

**UNIVERZITET CRNE GORE**  
**PRIRODNO – MATEMATIČKI FAKULTET**

Studijski program: **BIOLOGIJA**

SEMINARSKI RAD

**BIOAKTIVNE SUPSTANCE ZNAČAJNE ZA  
EKOFIZIOLOŠKE ADAPTACIJE BILJAKA**

Predmet: Ekofiziologija

Profesor: Prof. dr Danka Caković

Studenti:

Milica Vučurović 6/20

Danijela Vuković 7/20

Mart 2021. godine, Podgorica

# S A D R Ź A J

## UVOD

### Fenolna jedinjenja – polifenoli

- ✿ Seasonal variation in phenolic compounds and antioxidant activity in leaves of *Cyclocarya paliurus* (batal.) Iljinskaja

### Alkaloidi

- ✿ In vitro production of solasodine alkaloid in *Solanum nigrum* under salinity stress

### Eterična ulja

- ✿ Variations of essential oil characteristics of *Clinopodium pulegium* (Lamiaceae) depending on phenological state

### Flavonoidi

- ✿ Seasonal variations of flavonoids in *Teucrium polium* L. (Lamiaceae)

## UVOD

**Metaboliti** su hemijska jedinjenja koja predstavljaju međuprodukte ili produkte metabolizma. Dije se na **primarne** i **sekundarne** metabolite koji se razlikuju kako po strukturi i biohemiji, tako i po funkciji koju obavljaju.

<b>PRIMARNI METABOLITI</b>	<b>SEKUNDARNI METABOLITI</b>
Produkti primarnog metabolizma	Produkti sekundarnog metabolizma
Obavljaju fiziološke funkcije u tijelu	Imaju važan ekološki značaj, zaštitnu ulogu u borbi protiv različitih oblika stresa, biološku i farmakološku aktivnost
Obezbeđuju energiju za rast, razviće, reprodukciju, funkcionisanje biljke	Nemaju energetske značaj, nisu direktno uključeni u rast, razviće i reprodukciju biljke
Sintetišu se tokom faze rasta biljke	Sintetišu se na kraju faze rasta biljke
Obrazuju se u većim količinama; lako ih je izolovati	Obrazuju se u malim količinama; teško ih je izolovati
Gradivna su jedinjenja – ulaze u sastav osnovnih molekulskih struktura	Ne ulaze u sastav osnovnih molekulskih struktura
Odlikuje ih manja hemijska raznovrsnost	Odlikuje ih veća hemijska raznovrsnost
Isti su kod svih biljaka	Jedinstveni su za određenu biljnu vrstu

- 🌸 Sekundarni metaboliti su produkti sekundarnog metabolizma koji za potrebe stvaranja ovih jedinjenja koristi intermedijere primarnog metabolizma.
- 🌸 Za razliku od primarnih metabolita, nisu direktno uključeni u rast, razviće i reprodukciju, odnosno nisu esencijalni za funkcionisanje.
- 🌸 Zaslužni su za boju, miris ili ukus organa u kojima su prisutni, te su bitni u komunikaciji sa drugim organizmima (npr. privlačenje polinatora) ili antagonističkim interakcijama (npr. odbijanje predatora/herbivore i patogena).
- 🌸 Smatra se da sekundarni metaboliti predstavljaju adaptaciju na različite ekološke faktore.
- 🌸 Imaju zaštitnu ulogu u borbi protiv različitih oblika stresa. Pružaju zaštitu kako od predatora i patogena, tako i od različitih abiotičkih i antropogenih faktora.
- 🌸 Mogu biti sastavni dio nekih enzimskih sistema (koenzima) neophodnih za ćelijsko disanje, mogu imati hormonsku aktivnosti ili poslužiti kao depoi štetnih produkata biljnog metabolizma, mogu pružiti dodatnu mehaničku potporu biljci.
- 🌸 Imaju i alelopatku ulogu što znači da regulišu odnose biljke u kojoj nastaju sa drugim biljkama.
- 🌸 Mnogi sekundarni metaboliti imaju terapijsko dejstvo pa se označavaju kao **bioaktivne komponente**.

## Tipovi sekundarnih metabolita

Na osnovu njihovog biosintetskog porijekla:

- Terpenoidi
- Flavonoidi i srodna fenolna i polifenolna jedinjenja
- Jedinjenja koja sadrže azot (alkaloidi) i jedinjenja koja sadrže sumpor

Na osnovu prisustva azota:

- Jedinjena sa azotom: alkaloidi, amini, neproteinske aminokiseline, cijanogeni heterozidi, alkamidi, glukozinolati, lektini, peptidi i polipeptidi
- Jedinjenja bez azota: terpeni, steroidi i saponini, flavonoidi i tanini, fenilpropanoidi, lignini, lignani i kumarini, poliacetileni, masne kiseline i voskovi, poliketidi, ugljeni hidrati i organske kiseline

Milica Vučurović:

- ✿ Seasonal variation in phenolic compounds and antioxidant activity in leaves of *Cyclocarya paliurus* (batal.) Iljinskaja
- ✿ In vitro production of solasodine alkaloid in *Solanum nigrum* under salinity stress

Danijela Vuković:

- ✿ Variations of essential oil characteristics of *Clinopodium pulegium* (Lamiaceae) depending on phenological state
- ✿ Seasonal variations of flavonoids in *Teucrium polium* L. (Lamiaceae)

**Fenolna jedinjenja** obuhvataju veliku grupu molekula koji imaju zajedničku osobinu da sadrže najmanje jednu hidroksilnu grupu u aromatičnom prstenu. Izvode se tako što se jedan ili više vodonikovih atoma zamijene sa OH grupom pa se prema broju OH grupa dijele na jednohidroksilne, dvohidroksilne i trohidroksilne fenole.

#### Fizičke osobine fenola

- Jednostavni fenoli su tečnosti ili čvrste supstance niske temperature topljenja
- Imaju visoke temperature ključanja zbog vodoničnih veza
- Fenol je djelimično rastvorljiv u vodi, ostali su gotovo nerastvoreni
- Fenoli se lako oksidišu, pa ako nisu dobro prečišćeni imaju obojenost

#### Hemijske osobine

- Fenoli su amfoterna jedinjenja, ponašaju se kao kiseline i baze

#### Biljni fenoli

- Ova jedinjenja spadaju u sekundarne metabolite i u biljkama se obično ne nalaze u slobodnom obliku, već u obliku estara, glikozida ili kondezovanih proizvoda.

### KLASIFIKACIJA BILJNIH FENOLA

HEMIJSKOJ STRUKTURI

FIZIOLOŠKOM DJELOVANJU

SLOŽENOSTI:

- 1) Prosti fenoli
- 2) Fitoaleksini
- 3) Lignani i neolignani
- 4) Melanini
- 5) Biflavonoidi
- 6) Složeni fenoli - polifenoli

Fenol, fenilpropanoidi, kumarini  
ksantoni, fenolkarbonske kiseline, ...

Flavonoidi i neflavonoidi (pr.fenolne kiseline)

BIOSINTETSKOM PORIJEKLU

U biljnim organizmima, **polifenoli** obavljaju niz funkcija koje imaju veliki uticaj na ekofiziologiju biljaka: djeluju kao antioksidansi, antimikrobni agensi, fotoreceptori, vizuelni atraktanti nekih insekata važnih za oprašivanje cvjetova ili kao zaštita biljnih tkiva od prekomjernog UV-zračenja (Pietta, 2000; Fangi sar.,2002; Heim i sar.,2002).

Kao prirodni izvori polifenolnih jedinjenja u literaturi se najčešće spominju začinsko i ljekovito bilje, ali to mogu biti i voće, povrće, žitarice, brojni životinjski i mikrobiološki proizvodi. (Naczk i Shahidi, 2006). Polifenolna jedinjenja se smatraju vodećim jedinjenjima sa antioksidativnim djelovanjem. Smatra se da je antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja prvenstveno rezultat njihove sposobnosti da budu donori vodonika slobodnim radikalima (npr. u reakciji oksidacije lipida) nakon čega nastaju manje reaktivni fenoksi radikali.

## ✿ Seasonal variation in phenolic compounds and antioxidant activity in leaves of *Cyclocarya paliurus* (batal.) Iljinskaja

(Yanni Cao, Shengzuo Fang, Xiangxiang Fu, Xulan Shang and Wanxia Yang)

### UVOD

- **Fenolna jedinjenja** – kao velika grupa biljnih sekundarnih metabolita, oni su prisutni u većini biljaka. Imaju antibakterijsku, antioksidativnu, antimutagenu, antikarcinogenu, antiinflamatornu, antialergijsku, anti – gojaznu i antidijabetičku aktivnost.
- Biosinteza i akumulacija ne zavise samo od unutrašnjih faktora i razvojnog stadijuma, već i od spoljašnjih faktora
- *Cyclocaria paliurus*
  - ✿ Pripada porodici Juglandaceae
  - ✿ Raste na planinskim područjima, Južna Kina
  - ✿ Koristi se kao čaj

## CILJ

- Istražiti vremenske varijacije sadržaja fenolnih kiselina i flavonoida kao i njihov antioksidativni uticaj u lišću *Cyclocaria paliurus* sakupljenih tokom cijelog perioda rasta biljke
- Ilustrovati odnos strukture i aktivnosti fenolnih jedinjenja u listovima biljke

## MATERIJAL I METODE

- Biljni materijali

Sjeme 10 porodica *C. paliurus* sakupljeno je iz prirodnih šuma grada Lushan, provincija Jiangxi krajem oktobra 2006. godine. Sakupljeno sjeme je pripremljeno prema metodi koju su predložili Fang i sar. Nakon stratifikacije, klijavo sjeme je prvo posijano u plastične posude (prečnika 5 cm i visine 15 cm). Kada su sadnice dostigle visinu od oko 6 cm, uslijedila je njihova transplantacija u *C. paliurus* rasadnik. Nakon godinu dana rasta u rasadniku, sadnice 10 porodica presađene su u bazu Univerziteta za šumarstvo Nanjing (31°660 N, 119°010 E, 368 m nadmorske visine), sa prosječnom godišnjom temperaturom od 15,5 °C. Ukratko, plantaža je osnovana sa razmakom sadnje 3 × 4 m 2008. godine i svaki porodica se sastojala od 10 do 30 sadnica.

