

Antioksidativna aktivnost etanolnog ekstrakta lista gajene jagode (*Fragariae folium*)

Ljiljana P. Stanojević, Jelena S. Stanojević, Dragan J. Cvetković, Milorad D. Cakić, Dušica P. Ilić

Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet, Leskovac, Srbija

Izvod

Cilj rada bio je ispitivanje antioksidativnog potencijala etanolnog ekstrakta lista gajene jagode (*Fragariae folium*) sorte Zenga zengana primenom različitih antioksidativnih testova (DPPH, FRAP, FIC, H₂O₂ i TBA-MDA). U ekstraktu je utvrđen visok sadržaj ukupnih fenola (metoda po Folin–Ciocalteu), dok je sadržaj ukupnih flavonoida znatno niži (metoda sa AlCl₃). Koncentracija ekstrakta potrebna za neutralisanje 50% početne koncentracije DPPH radikala iznosi 7,91 µg cm⁻³. Maksimalno heliranje jona gvožđa od 67,89% ostvaren je sa koncentracijom ekstrakta 2 mg cm⁻³; 70% inhibicije lipidne peroksidacije ostvareno je sa koncentracijom 0,03125 mg cm⁻³, dok se 30,47% H₂O₂ neutrališe ekstraktom koncentracije 0,5 mg cm⁻³. FRAP vrednost ekstrakta iznosi 284,51 mg Fe²⁺/g suvog ekstrakta.

Ključne reči: list jagode (*Fragariae folium*), Zenga zengana, ukupni fenoli, ukupni flavonoidi, antioksidativna aktivnost.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Lekovito bilje se koristi u ishrani kao začim, za pripremu čajnih mešavina, kao i u medicinske svrhe za izradu fitopreparata. U ekstraktima lekovitog bilja utvrđeno je prisustvo fenolnih kiselina, flavonoida, katehina, tokoferola, tanina, terpena i drugih bioaktivnih jedinjenja koja pokazuju antimikrobna, antiinflamatorna i antioksidativna svojstva [1]. Bioaktivni proizvodi iz biljnih sirovina, poznati kao prirodni izolati ili prirodne biohemikalije, imaju sve veću primenu u proizvodnji lekova, kozmetičkih i prehrambenih proizvoda ili kao prekursori u sintezi novih proizvoda sa specifičnim bioaktivnim svojstvima [2]. Sagledavaju se novi aspekti primene tradicionalnih biljnih lekova i sprovode obimna fitohemijska ispitivanja u cilju pronalazaženja novih prirodnih izvora i aktivnih principa.

Jagoda pripada familiji ruža (*Rosaceae*, podfamilija *Rosoideae*) iz roda *Fragaria*. Gajene (baštenske) sorte komercijalnih jagoda obično su označene kao *Fragaria ananassa* [3]. Zenga zengana je poreklom iz Nemačke, spada u srednje pozne sorte jagoda i privredno je najznačajnija u svetu [4]. Jagoda je bogata vitaminima B-kompleksa, vitaminom C, E, provitaminom A (β -karotenom), kalijumom, kalcijumom, gvožđem, fosforom i magnezijumom [5,6]. Takođe sadrži fenole, flavonoide, alkohole, terpene, aldehide, ketone, estere, jedinjenja sumpora, furane, epoksidge, organske kiseline i dr. [3]. List jagode sadrži flavonoide (kvercetin i rutin), tanine, etarska ulja, vitamin C i fenolna jedinjenja, u većoj meri nego u plodu pa se zato upotrebljava za pravljenje čajeva [7,8].

Prepiska: Lj. Stanojević, Tehnološki fakultet u Leskovcu, Bulevar Oslobođenja 124, 16000 Leskovac.

E-pošta: stanojevic@tf.ni.ac.rs; ljiljas76@yahoo.com

Rad primljen: 18. jul, 2014

Rad prihvaćen: 15. oktobar, 2014

NAUČNI RAD

UDK 634.75:66.061.3:543.42

Hem. Ind. 69 (5) 567–576 (2015)

doi: 10.2298/HEMIND140718077S

U literaturi ima podataka o različitim biološkim aktivnostima (pre svega antioksidativnoj i antimikrobnoj) ekstrakata ploda i lista kako šumske, tako i gajenih sorti jagoda. Najveći broj ispitivanja odnosi se na ekstrakte iz ploda jagode, dok su ekstrakti iz lista gajenih jagoda, kao izvor bioaktivnih jedinjenja sa potencijalnim korisnim biološkim dejstvima manje ispitivani [8–10]. Cilj ovog rada je određivanje antioksidativne aktivnosti etanolnog ekstrakta lista gajene jagode sorte Zenga zengana, primenom različitih antioksidativnih testova.

EKSPERIMENTALNI DEO

Biljni materijal

U radu je korišćen suvi list gajene jagode (*Fragaria ananassa* Duch.), sorta: *Senga sengana*. Jagoda je gajena u plasteniku visine 2,5 m, pokrivenom polietilenskom folijom (0,15 mm debljine; Ginagar Plastic Products-Ltd.). Biljni materijal ubran je početkom maja 2013, u periodu cvetanja, sušen na promaji u hladovini i neposredno pre analize samleven u električnom mlinu (laboratorijski električni mlin Braun Aromatic KSM2) do granulacije 0,5 mm.

Hemikalije i reagensi

2,4,6-Tris(2-piridil)-1,3,5-triazin (TPTZ reagens), Folin–Ciocalteu reagens, galna kiselina, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH radikal), aluminijum(III)-hlorid heksahidrat, kalijum-acetat, natrijum-acetat trihidrat, gvožđe(III)-hlorid heksahidrat, gvožđe(II)-sulfat heptahidrat, ferozin (natrijumova so 3-(2-piridil)-5,6-difenil-difenil-1,2,4-triazin-4',4''-disulfonske kiseline), etilen-diamino-tetra-sirćetna kiselina (EDTA), butilovani hidroksi-toluen (BHT), butilovani hidroksi-anizol (BHA), tiobarbi-

turna kiselina (TBA), 2,2'-azobis(2-metilpropionamidin) dihidrohlorid (AAPH), kvercetin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA); gvožđe (II)-hlorid tetrahidrat, trihlorsirćetna kiselina (TCA), L-askorbinska kiselina (J.T. Baker, VA Deventer, Netherlands); rutin (Merck, Darmstadt, Germany); etanol (70 vol.%) analitičkog stepena čistoće (p.a.). Fosfolipidi (Phospholipon® 90; PL90) su poklon firme Phospholipid GMBH (Köln, Germany). Prema deklaraciji smeša PL90 se sastoji iz: fosfatidilholina 94,6%, lizo-fosfatidilholina 1,3%; masnih kiselina: palmitinska kiselina 12±2%, stearinska kiselina 3±1%, oleinska kiselina 10±3%, linolna kiselina 66±5%, lino-lenska kiselina 5±2%; peroksidni broj 1,4.

