

# *Bioaktivne supstance – značajne za ekofiziološke adaptacije biljaka*

*Milica Vučurović 6/20  
Danijela Vuković 7/20*



## Primarni metaboliti

- Produkti primarnog metabolizma
- Obavljaju fiziološke funkcije u tijelu
- Obezbjeđuju energiju za rast, razviće, reprodukciju i funkcionisanje
- Sintetišu se tokom faze rasta biljke
- Obrazuju se u većim količinama; lako ih je izolovati
- Gradivna su jedinjenja, ulaze u sastav osnovnih molekulskih struktura
- Manja hemijska raznovrsnost
- Isti su kod svih biljaka

## Sekundarni metaboliti

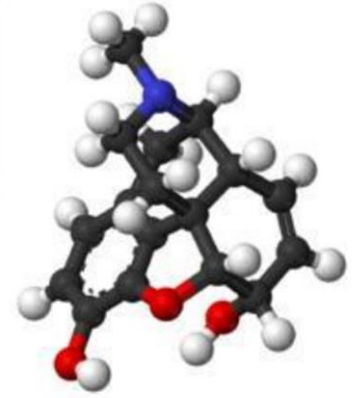
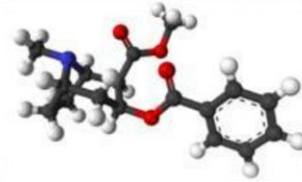
- Produkti sekundarnog metabolizma
- Imaju važan ekološki značaj, zaštitnu ulogu u borbi protiv različitih oblika stresa, biološku i farmakološku aktivnost
- Nemaju energetske značaj, nisu direktno uključeni u rast, razviće i reprodukciju
- Sintetišu se na kraju faze rasta biljke
- Obrazuju se u malim količinama; teško ih je izolovati
- Ne ulaze u sastav osnovnih molekulskih struktura
- Veća hemijska raznovrsnost
- Jedinstveni su za određenu biljnu vrstu



# 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 sunpor



Na osnovu prisustva azota:

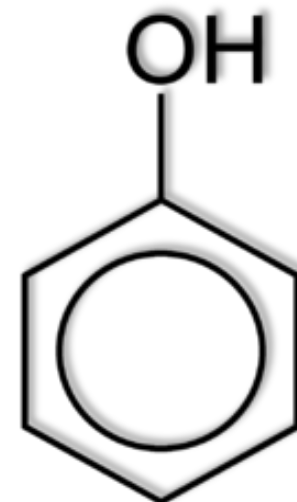
- Jedinjena sa azotom: alkaloidi, amini, neproteinske aminokiseline, cijanogeni heterozidi, alkamidi, glukozinolati, lektini, peptidi i polipeptidi
- Jedinjenja bez azota: terpeni, steroidi i saponini, flavonoidi i tanini, fenilpropanoidi, lignin, lignani i kumarini, poliacetileni, masne kiseline i voskovi,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

# 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** obuhvataju veliku grupu molekula koji imaju zajedničku osobinu da sadrže najmanje jednu hidroksilnu grupu u aromatičnom prstenu.
- 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

BIOSINTETSKOM PORIJEKLU

SLOŽENOSTI:

Prosti fenoli

Fitoaleksini

Lignani i neolignani

Melanini

Biflavonoidi

Složeni fenoli - polifenoli

Fenol, fenilpropanoidi, kumarini, ...

Flavonoidi i neflavonoidi



- 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 cvijetova ili kao zaštita biljnih tkiva od prekomjernog UV-zračenja
- Prirodni izvori polifenolnih jedinjenja: začinsko i ljekovito bilje, ali to mogu biti i voće, povrće, žitarice, brojni životinjski i mikrobiološki proizvodi.