- Uzimanje uzorka

Uzorkovano je približno 200g svježeg potpuno razvijenog lišća iz 10 porodica svake 4 nedelje od maja do novembra (24. maja, 21. juna, 19. jula, 16. avgusta, 13. septembra, 11. oktobra, i 9. novembra 2017. godine). Za svaku porodicu uzorci su nasumično sakupljeni sa 3 pojedinačna stabla sa sličnim krošnjama.

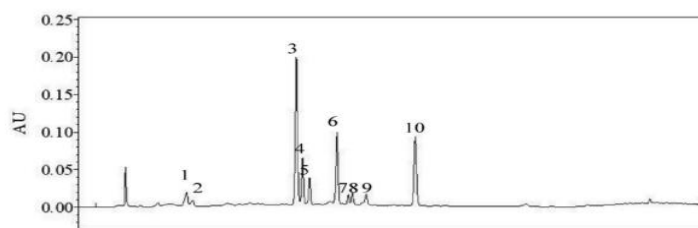
- Priprema uzoraka

Svi uzorci su sušeni u peći do konstantne težine na 60 °C. Poslije toga su osušeni listovi bili samljeveni u fini prah brusilicom za tkivo. Zatim su se uzorci praha čuvali na sobnoj temperaturi prije analize. Približno 1g uzorka lišća u prahu je ekstrahovano sa 100 ml petroleja u ekstraktoru i refluksovano u vodenom kupatilu na 80 °C 4 sata kako bi se uklonile nečistoće rastvorljive u mastima kao što je pigment sadržan u uzorku. Ekstrakt je odbačen, dok su ostaci zadržani i osušeni na sobnoj temperaturi. Fenolna jedinjenja u ostatku su ekstrahovana ultrazvuk metodom. Ukratko, 15 ml 70% etanola je dodato u svaki uzorak i uzorci su obrađeni ultrazvukom u ultrazvučnom čistaču na 70 °C 45 minuta, a zatim centrifugirani 10 minuta u centrifugi velike brzine (10 000 o/min). Svi rastvori su čuvani u frižideru na 4°C i prije upotrebe stajali na sobnoj

temperaturi, takođe svi rastvarači su filtrirani sa filterom organske faze od 0,22  $\mu\text{m}$  u HPLC bočicu i podvrgnuti HPLC analizi.

- HPLC određivanje fenolnih jedinjenja

Kvantifikacija pojedinačnih fenolnih jedinjenja je postignuta na koloni Ks-Bridge C18 obrnute faze (unutrašnji prečnik  $250 \times 4,6$  mm, veličina čestica 5  $\mu\text{m}$ ) sa brzinom protoka od 1,0 ml / min, a kolona je radila na  $45^\circ\text{C}$ . Talasna dužina detekcije održavana je na 360 nm a zapremina ubrizgavanja je bila 10,0 mL. Pokretne faze su bili (A) acetonitril sa 0,01% mravlje kiseline i (B) voda sa 0,01% mravlje kiseline.



Reprezentativni HPLC hromatogrami ekstrakta lišća C.

1. 3-O-kafeoilhininska kiselina; 2. 4-O-kafeoilhininska kiselina; 3. kvercetin-3-O-glukuronid; 4. kvercetin-3-O-galaktozid; 5. kvercetin-3-O-glukozid; 6. kaempferol-3-O-glukuronid; 7. kempferol-3-O-glukozid; 8. kvercetin-3-O-ramnozid; 9. 4,5-di-O-kafeoilhininska kiselina; 10. kaempferol-3-O-ramnozid.

- Mjerenje antioksidativnih aktivnosti

Kako bi se procijenilo u kojoj mjeri ovi otkriveni fenoli doprinose antioksidativnoj efikasnosti ekstrakata lišća; sprovedene su antioksidativne aktivnosti na svakom pojedinačnom fenolnom jedinjenju. U tu svrhu, korišćeni su čisti standardni molekuli.

- Analiza podataka

Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD) uzoraka deset porodica. Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina (TPA), ukupnog kvercetin glikozida (TK), ukupnih kempferol glikozida (TK) i ukupni flavonoidi (TF) izračunati su kao sume njihovih odgovarajućih pojedinačnih vrijednosti.

## REZULTATI

- Sezonske varijacije sadržaja fenolnih kiselina



Sezonski obrasci kolebanja sadržaja fenolnih kiselina bili su gotovo sinhroni kod svih 10 porodica koje smo istražili. Rezultati su otkrili da je uzorkovanje značajno uticalo na akumulaciju fenolnih kiselina u lišću *C. paliurus*. 3-O-kafeoilhininska kiselina (3-CKA) je uvijek bila glavna fenolna kiselina tokom cijele faze rasta, a sadržaj 4-O-kafeoilhininske kiseline (4-CKA) je uvijek bio veći od sadržaja 4,5-di-O-kafeoilhininske kiseline (4,5-CKA), osim u novembru.

Sadržaj 3-CKA pokazao je jasne sezonske varijacije, u rasponu od 0,24 do 2,22 mg / g. Najveći sadržaj 3-CKA je izmjeren u novembru, zatim u julu, dok je najniži bio u junu i septembru. Najveći sadržaj 4-CKA zabilježen je u maju, do 0,54 mg / g, zatim u julu i novembru, dok je najniži izmjeren u junu i iznosio je manje od 0,10 mg / g. Među tri testirane fenolne kiseline, nivoi 4,5-CKA su najočiglednije varirali, približno 64 puta. Najveći sadržaj 4,5-CKA zabilježen je u novembru i dostigao je 0,57 mg / g, dok je najniži bio u junu sa 0,009 mg / g. Sadržaj 4,5-CKA u maju i julu bio je na umjerenom nivou. Štaviše, ukupni sadržaj fenolnih kiselina (TPA) izračunat je sabiranjem sadržaja pojedinačnih fenolnih jedinjenja na osnovu HPLC određivanja sadržaja svake pojedinačno. TPA se takođe značajno promijenio tokom godine. Uslijedio je najveći sadržaj TPA u maju i novembru, više od 3,10 mg / g do jula, dok je najniža izmjerena u junu, manje od 0,35 mg / g.

- Sezonske varijacije sadržaja flavonoida

Generalno, flavonoidi su prisutni kao glikozidi u biljkama, obično konjugovani sa glukozom. U našem eksperimentu, sedam pojedinačnih flavonoidnih jedinjenja, kvercetin-3-O-glukuronid (K-3-Glu), kvercetin-3-O-galaktozid (K-3-Gal), kvercetin-3-O-glukozid (K-3-Glc), kvercetin-3-O-ramnozid (K-3-Rha), kaempferol-3-O-glukuronid (K-3-Glu), kaempferol-3-O-glukozid (K-3-Glc) i kaempferol-3-O-ramnozid (K-3-Rha), je otkriveno su u listovima *C. paliurus*.

Sezonske varijacije sadržaja ispitivanih flavonoida bili su gotovo sinhroni među 10 porodica uzoraka.. K-3-Glu se smatrao glavnim flavonoidnim jedinjenjem i ključna komponenta u lišćima *C. paliurus*, u rasponu od 1,61 (jun) do 4,36 (jul) mg / g. Sadržaj K-3-Gal, K-3-Glc i K-3-Rha je bio na niskom nivou do posljednjeg vremena uzorkovanja. Njihov najveći sadržaj izmjeren je u novembru a najniži u junu. Među tri kvercetinska glikozida, sadržaj K-3-Glc varirao je relativno u velikoj mjeri tokom godine, a njen sadržaj u novembru bio je 83 puta veći u odnosu na sadržaj u junu. Sadržaj K-3-Glu i K-3-Rha bio je na visokom nivou u julu, avgustu i novembru. U poređenju sa sadržajima K-3-Glu i K-3-Rha, sadržaj K-3-Glc pokazao je relativno veliku stopu varijacije tokom perioda rasta, u rasponu od 0,05 (jun) do 0,5 (novembar) mg / g.