Ekstrakcija uz refluks

Usitnjeni i homogenizovani biljni materijal (10 g) ekstrahovan je 70 vol.% etanolom u toku 120 min, pri solvomodu (odnos biljni materijal/rastvarač) 1:20 m/V na temperaturi ključanja rastvarača uz refluks. Nakon ekstrakcije biljni materijal je odvojen od tečnog ekstrakta filtriranjem uz vakuum na Bichner-ovom levku. Rastvarač je uklonjen uparavanjem na rotacionom vakuum uparivaču na 50 °C. Dobijeni ekstrakt je sušen u vakuum sušnici na 40 °C do konstantne mase i čuvan u frižideru na 4 °C do analize. Prinosa ekstrahovanih supstanci (suvi ekstrakt) je određen na Scaltec SMO 01 (Scaltec Instruments, Germany) aparatu. Alikvotni deo (2 cm^3) ispitivanog ekstrakta je sušen do konstantne mase na 105 °C.

Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola određen je po proceduri Folin–Ciocalteu [11] sa određenim modifikacijama [12–14]. Ukupni fenoli se izražavaju kao ekvivalenti galne kiseline po gramu biljnog materijala (mg GKE/g biljnog materijala) [14].

Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida određen je spektrofotometrijskom metodom sa aluminijum(III)-hloridom [15–17] sa određenim modifikacijama [14]. Rezultati se izražavaju kao ekvivalenti rutina po gramu biljnog materijala (mg RE/g biljnog materijala) [14].

Antioksidativna aktivnost

DPPH-test

Etanolni rastvor DPPH radikala (1 cm^3 , 300 μmol rastvor ($3 \times 10^{-4} mol dm^{-3}$)) dodat je u 2,5 cm^3 ekstrakta različitih koncentracija. Postupak se radi u dve probe. Jednom uzorku odmah je merena apsorbanca na 517 nm, drugi uzorak je inkubiran na sobnoj temperaturi, u mraku, 20 min i merena apsorbanca na 517 nm. Apсорbanca na 517 nm određuje se i za čist etanolni rastvor DPPH radikala razblažen u navedenom odnosu (1 cm^3 DPPH radikala date koncentracije kome je dodato 2,5 cm^3 etanola, „kontrola“), i za ekstrakt pre tretiranja

DPPH radikalom (2,5 cm^3 ekstrakta kome je dodat 1 cm^3 etanola, „blank“). Kapacitet hvatanja slobodnih radikala se izračunava prema jednačini (1) [14,18,19]:

$$\begin{aligned} \text{Stepen neutralisanja DPPH radikala (\%)} &= \\ &= 100 - \left[\frac{100(A_U - A_B)}{A_K} \right] \end{aligned} \quad (1)$$

gde je: A_U – apsorbanca „uzorka“, A_B – apsorbanca probe „blank“, A_K – apsorbanca „kontrola“.

DPPH test je urađen i za standardne komponente: rutin i L-askorbinsku kiselinu i sintetske antioksidanse BHA i BHT.

FRAP metoda

Antioksidativna aktivnost etanolnog ekstrakta lista jagode primenom FRAP metode određena je po metodi Benzie i Strain [20], sa izvesnim modifikacijama [14].

Standardna kriva. Priprema FRAP reagensa: (300 $mmol dm^{-3}$, pH 3,6), TPTZ reagensa (10 $mmol dm^{-3}$ u 40 $mmol dm^{-3}$ HCl) i $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (20 $mmol dm^{-3}$) u odnosu 10:1:1. U pet epruveta je odmereno po 3 cm^3 FRAP reagensa i njima dodato po 0,1 cm^3 standardnih rastvora $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2–1 $mmol dm^{-3}$). Apсорbanca je merena na 593 nm u odnosu na slepu probu (3 cm^3 FRAP reagensa + 0,1 cm^3 vode). Kalibraciona kriva je konstruisana na osnovu poznatih koncentracija dobijenih vrednosti apsorbanca.

Određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata. U epruvetu je dodato po 0,1 cm^3 ekstrakta i 3 cm^3 FRAP reagensa i nakon inkubacije od 30 minuta na 37 °C izmerena je apсорbanca na 593 nm. Iz jednačine kalibracione krive određena je koncentracija ($mmol dm^{-3}$) Fe^{2+} u uzorku i preračunata na masu suvog ekstrakta (mg Fe^{2+}/g suvog ekstrakta, tj. FRAP vrednost).

H_2O_2 test

Antioksidativna aktivnost ekstrakta na H_2O_2 određena je po metodi koju su opisali Ruch i saradnici [21] sa izvesnim modifikacijama. Napravljena je serija različitih koncentracija (0,0078–0,5 $mg cm^{-3}$) ekstrakata. Rastvoru H_2O_2 (40 $mmol dm^{-3}$) pripremljenom u 0,1 M fosfatnom puferu pH 7,4 određena je apсорbanca na 230 nm. Ekstraktima različitih koncentracija (1 cm^3) dodato je 3,4 cm^3 fosfatnog pufera, rastvor H_2O_2 (0,6 cm^3) i nakon 10 min inkubacije u mraku izmerena apсорbanccija na 230 nm.

Apsorbanccija je određena i za rastvor H_2O_2 razblažen u navedenom odnosu (0,6 cm^3 H_2O_2 date koncentracije kome je dodato 4,4 cm^3 fosfatnog pufera – „kontrolni rastvor“), i za ekstrakt pre tretiranja H_2O_2 (1 cm^3 ekstrakta kome je dodato 4,0 cm^3 fosfatnog pufera – „blank“ rastvor). Kapacitet neutralisanja H_2O_2 se izračunava prema jednačini (1).

Antioksidativna aktivnost primenom ovog testa određena je i za standardni antioksidans L-askorbinsku kiselinu ($0,781\text{--}25\ \mu\text{g cm}^{-3}$).

