



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Невена Р. Михаиловић

**ОДРЕЂИВАЊЕ ФЕНОЛНИХ ЈЕДИЊЕЊА У ПЛОДОВИМА
НЕКИХ БИЉАКА ИЗ ФАМИЛИЈЕ ROSACEAE И
АНТИОКСИДАТИВНЕ АКТИВНОСТИ ЊИХОВИХ
СИНТЕТИЧКИХ ДЕРИВАТА**

Докторска дисертација

Ментор: др Љубинка Јоксовић

Крагујевац, 2019.

<i>I Аутор</i>	
Име и презиме	Невена Р. Михаиловић (рођ. Ивановић)
Датум и место рођења	18.05.1989., Крагујевац
Садашње запослење	Истраживач-сарадник на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу
<i>II Докторска дисертација</i>	
Наслов	„Одређивање фенолних једињења у плодовима неких биљака из фамилије Rosaceae и антиоксидативне активности њихових синтетичких деривата“
Број страница	197
Број слика	56
Број библиографских података	258
Установа и место где је рад израђен	Природно-математички факултет, Крагујевац
Научна област (УДК)	Хемија (54), аналитичка хемија (543)
Ментор	др Љубинка Јоксовић, ванредни професор
<i>III Оцена и одбрана</i>	
Датум пријаве теме	13.07.2016. године (одлука бр. IV-01-698/6)
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације	
Комисија за оцену подобности теме и кандидата	1. др Љубинка Јоксовић, доцент (ментор) Природно-математички факултет, Крагујевац <i>Ужа научна област:</i> Аналитичка хемија 2. др Предраг Ђурђевић, редовни професор Природно-математички факултет, Крагујевац <i>Ужа научна област:</i> Аналитичка хемија 3. др Милена Јеликић Станков, редовни професор Фармацеутски факултет, Београд <i>Ужа научна област:</i> Аналитичка хемија
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације	1. др Андрија Ћирић, доцент (председник комсије) Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу; <i>Ужа научна област:</i> Аналитичка хемија 2. др Само Крефт, редовни професор Фармацеутски факултет, Универзитет у Љубљани <i>Ужа научна област:</i> Фармацеутска биологија 3. др Биљана Шмит, виши научни сарадник Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу; <i>Научна област:</i> Хемија
Датум одбране докторске дисертације	2019.

Мојој мами...



Захвалница

Ова докторска дисертација је резултат рада многих људи који су посредно или непосредно учествовали у њеном обликовању и изради.

Велику захвалност дугујем проф. др Предрагу Ђурђевићу, редовном професору у пензији, првобитном ментору у чијој сам истраживачкој групи уписала докторске студије. Захвалност дугујем ментору, др Љубинки Јоксовић, ванредном професору, на идејема и помоћи током израде и писања докторске дисертације, као и разумевању, слободи и поверењу које ми је пружила у току експеримената, писања радова и осталим облицима ангажовања.

Велики део ове докторске дисертације урађен је у лабораторији за органску хемију, уз помоћ проф. др Милана Јоксовића и доц. др Виолете Марковић, којима се овом приликом искрено захваљујем, и понављам, „ко није искусио...“ ☺

Захваљујем се и колеги др Андрији Ћирићу, који ме је увео у велики део ове тематике и помагао током процеса израде и писања дисертације. Професору др Само Крефту, са Универзитета у Љубљани, дугујем велику захвалност јер сам део ове дисертације урадила у његовој лабораторији, са изузетно пријатним условима за рад, као и помоћи у изради научног рада који је проистекао из ове сарадње. Хвала др Биљани Шмит, члану Комисије, на детаљном прегледу овог рада и свим корисним сугестијама. Такође, захваљујем се и колегама са Института за хемију, као и својим пријатељима.

Наравно, огромну захвалност дугујем својој целој породици, оцу и браћи, што су такви какви су, и што стварно имам на кога да се угледам. Сави, Мини, Вукију и Фићку, што ме увесељавају из дана и дан и на толикој љубави коју ми пружају, па ми самим тим представљају непроцењив извор покретачке енергије.

ОГРОМНО хвала мом супругу Владимиру, за превелику подршку и помоћ, што у току израде ове дисертације, што у најтежим животним тренуцима, и што ме увек врати у колосек и подигне после свега. Заслужује медаљу што ме трпи ☺

НАЈВЕЋУ ЗАХВАЛНОСТ ДУГУЈЕМ СВОЈОЈ МАМИ...ЗА СВЕ.

Због тебе сам заволела хемију, мада је то најмање битно. За све тренутке подршке и разумевања, када баш и нисам била особа каква бих волела да будем. За то што сам, гледајући и учећи од тебе, постала бољи човек. За то што си била најхрабрија и најбоља особа коју познајем. Остаје ми само да се надам да си "негде тамо" поносна на мене...

ИЗВОД

У последњих неколико деценија, интерес за изучавањем познатих и проналажењем нових врста које могу имати значајан антиоксидативни потенцијал све више расте. Имајући у виду да су фенолна једињења позната као јако добри антиоксиданси, а да су главни извори ових једињења биљке, константно се изучавају биљне врсте које потенцијално поседују висок садржај природних антиоксиданаса.

Фамилија Rosaceae обухвата велики број биљних врста које људи од давнина користе у својој исхрани, али су многе дивље врсте недовољно проучаване, па је део ове дисертације базиран на анализи фенолних једињења у дивљим плодовима јабуке, малине и трешње. У циљу добијања максималног приноса ових једињења из биљног материјала, извршена је оптимизација методе екстракције фенолних једињења, и дефинисани су оптимални услови за екстракцију, који обухватају правилан одабир растварача (и његове концентрације), однос масе узорка и запремине растварача, време и температуру екстракције. У овако добијеним екстрактима, анализиран је укупан садржај фенолних једињења (укупних фенола, фенолних киселина, флавоноида и антоцијанина), а резултати су омогућили одређивање оптималних услова екстракције ових једињења у узорцима применом софтвера Design-Expert® и методологије одзива површине (*енг.* Response Surface Methodology).

Квантификација појединачних фенолних једињења у узорцима добијеним екстракцијом под оптималним условима извршена је HPLC методом, при чему су добијени резултати потврдили да су ови плодови богати садржајем биолошки важних фенолних једињења. Добијене вредности концентрација појединачних фенолних једињења указале су да плодови испитиваних самониклих врста фамилије Rosaceae могу бити значајан извор ове групе једињења у исхрани људи. Резултати и методологија анализе фенолног састава ових плодова, могу бити од значаја и за будућа испитивања и анализу садржаја фенолних једињења у плодовима биљака сличних карактеристика. Испитана је и стабилност и биодоступност ових компоненти у организму, симулацијом услова *in vitro*

гастроинтестиналне дигестије. Да би се расветлио антиоксидативни потенцијал тестираних узорака, примењен је низ метода које испитују њихову способност да неутралишу штетне слободно-радикалске врсте.

Иако постоји све већа тежња за налажењем и употребом природних антиоксиданаса, могућности њихове универзалне примене су често ограничене, па се прибегава добијању антиоксидативних једињења синтетичким путем. У том смислу, у овом раду је извршена синтетичка модификација одабраних фенолних киселина, са циљем налажења нових једињења са бољим биолошким активностима, пре свега антиоксидативном. На овај начин су добијене две серије једињења, 1,2,4-триазол-3-тиони и 1,3,4-оксадиазоли.

Добијени резултати дају допринос анализи фенолних једињења у природним производима, њиховој функционализацији и примени.

SUMMARY

In the past several decades, the interest in studying well-known and discovery of new species that may have significant antioxidant potential is constantly growing. Taking into account that phenolic compounds are known as good antioxidants, and that the main sources of these compounds are plants, there is a constant pursuit for plant species potentially possessing a high content of natural antioxidants.

The Rosaceae family includes a large number of plant species that humans have used in their diet for a long time, but many wild species are insufficiently studied, therefore part of this PhD thesis is based on the analysis of phenolic compounds in wild apples, raspberries, and cherries (family Rosaceae). In order to obtain the maximum yield of these compounds, optimization of the extraction method of phenolic compounds from plant material was performed, and optimal conditions for extraction, including the appropriate choice of the solvent (and its concentration), the solid to solvent ratio, the time and temperature of the extraction, were defined. The total content of phenolic compounds (total phenols, phenolic acids, flavonoids, and anthocyanins) was analyzed in the obtained extracts, and the obtained results were used in determination of optimal conditions for the extraction of these compounds in the samples using the Design-Expert® software and the response surface methodology.

The quantification of individual phenolic compounds in the samples obtained by extraction under optimal conditions was performed by HPLC method and the results confirmed that these fruits are rich in the biologically important phenolic compounds. The obtained concentrations of individual phenolic compounds indicated that the studied wild fruit species of the Rosaceae family could be a significant source of phenolic compounds in human nutrition. The results and methodology of analyzing the phenolic composition of these fruits can be of importance for future research and analysis of phenolic compounds content in fruit or plants with similar characteristics. Furthermore, the stability and bioaccessibility of these components in the organism were examined by the simulation of the *in vitro* gastrointestinal digestion conditions. In order to clarify the

antioxidant potential of the tested samples, a number of methods for determination of the ability of obtained extracts to neutralize harmful free-radical species have been applied.

Although there is a growing tendency to find and use natural antioxidants, the possibilities of their universal application are often limited, therefore antioxidant compounds are often synthetically obtained. The synthetic modification of selected phenolic acids was carried out with the aim of finding a new series of compounds with better biological activities, mainly antioxidant activity. Two series of novel compounds were synthesized, 1,2,4-triazol-3-thiones and 1,3,4-oxadiazoles.

The obtained results in this PhD thesis contribute to the analysis of phenolic compounds in natural products, their functionalization, and application.

САДРЖАЈ

ИЗВОД

SUMMARY

СКРАЋЕНИЦЕ

Списак слика

Списак схема

Списак табела

1. УВОД	1
2. ОПШТИ ДЕО	5
2.1. Хемијска структура и класификација фенолних једињења	7
2.1.1. Прости феноли	7
2.1.2. Флавоноиди	11
2.1.3. Бензофенони, ксантони и стилбени	15
2.1.4. Хинони	15
2.1.5. Лигнани и лигнини	16
2.1.6. Танини	17
2.2. Значај и примена фенолних једињења	18
2.3. Плодови биљака фамилије Rosaceae као извори фенолних једињења	19
2.3.1. <i>Malus sylvestris</i> (L.) Mill. (дивља јабука)	20
2.3.2. <i>Rubus idaeus</i> L. (дивља малина)	22
2.3.3. <i>Prunus avium</i> L. (дивља трешња)	25
2.4. Екстракција фенолних једињења	26
2.4.1. Ултразвучна екстракција	27
2.4.2. Микроталасна екстракција	28
2.4.3. Оптимизација екстракционих услова	29
2.5. Анализа фенолних једињења	30
2.6. Фенолна једињења као антиоксиданси	30
2.6.1. Слободни радикали и оксидативни стрес	31
2.6.1.1. Реактивне кисеоничне врсте (ROS)	32
2.6.1.2. Реактивне врсте азота (RNS)	35

2.6.2.	Утицај слободних радикала на примарне биомолекуле	36
2.6.2.1.	Оксидативни стрес и липиди – липидна пероксидација.....	36
2.6.2.2.	Оксидативни стрес и ДНК	38
2.6.2.3.	Оксидативни стрес и протеини	39
2.6.2.4.	Оксидативни стрес и угљени хидрати	40
2.6.2.5.	Оксидативни стрес и антиоксиданси	40
2.6.2.5.1.	Ензими антиоксидативне заштите	42
2.6.2.5.2.	Неензимски антиоксиданси.....	43
2.6.3.	Механизми антиоксидативне активности фенолних једињења	44
2.6.3.1.	НАТ механизам.....	45
2.6.3.2.	SET-PT механизам.....	46
2.6.3.3.	SPLET механизам	47
2.7.	Синтетичка модификација фенолних киселина.....	49
2.7.1.	1,2,4-Триазол-3-тиони	49
2.7.2.	1,3,4-Оксадиазоли.....	50
3.	ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	53
4.	ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	57
4.1.	Сакупљање плодова воћа из фамилије Rosaceae.....	59
4.2.	Екстракција плодова дивљег воћа	59
4.2.1.	Поступак екстракције коре и пулпе дивље јабуке.....	59
4.2.2.	Поступак екстракције плода дивље малине.....	60
4.2.3.	Поступак екстракције плода дивље трешње	60
4.2.4.	Оптимизација услова ултразвучне и микроталасне екстракције	61
4.3.	Методe за одређивање количине фенолних једињења у екстрактима.....	61
4.3.1.	Одређивање количине укупних фенола	61
4.3.2.	Одређивање количине укупних флавоноида	63
4.3.3.	Одређивање количине укупних фенолних киселина	64
4.3.4.	Одређивање количине антоцијанина	65
4.4.	Одређивање садржаја фенолних једињења у екстрактима плодова дивље јабуке и дивље малине HPLC методом.....	66
4.4.1.	Стандарди и припрема стандардних раствора фенолних једињења.....	67
4.4.2.	Карактеризација HPLC методе.....	68
4.4.2.1.	Линеарност	68
4.4.2.2.	Тачност	69
4.4.2.3.	Прецизност	69
4.4.2.4.	Граница детекције (<i>LOD</i>) и граница квантификације (<i>LOQ</i>)	69

4.5. Симулација <i>in vitro</i> гастроинтестиналне дигестије плодова дивљег воћа.....	70
4.6. Синтетичка модификација неких фенолних киселина	71
4.6.1. Поступак за синтезу 1,2,4-триазол-3-тиона	72
4.6.2. Синтеза 1,3,4-оксадиазола	75
4.6.2.1. Поступак за синтезу хидразида	75
4.6.2.2. Поступак за синтезу 1,3,4-оксадиазола	76
4.6.3. Мерења физичких особина 1,2,4-триазол-3-тиона, диацилхидразина и 1,3,4-оксадиазола	81
4.6.4. Метода цикличне волтаметрије за испитивање електрохемијског понашања 1,2,4-триазол-3-тиона и матичних фенолних киселина.....	81
4.7. Испитивање антиоксидативног потенцијала плодова дивљег воћа и синтетички модификованих фенолних киселина	81
4.7.1. Испитивање способности неутрализације DPPH [•] радикала	82
4.7.2. ABTS ^{•+} радикал-катјон метода	85
4.7.3. Испитивање неутрализације NO [•] радикала	86
4.7.4. Испитивање неутрализације OH [•] радикала	87
4.7.5. Испитивање неутрализације O ₂ ^{•-} радикала	88
4.7.6. Испитивање способности неутрализације водоник-пероксида	89
4.7.7. Испитивање способности редукције Fe ³⁺ јона	90
4.7.8. Испитивање способности редукције Фолин-Чиокалте реагенса	91
4.8. Испитивање цитотоксичности синтетички модификованих фенолних киселина	91
4.8.1. Коришћена ћелијска култура	91
4.8.2. МТТ тест преживљавања ћелија	92
4.9. Мерење нивоа интрацелуларних ROS у MRC-5 ћелијској култури.....	93
4.9.1. Тестови за испитивање активности антиоксидативних ензима у MRC-5 ћелијској култури	94
4.10. Испитивање механизма антиоксидативног дејства 1,2,4-триазол-3-тиона.....	95
4.11. Софтвери и статистичка обрада података.....	97
5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	99
5.1. Оптимизација екстракционих услова	101
5.1.1. Оптимизација ултразвучне методе за екстракцију фенолних једињења из коре и пулпе плода дивље јабуке	105
5.1.2. Оптимизација ултразвучне методе за екстракцију фенолних једињења из плода дивље малине	113

5.1.3. Оптимизација услова микроталасне екстракције фенолних једињења из плода дивље трешње.....	118
5.2. Садржај укупних фенолних једињења, флавоноида, фенолних киселина и антоцијана у испитиваним узорцима	124
5.3. Анализа екстракта плодова дивљег воћа HPLC методом	127
5.3.1. Карактеризација HPLC методе и анализа екстракта дивље јабуке.....	127
5.3.2. HPLC анализа екстракта плода дивље малине	132
5.4. Антиоксидативни капацитет испитиваних екстракта дивљег воћа	133
5.4.1. Испитивање антиоксидативног потенцијала екстракта плода дивље јабуке...	134
5.4.2. Испитивање антиоксидативног потенцијала плодова дивље малине и дивље трешње	136
5.5. Испитивање стабилности фенолних једињења симулацијом <i>in vitro</i> гастроинтестиналне дигестије	138
5.5.1. Симулација <i>in vitro</i> гастроинтестиналне дигестије плода дивље јабуке	138
5.5.2. Симулација <i>in vitro</i> гастроинтестиналне дигестије плода дивље малине	141
5.6. Функционализација фенолних киселина синтетичком модификацијом	143
5.6.1. Синтеза 1,2,4-триазол-3-тиона	144
5.6.1.1. Евалуација антиоксидативне активности 1,2,4-триазол-3-тиона	144
5.6.1.1.1. Испитивање способности неутралисања радикала DPPH [•] радикала...	144
5.6.1.2. Испитивање електрохемијског понашања 1,2,4-триазол-3-тиона и полазних фенолних киселина методом цикличне волтаметрије	148
5.6.1.3. Теорија функционала густине	151
5.6.1.4. Слободни радикали, радикал-катјони и анјони 1,2,4-триазол-3-тиона	152
5.6.1.5. Механизам антиоксидативне активности и SAR студија	157
5.6.2. Синтеза диацилхидразина и 1,3,4-оксадиазола	160
5.6.2.1. Биолошке активности диацилхидразина и одговарајућих 1,3,4-оксадиазола	161
5.6.2.1.1. Испитивање антиоксидативне активности диацилхидразина и одговарајућих 1,3,4-оксадиазола	161
5.6.2.1.1.1. Испитивање способности 1,3,4-оксадиазола и диацилхидразина да неутралишу DPPH [•] радикал.....	161
5.6.2.1.1.2. Способност неутрализације ABTS ^{•+} , H ₂ O ₂ и редуктивна активност.....	164

5.6.2.1.2.	Цитотоксична активност диацилхидразина и одговарајућих 1,3,4-оксадиазола на MRC-5 ћелијској култури	166
5.6.2.1.3.	Утицај третирања MRC-5 ћелија диацилхидразинима и 1,3,4-оксадиазолима на производњу ROS индуковану водоник-пероксидом	167
5.6.2.1.4.	Утицај диацилхидразина и 1,3,4-оксадиазола на активност антиоксидативних ензима	169
6.	ЗАКЉУЧАК	171
7.	ЛИТЕРАТУРА	177
	БИОГРАФИЈА	195
	БИБЛИОГРАФИЈА	
	ПРИЛОГ	
	ПУБЛИКОВАНИ РАДОВИ	

Скраћенице

A-III

ДНК – дезоксирибонуклеинска киселина

СМ – маса свежег узорка

A-Z

ABTS – 2,2'-азинобис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина)

ANOVA – анализа варијансе

BDE – енталпија дисоцијације везе

BHT – бутиловани хидрокситолуен

CAE – еквиваленти кафеинске киселине

CAT – каталаза

CCD – централни композитни дизајн

CGE – еквиваленти цијанидин-3-глукозида

CV – коефицијент варијације

DFT – теорија функционала густине

DMF – диметилформамид

DMSO – диметил сулфоксид

DPPH – 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил

DTNB – 2,2'-динитро-5,5'-дитио-добензоева киселина

EDTA – етилендиаминтетрасирћетна киселина

ETE – енталпија преноса електрона

F-C – *Folin-Ciocalteu*

G – гуанин

GAE – еквиваленти галне киселине

GC – стакласти угљеник

GR – глутатион редуктаза

GSH – глутатион

GSHPx – глутатион пероксидаза

GSSG – глутатион дисулфид

HAT – пренос атома водоника

HEPES – 4-(2-хидроксиетил)-1-пиперазинетан сулфонска киселина

HILIC – течна хроматографија хидрофилних интеракција

HOMO – највиша заузета молекулска орбитала

HPLC – течна хроматографија високих перформанси

IP – јонизациони потенцијал

LOD – лимит детекције

LOQ – лимит квантификације

MeOH – метанол

MRC-5 – хумане здраве ћелије фибробласта плућа

MS – масена спектрометрија

MTT – 3-(4,5-диметилтриазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид

NADH – никотинамид аденин динуклеотид (редуковани)

NBO – *енг.* Natural Bond Orbital

NBT – нитро-плаво тетразолијум

NDGA – нордихидрогвајаретинска киселина

NMR – нуклеарна магнетна резонанција

PA – афинитет према протону

PBS – фосфатни пуфер

PDA – фотодиодни детектор

PDE – енталпија дисоцијације протона

PMS – феназин метосулфат

RNS – реактивне азотне врсте

ROS – реактивне кисеоничне врсте

RSD – релативна стандардна девијација

RSM – методологија одзива површине

RUE – еквиваленти рутина

SAR – веза између структуре и активности

SCE – референтна каломелова електрода

SD – стандардна девијација

SDS – натријум додецил сулфат

SET-PT – пренос једног електрона праћен преносом протона

SGF – симулирани желудачни флуид

SIF – симулирани интестинални флуид

SOD – супероксид дисмутаза

SPLET - секвенционални губитак протона праћен губитком електрона

SSF – симулирани орални флуид

T – тимин

TBA – тиобарбитурна киселина

TBAP – тетрабутиламонијум перхлорат

TCA – трихлорсирћетна киселина

TE – еквиваленти тролокса

TFC – садржај флавоноида

THF – тетра hidroфуран

TMS – триметилсилан

TPA – садржај фенолних киселина

TPC – садржај укупних фенола

UV/Vis – ултраљубичаста/видљива област

Списак слика

Слика 1. Резорцинол, флороглуцинол, катехол и пирогалол

Слика 2. Структуре неких фенолних киселина

Слика 3. Циметне киселине

Слика 4. Хлорогенска киселина

Слика 5. Ацетофенон и фенилсирћетна киселина

Слика 6. Кумарин умбелферон и изокумарин бергенин

Слика 7. Поткласе флавоноида

Слика 8. Халкон и дихидрохалкон

Слика 9. Аурон

Слика 10. Најпознатији антоцијанини

Слика 11. Бифлавоноид аментофлавон

Слика 12. Бензофенон и ксантон

Слика 13. Стилбен ресвератрол

Слика 14. Бензохинон и убихинон

Слика 15. Бензохинон југлон и антрахинон емодин

Слика 16. р-кумарил, кониферил и синапил алкохол

Слика 17. Подела танина

Слика 18. Најзаступљеније фенолне киселине и флавоноиди плода дивље јабуке

Слика 19. Неки од елагитанина, фенолних киселина и флавонола плода дивље малине

Слика 20. Неки од антоцијанина плода дивље трешње

Слика 21. Подела антиоксиданаса примарног и секундарног нивоа антиоксидативне заштите

Слика 22. Структурни изомери триазола

Слика 23. Таутомерни облици супституисаних 1,2,4-триазола

Слика 24. Изомери оксadiaзола: (1) 1,2,3-оксадиазол; (2) 1,2,4-оксасдиазол; (3) 1,2,5-оксадиазол; (4) 1,3,4-оксадиазол

Слика 25. Калибрациона права стандардног раствора галне киселине

Слика 26. Калибрациона права стандардног раствора рутина

Слика 27. Калибрациона права стандардног раствора кафеинске киселине

Слика 28. $ABTS^{\bullet+}$ радикал катјон

Слика 29. 3D одзиви површина комбинације А. утицаја концентрације метанола и односа масе узорка и запремине растварача на принос екстракције укупних фенолних једињења из

узорка коре дивље јабуке; **В.** утицаја концентрације метанола и температуре на принос екстракције флавоноида из узорка коре дивље јабуке

Слика 30. 3D одзиви површина комбинација **А.** утицаја концентрације метанола и односа масе узорка и запремине растварача на принос екстракције укупних фенолних једињења из узорка пулпе дивље јабуке; **В.** утицаја температуре и односа масе узорка и запремине растварача на принос екстракције флавоноида из узорка пулпе дивље јабуке; **С.** утицаја времена екстракције и односа масе узорка и запремине растварача на принос екстракције фенолних киселина из узорка пулпе дивље јабуке

Слика 31. Бар графикон појединачних (d_i) и комбинованих (D) вредности прихватљивости за појединачне факторе и добијене одзиве екстракције фенола из **А.** коре; **В.** пулпе дивље јабуке

Слика 32. Одзиви површина добијени из функција прихватљивости (D) за екстракцију **А.** коре; **В.** пулпе узорка дивље јабуке

Слика 33. 3D одзиви површина комбинације **А.** утицаја температуре и односа масе узорка и запремине растварача на принос екстракције укупних фенолних једињења; **В.** односа масе узорка и запремине растварача и концентрације метанола на принос екстракције флавоноида; **С.** концентрације метанола и температуре на принос екстракције антоцијана из узорка дивље малине

Слика 34. Бар графикон појединачних (d_i) и комбинованих (D) вредности прихватљивости појединачних фактора и добијених одзива екстракције фенола из плода дивље малине

Слика 35. Одзив површине добијен за функцију прихватљивости (D) екстракције фенолних једињења из плода дивље малине

Слика 36. 3D одзиви површина комбинације **А.** утицаја температуре и односа масе узорка и запремине растварача на принос екстракције укупних фенолних једињења; **В.** температуре и концентрације метанола на принос екстракције флавоноида; **С.** времена екстракције и температуре на принос екстракције фенолних киселина из узорка дивље трешње

Слика 37. Бар графикон појединачних (d_i) и комбинованих (D) вредности прихватљивости појединачних фактора и добијених одзива екстракције фенола из узорка дивље трешње

Слика 38. Одзив површине добијен за функцију прихватљивости екстракције фенолних једињења из плода дивље трешње

Слика 39. HPLC-PDA хроматограми стандардних једињења **1:** (+)-катехин, **2:** хлорогенска киселина, **3:** (-)-епикатехин, **4:** хиперозид, **5:** кверцитрин, **6:** флоризин (**А**), екстракта коре (**В**) и екстракта пулпе дивље јабуке (**С**) на 280 nm. Концентрација свих стандарда је 0,05 mg/mL

Слика 40. HPLC-PDA хроматограм екстракта дивље малине снимљен на 280 nm (**1**: гална киселина, **2**: (+) - катехин, **3**: цијанидин-3-глукозид, **4**: цијанидин-3-софорозид, **5**: елагинска киселина)

Слика 41. Редуктивна активност екстракта коре и пулпе дивље јабуке у поређењу са стандардним антиоксидансима. Већа апсорбанца указује на бољу антиоксидативну активност. Резултати су средња вредност 3 мерења $\pm$ SD; средње вредности са различитим словима у суперскрипту се статистички значајно разликују ($p < 0,05$)

Слика 42. Способност екстракта дивље малине да неутралише DPPH и ABTS радикале

Слика 43. Промене концентрација фенолних једињења у кори дивље јабуке током симулиране in vitro дигестије праћене HPLC методом (**1**: катехин; **2**: хлорогенска киселина; **3**: епикатехин; **4**: хиперозид; **5**: кверцитрин; **6**: флоризин)

Слика 44. Промене концентрација фенолних једињења у пулпи дивље јабуке током симулиране in vitro дигестије праћене HPLC методом (**1**: хлорогенска киселина; **2**: епикатехин; **3**: флоризин)

Слика 45. Промене концентрација фенолних једињења у пулпи дивље малине током симулиране in vitro дигестије праћене HPLC методом (**1**: гална киселина, **2**: цијанидин-3-глукозид, **3**: цијанидин-3-софорозид, **4**: катехин, **5**: елагинска киселина)

Слика 46. Корелација између процента инхибиције и времена за 2 пара фенолних киселина и триазола који су показали највећу антиоксидативну активност, мерену DPPH методом. Свака вредност је средња вредност 3 мерења $\pm$ SD

Слика 47. Проценат инхибиције DPPH за једињења **1f**, **4f**, **1h** и **4h** различитих концентрација. Свака вредност је средња вредност 3 мерења $\pm$ SD

Слика 48. Циклични волтамограми једињења **1d** (0,86 mM) и **4d** (1,11 mM) у DMF-у + 0,1 M ТВАР на GC електроди, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$

Слика 49. Циклични волтамограми једињења **1f** (0,86 mM) и **4f** (1,11 mM) у DMF-у + 0,1 M ТВАР на GC електроди, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$

Слика 50. Оптимизоване геометрије испитиваних једињења; свако једињење је представљено у облику свог најстабилнијег конформера

Слика 51. Оптимизоване геометрије тионских и тиолских таутомера једињења **4d** и **4h** и одговарајуће релативне вредности енталпија

Слика 52. Расподела спинске густине у радикалима насталим из испитваних 1,2,4-триазол-3-тиона у метанолу

Слика 53. НОМО испитиваних 1,2,4-триазол-3-тиона у метанолу

Слика 54. Расподела спинске густине и природног наелектрисања у свим радикал-катјонима насталим из испитиваних 1,2,4-триазол-3-тиона у метанолу

Слика 55. Природна дистрибуција наелектрисања у свим анјонима добијеним из испитиваних 1,2,4-триазол-3-тиона у метанолу

Слика 56. Утицај 24 h третмана MRC-5 ћелија диацилхидразинима и 1,3,4-оксадиазолима на производњу ROS индуковану водоник-пероксидом; **A.** флуоресцентни хистограми; **B.** интензитет флуоресценције насталог дихлорофлуоресцеина у MRC-5 ћелијама. Примењене нетоксичне концентрације једињења су: 50 mM за **6d**, **6e**, **6g** и **6h**; 20 mM за **7d**, **7e**, **7g** и **7h**

Списак схема

Схема 1. Биосинтеза NO из аргинина

Схема 2. Оксидација нуклеинских база под дејством хидроксил радикала

Схема 3. Реверзибилна оксидација метионина и иреверзибилна оксидација пролина

Схема 4. Механизми антиоксидативне активности фенолних једињења

Схема 5. НАТ механизам

Схема 6. Резонантна стабилизација фенолних једињења

Схема 7. Синтетички пут за добијање деривата 1,2,4-триазол-3-тиона (2,4-дихидро-3H-1,2,4-триазол-3-тион)

Схема 8. Синтетички пут за добијање деривата 1,3,4-оксадиазола

Схема 9. Неутрализација DPPH[•] радикала одговарајућим антиоксидансом

Схема 10. Реагенси и услови: а) SOCl₂, DMF, CH₂Cl₂, 2 h, собна температура; б) NH₂NHC(S)NH₂, THF; с) NaOH, кување, 3 h; HCl

Схема 11. Резонантна стабилизација радикал - катјона у једињењу **4h**

Схема 12. Резонантна стабилизација радикала протокатехинске киселине

Схема 13. Резонантна стабилизација радикала триазола **4h** након хетеролитичког: **A)** O-H, **B)** N-H раскидања везе, и губитка једног електрона према SPLET механизму

Схема 14. Реагенси и услови: **a)** H₂SO₄, MeOH, кување, 5 h; **b)** N₂H₄ × H₂O, EtOH, кување, 12 h; **c)** SOCl₂, DMF, CH₂Cl₂, 2 h, на собној температури; **d)** THF, 6 h, собна температура; **e)** SOCl₂, кување, 6 h

Схема 15. Резонантна стабилизација радикала насталог из једињења **6e (A)** и **7e (B)**, након хетеролитичког цепања OH везе и губитка једног електрона

Списак табела

Табела 1. *Класификација фенолних једињења по Харборну и Симондсу*

Табела 2. *Најважнији слободни радикали и нерадикалске врсте кисеоника*

Табела 3. *Најважнији слободни радикали и нерадикалске врсте азота*

Табела 4. *Подела метода за одређивање антиоксидативне активности према механизму дејства*

Табела 5. *Независне променљиве и њихове кодиране и праве вредности коришћене за оптимизацију екстракције фенолних једињења из коре и пулпе плода дивље јабуке*

Табела 6. *Редуковани модел централног композитног дизајна са ANOVA анализом коришћен за оптимизацију екстракције фенолних једињења из коре и пулпе плода дивље јабуке*

Табела 7. *Поређење експерименталних и предвиђених вредности променљивих и одзива добијених под оптималним условима екстракције фенолних једињења из коре и пулпе плода дивље јабуке*

Табела 8. *Независне променљиве и њихове кодиране и праве вредности коришћене за оптимизацију екстракције полифенолних једињења из плода дивље малине*

Табела 9. *Редуковани модел централног композитног дизајна са ANOVA анализом коришћен за оптимизацију екстракције фенолних једињења из плода дивље малине*

Табела 10. *Поређење експерименталних и предвиђених вредности променљивих и одзива добијених под оптималним условима екстракције фенолних једињења из плода дивље малине*

Табела 11. *Независне променљиве и њихове кодиране и праве вредности коришћене за оптимизацију екстракције фенолних једињења из плода дивље трешње*

Табела 12. *Редуковани модел централног композитног дизајна са ANOVA анализом коришћен за оптимизацију екстракције фенолних једињења из плода дивље трешње*

Табела 13. *Поређење експерименталних и предвиђених вредности променљивих и одзива добијених под оптималним условима екстракције фенолних једињења из плода дивље трешње*

Табела 14. *Количина укупних фенола, флавоноида, фенолних киселина и антоцијана у испитиваним екстрактима дивље јабуке (кора и пулпа), дивље малине и дивље трешње*

Табела 15. *Једначине стандардних правих за фенолна једињења и лимити детекције и квантификације*

Табела 16. HPLC анализа фенолних једињења коре и пулпе дивље јабуке и прецизност HPLC методе за квантитативну евалуацију фенолних једињења

Табела 17. Фенолни састав екстракта дивље малине добијен под оптималним условима екстракције (mg/100 g CM $\pm$ SD)

Табела 18. Антиоксидативна активност метанолских екстраката коре и пулпе дивље јабуке (изражена као IC₅₀ вредност) у поређењу са стандардним антиоксидансима

Табела 19. Садржај фенолних једињења у кори и пулпи дивље јабуке (mg/g CM) током симулиране in vitro гастроинтестиналне дигестије

Табела 20. Садржај фенолних једињења у дивљим малинама (mg/100g CM) током симулиране in vitro гастроинтестиналне дигестије

Табела 21. Способност фенолних киселина и њихових одговарајућих триазола да неутралишу DPPH радикал

Табела 22. Потенцијали оксидационих пикова ($v=100 \text{ mVs}^{-1}$)

Табела 23. Способност диацилхидразина и њихових одговарајућих 1,3,4-оксадиазола да неутралишу DPPH радикал

Табела 24. Антиоксидативна активност одабраних диацилхидразина и 1,3,4-оксадиазола

Табела 25. Концентрације диацилхидразина и 1,3,4-оксадиазола које индукују 50% смањења MRC-5 ћелијског преживљавања након третмана у трајању од 72 h

Табела 26. Активности антиоксидативних ензима у контролним MRC-5 ћелијама и ћелијама изложеним 24 h нетоксичним концентрацијама испитиваних диацилхидразина и 1,3,4-оксадиазола



УВОД



Фенолна једињења, као саставни део многих биљних врста, имају значајну улогу у исхрани и очувању здравља људи, па су све више су предмет проучавања.¹ Број публикација које се баве испитивањем ове врсте једињења у воћу у периоду од 20 година (од 1991. до 2011. године) повећао се приближно 40 пута, што осликава велики интерес за њихово проучавање.²

Многе студије истичу да се повећаним конзумирањем поврћа и воћа богатог фенолним једињењима смањује ризик од различитих болести, као што су кардиоваскуларне, неуродегенеративне, дијабетес, па и канцер.³⁻⁵ Такође, ове студије показују да храна биљног порекла, поред витамина и минерала, садржи приближно 10 000 других једињења са антиоксидативним потенцијалом која могу имати позитиван утицај на здравље човека.⁶ Да би корист од конзумирања воћа и поврћа била максимална, неопходно је познавати садржај антиоксиданаса, начин њихове ресорпције у организму, биодоступност, као и механизам антиоксидативног дејства у организму.⁷

Екстракција фенолних једињења из различитих делова биљака предмет је интензивног истраживања већ пар деценија. Од познатих екстракционих метода, најбоље резултате у смислу приноса екстракције дају ултразвучна и микроталасна екстракција. Трагање за ефикасним антиоксидансима укључује и испитивање биљних сировина чијом се екстракцијом могу добити економски исплативији производи који би садржали максималне количине фенолних једињења. Литературни подаци указују да је најбољи компромис између приноса и времена трајања екстракције ултразвучна метода на повишеној температури.^{8,9}

Биљке из фамилије Rosaceae људи од давнина користе у својој исхрани, али многе самоникле (дивље) врсте, које се сматрају потпуно безбедним за употребу, су последњих деценија неправедно запостављене у смислу употребе у исхрани и као суплементи који би могли побољшати здравље људи.^{10,11}

Могућности универзалне примене природних антиоксиданаса су ограничене, јер је тешко предвидети ефикасност сваког антиоксиданса у одређеном прехранбеном производу.¹² Из овог разлога, често се истражује и могућност синтетичких модификација њихове структуре, у циљу побољшања наведених активности.^{13,14}



 ОПШТИ ДЕО 



2.1. Хемијска структура и класификација фенолних једињења

Феноли обухватају веома велику и разнолику групу хемијских једињења која у свом саставу имају ароматични прстен за који је директно везана једна или више хидроксилних група. Могу бити врло једноставне структуре, као што су фенолне киселине, или врло сложене структуре, попут поликондензованих једињења.^{1,15}

Полифеноли представљају једињења која имају више од једне фенолне хидроксилне групе везане за један или више бензенових прстенова. Овај термин може да заваља, па се може помислити да су полифеноли полимери појединачних молекула фенола, иако и оваква једињења постоје.¹

С обзиром да постоји преко 8 000 окарактерисаних структура, наметнула се потреба класификације фенолних једињења. Углавном су класификована према броју фенолних прстенова који садрже (фенолне киселине, стилбени, флавоноиди, лигнани и танини).¹ Према растворљивости, разликују се једињења растворна у води (фенолне киселине, фенилпропаноиди, флавоноиди и хинони) и она која су нерастворна у води (кондензовани танини, лигнини и хидроксициметне киселине везане за ћелијски зид).¹⁰

Једна од најприхваћенијих класификација коју су извршили Харборн и Симондс (*Harbon* и *Simonds*), извршена је на основу броја угљеникових атома у молекулу (*Табела 1*).¹⁶

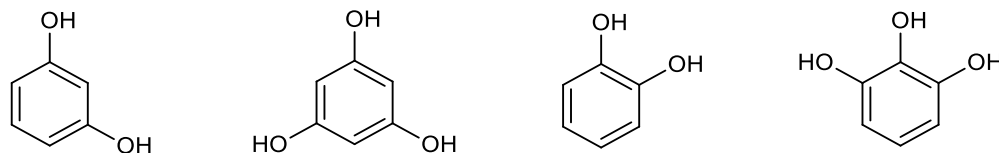
2.1.1. Прости феноли

Под називом прости феноли подразумевају се углавном супституисана фенолна једињења. Неки од најпознатијих представника простих фенола су резорцинол (1,3-дихидрокси бензен) и флороглуцинол (1,3,5-трихидрокси бензен) (*Слика 1*). Прости феноли се ретко могу наћи у биљним врстама, а ако их има, заступљени су у веома ниским концентрацијама.

Табела 1. Класификација фенолних једињења по Харборну и Симондсу¹⁶

Основни скелет	Класа	Пример
C ₆	прости феноли	катехол, резорцинол
C ₆ -C ₁	фенолне киселине и сродна једињења	<i>p</i> -хидроксibenзова киселина, гална киселина
C ₆ -C ₂	ацетофенони и фенилсирћетне киселине	2-хидроксиацетофенон, 2-хидроксифенилсирћетна киселина
C ₆ -C ₃	циметне киселине	<i>p</i> -кумаринска, ферулна, кафеинска киселина
C ₆ -C ₃	кумарини, изокумарини	умбелферон и бергинин
C ₁₅ (C ₆ -C ₃ -C ₆)	халкони, дихидрохалкони	флоризин, арбутин
C ₁₅ (C ₆ -C ₃ -C ₆)	флавони	синесетин, нобилетин
C ₁₅ (C ₆ -C ₃ -C ₆)	флаванони	хесперидин, нарингенин
C ₁₅ (C ₆ -C ₃ -C ₆)	флаваноли	дихидроксикверцерин и дихидроксикемферол гликозиди
C ₁₅ (C ₆ -C ₃ -C ₆)	антоцијанидини	пеларгонидин, пеонидин
C ₃₀	бифлавоноиди	агатисфлавор
C ₆ -C ₁ -C ₆ , C ₆ -C ₂ - C ₆	бензофенони, ксантони, стилбени	мангиферин, ресвератрол
C ₆ , C ₁₀ , C ₁₄	хинони	југлон, емодин
C ₁₈	бетацијанидини	бетанидин
димери	лигнани	ентеролигнани, ентеродиоли
олигомери	танини	галотанин, елагитанин инорезинол
полимери	лигнани, лигнини	инорезинол

Неки од простих фенола који се могу наћи у воћу и поврћу у већим концентрацијама су катехол (1,2-дихидроксибензен) и пирогалол (1,2,3-трихидрокси бензен) (Слика 1) и многе студије описују њихове различите биолошке активности.¹

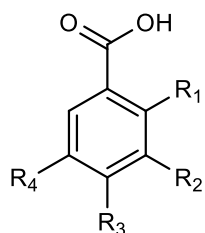


Слика 1. Резорцинол, флороглуцинол, катехол и пирогалол

Фенолне киселине и сродна једињења

Фенолне киселине су подељене у две подгрупе: *хидроксибензоеве* и *хидроксициметне киселине*. Карактерише их присуство карбоксилне групе, па за разлику од других фенолних једињења, поседују кисели карактер.¹⁷

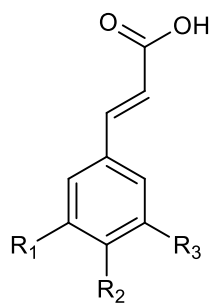
Најпознатији представници *хидроксибензоевих киселина* (Слика 2) су *p*-хидроксибензоева, гална, протокатехинска, салицилна и ванилинска киселина.



Фенолна киселина	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<i>p</i> -хидроксибензоева	H	H	OH	H
гална	H	OH	OH	OH
протокатехинска	H	OH	OH	H
салицилна	OH	H	H	H
ванилинска	H	OCH ₃	OH	H

Слика 2. Структуре неких фенолних киселина

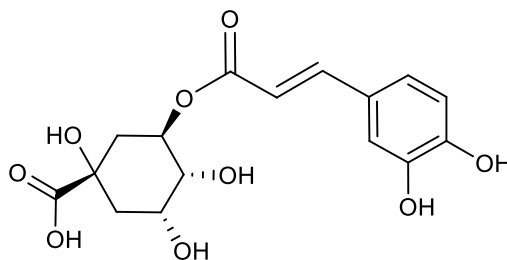
Постоји шест широко распрострањених *циметних киселина*, које имају C₆–C₃ скелет и све биљке највероватније садрже најмање три од њих. На Сlici 3 приказане су циметна, *p*-кумаринска, кафеинска, ферулна, 5-хидроксиферулна и синапинска киселина.¹



Фенолна киселина	R ₁	R ₂	R ₃
циметна	H	H	H
<i>p</i> -кумаринска	H	OH	H
кафеинска	H	OH	OH
ферулна	H	OH	OCH ₃
5-хидроксиферулна	OH	OH	OCH ₃
синапинска	OCH ₃	OH	OCH ₃

Слика 3. Циметне киселине

Циметне киселине се могу наћи у биљкама као естри хининске, шикимске и винске киселине. На пример, хлорогенска киселина (Слика 4) је естар кафеинске и хининске киселине.¹



Слика 4. Хлорогенска киселина

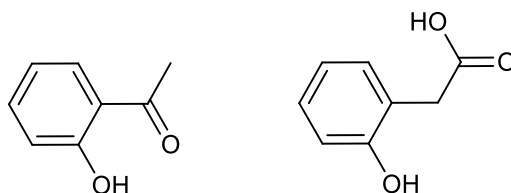
Фенолне киселине се ретко налазе слободне у биљкама, већ углавном везане у облику естара са различитим једињењима (глукоза, органске киселине, флавоноиди, терпени итд.). Кафеинска, *p*-кумаринска, ванилинска и протокатехинска киселина су заступљене у великом броју биљака, као и хлорогенска киселина.¹⁸

Храна биљног порекла је од свих фенолних једињења, најбогатија флавоноидима, који чине чак 2/3 свих фенолних једињења која се могу наћи у биљкама, док фенолне киселине чине највећи део преостале трећине. У односу на ове две класе фенолних једињења, остале класе су знатно мање заступљене.¹⁸

Сродна једињења су хидроксibenзоeви алдехиди, који у својој структури поседују алдехидну групу уместо карбоксилне.⁶

Ацетофенони и фенилсирћетне киселине

Ацетофенони и фенилсирћетне киселине представљају проста ароматична C_6-C_2 једињења, која се ретко налазе у природи. Најпознатији представник ацетофенона (Слика 5) је 2-хидроксиацетофенон, а један од представника фенилсирћетних киселина је 2-хидроксифенил сирћетна киселина.

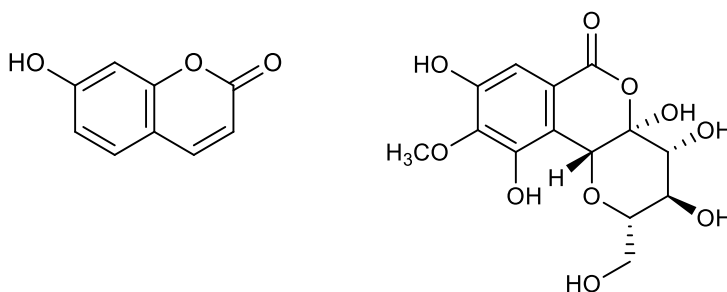


Слика 5. Ацетофенон и фенилсирћетна киселина

Кумарини и изокумарини

Кумарини такође имају C_6-C_3 скелет (Слика 6), али у својој структури имају и хетероцикл са кисеоником, као део C_3 - јединице. Постоји велики број кумарина, од којих многи имају улогу у спречавању биљних болести и заштити од штеточина, као и UV-заштити.¹

Изокумарини, као што је бергенин (Слика 6), имају структуру сличну кумаринима, али је положај кисеоника и карбонилних група у хетероцикличном прстену обрнут.



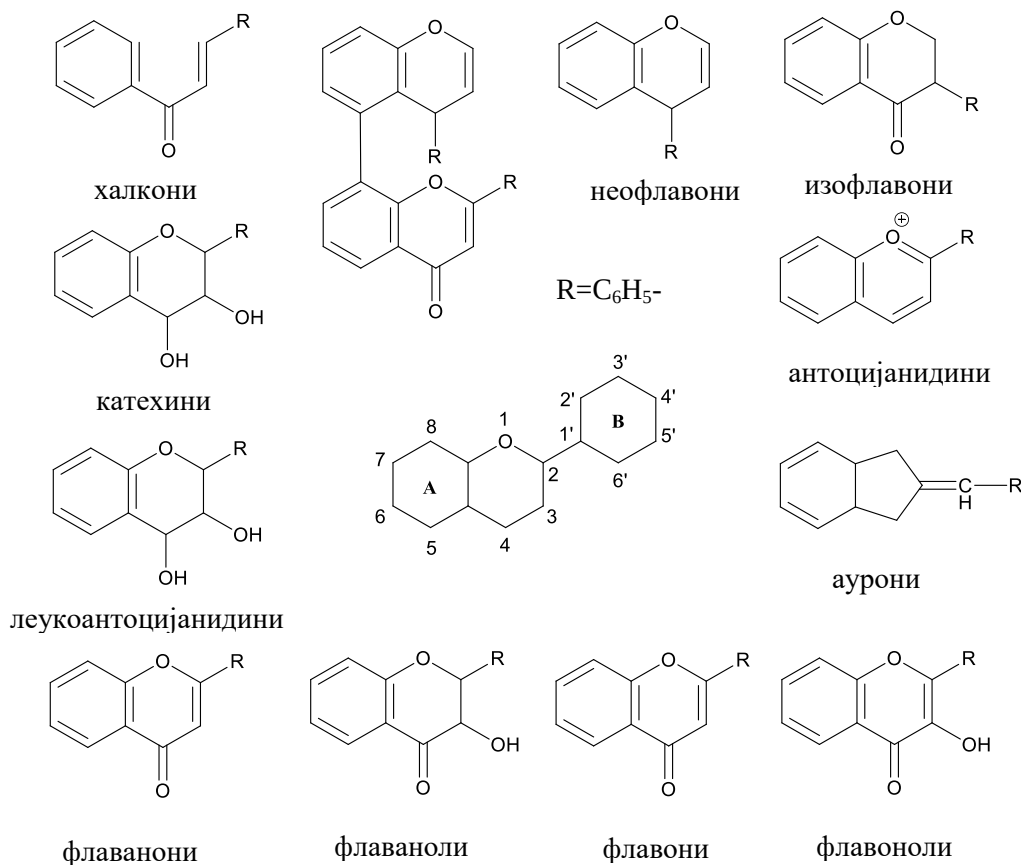
Слика 6. Кумарин умбелферон и изокумарин бергенин

2.1.2. Флавоноиди

Флавоноиди су полифенолна једињења, која се састоје од 15 угљеникових атома, при чему сви имају основни скелет $C_6-C_3-C_6$, који може имати велики број супституената.¹ Термин флавоноиди (*flavus* - жут) се углавном користи да опише велику групу природних производа која су највећим делом пигменти који дају жуту, црвену и плаву боју биљкама.¹⁹

Представљају најмногобројнију групу фенолних једињења биљака.²⁰ Могу се поделити у 6 главних поткласа, као што су флавоноли, флавони, флаваноли (флаван-3-оли), флаванони, антоцијанидини и изофлавоноли. Мање заступљене поткласе обухватају дихидрофлавоноле, флаван-3,4-диоле, халконе, дихидрохалконе и ауроне.²⁰ Неке од поткласа флавоноида приказане су на Слици 7. Флавоноиди су главне биоактивне компоненте које се могу наћи у воћу и поврћу.

Од фенола који се користе у исхрани, флавоноиди чине приближно две трећине¹⁸, и углавном су присутни као гликозиди, а делом као естри, чешће него као слободна једињења.^{1,21}

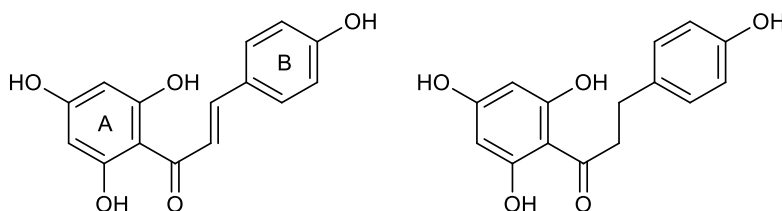


Слика 7. Поткласе флавоноида

Када су везани за један или више молекула шећера, називају се флавоноидни гликозиди, а када не садрже шећерну компоненту, називју се агликони.²² Степен гликолизације директно утиче на антиоксидативни капацитет флавоноида; углавном је агликонски облик активнији од гликозидног.^{23,24} Ове фитохемикалије су веома ефикасни „хватачи“ слободних радикала и значајни су антиоксиданси због свог високог редокс потенцијала и способности да хелатирају метале.²⁵⁻²⁷

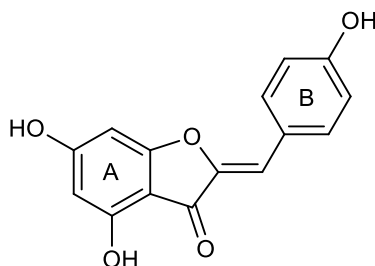
Халкони, дихидрохалкони и аурони

Халкони и дихидрохалкони (Слика 9) имају линеарни C_3 - ланац који повезује два ароматична прстена у својој структури. C_3 - ланац халкона садржи двоструку везу, а C_3 - ланац дихидрохалкона је засићен.¹



Слика 9. Халкон и дихидрохалкон

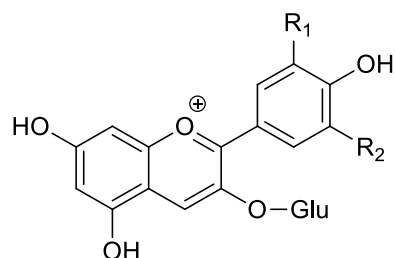
Аурони (Слика 10) су жути пигменти присутни у цвећу, који се добијају циклизацијом халкона, при чему *m*- хидроксилна група реагује са α - угљеником и даје петочлани хетероцикл.¹



Слика 10. Аурон

Антоцијанидини

Антоцијанидини обухватају велики број једињења која представљају једну од поткласа флавоноида. Највише их има у цвећу и плодовима воћа и поврћа, за чију су боју (црвену, љубичасту, плаву) заслужни. Пеларгонидин, цијанидин, делфинидин, пеонидин, петунидин и малвидин су најпознатији антоцијанидини, који се у природи углавном могу наћи у својим глукозидним формама, и када су у том облику, називају се антоцијанинима (Слика 8).¹

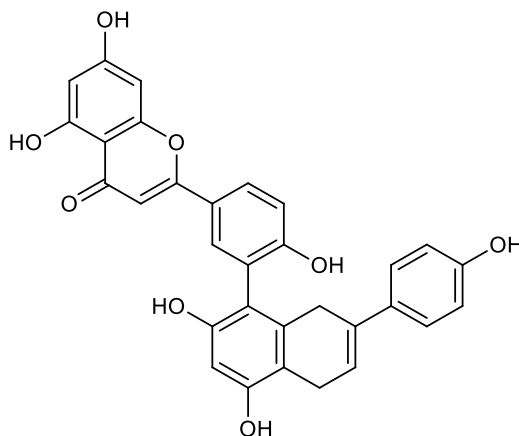


Антоцијанини	R ₁	R ₂
пеларгонидин-3-глюкозид	H	H
цијанидин-3-глюкозид	OH	H
делфинидин-3-глюкозид	OH	OH
пеонидин-3-глюкозид	OCH ₃	H
петунидин-3-глюкозид	OH	OCH ₃
малвидин-3-глюкозид	OCH ₃	OCH ₃

Слика 8. Најпознатији антоцијанини

Бифлавоноиди

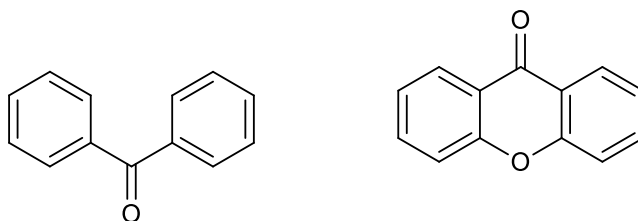
Бифлавоноиди имају у својој структури скелет од 30 угљеникових атома. Они су димери флавона, на пример апигенина, или његови метиловани деривати. Често се могу наћи у биљкама голосеменицама, као што је *Ginkgo biloba*. Постоје студије које показују да бифлавоноиди могу да инхибирају ослобађање хистамина из мастоцита и пролиферацију лимфоцита, што указује на њихов антиинфламаторни и антиалергијски потенцијал.¹ Један од најпознатијих представника је аментофлавон (Слика 11).¹



Слика 11. Бифлавоноид аментофлавон

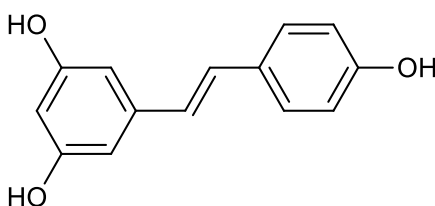
2.1.3. Бензофенони, ксантони и стилбени

Бензофенони и ксантони имају $C_6-C_1-C_6$ структуру. Ксантони дају цвећу жуту боју, а присуство стилбена је у вези са тамнијом бојом дрвећа. На *Слици 12* су приказане структуре бензофенона и ксантона.¹



Слика 12. Бензофенон и ксантон

Стилбени су група деривата фенилпропаноидних једињења које карактерише 1,2-дифенилетиленски скелет $C_6-C_2-C_6$.²⁸ Присутни су у малој количини у појединим намирницама биљног порекла које људи користе у исхрани. Најзначајнији представник је ресвератрол (*Слика 13*), углавном у гликозилованом облику, који има улогу у превенцији канцерогених обољења, срчаних, неуролошких и дегенеративних болести.²⁹⁻³²

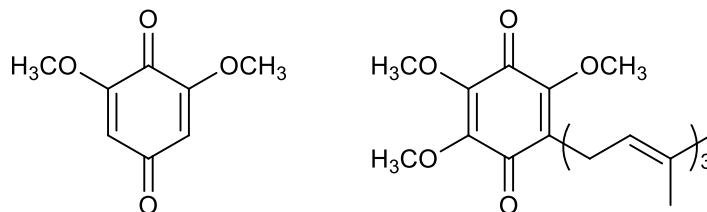


Слика 13. Стилбен ресвератрол

2.1.4. Хинони

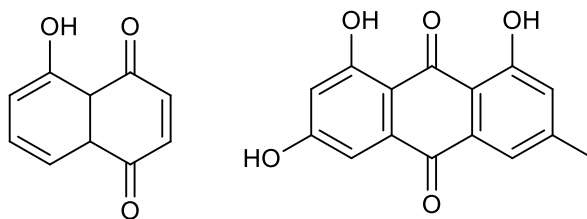
Бензохинони, као што је 2,6-диметоксибензохинон (*Слика 14*) су присутни у корену кукуруза и стимулишу паразитске биљке да формирају специјални део који служи да апсорбује нутритивне и воду из биљке домаћина.³³ Убихинони, као што

је убихион (3), где (3) представља број изопренских бочних ланаца, познат је као коензим Q и има улогу у транспорту електрона у митохондријама.¹



Слика 14. Бензохинон и убихион

Нафтахинони су ретки, изузев југлона, који је релативно чест и може се наћи у орасима. Антрахинон емодин се јавља као рамнозид у корену репе (Слика 15).¹

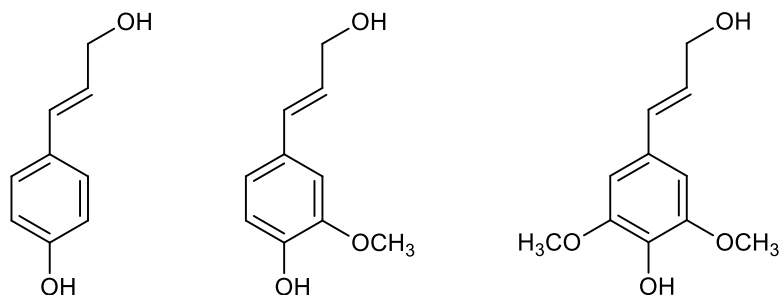


Слика 15. Бензохинон југлон и антрахинон емодин

2.1.5. Лигнани и лигнини

Лигнани су једињења која се углавном састоје од две фенилпропаноидне јединице повезане преко својих бочних ланаца са C₈ скелетом, и углавном су присутни као гликозиди.³⁴ Једна су од главних класа фитоестрогена. У гастроинтестиналном тракту, ови молекули се конвертују у једињења (ентеродиол и ентеролактон) која имају и естрогенска и антиестрогенска својства.³⁵ Највећа количина ових једињења је пронађена у ланеном семену.¹

Лигнани су димери или олигомери који настају оксидативним купловањем фенилпропанских јединица (C_6-C_3), које се међусобно везују $C-C$ и $C-O$ везама. Основне јединице лигнана су *p*-кумарил, кониферил и синапил алкохол (Слика 16).¹

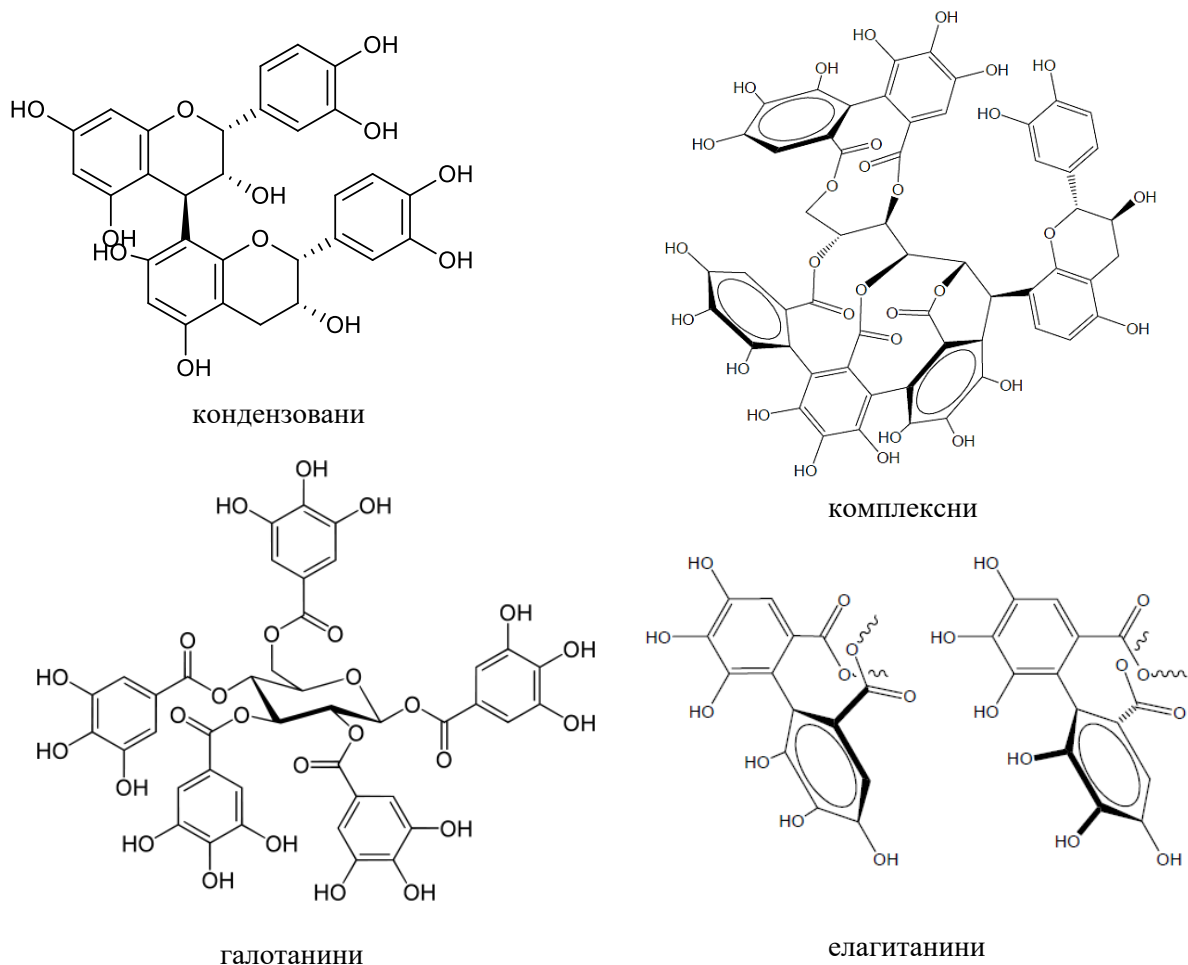


Слика 16. *p*-кумарил, кониферил и синапил алкохол

Лигнини су фенолни полимери и после целулозе представљају други најраспрострањенији биополимер на Земљи. Обично су везани за полисахариде и са целулозом граде ћелијске зидове биљних ћелија. Лигнини се синтетишу из истих прекурсора као и лигнани.¹

2.1.6. Танини

Танини представљају групу полихидрокси-флаван-3-ол олигомера и полимера са $C-C$ везом између флавонолних јединица.³⁶ Танини су у воћу и поврћу углавном присутни као полимери. То су опоре и горке супстанце различите молекулске масе, и неке од њих су растворне у води. Присутни су у појединим врстама вина и зеленом чају и имају способност да талоче протеине. У прошлости су се користили за штављење коже. Са солима олова граде нерастворан талог. Могу се поделити на кондензоване, комплексне и хидролизабилне танине (Слика 17). Хидролизабилни танини се деле на галотанине и елагитанине. Кондензовани танини (проантоцијанидини) су главна фенолна једињења нађена у грозђу.²⁶



Слика 17. Подела танина

2.2. Значај и примена фенолних једињења

Фенолна једињења представљају распрострањену групу једињења биљног порекла, која имају широк опсег структура и функција.¹⁰ Сматрају се најважнијом и бројном групом секундарних метаболита биљака, која је свеприсутна у биљном царству.

Фенолна једињења се синтетишу током нормалног развоја биљке, али и као одговор на различите еколошке услове, као што су, између осталог, стрес (неповољни животни услови) и UV зрачење.¹¹ Синтеза фенолних једињења у биљкама се одиграва биосинтетичким путем шикимске киселине и повезана је са метаболизмом угљених хидрата.^{3,4}

Обухватају пигменте и ароме, који могу да привлаче или одбијају, као и једињења која могу да заштите биљке од инсеката, гљива, бактерија и вируса. Танини и лигнини се комерцијално користе као боје и адстрингенси (једињења која стежу ткиво, таложу беланчевине, сужавају крвне судове, одузимају воду ткиву и отупљују осећај), а лигнини су одговорни за структурну чврстину ћелија и ткива и веома су битни за васкуларни развој.¹

Најзначајнија и највише проучавана улога фенолних једињења биљног порекла је њихова антиоксидативна активност. Антиоксиданси присутни у воћу и поврћу, као што су фенолне киселине, флавоноиди, антоцијанини и танини, између осталих, често су повезани са позитивним ефектима на здравље човека.^{2,37} Фенолна једињења као антиоксиданси имају способност да донирају атом водоника или електрон слободном радикалу и претворе га у мање реактивни молекул.³⁸ Због изразитог антиоксидативног капацитета, фенолна једињења имају способност да неутралишу слободне радикале (пре свега реактивне кисеоничне и азотне врсте)³⁹, хелатирају металне јоне⁴⁰, активирају антиоксидативне ензиме⁴¹ и инхибирају пероксидацијске ензиме⁴². Уношењем хране која је богата фенолним једињењима може да се избегне оксидативни стрес.⁴³

2.3. Плодови биљака фамилије Rosaceae као извори фенолних једињења

Фамилија ружа (Rosaceae) је бројна и географски широко распорострањена биљна фамилија. Према традиционалној подели према типу плода, фамилија Rosaceae је подељена на четири подфамилије: Spiroideae, Rosidaeae, Maloideae (Pomoideae) и Prunoideae (Amygdaloideae). Обухвата преко 100 родова које броје близу 3000 биљних врста.^{44,45} Родови који обухватају највећи број биљних врста су *Alchemilla*; *Sorbus*, *Crataegus* и *Cotoneaster*; *Rubus* и *Prunus* и сви броје између 200 и 300 врста.⁴⁶ Ова разноврсна фамилија обухвата дрвеће, жбунове, шибље и зељасте вишегодишње биљке, док су једногодишње ређе.⁴⁵

Многе биљне врсте ове фамилије се култивишу широм света, а њихови плодови, попут бадема, јабука, шљива, брескви, крушака, малина, трешања, вишања и јагода, саставни су део људске исхране. Друге нејестиве врсте су познате

као украсне биљке, попут ружа, глога и украсног жбуња. Дрвеће из фамилије Rosaceae обухвата, између осталих, родове *Malus*, *Pyrus* и *Prunus*, који се узгајају претежно због својих јестивих плодова. Највише узгајане врсте родова *Malus* и *Pyrus* су култивисане јабуке (*Malus x domestica*) и многобројне врсте култивисаних азијских и европских крушака.⁴⁷

Економски значај биљака из фамилије Rosaceae се огледа у њиховим укусним плодовима, који су значајни за људску исхрану и здравље. Плодови Rosaceae биљака се конзумирају у различитим формама, укључујући свеже и сушене плодове, сокове и обрађене производе (конзервирани плодови, џемови, компоти итд.). Ови плодови такође представљају главни извор биоактивних хемијских једињења у људској исхрани, попут флавоноида и других фенолних једињења, која су позната по позитивном ефекту на здравље човека. Аскорбинска киселина, кверцетин, кампферол, мирицетин, *p*-кумаринска, гална и елагинска киселина, једињења која су идентификована у овим плодовима, добро су познати антиоксиданси и/или имају способност инхибиције пролиферације канцерогених ћелија.⁴⁷

Епидемиолошки подаци указују да исхрана богата воћем и поврћем значајно редукује ризик настанка канцера. *In vivo* студије на животињама показују да екстракти воћа и листова многих биљака из фамилије Rosaceae могу да зауставе раст појединих врста канцера или имају изражен антиоксидативни потенцијал. Елагинска киселина, присутна у јагодама, црвеним малинама, купинама и другом бобичастом воћу из фамилије Rosaceae, може да редукује ћелијску пролиферацију и апоптозу, па има антиканцерогену улогу. За многа структурно различита фенолна једињења, изолована из плодова поменутих врста, такође је доказано да су потенцијални антиоксиданси и антиканцерогени агенси.⁴⁷

2.3.1. *Malus sylvestris* (L.) Mill. (дивља јабука)

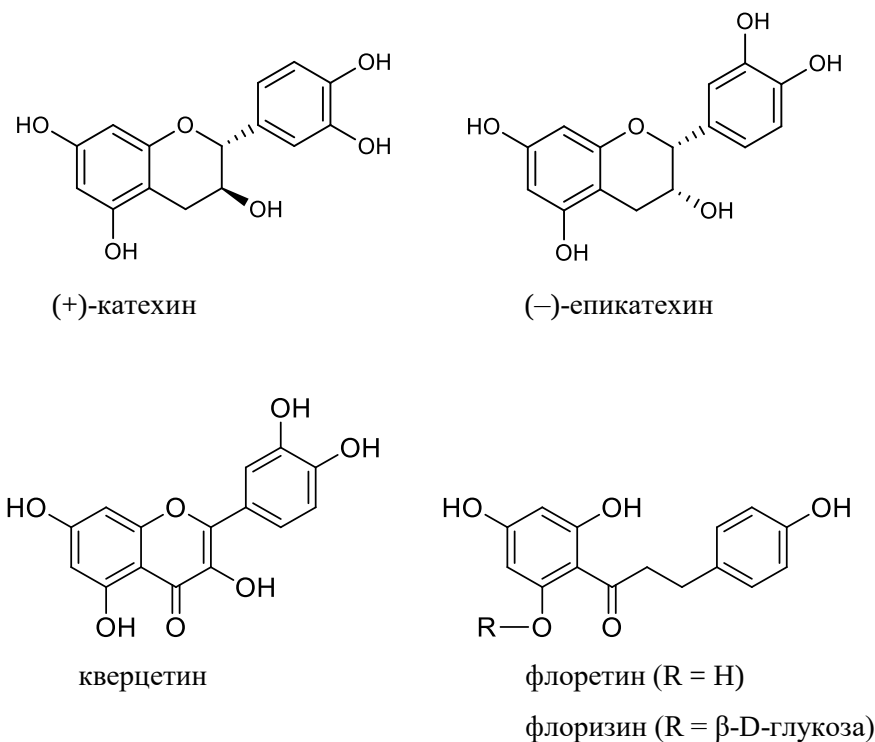
Дивља јабука (*M. sylvestris*) припада роду *Malus*, фамилији Rosaceae (подфамилија Maloideae). Род *Malus* обухвата листопадно дрвеће средње или мале висине или жбуње.^{45,48} Цветови су двополни, медоносни, крунични листићи бели,

ружичасти или црвени. Плод је округласта јабука са 5 окаца, свако са по 2 (ретко 3) семена. Род обухвата 30-55 биљних врста које се могу наћи широм Европе и умереним деловима Северне Америке и Азије.

Дивља јабука је углавном ниско дрво са неправилном, широком, купастом и светлом крошњом. Чешће се јавља као жбун него као дрво, висине до 10 m, са пречником стабла 23-45 cm.⁴⁸ Због велике потребе за светлошћу, углавном се може наћи на влажним ободима шума, ободима пољопривредних површина или на екстремним, маргиналним местима, некад и до 1000 m надморске висине.⁴⁵ Расте у већини земаља Европе, као и у Северној Африци и Азији. У Србији се може наћи углавном распрострањена у виду појединачних стабала у шумама храстовог појаса.⁴⁵

Дивља јабука цвета на пролеће, у периоду април-мај, а плодови сазревају у периоду август-септембар. Плодови дивље јабуке су јајасто-округласти или округласти, голи, пречника 2-3 cm, зеленожути до слабо-црвенкасти и кисели.⁴⁵ Могу бити конзумирани као свеже воће, а честа је и њихова употреба у производњи сирћета, због бројних здравствених предности које има.⁴⁵ Поред тога, у српској традиционалној медицини, сирће од плодова дивље јабуке користи се за јачање имунолошког система за одбрану од прехладе, дигестивних и хипертензивних обољења.⁴⁹ У европској традиционалној медицини, дивље јабуке су коришћене за лечење интестиналних поремећаја код новорођенчади (дијареја, диспепсија и дизентерија), и лечење констипације код одраслих особа.⁵⁰

Најзаступљенија фенолна једињења идентификована у плоду дивље јабуке су кверцетин и његови деривати, катехин и епикатехин (*Слика 18*), који су одговорни за њихов опор укус. Хлорогенска киселина (*Слика 4*) и *p*-кумаринска киселина (*Слика 3*) су такође готово увек присутне у овим плодовима.⁵¹ Флоретин и његов глукозид флоризин су два дихидрохалкона присутна у високим концентрацијама у кори плода јабуке.^{52,53} Фенолни састав плодова јабуке се може разликовати у зависности од сорте јабуке, као и дела плода јабуке (кора или пулпа).⁵⁴



Слика 18. Најзаступљеније фенолне киселине и флавоноиди плода дивље јабуке

2.3.2. *Rubus idaeus* L. (дивља малина)

Дивља малина (*Rubus idaeus* L.) припада роду *Rubus*, фамилије Rosaceae (подфамилија Rosideae). Род *Rubus* је многобројан и разнолик, са преко 700 биљних врста.⁴⁵ Стабло дивље малине је високо 100-150 cm, усправно, ваљкасто, пепељасто, често снабдевано трњем. Лишће је обично перасто сложено, одозго глатко, одоздо бело, длакаво. Цветови су двополни, већином оборени наниже, док је плод збирна црвена или наранџаста једносемена коштуница.⁴⁵

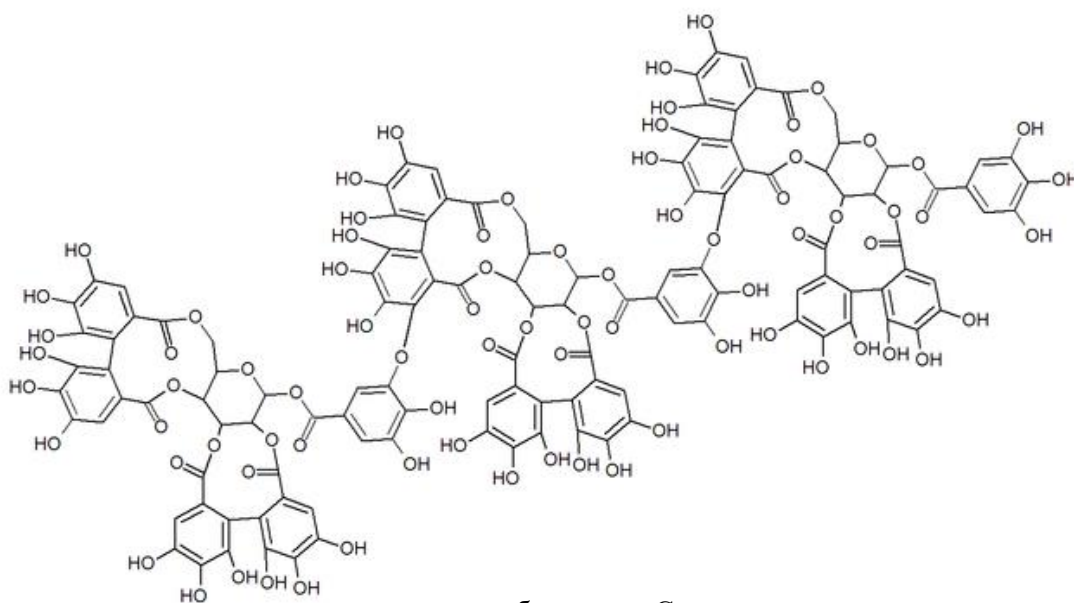
Природно станиште дивље малине су шуме, утрине и пропланици. Среће се широм Европе и у умереним областима Азије и Северне Африке. Што се тиче њене распрострањености по Србији, расте на Копаонику, Голији, Јастрепцу, Старој планини, Златибору и многим другим планинама и брдима, претежно на пропланицима.⁴⁵

Традиционална употреба малине континуирано је документована у приручницима, фармакопејама и научној литератури. Екстракти листа и плода

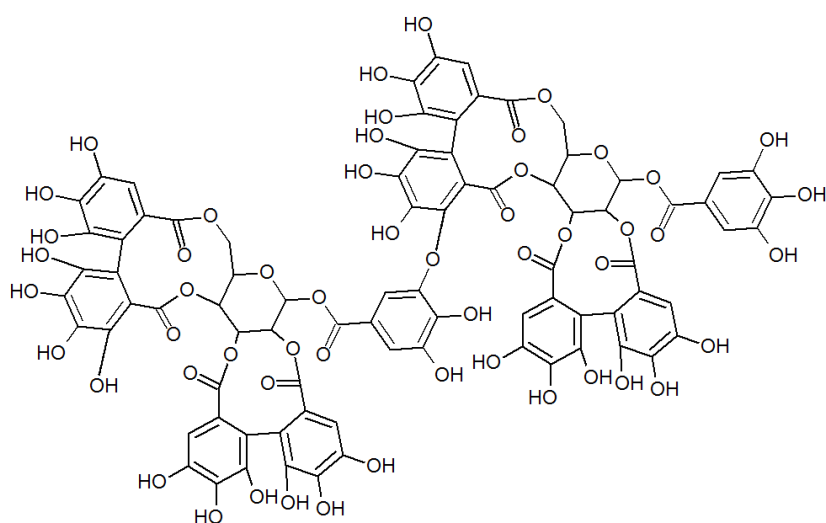
дивље малине користе се у многим земљама за третирање различитих болести, као што су дијабетес, многи типови инфекција, грчеви и опекотине. Такође, у народној медицини, лист дивље малине коришћен је као антиспазмолитик.⁵⁵ Традиционална медицинска употреба листа и плода малине обухвата лечење различитих поремећаја најчешће повезаних са проблематичним циклусима код жена и обољењима гастроинтестиналног тракта.⁵⁶

Многобројна истраживања хемијског састава плода малине показала су да фенолна једињења представљају значајне конституенте овог плода. Прва испитивања фенолног састава плода малине откривају присуство елагинске киселине (*Слика 19*) у високој концентрацији. Малине су такође богате и у садржају минерала, витамина, масних киселина, влакана, као и различитих група фенолних једињења (флавоноида, фенолних киселина, лигнана и танина). Најзаступљенија група танина у плоду малине су елагитанини, ламбертианин С и сангуин Н-6, док су гликозиди једињења из групе антоцијанидина, цијанидин, делфинидин, пеларгонидин, малвидин, петунидин и пеонидин (*Слика 8*), идентификовани код највећег броја испитиваних узорка малине.

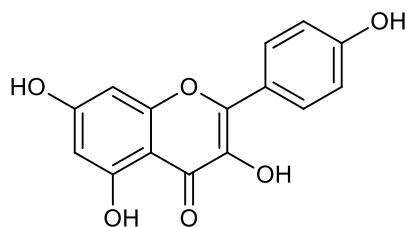
Испитивања хемијског састава плода малине показала су да је антоцијанин цијанидин-3-глукозид увек присутан у овом плоду. Поред антоцијанина, малине садрже и друге флавоноиде. Основни флавоноли у плоду малине су кверцетин (*Слика 18*) и кампферол (*Слика 19*), док је најприсутнији флаван-3-ол катехин (*Слика 18*). У плоду малине идентификоване су и мање количине *p*-хидроксибензоеве киселине (*Слика 2*) и деривата хидроксициметне киселине, укључујући *p*-кумаринску (*Слика 3*), кафеинску (*Слика 3*), ферулну (*Слика 3*), синапинску (*Слика 3*) и ванилинску киселину (*Слика 2*).⁵⁷



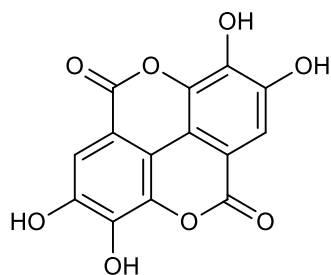
ламбертианин С



сангуин Н-6



кампферол



елагинска киселина

Слика 19. Неки од елагитанина, фенолних киселина и флавонола присутних у плоду малине

2.3.3. *Prunus avium* L. (дивља трешња)

Дивља трешња (*Prunus avium* L.) припада роду *Prunus*, фамилије Rosaceae (подфамилија Prunoideae (Amygdaloideae)). Род *Prunus* обухвата листопадно (ретко зимзелено), дивље (или често гајено као воће) дрвеће и жбуње.⁴⁵ Биљне врсте овог рода су распрострањене широм Европе и у умереним климатским зонама Азије и Северне Африке.

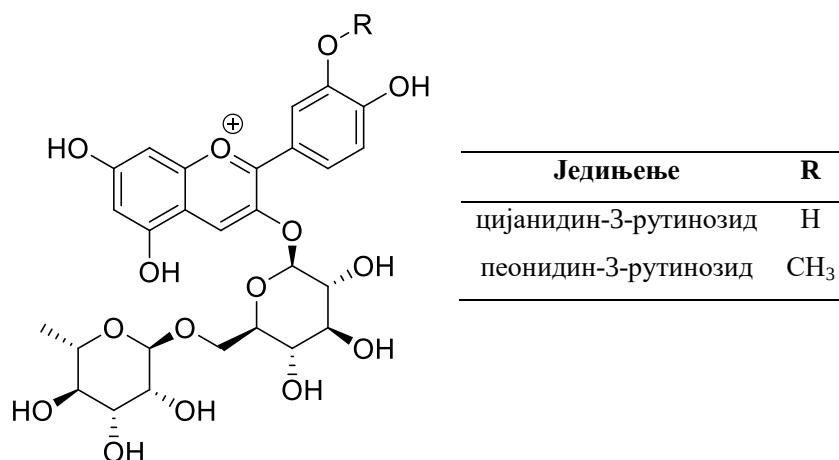
Дивља трешња (*P. avium*) је дрво висине 15-20 m (некад и 30 m) са широко купастом крошњом и добро израженим стаблом и доста ретким хоризонталним гранама.⁴⁵ Цветови се јављају када је лишће већ делом развијено и цветиште је звонасто. Округласт плод је пречника 7-18 mm, меснат, црвен или црн и сазрева у периоду јун-јул.

Расте на дубоком, растреситом и плодном земљишту, које је довољно топло. Обично се као самоникла биљка јавља местимично у шумама храстовог и доњег буквиног појаса. Распрострањена је у већем делу Европе, изузев северних, источних и медитеранских предела, западном делу Азије и северном делу Африке. У Србији је распрострањена у готово свим шумским пределима.⁴⁵

Плод трешње се у домаћинству користи за припремање слатког, компота, сокова и сирупа. Плод дивље трешње је делимично горког укуса, па се због тога мање употребљава у исхрани од култивисане. Семенка језгра трешње је горка и отровна, као и других плодова биљака из фамилије Rosaceae. Горчина потиче од гликозида амигдалина, који се под дејством ензима разлаже на цијановодоничну киселину. У традиционалној медицини највише је употребљаван чај од петељака трешње, за који се веровало да смањује упале, повећава и убрзава лечење мокраће, за лечење болести јетре, бубрега и стомачних проблема.⁴⁵

Испитивање хемијског састава плода дивље трешње показало је да су различите фенолне киселине, флавоноиди и њихови гликозиди, као и антоцијанини присутни у овом воћу. Доминантне фенолне киселине, као и њихови гликозиди, у плоду дивље трешње су *p*-кумаринска, кафеинска, ферулна и синапинска киселина (Слика 3). Од флавоноида, у плоду трешње најзаступљенији су деривати кверцетина (Слика 18) и кампферола (Слика 19), док су од антоцијанина

идентификовани цијанидин-3-глюкозид (Слика 8), цијанидин-3-рутинозид и пеонидин-3-рутинозид (Слика 20).⁵⁸



Слика 20. Неки од антоцијанина плода дивље трешње

2.4. Екстракција фенолних једињења

Поступак екстракције је први и веома важан корак у изоловању, пречишћавању и анализи биоактивних компоненти из биљног материјала. Постоји велики број метода за екстраховање фенолних једињења из биљног материјала, а генерално се могу поделити на традиционалне и модерне технике. Традиционалне методе укључују мацерацију, мацерацију са мешањем и екстракцију по Сокслету. Ове методе одузимају доста времена, често је принос екстракције добијен њиховом применом низак, а нису ни погодне са становишта очувања животне средине, због великих запремина органских растварача који се користе. У данашње време се све више користе новије (модерне) технике за екстракцију биоактивних једињења, као што су ултразвучна, микроталасна, суб- и суперкритична екстракција, микроекстракција на чврстој фази и убрзана екстракција растварачима.⁵⁹ Свака од ових метода има своје предности и мане, али је свакако главни циљ изабране методе постизање максималног приноса екстракције једињења од интереса и избегавање њихове хемијске модификације. На ефикасност свих набројаних метода утиче више фактора, а најзначајнији међу њима су концентрација растварача, однос запремине растварача и масе узорка, време и температура екстракције, као и pH.⁶⁰

2.4.1. Ултразвучна екстракција

Екстракција помоћу ултразвука се сматра једном од најефикаснијих метода за екстракцију фенолних једињења из биљног материјала због своје брзине, једноставности, малих запремина растварача, а није ни скупа.⁶¹

Ултразвук представља високофреквентни звук ($> 20 \text{ kHz}$), и у индустрији прераде хране се могу користити два нивоа ултразвука; један може бити ниског интензитета ($< 1 \text{ W/cm}^2$), а други високог интензитета ($10\text{-}1000 \text{ W/cm}^2$). Ултразвучна техника екстракције се заснива на проласку ултразвучне енергије у форми таласа кроз течни растварач који је помешан са чврстим узорком. Када ови таласи погоде површину материјала, ствара се сила која може бити нормална при чему настаје компресивни талас, или паралелна са површином, када настаје експазиони талас.⁶²

Константно формирање високофреквентних ултразвучних таласа изазива кавитациони ефекат, што нарушава ћелијске зидове чврстог узорка, доводи до бржег кретања молекула и већег продирања растварача у чврсти материјал, чиме се повећава ефикасност екстракције. Сматра се да мехурићи растварача нарасту за време експанзионе фазе звучних таласа и уруше се за време фазе компресије. Када се уруше, звучна енергија се претвара у механичку у форми ударних таласа еквивалентних притиску од неколико хиљада атмосфера (до 100 MPa).⁶²

Овај феномен доводи до убрзаног ослобађања жељених једињења и повећања брзине екстракције,⁶³ па је техника ултразвучне екстракције широко примењива за екстракцију фенолних једињења из различитих биљних матрикса као што су малина⁶⁴, кора наранџе⁶⁵, шећерна репа⁶⁶, купина⁶⁷, лук⁶⁸, грожђе⁹ итд. На ефикасност ултразвучне екстракције може утицати неколико променљивих, као што су састав и концентрација растварача, температура, амплитуда ултразвука, рН и однос чврсте и течне фазе.⁹

2.4.2. Микроталасна екстракција

Микроталасна екстракција је, уз ултразвучну, једна од најефикаснијих метода за екстракцију фенолних једињења због посебне интеракције између микроталаса и материје, као и веома кратког времена екстракције.⁶⁹

Микроталаси су облик нејонизационе електромагнетне енергије, која се може апсорбовати, одбити или пренети на материјал у облику таласа на фреквенцији од 300 MHz до 300 GHz. Микроталасна снага која се преноси кроз масу може се апсорбовати или претворити у топлоту, па на основу тога постоје два предложена механизма микроталасног загревања: ротација дипола и јонска поларизација.

