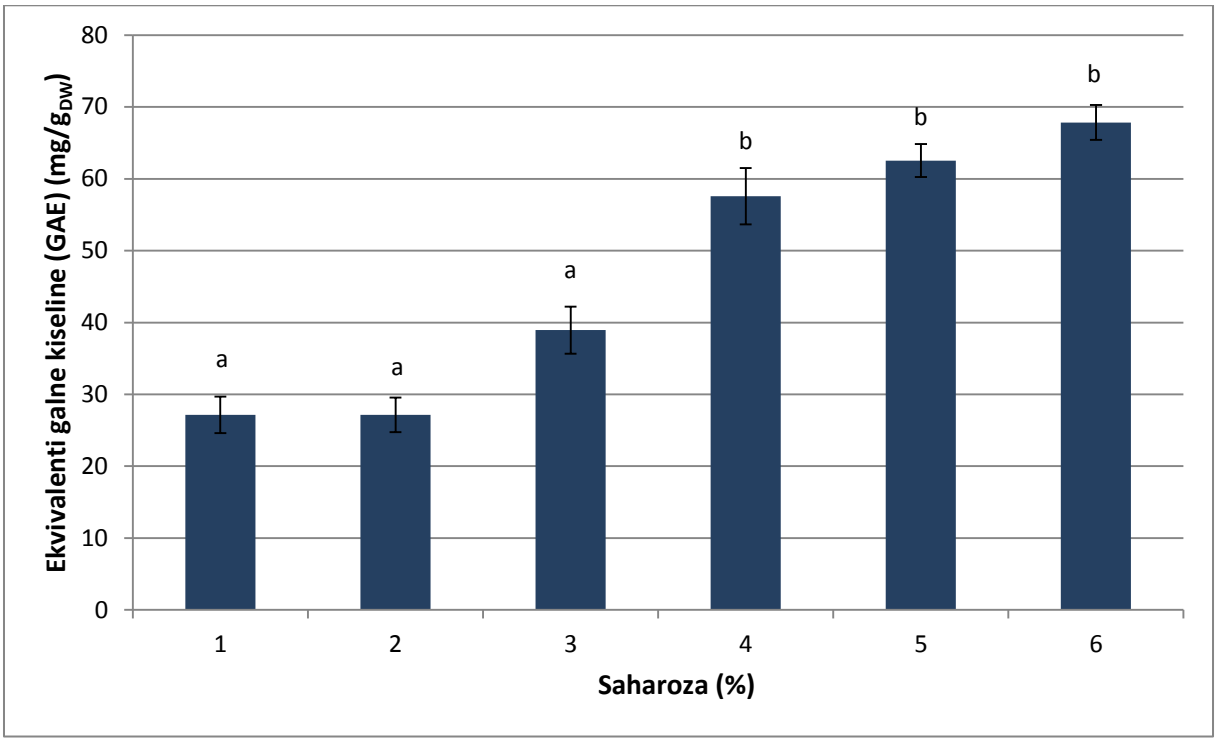
4.3.1. Metoda ABTS

Porastom koncetracije saharoze u hranjivoj podlozi raste i antioksidacijski kapacitet listova smilja prema metodi ABTS. Najnižu sposobnost inhibicije radikala ABTS•$^{+}$ pokazuju biljke uzgojene na podlozi s 1 % (39,78 %) i 2 % saharoze (39,77 %). Statistički značajan porast antioksidacijskog potencijala primjećen je u biljaka uzgajanih na hranjivim podlogama s dodatkom 4 do 6 % saharoze, dok je najviši potencijal inhibicije radikala ABTS•$^{+}$ primjećen u biljkama koje su uzgajane na podlozi sa 6 % saharoze (92,35 %) (Slika 9.). Biljke uzgajane na podlogama s 1 % do 3 % saharoze međusobno ne pokazuju značajnu razliku antioksidacijskog kapaciteta. Isto je opaženo za biljke uzgajane na podlogama sa 4 % do 6 % saharoze.



Slika 9. Antioksidacijski kapacitet smilja uzgojenog na podlogama s različitim koncentracijama saharoze izražen kao postotak inhibicije radikala ABTS•$^{+}$. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti najmanje četiri replike ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima (a, b, c) međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$).