TBA-MDA test

TBA-MDA test je jedan od najčešće korišćenih testova za kvantitativno praćenje procesa lipidne peroksidacije *in vitro*. Zasniva se na zagrevanju ispitivanog uzorka sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) u kiseloj sredini, kada dolazi do reakcije TBA i MDA – krajnjim produktom lipidne peroksidacije nastalim degradacijom hidroperoksida i građenja ružičastog hromogena ($[\text{TBA}]_2$ -malondialdehid adukt) sa apsorpcionim maksimumom na 532 nm. Ovaj obojeni kompleks nastaje kondenzacijom 2 mol TBA i 1 mol MDA samo iz lanaca masnih kiselina koje sadrže bar tri dvostruke veze [22,23]. Antioksidativna aktivnost etanolnog ekstrakta jagode primenom TBA-MDA testa određena je po metodi razvijenoj za rastvore karotenoida, flavonoida i potencijalnih antioksidanasa [24–26], sa određenim modifikacijama. „Uzorak“ čine $0,3\ \text{cm}^3$ metanolnog rastvora PL90 ($1 \times 10^{-2}\ \text{mol dm}^{-3}$) i etanolnog ekstrakta lista jagode ($0,00195\text{--}0,03125\ \text{mg cm}^{-3}$) u odnosu 2:1 (V/V). Lipidna peroksidacija je inicirana dodavanjem $0,2\ \text{cm}^3$ vodenog rastvora hidrofilnog termalnog azo-inicijatora AAPH ($2,2 \times 10^{-2}\ \text{mol dm}^{-3}$) u toku 3 h na temperaturi od $40\ ^\circ\text{C}$, zaštićeno od svetlosti. Nakon inkubacije u reakcionu smešu je dodato po $1\ \text{cm}^3$ vodenog rastvora TCA (5,5%), $0,5\ \text{cm}^3$ metanolnog rastvora BHT ($1 \times 10^{-3}\ \text{mol dm}^{-3}$) i $0,5\ \text{cm}^3$ TBA ($4,2 \times 10^{-2}\ \text{mol dm}^{-3}$ u $5 \times 10^{-2}\ \text{mol dm}^{-3}$ NaOH). Smeša je inkubirana 10 min na $65\ ^\circ\text{C}$ a zatim centrifugirana 5 min na 13800 obr./min. Porast apsorpcije supernatanta na 532 nm predstavlja apsorpcioni maksimum stvorenog TBA-MDA kompleksa.

Određena je i apsorbancija rastvora PL90, u kome je inicirana lipidna peroksidacija, tretiranim sa TBA („kontrola“) i rastvora PL90, bez inicijacije lipidne peroksidacije, takođe tretiranim sa TBA („blank“).

Procenat inhibicije lipidne peroksidacije se izračunava prema jednačini (2):

$$\text{Inhibicija lipidne peroksidacije (\%)} = \frac{100(A_K - A_U)}{(A_K - A_B)} \quad (2)$$

TBA-MDA test je urađen i sa metanolnim rastvorom kvercetina kao predstavnikom prirodnih antioksidanasa ($0,00625\text{--}0,025\ \text{mg cm}^{-3}$) i metanolnim rastvorom BHT ($0,0125\text{--}0,05\ \text{mg cm}^{-3}$), predstavnikom sintetskih antioksidanasa.

Sposobnost heliranja jona gvožđa (FIC test)

FIC (*Ferrous ion-chelating*) aktivnost se može koristiti kao test za antioksidanse i to je mera smanjenja apsorbanca gvožđa (II) i ferozin kompleksa na 562 nm.

Sposobnost heliranja je određena u skladu sa metodom koju su opisali Dinis i saradnici [27] sa određenim modifikacijama [28,29]. Rastvoru ekstrakta različitih koncentracija ($1\ \text{cm}^3$, $0,031\text{--}2,0\ \text{mg cm}^{-3}$) dodato je $3,75\ \text{cm}^3$ etanola i $0,05\ \text{cm}^3$ 2 mM $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Reakcija je inicirana dodavanjem $0,2\ \text{cm}^3$ 5 mM ferozina. Smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi u toku 10 min, nakon čega je izmerena apsorbanca na 562 nm. Smeša etanola, ferozina i $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ bez test uzorka se koristi kao „kontrola“ a smeša etanola i uzorka bez ferozina i $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ se koristi kao „blank“. EDTA je referentni standard za test. Niža vrednost apsorbancije označava bolju FIC aktivnost, odnosno gvožđe-jon helirajuću sposobnost test uzorka. Sposobnost heliranja jona gvožđa, FIC aktivnost (%) je računata korišćenjem jednačine (1).

Svi eksperimenti rađeni su u tri ponavljanja. Statistička obrada podataka rađena je u MS Office Excel programu.

REZULTATI I DISKUSIJA

Prinos ekstrahovanih supstanci, sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktu lista jagode

Ranijim istraživanjima pokazano je da prinos ekstrahovanih supstanci, sadržaj ukupnih fenola i antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakata zavise od primenjene tehnike ekstrakcije. Dhanani i sar. [30] su u svojim istraživanjima pokazali da je u etanolnim i vodenom-etanolnim ekstraktima biljne vrste *Withania somnifera* dobijenim konvencionalnom ekstrakcijom uz refluks veći sadržaj ukupnih fenola u odnosu na iste ekstrakte dobijene ultrazvučnom ili mikrotalasnom ekstrakcijom. Prinos ekstrahovanih supstanci, kao i sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u etanolnom ekstraktu lista jagode dobijenom ekstrakcijom uz refluks na temperaturi ključanja prikazani su u Tabeli 1.

Tabela 1. Prinos ekstrahovanih supstanci, sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u etanolnom ekstraktu lista jagode; b.m. – biljni materijal

Table 1. The yield of extracted substances, total phenols and flavonoids content in the ethanolic extract from strawberry leaves

Ekstrahovane supstance g/100 g b.m.	Ukupni fenoli mg GKE/g b.m.	Ukupni flavonoidi mg RE/g b.m.
35,82±1,075	427,46±12,824	17,39±0,870

Biosinteza flavonoida odvija se u biljci gde oni učestvuju u svetloj fazi fotosinteze u toku koje katalizuju prenos elektrona. Proces biosinteze flavonoida može se stimulisati UV zračenjem, interakcijama izazvanim mikroorganizmima, ali i hemijskim stresom. Na stvaranje fenolnih jedinjenja utiču pored svetlosti, temperatura, zemljište i drugi faktori [31]. S obzirom na to da je ispitivana sorta jagode gajena u plasteniku gde je tem-

peratura u sunčanim periodima iznad 40 °C, verovatno je visoka temperatura jedan od uzroka jako visokog sadržaja fenolnih jedinjenja u biljnom materijalu.

