
Natalija Novta

In vitro ispitivanja antioksidantnih svojstava etanolnog ekstrakta žalfije i nane

Ispitivana su antioksidantna svojstva etanolnih ekstrakata žalfije (*Salvia officinalis* L.) i nane (*Mentha x piperita* L.). Da bi se odredio njihov antioksidantni potencijal, odredivan je inhibicioni efekat njihovih etanolnih ekstrakata na lipidnu peroksidaciju u dva *in vitro* sistema: homogenatu jetre pacova i suspenziji lipozoma. Stepenn lipidne peroksidacije (LP) odredivan je spektrofotometrijski, merenjem absorbancije kompleksa nastalog malondialdehida (535 nm). Rezultati pokazuju da žalfija ima veći antioksidantni potencijal u odnosu na nanu. Prosečna inhibicija LP postignuta etanolnim ekstraktom žalfije u homogenatu jetre pacova bila je 54%, a u suspenziji lipozoma 51%. Za etanolni ekstrakt nane procenat inhibicije bio je 31% u homogenatu jetre i 45% u sistemu suspenzije lipozoma. Utvrđeno je da i etanol u manjim koncentracijama deluje kao antioksidans (inhibicija LP 10-20%), te da i on, kao rastvarač, ima udela u antioksidantnom dejstvu ekstrakata žalfije i nane.

Uvod

Naučnim istraživanjima novijeg datuma utvrđeno je da su slobodni radikali uključeni u izazivanje i razvoj preko 100 bolesti ljudi i životinja. Tu spadaju karcinom i aterosleroza, kao najčešći uzroci smrti savremenog čoveka, starenje, neplodnost, posledice alkoholizma... (Elmadf and Thiele 1982). Osnovno sredstvo odbrane protiv slobodnih radikala su upravo antioksidansi. Stoga se sve intenzivnije sprovode istraživanja u smislu otkrivanja i ispitivanja antioksidantnih svojstava pojedinih supstanci.

Cilj ovog rada je ispitivanje antioksidantnih svojstava etanolnih ekstrakata dve, u narodu po lekovitim svojstvima poznate, biljke: žalfije, *Salvia officinalis* L., (*Lamiaceae*), i nane, *Mentha x piperita* L., (*Lamiaceae*). U tu svrhu meren je stepen inhibicije lipidne peroksidacije pri dejstvu etanolnih ekstrakata ovih biljaka u dva *in vitro* sistema: homogenatu jetre pacova i suspenziji lipozoma.

Natalija Novta
(1981), Novi Sad, Ive
Andrića 23, učenica
1. razreda Gimnazije
„Isidora Sekulić“ u
Novom Sadu

MENTOR:
Dr Neda
Mimica-Dukić, PMF
Univerzitet u N. Sadu

Teorijski deo

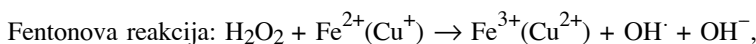
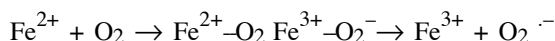
Bez kiseonika nema života na ovoj planeti, ali u većim koncentracijama neki njegovi oblici postaju štetni za žive organizme. Najčešći toksični oblici kiseonika su:

O_2^- – superoksid anjon radikal

$^{\cdot}OH$ – hidroksil radikal

H_2O_2 – vodonik peroksid (homolitičkim cepanjem O–O veze on daje reaktivniji $^{\cdot}OH$ radikal)

Navedene strukture su redukovani oblici kiseonika i, uopšte, mogu nastati prenosom elektrona sa raznih jedinjenja na molekul kiseonika, i to: kao proizvodi normalnih metaboličkih procesa u ćeliji; reakcijom O_2 i jona prelaznih metala koji imaju nesporen elektron kao, na primer, Fe^{2+} ili Cu^+ :