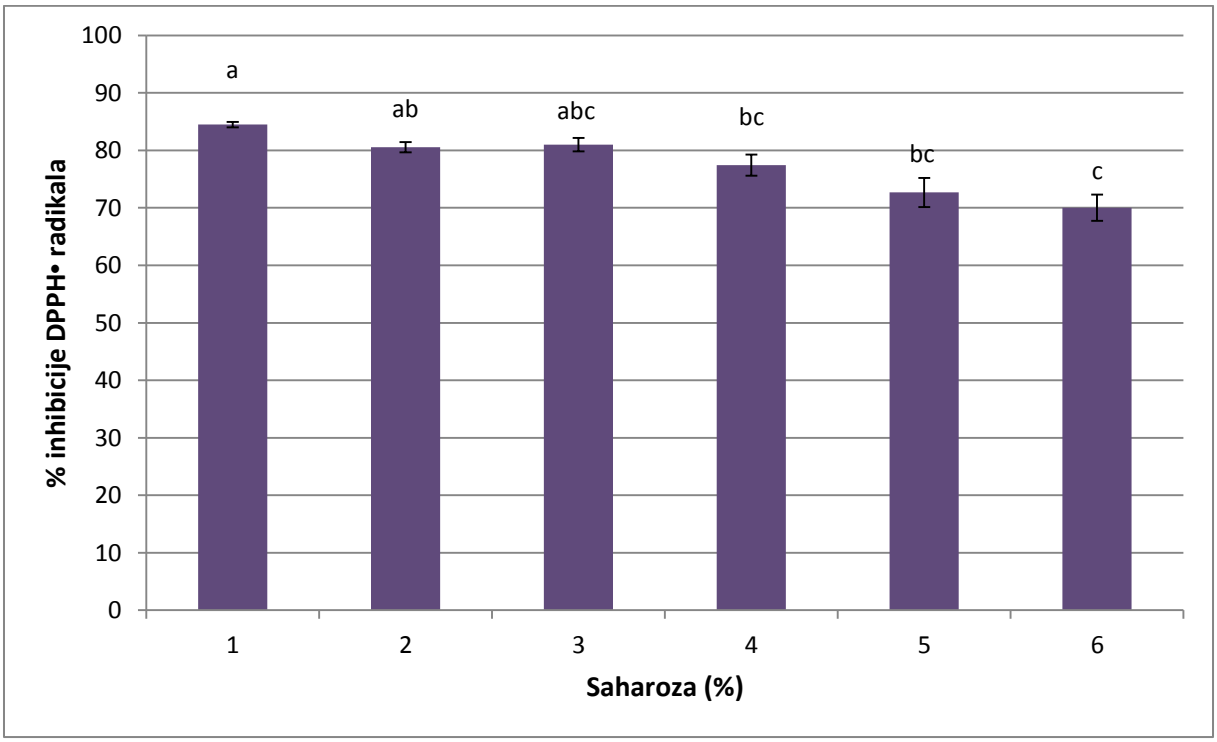
Ovisnost antioksidacijskog potencijala etanolnog ekstratkta listova smilja uzgojenih na hranjivoj podlozi u uvjetima *in vitro* u ovisnosti o koncentraciji saharoze u hranjivoj podlozi prikazana je na slici 10. pri čemu su rezultati izraženi u ekvivalentima galne kiseline (GAE). Jednako kao i na slici 9, gdje je antioksidacijski potencijal izražen u postotcima inhibicije radikala $ABTS^{\bullet+}$, vidljivo je da s porastom koncentracije saharoze u podlozi raste i količina ekvivalenata galne kiseline u pojedinim tretmanima. Zanimljivo je da tretmani s 1 % i 2 % saharoze pokazuju podjednako nisku količinu ekvivalenata galne kiseline (27,14 mg/g_{DW}), dok najvišu količinu ekvivalenata galne kiseline pokazuje tretman sa 6 % saharoze u hranjivoj podlozi (67,83 mg/g_{DW}). Značajna razlika ekvivalenata galne kiseline uočava se između biljaka s 3 % i 4 % saharoze u hranjivoj podlozi. Daljnje povećanje koncentracije saharoze u hranjivoj podlozi rezultiralo je daljnjim rastom količine ekvivalenata galne kiseline pri čemu taj porast nije bio statistički značajan.



Slika 10. Antioksidacijski kapacitet smilja uzgojenog na podlogama s različitim koncentracijama saharoze izražen u ekvivalentima galne kiseline (GA). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti najmanje četiri replike ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima (a, b, c) međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$).

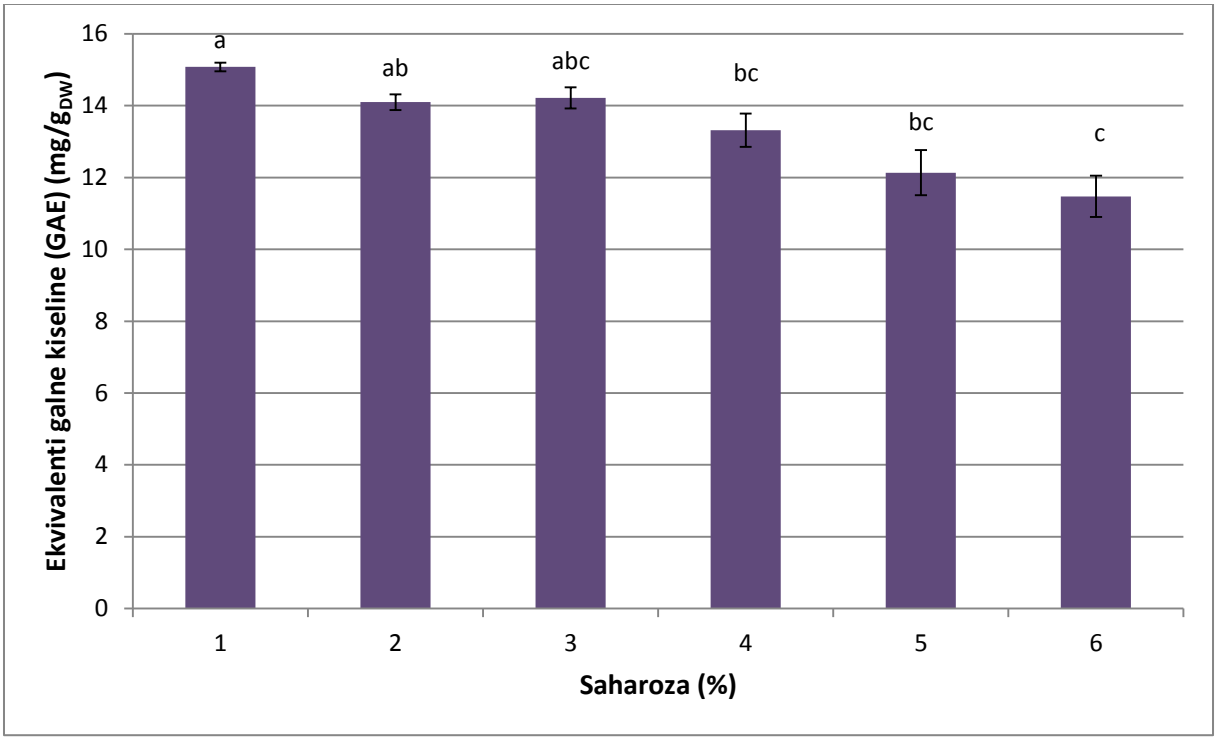
4.3.2. Metoda DPPH

Porastom koncentracije saharoze u hranjivoj podlozi smanjuje se antioksidacijski kapacitet smilja prema metodi DPPH (Slika 11.). Najmanju sposobnost inhibicije radikala DPPH• pokazuju biljke uzgojene na hranjivoj podlozi sa 6 % saharoze (70,02 %), dok najveću sposobnost inhibicije imaju biljke uzgajane na hranjivoj podlozi s 1 % saharoze (84,48 %). Značajan pad postotka inhibicije radikala DPPH• uočava se između biljaka uzgajanih na hranjivoj podlozi s 1 % i biljaka uzgajanih na podlozi sa 4 % saharoze. Zanimljivo je da metoda ABTS (Slika 9.) i metoda DPPH (Slika 11.) daju suprotne rezultate antioksidacijskog kapaciteta smilja, iako oba radikala imaju jednaki mehanizam reakcije s antioksidansima.