Ukupan sadržaj četiri kvercetinska glikozida utvrđena u ovoj studiji definisan je kao TK. Slično tome, TK je definisan kao ukupan sadržaj tri ispitivana glikozida kempferola. Stoga, ukupni sadržaj svih pojedinačnih flavonoida izmjeren u ovoj studiji definisan je kao TF. Sadržaj TK, TK i TF u novembru je bio najveći, a najmanji sadržaj u junu i septembru. Zanimljivo je da je sadržaj TK uvijek bio veći od TK, osim u junu, a razlika je bila statistički značajna u maju, julu, avgustu i novembru.

- Sezonske varijacije antioksidativnih aktivnosti

Značajna sezonska kolebanja antioksidativnih aktivnosti su primjećena u ekstraktima lišća *C. paliurus*. Uzorci prikupljeni u maju, julu, avgustu i novembru pokazali su dobre performanse u tri testa antioksidativnih aktivnosti (DPPH, FRAP i ABTS). Veće antioksidativne aktivnosti uzoraka prikupljenih u maju, julu, avgustu i novembru može se pripisati većem sadržaju fenola u tom periodu.

- Korelacija između sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti

Snažne korelacije između antioksidativnih aktivnosti i sadržaja fenolnih kiselina kao i flavonoida primjećeni su u testovima DPPH, FRAP i ABTS. Štaviše, Pearsonova korelacija koeficijenta između antioksidativnih aktivnosti i ukupnog sadržaja fenolne kiseline ili ukupnih kvercetinskih glikozida je bio veći od onog između antioksidativnih aktivnosti i ukupnih glikozida kempferola, što ukazuje da je doprinos kvercetin glikozida i fenolnih kiselina antioksidativnoj aktivnosti bio veći nego kod kempferol glikozida.

- Efekti pojedinačnih fenolnih jedinjenja na antioksidativni kapacitet

Da bi se procijenilo u kojoj mjeri ove identifikovane fenolne supstance doprinose antioksidativnoj efikasnosti ekstrakata *C. paliurus*, izvedeni su testovi antioksidativnog kapaciteta za svako pojedinačno fenolno jedinjenje DPPH, ABTS i FRAP metodama. Zapaženo je da je kvercetin ispoljio najjaču antioksidativnu aktivnost u testu uklanjanja radikala DPPH. Rezultati testova FRAP i ABTS su ukazali da bi kvercetin i njegovi glikozidi, kao i fenolne kiseline mogli biti glavni u doprinosu antioksidativne sposobnosti za ekstrakte *C. paliurus*.

## DISKUSIJA

- Uticaji životne sredine i faze razvoja na fenomen akumulacije lista

Mnoge studije su pokazale da fenolna jedinjenja posjeduju različite biološke aktivnosti. Za samu biljku, jedna od poznatih i važnih funkcija fenolnih jedinjenja je njihova uloga u odbranbenim mehanizmima biljaka. Egzogeni faktori odražavaju biotičke i abiotičke stimulse iz okoline koji se javljaju tokom perioda biljnog uzgoja.

U ovom radu, fenolni profili su bili slični u pogledu hemijskog sastava, ali su se količinski značajno razlikovali. Sve porodice koje su ispitivane su prikazale veće vrijednosti fenolnih supstanci u maju i julu. Fenoli su odgovorni za zaštitu biljaka od oštećenja izazvanih zračenjem, posebno UV-B. Shodno tome, izlaganje globalnom zračenju stimulisalo je sintezu i akumulaciju ovih zaštitnih jedinjenja, poput flavonoida, posebno u epidermisu potpuno razvijenih listova. Niže temperature povezane su sa višim koncentracijama flavonoida zbog višeg nivoa ROS-a. Flavonoidi deluju direktno kao antioksidanti, jer su snažni čistači ROS-a. Dobro je poznato da

biljke proizvode ROS tokom normalnog metabolizma i pod raznim uslovima stresa okoline. Sve je više dokaza da fenolna jedinjenja mogu djelovati kao antioksidanti pod određenim fiziološkim uslovima i, na taj način, zaštititi biljke od oksidativnog stresa.

I koncentracija i sastav sekundarnih metabolita se obično razlikuje tokom ontogeneze drveća i mogu uticati na kvalitet lijeka biljke. U našoj studiji, veći sadržaj fenola početkom novembra zaključuje da se vjerovatno povećala njihova akumulacija u zastarelim listovima *C. paliurus*. Kod *C. paliurus*, smanjena akumulacija fenola u junu podrazumijeva da se izdvajaju veće količine fotoasimilata za vegetativni i reproduktivni rast. Uzimajući u obzir rast *C. paliurus*, sakupljanje lišća *C. paliurus* treba obaviti početkom novembra.

U trenutnoj studiji, istraživali smo sezonske promene odnosa K-3-Glu / K-3-Glu, K-3-Glc / K-3-Glc i K-3-Rha / K-3-Rha. Vrijednost K-3-Glu / K-3-Glu je uvijek bila veća od 1,0 tokom cijele sezone rasta, što ukazuje da je K-3-Glu postao dominantni flavonoid u skladu sa izmijenjenim okruženjem.

- Veza između fenolne kompozicije i antioksidativnog kapaciteta

Flavonoidi i fenolne kiseline posjeduju visoki antioksidativni kapacitet i time štite ljude od bolesti izazvanih slobodnim radikalima. U *C. paliurus*, flavonoidi su uglavnom prisutni kao kvercetin glukozidi i glukozidi kaempferol, dok aglikoni kvercetina i kempferola nalaze se u kvantitativno neotkrivenim tragovima. Naši rezultati su otkrili da je antioksidativna aktivnost flavonoidnih glukozida dramatično smanjena u poređenju sa aglikonom. Dalje, pozitivna korelacija između antioksidativne aktivnosti i sadržaja fenolnih kiselina kao i flavonoida primjećena je u testovima DPPH, FRAP i ABTS. Naš rezultat je u skladu sa nedavnim publikacijama, koje sugeriraju veći sadržaj fenola, jača antioksidativna aktivnost.

Različiti antioksidativni kapaciteti predstavljeni fenolnim jedinjenjima usko su povezani sa njihovom hemijskom strukturom u odnosu na broj i položaj fenolnih hidroksilnih grupa. Dobro je poznato da je supstitucija hidroksila neophodna za antioksidativnu aktivnost flavonoida. Generalno, jedinjenja sa više hidroksilnih supstitucija na B prstenu mogu pokazati jaču antioksidativnu aktivnost.

## ZAKLJUČAK

Kao zaključak, naši rezultati su jasno pokazali da postoji veći sadržaj fenola u lišću *C. paliurus*, i relativno veće antioksidativne aktivnosti u ekstraktu lista. Koncentracije fenola i antioksidativne aktivnosti u ekstraktima *C. paliurus* pokazale su značajne sezonske varijacije, a obrasci varijacija su bili slični. Sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktu lišća *C. paliurus* bio je u snažnoj korelaciji sa antioksidativnim aktivnostima, što ukazuje da su ekstrakti sa većim sadržajem fenola imali veće antioksidativne aktivnosti. Štaviše, antioksidativni kapacitet fenola zavisi od rasporeda funkcionalne grupe na nuklearnoj strukturi. Generalno, sezona žetve značajno utiče na sadržaj fenola u lišću *C. paliurus* i posljedično utiče na antioksidativnu aktivnost. Na osnovu rezultata,

predlažemo da je početak novembra optimalno vrijeme za berbu lišća *C. paliurus*. Kao potencijalni izvor prirodnih antioksidanata, *C. paliurus* mogu biti vrlo korisni dodaci za farmaceutske proizvode i funkcionalne sastojke hrane u nutraceutskoj i prehrambenoj industriji.

**Alkalodi** su najveća grupa sekundarnih metabolita kod biljaka koji sadrže jedan ili više atoma azota u heterocikličnom prstenu. Osnovna struktura alkaloida (heterociklični prsten sa azotom) vodi porijeklo od aminokiselina (ornitina, lizina, fenilalanina, tirozina, triptofana ili antranilne kiseline). Azotna jedinjenja, koje biljka upija iz zemljišta, mogu da budu ograničavajući faktor rasta pa se zato jedinjenja sa azotom ne izlučuju. Kada azota ima dovoljno, dolazi do sinteze aminokiselina u višku pa se taj višak pretvara u alkaloidne.

#### Fizičke osobine alkaloida

- Alkaloidi koji sadrže kiseonik su čvrste, kristalne supstance, bijele boje, bez mirisa i gorkog su ukusa
- Mali broj alkaloida koji ne sadrži kiseonik su tečni i imaju neprijatan miris (nikotin)
- Alkaloidi su nerastvorni u vodi, a dobro rastvorni u organskim rastvaračima

#### Hemijske osobine

- Prisustvo azota uslovljava bazni karakter

Zastupljeni su u različitim razdjelima biljaka: Lycopodiophyta (*Lycopodium*), Equisetophyta (*Equisetum*), Piniphyta (*Ephedra* *Taxus*). Cvjetnice sadrže najviše alkaloida, paprati male količine, dok ih alge i mahovine uopšte ne sadrže. Mnogi alkaloidi su nazvani po biljnoj vrsti iz koje su prvi put izolovani.

U biljnim ćelijama se rijetko nalaze u slobodnoj formi već u obliku soli, estara ili amida. Najčešći oblik alkaloida jesu soli koje su vezane za organske kiseline kao što su mliječna, jabučna, sirćetna i dr. ili za neorganske kiseline (najčešće sumporna i fosforna). Alkaloidi se mogu naći praktično u svim dijelovima biljaka.