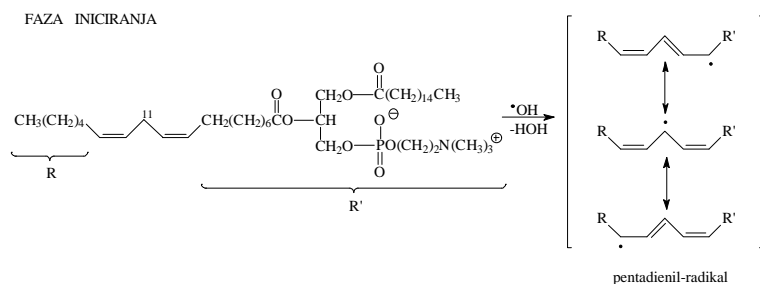


Pored toga nastaju i dejstvom spoljanjih faktora kao to su: nuklearno ili UV zračenje, zatim delovanjem pesticida, duvana, izduvnih gasova itd. Ovi aktivni oblici kiseonika iniciraju i katalizuju radikalske reakcije napadajući prvenstveno nezasićene masne kiseline, proteine i DNK. To dovodi do smanjenih životnih sposobnosti ćelija, starenja, kardiovaskularnih bolesti, raka i drugih degenerativnih bolesti (Vollhardt and Schore 1994). Pri preradi hrane, posledice oksidacije su neugodan miris i užegao ukus (Daković 1997).

U strukturi ćelijske membrane nalaze se nezasićene masne kiseline u obliku fosfolipida. Štetan efekat kiseonika na lipide ogleda se u procesima lipidne peroksidacije (Slika 1). To je u osnovi niz lančanih slobodno-radikalskih reakcija u kojima radikali kiseonika deluju na dvostruke veze nezasićenih masnih kiselina obrazujući najpre peroksi radikal, pa zatim hidroperokside i ciklične perokside, koji se dalje razgrađuju dajući aldehide, ketone, organske kiseline... (Wichtl 1994).

Antioksidantni sistemi

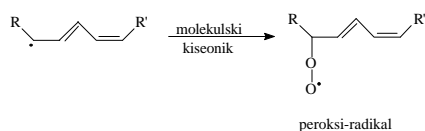
Da bi se odbranili, živi organizmi su u toku evolucije morali izgraditi posebne sisteme zaštite od tih reaktivnih vrsta – *antioksidantne sisteme*. Tu spadaju antioksidantni enzimi (superoksid-dizmutaza, katalaza, peroksidaza, glutation peroksidaza) i antioksidantna jedinjenja (vitamini E, C, A, flavonoidi, polifenoli, karotenoidi, redukovani glutation.) (Štajner 1990). U zdravom organizmu postoji ravnoteža između produkcije slobodnih kiseoničnih radikala i delovanja zaštitnih, antioksidantnih mehanizama. U-



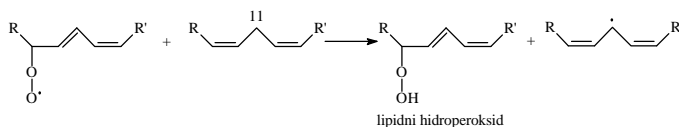
Slika 1.
Lipidna peroksidacija
fosfolipida.

Figure 1.
Lipid peroxidation of
phospholipids.

PROPAGACIONA FAZA 1



PROPAGACIONA FAZA 2



koliko se, međutim, pod dejstvom različitih faktora (endogenih ili egzogenih) ova ravnoteža poremeti, doći će do odsustva kontrole produkcije radikala i niza patoloških stanja ćelije i organizma. Tada se organizam ili supstrat mora dodatno snabdjeti antioksidansima.

Danas u svetu postoji trend da se, u prehrambenoj industriji dugo korišćeni, sintetički, komercijalni antioksidansi (BHT i BHA) zamene prirodnim jedinjenjima jer neki od njih ispoljavaju kancerogeni efekat. Prirodni antioksidanti sve više se primenjuju, kako u tehnologiji prerade hrane (prerada margarina, ulja, masti), kozmetici (kreme, i drugi preparati) tako i u farmaceutskoj industriji.

Sekundarni biomolekuli kod biljaka tipa flavonoida, polifenola i etarskih ulja direktno ne utiču na primarne biohemijske procese ali imaju mnoga lekovita svojstva i mogu delovati kao antioksidansi. Ovi tipovi jedinjenja sintetišu se samo u biljnim biohemijskim procesima a u najširem smislu funkcija im je analogna imunom sistemu u animalnom svetu. U tome se upravo i ogleda uloga biljaka kao nezamenjiv izvor prirodnih antioksidanasa. Antioksidantna svojstva, kao i uopšte lekoviti potencijal određene biljke zavisi od njene genetičke osnove i ekoloških uslova (Gašić 1992; Bošković 1994).