Slika 11. Antioksidacijski kapacitet smilja uzgojenog na podlogama s različitom koncentracijom saharoze izražen kao postotak inhibicije radikala DPPH•. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti najmanje četiri replike ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima (a, b, c) međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$).

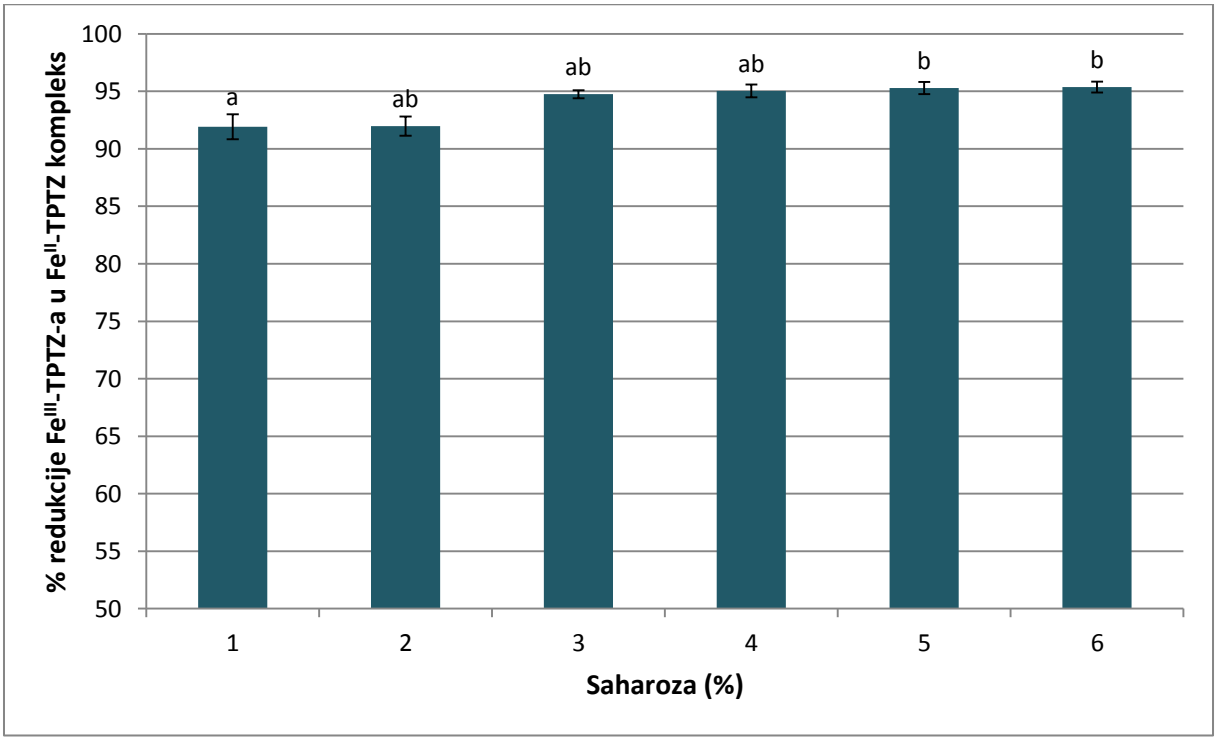
Jednako kao i kod metode ABTS, postotci inhibicije radikala (DPPH•) preračunati su u ekvivalente galne kiseline (Slika 12.). Najnižu količinu ekvivalenata galne kiseline pokazuju biljke uzgajane na 6 % saharoze (11,47 mg/g_{DW}), dok najvišu pokazuje one na 1 % saharoze (15,08 mg/g_{DW}). Kao i kod postotka inhbicije radikala DPPH• (Slika 11.), značajan pad količine ekvivalenata galne kiseline uočava se između biljaka uzgajanih na 1 % i onih na 4 % saharoze.



Slika 12. Antioksidacijski kapacitet smilja uzgojenog na podlogama s različitim koncentracijama saharoze izražen u ekvivalentima galne kiseline (GAE). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti najmanje četiri replike ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima (a, b, c) međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$).