# 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 materijal

- Sakupljeno je sjeme 10 porodica *C.paliurus* iz prirodnih šuma, grad Lushan
- Sjeme je prvo posijano u plastične posude

### Uzimanje uzorka

- Uzorkovano je približno 200g svježeg potpuno razvijenog lišća iz 10 porodica svake 4 nedelje od maja do novembra

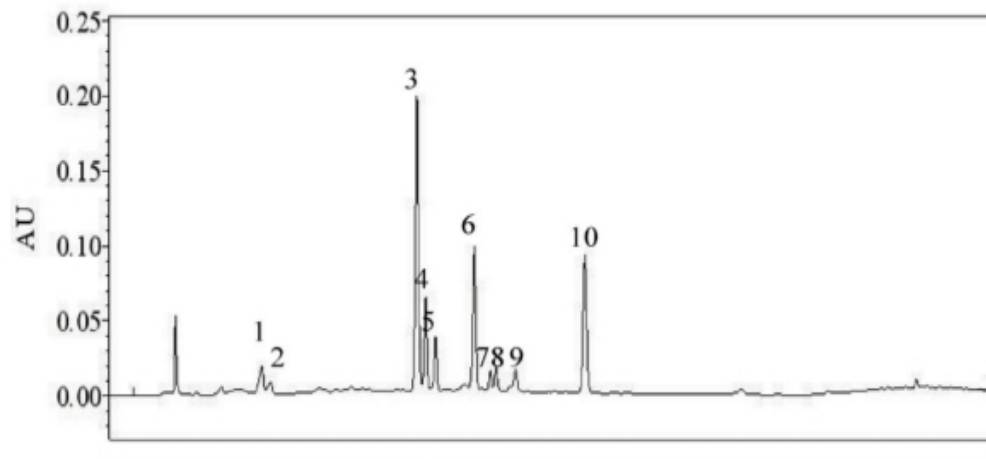


## Priprema uzorka

1. Svi uzorci su sušeni u peći, nakon čega su osušeni listovi samljeveni u fini prah
2. Čuvanje na sobnoj temperaturi prije analize
3. Približno 1g uzorka lišća u prahu je ekstrahovano sa 100 ml petroleja u ekstraktoru
4. Ekstrakt je odbačen, dok su ostaci zadržani i osušeni na sobnoj temperaturi
5. Fenolna jedinjenja u ostatku su ekstrahovana ultrazvuk metodom
6. 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

## HPLC određivanje fenolnih jedinjenja

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.



Reprezentativni HPLC hromatogrami ekstrakta lišća C.

## Mjerenje antioksidativnih aktivnosti

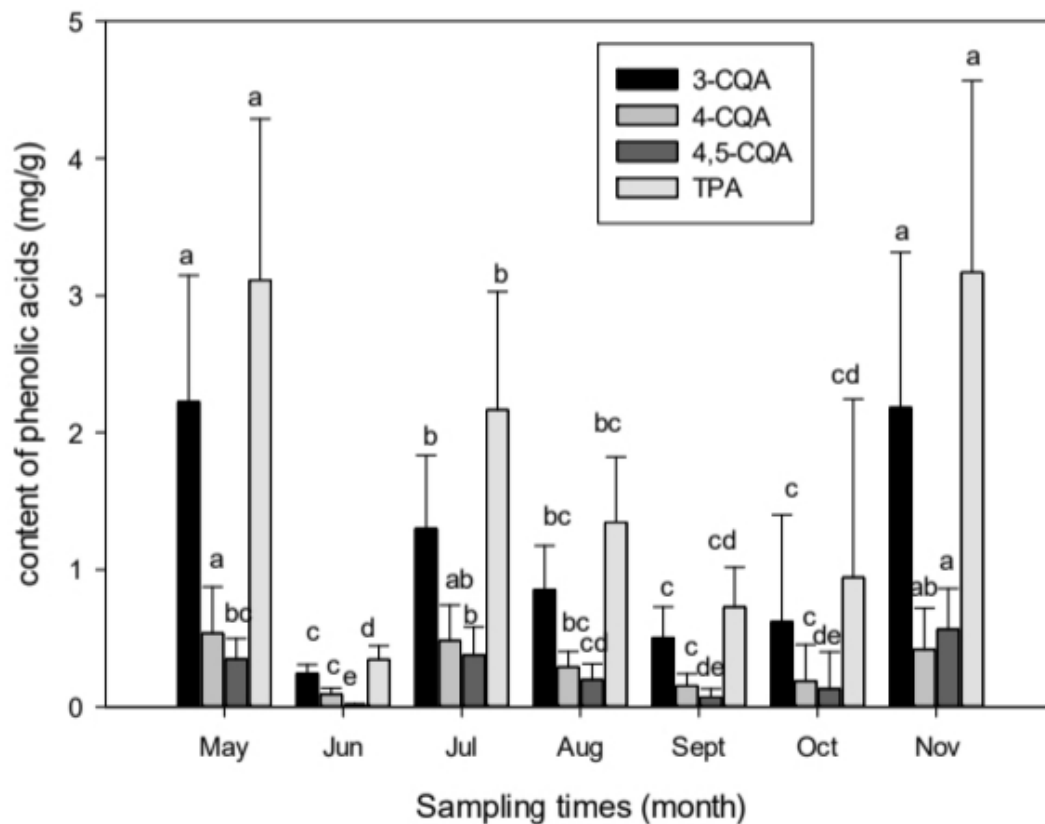
- Kako bi se procijenilo u kojoj mjeri ovi otkriveni fenoli doprinose antioksidativnoj efikasnosti ekstrakata lišća; sprovedene su antioksidativne aktivnosti na svakom pojedinačnom fenolnom jedinjenju.