Механизам диполне ротације заснива се на чињеници да многи молекули постоје као електрични диполи, што значи да молекули имају негативно и позитивно наелектрисани крај. Када су постављени у електромагнетно поље, диполи теже да се орјентишу између себе у складу са поларношћу поља, која се мења око $4,9 \times 10^9$ пута у секунди. Константна ротација молекула изазива фракционо загревање.⁷⁰

Јонска поларизација се јавља када се јонска једињења као што су соли убрзано крећу као одговор наизменичном електричном пољу. Генерисана кинетичка енергија настала кретањем јона претвара се у топлотну енергију.

Постоје два типа микроталасне екстракције, а то су екстракција у затвореним посудама при контролисаном притиску и температури, и у микроталасним пећницама при атмосферском притиску. Систем микроталасне екстракције у затвореним посудама користи се за екстракцију при условима ниске или високе температуре екстракције.

Интересовање за примену микроталасне екстракције повећало се последњих година због смањења времена екстракције и количине растварача у односу на ковенционалне екстракционе технике.

Избор и количина примењеног растварача су два кључна фактора који се са посебном пажњом морају узети у обзир када се користи микроталасна екстракција.⁷¹ Растварачи који се најчешће користе за микроталасну екстракцију биљног материјала су метанол, етанол, ацетон, хексан, вода или смеша неких од

ових растварача. Висока температура која се достиже микроталасним загревањем повећава моћ растварања већине растварача смањењем његовог површинског напона и вискозитета, што побољшава квашење узорка и продирање у матрикс.^{11,72}

Дакле, систем за микроталасну екстракцију брзо ствара топлоту, што омогућава брже продирање растварача у биљни материјал, па ова особина резултује кратким временом екстракције и добрим квалитетом екстраката, са вишим приносима екстракције.⁷⁰ Ефикасност процеса микроталасне екстракције зависи од времена екстракције, температуре, односа чврсте и течне фазе, као и од типа и састава употребљеног растварача.⁷¹ Одабир растварача који ће се користити за екстракцију је јако битан за комплексне матриксе хране, јер практично одређује количину и врсту фенолних једињења која ће бити екстрахована.⁷²

2.4.3. Оптимизација екстракционих услова

На ефикасност екстракције утиче више фактора,⁹ па их је потребно оптимизовати у циљу проналазка њихове најбоље комбинације, тј. да би се добио максимални принос екстракције.

У принципу, процес оптимизације се може постићи било емпиријским, било статистичким методама.^{73,74} Емпиријска метода користи једнофакторски приступ, у којем један фактор варира, док су сви остали константни.⁷⁴ Главни недостатак ове методе је немогућност да се одреди интеракција између испитиваних променљивих, скупа је и мање ефикасна.⁷⁵ Да би се превазишли недостаци и ограничења ових класичних метода, развијена је методологија одзива површине (енг. Response Surface Methodology), првобитно описана од стране Бокса и Вилсона (Box-а и Wilson).⁷⁶

За разлику од класичних метода оптимизације, методологија одзива површине узима у обзир могуће интеракције између испитиваних променљивих, уз минимизирање броја експеримената, па представља моћну методу која може да пружи комплетне оптималне услове за процес екстракције.⁷⁷

2.5. Анализа фенолних једињења

Методе које се користе за анализу фенолних једињења у различитим узорцима, пре свега биљног порекла, годинама се све више усавршавају. Најједноставнија метода која је широко примењива за одређивање садржаја фенолних једињења је *UV-Vis* спектрофотометријска анализа.^{78,79} Међутим, за прецизније утврђивање присуства појединачних фенолних компонената и њиховог тачног садржаја, у данашње време је највише у употреби течна хроматографија високих перформанси (*енг.* High Performance Liquid Chromatography, *HPLC*) и њена комбинација са масеном спектрометријом.⁸⁰ На *HPLC* анализу фенолних једињења утиче неколико фактора, као што су чистоћа самог узорка, састав мобилне фазе, врста колоне која се користи за раздвајање и тип детектора.⁸¹ Као мобилна фаза се најчешће употребљавају ацетонитрил и метанол, као и њихови водени раствори, често закишељени поларним органским растварачима (сирћетна, мравља, фосфорна киселина), при чему се у највећем броју случајева (у зависности од сложености матрикса) примењује градијентни начин елуирања.³⁴ За раздвајање фенолних једињења се најчешће користи реверзно-фазна колона (*C18*) и фотодиодни (*PDA*) или масени (*MS*) детектор, а честу употребу има и флуоресцентни детектор.³⁴

Неки новији трендови који се баве анализом фенолних једињења обухватају укључивање нуклеарне магнетне резонанције (*NMR*) у *HPLC* анализу (*HPLC-NMR*). Такође, све више се примењују течна хроматографија ултра високих перформанси (*UHPLC*), као и течна хроматографија хидрофилних интеракција (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC*), при чему се њена прецизност још више повећава у комбинацији са масеном спектрометријом, па се фенолна једињења могу одредити у јако сложеним матриксама.⁸²

2.6. Фенолна једињења као антиоксиданси

Фенолна једињења су позната по широком спектру биолошких активности, али када се говори о здравственим предностима ових једињења, обично се антиоксидативна активност истиче као најзначајнија од њих. Поред тога што могу

директно да реагују са слободно-радикалским врстама у организму и на тај начин инхибирају њихову активност, постоји још неколико индиректних механизма њиховог деловања. Полифеноли могу да инхибирају ензиме који су одговорни за синтезу супероксид-анјона, као што су ксантин-оксидаза и протеин-киназа Ц. Такође, ова једињења спречавају оксидативни стрес тако што инхибирају циклооксигеназе, липоксигеназе, митохондралне монооксидазе, глутатион-S-трансферазе, митохондријалне сукцинат-оксидазе и NADH-оксидазе.⁸³⁻⁸⁵

2.6.1. Слободни радикали и оксидативни стрес

Слободни радикали су атоми, јони или молекули, који имају један или више слободних (неспарених) електрона у последњој орбитали, услед чега су нестабилни и врло неселективно реактивни.⁸⁶ Присуство слободних радикала у биолошком материјалу откривено је касних 1950-их.⁸⁷ Нешто касније је Денхам Харман (*Denham Harman*) поставио хипотезу да кисеонични радикали вероватно настају као споредни производи у ензимски контролисаним реакцијама и описао их је као Пандорину кутију зла, одговорну за ћелијска оштећења, мутагенезу, канцер, дегенеративне процесе итд.⁸⁸

Порекло реактивних врста кисеоника у организму може бити ендогено (у току физиолошких процеса, нпр. ћелијског дисања) и егзогено (када је њихова продукција изазвана уносом других материја у организам). Слободни радикали ендогено могу настати као резултат нормалног метаболизма у митохондријама. Под одређеним околностима, као што су стрес, рањавање и патогени напад на организам, концентрација слободних радикала расте изнад нормалног нивоа (егзогено порекло).⁸⁶

Када се не контролишу, слободни радикали могу да нанесу огромну штету живим организмима. Ово се дешава делимично због њихове велике реактивности, нарочито према ДНК и липидима и протеинима мембрана ћелије, а делом због ланчаних реакција које могу иницирати. Ланчане реакције се јављају када радикал реагује са другим молекулом, издваја електрон и ствара нови радикал који може да реагује са другим молекулима.⁸⁶

Када се, услед прекомерног стварања и/или неадекватног уклањања слободних радикала, односно реактивних врста, наруши редокс хомеостаза ћелије, развија се стање које се назива *оксидативни стрес*. Који ће тип оштећења биомолекула превагнути (оксидативни или нитрозативни) зависи од реактивне врсте која посредује настанку овог стања.⁸⁹

2.6.1.1. Реактивне кисеоничне врсте (ROS)

Један од највећих парадокса је да молекула кисеоника, који је неопходан за живот, добијање енергије и респирацију, може бити узрок многих болести и дегенеративних процеса.⁹⁰ Реактивне кисеоничне врсте (*енг.* Reactive Oxygen Species, ROS) су молекули који садрже атом кисеоника и високо су реактивни, као резултат присуства слободног радикала, или конфигурације атома кисеоника, при чему је присутно више електрона него обично. Реактивне кисеоничне врсте, тј. слободни радикали и нерадикалски облици кисеоника, одговорни за настанак оксидативног стреса приказани су у Табели 2.⁹¹

Табела 2. Најважнији слободни радикали и нерадикалске врсте кисеоника⁹¹

Слободни радикали	Нерадикалски облици
<i>Реактивне кисеоничне врсте (ROS)</i>	
Супероксил анјон радикал, $O_2^{\bullet -}$	Водоник-пероксид, H_2O_2
Хидроксил радикал, $\bullet OH$	Хипобромна киселина, $HOBr$
Хидропероксил радикал, $HO\bullet O$	Хипохлорна киселина, $HOCl$
Пероксил радикал, $ROO\bullet$	Озон, O_3
Алкоксил радикал, $RO\bullet$	Синглетни кисеоник, 1O_2
Угљендиоксидни радикал, $CO_2^{\bullet}$	Органски пероксиди, $ROOH$
Угљенмоноксидни радикал, $CO\bullet$	

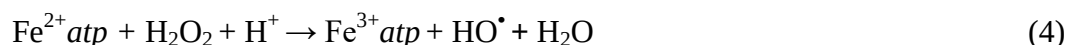
Хидроксил радикал је изузетно агресиван оксиданс (најпотентнији ROS), који може великом брзином да оксидује већину биомолекула. Има јако кратко време полуживота (10^{-9} s), што значи да је изузетно неселективно реактиван.⁸⁹

In vitro и *in vivo* се ствара у респираторном ћелијском ланцу:

а) троелектронском редукцијом:



б) Фентоновом (*Fenton*) реакцијом:



$$\Delta_{\text{rxn}} G^\circ = -21 \text{ kJ/mol}$$

Реакције (1-4) су термодинамички могуће и дешавају се у организму.⁸¹

в) Хабер-Вајсовом (*Haber-Weiss*) реакцијом:



Хабер-Вајсова реакција је практично термодинамички немогућа (реакције чија је позитивна Гибсова (*Gibbs*) енергија већа од 40 kJ се практично не одвијају) и не дешава се у организму, осим у случају да се продукти реакције брзо троше у неким другим реакцијама.⁸⁹

Хидроксил радикал је најмоћнији оксиданс који настаје у биолошким системима и може оксидовати сваки биомолекул. Тако, оксидацијом полинезасићених масних киселина започиње процес липидне пероксидације.⁹¹

Супероксил анјон радикал настаје једноелектронском редукцијом молекуларног кисеоника:



Хемијске особине супероксил анјон радикала у великој мери зависе од медијума у ком се налази. Слаба је база, у воденој средини је у хидратисаном облику, док у неполярној средини испољава нуклеофилни карактер. Може се понашати као електрон-донор. Не спада у агресивне слободне радикале, јер не

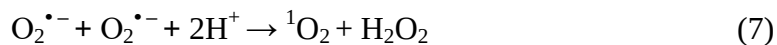
може апстраховати водоник и отпочети ланчану реакцију радикаског типа. При физиолошким условима спонтано прелази у H_2O_2 . Његова прооксидативна активност се углавном односи на деловање његове коњуговане киселине, $\text{HOO}^\bullet$, која иницијално покреће процес оштећења липида и започиње процес липидне пероксидације.⁸⁹

Метаболички пут овог радикала у великој мери зависи од рН средине и може кренути у смеру редукције или оксидације, што значи да се може понашати и као оксиданс и као антиоксиданс.⁸⁹

Водоник-пероксид, H_2O_2 , настаје аутооксидацијом супероксил анјон радикала. Ова реакција може тећи ензимским (у присуству ензима супероксид дисмутазе, SOD) и неензимским путем, при чему је први 4 пута бржи.^{92,93}

Водоник-пероксид спада у стабилне реактивне врсте кисеоника нерадикаског типа, јер нема неспарене електроне у последњој орбитали.⁹³ Хомолитичким кидањем H_2O_2 које је катализовано металима са променљивом валенцом (Фентонова реакција) ствара се $^\bullet\text{OH}$, који се сматра најреактивнијим оксидансом у биолошком систему. Лако дифундује у околни простор, па може досећи далеко од места свог генерисања.⁸⁹

Синглетни кисеоник. Реактивне кисеоничне врсте се могу генерисати не само преношењем електрона, већ и довођењем енергије, како и настаје синглетни кисеоник и он представља побуђено (ексцитовано) стање кисеоника. Он нема неспарене електроне, па по дефиницији није радикал, али има виши оксидациони потенцијал од основног стања кисеоника. Синглетни кисеоник, $^1\text{O}_2$, може настати у реакцији два супероксил анјон-радикала:



Синглетни кисеоник може настати у кожи изложеној зрачењу (јонизујуће, UV, видљиво и IR), а њихова продукција је повећана у присуству фотоосетљивих супстанци.⁸⁹

2.6.1.2. Реактивне врсте азота (RNS)

Као и реактивне кисеоничне врсте, тако и реактивне азотне врсте (енг. Reactive Nitrogen Species, RNS) могу постојати као слободни радикали, али и у нерадикалским формама. Азот моноксидни ($\text{NO}^\bullet$) и азот диоксидни ($\text{NO}_2^\bullet$) радикали имају неспарене електроне у последњој орбитали, па се могу сврстати у слободне радикале, за разлику од других облика реактивних азотних врста. Најважнији представници RNS су приказани у Табели 3.

Табела 3. Најважнији слободни радикали и нерадикалске врсте азота ⁹¹

Слободни радикали	Нерадикалски облици
<i>Реактивне азотне врсте (RNS)</i>	
Азотмонооксидни радикал, $\text{NO}^\bullet$	Азотдиоксидни ањон, NO_2^-
Азотдиоксидни радикал, $\text{NO}_2^\bullet$	Азотдиоксидни катјон, NO_2^+
	Пероксинитрит, ONOO^-
	Пероксинитритна киселина, ONOOH
	Алкил пероксинитрит, ROONO
	Нитрил хлорид, NOOCl

Азот моноксид у организму настаје из аминокиселине L-аргинина под дејством ензима NO синтетазе и игра важну улогу у ћелијској сигнализацији, па је веома значајан за многе биолошке процесе (релаксација мишића, ширење крвних судова) (Схема 1).⁸⁹

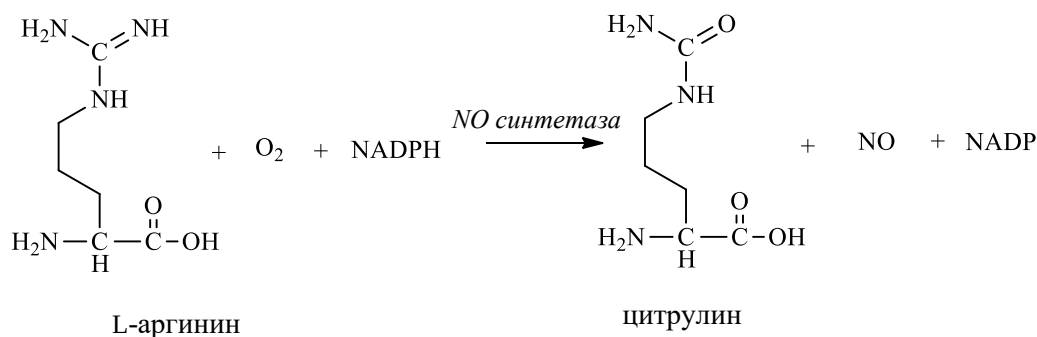
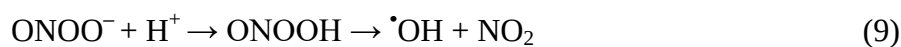


Схема 1. Биосинтеза NO из аргинина

У ендотелним ћелијама, макрофагима и синапсомима мозга, $\text{NO}^\bullet$ може да реагује са још једним ендегеним слободним радикалом, супероксил анион радикалом, при чему настаје јак оксиданс, пероксинитрит (ONOO^-), који може да оштети многе биомолекуле (*Реакција 8*). У киселој средини се распада продукујући мале количине хидроксил радикала, који у овом случају настаје независно од присуства металних јона (*Реакција 9*).⁸⁹



Пероксинитрит се сматра ефикасним оксидансом биолошких тиолних једињења, а пероксинитритна киселина даје оксидансе који су у рангу хидроксил радикала (*Реакција 9*). Она је врло нестабилна, а њени деградациони продукти, који су јако активни слободни радикали, доприносе свеукупном цитотоксичном ефекту.⁹⁴

2.6.2. Утицај слободних радикала на примарне биомолекуле

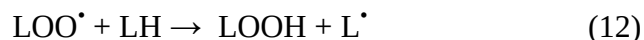
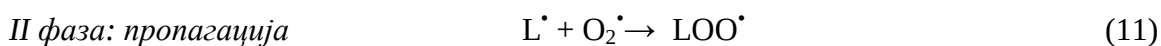
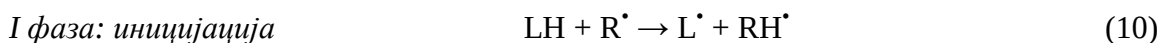
Људски организам је, као и сви аеробни организми, стално изложен повољним и неповољним ефектима стварања реактивних врста кисеоника. Најпознатији негативни ефекти повећаног стварања ROS-а у биолошким системима обухватају пероксидацију мембранских липида, оксидативно оштећење нуклеинских киселина и шећера, као и оксидацију сулфхидрилних и других група у протеинима.⁹⁵

2.6.2.1. Оксидативни стрес и липиди - липидна пероксидација

Један од најнегативнијих ефеката оксидативног стреса у биолошким системима је пероксидација мембранских липида. Реагујући са липидима, ROS изазивају оксидативну деградацију незасићених, односно полинезасићених масних киселина, што је познато као процес липидне пероксидације. Овом процесу

подлежу, како липиди у биосистемима, тако и липиди у храни. Основни супстрат за оксидативно оштећење липида представљају полинезасићене масне киселине у фосфолипидима и гликолипидима, као и холестерол у биолошким мембранама.^{96,97}

Липидна пероксидација се у биолошким системима може одигравати ензимским (под дејством липооксигеназа) и неензимским путем. Механизам комплексне ланчане реакције липидне оксидације одвија се у три фазе (*Реакције 10-19*).¹²



L - масна киселина, *M* - катјон

Уколико ланчана реакција брзо не подлегне терминацији, долази до оштећења липидних молекула ћелијске мембране. У највећем броју случајева до оштећења ћелијских мембрана долази пероксидацијом липида мембрана здравих ћелија, али је могућа и инкорпорација већ модификованих производа из хране.¹²

2.6.2.2. Оксидативни стрес и ДНК

Највећи број оштећења молекула ДНК су узрокована реактивним кисеоничним врстама. ROS индукују оксидативна оштећења ДНК, као што је разлагање полинуклеотидних ланаца и хемијске промене база и нуклеотида, нарочито на секвенцама које садрже доста гуанина.⁹⁸ Као главни производ оксидације гуанина добија се 8-хидрокси гуанин, оксидовани облик изражене мутагене активности. Новија истраживања су показала да при реакцији ДНК полимеразе са 8-хидрокси гуанином најчешће долази до инкорпорације аденина, уместо цитозина, што доводи до трансверзије G → Т (гуанин → тимидин) која је карактеристична за хумани канцер (Схема 2).⁹⁸

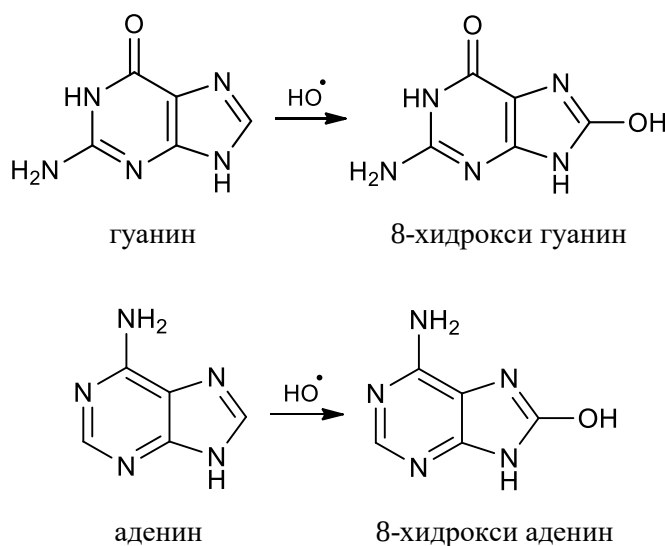


Схема 2. Оксидација нуклеинских база под дејством хидроксил радикала

На основу количине оксидованих облика нуклеинских база (8-хидрокси гуанозин, тимидин гликол, мокраћна киселина), у урину се може одредити степен оштећења ДНК материјала у ћелијама организма. Оштећење ДНК се може одредити и на основу степена разлагања полинуклеотидних ланаца и на основу количине оксидованих облика база у ћелијским културама које су претходно изложене условима оксидативног стреса.⁹⁸

2.6.2.3. Оксидативни стрес и протеини

Протеини поседују много реакционих центара који се могу оксидовати у условима оксидативног стреса. Агресивни радикали, као што је хидроксил радикал, могу довести до фрагментације протеина крвне плазме. Процес фрагментације је повезан са реакцијама аминокиселина као што су пролин и хистидин.¹⁰⁰

Неки протеини садрже активне центре који координују металне јоне, преко којих се често врши трансфер електрона у биолошким оксидо-редукционим реакцијама. Слободни радикали неретко доводе до иреверзибилне модификације аминокиселина, које учествују у координовању металних јона (нпр. хистидин).

Многи интрацелуларни протеини садрже реактивне тиолне групе (из цистеина) које се могу оксидовати до дисулфида, па опет могу бити редуковане различитим метаболичким процесима. Неки протеини садрже активни метионин, који се реверзибилно може оксидовати до метионин сулфоксида (Схема 3).

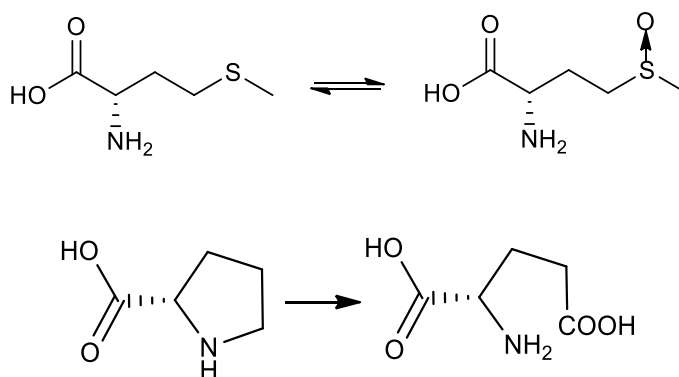


Схема 3. Реверзибилна оксидација метионина и иреверзибилна оксидација пролина

Дисулфидни и сулфоксидни облици ових аминокиселина могу да имају протективну улогу, због реверзибилности оксидационих промена које се дешавају на оваквим протеинима, па тако могу поништити ефекте до којих је дошло под дејством ROS.¹⁰⁰

2.6.2.4. Оксидативни стрес и угљени хидрати

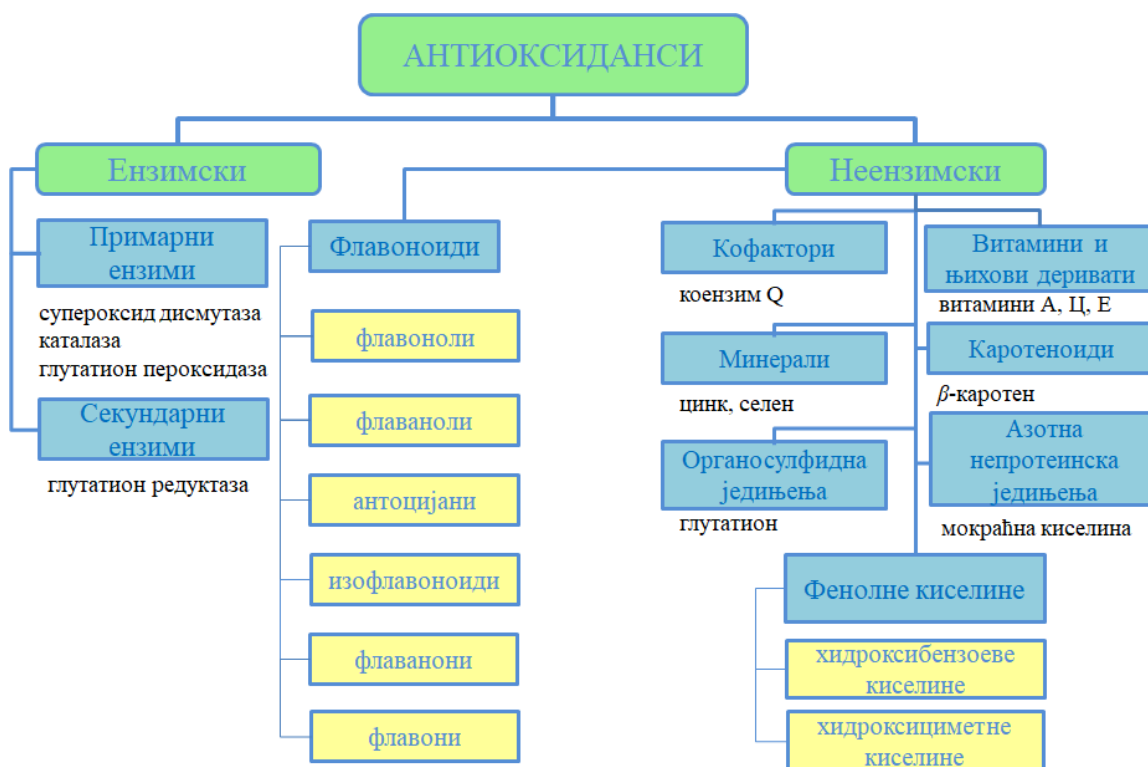
Хидроксил радикали реагују са угљеним хидратима насумично преузимајући водоникове атоме са угљеникових атома, при чему настају слободни радикали са неспареним електронима на угљенику. То доводи до раскида гликозидних веза у ланцима важних биомолекула. Ови процеси се одигравају преко интермедијера, као што су пероксил-радикали.¹⁰⁰

2.6.2.5. Оксидативни стрес и антиоксиданси

Живи организми су развили различите начине како да се изборе са ROS и RNS, поништавањем њиховог деловања (антиоксиданси) или „поправљањем“ насталих оштећења. Термин „антиоксиданси“ не подразумева једну одређену групу једињења сличних по хемијској природи, већ је општи назив за све супстанце које могу спречити или значајно смањити оксидацију супстрата.¹⁰¹ Антиоксиданси могу реаговати са радикалима, али уместо да се претворе у други реактивни молекул, ова једињења остају релативно стабилна. Они имају способност да неутралишу слободне радикале, прекину ланчану реакцију и спрече даља оштећења. Релативна стабилност антиоксиданаса је генерално резултат присуства коњугованих веза, па електрони могу бити делокализовани, из чега се може закључити да су ароматична једињења генерално, а посебно фенолна једињења, веома ефикасни антиоксиданси.⁹⁶

Хемијска једињења која продукују реактивне кисеоничне врсте се називају прооксидансима. Са друге стране, једињења које их разлажу, неутралишу, спречавају њихово настајање или делују супротно слободним радикалима, називају се антиоксидансима. У нормалним здравим ћелијама је успостављена равнотежа прооксиданс/антиоксиданс. Међутим, она се може померити у правцу прооксиданаса када је продукција реактивних кисеоничних врста повећана или када је ниво антиоксиданаса умањен. Као што је већ напоменуто, овакво стање се назива оксидативним стресом и може резултирати озбиљним оштећењима ћелије, ако је тешког облика или ако дуго траје.⁹⁶

Антиоксиданси се могу поделити на антиоксидансе примарне, секундарне и терцијарне заштите. Поједине групе антиоксиданаса примарног и секундарног нивоа антиоксидативне заштите приказане су на *Слици 21*.¹⁰⁶



*Слика 21. Подела антиоксиданаса примарног и секундарног нивоа антиоксидативне заштите*¹⁰⁶

Антиоксидативну заштиту аеробних организама чине:

- **примарни ниво антиоксидативне заштите:** ензими који неутралишу слободне радикале (каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD), глутатион редуктаза (GR), глутатион пероксидаза (GSHPx))¹⁰² и неензимски антиоксиданси (витамин Ц, витамин Е, коензим Q, глутатион (GSH), β-каротен, уреа, итд.);
- **секундарни ниво антиоксидативне заштите:** када је већ дошло до оштећења биомолекула, постоје ензими који могу поправити настала

- оштећења и то су специфични ензими из групе оксидоредуктаза и репаративни ензими.^{93,103}
- **терцијарни ниво антиоксидативне заштите:** хелатизација метала са променљивом валенцом посредством специфичних протеина (церулоплазмин, апоферитин, феритин и др.) или метала који се генеришу током оксидативног оштећења. Антиоксиданси на терцијарном нивоу инактивирају (хелатирају) метале који учествују у стварању слободних радикала ($\cdot\text{OH}$ радикал у Фентоновој реакцији).¹⁰⁴

2.6.2.5.1. Ензими антиоксидативне заштите

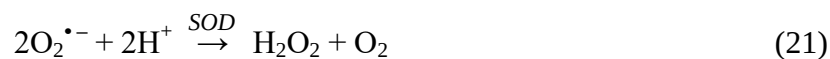
Најзначајнији антиоксидативни ензими примарне антиоксидативне заштите аеробних организама су: каталаза, супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза и глутатион редуктаза.

Каталаза је један од најраспрострањенијих ензима у природи и налази се у свим живим организмима. Састоји се од четири идентичне подјединице, које садрже хем групу у активном центру ензима. Основна улога каталазе је разградња водоник-пероксида (*Реакција 20*):



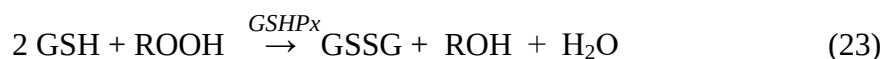
Активност каталазе је примећена тек при већим концентрацијама H_2O_2 , што говори да је каталаза искључиво одговорна за разградњу пероксида у условима оксидационог стреса. Каталаза је присутна у свим ткивима сисара, при чему се високом активношћу нарочито истичу јетра и еритроцити.¹⁰⁵

Супероксид дисмутаза (SOD) катализује реакцију дисмутације супероксилног анјон радикала ($\text{O}_2^{\cdot-}$) до водоник-пероксида и кисеоника:



Супероксид дисмутаза је металоензим, који у свом активном центру садржи јоне бакра или мангана. Митохондријална SOD се у великој количини продукује медијаторима акутног оксидативног стреса, као што су водоник-пероксид и супероксил анјон радикал.⁸⁹

Глутатион пероксидаза (GSHPx) је ензим који редукује ниске концентрације водоник-пероксида и органских пероксида, до воде и алкохола и повезана је са оксидацијом глутатиона.



GSHPx је селенопротеин који се налази у свим ткивима сисара. Нарочито је изражена њена активност у еритроцитима, где врши уклањање водоник-пероксида, а има и кључну улогу у разградњи органских хидропероксида и заштити SH-група биомолекула.⁸⁹

Глутатион редуктаза (GR) омогућава редукцију глутатион-дисулфида (GSSG), оксидованог облика глутатиона, уз учешће коензима NADPH.



Антиоксидативна улога GR огледа се у обезбеђивању довољне количине GSH, редукцијом GSSG, што омогућава нормалну регулацију редокс статуса ћелије.⁸⁹

2.6.2.5.2. Неензимски антиоксиданси

Неензимски антиоксиданси се могу поделити на антиоксидансе ендемог или егзоеног порекла. Поред тога, деле се и на природне и синтетичке, као и липофине и хидрофилне.^{89,106}

Антиоксиданси који се синтетишу у организму спадају у групу ендогених, док антиоксидансе који се уносе исхраном или путем дијететских суплемената убрајамо у егзогене. Групу ендогених антиоксиданаса чине ензими који спадају у примарни ниво антиоксидативне заштите, неензимски молекули глутатиона, трансферина, коензим Q итд. и неки хемијски елементи, попут цинка и селена. Ендогени систем антиоксидативне заштите у неким стањима организма има ограничену ефикасност, па је неопходно уносити егзогене антиоксидансе путем исхране. Најефикаснији и најпознатији егзогени антиоксиданси су витамини Ц и Е, каротеноиди и нискомолекуларна биљна фенолна једињења. Највише изучавани и најјефикаснији антиоксиданси из групе природних фенолних једињења су фенолне киселине, флавоноиди и танини.⁸⁹

2.6.3. Механизми антиоксидативне активности фенолних једињења

На молекулском нивоу, полифеноли могу да испољавају своје антиоксидативне особине путем више различитих механизма, који произилазе из директне реакције са слободним радикалима¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ или хелатизацијом јона метала, који би у даљим реакцијама произвели слободне радикале.¹¹⁰

Стабилни радикали најчешће настају као последица преноса атома водоника са антиоксидативне врсте, а механизам антиоксидативног дејства се може одвијати у једном или два корака.

У даљем тексту биће описани следећи механизми антиоксидативног деловања:

- пренос атома водоника - *енг.* Hydrogen Atom Transfer (HAT);
- пренос једног електрона праћен преносом протона - *енг.* Single Electron Transfer followed by Proton Transfer (SET-PT);
- секвенционални губитак протона праћен губитком електрона - *енг.* Sequential Proton Loss Electron Transfer (SPLET).

Принципи антиоксидативног дејства преко претходно наведених механизма приказани су на *Схеми 4*.

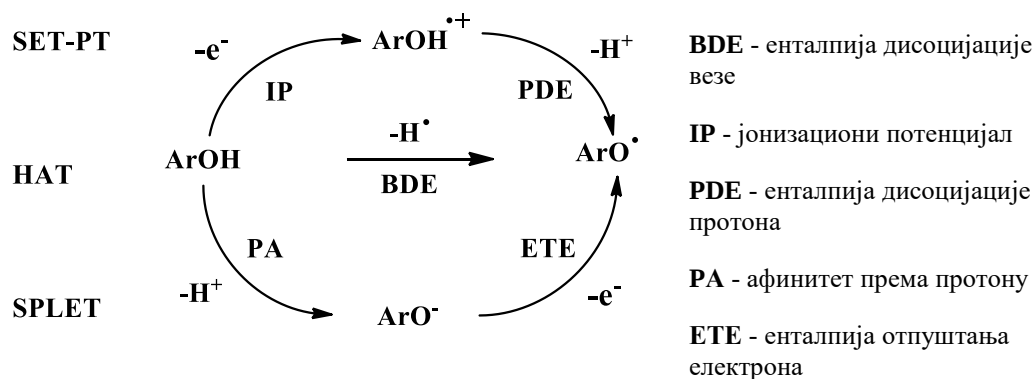


Схема 4. Механизми антиоксидативне активности фенолних једињења¹¹¹

2.6.3.1. HAT механизам

HAT механизам се јавља у случају када антиоксиданс неутралише слободно-радикалске врсте донирањем атома водоника. *Схема 5* илуструје HAT механизам: фенолно једињење донира водоников атом нестабилном слободном радикалу и у овом процесу настаје знатно стабилнија слободно-радикалска врста. У овом случају мање је вероватно да ће настала стабилнија врста даље пропагирати радикалске реакције.¹⁰⁹

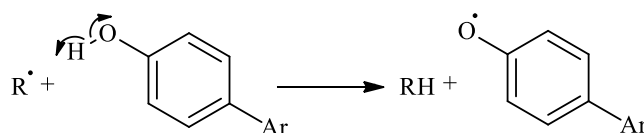


Схема 5. HAT механизам

Схема 6 илуструје коњуговане резонантне структуре феноксидног радикала насталог у реакцији са слободним радикалом HAT механизмом. Иако феноксил-радикалски електрон најпре настаје на изузетно електронегативном атому кисеоника, вероватно је да је електрон делокализован и расподељен кроз ароматични прстен. Што је водоников атом слабије везан за хидрокси- супституент антиоксиданса, већа је вероватноћа да ће учествовати у HAT реакцијама са слободно-радикалским супстратима. Параметар који је значајан при проучавању капацитета фенолног једињења да се подвргне HAT механизму у слободно-

радикалским реакцијама је енталпија дисоцијације везе (енг. Bond Dissociation Enthalpy, BDE) антиоксидативне врсте. Што је BDE вредност већа, једињење има мању способност неутрализације слободних радикала НАТ механизмом.¹⁰⁹

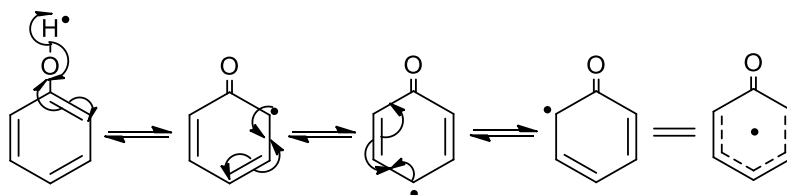


Схема 6. Резонантна стабилизација фенолних једињења

Величина антиоксиданса, структура и поларност имају велику улогу у капацитету и брзини одигравања НАТ реакција.¹¹¹ НАТ реакције могу бити отежане присуством електрон-акцепторских или привлачних група у 3- и 5- положајима преко деактивирања ароматичног прстена.¹¹² НАТ реакције поспешује присуство *t*-бутил група на положајима 2- и 6- и метокси групе на положају 4-, које помажу у стабилизацији резонанцијом насталог фенокsidног радикала.^{113,114}

2.6.3.2. SET-PT механизам

SET-PT механизам се одиграва у два корака. Први корак овог механизма је одређен енергијом отпуштања електрона, односно јонизационим потенцијалом (енг. Ionization Potential, IP), при чему у овој реакцији као производ настаје радикал-катјон, што се може представити следећом реакцијом:



Добијена антиоксидативна врста у реакцији $\text{ArOH}^{\bullet+}$ показује да, иако електрон радикала и формално наелектрисање на почетку постоје на атому кисеоника, врло је вероватно да је електрон делокализован и расподељен кроз ароматични прстен у случају фенолних једињења као антиоксидативних врста.¹⁰⁹

Што је потребна већа енергија јонизације, то је мања вероватноћа да ће антиоксидативно једињење донирати електрон. IP опада са порастом pH вредности средине, па су SET реакције фаворизоване у алкалној средини.¹⁰⁹

Други корак SET-PT механизма је одређен енталпијом дисоцијације протона (*енг.* Proton Dissociation Enthalpy, PDE) радикал-катјона, што се може представити следећом реакцијом:



У овој реакцији као производ настаје радикал антиоксиданса. Завршна SET-PT реакција је иста као НАТ реакција у смислу неутрализације слободних радикала.

2.6.3.3. SPLET механизам

Први корак SPLET механизма је хетеролитичко ракидање О-Н везе, и одређен је РА (*енг.* Proton Affinity) вредношћу, односно афинитетом Ar-O^- према протону. У овој реакцији као производ настаје анјон.



Други корак SPLET механизма је одређен енталпијом отпуштања електрона (*енг.* Electron Transfer Enthalpy, ETE) из анјона, што се може представити следећом реакцијом:



У овој реакцији као производ настаје радикал антиоксидативне врсте. Постоји велики број резултата који се могу сматрати доказима да је управо SPLET механизам кључан у заштити од оксидативног оштећења.

Најзаступљенији механизам антиоксидативног дејства у било ком систему зависиће од структуре и особина антиоксиданса, као и од средине у којој долази до интеракције. Ако се веће групе налазе поред фенолних хидроксилних група, због

стерних сметњи, НАТ реакције могу бити ометене.¹¹⁵⁻¹¹⁷ Методе за одређивање антиоксидативне активности се, према претходно изложеном, могу поделити према механизму антиоксидативног дејства¹²¹, и ова подела је дата у Табели 4.

Табела 4. Подела метода за одређивање антиоксидативне активности према механизму дејства¹²¹

Тест	Радикал/јон који се мери
НАТ тестови	
Азо-иницирана хемилуминисценција (CL)	$RO_2^{\bullet}$
Фотохемилуминисценција (PCL)	$O_2^{\bullet-}$
Укупна антиоксидативна активност (TAR)	$RO_2^{\bullet}$
Капацитет апсорпције кисеоничних радикала (ORAC)	$RO_2^{\bullet}$
Потпуно задржавање слободних радикала (TRAP)	$RO_2^{\bullet}$
β - каротен тестови (UV/Vis)	$RO_2^{\bullet}$
Укупни капацитет неутралисања кисеоничних радикала (TOSC)	$RO_2^{\bullet}$ или $HO^{\bullet}$
Липозомски модел системи	$RO_2^{\bullet}$ или $HO^{\bullet}$
Модел оксидације липопротена мале густине (LDL)	$RO_2^{\bullet}$ или $HO^{\bullet}$
SET тестови	
Капацитет редукције бакра (II) (CUPRAC)	$Cu^{2+} \rightarrow Cu^{+}$ (комплекс)
Моћ редукције гвожђа (III) (FRAP)	$Fe^{3+} - TPTZ \rightarrow Fe^{2+} - TPTZ$
Мешовити тестови	
Антиоксидативни капацитет изражен у еквивалентима тролокса (TEAC)	$ABTS^{\bullet+}$
Способност неутралисања DPPH [•] радикала (DPPH)	$DPPH^{\bullet}$
Тестови хелатизације	
Ферозин	катјони двовалентних метала
Тетраметилмурекид (ТММ)	катјони двовалентних метала
Квантификацијски тестови	
Укупни садржај фенола (TPC)	Mo^{6+} (жут) $\rightarrow$ Mo^{5+} (плав)

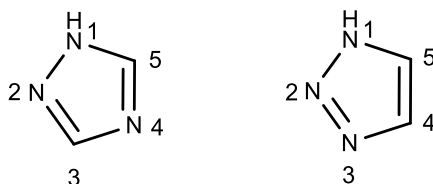
2.7. Синтетичка модификација фенолних киселина

Фенолна једињења, па самим тим и фенолне киселине, имају снажан антиоксидативни капацитет. У циљу проналажења једињења са бољим биолошким активностима, пре свега снажнијом антиоксидативном активношћу, извршена је дериватизација ових једињења. 1,2,4-Триазол-3-тиони и 1,3,4-оксадиазоли представљају групу деривата фенолних киселина, која налази широку примену у индустрији, и као агенси који имају позитиван утицај на здравље човека.^{13,122}

2.7.1. 1,2,4-Триазол-3-тиони

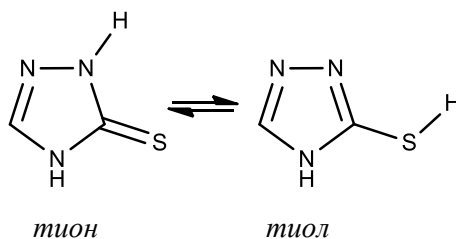
Последњих неколико деценија, хемија триазола (пиродиазола) и њихових деривата привлачи велику пажњу због њиховог синтетичког и биолошког значаја.¹³

Постоје два структурна изомера триазола, 1,2,3-триазоли и 1,2,4-триазоли, чије су структуре приказане на *Слици 22*.



Слика 22. Структурни изомери триазола

Деривати 1,2,4-триазола, 3-меркапто-1,2,4-триазоли постоје у два таутомерна облика (*Слика 23*), у којима водоник може бити везан или за азот (тионски облик) или за сумпор (тиолни облик), при чему је тионска форма доминантнија.¹⁴



Слика 23. Таутомерни облици супституисаних 1,2,4-триазола

Деривати 1,2,4-триазола, 3-меркапто-1,2,4-триазоли (**3**) најчешће се добијају реакцијом хлорида карбоксилних киселина (**1**) и тиосемикарбазида, при чему једињење настало у овој реакцији (**2**) подлеже интрамолекулској циклизацији у базној средини (Схема 7).¹²⁴⁻¹²⁹

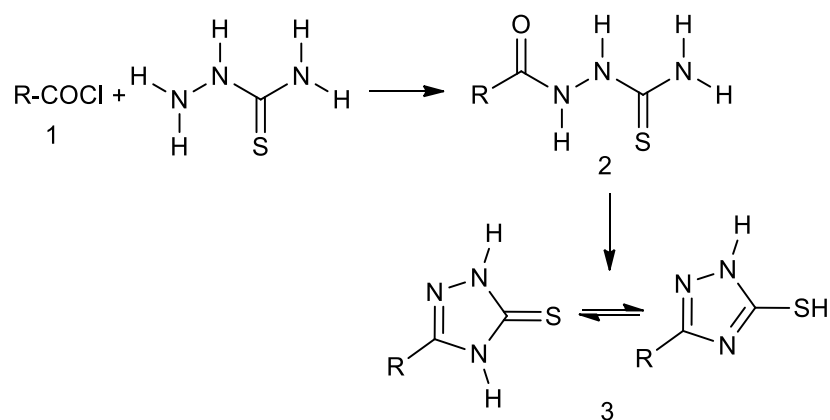
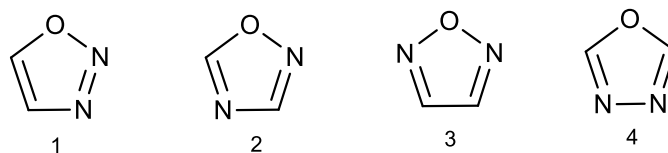


Схема 7. Синтетички пут за добијање деривата 1,2,4-триазол-3-тиона (2,4-дихидро-3H-1,2,4-триазол-3-тион)

1,2,4-Триазоли и њихови деривати имају примену у екологији¹³⁰, индустрији^{131,132} и пољопривреди^{133,134}, али и широк спектар биолошких активности, укључујући антимикробну^{13,135-136}, антифунгалну¹³⁸, антибактеријску^{133,135}, антиканцерогену^{139,140}, антиоксидативну^{133,134}, антиконвулзивну¹⁴¹, антивирусну¹⁴² и антиинфламаторну^{143,144}, па не изненађује чињеница да су ова једињења и њихови деривати све више проучавани у циљу модификације постојећих и изналажења нових начина примене.

2.7.2. 1,3,4-Оксадиазоли

Оксадиазоли су ароматична петочлана хетероциклична једињења која постоје у облику четири изомера (Слика 24), при чему 1,3,4-оксадиазоли и 1,2,4-оксадиазоли имају најширу примену.¹⁴⁴



Слика 24. Изомери оксадиазола: (1) 1,2,3-оксадиазол; (2) 1,2,4-оксадиазол; (3) 1,2,5-оксадиазол; (4) 1,3,4-оксадиазол

Деривати 1,3,4-оксадиазола најчешће се синтетишу реакцијом хидразина са метил-кетонима (Схема 8).¹⁴⁵

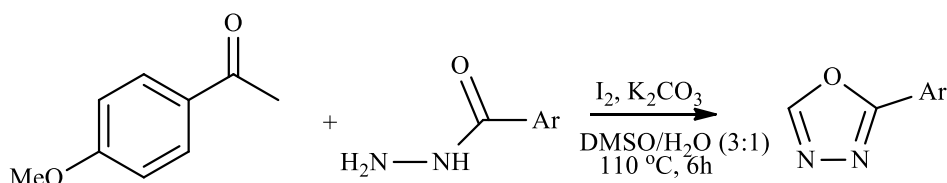


Схема 8. Синтетички пут за добијање деривата 1,3,4-оксадиазола

Деривати 1,3,4-оксадиазола са аминским и алкил- ланцима у структури се користе као електролуминисцентни материјали¹⁴⁶, а 1990-их је откривено да неки од њих могу да служе као електрон-транспортни материјали у светлосним диодама.¹⁴⁷ Деривати 1,3,4-оксадиазола су такође значајни и као полазна једињења у реакцијама циклоадиције¹⁵⁸ и синтези фурана.¹⁴⁹ Многи од њих могу бити инсектициди и хербициди.¹⁵⁰ Поседују и широк спектар биолошких активности, као што су антиинфламанторна^{151,152}, антиканцерогена^{153,154}, антибактеријска¹⁵⁵, антиконвулзивна¹⁵⁶, цитотоксична¹⁵⁷, антифунгална¹⁵⁸, антиалергијска¹⁵⁹ итд. Нека једињења која имају 1,3,4-оксадиазолну јединицу у својој структури су тренутно у употреби као лекови: *Зиботентан* је антиканцерогени агенс¹⁶⁰, *Фенадиазол* је хипнотички лек¹⁶¹, *МК-0633 p*-толуенсулфонат је инхибитор 5-липоксиназе¹⁶², *Несапидил* је антихипертензивни агенс¹⁶³, док су *АВТ-751-оксадиазол* и *Фурамизол* антибиотици¹⁶³.



ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА



Задати циљеви ове докторске дисертације су били следећи:

- ✓ Оптимизовати параметре одабраних метода екстракције фенолних једињења из плодова дивљих јабука, малина и трешања (фамилија Rosaceae) који утичу на њену ефикасност (врста растварача и његова концентрација, однос запремине растварача и масе узорка, време и температура екстракције) у циљу добијања максималног приноса фенолних једињења из испитиваних узорака;
- ✓ Одредити садржај фенолних једињења (укупних фенола, флавоноида, фенолних киселина и антоцијанина), идентификовати појединачна фенолна једињења и одредити њихове количине у екстрактима дивљег воћа, добијеним под оптималним условима екстракције;
- ✓ Испитати стабилност и биодоступност фенолних једињења симулирањем услова *in vitro* гастроинтестиналне дигестије;
- ✓ Проценити способност испитиваних узорака да неутралишу штетне слободно-радикалске врсте, односно њихов антиоксидативни потенцијал;
- ✓ Извршити синтетичку модификацију одабраних фенолних киселина, у циљу добијања једињења са потенцијално бољим биолошким активностима, пре свега антиоксидативом активношћу;
- ✓ Проценити степен цитотоксичности деривата фенолних киселина са највећим антиоксидативним потенцијалом на ћелијској линији здравих фибробласта плућа (MRC-5), у циљу дефинисања њихове безбедне примене, као и утицај ових деривата на активност антиоксидативних ензима.



ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО



4.1. Сакупљање плодова воћа из фамилије Rosaceae

Плод дивље јабуке (*M. sylvestris*) сакупљен је у централном делу Србије, у селу Честин, у октобру 2014. године. Идентификација биљног материјала и депоновање примерка извршено је у хербаријуму Института за биологију и екологију, Природно-матемтичког факултета, Универзитета у Крагујевцу и води се под идентификационим бројем 118/015. Плодови дивље јабуке су опрани и ољуштени, а кора и пулпа јабуке су одвојене и исечене на ситније комадиће, па замрзнуте на температури од -22 °C до даље анализе.

Плод дивље малине (*R. idaeus*) сакупљен је у југозападном делу Србије, у селу Јабука, у августу 2017. године. Биљка је систематисана и депонована у хербаријуму Института за биологију и екологију, Природно-матемтичког факултета, Универзитета у Крагујевцу и води се под систематским бројем 132/019. Плодови дивље малине су опрани под водом и замрзнути на температури од -22 °C до даље анализе.

Плод дивље трешње (*P. avium*) је такође сакупљен у централном делу Србије, у селу Честин, у мају 2016. године и биљни материјал је систематисан и депонован у хербаријуму Института за биологију и екологију, Природно-матемтичког факултета, Универзитета у Крагујевцу и води се под систематским бројем 133/019. Плодови дивље трешње су опрани под водом, одвојени од коштице и замрзнути на температури од -22 °C до даље употребе.

4.2. Екстракција плодова дивљег воћа

4.2.1. Поступак екстракције коре и пулпе дивље јабуке

Кора и пулпа дивље јабуке су одлеђене, уситњене и засебно хомогенизоване коришћењем лабораторијског млина (ИКА хомогенизатор, произвођача ИКА – Werke GmbH & Co. KG, Штауфен, Немачка). Узорци коре и пулпе (2,0 g) екстраховани су коришћењем растварача метанол/вода, где су примењене концентрације метанола 20, 60 и 100%, на различитим температурама (20, 50 и 80

°C) и ултразвучна екстракција, изведена коришћењем ултразвучног купатила (Bandelin Sonorex, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Берлин, Немачка) трајала је различито време (20, 30 и 40 min). Запремина растварача који је додаван у узорке (2,0 g) била је 30, 65 и 100 mL. Припремљено је 30 екстраката коре и 30 екстраката пулпе дивље јабуке у различитим комбинацијама ова четири параметра (концентрација метанола, однос запремине растварача и масе узорка, температура и време екстракције). Након ултразвучне екстракције, течни екстракт је одвојен филтрацијом и замрзнут до даље анализе.

4.2.2. Поступак екстракције плода дивље малине

Одређена количина дивљих малина је одлеђена и даље уситњена и хомогенизована помоћу кухињског блендера. Узорци (1,0 g) су екстраховани помоћу ултразвучног купатила, коришћењем смеше растварача метанол/вода, где је примењена концентрација метанола 20, 60 и 100%, на различитим температурама (40, 60 и 80 °C), за различито време екстракције (1, 8 и 15 min). Запремина растварача који је додаван у узорке (1,0 g) била је 10, 20 и 30 mL. Припремљено је 30 екстраката са различитим комбинацијама ових параметара и након екстракције, течни екстракти су одвојени филтрацијом и замрзнути до даље анализе.

4.2.3. Поступак екстракције плода дивље трешње

Одређена количина дивљих трешања је одлеђена, изблендирана и хомогенизована. Дивље трешње су затим екстраховане коришћењем микроталасне пећнице MicroSYNTH (Milestone, Италија). У 30 засебно одмерених узорака дивље трешње (1,0 g), додаване су различите запремине растварача (20, 25 и 30 mL), различитих концентрација метанола (60, 80 и 100%), и вршена је микроталасна екстракција на различитим температурама (60, 80 и 100 °C), за различито време екстракције (1, 2 и 3 min). Припремљено је 30 екстраката са различитим комбинацијама ових променљивих и након екстракције, течни екстракти су одвојени филтрацијом и замрзнути до даље анализе.

4.2.4. Оптимизација услова ултразвучне и микроталасне екстракције

Услови ултразвучне и микроталасне екстракције (концентрација метанола, однос запремине растварача и масе узорка, температура и време екстракције) плодова дивље јабуке (кора и пулпа), дивље малине и дивље трешње, оптимизовани су коришћењем компјутерског софтвера Design-Expert®, верзије 7.0.0 (Stat-Ease Inc., Минеаполис, Минесота, САД).

4.3. Методе за одређивање количине фенолних једињења у екстрактима

Количине укупних фенола, флавоноида, фенолних киселина и антоцијанина у екстрактима плодова дивље јабуке, дивље малине и дивље трешње одређене су спектрофотометријским методама коришћењем UV/Vis спектрофотометара Nanocolor (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Дурен, Немачка) и Agilent (Санта Клара, САД).

4.3.1. Одређивање количине укупних фенола

Садржај укупних фенолних једињења одређен је применом Фолин-Чиокалте (*Folin-Ciocalteu*) методе.¹⁶⁴ Ова метода се заснива на мерењу редуковане способности фенолних једињења, чијом дисоцијацијом настаје протон и феноксни анјон. Феноксни анјон настао у овој реакцији редукује Фолин-Чиокалте реагенс до плаво обојеног јона (*Реакције 29 и 30*):



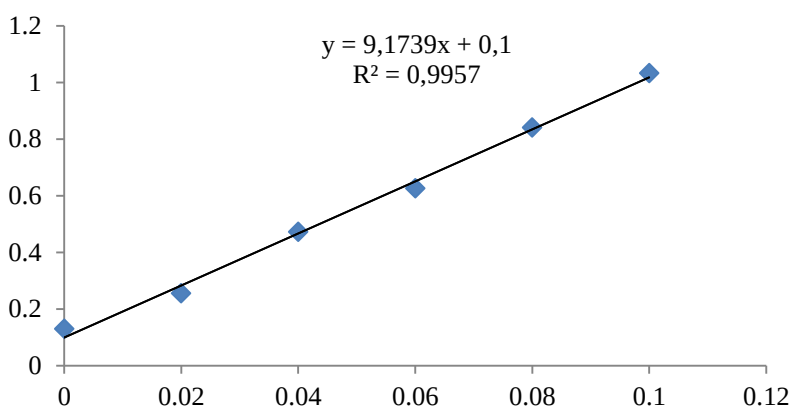
Потребни раствори и реагенси:

- Екстракт добијен ултразвучном/микроталасном екстракцијом плодова дивљег воћа
- NaHCO_3 (7,5%)

- Фолин-Чиокалте реагенс
- Стандардни раствор галне киселине

Поступак: Аликвот од 0,2 mL екстракта плодова дивљег воћа (јабуке, малине и трешње), добијен описаним методама екстракције, помешан је са 1 mL Фолин-Чиокалте реагенса (разблаженог дестилованом водом 10 пута) и 0,8 mL NaHCO_3 (7,5%). За припрему следеће пробе уместо екстракта воћа коришћена је иста запремина метанола. Након 15 минута инкубације на 45 °C, мерена је апсорбанца на 765 nm, у односу на слепог пробу.

Израчунавање: Концентрација укупних фенолних једињења у добијеним екстрактима израчуната је коришћењем калибрационе праве галне киселине (Слика 25). На основу добијених вредности за концентрацију укупних фенола у екстрактима израчунат је укупан садржај фенола у испитиваном воћу и изражен је у еквивалентима галне киселине (mg GAE/100g масе свежег узорка (CM)). Сва мерења вршена су у три понављања, а резултати су представљени као средња вредност три мерења ($\pm$ стандардна девијација).



Слика 25. Калибрациона права стандардног раствора галне киселине

4.3.2. Одређивање количине укупних флавоноида

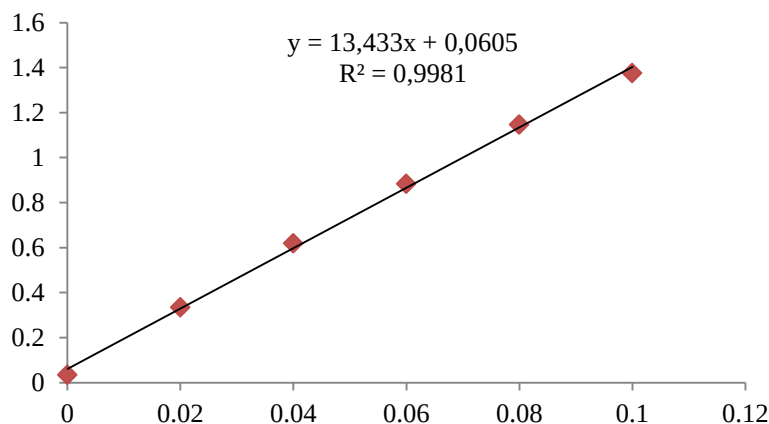
Метода која се заснива на реакцији флавоноида са Al^{3+} јоном, при чему настаје одговарајући комплекс жуте боје, примењена је за одређивање укупне количине флавоноида у испитиваним екстрактима дивљег воћа.¹⁶⁵

Потребни раствори и реагенси:

- Екстракт добијен ултразвучном/микроталасном екстракцијом плодова дивљег воћа
- 2% раствор AlCl_3 у метанолу
- Стандардни раствор рутина

Поступак: Аликвот од 1 mL екстракта добијеног ултразвучном/микроталасном екстракцијом плодова дивљег воћа помешан је са 1 mL 2%-тног раствора AlCl_3 у метанолу. Слепа проба је припремљена на исти начин, без додатка AlCl_3 . Након 1 h инкубације на собној температури, апсорбанца се читава на 415 nm.

Израчунавање: Укупан садржај флавоноида израчунат је коришћењем калибрационе праве за стандардни раствор рутина (Слика 26) и изражен је у еквивалентима рутина (mg RUE/100g CM).



Слика 26. Калибрациона права стандардног раствора рутина

4.3.3. Одређивање укупне количине фенолних киселина

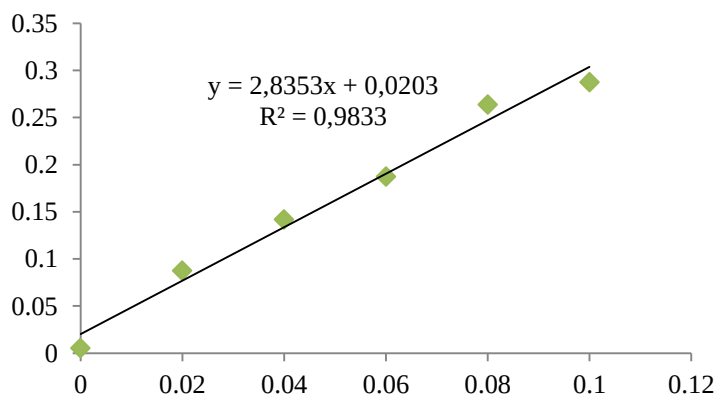
Садржај фенолних киселина у екстрактима одређен је по методи коју су описали Матковски (*Matkowski*) и сарадници, а заснива се на реакцији са Арноовим (*Arnow*) реагенсом.¹⁶⁶

Потребни раствори и реагенси:

- Екстракт плодова дивљега воћа добијен ултразвучном екстракцијом
- 0,1 М раствор HCl
- Арноов реагенс (водени раствор NaNO_2 помешан са воденим раствором $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$)
- 1 М раствор NaOH

Поступак: Аликвот од 0,2 mL екстракта добијеног ултразвучном екстракцијом плодова дивљега воћа помешан је са 1 mL воде, 0,2 mL хлороводоничне киселине (0,1 М), 0,2 mL Арноовог реагенса и истом запремином 1 М NaOH. Апсорбанца се читава истог тренутка на 490 nm.

Израчунавање: Укупан садржај фенолних киселина израчунат је на основу измерених апсорбанци тестираних екстраката, коришћењем калибрационе праве стандардног раствора кафеинске киселине (*Слика 27*) и изражен је у еквивалентима кафеинске киселине (mg CAE/100g CM).



Слика 27. Калибрациона права стандардног раствора кафеинске киселине

4.3.4. Одређивање количине антоцијана

Садржај антоцијана у екстрактима плодова дивљег воћа одређен је рН диференцијалном методом описаном од стране Ђустија и Вролстада (*Giusti и Wrolstad*).¹⁶⁷ Метода се заснива на структурној промени хромофоре антоцијана између рН 1,0 и 4,5 мерењем промена апсорбанце на две различите рН вредности.

Потребни раствори и реагенси:

- Екстракт плодова дивљег воћа добијен ултразвучном екстракцијом
- 0,025 М раствор KCl (раствор 1)
- 0,4 М раствор CH₃COONa (раствор 2)

Поступак: Запремине екстракта (по 0,2 mL) се мешају са 2,3 mL 0,025 М раствора KCl (2,3) и са 2,3 mL 0,4 М раствору CH₃COONa, чија је рН подешена помоћу HCl на рН=1,0 односно рН=4,5. Апсорбанца сваког раствора узорка се мери два пута, на 520 nm (λ_{max}) и 700 nm у односу на слепу пробу (дестилована вода).

Израчунавање: Укупан садржај антоцијанина изражен је у еквивалентима цијанидин-3-глукозида (mg CGE/100g CM) и израчунава се из следећих једначина:

$$A = (A_{(\lambda_{max})} - A_{700nm})_{pH=1} - (A_{(\lambda_{max})} - A_{700nm})_{pH=4,5} \quad (31)$$

$$\text{количина укупних антоцијанина (mg/L)} = \frac{A' \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon \times l} \quad (32)$$

где је:

$$A' = (A_{(\lambda_{max})} - A_{700nm})_{pH=1}$$

MW - молекулска маса цијанидин-3-глукозида (449,2 g/mol)

DF - фактор разблажења

ϵ - моларна апсорбанција (26900 l mol⁻¹cm⁻¹)

l - дужина кивете (1 cm)

4.4. Одређивање садржаја фенолних једињења у екстрактима плодова дивље јабуке и дивље малине HPLC методом

Идентификација и квантификација фенолних једињења (флавоноида, фенолних киселина и антоцијанина) извршена је коришћењем течне хроматографије високих перформанси, на HPLC апарату марке Shimadzu (Кјото, Јапан), опремљеног фотодиодним детектором (PDA) који снима таласне дужине у интервалу 190-800 nm.

За HPLC анализу екстракта коре и пулпе дивље јабуке, коришћена је C18 колона Phenomenex Kinetex® (Phenomenex, Torrance, CA, US) (величина честица 100×4,6 mm; 2,7 µm), а температура колоне је подешена на 40 °C. Примењена је метода градијентног елуирања, при чему се мобилна фаза састојала од воде (растварач А) и ацетонитрила (растварач Б). Оба растварача су садржала 0,1% раствор трифлуорсирћетне киселине. Примењена градијентна метода је била следећа: 0-1 min 5% Б, 1-10 min 5-30% Б, 10-15 min 100% Б. Проток мобилне фазе је подешен на 2 mL/min, а инјекциона запремина свих узорака била је 5 µL. Хроматограми су снимани на 280, 325 и 360 nm.¹⁶⁸ Одговори детектора су снимани помоћу LC Solution софтвера, верзија 1.24 SP1 (Shimadzu, Кјото, Јапан).

У случају HPLC анализе екстракта дивље малине, коришћена је C18 колона Luna (Phenomenex, Торенс, Калифорнија, САД) (величина честица 250×4,6 mm; 5 µm), а температура колоне је подешена на 30 °C. Мобилна фаза се састојала од воде (растварач А) и ацетонитрила (растварач Б), при чему су оба растварача садржала 0,1% мрављу киселину. Фенолна једињења у испитиваним екстрактима су анализирана применом градијентног елуирања на следећи начин: 0-1 min 5% Б, 1-5 min 5-10% Б, 5-25 min 10-80% Б, 25-27 min 100% Б и 27-30min 5% Б, а проток мобилне фазе је подешен на 1 mL/min. Хроматограми су снимани на 280, 325, 360 и 517 nm.

4.4.1. Стандарди и припрема стандардних раствора фенолних једињења

Гална киселина ($C_7H_6O_5$): у раду је коришћен стандард галне киселине ($M=170,12$ g/mol), чистоће $> 99\%$, произвођача Sigma Aldrich (Беч, Аустрија). Основни стандардни раствор галне киселине био је концентрације $25 \mu\text{g/mL}$, а од овог полазног раствора направљена је серија раствора разблаживањем основног раствора.

Елагинска киселина ($C_{14}H_6O_8$): коришћен је стандард елагинске киселине ($M= 302,197$ g/mol), чистоће $> 99\%$, произвођача Sigma Aldrich (Беч, Аустрија). Основни стандардни раствор елагинске киселине био је концентрације $40 \mu\text{g/mL}$, а од њега је даље направљена серија стандардних раствора.

Епикатехин ($C_{15}H_{14}O_6$): у раду је коришћен стандард епикатехина ($M= 290,271$ g/mol), чистоће $> 99\%$, произвођача Sigma Aldrich (Беч, Аустрија). Основни стандардни раствор епикатехина био је концентрације $100 \mu\text{g/mL}$, од кога је даље направљена серија стандардних раствора.

Катехин ($C_{15}H_{14}O_6$): у раду је коришћен стандард катехина ($M= 290,271$ g/mol), чистоће $> 99\%$, произвођача Sigma Aldrich (Беч, Аустрија). Основни стандардни раствор катехина био је концентрације $100 \mu\text{g/mL}$, од кога је даље направљена серија стандардних раствора.

Кверцитрин ($C_{21}H_{20}O_{11}$): у раду је коришћен стандард кверцитрина ($M= 448,38$ g/mol), чистоће $> 99\%$, произвођача Sigma Aldrich (Беч, Аустрија). Основни стандардни раствор епикатехина био је концентрације $100 \mu\text{g/mL}$, а од њега је даље направљена серија стандардних раствора.

Флоризин ($C_{21}H_{24}O_{10}$): у раду је коришћен стандард флоризина ($M= 436,409$ g/mol), чистоће $> 99\%$, произвођача Sigma Aldrich (Беч, Аустрија). Основни стандардни раствор флоризина био је концентрације $100 \mu\text{g/mL}$, а од њега је даље направљена серија стандардних раствора.

Хиперозид ($C_{21}H_{20}O_{12}$): у раду је коришћен стандард хиперозида ($M= 464,379$ g/mol), чистоће $> 99\%$, произвођача Sigma Aldrich (Беч, Аустрија). Основни стандардни раствор хиперозида био је концентрације $100 \mu\text{g/mL}$, а од њега је даље направљена серија стандардних раствора.

Хлорогенска киселина ($C_{16}H_{18}O_9$): у раду је коришћен стандард хлорогенске киселине ($M = 354,311 \text{ g/mol}$), чистоте $> 99\%$, произвођача Sigma Aldrich (Беч, Аустрија). Основни стандардни раствор хлорогенске киселине био је концентрације $25 \mu\text{g/mL}$, а од њега је даље направљена серија стандардних раствора.

Цијанидин-3-глукозид ($C_{21}H_{21}O_{11}^+$): у раду је коришћен стандард цијанидин-3-глукозида ($M = 484,83 \text{ g/mol}$), чистоте $> 99\%$, произвођача Sigma Aldrich (Беч, Аустрија). Основни стандардни раствор цијанидин-3-глукозида био је концентрације $40 \mu\text{g/mL}$, а од њега је даље направљена серија стандардних раствора.

Цијанидин-3-софорозид ($C_{27}H_{31}O_{16}^+$): у раду је коришћен стандард цијанидин-3-софорозида ($M = 611,529 \text{ g/mol}$), чистоте $> 99\%$, произвођача Sigma Aldrich (Беч, Аустрија). Основни стандардни раствор цијанидин-3-софорозида био је концентрације $40 \mu\text{g/mL}$, а од њега је даље направљена серија стандардних раствора.

4.4.2. Карактеризација HPLC методе

HPLC метода је окарактерисана на основу следећих параметара: линеарност, тачност, прецизност, граница детекције (*енг.* Limit of Detection, *LOD*) и граница квантификације (*енг.* Limit of Quantitation, *LOQ*), према међународном стандарду хармонизације (*енг.* International Conference on Harmonization, *ICH*).¹⁶⁹

4.4.2.1. Линеарност

За сваки стандардни раствор фенолних једињења конструисане су засебне стандардне праве у опсегу концентрација $0,781\text{--}100 \mu\text{g/mL}$. Анализирана су три поновљена инјектирања сваке концентрације. Линеарна регресија је изведена коришћењем концентрације, као независне, и површине пика, као зависне променљиве.

4.4.2.2. Тачност

Тачност методе је процењена коришћењем теста искоришћења („*recovery*“). У познате количине узорака додате су смеше стандардних раствора („*спажковање*“) на три различита нивоа концентрације (висока, средња и ниска). Ове смеше су екстраховане и анализиране применом HPLC методе.¹⁷⁰ Проценат искоришћења је израчунат према следећој једначини:

$$\% \text{ искоришћења} = \frac{X_{\text{детектовано}} - X_{\text{оригинално}}}{X_{\text{додато}}} \cdot 100 \quad (33)$$

где је:

$X_{\text{детектовано}}$ - укупна детектована количина; $X_{\text{оригинално}}$ - оригинална количина;
 $X_{\text{додато}}$ - додата количина

4.4.2.3. Прецизност

Прецизност је дефинисана као релативна стандардна девијација средње вредности и процењена је као „*intra-day*“ и „*inter-day*“ прецизност. „*Intra-day*“ прецизност израчуната је из поновљених мерења (три понављања за сваку концентрацију), за три различите концентрације, два пута у једном дану (тј. ујутру и увече), док је испитивање „*inter-day*“ прецизности спроведено понављањем анализе три различите концентрације у три узастопна дана. Поновљивост је испитана на три различита нивоа концентрације у три понављања и мерена је површина пика, па израчунат проценат релативне стандардне девијације (% RSD).¹⁷⁰

4.4.2.4. Граница детекције (LOD) и граница квантификације (LOQ)

Граница детекције (LOD) је најнижа концентрација (или количина) неке супстанце која може бити поуздано (са одређеном статистичком сигурношћу) детектована неком аналитичком методом и дата је релацијом:

$$LOD = 3,3 \times \sigma/s_p \quad (34)$$

где је σ стандардна девијација одсечка калибрационе праве, а s_p нагиб калибрационе праве.

Граница квантификације (LOQ) је најнижа концентрација (количина) неке супстанце која може бити поуздано одређена. Дата је релацијом:

$$LOQ = 10 \times \sigma/s_p \quad (35)$$

где је σ стандардна девијација одсечка калибрационе праве, а s_p нагиб калибрационе праве.

4.5. Симулација *in vitro* гастроинтестиналне дигестије плодова дивљег воћа

Симулација услова *in vitro* гастроинтестиналне дигестије изведена је по методи коју су описали Минекус (*Minekus*) и сарадници¹⁷¹, уз мале модификације описане од стране Михаиловића и сарадника.¹⁷²

Раствори и реагенси:

- Узорци свежих дивљих јабука и дивљих малина
- Симулирани орални флуид (*енг.* Simulated Salivary Fluid, SSF); састав: 13,6 mM NaHCO₃, 3,7 mM KH₂PO₄, 15,1 mM KCl, 0,06 mM (NH₄)₂CO₃ и 0,15 mM MgCl₂; pH=7,0
- Симулирани желудачни флуид (*енг.* Simulated Gastric Fluid, SGF); састав: 25 mM NaHCO₃, 0,9 mM KH₂PO₄, 6,9 mM KCl, 47,2 mM NaCl и 0,33 mM MgCl₂; pH=3,0
- Раствор пепсина изолован из слузокоже желуца свиња (25 000 U m/L, у SGF)
- 0,3 М раствор CaCl₂
- 1 М раствор HCl
- Симулирани интестинални флуид (*енг.* Simulated Intestinal Fluid, SIF); састав: 85 mM NaHCO₃, 0,8 mM KH₂PO₄, 6,8 mM KCl, 38,4 mM NaCl, 0,5 mM (NH₄)₂CO₃ и 0,1 mM MgCl₂; pH= 7,0

- Раствор панкреатина концентрације 800 U/mL (састав: SIF, 2,5 mL свежје жучи (160 mM), 40 μ L CaCl₂ (0,3 M), 0,15 mL 1 M NaOH и 1,31 mL воде)); pH=7,0

Поступак: Симулација услова гасторинтестиналне дигестије састоји се из две фазе, симулације желудачних услова и симулације интестиналних услова. Свежи узорци коре и пулпе дивљих јабука, као и целих малина (1,0 g), претходно хомогенизовани у кухињском блендеру, помешани су са 10 mL SSF (pH=7,0). Затим, да би се симулирали услови у желуцу, у 10 mL смеше узорака додато је 7,5 mL SGF, раствора електролита (pH=3,0). У ову смешу је даље додато 1,6 mL раствора пепсина слугокоже желуца свиња (25 000 U mL⁻¹, у SGF), 5 μ L 0,3 M CaCl₂, 0,2 mL 1 M HCl (да би се достигла pH=3,0) и 0,695 mL воде. Тест епрувете са добијеним смешама су инкубирани у воденом купатилу са уграђеном мешалицом на температури од 37 °C, у временском периоду од 2 h. Током дигестије, pH је поново подешена помоћу 1 M HCl. За симулацију интестиналне фазе, 20 mL желудачног садржаја је помешано са 11 mL раствора електролита SIF-а. У ову смешу је такође додат и раствор панкреатина (концентрације 800 U/mL), направљен у SIF-у, 2,5 mL свежје жучи (160 mM), 40 μ L CaCl₂ (0,3 M), 0,15 mL 1 M NaOH (да би се досегла pH=7,0) и 1,31 mL воде. Тест епрувете са овако припремљеним смешама су инкубирани у воденом купатилу са могућношћу мешања узорака, у периоду од 2 h, на температури од 37 °C. Током интестиналне дигестије, pH је поново подешена помоћу 1 M NaOH. Тест епрувете са контролним узорцима су припремљене на исти начин, али без додатка узорака коре и пулпе јабуке, односно узорка малине. Током процеса дигестије, узорци потребни за HPLC анализу су узимани 0, 1, 2, 3 и 4 h од почетка експеримента и залеђени до даље анализе.

4.6. Синтетичка модификација неких фенолних киселина

Синтетичка модификација неких фенолних киселина извршена је у циљу могућности побољшања њихових биолошких активности, пре свега побољшања

антиоксидативног потенцијала. У ову сврху, карбоксилна група фенолних киселина је модификована и синтетички су добијене две серије једињења, 1,2,4-триазол-3-тиони и 1,3,4-оксадиазоли.

4.6.1. Поступак за синтезу 1,2,4-триазол-3-тиона

Смеси одговарајућих фенолних киселина **1a-i** (1,00 mmol за **1a-f,h,i** и 4,00 mmol за **1g**) у сувом дихлорметану (4,0 ml за **1a-f,h,i** и 8,0 ml за **1g**), полако је додаван тионил хлорид (SOCl_2) (0,3 mL, 4,00 mmol за **1a-f,h,i** и 1,2 mL, 16,00 mmol за **1g**), уз додатак две капи диметилформамида. Добијена смеша је мешана 2 h на собној температури. Након тога, растварач је упарен под сниженим притиском и вишак SOCl_2 је уклоњен азеотропном дестилацијом са толуеном. У формирани киселински хлорид (**2a-i**), додати су тиосемикарбазид (0,109 g, 1,20 mmol за **2a-f,h,i** и 0,436 g, 4,80 mmol за **2g**) и суви тетраhydroфуран (10,0 mL), и добијена смеша је мешана 24 h на собној температури (изузев за **2e**, где је смеша рефлугована 6 h). Након тога, растварач је упарен под сниженим притиском, изузев за **3g**, који је изолован филтрацијом и осушен (0,668 g, 2,94 mmol), додат је водени раствор натријум хидроксида (1,8 M, 18,37 mmol за **3a-f,h,i** и 0,9 M, 27,05 mmol за **3g**), и раствор затим рефлугован 3 h. Након хлађења, раствор је закишељен додатком 2 M HCl (изузев за **4f** и **4g**, где је коришћена концентрована HCl), док није постигнута pH=1, што је праћено формирањем талога. У случају **4a**, **4d** и **4e**, 15 mL H_2O је додато пре закишељавања, у циљу уклањања могућих трагова полазне фенолне киселине, због њихове боље стабилности у поређењу са крајњим производом (триазолима). Ова смеша је остављена преко ноћи на 4 °C и једињења **4a-i** су профилирани и осушена преко CaCl_2 . Једињења **4a** и **4e** су захтевала даље пречишћавање прекристализацијом из врућег етанола. Поступак синтезе 1,2,4-триазол-3-тиона дат је на *Схеми 10*.

5-(2-Хидроксифенил)-2H-1,2,4-триазол-3(4H)-тион (**4a**): Бела прашкаста супстанца; принос: 0,10 g (53%); T.T.: > 250 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): 6,88-7,01, (m, 2H, Ar-H); 7,30-7,39, (m, 1H, Ar-H); 7,63, (dd, 1H, $J = 7,8$ и 1,6 Hz, Ar-H); 10,25, (s,

1H, OH); 13,21, (s, 1H, NH); 13,70, (s, 1H, NH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): 112,00, 116,69, 119,61, 128,41, 132,11, 149,46, 155,73, 166,33; IR (KBr, cm⁻¹): 3192; 3092; 2917; 1622; 1595; 1567; 1246; 829; Израчунато: C₈H₇N₃OS (193,23 g/mol): C, 49,73; H, 3,65; N, 21,75; S, 16,60; Нађено: C, 49,59; H, 3,64; N, 21,69; S, 16,54.

5-(3-Хидроксифенил)-2H-1,2,4-триазол-3(4H)-тион × 1,5 H₂O (**4b**): Бела прашкаста супстанца; принос: 0,13 g (58%); Т.Т.: > 250 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 6,90, (dt, 1H, J = 7,0 и 2,4 Hz, Ar-H); 7,25-7,35, (m, 3H, Ar-H); 9,85, (s, 1H, OH); 13,63, (s, 1H, NH); 13,77, (s, 1H, NH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): 112,53, 116,59, 117,89, 126,69, 130,24, 150,41, 157,92, 167,12; IR (KBr, cm⁻¹): 3495; 3417; 3120; 2871; 1603; 1578; 1477; 1265; 879; Израчунато: C₈H₇N₃OS×1,5H₂O (220,25 g/mol): C, 43,63; H, 4,58; N, 19,08; S, 14,56; Нађено: C, 43,57; H, 4,60; N, 19,02; S, 14,51.

5-(4-Хидроксифенил)-2H-1,2,4-триазол-3(4H)-тион × 2 H₂O (**4c**): Бела прашкаста супстанца; принос: 0,12 g (51%); Т.Т.: > 250 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 6,86, (d, 2H, J_{AB} = 8,6 Hz, Ar-H), 7,73, (d, 2H, J_{BA} = 8,6 Hz, Ar-H); 10,08, (s, 1H, OH); 13,48, (s, 1H, NH); 13,59, (s, 1H, NH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): 115,90 (2C), 116,46, 127,53 (2C), 150,54, 159,67, 166,68; IR (KBr, cm⁻¹): 3431; 3136; 2934; 1617; 1579; 1521; 1455; 1221; 844; Израчунато: C₈H₇N₃OS×2H₂O (229,26 g/mol): C, 41,92; H, 4,84; N, 18,33; S, 13,99; Нађено: C, 41,85; H, 4,82; N, 18,26; S, 14,03.

5-(4-Хидрокси-3-метоксифенил)-2H-1,2,4-триазол-3(4H)-тион × 1,5 H₂O (**4d**): Бела прашкаста супстанца; принос: 0,15 g (61%); Т.Т.: 249 - 250 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 3,81, (s, 3H, CH₃); 6,86, (d, 1H, J = 8,0 Hz, Ar-H), 7,35, (d, 1H, J = 8,0 Hz, Ar-H); 7,46, (s, 1H, Ar-H); 9,65, (s, 1H, OH); 13,50, (s, 1H, NH); 13,59, (s, 1H, NH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): 55,84, 109,87, 115,95, 116,62, 119,07, 147,98, 149,01; 150,57; 166,67; IR (KBr, cm⁻¹): 3473; 3148; 2965; 1613; 1606; 1576; 1519; 1481; 1250; 860; Израчунато: C₉H₉N₃O₂S×1,5H₂O (250,28 g/mol): C, 43,19; H, 4,83; N, 16,79; S, 12,82; Нађено: C, 43,28; H, 4,81; N, 16,73; S, 12,78.

5-(3-Хидрокси-4-метоксифенил)-2H-1,2,4-триазол-3(4H)-тион (**4e**): Прашкаста супстанца беж боје; принос: 0,12 g (53%); Т.Т.: > 250 °C; ¹H NMR (200 MHz,

DMSO- d_6): 3,81, (s, 3H, CH₃); 7,02, (d, 1H, J = 8,2 Hz, Ar-H), 7,31, (d, 1H, J = 2,2 Hz, Ar-H); 7,35, (dd, 1H, J = 8,2 и 2,2 Hz, Ar-H); 9,39, (s, 1H, OH); 13,50, (s, 1H, NH); 13,62, (s, 1H, NH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 55,83, 112,35, 112,77, 117,56, 118,22, 146,95, 149,96, 150,40; 166,82; IR (KBr, cm⁻¹): 3423; 3059; 2915; 1624; 1600; 1573; 1518; 1487; 1264; 813; Израчунато: C₉H₉N₃O₂S (223,26 g/mol): C, 48,42; H, 4,06; N, 18,82; S, 14,36; Нађено: C, 48,55; H, 4,07; N, 18,75; S, 14,31.

5-(2,3-Дихидроксифенил)-2H-1,2,4-триазол-3(4H)-тион × H₂O (**4f**): Прашката супстанца светло браон боје; принос: 0,13 g (58%); Т.Т.: > 250 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 6,75, (t, 1H, J = 7,8 Hz, Ar-H), 6,91, (dd, 1H, J = 7,8 и 1,6 Hz, Ar-H); 7,11, (dd, 1H, J = 7,8 and 1,6 Hz, Ar-H); 9,40, (s, 1H, OH); 9,63, (s, 1H, OH); 13,36, (s, 1H, NH); 13,73, (s, 1H, NH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 112,25, 117,86, 118,19, 119,70, 144,52, 146,12; 149,86; 166,22; IR (KBr, cm⁻¹): 3569, 3446; 3128; 2921; 1627; 1604; 1575; 1504; 1472; 1250; 823; Израчунато: C₈H₇N₃O₂S×H₂O (227,24 g/mol): C, 42,28; H, 3,99; N, 18,49; S, 14,11; Нађено: C, 42,19; H, 4,00; N, 18,42; S, 14,06.

5-(2,4-Дихидроксифенил)-2H-1,2,4-триазол-3(4H)-тион × 2 H₂O (**4g**): Прашката супстанца беж боје; принос: 0,14 g (55%); Т.Т.: > 250 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 6,35, (dd, 1H, J = 8,4 и 2,2 Hz, Ar-H), 6,40, (d, 1H, J = 2,2 Hz, Ar-H); 7,47, (d, 1H, J = 8,4 Hz, Ar-H); 9,94, (s, 1H, OH); 10,09, (s, 1H, OH); 12,98, (s, 1H, NH); 13,54, (s, 1H, NH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 103,00, 103,25, 107,89, 129,21, 149,94, 157,29; 160,96; 165,83; IR (KBr, cm⁻¹): 3521, 3474; 3112; 2928; 1640; 1607; 1577; 1526; 1442; 1147; 859; Израчунато: C₈H₇N₃O₂S×2H₂O (245,26 g/mol): C, 39,50; H, 3,73; N, 17,28; S, 13,18; Нађено: C, 39,35; H, 3,74; N, 17,33; S, 13,14.