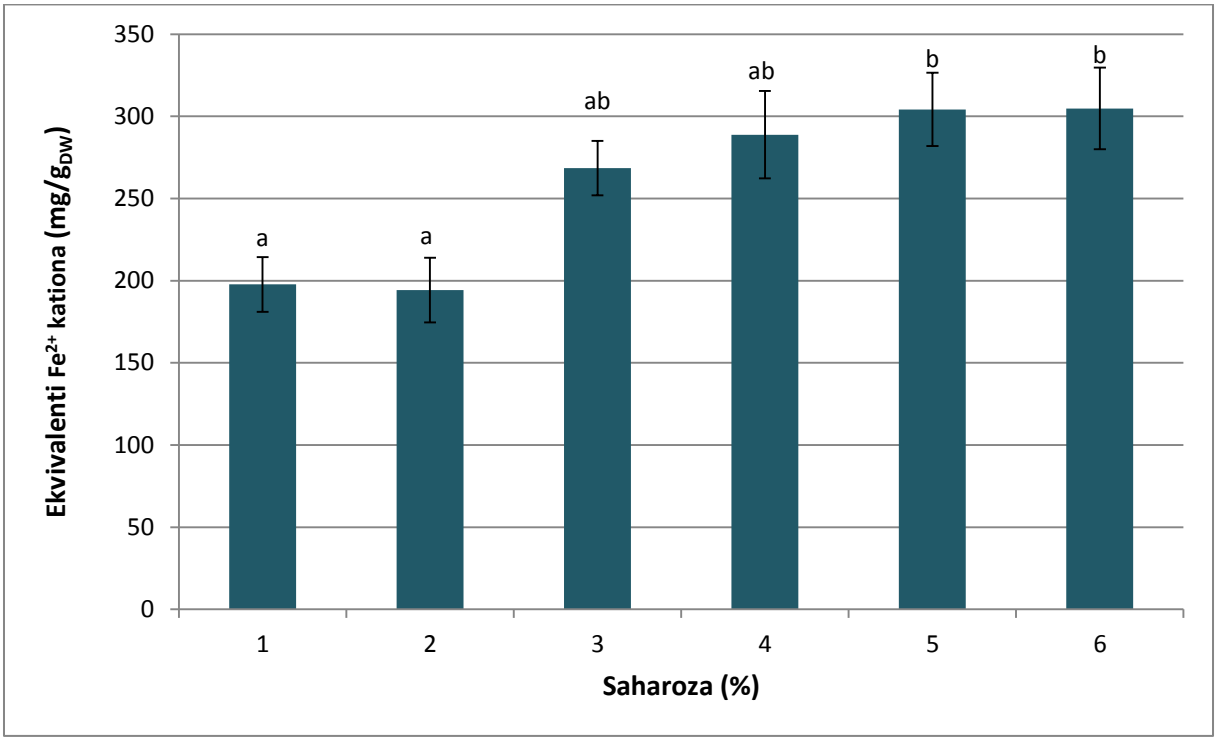
4.3.3. Metoda FRAP

Porastom koncentracije saharoze u hranjivoj podlozi povećava se i antioksidacijski kapacitet listova smilja prema metodi FRAP. Smilje uzgajano na svim istraženim koncentracijama saharoze pokazuje izrazito visoke vrijednosti redukcije Fe^{III}-TPTZ-a u Fe^{II}-TPTZ kompleks (Slika 13.). Vrijednosti postotka redukcije na svim je tretmanima viša od 90 %. Najnižu vrijednost postotka redukcije Fe^{III}-TPTZ-a pokazuju biljke uzgojene na hranjivoj podlozi s 1 % saharoze (91,91 %), a navišu vrijednost one na podlozi sa 6 % saharoze (95,37 %). Zbog visokog postotka redukcijske sposobnosti svih tretmana, značajan porast redukcije Fe^{III}-TPTZ-a uočava se tek na petom tretmanu (Slika 13). Uspoređujući rezultate metode FRAP s metodama ABTS i DPPH uočava se porast antioksidacijskog kapaciteta smilja na većini tretmana. Također, rezultati metode FRAP bliži su rezultatima metode ABTS (Slika 9.) nego rezultatima metode DPPH (Slika 11.).



Slika 13. Antioksidacijski kapacitet smilja uzgojenog na podlogama s različitim koncentracijama saharoze izražen u postotcima redukcije Fe^{III}-TPTZ-a u Fe^{II}-TPTZ kompleks. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti najmanje četiri replike ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima (a, b, c) međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$).

Kod metode FRAP postotci inhibicije (redukcije) se umjesto u ekvivalente galne kiseline, kao kod metoda ABTS (Slika 10.) i DPPH (Slika 12.), preračunavaju u ekvivalente reduciranog željezova (II) kationa (Slika 14.). Sposobnost redukcije kationa metala također je dobar pokazatelj antioksidacijskog kapaciteta. Najnižu vrijednost ekvivalenata željezova (II) kationa pokazuju biljke na 2 % saharoze (194,35 mg_{Fe}^{2+}/g_{DW}), dok najvišu vrijednost pokazuju one na 6 % saharoze u hranjivoj podlozi (304,75 mg_{Fe}^{2+}/g_{DW}). Kao i kod rezultata s postotkom redukcije (Slika 13.) značajan porast ekvivalenata željezova (II) kationa uočava se na 5 % saharoze.



Slika 14. Antioksidacijski kapacitet smilja uzgojenog na podlogama s različitim koncentracijama saharoze izražen u ekvivalentima željezova (II) kationa (Fe^{2+} kationa). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti najmanje četiri replike ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima (a, b, c) međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$).

5. RASPRAVA

Primorsko smilje (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) je izrazito cijenjena biljka zbog svojeg eteričnog ulja koje blagotovorno djeluje na ljudsko zdravlje. Suvremeni tržišni trendovi sve veće potražnje ljekovitog i aromatičnog bilja često imaju za posljedicu nekontrolirano branje i sakupljanje čime se utječe na postupni nestanak samonikolog bilja, pa tako i smilja, na njegovim staništima. Kako je nepravilno branje i sakupljanje smilja u kopnenom dijelu Dalmacije i na otocima (Krk, Pag) dovelo do katastrofalnih posljedica, tako je od posebne važnosti razmotriti mogućnost uvođenja ove biljke u poljoprivrednu proizvodnju. Smilje pripada kategoriji zaštićenih biljaka NN (7/06 i 99/09), te je za njegovo skupljanje potrebno ishoditi odgovarajuće dopuštenje, koje izdaje Ministarstvo zaštite okoliša i prirode (Pohajda i sur. 2015).

Upravo je zbog rastućeg problema nekontroliranog uništavnja prirodnih izvora smilja potrebno razmotriti alternativne načine proizvodnje sadnica smilja za poljoprivrednu proizvodnju kako bi se očuvali prirodni izvori samoniklog smilja. Smilje se može razmnožavati generativno sjemenom i vegetativno reznicama ili dijeljenjem busena. Zbog slabe klijavosti sjemena (~ 50 %) izravna sjetva sjemena se ne preporuča. Smatra se da je razmnožavanje u uvjetima *in vitro* najkvalitetniji i nasigurniji način razmnožavanja (Pohajda, 2014).

U ovom su istraživanju u svrhu umnožavanja biljnog materijala potrebnog za pokus istraženi uvjeti razmnožavanja smilja u uvjetima *in vitro*. Za umnožavanje početnih eksplatanata korištena je hranjiva podloga MS s dodatkom 6-benzilaminopurina i indol-3-octene kiseline u različitim koncentracijama. Na svim se hranjivim podlogama (osim MS0) iz primarnih eksplatanata, razvijalo kalusno tkivo. Perrini i sur. (2009) izvjestili su kako je za razvoj nadzemnih dijelova (stabljika i listovi) smilja (*Helichrysum italicum* ssp. *mycrophyllum*) najpogodnija kombinacija upravo BA i IBA. U tom je istraživanju najbolja proliferacija izdanaka smilja bila na podlozi MS s dodanim 1 mg/L BA i 0,2 mg/L IBA. Najpogodnijom hranjivom podlogom za mikrorazmnožavanje eksplatanata smilja u mojem pokusu pokazala se podloga MS s 1 mg/L BA i 0,5 mg/L IBA. Ova razlika može se objasniti različitim genotipom biljaka korištenih u pokusima što navode i Perrini i sur. (2009).