Mentha x piperita L., nana, (*Lamiaceae*), sadrži 0.5 do 4% etarskog ulja u kom dominiraju oksidovani monoterpeni: mentol, menton i mentilacetat. Od flavonoida zastupljeni su luteolinski i apigeninski derivati,

luteolin-7-glukozid i apigenin-7-glukozid, kao i visoko metilovani, lipofilni flavonoidi eupatorin, salvigenin i dr.

Domaća nana je od davnina u narodu poznata lekovita biljka. Koristi se kao spazmolitik, karminativ, holagog, a ispoljava i blago sedativno delovanje. Naročito se primenjuje kod akutnog i hroničnog gastritisa. Nana je sastojak mnogih fitopreparata.

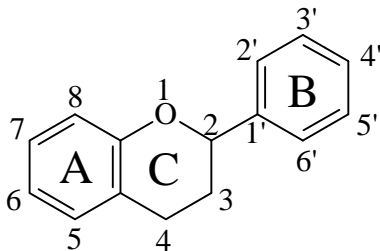
Salvia officinalis L., žalfija, (*Lamiaceae*), sadrži 2 do 2.5% etarskog ulja čija je glavna komponenta tujon, a u manjoj meri i 1,8-cineol. Sadrži 3 do 7% tanina, ruzmarinsku kiselinu, diterpenoidne gorke supstance (karnozol, rozmanol), flavonoide (luteolin) i dr. (Ramanathan 1994).

Žalfija se široko koristi kod raznih upalnih procesa i problema digestivnog trakta, a poznato je i njeno dejstvo protiv znojenja (antihidrotik). Na tržištu postoje brojni preparati (tinkture, ekstrakti) žalfije.

Flavonoidi

Biljni fenoli su sekundarni biomolekuli koji u svojoj strukturi sadrže aromatični prsten sa jednim ili više hidroksilnih supstituenata.

Flavonoidi su žuti, crveni ili ljubičasti pigmenti koji se nalaze u svim biljnim organima. Prema strukturi, oni su fenoli oblika C₆-C₃-C₆ (slika 2), a raznim modifikacijama osnovne strukture nastaje velik broj različitih flavonoida (oko 5000 otkrivenih struktura) (Bošković 1994). S obzirom na stepen oksidacije centralnog piranskog prstena podeljeni su u 12 klasa. U najrasprostranjenije spadaju flavonoidi iz klase flavona (luteolin i apigenin) i flavonola (kamferol i kvercetin), (slika 3).

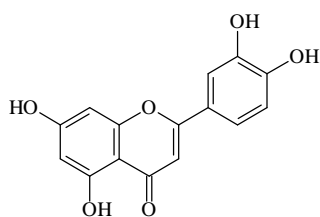


Slika 2.
Opšta struktura
flavonoida.

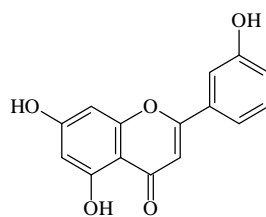
Figure 2.
General structure of
flavonoids.

Flavonoidi ispoljavaju antioksidantni efekat na tri načina:

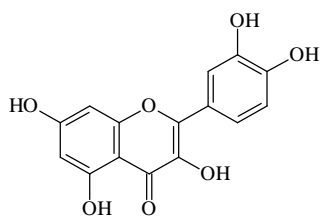
1. Deluju kao hvatači (scavengers) slobodnih radikala
2. Deluju kao kompleksirajući agensi prelaznih metala (metal chelators) čime inhibiraju Fentonovu reakciju produkcije visoko toksičnog OH[•] radikala
3. Reaguju sa lipid peroksi radikalima, čime inhibiraju lančane slobodno-radikalske reakcije



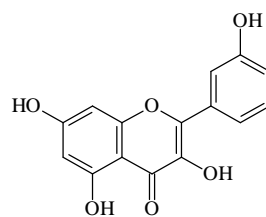
luteolin



apigenin



kvercetin

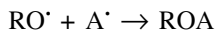
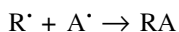
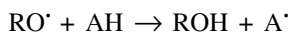
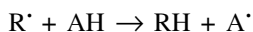


kamferol

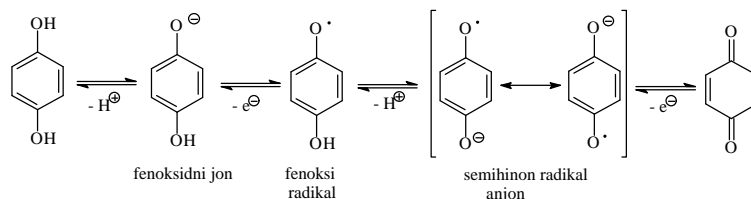
Slika 3.
Primeri najrasprostranjenijih flavonoida.