5-(3,4- Дихидроксифенил)-2H-1,2,4- триазол -3(4H)- тион × 3 H₂O (**4h**): Прашката супстанца беж боје; принос: 0,16 g (59%); Т.Т.: > 250 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 6,81, (d, 1H, J = 8,2 Hz, Ar-H), 7,20, (dd, 1H, J = 8,2 и 2,0 Hz, Ar-H); 7,28, (d, 1H, J = 2,0 Hz, Ar-H); 9,32, (s, 1H, OH); 9,58, (s, 1H, OH); 13,44, (s, 1H, NH); 13,54, (s, 1H, NH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 113,17, 115,88, 116,76, 117,80, 145,76, 148,11; 150,68; 166,63; IR (KBr, cm⁻¹): 3516, 3370; 3117; 2929; 1627; 1610;

1587; 1524; 1485; 1268; 1192; 807; Израчунато: $C_8H_7N_3O_2S \times 3H_2O$ (263,27 g/mol): C, 36,50; H, 4,98; N, 15,96; S, 12,18; Нађено: C, 36,45; H, 4,97; N, 15,98; S, 12,14.

5-(3,5- Дихидроксифенил)-2H-1,2,4- триазол -3(4H)- тион $\times 3 H_2O$ (**4i**): Сива прашкаста супстанца; принос: 0,14 g (55%); Т.Т.: > 250 °C; 1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 6,36, (t, 1H, $J = 2,0$ Hz, Ar-H), 6,75, (d, 2H, $J = 2,0$ Hz, Ar-H); 9,63, (s, 2H, OH); 13,57, (s, 1H, NH); 13,67, (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 104,15 (2C), 104,89, 127,00, 150,56, 158,91 (2C), 166,97; IR (KBr, cm^{-1}): 3501, 3438; 3196; 2922; 1618; 1613; 1582; 1527; 1491; 1247; 1167; 843; Израчунато: $C_8H_7N_3O_2S \times 3H_2O$ (263,27 g/mol): C, 36,50; H, 4,98; N, 15,96; S, 12,18; Нађено: C, 36,64; H, 4,96; N, 15,91; S, 12,14.

4.6.2. Синтеза 1,3,4-оксадиазола

4.6.2.1. Поступак за синтезу хидразида

Смеша одговарајуће ароматичне киселине **1a-h** (16,00 mmol) и H_2SO_4 (0,7 mL) у метанолу (10 mL), рефлугована је 5 h. Након испаравања метанола, додата је вода и добијени естар је екстрахован помоћу етил ацетата (3 x 15 mL). Органски слој је испран са $NaHCO_3$ (15 mL) и H_2O (15 mL), осушен преко Na_2SO_4 , профильтриран и упарен у вакууму, дајући одговарајуће естре **2a-h**. Естар одговарајуће ароматичне киселине **2a-h** (8,00 mmol) и хидразин хидрат (1,2 mL, 24,00 mmol) у етанолу (30 mL) су рефлуговани 12 h. Након тога, растварач је упарен, додата је мала количина воде (2 mL) и суспензија је профильтрирана, дајући хидразиде (једињења **5a-h**). Поступак синтезе хидразида дат је на *Схеми 15*.

4.6.2.2. Поступак за синтезу 1,3,4-оксадиазола

Смеси одговарајућих ароматичних киселина **3a-h** (1,00 mmol) у сувом дихлорметану (4,0 mL), полако је додаван $SOCl_2$ (0,3 mL, 4,00 mmol), уз додатак две капи диметилформаида. Добијена смеша је након тога мешана 2 h на собној температури. Даље, растварач је упарен под сниженим притиском, и вишак $SOCl_2$ уклоњен азеотропном дестилацијом са толуеном. Формираном киселинском

хлориду **4a-h** (1,00 mmol), додати су одговарајући киселински хидразид **5a-h** (1,30 mmol) и суви тетраhydroфуран (10,0 mL), и добијена смеша је након тога мешана на собној температури 6 h. Растварач је даље упарен под сниженим притиском, додата је мала количина воде (2 mL) и формирани талог (**6a-h**) је изолован филтрацијом и осушен преко CaCl_2 . Смеша **6a-h** (1,00 mmol) у SOCl_2 (6,00 mL) је након тога рефлугована 6 h. Након хлађења, раствору је додат лед и формирана суспензија је мешана на собној температури 30 min и остављена преко ноћи на 4 °C, након чега су добијена једињења **7a-h** даље профилтрирана и осушена преко CaCl_2 . Крајње добијена једињења **7a-h** су захтевала даље пречишћавање прекристализацијом из врућег раствора 45% етанола. Поступак синтезе диацилхидразина и 1,3,4-оксадиазола приказан је на *Схеми 14*.

N'-Бензоил-2-хидроксibenзохидразид $\times 0,5 \text{ H}_2\text{O}$ (**6a**) Бела прашкаста супстанца; принос: 0,24 g (89%); Т.Т.: >250 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): 6,92-7,00, (m, 2H, Ar-H); 7,43-7,62, (m, 4H, Ar-H); 7,93, (dd, 3H, $J = 7,9$ и 1,2 Hz, Ar-H); 10,69, (s, 2H, NH); 11,95, (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO-d_6): 114,7, 117,5, 119,1, 127,6 (2C), 128,4, 128,6 (2C), 132,0, 132,8, 134,2, 159,4, 165,7, 167,8; IR (KBr, cm^{-1}): 3304; 3058; 1657; 1635; 1548; 1480; 1283; 759; Израчунато: $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3 \times 0,5\text{H}_2\text{O}$ (265,27 g/mol): C, 63,39; H, 4,94; N, 10,56; Нађено: C, 63,53; H, 4,92; N, 10,60.

N'-Бензоил-3-хидроксibenзохидразид $\times 0,5\text{H}_2\text{O}$ (**6b**) Прашкаста супстанца беж боје; принос: 0,20 g (74%); Т.Т.: >250 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): 6,97, (dt, 1H, $J = 7,4$ и 2,2 Hz, Ar-H); 7,30-7,34, (m, 3H, Ar-H); 7,47- 7,60, (m, 3H, Ar-H); 7,92, (dd, 2H, $J = 8,0$ и 1,6 Hz, Ar-H); 9,76, (s, 1H, OH); 10,40, (d, $J = 1,0$ Hz, 1H, NH); 10,47, (d, $J = 1,0$ Hz, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO-d_6): 114,6, 118,0, 118,8, 127,5 (2C), 128,5 (2C), 129,6, 131,8, 132, 8, 134,2, 157,5, 165,9, 166,0; IR (KBr, cm^{-1}): 3245; 3067; 1614; 1586; 1508; 1476; 1307; 749; Израчунато: $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3 \times 0,5\text{H}_2\text{O}$ (265,27 g/mol): C, 63,39; H, 4,94; N, 10,56; Нађено: C, 63,42; H, 4,95; N, 10,54.

N'-Бензоил-4-хидрокси-3-метоксибензохидразид $\times 0,5\text{H}_2\text{O}$ (**6c**). Прашкаста супстанца беж боје; принос: 0,18 g (60%); Т.Т.: 219-220 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): 3,83, (s, 3H, CH_3); 6,86, (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 7,42-7,60, (m, 5H, Ar-

H); 7,92, (dd, 2H, $J = 7,4$ и $1,6$ Hz, Ar-H); 9,73, (s, 1H, OH); 10,28, (s, 1H, NH); 10,42, (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 55,8, 111,6, 115,1, 121,3, 123,6, 127,5 (2C), 128,5 (2C), 131,8, 132,9, 147,3, 150,2, 165,6, 166,0; IR (KBr, cm^{-1}): 3218; 3009; 1633; 1593; 1513; 1287; 690; Израчунато: $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4 \times 0,5\text{H}_2\text{O}$ (295,29 g/mol): C, 61,01; H, 5,12; N, 9,49; Нађено: C, 60,94; H, 5,14; N, 9,47.

N'-Бензоил-2,3-дихидроксибензохидразид $\times 0,5\text{H}_2\text{O}$ (**6d**). Бела прашкаста супстанца; принос: 0,23 g (82%); Т.Т.: 226-227 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 6,76, (t, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar-H); 6,99, (dd, 1H, $J = 7,8$ и $1,2$ Hz, Ar-H); 7,39, (dd, 1H, $J = 8,0$ и $1,2$ Hz, Ar-H); 7,49-7,66, (m, 1H, Ar-H); 7,93, (dd, 2H, $J = 7,4$ и $1,6$ Hz, Ar-H); 9,38, (s, 1H, OH); 10,64, (s, 1H, NH); 10,72, (s, 1H, NH); 11,96, (s, 1H, OH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 114,3, 117,7, 118,6, 119,5, 127,6 (2C), 128,6 (2C), 132,0, 132,5, 146,3, 149,2, 165,8, 168,9; IR (KBr, cm^{-1}): 3434; 3224; 3057; 1636; 1602; 1579; 1535; 1310; 1265; 737; Израчунато: $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4 \times 0,5\text{H}_2\text{O}$ (281,27 g/mol): C, 59,78; H, 4,66; N, 9,96; Нађено: C, 59,73; H, 4,67; N, 9,93.

N'-Бензоил-3,4-дихидроксибензохидразид $\times 1,5\text{H}_2\text{O}$ (**6e**). Прашкаста супстанца беж боје; принос: 0,17 g (57%); Т.Т.: 166-167 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 6,80, (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 7,29, (d, 1H, $J = 8,2$ and $2,0$ Hz, Ar-H); 7,34, (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, Ar-H); 7,46-7,59, (m, 3H, Ar-H); 7,91, (dd, 2H, $J = 7,2$ и $1,6$ Hz, Ar-H); 9,25, (s, 1H, OH); 9,59, (s, 1H, OH); 10,16, (s, 1H, NH); 10,36, (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 115,1, 115,5, 119,5, 123,9, 127,5 (2C), 128,5 (2C), 131,8, 132,9; 145,1, 149,0, 165,9, 166,0; IR (KBr, cm^{-1}): 3215; 3055; 1618; 1600; 1576; 1516; 1489; 1296; 688; Израчунато: $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4 \times 1,5\text{H}_2\text{O}$ (299,28 g/mol): C, 56,38; H, 4,73; N, 9,32; Нађено: C, 56,40; H, 4,74; N, 9,34.

N'-Бензоил-3,5-дихидроксибензохидразид (**6f**). Прашкаста супстанца светло беж боје; принос: 0,23 g (84%); Т.Т.: >250 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 6,41, (t, 1H, $J = 2,2$ Hz, Ar-H); 6,75, (d, 2H, $J = 2,2$ Hz, Ar-H); 7,47-7,60, (m, 3H, Ar-H); 7,91, (dd, 2H, $J = 8,0$ and $1,6$ Hz, Ar-H); 9,56, (s, 2H, OH); 10,26, (s, 1H, NH); 10,41, (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 105,8 (3C), 127,5 (2C), 128,5 (2C), 131,8, 132,8, 134,9; 158,5 (2C); 165,8; 166,2; IR (KBr, cm^{-1}): 3340, 3198; 1676; 1649; 1599; 1541; 1501;

1160; 706; Израчунато: $C_{14}H_{12}N_2O_4$ (272,26 g/mol): C, 61,76; H, 4,44; N, 10,29; Нађено: C, 61,73; H, 4,45; N, 10,31.

3,4-Дихидрокси-N'-(2-хидроксибензоил)бензохидразид $\times 1,5H_2O$ (**6g**). Прашката супстанца беж боје; принос: 0,28 g (88%); Т.Т.: $>250^\circ C$; 1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 6,81, (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 6,91-6,99, (m, 2H, Ar-H); 7,29, (dd, 1H, $J = 8,2$ and 2,0 Hz, Ar-H); 7,34, (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, Ar-H); 7,46, (td, 1H, $J = 8,0$ and 1,6 Hz, Ar-H); 7,92, (dd, 1H, $J = 8,0$ и 1,6 Hz, Ar-H); 9,27, (s, 1H, OH); 9,63, (s, 1H, OH); 10,32, (s, 1H, NH); 10,58, (s, 1H, NH); 12,03, (s, 1H, OH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 114,7, 115,2, 115,4, 117,5, 119,1, 119,6, 123,5, 128,3, 134,2, 145,1, 149,2, 159,5, 165,6, 168,0; IR (KBr, cm^{-1}): 3288, 3055; 2956; 1638; 1605; 1526; 1489; 1302; 1219; 754; Израчунато: $C_{14}H_{12}N_2O_5 \times 1,5H_2O$ (315,28 g/mol): C, 53,34; H, 4,80; N, 8,88; Нађено: C, 53,35; H, 4,79; N, 8,90.

N'-(3,5-Дихидроксибензоил)-3,4-дихидроксибензохидразид $\times 0,5H_2O$ (**6h**). Прашката супстанца беж боје; принос: 0,19 g (62%); Т.Т.: $>250^\circ C$; 1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 6,39, (t, 1H, $J = 2,2$ Hz, Ar-H); 6,73, (d, 1H, $J = 2,2$ Hz, Ar-H); 6,79, (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 7,27, (dd, 1H, $J = 8,2$ и 2,0 Hz, Ar-H); 7,33, (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, Ar-H); 9,24, (s, 1H, OH); 9,54, (s, 2H, OH); 9,58, (s, 1H, OH); 10,06, (s, 1H, NH); 10,11, (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 105,7, 105,8 (2C), 115,1, 115,5, 119,5, 124,0, 135,1, 145,1, 149,0, 158,4 (2C), 165,7, 166,3; IR (KBr, cm^{-1}): 3385; 3279; 1598; 1508; 1299; 1168; 859; Израчунато: $C_{14}H_{12}N_2O_6 \times 0,5H_2O$ (313,27 g/mol): C, 53,68; H, 4,18; N, 8,94; Нађено: C, 53,66; H, 4,19; N, 8,92.

2-(5-Фенил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)фенол (**7a**). Бела прашката супстанца; принос: 0,16 g (66%); Т.Т.: $158-159^\circ C$; 1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 7,01-7,14, (m, 2H, Ar-H); 7,45-7,54, (m, 1H, Ar-H); 7,61-7,68, (m, 3H, Ar-H); 7,93, (dd, 1H, $J = 7,4$ и 1,6 Hz, Ar-H); 8,08-8,13, (m, 2H, Ar-H); 10,34, (s, 1H, OH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 109,6, 117,3, 119,9, 123,4, 126,8 (2C), 128,9, 129,6 (2C), 132,2, 133,6, 156,5, 163,5, 163,7; IR (KBr, cm^{-1}): 3444; 3206; 1624; 1593; 1542; 1489; 1254; 1240; 709; Израчунато: $C_{14}H_{10}N_2O_2$ (238,25 g/mol): C, 70,58; H, 4,23; N, 11,76; Нађено: C, 70,56; H, 4,22; N, 11,74.

3-(5-Фенил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)фенол $\times$ 0,5H₂O (**7b**). Прашката супстанца беж боје; принос: 0,14 g (56%); Т.Т.: 179-180 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 7,04, (dq, 1H, *J* = 8,2, 2,4 и 1,0 Hz, Ar-H); 7,43, (t, 1H, *J* = 7,8 Hz, Ar-H); 7,51, (t, 1H, *J* = 2,0 Hz, Ar-H); 7,57, (dt, 1H, *J* = 7,8 and 1,2 Hz, Ar-H); 7,62-7,66, (m, 3H, Ar-H); 8,09-8,14, (m, 2H, Ar-H); 10,02, (s, 1H, OH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): 113,2, 117,5, 119,3, 123,5, 124,5, 126,8 (2C), 129,5 (2C), 130,7, 132,1, 158,1, 164,0, 164,2; IR (KBr, cm⁻¹): 3263; 3051; 1604; 1562; 1550; 1459; 1227; 726; Израчунато: C₁₄H₁₀N₂O₂ $\times$ 0,5H₂O (247,25 g/mol): C, 68,01; H, 4,48; N, 11,33; Нађено: C, 68,04; H, 4,47; N, 11,35.

2-Метокси-4-(5-фенил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)фенол $\times$ 2,5H₂O (**7c**). Сива прашката супстанца; принос: 0,17 g (53%); Т.Т.: 162-163 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 3,90, (s, 3H, CH₃); 6,99, (d, 1H, *J* = 8,8 Hz, Ar-H); 7,58-7,65, (m, 5H, Ar-H); 8,11-8,15, (m, 2H, Ar-H); 9,99, (s, 1H, OH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): 56,0, 110,4, 114,4, 116,2, 120,7, 123,6, 126,6 (2C), 129,5 (2C), 131,9, 148,3, 150,6, 163,5, 164,4; IR (KBr, cm⁻¹): 3432; 3204; 1600; 1502; 1432; 1288; 726; Израчунато: C₁₅H₁₂N₂O₃ $\times$ 2,5H₂O (313,31 g/mol): C, 57,50; H, 5,47; N, 8,94; Нађено: C, 57,53; H, 5,46; N, 8,96.

3-(5-Фенил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензен-1,2-диол (**7d**). Кристали беж боје; принос: 0,15 g (58%); Т.Т.: 172-173 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 6,88, (t, 1H, *J* = 7,8 Hz, Ar-H); 7,04, (dd, 1H, *J* = 7,8 and 1,6 Hz, Ar-H); 7,39, (dd, 1H, *J* = 7,8 and 1,6 Hz, Ar-H); 7,61-7,69, (m, 3H, Ar-H); 8,09-8,14, (m, 2H, Ar-H); 9,70, (s, 1H, OH); 9,77, (s, 1H, OH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): 109,7, 118,3, 119,0, 120,1, 123,4, 126, 8 (2C), 129,6 (2C), 132,2, 145,5, 146,4, 163,3, 164,0; IR (KBr, cm⁻¹): 3439; 3297; 1624; 1610; 1551; 1494; 1284; 727; Израчунато: C₁₄H₁₀N₂O₃ (254,24 g/mol): C, 66,14; H, 3,96; N, 11,02; Нађено: C, 66,15; H, 3,97; N, 11,00.

4-(5-Фенил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензен-1,2-диол $\times$ 2H₂O (**7e**). Прашката супстанца беж боје; принос: 0,16 g (56%); Т.Т.: 220-221 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 6,93, (d, *J* = 8,0 Hz, Ar-H); 7,45, (dd, 1H, *J* = 8,0 and 2,0 Hz, Ar-H); 7,50, (d, 1H, *J* = 2,0 Hz, Ar-H); 7,61-7,64, (m, 3H, Ar-H); 8,05-8,10, (m, 2H, Ar-H); 9,58, (s, 1H, OH); 9,86, (s, 1H, OH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): 113,8, 114,4, 116,4, 119,1, 123,7, 126,6 (2C), 129,5 (2C), 131,9; 146,0, 149,5, 163,4, 164,5; IR (KBr, cm⁻¹): 3421;

3253; 1608; 1506; 1448; 1296; 698; Израчунао: $C_{14}H_{10}N_2O_3 \times 2H_2O$ (290,28 g/mol): C, 57,92; H, 4,86; N, 9,65; Нађено: C, 57,90; H, 4,87; N, 9,63.

5-(5-Фенил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензен-1,3-диол (**7f**). Прашката супстанца светло жуте боје; принос: 0,19 g (71%); Т.Т.: >250 °C; 1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 6,46, (t, 1H, $J = 2,2$ Hz, Ar-H); 6,98, (d, 2H, $J = 2,2$ Hz, Ar-H); 7,62-7,66, (m, 3H, Ar-H); 8,06-8,11, (m, 2H, Ar-H); 9,84, (s, 2H, OH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 104,8 (2C), 106,2, 123,5, 124,7, 126,7 (2C), 129,5 (2C); 132,1; 159,3 (2C); 163,9; 164,3; IR (KBr, cm^{-1}): 3493, 3386; 3102; 1624; 1608; 1567; 1555; 1448; 1160; 853; Израчунао: $C_{14}H_{10}N_2O_3 \times H_2O$ (272,26 g/mol): C, 61,76; H, 4,44; N, 10,29; Нађено: C, 61,75; H, 4,43; N, 10,27.

4-(5-(2-Хидроксифенил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензен-1,2-диол $\times 0,5H_2O$ (**7g**). Прашката супстанца светло браон боје; принос: 0,22 g (78%); Т.Т.: >250 °C; 1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 6,94, (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 7,00-7,12, (m, 2H, Ar-H); 7,42, (dd, 1H, $J = 8,2$ и 1,6 Hz, Ar-H); 7,47-7,51, (m, 2H, Ar-H); 7,87, (dd, 1H, $J = 8,0$ и 1,0 Hz, Ar-H); 9,60, (s, 1H, OH); 9,86, (s, 1H, OH); 10,28, (s, 1H, OH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 109,7, 113,8, 114,2, 116,4, 117,2, 119,1, 120,0, 128,4, 133,3, 146,0, 149,6, 156,4, 162,9, 163,7; IR (KBr, cm^{-1}): 3435, 3204; 1615; 1595; 1517; 1491; 1451; 1301; 1253; 746; Израчунао: $C_{14}H_{10}N_2O_4 \times 0,5H_2O$ (279,25 g/mol): C, 60,21; H, 3,97; N, 10,03; Нађено: C, 60,23; H, 3,96; N, 10,05.

4-(5-(3,5-Дихидроксифенил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензен-1,2-диол $\times 2H_2O$ (**7h**). Прашката супстанца браон боје; принос: 0,18 g (57%); Т.Т.: >250 °C; 1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 6,43, (t, 1H, $J = 2,0$ Hz, Ar-H); 6,91-6,95, (m, 3H, Ar-H); 7,38, (d, 1H, $J = 8,2$ и 2,0 Hz, Ar-H); 7,45, (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, Ar-H); 9,58, (s, 1H, OH); 9,81, (s, 3H, OH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 104,57 (2C), 106,0, 113,7, 114,4, 116,4, 119,0, 125,0, 146,0, 149,5, 159,2 (2C), 163,6, 164,2; IR (KBr, cm^{-1}): 3237, 1605; 1573; 1505; 1453; 1285; 1162; 854; Израчунао: $C_{14}H_{10}N_2O_5 \times 2H_2O$ (322,27 g/mol): C, 52,18; H, 4,38; N, 8,69; Нађено: C, 52,16; H, 4,37; N, 8,70.

4.6.3. Мерења физичких особина 1,2,4-триазол-3-тиона, диацилхидразина и 1,3,4-оксадиазола

Тачке топљења свих синтетисаних једињења одређене су на Mel-Temp апарату, модел 1001, и нису кориговане. Елементарна анализа (C, H, N, S) свих једињења урађена је помоћу стандардних метода у Центру за Инструменталне анализе, Хемијског факултета у Београду. Инфрацрвени спектри снимани су на Perkin Elmer Spectrum One FT-IR спектрофотометру са KBr пилулом. Сви ^1H и ^{13}C нуклеарно-магнетно-резонанциони (NMR) спектри снимани су на Varian Gemini 2000 и Bruker Avance III 500 MHz спектрометрима. Хемијска померања дата су у односу на стандард, TMS (триметилсилан).

4.6.4. Метода цикличне волтаметрије за испитивање електрохемијског понашања 1,2,4-триазол-3-тиона и матичних фенолних киселина

Електрохемијско понашање 1,2,4-триазол-3-тиона и матичних фенолних киселина праћено је методом цикличне волтаметрије. Ови експерименти су изведени на VOLTALAB PST050 са диском од стакластог угљеника (GC-дискотом пречника 3 mm) као радном електродом, платинском (Pt) жицом као контра електродом и референтном каломеловом електродом (*енг.* Saturated Calomel Electrode, SCE). Сви потенцијали су мерени у односу на ову електроду. Мерења раствора фенолних киселина и триазола концентрације 0,5-1 mM је изведено у дестилованом диметилформамиду (DMF). Помоћни електролит био је 0,1 M тетрабутиламонијум перхлорат (TBAP) и LiClO_4 . Експерименти су изведени у инертној атмосфери добијеној пречишћавањем азота.

4.7. Испитивање антиоксидативног потенцијала плодова дивљег воћа и синтетички модификованих фенолних киселина

Антиоксидативна активност плодова дивље јабуке (коре и пулпе) испитана је коришћењем DPPH и ABTS метода, као и испитивањем способности

неутрализације NO, OH и супероксил анион радикала, и изражена као IC₅₀ вредност (µg/mL), која представља концентрацију испитиваног узорка која инхибира дејство слободних радикала за 50%. Добијени резултати су поређени са референтним антиоксидансима, који су познати по свом високом антиоксидативном потенцијалу, као што су аскорбинска киселина, бутиловани хидрокситолуен (BHT) и епигалокатехин галат.

Антиоксидативни потенцијал екстракта дивље малине тестиран је применом DPPH и ABTS метода, при чему су резултати изражени као еквиваленти тролокса у 100 g масе свежег узорка (µmol TE/100g CM).

Евалуација антиоксидативне активности плода дивљих трешања испитана је применом DPPH методе и резултати су изражени као IC₅₀ вредност (µg/mL).

Антиоксидативна активност полазних фенолних киселина и једне врсте синтетисаних једињења (1,2,4-триазол-3-тиона) испитана је DPPH методом и изражена као IC₅₀ вредност (µM), при чему су као референтни антиоксиданси коришћени аскорбинска киселина и нордихидрогвајаретинска киселина (NDGA). Антиоксидативни потенцијал 1,3,4-оксадиазола испитан је применом DPPH и ABTS метода, испитивањем способности неутрализације водоник-пероксида, као и праћењем њихове редуктивне активности и поређен са антиоксидативним потенцијалом полазних киселина и прекурсора крајњег производа. Резултати су изражени као IC₅₀ вредност (µM), а као референтни антиоксиданси су такође коришћени аскорбинска киселина и NDGA.

4.7.1. Испитивање способности неутрализације DPPH[•] радикала

Метода која се заснива на примени стабилног DPPH[•] (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил) радикала, једна је од најчешће коришћених метода за евалуацију способности неутралисања слободних радикала. У реакцији антиоксиданса са DPPH[•], овај радикал се преводи у 1,1-дифенил-2-(2,4,6-тринитрофенил)-хидразин (Схема 9). Степен деколоризације љубичасто обојеног раствора DPPH[•] радикала, који апсорбује на 517 nm, указује на потенцијал испитиваног антиоксиданса да неутралише слободне радикале.¹⁷³

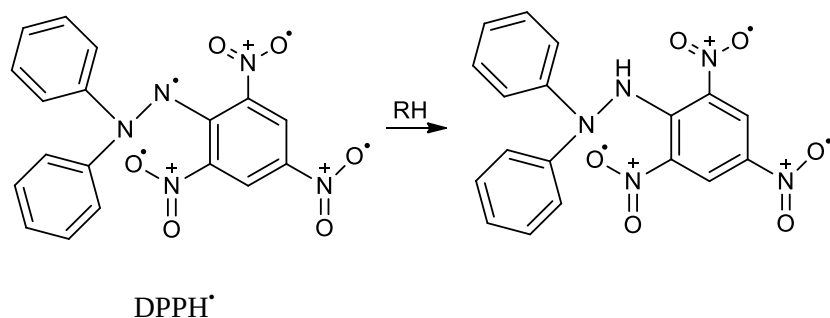


Схема 9. Неутрализација DPPH• радикала одговарајућим антиоксидансом

Раствори и реагенси:

- Испитивани екстракт дивљег воћа/раствор испитиваног једињења у метанолу одређене концентрације
- Раствор DPPH у метанолу, концентрације 80 µg/mL
- Раствор аскорбинске киселине (1 mg/mL)
- Раствор ВНТ-а (1 mg/mL)
- Раствор епигалокатехин галата (1 mg/mL)
- Раствор NDGA (1 mg/mL)
- Раствор тролокса (0,1 mg/mL)

Поступак: У циљу испитивања антиоксидативне активности дивљих јабука, екстракти коре и пулпе су лиофилизовани и припремљени тако да буду концентрације 2 mg/mL, растварањем у одговарајућој запремини метанола. Дуплим разблажењем, направљена је серија раствора различитих концентрација, па је по 1 mL раствора различитих концентрација помешан са 1 mL раствора DPPH. За испитивање способности екстракта дивље малине да неутралише DPPH радикал, узет је 1 mL екстракта (разблажен 10 пута) и у овај раствор је додат 1 mL раствора DPPH. За испитивање антиоксидативног потенцијала екстракта дивље трешње, припремљен је екстракт концентрације 10 mg/mL и од њега серија дуплих разблажења, а даљи поступак је исти као у случају дивљих јабука и малина. Антиоксидативни потенцијал полазних фенолних киселина и синтетисаних триазола и оксадиазола испитан је тако што је за свако једињење направљена серија

раствора (8 различитих концентрација, методом дуплог разблажења), узет по 1 mL сваког раствора, а након тога помешан са 1 mL раствора DPPH.

Након додавања раствора DPPH, добијене смеше су остављене у мраку, у периоду од 30 минута. Степен способности неутрализације DPPH радикала одређује се спектрофотометријски, мерењем апсорбанце узорака на 517 nm. Исти поступак, зависно од врсте испитиваних антиоксиданаса, примењен је за испитивање способности референтних антиоксиданаса (аскорбинске киселине, ВНТ-а, епигалокатехин галата и NDGA) да неутралишу DPPH радикал.

Израчунавање: Проценат инхибиције DPPH[•] се израчунава помоћу формуле:

$$\% \text{ инхибиције DPPH}^{\bullet} = \frac{A_k - A_y}{A_k} \cdot 100 \quad (36)$$

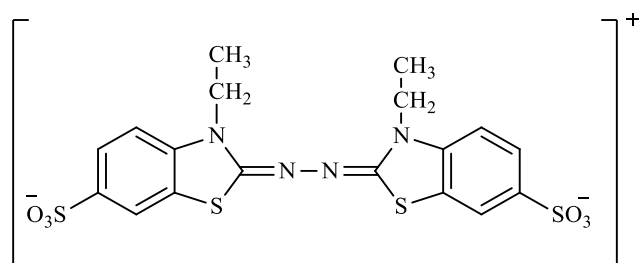
где је:

A_k - апсорбанца контроле, припремљена као и узорци, али се уместо испитиваног раствора додаје иста запремина метанола; A_y - апсорбанца узорка.

Концентрација испитиваног узорка која инхибира дејство слободних радикала за 50%, дефинисана као IC₅₀ вредност, израчуната је коришћењем криве зависности процента инхибиције од концентрације узорка. IC₅₀ вредности израчунате су преко сигмоидне „dose-response” криве поступком нелинеарне регресије, коришћењем софтвера за анализу података *OriginPro* 8. IC₅₀ вредности у случају испитивања антиоксидативне активности коре и пулпе дивљих јабука и дивљих трешања изражене су као µg сувог екстракта у mL раствора, а као µM, када је изражаван антиоксидативни потенцијал полазних фенолних киселина, триазола и оксадиазола. Способност екстракта дивље малине да неутралише DPPH радикал, изражена је у еквивалентима тролокса у 100 g масе свежег узорка (µmol TE/100g CM), коришћењем стандардне праве тролокса (зависност апсорбанце DPPH раствора од концентрације тролокса).

4.7.2. ABTS^{•+} радикал катјон метода

ABTS^{•+} (2,2'-азинобис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина)) радикалски катјон (Слика 28), има велику примену при одређивању антиоксидативног потенцијала испитиваних узорака. Метода се базира на спектрофотометријском мерењу степена деколоризације ABTS^{•+} радикала у присуству тестираног антиоксиданса. Раствор ABTS^{•+} радикала је зелене боје, релативно стабилан и одређивање се врши спектрофотометријски на 734 nm. Антиоксидативна активност испитиваних екстраката у овом раду тестирана је по методи коју су описали Ре (Re) и сарадници.¹⁷⁴



Слика 28. ABTS^{•+} радикал катјон

Раствори и реагенси:

- Испитивани екстракти дивљег воћа/раствор испитиваног једињења у метанолу одређене концентрације
- ABTS (2,2'-азинобис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) амонијум со)
- Метанол
- Калијум персулфат (K₂S₂O₈)
- Раствор аскорбинске киселине (1 mg/mL)
- Раствор ВНТ-а (1 mg/mL)
- Раствор епигалокатехин галата (1 mg/mL)

Поступак: ABTS^{•+} се добија реакцијом 7 mM воденог раствора ABTS са K₂S₂O₈ (2,45 mM) која се одвија у мраку, на собној температури, у периоду од 16 h.

Добијени раствор $ABTS^{++}$ је даље потребно разблажити метанолом, у циљу добијања раствора који спектрофотометријским мерењем даје апсорбанцу 0,7 на таласној дужини 734 nm. За тестирање антиоксидативне активности испитиваних узорака, потребно је припремити серије дуплих разблажења узорака и референтних стандардних антиоксиданаса (раствора екстракта, аскорбинске киселине, ВНТ-а и епигалокатехин галата). Аликвот од 100 μ L овако добијених раствора се даље меша са 900 μ L раствора $ABTS^{++}$ и добијена смеша се инкубира на собној температури у мраку у периоду од 30 min, и након тога мери апсорбанца на таласној дужини од 734 nm.

Израчунавање: Инхибиција $ABTS^{++}$ се израчунава према формули:

$$\% \text{ инхибиције } ABTS^{++} = \frac{A_k - A_y}{A_k} \cdot 100 \quad (38)$$

где је: A_k - апсорбанца контроле; A_y - апсорбанца узорка.

Као и у случају испитивања антиоксидативне активности применом DPPH методе, за израчунавање IC_{50} вредности (μ g/mL) коришћена је крива зависности процента инхибиције од концентрације екстракта.

4.7.3. Испитивање неутрализације $NO^{\bullet}$ радикала

За испитивање неутрализације $NO^{\bullet}$ радикала коришћена је метода коју су описали Грин (*Green*) и сарадници, а која се заснива на добијању NO радикала помоћу Грисовог (*Griess*) реагенса.¹⁷⁵

Раствори и реагенси:

- Раствор екстракта плода дивље јабуке (2 mg/mL, у метанолу)
- Грисов реагенс (1% сулфаниламид, 2% ортофосфорна киселина и 0,1% N-(1-нафтил)етилендиамин дихидрохлорид)
- 50 mM пуфер *PBS* (енг. Phosphate Buffer Saline, pH=7,4)

- 5 mM натријум нитропрусид ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$), растворен у 0,01 М PBS пуферу
- Раствор аскорбинске киселине (1 mg/mL)
- Раствор епигалокатехин галата (1 mg/mL)

Поступак: Од раствора узорака (екстракта и стандарних антиоксиданаса) прави се серија од 8 дуплих разблажења у метанолау. У аликвоте од 0,5 mL узорака, додаје се 0,5 mL натријум нитропрусида и овако добијена смеша инкубира 150 min на собној температури. Након инкубације, 1 mL Грисовог реагенса се додаје у 1 mL добијене реакционе смеше и инкубира додатних 30 min, такође на собној температури. Резултујућа смеша је пурпурно-розе боје и њена апсорбанца се мери спектрофотометријски, на 546 nm.

Израчунавање: Проценат инхибиције $\text{NO}^\bullet$ радикала се израчунава помоћу формуле:

$$\% \text{ инхибиције } \text{NO}^\bullet = \frac{A_k - A_y}{A_k} \cdot 100 \quad (38)$$

где је: A_k - апсорбанца контроле; A_y - апсорбанца узорка.

Резултати су изражени као IC_{50} вредност ($\mu\text{g/mL}$).

4.7.4. Испитивање неутрализације $\text{OH}^\bullet$ радикала

Способност неутрализације $\text{OH}^\bullet$ радикала тестирана је применом методе коју су описали Хинебург (*Hinneburg*) и сарадници.¹⁷⁶

Раствори и реагенси:

- Раствор екстракта плода дивље јабуке (у 0,2 М фосфатном пуферу; pH=7,4)
- 1 mM FeCl_3 (водени раствор)
- 1 mM аскорбинска киселина (у фосфатном пуферу)
- 1 mM EDTA (у фосфатном пуферу)
- 14 mM 2-деокси-D-рибоза (у фосфатном пуферу)

- 10 mM H₂O₂ (у фосфатном пуферу)
- Смеша 10% ТСА (трихлорсирћетна киселина) и 0,5% ТВА (тиобарбитурна киселина)

Поступак: Аликвот од 200 µL различитих концентрација екстракта и референтних антиоксиданаса, који су претходно растворени у фосфатном пуферу, меша се са 11 µL воденог раствора FeCl₃, 100 µL аскорбинске киселине, 100 µL EDTA, 200 µL 2-деокси-D-рибозе и 100 µL H₂O₂. Након инкубације добијене реакционе смеше на температури 37 °C, у трајању од 60 min, сваком узорку се додаје 1 mL смеше 10% ТСА и 0,5% ТВА. Овако добијена смеша се оставља у воденом купатилу на температури од 85 °C, у року од 30 min и апсорбанца раствора ружичасте боје се након тога мери на 535 nm.

Израчунавање: Проценат инхибиције •ОН радикала се израчунава помоћу формуле:

$$\% \text{ инхибиције } \bullet\text{OH} = \frac{A_k - A_y}{A_k} \cdot 100 \quad (39)$$

где је: A_к - апсорбанца контроле; A_у - апсорбанца узорка.

Резултати су изражени као IC₅₀ вредност (µg/mL).

4.7.5. Испитивање неутрализације O₂^{•-} радикала

Да би се одредила способност неутрализације супероксил радикал-анјона (O₂^{•-}), примењена је метода која су описали Нишикими (*Nishikimi*) и сарадници¹⁷⁷, уз мање модификације.¹⁷⁸

Раствори и реагенси:

- Раствор екстракта плода дивље јабуке у метанолу (концентрације 2 mg/mL)
- Раствор нитро-плаво тетразолијума (NBT), (156 µM, припремљен у 0,1 M фосфатном пуферу; pH=7,4)
- Раствор NADH (468 µM, припремљен у 0,1 M фосфатном пуферу; pH=7,4)

- Раствор феназин метосулфата (PMS) (60 μM , припремљен у 0,1 М фосфатном пуферу; pH=7,4)
- Раствор епигалокатехин галата (1 mg/mL)

Поступак: Од раствора узорака (екстраката и стандарда) прави се серија од 8 дуплих разблажења у метанолу. У 0,1 mL узорка се додаје 1 mL раствора NBT и 1 mL раствора NADH. Да би се реакција убрзала, у реакциону смешу се додаје 100 μL раствора PMS. Овако добијена смеша се инкубира 5 min на собној температури, а апсорбанца мери на 560 nm.

Израчунавање: Проценат инхибиције $\text{O}_2^{\bullet-}$ радикала се израчунава помоћу формуле:

$$\% \text{ инхибиције } \text{O}_2^{\bullet-} = \frac{A_k - A_y}{A_k} \cdot 100 \quad (40)$$

где је: A_k - апсорбанца контроле; A_y - апсорбанца узорка.

Резултати су изражени као IC_{50} вредност ($\mu\text{g/mL}$).

4.7.6. Испитивање способности неутрализације водоник-пероксида

За испитивање способности 1,3,4-оксадиазола и њихових прекурсора диацилхидразина да уклоне водоник-пероксид, коришћена је метода коју су претходно развили и описали Рух (Ruch) и сарадници.¹⁷⁹

Раствори и реагенси:

- Испитивани узорци 1,3,4-оксадиазола и диацилхидразина различитих концентрација
- Водоник-пероксид (40 mM)
- Фосфатни пуфер (pH=7,4)

Поступак: Реакциона смеша која садржи 0,6 mL H_2O_2 (40 mM) у 50 mM фосфатном пуферу (pH=7,4), додата је у 3,4 mL истог пуфера, који садржи различите концентрације испитиваних узорака. Након додатка пероксида, ова

смеша се снажно промућка и инкубира на собној температури у периоду од 10 минута. Након тога, мери се апсорбанца на таласној дужини 230 nm. Контролни узорак се састоји од фосфатног пуфера и водоник-пероксида, без додатка испитиваних узорака.

Израчунавање: Проценат инхибиције водоник-пероксида се рачуна по формули:

$$\% \text{ инхибиције } \text{H}_2\text{O}_2 = \frac{A_k - A_y}{A_k} \cdot 100 \quad (41)$$

где је:

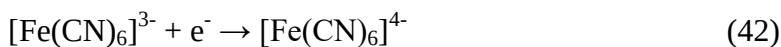
A_k - апсорбанца контроле; A_y - апсорбанца узорка

Антиоксидативни капацитет испитиваних једињења изражен је као IC_{50} вредност (концентрација једињења изражена у mM, потребна за редукцију 50% H_2O_2).

4.7.7. Испитивање способности редукције Fe^{3+} јона

Редуктивна активност коре и пулпе дивље јабуке, као и синтетисаних 1,3,4-оксадиазола и њихових прекурсора диацилхидразина испитана је применом методе коју су описали Паунал (Pownall) и сарадници, са мањим модификацијама.¹⁸⁰

Метода се заснива на следећим реакцијама:



Раствори и реагенси:

- Раствор 1,3,4-оксадиазола и диацилхидразина различитих концентрација
- 1 % раствор $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
- 50 mM фосфатни пуфер (pH=7,0)
- 10% трихлорсирћетна киселина (TCA)

- 0,1% FeCl₃
- Раствор аскорбинске киселине (1 mg/mL)

Поступак: Прави се серија дуплих разблажења узорка (раствора испитиваних узорка и аскорбинске киселине) у фосфатном пуферу. У 0,5 mL узорка се додаје 0,25 mL 1 % раствора K₃[Fe(CN)₆] и добијена смеша се затим инкубира на 50 °C у периоду од 20 min. Након инкубације, у 0,5 mL добијене смеше се додаје 0,5 mL ТСА (10%), 0,1 mL раствора FeCl₃ и 0,5 mL дестиловане воде. Овако настала смеша се инкубира 10 min на собној температури и апсорбанца се одмах мери на 700 nm, у односу на контролу.

Интензитет плаве боје је управо пропорционалан редукционој моћи антиоксиданса, тј. виша вредност апсорбанце указује на већу редуктивну активност. Аскорбинска киселина је коришћена као референтни стандард.

4.7.8. Испитивање способности редукције Фолин-Чиокалте реагенса

Способност синтетисаних 1,3,4-оксадиазола и њихових прекурсора диацилхидразина да редукују Фолин-Чиокалте реагенс је испитана према методи коју су описали Синглетон и Роси (*Singleton u Rossi*) (поступак описан у поглављу 4.3.1.).¹⁶⁴

4.8. Испитивање цитотоксичности синтетички модификованих фенолних киселина

4.8.1. Коришћена ћелијска култура

Раствори и реагенси:

- RPMI-1640 хранљиви медијум
- L-глутамин
- Стрептомицин
- Пеницилин

- Серум феталног говечета
- 4-(2-хидроксиетил)-1-пиперазинетан сулфонска киселина (*HEPES*)

Хумане здраве ћелије фибробласта плућа MRC-5 (American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)) су култивисане као монослојеви на температури од 37 °C у атмосфери ваздуха обогаћеног 5% CO₂ и засићеног воденом паром. Хранљиви медијум је био RPMI-1640, у који је додат L-глутамин (2 mM), стрептомицин (концентрација 100 µg/mL), пеницилин (100 IU/mL), серум феталног говечета (10%, термички инактивиран на 56 °C) и *HEPES* (25 mM), а pH је подешена на 7,2 помоћу бикарбонатног раствора.

4.8.2. МТТ тест преживљавања ћелија

Раствори и реагенси:

- 10 mM раствор испитиваних једињења у диметил сулфоксиду (*DMSO*)
- Раствор 3-(4,5-диметилтриазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромида (*MTT*) концентрације 5 mg/mL у фосфатном пуферу (*PBS*)
- Раствор натријум додецил сулфата (*SDS*) концентрације 100 g/L

Поступак: MRC-5 здраве ћелије фибробласта плућа (5 000 ћелија по удубљењу) засејане су у микротитарске плоче са 96 удубљења са равним дном и 20 h касније, након пријањања ћелија, пет концентрација испитиваних једињења додато је у удубљења микротитарске плоче са ћелијама (опсег концентрација 12,5 µM - 200 µM). Уместо испитиваних једињења, хранљиви медијум додат је у ћелије у контролним удубљењима. Основни раствор испитиваних једињења, концентрације 10 mM, припремљен је у *DMSO*. Након третмана у трајању од 72 h, преживљавање MRC-5 ћелија је одређено применом МТТ теста, према методи описаној од стране Мосмана (*Mosmann*)¹⁸¹, уз мање модификације.¹⁸² 10 µL раствора МТТ додато је у свако удубљење са испитиваном ћелијском линијом. Узорци су инкубирани 4 h на 37 °C у атмосфери 95% ваздух/5% CO₂ (v/v). Након тога, 100 µL *SDS*-а је додато у удубљења да би се омогућило растварање нерастворног формазанског производа

који настаје конверзијом МТТ боје у живим ћелијама. Апсорбанца је мерена након 24 h на 570 nm. Број живих ћелија у сваком удубљењу микротитарске плоче пропорционалан је интензитету апсорбанце светлости, која је очитана на ELISA (енг. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) читачу.

Израчунавање: Проценат ћелијског преживљавања израчунат је коришћењем следећег израза:

$$\% \text{ ћелијског преживљавања } = \frac{A_y}{A_k} \cdot 100 \quad (44)$$

где је: A_k - апсорбанца контроле (контролне ћелије чији је раст био само у присуству хранљивог медијума); A_y - апсорбанца узорка са ћелијским растом у присуству различитих концентрација испитиваних једињења.

У сваком експерименту, апсорбанца слепе пробе се увек одузима од апсорбанце одговарајућег узорка. Резултати су изражени као IC_{50} вредност, која је дефинисана као концентрација испитиваног једињења која инхибира ћелијски раст за 50% у односу на нетретирану контролу.

Сви експерименти су урађени у три понављања. Хемиотерапеутик цисплатина је коришћен као позитивна контрола. Коришћене хемикалије су добављене од произвођача Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

4.9. Мерење нивоа интрацелуларних ROS у MRC-5 ћелијској култури

24 h након третмана нетоксичним концентрацијама испитиваних диацилхидразина и 1,3,4-оксадиазола, третиране и контролне MRC-5 ћелије изложене су 30 mM 2',7'-дихлородихидрофлуоросцеин диацетату, раствореном у PBS-у, у трајању од 45 min на температури од 37 °C. Након тога, ћелије су испране PBS-ом и изложене су дејству раствора водоник-пероксида (концентрације 2,5 mM), у трајању од 30 min на 37 °C, да би се изазвало генерисање ROS. Након инкубације са H_2O_2 , узорци ћелија су испрани PBS-ом, сакупљени и измерен је интензитет зелене флуоресценције емитоване од стране насталог

дихлорофлуоресцеина на FACSCalibur проточном цитометру (BD Biosciences Franklin Lakes, NY, USA). Подаци (20 000 ћелија по узорку, за сваки узорак) анализирани су коришћењем CELLQuest софтвера (BD Biosciences). Примењене нетоксичне концентрације биле су 50 mM за диацилхидразине и 20 mM за 1,3,4-оксадиазоле.

4.9.1. Тестови за испитивање активности антиоксидативних ензима у MRC-5 ћелијској култури

MRC-5 ћелије (контролне и ћелије изложене нетоксичним концентрацијама испитиваних једињења у трајању 24 h) сакупљене су из посуда за култивисање, опране PBS-ом и центрифугиране на 1 500 x g, 10 минута, на температури од 4 °C. Сталожене ћелије поново су суспендоване у 0,5 mL PBS-а и затим сонификоване на леду, три пута у трајању по 30 секунди. Добијени екстракт је центрифугиран на 3000 x g, 15 минута, на 4 °C. Аликвоти добијеног супернатанта (протеински екстракт ћелија) коришћени су за испитивање ензимске активности. Концентрација протеина у екстрактима је одређена Бредфодовом (*Bradford*) методом, коришћењем BioRad припремљених тест хемикалија са говеђим серумским албумином као стандардом.¹⁸³

Активност глутатион редуктазе (EC 1.6.4.2) је мерена према методи коју су описали Фојер и Халивел (*Foyer и Halliwell*).¹⁸⁴ Мерење је вршено у медијуму који чине 0,025 mM фосфатни пуфер (pH=7,8), 0,5 mM глутатион дисулфид (GSSG), 0,12 mM NADPH-Na₄ и 50 mL екстракта протеина. Оксидација NADPH одређена је праћењем смањења апсорбанце на 340 nm. Ензимска активност глутатион редуктазе је изражена у mU/mg протеина, коришћењем екстинкционог коефицијента NADPH ($\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Једна ензимска јединица активности глутатион редуктазе се дефинише као 1 μM NADPH, који се трансформише у минути под стандардним условима.

Активност глутатион пероксидазе (EC 1.11.1.9) одређена је применом методе коју су описали Ротрук (*Rotruck*) и сарадници, са малим модификацијама.¹⁸⁵ Реакциона смеша (која се састоји од 0,4 mL 0,4 M натријум фосфатног пуфера

(pH=7,0), 0,1 mL 10 mM натријум азида, 0,2 mL 4 mM редукованог глутатиона, 0,1 mL 2,5 mM H₂O₂, 0,2 mL воде и 0,5 mL ензима), инкубирана је на 0, 30, 60 и 90 секунди. Реакција је прекинута додатком 0,5 mL 10% ТСА, и након центрифугирања, 2 mL супернатанта је додато у 3 mL фосфатног пуфера и 1 mL 2,2'-динитро-5,5'-дитио-добензоеве киселине (DTNB) (0,04% DTNB растворен у 1% натријум цитрату). Развијена боја је праћена спектрофотометријски на 412 nm и ензимска активност је изражена у mg глутатиона који се трансформише у току једног минута дејством глутатион пероксидазе по mg протеина.

Активност супероксид дисмутазе (EC 1.15.1.1) мерена је применом методе коју су описали Бешамп и Фридович (*Beuchamp* и *Fridovich*).¹⁸⁶ Протеински екстракт ћелија (50 µL) додат је у реакциону смешу (1,5 mL), која садржи 50 mM фосфатног пуфера (pH=7,0), 0,1 mM EDTA, 13 mM метионина, 2 mM рибофлавина и 75 mM NBT-а. У реакциону смешу рибофлавин је додат последњи, а након тога су узорци у киветама за тестирање измешани. Реакција је започета излагањем смеше хладној белој флуоресцентној светлости. Након 15 min, извор светлости је искључен, садржај у киветама за тестирање промућкан и апсорбанца мерена на 560 nm. Једна јединица ензимске активности је одређена као количина супероксид дисмутазе (SOD) која може да инхибира 50% формирања нитрита под испитиваним условима.

4.10. Испитивање механизма антиоксидативног дејства 1,2,4-триазол-3-тиона

Равнотежне геометрије свих истраживаних триазола и одговарајућих реактивних врста (радикал-катјона, радикала и анјона) оптимизоване су методом B3LYP-D3 у комбинацији са 6-311++G(d,p) базисним скупом. Овај функционал, који укључује дисперзионе корекције, које је предложио Грим (*Grimme*)¹⁸⁷, изабран је јер је доказано да успешно описује интератомске интеракције на кратким и средњим растојањима (≤ 5 Å), и очекује се да ће дати прецизније и поузданије резултате од уобичајених DFT (енг. Density Functional Theory) метода. Све структуре су оптимизоване на температури од 298 K, без икаквих геометријских ограничења. Геометрије свих испитаних врста верификоване су анализом

нормалног мода и потврђено је одсуство имагинарних фреквенци. Утицај метанола као растварача узет је у обзир при свим геометријским оптимизацијама и енергетским прорачунима помоћу *SMD* (енг. Solvation Model Density) солватационог модела¹⁸⁸ који је имплементиран у Gaussian 09.¹⁸⁹ *NBO* (енг. Natural Bond Orbital) анализа свих испитиваних врста извршена је коришћењем софтвера *NBO* 5.9.¹⁹⁰

За одређивање доминантног механизма антиоксидативног дејства, вредности термодинамичких параметара: BDE, IP, PDE, PA и ETE израчунате су коришћењем следећих једначина:

$$\text{BDE} = H(\text{Ar}-\text{O}^\bullet) + H(\text{H}^\bullet) - H(\text{ArO}-\text{H}) \quad (45)$$

где је $H(\text{Ar}-\text{O}^\bullet)$ енталпија феноксилног радикала, $H(\text{H}^\bullet)$ је енталпија водониковог атома, $H(\text{Ar}-\text{OH})$ је енталпија молекула фенолног једињења.

$$\text{IP} = H(\text{ArO}-\text{H}^{\bullet+}) + H(\text{e}^-) - H(\text{ArO}-\text{H}) \quad (46)$$

где $H(\text{Ar}-\text{OH}^{\bullet+})$ представља енталпију радикал-катјон фенолног једињења, а $H(\text{e}^-)$ енталпију електрона.

$$\text{PDE} = H(\text{Ar}-\text{O}^\bullet) + H(\text{H}^+) - H(\text{ArO}-\text{H}^{\bullet+}) \quad (47)$$

где је $H(\text{H}^+)$ је енталпија протона.

$$\text{PA} = H(\text{ArO}^-) + H(\text{H}^+) - H(\text{ArO}-\text{H}) \quad (48)$$

где је $H(\text{Ar}-\text{O}^-)$ је енталпија феноксидног анјона.

$$\text{ETE} = H(\text{Ar}-\text{O}^\bullet) + H(\text{e}^-) - H(\text{ArO}^-) \quad (49)$$

Пошто нема података о експерименталним вредностима за енталпије солватације протона и електрона, коришћене су израчунате вредности из литературе.¹⁹¹

4.11. Софтвери и статистичка обрада података

Експериментални дизајн оптимизације, анализа података и израчунавања функције прихватљивости изведени су коришћењем софтвера Design-Expert®, верзије 7.0.0 (Stat-Ease Inc., Минеаполис, Минесота, САД). *OriginPro* 8 (OriginLab, Масачусетс, САД), статистички софтвер, коришћен је за израчунавање IC_{50} вредности (концентрација испитиваног узорка која инхибира дејство слободних радикала за 50%), у тестовима за испитивање антиоксидативне активности, а израчуната је преко сигмоидне „*dose-response*” криве поступком нелинеарне регресије. Подаци добијени у овом раду су обрађени у статистичком програму за обраду података SPSS, верзија 13.0, за оперативни систем Windows. Сви резултати су изражени као средња вредност три мерења ($\pm$ стандардна девијација). Статистичке разлике одређене су употребом једноставне анализе варијансе (1-way analysis ANOVA) на нивоу значајности 0,05 ($p < 0,05$), 0,01 ($p < 0,01$) и 0,001 ($p < 0,001$).



Фенолна једињења, као саставни део многих биљних врста, имају значајну улогу у исхрани људи и важну улогу у очувању здравља човека. На основу прегледа литературних података, може се приметити да се значајно више пажње поклања испитивању хемијског састава, антиоксидативног потенцијала и других биолошких особина култивисаног биља. Ипак, и самоникле (дивље) биљне врсте могу бити значајан извор биолошки активних једињења, чији је садржај често или врло сличан или чак виши од њиховог садржаја у култивисаним врстама. Из тог разлога, један од циљева ове докторске дисертације било је испитивање одабраних врста дивљег воћа из фамилије Rosaceae (јабука, малина и трешња), при чему свака припада различитој подфамилија ове породице.

У овом поглављу докторске дисертације приказани су и дискутовани резултати оптимизације екстракционих услова за изоловање фенолних једињења из плода дивљих јабука, малина и трешања. Одређен је и укупан садржај фенолних једињења у наведеним врстама, а квантификација појединачних фенолних једињења извршена је применом HPLC методе. Антиоксидативна активност ових екстраката одређена је применом више различитих метода. Стабилност идентификованих фенолних једињења у узорцима дивљег воћа испитана је симулирањем услова *in vitro* гастроинтестиналне дигестије. Део ове докторске дисертације односи се на синтетичку модификацију одабраних фенолних киселина у циљу побољшања њихових биолошких активности, пре свега антиоксидативне.

5.1. Оптимизација екстракционих услова

У циљу добијања максималног садржаја биоактивних једињења, пре свега фенолних једињења из плодова дивље јабуке, малине и трешњебило је потребно одабрати најпогоднију методу екстракције ових једињења из биљног материјала, али и оптималне екстракционе услове одабране врсте екстракције. Прегледом литературних података и на основу расположивих ресурса, одабране су ултразвучна и микроталасна метода екстракције, које су се показале као најефикасније у изоловању фенолних једињења из биљног материјала ове врсте.

Садржај фенолних једињења у екстракту у великој мери зависи од врсте биљног материјала, утицаја спољне средине, пре свега климатских услова и типа земљишта, али веома значајан утицај има и примењена техника екстракције и услови под којима се она изводи. У зависности од садржаја фенолних једињења, испитивани екстракти воћа могу имати различит биолошки потенцијал. У циљу добијања максималног приноса укупних фенола (TPC), флавоноида (TFC), фенолних киселина (TPA) и антоцијана (TAC), четири променљиве (концентрација метанола, однос масе узорка и запремине растварача, време и температура екстракције) су оптимизоване применом статистичког експерименталног дизајна, коришћењем софтвера Design-Expert®. Избор растварача може бити од пресудног значаја за екстраховање већег садржаја фенолних једињења. Најчешће се користе органски растварачи, као што су метанол, етанол, ацетон и етилацетат. Фенолна једињења присутна у биљкама се веома разликују по поларности, па се због тога најчешће користе органски растварачи или њихове смеше са водом у циљу екстракције што ширег спектра фенолних једињења. Да би се разумео утицај концентрације метанола на екстракцију фенола, концентрација растварача је подешена на различите нивое, јер се смеше органских растварача са водом сматрају ефикаснијим од чистих растварача.²⁰¹ Температура и време екстракције, као и однос масе узорка према растварачу су фактори који утичу на ефикасност екстракције фенолних једињења, а досадашња испитивања су дала контрадикторне резултате у вези са солубилизацијом и деградацијом фитохемикалија.²⁰²

За испитивање променљивих које утичу на ефикасност екстракције, примењена је методологија одзива површине (*енг.* Response Surface Methodology, RSM). Коришћен је сложен, централни композитни дизајн (*енг.* Central Composite Design, CCD), и фракциони експериментални дизајн са три нивоа/четири фактора, као и шест понављања у централној тачки, за испитивање утицаја променљивих фактора на ефикасност екстракције укупних фенолних једињења, флавоноида, фенолних киселина и антоцијана. Независне променљиве су кодиране на три нивоа, најнижи, средњи и највиши (−1, 0 и +1), а сваки ниво је одабран на основу стабилности испитиваних фенолних једињења под условима ултразвучне/микроталасне екстракције. Комплетан експериментални дизајн

састојао се од 30 експерименталних тачака и променљивих чији је утицај на ефикасност екстракције испитиван.

Наведени подаци су искоришћени за добијање одзива површине прилагођавањем података полиномном моделу. Процењени су ефекти сваког фактора, као и интеракције између фактора на ефикасност екстракције. Најбитнија функција за централни композитни дизајн је приказана једначином:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j=1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (50)$$

где је:

Y - одзив екстракције (садржај укупних фенола, флавоноида, фенолних киселина, антоцијана), X_i и X_j - независне променљиве (концентрација растварача, однос масе узорка и запремине растварача, време и температура екстракције), k - број испитиваних променљивих ($k = 4$), $\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}$ и β_{ij} - регресиони коефицијенти одсечка, линеарни, квадратни и регресиони коефицијент интеракције, ε - грешка.

Сваки одзив у експерименталном дизајну је израчунат као укупна количина испитиваних фенолних једињења са нивоима изнад граница квантификације. Затим је израчунат регресиони коефицијент за сваку од комбинација независних променљивих, док је значајност модела одређена преко p - вредности која је израчуната из t - теста. Значај ефеката независних променљивих и њихов утицај на зависне променљиве је проверен анализом варијансе (ANOVA). Анализа варијансе је извршена да би се одредили индивидуални линеарни, квадратни и интеракциони коефицијенти регресије и подобност полиномне једначине за добијене одзиве, а процењена је помоћу корелационог коефицијента (R^2). У статистичком моделирању, обично се користи прилагођен R^2 , зато што се овај коефицијент увек смањује када се регресиона променљива елиминише из регресионог модела.²⁰³ Значај свих делова полиномне једначине анализиран је статистички, израчунавањем F вредности на $p < 0,05$, а софтвер Design Expert је коришћен за добијање тродимензионалних (3D) графика одзива површине. Избор најбољих услова за припрему екстраката је извршен коришћењем анализе вишеструких одзива (симултане анализе одзива), у складу са методологијом коју су описали

Дерингер и Суих (*Derringer & Suich*).²⁰⁴ Ова метода укључује трансформацију сваког предвиђеног одзива на бездимензионалну функцију делимичне прихватљивости, d_i , која се креће од 0, за потпуно неприхватљив одзив, до 1, за потпуно прихватљив одзив. Функције делимичне прихватљивости се онда комбинују у један композитни одговор, који се назива глобална функција прихватљивости, D , а дефинише се као геометријска средина свих d_i вредности:

$$D = [d_1^{p_1} \times d_2^{p_2} \times \dots \times d_n^{p_n}]^{1/n} \quad (51)$$

У суштини, функција глобалне прихватљивости комбинује вишеструке појединачне, независне одзиве у једну функцију одзива (D), која се може минимизирати или максимизирати униваријатном анализом. У једначини (51), p_i представља релативни значај додељен одговору i . Релативни значај p_i је компаративна скала за мерење сваког од резултујућих d_i у укупном производу прихватљивости, и варира од најмање важног ($p_i = 1$) до најважнијег ($p_i = 5$). За симултану оптимизацију, сваки одзив мора имати ниску и високу вредност додељену сваком циљу. Позитивна вредност ($D > 0$) подразумева да су сви одзиви истовремено у прихватљивом распону. Вредности D близу 1 указују да је комбинација различитих критеријума глобални максимум, тако да су вредности одзива близу циљних вредности.

Дакле, на основу литературних података и прелиминарних испитивања, бирају се параметри за оптимизацију екстракције фенолних једињења из узорака дивљег воћа. На основу постављеног опсега (најнижа, средња и највиша вредност) за сваки од параметара, софтвер формира експериментални дизајн састављен од 30 експеримената, који се потом појединачно изводе, и на основу добијених података врши се компјутерска оптимизација екстракционих услова.

5.1.1. Оптимизација ултразвучне методе за екстракцију фенолних једињења из коре и пулпе плода дивље јабуке

На основу прелиминарних испитивања и литературних података, изабрани су параметри за екстракцију фенолних једињења из коре и пулпе плода дивље јабуке методом ултразвучне екстракције. Утврђено је да на ефикасност екстракције фенолних једињења утичу однос запремине растварача и масе узорка, врста и концентрација растварача, време и температура екстракције²⁰¹, па је утицај ових фактора даље испитиван. Независне променљиве које су оптимизоване, као и њихови одабрани кодирани нивои (најнижи, средњи и највиши, тј. -1, 0 и +1) приказани су у Табели 5.

Табела 5. Независне променљиве и њихове кодирани нивои коришћене за оптимизацију екстракције фенолних једињења из коре и пулпе плода дивље јабуке

Независне променљиве	Јединице	Ознака	Кодирани нивои		
			-1	0	+1
однос запремине растварача и масе узорка	mL/g	X ₁	30,0	65,0	100,0
концентрација метанола	%	X ₂	20,0	60,0	100,0
време екстракције	min	X ₃	20,0	30,0	40,0
температура екстракције	°C	X ₄	20,0	50,00	80,0

На основу прикупљених података датих у Табели 5, софтвер формира централни композитни дизајн, састављен од 30 појединачних експеримената (Табела III у Прилогу), који су појединачно експериментално изведени, а добијени подаци су коришћени за компјутерску оптимизацију ултразвучне методе за екстракцију фенолних једињења из коре и пулпе дивље јабуке.

Као што је већ напоменуто, значај ефеката независних променљивих и њихов утицај на зависне променљиве је проверен анализом варијансе (ANOVA). Незначајне променљиве ($p > 0,05$) су елиминисане из модела да би се добио једноставан и реалистичан модел, приказан у Табели 6. Веће вредности регресионих коефицијената (β) указују на већи утицај испитиваних променљивих на принос екстракције фенолних једињења из испитиваних узорака (Y).

У редукованом моделу p -вредности су мање од 0,005, што указује да су ови модели значајни. Корелациони коефицијент (R^2) био је у прихватљивим границама (Табела 6), што је указало да су експериментални подаци добро прилагођени полиномним једначинама другог реда. Адекватна прецизност представља меру односа сигнал/шум и пожељно је да њена вредност буде већа од 4^{205} , што је и случај у добијеном моделу, што говори о значајности овог модела за процес екстракције.

Табела 6. Редуковани модел централног композитног дизајна са ANOVA анализом коришћен за оптимизацију екстракције фенолних једињења из коре и пулпе плода дивље јабуке

Коефицијенти	Зависне променљиве (одзиви)					
	Кора			Пулпа		
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆
β_0	6,72	0,17	4,69	10,64	0,039	1,24
β_1	3,27	0,010	4,20	5,15	$5,339 \times 10^{-3}$	1,04
β_2	0,11	0,057	0,052	$8,58 \times 10^{-3}$	$3,209 \times 10^{-4}$	
β_3	0,013	$5,556 \times 10^{-3}$	0,072	1,19	$1,549 \times 10^{-3}$	0,019
β_4	0,048	$9,339 \times 10^{-3}$	0,18	0,34	$9,068 \times 10^{-3}$	0,037
$\beta_1\beta_2$	0,35			0,21		
$\beta_1\beta_3$						0,025
$\beta_1\beta_4$	0,36			0,40	$1,073 \times 10^{-3}$	
$\beta_2\beta_3$				0,76		
$\beta_2\beta_4$	0,71	$3,192 \times 10^{-3}$			$3,164 \times 10^{-3}$	
$\beta_3\beta_4$		$2,401 \times 10^{-3}$				0,030
β_1^2	0,21		0,19	2,58	0,018	0,086
β_2^2		0,088				
β_3^2	0,314					
β_4^2						
резидуали	0,77	0,017	0,36	1,47	$6,732 \times 10^{-3}$	0,14
„Lack of Fit“	0,77	0,017	0,36	1,46	$6,711 \times 10^{-3}$	0,13
грешка одређивања	$9,423 \times 10^{-3}$	$7,333 \times 10^{-5}$	$3,995 \times 10^{-4}$	$8,057 \times 10^{-3}$	$2,122 \times 10^{-5}$	$7,588 \times 10^{-4}$
CV %	2,70	3,86	6,02	4,57	3,66	5,74
прилагођен R^2	0,8501	0,8782	0,9129	0,8327	0,8056	0,8759
адекватна прецизност	16,904	18,259	25,431	14,553	15,495	17,179

Y₁, Y₄ - садржај укупних фенола (mg GAE/g CM); Y₂, Y₅ - садржај флавоноида (mg RUE/g CM); Y₃, Y₆ - садржај фенолних киселина (mg CAE/g CM)

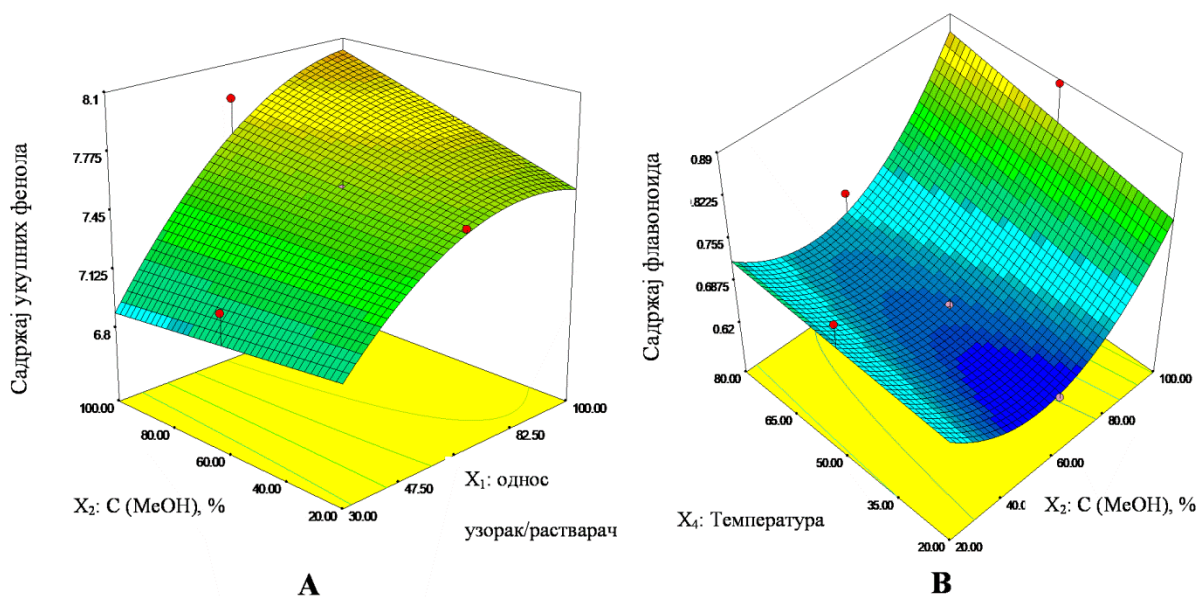
Коефицијент варијације, %CV, мера је репродуктивности модела и прихватљиве вредности овог параметра су мање од 10%. Добијене су вредности коефицијента варијације у опсегу 2,70-6,02% за све одзиве, на основу чега се може закључити да је овај модел репродуктиван.

Критеријуми за оптимизацију услова екстракције укупних фенолних једињења, флавоноида и фенолних киселина из узорка коре и пулпе дивљих јабука, утврђени су варирањем циља прихватљивости и њиховог значаја.

На основу вредности регресионих коефицијената приказаних у *Табели 6* може се видети да X_1 (однос масе узорка и запремине растварача) и X_2 (концентрација растварача) имају значајан утицај на принос екстракције укупних фенолних једињења из коре плода дивље јабуке, док је утицај фактора X_3 (време екстракције) и X_4 (температура екстракције) мали. Такође, вредности регресионих коефицијената показале су да на принос екстракције укупних фенолних једињења из пулпе дивље јабуке највише утиче однос масе узорка и запремине растварача (X_1), али и време екстракције (X_3), док концентрација растварача (X_2) и температура екстракције (X_4) имају мањи утицај. Из *Табеле 6* се може видети да је најзначајнија интеракција променљивих X_2X_4 (концентрација растварача и температура) у случају екстракције укупних фенола из коре дивље јабуке, док је у случају пулпе то интеракција фактора X_2X_3 (концентрација растварача и време екстракције). На количину укупних фенола у екстракту коре значајно утиче квадратни члан X_3^2 (време екстракције), а у случају екстракције фенолних једињења из пулпе, квадратни члан X_1^2 (однос масе узорка и запремине растварача). Однос између најутицајнијих фактора и добијених одзива је илустрован тродимензионалним (3D) приказом одзива површине комбинације утицаја испитиваних променљивих на принос екстракције укупних фенолних једињења, флавоноида и фенолних киселина из екстракта коре (*Слика 29*) и пулпе (*Слика 30*) дивље јабуке.

Када је реч о појединачним факторима, највећи утицај на принос екстракције флавоноида из узорка коре и пулпе дивље јабуке има однос масе узорка и запремине растварача (X_1). На принос флавоноида из коре дивље јабуке

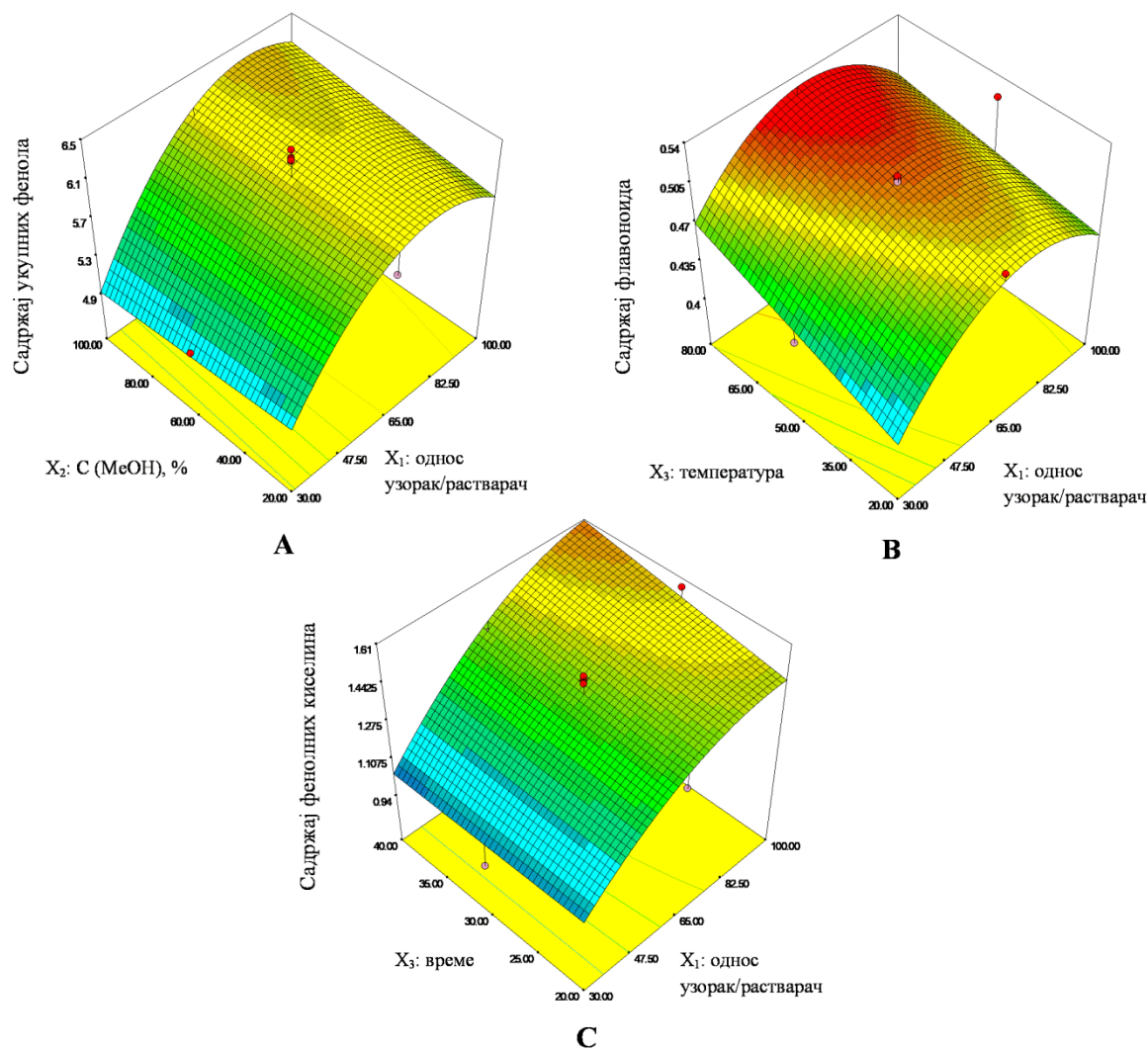
утиче и концентрација метанола (X_2), док је у случају екстракције флавоноида из пулпе, температура (X_4) значајан фактор.



Слика 29. 3D одзиви површина комбинације **A.** утицаја концентрације метанола и односа масе узорка и запремине растварача на принос екстракције укупних фенолних једињења из узорка коре дивље јабуке; **B.** утицаја концентрације метанола и температуре на принос екстракције флавоноида из узорка коре дивље јабуке

Најзначајнија интеракција испитиваних фактора за екстракцију флавоноида из оба узорка је X_2X_4 (концентрација метанола/температура), док на екстракцију флавоноида из коре дивље јабуке утиче и интеракција фактора X_3X_4 (време/температура екстракције), а у случају узорка пулпе забележен је и значајан утицај интеракције фактора X_1X_4 (однос масе узорка и запремине растварача/температура екстракције). На количину екстрахованих флавоноида из узорка коре утиче и квадратни фактор времена екстракције (X_3^2), а квадратни фактор односа масе узорка и запремине растварача (X_1^2) утиче на количину екстрахованих флавоноида из узорка пулпе дивље јабуке.

На принос екстракције фенолних киселина из оба узорка дивље јабуке (кора и пулпа) од појединачних фактора највећи утицај имају однос масе узорка и запремине растварача (X_1) и температура екстракције (X_4).

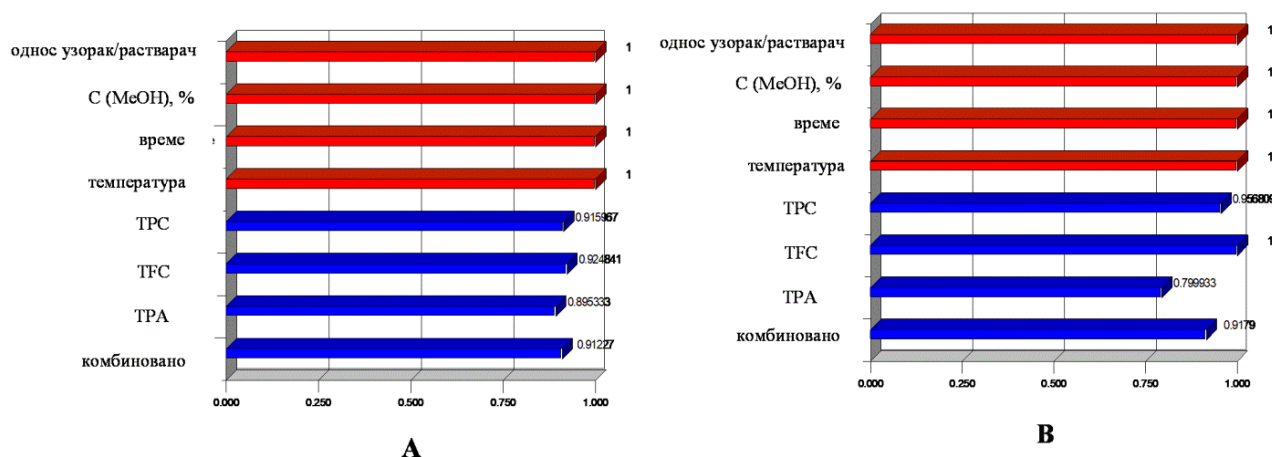


Слика 30. 3D одзиви површина комбинације **А.** утицаја концентрације метанола и односа масе узорка и запремине растварача на принос екстракције укупних фенолних једињења из узорка пулпе дивље јабуке; **В.** утицаја температуре и односа масе узорка и запремине растварача на принос екстракције флавоноида из узорка пулпе дивље јабуке; **С.** утицаја времена екстракције и односа масе узорка и запремине растварача на принос екстракције фенолних киселина из узорка пулпе дивље јабуке

У случају екстракције ових једињења из узорка коре, није нађен значајан утицај интеракција датих фактора, док је за екстракцију фенолних киселина из узорка пулпе најзначајнија интеракција времена и температуре екстракције (X_3X_4).

Најутицајнији квадратни фактор на екстракцију фенолних киселина из оба узорка (кора и пулпа) је X_1^2 (однос масе узорка и запремине растварача).

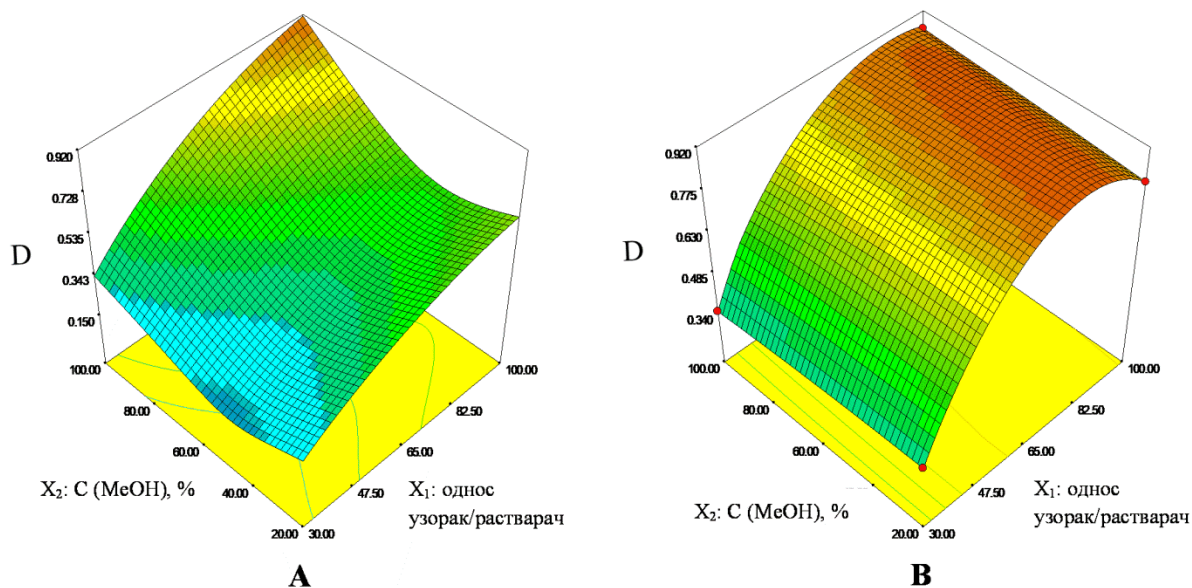
Функције делимичне прихватљивости (d_i) сваког од одзива су приказане на *Слици 31*, у којој d_i варира од 0 до 1, у зависности од блискости одзива његовој циљној вредности.



*Слика 31. Бар графикон појединачних (d_i) и комбинованих (D) вредности прихватљивости за појединачне факторе и добијене одзиве екстракције фенола из **А.** коре; **В.** пулпе дивље јабуке*

На *Слици 31* може се видети да за сваки параметар (променљиве и одговарајући одзиви) функција d_i има вредности близу јединици, па сви одзиви појединачно, као и њихов комбиновани ефекат, показују значајну прихватљивост.

Имајући у виду претходно наведене услове и ограничења, изведена је оптимизација екстракционих услова. Одзив површине добијен из функције прихватљивости је приказан на *Слици 32*, и приказује оптималне услове за екстракцију коре и пулпе узорка дивље јабуке. Ова функција је максимизирана при комбинованој прихватљивости која је имала вредност $D = 0,912$ за екстракцију коре и $D = 0,918$ за екстракцију пулпе дивље јабуке.



Слика 32. Одзиви површина добијени из функција прихватљивости (D) за екстракцију **A.** коре; **B.** пулпе узорка дивље јабуке

Након примене приступа функције прихватљивости, нађено је да су оптимални услови ултразвучне екстракције следећи: однос запремине растварача и масе узорка 100 mL/g, метанол концентрације 100%, време екстракције 33 min и температура 65 °C за екстракцију коре; однос запремине растварача и масе узорка 79 mL/g, метанол концентрације 20%, време екстракције 40 min и температура од 80 °C за екстракцију пулпе плода дивље јабуке.

Под оптималним условима екстракције, уочена разлика између предвиђених и експериментално добијених одзива је веома мала, у опсегу 1,11-3,45% за екстракцију коре дивље јабуке односно 1,31-3,85% у случају екстракције пулпе истог узорка, па се може закључити да су предвиђене и експериментално добијене вредности у добром слагању (Табела 7).

Табела 7. Поређење предвиђених и експериментално добијених вредности променљивих и одзива под оптималним условима екстракције фенолних једињења из коре и пулпе плода дивље јабуке

	Променљиве	Предвиђено	Експериментално	Грешка (%)	Прихватљивост (D)
кора	однос запремине растварача и масе узорка (mL/g)	100,00	100,00	0,00	0,912
	С (MeOH), %	100,00	100,00	0,00	
	време екстракције (min)	33,00	33,00	0,00	
	температура екстракције (°C)	65,00	65,00	0,00	
	укупан садржај фенолних једињења (TPC)	809	800	1,11	
	укупан садржај флавоноида (TFC)	87,0	84,0	3,45	
	укупан садржај фенолних киселина (TPA)	259	251	3,09	
пулпа	однос запремине растварача и масе узорка (mL/g)	79,00	79,00	0,00	0,918
	С (MeOH), %	20,00	20,00	0,00	
	време екстракције (min)	40,00	40,00	0,00	
	температура екстракције (°C)	80,00	80,00	0,00	
	укупан садржај фенолних једињења (TPC)	675	664	1,63	
	укупан садржај флавоноида (TFC)	52,0	50,0	3,85	
	укупан садржај фенолних киселина (TPA)	153	151	1,31	

TPC - садржај укупних фенола (mg GAE/100g CM); TFC - садржај флавоноида (mg RUE/100g CM) и TPA - садржај фенолних киселина (mg CAE/100g CM)

5.1.2. Оптимизација ултразвучне методе за екстракцију фенолних једињења из плода дивље малине

За испитивање променљивих које утичу на ефикасност ултразвучне екстракције фенолних једињења из плода дивље малине, такође је коришћена методологија одзива површине са централним композитним дизајном. Испитиван је утицај концентрације метанола у растварачу (X_1), односа запремине растварача и масе узорка (X_2), времена (X_3) и температуре екстракције (X_4) на ефикасност екстракције укупних фенолних једињења, флавоноида и антоцијана. Независне променљиве су кодиране на три нивоа (-1 , 0 и $+1$), а сваки ниво је одабран на основу стабилности испитиваних фенолних једињења под условима ултразвучне екстракције (Табела 8).

Табела 8. Независне променљиве и њихове кодиране и праве вредности коришћене за оптимизацију екстракције фенолних једињења из плода дивље малине

Независне променљиве	Јединице	Ознака	Кодирани нивои		
			-1	0	+1
концентрација метанола	%	X_1	20,0	60,0	100,0
однос запремине растварача и масе узорка	mL/g	X_2	10,0	20,0	30,0
време екстракције	min	X_3	1,0	8,0	15,0
температура екстракције	°C	X_4	40,0	60,00	80,0

Процес оптимизације извршен је применом квадратне полиномне једначине (51), а комплетан експериментални дизајн састојао се од 30 експерименталних тачака и променљивих чији је утицај на ефикасност екстракције испитиван (Табела П2 у Прилогу).