Antioksidativna aktivnost

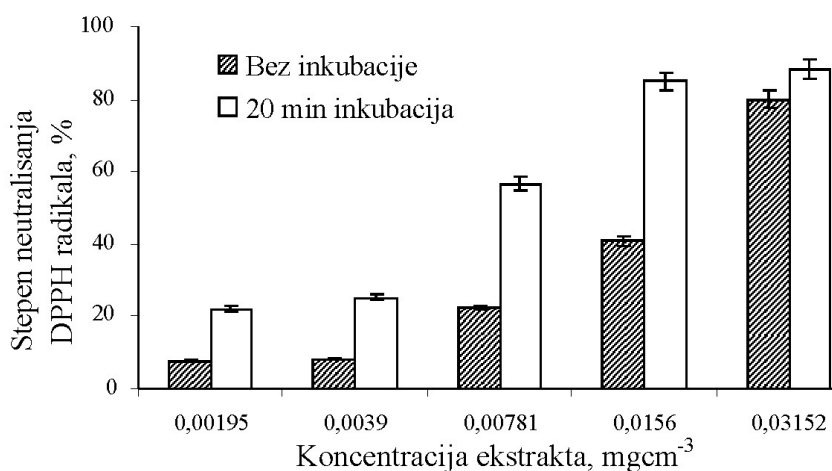
DPPH test

DPPH test se zasniva na reakciji razmene atoma vodonika između antioksidansa i stabilnog DPPH radikala. U reakciji dolazi do redukcije intenzivno ljubičasto obojenog DPPH radikala do odgovarajućeg hidrazina, što se spektrofotometrijski prati preko pada apsorpcije na 517 nm [32]. Na slici 1 je prikazan stepen neutralisanja DPPH radikala etanolnim ekstraktom lista jagode.

Vreme inkubacije ekstrakata ima uticaja na stepen neutralisanja slobodnog DPPH radikala i to za sve ispitivane koncentracije. Stepenn neutralisanja DPPH radikala ispitivanim ekstraktom veći je za inkubirani uzorak (sl. 1). EC_{50} vrednosti etanolnog ekstrakta lista jagode, standardnih komponenti i sintetskih antioksidanasa prikazane su u Tabeli 2.

Tabela 2. EC_{50} vrednosti ($\mu\text{g cm}^{-3}$) etanolnog ekstrakta lista jagode, standardnih komponenti i sintetskih antioksidanasa; EC_{50} – koncentracija ekstrakta potrebna za neutralisanje 50% početne koncentracije DPPH radikala
Table 2. EC_{50} values ($\mu\text{g cm}^{-3}$) of ethanolic extract from strawberry leaves, standard components and synthetic antioxidants

Uzorak	Bez inkubacije	20 min inkubacije
Ekstrakt	19,46±0,584	7,91±0,237
Standardna komponenta		
L-Aksorbinska kiselina	3,29±0,10	3,29±0,10
Rutin	14,14±0,424	4,39±0,132
Sintetički antioksidans		
BHT	–	21,0±0,63
BHA	–	7,11±0,213



Slika 1. Stepenn neutralisanja DPPH radikala etanolnim ekstraktom lista jagode.

Figure 1. The capacity of neutralizing of DPPH radicals by ethanolic extract from strawberry leaves.

Ekstrakt pokazuje bolju antioksidativnu aktivnost od sintetskog antioksidansa BHT, približno istu aktivnost kao i BHA i nešto slabiju aktivnost od L-askorbinske kiseline i rutina. Obzirom da je BHT jedan od najčešće korišćenih antioksidanasa ali sa štetnim efektima po organizam [33], na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ispitivani ekstrakt predstavlja alternativu ovom antioksidansu sa potencijalnom primenom u farmaceutskim, kozmetičkim i prehrambenim proizvodima.

Izuzetno visoka antioksidativna aktivnost ekstrakta najverovatnije dobrim delom potiče od fenolnih jedinjenja za koje je utvrđen visok sadržaj (427,46 mg GKE/g b.m.). Antioksidativno delovanje fenolnih jedinjenja uglavnom se pripisuje prisustvu hidroksilne funkcionalne grupe u njihovoj strukturi [34,35]. Antioksidativno dejstvo ispitivanog ekstrakta ne potiče samo od fenolnih jedinjenja, već je posledica sinergističkog dejstva ovih jedinjenja sa nekim drugim biomolekulima izolovanim iz biljnog materijala. Podaci o ovakvim ispitivanjima antioksidativne aktivnosti nisu pronađeni u dostupnoj literaturi.

FRAP metoda

FRAP metoda [20,36–38] se zasniva na redukciji $[\text{Fe}^{3+}\text{-TPTZ}]$ kompleksa do intenzivno plavog (apsorpcioni maksimum 593 nm) $[\text{Fe}^{2+}\text{-TPTZ}]$ kompleksa u kiseloj sredini. Koncentracija Fe^{2+} ekvivalenta (FRAP vrednost) u ekstraktu je očitana direktno sa kalibracione krive [14] na osnovu koje se određuje koncentracija Fe^{2+} u uzorcima i preračunava na masu ekstrakta. U tabeli 3 su prikazane FRAP vrednosti (mg Fe^{2+} /g s.e.) ekstrakta lista jagode, L-askorbinske kiseline i sintetskog antioksidansa BHT.

Rezultati prikazani u tabeli 3 pokazuju da najveću FRAP vrednost a time i najbolju redukcionu sposobnost, odnosno antioksidativnu aktivnost pokazuje sintetski antioksidans BHT. Ispitivani ekstrakt pokazuje skoro dva

puta bolju redukcionu sposobnost od L-askorbinske kiseline. Na osnovu prikazanih rezultata, a saglasno antioksidativnoj aktivnosti ekstrakta određenoj primenom DPPH testa, može se reći da su i u ovom testu za antioksidativnu aktivnost najverovatnije dobrim delom odgovorni fenoli i flavonoidi.

Tabela 3. FRAP vrednosti etanolnog ekstrakta lista jagode, L-askorbinske kiseline i sintetskog antioksidansa BHT; s.m. – suva materija

Table 3. FRAP values of ethanolic extract from strawberry leaves, L-ascorbic acid and synthetic antioxidant BHT

Uzorak	FRAP vrednost, mg Fe ²⁺ /g s.m.
Ekstrakt	284,51±14,226
L-Askorbinska kiselina	145,10±10,157
BHT	810,92±40,546

H₂O₂ test

Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti ekstrakta primenom H₂O₂ testa (stepen neutralisanja H₂O₂ – „H₂O₂ scavenging“ u zavisnosti od koncentracije ekstrakata) su prikazani na slici 2a, a na slici 2b je prikazana antioksidativna aktivnost L-askorbinske kiseline primenom ovog testa.