#### Količina i sadržaj alkaloida u biljkama zavisi od više faktora:

- faze ontogenetskog razvića
- geografskog položaja
- zajedničkog dejstva faktora spoljašnje sredine (vlage, temperature, jačine osvetljenosti, nadmorske visine i dr.)

U toku ontogenetskog razvića biljke količina i sadržaj alkaloida se mijenja. Iz praktičnih razloga je veoma važno znati u kom periodu je sadržaj najveći da bi se tada vršilo prikupljanje sirovina. Što se uticaja geografskog položaja tiče on se svodi na to da je najveći broj biljaka sa alkaloidima

rasprostranjen u žarkim i tropskim predjelima sa vlažnom klimom. Svaka biljna vrsta zahtijeva određene uslove spoljašnje sredine koji, kada su optimalni doprinose da je količina alkaloida u biljci najveća.

### Podjela alkaloidnih biljaka

- ✿ Prvu klasu čine **visokoalkaloidne familije** koje imaju preko 20% rodova sa alkaloidnim vrstama (Amaryllidaceae, Ranunculaceae, Solanaceae,...)
- ✿ Drugoj klasi pripadaju **srednjealkaloidne familije** čijih 10-20% rodova sadrži alkaloidne vrste (Fabaceae, Boraginaceae)
- ✿ Treća klasa su **maloalkaloidne familije** čijih 1-10% rodova ima vrste bogate alkaloidima (Euphorbiaceae, Lamiaceae)

### Klasifikacija alkaloida

- alkaloidi bez heterocikličnog prstena
- pirolidin (skr. PRL) i pirolizidin (PRZ) alkaloidi
- piperidin i piridin (PIR) alkaloidi
- hinolizidin (HLZ) alkaloidi
- hinolin (HIN) alkaloidi
- izohinolin (IZH) alkaloidi
- indol (IND) alkaloidi
- purin (PUR) alkaloidi
- diterpen alkaloidi
- steroidni (STE) alkaloidi

### Biološka funkcija alkaloida

- Alkaloidi štite biljku od herbivora
- Pojedini alkaloidi ispoljavaju antimikrobnu aktivnost, pa biljku štite od gljivičnih i bakterijskih infekcija
- Određene grupe alkaloida vezuju slobodne radikale, koji oštećuju biljno tkivo, pa je to još jedan oblik njihove zaštitne funkcije
- U obliku ovih jedinjenja, akumuliran je azot u biljnom tkivu
- U obliku soli alkaloida omogućen je transport određenih specifičnih kiselina kroz tkivo biljaka
- Moguće je da neki alkaloidi djeluju kao regulatori rasta biljaka

Poseduju jaku i specifičnu farmakološku aktivnost na humani i životinjski organizam. Zbog njih se veliki broj biljaka koristi kao lijekovi, ali isto tako uzrok su otrovnosti nekih biljaka.

### Fiziološki aktivni alkaloidi

- Djelovanje na centralni nervni sistem – morfin i skopolamin (depresivno); kofein, strihnin (stimulativno)
- Anestezirajuće djelovanje - kokain

# ✿ In vitro production of solasodine alkaloid in *Solanum nigrum* under salinity stress

(Jasmin Šutković, Daria Ler, Mohamed Ragab, Abdel Gawwad)

## UVOD

- **Solasodin** je otrovno alkaloidno hemijsko jedinjenje koje se javlja u biljkama porodice Solanaceae. Solasodin ima diuretsko, antikancerogeno, antimikotično, kardiotonično, antispermatogenetsko, antiandrogeno, imunomodulatorno, antipiretičko i različito dejstvo na centralni nervni sistem.
- *Solanum nigrum*
  - ✿ Jednogodišnja zeljasta biljka koja pripada porodici Solanaceae
  - ✿ U hemijski sastav ove biljke ulaze alkaloidi
  - ✿ Otrovnost je biljka
  - ✿ Ljekovita je biljka, upotrebljava se u medicini

## MATERIJAL I METODE

- Sjeme *Solanum nigrum*

Sjeme *Solanum nigrum* potiče od divljih biljaka u provinciji Fajum (Egipat). Suvo sjeme se ispira destilovanom vodom i gaji se u loncima napunjenim teškim glinenim zemljištem. Deset dana nakon klijanja, sadnice su prebačene u plastične kontejnere napunjene (2 sadnice po kontejneru) teškim glinenim zemljištem. Biljke su potom uzgajane do starosti od 30 dana, zatim su vršni pupoljci odvojeni i sterilisani.

- In vitro kultivacija

Vršni pupoljci su se gajili in vitro na modifikovanom hranljivom medijumu MurashigeSkoog (MS).

- Tretman slanosti

MS medijum dopunjen sa optimizovanim nivom regulatora rasta biljaka bio je odvojeno tretiran sa 50, 100, 150 i 200mM NaCl. PH vrijednost medijuma je bila podešena na 5,7 prije autoklaviranja i sijanja kulture. Ove kulture su redovno sub - kultivisane u intervalu od dvije nedelje na istom regulatoru rasta. Kvantifikacija solasodina svake kulture je izvršena 8 nedelja poslije inkubacije. Poslije 15 dana, uzorci su prebačeni na MS medijum koji je sadržio pet nivoa NaCl: 0,0 (kontrola), 50, 100, 150 i 200mM. Tokom rasta, uslovi inkubacije su bili konstantni: relativna vlažnost 80%, temperatura 25 ° C i 16/8 h svijetlo / tamno ciklusa.

- Sadržaj ukupnih proteina i prolina

Tri slučajna uzorka tkiva su se uzimala svakih 15 dana i to od svakog tretmana (različiti nivo NaCl). Oslobođeni prolin je bio ekstrahovan i određen po Bejtsovoj spektrofotometrijskoj metodi (Bates i sar., 1973). 0,04 g suve težine kalusa je homogenizovano sa 3% sulfosalicilne kiseline a nakon 72 sata se oslobodio prolin; homogenat je centrifugiran na 3000 obrtaja tokom 20 min. Supernatant je tretiran sa acetil i acil ninhidrinom, kuvano 1 sat, a zatim, apsorbancija je određena pomoću spektrofotometara na 520 nm. Sadržaj prolina je izražen u mg / g DV. Ukupno sadržaj rastvorljivih proteina određenje prema metodi Lovri i sar

- Procjena alkaloida solasodina

Ekstrakcija i određivanje solasodina izvedeni su spektrofotometrijski na 610 nm prema Eltaieb i sar., (1997). Sadržaj solasodina izražen je u mg / g DV.

## REZULTATI

- Efekat regulatora rasta na masu kalusa: mala koncentracija NAA regulatora rasta ima veliki efekat na masu kalusa *Solanum nigrum*. Između tri koncentracije; 0,5, 1,0 i 2 mg / l, najmanja koncentracija je pokazala veliku sposobnost indukovanja mase kalusa *Solanum nigrum* u odnosu na preostale dvije.
- Sadržaj prolina: Sadržaj prolina je značajno povećan kao rezultat povećanja koncentracije NaCl u medijumu, dok je u 8 nedelji, akumulacija prolina bila neznatno smanjena od one primjećene tokom 4 i 6 sedmice. Maksimalni efekat NaCl na akumulaciju prolina u kalusima, je bio na 150 mM NaCl, koncentracija prolina je povećana dva puta u odnosu na kontrolu.
- Sadržaj proteina: Povećanje koncentracije NaCl u medijumu ima negativan uticaj na ukupan sadržaj proteina u kalusu. Rezultati pokazuju da je tokom svih uzorkovanja tretman NaCl-om prouzrokovao dramatično smanjenje koncentracije proteina, posebno sa 150 i 200 mM NaCl, u poređenju sa kontrolom.

- Sadržaj solasodina: Proizvodnja solasodina, u kalusu *Solanum nigrum*, značajno reaguje na povećanje koncentracije NaCl u kulturi. Međutim, efekat najvišeg nivoa NaCl (200 mM) na akumulaciju solasodina je izuzetno niži od nivoa od 150, odnosno 100 mM. Najveće koncentracije solasodina su primjećene u 6. nedelji.

## DISKUSIJA

Mnogi naučnici su otkrili da se aminokiseline akumuliraju u biljci kada je ona izložena stresu soli i uglavnom je to prolin. U našem radu smo indukovali kalus *Solanum nigrum* da proizvode solasodin pod stresom soli. Rezultati su pokazali da se prolin eksponencijalno povećao sa porastom nivoa NaCl. U 150 i 200mM koncentracije NaCl, prolin je uveliko povećan na 100% i 120% u odnosu na kontrolu. U ovoj studiji, proteini u kalusu *Solanum nigrum* su se dramatično smanjili kao fiziološki odgovor na stres slanosti. Izgleda da je ukupani pad rastvorljivih proteina tokom stresa slanosti bio zbog ozbiljnog smanjenja stope fotosinteze u biljkama. Fotosinteza se smanjila pod stresom slanosti (Lee et al., 2004), dakle, sinteza proteina se dramatično smanjila ili se zaustavila.