Figure 3.
Examples of most common flavonoids.

Najbitnije svojstvo fenolnih jedinjenja, je da u slobodnoradikalnim reakcijama karakterističnim za oksidativne procese ne generišu nove reaktivne radikale i na taj način zaustavljaju reakciju. Naime, fenolna jedinjenja prekidaju u pojedinim fazama lančane slobodnoradikalne reakcije, to se može predstaviti na sledeći način:



Predajući vodonikov atom radikal (R[·], RO[·]) potencijalni antioksidans sam prelazi u radikalsku formu, koja se prema šemi iz slike 4 rezonantno stabilizuje. Pored toga nastali A[·] radikal može da stupi u interakciju sa R[·] i RO[·] radikalima pri čemu, takođe, nastaju neutralna jedinjenja.



Slika 4.
Redoks odnos između 2,5-cikloheksadein-1,4-diona (p-benzohinona) i 1,4-benzendiola (hidrohinona).

Figure 4.
Redox relation between 2,5-cyclohexadiene-1,4-dione (p-benzoquinone) and 1,4-benzenediol (hydroquinone).

Potencijalna antioksidantna svojstva određenih supstanci ili preparata mogu se uspešno ispitivati, kako u biološkim tako i u nebiološkim sistemima, na osnovu njihove sposobnosti da inhibiraju lipidnu peroksidaciju (LP). Uticaj određenih supstanci na LP prati se različitim fizičko-hemijskim metodama:

- određivanjem peroksidnog broja (jodometrijski ili tiocijanatnom metodom)
- merenjem produkata razgradnje lipida (određivanje karbonilnog broja, kolorimetrijsko određivanje, TBA-test)
- merenjem utroenog kiseonika (gravimetrijski, Varburgovom metodom)
- fizičko-hemijskim metodama (UV spektroskopija, ESR, IR, fluorescencija, hemiluminescencija)
- merenjem redoks potencijala.

Materijal i metode

Etanolni ekstrakti nane i žalfije dobijeni su iz listova osušenih lekovitih biljaka, nane i žalfije, obe roda 1996, sa područja Vojvodine. Korišćeni supstrati su bili: sveži homogenat jetre pacova i 15% suspenzija lipozoma u 4% etanolu. Step en lipidne peroksidacije odredivan je spektrofotometrijski po metodi Placer-a i sar. i D. Štajner (Štajner 1990), merenjem koncentracije malondialdehida (MDA). Absorbanca se očitava na 535 nm.

1. Priprema alkoholnog ekstrakta žalfije i nane:

Odmeri se 20 g osušenog biljnog materijala i macerira u 500 cm³ u 98% etanolu u toku tri dana. Nakon toga se dobijeni rastvor procedi preko vate, a rastvarač se otpari na vakuum uparivaču. Na taj način se dobije 1.69 g suvog ekstrakta nane, i 1.74 g suvog ekstrakta žalfije. Od dobijenih ekstrakata se naprave 0.25%-tni etanolni rastvori koji se koriste u daljem radu.

2. Lipidna peroksidacije homogenata jetre:

0.5 g svežeg tkiva jetre pacova se homogenizuje sa 5 ml fosfatnog pufera pH 7.4 i centrifugira 10 min na 3500 o/min. Koristi se supernatant.

Inkubaciona smeša: U epruvete se stavi po 50 ml homogenata jetre. Lipidna peroksidacija se indukuje dodatkom 20 ml FeSO₄ (1 mM) uz prisustvo 20 ml askorbinske kiseline (0.5 mM). U četiri epruvete radi se, redom:

1. kontrola bez dodatka biljnih ekstrakata,
2. zatim test sa dodatkom 20 ml ekstrakta žalfije,
3. test sa dodatkom 20 ml ekstrakta nane i

4. test sa dodatkom 20 ml etanola radi ispitivanja mogućeg delovanja etanola u oksidativnim procesima ove vrste.