## 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.

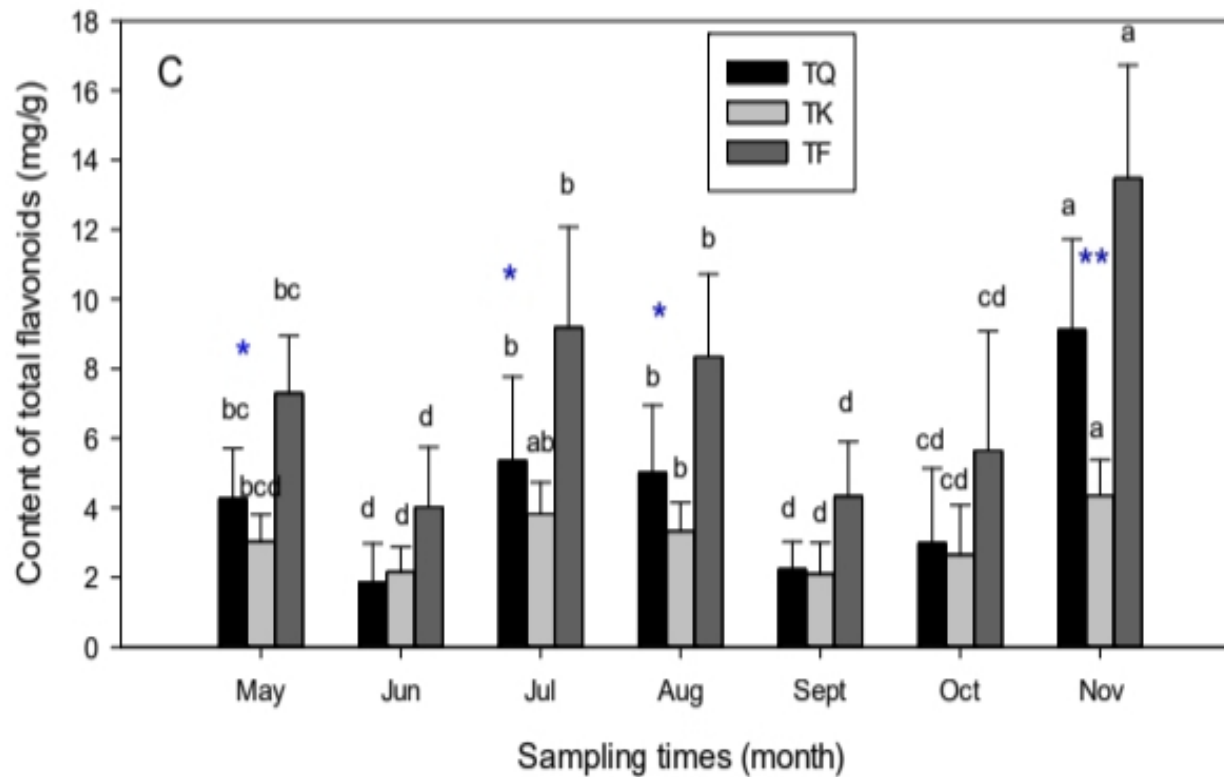
# REZULTATI I DISKUSIJA

## Sezonske varijacije sadržaja fenolnih kiselina



Sezonske varijacije fenolnih kiselina u lišću *C. paliurus* (srednja vrednost  $\pm$  SD). 3-CKA, 4-CKA, 4,5-CKA i TPA predstavljaju 3-O-kafeoilhininsku kiselinu, 4-O-kafeoilhininsku kiselinu, 4,5-di-O-kafeoilhininsku kiselinu kiseline, odnosno ukupnost fenolnih kiselina

## Sezonske varijacije flavonoida

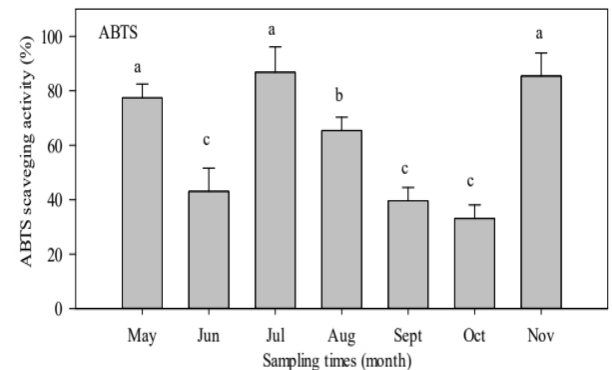
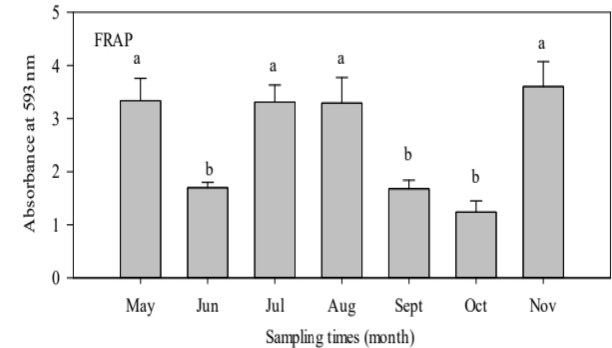
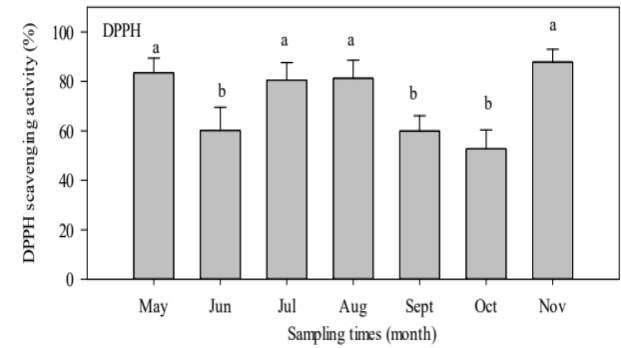


Sezonske varijacije i  
ukupnih flavonoidi u  
lišću *C. paliurus* (prosek  $\pm$  SD)

## Sezonske varijacije antioksidativnih aktivnosti

- Značajna sezonska kolebanja antioksidativnih aktivnosti su primjećena u ekstraktima lišća *C. paliurus*

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 glukozida je bio veći od onog između antioksidativnih aktivnosti i ukupnih glukozida kempferola, što ukazuje da je doprinos kvercetin glukozida i fenolnih kiselina antioksidativnoj aktivnosti bio veći nego kod kempferol glukozida.

## Efekti pojedinačnih fenolnih jedinjenja na antioksidativni kapacitet

- 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 glukozidi, kao i fenolne kiseline mogli biti glavni u doprinosu antioksidative sposobnosti za ekstrakte *C. paliurus*.

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 djeluju direktno kao antioksidanti, jer su snažni čistači ROS-a.