Rezultati su pokazali da je ovaj vid stresa stimulisao akumulaciju solasodina. Odgovor na stres je značajan nakon 4 i 6 nedelja. Suprotno, povećanje NaCl od 150 do 200 mM ima negativan efekat na sintezu solasodina.

S druge strane, tretmani solju su imali veliki uticaj na sadržaj solasodina u kalusu. Minimalni sadržaj solasodina (0,53mg / g suve mase) se pojavio u biljkama uzgajane u poljima, dok je maksimalni sadržaj (2,25 mg / g suve mase) otkriven u kalusu in vitro. To je postignuto sa 150mM NaCl medijumom. Zabilježena je pojačana proizvodnja solasodina u nekim kulturama u poređenju sa ratarskim biljkama i kontrolom (bez NaCl). Međutim, visok nivo NaCl (200 mM) izazvao je izuzetno smanjenje akumulacije solasodina u kalusu. Ovo je zbog velikog poremećaja u fiziološkom procesu pod visokim nivom slanosti. Kalus tretiran sa 150mM NaCl je sadržao najveći sadržaj solasodina. Kako je *Solanum nigrum* važna ljekovita biljka, sadašnji protokol nudi mogućnost povećavanja proizvodnje solasodina.



## ZAKLJUČAK

Rezultati su pokazali da je moguće povećati sintezu solasodina u *Solanum nigrum*, koji se uzgaja in vitro, povećanjem koncentracije NaCl u kulturi. Najbolji efekat NaCl na povećanje akumulacije solasodina i prolina je pri koncentraciji od 150 mM, dok najviši nivo NaCl (200 mM) smanjuje proces sinteze solasodina.

## Etarska ulja

Etarska ulja su kompleksne smeše različitih hemijskih jedinjenja (u jednom etarskom ulju može se naći i do 800 jedinjenja). Nastaju kao produkti sekundarnog metabolizma biljaka.

Biljke koje sadrže etarska ulja nazivaju se aromatičnim biljkama.

Posebno su zastupljena u biljkama sledećih familija: Pinaceae, Zingiberaceae, Lauraceae, Rutaceae, Apiaceae, Myrtaceae, Lamiaceae, Asteraceae...

Lokalizovani su u različitim delovima biljke: - korijen i rizom(Zingiberis, Curcuma)

-kora(cimet)

-stablo(camphora)

-plodovi(biber, limun)

-sjemenu(muscat).

Generalno, produkcija etarskih ulja se naročito odvija u listovima i cvjetovima biljke.

Osim kod viših biljaka, etarska ulja se mogu naći i u nekim organizmima niže organizacije (mrke i crvene alge). Golosjemenice ih sadrže u listovima i iglicama četine (Pinus).

Etarska ulja mogu biti skoncentrisana samo u izvjesnim organima, ili ravnomjerno raspoređena u svim organima. Dešava se da različiti organi iste biljke sadrže etarska ulja različitog sastava. U zavisnosti od uslova sredine u kojima biljka raste, prije svega klime, ali također i od činjenice da većina biljaka koja se koriste za proizvodnju etarskog ulja, bilo kultivisane ili sakupljene u prirodi, imaju brojne varijetete, podvarijetete, sorte, klonove i hibride tako da će hemijski sastav ulja biti poprilično neujednačen usled genetičkog diverziteta biljaka. Smatra se da je razlika u kvantitativnom sastavu etarskih ulja iste biljne vrste, najverovatnije posledica uticaja ekoloških faktora ili ontogenetskog stadijuma razvoja biljke. Kvalitativni sastav je specifična karakteristika određene vrste ili varijeteta i genetski je uslovljen, te predstavlja "finger print" (otisak prsta) date vrste.

Sinteza i sekrecija etarskih ulja u biljkama odvija se u specijalizovanim strukturama koje se dijele na spoljašnje (žljezdane dlake i osmofore) i unutrašnje (uljne ćelije, sekretorne šupljine, sekretorne kanale)

Na sobnoj temperaturi su tečnosti. Rijetko su obojena i aromatičnog su mirisa. Gustina im je manja od gustine vode, ali postoje i izuzeci (karamfilićevo, cimetovo...). Slabo su rastvorljiva u vodi, rastvorni su samo neki sastojci, koji daju miris aromatičnim vodama (Aquae aromaticae).

Najjednostavniji način da se ove tečnosti izoluju iz biljne sirovine je destilacija vodenom parom.

Sastojci su u odnosu na koncentraciju u etarskim uljima su podijeljeni na: - glavne (20-95%)

-sporedne(1-20%)

-zastupljene u tragovima (ispod 1%)

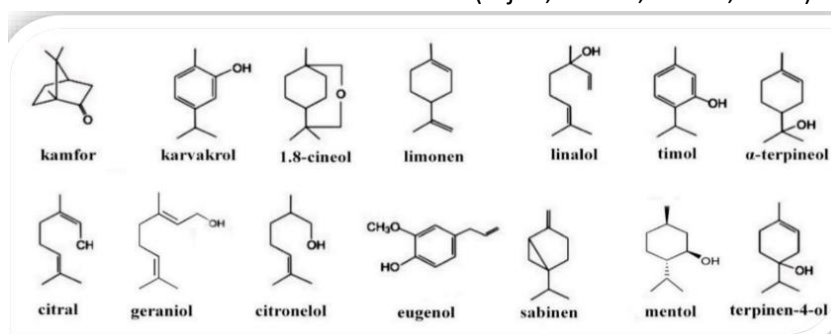
Grupa jedinjenja koja dominiraju u sastavu etarskih ulja su terpeni . Odnosno, monoterpeni, seskviterpeni, diterpeni i njihovi oksidativni produkti (alkoholi, aldehidi i ketoni) . Pored terpena, mogu se naći i još neka isparljiva jedinjenja kao što su : alifatična (tipa dodekana, tridekana, tetradekana, dekanola, metildodekanala, metilo-leata i dr.), aromatična (derivati benzoeve kiseline, fenilpropanoidi, kumarini, eugenol, safrol, miristicin, koniferil- alkohol i apiol) i specifična jedinjenja koja sadrže sumpor (najčešće izosulfocijanati i organski disulfidi) i azot (derivati indola ili alifatični amini)

Klasifikuju se na osnovu glavnih sastojaka:- ugljovodonici (pineni, limonen)

-alkoholi(geraniol, citronelol, linalol, mentol)

-aldehidi(citral)

-ketoni(tujon, cineol, anetol, timol)



Eterična ulja se razlikuju od masnih ulja po hemijskom sastavu. Masna ulja su gliceridi masnih kiselina , a estarska su terpeni , mogu uvrstiti u caiklična jedinjenja. Masna ulja su bez mirisa tj. imaju slab miris (kada su u svježem stanju) . Na papiru ostavljaju trajnu masnu mrlju . Dok eterična ulja imaju intenzivan miris i ne ostavljaju trajnu mrlju na papiru jer su lako ispraljiva , tako da se ona gubi nakon određenog vremena.

Dugo se smatralo da jedinjenja koja ulaze u sastav etarskih ulja nemaju značajnu ulogu u fiziološkim procesima biljke, nit da predstavljaju dio njenog adaptivnog sistema. Pretpostavljalo se da su mnoga štetna za samu biljku, iz razloga što su izolovana u specijalizovanim ćelijama i što se odstranjuju iz organizma kao ekskreti. Brojnim eksperimentima je dokazano da etarska ulja aktivno učestvuju u metabolizmu biljke (fiziološka funkcija) i da su biljci značajna za adaptaciju na postojeće ekološke uslove (ekološka funkcija). Variranjem količine i sastava etarskog ulja biljke reaguju na varijabilnosti u ekološkim uslovima životne sredine. Smatra se da etarska ulja doprinose boljem podnošenju promenljivih uslova životne sredine. U stresnim klimatskim okolnostima etarska ulja mogu uticati na smanjenje transpiracije ili poboljšanje opšteg temperaturnog stanja biljnog organizma. Pretpostavlja se da je metabolizam etarskih ulja pod kontrolom primarnog metabolizma i da zavisi od balansa fotosinteze i iskorišćenja njenih produkata . Pojedine komponente ulja deluju, kako mirisom tako i drugim biohemijskim svojstvima, privlačno ili odbojno na druge organizme. Na taj način, ove komponente utiču na

uspostavljanje različitih botaničkih odnosa biljaka sa drugim živim bićima (biljkama, životinjama, mikroorganizmima i čovekom).

Od davnina se zna da oko pojedinih biljnih vrsta ne rastu druge zeljaste biljke, tj. da biljke ispoljavaju fitotoksično dejstvo na druge biljne vrste, koje se ogleda u inhibiciji klijanja i/ili rasta ovih vrsta. Prvo naučno tumačenje takve pojave u neposrednoj okolini žalfije, *Salvia leucophyta* (Lamiaceae) i pelina, *Artemisia californica* (Asteraceae). Ovaj efekat je pripisan dejstvu monoterpena, kamfora i 1,8-cineola, poznatih inhibitora klijanja (detektovanih u zemljištu i atmosferi u neposrednoj blizini ovih biljnih vrsta). Miris biljaka značajan je faktor u komunikaciji biljka - životinja. Za ulogu privlačenja insekata odgovorni su hemijski atraktanti u ulju (citral, linalol, mircen i limonen).