Na biosintezu i sadržaj sekundarnih metabolita, uključujući i fenolne spojeve, utječu promjene okolišnih uvjeta stoga su oni dobri pokazatelji biotičkih i abiotičkih uvjeta uzgoja

(Ferrat i sur., 2003). U ovom su istraživanju abiotički čimbenici (temperatura, vlaga, svjetlost, atmosferski plinovi te tlak) bili jednaki (konstantni) za sve ispitivane uzorke. Jedini abiotički čimbenik koji se mijenjao u eksperimentalnim uvjetima tijekom istraživanja bila je koncentracija saharoze u hranjivoj podlozi (od 1 % do 6 %). Saharoza je primarni produkt fotosinteze i ujedno najzastupljeniji ugljikohidrat u biljaka. Dvije su glavne uloge saharoze u biljnim stanicama: glavni je izvor ugljika za sintezu ostalih organskih spojeva (primarno škroba, celuloze i hemiceluloze) te služi kao izvor energije svim nefotosintetskim (heterotrofnim) tkivima. Iz suviška saharoze biljke stvaraju škrob koji biljnim stanicama služi kao rezerva energije (Mansfield i sur., 2009). U uvjetima *in vitro* iz suviška šećera mogu nastati također i fenoli te drugi aromatski spojevi (Grdinić i Kremer, 2009).

Brojna istraživanja potvrđuju kako biljke u eksperimentalnim uvjetima iz suviška šećera (saharoze) stvaraju brojne fenolne spojeve. Pirie i Mullins (1976) istražili su utjecaj povišene koncentracije saharoze na količinu ukupnih fenola i antocijana u listovima vinove loze u uvjetima *in vitro*. Rezultati su pokazali kako povišena koncentracija saharoze u hranjivim podlogama (4,1 % u odnosu na 1,3 %) značajno utječe na povećanje količine ukupnih fenola i antocijana. Mervat i sur. (2009) također su izvjestili o stimulativnom djelovanju povišenih koncentracija saharoze na količinu ukupnih fenola, antocijana i flavonoida u kalusnom tkivu krumpira. U ovom je istraživanju porastom koncentracije saharoze u hranjivoj podlozi također značajno rasla količina ukupnih fenola, flavonoida, antocijana te tanina. Budući da se svi navedeni fenolni spojevi sintetiziraju preko puta šikiminske kiseline u kojem je najzačajniji enzim PAL (fenilalanin-amonij-lijaza) možemo pretpostaviti kako je povišena koncentracija saharoze djelovala na povećanje aktivnosti tog enzima, a time i nakupljanje fenolnih spojeva u listovima smilja. Ovu pretpostavku možemo potvrditi i morfološkim promjenama na listovima smilja koja se očitovala promjenom boje listova iz zelene (niže koncentracije saharoze, 1% do 3%) u žutu i žutosmeđu (više koncentracije saharoze, 4 % do 6 %). Naime, povećanjem količine fenolnih spojeva u listovima povećava se i koncentracija enzima polifenoloksidaze (PPO) i peroksidaze (POD) koji razgrađuju fenolne spojeve ukoliko ih biljka ne koristi za zaštitu od vanjskih šetnih utjecaja, što rezultira promjenom boje listova (Yildiz i sur. 2007). Morfološke promjene, kao i povišena količina fenolnih spojeva u smilju uzgojenim na podlogama s povišenim koncentracijama saharoze, u skladu su s rezultatima koje su Wang i sur. (2011) dobili na mladicama brokule uzgojenim na podlozi s povišenom koncentracijom saharoze. Njihovo je istraživanje pokazalo kako se povišenjem koncentracije saharoze u hranjivoj podlozi (s 3 %

na 6 %) aktivnost enzima PAL povećala za više od 40 %, a sukladno povišenju aktivnosti enzima rasla je i količina fenolnih spojeva.

S povišenjem koncentracije saharoze u hranjivoj podlozi osim povišenog sadržaja fenolnih spojeva u eksplantatima smilja, povećavala se i antioksidacijska aktivnost analiziranih ekstrakata. Fenolni spojevi dobro su poznati „hvatači“ slobodnih radikala, kelatori metala, donori vodika te „gasitelji“ reaktivnih oblika kisika (Proestos i sur. 2006). Dai i Mumper (2010) opisali su fenolne spojeve kao spojeve koji imaju idealnu kemijsku strukturu za neutralizaciju slobodnih radikala jer imaju: (I) fenolne hidroksilne grupe koje mogu donirati vodikov atom ili elektron i (II) dodatni konjugirani aromatski sustav za delokalizaciju nesparenih elektrona. Brojni autori već su potvrdili antioksidacijsko djelovanje ekstrakata smilja u uvjetima *in vitro* (Sala i sur., 2002, Sala i sur., 2003, Rosa i sur., 2007, Appendino i sur., 2007). Metode koje su najčešće korištene su ABTS, DPPH, FRAP, te testovi anti-peroksidativne aktivnosti. U ovom su istraživanju korištene metode ABTS, DPPH i FRAP koje su pokazale visoku antioksidacijsku aktivnost ekstrakata smilja.

Re i sur. (1999) opisali su metodu ABTS kao jednostavnu metodu kojom se mjeri antioksidacijska aktivnost širokog spektra karotenioda, fenolnih spojeva i nekih drugih antioksidanasa prisutnih u krvnoj plazmi pri čemu dolazi do redukcije radikala $ABTS^{\bullet+}$ u neradikalni oblik uz promjenu boje reakcijske otopine. Ovaj radikal pokazuje visoku stabilnost i dobru toplivost u vodenim otopinama pri sobnoj temperaturi (Robards i sur., 2001 no unatoč tomu njegova je aktivnost u hidrofobnim otapalima (a time i reakcija s hidrofobnim molekulama) izrazito slaba. Osim toga pokazuje slabu aktivnost s biljnim ekstraktima u kojima je prisutna veća količina enzima peroksidaze, a sama metoda pokazuje nelinearne rezultate u različitim razrjeđenjima uzoraka (Callewaert, 2012). No, bez obzira na spomenute nedostatke, rezultati metode ABTS provedene u sklopu ovog istraživanja potvrdili su značajan porast antioksidacijske aktivnosti ekstrakata smilja uslijed porasta koncentracije saharoze u hranjivoj podlozi.