Pozitivna korelacija između antioksidativne aktivnosti i sadržaja fenolnih kiselina kao i flavonoida primjećena je u testovima DPPH, FRAP i ABTS.

Veći sadržaj fenola  $\longrightarrow$  jača antioksidativna aktivnost



## ZAKLJUČAK

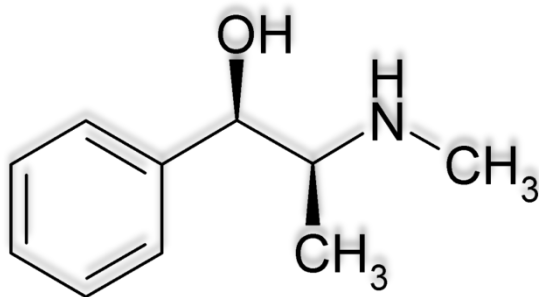
- Koncentracije fenola i antioksidativne aktivnosti u ekstraktima *C. paliurus* pokazale su značajne sezonske varijacije, a obrasci varijacija su bili slični.
- Sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktu lišća *C. paliurus* bio je u snažnoj korelaciji sa antioksidativnim aktivnostima, što ukazuje da su 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.

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

Jasmin Šutković, Daria Ler, Mohamed Ragab, Abdel Gawwad

## UVOD

- **Alkalodi** su najveća grupa sekundarnih metabolita kod biljaka koji sadrže jedan ili više atoma azota u heterocikličnom prstenu.



- Zastupljeni su u različitim razdjelima biljaka: Lycopodiophyta (*Lycopodium*), Equisetophyta (*Equisetum*), Piniphyta (*Ephedra* Taxus).

- U biljnim ćelijama se rijetko nalaze u slobodnoj formi već su 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).

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

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

### Podjela alkaloidnih biljaka

1. visokoalkaloidne familije koje imaju preko 20% rodova sa alkaloidnim vrstama → Amaryllidaceae, Ranunculaceae, Solanaceae,...
2. srednjealkaloidne familije čijih 10-20% rodova sadrži alkaloidne vrste → Fabaceae, Borraginaceae
1. maloalkaloidne familije čijih 1-10% rodova ima vrste bogate alkaloidima → Euphorbiaceae, Lamiaceae

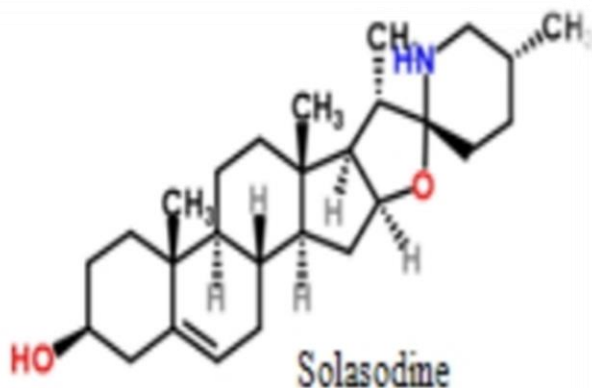
## Klasifikacija alkaloida

- 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

- Štite biljku od herbivora
- Ispoljavaju antimikrobnu aktivnost
- Vezuju slobodne radikale
- 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

**Solasodin** - otrovno alkaloidno hemijsko jedinjenje koje se javlja u biljkama porodice Solanaceae.



*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, 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
- Biljke su potom uzgajane do starosti od 30 dana, zatim su vršni pupoljci odvojeni i sterilisani.