Analizama kvalitativnog i kvantitativnog sastava etarskog ulja utvrđeno je da se produkcija etarskog ulja mijenja u toku dana, u zavisnosti od vremena oprašivanja date biljne vrste. Kod biljaka koje se oprašuju danju produkcija mirisa je najveća u podne, kada su insekti najaktivniji, dok kod biljaka koje se oprašuju noću najveća je pred veće .

Etarsko ulje štiti biljke od preživara i drugih herbivora, koje ne mogu da podnesu miris i ukus takvih biljaka. Poznato je da različiti monoterpeni alkoholi deluju na sluzokošu želuca otežavajući varenje hrane kod jelena i ovaca .

Neki insekti vremenom razvijaju sposobnost detoksikacije pojedinih toksičnih supstanci iz ulja. Zbog toga se javlja potreba biljke da sintetiše novo jedinjenje koje će imati toksičan efekat na takve insekte. Iz toga proističe velika raznovrsnost sastava etarskih ulja.

Etarska ulja su biljci i jedna vrsta patogene barijere. Etarsko ulje semena kupusa (*Brassica oleracea*) sadrži inhibitor rasta mikroorganizama, zbog čega su krstašice (*Brassicaceae*) rezistentne na infekciju koju izaziva *Plasmodiophora brassicae*. Odbrambena uloga etarskih ulja zasniva se pre svega na njihovim baktericidnim i fungicidnim svojstvima. Primijećeno je da prilikom oštećenja (od strane insekta, glodara, gusenica, ljudi itd.) biljka luči etarska ulja, koja svojom antimikrobnom aktivnošću spečavaju patogene agense da prodru dalje.

Primjer 1:

## VARIATIONS OF ESSENTIAL OIL CHARACTERISTICS OF CLINOPODIUM PULEGIUM (LAMIACEAE) DEPENDING ON PHENOLOGICAL STAGE

(Violeta Slavkowska, Bojan Zlatković, Christian Bräuchler, Danilo Stojanović, Olga Tzakou and Maria Couladis)

U radu je praćena promjenljivost količine i sastava etarkog ulja *Clinopodium pulegium* kroz različite stadijume razvoja biljke (vegetativni, stadijum cvjetanja i plodonošenja). Materijali su sakupljeni iz samonikle (klisura Svrliškog Timoka) i gajene (Niš) populacije. Etarsko ulje je izolovano iz nadzemnih delova biljaka destilacijom vodenom parom i analizirano GC-MS metodom. Ovo su prvi podaci o osobinama etarskog ulja biljaka populacije iz klisure Svrliškog Timoka

*Clinopodium pulegium* endemična vrsta, naseljava kamenita tla, uglavnom u klisurama, na 1000 do 1200 m n.v. Višegodišnja je biljka uspravne stabljike i više ili manje jajolikih listova. Bogata je esencijalnim uljem (preko 0,5%) Pulegon, izomenton i menton su najviše prisutne komponente eteričnog ulja. Nekolike vrste roda *Clinopodium* pokazuju antimikrobnu i antioksidativnu aktivnosti.

### MATERIJAL I METODE

Materijal je prikupljen sa teritorije Klisura Svrliški Timok, Srbija (karta 1). Biljni materijal sakupljan je tokom vegetativnog stadijuma (Jun, 2009.), stadijuma cvjetanja (jul, 2009.) i plodonošenja (Septembar, 2009). Biljke su prenete iz svog prirodnog staništa u privatnu baštu u Nišu. Nadzemni djelovi ovih primjeraka (gajene populacije) takodje su sakupljeni u različitim razvojnim stadijumima: vegetativnom (maj, 2010.), cvjetanja (avgust, 2010.) i plodonošenja (početak oktobra 2010). Materijal je sušen na sobnoj temperaturi.

Etarska ulja iz nadzemnih delova biljaka dobijeni su destilacijom vodenom parom u vremenskom periodu od oko 3 sata u aparatu tipa Clevenger. Etarska ulja su rastvorena korišćenjem n-heksana i osušena preko anhidrovanog natrijum-sulfata i držao na -40 ° C do analiziranja. Prinos ulja je izražen u ml / 100g suve težine biljnog materijala.

GC-MS analiza:

Identifikacija jedinjenja je zasnovana na poređenju njihovih indeksa zadržavanja (RI), retencionog vremena (RT) i masenog spektra sa onima dobijenim iz autentični uzoraka.



Map 1. Distribution of *Clinopodium pulegium* in Serbia [black spots – data from literature (Šilić, 1979; Bogosavljević et al., 2007); red spot – population from Svrliški Timok gorge]

## REZULTATI I DISKUSIJA

### Sadržaj ulja.

Svi uzorci su se odlikovali visokim sadržajem etarskog ulja (0,8% - 1,4%). Količina ulja kod biljaka iz samoniklih populacija u vegetativnoj fazi, 1% (v / v), količina je bila je veća u fazi cvjetanja, 1,4% (v / v), dok je nešto niža u fazi plodonošenja, 1,2% (v / v) (slika 1).

Gajene biljke u vegetativnom stadijumu su sadržale 1,2% (v / v) ulja. Utvrđen je najveći sadržaj ulja u fazi cvjetanja, 1,3% (v / v), a najniži u faza plodonošenja 0,8% (v / v).

Neke studije su pokazale da sadržaj etarskog ulja zavisi od faktora sredine. Međutim, u ovoj studiji sadržaj ulja je bio približno jednak u biljkama iz samoniklih staništa i gajenih populacija.

Najveća količina etarskog ulja u fazi cvjetanja može biti povezana sa biološkom ulogom esencijalnih ulja. Poznato je da esencijalna ulja mnogih vrsta klinopodijuma imaju antimikrobne aktivnosti i shodno tome štite biljku u ovoj veoma važnoj, i osjetljivoj fazi razvoja od napada patogena.

### Sastav esencijalnog ulja.

Dvadeset jedno jedinjenje je identifikovano je, što predstavlja 95,3-99,6% ukupnih ulja (Tabela 1). Razlike u sastavu etarskog ulja su bile više kvantitativne nego kvalitativne. Monoterpenoidi su dominirali u uljima (u koncentraciji većoj od čak 94%). Među monoterpenoidima, kiseonični monoterpeni tipa metana je bio prisutan u veoma visokom procentu (90,6% -94,7%). Komponente seskviterpena pronađene su u samo male količine (0,5% -2,5%).

Na osnovu dobijenih rezultata možemo se zaključiti da je odnos monoterpena i seskviterpena stabilan karakter u ulju *C. pulegium* i uglavnom nezavisan od uslova okoline i fenološke faze.

Table 1. Content and chemical composition of the essential oil of *Clinopodium pulegium*

	Wild plants			Cultivated plants		
	June	July	September	May	August	October
	vegetative stage	flowering stage	fruiting stage	vegetative stage	flowering stage	fruiting stage
<b>Oil content (% v/w)</b>	1.0	1.4	1.2	1.2	1.3	0.8
<b>Constituents</b>	<b>RI</b>					
1. $\alpha$ -pinene	937	0.3	0.9	tr	tr	0.4
2. sabinene	974	0.2	0.4	tr	tr	0.3
3. $\beta$ -pinene	977	0.7	1.2	tr	tr	1.0
4. myrcene	988	0.1	0.5	tr	tr	0.3
5. 3-octanol	993	0.2	-	-	-	-
6. limonene	1027	1.7	4.1	3.3	4.2	3.5
7. (E)- $\beta$ -ocimene	1041	-	tr	tr	0.1	0.1
8. menthone	1148	7.8	28.4	48.5	16.9	14.5
9. iso-menthone	1157	0.6	1.7	2.8	0.9	0.9
10. isopulegone*	1176	0.9	2.1	1.6	3.5	3.5
11. $\alpha$ -terpineol	1181	-	tr	tr	0.3	tr
12. pulegone	1232	76.1	49.5	34.7	62.7	64.6
13. piperitone	1247	0.5	2.1	4.5	0.9	1.2
14. piperitenone	1337	5.4	6.3	2.4	3.3	6.2
15. piperitenone oxide	1360	0.3	0.5	0.2	3.9	2.3
16. $\beta$ -bourbonene	1380	-	tr	0.3	tr	0.3
17. (E)-caryophyllene	1412	0.1	0.4	0.5	0.5	0.4
18. germacrene D	1479	-	1.1	0.3	0.8	1.4
19. bicylogermacrene	1492	-	0.4	tr	0.1	0.3
20. spathulenol	1571	0.2	tr	0.4	1.1	0.2
21. caryophyllene oxide	1583	0.2	-	-	-	-

Monoterpenoids	94.6	97.7	98.0	96.4	97.1	97.8
Hydrocarbons	3.0	7.1	3.3	4.3	3.6	4.4
Oxygenated monoterpenes	91.6	90.6	94.7	92.1	93.5	93.4
Sesquiterpenoids	0.5	1.9	1.5	2.5	2.3	1.5
Hydrocarbons	0.1	1.9	1.1	1.4	2.1	1.2
Oxygenated sesquiterpens	0.4	-	0.4	1.1	0.2	0.3
Other compounds	0.2	-	-	-	-	-
Total	95.3	99.6	99.5	98.9	99.4	99.3

\* Correct isomer not identified; RI, Retention Indices relative to  $C_7$ - $C_{10}$  n-alkanes on HP-5MS; %, Relative percentage obtained from peak area; tr, trace (< 0.1%)

### Dominantna jedinjenja u etarskim uljima.

Ulja karakteriše velika količina monoterpena C-3 ketoni kao što su: pulegon (18,4% -76,1%), menton (7,8% -65,3%), piperiton (0,5% -4,5%) i piperitenon(0,6% -6,3%).