Stepen neutralisanja H₂O₂ etanolnim ekstraktom lista jagode zavisi od koncentracije ispitivanog ekstrakta. Sa ekstraktom koncentracije 0,5 mg cm⁻³ postiže se stepen neutralisanja H₂O₂ od 30,47%. Sa povećanjem koncentracije ekstrakta iznad 0,5 mg cm⁻³ stepen neu-

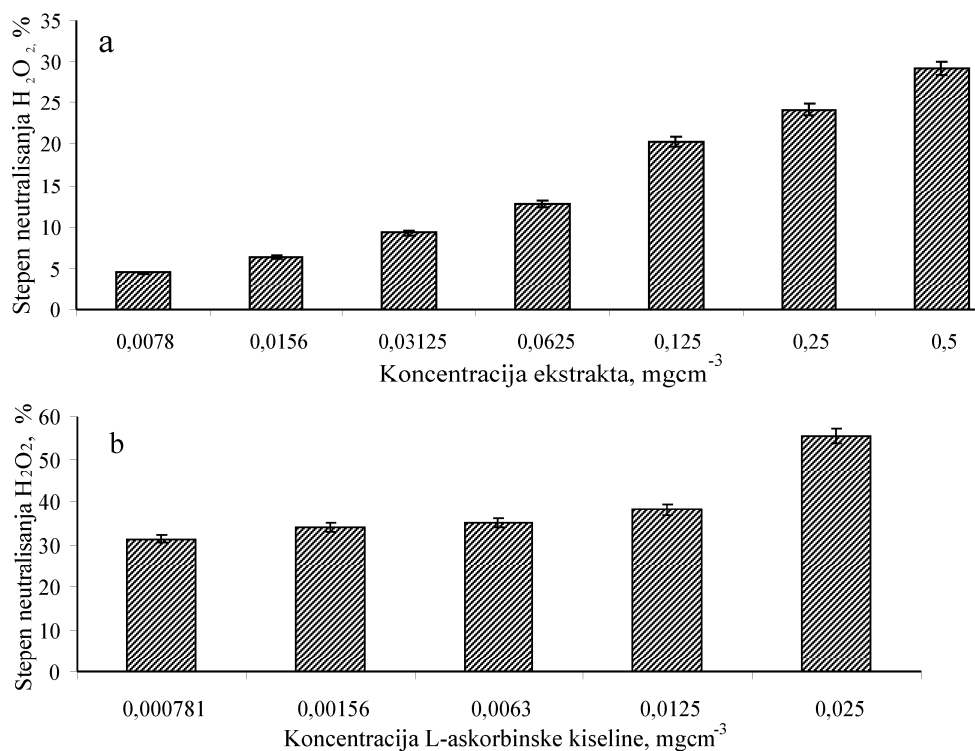
tralisanja H₂O₂ se neznatno menja. Ispitivani ekstrakt pokazuje manju antioksidativnu aktivnost od L-askorbinske kiseline, koja u koncentraciji 0,025 mg cm⁻³ neutrališe oko 55% H₂O₂.

H₂O₂ je u odnosu na druge reaktivne kiseonične vrste (npr. hidroksil radikal, OH[•]; superoksid anjon radikal, O₂^{•-}), manje reaktivan, ali može biti toksičan jer dovodi do stvaranja hidroksil radikala u ćelijama, zbog čega je uklanjanje H₂O₂ kao i O₂^{•-} veoma važno za zaštitu ćelija. Neutralisanje H₂O₂ vodenim ekstraktima lista jagode može se pripisati prisutnošću fenolnih jedinjenja [39].

TBA-MDA test

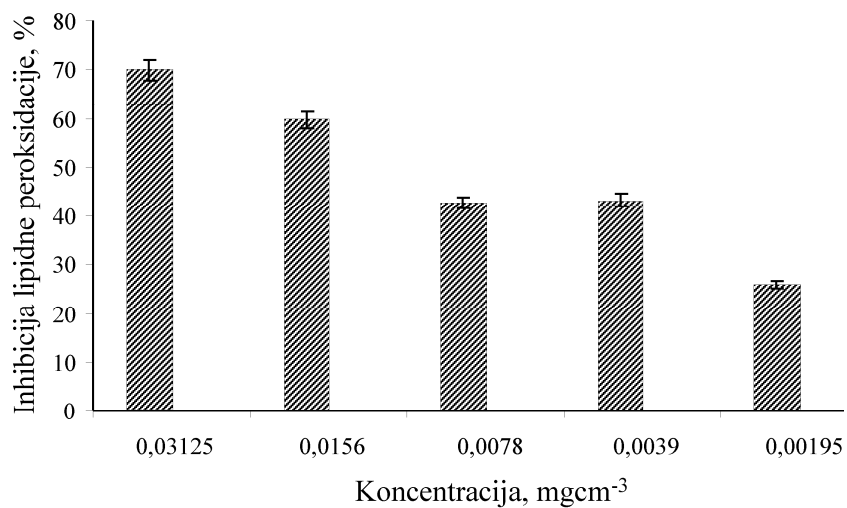
Na slici 3 je prikazan stepen inhibicije lipidne peroksidacije etanolnim ekstraktom lista jagode, a na slici 4 stepen inhibicije lipidne peroksidacije metanolnim rastvorima sintetskog antioksidansa BHT (slika 4a) i standarda kvercetina (slika 4b).

Najveći stepen inhibicije lipidne peroksidacije (99%) postiže se pri koncentraciji 0,05 mg cm⁻³ BHT. Kod kvercetina se najveći stepen inhibicije lipidne peroksidacije (84%) postiže sa koncentracijom od 0,025 mg cm⁻³. Na osnovu prikazanih rezultata vidi se da je ispitivani ekstrakt pokazao dobru, koncentracijski zavisnu, antioksidativnu aktivnost. Sa koncentracijom ekstrakta od 0,03125 mg cm⁻³ postignuta je inhibicija lipidne peroksidacije od 70%. Poređenjem antioksidativnih aktivnosti ekstrakta i poznatih antioksidanasa (kverce-