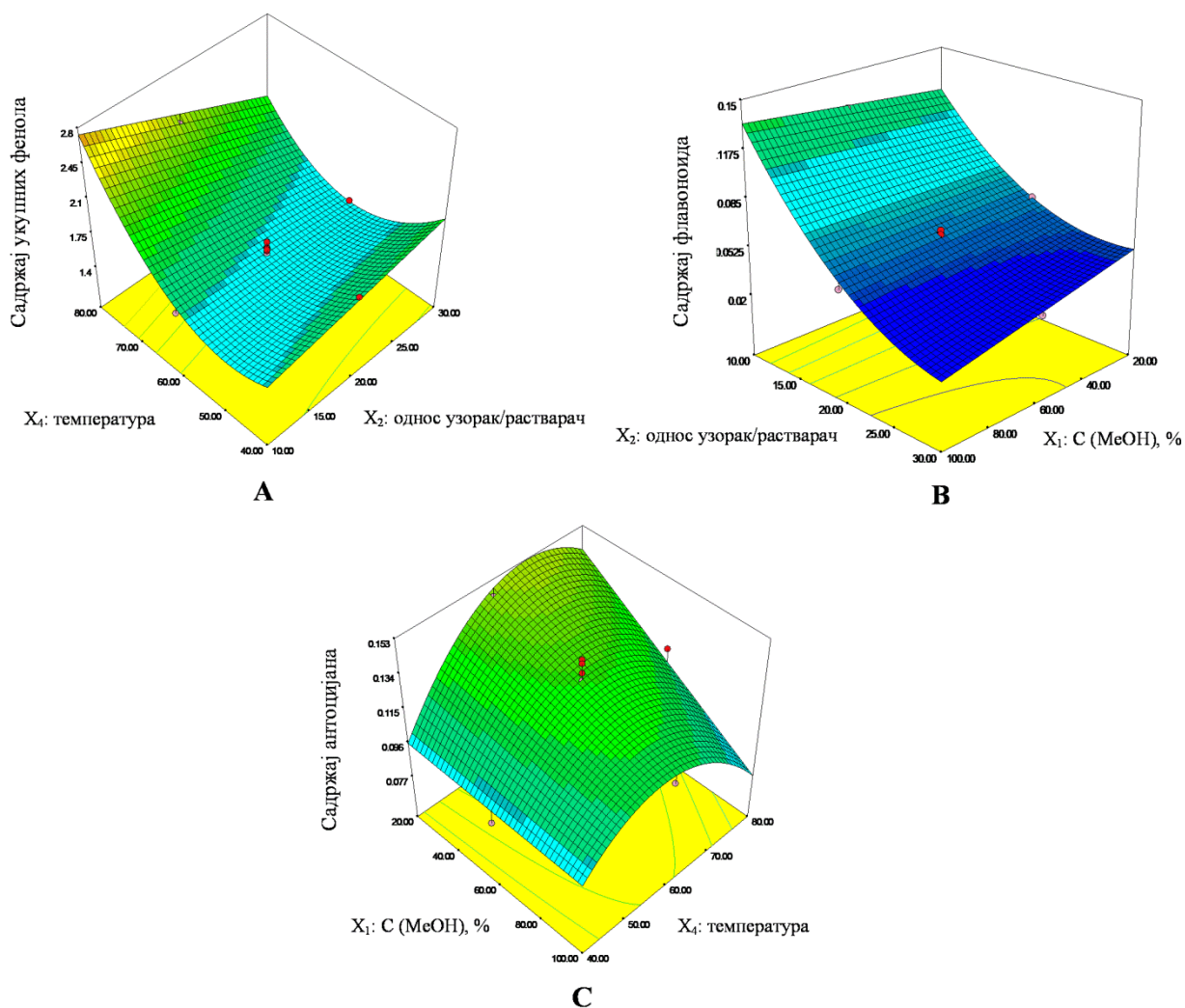
У следећем кораку, да би се проверило да ли је модел одговарајући, за редуковани модел израчунати су статистички параметри анализом варијансе (ANOVA), који су приказани у Табели 9. На основу добијених резултата приказаних у Табели 9, тј. вредности корелационог коефицијента, коефицијента варијације и адекватне прецизности, може се закључити да је модел значајан, репродуктиван и валидан за рад.

Табела 9. Редуковани модел централног композитног дизајна са ANOVA анализом коришћен за оптимизацију екстракције фенолних једињења из плода дивље малине

Коефицијенти	Зависне променљиве (одзиви)		
	Y ₁ (TPC)	Y ₂ (TFC)	Y ₃ (TAC)
β_0	6,12	0,12	0,035
β_1	0,011	$2,413 \times 10^{-4}$	$4,901 \times 10^{-3}$
β_2	0,21	0,037	$1,861 \times 10^{-3}$
β_3	1,62	$2,008 \times 10^{-3}$	$1,152 \times 10^{-3}$
β_4	1,65	0,035	$8,542 \times 10^{-4}$
$\beta_{1,2}$		$1,938 \times 10^{-3}$	
$\beta_{1,3}$		$1,328 \times 10^{-4}$	
$\beta_{1,4}$		$1,258 \times 10^{-3}$	$3,66 \times 10^{-3}$
$\beta_{2,3}$			0,018
$\beta_{2,4}$	1,11	$5,621 \times 10^{-3}$	
$\beta_{3,4}$	0,38	0,010	
β_1^2	0,022		
β_2^2		$1,768 \times 10^{-3}$	$4,345 \times 10^{-3}$
β_3^2	0,25		
β_4^2	0,71	$7,024 \times 10^{-3}$	$3,097 \times 10^{-3}$
резидуали	0,11	$1,674 \times 10^{-4}$	$1,843 \times 10^{-3}$
„Lack Of Fit“	0,10	$1,541 \times 10^{-4}$	$1,665 \times 10^{-3}$
грешка одређивања	$8,339 \times 10^{-3}$	$1,333 \times 10^{-5}$	$1,773 \times 10^{-4}$
CV %	4,24	3,05	6,92
прилагођен R ²	0,9748	0,9978	0,9302
адекватна прецизност	48,111	125,768	29,252

TPC - садржај укупних фенола; TFC - садржај укупних флавоноида и TAC - садржај антоцијана; $p < 0,0001$ за све одзиве

Однос између најутицајнијих фактора и добијених одзива је илустрован тродимензионалним (3D) приказом одзива површина (Слика 33). На основу статистичке анализе (Табела 7) и одзива површина приказаних на Слици 33, може се закључити да на принос екстракције укупних фенолних једињења из плода дивље малине од појединачних фактора највише утичу температура (X_4) и време екстракције (X_3), док је најзначајнија интеракција фактора X_2X_4 (однос масе узорка и запремине растварача/температура екстракције). Квадратни фактор који има највећи ефекат на екстракцију укупних фенола је X_4^2 (температура).

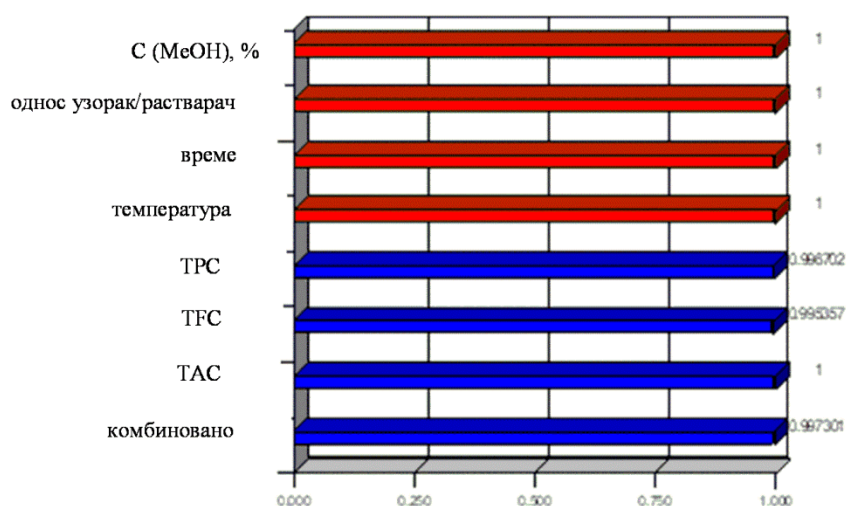


Слика 33. 3D одзиви површина комбинације **A.** утицаја температуре и односа масе узорка и запремине растварача на принос екстракције укупних фенолних једињења; **B.** односа масе узорка и запремине растварача и концентрације метанола на принос екстракције флавоноида; **C.** концентрације метанола и температуре на принос екстракције антоцијана из узорка дивље малине

Од појединачних фактора, на екстракцију флавоноида из плода дивље малине највише утиче однос масе узорка и запремине растварача. Најзначајнија интеракција је интеракција температура/време екстракције, док је најутицајнији квадратни фактор X_4^2 (температура), као и у случају екстракције укупних фенола.

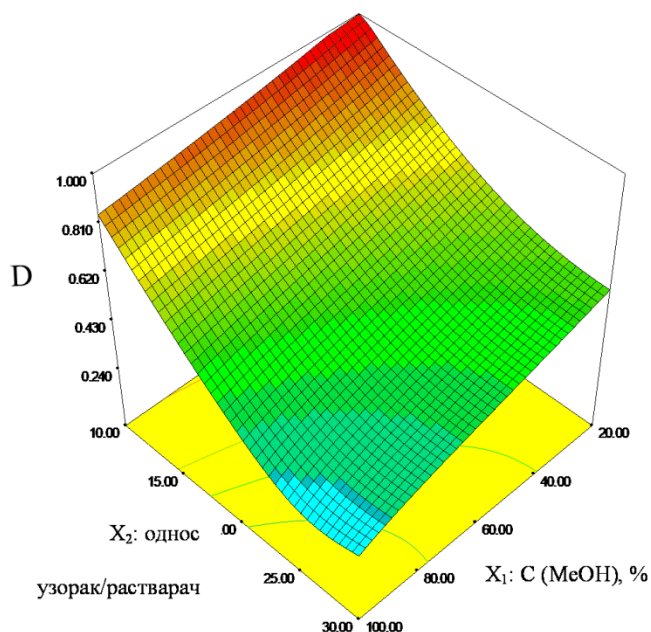
На екстракцију укупних антоцијана из плода дивље малине највећи утицај има концентрација метанола и интеракција масе узорка и запремине растварача и времена екстракције, као и квадратни фактор X_2^2 (однос масе узорка и запремине растварача).

За симултану оптимизацију испитиваних променљивих за све одзиве, израчуната је функција прихватљивости. Функције делимичне прихватљивости (d_i) сваког одзива и израчуната геометријска средина, као максимална глобална функција прихватљивости ($D = 0,997$) приказане су на *Слици 34*, у којој d_i варира од 0 до 1, у зависности од блискости одзива његовој циљној вредности. Применом ових услова, максимална постигнута ефикасност екстракције фенолног садржаја била је 99,7%, што указује на прикладност и тачност модела.



Слика 34. Бар графикон појединачних (d_i) и комбинованих (D) вредности прихватљивости појединачних фактора и добијених одзива екстракције фенола из плода дивље малине

Одзив површине добијен за функцију прихватљивости (D) екстракције фенолних једињења из плода дивље малине приказан је на *Слици 35*.



Слика 35. Одзив површине добијен за функцију прихватљивости (D) екстракције фенолних једињења из плода дивље малине

Оптимални услови екстракције фенолних једињења из плода дивље малине одређени су максимизирањем функције прихватљивости, применом Design Expert софтвера. Овако добијени оптимални услови су коришћени за процес екстракције, а касније су одређени и валидирани одзиви у складу са раније наведеним поступком. Оптимални услови за екстракцију TPC, TFC и TAC били су: концентрација метанола (20%), однос запремине растварача и масе узорка (10,01 mL/g), време екстракције (15 min) и температура екстракције (80 °C).

Експериментални и предвиђени одзиви су приказани у Табели 10. Под овим условима, експерименталне вредности независних променљивих су биле у сагласности са предвиђеним вредностима са грешком у опсегу од 0,00 до 4,12%. Експерименталне и предвиђене вредности одзива (зависне променљиве) су такође у сагласности, са грешком у опсегу 0,08-1,06%.

Табела 10. Поређење предвиђених и експериментално добијених вредности променљивих и одзива под оптималним условима екстракције фенолних једињења из плода дивље малине

Променљиве	Предвиђено	Експериментално	Грешка (%)	Прихватљивост (D)
С (MeOH), %	20,86	20,00	4,12	0,997
однос запремине растварача и масе узорка	10,01	10,00	0,10	
време екстракције	15,00	15,00	0,00	
температура екстракције	80,00	80,00	0,00	
укупан садржај фенолних једињења (TPC)	382,1	383	0,24	
укупан садржај флавоноида (TFC)	37,57	37,6	0,08	
укупан садржај антоцијана (TAC)	16,07	15,9	1,06	

TPC - садржај укупних фенола (mg GAE/100g CM); TFC - садржај укупних флавоноида (mg RUE/100g CM) и TAC - садржај антоцијана (mg CGE/100g CM); $p < 0,0001$ за све одзиве

5.1.3. Оптимизација услова микроталасне екстракције фенолних једињења из плода дивље трешње

Микроталасна екстракција, уз ултразвучну екстракцију, спада у једну од најефикаснијих и најчешће коришћених метода за екстракцију фенолних једињења, због посебних интеракција између микроталаса и материје, као и веома кратког времена екстракције.⁷¹ Ефикасност процеса микроталасне екстракције, као и екстракције ултразвуком, зависи од времена екстракције, температуре, односа узорка и растварача, као и од типа и концентрације употребљеног растварача, па су сходно томе, ови екстракциони услови оптимизовани у циљу добијања максималног приноса екстракције фенолних једињења из плода дивље трешње.

Методологија одзива површине са централним композитним дизајном је коришћена за испитивање променљивих које утичу на ефикасност микроталасне екстракције. Као и у случају оптимизације екстракције плода дивље јабуке и малине, независне променљиве су кодиране на три нивоа (−1, 0 и +1) и сваки ниво је одабран на основу стабилности фенолних једињења под условима микроталасне екстракције (Табела 11).

Табела 11. Независне променљиве и њихове кодиране и праве вредности коришћене за оптимизацију екстракције фенолних једињења из плода дивље трешње

Независне променљиве	Јединице	Ознака	Кодирани нивои		
			-1	0	+1
концентрација метанола	%	X ₁	60,0	80,0	100,0
температура екстракције	°C	X ₂	60,0	80,0	100,0
време екстракције	min	X ₃	1,0	2,0	3,0
однос запремине растварача и масе узорка	mL/g	X ₄	20,0	25,00	30,00

Комплетан експериментални дизајн (Табела ПЗ у Прилогу) састојао се од 30 експерименталних тачака и променљивих чији је утицај на ефикасност екстракције испитиван: концентрација метанола (60 - 100%), температура (60 - 100 °C), време екстракције (1 - 3 min) и однос масе узорка и запремине растварача (0,03-0,05 g/mL).

Одзиви за сваки појединачни екстракциони процес у експерименталном дизајну су израчунати као укупна количина фенолних једињења са вредностима изнад границе квантификације. Значај ефеката независних променљивих и њихов утицај на зависне променљиве је проверен ANOVA анализом (Табела 12).

На основу статистичке анализе, тј. вредности адекватне прецизности, прилагођеног корелационог коефицијента и коефицијента варијације може се закључити да је модел значајан, валидан за рад и репродуктиван за процес екстракције (Табела 12).

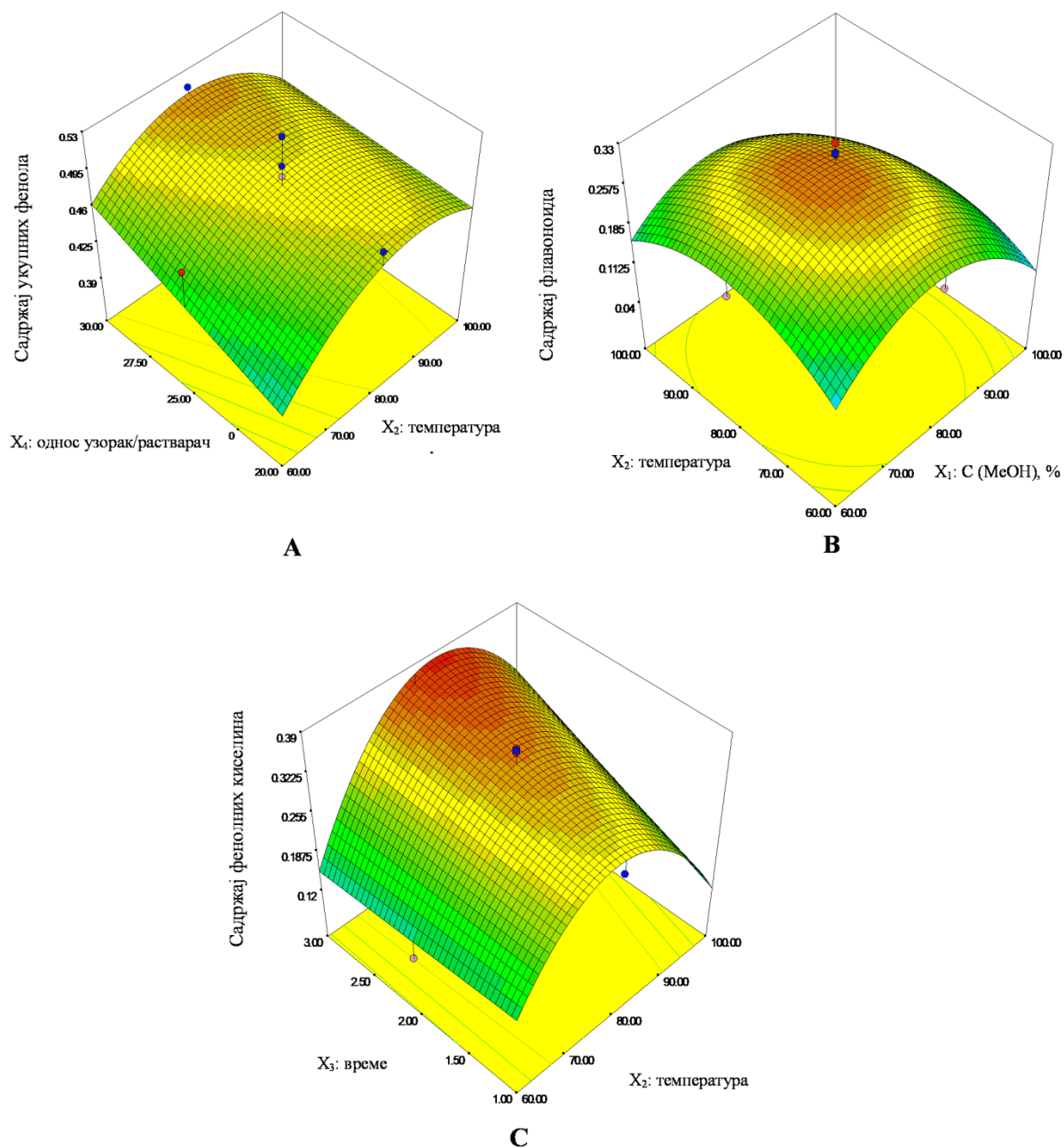
3D одзиви површина интеракције утицаја различитих променљивих на принос екстракције укупних фенола, флавоноида и фенолних киселина из плода дивље трешње приказани су на Слици 36. На основу статистичке анализе (Табела 12) и приказаних одзива површина (Слика 36), може се закључити да концентрација метанола (X₁) има велики утицај на ефикасност екстракције укупних фенола, флавоноида и фенолних киселина из плода дивље трешње. Интеракције између екстракционих променљивих, односа масе узорка и запремине растварача и температуре (X₂X₄) у случају екстракције укупних фенола, температуре и времена екстракције (X₂X₃) у случају екстракције флавоноида и односа масе узорка и запремине растварача и времена (X₃X₄), такође су се показале као значајне. Што се тиче квадратних ефеката екстракционих променљивих, на количину укупних

фенола, флавоноида и фенолних киселина у екстракту дивље трешње значајно утиче квадратни члан концентрације метанола (X_1^2) Остале интеракције и квадратни чланови екстракционих променљивих се нису показали као значајни.

Табела 12. Редуковани модел централног композитног дизајна са ANOVA анализом коришћен за оптимизацију екстракције фенолних једињења из плода дивље трешње

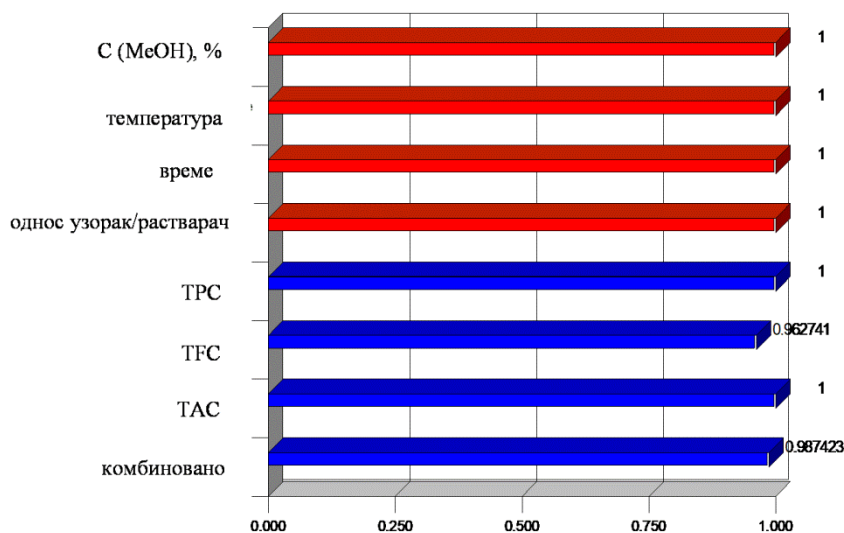
Коефицијенти	Зависне променљиве (одзиви)		
	Y ₁ (TPC)	Y ₂ (TFC)	Y ₃ (TPA)
β_0	$8,622 \times 10^{-3}$	0,22	0,40
β_1	0,02	0,025	$4,222 \times 10^{-4}$
β_2	$4,923 \times 10^{-3}$	$1,394 \times 10^{-3}$	$6,528 \times 10^{-3}$
β_3	$4,545 \times 10^{-3}$	$8,264 \times 10^{-3}$	0,022
β_4	$5,998 \times 10^{-3}$	$5,618 \times 10^{-4}$	$3,549 \times 10^{-4}$
$\beta_{1,2}$		$4,947 \times 10^{-3}$	
$\beta_{1,3}$			
$\beta_{1,4}$			
$\beta_{2,3}$		0,029	0,029
$\beta_{2,4}$	$3,322 \times 10^{-3}$		$4,750 \times 10^{-3}$
$\beta_{3,4}$			0,077
β_1^2	$7,142 \times 10^{-3}$	0,035	0,025
β_2^2	$5,096 \times 10^{-3}$	0,015	0,071
β_3^2	$2,753 \times 10^{-3}$		
β_4^2		$4,321 \times 10^{-3}$	0,011
резидуали	$7,967 \times 10^{-3}$	$3,663 \times 10^{-4}$	$4,291 \times 10^{-4}$
„Lack of Fit“	$8,522 \times 10^{-4}$	$4,719 \times 10^{-4}$	$5,805 \times 10^{-4}$
грешка одређивања	$6,192 \times 10^{-4}$	$4,937 \times 10^{-5}$	$5,003 \times 10^{-6}$
CV %	6,22	9,12	9,15
прилагођен R ²	0,7304	0,9523	0,9697
адекватна прецизност	13,381	25,259	32,715

TPC - садржај укупних фенола; TFC - садржај укупних флавоноида и TPA - садржај фенолних киселина; $p < 0,0001$ за све одзиве



Слика 36. 3D одзиви површина комбинације **A.** утицаја температуре и односа масе узорка и запремине растварача на принос екстракције укупних фенолних једињења; **B.** температуре и концентрације метанола на принос екстракције флавоноида; **C.** времена екстракције и температуре на принос екстракције фенолних киселина из узорка дивље трешиње

Бар графикон прихватљивости појединачних (d_i) и комбинованих (D) вредности одговарајућих фактора и одзива екстракције фенолних једињења из узорка дивље трешње дат је на *Слици 37*.

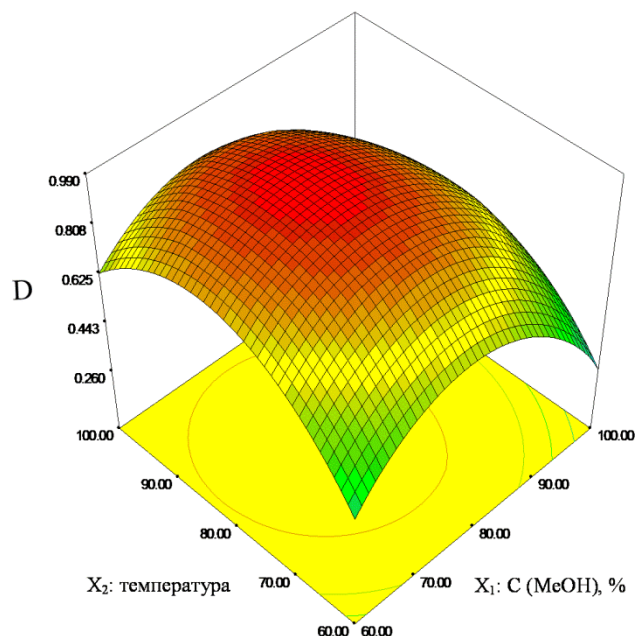


Слика 37. Бар графикон појединачних (d_i) и комбинованих (D) вредности прихватљивости појединачних фактора и добијених одзива екстракције фенола из узорка дивље трешње

Са бар графикона прихватљивости (*Слика 37*) види се да су за сваки параметар (променљиве и одговарајући одзиви) d_i вредности близу јединици, па сви одзиви појединачно, као и њихов комбиновани ефекат, показују значајну прихватљивост ($D = 0,987$).

Одзив површине добијен за функцију прихватљивости (D) екстракције фенолних једињења из плода дивље трешње приказан је на *Слици 38*.

Оптимални услови за екстракцију фенолних једињења из плода дивље трешње одређени су максимизирањем функције прихватљивости. Овако добијени оптимални услови су коришћени за процес екстракције, а касније су одређени и валидирани одзиви у складу са уобичајеним поступком. Оптимални услови за екстракцију ТРС, ТФС и ТРА били су: концентрација метанола (69,38%), однос запремине растварача и масе узорка (30 mL/g), време екстракције (1,82 min) и температура екстракције (78 °C).



Слика 38. Одзив површине добијен за функцију прихватљивости екстракције фенолних једињења из плода дивље трешиње

Под овим условима, експерименталне вредности су биле у сагласности са предвиђеним вредностима са опсегом грешке од 0,00 до 0,30%, као и експерименталне и предвиђене вредности одзива, са грешком у опсегу 0,19-0,48% (Табела 13).

Табела 13. Поређење експерименталних и предвиђених вредности променљивих и одзива добијених под оптималним условима екстракције фенолних једињења из плода дивље трешиње

Променљиве	Предвиђено	Експериментално	Грешка (%)	Прихватљивост (D)
концентрација МеОН (%)	75,96	76,00	0,05	0,987
температура екстракције (°C)	82,75	83,00	0,30	
време екстракције (min)	2,71	2,71	0,00	
однос запремине растварача и масе узорка (mL/g)	30,00	30,00	0,00	
укупан садржај фенолних једињења (TPC)	54,00	54,26	0,48	
укупан садржај флавоноида (TFC)	31,96	31,82	0,44	
укупан садржај фенолних киселина (TPA)	47,02	47,11	0,19	

5.2. Садржај укупних фенолних једињења, флавоноида, фенолних киселина и антоцијана у испитиваним узорцима

Имајући у виду да су различите врсте фенолних једињења носиоци битних биолошких активности, информације о количинама ових једињења у испитиваним узорцима су од великог значаја. Количине укупних фенола, флавоноида, фенолних киселина и антоцијанина одређиване су спектрофотометријским методама, а резултати су изражени у еквивалентима одговарајућих референтних фенолних једињења за сваку групу фенолних једињења.

Садржај укупних фенола одређен је у кори и пулпи дивље јабуке, плоду дивље малине и дивље трешње Фолин-Чиокалте спектрофотометријском методом, мерењем апсорбанце екстракта у који су додати одговарајући реагенси на таласној дужини 765 nm, и изражен је у еквивалентима галне киселине у 100 g масе свежег узорка (mg GAE/100 g CM). Количина укупних флавоноида у истим узорцима одређена је методом са алуминијум-хлоридом и измерена је спектрофотометријски на 415 nm, а резултати су изражени у еквивалентима рутина у 100 g масе свежег узорка (mg RUE/100 g CM). Садржај фенолних киселина у кори и пулпи дивље јабуке и плода дивље трешње одређен је реакцијом са Арноовим реагенсом, спектрофотометријским мерењем апсорбанце екстракта на 490 nm и изражен је у еквивалентима кафеинске киселине у 100 g масе свежег узорка (mg CAE/100 g CM). Количина антоцијанина је изнад граница квантификације само у плоду дивље малине и одређена је pH диференцијалном методом (мерење апсорбанце екстракта на таласним дужинама 520 и 700 nm), а резултати су изражени у еквивалентима цијанидин-3-глукозида у 100 g масе свежег узорка (mg CGE/100 g CM). Резултати ових одређивања су приказани у Табели 14.

Под оптималним условима ултразвучне екстракције (Табела 14), значајно већи садржај укупних фенолних једињења нађен је у екстракту коре дивље јабуке (800 mg GAE/100 g CM) него у екстракту пулпе дивље јабуке (664 mg GAE/100 g CM). Флавоноиди су присутни у екстракту коре у количини од 84 mg RUE/100 g CM, а у екстракту пулпе 50 mg RUE/100 g CM флавоноида.

Табела 14. Количина укупних фенола, флавоноида, фенолних киселина и антоцијана у испитиваним екстрактима дивље јабуке (кора и пулпа), дивље малине и дивље трешње

Екстракт дивљег воћа		Укупни феноли	Флавоноиди	Фенолне киселине	Антоцијани
јабука	кора	800 ± 12	84,0 ± 1,1	251 ± 5	-
	пулпа	664 ± 17	50,0 ± 0,3	151 ± 4	-
малина	плод	383 ± 12	37,6 ± 1,2	-	15,9 ± 0,6
трешња	плод	64,8 ± 1,9	13,3 ± 0,5	39,6 ± 3,1	-

Резултати су представљени као средња вредност три мерења ± SD; укупни феноли - mg GAE/100g CM; флавоноиди - mg RUE/100g CM; фенолне киселине - mg CAE/100g CM; антоцијани - mg CGE/100g CM

Садржај фенолних киселина је такође знатно већи у екстракту коре дивље јабуке (251 mg CAE/100 g CM) него у екстракту пулпе (151 mg CAE/100 g CM). Према литературним подацима, количина фенолних једињења се може значајно разликовати зависно од врсте јабуке, међутим, у већини досадашњих радова, за различите сорте јабука, потврђено је да се у кори овог плода налази већи садржај укупних фенола у него у пулпи,^{192,193} што је случај и за плод дивље јабуке који је испитиван у оквиру овог рада. Стојиљковић и сарадници¹⁹⁴ наводе да дивље јабуке, такође сакупљене на територији Србије, садрже до 15 mg GAE/g суве масе узорка укупних фенола и 0,18 mg RUE/g CM суве масе узорка флавоноида. У култивисаним сортама јабука (*Malus domestica* Borkh) које су најчешће испитиване врсте у научној литератури, измерене количине фенолних једињења варирају од 10 до 3 mg GAE/g CM у кори, и од 6,6 до 0,8 mg GAE/g CM у пулпи. Количина флавоноида у култивисаним јабукама варира од 10 до 1,5 mg у кори, и од 0,5 mg до 0,1 mg у пулпи (вредности су изражене у mg катехина или рутина по g масе свежег узорка).^{195,196} Поређењем експерименталних резултата овог рада са литеатурним подацима, може се уочити да нема значајних разлика у садржају укупних фенолних једињења у дивљим јабукама и култивисаним сортама јабуке.

Под оптималним условима ултразвучне екстракције, количина укупних фенола у добијеном екстракту плода дивље малине је 383 mg GAE/100 g CM, концентрација флавоноида 37,6 mg RU/100 g CM, а укупних антоцијана 15,9 mg CGE/100 g CM. Резултати добијени за садржај укупних фенола су у складу са

литературним подацима садржаја укупних фенола у различитим сортама малина са територије Литваније.¹⁹⁷ Количина укупних фенола у сорти малина која је испитивана у овом раду је знатно виша него у 6 анализираних сорти у претходно наведеној студији (*Pokusa, Polka, Polana, Polesie, Benefis* и *Aborigen*), а веома слична као у 3 тестиране сорте (*Ottawa, Meeker* и *Beglianka*), док је мања него неколико испитиваних сорти (*Bristol, Sputnika* и *Norna*). Тосун (*Tosun*) и сарадници¹⁹⁸ су мерили садржај укупних фенола у сортама дивље малине која расте на територији Турске и вредности које су добили су знатно ниже у поређењу са вредностима у овом раду (од 1145 до 2031 $\mu\text{g GAE}/100 \text{ g CM}$). Што се тиче количине флавоноида у плоду дивље малине, у литератури нису нађени подаци са којима могу да се пореде резултати овог рада, углавном због изражавања резултата у еквивалентима других једињења, или у другим јединицама. Садржај антоцијана у узорцима дивље малине углавном је нижи у поређењу са садржајем антоцијана измереним за неколико сорти малине са територије Литваније¹⁹⁷, са једним изузетком (сорта *Beglianka*). Нижи садржај антоцијана може бити приписан локацији на којој воће расте, типу земљишта, као и климатским условима у региону и у години када је воће сакупљено.¹⁹⁹ Сарибурун (*Sariburun*) и сарадници²⁰⁰ су проценили да је садржај антоцијана у сортама малине коју су тестирали у опсегу од 12,4 до 69,5 $\text{mg CGE}/100 \text{ g CM}$, а у дивљој малини је 15,9 $\text{mg CGE}/100 \text{ g CM}$.

Садржај фенолних једињења у екстракту дивље трешње добијеног под оптималним условима микроталасне екстракције, такође је одређен спектрофотометријским методама. Садржај укупних фенола у екстракту дивље трешње износи 64,8 $\text{mg GAE}/100 \text{ g CM}$ и знатно је мањи у поређењу са екстрактима дивљих јабука и малина. Укупни флавоноиди су нађени у количини од 13,3 $\text{mg RUE}/100 \text{ g CM}$, док количина фенолних киселина у плоду дивље трешње износи 39,6 $\text{mg CAE}/100 \text{ g CM}$, што је приближно 6 пута мање од количине фенолних киселина нађених у кори, а приближно 4 пута мање од количине фенолних киселина нађене у пулпи дивље јабуке.

Може се закључити да су дивље јабуке најбогатије фенолним једињењима, затим дивље малине, а да је њихов садржај у плоду дивље трешње доста оскуднији.

5.3. Анализа екстракта плодова дивљег воћа HPLC методом

Идентификација фенолних једињења присутних у екстрактима коре и пулпе плода дивље јабуке и плода дивље малине, као и њихова квантификација, извршена је применом методе течне хроматографије високих перформанси (HPLC), применом фотодиодног (PDA) детектора. За раздвајање ових једињења коришћене су колоне C18 типа уз градијентно елуирање. Положај пикова на хроматограмима праћен је на таласним дужинама максимума апсорпције фенолних киселина, флавоноида и антоцијанина (280, 325, 360 или 517 nm).

5.3.1. Карактеризација HPLC методе и анализа екстракта дивље јабуке

Садржај фенолних једињења карактеристичних за плод јабуке (фенолне киселине и флавоноиди) у екстрактима коре и пулпе плода дивље јабуке добијених под оптималним условима, одређен је HPLC методом применом PDA детектора. За потребе квантитативне HPLC анализе и идентификације фенолних једињења у екстрактима дивље јабуке коришћена је серија стандардних супстанци фенолних једињења. Идентификација једињења у екстрактима извршена је поређењем ретенционих времена раздвојених компоненти (пикова) у хроматограму испитиваног узорка са ретенционим временима стандарда, као и поређењем апсорпционих UV-Vis спектра идентификованих једињења са апсорпционим спектрима стандарда. На основу доступних стандарда фенолних једињења у екстрактима плода дивље јабуке идентификовани су: (+)-катехин, хлорогенска киселина, (–)-епикатехин, хиперозид, кверцитрин и флоризин. Након идентификације присутних фенолних једињења у екстрактима, извршена је карактеризација HPLC методе. Репрезентативни хроматограм смеше стандардних једињења која су идентификована у испитиваним узорцима је приказан на *Слици 48А*. Добијени хроматограм смеше стандарда показао је да је постигнуто одговарајуће раздвајање компоненти смеше. Стандардне праве за одређивање концентрације фенолних једињења у узорцима добијене су хроматографисањем серије стандардних раствора концентрација од 0,78 до 100 µg/mL, при чему је

добијена линеарна зависност површине одговарајућег пика и концентрације једињења. Подаци о ретенционим временима, таласним дужинама на којима је извршена квантификација и једначинама стандардних правих коришћених за квантификацију дати су у *Табели 15*. Резултати указују на добру линеарну корелацију, са коефицијентом корелације $R^2 > 0,998$ за сва једињења у опсегу концентрација 0,78-100 $\mu\text{g/mL}$. Граница детекције (*LOD*) и граница квантификације (*LOQ*) су такође сумиране у *Табели 15*. Најнижа граница детекције (0,131 $\mu\text{g/mL}$) и квантификације (0,396 $\mu\text{g/mL}$) добијена је за флоризин, док је највиша граница детекције (0,259 $\mu\text{g/mL}$) и граница квантификације (0,784 $\mu\text{g/mL}$) добијена за (–)-епикатехин, што је у складу са литературним подацима.²⁰⁶

„*Intra-day*“ и „*inter-day*“ варијабилност примењена је за испитивање прецизности мерења, коришћењем релативне стандардне девијације (*RSD*) као мере прецизности. Вредности „*intra-day*“ су биле мање од 0,353%, а „*inter-day*“ варијабилности 0,830%. Резултати су такође показали и велику тачност, са вредностима искоришћења („*recovery*“) у опсегу 92,2-101% за екстракт коре и 97,7-103% за екстракт пулпе дивље јабуке. Поновљивост, као мера прецизности инструмента (изражена као *RSD* испитивних једињења), била је у опсегу 0,308-0,723% (*Табела 15*).

Фенолна једињења у екстрактима коре и пулпе плода дивље јабуке, добијеним под оптималним условима екстракције, идентификована су поређењем ретенционих времена и UV–Vis апсорпционих спектра непознатих пикова са референтним стандардима. Идентификована једињења су потврђена „спајковањем“ узорка са стандардним једињењем и праћењем промена облика пика и спектралних карактеристика.

На *Слици 39B* и *C* приказани су HPLC хроматограми екстракта коре и пулпе дивље јабуке, а концентрације идентификованих једињења у узорцима у *Табели 16*. HPLC анализа екстракта добијених под оптималним условима ултразвучне екстракције показала је да и кора и пулпа садрже хлорогенску киселину, епикатехин и флоризин, док екстракт коре, поред ових једињења, садржи још и катехин, хиперозид и кверцитрин (*Табела 16*). Флавоноид епикатехин је доминантна компонента у оба екстракта, са значајно вишим ($p < 0,05$) садржајем у

кори (1,36 mg/g CM), у поређењу са екстрактом пулпе (1,18 mg/g CM). Количине детектованих фенолних једињења су углавном биле веће у екстракту коре, изузев хлорогенске киселине, која је била у значајно већем ($p < 0,05$) садржају у екстракту пулпе (0,791 mg/g CM).

У литератури постоји веома оскудан број података о HPLC анализи дивљих сорти јабуке, а многе студије се баве анализирањем култивисаних врста. Према литературним подацима, садржај катехина, хлорогенске киселине и флоризина зависи од сорте јабука. Францини и Себастијани (*Francini* и *Sebastiani*) су показали да култивисане јабуке садрже знатно веће количине ових једињења у кори него у пулпи.⁵⁴ Додатно, примећено је да количина хлорогенске киселине, флоризина и епикатехина зависи од анализиране сорте јабуке, при чему пулпа садржи највећу количину хлорогенске киселине, у односу на друга детектована једињења. У другој студији, флоризин је нађен у највећој концентрацији у пулпи сорти *Јонаголд* и *Елстар*, док су епикатехин, хлорогенска киселина и катехин били присутни у нешто нижим концентрацијама.²⁰⁷

Резултати добијени у овом истраживању показују да плод испитиване дивље јабуке има висок садржај ових једињења. Концентрација епикатехина, који је најзаступљенија компонента у узорцима је знатно виша у поређењу са претходно описаним резултатима за култивисане врсте јабука.²⁰⁸ Сан (*Sun*) и сарадници су такође утврдили да сорте дивљих јабука имају приметно веће концентрације девет главних фенолних једињења, укључујући епикатехин, хлорогенску киселину и флоризин, у поређењу са култивисаном.

Табела 15. Једначине калибрационих кривих за фенолна једињења и лимити детекције и квантификације

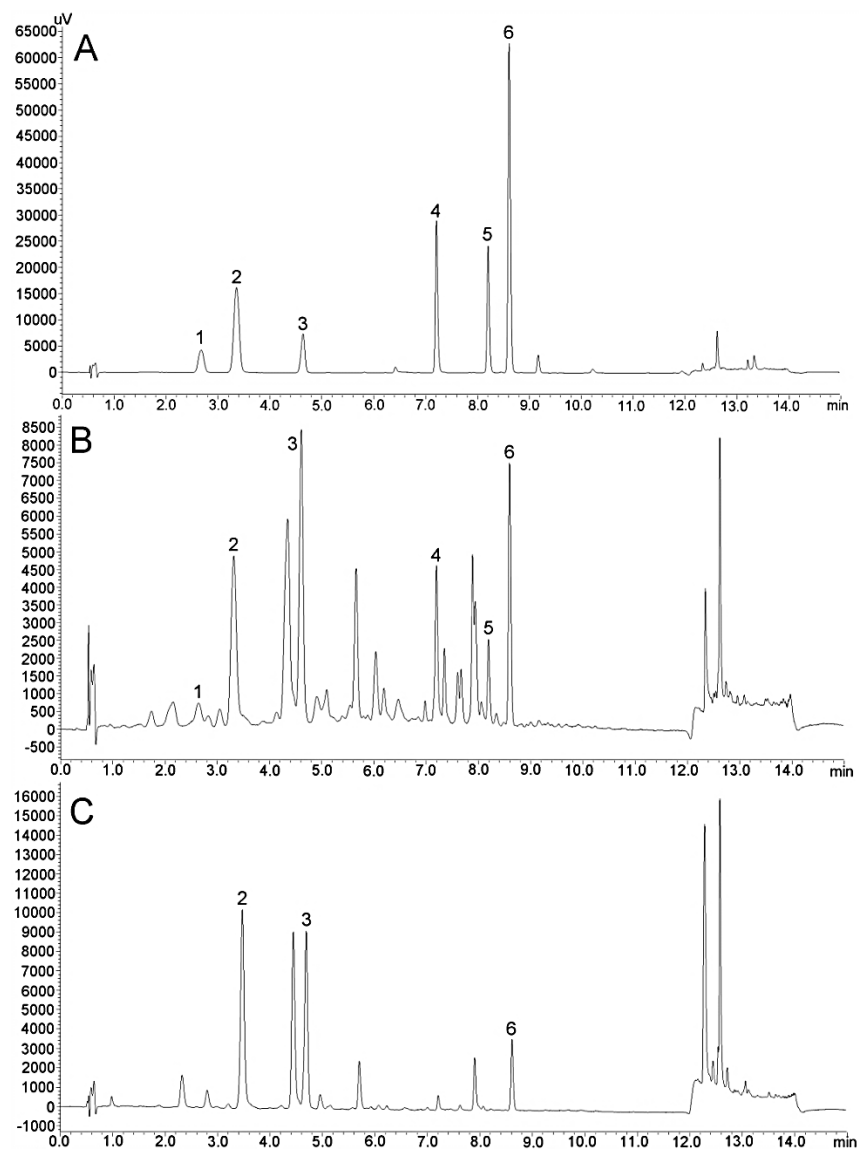
Једињење	Ретенционо време (min) ^a	Таласна дужина (nm)	Једначина калибрације ^b	R ²	LOD (µg/mL) ^c	LOQ (µg/mL) ^c
(+)-катехин	2,68	280	y = 1,55x10 ³ + 256,34	0,9999	0,184 ± 0,007	0,559 ± 0,027
хлорогенска киселина	3,36	325	y = 6,23x10 ³ - 7094,3	0,9985	0,257 ± 0,012	0,780 ± 0,034
(-)-епикатехин	4,64	280	y = 1,58x10 ³ + 386,98	0,9999	0,259 ± 0,012	0,784 ± 0,035
хиперозид	7,21	360	y = 4,85x10 ³ + 737,47	1	0,251 ± 0,010	0,761 ± 0,033
кверцитрин	8,20	360	y = 3,33x10 ³ - 4447,8	0,9992	0,201 ± 0,031	0,663 ± 0,009
флоризин	8,61	280	y = 5,48x10 ³ + 352,42	1	0,131 ± 0,004	0,396 ± 0,018

^aсредња вредност је израчуната из 3 мерења, n=3; ^bx у калибрационој једначини одговара концентрацији једињења, а у површину пика; ^cСредња вредност је израчуната из 9 понављања, n=9

Табела 16. HPLC анализа фенолних једињења коре и пулпе дивље јабуке и прецизност HPLC методе за квантитативну евалуацију фенолних једињења

Једињење	Концентрација (mg/g CM)*		„intra-day“ (RSD, %)**	„inter-day“ (RSD, %)**	Поновљивост (RSD, %)**	„recovery“ (%)*	
	Кора	Пулпа				Кора	Пулпа
(+)-катехин	0,187 ± 0,007 ^a	-	0,276	0,807	0,723	99,4 ± 2,51	97,7 ± 2,4
хлорогенска киселина	0,568 ± 0,008 ^b	0,791 ± 0,007 ^f	0,198	0,488	0,382	101 ± 3	102 ± 3
(-)-епикатехин	1,36 ± 0,02 ^c	1,18 ± 0,01 ^g	0,326	0,830	0,546	92,2 ± 1,24	100 ± 3
хиперозид	0,261 ± 0,002 ^d	-	0,292	0,547	0,308	97,5 ± 2,25	99,2 ± 2,7
кверцитрин	0,256 ± 0,002 ^d	-	0,353	0,581	0,328	101 ± 3	101 ± 3
флоризин	0,207 ± 0,00 ^e	0,106 ± 0,007 ^h	0,299	0,670	0,443	99,0 ± 2,44	103 ± 3

"-" није детектовано; *средња вредност је израчуната из 3 мерења, n=3; ** средња вредност је израчуната из 6 мерења, n=6; *** средња вредност је израчуната из 9 мерења, n=9; средње вредности са различитим словима у суперскрипту се значајно разликују на p < 0,05

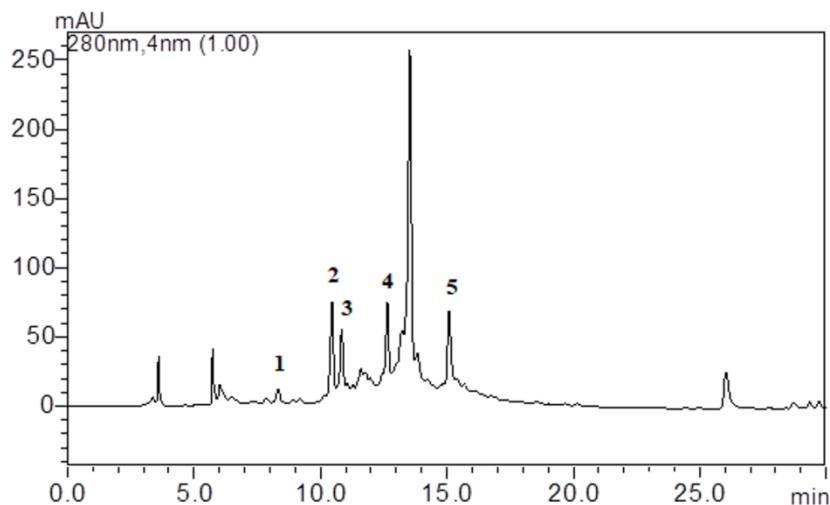


Слика 39. HPLC-PDA хроматограми стандардних једињења **1:** (+)- катехин, **2:** хлорогенска киселина, **3:** (–)-епикатехин, **4:** хиперозид, **5:** кверцитрин, **6:** флоризин (**A**), екстракта коре (**B**) и екстракта пулпе дивље јабуке (**C**) на 280 nm. Концентрација свих стандарда је 0,05 mg/mL

На основу резултата HPLC анализе екстракта коре и пулпе дивље јабуке, може се закључити да ова врста воћа представља значајан извор фенолних једињења, која су носиоци различитих биолошких активности.

5.3.2. HPLC анализа екстракта плода дивље малине

HPLC-PDA анализа екстракта плода дивље малине, добијеног под оптималним условима ултразвучне екстракције, показала је да испитивани екстракт садржи галну киселину, флаванол катехин, антоцијанине цијанидин-3-глукозид и цијанидин-3-софорозид, као и елагинску киселину (Слика 40).



Слика 40. HPLC-PDA хроматограм екстракта дивље малине снимљен на 280 nm (1: гална киселина, 2:(+) - катехин, 3: цијанидин-3-глукозид, 4:цијанидин-3-софорозид, 5: елагинска киселина)

Међу свим идентификованим једињењима (Табела 17), цијанидин-3-глукозид (43,6 mg/100g CM) и елагинска киселина (28,6 mg/100g CM) нађени су у највећим концентрацијама у екстракту плода дивље малине.

Табела 17. Фенолни састав екстракта дивље малине добијен под оптималним условима екстракције (mg/100 g CM $\pm$ SD)

Једињење	Ретенционо време (min)	Концентрација (mg/100 g CM)
гална киселина	8,32	0,986 $\pm$ 0,009 ^a
цијанидин-3-глукозид	10,45	43,61 $\pm$ 0,16 ^b
цијанидин-3-софорозид	10,83	11,46 $\pm$ 0,08 ^c
(+)-катехин	13,23	16,36 $\pm$ 0,11 ^d
елагинска киселина	15,08	28,67 $\pm$ 0,11 ^e

Резултати су представљени као средња вредност 3 мерења $\pm$ SD (n = 3); средње вредности са суперскриптом различитих слова се значајно разликују на $p < 0,05$

Антоцијанин цијанидин-3-софорозид је детектован у значајно ($p < 0,05$) нижој количини (11,5 mg/100 g CM) у поређењу са цијанидин-3-глукозидом. Сличан фенолни профил плода малине је приказан од стране Дантаса (*Dantas*) и сарадника, где је цијанидин-3-глукозид такође био доминантно једињење у замрзнутој пулпи малине, док у њиховој студији, није евидентирано присуство цијанидин-3-софорозида и елагинске киселине.²¹⁰ Бобинајт (*Bobinaite*) и сарадници¹⁹⁷ су одредили садржај слободне елагинске киселине у различитим сортама малине, и све анализиране врсте су имале 5 до 10 пута ниже количине овог једињења у поређењу са садржајем елагинске киселине коју смо добили HPLC анализом екстракта плода дивље малине у овом раду.

Антоцијанини су добро познати антиоксиданси, а такође постоје и литературни подаци који потврђују да антоцијанини делују на ћелије канцера.²¹¹ Штавише, исти аутори су потврдили антиканцерогену активност цијанидин-3-глукозида на ћелијској линији хуманог рака дојке. За елагинску киселину, која је детектована као друга доминантна компонента у анализираном екстракту, такође је доказано да показује широк спектар биолошких активности, као што су антивирусна, антибактеријска, превентивна и антиоксидативна терапија.¹⁹⁷

Узимајући у обзир резултате HPLC анализе добијене у нашој студији, висок садржај цијанидин-3-глукозида и елагинске киселине, као и других идентификованих једињења у екстракту малине, указује да би овај плод могао бити добар природни извор антиоксиданаса са значајним биолошким својствима.

5.4. Антиоксидативни капацитет испитиваних екстраката дивљег воћа

Антиоксидативни потенцијал екстраката плодова дивљих јабука, малина и трешања одређен је различитим спектрофотометријским методама, које се заснивају на тестирању способности добијених екстраката дивљег воћа да неутралишу реактивне слободне радикале.

5.4.1. Испитивање антиоксидативног потенцијала екстракта плода дивље јабуке

Да би се одредио антиоксидативни капацитет дивљих јабука, припремљен је екстракт коре и пулпе под претходно дефинисаним оптималним условима ултразвучне екстракције. Растварач је упарен и екстракти лиофилизовани да би се добили получврсти екстракти. Антиоксидативна активност екстракта коре и пулпе дивље јабуке процењена је применом различитих метода: способности неутрализације DPPH[•], ABTS^{•+}, NO[•], OH[•] и O₂^{•-} радикала и мерењем редуктивног капацитета. Резултати добијени овим методама приказани су у Табели 18.

Табела 18. Антиоксидативна активност метанолских екстраката коре и пулпе дивље јабуке (изражена као IC₅₀ вредност) у поређењу са стандардним антиоксидансима

Екстракти/стандарди	IC ₅₀ (µg/mL)				
	ABTS ^{•+}	DPPH [•]	NO [•]	OH [•]	O ₂ ^{•-}
дивља јабука (кора)	134 ± 3 ^a	240 ± 6 ^a	92,3 ± 3,0 ^a	4,62 ± 0,13 ^a	871 ^a ± 18
дивља јабука (пулпа)	167 ± 4 ^b	286 ± 7 ^b	233 ± 6 ^b	5,58 ± 0,16 ^a	880 ^a ± 19
аскорбинска киселина	23,6 ± 1,4 ^c	7,81 ± 0,27 ^c	13,9 ± 1,1 ^c	НТ	НТ
ВНТ	24,0 ± 1,5 ^c	12,7 ± 0,9 ^c	НТ	3,36 ± 0,09 ^b	НТ
епигалокатехин галат	11,8 ± 1,0 ^d	7,34 ± 0,25 ^c	11,9 ± 1,0 ^c	19,3 ± 1,2 ^c	13,0 ± 1,0 ^b

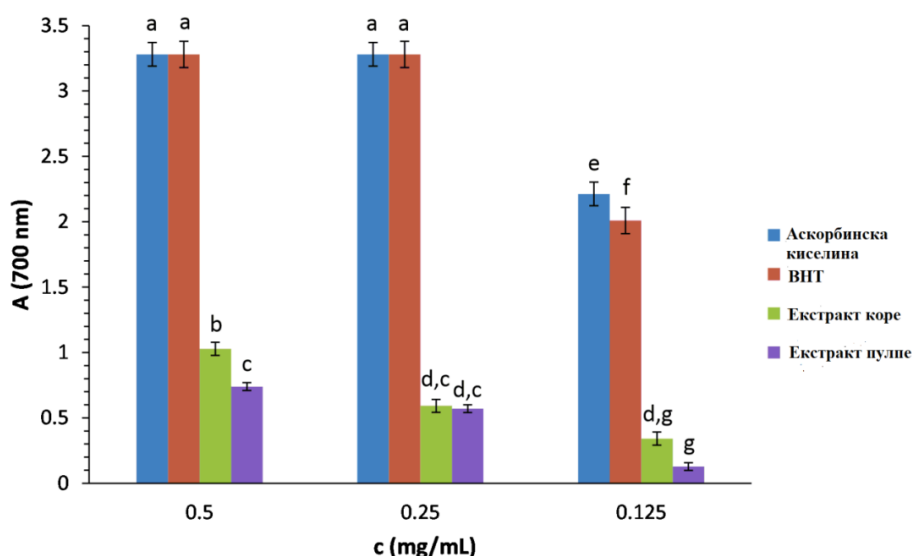
Резултати су представљени као средња вредност 3 мерења ± SD; НТ - није тестирано; Вредности у колони означене различитим словима у суперскрипту се статистички значајно разликују ($p < 0,05$)

Сви резултати су изражени као IC₅₀ вредност (концентрација антиоксиданса довољна да смањи концентрацију слободног радикала за 50%). Из резултата добијених у свакој од примењених метода, може се видети да екстракт коре показује виши антиоксидативни потенцијал од екстракта пулпе. Према ABTS, DPPH и NO тестовима, екстракт коре показао је значајно ($p < 0,05$) већи антиоксидативни капацитет у поређењу са екстрактом пулпе, међутим, оба екстракта су показала знатно слабији антиоксидативни потенцијал у поређењу са референтним антиоксидансима. Једино у случају испитивања способности неутрализације OH радикала, екстракти су показали бољу антиоксидативну активност од референтног антиоксиданса епигалокатехин галата, док је ВНТ

показао нешто већи антиоксидативни капацитет. Боља антиоксидативна активност екстракта коре је могла и бити очекивана из разлога што је антиоксидативни потенцијал најчешће у корелацији са садржајем фенолних једињења за који је доказано да је значајно виши у екстракту коре дивље јабуке. Још једна од чињеница која иде у прилог томе да екстракт коре има бољи антиоксидативни потенцијал је да су у екстракту коре идентификована једињења као што су хлорогенска киселина, катехин, епикатехин, хиперозид, кверцитрин и флоризин, за које је познато да поседују снажну антиоксидативну активност.

Резултати испитивања редукционе моћи екстракта коре и пулпе дивље јабуке (Слика 41) показују сличан тренд као и резултати добијени применом различитих метода за испитивање способности неутрализације слободних радикала. Већа вредност апсорбанце анализираних узорка мерена на 700 nm, (Слика 41), указује на бољу антиоксидативну активност одговарајућег узорка. Екстракт коре поседује значајно већи ($p < 0,05$) редуктивни капацитет него екстракт пулпе, у концентрацији од 0,500 mg/mL, али при нижим концентрацијама нема значајне разлике у редукционој моћи између ова два екстракта. Оба екстракта су показала значајно нижи ($p < 0,05$) редуктивни капацитет него стандардни антиоксиданси, аскорбинска киселина и ВНТ. Аскорбинска киселина и ВНТ имају максимум редукције Fe^{3+} у Fe^{2+} (оптичка густина 3,28) на концентрацији од 0,500 mg/mL, док су оптичке густине коре 1,03 и пулпе дивље јабуке 0,704 при истој концентрацији.

Због примене различитих метода екстракције и различитих тестова за испитивање антиоксидативне активности, упоређивање резултата са литературним подацима је отежано. Постоји доста радова који се баве испитивањем антиоксидативног потенцијала култивисаних сорта јабука, али су подаци о антиоксидативној активности дивљих сорти веома оскудни. Стојиљковић и сарадници¹⁹⁴ показали су да је проценат инхибиције DPPH радикала екстракта дивљих јабука у опсегу од 8,12 до 78,43%, у зависности од примењене методе екстракције. У истом раду је доказано да су у случају примене ултразвучне екстракције плода јабуке добијени екстракти поседовали највећу антиоксидативну активност и највећи садржај фенолних једињења.



Слика 41. Редуктивна активност екстракта коре и пулпе дивље јабуке у поређењу са стандардним антиоксидансима. Већа апсорбанца указује на бољу антиоксидативну активност. Резултати су средња вредност 3 мерења $\pm$ SD; средње вредности са различитим словима у суперскрипту се статистички значајно разликују ($p < 0,05$)

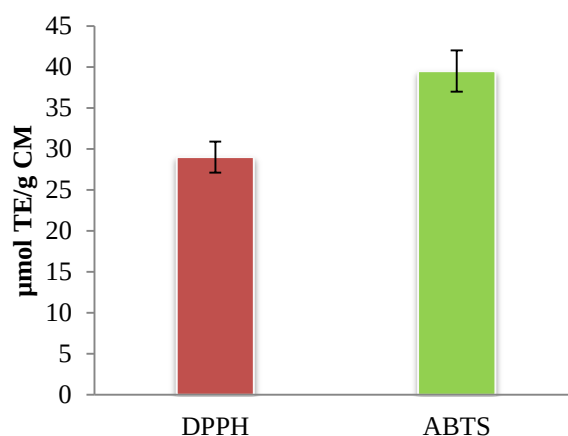
Антиоксидативни потенцијал дивљих јабука, са процентом инхибиције DPPH од 89,72%, већи него у случају култивисаних сорти²¹², резултат је и других истраживања.^{213,214}

5.4.2. Испитивање антиоксидативног потенцијала плодова дивље малине и дивље трешње

Антиоксидативна активност екстракта плода дивље малине добијеног под оптималним условима ултразвучне екстракције испитана је применом тестова за испитивање способности неутрализације DPPH и ABTS радикала, а резултати су изражени као еквиваленти тролокса по граму масе свежег узорка (Слика 42).

Применом DPPH методе, која се заснива на редукцији DPPH радикала испитиваним екстрактом плода дивље малине, добијена је вредност од 29,0 $\mu\text{mol TE/g CM}$. Ова вредност је боља од способности смрзнуте пулпе бразилске малине да неутралише овај слободни радикал (1071 $\mu\text{M TE/100 g суве масе}$).²¹⁰ Испитивани екстракт је показао значајну способност неутралисања ABTS радикал-катјона, са

вредношћу од 39,5 $\mu\text{mol TE/g CM}$. У поређењу са литературним подацима, способност неутралисања ABTS радикал-катјона испитиваног екстракта је приближно 6 пута боља него у случају црвених малина са територије Бразила, чија је вредност антиоксидативног капацитета добијена овом методом 6,27 $\mu\text{mol TE/g CM}$.⁷ Сва фенолна једињења детектована HPLC методом су добро познати антиоксиданси који доприносе антиоксидативној активности испитиваних екстраката плода дивље малине.



Слика 42. Способност екстракта дивље малине да неутралише DPPH и ABTS радикале

Антиоксидативна активност екстракта плода дивље трешње, мерена применом DPPH методе, изражена је као IC_{50} вредност и износи је 5,15 mg/mL. Знатно нижа антиоксидативна активност екстракта дивље трешње, у односу на дивље јабуке и малине, може се приписати ниској концентрацији фенолних једињења у овом екстракту. На основу овог резултата може се донети закључак да испитивани екстракт плода дивље трешње нема значајан антиоксидативни потенцијал у поређењу са тестираним екстрактима дивље јабуке и малине.

5.5. Испитивање стабилности фенолних једињења симулацијом *in vitro* гастроинтестиналне дигестије

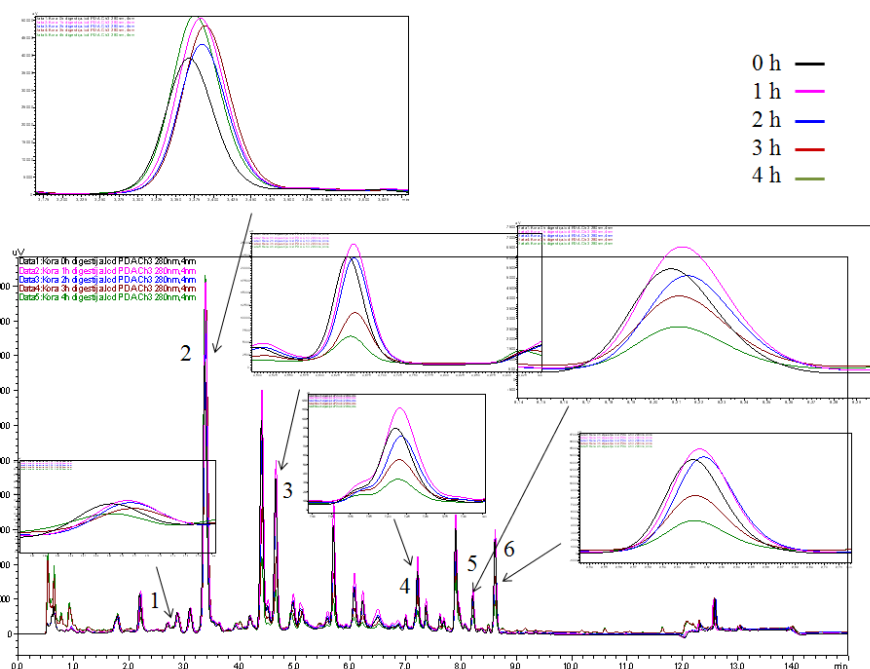
Промене у концентрацији или хемијској структури једињења присутних у храни биљног порекла током њихове дигестије могу да узрокују различите биолошке активности *in vivo* у поређењу са резултатима добијеним у *in vitro* студијама.^{210,215} Степен биодоступности фенолних једињења из биљне хране често није сразмеран њиховој концентрацији која се добија хемијском екстракцијом. Поред тога, структура фенолних једињења, нарочито њихових гликозида, може бити промењена деловањем физиолошких услова дигестивног тракта (pH, интеракција са осталим састојцима хране и дејство ензима). Један од циљева овог рада био је да утврди ефекте *in vitro* дигестије на концентрацију фенолних једињења присутних у плоду дивље јабуке, из разлога што количина једињења у намирници која се конзумира не осликава увек и количину која је доступна за апсорпцију у дигестивном тракту.²¹⁶

5.5.1. Симулација *in vitro* гастроинтестиналне дигестије плода дивље јабуке

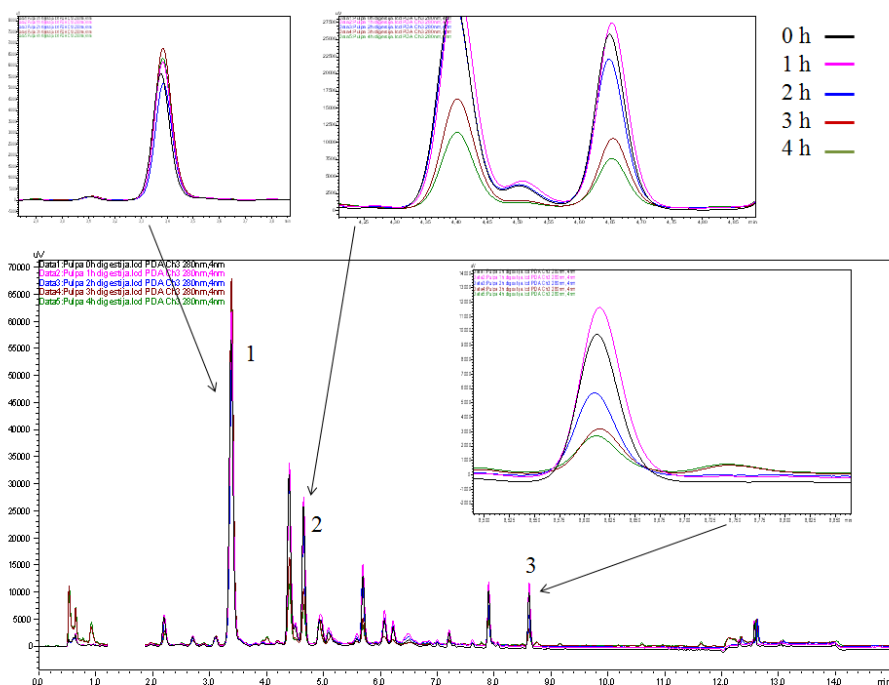
Промене концентрације појединачних фенолних једињења у узорцима коре и пулпе свеже јабуке добијеним у различитим временским периодима симулиране *in vitro* дигестије праћене су применом HPLC методе (Слике 43 и 44).

За HPLC анализу су коришћени и контролни узорци и њиховом анализом нису уочени пикови који би могли имати утицај на идентификацију и квантификацију фенолних једињења. Концентрације катехина, хлорогенске киселине, епикатехина, хиперозида, кверцитрина и флоризина у гастричним и интестиналним флуидима током симулиране *in vitro* гастроинтестиналне дигестије су сумиране у Табели 19.

Према добијеном резултатима, сва једињења идентификована у узорцима који су добијени хемијском екстракцијом коре и пулпе дивље јабуке детектована су и у узорцима симулиране дигестије.



Слика 43. Промене концентрација фенолних једињења у кори дивље јабуке током симулиране *in vitro* дигестије праћене HPLC методом (1:катехин; 2:хлорогенска киселина; 3:епикатехин; 4:хиперозид; 5: кверцитрин; 6:флоризин)



Слика 44. Промене концентрација фенолних једињења у пулпи дивље јабуке током симулиране *in vitro* дигестије праћене HPLC методом (1:хлорогенска киселина; 2:епикатехин; 3:флоризин)

Током првог сата *in vitro* дигестије, концентрација праћених једињења је значајно порасла ($p < 0,05$), изузев концентрације катехина, која се није значајно променила ($p > 0,05$) у овом периоду. Ови резултати указују на то да желудачни услови током првог сата варења могу ослободити фенолна једињења из матрикса воћа.

Гастрична-симулирана дигестија у периоду од 2 сата је узроковала изванредан степен смањења ($p < 0,05$) концентрације анализираних једињења. Након 3 сата (интестинална фаза) симулираних услова дигестије, концентрација флавоноида била је значајно нижа ($p < 0,05$) него на почетку дигестије и током гастричне фазе. Резултати добијени на самом крају симулиране *in vitro* дигестије показали су значајно смањење садржаја флавоноида (50,0-78,0%) у поређењу са њиховим концентрацијама после 1 h дигестије. Разматрајући све флавоноиде који су анализирани, може се закључити да је концентрација флоризина најзначајније смањена током интестиналне фазе симулиране дигестије.

Концентрација епикатехина је такође смањена током дигестије, али се он показао као нешто стабилнији. Смањење концентрације епикатехина у екстракту коре износило је 70,8%, док је смањење концентрације флоризина у истом узорку било 71,7%. У екстракту пулпе, концентрација епикатехина се смањила за 71,2%, док је смањење концентрације флоризина износило 78,7%.

Уочене су мале разлике у стабилности између хиперозида и епикатехина у узорку коре дивље јабуке током интестиналне дигестије, са смањењем концентрација за 70,7 односно 70,8% од почетне концентрације. Кверцитрин је показао већу стабилност, уз смањење концентрације од 59,0% у узорку коре, док је најмање смањење (приближно 50%) уочено у количини катехина у истом узорку (после 1 h дигестије).

Многе студије показују да концентрација гликозида кверцетина и флаван-3-ола (катехин и епикатехин) може бити веома смањена због базних услова током интестиналне фазе дигестије.^{217,218} Кверцитрин и хиперозид су *O*-гликозиди са моносахаридном јединицом у својој структури, а познато је да гликозидна веза подлеже хидролизи у киселој средини и/или дејством ензима. Алтернативна могућност је да се агликонски део ових полифенолних једињења деградира до

својих структурно и хемијски различитих облика у базним условима танког црева.^{219,221}

Табела 19. Садржај фенолних једињења у кори и пулпи дивље јабуке (mg/g CM) током симулиране *in vitro* гастроинтестиналне дигестије

Време	Катехин	Хлорогенска киселна	Епикатехин	Хиперозид	Кверцитрин	Флоризин
кора						
0 h	3,37 ± 0,06 ^a	56,4 ± 1,9 ^a	51,0 ± 1,7 ^a	8,61 ± 0,1 ^a	9,58 ± 0,19 ^a	7,44 ± 0,14 ^a
1 h	3,50 ± 0,07 ^a	72,5 ± 2,4 ^b	56,9 ± 1,8 ^b	10,7 ± 0,2 ^b	11,1 ± 0,2 ^b	8,24 ± 0,16 ^b
2 h	3,02 ± 0,05 ^b	61,3 ± 1,9 ^c	48,0 ± 1,5 ^c	7,09 ± 0,16 ^c	8,70 ± 0,17 ^c	7,42 ± 0,14 ^a
3 h	2,24 ± 0,03 ^c	68,1 ± 2,1 ^d	23,0 ± 0,6 ^d	5,17 ± 0,09 ^d	6,70 ± 0,11 ^d	4,29 ± 0,05 ^c
4 h	1,74 ± 0,01 ^d	73,5 ± 2,4 ^b	12,6 ± 0,3 ^e	3,12 ± 0,04 ^e	4,53 ± 0,07 ^e	2,33 ± 0,03 ^d
пулпа						
0 h	-	81,3 ± 2,9 ^a	57,8 ± 1,9 ^a	-	-	5,67 ± 0,13 ^a
1 h	-	88,7 ± 2,9 ^b	62,6 ± 1,9 ^b	-	-	6,48 ± 0,15 ^b
2 h	-	74,4 ± 2,5 ^c	50,4 ± 1,8 ^c	-	-	3,15 ± 0,07 ^c
3 h	-	96,8 ± 3,0 ^d	24,8 ± 0,6 ^d	-	-	1,70 ± 0,03 ^d
4 h	-	90,3 ± 2,9 ^e	18,0 ± 0,5 ^e	-	-	1,38 ± 0,01 ^e

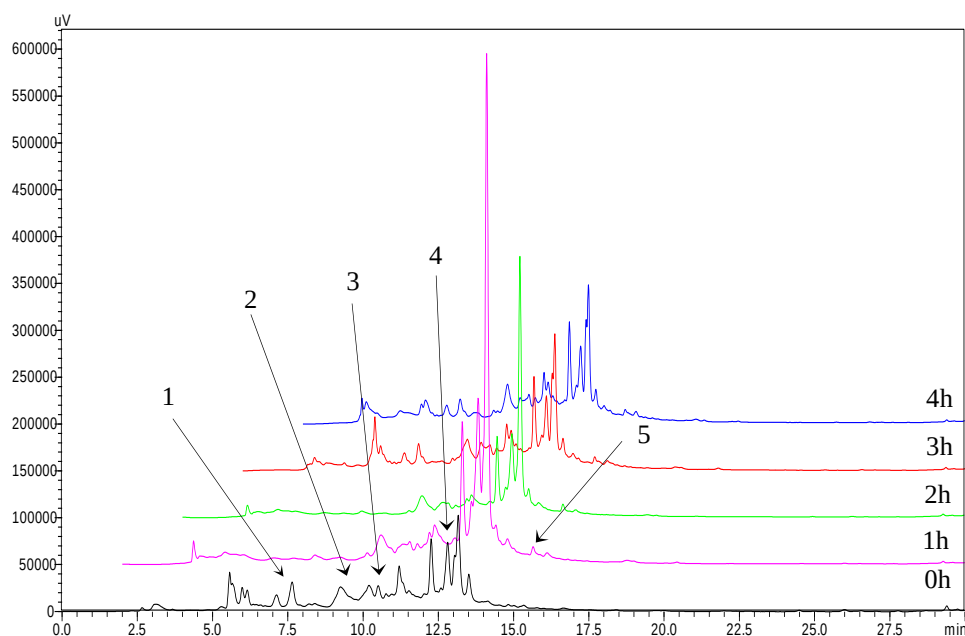
Резултати су изражени као средња вредност ± SD три мерења (n=3); средње вредности у истој колони са суперскриптом који је означен различитим словима, статистички се разликују на $p < 0,05$; "-" није детектовано

Међу свим идентификованим фенолним једињењима, једино је хлорогенска киселина показала високу стабилност под интестиналним условима. Током ове фазе, садржај хлорогенске киселине у оба узорка (кора и пулпа дивље јабуке) се повећао од 1,40% до 30,0% у поређењу са гастричном фазом и 11,0% до 30,3% у поређењу са концентрацијом на самом почетку дигестије.

Неки литературни подаци потврђују стабилност фенолних киселина у узорцима воћа и воћним соковима током интестиналних услова (уочено је врло мало смањење, мање од 5%) и њихову отпорност на промене рН и ензимску хидролизу.²²¹⁻²²³

5.5.2. Симулација *in vitro* гастроинтестиналне дигестије плода дивље малине

Промене у концентрацијама фенолних једињења детектованих у екстракту свежег плода дивље малине, у различитим временским интервалима *in vitro* симулиране дигестије, анализирание HPLC методом, приказане су на Слици 45 и у Табели 20.



Слика 45. Промене концентрација фенолних једињења у пулпи дивље малине током симулиране *in vitro* дигестије праћене HPLC методом (1:гална киселина, 2:цијанидин-3-глукозид, 3:цијанидин-3-софорозид, 4:катехин, 5:елагинска киселина)

Резултати показују да се концентрација галне киселине у гастричној фази (после 1 и 2 h) смањила, док се после 3 h и 4 h, у симулираном интестиналном флуиду, значајно повећала ($p < 0,05$) у поређењу са првим сатом дигестије. Антоцијанини цијанидин-3-глукозид и цијанидин-3-софорозид, као и катехин, показали су висок степен ослобађања после 1 h дигестије (гастрична фаза), док су њихове концентрације благо смањене током интестиналне фазе дигестије. Елагинска киселина се такође показала као отпорна на гастричне услове, док је њен ниво у интестиналној фази дигестије значајно опао ($p < 0,05$).

Повећање концентрације катехина, након једног сата дигестије, указује да постоји могућност да се под таквим условима катехин ослобађа из самог матрикса воћа. Такође, могуће је да је концентрација катехина у порасту због хидролизе једињења у којима се катехин налазио у везаном облику. Благо смањење његове концентрације у интестиналној фази дигестије указује да услови у овом делу дигестивног тракта ипак могу утицати на смањење концентрације катехина

доступне за апсорпцију из интестиналног тракта у крвоток. Свеукупно, друге студије које се баве анализом биодоступности фенолних једињења из различитих производа малине (екстракти, сокови или пулпа) показале су да флавоноиди и фенолне киселине показују већу биолошку доступност од антоцијана.^{210,224}

Табела 20. Садржај фенолних једињења у дивљим малинама (mg/100g CM) током симулиране *in vitro* гастроинтестиналне дигестије

Време	Гална киселина	Цијанидин-3- глукозид	Цијанидин-3- софорозид	Катехин	Елагинска киселина
0h	2,61 ± 0,05 ^a	25,5 ± 0,30 ^a	4,16 ± 0,06 ^a	1,01 ± 0,03 ^a	-
1h	0,556 ± 0,014 ^b	31,2 ± 0,53 ^b	4,40 ± 0,08 ^b	6,03 ± 0,10 ^b	1,50 ± 0,03 ^a
2h	0,418 ± 0,009 ^c	21,3 ± 0,45 ^c	3,35 ± 0,05 ^c	5,12 ± 0,08 ^c	1,10 ± 0,07 ^b
3h	0,908 ± 0,015 ^d	24,4 ± 0,48 ^d	4,52 ± 0,06 ^b	4,38 ± 0,06 ^d	0,906 ± 0,05 ^c
4h	1,82 ± 0,02 ^e	27,1 ± 0,49 ^e	4,32 ± 0,07 ^b	4,98 ± 0,07 ^e	0,769 ± 0,04 ^d

Резултати су изражени као средња вредност ± SD три мерења (n=3); средње вредности у истој колони са суперскриптом који је означен различитим словима, статистички се разликују на $p < 0,05$; "-" није детектовано

Резултати добијени у овом раду указују да током дигестије антоцијани, флавоноиди и фенолне киселине могу остати у релативно високим концентрацијама, па имају позитивне ефекте на организам. Резултати *in vitro* дигестије, заједно са резултатима хемијске екстракције, потврђују да све количине фенолних једињења присутне у испитиваним плодовима нису потпуно биодоступне за апсорпцију.

5.6. Функционализација фенолних киселина синтетичком модификацијом

Функционализација фенолних киселина извршена је њиховом синтетичком модификацијом у циљу добијања једињења са потенцијално бољом биолошком активношћу, пре свега антиоксидативном. На овај начин су добијене две серије једињења, 1,2,4-триазол-3-тиони и 1,3,4-оксадиазоли.

5.6.1. Синтеза 1,2,4-триазол-3-тиона

Полазећи од одабраних фенолних киселина, серија 1,2,4-триазол-3-тиона је синтетисана по следећој реакционој схеми (Схема 10):

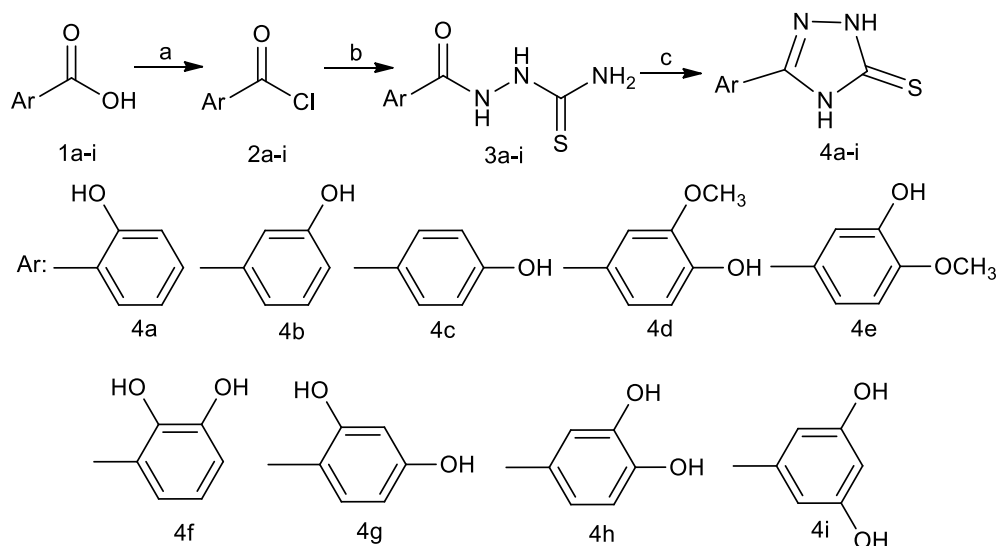


Схема 10. Реагенси и услови: а) SOCl_2 , DMF, CH_2Cl_2 , 2 h, собна температура; б) $\text{NH}_2\text{NHC(S)NH}_2$, THF; c) NaOH, кување, 3 h; HCl

5.6.1.1. Евалуација антиоксидативне активности 1,2,4-триазол-3-тиона

1,2,4-Триазол-3-тиони последњих година привлаче доста пажње због свог потенцијала у неутралисању слободних радикала, па се антиоксидативна активност ових једињења све више испитује. Већина ових хетероцикличних једињења, са умереном антиоксидативном активношћу, синтетисана је додавањем различитих супституената триазолском прстену, у положајима 4- и 5-²²⁵

5.6.1.1.1. Испитивање способности неутралисања DPPH радикала

У циљу поређења, антиоксидативни капацитет полазних фенолних киселина и девет синтетисаних 1,2,4-триазол-3-тиона процењен је на исти начин и под истим условима, на основу њихове способности да неутралишу стабилни DPPH слободни радикал.²²⁶ Постоји много модификација ове методе и резултати DPPH

теста представљају се на много начина, првенствено у зависности од концентрације узорака, концентрације раствора DPPH, времена инкубације, примењеног растварача и температуре. Већина студија изражава резултате као IC₅₀ вредност, дефинисану као количину антиоксиданса која је потребна да смањи почетну концентрацију DPPH за 50%.²²⁷

Тако је изражена и антиоксидативна активност синтетисаних триазола и одговарајућих полазних фенолних киселина (Табела 21). Сви триазоли су показали осредњу до одличну антиоксидативну активност, са IC₅₀ вредностима у опсегу од 12,66 до 130,81 µM, док су IC₅₀ вредности аскорбинске и нордихидрогвајаретинске киселине (NDGA), које су коришћене као референтни стандарди, износиле 38,78 односно 20,83 µM. Триазоли **4f** и **4h** су показали значајно веће способности неутралисања DPPH радикала у поређењу са тестираним референтним антиоксидансима, са IC₅₀ вредностима 14,63 и 12,66 µM, респективно.

Полазне фенолне киселине поседују знатно ниже антиоксидативне активности у поређењу са триазол-3-тионима (Табела 21). Резултати добијени DPPH тестом показују да међу свим испитиваним фенолним киселинама, једино једињења **1f** и **1h** имају IC₅₀ < 1000 µM. Ове две фенолне киселине су показале добар антиоксидативни потенцијал мерен DPPH методом (са IC₅₀ вредностима 22,71 односно 35,17 µM), али је антиоксидативна активност њихових одговарајућих триазола ипак значајно већа. Литературни подаци потврђују резултате добијене за једињења **1f** и **1h**, тј. њихову велику способност неутралисања слободних радикала^{228,229}, док фенолне киселине које у својој структури поседују само једну хидроксилну групу, као што су **1a**, **1b** и **1c**, показују незнатни антиоксидативни потенцијал.²²⁸⁻²³¹

Резултати овог рада показују да су фенолне киселине, које у својој структури поседују две хидроксилне групе, као што су **1g** и **1i**, бољи антиоксиданси него монохидроксилне киселине, али је њихова активност такође веома мала.

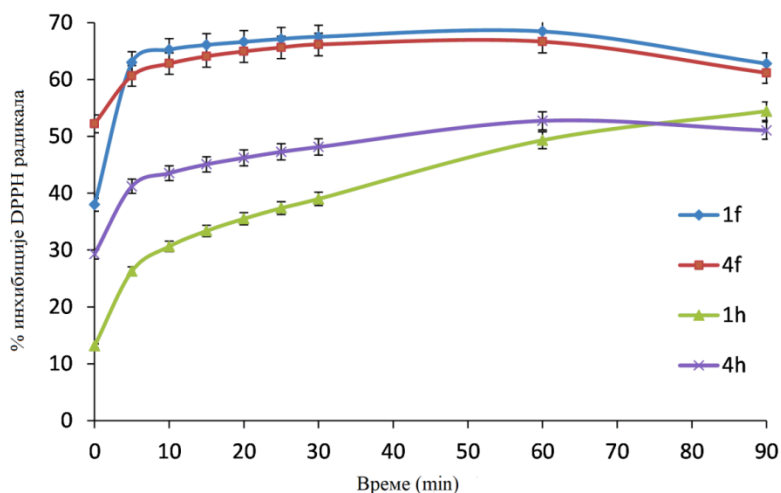
Триазоли **4f** и **4h** су показали најзначајнији потенцијал у неутрализацији DPPH радикала међу свим синтетисаним триазолима. Једињење **4h** је показало најбољи антиоксидативни потенцијал са најнижом IC₅₀ вредношћу (12,66 µM), која се значајно не разликује од IC₅₀ вредности добијене за триазол **4f** (14,63 µM).

Табела 21. Способност фенолних киселина и њихових одговарајућих триазола да неутралишу DPPH радикал

Фенолне киселине		1,2,4-триазол-3-тиони	
Једињење	IC ₅₀ (μM)	Једињење	IC ₅₀ (μM) ± SD
1a	> 1000	4a	106,48 ± 2,30
1b	> 1000	4b	108,69 ± 2,06
1c	> 1000	4c	122,98 ± 2,27
1d	> 1000	4d	53,72 ± 1,36
1e	> 1000	4e	130,81 ± 1,59
1f	22,71 ± 0,70	4f	14,63 ± 0,36
1g	> 1000	4g	110,17 ± 2,20
1h	35,17 ± 0,81	4h	12,66 ± 0,22
1i	> 1000	4i	118,53 ± 2,24
Референтни антиоксиданси			
Аскорбинска киселина		38,78 ± 0,60	
NDGA		20,83 ± 0,23	

Резултати су изражени као средња вредност ± SD три мерења

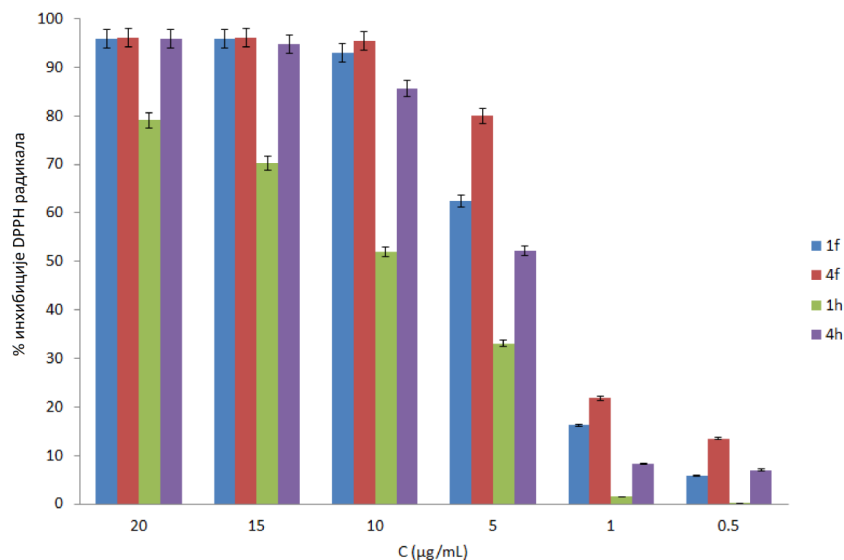
Да би се утврдило понашање два пара триазола и фенолних киселина које су показале највећи антиоксидативни потенцијал, праћена је њихова способност „хватања“ DPPH радикала током 90 минута. Корелација између процента инхибиције и протеклог времена за једињења **1f**, **4f**, **1h** и **4h**, где је концентрација свих једињења 5 μg/mL, приказана је на *Слици 46*.