Glavna jedinjenja ulja predstavnika iz samoniklih i gajenih populacija su pulegon i menton.

Koncentracija pulegona u biljkama iz samoniklih populacija (slika 2) bila je najviše (76,1%) u vegetativnom stadijumu, opada tokom cvetanja (49,5%) do faze plodonošenja (34,7%). Nasuprot tome, koncentracija mentona bila je najniža u vegetativnoj fazi (7,8%) i zatim linearno povećana tokom cvetanja (28,7%) do faze plodonošenja (48,5%).

Kvantitativno su ulja kultivisanih biljaka bila malo različita (slika 3). Pulegon je bio konstantno visok i u vegetativnom (62,7%) i u stadijumu cvetanja (64,6%), dok se njegova koncentracija smanjila u fazi plodonošenja (18,4%).

Menton je pokazivao potpuno suprotnu tendenciju. Njegova koncentracija je bila niska u vegetativnoj (16,9%) i fazi cvetanja (14,5%) i visoka u fazi plodanja (65,3%).

Sadržaj dominantnih komponenti u uljima divlje i gajene biljke odlikovale su se postepenošću smanjenja pulegona i povećanja mentona tokom razvoja biljaka u prirodnim uslovima (slika 2). Ulje gajenih biljaka pokazuje smanjenje pulegona i povećanje mentona od cvetanja do plodonošenja (slika 3).

Razlike mogu nastali su iz činjenice da su divlje i kultivisane biljke su sakupljane u različitim mesecima.

Visoke koncentracije pulegona u ulju biljaka u fazi vegetacije i cvetanja može se objasniti njegovom biološkom ulogom. Pulegon u etarskim uljima djeluje kao zaštitni odgovor biljke na dejstva drugih organizama, biljaka, insekata, biljojeda, parazita ili patogena. Na primer, pulegon se pokazao se efikasnim protiv vrsta *Musca domestica*, *Diabrotica virgifera*, *Peridroma saucia*, *Spodoptera litura*. Istraživanje sprovedeno na *Spodoptera eridania* pokazalo je da larve tretirane pulegonom razvijaju se u odrasle jedinke sa smanjenom plodnošću. Štaviše, istraživanja su pokazala da čisti pulegon ima veću inhibitornu aktivnost na rast bakterija u odnosu na ukupno etarsko ulje. Pulegona ima značajnu ulogu u alelopatiji. Inhibitorna aktivnost pulegona na sjemenu i klicama *Raphanus sativus* u in vitro uslovima pokazalo se da ima četiri puta jače dejstvo nego HCl. Eterično ulje vrsta *Clinopodium* i njegova glavna komponenta pulegon je takođe pokazala da sprečava klijanje semena i razvoj biljaka drugih vrsta.

Pokazalo se da sinergijski / antagonistički odnosi između bitnih komponenti ulja mogu promeniti toksičnost cjelokupnog esencijalnog ulje. Jaka toksičnost pulegona je suzbijena prisustvom mentona. Dakle, zaključeno je da je etarsko ulje dobijeno u fazi plodonošenja u eksperimentu bilo manje toksično, i sa nižim insekticidnim dejstvom od ulja dobijenog u vegetativnom stadijumu i stadijumu cvetanja.

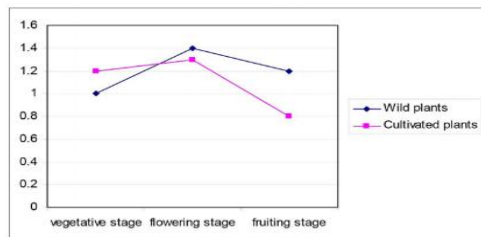


Fig. 1. Oil content (% v/w) of *Clinopodium pulegium*

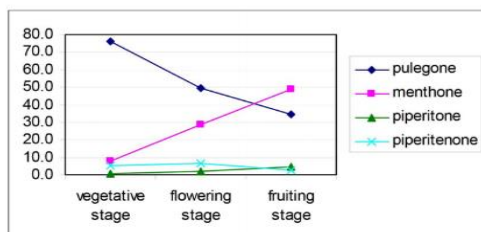


Fig. 2. The dominant constituents (%) of essential oils of wild *Clinopodium pulegium*

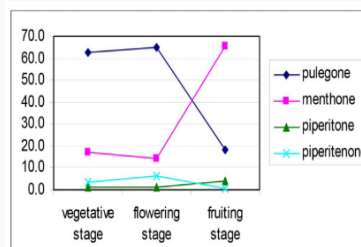


Fig. 3. The dominant constituents (%) of essential oils of cultivated *Clinopodium pulegium*

## ZAKLJUČAK

*C. pulegium* poreklom iz prirodnih i gajenih populacija odlikovale su velike količine etarskih ulja u svim fazama razvoja. Međutim, ova vrsta je imala najveći prinos u fazi cvjetanja. Kvalitet esencijalnog ulja je bio stabilan i nije varirao u zavisnosti od promene uslova okoline. Primijećena je promjena u dominaciji glavnih komponenti sa promjenom fenološkog stadijumima. U vegetativnom stadijumu dominirao je pulegon, kao i u fazi cvjetanja, dok je menton dominirao u fazi plodonošenja. Gajene biljke u vegetativnoj fazi i fazi cvjetanja mogu se smatrati značajnim izvorom pulegona, a u fazi plodonošenja značajnim izvorom mentona.

## FLAVONOIDI

Polifenoli predstavljaju široko rasprostranjenu heterogenu grupu sekundarnih biljnih metabolita i jednu od najvažnijih klasa prirodnih antioksidanasa. Pojam „flavonoid“ (latinski naziv flavus, što znači žuto) se koristi da opiše grupu prirodnih jedinjenja koji u svojoj strukturi imaju fenilbenzopiransku strukturu.

U odnosu na poziciju aromatičnog prstena na benzopiranski ciklus prirodni flavonoidi se dijele u tri grupe: flavonoidi (2 –benzopirani), izoflavonoidi (3 –benzopirani) i neoflavonoidi (4 –benzopirani).

Flavonoidi su podijeljeni na nekoliko podgrupa: halkoni, flavani, flavoni, flavonoli, izoflavoni, flavanoni, flavanonoli, i antocijani, čije su osnovne strukturne formule dane na. Za raznovrsnost flavonoida odgovorni su kako genetički faktori, tako i egzogeni faktori( klima, zemljište, geografska širina, nadmorska visina). U prirodi se flavonoidi nalaze uglavnom u obliku glikozida, tj. povezani su s različitim molekulama šećera. Flavonoli i flavoni su od posebne važnosti jer je utvrđeno da posjeduju antioksidativne sposobnosti. Flavonoidima se pripisuje svojstvo uticaja na boju listu, cvijetu, plodu (crvena/plava/ljubičasta). Samo određeni broj flavonoida daje boju biljkama zbog apsorpcije u vidljivom dijelu spektra. Takođe, štite biljku od UV zračenja, napada štetočina, djeluju i kao signalne molekule, mogu imati ulogu da privlače insekte zbog hrane (npr. izokvercetin u plodu dudu) ili da bi se zaštitila biljka od herbivora (npr. Proantocijanidin)

### Primjer 2:

Seasonal variation of flavonoids in *Teucrium polium* L. (Lamiaceae)

(Gjoshe Stefkov, Marija Karapandzova, Marina Stefova, Svetlana Kulevanova)

Cilj ove studije bio je identifikacija aglikona flavona i određivanje sadržaja svakog, kao i ukupnog sadržaja flavonoida, i ispitivanje mogućih sezonskih varijacija flavonoida kod vrste *Teucrium polium* L. (Lamiaceae), (narodni naziv-pepeljuša). Uzorci biljaka prikupljeni su na šest različitih lokacija na teritoriji Sjeverne Makedonije. Šest flavonskih aglikona (luteolin, apigenin, diosmetin, cirsiliol, cirsimaritin i cirsilineol) identifikovani su HPLC metodom.



*Teucrium polium* L. (Lamiaceae) je polužbunasta vrsta poreklom sa mediterana i srednjeg Istoka. U Republici Makedoniji je široko primjenjivana u tradicionalnoj medicini ,gdje se koristi kao čaj za dijabetes, primjenjuje se i kao začin. Pokazuje sledeća dejstva : antioksidativno , antinflatorno , antipiretik ,antimikrobno, hepatoprotektivno, citotoksično.

Flavonoidi predstavljaju najvažniju grupu aktivnih komponenti vrsta roda *Teucrium*.

#### Materijal i metode

Nadzemni delovi biljke od 6 različitih populacija *T. poliuma* sakupljane su tokom ljeta 1999, 2000, 2003 i 2004 .Biljni materijal je sušen na vazduhu, pakovan u papirnim kesama i čuvan na mračnom i hladnom mestu do analize.