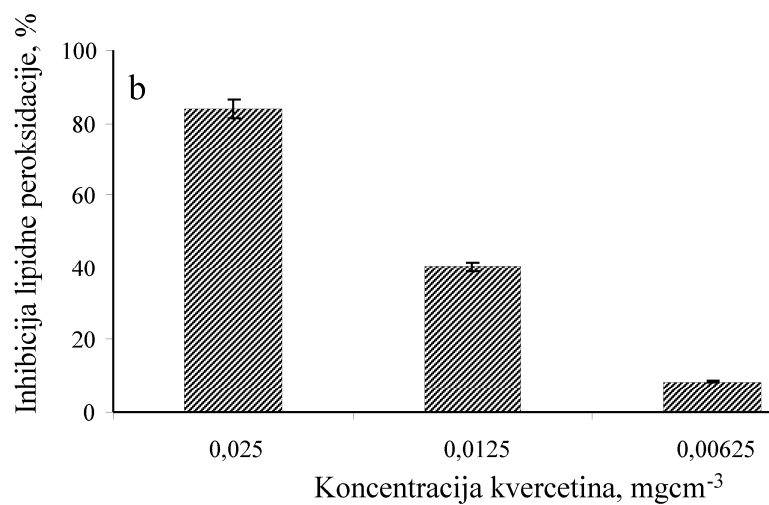
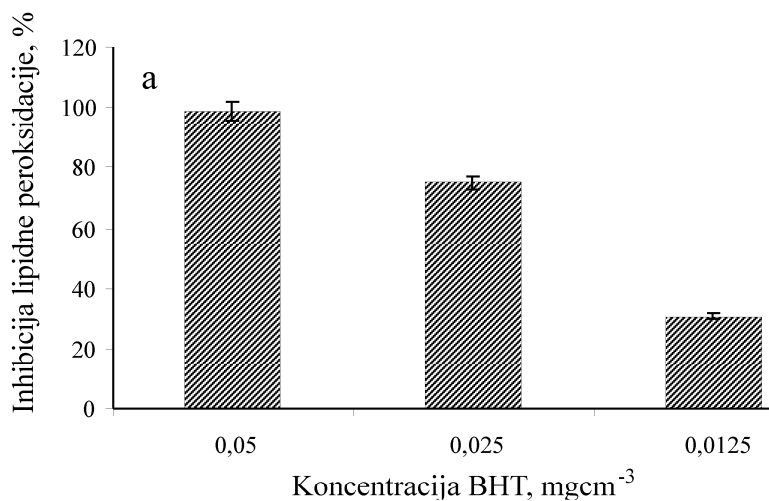


Slika 2. Stepen neutralisanja vodonik peroksida etanolnim ekstraktom lista jagode (a) i L-askorbinskom kiselinom (b).

Figure 2. The capacity of neutralizing of hydrogen peroxide by ethanolic extract from strawberry leaves (a) and L-ascorbic acid (b).



Slika 3. Inhibicija lipidne peroksidacije etanolnim ekstraktom lista jagode.
Figure 3. The inhibition of lipid peroxidation by ethanolic extract of strawberry leaves.



Slika 4. Inhibicija lipidne peroksidacije metanolnim rastvorima BHT (a) i kvercetina (b).
Figure 4. The inhibition of lipid peroxidation by methanolic solutions of BHT (a) and quercetin (b).

tina i BHT), može se zaključiti da dobijeni ekstrakt pokazuje visoku antioksidativnu aktivnost pod opisanim uslovima.

Fenolna jedinjenja direktno smanjuju količinu nastalih peroksi radikala. Na osnovu brojnih *in vitro* ispitivanja se došlo do zaključka da je 1,2-dihidrosupstitucija (*orto*-supstitucija) prstena B (tzv. kateholna struktura) ključna za antioksidativnu aktivnost fenolnih jedinjenja [40,41]. Ova jedinjenja su najverovatnije velikim delom odgovorna za visok stepen inhibicije lipidne peroksidacije etanolnim ekstraktom lista jagode.

FIC test

Sposobnost heliranja jona gvožđa etanolnog ekstrakta lista jagode i rastvora EDTA prikazana je na slici 5. Ekstrakt lista jagode sorte Zenga zengana dostigao je maksimum od 67,90% pri koncentraciji od 2 mg cm⁻³ (slika 5a). Helirajući efekat EDTA (opseg koncentracija 0,004–0,25 mg cm⁻³) je znatno bolji od ekstrakta (slika 5b). Maksimum aktivnosti je postignut pri koncentraciji 0,25 mg cm⁻³ i iznosi 96,34%.

Postoje naučni dokazi o pozitivnoj korelaciji između sposobnosti heliranja jona gvožđa i sadržaja ukupnih fenola [42]. Sposobnost heliranja jona metala koju pokazuju fenolna jedinjenja u funkciji je njihove karakteristične strukture, broja i položaja hidroksilnih grupa [43]. Antioksidativna aktivnost određena primenom

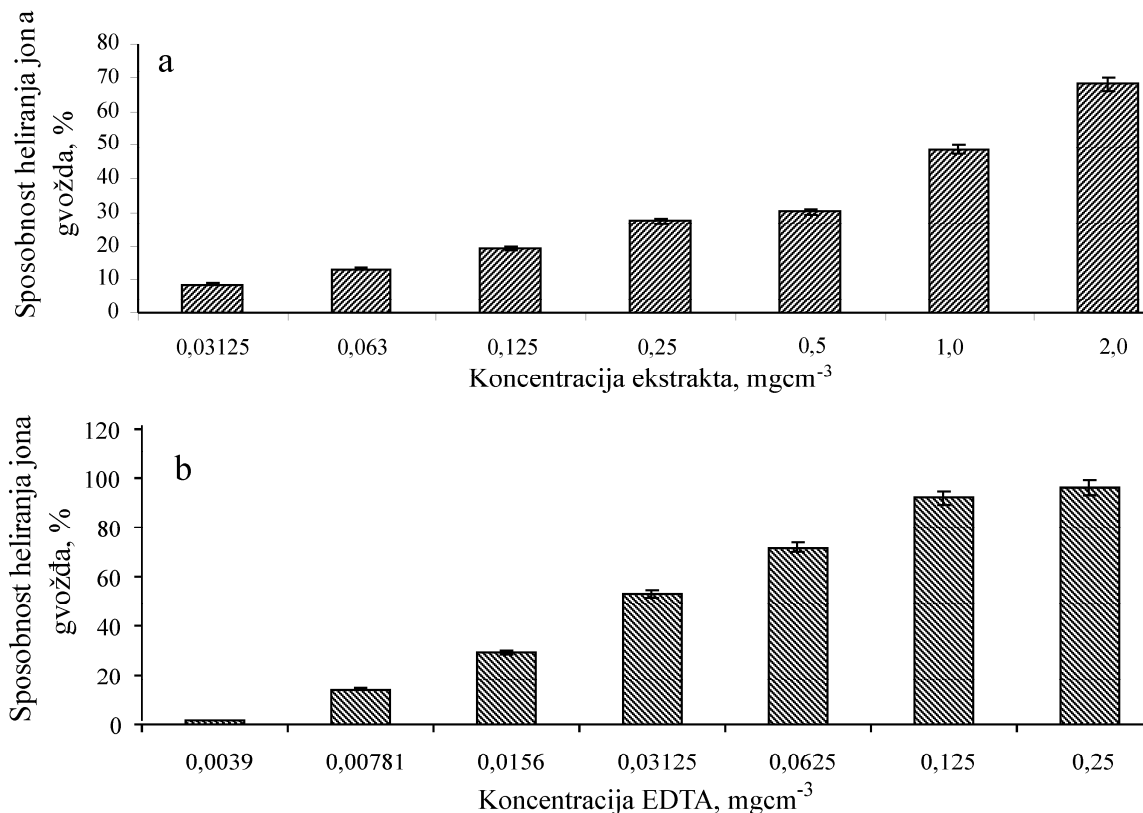
ovog, kao i u slučaju prethodnih testova verovatno je posledica visokog sadržaja fenolnih jedinjenja.