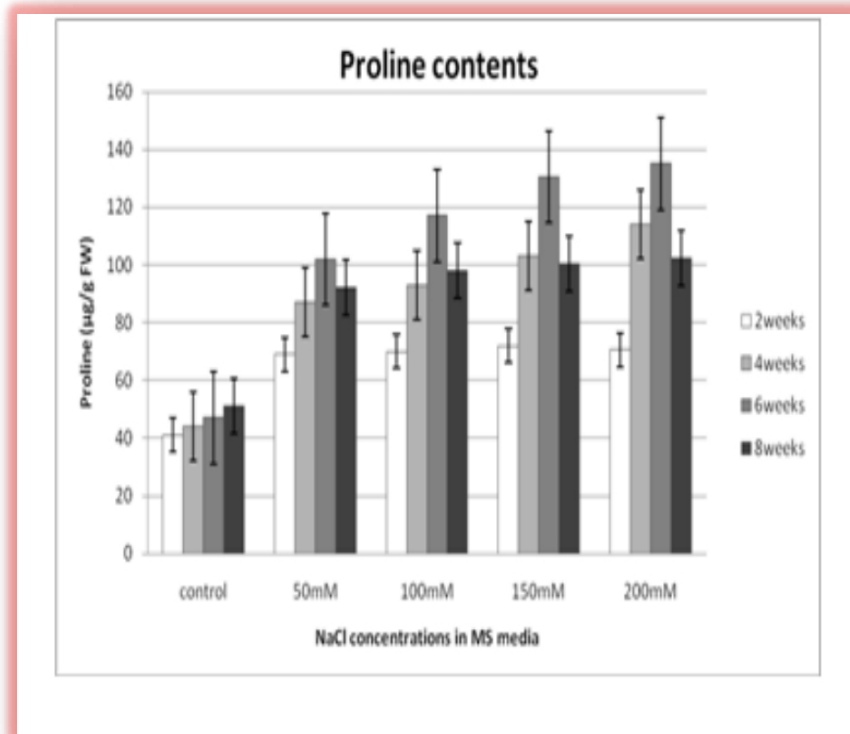
## In vitro kultivacija

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

## Tretman slanosti

- MS medijum - 50, 100, 150 i 200mM NaCl
- 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:
  - 1) 0,0 (kontrola)
  - 2) 50
  - 3) 100
  - 4) 150
  - 5) 200mM

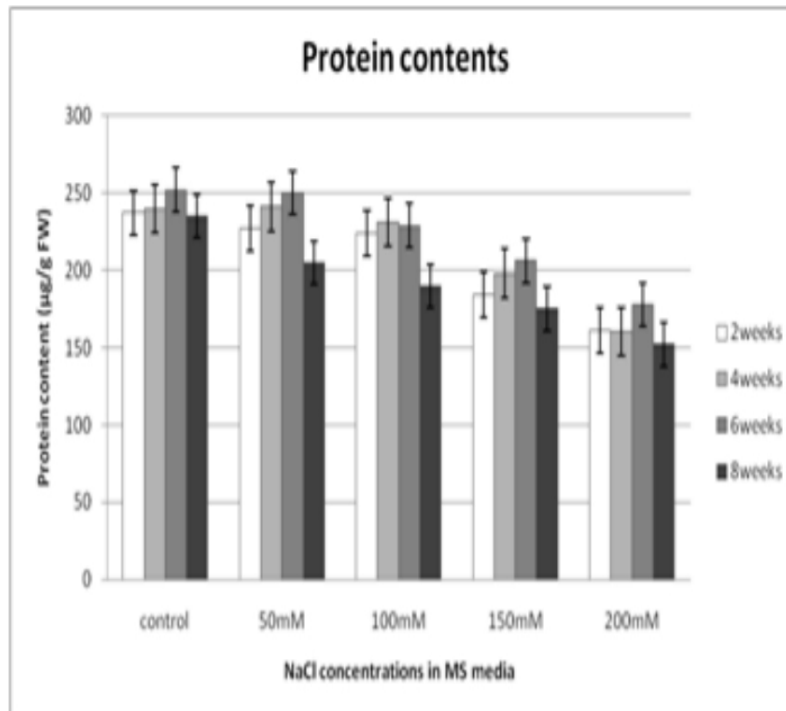
# REZULTATI I DISKUSIJA



- Sadržaj prolina je značajno povećan kao rezultat povećanja koncentracije NaCl u medijumu
- Maksimalni efekat NaCl na akumulaciju prolina u kalusima, je bio na 150 mM NaCl, koncentracija prolina je povećana dva puta u odnosu na kontrolu