**Table 1.** The locations of collection of samples of *T. polium*

Species	Voucher specimen	Location	Mount and year of collection	Collection for determination of seasonal variation
<i>Teucrium polium</i>	T <sub>p</sub>	v. Koleshino	July - 2003	Each month, from January to December, in 2004.
<i>Teucrium polium</i>	T <sub>7</sub>	v. Janche	July - 1999	
<i>Teucrium polium</i>	T <sub>9</sub>	v. Rashtak	July - 2000	
<i>Teucrium polium</i>	T <sub>11</sub>	v. Gari	July - 2000	
<i>Teucrium polium</i>	T <sub>12</sub>	Alshar	July - 2000	
<i>Teucrium polium</i>	T <sub>15</sub>	Arkutino	July - 2000	

Biljni materijal (1 g) je ekstrahovan, pripremljen za HPLC analizu

Flavonoidni aglikoni u hidrolizovanim ekstraktima su analizirani HPLC metodom .Hromatogrami za skrining flavona su se najbolje videli na 348 nm, što je u regionu gdje flavoni pokazuju maksimum apsorpcije.

Identifikacija flavonskih aglikona u ekstraktima *T. polium*, izvršena je upoređivanjem vremena zadržavanja i podacima UV spektra komponenata ekstrakta sa autentičnim flavonoidnim supstanci. Sastav smeša i vrijeme zadržavanja flavonoida predstavljeni su u tabeli 2. HPLC hromatogrami obje smješe standarda predstavljeni su na slici 1.

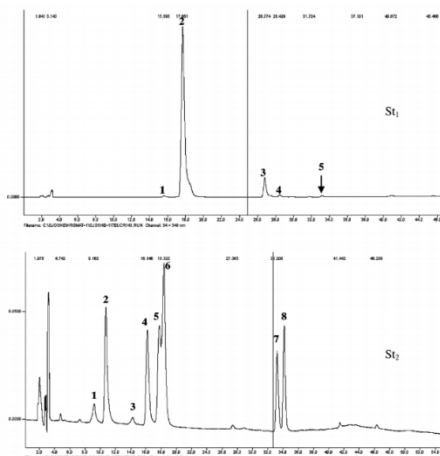


Fig. 1. HPLC chromatograms (348 nm) of two mixtures of standard substances of flavones. St<sub>1</sub>: 1-apigenin, 2 – diosmetin, 3-cirsimaritin, 4 – cirsilineol, 5 – genkwanin; St<sub>2</sub>: 1 – eryodictiol, 2 – luteolin, 3 – naringenin, 4 – apigenin, 5 – chrysoeriol, 6 – diosmetin, 7 – acacetin, 8 – genkwanin

Table 2. Retention times ( $t_R$ ) of the components in two mixture of authentic samples of flavonoids (St<sub>1</sub> and St<sub>2</sub>)

Mixture	Structure	$t_R$ /min
St <sub>1</sub>		
Apigenin	5,7,4'-OH flavone	15,59
Diosmetin	5,7,3'-OH, 4'-OCH <sub>3</sub> flavone	17,65
Cirsimaritin	5,4'-OH 6,7-OCH <sub>3</sub> - flavone	26,77
Cirsilineol	5,4'-OH 6,7,3'-OCH <sub>3</sub> - flavone	28,43
Genkwanin	5, 4'-OH 7-OCH <sub>3</sub> flavone	32,98
St <sub>2</sub>		
Eryodictiol	5,7,3',4'-OH flavanone	9,15
Luteolin	5,7,3',4'-OH flavone	10,79
Naringenin	5,7,4'-OH flavanone	13,82
Apigenin	5,7,4'-OH flavone	15,73
Chryseriol	5,7,4'-OH, 3'-OCH <sub>3</sub> flavone	17,31
Diosmetin	5,7,3'-OH, 4'-OCH <sub>3</sub> flavone	17,77
Acacetin	5,7 -OH 4'-OCH <sub>3</sub> flavone	32,09
Genkwanin	5, 4'-OH 7-OCH <sub>3</sub> flavone	32,98

Identifikovano je šest flavonskih aglikona, luteolin, apigenin, cirsilol, diosmetin, cirsimaritin i cirsilineol (tabela 3). HPLC hromatogram hidrolizovanog ekstrakta T. Polijum. Rezultati polukvantitativnitivne analize sadržaja svakog flavona i količine ukupnih flavonoida predstavljeni su u tabeli 3.

Table 3. Semi-quantitative determination of flavones aglycons in hydrolyzed extracts of *T. polium*

Sample	Luteolin	Apigenin	Cirsilol	Diosmetin	Cirsimaritin	Cirsilineol
Tp	++	++	++	+	++	tr
T <sub>7</sub>	++	+	+	tr	+	tr
T <sub>9</sub>	++	++	+	-	+	tr
T <sub>11</sub>	++	++	+	+	+	tr
T <sub>12</sub>	++	+	+	tr	+	tr
T <sub>15</sub>	++	+	+	+	+	tr

(++) - Dominantly present; (+) - present; tr – presented in traces; (-) – not detected

## Rezultati i diskusija

Za utvrđivanje sezonske varijacije u sastavu i sadržaju flavonoida uz pomoć HPLC metode u uzorcima T. polium izvedeno sa istog mesta (v. Koleshino, jugoistok Sjeverne Makedonije), svakog mjeseca (osim juna) tokom 2004.

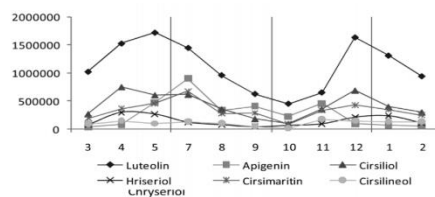
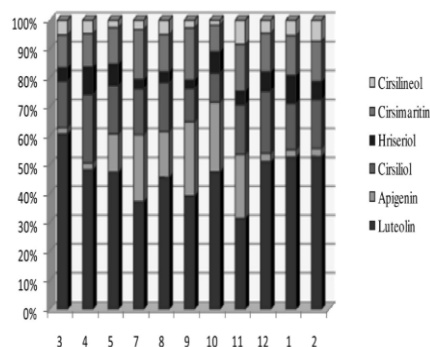
Identifikovano je svih šest flavonskih aglikona u svakom mesecu. Koncentracija svakog flavona aglikona, kao i koncentracija ukupnih flavonoida varirale su tokom sezone (tabela 4). Iz prikazanih rezultata (Tabela 4 i Slika 3 i Sl.4), moglo bi se primijetiti da ne postoje kvalitativne varijacije aglikona flavona u T. polium tokom jedne sezone, pošto je identifikovano svih šest flavonskih aglikona u svakom mjesecu.

Varijacije svakog flavonoida ponaosob bile različite i najveća količina luteolina je pronađen u maju, za apigenin u julu, za cirsilol i diosmetin u aprilu, za cirsimaritin u julu i za cirsilol u Novembru.

Najzastupljeniji flavoni bili su luteolin, zatim apigenin i cirsimaritin. Najzastupljeniji flavon tokom cijele sezone bio je luteolin sa najvećom koncentracijom u maju. Sadržaj ukupnih flavonoida bio je najveći u periodu od maja do jula, što bi bio i najprikladniji period u sezoni za sakupljanje biljnog materijala ove vrste. Ovaj period odgovara fazi cvjetanja T. polium. Period od avgusta do novembra je period plodonošenja i nije pogodan za sakupljanje biljnog materijala, jer sadržaj ukupnih flavonoida opada. Izmjereno je da je koncentracija cirsilineola u oktobru je bila najniža.

**Table 4.** Total amount and relative abundance of flavone aglycones during the one season of *Teucrium polium*, with normalized peak areas values of flavonoids accounted on peak area of cirsilineol, expressed as value one.

	III	IV	V	VII	VIII	Months IX	X	XI	XII	I	II
	Spring			Summer			Autumn			Winter	
Luteolin	64	95	107	90	60	39	28	41	102	82	59
Apigenin	2	5	30	56	21	25	14	28	6	4	3
Cirsiliol	17	47	38	38	22	11	6	22	43	25	19
Diosmetin	5	19	17	8	5	3	4	6	13	15	7
Cirsimaritin	12	23	28	42	17	18	5	21	27	21	15
Cirsilineol	5	9	6	8	7	3	1	11	9	8	8
Total:	105	198	226	242	143	99	58	129	200	155	111

**Fig. 3.** Seasonal variations in the content of six flavone aglycones in *Teucrium polium* (1-12 number of months)**Fig. 4.** Relative ratio of the flavonoids in *Teucrium polium* during one season (1-12 numbers of months)

## Zaključak

Šest flavonskih aglikona (luteolin, apigenin, diosme-, cirsiliol, cirsimaritin i cirsilineol) identifikovani su HPLC metodom iz hidrolizovanih ekstrakata podzemnog dijela *Teucrium polium*. Najzastupljeniji flavon bio je luteolin, praćen apigeninom i cirsimaritinom. Pronađene su velike sezonske varijacije u sadržaju svakog flavonoida i u sadržaju ukupnih flavonoida. Sadržaj svih flavonoida bio je najveći u period od maja do jula, što bi mogao biti najprikladniji period za sakupljanje biljnog materijala. Suprotno tome, period sazrijevanja karakteriše niska ukupna količina flavonoida.