Sadržaj svake epruvete se dopuni fosfatnim puferom do 3 ml.

Dobijene smeše se inkubiraju 45 minuta na 37° u vodenom kupatilu. Zatim se uzorci od po 0.3 ml svake inkubacione smeše tretiraju sa 3.5 ml TBA reagensa (10 ml 10% HClO₄ zasićena na hladno sa tiobarbiturnom kiselinom), 0.3 ml EDTA (0.1M etilendiamintetrasirćetna kiselina) i 0.3 ml TCA (20% trihlorsirćetna kiselina). Epruvete se ostave u ključalom vodenom kupatilu 15 min. Smeše se potom se hlade i centrifugiraju. Absorbanca se očitava na 535 nm.

Testovi za liposome se rade na potpuno isti način, samo se umesto homogenata jetre dodaje 50 ml 15% suspenzije lipozoma, jer lipozomi, u stvari, predstavljaju model-sistem ćelijske membrane.

Rezultati i diskusija

Antioksidantna svojstva etanolnih ekstrakata žalfije i nane, merena na osnovu stepena inhibicije lipidne peroksidacije homogenata jetre i lipozoma prikazana su u tabelama 1 i 2. Ispitivanja su rađena u tri serije i stepen lipidne peroksidacije u svakom sistemu izražen je srednjom vrednošću i njenom standardnom greškom. Računat je i stepen inhibicije lipidne peroksidacije pri dejstvu etanolnih ekstrakata žalfije i nane. U poslednjem redu tabela data je njegova srednja vrednost.

Izračunavanje stepena lipidne peroksidacije (LP):

1. Homogenata jetre:

$$LP = E \times 32.54 \times 0.2 \text{ (nmol MDA/mg homogenata jetre pacova)}$$

2. Suspenzije lipozoma:

$$LP = E \times 32.54 \times 20 \text{ (nmol MDA/ ml 15% suspenzije lipozoma)}$$

Izračunavanje inhibicije lipidne peroksidacije u procentima (%I):

$$\%I = (LP \text{ kontrole} - LP \text{ uzorka}) / LP \text{ kontrole} \times 100$$

Tabela 1. Uticaj ekstrakata nane i alfije na LP u homogenatu jetre pacova (nmol MDA/ mg homogenata jetre)

kontrola	žalfija	nana	kontrola sa EtOH			
LP	LP	%I	LP	%I	LP	%I
0.56	0.27	52	0.35	38	0.42	25
0.52	0.23	56	0.35	33	0.41	21
0.48	0.21	56	0.37	23	0.42	12
0.52(2)	0.24(2)	55	0.37(1)	31	0.42(0)	20

Tabela 2. Uticaj ekstrakata nane i žalfije na LP lipozoma (nmol MDA/ml lipozoma)

kontrola		žalfija		nana		kontrola sa EtOH	
LP	%I	LP	%I	LP	%I	LP	%I
47.01	53	22.12	53	24.73	47	34.49	27
42.78	46	23.30	46	24.73	42	38.60	9.8
46.50	54	21.24	54	25.30	46	44.90	3.4
45.44(1)	51	22.2(6)	51	24.92(19)	45	39(3)	13

Iz navedenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

Etanolni ekstrakt žalfije pokazao je visok inhibitorski efekat 54% na LP u homogenatu jetre. Ekstrakt nane je takođe delovao inhibitorski (31%), dok je i sam etanol, kao rastvarač, pokazao slab antioksidantski efekat.

U lipozomima antioksidantsko dejstvo žalfije je smanjeno u odnosu na homogenat jetre (51%), a aktivnost nane je porasla (45%). Inhibitorski efekat rastvarača bio je 13%.

Stepen inhibicije lipidne peroksidacije je izraženiji u sistemu homogenata jetre nego u sistemu lipozoma.

Etanolni ekstrakt žalfije ima bolje antioksidantsko dejstvo od etanolnog ekstrakta nane u oba ispitivana sistema.

Zaključak

Etanolni ekstrakti žalfije (*Salvia officinalis* L.) i nane (*Mentha x piperita* L.) pokazali su visok inhibitorski efekat (između 30 i 55%) na lipidnu peroksidaciju u homogenatu jetre pacova i suspenziji lipozoma. Dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost primene ekstrakata nane i žalfije kao prirodnih antioksidanata visokog potencijala u prehrambenoj industriji i ljudskoj ishrani.