Rezultati metode DPPH u reakciji s ekstraktima smilja pokazali su blagi, ali značajan pad antioksidacijske aktivnosti povišenjem koncentracije saharoze. Iako radikali $ABTS^{\bullet+}$ i $DPPH^{\bullet}$ imaju jednaki mehanizam reakcije s antioksidansima, metode pokazuju oprečne rezultate. Ovakvo neslaganje u rezultatima potvrdili su i Okoh i sur. (2011) koji su izvjestili kako fenolni spojevi prisutni u biljnim ekstraktima ne reagiraju uvijek jednako s različitim radikalima, odnosno da spojevi koji pokazuju dobru antioksidacijsku aktivnost prema radikalu

ABTS•$^{+}$ ne pokazuju uvijek takvu aktivnost prema radikalu DPPH•. Čimbenici koji su mogli doprinijeti neslaganju u rezultatima su i način pripremanja otopina radikala (pH vrijednost otopine radikala ABTS•$^{+}$ je 7,4 dok je pH vrijednost otopine radikala DPPH• između 5,0 i 5,5), stabilnost radikala pri sobnoj temperaturi, te vrijeme inkubacije nakon dodatka radikala u ekstrakt (vrijeme inkubacije prije mjerenja kod metode ABTS iznosi 6 minuta, dok je kod metode DPPH 30 minuta). Huang i sur. (2005) navode kako je aktivnost radikala DPPH• izrazito ovisna o ekstrakcijskom otapalu: u vodenim i alkoholnim (metanolnim i etanolnim) ekstraktima reakcija između radikala i antioksidansa izrazito je spora zbog vodikovih veza prisutnih u otopini. Ovaj učinak uvelike se pojačava ako je biljni ekstrakt bogat fenolnim spojevima koji zbog svojih hidroksilnih skupina mogu stvarati vodikove veze s hidroksilnim skupinama alkohola i s vodom. Učinak stvaranja vodikovih veza između otapala i fenolnih spojeva uvelike bi objasnio smanjenje antioksidacijske aktivnosti u našim ekstraktima, budući da su ekstrakti načinjeni od smilja koje je raslo na hranjivim podlogama s višim koncentracijama saharoze bogatiji fenolnim spojevima.

Rezultati metode FRAP pokazali su značajan rast redukcijske (antioksidacijske) aktivnosti ekstrakata smilja porastom koncentracije saharoze u hranjivim podlogama. Metoda FRAP pripada skupini metoda ET (electron transfer) budući da se mehanizam reakcije temelji na redukciji bezbojnog Fe^{III}-TPTZ (TPTZ − 2,4,6-tripiridil-s-tirazin) kompleksa u intenzivno plavi Fe^{II}-TPTZ kompleks pri niskim pH vrijednostima (3,6) (Benzie i Strain, 1999). Ova metoda je primarno razvijena za mjerenje redukcijske (antioksidacijske) aktivnosti krvne plazme, ali se pokazala korisnom i u mjerenju antioksidacijske aktivnosti širokog spektra drugih bioloških uzoraka (Hodžić i sur. 2009). Za razliku od metode DPPH, rezultati metode FRAP podudaraju se s rezultatima metode ABTS: porastom koncentracije saharoze raste i antioksidacijski kapacitet ekstrakata smilja. Sličnost u rezultatima dobivenim metodama FRAP i ABTS objasnili su Böhm i sur. (2011). Oni su također uočili sličnost u rezultatima ovih metoda mjereći antioksidacijski kapacitet karotenoida iz rajčice i mrkve. Prema njihovom razmatranju, sličnost u rezultatima ovih metoda posljedica je bliskog redoks potencijala Fe(II)/(III) (0,70 V) i ABTS/ABTS•$^{+}$ (0,68 V), što znači da Fe^{III}-TPTZ i radikal ABTS•$^{+}$ imaju gotovo jednaku tendenciju redukcije u niže oksidacijsko stanje (reagiraju sa spojevima sličnog redukcijskog potencijala). Mnogi autori koriste metodu FRAP u svojim istraživanjima upravo zbog različitog mehanizma reakcije s antioksidansima. Bin Li i sur. (2010) napominju kako na antioksidacijsku aktivnost pojedinog ekstrakta mogu utjecati mnogi čimbenici, te jedna metoda, ili nekoliko metoda sličnih mehanizama, nisu dovoljne za

određivanje antioksidacijskog kapaciteta. Upravo iz tog razloga i u ovom je istraživanju korištena metoda FRAP. Iako je brza i jednostavna, a reagensi potrebni za izvođenje mogu se lako komercijalno nabaviti i nisu skupi, u literaturi se često navodi kako ova metoda ima nisku stopu reprodukcije (isti ekstrakti često daju različite rezultate) te da mjerena redukcijska aktivnost ne odražava nužno i antioksidacijsku aktivnost ekstrakta, već daje uvid u ukupnu koncentraciju antioksidanasa prisutnih u uzorku (Bin Li i sur., 2010).