Слика 46. Корелација између процента инхибиције и времена за 2 пара фенолних киселина и триазола који су показали највећу антиоксидативну активност, мерена DPPH методом. Свака вредност је средња вредност 3 мерења ± SD

На самом почетку реакције (на 0 min), триазол **4f** је показао највиши проценат инхибиције од 52,22%, праћен својом одговарајућом фенолном киселином **1f**, која је дала проценат инхибиције 37,98% на истом времену. Проценат инхибиције једињења **4h** и **1h**, на истом времену, био је 29,30 и 13,13%, редом. На времену од 5 min, овај ред је промењен; киселина **1f** је показала већи антиоксидативни потенцијал од одговарајућег триазола (**4f**), али ова разлика није значајна ($p > 0,05$). Овакав однос је остао сличан до самог краја реакције. Триазол **4h** је показао убедљиво већу способност неутрализације DPPH радикала него његова одговарајућа фенолна киселина **1h** на времену од 5 min, и овај однос је остао сличан до 90 min.

Проценти инхибиције DPPH радикала за једињења **1f**, **4f**, **1h** и **4h**, добијени за различите концентрације једињења, у опсегу од 0,5 до 20 $\mu\text{g/mL}$, приказани су на Слици 47. На високим концентрацијама (20 $\mu\text{g/mL}$), проценти инхибиције триазола **4f** и његове одговарајуће фенолне киселине **1f** се нису значајно разликовали ($p > 0,05$), док је, на истој концентрацији, триазол **4h** показао већи проценат инхибиције него његова одговарајућа фенолна киселина.



Слика 47. Проценат инхибиције DPPH за једињења **1f**, **4f**, **1h** и **4h** различитих концентрација. Свака вредност је средња вредност 3 мерења $\pm$ SD

За ниске концентрације триазола и фенолних киселина (Слика 47), разлике у проценту инхибиције DPPH радикала између ових једињења су више наглашене него при високим концентрацијама. Добијени резултати за једињења **4f** и **1f**, на концентрацијама нижим од 10 µg/mL, показали су да триазол **4f** има значајно виши ($p < 0,05$) проценат инхибиције у поређењу са **1f**, а ово указује да триазол поседује моћније антиоксидативне особине при ниским концентрацијама него његова матична фенолна киселина. Једињења **4h** и **1h** имају врло сличан однос антиоксидативног потенцијала при свим примењеним концентрацијама.

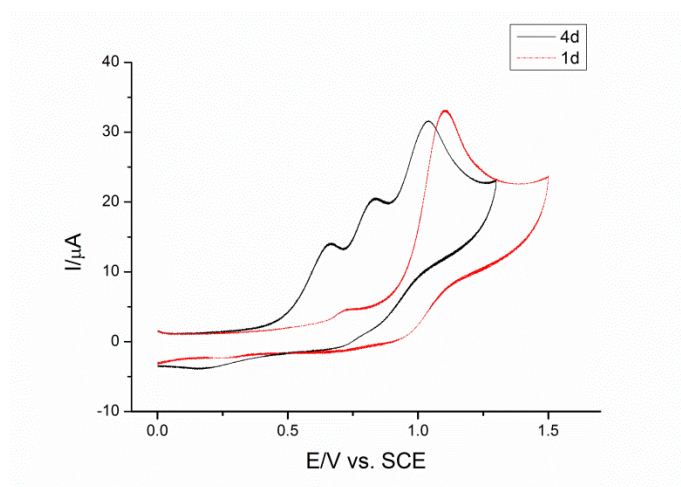
5.6.1.2. Испитивање електрохемијског понашања 1,2,4-триазол-3-тиона и полазних фенолних киселина методом цикличне волтаметрије

У циљу испитивања електрохемијског понашања 1,2,4-триазол-3-тиона и њихових матичних фенолних киселина, извршена су испитивања наведених једињења методом цикличне волтаметрије. Ова испитивања су изведена у диметилформаиду (DMF) као растварачу, у опсегу потенцијала од +1,7 V до -2,1 V. Одабрана су два триазола, која су показала најбољи антиоксидативни капацитет (**4d** и **4f**) и добијени волтамограми су упоређени са волтамограмима матичних фенолних киселина снимљеним под истим условима. Понашање фенолних киселина у DMF-у било је слично и у другим срединама (DMSO, AN²³² и EtOH-H₂O, pH 7²³³). Оба једињења (**1d** и **1f**) дају један сигнал који се састоји од два делимично преклопљена пика који одговарају отпуштању 2 електрона. Струје другог (најизраженијег) пика за једињење **1f** одговарају сукцесивном отпуштању једног електрона у сваком од благо раздвојених пикова. Насупрот томе, за једињење **1d** пикови су веома блиски, а струја повећана, тако да изгледа да је отпуштено 2 електрона у једном кораку. У исто време, потенцијали ових пикова се са повећањем брзине скенирања померају ка позитивнијим вредностима. Функција $\Delta E_p / \Delta \log v$ износи отприлике 50-60 mV dec⁻¹, при мањим брзинама скенирања (< 200 mV s⁻¹), док при вишим брзинама достиже 100 mV dec⁻¹ (< 2000 mV s⁻¹). Судећи по изгледу снимљених волтамограма, прва вредност се углавном може приписати

утицају хемијских реакција везаних за процес оксидације, а друга иреверзибилности процеса преноса електрона.

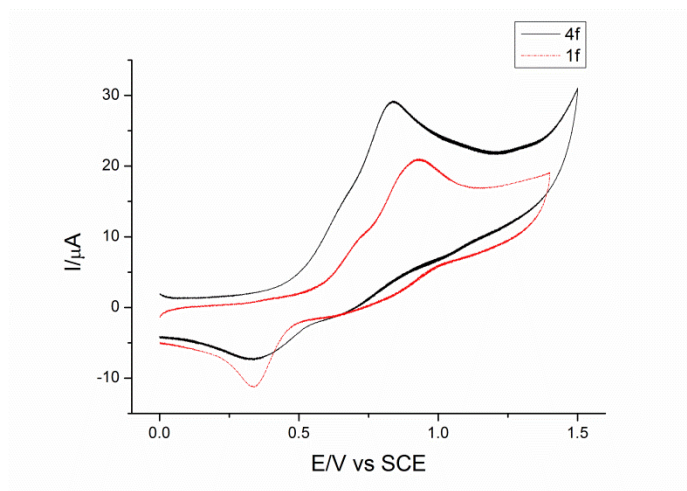
Одабрани триазоли (**4d** и **4f**) оксидују на потенцијалима $> 0,6$ V у форми 2-3 једноелектронска пика, који се разликују у потенцијалима и облику. Међутим, њихови волтамограми су у корелацији са волтамограмима одговарајућих фенолних киселина, уз боље раздвајање пикова. Ова чињеница може бити приписана бољој стабилизацији оксидацијоних производа триазола, делокализацијом неспарених електрона преко триазолски или оба прстена.

Уместо једног очигледно двоелектронског пика на $+1,14$ V код фенолне киселине **1d**, у случају одговарајућег триазола **4d** долази до појаве три једноелектронска пика на $+0,66$ V, $+0,83$ V и $+1,04$ V (Слика 48). Пикови на потенцијалима $+0,83$ V и $+1,04$ V настају услед хемијске реакције која је праћена процесом на $+0,66$ V. Пошто пик на $+0,83$ V преовладава при вишим брзинама скенирања и брзо се смањује при нижим, а понашање већине позитивних пикова је обрнуто, може се закључити да су прва два пика повезана електрон-електрон процесом, док су први и трећи пик хемијски купловани. Ово вероватно значи да се на $+1,04$ V оксидује депротоновани облик једињења **4d**, као што показују литературни подаци добијени за слична једињења.^{232,233} DMF такође има улогу стабилизатора, као протон-акцепторски растварач, слично као DMSO.²³²



Слика 48. Циклични волтамограми једињења **1d** (0,86 mM) и **4d** (1,11 mM) у DMF-у + 0,1 M TBAP на GC електроди, $\nu = 100$ mV s⁻¹

Највећа сличност између матичне киселине и одговарајућег триазола у волтаметријском смислу је установљена за једињење **4f**, где су два једноелектронска пика на блиским потенцијалима за фенолну киселину померена у негативном правцу за само 150-200 mV (Слика 49).



Слика 49. Циклични волтамограми једињења **1f** (0,86 mM) и **4f** (1,11 mM) у DMF-у + 0,1 M TBAP на GC електроди, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$

Ово указује на лак процес иреверзибилне оксидације, са $\Delta E(a/c) \sim 450 \text{ mV}$ (на 100 mV s^{-1}). Након оксидације при катодном скенирању до -2,1V, на волтамограмима се појављују 2-3 нова мала пика, као последица настајања врста у куплованим хемијским реакцијама. Насупрот томе, у овом опсегу потенцијала није забележен јасно дефинисан редукциони процес. Значајни потенцијали оксидационих пикова су приказани у Табели 22.

Табела 22. Потенцијали оксидационих пикова ($\nu=100 \text{ mVs}^{-1}$)

Једињење	Ер(1) ^a	Ер(2)	Ер(3)
1d		+1,14	
4d	+0,66	+0,83	+1,04
1f		+0,96	
4f	н.д. ^b	+0,84	н.д.

^aУ V према zasiћеној каломеловој електроди (SCE); ^bнејасно дефинисан

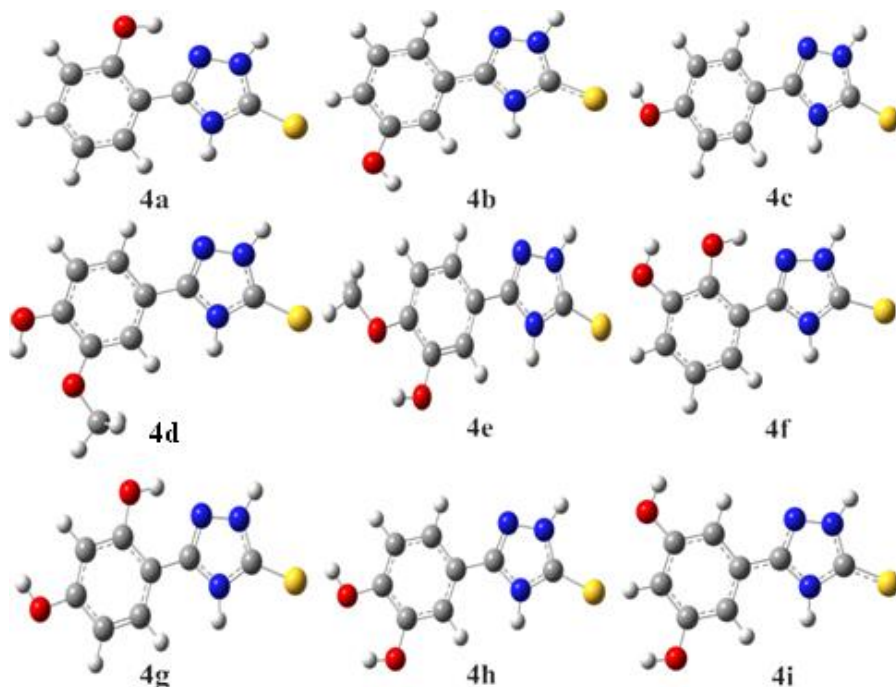
5.6.1.3. Теорија функционала густине

За сваки 1,2,4-триазол-3-тион, оптимизовани су сви могући ротамери, и израчунате њихове енергије. Најстабилнији конформери свих испитиваних једињења су приказани на *Слици 50*.

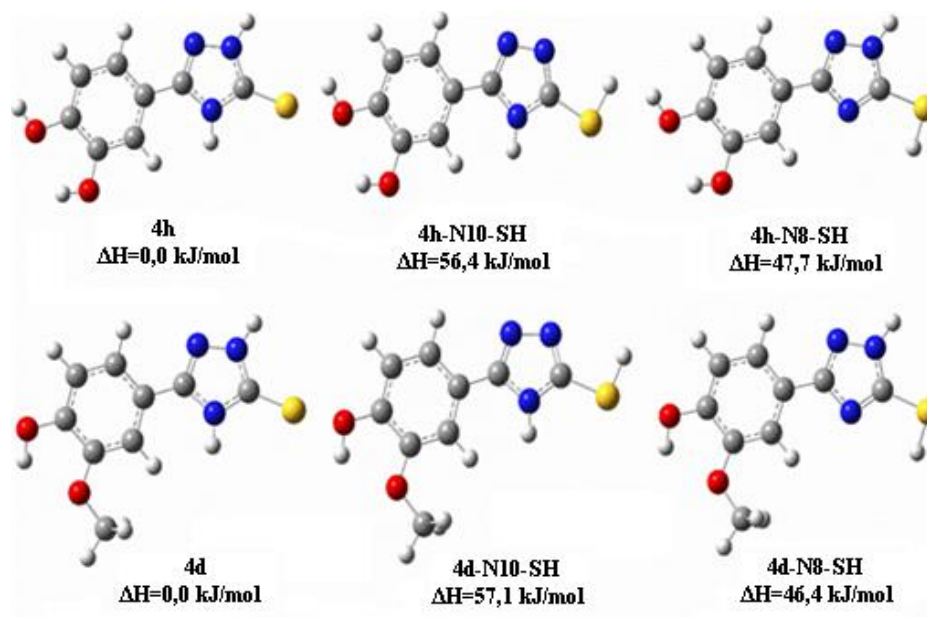
Додатно, испитивани су и тион-тиол таутомери једињења **4a-4h**. Утврђено је да су тионски облици стабилнији за више од 45 kJ mol^{-1} него њихове одговарајуће тиолске форме. Два примера тион-тиол таутомеризма приказана су на *Слици 51*. Узимајући у обзир ову чињеницу, даља пажња је усмерена на тионске облике испитиваних једињења. Добијени геометријски параметри за све молекуле су међусобно веома слични. Вредности дужина веза, углови веза и диедарски углови једињења **4d**, **4e** и **4h** дати су у *Табели П4 (Прилог)*.

Сви испитивани 1,2,4-триазол-3-тиони су планарни, што указује на то да могу да користе оба прстена при делокализацији наелектрисања и спинске густине.

Изузев једињења **4b**, **4c** и **4i**, сва друга једињења поседују интрамолекулске водоничне везе, које додатно стабилизују одговарајућа једињења.



Слика 50. Оптимизоване геометрије испитиваних једињења; свако једињење је представљено у облику свог најстабилнијег конформера

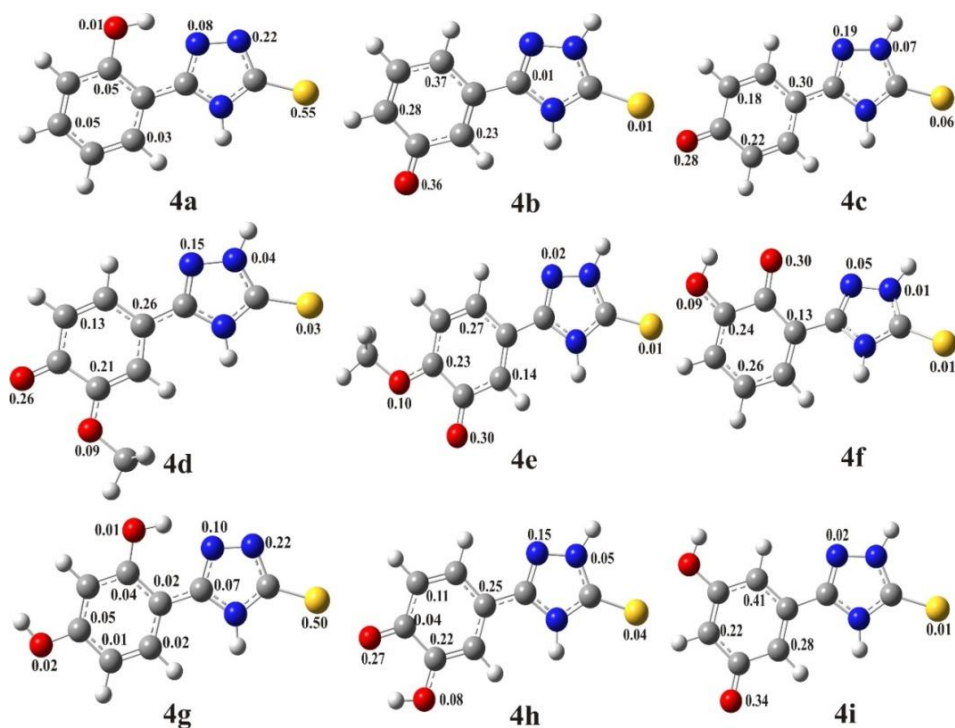


Слика 51. Оптимизоване геометрије тионских и тиолских таутомера једињења **4d** и **4h** и одговарајуће релативне вредности енталпија

5.6.1.4. Слободни радикали, радикал-катјони и анјони 1,2,4-триазол-3-тиона

Антиоксидативна активност триазола је повезана са њиховом способности да ослободе атоме водоника, од атома азота или кисеоника. Хомолитичко раскидање О-Н и N-Н веза 1,2,4-триазол-3-тиона води формирању одговарајућих радикала. Вредности израчунатих енталпија дисоцијације везе (BDE) приказане су у Табели П5 (Прилог).

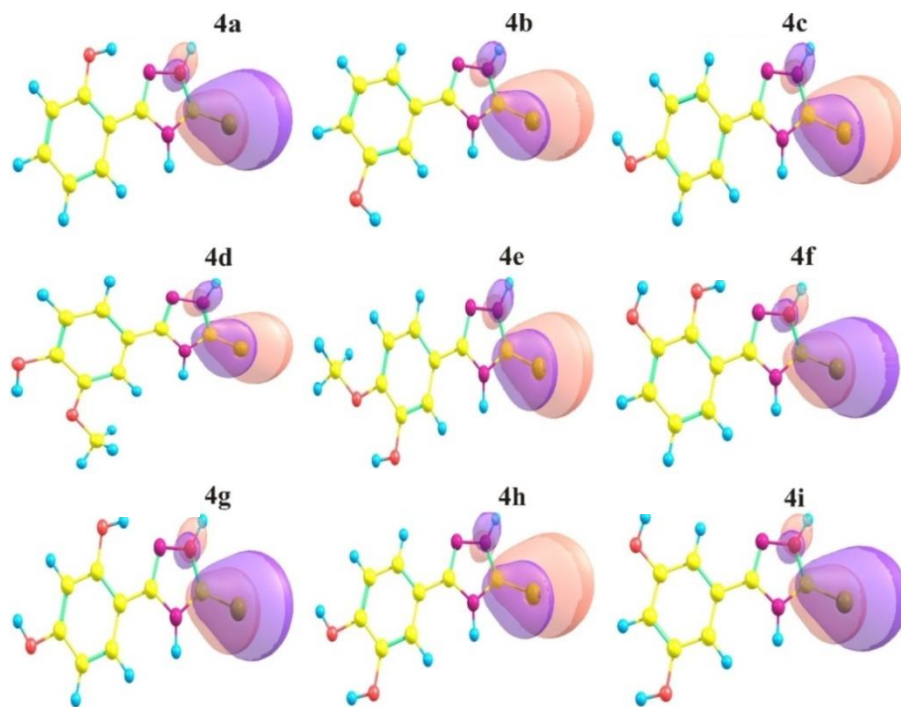
Стабилност ових радикала игра значајну улогу у одређивању антиоксидативне активности матичних молекула. Познато је да делокализација спинске густине у слободном радикалу значајно утиче на његову стабилност.¹⁰⁷ Вредности спинске густине стабилних радикала су приказане на Слици 52. Што је боља делокализација неспареног електрона, то је добијени радикал стабилнији. Радикали настали из *p*-хидроксилне групе (једињења **4c**, **4d** и **4h**) су најстабилнији јер су њихови неспарени електрони делокализовани и преко бензенског и преко триазолског прстена.



Слика 52. Расподела спинске густине у радикалима насталим из испитваних 1,2,4-триазол-3-тиона у метанолу

Нешто слабија, али вредна помена, је стабилност радикала који настаје раскидањем О-Н везе у *o*-положају (једињење **4f**), услед сличне делокализације неспареног електрона. Веома добра делокализација неспарених електрона је примећена у случају радикала насталих раскидањем N8-Н везе (једињења **4a** и **4g**).

Такође, важно је одредити енергије НОМО (*енг.* Highest Occupied Molecular Orbital) из разлога што оне учествују у хемијским реакцијама, па су ове енергије врло битан параметар за одређивање реактивности молекула. Што молекул има нижу енергију НОМО, то је његова електрон донорска способност слабија, док виша енергија НОМО имплицира бољу електрон-донорску способност молекула. Слика 53 показује да највећи допринос НОМО свих испитиваних 1,2,4-триазол-3-тиона долази од сумпора.



Слика 53. НОМО испитиваних 1,2,4-триазол-3-тиона у метанолу

У складу са овим подацима су и резултати добијени NBO анализом, која је показала да се у НОМО сваког једињења налази усамљени електронски пар сумпора. Логично је закључити да ће молекул изгубити електрон из ове орбитале, при чему се формира одговарајући радикал-катјон (Схема 11).

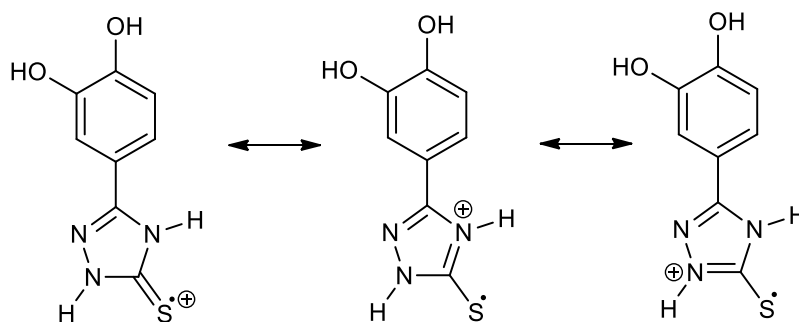
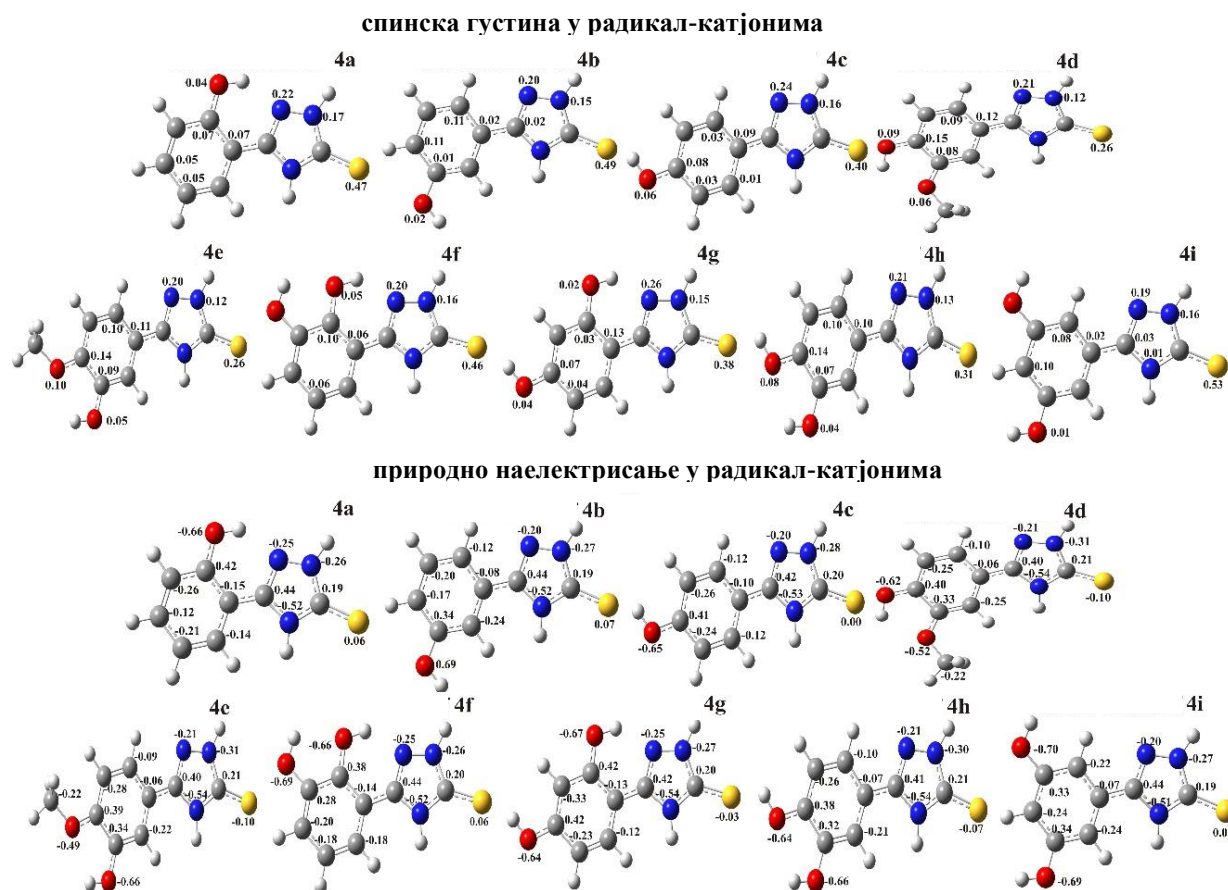


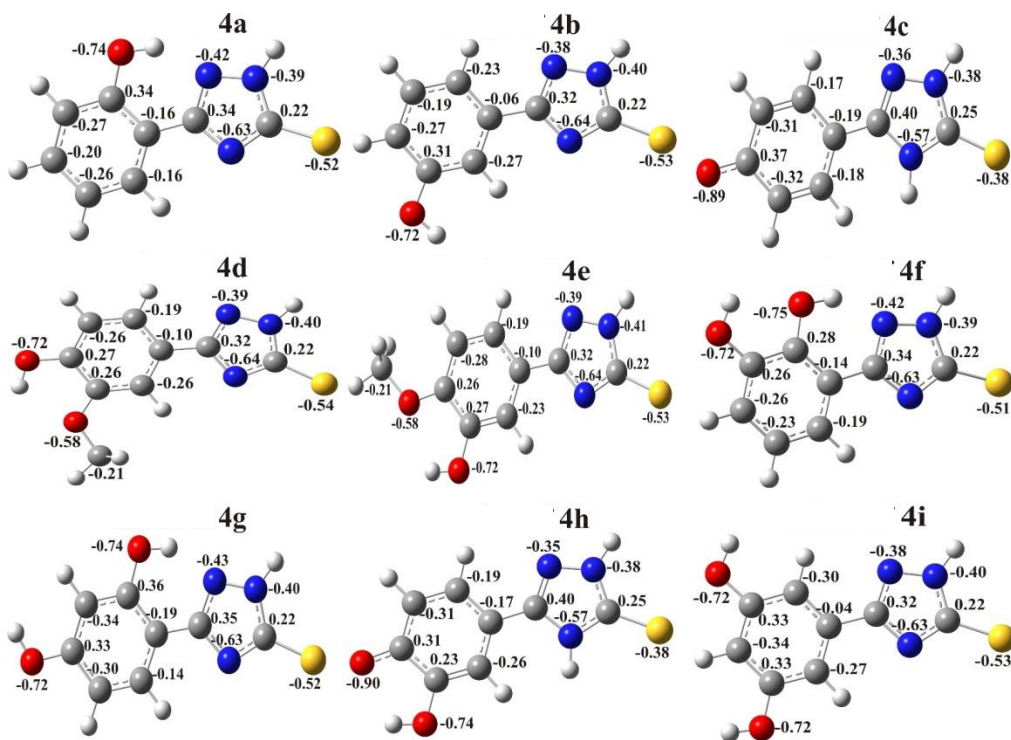
Схема 11. Резонантна стабилизација радикалског катјона у једињењу **4h**

Јонизациони потенцијал (IP) је мера лакоће неког једињења да отпусти електрон. Израчунате IP вредности испитиваних једињења су приказане у *Табели П5 (Прилог)*. У случају радикал-катјона **4d**, **4e** и **4h**, неспарени електрон је добро делокализован преко триазолског прстена (*Слика 54*), што стабилизује ове врсте, па су IP вредности мале.



Слика 54. Расподела спинске густине и природног наелектрисања у свим радикал-катјонима насталим из испитиваних 1,2,4-триазол-3-тиона у метанолу

Хетеролитичко раскидање О-Н и N-H веза 1,2,4-триазол-3-тиона је први корак SPLET механизма, који води до формирања одговарајућих анјона. Дистрибуција наелектрисања у свим анјонима, добијена NBO анализом, приказана је на *Слици 55*.



Слика 55. Природна дистрибуција наелектрисања у свим ањонима добијеним из испитиваних 1,2,4-триазол-3-тиона у метанолу

На основу РА вредности (Табела П5 у Прилогу) хетеролитичко раскидање N8-H везе је фаворизовано. У овим ањонима, негативно наелектрисање је делокализовано преко сумпора и азота триазолског прстена. У случају једињења **4h**, где је ањон формиран раскидањем О-Н везе фенолне групе у *p*-положају, РА вредност је најнижа. Поређењем РА и ЕТЕ вредности, може се видети да је отпуштање електрона енергетски захтевније него хетеролитичко раскидање везе. Добијене ЕТЕ вредности су упоредиве са вредностима добијеним за галну киселину²³⁵, кафеинску киселину²³⁶ и хидроксibenзоеве киселине²³⁷.

5.6.1.5. Механизам антиоксидативне активности и SAR студија

На основу вредности термодинамичких параметара BDE, IP, PDE, PA и ETE, може се претпоставити који ће механизам антиоксидативне активности превагнути под одређеним условима. Наиме, може се претпоставити да пут који карактерише најнижа вредност реакционе енталпије може бити доминантан антиоксидативни механизам за испитивана једињења. Израчунате вредности у *Табели П5 (Прилог)* показују да су IP вредности за сва испитивана једињења значајно више од одговарајућих BDE вредности, а нарочито од PA вредности. Ова сазнања указују да SET-PT механизам није фаворизован реакциони пут за испитиване 1,2,4-триазол-3-тионе у метанолу. Са друге стране, PA вредности су знатно ниже од BDE вредности, што имплицира да је SPLET механизам доминантни механизам под овим условима. Ови резултати су у сагласности са експерименталним IC₅₀ вредностима (*Табела 22*). Наиме, једињења **4f** и **4h** су окарактерисана најнижим PA вредностима и најнижим IC₅₀ вредности. Овај резултат је донекле и очекиван, зато што је у неким објављеним испитивањима антиоксидативне активности Шифових база показано да поларни протични растварачи, као што су метанол и етанол, погодују SPLET механизму.²³⁸

Као што се може видети из DFT израчунавања, присуство триазол-3-тионске групе значајно повећава способност неутралисања слободних радикала једињења **4a-i**, у поређењу са матичним фенолним киселинама. Као резултат SPLET механизма, феноксидни радикал добијен из фенолне киселине, може бити конвертован у хинонску структуру, као што је приказано на *Схеми 12*.

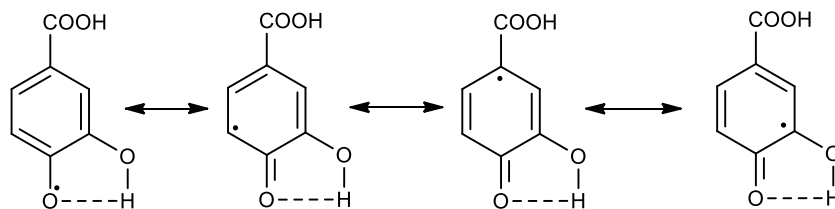


Схема 12. Резонантна стабилизација радикала протокатехинске киселине

Међутим, формирање хинона је много спорије него формирање деривата триазола. Према SPLET механизму, карбоксилна група у поларној средини тежи да дисосује до електрон-донорског карбоксилатног ањона, који смањује електрофилност хинона, снижавајући реактивност према нуклеофилном нападу метанола. Познато је да хинон одмах реагује са метанолом, што води регенерацији фенолне структуре, која има способност неутрализације додатних количина DPPH радикала.²³⁹ У једињењима триазола, феноксидни радикал може бити јако стабилизован резонанцијом будући да неспарени електрон може бити присутан не само на кисеонику или бензеновом прстену, него може бити и делокализован преко триазолског дела молекула (Схема 13).

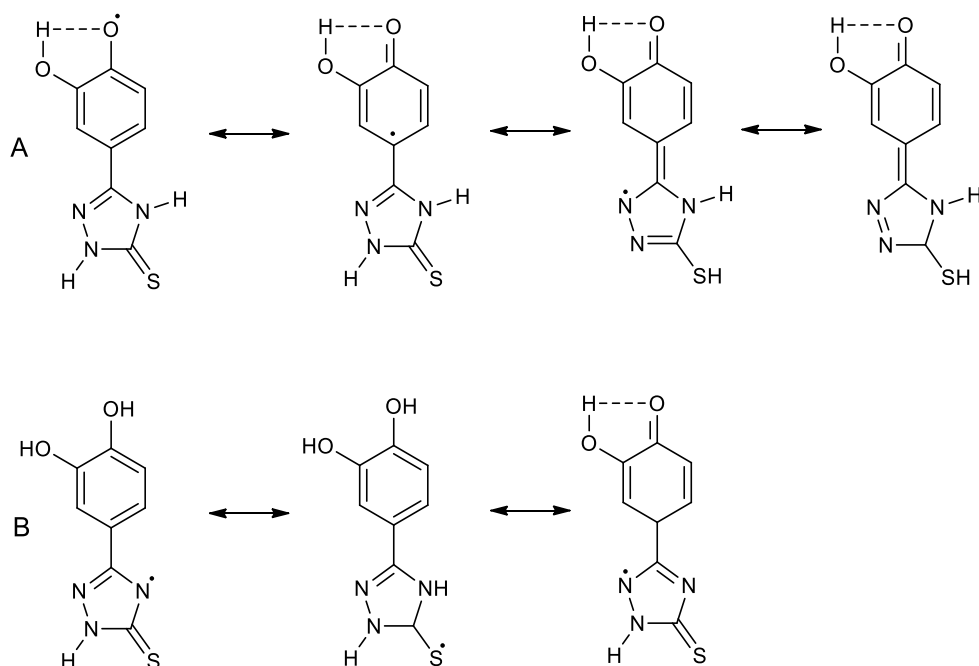


Схема 13. Резонантна стабилизација радикала триазола **4h** након хетеролитичког: **А)** *O*-*H*, **Б)** *N*-*H* раскидања везе, и губитка једног електрона према SPLET механизму

Резонантна стабилизација узрокује лако формирање феноксидног радикала са нижом реактивношћу и вишом стабилношћу. Другим речима, радикал није у стању да се укључи у иницијацију или пропагацију ланчаних реакција и његова највероватнија судбина је да се претвара у неутралну хинонску структуру, или, у

мањој мери, куплује до димерне структуре, која и даље садржи фенолне хидроксилне групе способне за даљу неутрализацију слободних радикала.²⁴⁰ Боље могућности за делокализацију ван бензеновог прстена смањују шансу за димеризацију и евентуално грађење комплекса са DPPH радикалом.²⁴¹

Два најактивнија једињења **4f** и **4h** садрже две суседне хидроксилне групе у својој структури и имају могућност да формирају интрамолекулске водоничне везе. Након дисоцијације протона који није обухваћен овом везом и губитком једног електрона, формира се веома стабилан феноксидни радикал.^{242,243}

Поређењем резултата добијених DPPH тестом, уочавају се велике разлике у способности једињења **4d** и **4f** или **4h** да неутралишу DPPH радикал. Увођење додатне метокси групе у ароматични прстен повећава нуклеофилност феноксилног радикала насталог из једињења **4d** и самим тим повећава способност неутрализације DPPH радикала.

Међутим, заменом метокси групе хидроксилном смањује се активност услед мањег ефекта стабилизације интрамолекулским водоничним везама. Опет, поређењем једињења **4d** и **4e** показано је да **4d** ефикасније неутралише радикале од **4e**, зато што хидроксилна групе у *m*-положај у једињењу **4e** не дозвољава продужену стабилизацију резонанцијом феноксидног радикала кроз цео молекул.²⁴⁴ Једињења **4g** и **4i** која имају две хидроксилне групе у *m*-положају показују нешто нижу антирадикалску активност у поређењу са **4f** и **4h**. Може се закључити да је положај хидроксилних група далеко важнији него њихов број. Јасно је да су *o*- и *p*-хидроксилна група у комбинацији са *m*-хидроксилном у бензеновом прстену кључне за добру антиоксидативну активност.²⁴⁵ Занимљиво је да постоје мале разлике у антирадикалској активности између једињења **4a**, **4b** и **4c**. Ови резултати указују да је интрамолекулска водонична веза главни услов за стабилизацију феноксидног радикала и висок антиоксидативни потенцијал, као и положај хидроксилне групе.

5.6.2. Синтеза диацилхидразина и 1,3,4-оксадиазола

Серија диацилхидразина и 1,3,4-оксадиазола синтетисана је полазећи од одабраних фенолних киселина, по следећој реакционој схеми (Схема 14):

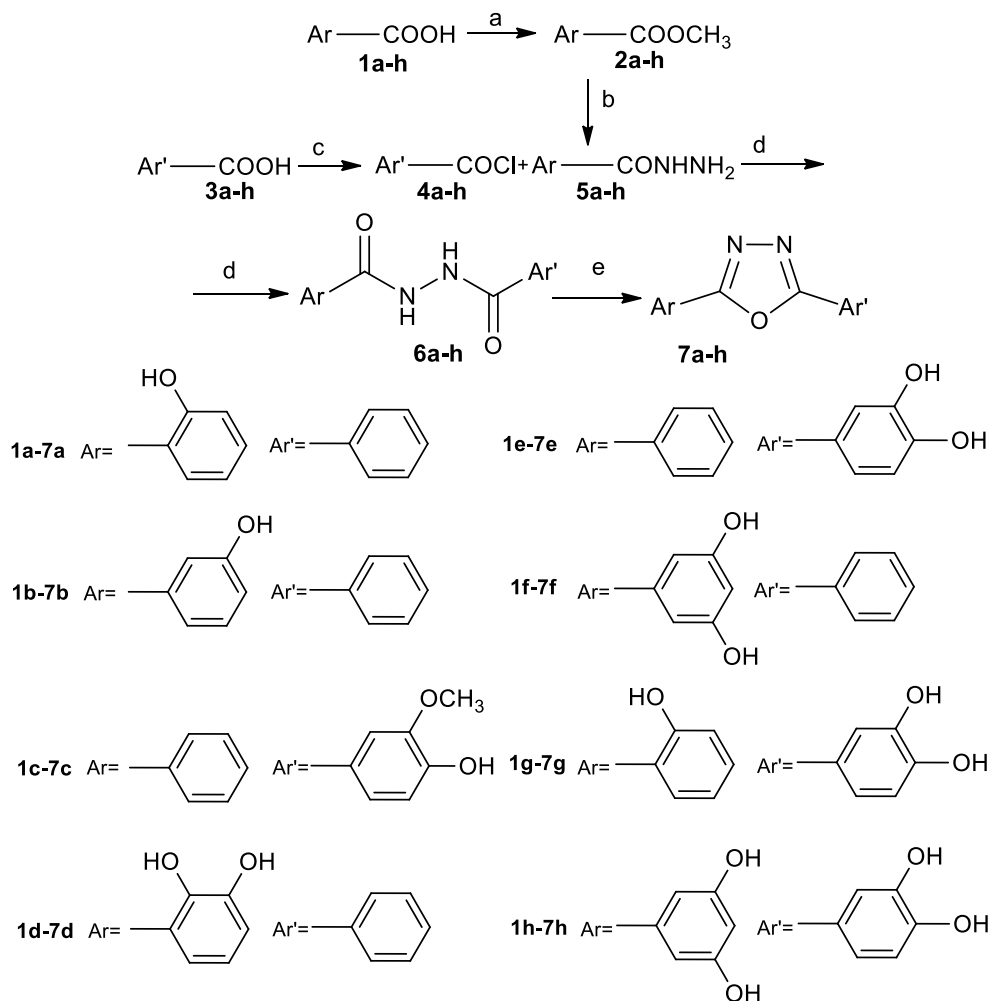


Схема 14. Реагенси и услови: **a)** H_2SO_4 , MeOH, кување, 5 h; **b)** $\text{N}_2\text{H}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, EtOH, кување, 12 h; **c)** SOCl_2 , DMF, CH_2Cl_2 , 2 h, на собној температури; **d)** THF, 6 h, собна температура; **e)** SOCl_2 , кување, 6 h

Синтетисана је серија од осам диацилхидразина (прекурсора) и осам 1,3,4-оксадиазола, чије су биолошке активности даље испитиване.

5.6.2.1. Биолошке активности диацилхидразина и одговарајућих 1,3,4-оксадиазола

Комбинација познатих антиоксиданаса са хетероцикличним фармакофорама у структури може бити интересантан приступ у откривању нових једињења која имају већи антиоксидативни потенцијал. Како је једно такво хетероциклично једињење, супституисани 1,3,4-оксадиазол, показало широк спектар биолошких активности,²⁴⁶⁻²⁴⁹ у овом раду је испитивана антиоксидативна активност синтетисаних 1,3,4-оксадиазола (применом неколико метода), цитотоксичност на нормалним хуманим ћелијама фибробласта плућа (MRC-5), њихов утицај на производњу ROS индуковану водоник-пероксидом и ефекат на активност антиоксидативних ензима.

5.6.2.1.1. Испитивање антиоксидативне активности диацилхидразина и одговарајућих 1,3,4-оксадиазола

Антиоксидативни капацитет 1,3,4-оксадиазола и њихових прекурсора диацилхидразина процењена је помоћу више различитих тестова који мере способност ових једињења да неутралишу реактивне слободне радикале (DPPH и ABTS) и реактивне кисеоничне врсте (H_2O_2), као и тестова који мере њихову редукциону моћ.

5.6.2.1.1.1. Испитивање способности 1,3,4-оксадиазола и диацилхидразина да неутралишу DPPH радикал

Резултати способности синтетисаних диацилхидразина и њихових одговарајућих 1,3,4-оксадиазола да неутралишу DPPH радикал, изражени као концентрација испитиваних једињења која неутралише 50% DPPH (IC_{50}) приказани су у Табели 23.

Табела 23. Способност диацилхидразина и њихових одговарајућих 1,3,4-оксадиазола да неутралишу DPPH радикал

Диацилхидразини		1,3,4-оксадиазоли	
Једињење	IC ₅₀ (μM) ± SD	Једињење	IC ₅₀ (μM) ± SD
6a	> 1000	7a	> 1000
6b	> 1000	7b	> 1000
6c	> 1000	7c	> 1000
6d	16,06 ± 0,40	7d	14,63 ± 0,34
6e	20,97 ± 0,47	7e	13,59 ± 0,30
6f	> 1000	7f	> 1000
6g	17,28 ± 0,41	7g	15,81 ± 0,38
6h	22,17 ± 0,53	7h	14,93 ± 0,36
Референтни антиоксиданси			
Аскорбинска киселина		38,78 ± 0,60	
NDGA		20,83 ± 0,23	

Резултати су изражени као средња вредност ± SD три мерења

Четири диацилхидразина и четири 1,3,4-оксадиазола показују добру антиоксидативну активност, са IC₅₀ вредностима у опсегу од 13,59 до 22,17 μM, у поређењу са IC₅₀ вредностима референтних антиоксиданаса, аскорбинске киселине (38,78 μM) и нордихидрогвајаретинске киселине, NDGA (20,83 μM). У поређењу са одговарајућим 1,3,4-оксадиазолима (**7a-h**), њихови прекурсори диацилхидразини (**6a-h**) су показали до 50% слабији антиоксидативни капацитет (Табела 23).

У овим једињењима, формирање радикала је могуће хетеролитичким цепањем ОН и NH везе, као што је претходно приказано за деривате триазола.²⁵⁰ Радикалске врсте настале од једињења **6a-h** након цепања NH везе, немају способност стабилизације резонанцијом одговарајућег ароматичног прстена, па њихова улога у антиоксидативној активности „родитељских“ једињења није значајна. Са друге стране, у случају хетеролитичког цепања ОН везе, неспарени електрон насталог радикала може бити делокализован у бензенском прстену (Схема 15A), узрокујући лако формирање феноксилног радикала са слабијом реактивношћу и већом стабилношћу. Феноксилни радикал настао из 1,3,4-оксадиазола (**7a-h**) је стабилизован резонанцијом будући да неспарени електрон може бити делокализован и преко ароматичног прстена, и преко 1,3,4-оксадиазолског дела молекула (Схема 15B). Сва једињења која показују одличну

антиоксидативну активност (**7d**, **7e**, **7g** и **7h**), у својој структури садрже две суседне хидроксилне групе са могућношћу формирања интрамолекулске водоничне везе (Схема 15B).

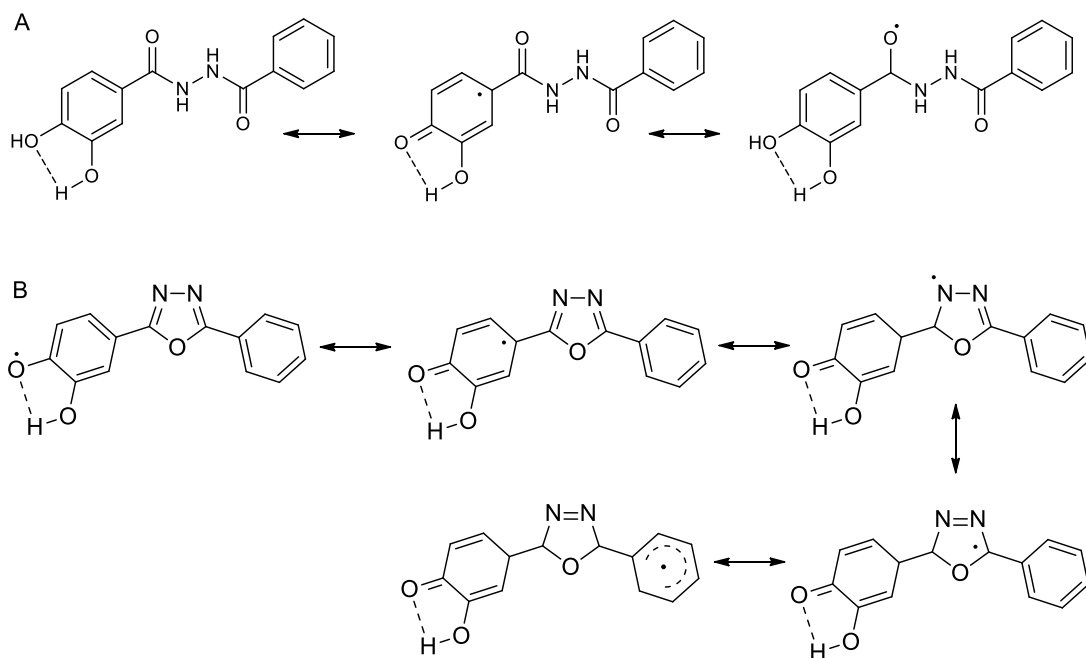


Схема 15. Стабилизација резонанцијом радикала насталог из једињења **6e** (A) и **7e** (B), након хетеролитичког цепања ОН везе и губитка једног електрона

Једињење које се показало као најактивније (**7e**) поседује две хидроксилне групе у *m*- и *p*- положајима ароматичног прстена. Замена хидроксилне групе метокси-групом (**7c**) води смањењу активности због мање ефикасне стабилизације радикала интрамолекулском водоничном везом. Упоређивањем активности једињења **7e** са активностима једињења **7g** и **7h**, може се закључити да присуство додатне хидроксилне групе изазива благи пад активности. Присуство једне или две ОН групе на другом бензеновом прстену у једињењима **7g** и **7h** не доприноси резонантној стабилизацији радикала услед негативног индуктивног ефекта хидроксилне групе. Једињење **7f** не показује антиоксидативну активност, што је и очекивано за молекул који у својој структури има две *m*-хидроксилне групе, па не дозвољава продужену стабилизацију резонанцијом.

5.6.2.1.1.2. Способност неутрализације ABTS^{•+}, H₂O₂ и редуктивна активност

Једињења која су показала најбољу способност неутрализације DPPH радикала (**6d**, **6e**, **6g**, **6h**, **7d**, **7e**, **7g** и **7h**) су одабрана за даља испитивања својих *in vitro* антиоксидативних својстава, применом тестова за испитивање способности неутрализације ABTS радикал-катјона, водоник-пероксида, као и кроз тестове за испитивање редуктивног капацитета. Добијени резултати су приказани у Табели 24.

Табела 24. Антиоксидативна активност одабраних диацилхидразина и 1,3,4-оксадиазола

Једињење	ФС тест редуктивне активности (g GAE/g узорка)	Способност редукције Fe ³⁺ - јона (A _{700nm})	ABTS тест IC ₅₀ (μM)	Тест неутралисања H ₂ O ₂ IC ₅₀ (μM)
6d	1,141 ± 0,013	0,296 ± 0,009	120,1 ± 5,7	37,41 ± 0,89
6e	1,256 ± 0,007	0,478 ± 0,011	104,4 ± 11,6	62,24 ± 3,97
6g	1,107 ± 0,003	0,461 ± 0,008	133,3 ± 35,7	43,92 ± 0,38
6h	1,470 ± 0,019	0,478 ± 0,009	102,6 ± 7,5	57,00 ± 1,43
7d	0,918 ± 0,008	0,270 ± 0,005	118,4 ± 31,2	100,33 ± 5,89
7e	1,153 ± 0,016	0,367 ± 0,015	79,3 ± 2,6	107,58 ± 9,02
7g	1,450 ± 0,006	0,313 ± 0,005	137,7 ± 30,4	84,89 ± 0,70
7h	1,209 ± 0,006	0,426 ± 0,004	120,6 ± 18,5	75,17 ± 5,23
Аскорбинска киселина	-	0,173 ± 0,007	242,6 ± 7,3	22,40 ± 0,60

Концентрације испитиваних једињења и стандарда су 500 μM

Способност синтетисаних једињења да неутралишу слободне радикале је испитивана применом ABTS радикал-катјон теста, који поред DPPH преставља један од најчешће коришћених тестова за процену *in vitro* антиоксидативне способности. Добијени резултати (Табела 24) показују да сва испитивана једињења имају израженији антиоксидативни капацитет него аскорбинска киселина (IC₅₀=242,6 μM). Као што је добијено и у случају примене DPPH теста, једињење **7e** се показало као најмоћнији „хватач“ ABTS радикал-катјона (IC₅₀=79,3 μM), праћено једињењима **6e** и **6h**. Са друге стране, једињења **6d** и **7h** су показала најслабији антиоксидативни капацитет, са IC₅₀ вредностима 120,1 μM и 120,6 μM.

Водоник-пероксид је биолошки релевантна, оксидујућа врста, која настаје у бројним животињским ткивима кроз неколико оксидативних процеса и може да

дифундује кроз биолошке мембране, узрокујући оксидативна оштећења ДНК, протеина, липида и других биомолекула. Сва испитивана једињења показују слабију способност неутрализације H_2O_2 него аскорбинска киселина ($\text{IC}_{50}=22,4 \mu\text{M}$). Од свих испитиваних једињења, диацилхидразин **6d** показује најизраженији капацитет неутрализације водоник-пероксида, са IC_{50} вредношћу која је приближно duplo виша од IC_{50} вредности аскорбинске киселине ($37,41 \mu\text{M}$). Добијени резултати су упоредиви са литературним подацима који су добијени испитивањем антиоксидативног капацитета деривата 1,3,4-оксадиазола, тиено[2,3-*d*]пиримидина применом истог теста.²⁵¹

Фолин-Чиокалте (F-C) тест за испитивање редуктивног капацитета је широко примењиван тест за мерење количине укупних фенола у природним производима, а обзиром да је основни механизам оксидо-редукциони процес, може се сматрати погодном методом за процену антиоксидативног капацитета.²⁵² Овај тест може бити посебно користан за поређење редуктивних капацитета природних производа или синтетисаних једињења, с обзиром да су резултати често изражени као mg или g еквивалената галне киселине или катехина по g испитиваног узорка, што омогућава директно упоређивање са литературним подацима који су изражени на исти начин. Резултати добијени овим тестом показују да већина испитиваних једињења поседује јачу редукциону моћ F-C комплекса него гална киселина, која је коришћена као референтни стандард, са изузетком једињења **7d**, које се показало као приближно 10% мање ефикасно у редукцији F-C реагенса него гална киселина. Међу свим тестираним једињењима, диацилхидразин **6h** поседује најјачи редукциони капацитет (Табела 24).

Разматрајући резултате добијене тестом редукционе моћи фери-јона (Табела 24), може се приметити да су сва испитивана једињења показала бољу моћ редукције Fe^{3+} него аскорбинска киселина, која је коришћена као референтни стандард. У складу са претходним тестом, који се такође бави испитивањем редуктивног капацитета, може се уочити да једињење **7d** поседује најнижи редуктивни капацитет према Fe^{3+} јону, а једињења са највећом редукционом моћи су диацилхидразини **6e** и **6h**.

Са механистичке стране гледишта, одступање резултата добијених у тестовима који мере редуктивни капацитет и ABTS теста може бити објашњено или различитим редокс потенцијалом у деловима молекула који реагују са тестираним антиоксидансним једињењима или различитим реакционим временима која су потребна да би се достигло стабилно стање. Разлика у стерној доступности антиоксиданаса ABTS радикал-катјону, F-C комплексу и Fe^{3+} јону такође може бити могући разлог за уочена одступања између поменутих тестова.²⁵²

5.6.2.1.2. Цитотоксична активност диацилхидразина и одговарајућих 1,3,4-оксадиазола на MRC-5 ћелијама

Сви диацилхидразини и 1,3,4-оксадиазоли који су показали најинтензивније антиоксидативне ефекте на основу DPPH теста, одабрани су за даљу евалуацију протективних особина у нормалним ћелијама. Прво је испитана цитотоксична активност изабраних диацилхидразина **6d**, **6e**, **6g**, **6h** и 1,3,4-оксадиазола **7d**, **7e**, **7g** и **7h** на MRC-5 ћелијама и резултати су приказани у Табели 25.

Табела 25. Концентрације диацилхидразина и 1,3,4-оксадиазола које индукују 50% смањења MRC-5 ћелијског преживљавања након третмана у трајању од 72 h

Једињење	IC ₅₀ (μM)
6d	118,35 ± 9,41
6e	194,27 ± 2,69
6g	86,33 ± 2,41
6h	91,83 ± 8,57
7d	26,88 ± 1,66
7e	37,49 ± 0,20
7g	34,88 ± 1,93
7h	25,59 ± 1,76
цисплатина	9,24 ± 0,18

Резултати су изражени као средња вредност ± SD три мерења

Међу тестираним једињењима, највећи интензитет цитотоксичне активности на MRC-5 ћелије показали су 1,3,4-оксадиазоли **7h** и **7d**. Једињења **7g** и **7e** су такође

показала изражену цитотоксичност, са IC_{50} вредностима које су за приближно 30% више него у случају једињења **7h** и **7d**.

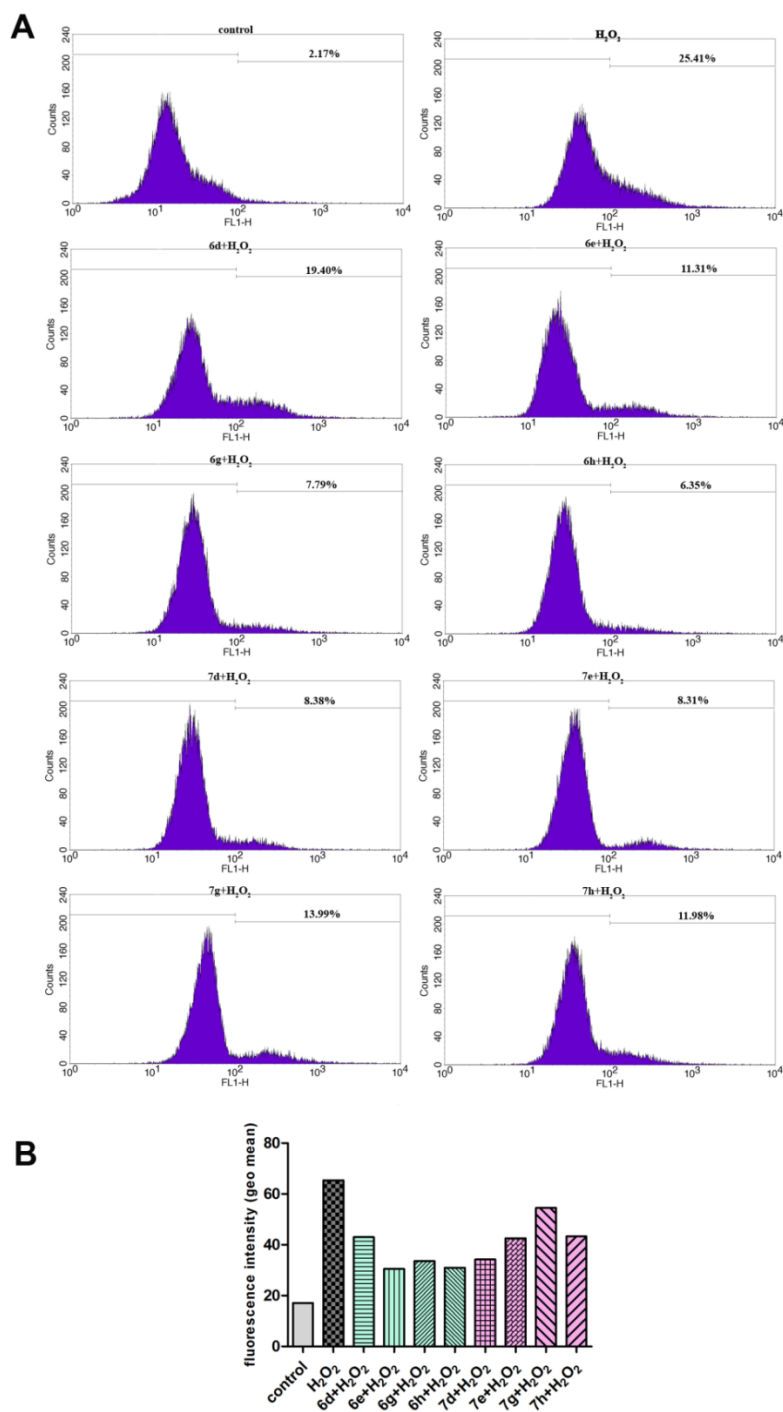
Испитивани диацилхидразини су показали значајно слабије цитотоксичне ефекте у поређењу са 1,3,4-оксадиазолима. Цитотоксичност једињења **6g** и **6h** је приближно три пута нижа него цитотоксичност најактивнијих једињења **7h** и **7d**. Једињење **6d** је показало јако ниску цитотоксичну активност, а и активност једињења **6e** је доста слаба. Испитано је да ли ова једињења имају токсичан ефекат на здраве ћелије, и резултати ових испитивања показују да се диацилхидразини **6d** и **6e** издвајају као једињења са највећом могућношћу примене.

5.6.2.1.3. Утицај третирања MRC-5 ћелија диацилхидразинима и 1,3,4-оксадиазолима на производњу ROS индуковану водоник-пероксидом

Да би се у потпуности проценио антиоксидативни потенцијал диацилхидразина и 1,3,4-оксадиазола, испитан је њихов цитопротективни ефекат на генерисање реактивних кисеоничних врста (ROS) индукованих водоник-пероксидом у нормалним хуманим плућним фибробластима MRC-5. Виши ниво интрацелуларних ROS је присутан у раним стадијумима малигних промена, као и у даљој прогресији малигних тумора.²⁵³

Третирање MRC-5 ћелија нетоксичним концентрацијама свих испитиваних једињења (50 μ M за диацилхидразине и 20 μ M за 1,3,4-оксадиазоле) у трајању од 24 h, смањује ниво ROS у овим ћелијама (третиране водоник-пероксидом у периоду од 30 min), у поређењу са ћелијама које су расле у хранљивом медијуму током 24 h, а онда изложене водоник-пероксиду (Слика 56).

Проценти означени у сваком хистограму представљају субпопулацију ћелија са повећаним нивоима флуоресценције, тј. повећаним нивоима ROS. Ефикасност диацилхидразина и 1,3,4-оксадиазола у редукцији оксидативног стреса у нормалним фибробластима, заједно са резултатима антиоксидативних тестова указује на значајан антиоксидативни потенцијал испитиваних једињења.



Слика 56. Утицај 24 h третмана MRC-5 ћелија са диацилхидразинима и 1,3,4-оксадиазолима на производњу ROS индуковану водоник-пероксидом. **A.** флуоресцентни хистограми; **B.** интензитет флуоресценције насталог дихлорофлуоресцеина у MRC-5 ћелијама. Примењене нетоксичне концентрације једињења су: 50 mM за 6d, 6e, 6g и 6h; 20 mM за 7d, 7e, 7g и 7h

Због истакнутих антиоксидативних ефеката, а поготово способности да редукују нивое интрацелуларних ROS, испитивани 1,3,4-оксадиазоли и њихови прекурсори диацилхидразини могу имати улогу као хемопревентивна средства у борби против рака.

5.6.2.1.4. Утицај диацилхидразина и 1,3,4-оксадиазола на активност антиоксидативних ензима

Постоји неколико ензимских механизма ћелијске одбране од оксидативног стреса. Тако ензими као што су супероксид дисмутаза (SOD), глутатион редуктаза (GR) и глутатион пероксидаза (GPX) покушавају да минимизирају производњу и дејство штетних оксиданаса. SOD дисмутира слободни ABTS радикал, претварајући га у водоник-пероксид, који се разграђује каталазом при високим концентрацијама, а помоћу GPX при ниским концентрацијама. Највећа количина водоник-пероксида у ћелији је генерисана кроз дисмутацију супероксида дејством SOD, иако може бити произведен и помоћу других супероксид-генеришућих ензима.^{254,255}

У овом раду је испитиван ефекат 1,3,4-оксадиазола и њихових прекурсора диацилхидразина, добијених из полазних фенолних киселина, на активност антиоксидативних ензима (SOD, GR и GPX) у MRC-5 ћелијама изложених дејству водоник-пероксида (Табела 26). Евидентно је да испитивана једињења драстично смањују активност ензима укључених у метаболизам глутатиона (GR и GPX). Једини изузетак је диацилхидразин **6h**, који дупло повећава активност GPX у изложеним ћелијама у поређењу са контролним узорком ћелије. Међутим, у случају активности SOD нису уочене значајне промене. Смањење активности GPX може да укаже на инактивацију реактивним кисеоничним врстама (ROS).²⁵⁶

Неки литературни подаци показују да супероксидни анјони могу да инхибирају GPX.²⁵⁷ Међутим, вероватније је да овакво смањење активности GR и GPX може бити приписано другим механизмима, а не производњи ROS, имајући у виду да није било промена у активности SOD током примењеног третмана.

Табела 26. Активности антиоксидативних ензима у контролним MRC-5 ћелијама и ћелијама изложеним 24 h нетоксичним концентрацијама испитиваних диацилхидразина и 1,3,4-оксадиазола

	Активност глутатион редуктазе (mU/mg протеина)	Активност глутатион пероксидазе (U/mg протеина)	Активност супероксид дисмутазе (U/mg протеина)
контрола	10,09 ± 0,44	1,17 ± 0,16	2,70 ± 0,24
6d	11,18 ± 0,76	0,86 ± 0,11	2,66 ± 0,21
6e	7,58 ± 1,02	0,87 ± 0,09	2,53 ± 0,14
6g	5,67 ± 0,33	0,05 ± 0,02	2,57 ± 0,23
6h	3,48 ± 0,07	2,26 ± 0,21	2,66 ± 0,31
7d	3,59 ± 0,01	0,66 ± 0,08	2,64 ± 0,16
7e	2,19 ± 0,06	0,67 ± 0,12	2,76 ± 0,15
7g	0,86 ± 0,17	0,37 ± 0,07	2,73 ± 0,22
7h	1,18 ± 0,11	0,37 ± 0,10	2,79 ± 0,30

Резултати су изражени као средња вредност ± SD три мерења

Познато је да неки 1,3,4-оксадиазоли, али само мали број њих, могу да инхибирају ензиме укључене у метаболизам глутатиона, пре свега глутатион редуктазу (GR).²⁵⁸ Добијени резултати могу бити веома значајни за употребу 1,3,4-оксадиазола и њихових деривата као антихелиминитика.



ЗАКЉУЧАК



У оквиру ове докторске дисертације, применом различитих инструменталних и рачунарских метода, извршена је анализа фенолних једињења присутних у плодовима дивље јабуке, малине и трешње (фамилија Rosaceae), уз одређивање услова екстракције који дају максимални принос ових једињења. Како би се дефинисао значај употребе испитиваних плодова дивљег воћа у исхрани, извршена је и квантификација фенолних једињења присутних у добијеним екстрактима применом HPLC методе. Такође, потенцијални здравствени бенефит одабраних плодова процењен је испитивањем антиоксидативне активности добијених екстраката, а симулирањем услова *in vitro* гастроинтестиналне дигестије, добијене су информације о биодоступности идентификованих фенолних једињења. У циљу добијања једињења са потенцијално бољим биолошким активностима, одабране фенолне киселине су подвргнуте синтетичкој модификацији.

На основу добијених резултата може се закључити:

- ✓ Оптимални услови (концентрација растварача, однос запремине растварача и масе узорка, време и температура) екстракције фенолних једињења из одабраних узорка дивљег воћа одређени су применом методологије одзива површине. Оптимални услови ултразвучне или микроталасне екстракције фенолних једињења из испитиваних узорка потенцијално могу бити примењени за ефикасну екстракцију неких врста воћа, поврћа или другог биљног материјала сличних особина;
- ✓ Оптимални услови за ултразвучну екстракцију фенолних једињења из коре дивље јабуке су следећи: концентрација метанола 100%, однос запремине растварача и масе узорка 100 mL/g, температура екстракције 65 °C и време екстракције 33 min, док су за екстракцију фенолних једињења из пулпе дивље јабуке оптимални услови: концентрација метанола 20%, однос запремине растварача и масе узорка 79 mL/g, температура екстракције 80 °C и време екстракције 40 min. За ултразвучну екстракцију фенолних једињења из плода дивље малине оптимална је концентрација метанола 20%, однос запремине растварача и масе узорка 10,01 mL/g, температура екстракције 80 °C и време

екстракције 15 min. Оптимална концентрација метанола за микроталасну екстракцију фенолних једињења из плода дивље трешње је 69,38%, однос запремине растварача и масе узорка 30 mL/g, температура екстракције 78 °C и време екстракције 1,82 min. Дефинисани параметри екстракције узимају у обзир и рационалност у извођењу саме методе, укључујући рационално коришћење токсичних растварача, времена и енергије;

- ✓ Спектрофотометријска анализа показује да садржај фенолних једињења, за која је познато да поседују широк спектар биолошких активности, није занемарљив у испитиваним узорцима дивљег воћа, и да је често виши него у култивисаним врстама. Највећи садржај фенолних једињења нађен је у екстракту коре дивље јабуке (800 mg GAE/100g CM), затим екстракту пулпе дивље јабуке (664 mg GAE/100g CM), док су екстракти плодова дивље малине (383 mg GAE/100g CM) и трешње (64,8 mg GAE/100g CM) показали нешто нижи садржај ових једињења. Ови подаци могу бити значајни и за подстицај веће употребе дивљег воћа у људској исхрани и за евентуални развој нових производа који се могу сврстати у функционалну храну;
- ✓ Испитивани екстракти су показали извесну способност неутрализације низа штетних слободно-радикалских врста, односно, показали су одређен антиоксидативни потенцијал, па конзумирање ове врсте воћа може имати позитивне ефекте на здравље човека. Узимајући у обзир да се дивље воће карактерише мањом калоријском вредношћу (нижи садржај угљених хидрата) у односу на култивисане сорте, а да је показано да је фенолни садржај дивљег воћа исти или сличан као и култивисаног, конзумација ових плодова је могућа и када постоје неке здравствене рестрикције у уносу калорија, а да се притом унесу и биолошки вредна једињења;
- ✓ Применом HPLC методе, идентификована су појединачна фенолна једињења у екстрактима коре и пулпе дивље јабуке и дивље малине, добијеним под оптималним условима екстракције. У екстракту пулпе дивље јабуке, нађени су хлорогенска киселина, епикатехин и флоризин, док су у екстракту коре, поред ова три једињења детектовани и катехин, хиперозид и кверцитрин. У оба

екстракта су доминантне компоненте епикатехин (1,36 mg/g СМ у екстракту коре и 1,18 mg/g СМ у екстракту пулпе) и хлорогенска киселина (0,568 mg/g СМ у екстракту коре и 0,791 mg/g СМ у екстракту пулпе). Екстракт плода дивље малине садржи галну киселину, цијанидин-3-глукозид, цијанидин-3-софорозид, катехин и елагинску киселину, при чему је антоцијанин цијанидин-3-глукозид најдоминантнији (43,61 mg/100g СМ), праћен елагинском киселином, које има у нешто мањој количини (28,67 mg/100g СМ). За свако од ових једињења је познато да поседује широк спектар биолошких активности које могу имати позитиван ефекат на здравље човека;

- ✓ Симулирањем услова *in vitro* гастроинтестиналне дигестије, добијени су подаци о стабилности идентификованих фенолних једињења током дигестије, као и о њиховој биодоступности у организму. Значајно је напоменути да се концентрација испитиваних фенолних једињења не мења или незнатно мења у гастроинтестиналном тракту, што их чини у великој мери доступним за апсорпцију у организму;
- ✓ Синтетичком модификацијом одабраних фенолних киселина, добијене су две серије једињења, 1,2,4-триазол-3-тиони и 1,3,4-оксадиазоли, за која је доказано да поседују значајне биолошке активности, пре свега антиоксидативну. Сви добијени деривати фенолних киселина испољили су висок степен антиоксидативне активности, док је неколицина синтетисаних триазола, 5-(2,3-дихидроксифенил)-2Н-1,2,4-триазол-3(4Н)-тион и 5-(3,4-дихидроксифенил)-2Н-1,2,4-триазол-3(4Н)-тион, показала већи степен неутрализације слободних радикала *in vitro* (са IC₅₀ вредностима 12,66 односно 14,63 μМ) од добро познатих антиоксиданаса, витамина Ц и NDGA (који имају IC₅₀ вредности 38,78 односно 20,83 μМ). Међу синтетисаним 1,3,4-оксадиазолима, једињења 3-(5-фенил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензен-1,2-диол; 4-(5-фенил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензен-1,2-диол, 4-(5-(2-хидроксифенил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензен-1,2-диол и 4-(5-(3,5-дихидроксифенил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил)бензен-1,2-диол показала су бољу антиоксидативну активност од референтних антиоксиданата. Антиоксидативне особине 1,3,4-оксадиазола су потврђене и у испитивањима на

ћелијама здравих фибробласта плућа (MRC-5), при чему снижавају ниво ROS-а индукованог водоник-пероксидом у овој ћелијској култури. Такође, рачунарским методама су одређене најповољније конформације 1,2,4-триазол-3-тиона и доминантан SPLET механизам њиховог антиоксидативног дејства, што је значајно за даља испитивања ове групе једињења и синтезу нових деривата са истим или бољим антиоксидативним особинама;

- ✓ У циљу дефинисања безбедне примене синтетисаних деривата фенолних киселина, дефинисан је степен цитотоксичности одабраних 1,3,4-оксадиазола, на ћелијској линији здравих фибробласта плућа (MRC-5). Одређене су IC_{50} вредности цитотоксичности ових једињења на здраве хумане ћелије, што је још један корак у дефинисању могућности да се ова једињења примене као антиоксиданси и одређене су максималне концентрације за нешкодљиву примену. Закључено је да поједини синтетисани деривати испољавају цитотоксичну активност у нижим концентрацијама (око 25 μM) и да значајно снижавају активност ензима који учествују у метаболизму глутатиона, што је значајан прилог у испитивању ових једињења за развој нових терапеутика.

Свеобухватно, добијени резултати дају допринос анализи фенолних једињења у плодовима биљака, њиховој функционализацији и примени.



ЛИТЕРАТУРА



1. W. Vermerris and R. Nicholson (2006) In: Phenolic Compound Biochemistry, W. Vermerris and R. Nicholson (eds.), Springer, USA, pp. 1-34.
2. C. W. I. Haminiuk, G. M. Maciel, M. S. V. Plata-Oviedo, R. M. Peralta (2012), *International Journal of Food Science and Technology*, **47**: 2023-2044.
3. M. Isabelle, B. L. Lee, M. T. Lim, W. P. Koh, D. Huang, C. N. Ong (2010) *Food Chemistry*, **123**: 77-84.
4. L. M. Steffen, J. D. R. Jacobs, J. Stevens, E. Shahar, T. Carithers, A. R. Folsom (2003) *The American Journal of Clinical Nutrition*, **78**: 383-390.
5. R. C. Pimpão, T. Dew, P. B. Oliveira, G. Williamson, R. B. Ferreira, C. N. Santos (2013) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**: 4053-62.
6. R.A. Moyer, K.E. Hummer, C.E. Finn, B. Frei, R.E. Wrolstad (2002) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 519-525.
7. V. R. de Souza, P. A. Pereira, T. L. da Silva, L. C. de Oliveira Lima, R. Pio, F. Queiroz (2014) *Food Chemistry*, **156**: 362-368.
8. Y. Tao, D. Wu, Q. A. Zhang, D. W. Sun (2014) *Ultrasonics Sonochemistry*, **21**: 706-715.
9. C. Carrera, A. Ruiz-Rodriguez, M. Palma, C. G. Barroso (2012) *Analytica Chimica Acta*, **732**, 100-104.
10. N. Risipail, P. Morris, K. Webb (2005) In: Phenolic compounds: extraction and analysis, Lotus Japonicus Handbook (ed.) A. Marquez, Berlin: Springer, pp. 349-354.
11. M. Naczki, F. Shahidi (2004) *Journal of Chromatography A*, **1054**: 95-111.
12. N.V. Yanishlieva-Maslarova (2001) y: Antioxidants in food, J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon (eds.), CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, pp. 23-70.
13. M. M. Abdulrasool, A. H. Jawad (2012) *International Journal of Applied Science and Technology*, **2**: 155-164.
14. D. C. Pinto, C. M. Santos, A. M. Silva (2007) *Recent Research Developments in Heterocyclic Chemistry*, **37**: 397-475.
15. D. A. Jacobo-Velázquez, L. Cisneros-Zevallos (2012) *Agriculture* **2**: 259-271.

16. J. B. Harborne and N. W. Simmonds (1964) y: *Biochemistry of Phenolic Compounds*, Academic Press, London, pp. 101.
17. F. Annie, M. Jean-Jacques (2003) *Phenolic acids in fruits and vegetables. Flavonoids in Health and Disease*, 2nd edn. New York, USA: CRC Press.
18. R.J. Robbins (2003) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 2866-2887.
19. P. Lampila, M. van Lieshout, B. Gremmen, L. Lahteenmaki (2009) *Food Research International*, **42**: 122-129.
20. A. Crozier, I. B. Jaganath, M. N. Clifford (2009) *Natural Product Reports*, **26**: 1001-1043.
21. H. D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle (2009) In: *Food Chemistry*. Berlin: Springer, pp. 807-861.
22. G. Williamson (2004) y: *Phytochemicals: Mechanisms of Action* (eds.) M.S. Meskin, W.R. Bidlack, A.J. Davies, D.S. Lewis & R.K. Randolph. New York, NY: CRC Press, pp. 21-33.
23. A. Hopia, M. Heinonen (1999) *Journal of the American Oil Chemists Society*, **76**: 139-144.
24. C. Kaur, H.C. Kapoor (2001) *International Journal of Food Science and Technology*, **36**: 703-725.
25. R. Tsao, R. Yang (2003) *Journal of Chromatography A*, **1018**: 29-40.
26. H. El Gharras (2009) *International Journal of Food Science and Technology*, **44**: 2512-2518.
27. I. Ignat, I. Volf, V.I. Popa (2011) *Food Chemistry*, **126**: 1821-1835.
28. S. Goyal, C. Lambert, S. Cluzet, J.M. Merillon, K.G. Ramawat (2012) In: *Plant Defence: Biological Control* (eds.) J.M.M. Merillon & K.G.G. Ramawat, Springer, Berlin, pp. 109-138.
29. D. Delmas, A. Lancon, D. Colin, B. Jannin, N. Latruffe (2006) *Current Drug Targets*, **7**: 423-442.
30. T. S. Anekonda (2006). Resveratrol - a boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Research Reviews*, **52**: 316-326.
31. P. Gresele, C. Cerletti, G. Guglielmini, P. Pignatelli, G. de Gaetano, F. Violi (2011) *Journal of Nutritional Biochemistry*, **22**: 201-211.

32. P. Saiko, A. Szakmary, W. Jaeger, T. Szekeres (2008) *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, **658**: 68-94.
33. O. Matvienko, D. S. Lewis, E. Schafer (2001) *Journal of Nutrition Education*, **33**:95-101.
34. E. Aehle, U. Muller, P.C. Eklund, S.M. Willfor, W. Sippl, B. Drager (2011) *Phytochemistry*, **72**: 2396-2405.
35. L.P. Meagher, G.R. Beecher (2000) *Journal of Food Composition and Analysis*, **13**: 935-947.
36. P. Schofield, D.M. Mbugua, A.N. Pell (2001) *Animal Feed Science and Technology*, **91**: 21-40.
37. L. Fu, B.T. Xu, X.R. Xu *et al.* (2011) *Food Chemistry*, **129**: 345-350.
38. M. Theriault, S. Caillet, S. Kermasha, M. Lacroix (2006) *Food Chemistry*, **98**: 490-501.
39. V. D. Kancheva (2009) *European Journal of Lipid Science and Technology*, **111**: 1072-1089.
40. A. Michalak (2006) *Polish Journal of Environmental Studies*, **15**: 523-530.
41. J.M. Lü, P.H. Lin, Q. Yao, C. Chen (2010) *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **14**: 840-860.
42. S. N. Krylov, H. B. Dunford (1996) *Photochemistry and Photobiology*, **63**: 735-741.
43. A. Kurosumi, C. Sasaki, K. Kumada, F. Kobayashi, G. Mtui, Y. Nakamura (2007) *Process Biochemistry*, **42**: 1449-1453.
44. W. C. Evans, Trease & Evans Pharmacognosy (2002), Elsevier (A Division of Reed Elsevier India Pvt. Limited), 15th edn.
45. M. Josifović (1973) *Flora of Serbia I-X*, Serbian Academy of Sciences and Arts, Belgrade, Serbia.
46. D. Potter, T. Eriksson, R. C. Evans, S. Oh, J. E. E. Smedmark, D. R. Morgan, M. Kerr, K. R. Robertson, M. Arsenault, T. A. Dickinson, C. S. Campbell (2007) *Plant Systematics and Evolution*, **266**: 5-43.
47. V. Shulaev, S. S. Korban, B. Sosinski, A. G. Abbott, H. S. Aldwinckle, K. M. Foltá, A. Iezzoni, D. Main, P. Arus, A. M. Dandekar, K. Lewers, S. K. Brown, T.

- M. Davis, S. E. Gardiner, D. Potter, R. E. Veilleux (2008), *Plant Physiology*, **147**: 985-1003.
48. B. R. Stephan, I. Wagner, J. Kleinschmit (2003) EUFORGEN Technical guidelines for genetic conservation and use of wild apple and pear (*Malus sylvestris* and *Pyrus pyraeaster*); International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
49. B. Zlatković, S. Bogosavljević, A. Radivojević, M. Pavlović (2014) *Journal of Ethnopharmacology*, **151**: 704-713.
50. J. A. Duke, K. K. Wain (1981) Medicinal plants of the World. Computer index with more than 85,000 entries. 3: 1654.
51. S. Asha, D. Anju, S. Pawan (2013) *Indian Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research*, **4**: 1081-1087.
52. S.C. Marks, W. Mullen, A. Crozier (2007) *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **87**: 719-728.
53. U. Vrhovsek, A. Rigo, D. Tonon, F. Mattivi (2004) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 6532-6538.
54. A. Francini, L. Sebastiani (2013) *Antioxidants*, **2**: 181-193.
55. A.V. Patel, J. Rojas-Vera, C.G. Dacke (2004) *Current Medicinal Chemistry*, **11**: 1501-1512.
56. The Euro+Med PlantBase - the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/PTaxonDetail.asp?NameCache=Rosaceae&PTRefFk=7300000>
57. A. V. Rao, D. M. Snyder (2010) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 3871-3883.
58. C. Bastos, L. Barros, M. Dueñas, R. C. Calhelha, M. J. R.P. Queiroz, C. Santos-Buelga, I. C.F.R. Ferreira (2015) *Food Chemistry*, **173**: 1045-1053.
59. A. Khoddami, M. A. Wilkes, T. H. Roberts (2013) *Molecules*, **18**: 2328-2375.
60. N. Čujić, K. Šavikin, T. Janković, D. Pljevljakušić, G. Zdunić, S. Ibrić (2016) *Food Chemistry*, **194**: 135-142.
61. F. D. Pingret, A. S. Fabiano-Tixier, F. Chemat (2013) *Natural product extraction: Principles and applications*, (ed.) J. P. M. Rostagno, RSC Publishing. Cambridge (UK), pp. 89-112.

62. P. Santos, A. C. Aguilar, G. F. Barbero, C. A. Rezende, J. Martinez (2015) *Ultrasonics Sonochemistry*, **22**: 78-88.
63. D. N. Avhad, V. K. Rathod (2015) *Ultrasonics Sonochemistry*, **22**: 257-264.
64. H. Teng, W. Y. Lee, Y. H. Choi (2013) *Journal of Separation Science*, **36**: 3107-3114.
65. M. K. Khan, M. Abert-Vian, A. S. Fabiano-Tixier, O. Dangles, F. Chemat (2010) *Food Chemistry*, **119**: 851-858.
66. M. Chen, Y. Zhao, S. Yu (2015) *Food Chemistry*, **172**: 543-550.
67. S. Oancea, C. Grosu, O. Ketney, M. Stoia (2013) *Acta Chimica Slovenica*, **60**: 383-389.
68. P. Katsampa, E. Valsamedou, S. Grigorakis, D. P. Makris (2015) *Industrial Crops and Products*, **77**: 535-543.
69. Y. Li, G. K. Skouroumounis, G. M. Elsey, D. K. Taylor (2011) *Food Chemistry*, **129**: 570-576.
70. G. F. Barbero, M. Palma, C. G. Barroso (2006) *Analytica Chimica Acta*, **578**: 227-233.
71. C. Pizarro, N. Pérez-del-Notario, J. M. González-Saiz (2007) *Journal of Chromatography A*, **1149**: 138-144.
72. C. Liyana-Pathirana, F. Shahidi (2005) *Food Chemistry*, **93**: 47-56.
73. E. A. Hayouni, M. Abedrabba, M. Bouix, M. Hamdi (2007) *Food Chemistry*, **105**: 1126-1134.
74. T. Juntachote, E. Berghofer, F. Bauer, S. Siebenhandl (2006) *International Journal of Food Science and Technology*, **41**: 121-133.
75. H. N. Sin, S. Yusof, N. S. A. Hamid, R. A. Rahman (2006) *Journal of Food Engineering*, **74**: 352-358.
76. G. E. P. Box, K. B. Wilson (1951) On the experimental attainment of optimum conditions. In Liyana-Pathirana, C. and Shahidi, F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry* **93**: 47-56.
77. E. M. Silva, H. Rogez, Y. Larondelle (2007) *Separation and Purification Technology*, **55**: 381-387.

78. G. Mazza, L. Fukumoto, P. Delaquis, B. Girard, B. Ewert (1999) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**: 4009-4017
79. T. H. Terrill, A. M. Rowan, G. B. Douglas, T. N. Barry (1992) *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **58**: 321-329.
80. E. Revilla, J. M. Ryan (2000) *Journal of Chromatography A*, **881**: 461-469.
81. C.D. Stalikas (2007), *Journal of Separation Science*, **30**: 3268- 3295.
82. P. Jandera (2008), *Journal of Separation Science*, **31**: 1421- 1437.
83. P.G. Pietta (2000), *Journal of Natural Products*, **63**:1035-1042.
84. Y.Z. Fang, S. Yang, G. Wu (2002) *Nutrition*, **18**: 872-879.
85. K.E. Heim, A. R. Tagliafferro, D. J. Bobilya (2002) *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**: 572-584.
86. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon, Press, Oxford, 3rd ed. Acworth, I.N. (2003) *The Handbook of Redox Biochemistry*. Eds. ESA, Inc., Chelmsford, USA
87. B. Commoner, J. Townsend, G. E. Pake (1954) *Nature*, **174**: 689-691.
88. D Harman (1981) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **78**: 7124-7128.
89. M. M. Đukić, Oksidativni stres - slobodni radikali, prooksidansi i antioksidansi, Mono i Manjana, Beograd, 2008.
90. J.L. Marx (1985) *Science*, **235**: 529-531.
91. B. Halliwell, M. Whiteman (2004) *British Journal of Pharmacology*, **142**: 231-255.
92. I. Fridovich (1974) *Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology*, **41**: 35-97.
93. E. Cadenas (1989) *Annual Review of Biochemistry*, **58**: 79-110.
94. L. Giuseppe, W. A. Pryor (1998) *Free Radical Biology and Medicine*, **25**: 392-403.
95. H. Sies, N.I. Krinsky (1995) *The American Journal of Clinical Nutrition*, **62**: 1229-1300.
96. H. Sies (1991) Oxidative stress: introduction. U: H. Sies (ur.), Oxidative stress, oxidants and antioxidants. Academic Press, San Diego, CA, pp. 15-22.
97. K.H. Cheeseman, (1993) Lipid peroxidation in biological systems. B. Halliwell, O.I. Aruoma, (eds.), *DNA and Free Radicals*, Ellis Harwood, London.