Literatura

- Gašić, O. 1992. *Biohemija biljaka*. Beograd: Naučna knjiga.
- Štajner D. 1990. Prilog proučavanju antioksidantskih jedinjenja pšenice. Nepubl. doktorska disertacija. PMF u Novom Sadu.
- Vollhardt, P.C., Schore, N.E. 1994. *Organic Chemistry*. New York: WH Freeman and Company.
- Elmadf, I., Thiele, B. 1982. *Antioxidanten ihre chemische und physiologische Wirkungsweise als Zusatzstoffe*. Hamburg: B. Beh s Verlag.
- Cadenas, E., Packer, L. 1996. *Handbook of Antioxidants*. New York: Marcel Dekker.

- Wichtl, M. 1994. *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*, Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers.
- Daković, M. 1997. Antioksidantna svojstva i analiza sekundarnih biomolekula u komercijalnom fitopreparatu, smeši ekstraktata lekovitih biljaka. Nepubl. diplomski rad. PMF u Novom Sadu.
- Bošković, S., 1994. Ispitivanje uticaja biljnih fenola na lipidnu peroksidaciju pšenice. Nepubl. diplomski rad. PMF u Novom Sadu.
- Ramanathan, R., Das, N.P., Tan, C.H. 1994. Effects of g-linolenic acid, flavonoids and vitamins on cytotoxicity and lipid peroxidation. *Free Radical Biology & Medicine*, **16**: 38-43.
- Sichal, G. et. al. 1991. *In Vitro* Scavenger Activity of some flavonoids and melanins against O₂⁻. *Free Radical Biology & Medicine*, **11**: 1-8.
- Grubješić, S., 1997. Delovanje flavanola na ćelijske linije: *in vitro* model. Nepubl. diplomski rad. PMF u Novom Sadu.
- Yoshida, T., et. al. 1989. Studies on inhibition mechanism of antioxidation by tannins and flavonoids, Radical scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenylhydrazyl radical. *Chem. Pharmacol. Bull.*, **37**: 1919-21.
- Placer Z.A., Cushman, L., Johnson, B.C., 1966. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyldialdehyde) in biochemical system. *Anal Biochem.*, **16**: 359-64.
- Mimica-Dukić, N. 1997. *In vivo* i *in vitro* ispitivanja antioksidantnih svojstava biljnih ekstraktata. U *Arhiv za farmaciju*, 5 (ur. K. Đaković). str. 479-94.
- Igor, B. et. al. 1989. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, **38** (11): 1763-9.
- Harper, H.A., Rodwell, V.W., Mayes, P.A. 1982. *Pregled fiziološke hemije*. Beograd: Savremena administracija.
- Stefanović, D., Stefanović, M., Grujić-Injac, B. 1965. *Hemija prirodnih proizvoda*. Beograd: Zavod za izdavanje udžbenika SRS.
- Hranisavljević, J. 1977. *Hemija prirodnih proizvoda*. Novi Sad: PMF
- Džamić, M. 1990. *Biohemija*. Beograd: Naučna knjiga.

Natalija Novta

In vitro Studies on Antioxidant Properties of Ethanolic Extracts of Sage and Mint

The aim of this study was to look into the antioxidant properties of sage, *Salvia officinalis* L. (*Lamiaceae*) and mint, *Mentha x piperita* L. (*Lamiaceae*). To estimate their antioxidant potential, the inhibitory effect of their ethanolic extracts on lipid peroxidation (LP) was measured in two *in vitro* systems: rat liver homogenate and liposome suspension. The degree of LP was determined by measuring the absorbance of the complex of malonyldialdehyde (MDA) produced in the reaction on a spectrophotometer. Re-

sults show that sage has a greater antioxidant potential than mint. The average inhibition of LP produced by the ethanolic extract of sage was 54% in rat liver homogenate and 51% in liposome suspension. The ethanolic extract of mint had an inhibitory effect of 31% in the liver homogenate and 45% in the liposome suspension. An antioxidant activity of ethanol was also detected. In the studied systems, ethanol showed an inhibitory effect on LP of 10-20%, therefore it also takes part in the antioxidant properties of sage and mint extracts.