Budući da su svi fenolni spojevi (tanini, flavonoidi i antocijani), čije su koncentracije mjerene u ovom istraživanju, pokazali antioksidacijsku aktivnost u različitim istraživanjima (Close i McArthur, 2002; Vladimir-Knežević i sur., 2011; Ma i Ge, 2013), bilo bi nezahvalno pripisati antioksidacijsku aktivnost ekstrakata smilja samo jednoj skupini fenolnih spojeva. Kako bi se utvrdilo koja skupina fenolnih spojeva smilja ima najviši antioksidacijski kapacitet potrebno je provesti daljna istraživanja. Daljna istraživanja potrebno je provesti i na mikropropagaciji i aklimatizaciji smilja kako bi se mogli uvesti u poljoprivednu proizvodnju.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja sadržaja fenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata listova smilja koje je uzgajano na hranjivoj podlozi MS s različitim koncentracijama saharoze (od 1 % do 6 %) može se zaključiti sljedeće:

1. Povišenjem koncentracije saharoze u hranjivoj podlozi povećao se udio ukupnih fenola, tanina, flavonoida i antocijana u listovima smilja što ukazuje kako saharoza značajno utječe na metaboličke puteve sinteze sekundarnih metabolita.
2. Od svih mjerenih fenolnih spojeva najveći udio imaju tanini (~87 %). Udio flavonoida značajno je niži (~11 %) dok je udio antocijana najniži (~1 %).
3. Povišenjem koncentracije saharoze u hranjivoj podlozi povećao se i antioksidacijski kapacitet ekstrakata listova smilja prema metodama ABTS i FRAP. Ovo je povećanje usko vezano uz povećanje udjela fenolnih spojeva.

7. LITERATURA

- 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-Pyrone from *Helichrysum italicum* ssp. *microphyllum*, Journal of Natural Products 70, 608-612.
- Arora A., Sairam R. K., Srivastava G. C. (2002): Oxidative stress and antioxidative system in plants, Current Science 82, 1227-1238.
- Asada K., Takahashi M., Kyle D. J., Osmond C. B., Arnten C. J. (1987): Photoinhibition, Topics in Photosythesis 9, 227-287.
- 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 Chemistry 131, 1279–1286.
- Benzie F. F. I., Strain J. J. (1999): The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay, Analytical Biochemistry 239, 70-76.
- Bin Li H., Ren-You G., Xiang-Rong X., Feng-Lin S., Lei K. (2010): Antioxidant activity ant total phenolic content of medical plants associated with prevention and treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases, Journal of Medicinal Plants Research 22, 2438-2444.
- Böhm V., Müller L., Fröhlich K. (2011): Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (αTEAC), DPPH assay and peroxyl radical scavening assay, Food Chemistry 129, 139-148.
- Callewaert D. (2012): Antioxidant assays: How do they compare, Oxford Biomedical Research, Oxford.
- Chen G. X., Asada K. (1989): Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties, Plant Cell Physiology 30, 987-998.
- Close D. C., McArthur C. (2002): Rethinking the role of many plant phenolics – protection from photodamage not herbivores? OIKOS 99, 166–172.

- Czinner E., Hagymasi K., Blazovics A., Kery A., Szoke E., Lemberkovicz E. (2000): *In vitro* antioxidant properties of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench, Journal of Ethnopharmacology 73, 437-443.
- Dai J., Mumper R. J. (2010): Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties, Molecules 10, 7313-7352.
- De Feo V., Mancini E., De Martino L., Marandino A., Scognamiglio M. R. (2011): Chemical composition and possible *in vitro* phytotoxic activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum*, Molecules 16, 7725-7735.
- Ferrat, L., Pergent-Martini, C., Roméo, M. (2003): Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. Aquatic Toxicology 65, 187-204.
- Foyer C. H., Noctor G. (1998): Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control, Physiology an Molecular Biology of Plants 49, 249-279.
- Gomez A., Hernandez J. A., Jimenez A., Del Rio L. A., Sevilla F. (1999): Differential response of anzioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea salts, Free Radical Research 31, 11-18.
- Grdinić V., Kremer D. (2009): Ljekovito bilje i ljekovite droge: farmakoterapijski, botanički i farmaceutski podaci, Hrvatska ljekarnička komora, Zagreb.
- Hamilton A. J., Holdom M. D., Jeavons L. (1996): Expression of the Cu,Zn superoxide dismutase of *Aspergillus fumigatus* as determined by immunochemistry and immunoelectron microscopy, FEMS Immunology and Medical Microbiology 14, 95–102.
- Hernandez J. A., Corpas F. J., Gomez M., Del Rio L. A., Sevilla F. (1994): Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria, Physiologia Plantarum 89, 103-110.
- Hodžić Z., Pašalić H., Memšević A., Srabović M., Šaletović M., Poljaković M. (2009): The influence of total phenols content on antioxidant capacity in the whole grain extracts, European Journal of Scientific Research 3, 471-477.
- Huang D., Ou B., Prior L. R. (2005): The chemistry behind antioxidant capacity assays, Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 1841-1856.
- Kunert K. J., Foyer C. H., De Kok J. L. (1993): Sulphur nutrition and assimilation in higher plants; Regulatory, Agrocultural and Enviromental Aspects, SPB Academic Publishers, 139-151.

- Kuštrak D. (2005): Farmakognozija i fitofarmacija, Golden Marketing – Tehnička knjiga, Zagreb.
- Lee J., Rennaker C., Wrolstad R. E. (2008): Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods, Food Chemistry 110, 782-786.
- Lorenzi V., Muselli A., Bernardini A. F., Berti L., Pages J. M., Amaral L., Bolla J. M. (2009): Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from Gram-negative species, Antimicrobial Agents and Chemoterapy 53, 2209-2211.
- Ma X., Ge Q. (2013): Composition and antioxidant activity of antocyanins from Yunnan edible rose (*An ning*), Food Science and Human Wellnes 2, 68-74.
- 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, Chemistry of Natural Compounds 41, 35-40.
- Mastelić J., Politeo O., Jerković I. (2008): Contribution to the analysis of the essential oils of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don; Determination of ester bonded acids and phenols, Molecules 13, 795-803.
- Mansfield D. S., Park J. – Y., Canam T., Kang K. – Y., Unda F. (2009): Sucrose phosphate synthase expression influences poplar phenology, Tree Physilogy 29, 937-946.
- Mazid, M., Khan T. A., Mohammad, F. (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. Biology and Medicine 3, 232-249.
- Mervat M. M., Taie H. A. A. (2009): Antioxidant activities, total antocyanins, phenolics and flavonoids contents of some sweetpotato genotypes under stress of different concentrations of sucrose and sorbitol, Australian Journal of Basic and Applied Science 3, 3609-3616.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures, Plant Physiology 15, 473-479.
- Nostro A., Bisignano G., Angela Cannatelli M., Crisafi G., Paola Germano M., Alonzo V. (2001): Effects of *Heichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*, International Journal of Antimicrobial Agents 17, 517-520.
- Nostro A., Cannatelli M., 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, Letters in Applied Microbiology 38, 423-427.