Prikazani podaci u ovom radu ukazuju da antioksidativna aktivnost etanolnog ekstrakta lista jagode najverovatnije potiče većim delom od fenola, ali je i rezultat njihovog sinergističkog delovanja sa ostalim bioaktivnim jedinjenjima prisutnim u ekstraktu.

ZAKLJUČAK

U etanolnom ekstraktu lista gajene jagode sorte Zenga zengana utvrđen je visok sadržaj ukupnih fenola dok je sadržaj ukupnih flavonoida znatno niži. Ispitivani ekstrakt pokazao je dobru, koncentracijski zavisnu antioksidativnu aktivnost, nezavisno od primenjene antioksidativne metode.

Poslednjih godina intenzivirana su ispitivanja biljnih ekstrakata koji predstavljaju alternativu sintetskim antioksidansima. Ispitivani ekstrakt lista gajene jagode pokazao je značajnu antioksidativnu aktivnost i predstavlja potencijalni izvor prirodnih antioksidanasa sa mogućom primenom u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Dalja istraživanja biće usmerena u pravcu ispitivanja antiinflamatornih, diuretskih i antikancerogenih aktivnosti, kao i detaljnijoj analizi hemijskog sastava dobijenog ekstrakta.



Slika 5. Sposobnost heliranja jona gvožđa etanolnog ekstrakta lista jagode (a) i EDTA (b).

Figure 5. The iron ions chelating ability of ethanolic extract from strawberry leaves (a) and of EDTA (b).

Zahvalnica

Rad je deo istraživanja u okviru projekta „Biljni i sintetski bioaktivni proizvodi novije generacije“, br. TR 34012, koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

- [1] F. Capasso, T.S. Gaginella, G. Grandolini, A.A. Izzo, Fitoterapija – Priručnik biljne medicine, Prometej, Novi Sad, 2005.
- [2] M.Z. Stanković, Bioaktivni proizvodi prirodnog porekla, Zbornik radova Tehnološkog fakulteta, Leskovac **12** (2002) 33–51.
- [3] A. Aharoni, A.P. Giri, F.W. Verstappen, C.M. Berteau, R. Sevenier, Z. Sun, M.A. Jongsma, W. Schwab, H.J. Bouwmeester, Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species, *Plant Cell*. **16** (2004) 3110–3131.
- [4] R. Blagojević, V. Božić, Tehnologija proizvodnje jagode, Kancelarija za program podrške u privatnom sektoru za podršku sektoru voćarstva i bobičastog voća u Južnoj Srbiji, Niš, 2012.
- [5] J. Tucakov, Lečenje biljem, Rad, Beograd, 1990.
- [6] S.M. Đilas, A.N. Tepić, S.M. Savatović, Z.M. Šumić, J.M. Čanadanović-Brunet, G.S. Četković, J.J. Vulić, Chemical composition and antioxidant activity of two strawberry cultivars, *APTEFF* **42** (2011) 33–44.
- [7] A. Legac, I. Ljubičić, Inovativne formulacije čajnih mješavina s prirodnim sladilima – karakterizacija nutritivnog sastava i biološke aktivnosti, studentski rad, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Zagreb, 2011.
- [8] L. Buřičova, M. Andjelkovic, A. Čermakova, Z. Reblova, O. Jurček, E. Kolehmainen, R. Verhe, F. Kvasnička, Antioxidant capacity and antioxidants of strawberry, blackberry and raspberry leaves, *Czech J. Food Sci.* **29** (2011) 181–189.
- [9] D. Rekika, S. Khanizadeh, M. Deschenes, A. Levasseur, M.T. Charles, Antioxidant capacity and phenolic content of selected strawberry genotypes, *HortScience* **40** (2005) 1777–1781.
- [10] S.Y. Wang, K.S. Lewers, Antioxidant capacity and flavonoid content in wild strawberries, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **132** (2007) 629–637.
- [11] V.L. Singelton, J.A. Rossi Jr., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol. Vitic.* **16** (1965) 144–158.
- [12] J. Singh, A.K. Upadhyay, K. Prasad, A. Bahadur, M. Rai, Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in *Brassica* vegetables, *J. Food Compos. Anal.* **20** (2007) 106–112.
- [13] M.P. Kähkönen, A.I. Hopia, H.J. Vuorela, J.P. Rauha, K. Pihlaja, T.S. Kujala, M. Heinonen, Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, *J. Agric. Food Chem.* **47** (1999) 3954–3962.
- [14] Lj.P. Stanojević, A.S. Zdravković, M.Z. Stanković, M.D. Cakić, V.D. Nikolić, D.P. Ilić, Antioksidativna aktivnost vodeno-etanolnih ekstrakata iz lista koprive (*Urtica dioica* L.), *Savremene tehnologije* **2** (2013) 51–59.
- [15] C.C. Chang, M.H. Yang, H.M. Wen, J.C. Chern, Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods, *J. Food Drug Anal.* **10** (2002) 178–182.
- [16] J.Y. Lin, C.Y. Tang, Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation, *Food Chem.* **101** (2007) 140–147.
- [17] G.N. Sharma, S.K. Dubey, N. Sati, J. Sanadya, Anti-inflammatory activity and total flavonoid content of aegle marmelos seeds, *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.* **3** (2011) 214–218.
- [18] D. Cvetković, D. Marković, UV-effects on antioxidant activity of selected carotenoids in the presence of lecithin estimated by DPPH test, *J. Serb. Chem. Soc.* **73** (2008) 1051–1061.
- [19] Lj.P. Stanojević, M.Z. Stanković, V.D. Nikolić, Lj.B. Nikolić, Antioxidative and antimicrobial activities of *Hieracium pilosella* L. extracts, *J. Serb. Chem. Soc.* **73** (2008) 531–540.
- [20] I.F. Benzie, J.J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay, *Anal. Biochem.* **239** (1996) 70–76.
- [21] R.J. Ruch, S.J. Cheng, J.E. Klaunig, Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea, *Carcinogenesis* **10** (1989) 1003–1008.
- [22] B. Halliwell, S. Chirico, Lipid peroxidation: its mechanism measurement, and significance, *Am. J. Clin. Nutr.* **57** (1993) 715S–725S.
- [23] M. Laguerre, J. Lecomte, P. Villeneuve, Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges, *Prog. Lipid Res.* **46** (2007) 244–282.
- [24] D. Cvetkovic, D. Markovic, UV-induced changes in antioxidant capacities of selected carotenoids toward lecithin in aqueous solution, *Radiat. Phys. Chem.* **77** (2008) 34–41.
- [25] D. Cvetković, D. Marković, D. Cvetković, B. Radovanović, Effects of continuous UV-irradiation on the antioxidant activities of quercetin and rutin in solution in the presence of lecithin as the protective target, *J. Serb. Chem. Soc.* **76** (2011) 973–985.
- [26] J. Zvezdanović, L. Daskalova, D. Yancheva, D. Cvetković, D. Marković, M. Anderluh, A. Šmelcerović, 2-Amino-5-alkylidenethiazol-4-ones as promising lipid peroxidation inhibitors, *Monatsh. Chem.* **145** (2014) 945–952.
- [27] T.C. Dinis, V.M. Madeira, L.M. Almeida, Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers., *Arch. Biochem. Biophys.* **315** (1994) 161–169.
- [28] K. Selvakumar, R. Madhan, G. Srinivasan, V. Baskar, Antioxidant assays in pharmacological research, *Asian J. Pharm. Technol.* **1** (2011) 99–103.
- [29] I. Gulçin, O.I. Küfrevioğlu, M. Oktay, M.E. Büyükkuroğlu, Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and anal-

- gesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.), J. Ethnopharmacol. **90** (2004) 205–215.
- [30] T. Dhanani, S. Shah, N.A. GAjbhiye, S. Kumar, Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. Arabian J. Chem. (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.02.015>
- [31] E. Middleton, C. Kandaswami, T.C. Theoharides, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, Pharmacol. Rev. **52** (2000), 673–751.
- [32] C. Sanchez-Moreno, Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, Food Sci. Tehnol. Int. **8** (2002) 121–137.
- [33] N. Ito, M. Hirose, S. Fukushima, H. Tsuda, T. Shirai, M. Tatenatsu, Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogens, Food Chem. Toxicol. **24** (1986) 1071–1082.
- [34] I. Konczak, S. Okuno, M. Yoshimoto, O. Yamakawa, Caffeoyl quinic acids generated in vitro in a high-anthocyanin-accumulating sweet potato cell line, J. Biomed. Biotechnol. **5** (2004) 287–292.
- [35] M. Koşar, D. Dorman, K. Başer, R. Hiltunen, An improved HPLC post-column methodology for the identification of free radical scavenging phytochemicals in complex mixtures, Chromatographia **60** (2004) 635–638.
- [36] L.M. Magalhães, M.A. Segundo, S. Reis, J.L. Lima, Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties, Anal. Chim. Acta **613** (2008) 1–19.
- [37] D. Huang, B. Ou, R.L. Prior, The chemistry behind antioxidant capacity assays, J. Agric. Food Chem. **53** (2005) 1841–1856.
- [38] K. Kranl, K. Schlesier, R. Bitsch, H. Hermann, M. Rohe, V. Böhm, Comparing antioxidative food additives and secondary plant products – use of different assays, Food Chem. **93** (2005) 171–175.
- [39] B. Raja, K.V. Pugalendi, Evaluation of antioxidant activity of *Melothria maderaspatana* in vitro, Cent. Eur. J. Biol. **5** (2010) 224–230.
- [40] R. Hirano, W. Sasamoto, A. Matsumoto, H. Itakura, O. Igrashi, K. Kondo, Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation, J. Nutr. Sci. Vitaminol. **47** (2001) 357–362.
- [41] P.G. Pietta, Flavonoids as Antioxidants, J. Nat. Prod. **63** (2000) 1035–1042.
- [42] S.A. Budhiyanti, S. Raharjo, D.W. Marseno, I.Y.B. Lelana, Free radical scavenging, metal chelating and singlet oxygen quenching activity of fractionated brown seaweed *Sargassum hystrix* extract, J. Biol. Sci. **11** (2011) 288–298.
- [43] S. Khokhar, R.K.O. Apenten, Iron binding characteristics of phenolic compounds: Some tentative structure-activity relations, Food Chem. **81** (2003) 1334–1410.

SUMMARY**ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACT FROM CULTIVATED STRAWBERRIES' LEAVES (*Fragariae folium*)**

Ljiljana P. Stanojević, Jelena S. Stanojević, Dragan J. Cvetković, Milorad D. Cakić, Dušica P. Ilić

University of Niš, Faculty of Technology, Leskovac, Serbia

(Scientific paper)

Strawberry is a member of the rose family (*Rosaceae*, subfamily *Rosoideae*, tribe *Potentilleae*) in the genus *Fragaria*. The cultivated varieties of commercial strawberries usually were designated as *Fragaria ananassa*. Root, leaf, flower and fruit have the healing properties. The strawberry leaves extract is used for blood cleaning, for treatment of oral inflammation, diarrhea, various gastro-intestinal inflammation, and hemorrhoids, as well as a diuretic. So far, many positive biological effects of strawberries (anticancer, antioxidant and anticoagulant effect) have been proven. The purpose of this study was to evaluate the antioxidant potential of ethanolic extract from cultivated strawberries (*Fragariae folium*, varieties *Senga Sengana*) by using different antioxidant assays (DPPH, FRAP, FIC, H_2O_2 and TBA-MDA). Ethanolic extract from strawberry leaves was obtained by reflux extraction at the boiling temperature. Total phenols and total flavonoids content was determined spectrophotometrically by the method of Folin-Ciocalteu and by method with $AlCl_3$, respectively. In the extract was determined high content of total phenols, while the total flavonoid content is much lower. The concentrations of extract required to neutralize 50% of the initial concentration of DPPH radicals (EC_{50}) after 20 min incubation and immediately after adding DPPH radical solution were 7.91 and $19.46 \mu g cm^{-3}$, respectively. Extract was achieved the maximum iron ions chelating ability (67.89%) at a concentration of $2 mg cm^{-3}$. Inhibition of lipid peroxidation of 70% was achieved by extract concentration of $0.03125 mg cm^{-3}$, while the maximum neutralization of H_2O_2 (30.47%) was achieved by extract concentration of $0.5 mg cm^{-3}$. FRAP value of the investigated extract is $284.51 mg Fe^{2+}/g$ of dry extract. Presented results of the antioxidant activity show that the obtained extract from the cultivated strawberry leaves is a potential source of natural antioxidants.

Keywords: Strawberry leaves (*Fragariae folium*) • *Senga sengana* • Total phenols • Total flavonoids • Antioxidant activity