98. R. Martin (2001) *Circulation Research*, **88**: 648-650.
99. C. E. Dateo, D. Wang, G. M. Chaban, W. M. Huo Oxidative Damage Of Dna Base Guanine <http://www.Dsls.Usra.Edu/Meetings/Radiation2005/Pdf/1030dateo.pdf>
100. M. Tarr, R. Samson (1993) *Oxygen Free Radicals and Tissue Injury*, Birkhauser, Boston.
101. B. Halliwell (1990) *Free Radical Research Communication*, **9**: 1-32.
102. J. M. McCord, I. Fridovich (1974) *Science*, **185**: 529-531.
103. R. Brigelius (1985), *Oxidative stress*, ed. (H. Sies), Academic Press, New York, pp. 243-271.
104. C. Giulivi, F.J. Romero, E. Cadenas (1992) *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **299**: 302-312.
105. V. Ravindranath, D. J. Reed (1990) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **169**: 1075-1079.
106. M. Carocho, I.C.F.R. Ferreira (2013) *Food and Chemical Toxicology*, **51**: 15-25.
107. M. Leopoldini, T. Marino, N. Russo, M. Toscano (2004) *The Journal of the Physical Chemistry A*, **108**: 4916-4922.
108. M. Leopoldini, T. Marino, N. Russo, M. Toscano (2004) *Theoretical Chemistry Accounts*, **111**: 210-216.
109. J. S. Wright, E. R. Johnson, G. A. DiLabio (2001) *Journal of the American Chemical Society*, **123**: 1173-1183.
110. S. V. Jovanović, S. Steenken, M. G. Simic, Y. Hara (1998) Antioxidant properties of flavonoids: Reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoids radicals. U: C. Rice-Evans, L. Packer (ur.), *Flavonoids in health and disease* New York: Marcel Dekker, pp. 137-161.
111. F.A.M. Silva, F. Borges, C. Guimaraes, J.L.F.C. Lima, C. Matos, S. Reis (2000) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**: 2122-6.
112. A. Streitwieser, C. H. Heathcock (1981) *Introduction to organic chemistry*. 2nd ed. New York: Macmillan Publishing Co., Inc. pp. 1258.
113. J. A. Howard, K. U. Ingold (1963) *Canadian Journal of Chemistry*, **41**: 2800-2806.
114. L. R. Mahoney (1969) *Angewandte Chemie International Edition*, **8**: 547-55.

115. E. Migliavacca, P.A. Carrupt, B. Testa (1997) *Helvetica Chimica Acta*, **80**:1613-1626.
116. H.Y. Zhang, H.F. Ji (2006) *New Journal of Chemistry*, **30**:503-504.
117. D. Huang, B. Ou, R. L. Prior (2005) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**:1841-1856.
118. E. Klein, V. Lukes (2006) *The Journal of Physical Chemistry A*, **110**:12312-12320.
119. L.R.C. Burton, K.U. Ingold (1981) *Journal of the American Chemical Society*, **103**: 6478-6485.
120. I. Nakanishi, K. Fukuhara, T. Shimada, K. Ohkubo, Y. Iizuka, K. Inami, M. Mochizuki, S. Urano, S. Itoh, N. Miyata, S. Fukuzumi (2002) *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*:1520-1524.
121. B. D. Craft, A. L. Kerrihard, R. Amarowicz, R. B. Pegg (2012) *Food Science and Food Safety*, **11**:148-173.
122. S.I. Kotelevskii, O.V. Prezhdoo (2001) *Tetrahedron*, **57**: 5715-5729.
123. I. B. Obot, A. S. Johnson (2012) *Elixir Computational Chemistry*, **43**: 6658-6661.
124. H. Moskowicz, A. Mignot, M. J. Miocque (1980) *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **17**: 1321-1323.
125. M. C. Bermann, J. P. Bonte, I. Lesieur-Demarquilly, M. Debaert, D. Leieur, M. Leinot, J. Penoit, C. Labrid (1982) *European Journal of Medicinal Chemistry*, **17**: 85.
126. N. F. Eweiss, A. A. Bahajaj, E. A. Elsherbini (1986) *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **23**: 1451-1458.
127. I. Saramet, M. D. Banciu, C. Draghici (1991) *Revue Roumaine de Chimie*, **36**: 135.
128. S. V. Vershilov, L. M. Popova, V. E. Mungalov, Ryabinin, N. A. Zh. Prikl. Khim. 1994, 67, 1124. *Chem. Abstr.*, 122, 265316.
129. C. Kavakli, P. A. Kavakli, O. Güven (2014) *Radiation Physics and Chemistry*, **94**: 111-114.
130. F. A. Hassan, K.W. Younus (2012) *Research Journal of Biological Sciences*, **7**: 48-51.
131. S. Sripriya, C. Subha, A. Selvaraj (2013) *IOSR Journal of Applied Chemistry*, **6**: 25-29.

132. M. Hanif, M. Saleem, M.T. Hussain, N.H. Rama, S. Zaib, M.A.M. Aslam, P.G. Jones, J. Iqbal (2012) *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **23**: 854-860.
133. M.M. Meenaxi, R. Ainapure, P.B. Patil, A.R. Bhat (2011) *Asian Journal of Research in Chemistry*, **4**: 1050-1054.
134. I.K. Jassim, W.Kh. Jassim, S. Abd ALsatar, A.H. Mohammed (2012) *Karbala Journal of Pharmaceutical Sciences*, **3**: 213- 222.
135. P.K. Shukla, N. Soni, A. Verma, A.K. Jha (2014) *Der Pharma Chemica*, **6**: 153-160.
136. W.W. Hope, R. Lewis, J. A. Smith (2010) *Clinical Primer: Potential Hepatic Complications with Triazole Therapy*, USA: University of Wisconsin-Madison School of Medicine and Public Health, School of Pharmacy, and School of Nursing and Fallon Medica LLC.
137. Y. P. Hou, J. Sun, Z.H. Pang, P.C. Lv, D.D. Li, L. Yan, H.J. Zhang, E.X. Zheng, J. Zhao, H.L. Zhu (2011) *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **19**: 5948-5954.
138. B.A. Baviskar, S.S. Khadabadi, S.L. Deore, M.R. Shiradkar (2012) *Der Pharmacia Sinica*, **3**: 24-30.
139. S. Jess, S. Kildea, A. Moody, G. Rennick, A.K. Murchie, L.R. Cooke (2014) *Pest Management Science*, **70**: 1646-1654.
140. V.K. Pandey, Z. Tusi, S. Tusi, M. Joshi (2012) *International Scholarly Research Notices: Organic Chemistry*, **2012**: 1-7.
141. M.N. Mousa, S.A.N. Al-Jadaan (2012) *Basrah Journal of Veterinary Research*, **11**: 122-127.
142. M.W. Akhter, M.Z. Hassan, M. Amir (2014) *Arabian Journal of Chemistry*, **7**: 955-963.
143. M. Carbone, Y. Li, C. Irace, E. Mollo, F. Castelluccio, A. D. Pascale, G. Cimino, R. Santamaria, Y. Guo, M. Gavagnin (2011) *Organic Letters*, **13**: 2516-2519.
144. Q. Gao, S. Liu, X. Wu, J. Zhang, A. Wu (2015) *Organic Letters*, **17**: 2960-2963.
145. H. Mochizuki, T. Hasui, M. Kawamoto, T. Shiono, T. Ikeda, C. Adachi, Y. Taniguchi, Y. Shirota (2000) *Chemical Communications*, **19**: 1923-1924.
146. C. Adachi, T. Tsutsui, S. Saito (1990) *Applied Physics Letters*, **56**: 799-801.

147. N. V. Vasilev, D. V. Romanov, A. A. Bazhenov, K. A. Lyssenko, G. V. Zatonsky (2007) *Journal of Fluorine Chemistry*, **128**: 740-747.
148. S. E. Wolkenberg, D. L. Boger (2002) *Journal of Organic Chemistry*, **67**: 7361-7364.
149. X. Zheng, Z. Li, Y. Wang, W. Chen, Q. Huang, C. Liu, G. Song (2003) *Journal of Fluorine Chemistry*, **123**: 163-169.
150. A. A. Deshmukh, P. B. Sattur, U. K. Sheth (1976) *Indian Journal of Experimental Biology*, **14**: 166-168.
151. Z. K. El-Samii (1991) *Chinese Pharmaceutical Journal*, **43**: 245-250.
152. S. Pinaki, D. K. Dash, V. C. Yeligar, K. Muruges, D. Rajalingam, J. Singh, T. K. Maity (2008) *Indian Journal of Chemistry*, **47**: 460-462.
153. K. Dalip, S. Swapna, O. J. Emmanuel, S. Kavita, D. Kumar, S. Sundaree, E. O. Johnson, K. Shah (2009) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **19**: 4492-4494.
154. T. P. Dabhi, V. H. Shah, A. R. Parikh (1992) *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **54**: 98-100.
155. J. Thomas, Ger. Pat. 2,403,357, 1974; Chem. Abstr. 1974, 81, 136153g.
156. V. Padmavathi, G. S. Reddy, A. Padmaja, P. Kondaiah, A. Shazia (2009) *European Journal of Medicinal Chemistry*, **44**: 2106-2112.
157. X. J. Zou, L. H. Lai, G. Y. Jin, Z. X. Zhang (2002) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 3757-3760.
158. J. H. Musser, R. E. Brown, B. Loev, K. Bailey, H. Jones, R. Kahen, F. Huang, A. Khandwala, M. Leibowitz (1984) *Journal of Medicinal Chemistry* **27**: 121-125.
159. N. D. James, J. W. Growcott (2009) *Drugs of the Future* **34**: 624-633.
160. H.; Brandenberger, R. A. A. Maes (1997) *Clinical Biochemistry: Analytical Toxicology for Clinical, Forensic and Pharmaceutical Chemists*; Walter de Gruyter: Berlin.
161. Y. Ducharme, M. Blouin, C. Brideau, A. Chateaufneuf, Y. Gareau, E. L. Grimm, H. Juteau, S. Laliberte, B. MacKay, F. Masse, M. Ouellet, M. Salem, A. Styhler, R. W. Friesen (2010) *ACS Medicinal Chemistry Letters* **1**: 170-174.

162. G. W. Adelstein, C. H. Yen, E. Z. Dajani, R. G. Bianchi (1976) *Journal of Medicinal Chemistry* **19**: 1221-1225.
163. M. Ogata, H. Atobe, H. Kushida, K. Yamamoto (1971) *The Journal of Antibiotics*, **24**: 443-451.
164. V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventós (1999) y: *Methods in Enzymology*, (ed) P Lester, Academic Press, Cambridge, pp. 152-178.
165. I.M.C. Brighente, M. Dias, L.G. Verdi, M.G. Pizzolatti (2007) *Pharmaceutical Biology*, **45**: 156-161.
166. A. Matkowski, S. Zielińska, J. Oszmiański, E. Lamer-Zarawska (2008) *Bioresource Technology*, **99**: 7892-7896.
167. M.M. Giusti, R.E. Wrolstad (2001) y: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (ed). R.E. Wrolstad, John Wiley & Sons, New York, unit F1.2.1–1
168. E. Tavčar Benković, T. Grohar, D. Žigon, U. Švajger, D. Janeš, S. Kreft, B. Štrukelj (2014) *Industrial Crops and Products*, **52**: 23-28.
169. ICH, 1996. Validation of analytical procedures: text and methodology. ICH-Q2B. In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Geneva, Switzerland.
170. S. Qiao, R. Shi, M. Liu, C. Zhang, X. Yang, X. Jiang, C. Wang, Q. Wang (2011) *Food Chemistry*, **129**: 1297-1304.
171. M. Minekus, M. Alming, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F. Carrière, R. Boutrou, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, L. Egger, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A. Mackie, S. Marze, , D.J. McClements et al. (2014) *Food and Function*, **5**: 1113-1124.
172. V. Mihailović, S. Kreft, E. Tavčar Benković, N. Ivanović, M.S. Stanković (2016) *Industrial Crops and Products*, **89**: 141-151.
173. J.K. Liu, L. Hu, Z.J. Dong, Q. Hu (2004) *Chemistry & Biodiversity*, **1**: 601-605.
174. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice Evans (1999) *Free Radical Biology & Medicine*, **26**: 1231-1237.
175. L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum (1982) *Analytical Biochemistry*, **26**: 131-138.
176. I. Hinneburg, H.J.D. Dorman, R. Hiltunen (2006) *Food Chemistry*, **97**: 122-129.

177. M. Nishikimi, N. Appaji, K.Yagi (1972) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **46**: 849-854.
178. J.S. Gowda, S.B. Veerabhadrapa (2013) *Asian Journal of Plant Science & Research*, **3**: 162-169.
179. R.J. Ruch, S.J. Cheng, J.E. Klauning (1989) *Carcinogenesis*, **10**: 1003-1008
180. T.L. Pownall, C.C. Udenigwe, R.E. Aluko (2010) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 4712-4718.
181. T. Mosmann (1983) *Journal of Immunological Methods*, **65**: 55-63.
182. M. Ohno and T. Abe (1991), *Journal of Immunological Methods*, **145**: 199-203.
183. M. M. Bradford (1976) *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.
184. C. H. Foyer and B. Halliwell (1976), *Planta*, **133**: 21-25.
185. J. T. Rotruck, A. L. Pope, H. E. Ganther, A. B. Swanson, D. G. Hafeman, W. G. Hoekstra (1973) *Science*, **179**: 588-590.
186. C. O. Beuchamp and I. Fridovich (1971) *Analytical Biochemistry*, **44**: 276-287.
187. S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich and H. Krieg (2010) *The Journal of Chemical Physics*, **132**: 154104-154122.
188. A. V. Marenich, C. J. Cramer and D. G. Truhlar (2009), *The Journal of Physical Chemistry B*, **113**: 6378-6396.
189. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. J. Montgomery, R. E. Stratmann et al. (2009) Gaussian 09, Revision D.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT.
190. A. E. Reed, L. A. Curtiss and F. Weinhold (1988), *Chemical Reviews*, **88**: 899-926.
191. Z. Marković, J. Tošović, D. Milenković and S. Marković (2016), *Computational and Theoretical Chemistry*, **1077**: 11-17.
192. K. Wolfe, X. Wu, R.H. Liu (2003) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 609-614.
193. J. Bouayed, L. Hoffmann, T. Bohn (2011) *Food Chemistry*, **128**: 14-21.
194. D. Stojiljković, I. Arsić, V. Tadić (2016) *Industrial Crops and Products*, **80**: 165-176.
195. G. Giomaro, A. Karioti, A.R. Bilia, A. Bucchini, L. Giamperi, D. Ricci, D. Fraternale (2014) *Chemistry Central Journal*, **8**: 1-10.

196. A. Hossain, M. Salehuddin, S.M. Kabir, M.J. Rahman, S.M.M. Vasanth, H.P. Rupasinghe (2009) *Food Chemistry*, **113**: 187-190.
197. R. Bobinaite, P. Viškelis, P.R. Venskutonis (2012) *Food Chemistry*, **132**: 1495-1501.
198. M. Tosun, S. Ercisli, H. Karlidag, M. Sengul (2009) *Journal of Food Science*, **74**:C575-C579.
199. R. Zadernowski, M. Naczek, J. Nesterowicz (2005) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**:2118-2124.
200. E. Sariburun, S. Sahin, C. Demir, C. Turkben, V. Uylaser (2010) *Journal of Food Science*, **75**:C328-C335.
201. G. Spigno, L. Tramelli, D.M. De Faveri (2007) *Journal of Food Engineering*, **81**: 200-208.
202. K. Robards (2003) *Journal of Chromatography A*, **1000**: 657-691.
203. T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, A. Nystrom, J. Petterson, R. Bergman (1998) *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **42**: 3-40.
204. G. Derringer, R. Suich (1980) *Journal of Quality Technology*, **12**: 214-219.
205. Q. Khalil Beg, V. Sahai, R. Gupta (2003) *Process Biochemistry*, **39**:203-209.
206. A. Escarpa, M.C. Gonzalez (1998) *Journal of Chromatography A*, **823**: 331-337.
207. A. Schieber, P. Keller, R. Carle (2001) *Journal of Chromatography A*, **910**: 265-273.
208. S. Kondo, K. Tsuda, N. Muto, J. Ueda (2002) *Scientia Horticulturae*, **96**: 177-185.
209. J. Sun, W.J. Janisiewicz, B. Nichols, W.M. Jurick II, P. Chen (2017) *Postharvest Biology and Technology*, **127**: 68-75.
210. A. Macedo Dantas, I. Meireles Mafaldo, P.M. de Lima Oliveira, M. dos Santos Lima, M. Magnani, G. da Silva Campelo Borgess (2019) *Food Chemistry*, **274**: 202-214.
211. P. Strugala, S. Loi, B. Bazanow, P. Kuropka, A.Z. Kucharska, A. Wloch, J. Gabrielska (2018) *Molecules*, **23**: 2566.
212. K.M. Maria John, G. Enkhtaivan, J.J. Kim, D.H. Kim (2014) *Food Chemistry*, **163**: 46-50.

213. C. Cekic, M. Ozgen (2010) *Journal of Food Composition and Analysis*, **23**: 540-544.
214. J. Kubola, S. Siriamornpun, N. Meeso (2011) *Food Chemistry*, **126**: 972-981.
215. D. Sun, S. Huang, S. Cai, J. Cao, P. Han (2015) *Food Research International*, **78**: 114-123.
216. N. Stanisavljević, J. Samardžić, T. Janković, K. Šavikin, M. Mojsin, V. Topalović, M. Stevanović (2015) *Food Chemistry*, **175**: 516-522.
217. R.J. Green, A.S. Murphy, B. Schulz, B.A. Watkins, M.G. Ferruzzi (2007) *Molecular Nutrition & Food Research*, **51**: 1152-1162
218. Z. Wu, J. Teng, L. Huang, N. Xia, B. Wei (2015) *RSC Advances*, **5**: 92089-92095.
219. M.J. Bermúdez-Soto, F.A. Tomás-Barberán, M.T. García-Conesa (2007) *Food Chemistry*, **102**: 865-874.
220. E. Celep, M. Charehsaz, S. Akyüz, E.T. Acar, E. Yesilada (2015) *Food Research International*, **78**: 209-215.
221. L. Ryan, S.L. Prescott (2010) *International Journal of Food Science & Technology*, **45**: 1191-1197.
222. R. Pinacho, R.Y. Cavero, I. Astiasarán, D. Ansorena, M.I. Calvo (2015) *Journal of Functional Foods*, **19**: 49-62.
223. J. Correa-Betanzo, E. Allen-Vercoe, J. McDonald, K. Schroeter, M. Corredig, G. Paliyath (2014) *Food Chemistry*, **165**: 522-531.
224. P. Berni, S.S. Campoli, T.C. Negri, N.M.V. de Toledo, S.G. Canniatti-Brazaca (2019) *Plant Foods for Human Nutrition*, **74**: 141-148.
225. S. G. Kucukguzel, P. Cikla-Suzgun (2015) *European Journal of Medicinal Chemistry*, **97**: 830-870.
226. R. P. Singh, K. N. C. Murthy, G. K. Jayaprakasha (2002) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 81-86.
227. J. Deng, W. Cheng, G. Yang (2011) *Food Chemistry*, **125**: 1430-1435.
228. Z. Sroka, W. Cisowski (2003) *Food and Chemical Toxicology*, **41**: 753-758.
229. C. A. Rice, N. J. Miller, G. Paganga (1996) *Free Radical Biology & Medicine*, **20**: 933-956.
230. Y. Z. Cai, S. Mei, X. Jie, Q. Luo, H. Corke (2006) *Life Sciences*, **78**: 2872-2888.;

231. P. Jing, S.-J. Zhao, W.-J. Jian, B.-J. Qian, Y. Dong, J. Pang (2012) *Molecules*, **17**: 12910-12924.
232. M. Salas-Reyes, J. Hernandez, Z. Dominguez, F. J. Gonzalez, P. D. Astudillo, R. E. Navarro, E. Martinez-Benavidez, C. Velazquez-Contreras, S. Cruz-Sanchez (2011) *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **22**: 693-701.
233. A. Simic, D. Manojlovic, D. Segan, M. Todorovic (2007) *Molecules*, **12**: 2327-2340.
234. A. Vaganeck, J. Rimarcik, K. Dropkova, J. Lengyel, E. Klein (2014) *Computational and Theoretical Chemistry*, **1050**: 31-38.
235. J. Đorović, J. M. Dimitrić-Marković, V. Stepanić, N. Begović, D. Amić, Z. Marković (2014) *Journal of Molecular Modeling*, **20**: 2345.
236. S. Marković, J. Tošović (2016) *Food Chemistry*, **210**: 585-592.
237. Z. Marković, J. Đorović, J. M. Dimitrić-Marković, R. Biočanin, D. Amić (2016) *Turkish Journal of Chemistry*, **40**: 499-509.
238. Z. D. Petrović, J. Đorović, D. Simijonović, V. P. Petrović, Z. Marković (2015) *RSC Advances*, **5**: 24094-24100.
239. S. Saito, J. Kawabata (2006) *Helvetica Chimica Acta*, **89**: 1395-1407.
240. S. Saito, J. Kawabata (2008) *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **72**: 1877-1880.
241. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset (1995) *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **28**: 25-30.
242. L. Valgimigli, R. Amorati, M. G. Fumo, G. A. DiLabio, G. F. Pedulli, K. U. Ingold, D. A. Pratt (2008) *Journal of Organic Chemistry*, **73**: 1830-1841.
243. S. A. Ordoudi, M. Z. Tsimidou, A. P. Vafiadis, E. G. Bakalbassis (2006) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**: 5763-5768.
244. X. Ma, H. Li, J. Dong, W. Qian (2011) *Food Chemistry*, **126**: 698-704.
245. P. C. Eklund, O. K. Langvik, J. P. Warna, T. O. Salmi, S. M. Willför, R. E. Sjöholm (2005) *Organic & Biomolecular Chemistry*, **3**: 3336-3347.
246. C. Soares de Oliveira, B. Freitas Lira, J. M. Barbosa-Filho, J. G. Fernandez Lorenzo and P. Filgueiras de Athayde-Filho (2012) *Molecules*, **17**: 10192-10231.

247. H. Khalilullah, M. J. Ahsan, M. Hedaitullah, S. Khan and B. Ahmed (2012) *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **12**: 789-801.
248. P. Neeraja, S. Srinivas, K. Mukkanti, P. K. Dubey and S. Pal (2016), *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **26**: 5212-5217.
249. A. Lukin, R. Karapetian, Y. Ivanenkov and M. Krasavin (2016) *Letters in Drug Design & Discovery*, **13**: 198-204.
250. N. Ivanović, L. Jovanović, Z. Marković, V. Marković, M. D. Joksović, D. Milenković, P. T. Djurdjević, A. Cirić and L. Joksović (2016) *ChemistrySelect*, **1**: 3870-3878.
251. Y. Kotaiah, N. Harikrishna, K. Nagaraju and C. V. Rao (2012), *European Journal of Medicinal Chemistry*, **58**: 340-345.
252. R. L. Prior, X. Wu and K. Schaich (2005) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 4290-4302.
253. G. Y. Liou and P. Storz (2010) *Free Radical Research*, **44**: 479-496.
254. N. Hauptmann, J. Grimsby, J. C. Shih and E. Cadenas (1996) *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **335**: 295-304.
255. T. Arimoto, M. B. Kadiiska, K. Sato, J. Corbett and R. P. Mason (2005) *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **171**: 379-387.
256. M. Radu, M. Munteanu, S. Petrache, A. I. Serban, D. Dinu, A. Hermenean, C. Sima and A. Dinischiotu (2010) *Acta Biochimica Polonica*, **57**: 355-360.
257. J. Blum and I. Fridovich (1985) *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **240**: 500-508.
258. R. S. Treger, A. G. Cook, G. Rai, D. J. Maloney, A. Simeonov, A. Jadhav, C. J. Thomas, D. L. Williams, M. Cappello and J. J. Vermeire (2012) *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, **2**: 171-177.





*Невена Михаиловић (рођ. Ивановић) је рођена 18.маја 1989. године у Крагујевцу. Основну школу завршила је у Крагујевцу, као и средњу - Прву крагујевачку гимназију. Природно-математички факултет, одсек хемија – наставни смер, уписала је школске 2008/2009. године. Основне академске студије је завршила 08.10.2012. године са просечном оценом **9,58**, а мастер академске студије 16.10.2013. године са просечном оценом **9,56**.*

Докторске академске студије уписала је школске 2013/2014. године на катедри за аналитичку хемију. Током прве године студија била је стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја (у оквиру пројекта ОИ 172016). У звање истраживач-приправник изабрана је 30.01.2014. године, а у звање истраживач-сарадник 17.01.2017. године. Ангажована је у радни однос на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије: „Синтеза, моделовање, физичко-хемијске и биолошке особине органских једињења и одговарајућих комплекса метала“ (пројекат бр. ОИ 172016), од 09.03.2015. године.

Током основних студија била је стипендиста фонда Драгослав Срејовић, и Министарства просвете, науке и технолошког развоја, а током завршних година (четврта година и мастер), стипендиста фонда „Доситеја“ за 1000 најбољих студената у Србији. Добитник је специјалног признања Српског хемијског друштва за 2013. годину за изузетан успех у току студија на Природно-математичком факултету у Крагујевцу. Током мастер студија, као један од најбољих студената на својој години одабрана је за усавршавање преко Темпус пројекта у Институту за хемију и технологију за заштиту животне средине, Хемијски факултет, Универзитет технологије у Брну, Чешка Република, под менторством професора др Јозефа Чаславског, у трајању од месец дана. Такође, у току докторских студија (2015. године), боравила је на Фармацеутском факултету у Љубљани, одсек-фармацеутска биологија, у групи професора др Сама Крефта, такође у периоду од месец дана.

У досадашњем раду била је ангажована на извођењу практичне наставе за студенте хемије на основним и мастер академским студијама, и то у оквиру следећих предмета: Аналитичка хемија 2, Семимикро и микро методе анализе, Инструментална аналитичка хемија 2, Процена утицаја на животну средину, Хемија природних и отпадних вода и Равнотеже у аналитичкој хемији. Вежбе из наведених предмета држи од школске 2013/2014. године, и од тада је више школских година за редом била награђена као најбоље оцењени асистент, према резултатима студентских анкета.



БИБЛИОГРАФИЈА



Невена Михаиловић је у досадашњем научно-истраживачком раду била аутор и/или коаутор извесног броја научних публикација, у научним часописима међународног значаја (категорије M20). Поред тога, учествовала је на бројним научним конференцијама, како домаћег, тако и међународног карактера. У овом делу хронолошки су побројани библиографски подаци кандидата који представљају резултате његовог досадашњег истраживачког рада, објављени у међународним научним часописима (укупно 9) и у виду саопштења на међународним (укупно 7) и домаћим (укупно 4) научним скуповима, што збирно чини 20 библиографских јединица.

Из ове докторске дисертације проистекле су 3 научне публикације (1 рад категорије M21, 1 рад категорије M22 и 1 категорије M23) и 4 конференцијска саопштења (обележене су звездицом након редног броја), а публиковани научни радови са резултатима из дисертације дати су у Прилогу.

Радови објављени у научним часописима међународног значаја (M20)

1. Milan D. Antonijevic, Marija Arsovic, Josef Časlavsky, Vesna Cvetkovic, Predrag Dabic, Mladen Franko, Gordana Ilic, Milena Ivanovic, **Nevena Ivanović**, Milica Kosovac, Dragana Medic, Slobodan Najdanovic, Milica Nikolic, Jovana Novakovic, Tatjana Radovanovic, Djurdjina Ranic, Bojan Sajatovic, Gorica Spijunovic, Ivana Stankov, Jelena Tosovic, Polonca Trebse, Olivera Vasiljevic and Jan Schwarzbauer, Actual contamination of the Danube and Sava Rivers at Belgrade, *Journal of the Serbian Chemical Society*, **79** (2014), 1169-1184.
DOI: 10.2298/JSC131105014A
ISSN: 0352-5139
IF₂₀₁₅= 0,970; област: Chemistry, Multidisciplinary (120/163)
Категорија: **M23**
2. Predrag Đurđević, Ivan Jakovljević, Ljubinka Joksović, **Nevena Ivanović**, Milena Jelikić - Stankov, The Effect of Some Fluoroquinolone Family Members on Biospeciation of Copper (II), Nickel (II) and Zinc (II) Ions in Human Plasma, *Molecules* **19** (2014), 12194-12223.
DOI: 10.3390/molecules190812194
ISSN: 1420-3049
IF₂₀₁₅=2,465; област: Chemistry, Organic (24/59)
Категорија: **M22**
3. Andrija R. Ćirić, **Nevena Ivanović**, Milica S. Cvijović, Milena Jelikić - Stankov, Ljubinka Joksović, Predrag T. Đurđević, Chemometric - Assisted Optimization of RP-HPLC Method

for Determination of Some Bioflavonoids in Brassica oleracea Species and Their Antioxidant Activity, *Food Analytical Methods* **7** (2014), 1387-1399.

DOI: 10.1007/s12161-013-9761-y

ISSN: 1936-9751

IF₂₀₁₅=2,167; област: Food Science & Technology (34/125)

Категорија: M21

4. ***Nevena Ivanović**, Ljiljana Jovanović, Zoran Marković, Violeta Marković, Milan D. Joksović, Dejan Milenković, Predrag T. Đurđević, Andrija Ćirić, Ljubinka Joksović, Potent 1,2,4-Triazole-3-thione Radical Scavengers Derived from Phenolic Acids: Synthesis, Electrochemistry, and Theoretical Study, *Chemistry Select*, **1** (2016), 3870-3878.

DOI: 10.1002/slct.201600738/epdf

ISSN: 2365-6549

IF₂₀₁₇ = 1,505; област: Chemistry, Multidisciplinary (106/171)

Категорија: **M23**

5. Vladimir Mihailović, Samo Kreft, Eva Tavčar Benković, **Nevena Ivanović**, Milan S. Stanković, Chemical profile, antioxidant activity and stability in stimulated gastrointestinal tract model system of three Verbascum species, *Industrial Crops and Products*, **89** (2016), 141-151.

DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.04.075

ISSN: 0926-6690

IF₂₀₁₇ = 3,849; област: Agronomy (6/87)

Категорија: **M21a**

6. ***Nevena Mihailović**, Violeta Marković, Ivana Z. Matić, Nemanja S. Stanisavljević, Živko S. Jovanović, Snežana Trifunović, Ljubinka Joksović, Synthesis and antioxidant activity of 1,3,4- oxadiazoles and their diacylhydrazine precursors derived from phenolic acids, *RSC Advances*, **7** (2017), 8550-8560.

DOI: 10.1039/C6RA28787E

ISSN: 2046-2069

IF₂₀₁₅=3,289; област: Chemistry, Multidisciplinary (49/163)

Категорија: **M22**

7. Katarina Jakovljević, Ivana Z. Matić, Tatjana Stanojković, Ana Krivokuća, Violeta Marković, Milan D. Joksović, **Nevena Mihailović**, Marija Nićiforović, Ljubinka Joksović, Synthesis, antioxidant and antiproliferative activities of 1,3,4-thiadiazoles derived from phenolic acids, *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, **27** (2017), 3709-3715.

DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.07.003

ISSN: 0960-894X

IF₂₀₁₆ = 2,454; област: Chemistry, Medicinal (31/60)

Категорија: **M22**

8. ***Nevena R. Mihailović**, Vladimir B. Mihailović, Samo Kreft, Andrija R. Ćirić, Ljubinka G. Joksović, Predrag T. Đurđević, Analysis of phenolics in the peel and pulp of wild apples (*Malus sylvestris* (L.) Mill.), *Journal of Food Composition and Analysis*, **67** (2018), 1-9.

DOI: 10.1016/j.jfca.2017.11.007

ISSN: 0889-1575

IF₂₀₁₇=2,956; област: Food Science & Technology (31/133)

Категорија: **M21**

9. Mirjana R. Cvijović, Valerio Di Marco, Srboljub J. Stanković, Zoran P. Nedić, Ljubinka G. Joksović, **Nevena R. Mihailović**, Atmospheric Solids Analysis Probe with Mass Spectrometry for Chlorpyrifos and Chlorpyrifos-Oxon Determination in Apples, *Acta Chimica Slovenica*, **66** (2019), 70-77.

DOI: 10.17344/acsi.2018.4468

ISSN: 1318-0207

IF₂₀₁₇=1,104; област: Chemistry, Multidisciplinary (125/171)

Категорија: **M23**

Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (**M34**)

1. Andrija Ćirić, **Nevena Ivanović**, Milica Cvijovic, Milena Jelikić-Stankov, Ljubinka Joksović, Predrag Djurdjević, Chemometric assisted optimization of RP-HPLC method for determination of some bioflavonoids in *Brassica oleracea* species and their antioxidative activity, *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, 27-29 June 2013, Belgrade, Serbia, p. 270.
2. **Nevena Ivanović**, Milica Cvijovic, Andrija Ćirić, Predrag Djurdjević, Computer assisted optimization of ultrasound extraction of total phenolics from citrus peel, *7th Central European Congress on Food (CEFood)*, 21-24 May 2014, Ohrid, Macedonia, p. 51.
3. Ljubinka Joksović, Ivan Jakovljević, **Nevena Ivanović**, Petar Stanić, Biljana Šmit, Influence of fluoroquinolone antibiotics on biospeciation of iron (III) ion in human blood plasma, *25th Congress of the Society of Chemists and Technologists of Macedonia*, 12-22 September 2018, Ohrid, Macedonia, p. 101.
4. Vladimir Mihailović, Jelena Katanić, Nikola Srećković, **Nevena Mihailović**, Ljubinka Joksović, *Salvia verticillata* L. root as potential dietary supplement and an important source of rosmarinic acid, *UNIFood Conference*, 05-06 October 2018, Belgrade, Serbia, p. 141.

5. ***Nevena Mihailović**, Andrija Ćirić, Ljubinka Joksović, Optimization of ultrasonic extraction conditions of phenolic compounds in wild raspberry extract (*Rubus idaeus* L.): HPLC-PDA analysis and antioxidant activity determination of obtained extract, *UNIFood Conference*, 5-6 October 2018, Belgrade, Serbia, p. 256.
6. ***Nevena R. Mihailović**, Vladimir B. Mihailović, Nikola Z. Srećković, Ljubinka G. Joksović, Stability of phenolic compounds during simulated in vitro gastrointestinal digestion of wild raspberries, *1st ISO-FOOD International Symposium on Isotopic and Other Techniques in Food Safety and Quality*, 1-3 April 2019, Portorož, Slovenia, p. 67.
7. Ljubinka Joksović, Biljana Šmit, Ivan Jakovljević, Nevena Mihailović, Đorđe Petrović, Influence of fluoroquinolone antibiotics on biospeciation of calcium(II) ion in human blood plasma by computer simulation, *9th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, 8-11 May 2019, Targoviste, Romania, S1_P_08.

Саопштења на националним научним конференцијама штампана у изводу (M64)

1. Vesna Cvetkovic, Gordana Ilic, Milena Ivanovic, **Nevena Ivanović**, Olivera Vasiljevic, Josef Caslavsky, Application of HPLC/MS and tandem mass spectrometry for the identification and quantification of organic pollutants in river water", *6th Symposium Chemistry and Environmental Protection*, 22 - 24 May 2013, Vršac, Serbia, p. 390.
2. ***Nevena Ivanović**, Vladimir Mihailovic, Samo Kreft, Andrija Ćiric, Predrag Djurdjevic, Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for phenolic content and antioxidant capacity of wild apple fruits, *52nd Meeting of the Serbian Chemical Society*, 29-30 May 2015, Novi Sad, Serbia, p. 103.
3. Vladimir Mihailović, Jelena Katanić, Nikola Srećković, **Nevena Mihailović**, Zelena sinteza metalnih nanočestica korišćenjem ekstrakata biljaka - nove primene biljnih resursa, *8th Symposium Chemistry and Environmental Protection*, May 30 - June 1 2018, Kruševac, Serbia, p. 33.

Саопштења са скупова националног значаја штампана у целини (M63)

1. ***Nevena Mihailović**, Tijana Maksimović, Andrija Ćirić, Ljubinka Joksović, Optimizacija uslova mikrotalasne ekstrakcije fenolnih jedinjenja divlje trešnje (*Prunus avium* L.), *XXIII Savetovanje o biotehnologiji*, 9-10 March 2018, Čačak, Serbia, p. 463.



ПРИЛОГ



Табела П1. Централни композитни експериментални дизајн са одзивима зависних променљивих екстракције фенолних једињења из коре и пулпе плода дивље јабуке

Независне променљиве					Зависне променљиве (одзиви)					
Бр.	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Кора			Пулпа		
					TPC	TFC	TPA	TPC	TFC	TPA
1	30,00	100,00	40,00	80,00	6,610	0,813	0,160	5,083	0,511	0,992
2	65,00	60,00	30,00	80,00	7,593	0,713	2,404	5,831	0,519	1,382
3	65,00	60,00	40,00	50,00	7,593	0,700	2,145	6,778	0,522	1,385
4	30,00	20,00	40,00	20,00	6,940	0,725	1,513	5,232	0,445	1,076
5	65,00	20,00	30,00	50,00	7,571	0,751	2,135	5,893	0,500	1,292
6	100,00	20,00	20,00	20,00	7,467	0,733	2,274	5,809	0,442	1,399
7	30,00	20,00	20,00	80,00	6,329	0,703	1,386	4,654	0,439	1,119
8	100,00	100,00	20,00	20,00	7,836	0,806	2,290	6,074	0,458	1,431
9	65,00	60,00	30,00	50,00	7,578	0,640	2,099	6,313	0,507	1,466
10	65,00	60,00	30,00	50,00	7,517	0,641	2,099	6,401	0,510	1,448
11	65,00	60,00	30,00	50,00	7,497	0,640	2,085	6,293	0,507	1,477
12	100,00	100,00	40,00	20,00	7,202	0,840	2,322	6,307	0,462	1,661
13	30,00	20,00	20,00	20,00	6,962	0,649	1,243	4,514	0,425	0,949
14	65,00	60,00	20,00	50,00	7,151	0,676	2,062	5,701	0,512	1,307
15	30,00	100,00	40,00	20,00	6,359	0,745	1,568	4,415	0,382	1,062
16	30,00	100,00	20,00	20,00	6,970	0,749	1,479	4,624	0,389	0,942
17	65,00	60,00	30,00	50,00	7,446	0,649	2,078	6,299	0,512	1,445
18	100,00	100,00	40,00	80,00	8,350	0,874	2,809	6,535	0,507	1,693
19	100,00	60,00	30,00	50,00	7,724	0,646	2,735	5,975	0,522	1,574
20	65,00	60,00	30,00	50,00	7,485	0,642	2,089	6,324	0,509	1,463
21	30,00	60,00	30,00	50,00	7,126	0,677	1,346	5,053	0,429	0,947
22	100,00	20,00	40,00	80,00	7,467	0,705	2,409	6,440	0,500	1,526
23	30,00	100,00	20,00	80,00	6,269	0,826	1,549	5,567	0,482	1,284
24	100,00	100,00	20,00	80,00	7,534	0,903	2,648	6,042	0,492	1,470
25	65,00	60,00	30,00	20,00	8,098	0,629	2,238	5,806	0,492	1,245
26	65,00	100,00	30,00	50,00	7,902	0,884	2,197	5,800	0,499	1,452
27	100,00	20,00	40,00	20,00	7,069	0,708	2,298	6,208	0,453	1,518
28	100,00	20,00	20,00	80,00	7,202	0,766	2,417	6,440	0,500	1,526
29	30,00	20,00	40,00	80,00	6,618	0,691	1,821	5,960	0,463	1,100
30	65,00	60,00	30,00	50,00	7,502	0,638	2,099	6,303	0,511	1,468

X₁ - однос запремине растварача и масе узорка (mL/g); X₂ - концентрација метанола (%); X₃ - време екстракције (min); X₄ - температура екстракције (°C); TPC - садржај укупних фенола (mg GAE/g CM); TFC - садржај флавоноида (mg RUE/g CM) и TPA - садржај фенолних киселина (mg CAE/g CM)

Табела П2. Централни композитни дизајн са одзивима зависних променљивих екстракције екстракције фенолних једињења из плода дивље малине

Независне променљиве					Зависне променљиве (одзиви)		
Бр.	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	TPC	TFC	TGA
1	20,00	30,00	15,00	80,00	2,191	0,170	0,135
2	60,00	20,00	8,00	60,00	1,544	0,064	0,135
3	60,00	30,00	8,00	60,00	1,460	0,034	0,158
4	20,00	30,00	1,00	40,00	1,619	0,076	0,176
5	60,00	20,00	8,00	60,00	1,570	0,060	0,140
6	100,00	10,00	1,00	80,00	2,140	0,202	0,097
7	100,00	10,00	15,00	80,00	2,973	0,267	0,151
8	100,00	20,00	8,00	60,00	1,531	0,051	0,111
9	60,00	20,00	8,00	40,00	1,783	0,060	0,088
10	100,00	30,00	15,00	80,00	2320	0,119	0,050
11	20,00	30,00	15,00	40,00	1,904	0,049	0,068
12	20,00	10,00	1,00	40,00	1,172	0,103	0,116
13	20,00	20,00	8,00	60,00	1,693	0,063	0,144
14	60,00	20,00	8,00	60,00	1,580	0,061	0,128
15	60,00	20,00	8,00	60,00	1,664	0,064	0,131
16	100,00	30,00	15,00	40,00	1,717	0,033	0,085
17	20,00	10,00	1,00	80,00	2,041	0,199	0,167
18	20,00	10,00	15,00	40,00	1,633	0,083	0,172
19	20,00	30,00	1,00	80,00	1,415	0,092	0,196
20	60,00	20,00	8,00	60,00	1,607	0,062	0,142
21	20,00	10,00	15,00	80,00	3,012	0,276	0,203
22	60,00	20,00	8,00	60,00	1,595	0,063	0,142
23	60,00	20,00	8,00	80,00	2,268	0,144	0,116
24	100,00	30,00	1,00	40,00	1,550	0,069	0,159
25	60,00	10,00	8,00	60,00	1,610	0,125	0,177
26	100,00	10,00	1,00	40,00	1,243	0,144	0,117
27	60,00	20,00	1,00	60,00	0,954	0,046	0,119
28	60,00	20,00	15,00	60,00	1,496	0,066	0,129
29	100,00	10,00	15,00	40,00	1,523	0,109	0,160
30	100,00	30,00	1,00	80,00	1,236	0,051	0,150

X₁ - концентрација метанола (%); X₂ – однос запремине растварача и масе узорка(mL/g); X₃ - време екстракције (min); X₄ - температура екстракције (°C); TPC - садржај укупних фенола (mg GAE/g CM); TFC - садржај укупних флавоноида (mg RUE/g CM) и TAC - садржај антоцијана (mg CGE/g CM)

Табела ПЗ. Централни композитни експериментални дизајн са одзивима зависних променљивих екстракције плода дивље трешње

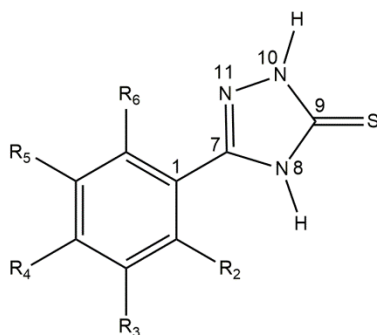
Независне променљиве					Зависне променљиве (одзиви)		
Бр.	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	TPC	TF	TPA
1	60,00	60,0	1,00	20,00	0,3627	0,2592	0,2159
2	100,00	60,00	1,00	20,00	0,3225	0,2001	0,1902
3	60,00	100,00	1,00	20,00	0,4898	0,1877	0,1802
4	100,00	100,000	1,00	20,00	0,3786	0,0811	0,1788
5	60,00	60,00	3,00	20,00	0,4831	0,1317	0,0644
6	100,00	60,00	3,00	20,00	0,3323	0,0807	0,0165
7	60,00	100,00	3,00	20,00	0,4682	0,2315	0,2009
8	100,00	100,00	3,00	20,00	0,4427	0,1144	0,2052
9	60,00	60,00	1,00	30,00	0,4689	0,2250	0,0840
10	100,00	60,00	1,00	30,00	0,4096	0,2211	0,0842
11	60,00	100,00	1,00	30,00	0,4343	0,1613	0,0075
12	100,00	100,00	1,00	30,00	0,4360	0,0612	0,0059
13	60,00	60,00	3,00	30,00	0,4627	0,1241	0,2311
14	100,00	60,00	3,00	30,00	0,4247	0,0706	0,1962
15	60,00	100,00	3,00	30,00	0,5106	0,2258	0,2562
16	100,00	100,00	3,00	30,00	0,4330	0,1010	0,2982
17	60,00	80,00	2,00	25,00	0,4929	0,1962	0,2232
18	100,00	80,00	2,00	25,00	0,3934	0,1372	0,2314
19	80,00	60,00	2,00	25,00	0,4654	0,2098	0,1321
20	80,00	100,00	2,00	25,00	0,4364	0,2001	0,1942
21	80,00	80,00	1,00	25,00	0,5088	0,3121	0,2824
22	80,00	80,00	3,00	25,00	0,5400	0,2432	0,3552
23	80,00	80,00	2,00	20,00	0,4847	0,3181	0,3931
24	80,00	80,00	2,00	30,00	0,5135	0,3143	0,3725
25	80,00	80,00	2,00	25,00	0,4896	0,3296	0,3639
26	80,00	80,00	2,00	25,00	0,4763	0,3119	0,3571
27	80,00	80,00	2,00	25,00	0,4678	0,3120	0,3612
28	80,00	80,00	2,00	25,00	0,5255	0,3125	0,3598
29	80,00	80,00	2,00	25,00	0,4557	0,3135	0,3601
30	80,00	80,00	2,00	25,00	0,4993	0,3125	0,3600

X₁ - концентрација метанола (%); X₂ - температура екстракције (°C); X₃ - време екстракције (min); X₄ - однос запремине растварача и масе узорка (mL/g); TPC - садржај укупних фенола (mg GAE/g CM); TFC - садржај укупних флавоноида (mg RUE/g CM) и TPA - садржај фенолних киселина (mg CAE/g CM)

Табела П4. Неки изабрани структурни параметри, дужине веза и углови веза једињења **4h**, **4d** и **4e**

Дужина веза (Å)	4h	4d	4e
D(C1 – C2)	1,403	1,407	1,404
D(C2 – C3)	1,387	1,389	1,385
D(C3 – C4)	1,404	1,409	1,409
D(C4 – C5)	1,393	1,389	1,395
D(C5 – C6)	1,389	1,390	1,392
D(C6 – C1)	1,402	1,400	1,399
D(C1 – C7)	1,462	1,462	1,462
D(C3 – O3)	1,369	1,365	1,368
D(C4 – O4)	1,366	1,363	1,361
D(O3 – H3)	0,968	/	0,969
D(O4 – H4)	0,967	0,970	/
D(O3 – CH ₃)	/	1,435	/
D(O4 – CH ₃)	/	/	1,437
D(C7 – N8)	1,378	1,378	1,378
D(N8 – C9)	1,370	1,370	1,370
D(C9 – S12)	1,689	1,689	1,689
D(C9 – N10)	1,351	1,350	1,350
D(N10 – N11)	1,368	1,369	1,368
D(N11 – C7)	1,311	1,312	1,311
D(N8 – H8)	1,012	1,011	1,012
D(N10 – H10)	1,011	1,011	1,011
D _H (O3 – H3 – O4)	2,233	/	2,180
D _H (O4 – H4 – O3)	/	2,158	/
Углови веза (°)			
A(C1 – C2 – C3)	120,4	120,0	120,3
A(C2 – C3 – C4)	120,0	119,9	120,3
A(C2 – C3 – O3)	118,6	125,6	118,7
A(C4 – C3 – O3)	121,4	114,4	120,9
A(C3 – C4 – C5)	119,6	119,9	119,4
A(C3 – O3 – CH ₃)	/	118,9	/
A(C3 – C4 – O4)	116,4	120,8	114,9
A(C5 – C4 – O4)	124,0	119,3	125,7
A(C4 – C5 – C6)	120,4	120,3	120,2
A(C4 – O4 – CH ₃)	/	/	118,6
A(C5 – C6 – C1)	120,2	120,3	120,6
A(C6 – C1 – C2)	119,3	119,6	119,2
A(C6 – C1 – C7)	119,5	119,5	119,7
A(C1 – C7 – N8)	125,3	125,1	125,2
A(C7 – N8 – C9)	109,5	109,5	109,5
A(N8 – C9 – N10)	102,4	102,4	102,4
A(N8 – C9 – S12)	128,6	128,6	128,6
A(N10 – C9 – S12)	129,0	129,0	129,0
A(C9 – N10 – N11)	113,8	113,8	113,8
A(N10 – N11 – C7)	104,6	104,6	104,6
A(N11 – C7 – N8)	109,7	109,7	109,7
A(N11 – C7 – C1)	125,0	125,2	125,1
Торзиони угао (°)			
τ(C2 – C1 – C7 – N8)	0,0	0,0	0,0

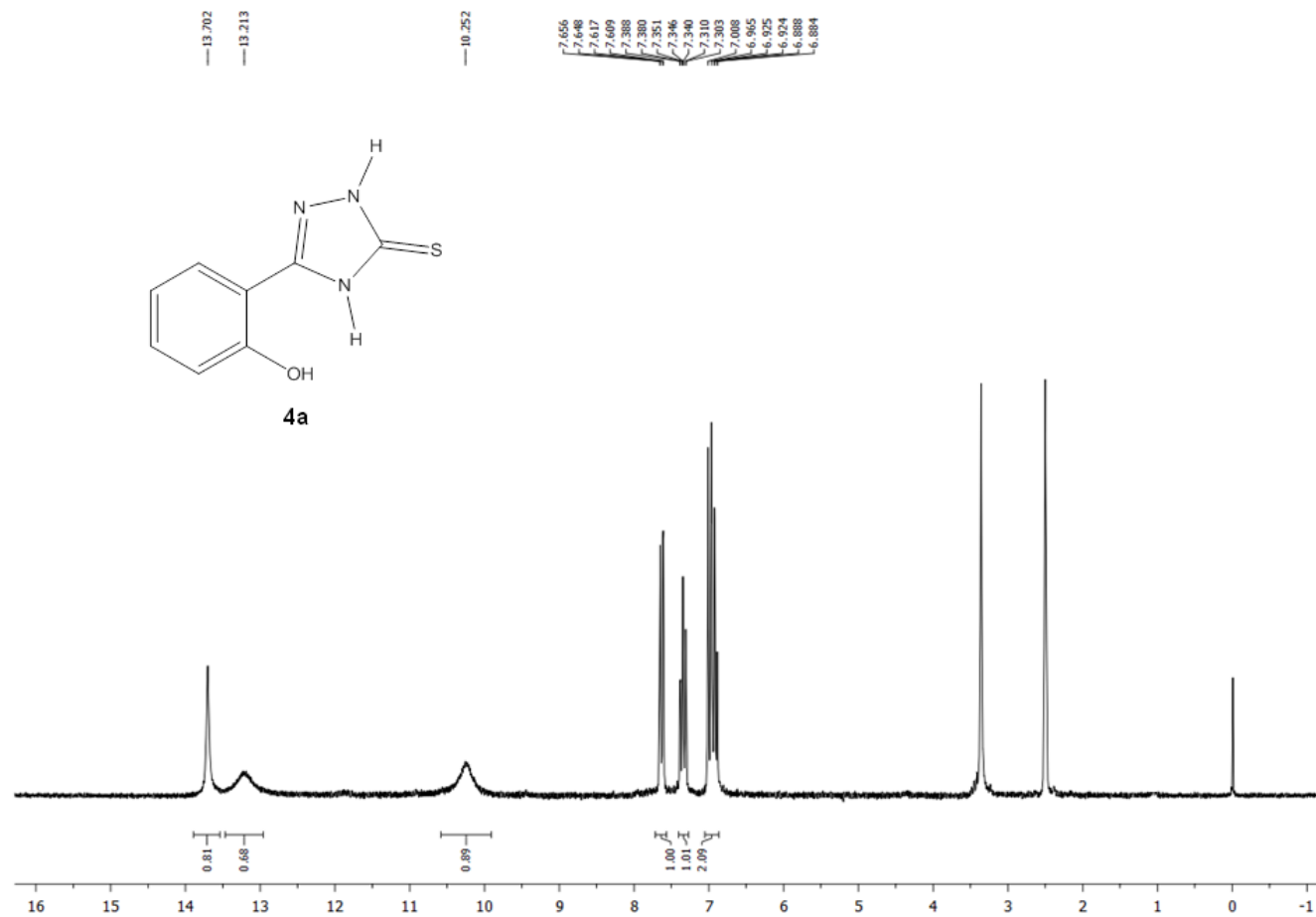
Табела П5. Израчунати термодинамички параметри (kJ mol^{-1}) за антиоксидативну активност 1,2,4-триазол-3-тиона



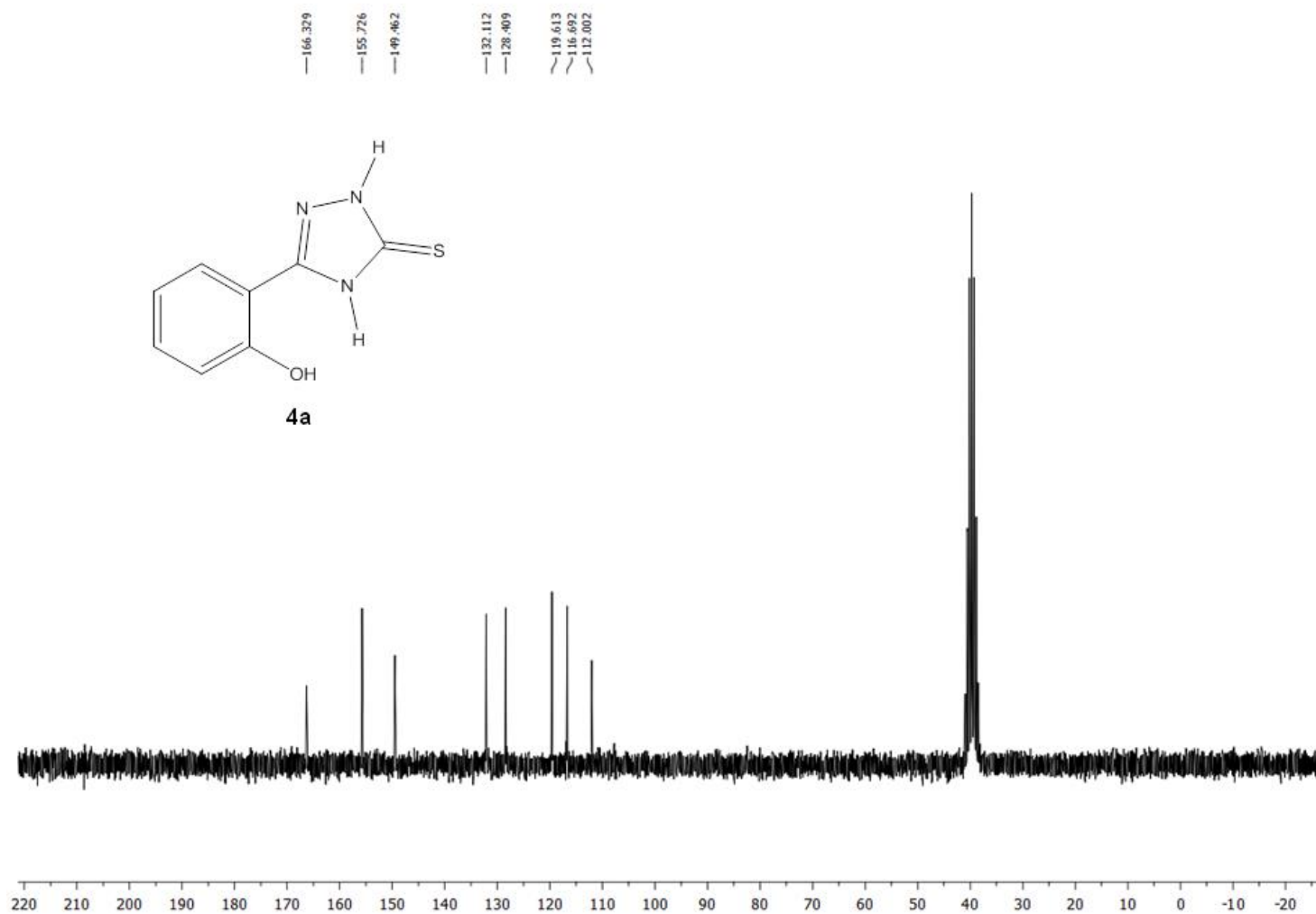
Једињење				BDE	IP	PDA	PA	ETE	
4a	R ₆ =O		N ₈ H	N ₁₀ H	365,5	481,7	52,8	154,6	379,9
	R ₆ =OH		N ₈	N ₁₀ H	361,5		48,7	128,8	401,7
	R ₆ =OH		N ₈ H	N ₁₀	351,8		39,1	137,5	383,4
4b	R ₃ =O		N ₈ H	N ₁₀ H	356,8	473,7	52,1	145,9	379,9
	R ₃ =OH		N ₈	N ₁₀ H	357,1		52,4	131,9	394,2
	R ₃ =OH		N ₈ H	N ₁₀	357,4		52,7	149,0	377,4
4c	R ₄ =O		N ₈ H	N ₁₀ H	346,8	462,1	53,7	139,1	376,7
	R ₄ =OH		N ₈	N ₁₀ H	355,0		61,9	139,4	384,6
	R ₄ =OH		N ₈ H	N ₁₀	351,7		58,6	152,9	367,8
4d	R ₃ =OCH ₃	R ₄ =O	N ₈ H	N ₁₀ H	329,5	451,8	46,7	142,1	356,9
	R ₃ =OCH ₃	R ₄ =OH	N ₈	N ₁₀ H	349,5		66,6	138,4	385,4
	R ₃ =OCH ₃	R ₄ =OH	N ₈ H	N ₁₀	349,8		67,0	152,9	368,9
4e	R ₃ =O	R ₄ =OCH ₃	N ₈ H	N ₁₀ H	336,8	452,1	53,7	148,9	356,9
	R ₃ =OH	R ₄ =OCH ₃	N ₈	N ₁₀ H	353,0		70,0	136,6	385,4
	R ₃ =OH	R ₄ =OCH ₃	N ₈ H	N ₁₀	350,1		67,1	150,3	368,9
4f	R ₆ =O	R ₅ =OH	N ₈ H	N ₁₀ H	339,4	481,4	26,9	138,4	370,0
	R ₆ =OH	R ₅ =O	N ₈ H	N ₁₀ H	341,3		28,9	150,2	360,1
	R ₂ =OH	R ₃ =OH	N ₈	N ₁₀ H	361,6		49,1	127,6	403,0

	R ₂ =OH	R ₃ =OH	N ₈ H	N ₁₀	352,1		39,7	136,1	385,1
4g	R ₆ =O	R ₄ =OH	N ₈ H	N ₁₀ H	364,6	466,6	67,8	153,0	380,8
	R ₆ =OH	R ₄ =O	N ₈ H	N ₁₀ H	352,8		55,9	137,4	384,5
	R ₆ =OH	R ₄ =OH	N ₈	N ₁₀ H	377,6		60,6	131,3	395,3
	R ₆ =OH	R ₄ =OH	N ₈ H	N ₁₀	346,5		49,5	140,2	375,3
4h	R ₃ =O	R ₄ =OH	N ₈ H	N ₁₀ H	327,9	456,2	40,8	131,1	365,9
	R ₃ =OH	R ₄ =O	N ₈ H	N ₁₀ H	320,4		33,3	125,0	364,4
	R ₃ =OH	R ₄ =OH	N ₈	N ₁₀ H	353,9		66,7	138,7	384,2
	R ₃ =OH	R ₄ =OH	N ₈ H	N ₁₀	351,1		63,9	152,4	367,7
4i	R ₃ =O	R ₅ =OH	N ₈ H	N ₁₀ H	357,3	477,3	49,0	144,9	381,4
	R ₃ =OH	R ₅ =O	N ₈ H	N ₁₀ H	359,3		51,0	145,8	382,5
	R ₃ =OH	R ₅ =OH	N ₈	N ₁₀ H	358,2		49,9	135,3	391,9
	R ₃ =OH	R ₅ =OH	N ₈ H	N ₁₀	357,4		49,1	146,1	380,4

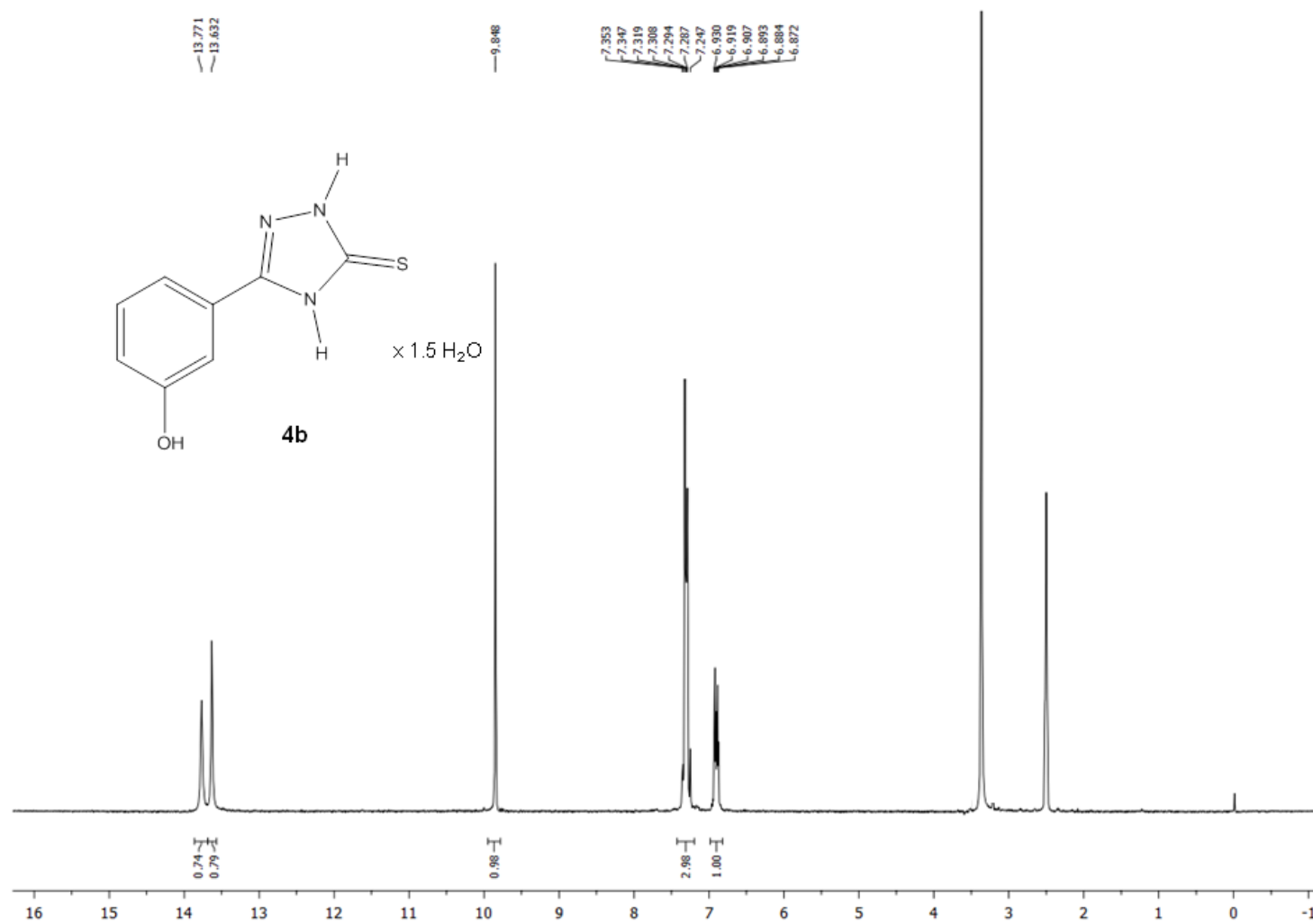
NMR спектри



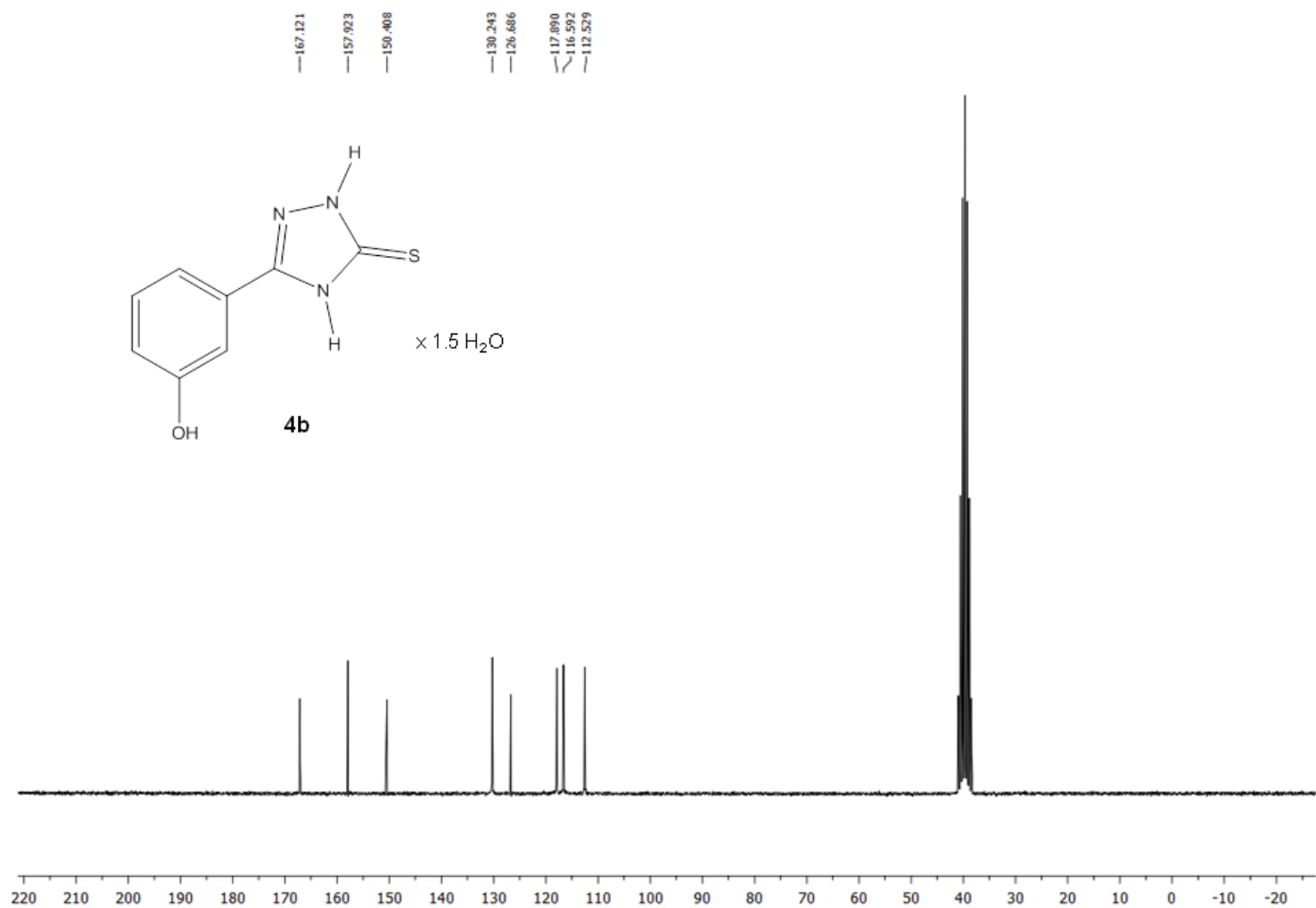
Слика П1. ¹H NMR спектар једињења **4a** у DMSO-d₆ (200 MHz)



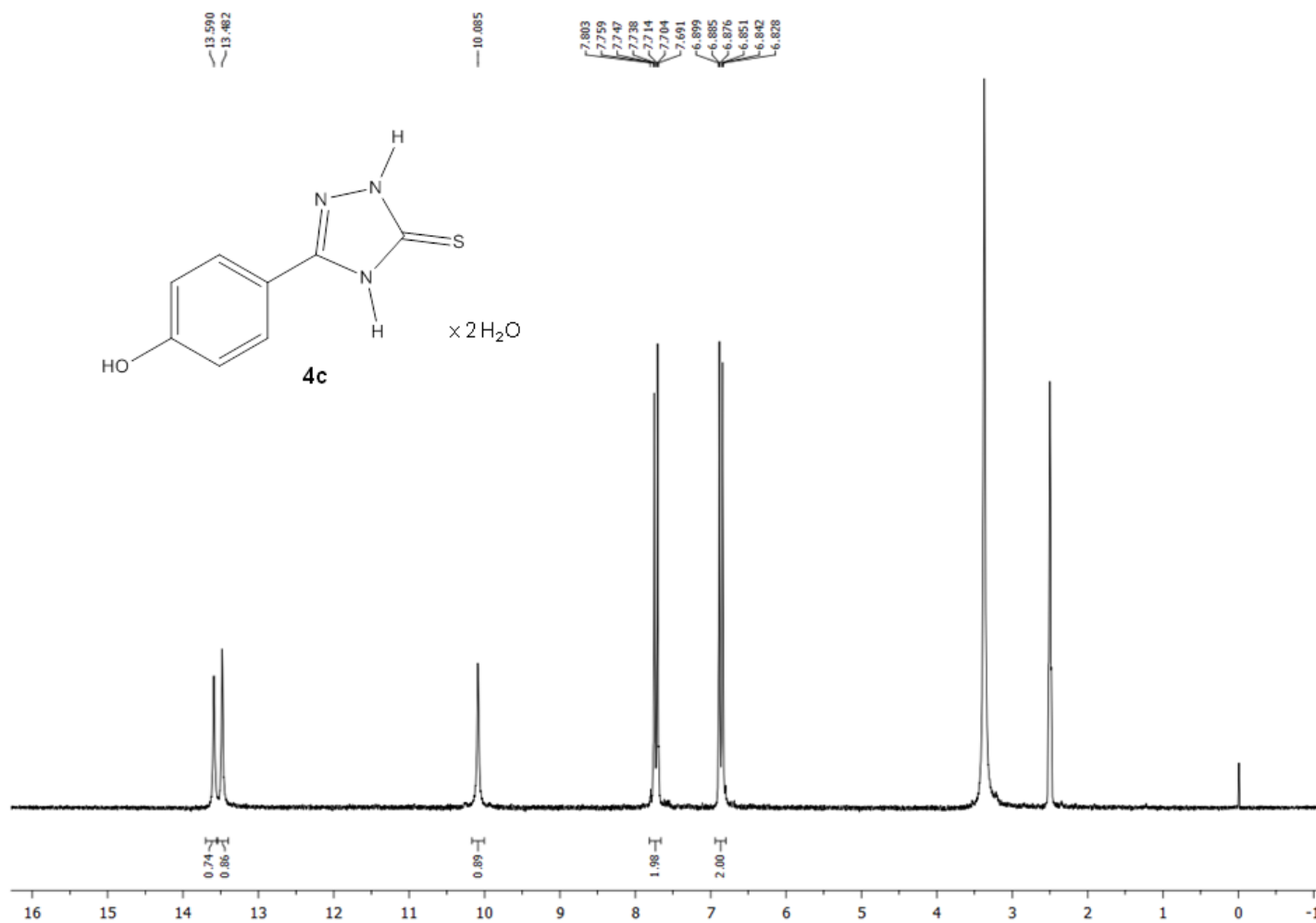
Слика П2. ^{13}C NMR спектар једињења **4a** у DMSO-d_6 (200 MHz)



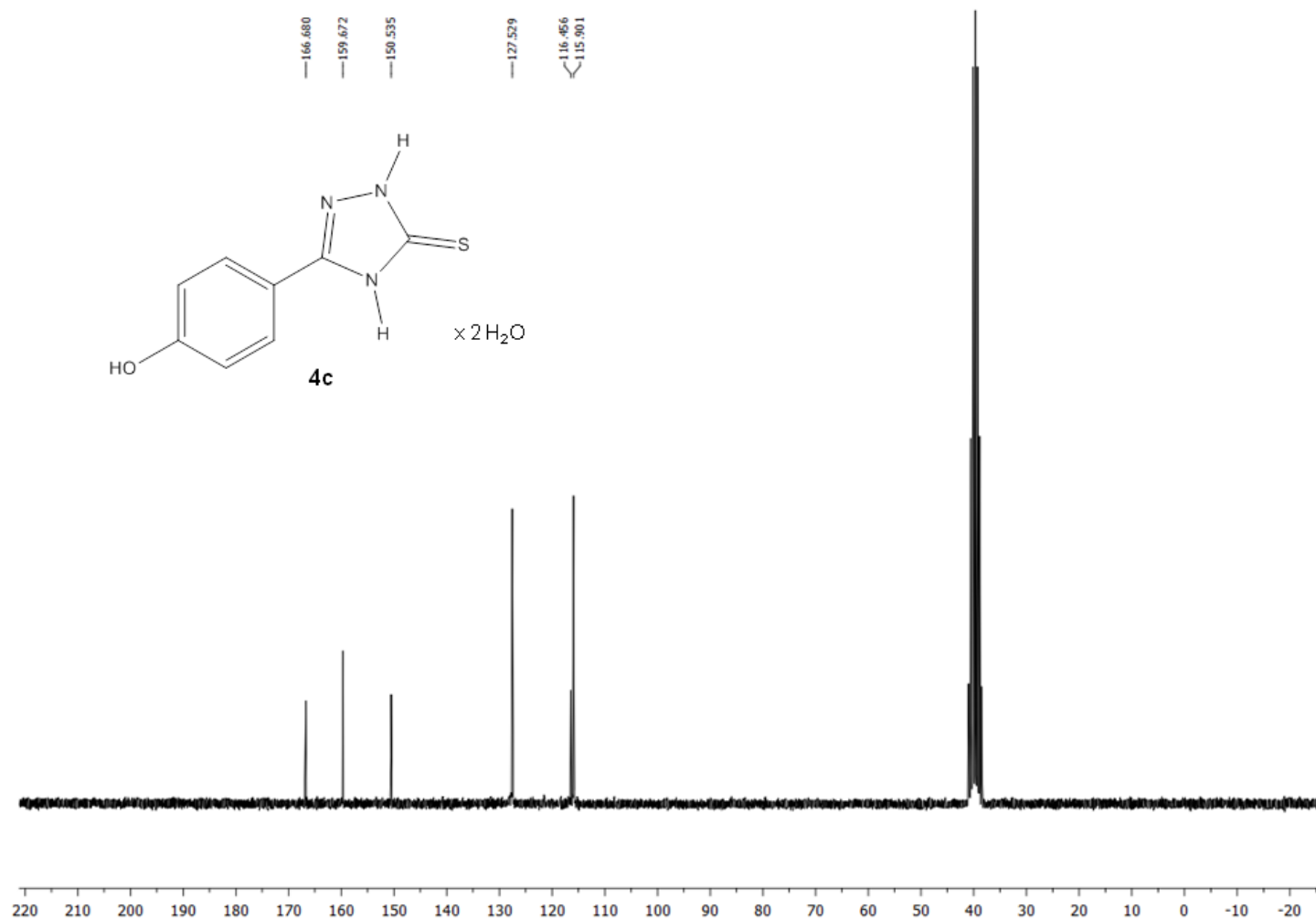
Слика ПЗ. ^1H NMR спектар једињења **4b** у DMSO-d_6 (200 MHz)



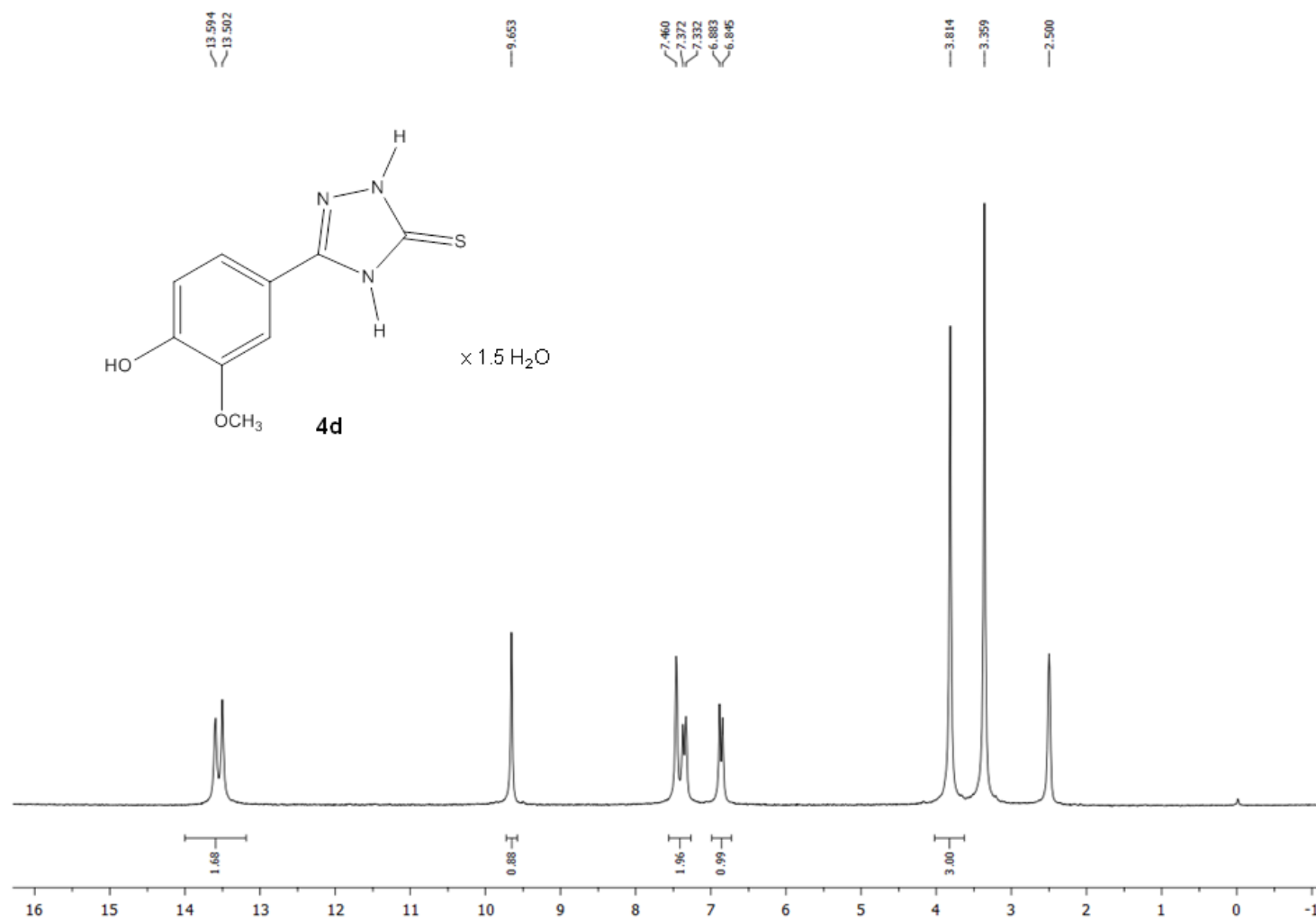
Слика П4. ^{13}C NMR спектар једињења **4b** у DMSO-d_6 (200 MHz)



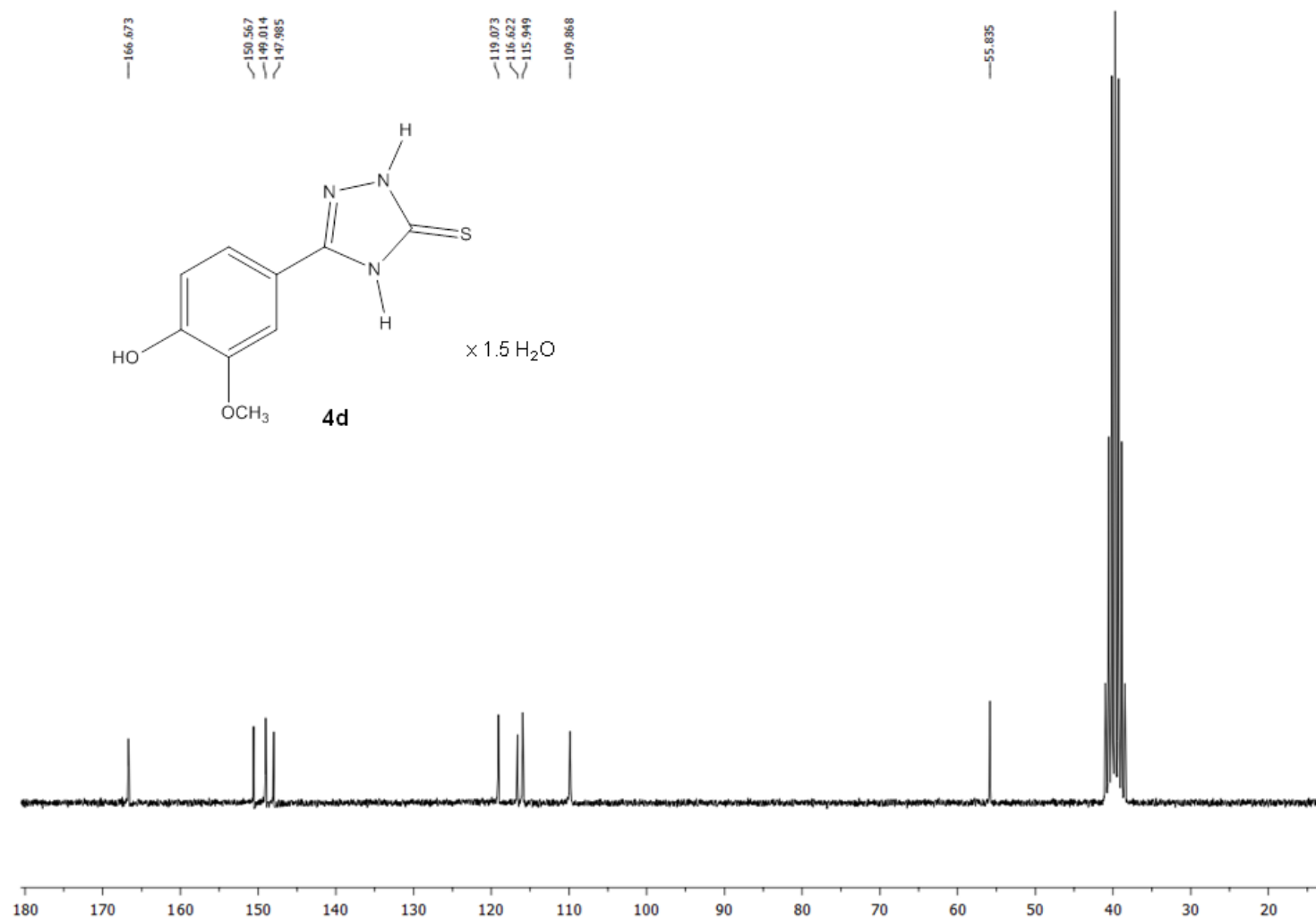
Слика П5. ^1H NMR спектар једињења **4c** у DMSO-d_6 (200 MHz)



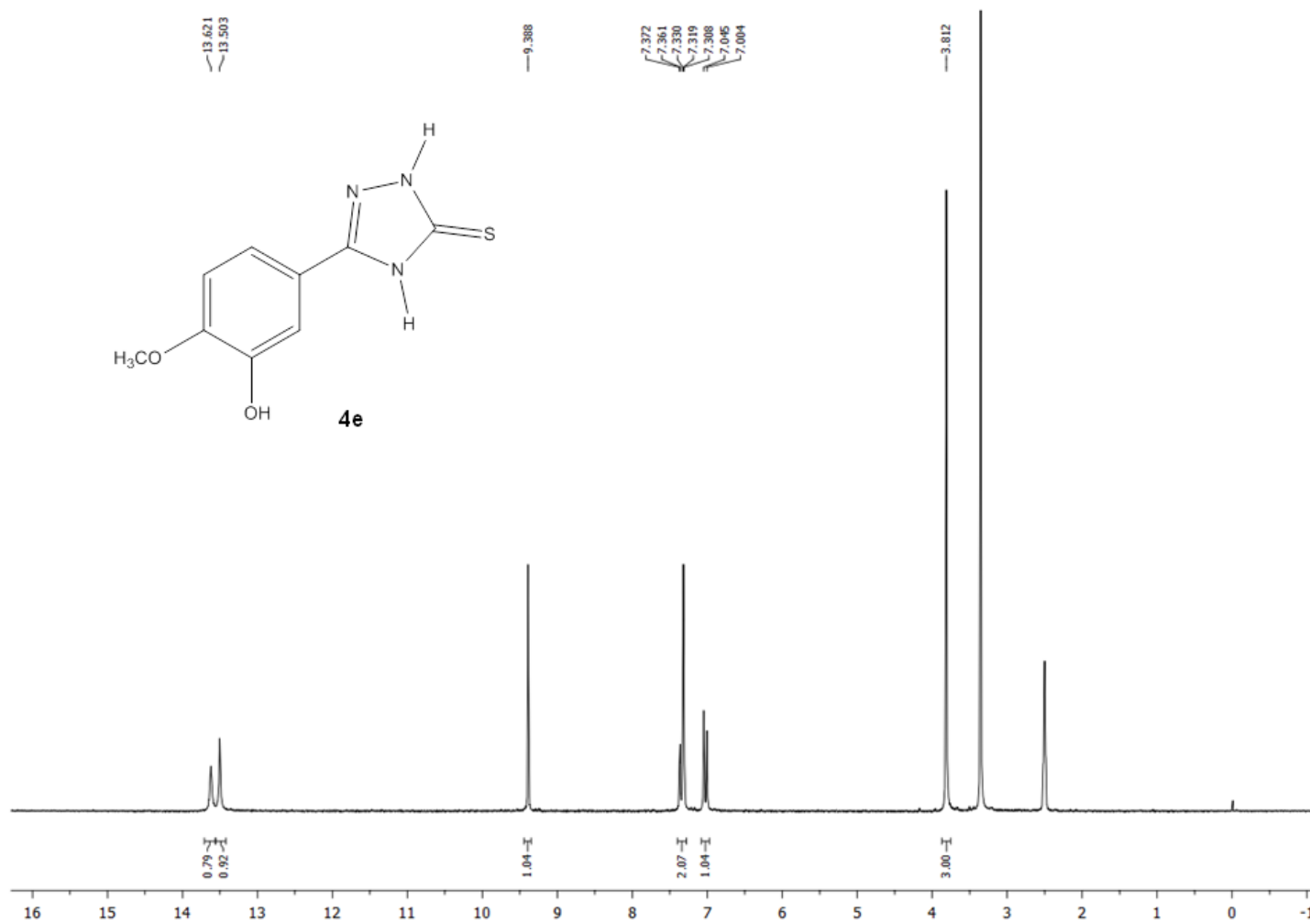
Слика П6. ^{13}C NMR спектар једињења **4c** у $\text{DMSO}-d_6$ (200 MHz)



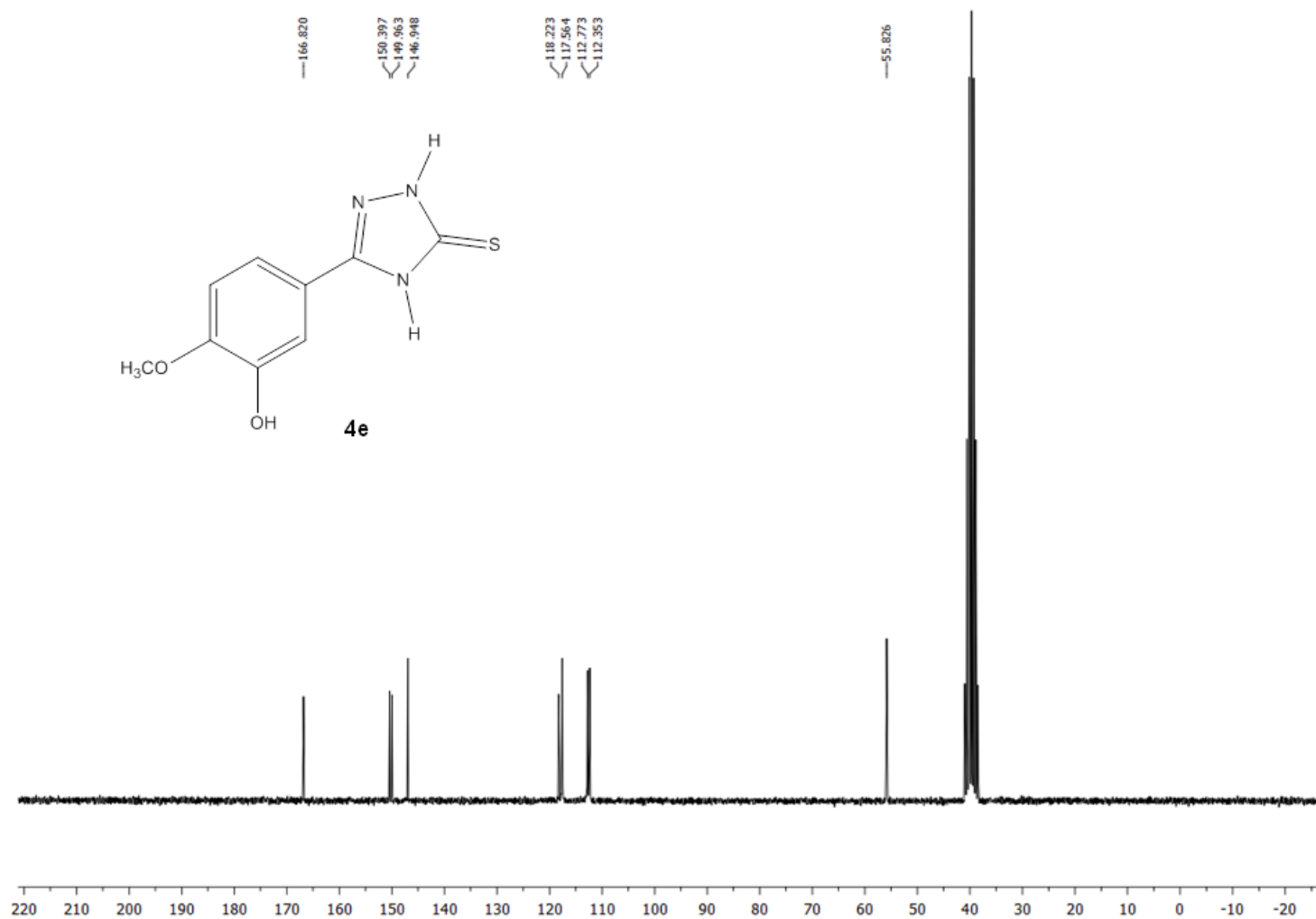
Слика П7. ^1H NMR спектар једињења **4d** у DMSO-d_6 (200 MHz)



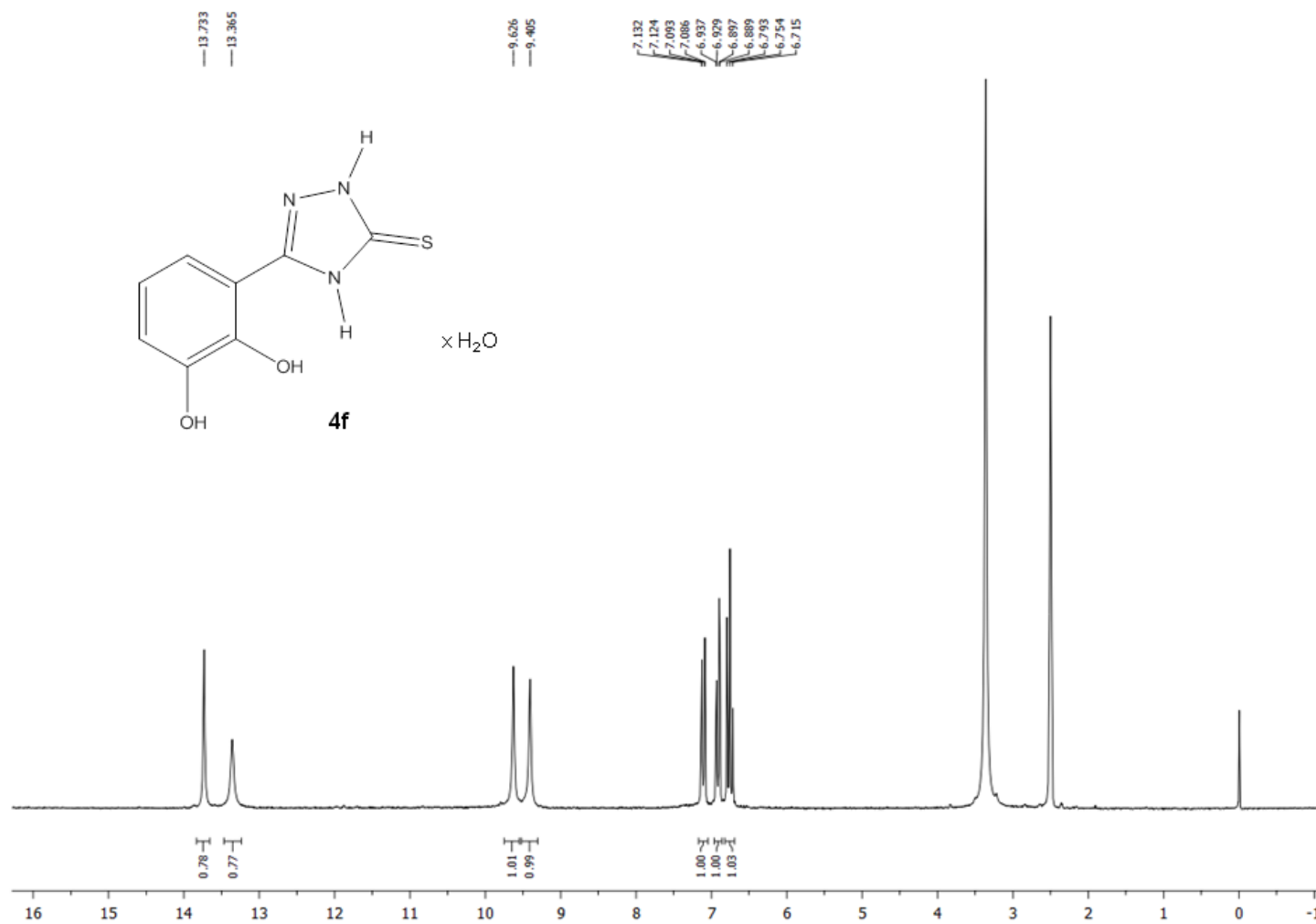
Слика П8. ^{13}C NMR спектар једињења **4d** у DMSO-d_6 (200 MHz)



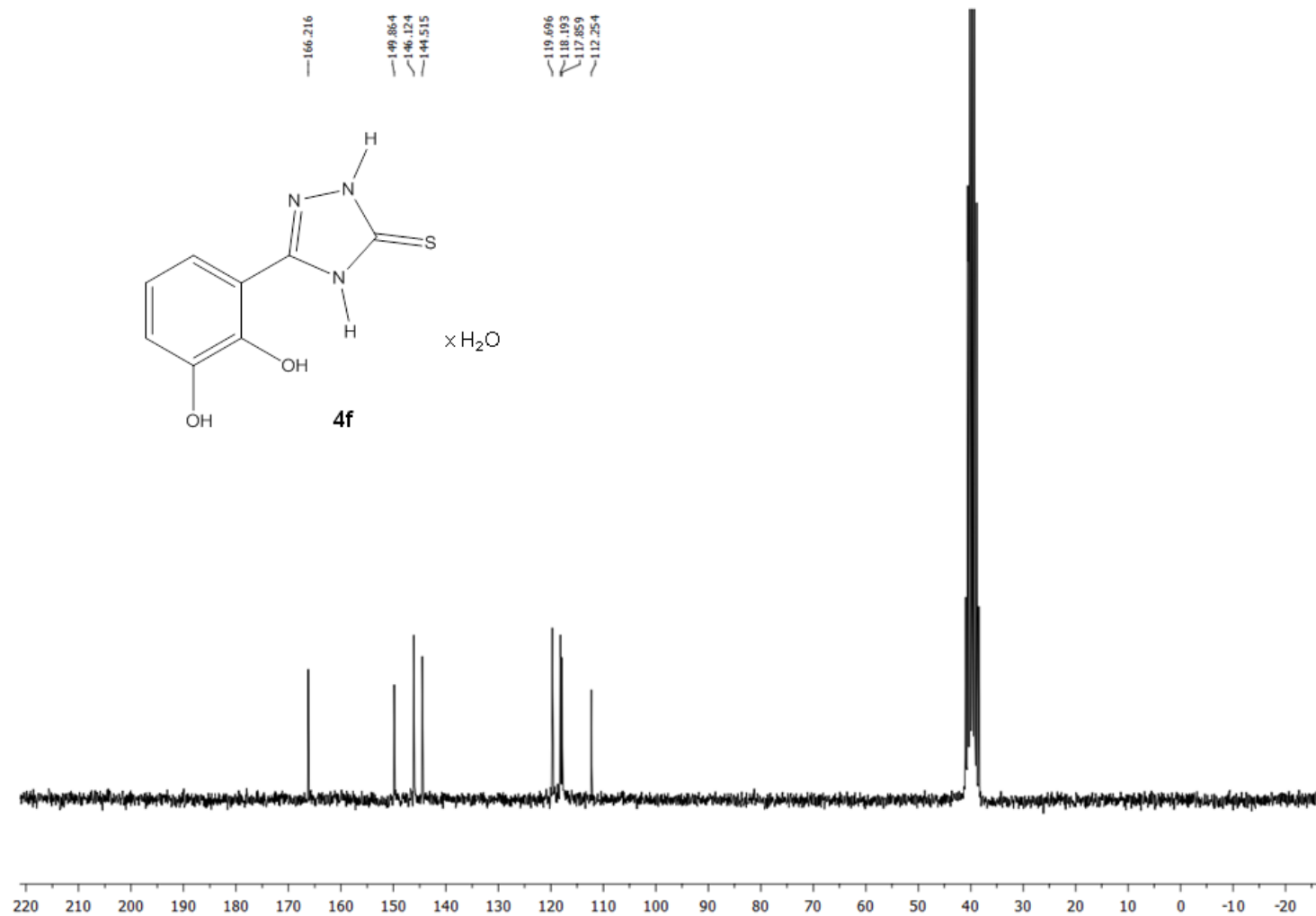
Слика П9. ^1H NMR спектар једињења **4e** у DMSO-d_6 (200 MHz)



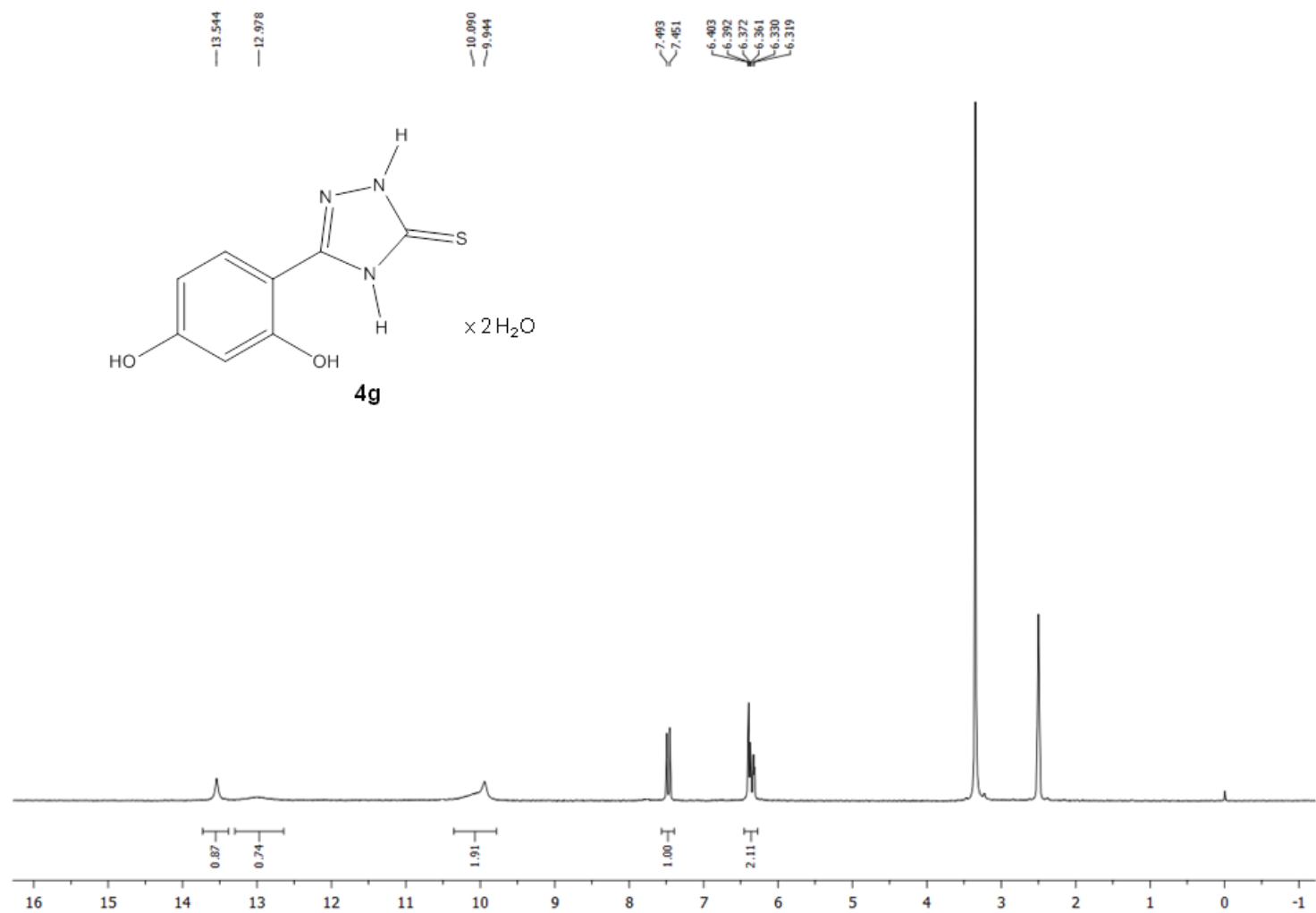
Слика П10. ^{13}C NMR спектар једињења **4e** у DMSO-d_6 (200 MHz)



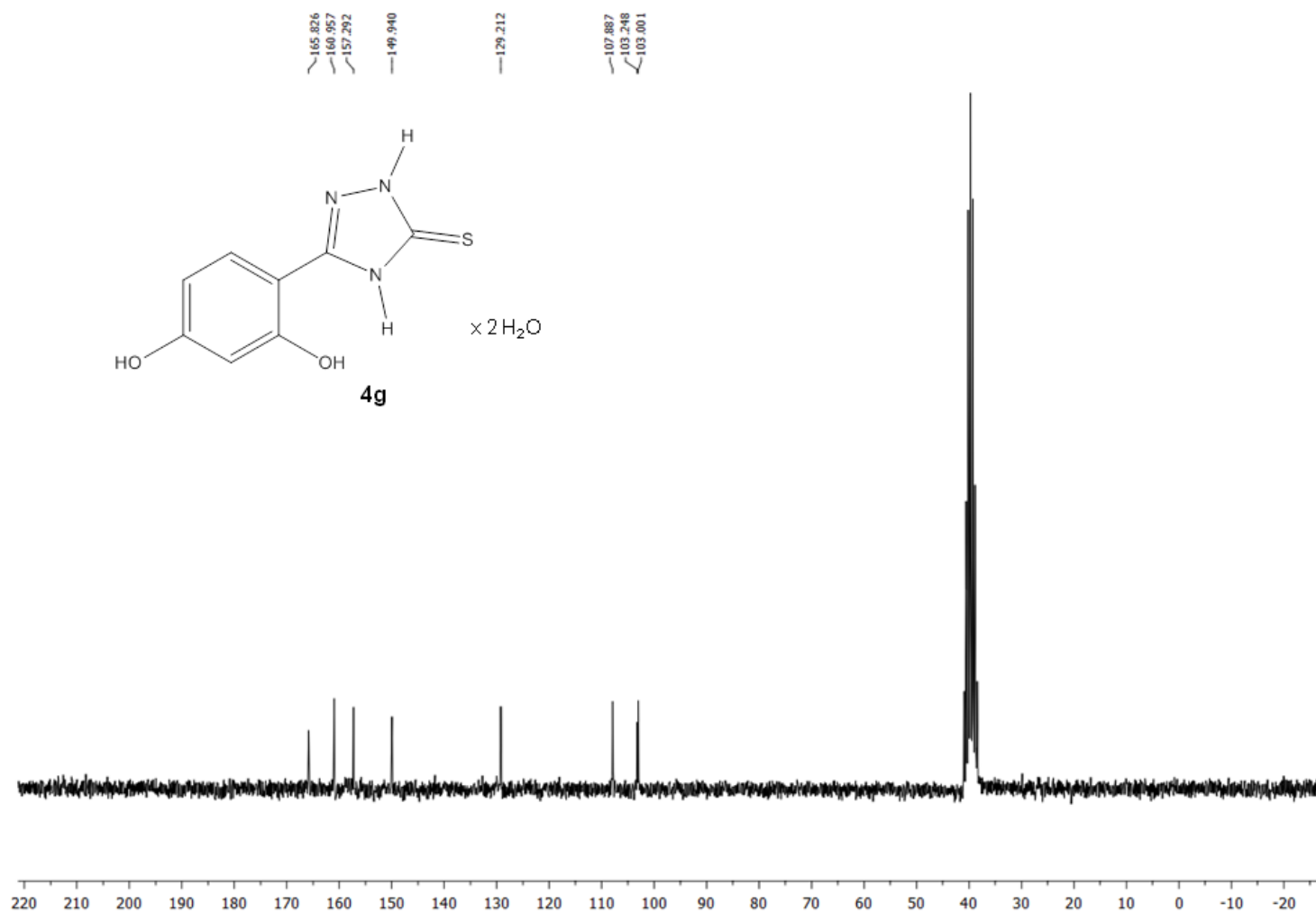
Слика П11. ^1H NMR спектар једињења **4f** у $\text{DMSO-}d_6$ (200 MHz)



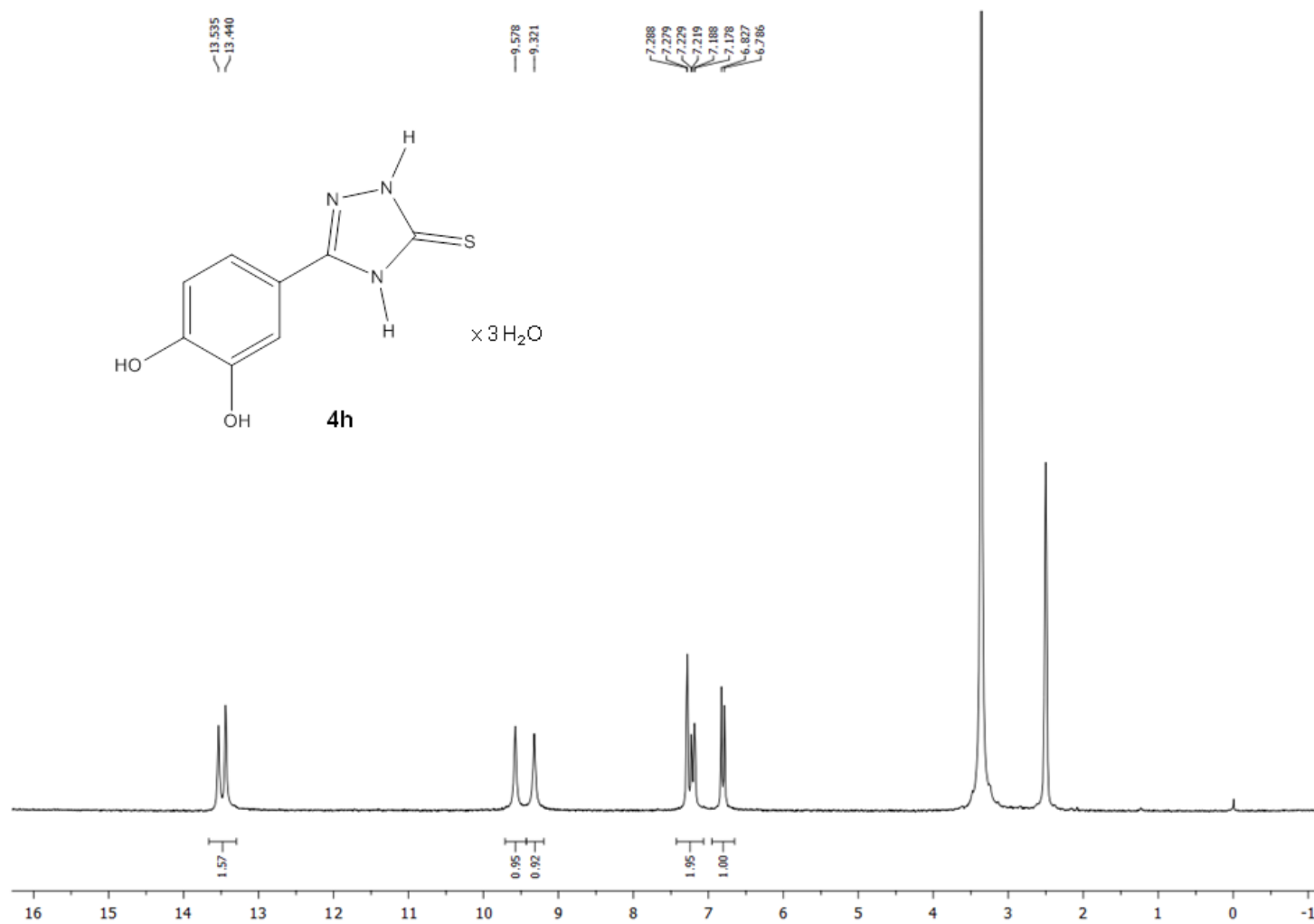
Слика П12. ^{13}C NMR спектар једињења **4f** у $\text{DMSO}-d_6$ (200 MHz)



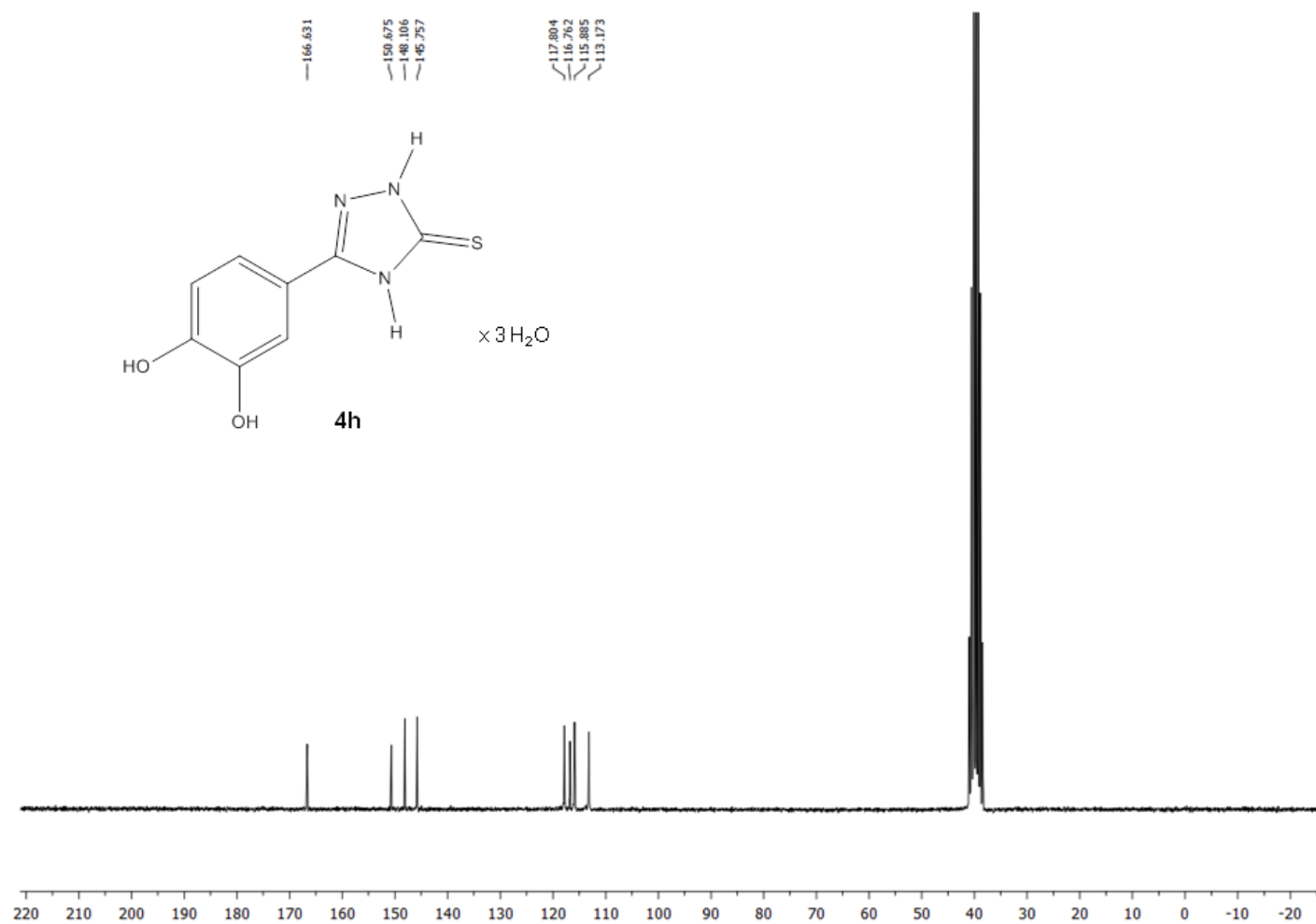
Слика П13. ^1H NMR спектар једињења **4g** у $\text{DMSO}-d_6$ (200 MHz)



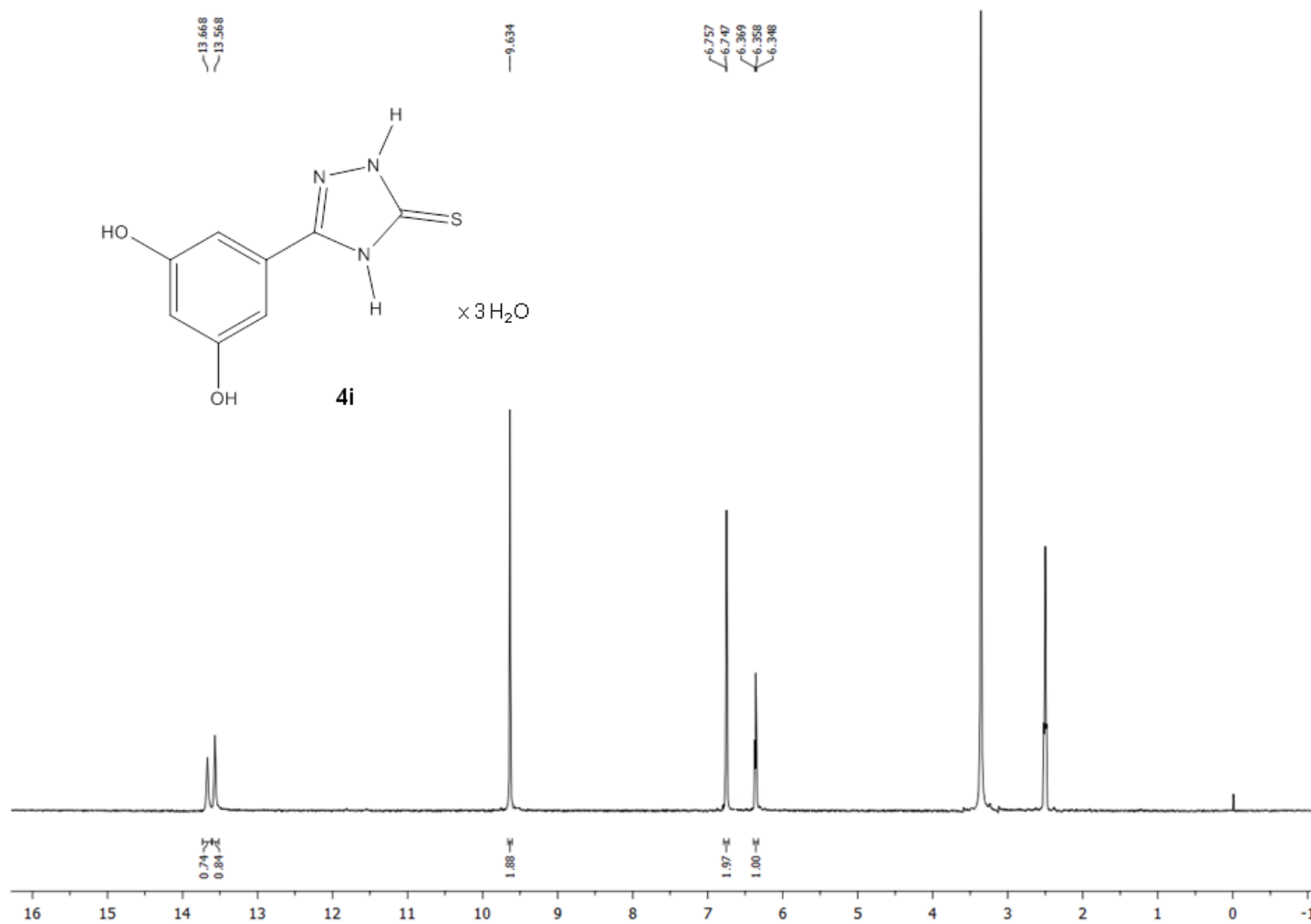
Слика П14. ^{13}C NMR спектар једињења **4g** у DMSO-d_6 (200 MHz)



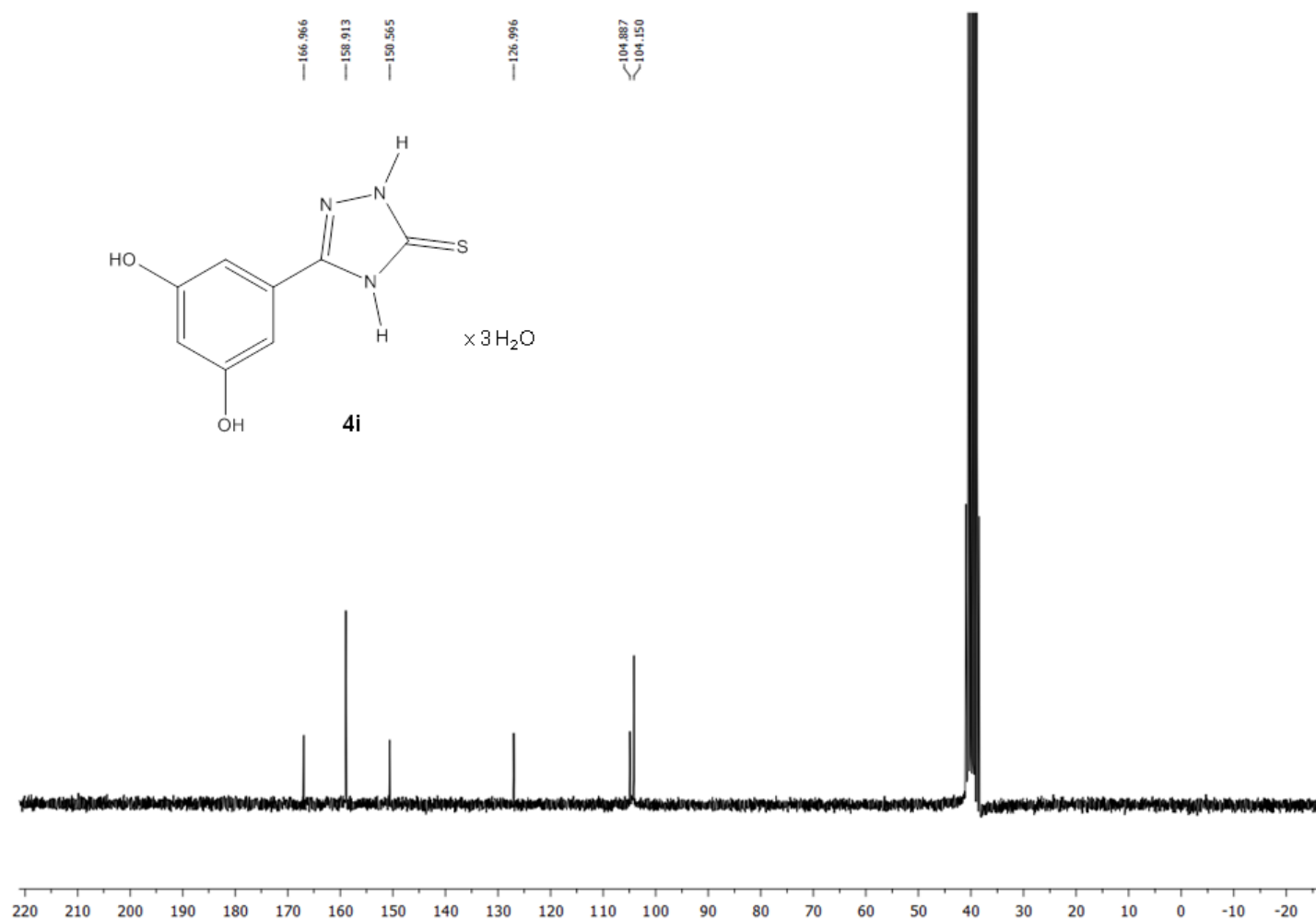
Слика П15. ^1H NMR спектар једињења **4h** у $\text{DMSO}-d_6$ (200 MHz)



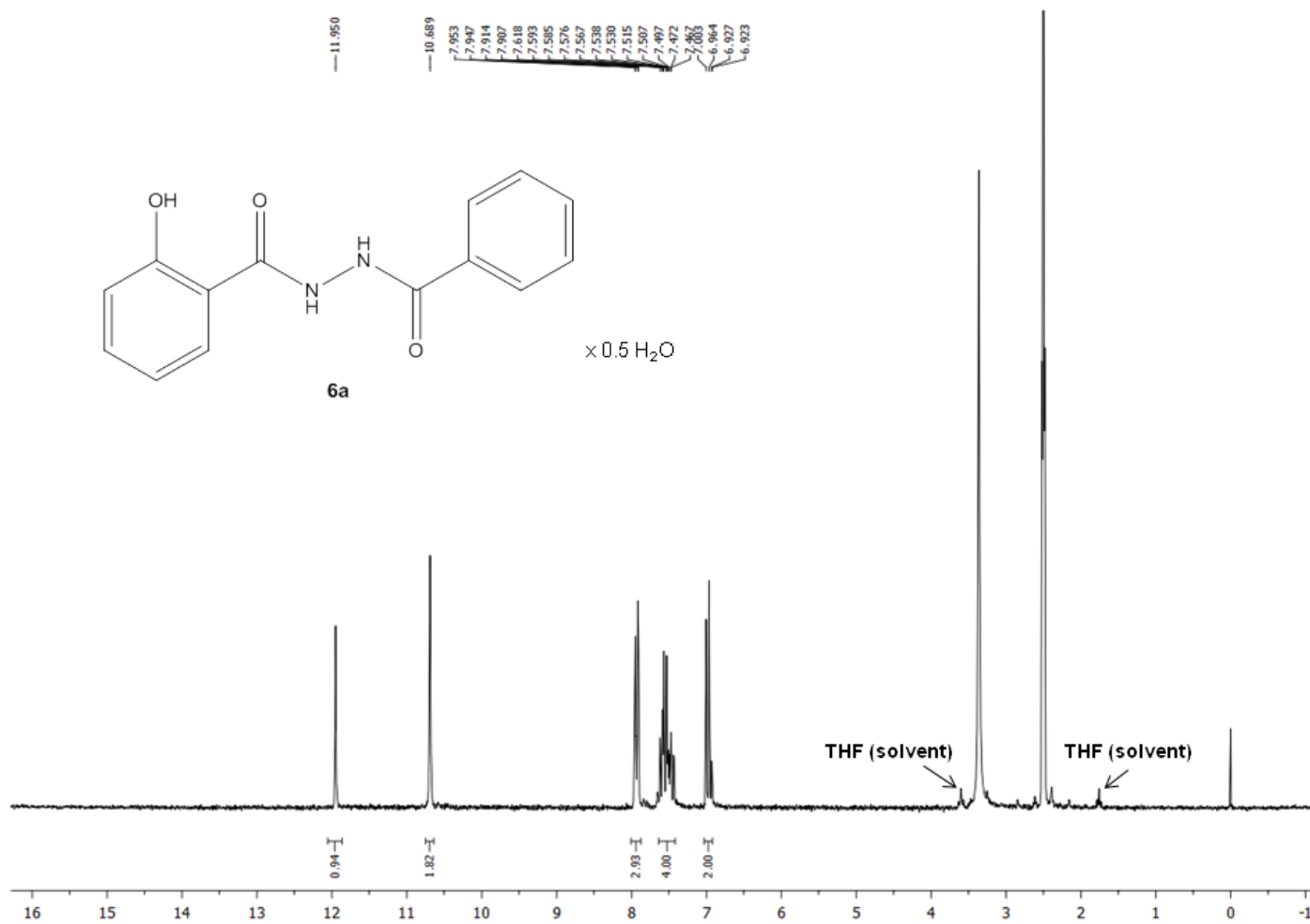
Слика П16. ^{13}C NMR спектар једињења **4h** у DMSO-d_6 (200 MHz)



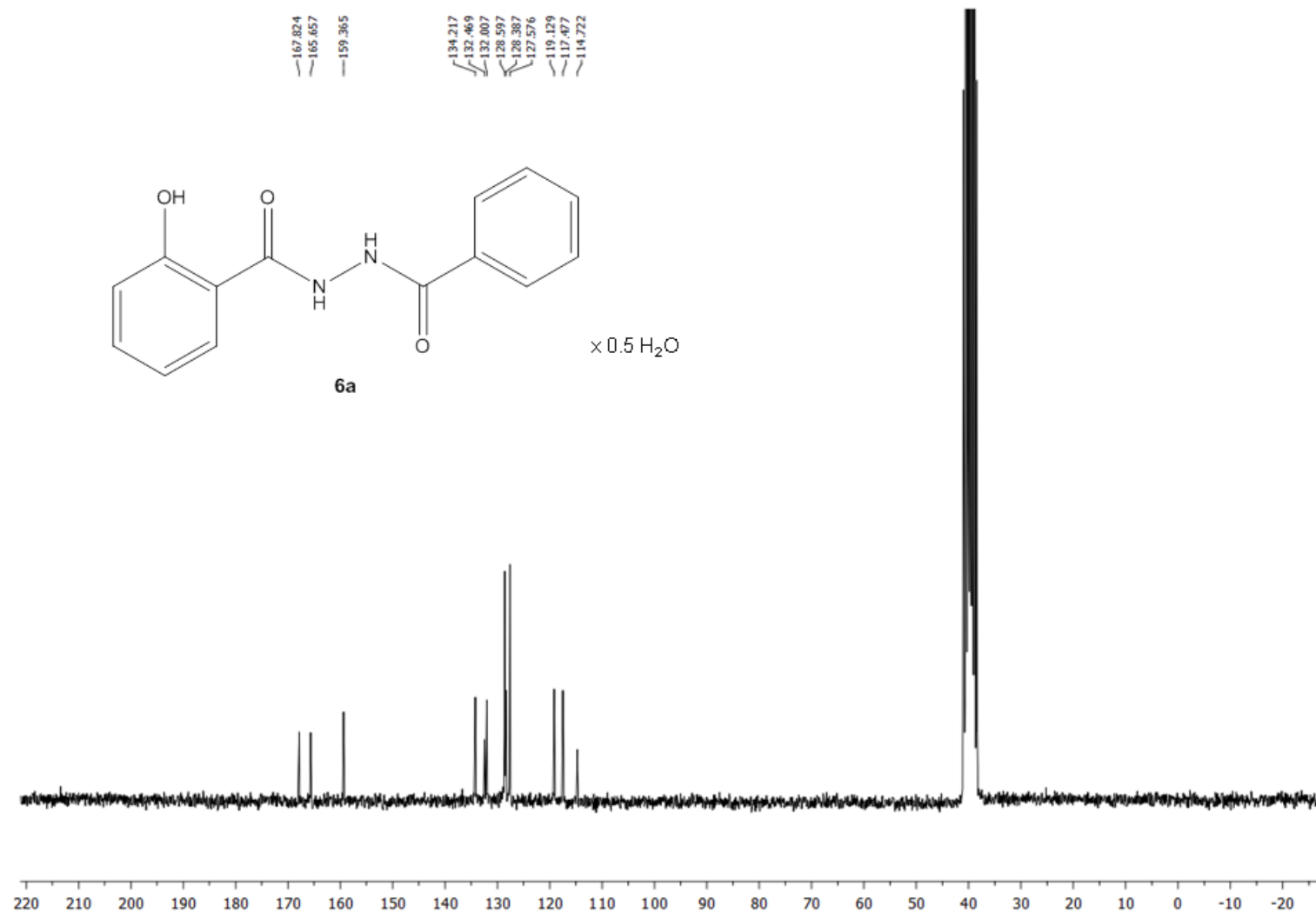
Слика П17. ^1H NMR спектар једињења **4i** у DMSO-d_6 (200 MHz)



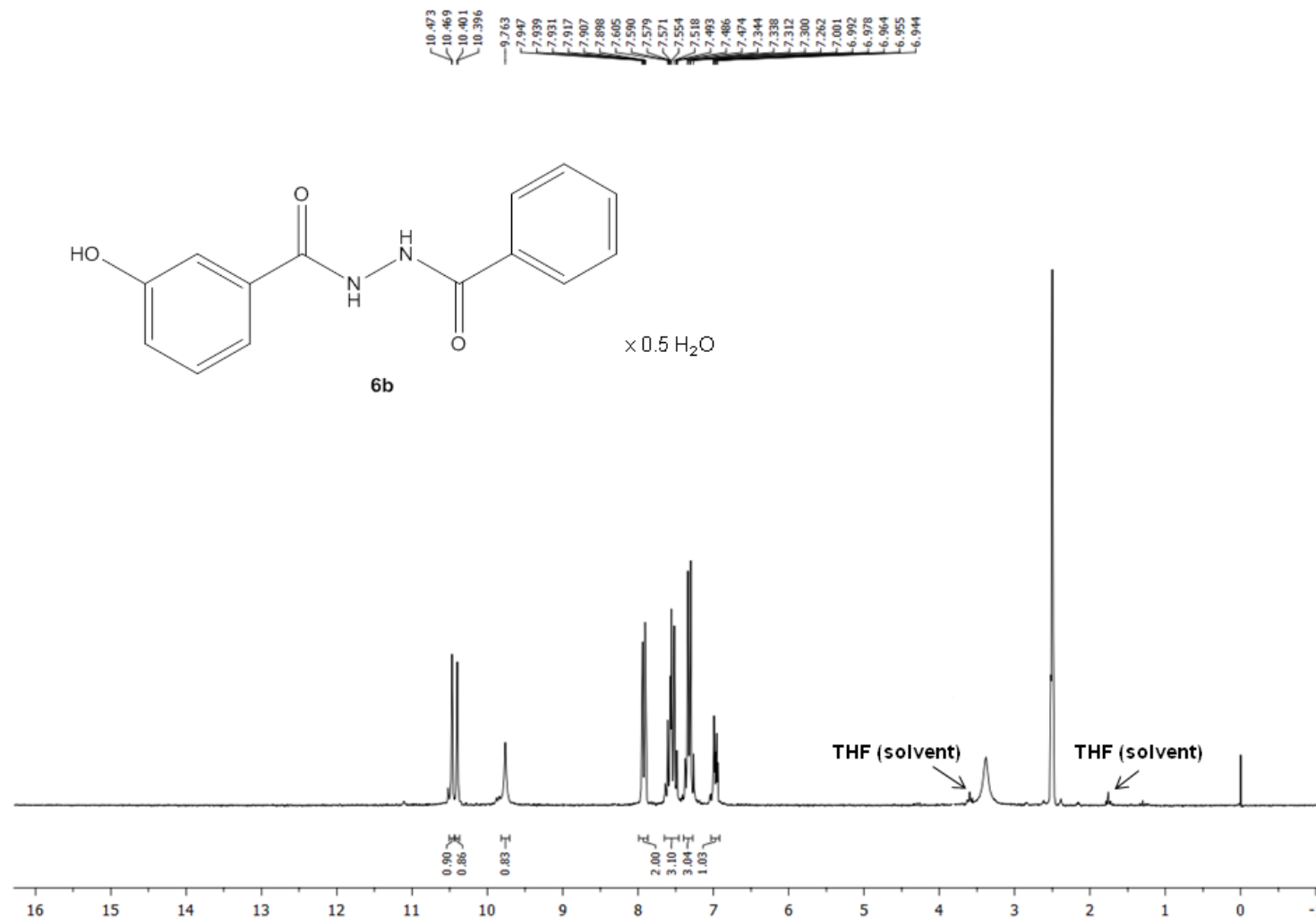
Слика П18. ^{13}C NMR спектар једињења **4i** у DMSO-d_6 (200 MHz)



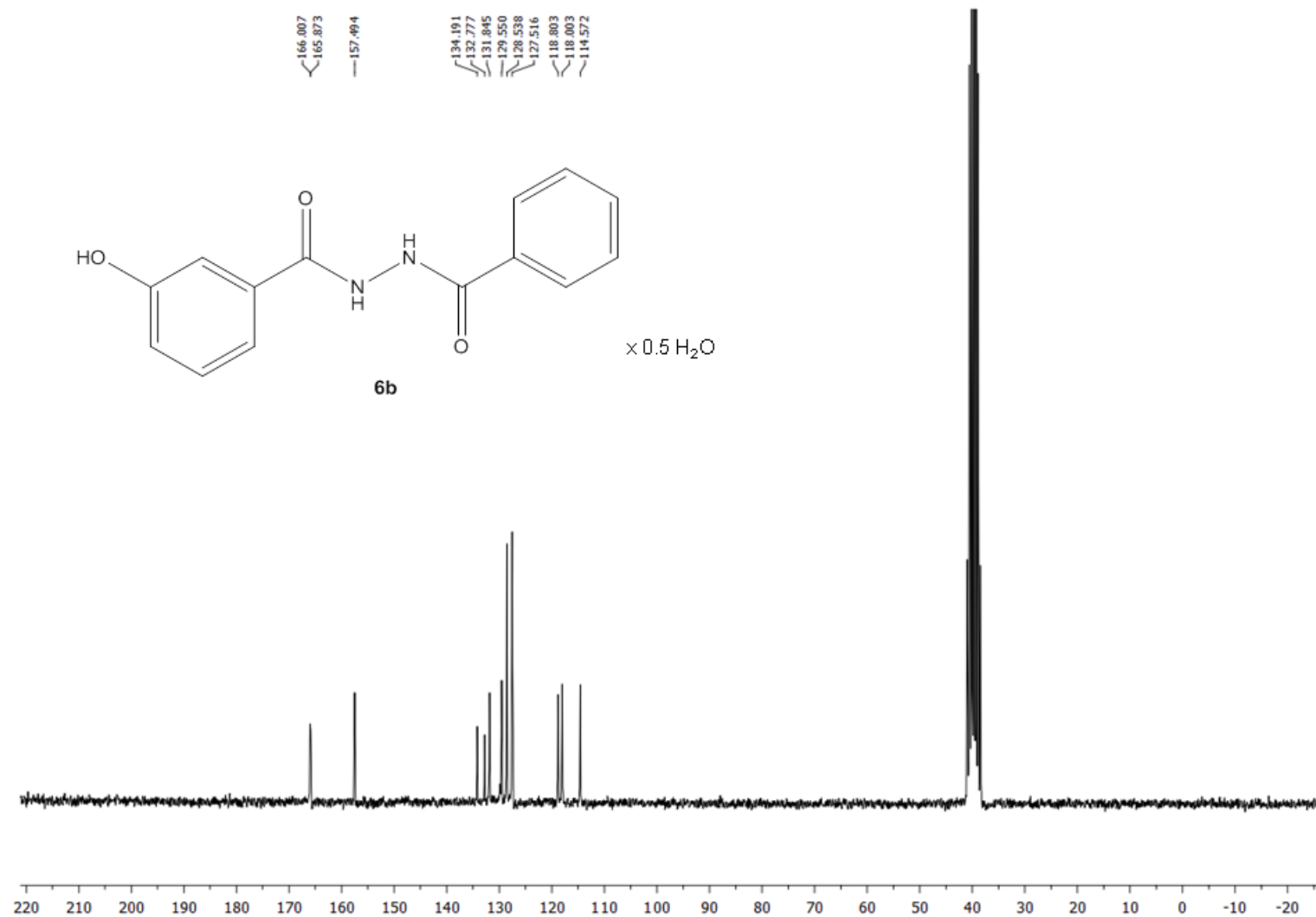
Слика П19. ^1H NMR спектар једињења **6a** у DMSO-d_6 (200 MHz)



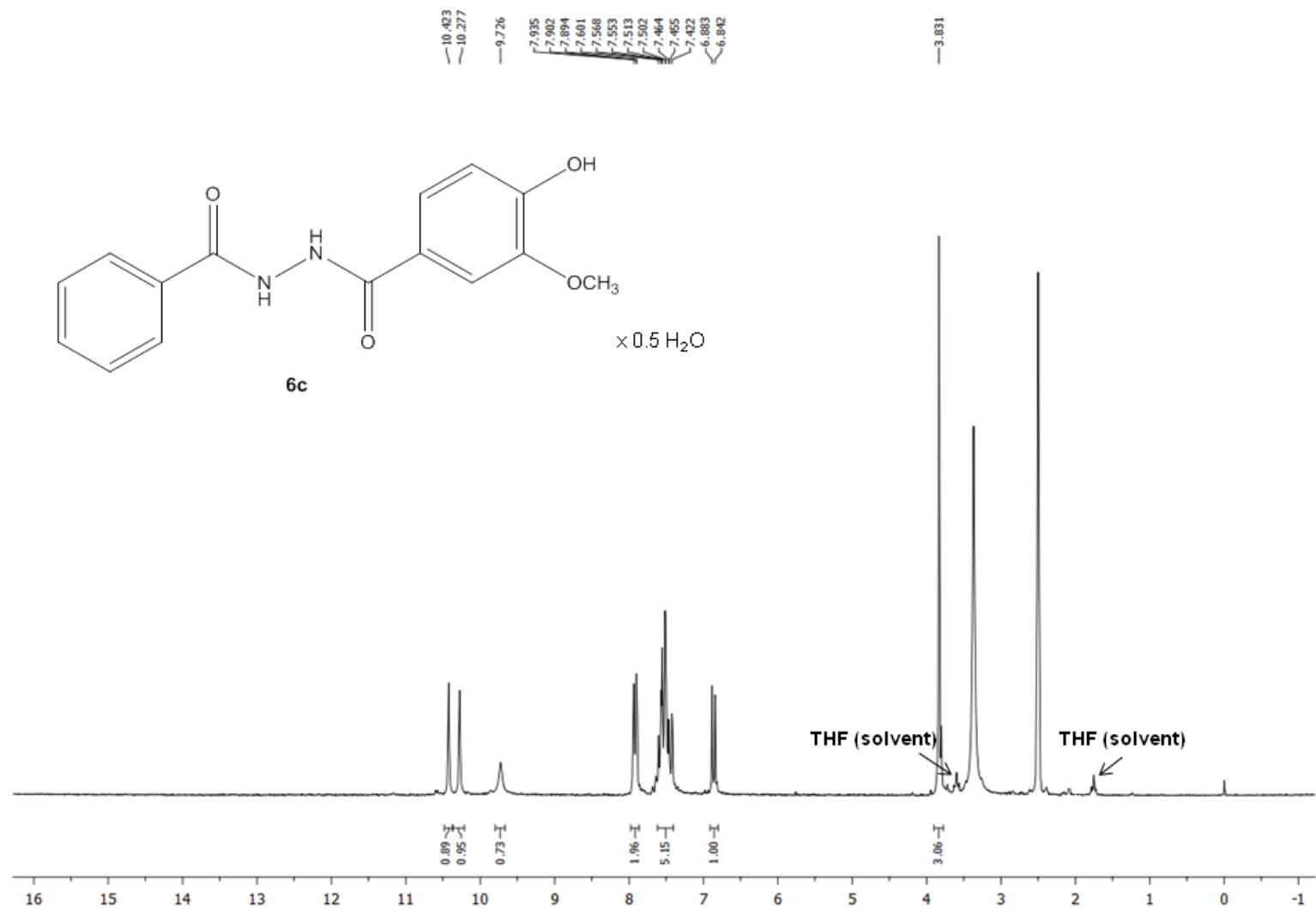
Слика П20. ^{13}C NMR спектар једињења **6a** у DMSO-d_6 (200 MHz)



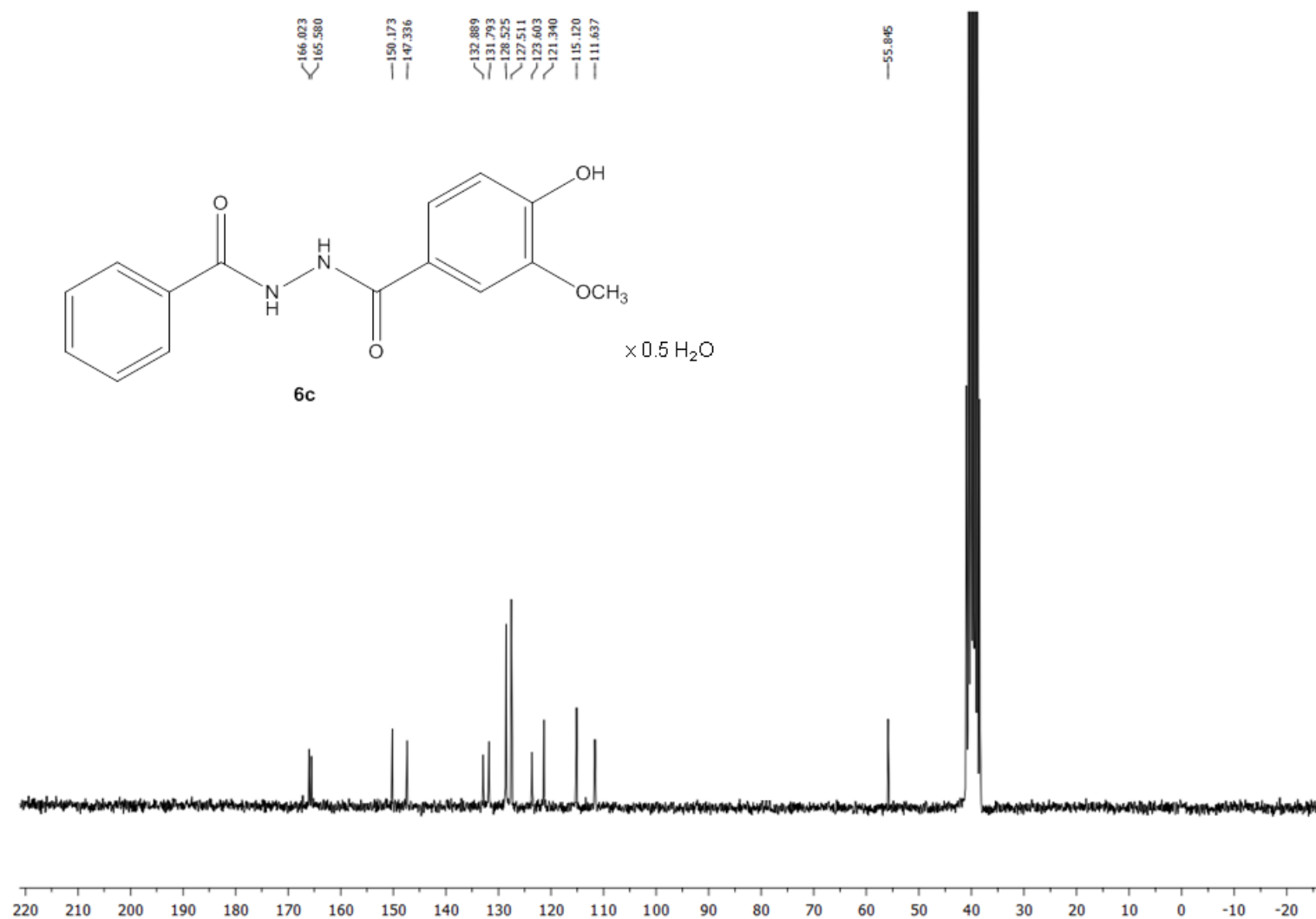
Слика П21. ^1H NMR спектар једињења **6b** у DMSO-d_6 (200 MHz)



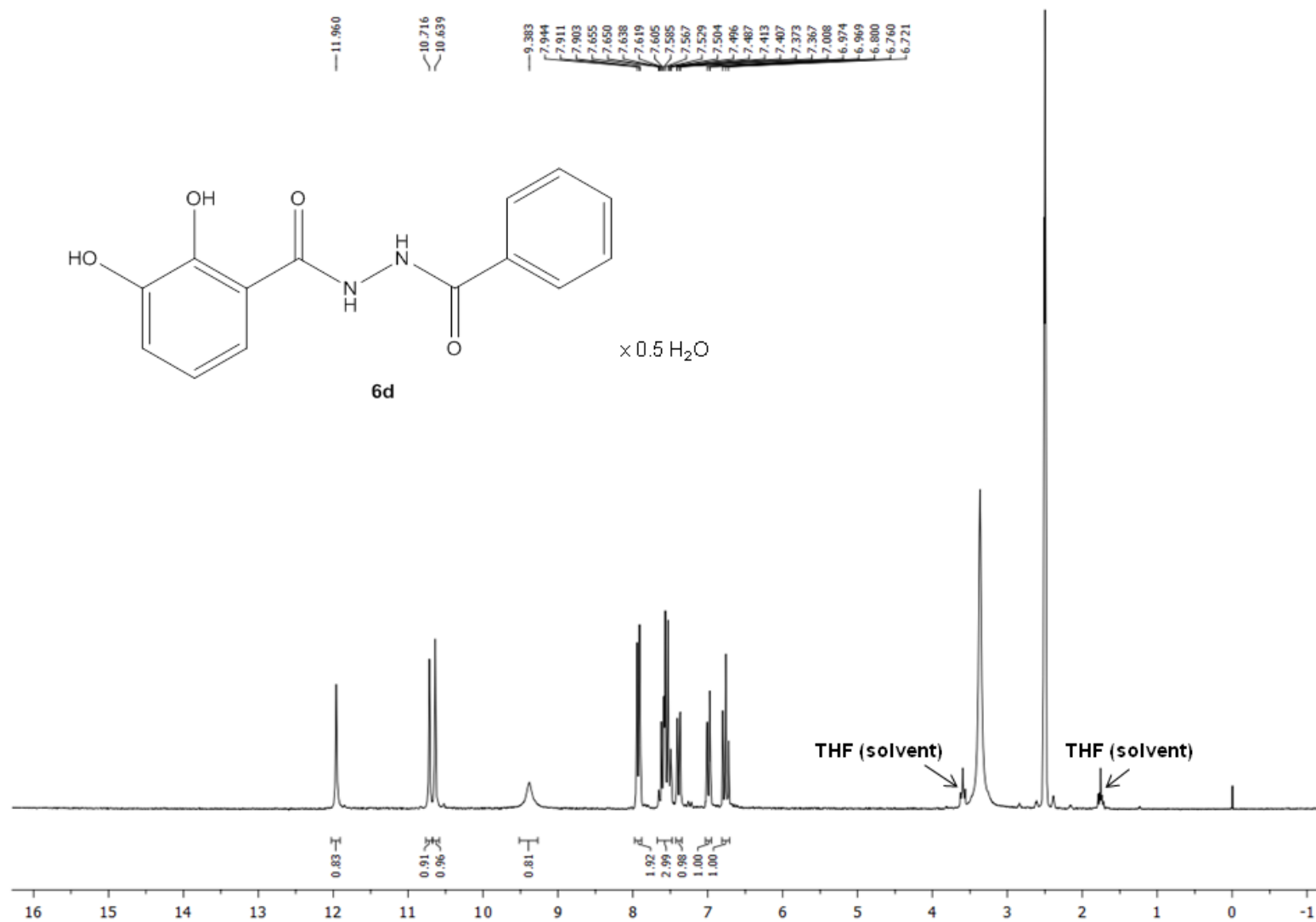
Слика П22. ^{13}C NMR спектар једињења **6b** у DMSO-d_6 (200 MHz)



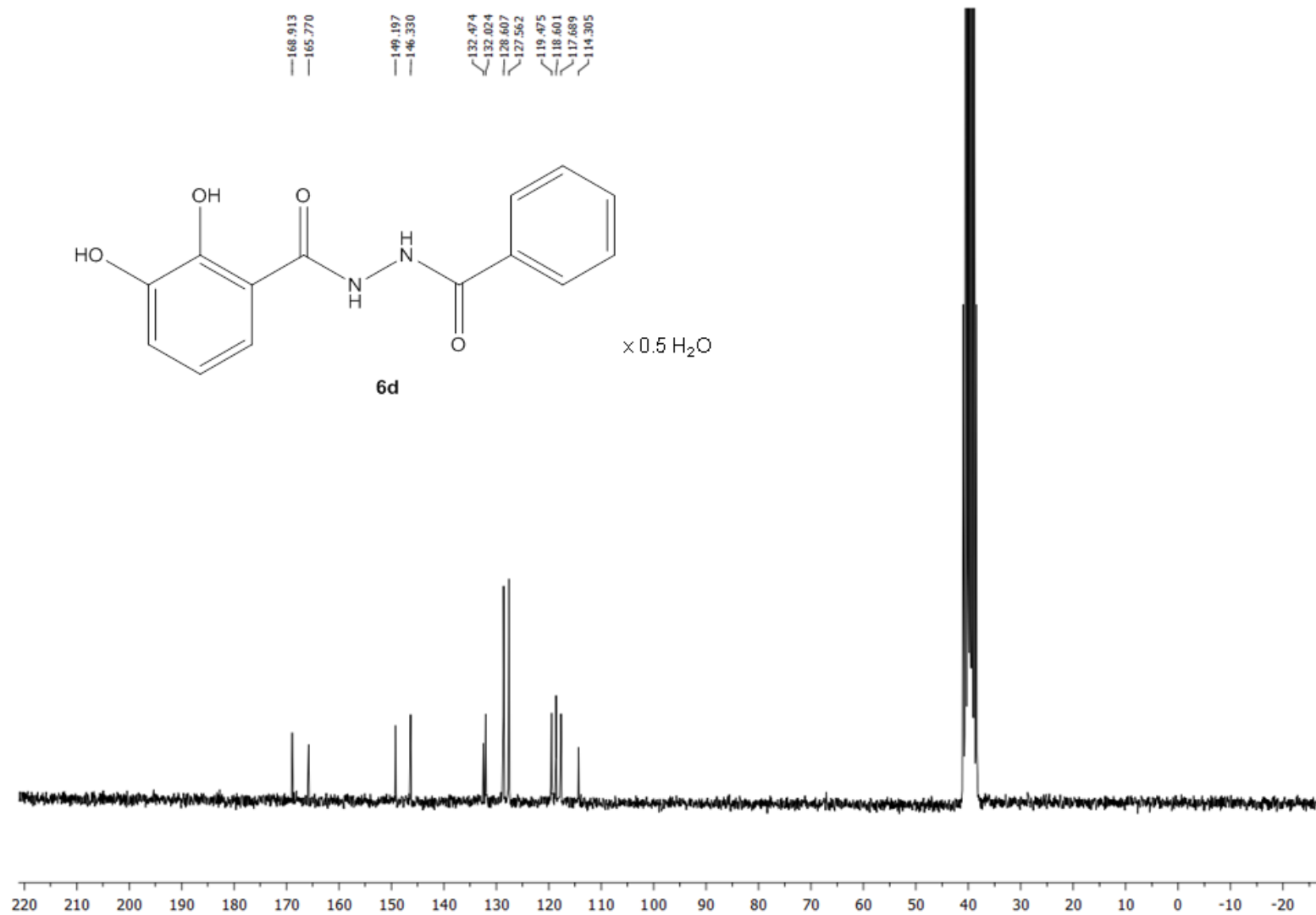
Слика П23. ^1H NMR спектар једињења **6c** у DMSO-d_6 (200 MHz)



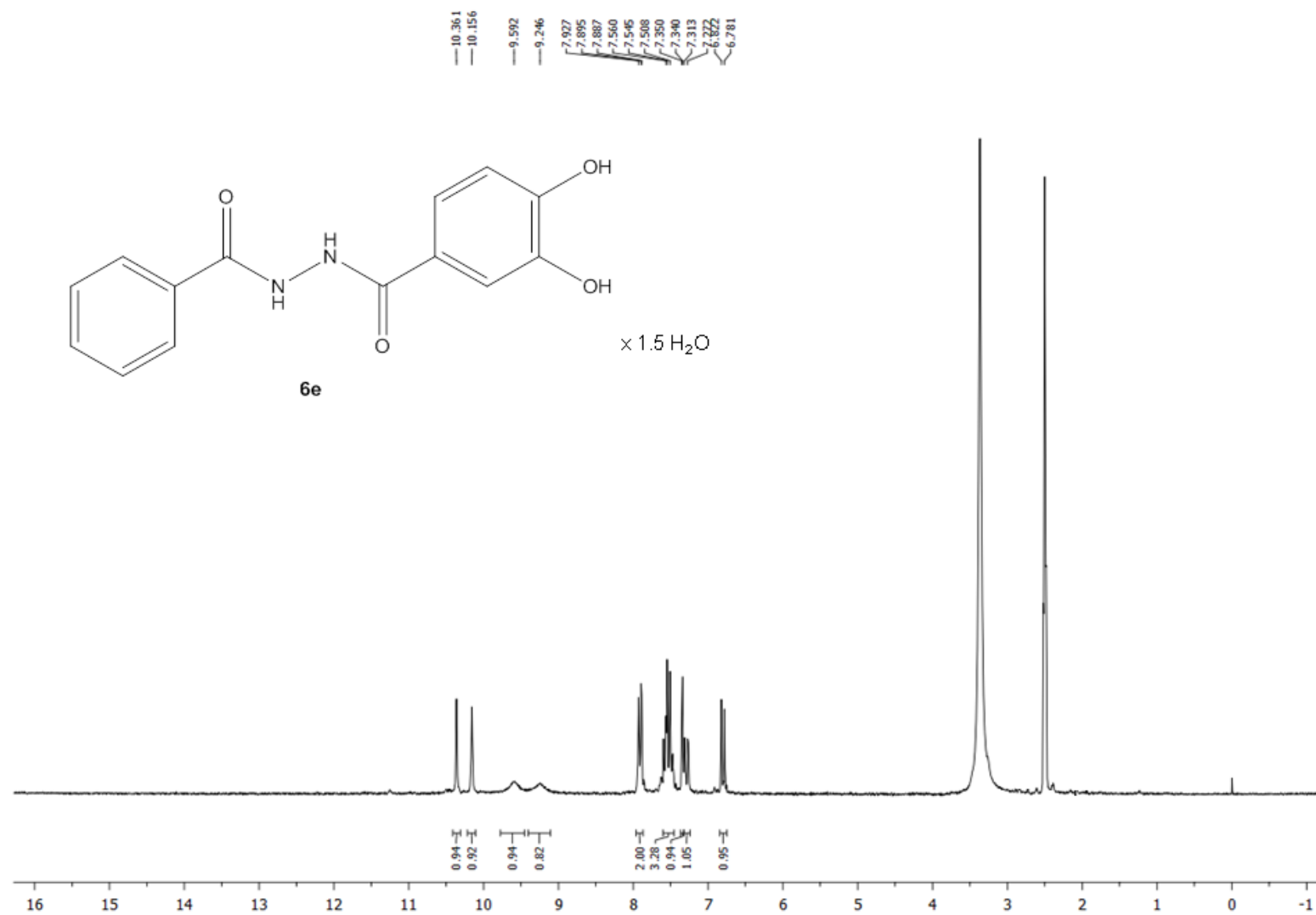
Слика П24. ^{13}C NMR спектар једињења **6c** у $\text{DMSO}-d_6$ (200 MHz)



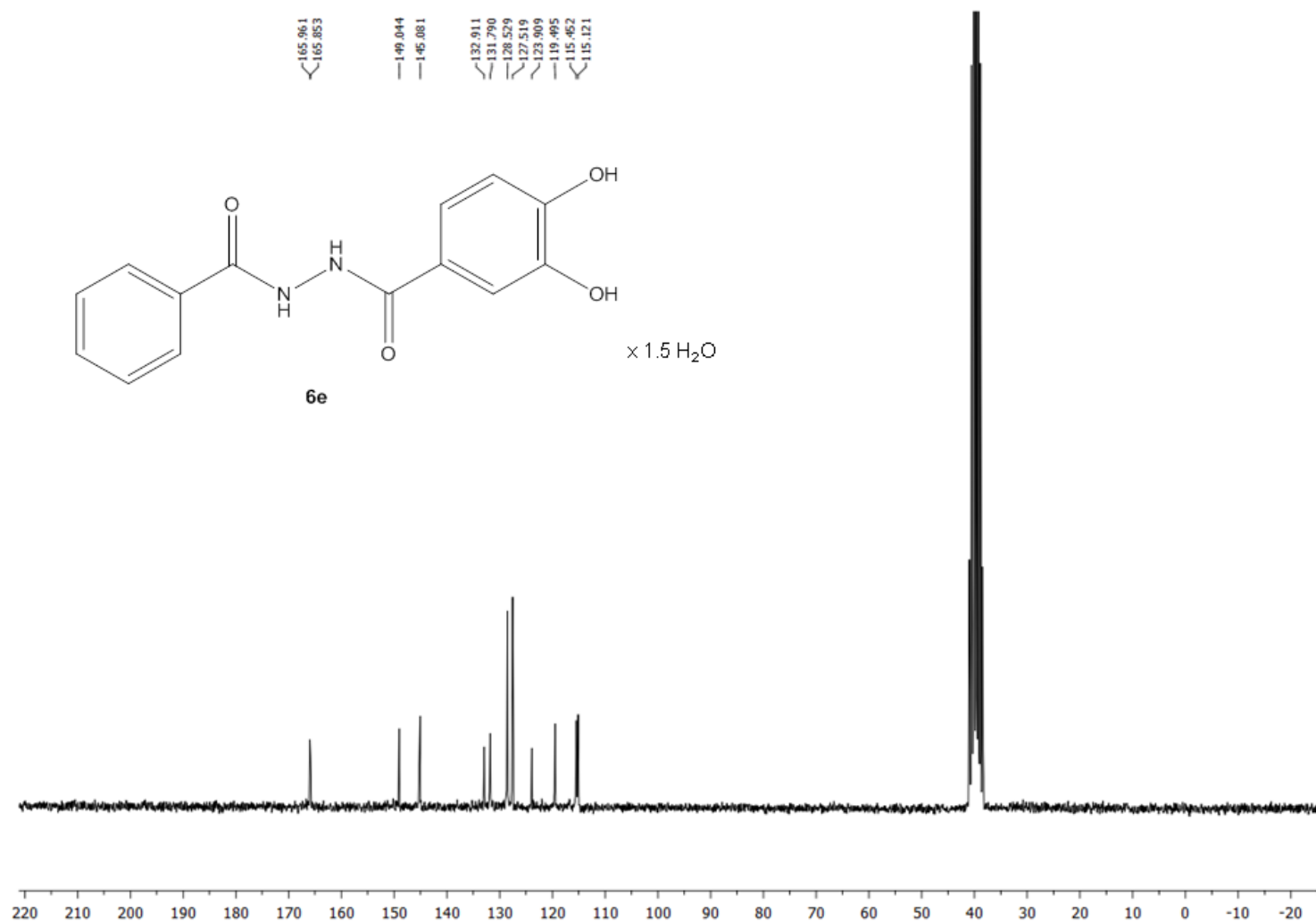
Слика П25. ¹H NMR спектар једињења **6d** у DMSO-d₆ (200 MHz)



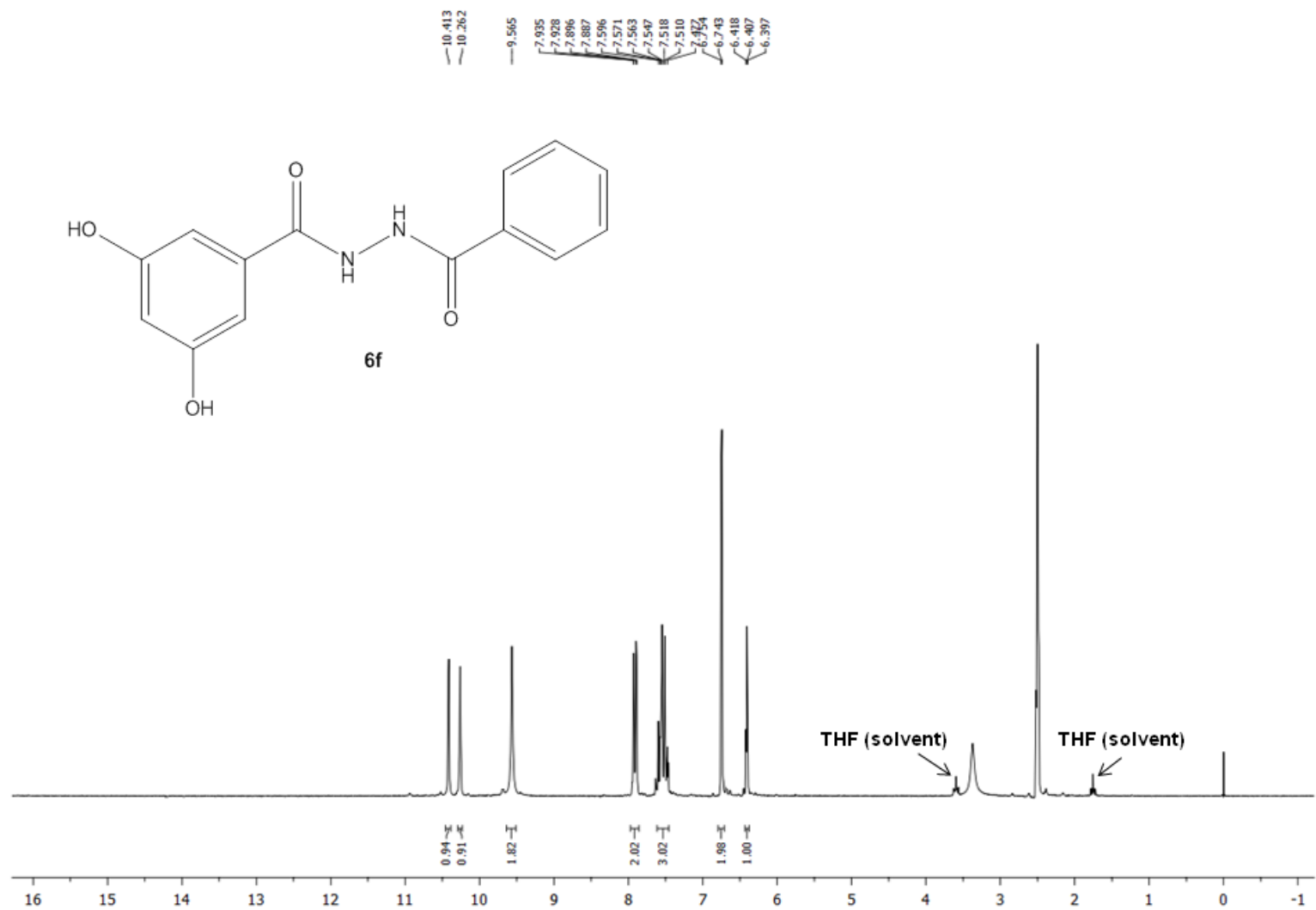
Слика П26. ^{13}C NMR спектар једињења **6d** у DMSO-d_6 (200 MHz)



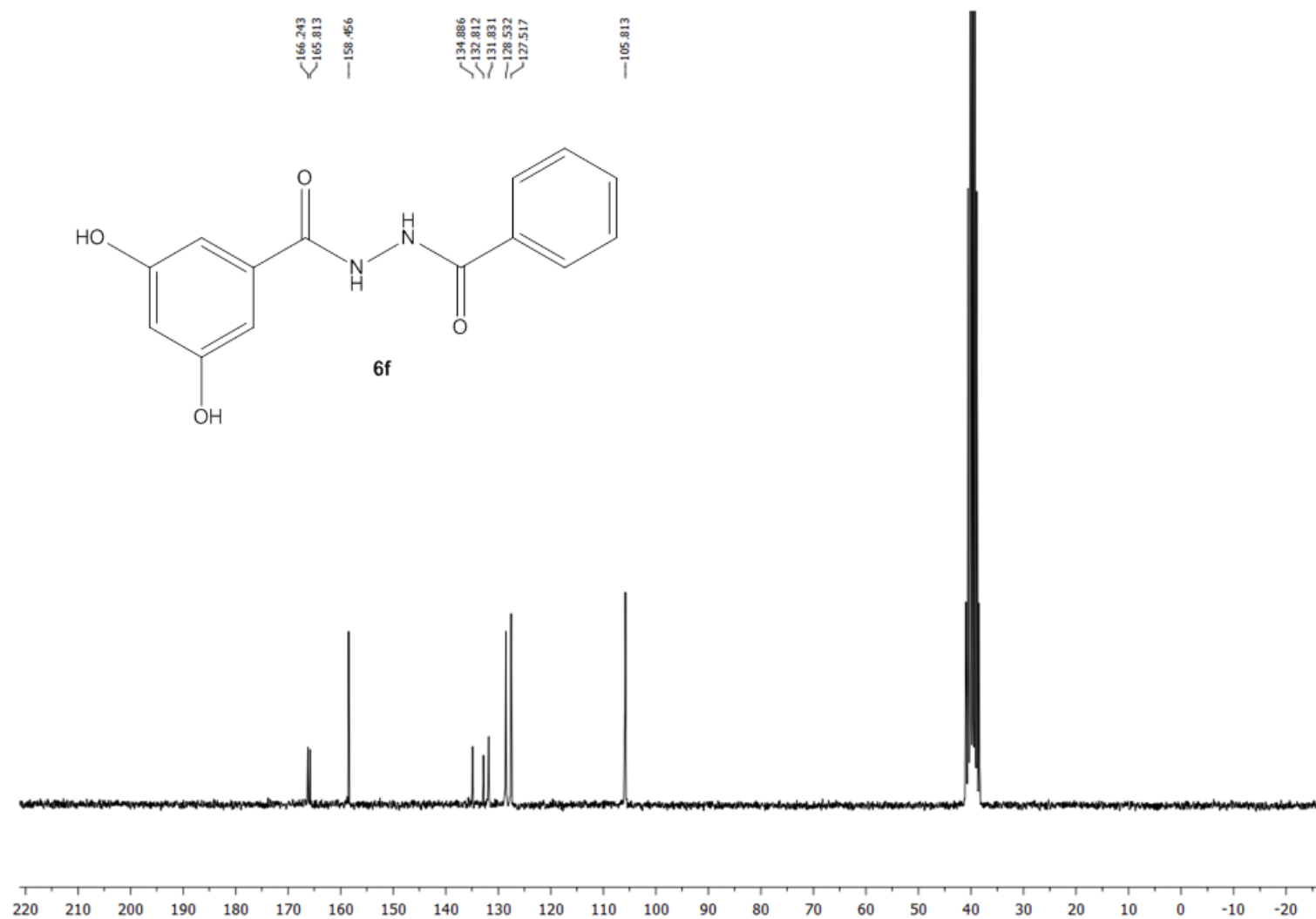
Слика П27. ¹H NMR спектар једињења **6e** у DMSO-d₆ (200 MHz)



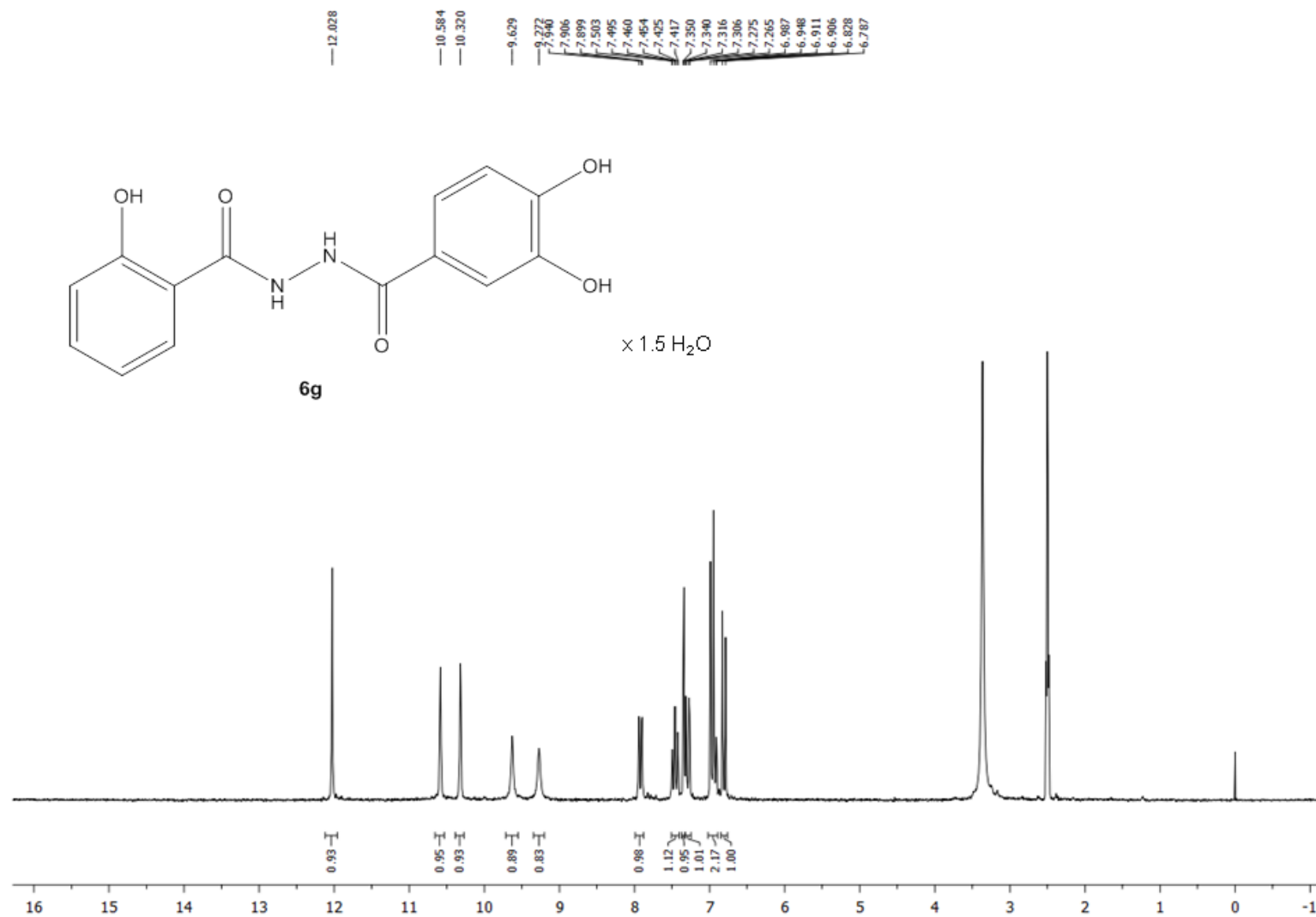
Слика П28. ^{13}C NMR спектар једињења **6e** у DMSO-d_6 (200 MHz)



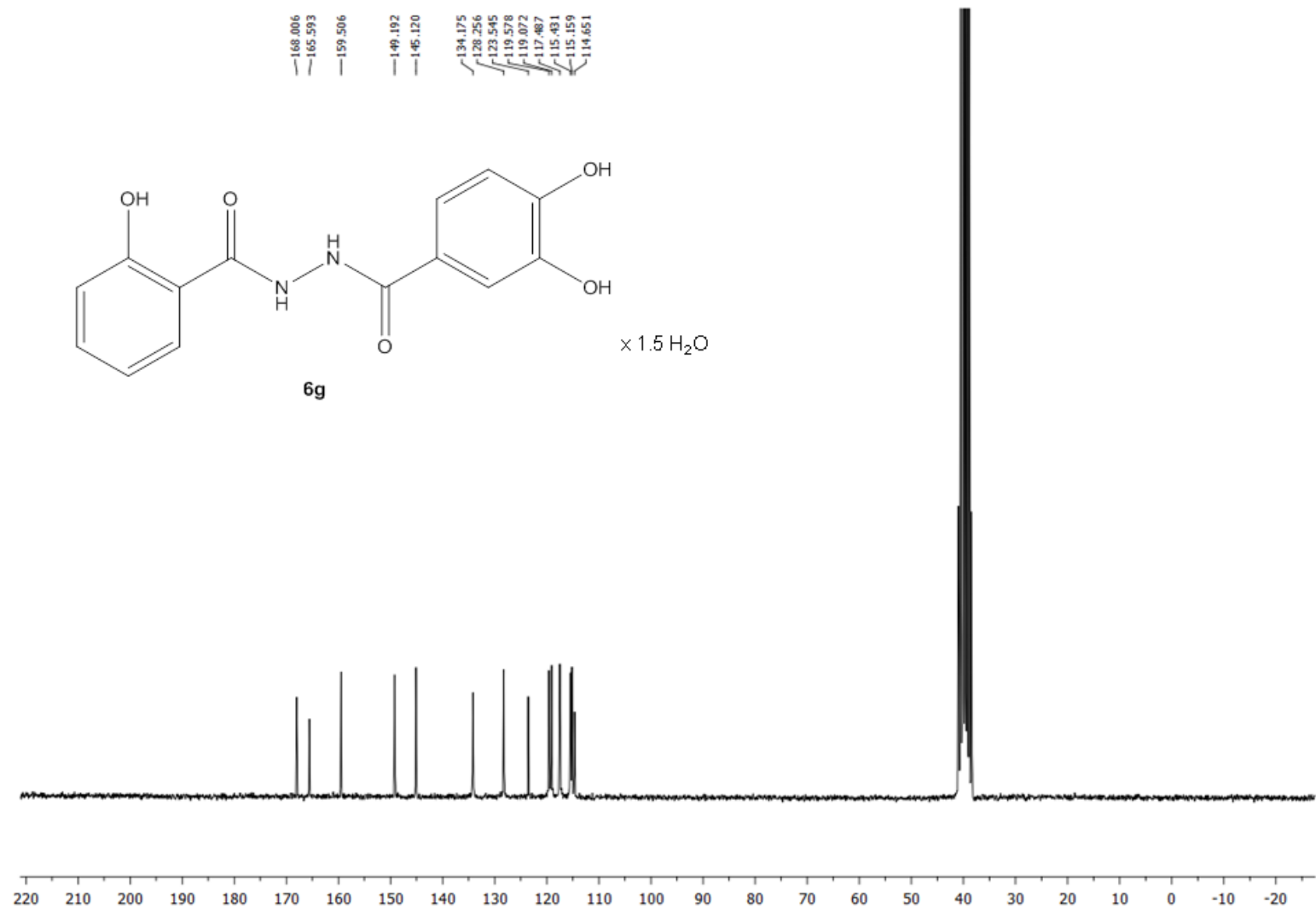
Слика П29. ^1H NMR спектар једињења **6f** у DMSO-d_6 (200 MHz)



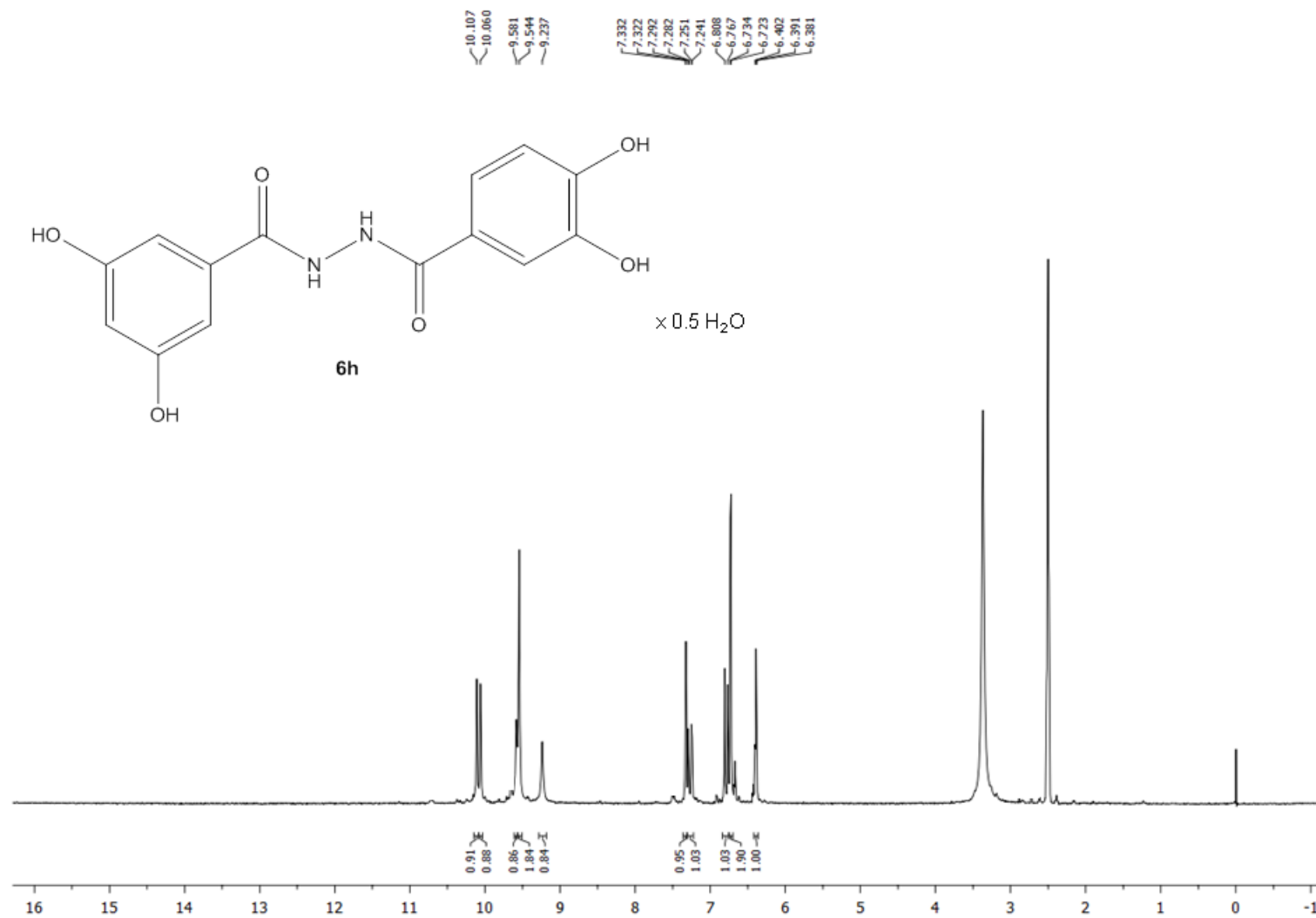
Слика П30. ^{13}C NMR спектар једињења **6f** у $\text{DMSO}-d_6$ (200 MHz)



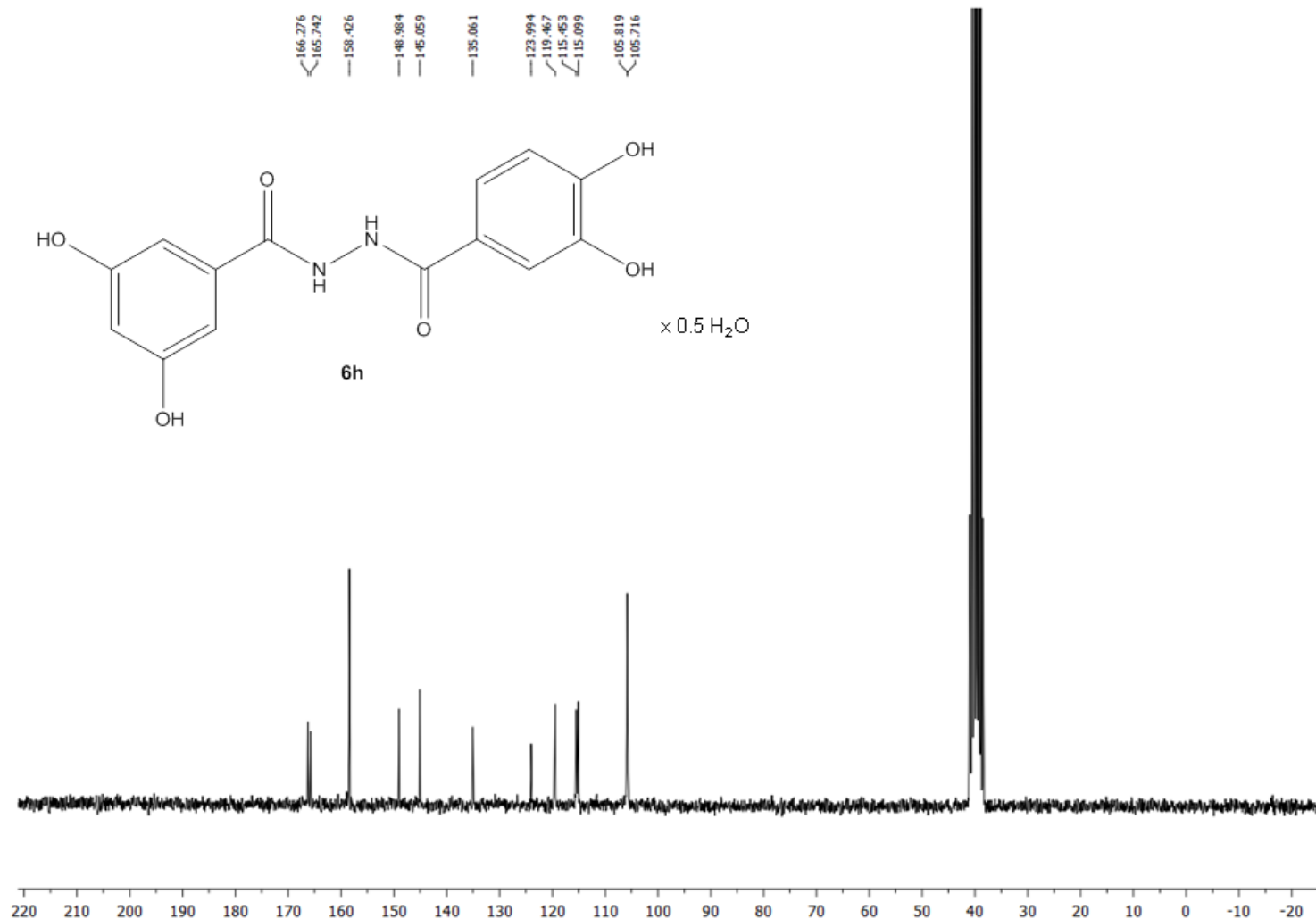
Слика ПЗ1. ^1H NMR спектар једињења **6g** у DMSO-d_6 (200 MHz)



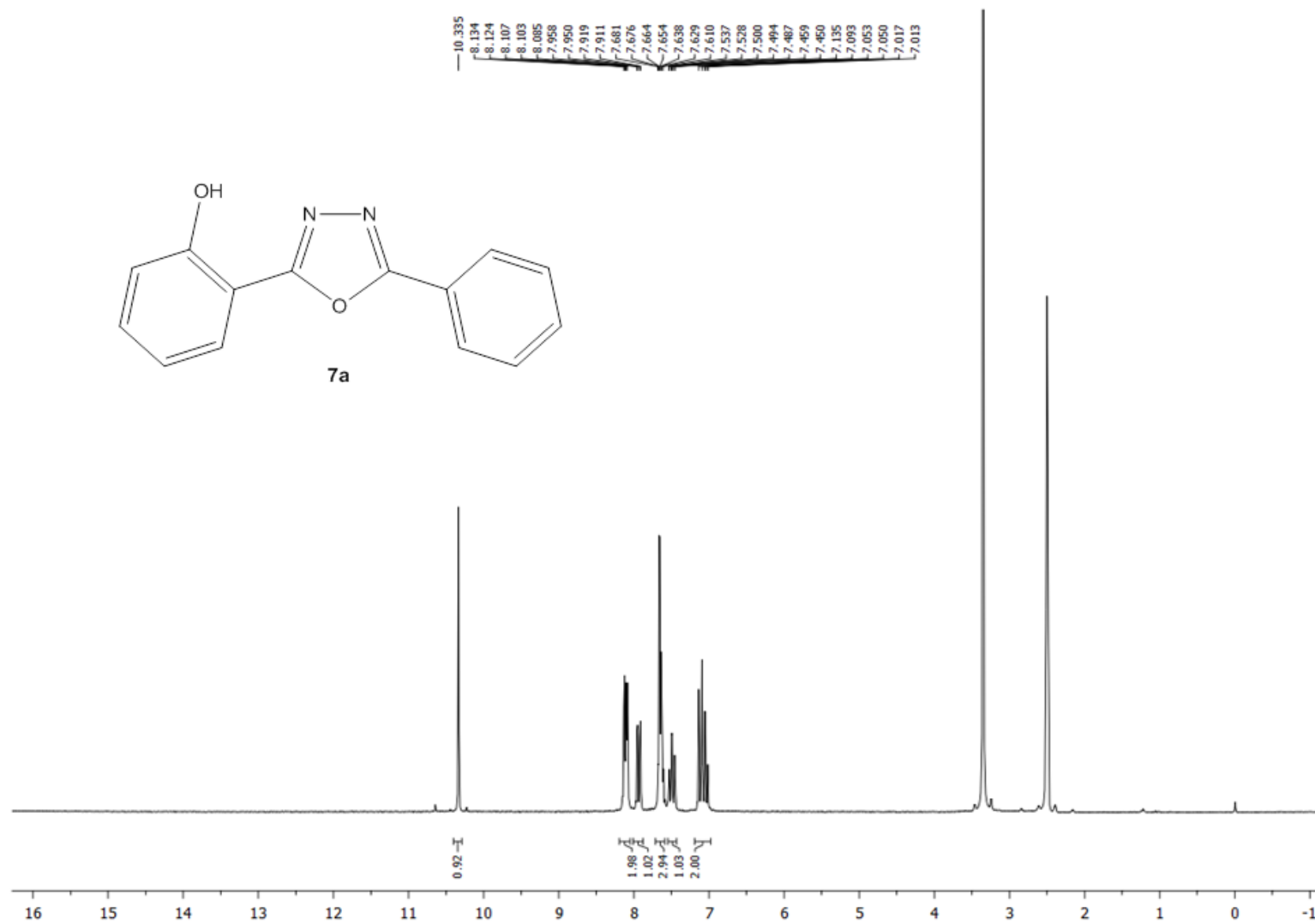
Слика ПЗ2. ^{13}C NMR спектар једињења **6g** у DMSO-d_6 (200 MHz)



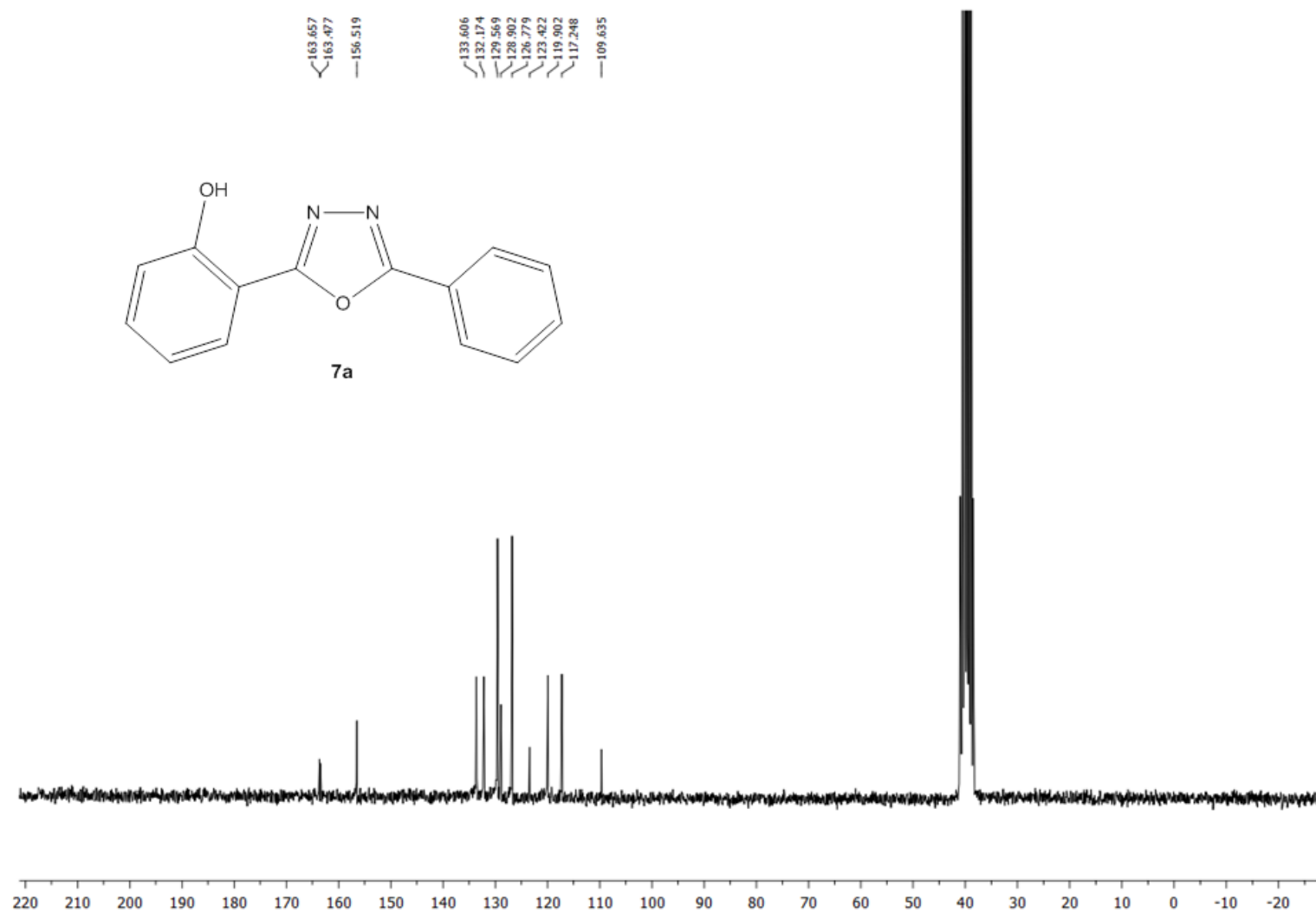
Слика ПЗЗ. ^1H NMR спектар једињења **6h** у DMSO-d_6 (200 MHz)



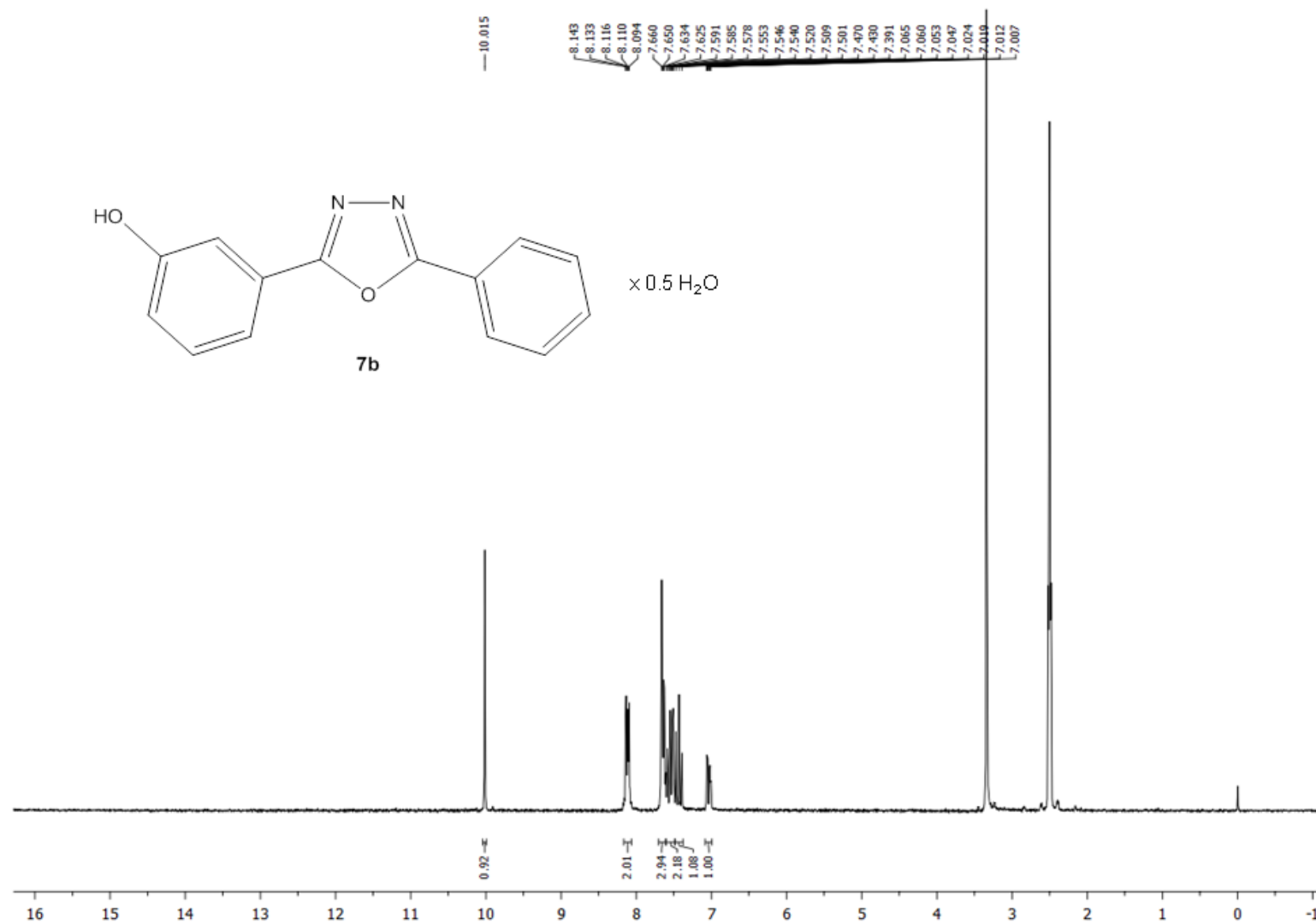
Слика ПЗ4. ^{13}C NMR спектар једињења **6h** у $\text{DMSO}-d_6$ (200 MHz)



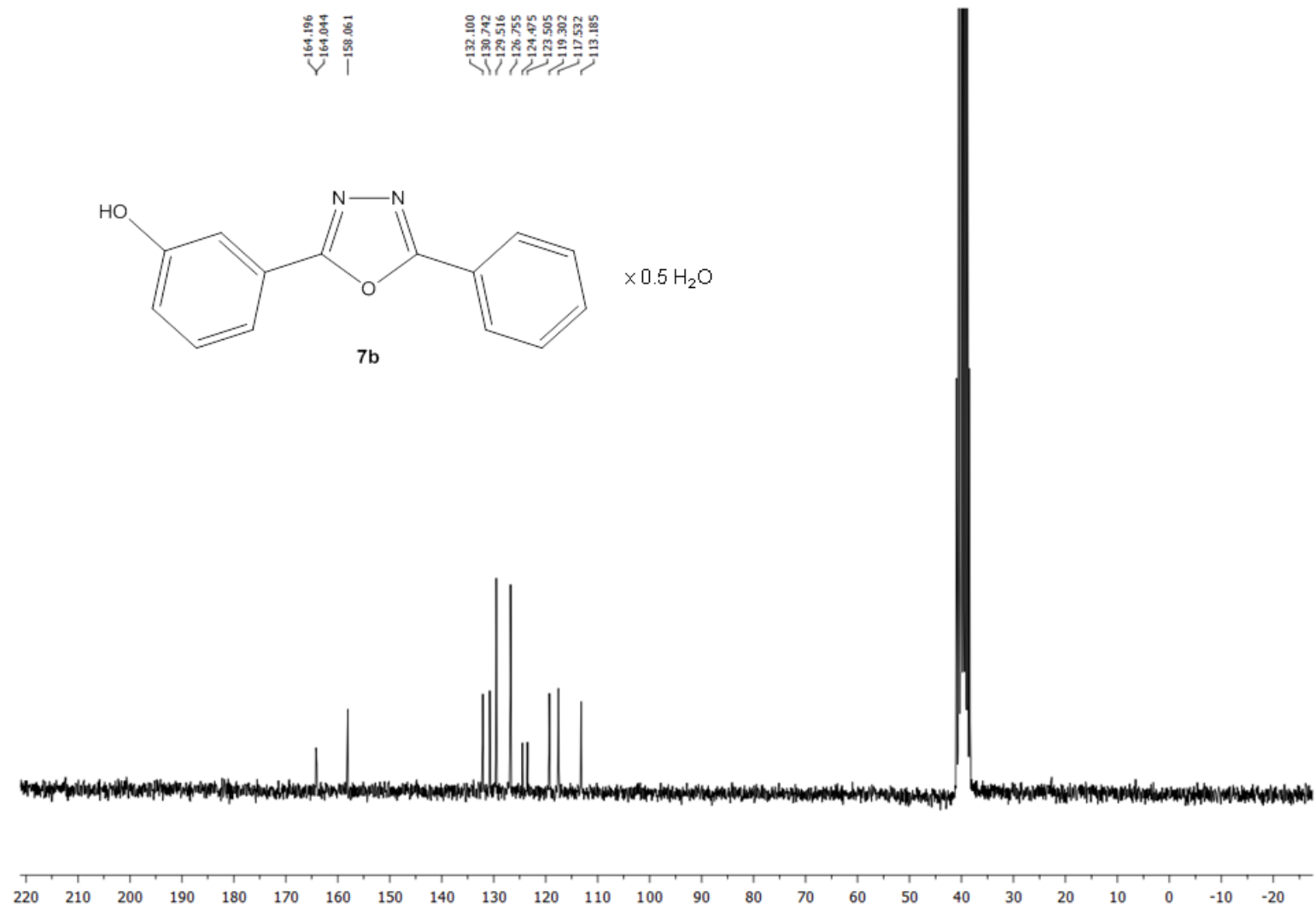
Слика ПЗ5. ¹H NMR спектар једињења **7a** у DMSO-d₆ (200 MHz)



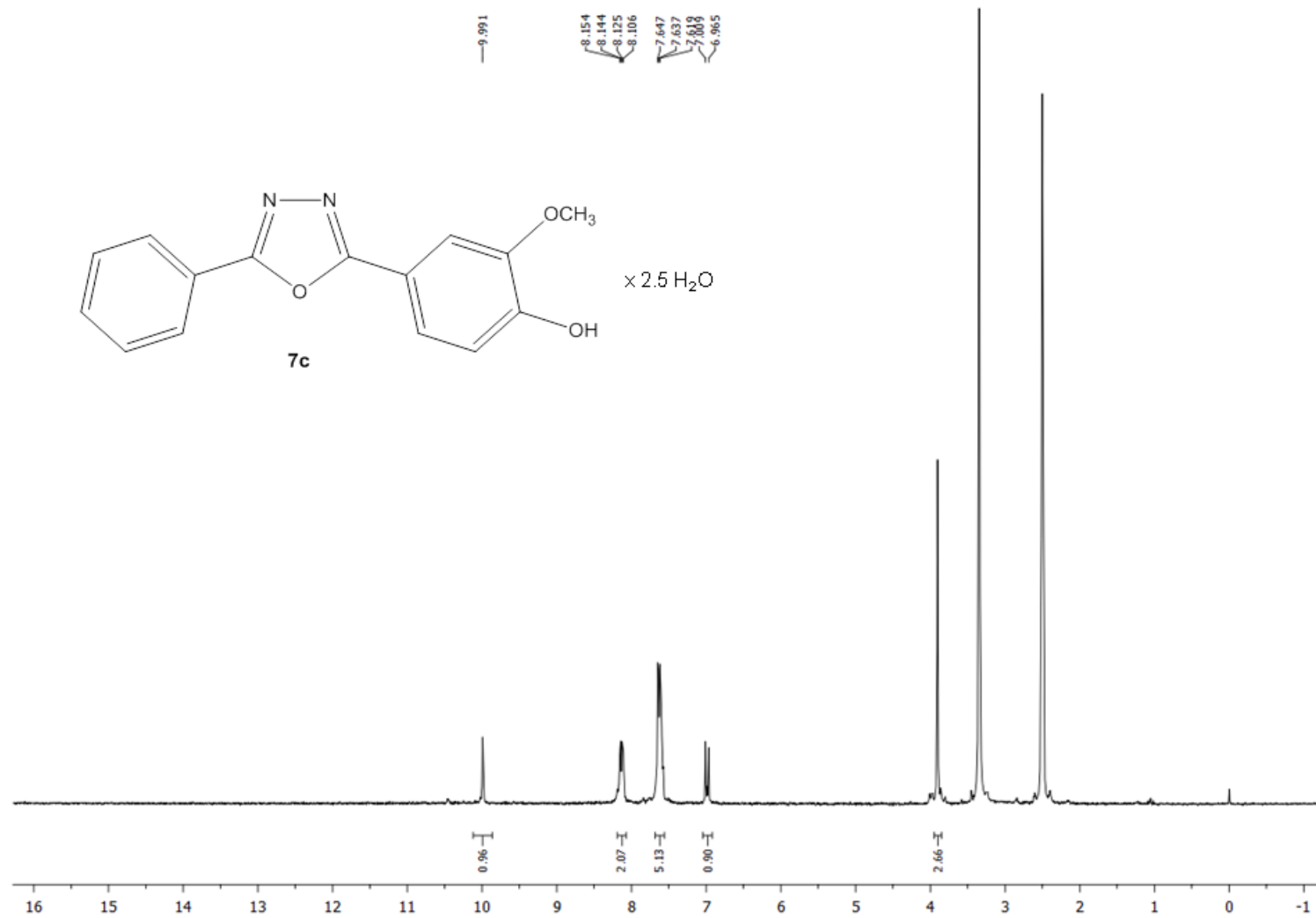
Слика ПЗ6. ^{13}C NMR спектар једињења **7a** у DMSO-d_6 (200 MHz)



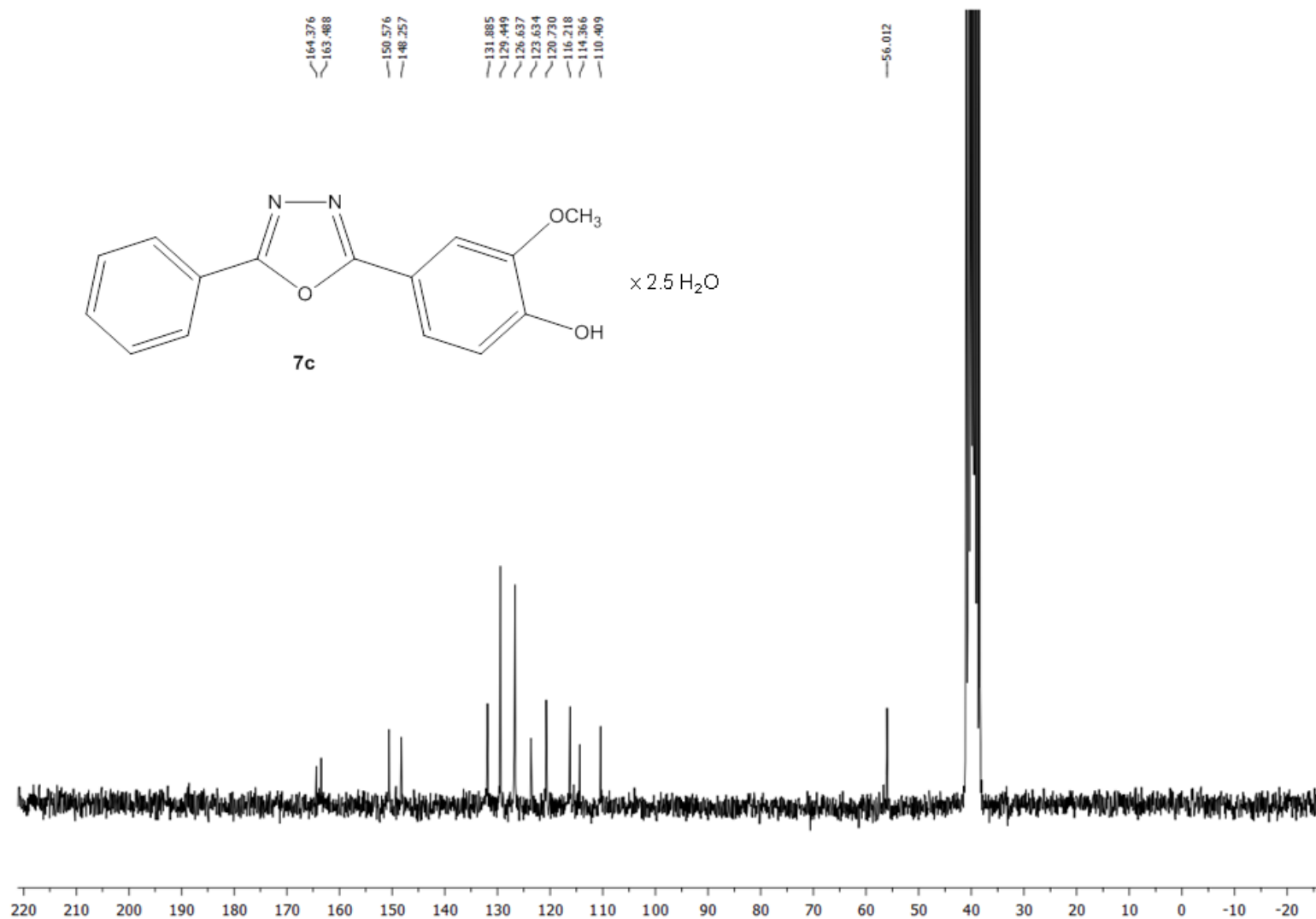
Слика ПЗ7. ^1H NMR спектар једињења **7b** у DMSO-d_6 (200 MHz)



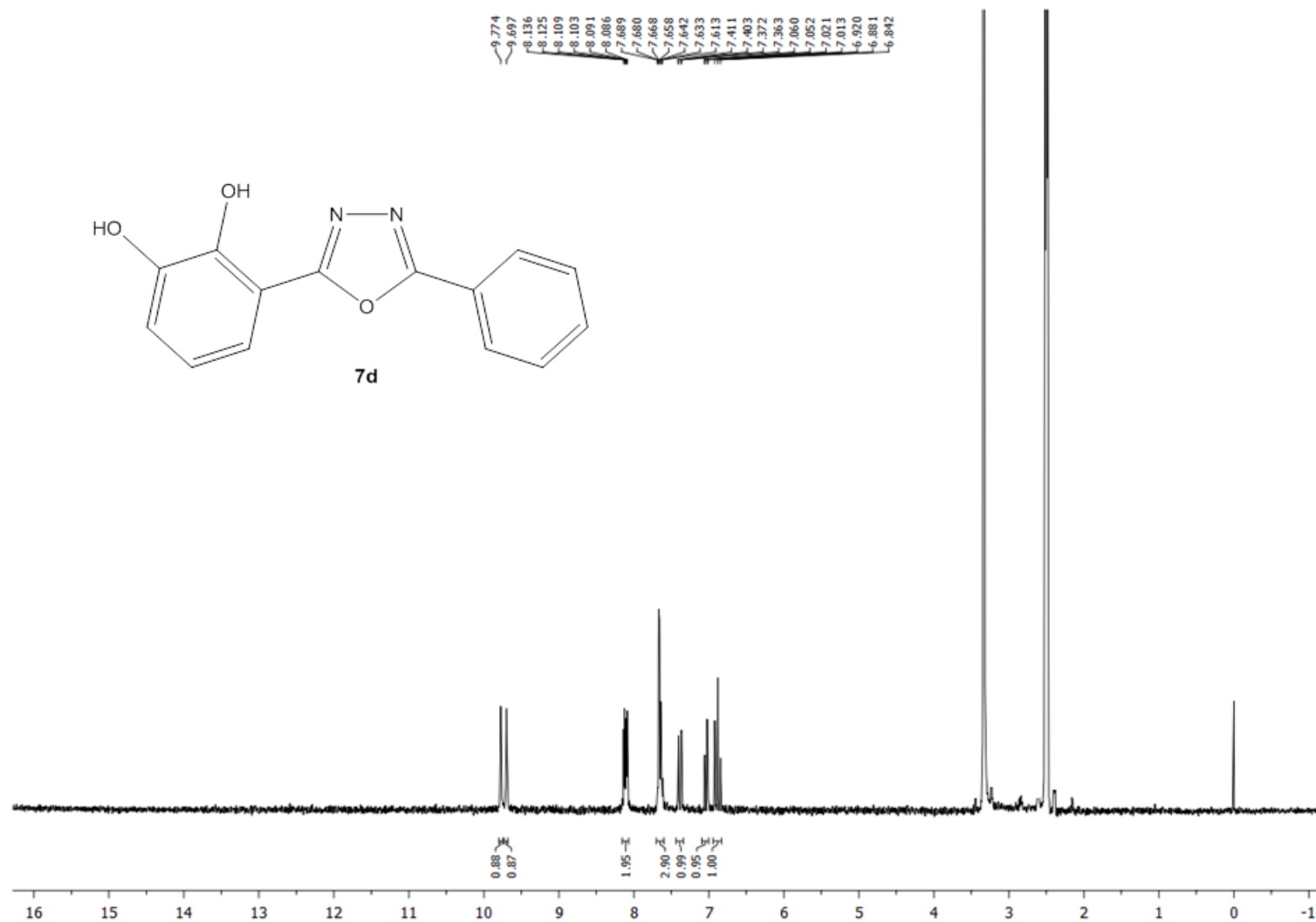
Слика ПЗ8. ^{13}C NMR спектар једињења **7b** у $\text{DMSO}-d_6$ (200 MHz)



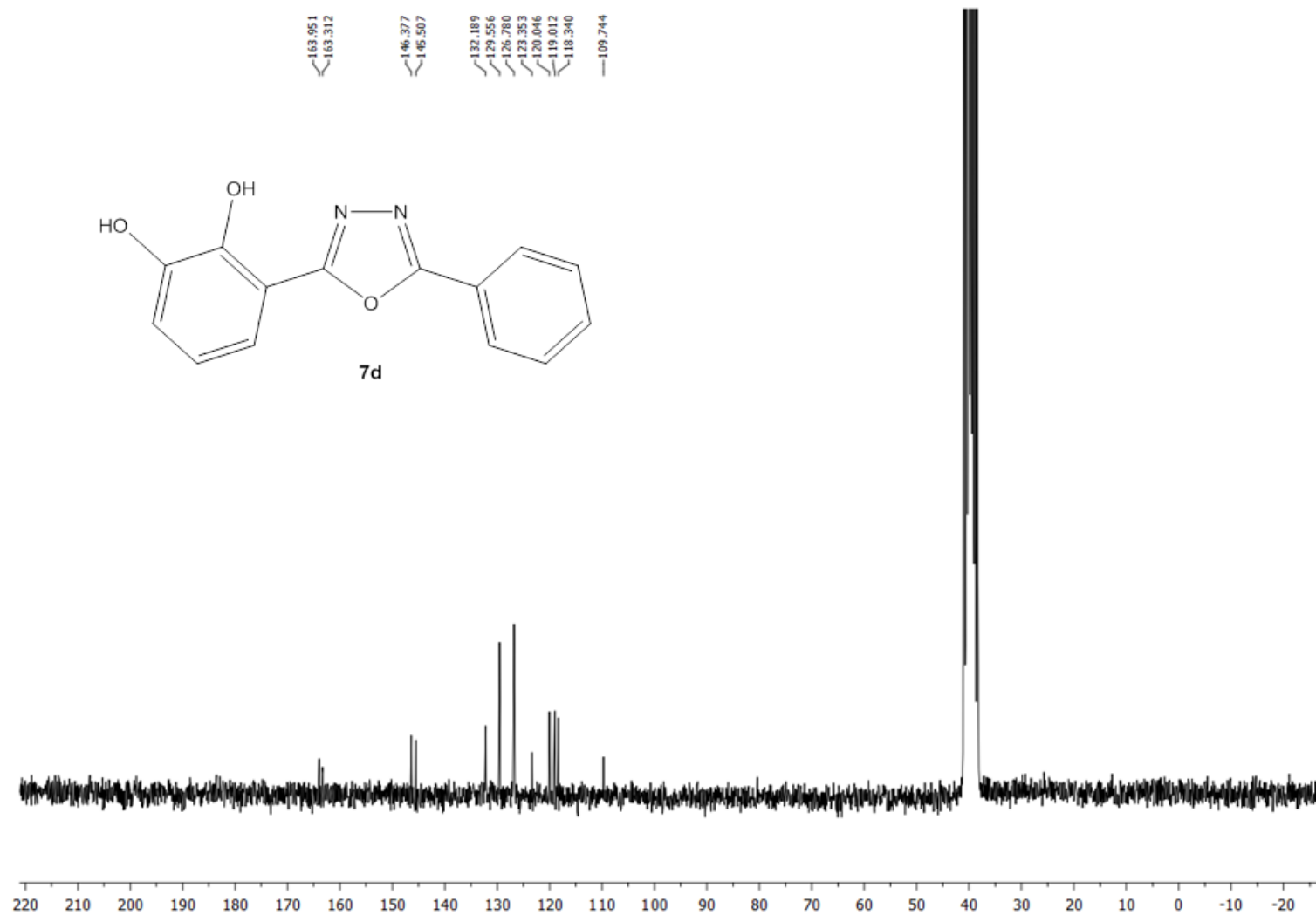
Слика ПЗ9. ^1H NMR спектар једињења **7c** у DMSO-d_6 (200 MHz)



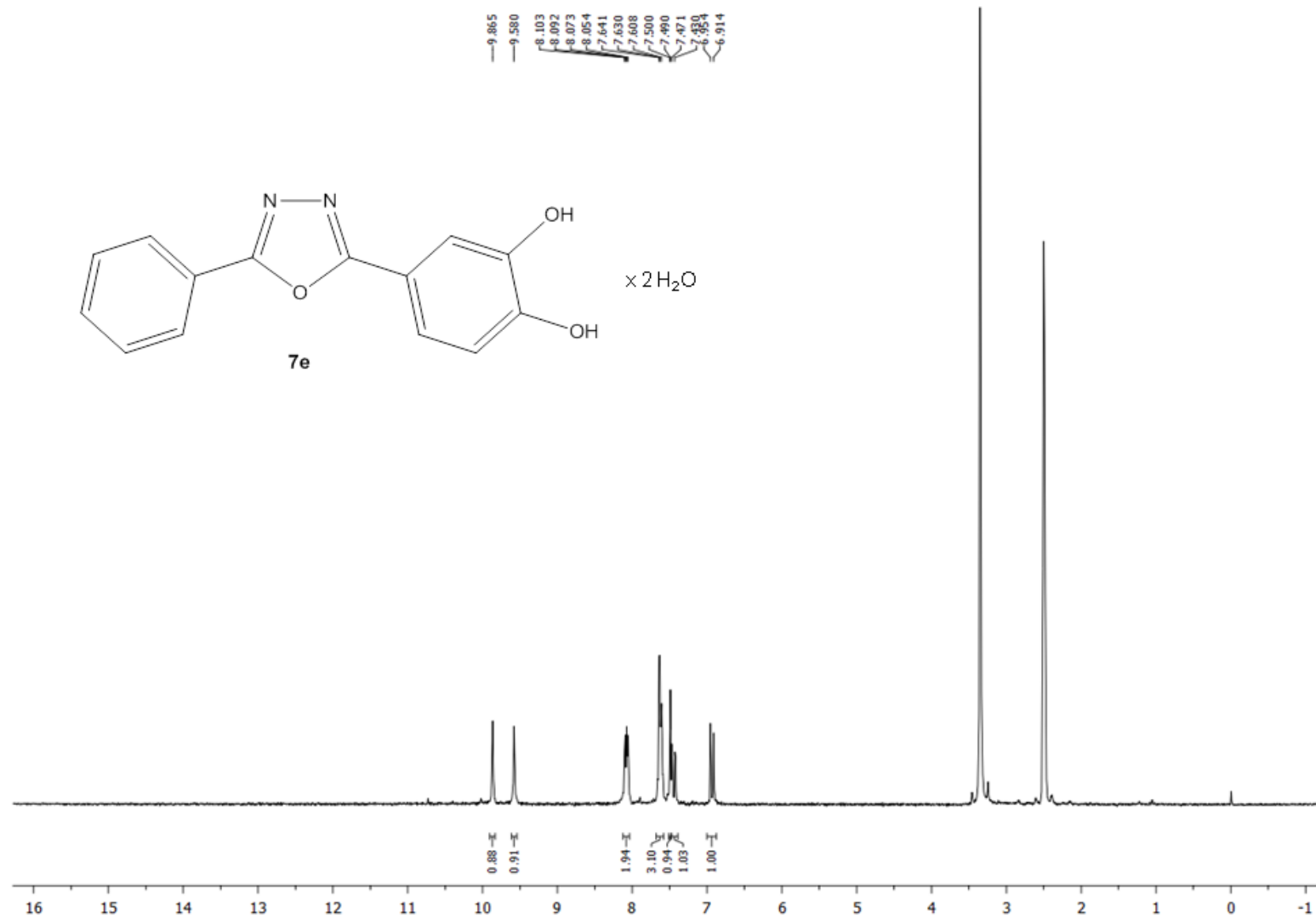
Слика П40. ^{13}C NMR спектар једињења **7c** у DMSO-d_6 (200 MHz)



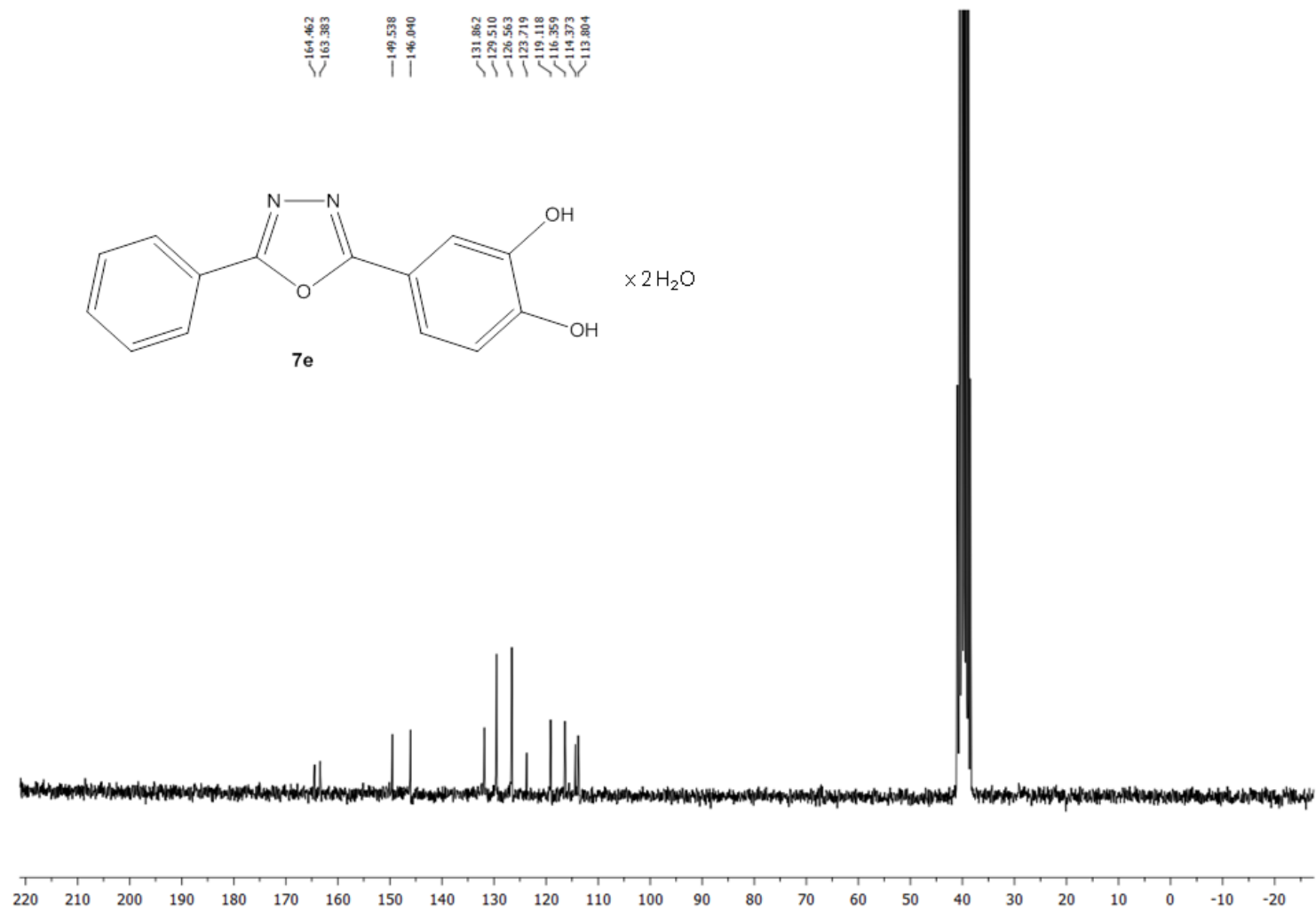
Слика П41. ¹H NMR спектар једињења **7d** у DMSO-d₆ (200 MHz)



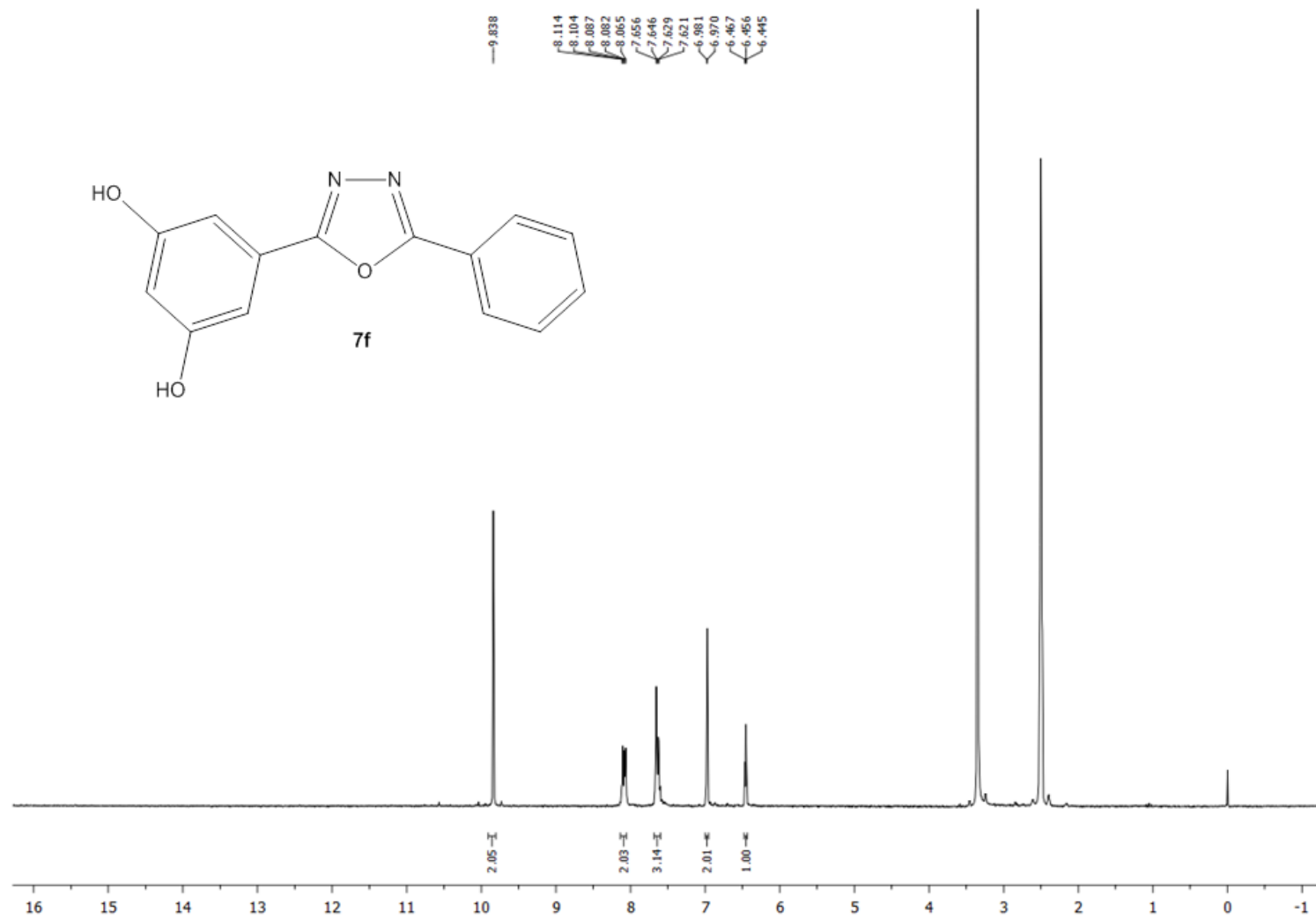
Слика П42. ^{13}C NMR спектар једињења **7d** у DMSO-d_6 (200 MHz)



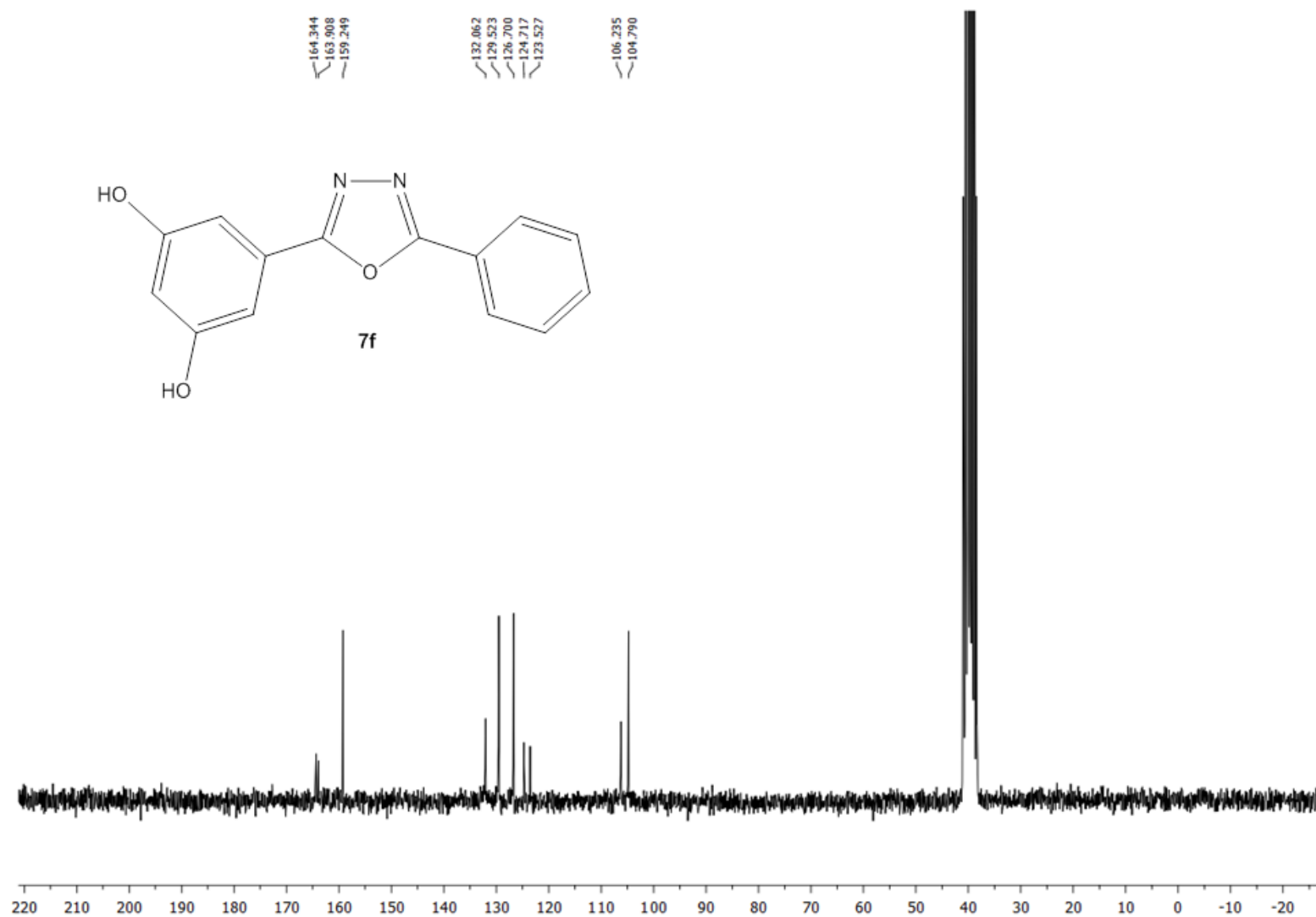
Слика П43. ^1H NMR спектар једињења **7e** у DMSO-d_6 (200 MHz)



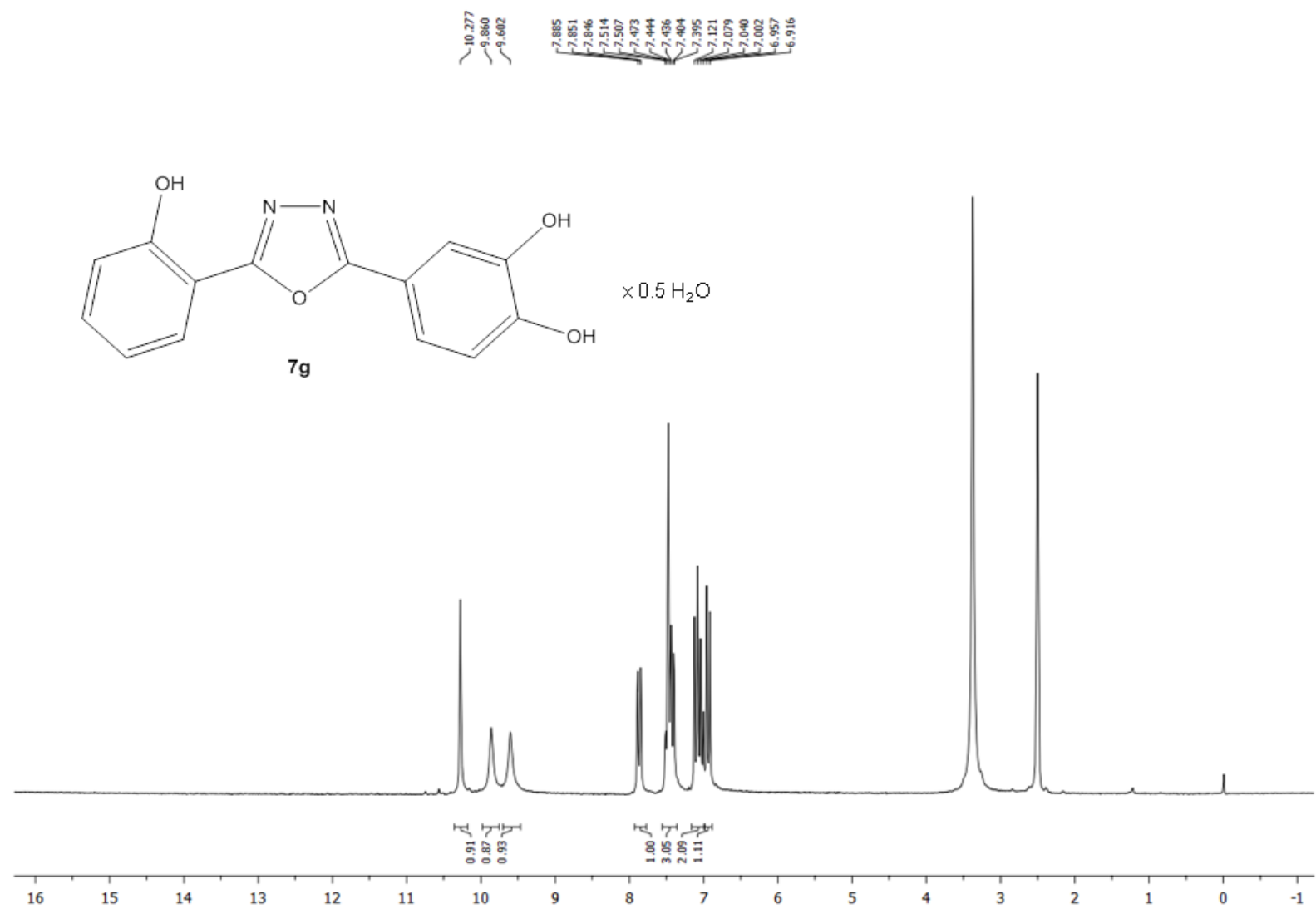
Слика П44. ^{13}C NMR спектар једињења **7e** у DMSO- d_6 (200 MHz)



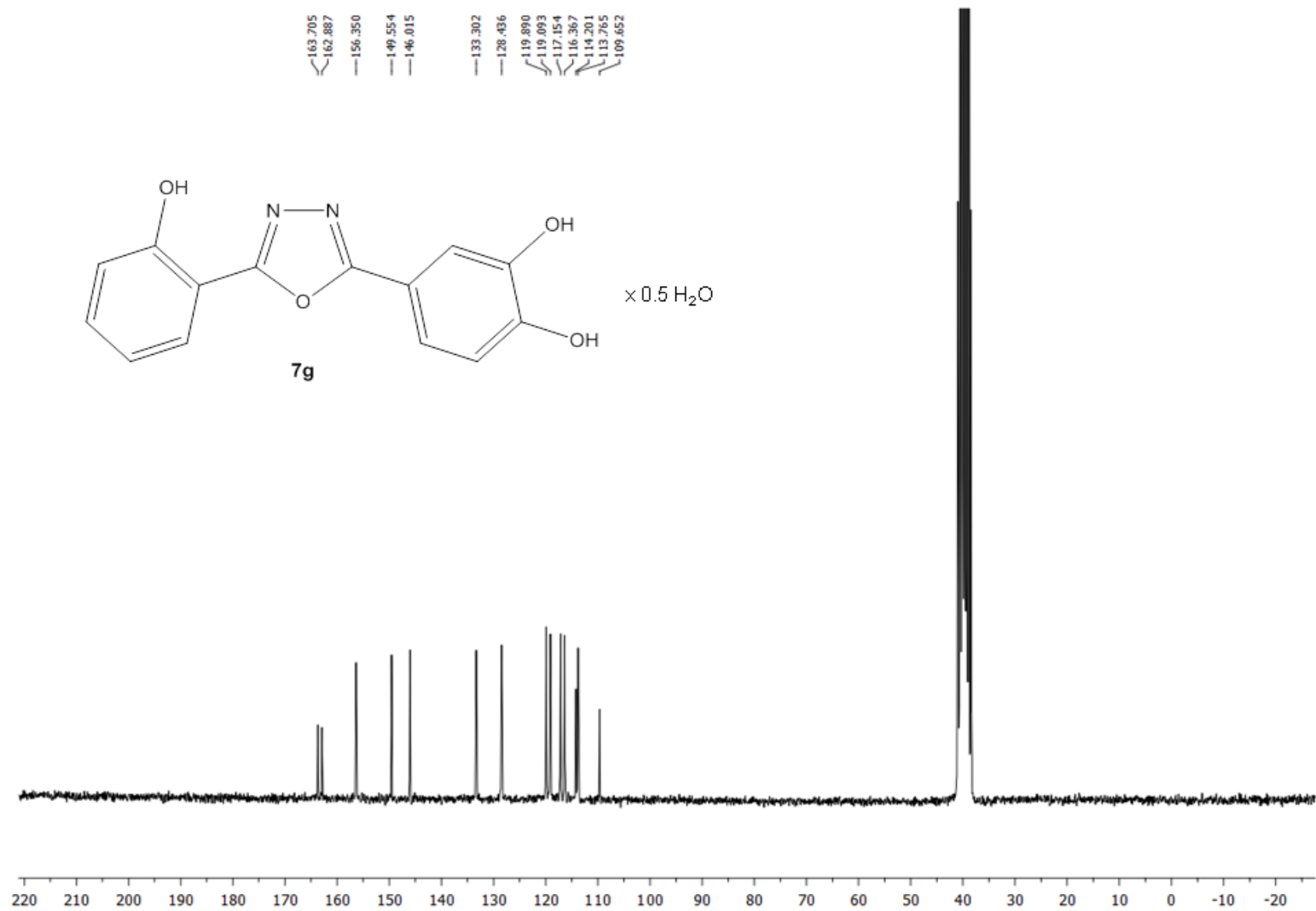
Слика П45. ¹H NMR спектар једињења **7f** у DMSO-d₆ (200 MHz)



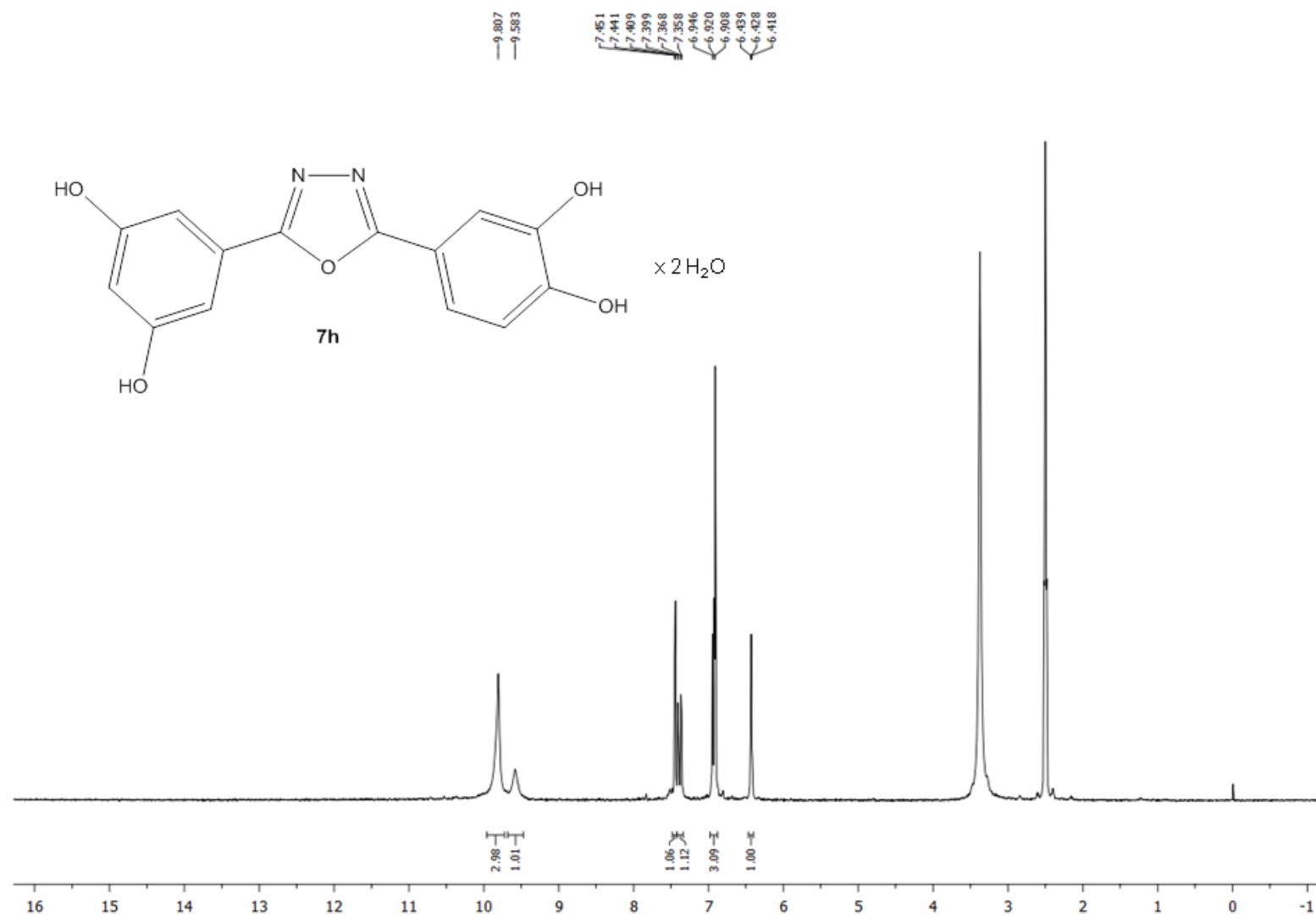
Слика П46. ^{13}C NMR спектар једињења **7f** у $\text{DMSO}-d_6$ (200 MHz)



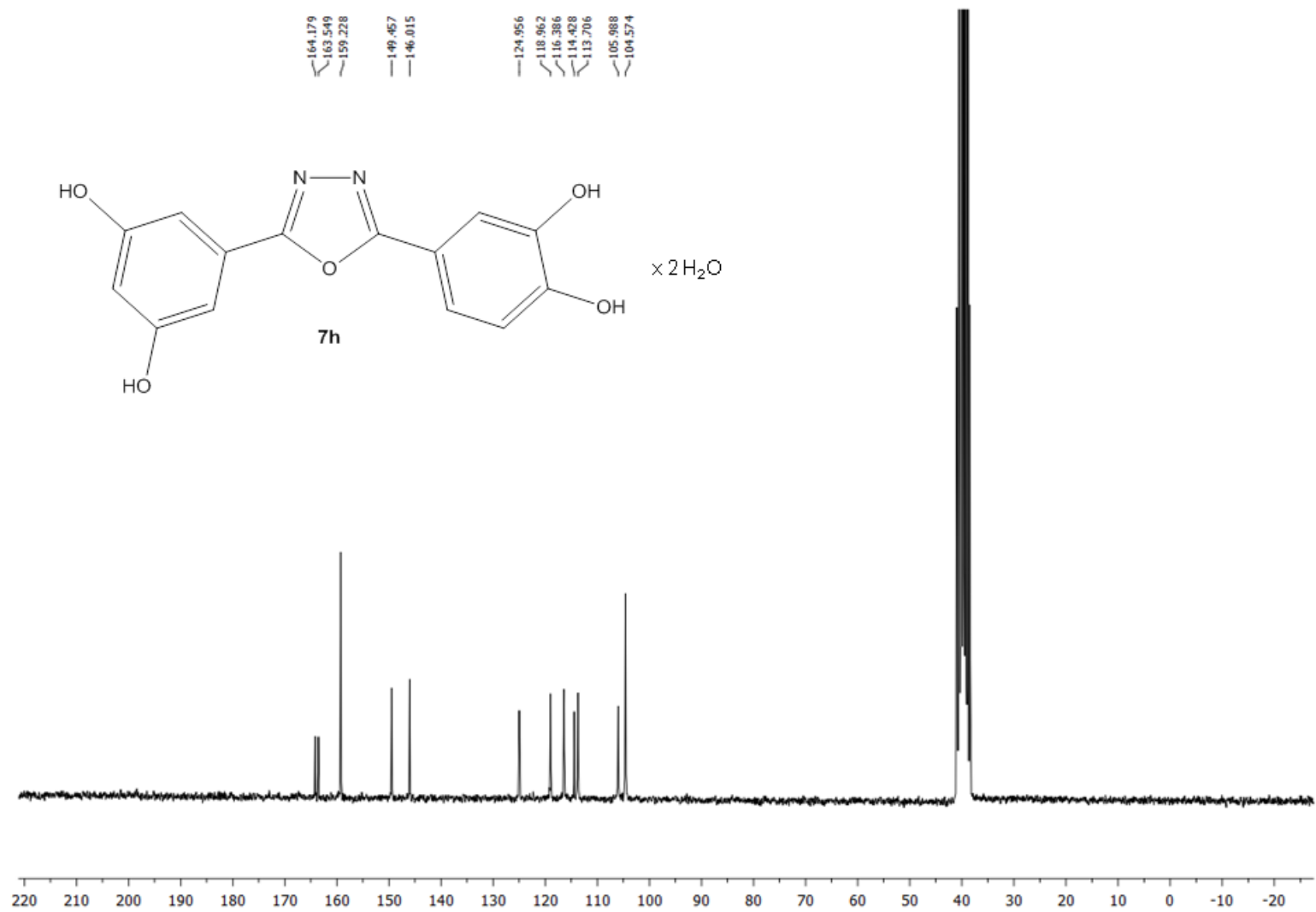
Слика П47. ^1H NMR спектар једињења **7g** у DMSO-d_6 (200 MHz)



Слика П48. ^{13}C NMR спектар једињења **7g** у DMSO-d_6 (200 MHz)



Слика П49. ^1H NMR спектар једињења **7h** у $\text{DMSO}-d_6$ (200 MHz)



Слика П50. ^{13}C NMR спектар једињења **7h** у DMSO- d_6 (200 MHz)



ПУБЛИКОВАНИ РАДОВИ



■ Biological Chemistry & Chemical Biology | Hot Paper |

Potent 1,2,4-Triazole-3-thione Radical Scavengers Derived from Phenolic Acids: Synthesis, Electrochemistry, and Theoretical Study

Nevena Ivanović,^[a] Ljiljana Jovanović,^[b] Zoran Marković,^[c] Violeta Marković,^[a] Milan D. Joksović,^[a] Dejan Milenković,^[d] Predrag T. Djurdjević,^[a] Andrija Ćirić,^[a] and Ljubinka Joksović^{✉[a]}

Nine 1,2,4-triazole-3-thiones containing phenolic acid moiety have been synthesized and examined by scavenging of stable DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical, measurement of reducing capacity, cyclic voltammetry experiments and density functional theory (DFT). The differences in DPPH-radical scavenging activity of the compounds **4a-i** are affected by the sta-

bility of the corresponding radicals or radical cations and possibility of delocalization of unpaired electron through benzene and triazole ring. Significantly, lower proton affinity (PA) values than bond dissociation enthalpy (BDE) indicate SPLET (sequential proton loss electron transfer) mechanism under these experimental conditions.

Introduction

Thione-substituted 1,2,4-triazoles represent an important class of heterocycles owing to their numerous features in various fields of medicinal and industrial chemistry. A large number of these derivatives exhibit diverse biological properties including anticonvulsant,^[1] antidepressant,^[2] anti-inflammatory,^[3] antibacterial,^[4] antifungal^[5] and anticancer activity.^[6] In the context of potential industrial applications, several 1,2,4-triazole-3-thiones have shown corrosion inhibition of copper and mild steel in chloride media and acidic solutions.^[7,8]

The antioxidant activity of 1,2,4-triazole-3-thione (thiol) compounds has attracted much attention in relation to their radical-scavenging potential. Most of these heterocycles with moderate to good scavenging activity toward DPPH radical were synthesized varying different substituents at 4- and 5-position of triazole ring.^[9] Ayhan-Kilcigil et al. designed a new 1,2,4-triazole-3-thione analogue (compound **A**, Figure 1) which

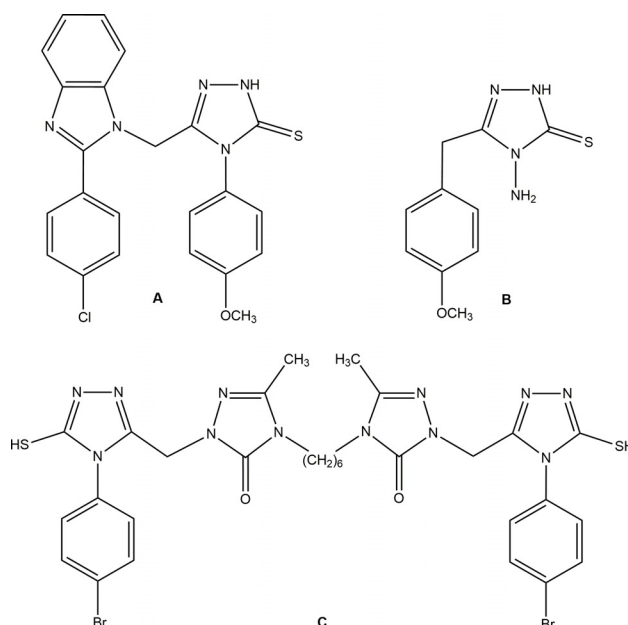


Figure 1. Some 1,2,4-triazole-3-thiones (thiols) as DPPH radical-scavengers.

is screened for its antioxidant properties using DPPH radical obtaining IC_{50} value of $54 \mu M$.^[10] An amino compound, 4-amino-5-aryl-3H-1,2,4-triazole-3-thione (**B**) displayed a significant decrease in the concentration of DPPH radical with $IC_{50} = 51.8 \mu M$.^[11] Düğdü et al. reported novel 1,2,4-triazole-3-thiol derivative (**C**) that exhibited good DPPH radical-scavenging activity ($IC_{50} = 10.0 \pm 0.7 \mu M$), better than using butylated hydroxytoluene (BHT) as a reference compound.^[12]

The antioxidant activity of phenolic compounds has been widely investigated in relation to prevention of heart disease, inflammation, cancer and food preservation.^[13–15] It is well

[a] N. Ivanović, Dr. V. Marković, Prof. Dr. M. D. Joksović, Prof. Dr. P. T. Djurdjević, Dr. A. Ćirić, Prof. Dr. L. Joksović
Faculty of Science, Department of Chemistry
University of Kragujevac
R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia
E-mail: ljubinka@kg.ac.rs

[b] Prof. Dr. L. Jovanović
Faculty of Sciences
University of Novi Sad
Trg D. Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Serbia

[c] Prof. Dr. Z. Marković
Department of Chemical-Technological Sciences
State University of Novi Pazar
Vuka Karadžića bb, 36300 Novi Pazar, Serbia

[d] Dr. D. Milenković
Bioengineering Research and Development Center
34000 Kragujevac, Serbia

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/slct.201600738>

Cite this: *RSC Adv.*, 2017, 7, 8550

Synthesis and antioxidant activity of 1,3,4-oxadiazoles and their diacylhydrazine precursors derived from phenolic acids†

Nevena Mihailović,^a Violeta Marković,^a Ivana Z. Matić,^b Nemanja S. Stanisavljević,^c Živko S. Jovanović,^c Snežana Trifunović^d and Ljubinka Joksović^{*a}

Eight 1,3,4-oxadiazole derivatives containing phenolic acid moieties (**7a–h**) and eight of their diacylhydrazine precursors (**6a–h**) were synthesized, characterized using spectroscopic methods and examined by scavenging of stable DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radicals. The most potent phenolic 1,3,4-oxadiazoles showed better DPPH scavenging activity in comparison with their corresponding diacylhydrazine precursors as a result of participation of both aromatic rings and a 1,3,4-oxadiazole moiety in resonance stabilization of the formed phenoxyl radical. Four diacylhydrazines (**6d**, **6e**, **6g**, and **6h**) and four 1,3,4-oxadiazoles (**7d**, **7e**, **7g** and **7h**) with the best DPPH scavenging activity, were chosen for further evaluation of their antioxidant potential through various assays. The investigated compounds exerted pronounced ABTS radical scavenging capacity, moderate to good H₂O₂ scavenging properties and strong ferric ion reducing capacity. Further *in vitro* evaluation of the antioxidant properties of the most active compounds demonstrated their protective effects in normal lung fibroblasts MRC-5 against hydrogen peroxide induced oxidative stress. Diacylhydrazine **6h** increased two times the activity of glutathione peroxidase in treated cells in comparison with a control sample and did not affect the superoxide dismutase activity.

Received 28th December 2016
Accepted 20th January 2017

DOI: 10.1039/c6ra28787e

rsc.li/rsc-advances

1. Introduction

Reactive oxygen species (ROS) in the form of free radicals (superoxide, singlet oxygen, hydroxyl radical) and neutral molecules (hydrogen peroxide) induce damage of biological macromolecules under oxidative stress and contribute to the pathogenesis of many health problems such as cancer, inflammation, atherosclerosis, cardiovascular and neurodegenerative diseases.^{1–3} The antioxidants prevent the oxidation of biological substrates, lowering oxidative stress, DNA mutations, malignant changes and thus, block the loss of cell function.⁴

Owing to the possibility of facile hydrogen atom transfer and resonance stabilization of the resulting phenoxyl radical, phenolic acids act as chain-breaking antioxidants able to scavenge free radical species.⁵ Natural and synthetic phenolic acids often contain both hydroxyl and methoxy substituents and the positioning of OH groups is crucial for their antioxidant

properties.^{6–8} The combination of the known phenolic antioxidants with heterocyclic pharmacophores in the same unit can be an interesting approach to discover novel more potent radical scavengers as a result of their synergistic effects. Furthermore, one of such heterocycles, substituted 1,3,4-oxadiazole scaffold has been reported to exhibit a broad spectrum of biological activity.^{9–12} Literature searches reveal that 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazole derivatives commonly obtained from diacylhydrazines show antioxidant potential. This class of compounds includes sulfonamidomethane linked 1,3,4-oxadiazoles,¹³ substituted bis(1,3,4-oxadiazoles),¹⁴ 1,3,4-oxadiazoles possessing benzoxazole,¹⁵ 1,3,4-oxadiazole tagged thieno [2,3-*d*]pyrimidines,¹⁶ 2-benzoylamino-5-hetaryl-1,3,4-oxadiazoles,¹⁷ and 1,3,4-oxadiazoles containing 3-fluoro-4-methoxyphenyl moiety.¹⁸ To the best of our knowledge, there is no available data regarding antioxidant activity of hydroxy-substituted dibenzoylhydrazines in the literature. In this study, a series of 1,3,4-oxadiazoles and their diacylhydrazine precursors derived from phenolic acids was synthesized and screened for radical scavenging properties using several assays.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

The synthesis of 1,3,4-oxadiazoles from 1,2-diacylhydrazines requires various cyclodehydration agents such as SOCl₂,¹⁹ POCl₃,^{20,21} Burgess reagent,²² and 2-chloro-1,3-

^aFaculty of Science, Department of Chemistry, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: ljubinka@kg.ac.rs

^bInstitute of Oncology and Radiology of Serbia, Pasterova 14, 11000 Belgrade, Serbia

^cInstitute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Vojvode Stepe 444a, 11000 Belgrade, Serbia

^dFaculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 12–16, 11000 Belgrade, Serbia

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c6ra28787e



Original research article

Analysis of phenolics in the peel and pulp of wild apples (*Malus sylvestris* (L.) Mill.)

Nevena R. Mihailović^{a,*}, Vladimir B. Mihailović^a, Samo Kreft^b, Andrija R. Ćirić^a, Ljubinka G. Joksović^a, Predrag T. Đurđević^a

^a Faculty of Science, Department of Chemistry, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

^b Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Biology, University of Ljubljana, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana, Slovenia



ARTICLE INFO

Keywords:

Food analysis
Food composition
Malus sylvestris
Extraction
Phenolics
HPLC-PDA
Antioxidant activity
In vitro digestion

ABSTRACT

A simple and efficient ultrasound extraction method for phenolic compounds in the pulp and peel of *Malus sylvestris* (wild apples) was developed using multivariate methodology. Optimal extraction conditions were obtained using this methodology for peel and pulp samples (2.0 g), including solvent volume 100 mL and 79 mL, methanol concentration 100% (v/v) and 20% (v/v), extraction time 33 min and 40 min, extraction temperature 65 °C and 80 °C, respectively. The peel and pulp extracts were analysed by HPLC-PDA using a C₁₈ Phenomenex Kinetex column. Among the phenolic compounds present in our samples, we quantified (mg/g fresh weight) chlorogenic acid, 0.791; epicatechin, 1.18; and phloridzin, 0.106 in the pulp extract, whereas the peel extract contained chlorogenic acid, 0.568; epicatechin, 1.36; phloridzin, 0.207; catechin, 0.187; hyperoside, 0.261; and quercitrin, 0.256 mg/g. The antioxidant activity of the extracts was measured by spectrophotometric methods. Peel extract proved to be a better antioxidant than pulp extract. Additionally, the stability of the analysed phenolic compounds was tested by *in vitro* digestion procedures. Simulated *in vitro* digestion showed that the concentrations of all analysed phenolic compounds (except chlorogenic acid) decreased during the intestinal phase of digestion.

1. Introduction

Apples are one of the most widely produced and consumed fruits in the world. Fresh apples and their processed products, such as dried apple, applesauce, juice and cider, are usually available in the market for the entire year and represent a significant part of human nutrition in many parts of the world (Šavikin et al., 2014). In addition to its nutritive value, the consumption of apples has been associated with a decreased risk of chronic diseases, including cardiovascular diseases, asthma, various cancers and type II diabetes (Gossé et al., 2005; Boyer and Liu, 2004; Knekt et al., 2002; Le Marchand et al., 2000; Hyun and Jang, 2016). Several studies have characterized the bioactive compounds and pharmacological functions of cultivated apples (*Malus domestica* Borkh.) (Xu et al., 2016; Panzella et al., 2013; Lata et al., 2009; Mikulić Petkovšek et al., 2009). However, data on wild European apples (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) are scarce because their populations are very rare, and some European countries (i.e., Belgium and the Czech Republic) have classified *M. sylvestris* as an “endangered species” (Schnitzler et al., 2014).

The European wild apple, which is a member of the Rosaceae

family, is widely spread in European forests as dispersed single trees. The genus *Malus* is native to the temperate zones of the northern hemisphere, Europe, Asia, and North America, and it comprises approximately 30–35 species of small deciduous trees or shrubs of the Rosaceae family. *M. sylvestris* species grow throughout Serbia in the woods and thickets at boundaries from lower to hilly regions, and they can reach up to 10 m in height. Their sour apples are consumed as fresh fruit or used for traditionally produced apple vinegar (Josifović, 1974). Because of its many health benefits, apple cider vinegar is a product of increasing interest (Solieri and Giudici, 2009; Morgan and Mosawy, 2016). Additionally, in Serbian traditional medicine, vinegar from wild apple fruits is used to strengthen the immune system to ward against cold, digestive, and hypertensive ailments (Zlatković et al., 2014). In Europe, wild apples have been used to treat infant intestinal disorders (diarrhoea, dyspepsia and dysentery), and for adults, they have been used against constipation (Duke and Wain, 1981). The examination of wild apples has been neglected despite their use in traditional medicine (Šavikin et al., 2014). Although wild apples are not used as much as cultivated apples because of their tart taste and because they are economically less significant, there is a possibility that they are rich in

* Corresponding author.

E-mail address: i.nevena@kg.ac.rs (N.R. Mihailović).

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Невена Р. Михаиловић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Одређивање фенолних једињења у плодовима неких биљака из фамилије Rosaceae и антиоксидативне активности њихових синтетичких деривата

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 20.5.2019. године,

Н.Михаиловић

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Невена Р. Михаиловић,

☒

дозвољавам

☐

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Одређивање фенолних једињења у плодовима неких биљака из фамилије
Rosaceae и антиоксидативне активности њихових синтетичких деривата

која је одбрањена на Природно-математичком факултету

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

☒

дозвољавам

☐

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 20.5.2019. године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>