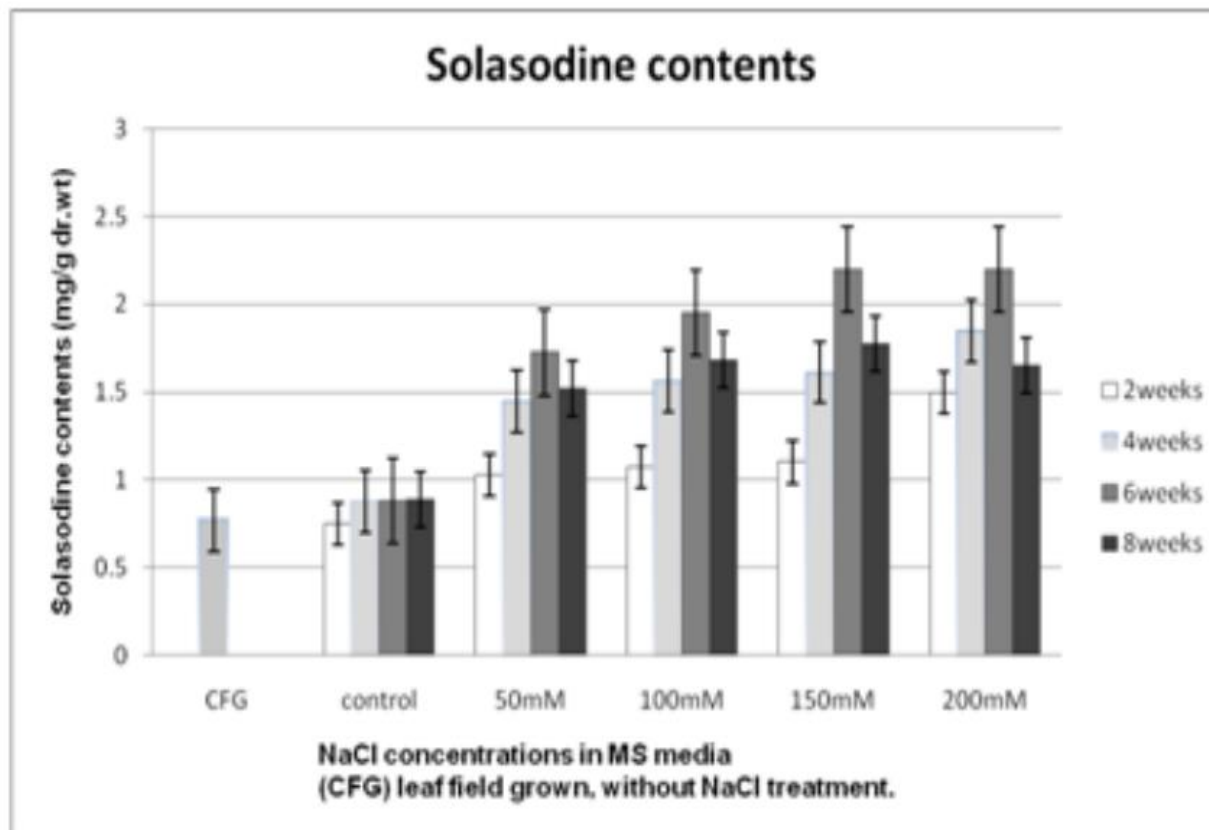
Efekti različitih koncentracija NaCl na sadržaj prolina u kalusu *Solanum nigrum*. Rezultati su prikazani kao dobijena srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $p < 0,05$ ) iz tri replike





- Povećanje koncentracije NaCl u medijumu ima negativan uticaj na ukupan sadržaj proteina u kalusu.

Efektii različitih koncentracija NaCl na sadržaj proteina u kalusu *Solanum nigrum*. Rezultati su prikazani kao projek ± standardna greška ( $p < 0,05$ ), dobijeni iz tri replike



Efekti različitih koncentracija NaCl na sadržaj solasodina u kalusu *Solanum nigrum*. Rezultati su prikazani kao prosjek  $\pm$  standardna greška ( $p < 0,05$ ), dobijen iz tri replike

# 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.