- 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 Microbiologica 26, 125-128.
- Okoh I. A., Aiyegoro A. O. (2009): Phytocemical screening and polyphenolic antioxidant activity of aqueous crude leaf extract of *Helichrysum italicum*, International Journal of Molecular Sciences 10, 4990-5001.
- Paiva É. A. S., Isaias R. M. S., Vale F. H. A., Queiroz C. G. S. (2003): The influence of light intensity on anatomical structure and pigment contents of *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. *purpurea* Boom (Commelinaceae) leaves, Brazilian Archives of Biology and Technology 46, 617-624.
- Palmeira-de-Oliveira A., Viegas D. A., Martinez-de-Oliveira J., Salguiero L., Palmiera-de-Oliveira R. (2014): *Helichrysum italicum*: From traditional use to scientific data, Journal of Ethnopharmacology 151, 54-65.
- 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, Industrial Crops and Products 29, 395-403.
- Perrini R., Morone-Fortunato I., Montemurro C., Ruta C., 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, Industrial Crops and Products 32, 639-649.
- Pevalek-Kozlina B. (2003): Fiziologija bilja, Profil International, Zagreb.
- Pirie A., Mullins G. M. (1976): Changes in antocyanin and phenolics content of grapevine leaf and fruit tissues tretaed with sucrose, nitrate and abscisic Acid, Plant Physiology 58, 468-472.
- Pohajda I. (2014): Lavanda, Poljoprivredna savjetodavna služba, Zagreb, str.1-5.
- Pohajda I., Žutić I. (2014): Arnika (Brđanka i Američka arnika), Poljoprivredna savjetodavna služba, Zagreb, str.1-12.
- Pohajda I., Dragun G., Puharić Visković L. (2015): Smilje, Poljoprivredna savjetodavna služba, Zagreb, str.1-15.

- Poli F., Muzzoli M., Saccheti G., Tassinato G., Lazzarin R., Bruni A. (2003): Antioxidant activity of supercritical CO_2 extracts of *Helichrysum italicum*, Pharmaceutical Biology 41, 379-383.
- Pourmorad F., Hosseinimehr S. J., Shahabimajd N. (2006): Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants, African Journal of Biotechnology, 5(11), 1142-1145.
- Proestos C., Sereli D., Komaitis M. (2006): Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and DC-MS, Food Chemistry 95, 45-52.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999): Antioxidant activity applying an improvised ABTS radical cation decolorization assay, Free Radical Biology & Medicine 26, 1231-1237.
- Robards K., Antolovich M., Prenzler D. P., Patsalides E., McDonald S. (2001): Methods for testing antioxidant activity, Analyst 127, 183-198.
- Rosa A., Deiana M., Atzeri A., Corona G., Incani A., Melis M. P., Appendino G., Dessi M. A. (2007): Evaluation on the antioxidant and cytotoxic activity of arzanol, a prenylated alpha-pyrone-phloroglucinol etherodimer from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*, Chemico-Biological Interactions 165, 117-126.
- Sala A., Recio M., Giner R. M., Manez S., Tournier H., Schinella G., Rios J. L. (2002): Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum*, Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics 54, 365-371.
- Sala A., Recio M., Schinella G. R., Manez S., Ginger R. M., Cerda-Nicolas M., Rosi J. L. (2003): Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavanger activity of tiliroside, European Journal of Pharmacology 461, 53-61.
- Scandalios G. J. (1993): Oxygen Stress and Superoxide Dismutases, Plant Physiology 101, 7-12.
- Scarborough J. (1978):Theophrastus on herbals and herbal remedies, Journal of Historical Biology 11, 353-358.
- Shirwaikar A., Shirwaikar A., Rajendran K., Punitha I. S. R. (2006): *In vitro* antioxidant studies on the benzyl tetra isoquinoline alkaloid berberine, Biological and Pharmaceutical Bulletin 29, 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-Ciocalteu reagent, Methods in Enzymology 299, 152-178.

- Stepanović B., Radanović D., Turšić I., Nemčević N., Ivanec J. (2009): Uzgoj ljekovitog i aromatičnog bilja, Jan-Spider, Pitomača.
- Sun D. X., Lu J. C., Fang Z. Z., Zhang Y. Y., Cao Y. F., Mao Y. X., Zhu L. L., Yin J., Yang L. (2010): Reversible inhibition of three important human cytochrome P450 enzymes by tiliroside, Phytotherapy Research 24, 1670-1675.
- Šalinović A. (2007): Morfološka raznolikost roda *Ocimum*, Rektorova nagrada za studentski rad, Agronomski fakultet, Zagreb.
- Temple N. J. (2000): Antioxidants and desease; More questions than answers, Nutrition Research 20, 449-459.
- Vladimir-Knežević S., Blažeković B., Bival Štefan M., Babac M. (2011): Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health, Phytochemicals as nutraceuticals – global approaches to their role in nutrition and health, InTech, Rijeka, Croatia, 155-177.
- Voinchet N., Giraud-Robert A. M. (2007): Utilisation de l'huile essentielle d'hélichryse italienne et de l'huile végétale de rose mosquée après intervention de chirurgie plastique réparatrice et esthétique, Phytothérapie, 67-72.
- Wang Q., Yuan G., Gou R. (2011): Effect of sucrose and mannitol on the accumulation of health-promoting compounds and the activity of metabolic enzymes in broccoli sprouts, Scientia Horticulturae 128, 159-165.
- Wook K., Karuppanapandian T., Jun-Cheol M., Changsoo K. (2011): Reactive oxygen species in plants: Their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms, Australian Journal of Crop Science 5(6), 709-725.
- Yildiz M., Önde S., Özgen M. (2007): Sucrose effects on phenolic concetration and plant regeneration from sugarbeet leaf and petiole explants, Journal Of Sugar Beet Research 44, 1-15.
- http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a0/Helichrysum_italicum_ssp_serotinum_3.jpg
- http://euromed.luomus.fi/euromed_map.php?taxon=416249&size=medium
- https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov