



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

3,3'-(Fenilimino)bispropanhidrazidų kondensacijos produktų biologinio aktyvumo įvertinimas

Baigiamasis magistro projektas

Rugilė Gelčiūtė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

Kaunas, 2025



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

3,3'-(Fenilimino)bispropanhidrazidų kondensacijos produktų biologinio aktyvumo įvertinimas

Baigiamasis magistro projektas

Chemijos inžinerija (6211EX020)

Rugilė Gelčiūtė

Projekto autorė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

Vadovė

M. d. dr. Ingrida Tumosienė

Recenzentė

Kaunas, 2025



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Rugilė Gelčiūtė

3,3'-(Fenilimino)bispropanhidrazidų kondensacijos produktų biologinio aktyvumo įvertinimas

Akademino sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama(s) kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi(s) Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – Universitetas) intelektinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei Universiteto akademinės etikos kodekse nustatytų etikos reikalavimų;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjęs (-usi);
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta(s) iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Rugilė Gelčiūtė

Patvirtinta elektroniniu būdu



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Tvirtinu:
Cheminės technologijos fakulteto dekanas
prof. dr. Vaida Kitrytė Syrpa

Suderinta:
Organinės chemijos katedra
prof. dr. Eglė Arbačiauskienė

Dekano potvarkis Nr. V25-02-22, 2025 gegužės 20 d. 2025 m. vasario mėn. 03 d.

Baigiamojo magistro projekto užduotis

Projekto tema 3,3'-(Fenilimino)bispropanhidrazidų kondensacijos produktų biologinio aktyvumo įvertinimas

Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas: ištirti susintetintų junginių antibakterines ir antioksidacines savybes, atrinkti aktyviausius junginius, papildyti jais mitybinę terpę brokoliams augti *in vitro*, nustatyti junginių poveikį brokolių antioksidacinėms ir antibakterinėms savybėms.

Darbo uždaviniai: įvertinti susintetintų junginių antioksidacinį aktyvumą, taikant FRAP, ABTS, redukcinių savybių ir antibakterinio aktyvumo nustatymo metodus; nustatyti brokolių *in vitro* ekstraktų antioksidacinį aktyvumą, taikant FRAP, ABTS, redukcinių savybių, antibakterinio aktyvumo ir DPPH nustatymo metodus; ištirti brokolių *in vitro* ekstraktų chlorofilo *a* ir *b*, karotinoidų, *L*-prolino ir gliukozinolatų koncentracijas; išanalizuoti brokolių ekstraktų flavonoidų, bendrųjų fenolinių junginių koncentracijas Folino-Kiokalto metodu bei superoksido dismutazės aktyvumą.

Reikalavimai ir sąlygos

Turi būti visos privalomos baigiamojo projekto sudėtinės dalys kaip nurodyta dekanu 2024 m. kovo 6 d. potvarkiu Nr. V25-02-10 patvirtintuose „Pirmosios pakopos studijų programos Cheminė technologija ir inžinerija ir antrosios pakopos studijų programos Chemijos inžinerija baigiamųjų projektų rengimo ir gynimo metodiniuose reikalavimuose“.

Vadovė

Doc. dr. Ilona Jonuškienė

2025-02-03

(vadovo pareigos, vardas, pavardė, parašas)

(data)

Užduotį gavau: Rugilė Gelčiūtė
(studento vardas, pavardė)

2025-02-03
(parašas, data)

Gelčiūtė, Rugilė. 3,3'-(Fenilimino)bispropanhidrazidų kondensacijos produktų biologinio aktyvumo įvertinimas. Magistro baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų kryptių grupė): Chemijos inžinerija, Inžinerijos mokslai.

Reikšminiai žodžiai: hidrazidai, biologiškai aktyvieji junginiai, antioksidantai, antibakterinės savybės, *in vitro*, brokoliai.

Kaunas, 2025. 62 p.

Santrauka

Junginių biologinis aktyvumas parodo jų įtaką biologiniuose, fiziologiniuose ir metaboliniuose procesuose. Taigi biologinis aktyvumas yra apibūdinamas kaip medžiagos savybė, priklausanti nuo jos struktūros, fizikinių bei cheminių savybių [1]. Hidrazidai yra organinių junginių klasė, pasižyminti biologiniu aktyvumu pvz.: antibakteriniu, antituberkulioziniu, priešgrybeliniu, priešvėžiniu, priešuždegiminiu ir t. t. Dėl šių savybių jie vis dažniau tiriama norint pritaikyti farmacijos, kosmetikos ir žemės ūkio pramonėje, kur ieškoma efektyvių ir saugių alternatyvų įvairiems produktams pagaminti. Pagrindinis šio tyrimo tikslas buvo nustatyti ir įvertinti hidrazidų junginių antioksidacines ir antibakterines savybes, išrinkti intensyviausiomis, jau išvardintomis savybėmis pasižyminčius junginius, papildyti jais brokoliams augti skirtą mitybinę terpę *in vitro*, nustatyti junginių įtaką brokolių antioksidacinėms ir antibakterinėms savybėms.

Remiantis duomenimis, nustatyta, kad intensyviausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo 3,3'-((4-etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas) junginys, o antibakteriniu 3,3'-((4-metoksifenil)azanediil)bis(N'-(4-nitrobenziliden)propano hidrazidas)) ir 3,3'-(fenilazandiil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas). Tyrimo rezultatai parodė, jog, 3,3'-((4-etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas) junginys, esantis brokolių *in vitro* MS sistemoje, paskatino antrinių metabolitų susidarymą ir turėjo didžiausią antioksidacinį aktyvumą. Nustatyta, kad intensyviausias antibakterines savybes turėjo brokoliai *in vitro* augę MS terpėje su 3,3'-(fenilazandiil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidu). Atliekant tyrimą buvo įvertintos chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų, *L*-prolino ir gliukozinolatų koncentracijos ir nustatyta, kad didžiausią šių junginių koncentracijos susidarymą paskatino 3,3'-((4-etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas) MS terpėje. Išanalizavus fenolinių junginių susidarymą, reikšmingiausią poveikį jų formavimuisi pasižymėjo (3,3'-(fenilazandiil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas). Atlikus superoksido dismutazės aktyvumo įvertinimą, buvo išsiaiškinta, jog biologiškai aktyvieji junginiai esantys MS brokolių mitybinėje *in vitro* terpėje neturėjo didelės įtakos antioksidaciniam aktyvumui. Apibendrinus gautus rezultatus galima daryti išvadą, jog brokoliai augę *in vitro* MS terpėje su biologiškai aktyviuoju junginiu 3,3'-((4-etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidu) buvo , norint paskatinti antrinių metabolitų susidarymą brokoliuose.

Gelčiūtė, Rugilė. Evaluation of the Biological Activity of Condensation Products of 3,3'-(Phenylimino)bispropanehydrazides. Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof. dr. Ilona Jonuškienė; The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): Chemical Engineering, Engineering Sciences.

Keywords: hydrazides, biologically active compounds, antioxidants, antibacterial properties, *in vitro*, broccoli.

Kaunas, 2025. 62.

Summary

The biological activity of compounds shows their influence on biological, physiological and metabolic processes. Thus, biological activity is described as a property of a substance that depends on its structure, physical and chemical properties [1]. Hydrazides are a class of organic compounds that exhibit biological activity, e.g. antibacterial, antituberculosis, antifungal, anticancer, anti-inflammatory, etc. Due to these properties, they are increasingly being studied for application in the pharmaceutical, cosmetic and agricultural industries, where effective and safe alternatives are sought for the production of various products. The main objective of this study was to determine and evaluate the antioxidant and antibacterial properties of hydrazide compounds, to select the compounds with the most intense, already listed properties, to supplement the nutrient medium for broccoli growth with them *in vitro*, and to determine the influence of the compounds on the antioxidant and antibacterial properties of broccoli.

Based on the data, it was determined that the most intense antioxidant activity was observed in the compound 3,3'-((4-ethoxyphenyl)azanediyl)bis(N-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)propanamide), while the antibacterial activity was observed in 3,3'-((4-methoxyphenyl)azanediyl)bis(N'-(4-nitrobenzylidene)propane hydrazide)) and 3,3'-(phenylazanediyl)bis(N-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)propanamide). The results of the study showed that the compound 3,3'-((4-ethoxyphenyl)azanediyl)bis(N-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)propanamide) present in broccoli *in vitro* in the MS system stimulated the formation of secondary metabolites and had the highest antioxidant activity. It was found that the most intense antibacterial properties were found in broccoli grown *in vitro* in MS medium with 3,3'-(phenylazanediyl)bis(N-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)propanamide). The concentrations of chlorophyll *a* and *b*, carotenoids, *L*-proline and glucosinolates were evaluated during the study and it was found that the highest concentration of these compounds were induced by 3,3'-((4-ethoxyphenyl)azanediyl)bis(N-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)propanamide in MS medium. After analyzing the formation of phenolic compounds, (3,3'-(phenylazanediyl)bis(N-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)propanamide) had the most significant effect on their formation. After evaluating the activity of superoxide dismutase, it was found that the biologically active compounds present in the MS broccoli nutrient *in vitro* medium did not have a significant effect on the antioxidant activity. Summarizing the obtained results, it can be concluded that broccoli grown *in vitro* on MS medium with the biologically active compound 3,3'-((4-ethoxyphenyl)azanediyl)bis(N-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)propanamide) was the most suitable combination to stimulate the formation of secondary metabolites in broccoli.

Turinys

Lentelių sąrašas	9
Paveikslų sąrašas	10
Santrumpų ir terminų sąrašas	12
Įvadas.....	13
1. Literatūros apžvalga	14
1.1. Hidrazidų sintezė ir savybės	14
1.1.1. Hidrazono darinių antivirusinis aktyvumas.....	15
1.1.2. Hidrazono darinių antioksidacinis aktyvumas.....	16
1.1.3. Hidrazono darinių antibakterinis aktyvumas.....	16
1.2. Antioksidantai naudojami pramonėje	16
1.3. Brokolių biologinis aktyvumas.....	18
1.3.1. Brokolių antioksidacinis aktyvumas.....	21
1.3.2. Brokoliuose esančių gliukozinolatų biologinis aktyvumas	22
1.3.3. Brokoliuose esančių vitaminų biologinis aktyvumas	22
1.4. Literatūros apžvalgos apibendrinimas	23
2. Tiriamoji dalis.....	24
2.1. Tyrimo planavimas ir tyrimų objektas	24
2.1.1. Darbo priemonės ir prietaisai, naudoti tyrimams atlikti.....	26
2.1.2. Tyrimo metu naudoti reagentai	26
2.2. Medžiagos ir tyrimų metodai.....	28
2.2.1. Junginių antioksidacinis aktyvumas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną 28	
2.2.2. Junginių antioksidacinio aktyvumo nustatymas 2,2'-azinobis (3-etil-benzotiazolino-6- sulfonrūgšties) radikalo slopinimo metodu	29
2.2.3. Junginių redukcinių (antioksidacinių savybių) nustatymas.....	29
2.2.4. Biologiškai aktyviųjų junginių aktyvumo nustatymas agar difuziniu metodu.....	29
2.2.5. Brokolių auginimas <i>in vitro</i> su biologiškai aktyviaisiais junginiais.....	30
2.2.6. Brokolių sėklų sterilinimas.....	30
2.2.7. Maitinamosios terpės paruošimas brokoliams daiginti	30
2.2.8. Augalų daigumo ir biomasės įvertinimas	31
2.2.9. Augalų antioksidacinis aktyvumas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną 31	
2.2.10. Augalų ekstrakto esančių bioaktyviųjų junginių antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu31	
2.2.11. Reducinių (antioksidacinių) savybių nustatymas augalų ekstraktuose	31
2.2.12. Antibakterinis įvertinimas augalų ekstraktuose turinčiuose bioaktyviųjų junginių	32
2.2.13. Augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu	32
2.2.14. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų koncentracijos įvertinimas augalų ekstraktuose.....	32
2.2.15. <i>L</i> -prolino koncentracijos nustatymas augalų ekstraktuose	33
2.2.16. Gliukozinolatų koncentracijos nustatymas augalų ekstraktuose	34
2.2.17. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folino-Kiokalto metodu	34
2.2.18. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo nustatymas.....	35
2.3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas	36
2.3.1. Biologiškai aktyviųjų junginių antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu.....	36

2.3.2. Biologiškai aktyviųjų junginių antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu	37
2.3.3. Biologiškai aktyviųjų junginių redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas.....	38
2.3.4. Tiriamųjų junginių antibakterinis įvertinimas	39
2.3.5. Brokolių auginimas <i>in vitro</i> su atrinktais bioaktyviaisiais junginiais	40
2.3.6. Brokolių daigumo ir biomasės įvertinimas.....	40
2.3.7. Antioksidacinio aktyvumo FRAP metodu įvertinimas brokolių <i>in vitro</i> ekstraktuose	41
2.3.8. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu brokolių ekstraktuose.....	42
2.3.9. Reducinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas brokolių <i>in vitro</i> ekstraktuose.....	42
2.3.10. Brokolių ekstraktų antibakterinis įvertinimas	43
2.3.11. Antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu brokolių <i>in vitro</i> ekstraktuose	44
2.3.12. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> bei karotinoidų koncentracijos įvertinimas brokolių ekstraktuose.....	45
2.3.13. <i>L</i> -prolino koncentracijos nustatymas brokolių <i>in vitro</i> ekstraktuose.....	47
2.3.14. Gliukozinolatų koncentracijos įvertinimas brokoliuose <i>in vitro</i>	48
2.3.15. Bendrųjų fenolinių junginių koncentracijos nustatymas brokoliuose <i>in vitro</i> Folino-Kiokalto metodu48	
2.3.16. Superoksido dismutazės įvertinimas brokolių ekstraktuose.....	49
3. Rekomendacijos (inžinerinė dalis)	51
4. Darbuotojų sauga ir sveikata	54
4.1. Profesinės rizikos veiksniai	54
4.1.1. Cheminiai veiksniai	54
4.2. Priešgaisrinės apsaugos priemonės.....	55
Išvados	56
Literatūros sąrašas	57
Priedai.....	63
1 priedas. Cheminių medžiagų charakteristika.....	63

Lentelių sąrašas

2.1 lentelė. Naudotos priemonės ir įrankiai	26
2.2 lentelė Maitinamosios Murashige & Skoog (MS) terpės sudėtis.....	30
2.3 lentelė Brokolių daigumo ir biomasės įvertinimo rezultatai:	40
3.1 lentelė. Technologinėje schemoje pateiktų aparatų numeravimas ir reikšmė.....	52
4.1 lentelė. Cheminių medžiagų IPRD ir prevencinės priemonės	54

Paveikslų sąrašas

1.1 pav. Hidrazido – hidrazono farmakoforo savybės	14
1.2 pav. Cheminė reakcija ftalio anhidrido su alkilglicinatu [7]	15
1.3 pav. Ftalamido žiedas (izoindolino-1,3-dionas)	15
1.4 pav. Askorbo rūgšties cheminė struktūra	17
1.5 pav. BHT (Butilintas hidroksitoluenas) cheminė struktūra	17
1.6 pav. Melatonino cheminė struktūra	18
1.7 pav. Brokolis (lot. <i>Brassica oleracea</i>) [34]	19
1.8 pav. Junginiai esantys brokoliuose (lot. <i>Brassica oleracea</i>)	19
1.9 pav. Brokolių nauda žmogaus mitybai ir sveikatai	20
1.10 pav. Sulforafano cheminė struktūra	21
1.11 pav. Gliukofaranino cheminė struktūra	22
2.1 pav. 3,3'-((4-Metoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas) (1 junginys)	24
2.2 pav. 3,3'-((4-Etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas) (2 junginys)	24
2.3 pav. 3,3'-(p-Tolilazanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas) (3 junginys)	24
2.4 pav. 3,3'-(Fenilazandiil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas) (4 junginys)	25
2.5 pav. 3,3'-(Fenilazandiil)bis(N'-(4-nitrobenziliden)propano hidrazidas) (5 junginys)	25
2.6 pav. 3,3'-(p-Tolilazandiil)bis(N'-(4-nitrobenziliden)propano hidrazidas) (6 junginys)	25
2.7 pav. 3,3'-((4-Metoksifenil)azanediil)bis(N'-(4-nitrobenziliden)propano hidrazidas) (7 junginys)	25
2.8 pav. 3,3'-((4-Etoksifenil)azanediil)bis(N'-(4-nitrobenziliden)propano hidrazidas) (8 junginys)	26
2.9 pav. Tiriamųjų biologiškai aktyviųjų junginių antibakterinio aktyvumo nustatymas agar difuziniu metodu	30
2.10 pav. FRAP metodo reakcijos mechanizmas [58]	36
2.11 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu	36
2.12 pav. ABTS radikalo susidarymas ir mechanizmas [59]	37
2.13 pav. ABTS radikalo slopinimo įvertinimas	37
2.14 pav. Redukcinio antioksidacinio aktyvumo įvertinimas	38
2.15 pav. Susintetintų junginių antibakterinis įvertinimas prieš <i>B.subtilis</i>	39
2.16 pav. Susintetintų junginių antibakterinis įvertinimas prieš <i>E.coli</i>	39
2.18 pav. Brokolių <i>in vitro</i> kultūra augusi MS su 2 junginiu	40
2.20 pav. Brokolių daigumo ir biomasės įvertinimas <i>in vitro</i>	40
2.21 pav. FeSO ₄ ·7H ₂ O kalibracinė kreivė	41
2.22 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu	41
2.23 pav. ABTS radikalo slopinimo įvertinimas	42
2.24 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas brokolių <i>in vitro</i> ekstraktuose	42
2.25 pav. Brokolių <i>in vitro</i> ekstraktų antibakterinis aktyvumas prieš <i>B. subtilis</i>	43
2.26 pav. Brokolių <i>in vitro</i> ekstraktų antibakterinis įvertinimas prieš <i>B.subtilis</i>	43
2.27 pav. Brokolių <i>in vitro</i> ekstraktų antibakterinis aktyvumas prieš <i>E. coli</i>	44
2.28 pav. DPPH radikalo redukcijos reakcija ir spalvos pokyčiai [60]	44
2.29 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu brokolių ekstraktuose	45
2.30 pav. Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> koncentracijos įvertinimas	46
2.31 pav. Karotinoidų koncentracijos įvertinimas brokolių <i>in vitro</i> ekstraktuose	46

2.32 pav. <i>L</i> -prolino kalibracinė kreivė	47
2.33 pav. <i>L</i> -prolino koncentracijos įvertinimas brokolių <i>in vitro</i> ekstraktuose	47
2.34 pav. Gliukozinolatų koncentracijos įvertinimas brokolių <i>in vitro</i> ekstraktuose	48
2.35 pav. Tanino rūgšties kalibracinė kreivė	49
2.36 pav. Bendrųjų fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas brokolių <i>in vitro</i> ekstraktuose...	49
2.37 pav. Superoksido dismutazės koncentracijos įvertinimas brokolių <i>in vitro</i> ekstraktuose.....	50
3.1 pav. Gliukozinolatų išskyrimo technologinė schema iš brokolių augusių MS <i>in vitro</i> terpėje...	52
4.1 pav. Simbolis: šauktukas	63
4.2 pav. Simbolis: aplinka	63
4.3 pav. Simbolis: kaukolė ir sukryžiuoti kaulai.....	63
4.4 pav. Simbolis: korozija	63
4.5 pav. Simbolis: pavojai sveikatai.....	64

Santrumpų ir terminų sąrašas

Santrumpos:

ABTS – 2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolino-6-sulfonrūgšties) radikalas;

BHT – Butilintas hidroksitoluenas;

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo radikalas;

LB – *Luria Broth* terpė;

MS – *Murashige* ir *Skoog* terpė.

Ivadas

Didėjanti bioaktyviųjų junginių, turinčių antibakterinių ir antioksidacinių savybių, paklausa paskatino naujų organinių junginių tyrimus, turinčius biologinį aktyvumą. Šiame projekte pagrindinis dėmesys buvo skiriamas bioaktyviųjų junginių iš hidrazidų klasės tyrimams. Dėl žinomų jų įvairių antimikrobinių ir antioksidacinių savybių buvo ištirti hidrazidų dariniai ir toliau naudoti tolimesniems tyrimams. Jie papildė brokolių (lot. *Brassica oleracea*) *in vitro* mitybines terpes, siekiant sustiprinti arba pagerinti jau turimas augalui būdingas antibakterines ir antioksidacines savybes. Vėliau, įvertinamas šių junginių poveikis brokoliams *in vitro*, siekiant nustatyti jų efektyvumą, antrinių metabolitų susidarymą ir gebėjimą paskatinti brokolio augimo procesą.

Augalų mitybinės terpės su įvairiais biologiškai aktyviaisiais junginiais yra plačiai pritaikomos pramonėje: žemės ūkyje, maisto pramonėje, vaistų ir kosmetikos gamyboje. Hidrazidų klasės dariniai taip pat gali būti potencialūs junginiai įeinantys į vaistų sudėtį, kurie gali įeiti į antibiotikų sudėtį, kurie būtų efektyvesni nei įprasti antibiotikai.

Projekto tikslas – ištirti susintetintų junginių antibakterines ir antioksidacines savybes, atrinkti aktyviausius junginius, papildyti jais mitybinę terpę brokoliams augti *in vitro*, nustatyti junginių poveikį brokolių antioksidacinėms ir antibakterinėms savybėms.

Norint pasiekti darbo tikslą buvo iškelti šie uždaviniai:

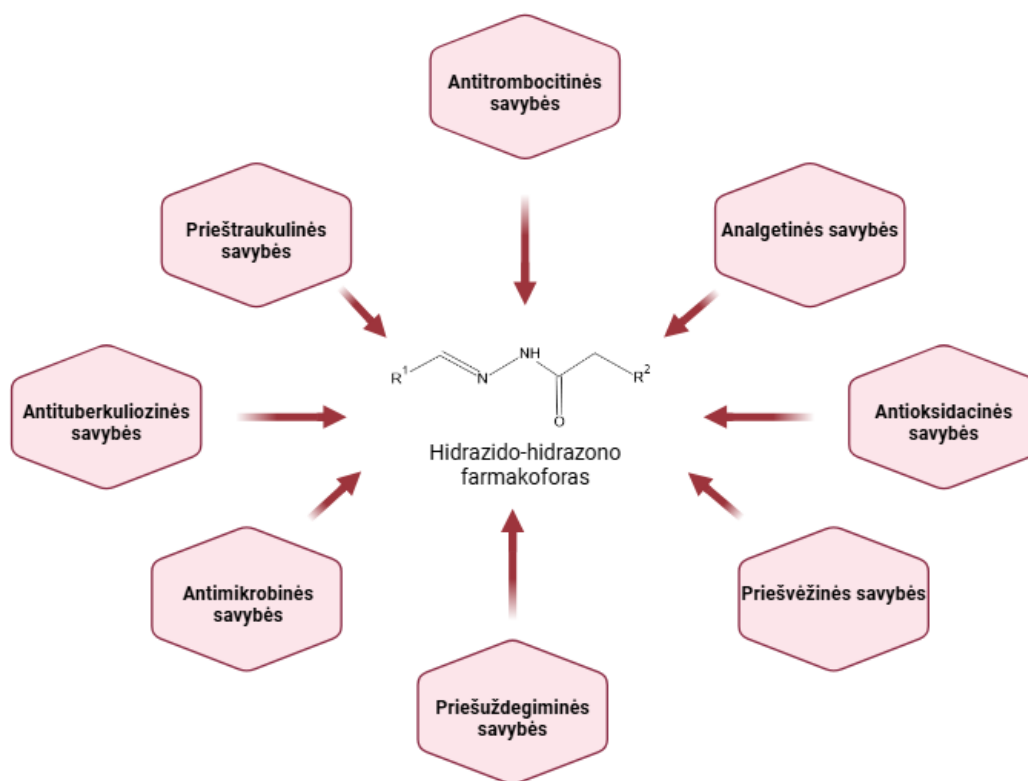
1. įvertinti susintetintų junginių antioksidacinį aktyvumą, taikant FRAP, ABTS, redukcinių savybių ir antibakterinio aktyvumo nustatymo metodus.
2. nustatyti brokolių *in vitro* ekstraktų antioksidacinį aktyvumą, taikant FRAP, ABTS, redukcinių savybių, antibakterinio aktyvumo ir DPPH nustatymo metodus.
3. ištirti brokolių *in vitro* ekstraktų chlorofilo *a* ir *b*, karotinoidų, *L*-prolino ir gliukozinolatų koncentracijas.
4. išanalizuoti brokolių ekstraktų flavonoidų, bendrųjų fenolinių junginių koncentracijas Folino-Kiokalto metodu bei superoksido dismutazės aktyvumą.

1. Literatūros apžvalga

Hidrazido ir hidrazono darinių yra daugelyje bioaktyviųjų molekulių sudėtyje ir jie pasižymi įvairiu biologiniu aktyvumu, todėl daugelis mokslininkų sintetina juos ir vertina jų biologinį aktyvumą [2]. Brokolių mitybinės terpės papildymas hidrazidų klasės junginiais gali būti ne tik didelis proveržis sveikatos srityje, bet ir medicinoje. Dėl to brokoliai sulaukė dėmesio dėl gebėjimo kaupti dideles gliukozinolatų ir kitų antrinių metabolitų koncentracijas, kurie padeda gydyti vėžį [3].

1.1. Hidrazidų sintezė ir savybės

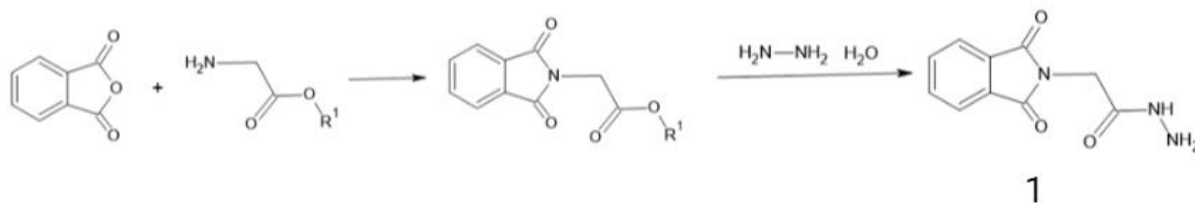
Heterocikliniai junginiai, turintys penkis ar šešis atomų žiedus, yra laikomi svarbiais ir tiksliniais vaistais farmacijoje ir medicinoje. Dėl šios priežasties jie suteikia daug medicininių ir biologinių pritaikymų [4]. Hidrazido ir hidrazono junginiai pasižymi plačiu biologiniu panaudojimu (žr. 1.1 pav.) t. y.: antibakteriniu, antituberkulioziniu, priešgrybeliniu, priešvėžiniu, priešūždegiminiu, prieštraukuliniu, analgetiniu, antivirusiniu poveikiu ir t. t.



1.1 pav. Hidrazido – hidrazono farmakoforo savybės

Pagrindinis būdas sintetinti hidrazido ir hidrazono darinius yra atitinkamos karboksirūgščių arba heterokarboksirūgščių hidrazidų reakcijos su skirtingais aldehidais arba ketonais įvairiuose organiniuose tirpikliuose, tokiuose kaip etanolis, metanolis ar butanolis [5]. Nustatyta, kad hidrazonai iš dalies slopina *S. aureus*, *E. coli* ir *B. subtilis* bakterijų augimą [6].

Ftalio anhidridas reaguoja su alkilglicinatu (metilu arba etilu), kad sudarytų alkil-2-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)acetatą (metilą arba etilą), kuris reaguoja su hidrazino hidratu sudarydamas 2-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)acetohidrazidą (žr. 1.2 pav).



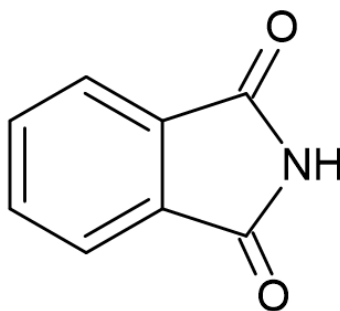
1.2 pav. Cheminė reakcija ftalio anhidrido su alkilglicinatu [7]

2-(1,3-Dioksoizoindolin-2-il)acetohidrazidas (1) yra naudojamas kaip pirmtakas susintetinti naujus veiksmingus junginius, tokius kaip 1,2,4-triazolas, 1,3,4-tiadiazolas, piridazinetrionas ir kt. [7]. Sintetintų hidrazido – hidrazono junginių molekulinę struktūrą galima patvirtinti spektriniais metodais. IR spektruose stebimos trys būdingos smailės. Smailės apie 1550 cm^{-1} atitinka C=N grupės buvimą. Karbonilo grupę (C=O) parodo smailė esanti apie 1650 cm^{-1} , o NH grupė randama 3050 cm^{-1} srityje [8].

1.1.1. Hidrazono darinių antivirusinis aktyvumas

Virusai yra maži infekciniai agentai, galintys daugintis tik gyvoje organizmo ląstelėje. Jie užkrečia visų tipų organizmus - žmones, gyvūnus ir augalus. El-Sabbagh'as [9] įvertino hidrazono darinių antivirusinį aktyvumą prieš hepatito A virusą, o Tian'as ir kiti [10] susintetino hidrazono darinius kaip galimus žmogaus imunodeficito viruso⁻¹ kapsidės baltymo taikinius. Tyrimas atskleidė, jog hidrazido-hidrazono (–CO–NH–N=CH–) dalis turi reikšmingą priešnavikinio agento vaidmenį. Taip pat, kai kurių karbohidrazido darinių priešvėžinį aktyvumą *in vitro* lemia jų gebėjimas slopinti dihidrofolato reduktazės fermentą, o pirolas ir izatinas dariniai turi citotoksinį poveikį kelioms vėžio ląstelių linijoms [11]. Taigi hidrazono junginiai, turi didelę reikšmę medicininėje chemijoje dėl savo įvairaus biologinio aktyvumo, o šiuo atveju priešvėžinio [12].

Ftalimido žiedas (izoindolino-1,3-dionas) (žr. 1.3 pav.) yra dar vienas perspektyvus farmakoforo subvienetas, tinkamas prisijungti prie hidrazono molekulės. Dėl hidrofobinio ftalimidų pobūdžio padidėja jų galimybė *in vivo* sistemose sukelti pokyčius įvairioms biologinėms membranoms [13]. Buvo ištirta, kad keli vaistai, turintys izoindolino-1,3-diono ir 2-oksindolų fragmentų, yra stiprūs priešvėžiniai vaistai pažengusiuose vystymosi etapuose.



1.3 pav. Ftalamido žiedas (izoindolino-1,3-dionas)

Įrodyta, kad vienos ar kelių elektronus atiduodančių metoksi- grupių įjungimas į benzeno žiedą sustiprina įvairių junginių priešvėžinį aktyvumą [14].

1.1.2. Hidrazono darinių antioksidacinis aktyvumas

Oksidacinis stresas, kurį sukelia reaktyviojo deguonies ir azoto rūšių susidarymas, yra laikomas pagrindiniu daugelio šiuolaikinių ligų, įskaitant diabetą, širdies ir kraujagyslių ligas, vėžį, virusinę infekciją ir įvairius virškinimo sutrikimus, priežastimi [15]. Antioksidantai dalyvauja organizmo gynybos mechanizme nuo patologijų, susijusių su laisvųjų radikalų ataka, sulėtindami arba visiškai slopindami reaktyviųjų radikalų sukeltus oksidacijos procesus. Dėl šios priežasties hidrazono dariniai yra dar viena reikšminga vaistų ir farmacinės chemijos pramonės sritis. Nustatyta, kad hidrazono junginių biologinis aktyvumas yra susijęs su aktyviu azometino $-NH-N=CH-$ farmakoforu [16] ir šie junginiai kartu su įvairiais heterocikliniais junginiais pasižymi įvairiu biologiniu aktyvumu, įskaitant priešvėžinį, antibakterinį, antivirusinį, antitrombocitinį [17], o taip pat ir antioksidacinį poveikį [18].

1.1.3. Hidrazono darinių antibakterinis aktyvumas

Tuberkuliozė yra lėtinė, infekcinė ir labiausiai paplitusi liga visame pasaulyje. Ją sukelia įvairios *Mycobacterium tuberculosis* padarės. Plaučiai, kepenys ir kaulai yra jautriausi infekcijai. Todėl mokslininkai susintetino hidrazono darinius, kurie pasižymi geru antituberkulioziniu poveikiu [19]. Kai kurie hidrazonai, kurie buvo susintetinti ir ištirti dėl jų antituberkuliozinio aktyvumo prieš įvairias mikobakterijų tuberkuliozės padarės, buvo pripažinti tinkamais gydyti tuberkuliozei. Tai apėmė darinius, tokius kaip izoniazido kilmės hidrazonai, izonikotinoilhidrazonų, piridilmetilenamino dariniai.

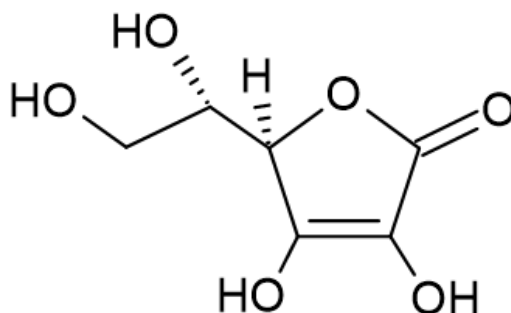
Teigiama, kad daugelis hidrazido-hidrazono darinių turi geras antibakterines ir priešgrybelines savybes [20]. Elektronų turintys azoto heterocikliniai junginiai yra reikšmingi įvairioje biologinėje veikloje. Buvo ištirta, kad indolai slopina keletą rūšių grybelių [21].

Pasaulyje labai staigiai išaugo bakterijų atsparumo prieš antibiotikus rodikliai. Atsiranda naujų atsparumo mechanizmų, dėl kurių sunku gydyti infekcines ligas. Siekdami suvaldyti šią pasaulinę problemą, vyriausybė imasi būtinų atsargumo priemonių ir remia naujų antimikrobinių vaistų kūrimo tyrimus [22]. Atsirandantis bakterijų atsparumas sukelia plačiai paplitusią įvairių infekcijų gydymo problemą. Todėl antimikrobinių medžiagų paieška yra nesibaigianti užduotis. Gera žinoma, kad hidrazono grupė vaidina svarbų vaidmenį antimikrobinėje ir antibakterinėje veikloje [20]. Todėl šiomis dienomis buvo sukurta nemažai hidrazono darinių, kurių antibakterinis aktyvumas yra vertinamas, siekiant išgauti geriausiomis savybėmis pasižymintį junginį. [23]. Wang'as ir kiti [24] susintetino hidrazono darinius, pasižymintį dideliu antibakteriniu aktyvumu ir poveikiu prieš įvairias bakterijų padarės [25]. Verta paminėti, kad hidrazido-hidrazono dalis taip pat yra antimikrobinio aktyvumo vaistų, tokių kaip nitrofurazonas, furazolidonas ar nitrofurantoinas, cheminėje struktūroje [26].

1.2. Antioksidantai naudojami pramonėje

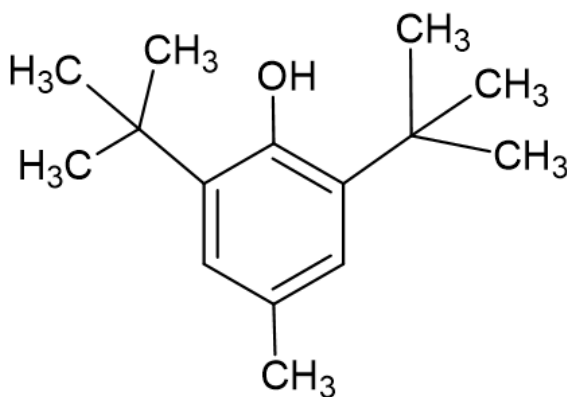
Pastaruoju metu įvairių disciplinų mokslininkai plačiai tiria naujus natūralius arba susintetintus junginius, kaip galimus antioksidantus, galinčius apsaugoti ląsteles nuo oksidacinio streso arba jį sumažinti [27].

Askorbo rūgštis yra vitaminas C, kuris augaluose gali susidaryti keliais būdais. Ši rūgštis pasižymi stipriomis redukuojančiomis savybėmis ir gali būti laikoma pagrindiniu [28]. Askorbo rūgščiai (žr. 1.4 pav.) būdinga stipriai oksiduotis pašalinant iš aplinkos deguonį. Be to, askorbo rūgštis gali reaguoti su laisvaisiais radikalais, sustabdydama grandininės reakcijos, kurios gali sukelti pavojingą poveikį organizmams, pvz., burnos ertmės, virškinimo sistemos ir kitos patologijos. Tai leidžia išlaikyti stabilius kitus svarbius elementus, tokius kaip vitaminas A, E, folio rūgštis ir tiaminas organizme [29].



1.4 pav. Askorbo rūgšties cheminė struktūra

Butilintas hidroksitoluenas (BHT) (žr. 1.5 pav.) yra dažniausiai naudojamas sintetinis antioksidantas ir pripažintas kaip saugiu naudoti maisto produktuose, kuriuose yra riebalų, taip pat naudojamas ir vaistų, naftos produktų, gumos, naftos pramonėse. Siekiami paspartinti antioksidantų atradimo procesą, mokslininkai sukūrė ir susintetino BHT darinį, skirtą pagerinti jo antioksidacines savybes, turinčias platų antioksidacinį veikimo spektrą, žymiai padidinant radikalų šalinimo gebėjimą ir kitas fizines savybes. Tačiau antioksidacinio aktyvumo nepakanka, kad jie būtų naudojami maisto ir kitose pramonės šakose kaip tiesioginiai ar netiesioginiai priedai. Renkantis antioksidantus reikia atsižvelgti į tam tikrus veiksnius, tokius kaip efektyvi koncentracija, terminis stabilumas ir synergizmas. Moksliniuose straipsniuose teigiama, kad kai kurie antioksidantai gali turėti neigiamą poveikį sveikatai. Dėl šios priežasties sintetinių antioksidantų saugumas yra išbandytas ir turi būti patvirtintas naudoti maiste.

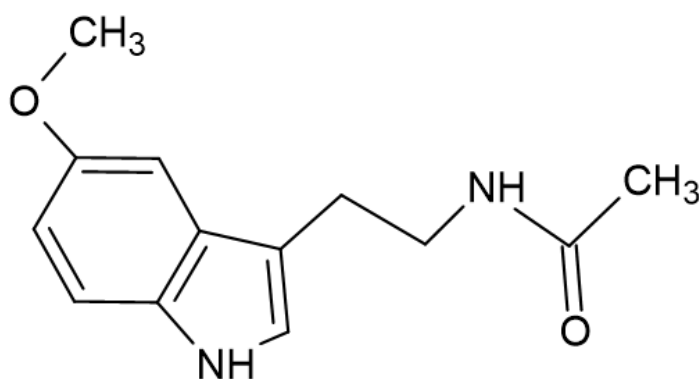


1.5 pav. BHT (Butilintas hidroksitoluenas) cheminė struktūra

BHT yra balta, kristalinė, kieta, turinti mažą molekulinę masę, medžiaga. Ji tinka terminiam apdorojimui, tačiau nėra pakankamai stabilus. Kadangi BHT yra plačiai naudojamas kaip maisto

konservantas, BHT biocheminės savybės buvo plačiai ištirtos. Tyrimai rodo, jog didelės BHT koncentracijos sukelia centrilobulinę nekrozę, padidina transaminazių aktyvumą serume ir hemoragiją kepenyse. Taip pat nustatyta, kad BHT padidina žiurkių ir kačių hepatocitų mitozinį aktyvumą kaip hepatokarcinogenezės skatintoją. Po dviejų kartų tyrimo su žiurkėmis BHT buvo apibūdintas kaip galimas žiurkių kepenų kancerogenas [30].

Melatoninas (žr. 1.6 pav.) yra endogeninis hormonas, gaunamas iš triptofano, kuris pagrinde išsiskiria iš kankorėžinės liaukos. Melatoninas reguliuoja daugelį biologinių funkcijų, tokių kaip miegas, imunitetas ir reprodukcija. Melatoninas turi laisvųjų radikalų šalinimo, priešuždegiminį ir antioksidacinį poveikį. Jis pašalina reaktyvias deguonies ir azoto rūšis ir padidina antioksidacinę apsaugą, todėl apsaugo nuo audinių pažeidimo. Melatoninas apsaugo nuo degeneracinių centrinių nervų sistemos pokyčių Alzheimerio ir Parkinsono ligos, sumažina laisvųjų radikalų žalą DNR, kuri gali sukelti vėžį. Dėl šios priežasties, melatoninas turi teigiamą poveikį organizmui [31].



1.6 pav. Melatonino cheminė struktūra

Buvo ištirtas melatonino vaidmuo augaluose, naudojant *in vitro* augalų audinių kultūros metodus. Melatoninas gali imituoti ir modifikuoti augsino ir citokinino santykį audiniuose, esančiuose *in vitro* sistemose [32].

1.3. Brokolių biologinis aktyvumas

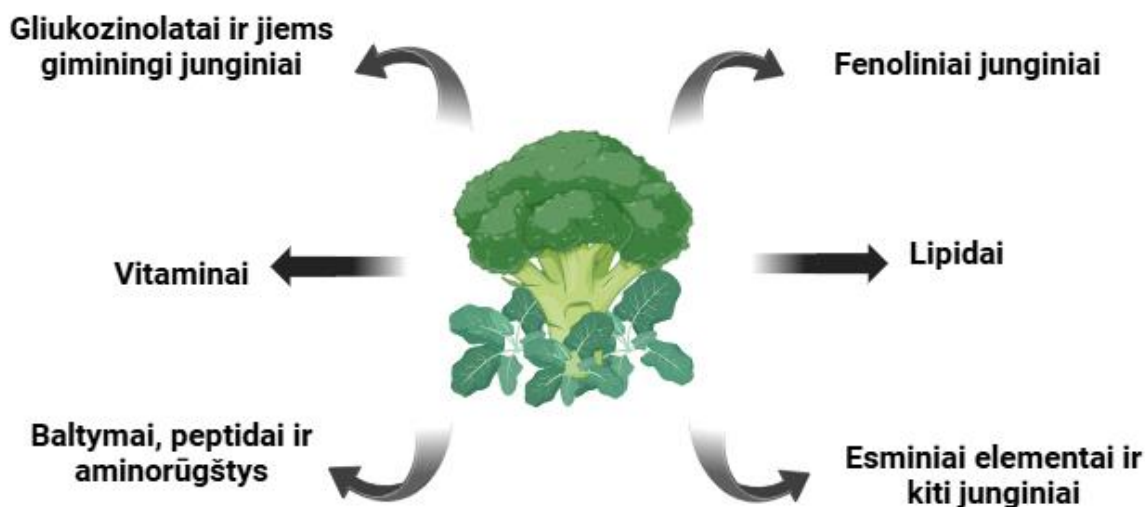
Brokoliuose (lot. *Brassica oleracea*) yra daug sveikatai naudingų junginių, tokių kaip vitaminai, gliukozinolatai, fenoliniai junginiai ir su maistu būtini mineralai; taigi, tai yra naudinga sveikatai, o ne tik pagrindinė mityba, o brokolių vartojimas ilgainiui didėja [33]. Brokoliai (žr. 1.7 pav.), kaip manoma, yra kilę iš rytinės Viduržemio jūros regiono.



1.7 pav. Brokolis (lot. *Brassica oleracea*) [34]

Šiais laikais vartojami visame pasaulyje ir yra labai vertinami ne tik dėl savo skonio, bet taip pat dėl kai kurių antioksidacinių savybių, kurios daugiausia buvo priskiriamos gliukozinolatomis ir jų skilimo produktams bei fenoliniams junginiams [35]. Todėl kai kurių iš brokolių sveikatą stiprinančių junginių įtraukimas tiesiai į farmacinius ar kitus maisto produktus yra saugus ir veiksmingas būdas apsaugoti nuo pastaruoju metu labiausiai paplitusių ligų [36]. Kaip matyti iš paveikslo (žr. 1.8 pav.), brokoliuose yra randami įvairiausi junginiai, kurie jiems suteikia antioksidacinių, antibakterinių savybių. Brokoliai yra žinomi kaip viena maistingiausių daržovių, nes juose yra visų reikalingų medžiagų, t. y. vitaminų, mineralų, antrinių metabolitų ir skaidulų, turinčių išskirtinę naudą sveikatai. Sieros darinių, turinčių gliukozinolatų ir izotiocianatų skilimo produktai yra aktyvūs priešvėžinių savybių agentai. Vaistines brokolių savybes lemia šie biologiškai aktyvūs junginiai, skatinantys įvairias funkcijas, įskaitant antioksidantų veikimą, fermentų reguliavimą ir apoptozės bei ląstelių ciklo kontrolę.

Brokoliuose yra daug vitaminų, antioksidantų ir antikancerogeninių junginių, todėl jie apibūdinami kaip didelės maistinės vertės daržovės. Brokoliuose taip pat yra svarbių biologiškai aktyvių junginių, tokių kaip polifenoliai, flavonoidai, karotenoidai, sulforafanas, gliukozinolatai ir daugelis kitų. Jame yra vitaminų A, B6, B12, C, D, E, K, tiamino, riboflavino, niacino, folio rūgšties ir nedidelio kiekio



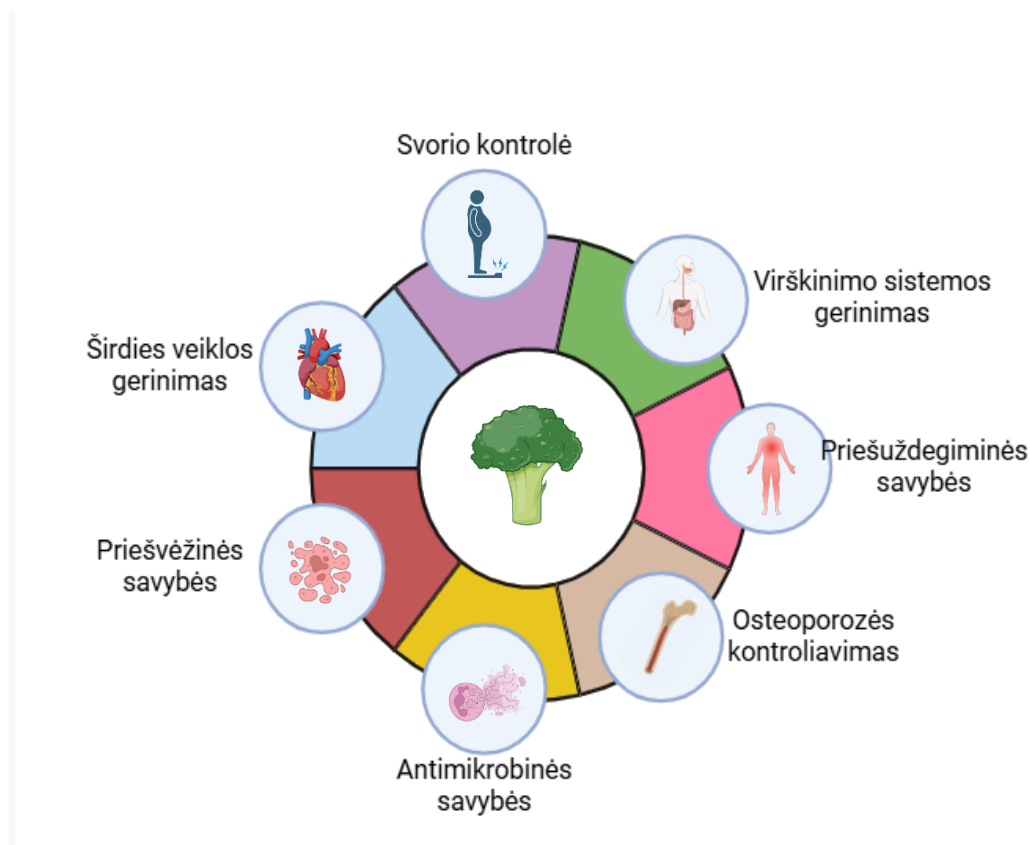
1.8 pav. Junginiai esantys brokoliuose (lot. *Brassica oleracea*)

pantoteno rūgšties, cholino ir betaino. Jame taip pat yra kalcio, kalio, natrio, fosforo ir nedideli kiekiai cinko, seleno, geležies, magnio ir mangano [37].

Brokolių biologines savybes lemia bioaktyvūs junginiai, kurie sukelia įvairius fiziologinius atsakus, įskaitant antioksidantų veikimą, fermentų reguliavimą bei ląstelių ciklo kontrolę. Tikėtinas biologinis poveikis yra dėl fenolinių junginių, vitaminų, gliukozinatų ir jų medžiagų apykaitos produktų cheminės struktūros [38].

Tyrimai rodo, kad dieta, kurioje gausu kryžmažiedžių šeimos daržovių, padeda sumažinti vėžio išsivystymo riziką. Šios šeimos brokoliai pasižymi daugybe biologiškai aktyvių medžiagų, stiprinančių sveikatą. Iš šių bioaktyvių junginių ypatingo dėmesio nusipelno gliukozinolatai, fenoliai, vitaminai C, B1, E ir selenas. Suvalgojus 150 g brokolių per dieną, patenkinamas suaugusio žmogaus vitaminų E, A, B1 ir C poreikis, sustiprėja imuninė sistema. Iš brokolių išskirtos bioaktyvios medžiagos gali neutralizuoti kancerogenus, kol jie nepažeidžia DNR ir transformuoja ląsteles [39].

Kryžmažiedžių daržovėse, šiuo atveju brokoliuose, yra daug skaidulų, mažai kalorijų, jose gausu vitaminų ir mineralų, kurie naudingi normalioms žmogaus fiziologinėms funkcijoms, o kasdienis brokolių vartojimas taip pat gali sumažinti daugelio ligų vystymąsi (žr. 1.9 pav.) [40].

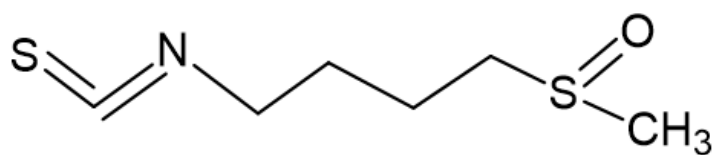


1.9 pav. Brokolių nauda žmogaus mitybai ir sveikatai

Brokoliai yra geras maistinių skaidulų šaltinis, kuris padeda virškinti, skatina sotumo jausmą ir prisideda prie sveikos virškinimo sistemos ir širdies veiklos [41]. Tai gali padėti sumažinti cholesterolio kiekį, palaikyti sveiką kraujospūdį ir pagerinti širdies ir kraujagyslių veiklą. [42]. Svarbu paminėti, jog brokoliai turi daug naudos sveikatai dėl savo turtingo maistinių medžiagų kiekio [40].

1.3.1. Brokolių antioksidacinis aktyvumas

Uždegimas yra natūralus imuninės sistemos atsakas, apsaugantis organizmą nuo traumų, infekcijų ar kitų kenksmingų dirgiklių. Tačiau lėtinis uždegimas gali pakenkti sveikatai ir prisidėti prie įvairių ligų, tokių kaip širdies ligos, artritas ir tam tikros vėžio rūšys. Įvairios daržovės gali sumažinti uždegimą, nes juose yra daug fitocheminių medžiagų, antioksidantų ir kitų biologiškai aktyvių junginių. Brokoliuose esantys antioksidantai gali neutralizuoti laisvuosius radikalus ir apsaugoti žmogaus organizmą nuo oksidacinio streso, kuris yra pagrindinis kai kurių vėžio rūšių ir širdies ligų priežastis [43]. Tyrimai rodo, kad sulforafanas (žr. 1.10 pav.), esantis brokoliuose, gali padėti sumažinti uždegimą, nes slopina tam tikrų fermentų, skatinančių uždegimą organizme, aktyvumą [44]. Taip pat nustatyta, kad jis skatina antioksidacinių fermentų, apsaugančių ląsteles nuo su uždegimu susijusių pažeidimų, gamybą [45].



1.10 pav. Sulforafano cheminė struktūra

Kadangi brokoliuose yra gausu sulforafano – sieros turinčio junginio, jo priešvėžinės savybės buvo plačiai ištirtos. Nustatyta, kad sulforafanas gali slopinti vėžio ląstelių augimą ir sukelti apoptozę sergant įvairių tipų vėžiu, įskaitant krūties, prostatos, plaučių ir tiesiosios žarnos vėžį. Tyrimai rodo, kad sulforafanas turi terapinį poveikį ir veikia įvairiais mechanizmais, pavyzdžiui, detoksikuodamas kancerogenus ir oksidantus, blokuodamas I fazės metabolinius fermentus ir sustabdydamas ląstelių ciklą G2 ir G1 fazėse tam, kad slopintų ląstelių dalijimąsi ir dauginimąsi [46].

Pastaruoju metu brokolių daigai susilaukė daug dėmesio, nes jų biologiškai aktyvios sudedamosios dalys šiek tiek skiriasi nuo subrendusių brokolių ir, kaip ištirta, yra net veiksmingesnės už brokolius reaktyviųjų deguonies rūšių sukeliamų ligų prevencijai [47]. Brokolių daigų daiginimas ir vartojimas nuolatos auga. Nors yra daug straipsnių apie visiškai išsivysčiusių brokolių antioksidacinį aktyvumą, šiomis dienomis yra labai mažai informacijos apie brokolių daigų antioksidacinį aktyvumą. Be to, kol kas nėra daug informacijos apie brokolių daigų lakiųjų junginių antioksidacinį aktyvumą. Ankstesni brokolių tyrimai parodė, kad juose yra antioksidantų, įskaitant karotinoidus, α -tokoferolius, askorbo rūgštį ir fenolinius junginius. Žinoma, kad šie antioksidantai sugeria reaktyviasias deguonies rūšis ir apsaugo ląsteles nuo oksidacinio pavojaus [48]. Be to, buvo nustatyta, kad brokoliai turi stipresnį antioksidacinių savybių nei daržovės, pavyzdžiui, žirniai, paprika, burokėliai arba salotos [49].

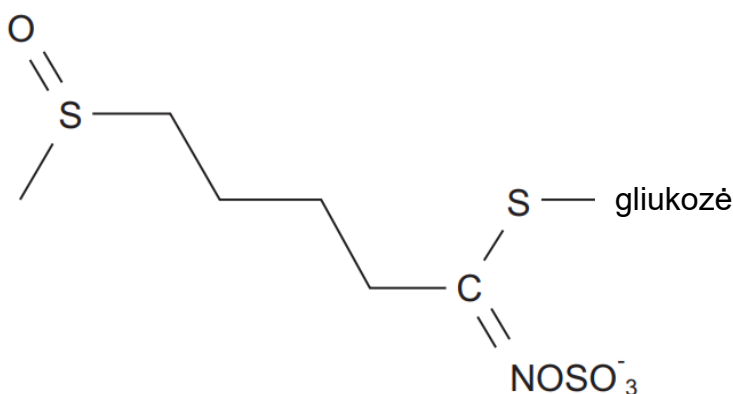
Brokoliai savo sudėtyje turi daugybę fitocheminių medžiagų, tokių kaip gliukozinolatai ir fenoliniai junginiai, taip pat gausų vitaminų ir mineralų kiekį. Šios medžiagos suteikia stiprų antioksidacinį poveikį. Taigi brokolių įtraukimas į kasdienę mitybą sumažina polinkį susirgti vėžiu. Daugybė tyrimų nurodė brokolių, kaip chemoprevecinio žaliajo maisto, svarbą mityboje dėl sulforafano, izotiocianato, gliukozinolatų pirmtakų, vadinamų gliukorafaninu, susidarančių hidrolizės reakcijos metu [50].

1.3.2. Brokoliuose esančių gliukozinolatų biologinis aktyvumas

Gliukozinolatai yra sieros turinčių junginių grupė, randama kryžmažiedėse daržovėse, tokiose kaip brokoliai. Šie junginiai yra atsakingi už šių daržovių aromatą. Gliukozinolatai yra antriniai metabolitai, kurie veikia kaip augalo apsauga [51]. Gliukozinolatai taip pat yra vandenyje tirpūs, anijoniniai, nelakūs ir karščiui stabilūs junginiai, kurie yra aptinkami augalų ląstelės vakuolėje. Gliukozinolatai priskiriami S-glikozidams, nes jie susidaro redukuojantis cukrui ir sierai molekulėje. Gliukozės molekulė, esanti gliukozinolate, suteikia junginiui hidrofilines savybes [52].

Iš brokoliuose esančių gliukozinolatų ypatingas dėmesys turėtų būti skiriamas gliukorafaninui (žr. 1.11 pav.), kuris yra viena svarbiausių natūralių medžiagų, pasižyminčių antikancerogeninėmis savybėmis. Vienas iš gliukozinolato skilimo produktų yra indolil-3-karbinolis, kuris reaguoja su askorbo rūgštimi ir gamina askorbinogeną; šis junginys taip pat turi antioksidacinį aktyvumą [53].

Brokoliuose taip pat yra keletas mikroelementų, reikalingų tinkamam žmogaus kūno funkcionavimui. Selenas yra vienas iš labiausiai pastebimų mikroelementų, kuris apsaugo nuo širdies ir kraujagyslių ligų bei vėžio. Seleno vartojimas gerina imunitetą ir apsaugo nuo nuosėdų susikaupimo arterijose.



1.11 pav. Gliukofaranino cheminė struktūra

Selenocisteino formoje jis taip pat apsaugo nuo oksidacinio ląstelių pažeidimo padidindamas fermentų, tokių kaip glutathiono peroksidazė, aktyvumą. Taip pat pranešama, kad brokoliuose esanti geležis apsaugo nuo anemijos nėščioms moterims ir krūtimi maitinančioms motinoms. Dėl didelio kalcio kiekio brokoliuose jie yra puikus maistas žmonėms, linkusiems į osteoporozę. Nedideli kiekiai kalio, fosforo, cinko, mangano ir magnio taip pat atlieka svarbų vaidmenį kaip fermentų kofaktoriai ir reguliuoja tarpląstelinį ryšį [54].

1.3.3. Brokoliuose esančių vitaminų biologinis aktyvumas

Brokoliai yra gausus antioksidantų šaltinis, įskaitant vitaminus C, K ir A. Jame taip pat yra keletas svarbių mineralų, įskaitant kalį, kalcį ir geležį. Šie antioksidantai padeda apsaugoti organizmą nuo oksidacinio streso ir mažina uždegimą.

Brokoliai yra puikus vitamino C šaltinis, kuris yra labai stiprus antioksidantas. Vitaminas C pašalina laisvuosius radikalus ir padeda organizme regeneruoti kitus antioksidantus, tokius kaip vitaminas E [55]. Didelis vitamino C kiekis stiprina imuninę sistemą ir skatina kolageno gamybą, žaizdų gijimą ir geležies pasisavinimą [56]. Kadangi brokoliai yra sukaupę didelius kiekius kalcio, tai padeda palaikyti stiprius kaulus ir osteoporozės profilaktikai [57]. Vitaminas C ne tik apsaugo nuo

aterosklerozės, bet ir prisideda prie adrenalino ir endogeninio serotonino susidarymo. Jis veikia ląstelių gynybos procesuose, kaip jau minėta, palengvina geležies pasisavinimą žarnyne ir pašalina toksiškus sunkiuosius metalus (tokius kaip kadmis, nikelis ir švinas), su kuriais gali susijungti [29].

Jame taip pat yra vitamino K, kuris yra būtinas kaulų sveikatai. Didelis vitamino A ir kitų antioksidantų kiekis brokoliuose palaiko akių sveikatą ir gali padėti išvengti su amžiumi susijusios geltonosios dėmės degeneracijos ir kataraktos [56].

1.4. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

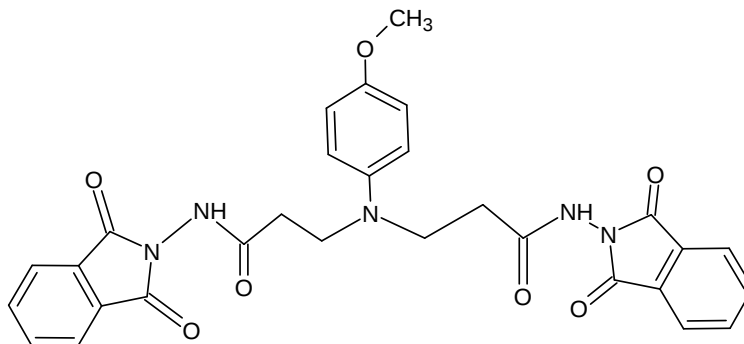
Bioaktyvieji junginiai sulaukia didelio dėmesio dėl savo plataus panaudojimo ir antioksidacinio bei antibakterinio aktyvumo. Keletas tyrimų parodė, kad bioaktyvieji junginiai gali padidinti chemoterapijos veiksmingumą, o kai kuriais atvejais palengvinti kai kuriuos chemoterapinių vaistų šalutinius poveikius. Hidrazidų klasės biologiškai aktyvieji junginiai pasižymi įvairiu aktyvumu kaip pvz.: antibakteriniu, priešgrybeliniu, priešvėžiniu, priešuždegiminiu, antivirusiniu poveikiu ir t. t. [57].

Augant paklausai ir plečiantis pramonės sektoriams norima sukurti vis veiksmingesnius produktus, kurie pasižymėtų sterilumu ir aukštu antioksidaciniu ir antibakteriniu aktyvumu. Dėl šios priežasties, analizės metu buvo nustatomas susintetintų hidrazidų klasės junginių biologinis aktyvumas, o vėliau jų įtaka brokolių MS *in vitro* terpių antrinių metabolitų susidarymui.

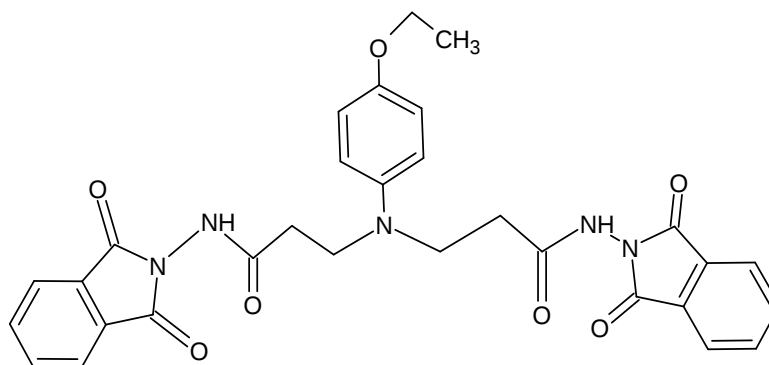
2. Tiriamoji dalis

2.1. Tyrimo planavimas ir tyrimų objektas

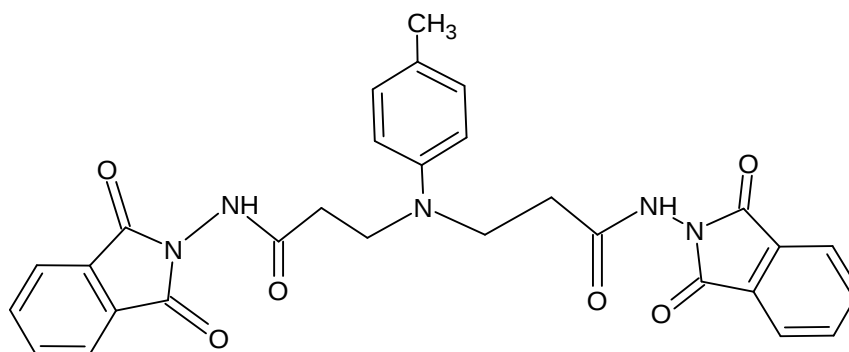
Atlikus išsamią literatūros analizę, tyrimo objektais buvo parinkti susintetinti hidrazonai (žr. 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 pav). Junginiai buvo susintetinti Organinės chemijos katedroje m. d. Ingridos Tumosienės.



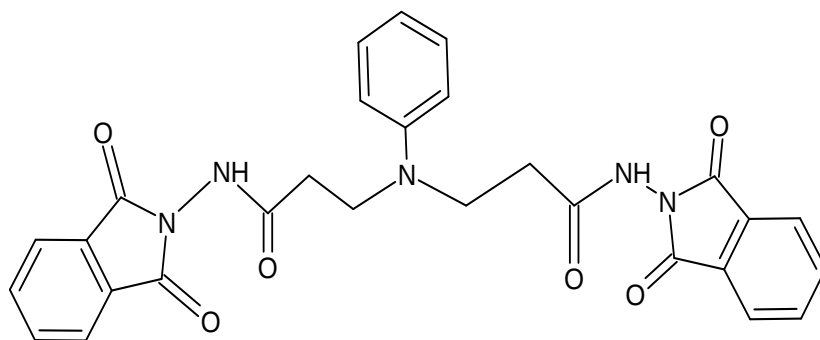
2.1 pav. 3,3'-((4-Metoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas) (1 junginys)



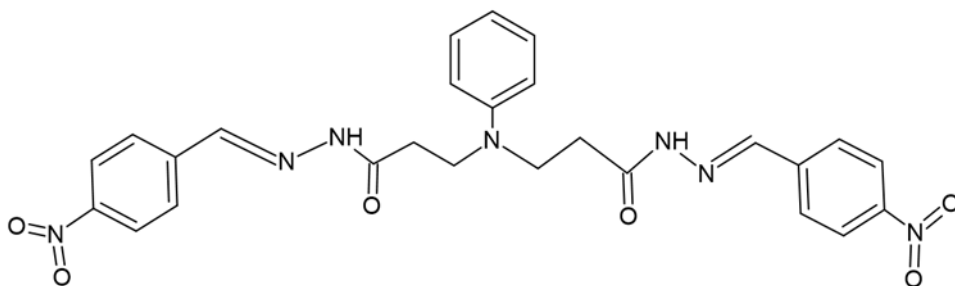
2.2 pav. 3,3'-((4-Etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas) (2 junginys)



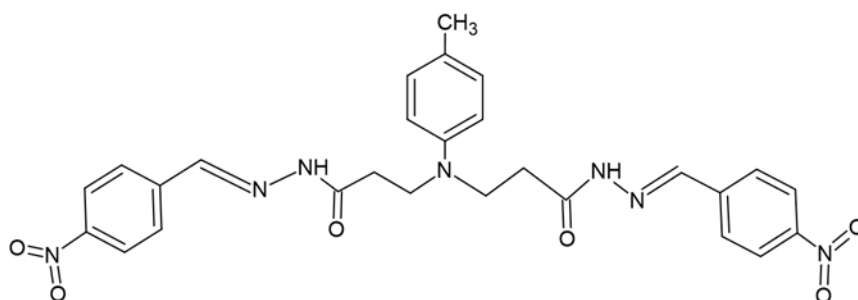
2.3 pav. 3,3'-((p-Tolilazanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas) (3 junginys)



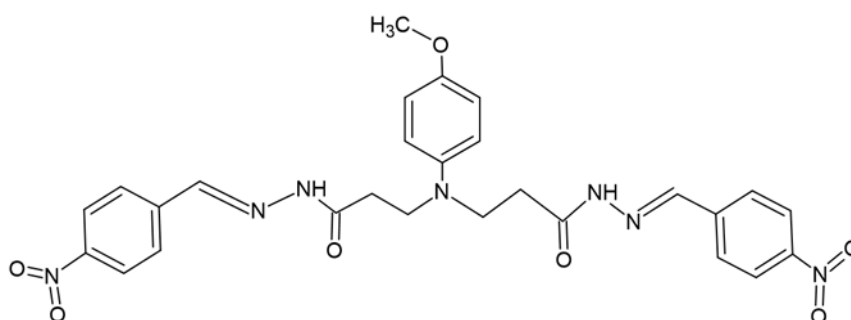
2.4 pav. 3,3'-(Fenilazandiil)bis(N-(1,3-diksoizoindolin-2-il)propanamidas) (4 junginys)



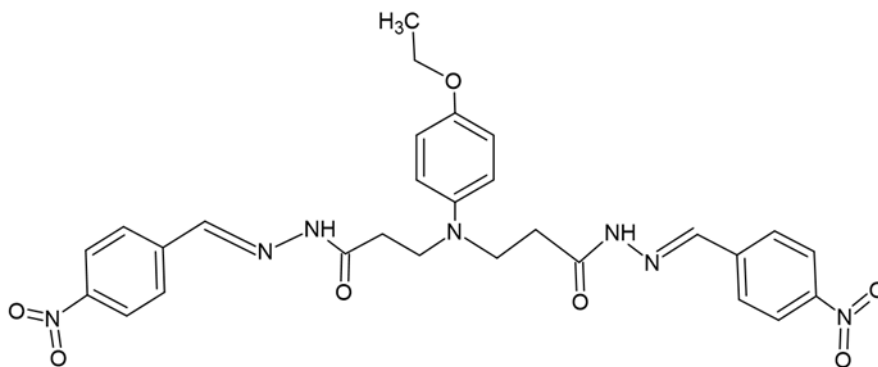
2.5 pav. 3,3'-(Fenilazandiil)bis(N'-(4-nitrobenziliden)propano hidrazidas) (5 junginys)



2.6 pav. 3,3'-(p-Tolilazandiil)bis(N'-(4-nitrobenziliden)propano hidrazidas) (6 junginys)



2.7 pav. 3,3'-((4-Metoksifenil)azanediil)bis(N'-(4-nitrobenziliden)propano hidrazidas) (7 junginys)



2.8 pav. 3,3'-((4-Etoksifenil)azanediil)bis(N'-(4-nitrobenzyliden)propano hidrazidas) (8 junginys)

Norint ištirti biologiškai aktyviųjų junginių antioksidacinį ir antibakterinį poveikį augalams *in vitro* buvo naudotos brokolių sėklos. Tyrimai buvo atliekami Kauno technologijos universitete, Cheminės technologijos fakultete, Biotechnologijos laboratorijoje.

2.1.1. Darbo priemonės ir prietaisai, naudoti tyrimams atlikti

Darbo priemonės ir prietaisai, kurie buvo naudojami tyrimams (žr. 2.1 lentelė).

2.1 lentelė. Naudotos priemonės ir įrankiai

Nr.	Laboratorijoje naudotos priemonės
1.	Svarstyklės <i>SHIMADZU ATX84</i> ;
2.	Automatinės pipetės <i>Eppendorf</i> ;
3.	Autoklavas <i>Certoclav</i> ;
4.	Karšto vandens vonelė <i>Memmert</i> ;
5.	Horizontalaus srauto laminaras 1) <i>Telstar BV – 100</i> ; 2) <i>Holten Laminair</i> ;
6.	Spektrofotometras <i>SUIMADZU UV – 1280</i> ;
7.	Centrifuga 1) <i>Hettich universal 320R</i> ; 2) <i>Medlab mini centrifuga</i> ;
8.	Purtyklė <i>VELP Scientifica</i> ;
9.	Termostatas <i>Binder</i> ;
10.	pH – metras <i>winLAB</i> ;
11.	Termostatuojamas kratytuvas <i>Environmental shaker-incubator ES-20</i> ;

2.1.2. Tyrimo metu naudoti reagentai

Sąrašas nurodo kokie reagentai buvo naudoti analizių metu:

- 1) Acetato buferis (pH 3,6);
- 2) $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$;

- 3) TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinas) ištirpintas 40 mmol/L HCl;
- 4) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$;
- 5) ABTS – 2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolino-6-sulfonrūgštis) radikalas;
- 6) Fosfatinis buferis (pH 7,4);
- 7) FeCl_3 ;
- 8) $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$;
- 9) Trichloracto rūgštis;
- 10) Ciprofloksacinas;
- 11) Nikotino rūgštis;
- 12) NH_4NO_3 ;
- 13) KNO_3 ;
- 14) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
- 15) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
- 16) KH_2PO_4 ;
- 17) KI;
- 18) H_3BO_3 ;
- 19) $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$;
- 20) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
- 21) $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
- 22) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$;
- 23) $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$;
- 24) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
- 25) $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
- 26) Mioinozitolis;
- 27) Piridoksinas – HCl;
- 28) Tiaminas – HCl;
- 29) Glicinas;
- 30) Sacharozė;

- 31) Agar – agaras;
- 32) C_2H_5OH ;
- 33) $HgCl_2$;
- 34) $NaCl$;
- 35) Triptonas;
- 36) *L*-prolinas;
- 37) Metanolis;
- 38) Natrio tetrachlorpaladatas;
- 39) K/Na fosfatinis buferis;
- 40) Ditiotritolis (DTT);
- 41) Fenilmetilsufonilfluoridas (PMSF);
- 42) DMSO;
- 43) Polivinilpirolidonas;
- 44) Tris-HCl buferis
- 45) *L*-metioninas;
- 46) Nitromėlynasis tetrazolis;
- 47) Tritonas X- 100;
- 48) Riboflavinai.

2.2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.2.1. Junginių antioksidacinis aktyvumas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną

Junginiai 20 mM buvo ištirpinti dimetilsulfoksido.

Tyrimui buvo ruošiami tolimesni reagentai: 300 mM acetato buferis (pH=3,6) ir 10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinas) yra ištirpinami 40 mmol/L HCl, $FeCl_3 \times 6H_2O$ (20 mmol/L). FRAP reagentas ruošiamas su 25 ml 300 mM acetato buferiu, 2,5 ml 10 mmol TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazino) ir 2,5 ml $FeCl_3 \times 6H_2O$ (20 mmol/L).

Bandiniai: 50 μ L mėginio yra sumaišoma su 3 ml FRAP reagentu.

Tuščias bandinys: 50 μ L DMSO ir 1,5 ml FRAP reagento.

Reakcijos mišinys matuojamas 593 nm bangos ilgyje spektrofotometriškai.

Ruošiama kalibracinė kreivė: $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (5, 10, 15, 20; 25 $\mu\text{mol/L}$). Reikšmė apskaičiuojama pagal kalibracinę kreivę $\mu\text{mol/L Fe(II)/L}$. Tuščias kalibracinės kreivės mėginys – 3 ml FRAP ir 7 ml H_2O .

2.2.2. Junginių antioksidacinio aktyvumo nustatymas 2,2'-azinobis (3-etil-benzotiazolino-6-sulfonrūgšties) radikalo slopinimo metodu

Pirmiausia išmatuojama ABTS tirpalo šviesos sugertis 734 nm, kurio šviesos sugertis turi būti 1,0-1,5 intervale.

Į šį 0,5 ml ekstraktą įpilama 1,7 ml fosfato buferio (20 mM) ir 0,3 ml praskiesto ABTS tirpalo. Nustatoma junginių ABTS šviesos sugertis 734 nm bangos ilgyje.

Tuščias bandinys buvo fosfatinis buferis (20 mM).

$$\text{ABTS radikalo slopinimas (\%)} = \frac{A_B - A_A}{A_B} \cdot 100 \%; \quad (2.1)$$

čia A_B – praskiesto ABTS tirpalo šviesos sugerties dydis;

A_A – tiriamojo junginio šviesos sugerties dydis.

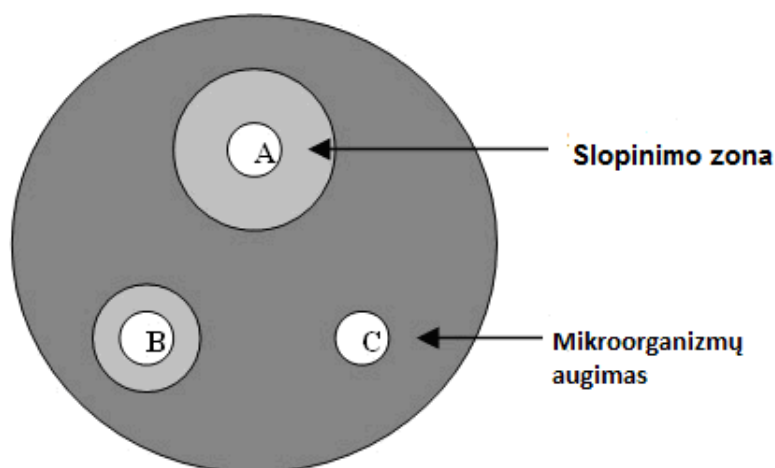
2.2.3. Junginių redukcinių (antioksidacinių savybių) nustatymas

Paruošiami biologiškai aktyvių junginių tirpalai (20 mM). Į 0,5 ml mėginius, supilama 1,25 ml 0,2 M fosfatinio buferio bei 1,25 ml 1% $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Šie yra sumaišoma ir inkubuojama 50 °C temperatūroje 20 min. Po to pridedama 1,25 ml 10 % trichloracto rūgšties ir sumaišoma. Jeigu mėgintuvėlio dugne yra nuosėdų, ekstraktas dar centrifuguojama 5 min.

Nucentrifuguoto tirpalo 1,25 ml sumaišoma su 1,25 ml distiliuotu vandeniu ir 0,25 ml 0,1 % FeCl_3 . Išmatuojami bandinių šviesos sugertis, kai bangos ilgis yra 700 nm. Tuščias mėginys: 1 ml 0,2 M fosfatinio buferio ir 1,0 ml 1% $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Kuo didesnė šviesos sugertis, tuo didesnės redukcines savybes.

2.2.4. Biologiškai aktyviųjų junginių aktyvumo nustatymas agaro difuziniu metodu

Ant LB terpės *Petri* lėkštelėse užpiltos *E.coli* ir *B.subtilis* bakterijų suspensijos 50 μl . Sudedami šeši popieriniai diskai, ant kurių buvo užpilti 50 μl antibiotiko ir biologiškai aktyviųjų junginių tirpalai. Paruoštos *Petri* lėkštelės patalpinamos į termostatą, kuriame yra palaikoma 37 °C temperatūra, tinkama bakterijų kolonijoms augti. Po vienos dienos yra stebimas bakterijų augimo pakitimas esant antibiotiko ir biologiškai aktyviųjų junginių įtakai.



2.9 pav. Tiriamųjų biologiškai aktyviųjų junginių antibakterinio aktyvumo nustatymas agar difuziniu metodu

2.2.5. Brokolių auginimas *in vitro* su biologiškai aktyviaisiais junginiais

Darbo eiga:

- 1) Paruošiama maitinamoji brokolių terpė:

Murashige – Skoog (MS);

- MS;
 - MS + 2 junginys (20 mM);
 - MS + 4 junginys (20 mM);.
- 2) Atliekamas brokolių sėklų išsterilinimas
 - 3) Sėklos yra sudaiginamos *in vitro* sistemoje.

2.2.6. Brokolių sėklų sterilinimas

Brokolių sėklos sterilinamos 70 % C_2H_5OH – 5 min, 1,5 % 10 % $HgCl_2$ – 10 min ir 3 kartus steriliu distiliuotu vandeniu. Sėklų sodinimas į *Petri* lėkštes vykdomas laminare. Vėliau laminare yra sterilinamas ultravioletiniais spinduliais bei etanoliu (70 %).

2.2.7. Maitinamosios terpės paruošimas brokoliams daiginti

Murashige & Skoog (MS) terpė yra plačiausiai naudojama maitinamoji terpė augalų kultūroms auginti. Svarbus šios terpės išskirtinumas yra didelės nitrato, kalio ir amonio jonų koncentracijos (žr. 2.2 lentelė).

2.2 lentelė Maitinamosios Murashige & Skoog (MS) terpės sudėtis

Reagentai	Koncentracija tirpale mg/L	Koncentracija terpėje mg/L
Makroelementai ^b		
NH_4NO_3	33000	1650
KNO_3	38000	1900

CaCl ₂ · 2H ₂ O	8800	440
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	7400	370
KH ₂ PO ₄	3400	170
Mikroelementai ^c		
KI	166	0,83
H ₃ BO ₃	1240	6,2
MnSO ₄ · 4H ₂ O	4460	22,3
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	1720	8,6
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	50	0,25
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	5	0,025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	5	0,025
Geležies šaltinis ^c		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	5560	27,8
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	7460	37,3
Organiniai priedai ^c		
Mioinozitolis	20000	100
Nikotino rūgštis	100	0,5
Piridoksinas-HCl	100	0,5
Tiaminas-HCl	100	0,5
Glicinas	400	2
Sacharozė		30000
Agar-agaras		5

b - 50 ml tirpalo pilama į terpę;

c – 5 ml tirpalo pilama į terpę;

2.2.8. Augalų daigumo ir biomasės įvertinimas

Buvo daigintos brokolių sėklos MS terpėje ir terpėse su atrinktais bioaktyviaisiais junginiais. Po 14 dienų buvo nustatytas brokolių daigumas, jų biomasė, daigų ilgis. Brokolių biomasė buvo sudžiovinta ir naudota tolimesniems tyrimams.

2.2.9. Augalų antioksidacinis aktyvumas pagal FRAP metodą, naudojant 2,4,6-tripiridil-s-triaziną

Išdžiovinti brokoliai yra pasveriami ir 0,1 g yra užpilama 5 ml metanoliu ir 0,5 val šildoma karšto vandens vonelėje 45 °C. Ekstraktas centrifuguojamas 10 min 9000 aps/min ir naudojamas tyrimams.

Tolimesnis tyrimas yra atliekamas pagal 2.2.1 poskyrį.

2.2.10. Augalų ekstrakte esančių bioaktyviųjų junginių antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu

Išdžiovinta augalinė brokolių medžiaga pasveriami 0,1 g ir ekstrahuojama metanolyje 5 ml 45 °C, 0,5 val. Ekstraktas centrifuguojamas 10 min ir naudojamas tyrimams.

Tolimesnis tyrimas yra atliekamas pagal 2.2.2 poskyrį.

2.2.11. Redukcinių (antioksidacinių) savybių nustatymas augalų ekstraktuose

Išdžiovinti brokoliai pasveriami 0,1 g ir ekstrahuojama metanolyje 5 ml 45 °C 0,5 val. Ekstraktas centrifuguojamas 10 min 9000 aps/min ir naudojamas tyrimams.

Tolimesnis tyrimas atliekamas pagal 2.2.3 poskyrį.

2.2.12. Antibakterinis įvertinimas augalų ekstraktuose turinčiuose bioaktyviųjų junginių

Ant LB terpės *Petri* lėkštelėse buvo užpiltos *B.subtilis*, *E.coli* bakterijų suspensijos 50 µl ir uždėti 6 popieriniai diskai (žr. 2.3 pav.), kurie buvo padengti 50 µl antibiotiku, brokolių ekstraktais. *Petri* lėkštelės patalpintos į termostatą, kuriame palaikoma 37 °C temperatūra. Po vienos paros yra stebimas bakterijų augimas bei antibiotikų, brokolių ekstraktų antibakterinis poveikis.

2.2.13. Augalų ekstraktų antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu

Sudžiovintos brokolių žaliava yra pasverama 0,2 g ir užpilama 2 ml metanolio. Ekstraktas yra homogenizuojamas 10 min. Vėliau homogenatas buvo nucentrifuguotas 9000 aps/min 10 minučių.

Tiriamajam tirpalui paruošti į mėgintuvėlį buvo įpilama 0,077 ml paruošto ekstrakto ir 3 ml DPPH tirpalo. Mėgintuvėlyje esamas turinys homogenizuojamas ir po 15 min palaikymo tamsoje, matuojama tirpalo šviesos sugertis 515 nm.

Palyginamasis tirpalas: į mėgintuvėlį įpilama 0,077 ml metanolio ir 3 ml DPPH tirpalo.

Etaloninis DPPH tirpalas ruošiamas: 0,0024 g DPPH radikalo ištirpinant metanolyje 100 ml talpos matavimo kolboje.

$$\text{DPPH radikalo slopinimas (\%)} = \frac{A_B - A_A}{A_B} \cdot 100 \%; \quad (2.2)$$

čia A_B – palyginamojo tirpalo šviesos sugerties dydis.

A_A – tiriamojo tirpalo šviesos sugerties dydis.

2.2.14. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijos įvertinimas augalų ekstraktuose

Augalinės brokolio medžiagos 0,5 g yra susmulkinama grūstuvėliu. Tuomet į mėgintuvėlį sudedama sutrinta žaliava ir įpilama 5 ml 96 % C_2H_5OH , viskas susmulkinama iki vientisos masės ir nucentrifuguojama. Gautas ekstraktas tūris išmatuojamas cilindru. Toliau yra išmatuojami supernatantai spektrofotometru, kai chlorofilo *a* bangos ilgis yra 662 nm, chlorofilo *b* bangos ilgis yra 644 nm ir karotinoidų bangos ilgis yra 441 nm.

Pigmentų chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijos apskaičiuojama pagal šias formules:

$$\text{Chlorofilo } a \text{ koncentracija (mg l}^{-1}\text{): } C_a = 9,784 \cdot D_{662} - 0,99 \cdot D_{644}; \quad (2.3)$$

$$\text{Chlorofilo } b \text{ koncentracija (mg l}^{-1}\text{): } C_b = 21,426 \cdot D_{644} - 4,65 \cdot D_{662}; \quad (2.4)$$

$$C_a + C_b = 5,134 \cdot D_{662} + 20,436 \cdot D_{644}; \quad (2.5)$$

$$\text{Karotinoidų koncentracija (mg l}^{-1}\text{) } C_{\text{karotinoidai}} = 4,695 \cdot D_{441} - 0,268 \cdot (C_a + C_b); \quad (2.6)$$

Pigmentų koncentracija mg/100g apskaičiuojama pagal (2.7) formulę:

$$X = \frac{C \cdot V \cdot V_2 \cdot 100}{n \cdot V_1 \cdot 1000}; \quad (2.7)$$

čia C – pigmentų koncentracija mg/l;

V – pradinis ekstrakto tūris ml;

V₁ – pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui;

V₂ – praskiesto ekstrakto tūris, ml;

n – augalinė masė, g.

2.2.15. L-prolino koncentracijos nustatymas augalų ekstraktuose

0,1 g brokolių augalinės žaliavos susmulkinama mėgintuvėlyje ir užpilama 4 ml distiliuotu vandeniu. Bandinys 3 min kaitinamas 95 °C ir atvėsინamas. Kaitinimo procesas kartojamas du kartus. Gautas ekstraktas centrifuguojamas 10 min 9000 aps/min tuomet nupilamas į kitą mėgintuvėlį ir praskiedžiamas iki 6 ml.

Paimamas kitas mėgintuvėlis į kurį įpilama 1 ml ekstrakto, 1 ml acto rūgšties, 1 ml ninhidrininio reagento ir visa tai kaitinama 45 min vandens vonelėje 95 °C.

Kontrolinio mėginio paruošimas: vietoj paruošto ekstrakto naudojamas 1 ml distiliuoto vandens, 1 ml acto rūgšties, 1 ml ninhidrininio reagento ir visa tai kaitinama 45 min vandens vonelėje 95 °C. Šviesos sugertis matuojama 520 nm bangos ilgyje.

Prolino koncentracija apskaičiuojama pagal kalibracinę kreivę (L-prolino), kurios formulė yra:

$$C_x = \frac{E \cdot k \cdot V_{bendras}}{V_{paimta} \cdot m}; \quad (2.8)$$

čia C_x – prolino koncentracija μmol/g;

E – tirpalo šviesos sugertis;

k – L-prolino koncentracija, gauta pagal kalibracinę kreivę (μmol);

V_{bendras} – bendras ekstrakto tūris, ml;

V_{paimta} – paimto ekstrakto tūris, ml;

m – vaistinės augalinės žaliavos kiekis, g.

L-Prolino kalibracinės kreivės paruošimas:

Pasveriami L-prolino 0,0011 g ir ištirpinama 10 ml H₂O 1 mM. Ruošiama L-prolino kalibracinė kreivė su koncentracijomis: 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,125; 0,15; 0,175 mM.

Paimami atitinkami L-prolino kiekiai iš pradinio tirpalo į mėgintuvėlius, sudarant kalibracinei kreivei:

- 1) Į tuščią bandinį įpilama 1 ml H₂O + 1 ml acto rūgšties ir 1 ml ninhidrininio reagento.
- 2) Pirmajam bandiniui paruošti buvo 0,025 ml L-prolino skiedžiama iki 1 ml su H₂O + 1 ml acto rūgšties, 1 ml ninhidrininio reagento.

- 3) Antrajam bandiniu paruošti buvo 0,050 ml *L*-prolino skiedžiama iki 1 ml su H₂O + 1 ml acto rūgšties, 1 ml ninhidrininio reagento.
- 4) Trečiajam bandiniu paruošti buvo 0,075 ml *L*-prolino skiedžiama iki 1 ml su H₂O + 1 ml acto rūgšties, 1 ml ninhidrininio reagento.
- 5) Ketvirtajam bandiniu paruošti buvo 0,1 ml *L*-prolino skiedžiama iki 1 ml su H₂O + 1 ml acto rūgšties, 1 ml ninhidrininio reagento.
- 6) Penktajam bandiniu paruošti buvo 0,125 ml *L*-prolino skiedžiama iki 1 ml su H₂O + 1 ml acto rūgšties, 1 ml ninhidrininio reagento.
- 7) Šeštajam bandiniu paruošti buvo 0,15 ml *L*-prolino skiedžiama iki 1 ml su H₂O + 1 ml acto rūgšties, 1 ml ninhidrininio reagento.
- 8) Septintajam bandiniu paruošti buvo 0,175 ml *L*-prolino skiedžiama iki 1 ml su H₂O + 1 ml acto rūgšties, 1 ml ninhidrininio reagento.

Galiausiai mėgintuvėliai kaitinami 45 min 95 °C karšto vandens vonelėje ir atšaldžius matuojama šviesos sugertis 520 nm bangos ilgyje.

2.2.16. Gliukozinolatų koncentracijos nustatymas augalų ekstraktuose

80 % 2 ml metanolinis ekstraktas pagaminamas su 0,1 g susmulkintų augalų seklių. Šis homogenatas yra laikomas per naktį kambario temperatūroje. Po išlaikymo homogenatas nucentrifuguojamas 9000 aps/min 10 min. Vėliau jis pakartotinai nucentrifuguojamas *Eppendorf* tipo mėgintuvėliuose dar 5 min. Supernatantas (0,5-1 ml) surenkamas po centrifugavimo ir iki 2 ml praskiedžiamas 80 % metanolio. Gliukozinolatams nustatyti yra naudojama 100 µl šio ekstrakto. Į jį pridedama 0,2 ml distiliuoto vandens ir 2 ml 2 mM natrio tetrachlorpaladato. Po inkubacijos kambario temperatūroje 0,5 val, šviesos sugertis yra matuojama 425 nm bangos ilgyje.

Tuščias mėginys yra paruošiamas taip pat tik be ekstrakto.

Bendra gliukozinolatų koncentracija (µmol/g) yra apskaičiuojama pagal formulę:

$$x = 1,40 + 118,86 \cdot A_{425} \quad (2.9)$$

2.2.17. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos nustatymas Folino-Kiokalto metodu

Išdžiovintos augalinės medžiagos 0,05 g yra suberiama į 10 ml acetono 70 % tirpalą ir maišoma kratytuve 20 min kambario temperatūroje. Vėliau mėgintuvėlis centrifuguojamas 10 min 9000 aps/min 4 °C. Po to mėginys centrifuguojamas 2 min *Eppendorf* tipo mėgintuvėliuose. Bandiniai surenkami ir toliau naudojamas tyrimams.

Kalibracinės kreivės ruošimas: paimama 0,0; 20; 40; 60; 80; 100, 120 µl standartinio tanino rūgšties tirpalo į mėgintuvėlius. Tada pridedama distiliuoto vandens, kad kiekis mėgintuvėliuose būtų 500 µl. Į šį tirpalą pridedama 250 µl Folino-Kiokalto reagento ir 1,25 ml 7,5 % natrio karbonato tirpalo. Visa tai sumaišoma ir inkubuojama kambario temperatūroje 40 min tamsoje. Galiausiai praėjus 40 min išmatuojama šviesos sugertis esant 725 nm bangos ilgiui. Kalibracinės kreivės tanino rūgšties koncentracija ant x ašies (2 mg/L; 4 mg/L; 6 mg/L; 8 mg/L; 10 mg/L; 12 mg/L).

Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos nustatymas: iš paruošto ekstrakto paimama 30 µl ir praskiedžiama vandeniu iki 500 µl. Toliau į bandinį pridedama 250 µl Folino-Kiokalto reagento ir įpilama 1,25 ml 7,5 % natrio karbonato tirpalo. Visa tai sumaišoma ir matuojama absorbcija tirpalo

725 nm bangos ilgyje po 40 min laikymo tamsoje. Apskaičiuojama bendra fenolinių junginių koncentracija pagal tanino rūgšties ekvivalentą (mg/100 g) pagal formulę (2.10):

$$X = \frac{a \cdot V \cdot 100}{n}; \quad (2.10)$$

čia a – tanino rūgšties koncentracija iš kalibracinės kreivės, mg/L;

V – pradinis ekstrakto tūris L;

n – augalinė masė, g.

2.2.18. Fermento superoksido dismutazės aktyvumo nustatymas

0,1 g augalinės sausos, džiovintos žaliavos yra susmulkinama ir vykdoma tirpių baltymų ekstrakcija 0,066 M K/Na fosfatiniame buferyje (pH 7,4) 4 ml tūryje, turinčiame 1 mM ditionitolio (DTT), 0,5 mM fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF), ištirpinto DMSO, 1 – 3 mg polivinilpirolidono. Bandiniai homogenizuojami kratytuve 10 min 25 °C. Vėliau nucentrifuguojami 9000 aps/min 10 min ir ekstraktai dar kartą centrifuguojami *Eppendorf* mėgintuvėliuose.

Baltymų nustatymui buvo paimta 200 µl mėginio ir įpilama 2 ml Bradfordo reagento ir išmatuojama šviesos sugertis esant 595 nm bangos ilgiui.

Paruošiama baltymų kalibracinė kreivė pagal albuminą.

Reakcijos mišinys 2 ml tūrio turi 40 µl fermentinio preparato, 400 µl 200 mM Tris-HCl buferio (pH=7,8), 200 µl 100 mM L-metionino; 200 µl 540 µM nitromėlynojo tetrazolio, 500 µl 0,1 % Tritono X-100 ir 20 µl 300 µM riboflavino ir 640 µl distiliuoto vandens. Paruošiamas kontrolinis mėginys neturintis fermentinio preparato.

Reakcija atiekama apšviečiant liuminescentinėmis lempomis 30 min. Kontrolei naudojamas mišinys neturintis fermentinio preparato. Šviesos sugertis matuojama kai bangos ilgis yra 560 nm.

Fermento aktyvumas apskaičiuojamas pagal (2.11) formulę:

$$A = \frac{\log\left(\frac{E_K}{E_T}\right)}{\log 2 \times m}; \quad (2.11)$$

čia A – SOD aktyvumas vnt/mg;

E_K – šviesos sugertis kontrolinio bandinio;

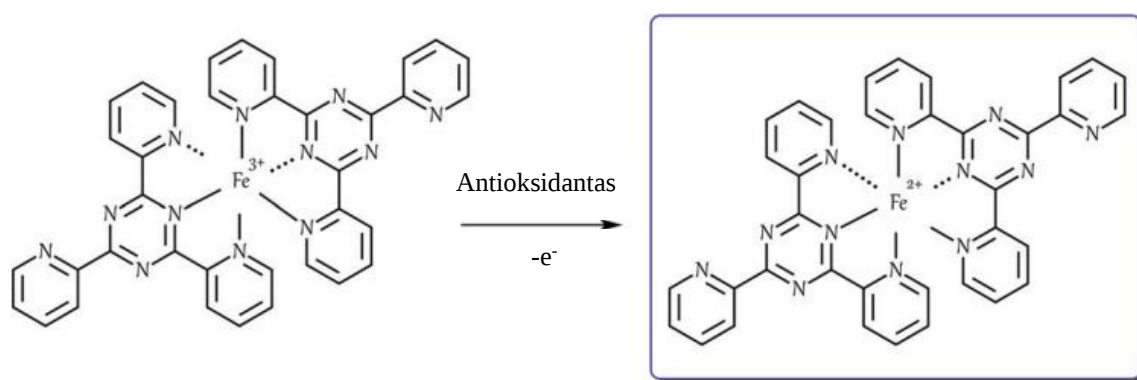
E_T – šviesos sugertis tiriamojo bandinio;

m – baltymo masė preparato tūryje, mg/ml (Baltymo koncentracija apskaičiuojama pagal Bradfordo metodą).

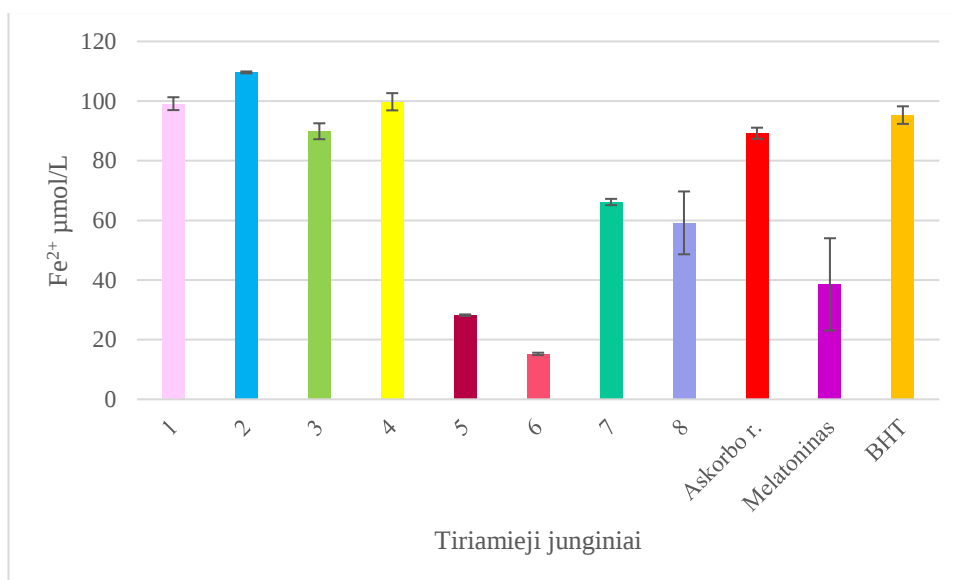
2.3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

2.3.1. Biologiškai aktyviųjų junginių antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu

FRAP tyrimas yra paprastas, greitas ir nebrangus tiesioginis redukcinių (elektronus atiduodančių) antioksidantų antioksidacinio aktyvumo matavimo metodas tiriamajame mėginyje. Atliekant tyrimą vyksta geležies jonų (Fe^{3+}) redukcija į geležies jonus (Fe^{2+}) (žr. 2.10 pav.), kuomet reakcijos vyksmas yra susietas su spalvos pasikeitimu iš bespalvės į ryškiai mėlyną. Įvairių tipų mėginiai gali būti tiriami FRAP metodu, kada nereikia daug specializuotos įrangos. Reagentai yra stabilūs ir mažo toksiškumo, o metodo jautrumas ir tikslumas yra didelis, net nedideli reakcijos sąlygų skirtumai nedaro didelės įtakos rezultatams [58].



2.10 pav. FRAP metodo reakcijos mechanizmas [58]



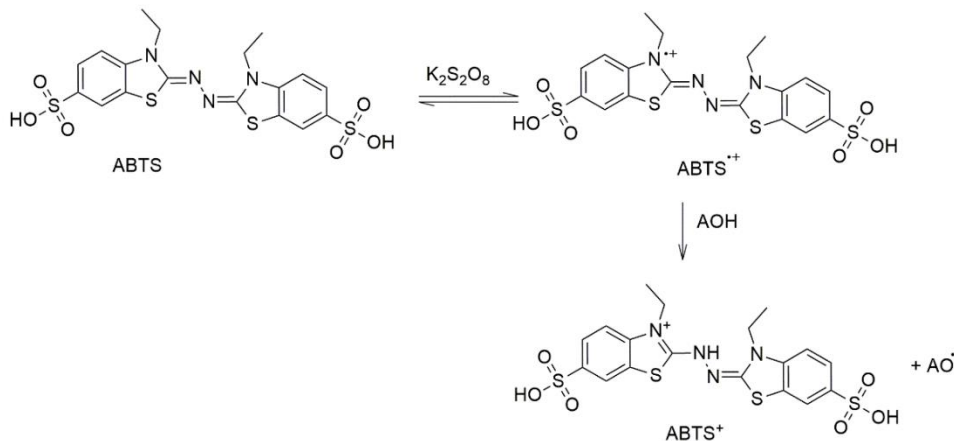
2.11 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu

Nustačius antioksidacinį aktyvumą FRAP metodu, biologiškai aktyviųjų junginių ir askorbo rūgšties, melatonino ir BHT, gautų rezultatų analizė (žr. 2.11 pav.) parodė, jog didžiausias antioksidacinis aktyvumas buvo gautas 2 junginio (3,3'-((4-etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizindolin-2-il)propanamido)). Mažiausias antioksidacinis efektyvumas buvo užfiksuotas 6 junginio (3,3'-(p-tolilazandiil)bis(N'-(4-nitrobenziliden)propano hidrazido)). Lyginant kontrolinius junginius: askorbo

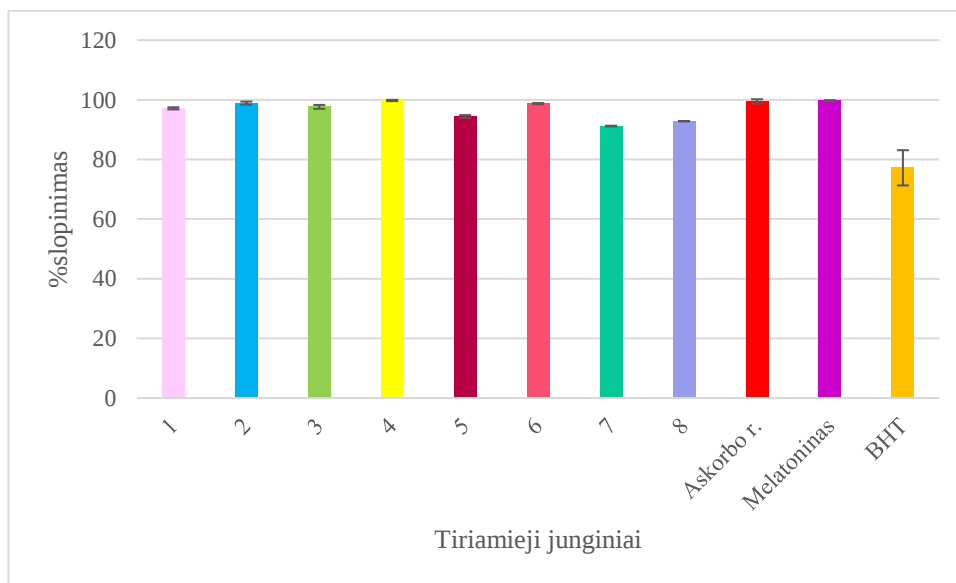
rūgštis, melatonino ir BHT, stipriausiu antioksidaciniu poveikiu pasižymėjo BHT. Po detalaus tyrimo galima prieiti išvadą, kad **2** junginys geriausiai tiktų ir paskatintų augalų antrinių metabolitų susidarymą.

2.3.2. Biologiškai aktyviųjų junginių antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu

ABTS yra molekulė, naudojama tiksliai įvertinti antioksidantų mėginių reaktyvumą. Šis metodas gali būti naudojamas esant skirtingam pH ir yra naudingas tiriant pH įtaką antioksidaciniam aktyvumui. ABTS tirpsta ir vandeniniuose, ir organiniuose tirpikliuose, todėl yra naudingas vertinant mėginių antioksidacinį aktyvumą įvairiose terpėse [59].



2.12 pav. ABTS radikalo susidarymas ir mechanizmas [59]



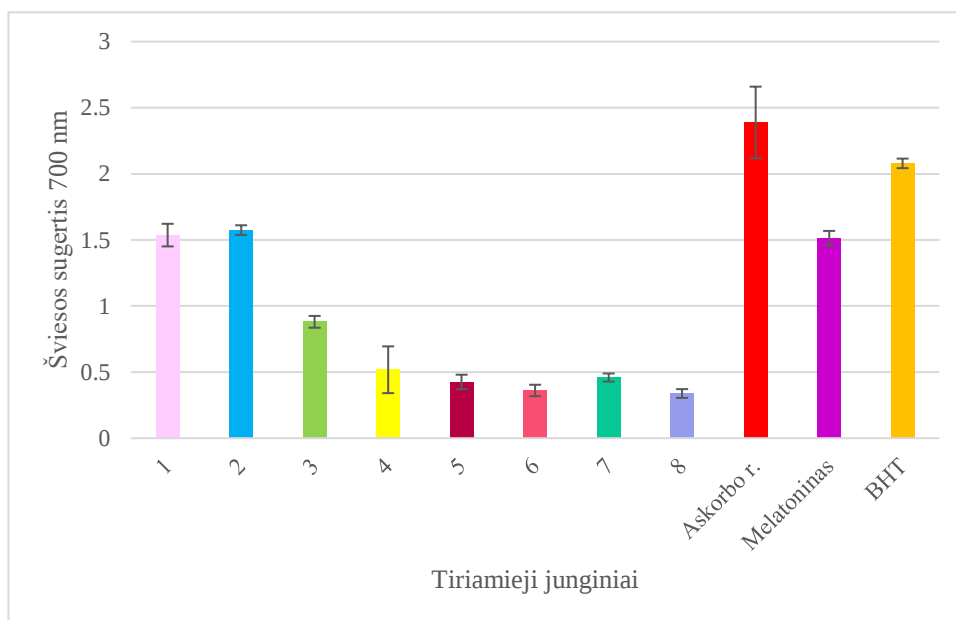
2.13 pav. ABTS radikalo slopinimo įvertinimas

Įvertinus biologiškai aktyviųjų junginių ir askorbo rūgštis, melatonino ir BHT tirpalų ABTS radikalo anijono slopinimą, iš gautų rezultatų (žr. 2.13 pav.), galima pamatyti tendenciją, jog dauguma junginių pasižymėjo panašiu antioksidaciniu aktyvumu. Didžiausiu radikalo slopinimu pasižymėjo melatoninas, o mažiausiu BHT. Lyginant biologiškai aktyviuosius junginius didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu pasižymėjo **4** junginys 3,3'-(fenilazandiil)bis(N-(1,3-dioksoizoinolin-2-il)propanamidas), o mažiausiu **7** junginys 3,3'-((4-metoksifenil)azanediil)bis(N'-(4-

nitrobenziliden)propano hidrazidas), todėl jo poveikyje buvo silpniausias radikalo slopinimo efektas. Taigi, iš to galima daryti išvadą, jog tiriamieji biologiškai aktyvieji junginiai pasižymėjo stipriomis antioksidacinėmis savybėmis.

2.3.3. Biologiškai aktyviųjų junginių redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas

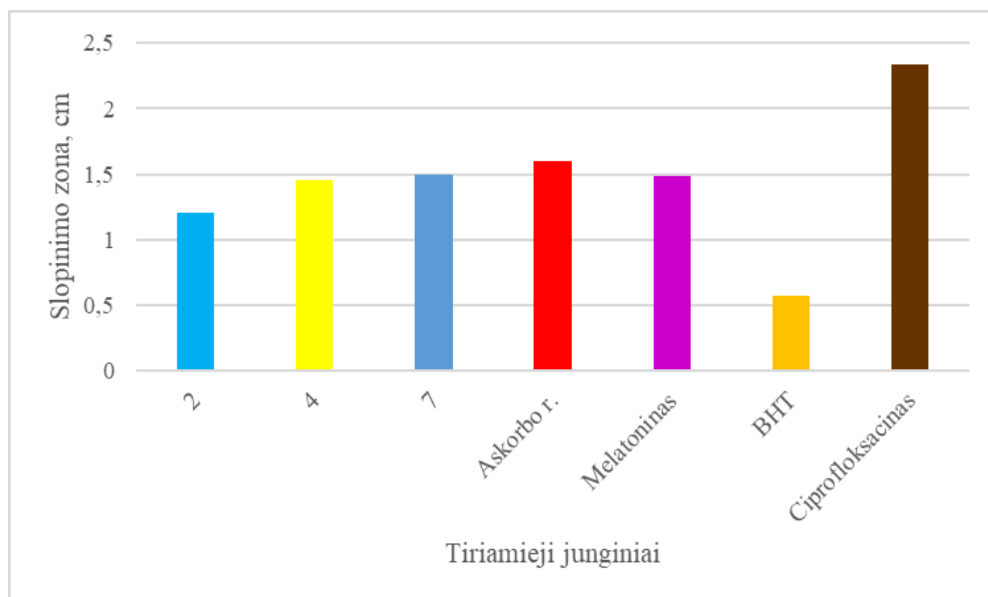
Redukcinių savybių įvertinimo metodas paremtas didele šviesos sugertimi, kuri parodo didesnes antioksidacines savybes. Jo esmė: trivalentės geležies virsmas į divalentę.



2.14 pav. Redukcinio antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

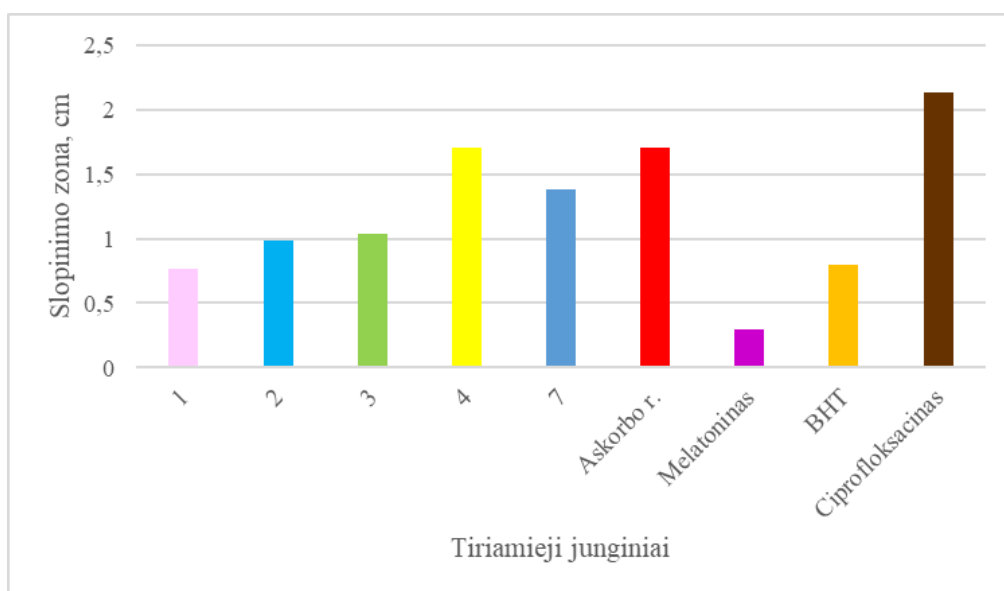
Atlikus antioksidacinio aktyvumo biologiškai aktyviųjų junginių ir askorbo rūgšties, melatonino ir BHT tirpalų vertinimą, turimi rezultatai parodė aiškią tendenciją, (žr. 2.14 pav.), jog intensyviausias redukcines savybes pademonstravo askorbo rūgštis. Iš biologiškai aktyviųjų junginių gautų duomenų 2 junginys 3,3'-((4-etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas turėjo didžiausią antioksidacinį efektyvumą. Junginys 1 3,3'-((4-metoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas) taip pat turėjo gana intensyvias antioksidacines savybes. Dėl šios priežasties, atlikus nuodugnią tyrimo analizę, galima konstatuoti, kad biologiškai aktyvieji junginiai, lyginant su kontroliniais, neturėjo pačių intensyviausių redukcinių savybių.

2.3.4. Tiriamųjų junginių antibakterinis įvertinimas



2.15 pav. Susintetintų junginių antibakterinis įvertinimas prieš *B.subtilis*

Atlikus biologiškai aktyviųjų junginių antibakterinio aktyvumo įvertinimą (žr. 2.15 pav.) prieš bakteriją *B.subtilis* iš gautų rezultatų galima teigti, jog didžiausią atsparumą turėjo 7 junginys 3,3'-((4-metoksifenil)azanediil)bis(N'-(4-nitrobenziliden)propano hidrazidas) prieš gramteigiamas *B.subtilis* bakterijas. Mažiausią antibakterinį atsparumą turėjo 2 junginys 3,3'-((4-etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizindolin-2-il)propanamidas). Iš to galima daryti išvadą, jog biologiškai aktyvieji junginiai pasižymėjo intensyviomis antibakterinėmis savybėmis.



2.16 pav. Susintetintų junginių antibakterinis įvertinimas prieš *E.coli*

Iš gautų rezultatų (žr. 2.16 pav.) galima išvelgti tendenciją, stipriausiomis antibakterinėmis savybėmis pasižymėjo 4 junginys 3,3'-(fenilazandiil)bis(N-(1,3-dioksoizindolin-2-il)propanamidas). Šis buvo tolygus askorbo rūgšties gautiems duomenims. Tai parodo, jog susintetinti biologiškai aktyvieji junginiai turėjo stiprias antibakterines savybes prieš gramneigiamą *e.coli*.

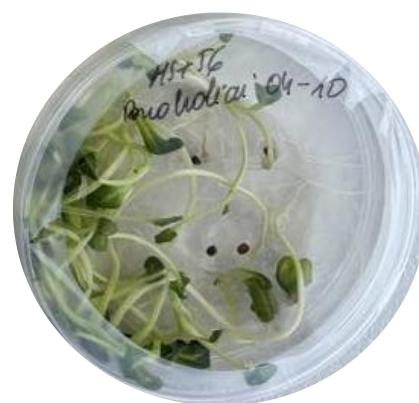
2.3.5. Brokolių auginimas *in vitro* su atrinktais bioaktyviaisiais junginiais



2.17 pav. Brokolių *in vitro* kultūra augusi MS



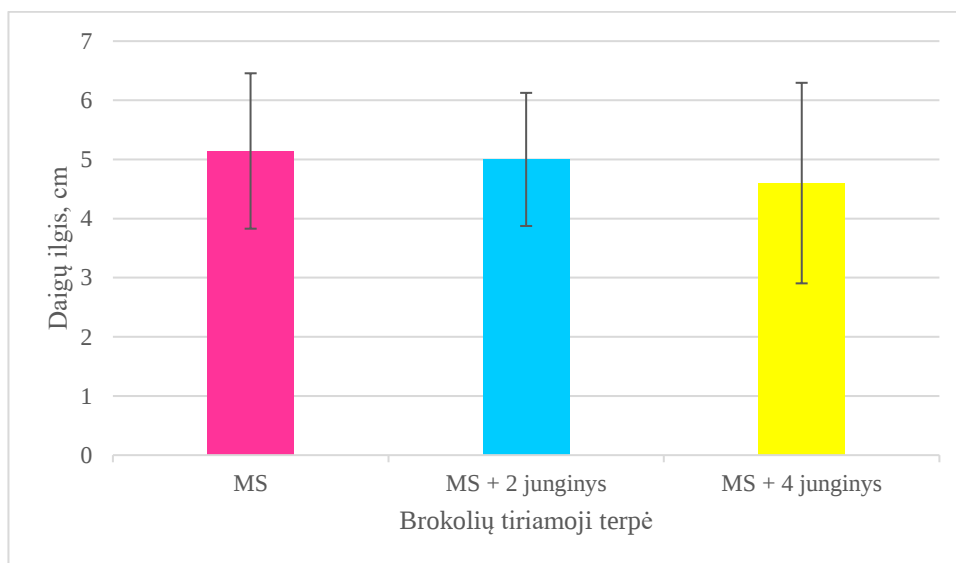
2.17 pav. Brokolių *in vitro* kultūra augusi MS su 2 junginiu



2.19 pav. Brokolių *in vitro* kultūra augusi MS su 4 junginiu

Laboratorijoje analizės metu buvo išrinkti biologiškai aktyvieji junginiai, kurie pasižymėjo geriausiomis antioksidacinėmis ir antibakterinėmis savybėmis. Buvo tiriamos brokolių kultūros *in vitro*, augusios MS mitybinėje terpėje su 2 junginiu 3,3'-((4-etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizindolin-2-il)propanamidu (žr. 2.18 pav.) ir 4 junginiu 3,3'-(fenilazandiil)bis(N-(1,3-dioksoizindolin-2-il)propanamidu (žr. 2.19 pav.).

2.3.6. Brokolių daigumo ir biomasės įvertinimas



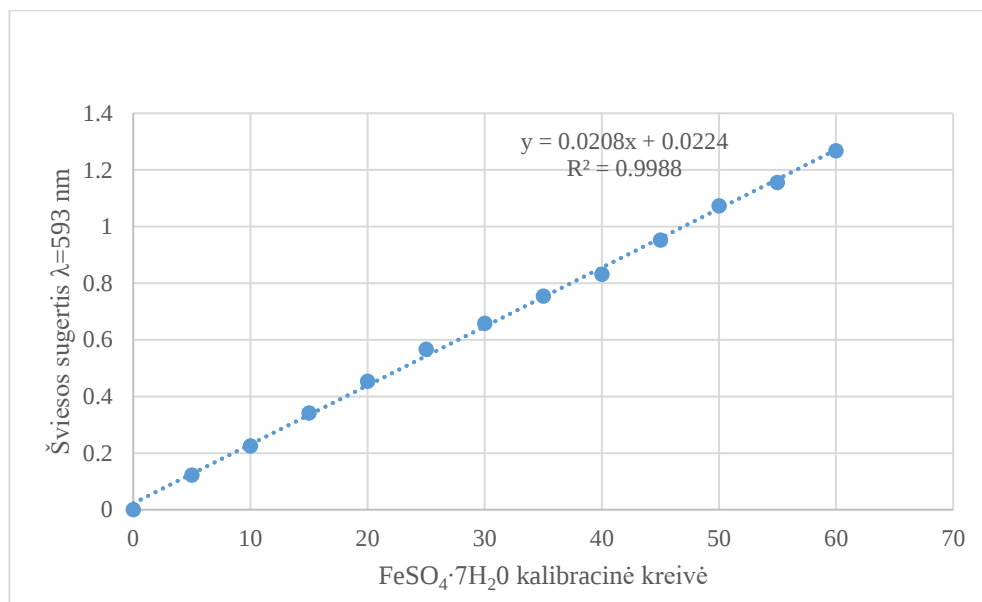
2.18 pav. Brokolių daigumo ir biomasės įvertinimas *in vitro*

2.3 lentelė Brokolių daigumo ir biomasės įvertinimo rezultatai:

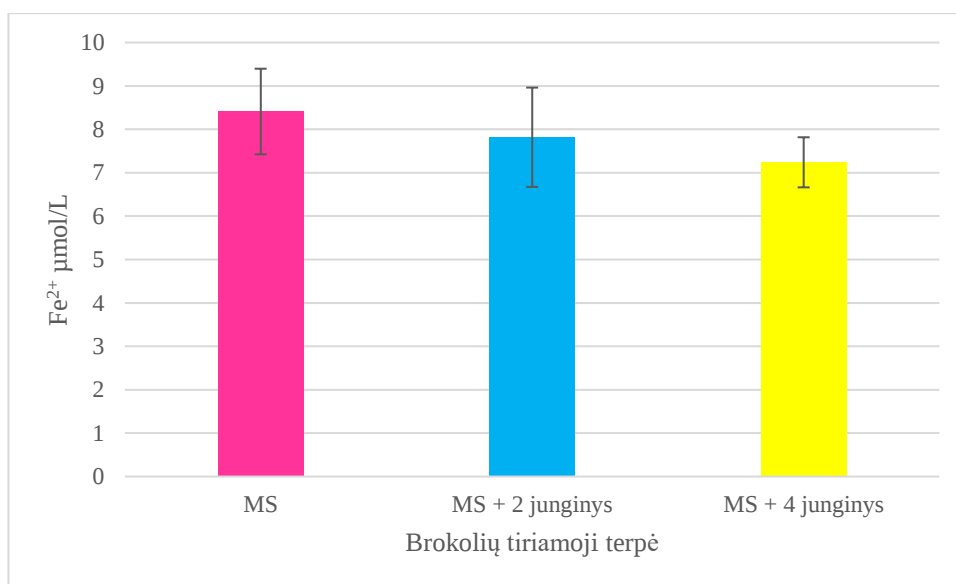
	MS	MS + 2 junginys	MS + 4 junginys
Daigų ilgio vidurkis $\bar{x}$, cm	5,14	5	4,6
Daigų svoris, g	2,86	1,75	3,45

Atlikus brokolių daigumo ir biomasės įvertinimą gautų duomenų (žr. 2.20 pav.) analizė parodė, jog didžiausias daigų ilgis užaugo MS terpėje, tačiau svoris (žr. 2.3 lentelė) MS terpėje su 4 junginiu 3,3'-(fenilazandiil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidu. Taigi, didžiausia brokolių biomasė buvo MS terpėje be biologiškai aktyviojo junginio.

2.3.7. Antioksidacinio aktyvumo FRAP metodu įvertinimas brokolių *in vitro* ekstraktuose



2.19 pav. FeSO₄·7H₂O kalibracinė kreivė

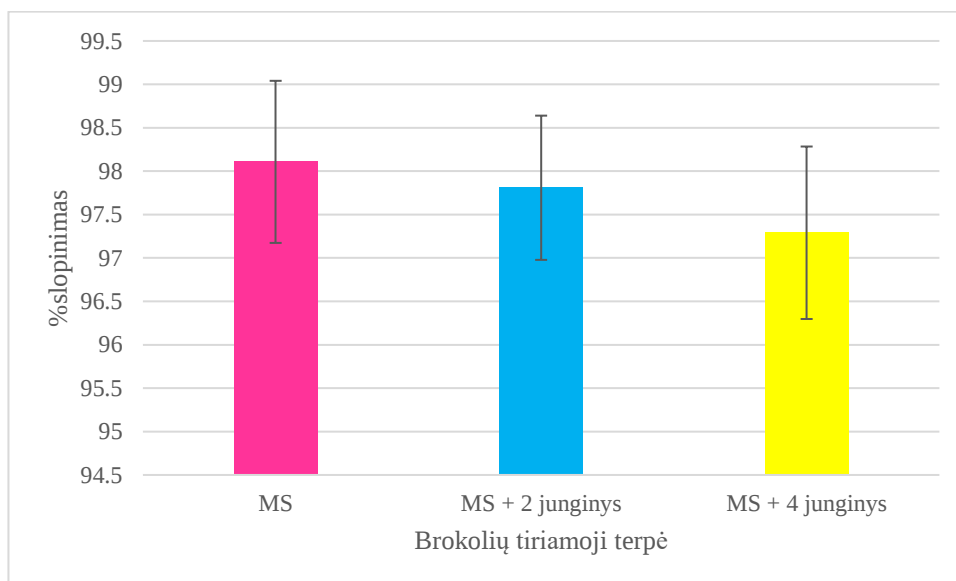


2.20 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas FRAP metodu

Atlikus antioksidacinio aktyvumo įvertinimą FRAP metodu buvo nustatomos brokolių ekstraktų redukcinės savybės. Iš gautų rezultatų (žr. 2.22 pav.) buvo aišku, jog brokolių *in vitro* sistemos augusios MS terpėje su biologiškai aktyviaisiais nepasižymėjo intensyvesnėmis savybėmis už brokolius augusius kontrolinėje MS terpėje. Tačiau lyginant ekstraktus tarpusavyje turinčius savo sudėtyje bioaktyviųjų junginių išryškėja akivaizdus dėsningumas, jog brokoliai augę MS terpėje su 2 junginiu 3,3'-((4-etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidu pasižymėjo didesnėmis antioksidacinėmis savybėmis nei MS terpė su 4 junginiu 3,3'-(fenilazandiil)bis(N-(1,3-

dioksoizoindolin-2-il)propanamidu. Tai leidžia manyti, jog biologiškai aktyvieji junginiai nepaskatino susidaryti didesnei koncentracijai Fe^{+2} - 2,4,6-tripiridil-s-triazino komplekso.

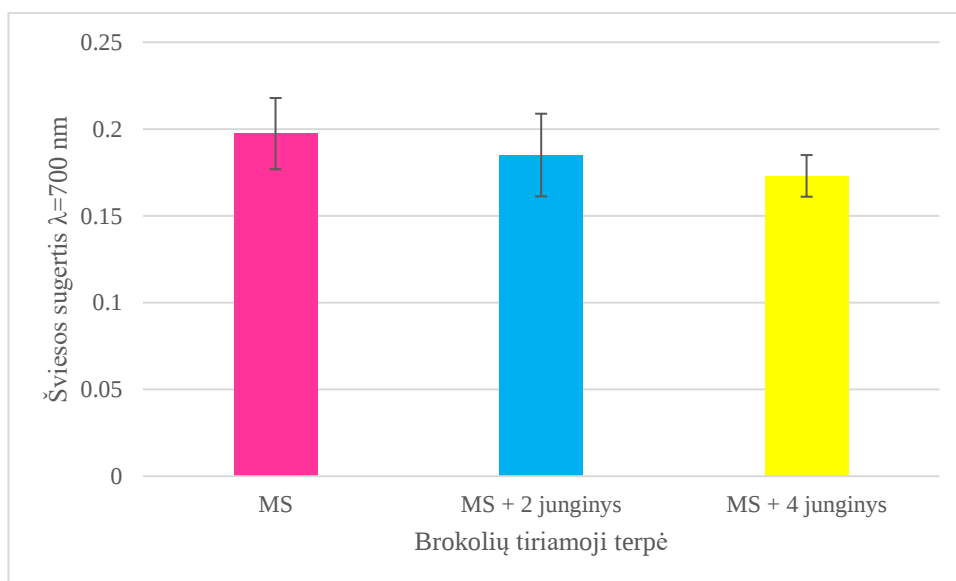
2.3.8. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas ABTS metodu brokolių ekstraktuose



2.21 pav. ABTS radikalo slopinimo įvertinimas

Išsiaiškinus brokolių augančių MS terpėje ir brokolių augančių MS terpėje su bioaktyviaisiais junginiais antioksidacinį intensyvumą, buvo nustatyta kiek procentiškai yra slopinamas ABTS radikalo anijonas. Iš (žr. 2.23 pav.) pateiktų rezultatų, galima išvelgti aiškia tendenciją, jog MS kontrolinėje terpėje augančių brokolių aktyvumas buvo didžiausias. Įvertinus brokolių kultūras, kurios augo su bioaktyviaisiais junginiais, buvo aišku, jog 2 junginys 3,3'-((4-etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas turėjo stipresnį efektą nei 4 junginys 3,3'-(fenilazandiil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas. Taigi, iš rezultatų yra gauta, jog bioaktyvieji junginiai nepaskatino ABTS radikalo slopinimo.

2.3.9. Redukcinių (antioksidacinių) savybių įvertinimas brokolių *in vitro* ekstraktuose



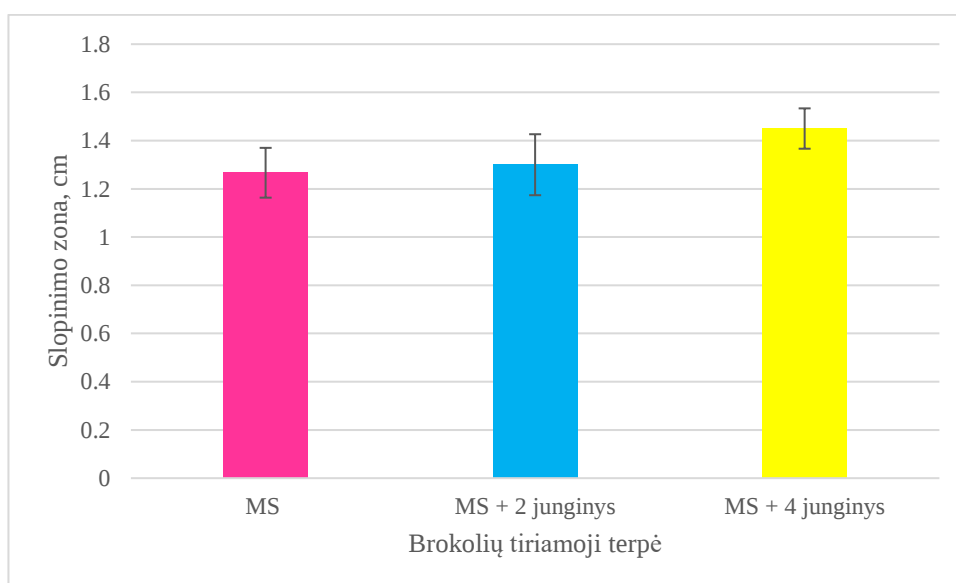
2.22 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas brokolių *in vitro* ekstraktuose

Ištirus brokolių, augusių su biologiškai aktyviaisiais junginiais *in vitro* ekstraktų antioksidacines savybes, tyrimo rezultatai (žr. 2.24 pav.) parodė, jog mažiausiomis redukcinėmis savybėmis pasižymėjo brokolių augalai, augę terpėje su 4 aktyviuoju junginiu 3,3'-(fenilazandiil)bis(N-(1,3-dioksoizindolin-2-il)propanamidu. Brokolių *in vitro* kultūra, turėjusi 2 junginio 3,3'-((4-etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizindolin-2-il)propanamido pasižymėjo taip pat mažesnėmis savybėmis už MS brokolių terpę. Taigi remiantis duomenimis, galima apibendrinti, jog biologiškai aktyvieji junginiai nepadidino antioksidacinių savybių.

2.3.10. Brokolių ekstraktų antibakterinis įvertinimas



2.23 pav. Brokolių *in vitro* ekstraktų antibakterinis aktyvumas prieš *B. subtilis*



2.24 pav. Brokolių *in vitro* ekstraktų antibakterinis įvertinimas prieš *B. subtilis*

Iš (2.26 pav.) pateiktų tyrimo rezultatų, galima teigti, jog prieš gramteigiamas *B. subtilis* bakterijas didžiausią antibakterinį aktyvumą turėjo 4 junginys 3,3'-(fenilazandiil)bis(N-(1,3-dioksoizindolin-2-il)propanamidas, buvęs MS *in vitro* terpėje. Lyginant junginius galima teigti jog, 4 junginys reikšmingai sumažino *B. subtilis* augimą. 2 junginys 3,3'-((4-etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizindolin-2-il)propanamidas taip pat turėjo tam tikrą slopinamąjį poveikį, tačiau jis buvo didesnis nei 4 junginio. MS kontrolinė brokolių terpė reikšmingo poveikio *B. subtilis* slopinimui neturėjo. Taigi, šie rezultatai parodė, kad 4 junginys gali būti efektyvus antibakterinis agentas prieš *B. subtilis* bakterijas, o tolimesni tyrimai galėtų padėti nustatyti jo konkrečius veikimo mechanizmus ir galimą pritaikymą antibakterinėse priemonėse.

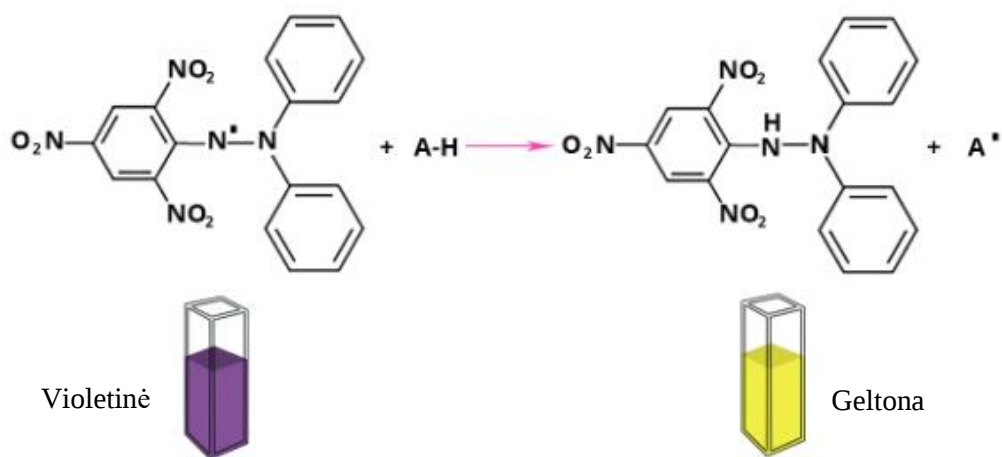


2.25 pav. Brokolių *in vitro* ekstraktų antibakterinis aktyvumas prieš *E. coli*

Junginiai esantys MS *in vitro* terpėje neparodė reikšmingo antibakterinio poveikio prieš gramneigiamas bakterijas *E. coli*.

2.3.11. Antioksidacinis aktyvumas DPPH metodu brokolių *in vitro* ekstraktuose

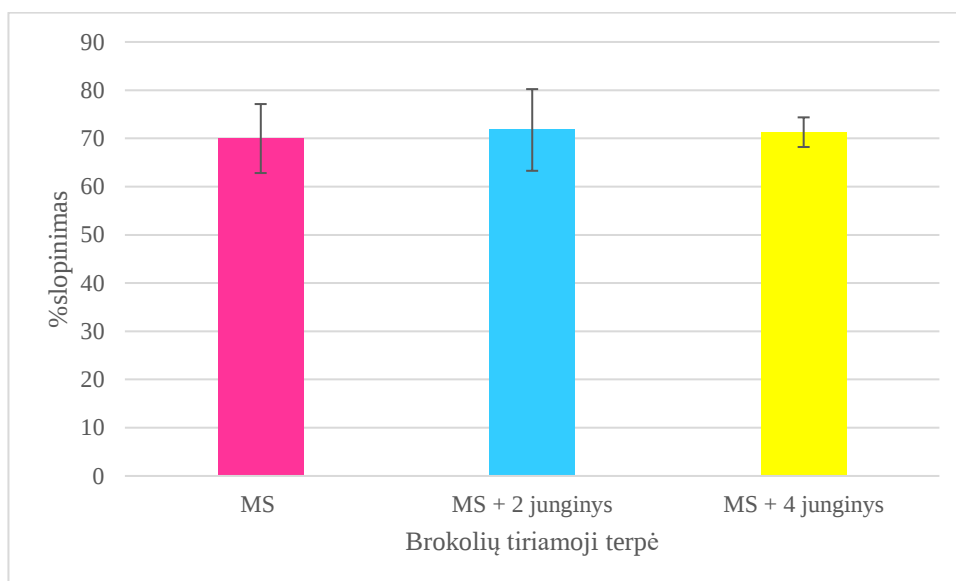
DPPH yra greitas, paprastas ir nebrangus antioksidacinio pajėgumo nustatymo metodas, naudojamas augalinių ekstraktų antiradikaliniui intensyvumui matuoti. Jo metu radikalas DPPH• 2,2-difenil-1-



2.26 pav. DPPH radikalo redukcijos reakcija ir spalvos pokyčiai [60]

pikrilhidrazilas reaguoja su vandenilio donoru ir neleidžia įvykti dimerizacijai šitaip suteikdamas DPPH molekulei spalvą. Dėl šios priežasties iš violetinės tirpalo spalvos mėginys tampa šviesiai

geltonas (žr. 2.28 pav.). DPPH sumažėjimas išmatuojamas spektrofotometrinio būdu 515 nm bangos ilgyje [61].

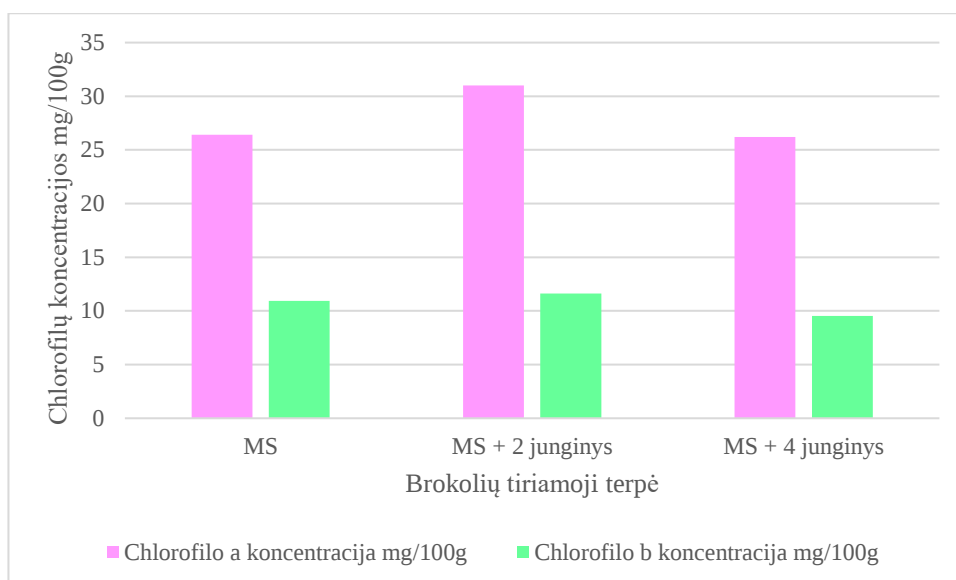


2.27 pav. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas DPPH metodu brokolių ekstraktuose

Iš (2.29 pav.) gautų rezultatų, galima teigti, jog antioksidacinis aktyvumas, atliktas DPPH metodu, brokolių *in vitro* ekstraktuose didžiausias buvo nustatytas brokolių MS terpėje su 2 junginiu 3,3'-((4-etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidu. Mažiausią antioksidacinį aktyvumą turėjo brokoliai, augę kontrolinėje MS terpėje. Svarbu paminėti, jog 4 junginys 3,3'-(fenilazandiil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas turėjo silpnesnes savybes nei 2 junginys. Tai patvirtina, jog brokolių mitybinės terpės papildymas biologiškai aktyviaisiais junginiais paskatino DPPH radikalo neutralizavimą.

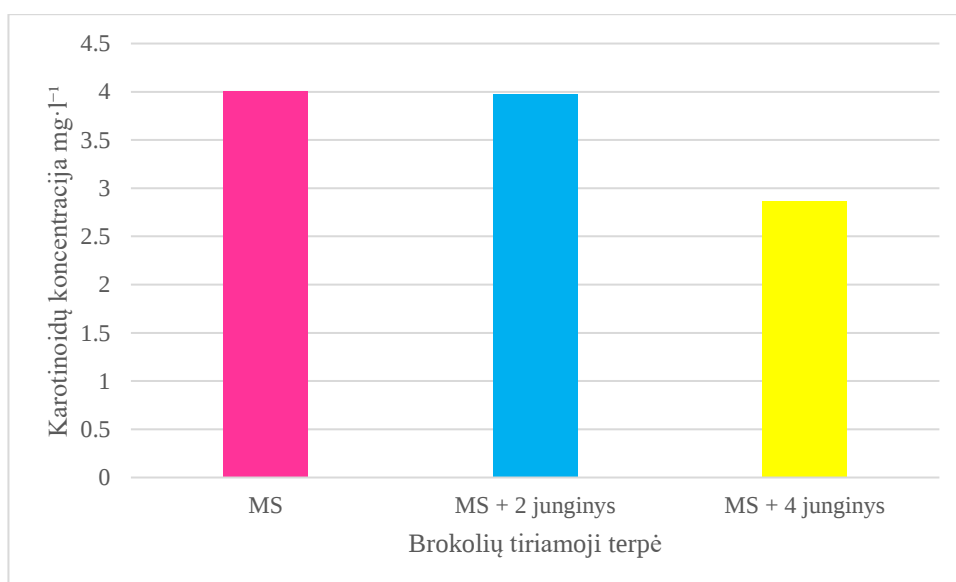
2.3.12. Chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijos įvertinimas brokolių ekstraktuose

Chlorofilas *a*, pagrindinis augalų pigmentas, fotosintezės procese paverčia šviesos energiją chemine energija ir yra melsvai žalios spalvos [62]. Chlorofilas *b* yra nepakeičiamas pirminis metabolitas augalo ląstelėms ir yra gelsvai žalios spalvos [63].



2.28 pav. Chlorofilo *a* ir *b* koncentracijos įvertinimas

Buvo nustatomi pigmentai brokolių, augusių MS terpėje ir brokolių su bioaktyviaisiais junginiais **2** ir **4**, ekstraktuose. Gauti išsamūs duomenų analizės rezultatai (žr. 2.30 pav.) parodė, kad didžiausią chlorofilo *a* koncentraciją turėjo brokoliai, augę MS terpėje su **2** bioaktyviuoju junginiu 3,3'-((4-etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidu, t.y. net 31 mg/100g. Dominuojančią chlorofilo *b* koncentraciją pademonstravo taip pat brokoliai, augę MS terpėje su **2** bioaktyviuoju junginiu, o tuo tarpu mažiausia buvo nustatyta brokolių, augusių MS terpėje su **4** bioaktyviuoju junginiu 3,3'-(fenilazandiil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidu.



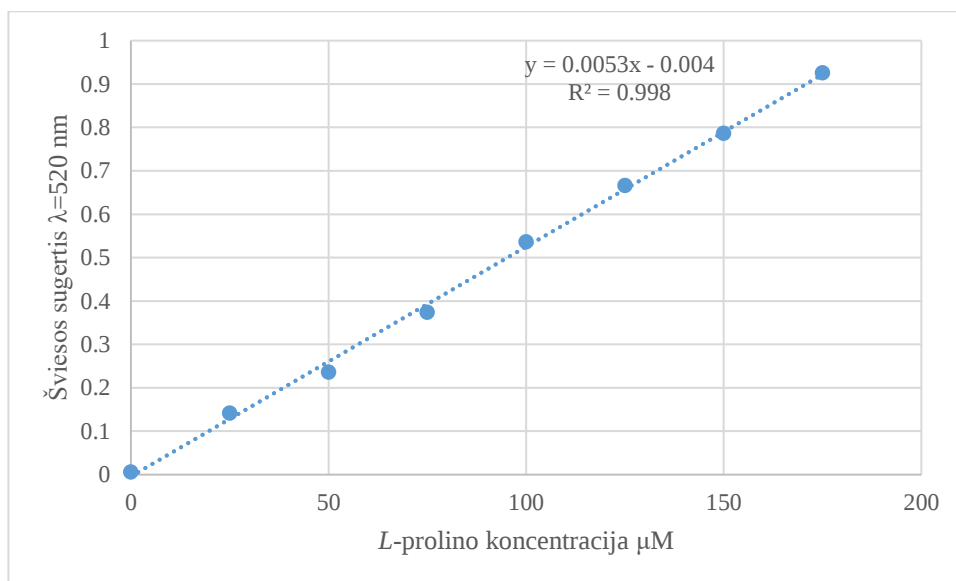
2.29 pav. Karotinoidų koncentracijos įvertinimas brokolių *in vitro* ekstraktuose

Taip pat buvo nustatomos ir karotinoidų koncentracijos brokolių *in vitro* ekstraktuose. MS brokoliai ir brokoliai augę *in vitro* sąlygomis su **2** junginiu 3,3'-((4-etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidu pasižymėjo panašia karotinoidų koncentracija (žr. 2.31 pav.). Gauti duomenys parodė, jog **2** junginys augęs MS mitybinėje terpėje turi didesnę poveikį karotinoidų

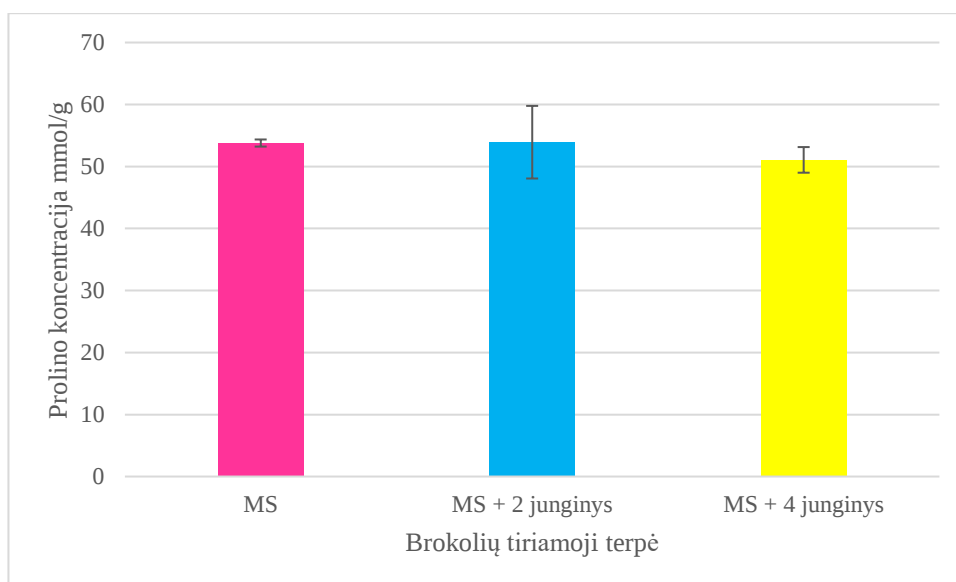
kaupimuisi ir jų stabilumui ekstraktuose, lyginant su 4 junginiu 3,3'-(fenilazandiil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidu. Šis skirtumas gali būti siejamas su skirtingomis šių bioaktyviųjų junginių cheminėmis savybėmis ir jų sąveika su augaliniais pigmentais. Tai leidžia teigti, kad 2 junginys turėjo net ~ 30 % didesnę karotinoidų koncentraciją nei 4 junginys.

2.3.13. *L*-prolino koncentracijos nustatymas brokolių *in vitro* ekstraktuose

L-prolinas yra svarbi aminorūgštis dėl savo biologinių funkcijų ir biotechnologinių pritaikymų. *L*-prolinas atlieka daug kitų funkcijų kaip pvz.: jis padidina baltymų arba membranų stabilumą vykstant šaldymo, dehidratacijos arba aukštos temperatūros pokyčiams. Taip pat padidina mažai tirpių baltymų tirpumą, slopina baltymų agregaciją ir turi reaktyvių deguonies rūšių savybę [64].



2.30 pav. *L*-prolino kalibracinė kreivė



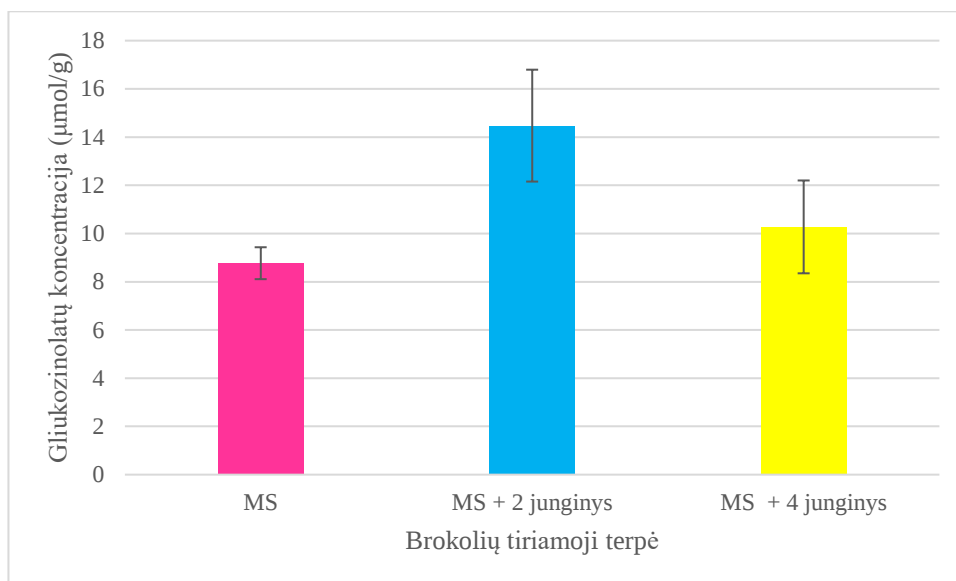
2.31 pav. *L*-prolino koncentracijos įvertinimas brokolių *in vitro* ekstraktuose

Atlikus išsamų *L*-prolino koncentracijos nustatymo tyrimą (žr. 2.33 pav.) brokoliuose *in vitro* su biologiškai aktyviaisiais junginiais matomas dėsningumas, jog brokolių, augusių MS terpėje su 4 junginiu 3,3'-(fenilazandiil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidu ekstrakto buvo mažiausia

L–prolino koncentracija. Duomenų analizė atskleidė ir tai, jog brokolių, augusių terpėje su 2 junginiu 3,3'-((4-etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidu, ekstrakte buvo didžiausia *L*–prolino koncentracija. Taigi, iš to galime daryti išvadą, jog mitybinę terpę papildžius bioaktyviaisiais junginiais jie paskatino augalo metabolizmą ir sustiprino ląstelės sienes.

2.3.14. Gliukozinolatų koncentracijos įvertinimas brokoliuose *in vitro*

Gliukozinolatai yra biologiškai aktyvūs junginiai randami Brassicaceae augalų šeimoje, kuriai priklauso brokoliai, kopūstai, žiediniai kopūstai, rapsai, garstyčios, krienai. Naujausi tyrimai rodo teigiamą gliukozinolatų poveikį, įskaitant uždegimo reguliavimo funkcijas, atsaką į stresą, I fazės metabolizmą ir antioksidacinę veiklą, taip pat tiesiogines antimikrobines savybes [65].

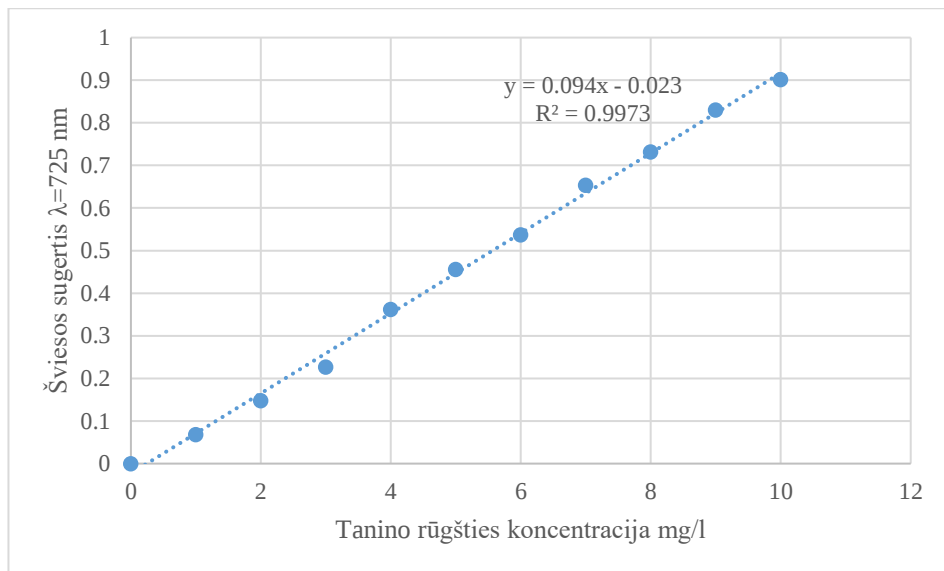


2.32 pav. Gliukozinolatų koncentracijos įvertinimas brokolių *in vitro* ekstraktuose

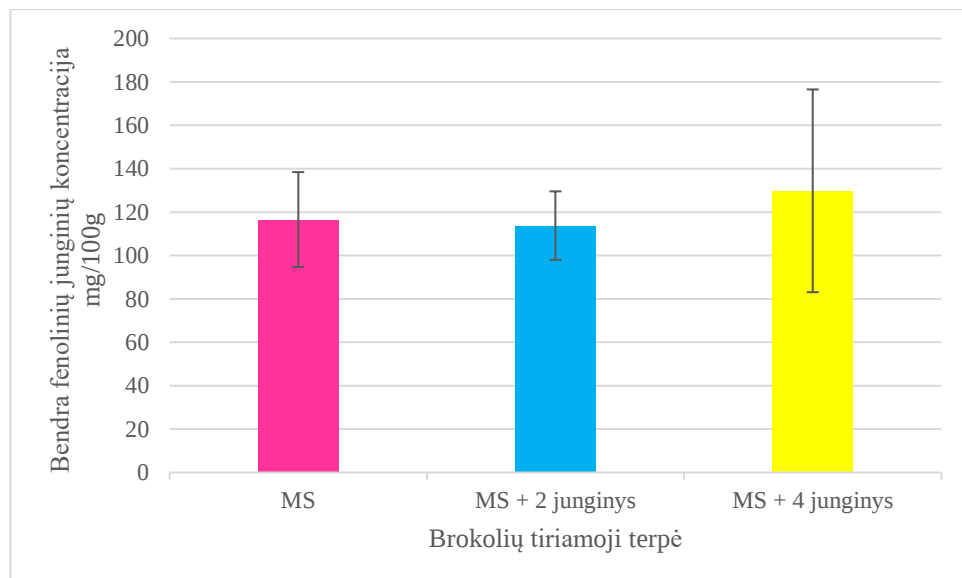
Įvertinus brokolių *in vitro* su bioaktyviais junginiais ekstraktų savybes, iš atlikto tyrimo rezultatų (žr. 2.34 pav.) nustatyta, jog brokolių augusių MS terpėje su 2 junginiu 3,3'-((4-etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidu ekstraktas turėjo didžiausią gliukozinolatų koncentraciją. Jo poveikyje buvo net 1,4 karto daugiau gliukozinolatų. Iš gautų rezultatų galima teigti, kad MS terpės papildymas biologiškai aktyviaisiais junginiais paskatino gliukozinolatų koncentracijos padidėjimą.

2.3.15. Bendrųjų fenolinių junginių koncentracijos nustatymas brokoliuose *in vitro* Folino-Kiokalto metodu

Nestruktūriniai fenoliniai junginiai augaluose atlieka įvairias funkcijas, o ypač pasižymi antioksidacinėmis savybėmis. Folino – Kiokalto metodas, tai kolorimetrinis metodas, kuris nustato bendrus fenolinius junginius, kuomet yra naudojamas Folino – Kiokalto reagentas. Šis tyrimas pagrįstas elektronų perkėlimu šarminėje terpėje iš fenolio junginių į fosfomolibdo arba fosfovolframo rūgšties kompleksus, kurie spektroskopiškai nustatomi 725 bangos ilgyje [66].



2.33 pav. Tanino rūgšties kalibracinė kreivė

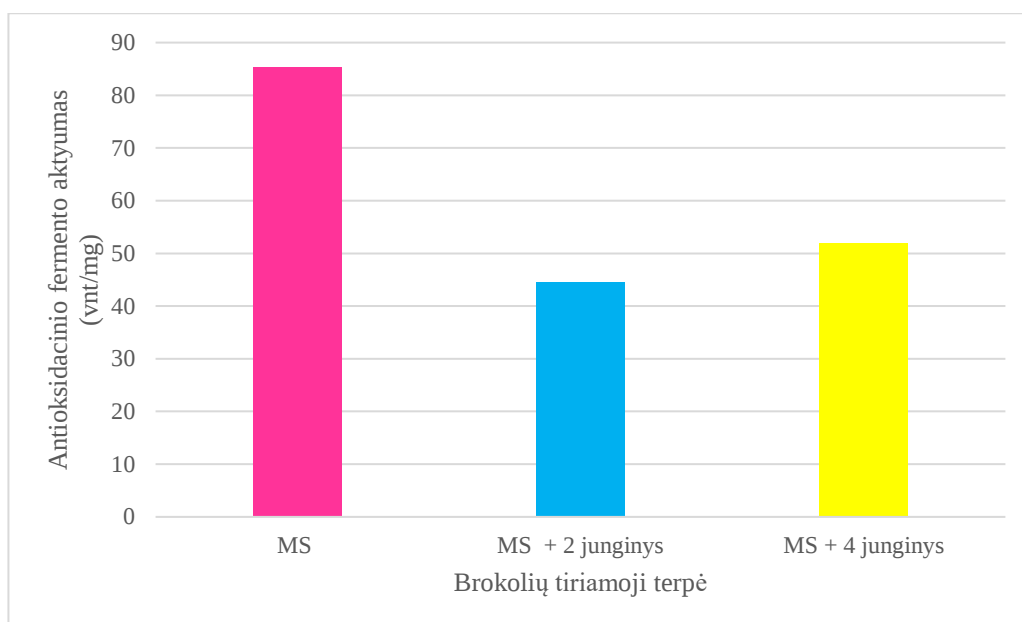


2.34 pav. Bendrųjų fenolinių junginių koncentracijos įvertinimas brokolių *in vitro* ekstraktuose

Atlikus bendrųjų fenolinių junginių koncentracijos įvertinimą brokolių *in vitro* ekstraktuose, iš gautų rezultatų (žr. 3.36 pav.) formuojasi aiški tendencija, jog didžiausia fenolinių junginių koncentracija buvo brokolių, augusių MS terpėje su 4 junginiu 3,3'-(fenilazandiil)bis(N-(1,3-dioksoizindolin-2-il)propanamidu, ekstrakto. Mažiausią sukaupę fenolinių junginių koncentraciją turėjo brokoliai, augę MS terpėje su 2 junginiu 3,3'-((4-etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizindolin-2-il)propanamidu. Reziumuojant, galima teigti, kad bioaktyvieji junginiai paskatino bendrųjų fenolinių junginių koncentracijos padidėjimą.

2.3.16. Superoksido dismutazės įvertinimas brokolių ekstraktuose

Reaktyviosios deguonies rūšys (RDR) susidaro biologinėse sistemose kaip normalaus metabolizmo dalis. Neigiami aplinkos veiksniai, tokie kaip sausros stresas, padidina RDR lygį, kuris kenkia augalui. Fermentai, tokie kaip superoksido dismutazė, atlieka gyvybiškai svarbų vaidmenį mažinant ROS lygį ir padedant išvengti oksidacinio streso. Šio fermento aktyvumo matavimas spektrofotometriškai suteikia galimybę suprasti svarbią apsaugos nuo oksidacinio streso dalį [67].



2.35 pav. Superoksido dismutazės koncentracijos įvertinimas brokolių *in vitro* ekstraktuose

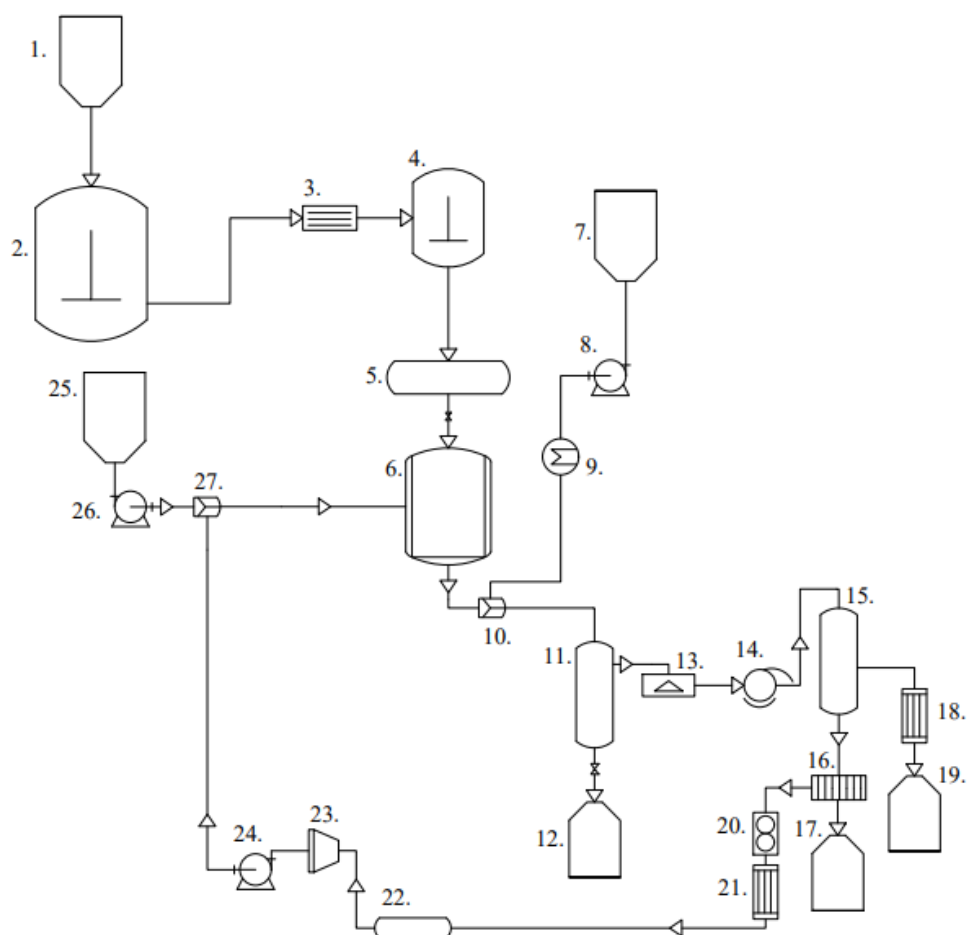
Įvertinus bioaktyvių junginių buvusių brokolių *in vitro* terpėje superoksido dismutazės aktyvumą, iš tyrimo metu gautų duomenų (žr. 2.37 pav.), matyti, kad didžiausias SOD aktyvumas nustatytas MS brokolių terpėje, kuri yra be bioaktyviųjų junginių. Vertinant rezultatus su 2 ir 4 junginiais galima apibendrinti, kad 4 junginys 3,3'-(fenilazandiil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas turėjo didesnę įtaką paskatinti augaluose antioksidacinių junginių susidarymą. Taigi, remiantis gautais rezultatais, galima pastebėti, jog MS mitybinės terpės papildymas bioaktyviais junginiais neturėjo didelio pokyčio, skatinančio antioksidacinių junginių susidarymą augale.

3. Rekomendacijos (inžinerinė dalis)

Remiantis gautais tyrimo rezultatais ir mokslinės literatūros šaltiniais, buvo nubraižyta gliukozinolatų išskyrimo technologinė schema iš brokolių. Nustatyta, kad tinkamiausias biologiškai aktyvusis junginys, kuris skatino gliukozinolatų susidarymą brokoliuose *in vitro*, augusiuose MS terpėje buvo 3,3'-((4-etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas. Gliukozinolatų išskyrimo technologinė schema yra pateikta (žr. 3.1 pav.).

Pirmiausia vyksta brokolių biomasės auginimas, kuomet MS mitybinė terpė (1) yra papildyta 3,3'-((4-etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidu). Brokolio daigai, augę *in vitro* sąlygomis, tiekiami į bioreaktorių (2). Padidėjęs biomasės kiekis yra liofilizuojamas (3) ir sumalamas malūne (4), stengiantis mechaniškai susmulkinti brokolio daigus. Gauta augalinė žaliava patalpinama į rezervuarą (5), iš kurio yra vis perduodama perdirbta biomasė į ekstraktorių (6). Ekstrakcijai yra naudojamas metanolis, kuris yra laikomas (25) talpykloje ir yra transportuojamas siurbliu (26). Metanolis transportuojamas į ekstraktorių (6). Čia vyksta kietafazė ekstrakcija. Jos metu fermentas mirozinazė inaktyvuojamas, tam, kad išvengti gliukozinolatų nuostolių. Talpykloje (7) esantis heksanas tiekiamas siurbliu (8) į šilumokaitį (9), o vėliau į maišyklę (10) kur maišymo procesas trunka 3 valandas.

Gauta suspensija transportuojama į separatorių (11), kur yra atskiriamos medžiagos. Riebalai nusėdę ant separatoriaus apačios patenka į talpyklą (12). Iš separatoriaus gauta žaliava yra nucentrifuguojama (13) ir nufiltruojama (14), norint eliminuoti šalutinius netirpius junginius. Toliau vyksta išgarinimas antrajame separatoriuje (15), kuriame lakiosios medžiagos yra atskiriamos nuo koncentrato. Vėliau jis tiekiamas yra į kondensatorių (18) ir skystos agregatinės būsenos pavidalu į talpą (19). Kitas ekstrakto srautas juda į garintuvą (16), kuriame yra pašalinamas metanolis judėdamas pro kondensatorių (21) ir surenkamas rezervuare (22), kuriame metanolis gali vėl būti panaudotas procese. Šis yra atvėsinamas aušintuve (23), siurbliu (24) transportuojamas ir maišykle (27) įmaišomas į srautą. Gautas švarus produktas yra surenkamas talpykloje (17). Gautas produktas yra kieto pavidalo – milteliai [68].



3.1 pav. Gliukozinolatų išskyrimo technologinė schema iš brokolių augusių MS *in vitro* terpėje

3.1 lentelė. Technologinėje schemoje pateiktų aparatų numeravimas ir reikšmė

Numeravimas	Aparatas
1	Mitybinė terpė su biologiškai aktyviuoju junginiu
2	Bioreaktorius
3	Liofilizatorius
4	Rutulinis malūnas
5	Augalinės žaliavos rezervuaras
6	Ekstraktorius
7	Heksano talpykla
8, 24, 26	Siurbliai
9	Šilumokaitis
10, 27	Maišytuvai
11, 15	Separatoriai
12	Riebalų mišinio talpa
13	Centrifuga
14	Filtrai
16	Garintuvai

17	Gauto produkto talpa
18, 21	Kondensatoriai
19	Lakiųjų junginių talpa
20	Srauto matuoklis
22	Metanolio rezervuaras
23	Aušintuvas
25	Metanolio talpa

4. Darbuotojų sauga ir sveikata

Šiame skyriuje yra pateikiama informacija apie profesinę riziką laboratorijoje bei galimus darbo aplinkos pavojus ir prevencines priemones.

Magistrinio darbo tyrimas yra atliekamas biotechnologijos laboratorijoje. Laboratorijoje atliekama: reagentų paruošimas, ekstrakcijos, spektrofotometriniai tyrimai, antimikrobiniai aktyvumo įvertinimai.

Tyrimo metu yra naudojamos įvairios cheminės medžiagos kaip pvz.: stipriosios rūgštys, organiniai tirpikliai, buferiai bei druskos.

4.1. Profesinės rizikos veiksniai

Laboratorijoje privalo būti sudarytos saugios sąlygos darbui. Todėl prieš pradedant veiklą turi būti įvertinta profesinė rizika ir parinktos prevencijos priemonės. Profesinės rizikos veiksniai gali būti cheminiai, fizikiniai, biologiniai ir ergonominiai. Todėl įvertinus profesinę riziką, privaloma taikyti įvairias prevencines darbo apsaugos priemones, kurios užtikrintų saugią darbo aplinką ir nesukeltų pavojų žmogaus sveikatai, kaip pvz.: kolektyvinės ir asmeninės apsaugos priemonės [69].

4.1.1. Cheminiai veiksniai

Dirbant su 2.1.1 skyrelyje pateiktomis darbo priemonėmis, prietaisais ir 2.1.2 skyrelyje pateiktais reagentais kyla šios rizikos:

- Lakieji tirpikliai (etanolis, metanolis) – turi dirginantį poveikį kvėpavimo takams.
- Oksidatoriai (HgCl_2 , FeCl_2) – toksiški, galimi odos nudegimai.
- Rūgštys (HCl , trichloracto rūgštis) – ėsdinantys, turi dirginantį poveikį odai.
- Sunkieji metalai (Cu^{2+} , Zn^{2+}) – toksiški, yra linkę kauptis organizme [70].

Kadangi yra dirbama su daugiau nei 40 skirtingų reagentų, kai kurie iš jų pagal CLP reglamentą (Europos Parlamento ir Tarybos Reglamentas) (ES Nr. 1272/2008) tam tikri junginiai klasifikuojami kaip pavojingi ir turi pavojingumo ir atsargumo frazes (žr. 1 priedą) [71]. Cheminės medžiagos taip pat yra klasifikuojamos ir ženklinamos pagal GHS (angl. Globally Harmonized System) sistemą.

4.1 lentelė. Cheminių medžiagų IPRD ir prevencinės priemonės

Cheminė medžiaga	Ilgalaikio poveikio ribinis dydis IPRD	Asmeninės apsaugos priemonės (AAP)	Kolektyvinės apsaugos priemonės (KAP)
HgCl_2	0,025 mg/m ³ (Hg, bendro) [70]	Nitrilinės pirštinės, apsauginiai akiniai arba skydai, laboratoriniai chalatai, uždari batai	Darbas traukos spintoje. Pavojingos cheminės medžiagos yra atskirtos specifiniais ženklais pagal GHS ženklimą, laikomos tam tikrose talpose ir patalpose. Įrengta vėdinimo sistema – kondicionierius. •
FeCl_2	–		
Trichloracto rūgštis	1 mg/m ³ [70]		
DMSO	–		
PMSF	–		

			Laboratorijoje yra įrengti akių plovimo prietaisai.
--	--	--	---

Esant pavojui sveikatai darbuotojas turi teisę nutraukti darbo procesą ir išeiti iš patalpos [72].

1. Esant kontaktui cheminėms medžiagoms su oda, akimis svarbu pašalinti užterštus darbužius, nuplauti pažeistą vietą vandeniu apie 15-20 min, o esant šalutiniams poveikiams, nedelsiant kreiptis į medikus.
2. Įkvėpus cheminių reagentų būtina išnešti asmenį į gryną orą, atlikti dirbtinį kvėpavimą, jeigu būtina, naudoti deguonies kaukę, kreiptis pas gydytojus.
3. Prarijus – skubiai kreiptis į gydymo įstaigą.

Biologiniai veiksniai:

Atliekant tyrimus su bakterijomis ir mikroorganizmais, kyla pavojus alerginėms reakcijoms ar infekcijoms. Tokiu atveju darbuotojai turi būti informuoti dėl galimų pavojų. Naudotos prevencinės priemonės: nitrilinės pirštines, spiritinė lemputė, laminaras, laboratorinis chalatas, apsauginiai akiniai.

Fizikiniai veiksniai:

Karšti paviršiai, kaitinimo prietaisai, veikiantys elektros įrenginiai, garai gali sukelti sunkius nudegimus. Prevencija: prietaisai yra paženklinėti įspėjamaisiais ženklais, kurie įspėja apie karštus paviršius [69], karšti paviršiai izoliuojami, elektriniai prietaisai įnulinami [73].

Ergonominiai veiksniai

Ilgalaikis stovėjimas ar sėdėjimas prie laboratorinių stalų ar prietaisų gali sukelti stuburo skausmus. Prevencija: keisti darbo pozą, daryti 30 minučių pertraukas kas 2 valandas.

Netinkamas aukštis pipetavimui ir mikroskopavimui gali sukelti įtampą kaklo srityje. Prevencija: parinkti tinkamą aukštį pagal dirbančiojo antropometrinius duomenis [75].

Norint užtikrinti saugias darbo sąlygas ir išvengti šių veiksnių kiekvienas asmuo dirbantis laboratorijoje turi būti išklauses darbų saugos ir sveikatos instruktažą ir turėti periodinius darbų saugos ir sveikatos instruktavimus darbo vietoje.

4.2. Priešgaisrinės apsaugos priemonės

Renkant priešgaisrines priemones svarbu įvertinti kokios medžiagos ir prietaisai yra laboratorijoje ir kokius pavojus jie gali sukelti. Pirmiausia darbovietė turi būti apsirūpinusi gesinimo priemonėmis tiek stacionariomis, tiek mobiliomis. Šiuo atveju automatiniai dūmų jutikliai ir CO₂ milteliniai gesintuvai [77]. ABC tipo milteliniai gesintuvai yra universalūs ir yra tinkami gesinti A (kietųjų medžiagų), B (skystųjų medžiagų) ir C (dujinių medžiagų) tipų gaisrams. Degias medžiagas svarbu laikyti nuo atviros liepos ir karštų paviršių. Esant ekstremalioms sąlygoms kaip gaisro pavojus, svarbu palikti patalpas, naudoti kvėpavimo apsaugos priemones ir naudotis parengtu evakuacijos planu [78].

Išvados

1. Nustatyta, kad 3,3'-((4-etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas pasižymėjo didesnėmis antioksidacinėmis savybėmis, lyginant su kitais tiriamaisiais hidrazidų junginiais. Intensyviausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo 3,3'-(fenilazandiil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas) pagal ABTS metodą.
2. Analizės metu buvo įvertinta brokolių *in vitro*, augusių MS terpėje su biologiškai aktyviaisiais junginiais įtaka antioksidacinėms savybėms. Naudojant DPPH metodą 3,3'-((4-etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas turėjo įtakos antioksidaciniams junginiams susidaryti. Didžiausiu antibakteriniu poveikiu prieš bakterijas *Bacillus subtilis* pasižymėjo 3,3'-(fenilazandiil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas).
3. Įvertinus chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų, gliukozinolatų ir *L*-prolino koncentracijas MS brokolių *in vitro* terpėse, nustatyta, jog junginiai turėjo įtakos jų koncentracijoms padidinti. Didžiausiomis bioaktyviųjų junginių koncentracijomis pasižymėjo MS brokoliai *in vitro*, augę su 3,3'-((4-etoksifenil)azanediil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamidas) junginiu.
4. Nustatyta, kad brokoliai, augę MS terpėje su 3,3'-(fenilazandiil)bis(N-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)propanamido junginiu, padidino fenolinių junginių koncentracijas. Įvertinus superoksido dismutazės koncentraciją, nustatyta, kad junginiai turėjo mažai įtakos antioksidacinių fermentų aktyvumui.

Literatūros sąrašas

1. SZAJDAK, L. W. Introduction: Biologically Active Compounds. In *Bioactive Compounds in Agricultural Soils* [interaktyvus]. 2016, 1–22. Springer International Publishing. [žiūrėta 2025-03-27]. Prieiga per: https://doi.org/10.1007/978-3-319-43107-9_1
2. POPIOŁEK, Ł. Hydrazide–hydrazones as potential antimicrobial agents: overview of the literature since 2010. *Medicinal Chemistry Research: An International Journal for Rapid Communications on Design and Mechanisms of Action of Biologically Active Agents* [interaktyvus]. 2017, 26(2), 287–301 [žiūrėta 2025-02-02]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s00044-016-1756-y>
3. OWIS, A. I. Broccoli; the green beauty: a review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2015, 7(9), 696 [žiūrėta 2025-02-02].
4. SHIRI, P. An overview on the copper-promoted synthesis of five-membered heterocyclic systems. *Applied Organometallic Chemistry* [interaktyvus]. 2020, 34(5) [žiūrėta 2025-02-02]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/aoc.5600>
5. POPIOŁEK, Ł., and BIERNASIUK, A. Design, synthesis, and in vitro antimicrobial activity of hydrazide–hydrazones of 2-substituted acetic acid. *Chemical Biology & Drug Design* [interaktyvus]. 2016, 88(6), 873–883 [žiūrėta 2025-02-03]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/cbdd.12820>
6. MOHD.S. K., SABA P. S., and NAZIA T. A systematic review on the synthesis and biological activity of hydrazide derivatives. *Hygeia journal for drugs and medicines* [interaktyvus]. 2017 [žiūrėta 2025-02-03]. Prieiga per: doi:10.15254/H.J.D.Med.9.2017.165
7. TARESH, B. H., AL-SAFFAR, A. Q., and EWIES, E. F. Synthesis, Reactions, and Antimicrobial Evaluation of 2-(1, 3-dioxoisindolin-2-yl) acetohydrazide derivatives. *Egyptian Journal of Chemistry* [interaktyvus]. 2022, 65(11), 541–548 [žiūrėta 2025-02-04]. Prieiga per: doi:10.21608/ejchem.2022.136934.6037
8. POPIOŁEK, Ł., and BIERNASIUK, A. Hydrazide-hydrazones of 3-methoxybenzoic acid and 4-tert-butylbenzoic acid with promising antibacterial activity against *Bacillus* spp. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. 2016b, 31(sup1), 62–69 [žiūrėta 2025-02-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3109/14756366.2016.1170012>
9. EL-SABBAGH, O. I., and RADY, H. M. Synthesis of new acridines and hydrazones derived from cyclic β -diketone for cytotoxic and antiviral evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. 2009, 44(9), 3680–3686 [žiūrėta 2025-02-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.04.001>
10. TIAN B, et al. Synthesis and antiviral activities of novel acylhydrazone derivatives targeting HIV-1 capsid protein. *Bioorg Med Chem Lett* [interaktyvus]. 2009, 19:2162–7 [žiūrėta 2025-02-10]. Prieiga per: doi:10.1016/j.bmcl.2009.02.116
11. KUMAR, D., MARUTHI KUMAR, N., GHOSH, S., and SHAH, K. Novel bis(indolyl)hydrazide–hydrazones as potent cytotoxic agents. *Interaktyvus. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [interaktyvus]. 2012, 22(1), 212–215 [žiūrėta 2025-02-15]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.11.031>
12. ZUBRICKĖ, I., et al. Synthesis and In Vitro Evaluation as Potential Anticancer and Antioxidant Agents of Diphenylamine-Pyrrolidin-2-one-Hydrazone Derivatives. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2023, 24(23), 16804–16804 [žiūrėta 2025-02-15]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/ijms242316804>

13. AHMED, H. E. A., ABDEL-SALAM, H. A., and SHAKER, M. A. Synthesis, characterization, molecular modeling, and potential antimicrobial and anticancer activities of novel 2-aminoisoindoline-1,3-dione derivatives. *Bioorganic Chemistry* [interaktyvus]. 2016, 66, 1–11 [žiūrėta 2025-02-18]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.03.003>
14. KAISE, A., OHTA, K., and ENDO, Y. Design, synthesis, and anti-proliferative activity of 1-(4-methoxyphenyl)-12-hydroxymethyl-p-carborane derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. 2016, 122, 257–263 [žiūrėta 2025-02-18]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.06.029>
15. SEET, R. C. S., et al. Oxidative damage in Parkinson disease: Measurement using accurate biomarkers. *Free Radical Biology & Medicine* [interaktyvus]. 2010, 48(4), 560–566 [žiūrėta 2025-02-20]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.026>
16. KOSTOVA, I., and SASO, L. Advances in research of Schiff-base metal complexes as potent antioxidants. *Current Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. 2013, 20(36), 4609–4632 [žiūrėta 2025-02-20]. Prieiga per: <https://doi.org/10.2174/09298673113209990149>
17. de OLIVEIRA C. B., J., FRANÇA, T. C. C., LAPLANTE, S. R., and VILLAR, J. D. F. Synthesis and biological activity of hydrazones and derivatives: A review. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. 2020, 20(5), 342–368 [žiūrėta 2025-02-23]. Prieiga per: <https://doi.org/10.2174/1389557519666191014142448>
18. DEMURTAS, M., et al. Indole derivatives as multifunctional drugs: Synthesis and evaluation of antioxidant, photoprotective and antiproliferative activity of indole hydrazones. *Interaktyvus. Bioorganic Chemistry* [interaktyvus]. 2019, 85, 568–576 [žiūrėta 2025-02-23]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.02.007>
19. TELVEKAR, V. N., BELUBBI, A., BAIRWA, V. K., and SATARDEKAR, K. Novel N'-benzylidene benzofuran-3-carbohydrazide derivatives as antitubercular and antifungal agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [interaktyvus]. 2012, 22(6), 2343–2346 [žiūrėta 2025-02-23]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.01.067>
20. GURKOK, G., ALTANLAR, N., and SUZEN, S. Investigation of Antimicrobial Activities of Indole-3-Aldehyde Hydrazide/Hydrazone Derivatives. *Chemotherapy* [interaktyvus]. 2009, 55(1), 15–19 [žiūrėta 2025-02-23]. Prieiga per: doi:10.1159/000166999
21. SIBEL S. Antioxidant Activities of Synthetic Indole Derivatives and Possible Activity Mechanisms. *Springer EBooks* [interaktyvus]. 2007, 145–178 [žiūrėta 2025-02-25]. Prieiga per: https://doi.org/10.1007/7081_2007_074
22. EVRANOS AKSÖZ, et al. Antimicrobial Activities of Some Pyrazoline and Hydrazone Derivatives. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* [interaktyvus]. 2020, 500–505 [žiūrėta 2025-02-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2019.42650>
23. ALAM, M., et al. A Review Exploring Biological Activities of Hydrazones. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* [interaktyvus]. 2014, 6 (2), 69 [žiūrėta 2025-02-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.4103/0975-7406.129170>
24. WANG, Y., et al. Synthesis and Antibacterial Activity of 5-(2-Hydroxyphenyl)-1,3,4-Thiadiazol-2-Yl-Sulfanyl Acetyl Hydrazones. *Chinese Journal of Organic Chemistry* [interaktyvus]. 2013, 33(1), 154–154 [žiūrėta 2025-02-28]. Prieiga per: <https://doi.org/10.6023/cjoc201206013>
25. ILKNUR B., et al. Synthesis, Characterization and Biological Activity of Vic-Dioxime Derivatives Containing Benzaldehydhydrazone Groups and Their Metal Complexes. *African*

- Journal of Microbiology Research* [interaktyvus]. 2011, 5 (3), 271–283 [žiūrėta 2025-03-03]. Prieiga per: <https://doi.org/10.5897/ajmr10.622>
26. POPIOŁEK, Ł. Updated information on antimicrobial activity of hydrazide-hydrazones. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2021, 22(17), 9389 [žiūrėta 2025-03-03]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/ijms22179389>
 27. TUMOSIENĖ, I., et al. Synthesis of 1-(5-Chloro-2-Hydroxyphenyl)-5-Oxopyrrolidine-3-Carboxylic Acid Derivatives and Their Antioxidant Activity. *Molecules/Molecules Online/Molecules* [interaktyvus]. 2019, 24(5), 971–971 [žiūrėta 2025-03-04]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/molecules24050971>
 28. BILSKA, K., WOJCIECHOWSKA, N., ALIPOUR, S., and KALEMBA, E. M. Ascorbic acid-the little-known antioxidant in woody plants. *Antioxidants* [interaktyvus]. Basel, Switzerland. 2019, 8(12), 645 [žiūrėta 2025-03-04]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/antiox8120645>
 29. VARVARA, M., et al. The use of ascorbic acid as a food additive: Technical-legal issues. *Italian Journal of Food Safety* [interaktyvus]. 2016, 5(1), 4313 [žiūrėta 2025-03-04]. Prieiga per: <https://doi.org/10.4081/ijfs.2016.4313>
 30. YEHYE, W. A., et al. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): a review. *European Journal of Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. 2015, 101, 295–312 [žiūrėta 2025-03-04]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.026>
 31. HACIŞEVKI, A., and BABA, B. An overview of melatonin as an antioxidant molecule: A biochemical approach. In *Melatonin - Molecular Biology, Clinical and Pharmaceutical Approaches* [interaktyvus]. 2018. IntechOpen [žiūrėta 2025-03-07]. Prieiga per: doi:10.5772/intechopen.79421
 32. ERLAND, L. A. E., CHATTOPADHYAY, A., JONES, A. M. P., and SAXENA, P. K. Melatonin in plants and plant culture systems: Variability, stability and efficient quantification. *Frontiers in Plant Science* [interaktyvus]. 2016, 7, 1721 [žiūrėta 2025-03-07]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01721>
 33. ARES, A. M., NOZAL, M. J., and BERNAL, J. Extraction, chemical characterization and biological activity determination of broccoli health promoting compounds. *Journal of Chromatography A* [interaktyvus]. 2013, 1313, 78–95 [žiūrėta 2025-03-07]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.051>
 34. Brassica oleracea. *Monaco Nature Encyclopedia: discover the biodiversity*. (n.d.) [žiūrėta 2025-03-07]. Prieiga per: <https://www.monaconatureencyclopedia.com/brassica-oleracea/?lang=en>
 35. LATTE, K. P., APPEL, K.-E., and LAMPEN, A. Health benefits and possible risks of broccoli – An overview. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* [interaktyvus]. 2011, 49(12), 3287–3309 [žiūrėta 2025-03-08]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.08.019>
 36. S. KUMAR and A. ANDY. Health Promoting Bioactive Phytochemicals from Brassica. *International Food Research Journal*. 2012, 19, 141-152 [žiūrėta 2025-03-08].
 37. NAGRAJ, G. S. Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables. *Broccoli* [interaktyvus]. 2020, 5–17 [žiūrėta 2025-03-08]. Prieiga per: doi:10.1016/B978-0-12-812780-3.00001-5

38. VASANTHI, H., MUKHERJEE, S., and DAS, D. Potential Health Benefits of Broccoli- A Chemico-Biological Overview. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. 2009, 9(6), 749–759 [žiūrėta 2025-03-08]. Prieiga per: <https://doi.org/10.2174/138955709788452685>
39. BOROWSKI, J., et al. Content of selected bioactive components and antioxidant properties of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *European Food Research and Technology* [interaktyvus]. 2008, 226(3), 459–465 [žiūrėta 2025-03-08]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0557-9>
40. SYED, R. U., et al. Broccoli: A multi-faceted vegetable for health: An in-depth review of its nutritional attributes, antimicrobial abilities, and anti-inflammatory properties. *Antibiotics* [interaktyvus]. Basel, Switzerland. 2023, 12(7), 1157 [žiūrėta 2025-03-09]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071157>
41. BARBER, T. M., KABISCH, S., PFEIFFER, A. F. H., and WEICKERT, M. O. The health benefits of dietary fibre. *Nutrients* [interaktyvus]. 2020, 12(10), 3209 [žiūrėta 2025-03-09]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/nu12103209>
42. KIM, J. S., CUONG, D. M., BAE, Y. B., and CHO, S. K. Antioxidant and antiproliferative activities of solvent fractions of broccoli (*Brassica oleracea* L.) sprout. *Applied Biological Chemistry* [interaktyvus]. 2022, 65(1) [žiūrėta 2025-03-11]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1186/s13765-022-00700-2>
43. SUN, T., POWERS, J., and TANG, J. Evaluation of the antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices. *Food Chemistry* [interaktyvus]. 2007, 105(1), 101–106 [žiūrėta 2025-03-11]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.048>
44. NANDINI, D. B., RAO, R. S., DEEPAK, B. S., and REDDY, P. B. Sulforaphane in broccoli: The green chemoprevention. Role in cancer prevention and therapy. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP* [interaktyvus]. 2020, 24(2), 405 [žiūrėta 2025-03-11]. Prieiga per: https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_126_19
45. SANTÍN-MÁRQUEZ, R., et al. Sulforaphane - role in aging and neurodegeneration. *GeroScience* [interaktyvus]. 2019, 41(5), 655–670 [žiūrėta 2025-03-11]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s11357-019-00061-7>
46. ZHANG, Y., Sulforaphane suppresses metastasis of triple-negative breast cancer cells by targeting the RAF/MEK/ERK pathway. *NPJ Breast Cancer* [interaktyvus]. 2022, 8(1), 40 [žiūrėta 2025-03-11]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41523-022-00402-4>
47. LI, Y., et al. Sulforaphane, a Dietary Component of Broccoli/Broccoli Sprouts, Inhibits Breast Cancer Stem Cells. *Clinical Cancer Research* [interaktyvus]. 2010, 16(9), 2580–2590 [žiūrėta 2025-03-11]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-09-2937>
48. JANG, H. W., MOON, J.-K., and SHIBAMOTO, T. Analysis and Antioxidant Activity of Extracts from Broccoli (*Brassica oleracea* L.) Sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2015, 63(4), 1169–1174 [žiūrėta 2025-03-12]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf504929m>
49. BOROWSKI, J., SZAJDEK EULALIA, A., and BOROWSKA E. C. H., J. Content of selected bioactive components and antioxidant properties of broccoli (*Brassica oleracea* L) [interaktyvus]. 2008, 226, 459–465 [žiūrėta 2025-03-12]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0557-9>
50. GASMI, A., et al. Anticancer activity of broccoli, its organosulfur and polyphenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [interaktyvus]. 2024, 64(22),

- 8054–8072 [žiūrėta 2025-03-12]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2195493>
51. LI, R., et al. Glucoraphenin, sulforaphane, and antiproliferative capacity of radish sprouts in germinating and thermal processes. *European Food Research and Technology* [interaktyvus]. 2017, 243(4), 547–554 [žiūrėta 2025-03-12]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2764-3>
 52. NAGRAJ, G. S. Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables. *Broccoli* [interaktyvus]. 2020, 5–17 [žiūrėta 2025-03-17]. Prieiga per: doi:10.1016/B978-0-12-812780-3.00001-5
 53. ZEHIROGLU, C., and OZTURK SARIKAYA, S. B. The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. *Journal of Food Science and Technology* [interaktyvus]. 2019, 56(11), 4757–4774 [žiūrėta 2025-03-17]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03952-x>
 54. FAVELA-GONZÁLEZ, K. M., HERNÁNDEZ-ALMANZA, A. Y., and DE la FUENTE-SALCIDO, N. M. The value of bioactive compounds of cruciferous vegetables (*Brassica*) as antimicrobials and antioxidants: A review. *Journal of Food Biochemistry* [interaktyvus]. 2020, 44(10), e13414 [žiūrėta 2025-03-17]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/jfbc.13414>
 55. MAHN, A., and CASTILLO, A. Potential of sulforaphane as a natural immune system enhancer: A review. *Molecules* [interaktyvus]. 2021, 26(3), 752 [žiūrėta 2025-03-17]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/molecules26030752>
 56. SUBRAMANIAM, S., SELVADURAY, K. R., and RADHAKRISHNAN, A. K. Bioactive compounds: Natural defense against cancer. *Biomolecules* [interaktyvus]. 2019, 9(12), 758 [žiūrėta 2025-03-18]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/biom9120758>
 57. BENZIE, I. F. F., and DEVAKI, M. The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications. *Interaktyvus. In Measurement of Antioxidant Activity & Capacity* [interaktyvus]. 2017, 77–106. John Wiley & Sons, Ltd [žiūrėta 2025-03-18]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch5>
 58. PRIOR, R. L., WU, X., and SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. 2005, 53(10), 4290–4302 [žiūrėta 2025-03-18]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
 59. SHALABY EA, and SHANAB SMM. Comparison of DPPH and ABTS assay for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* . 2013, 42(5), 556-564.
 60. ChimActiv. Determination of the activity of an antioxidant by the DPPH assay. (n.d.). [žiūrėta 2025-03-19] Prieiga per: <https://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe>
 61. BEDLOVIČOVÁ, Z., et al. A brief overview on antioxidant activity determination of silver nanoparticles. *Molecules* [interaktyvus]. 2020, 25(14), 3191 [žiūrėta 2025-03-01]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/molecules25143191>
 62. COSTACHE, M. A., CAMPEANU, G. H. E. O. R. G. H. E., and NEATA, G. Studies concerning the extraction of chlorophyll and total carotenoids from vegetables. *Romanian Biotechnological Letters*. 2012, 17(5), 7702-7708.

63. JONUŠKIENĖ, I. Augalų ir mikroorganizmų biotechnologija: metodinė priemonė [interaktyvus]. Kaunas, 2012, 16-38 p. TEV [žiūrėta 2025-03-01]. Prieiga per: <https://doi.org/10.5755/e01.9786094331886>
64. BACH, T. M. H., and TAKAGI, H. Properties, metabolisms, and applications of l-proline analogues. *Applied Microbiology and Biotechnology* [interaktyvus]. 2013, 97(15), 6623–6634 [žiūrėta 2025-03-01]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5022-7>
65. BISCHOFF, K. L. Glucosinolates. In *Nutraceuticals* [interaktyvus]. 2021, 903–909 [žiūrėta 2025-03-25]. Elsevier. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821038-3.00053-7>
66. AINSWORTH, E. A., and GILLESPIE, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* [interaktyvus]. 2007, 2(4), 875–877 [žiūrėta 2025-03-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>
67. ELAVARTHI, S., and MARTIN, B. Spectrophotometric assays for antioxidant enzymes in plants. In *Methods in Molecular Biology* [interaktyvus]. 2010, 273–280 [žiūrėta 2025-03-25]. Humana Press. Prieiga per: doi:10.1007/978-1-60761-702-0_16
68. DSM IP Assets BV. Process for extraction of glucosinolates from broccoli seeds. Inventors: Christof Wehrli, Jan Schutz. United States patent, US20130030162A1, US 8491944 B2, A61K36/31, 2013, [žiūrėta 2025-04-29]. Prieiga per: <https://patents.google.com/patent/US8491944B2/en>
69. Darbuotojų aprūpinimo asmeninėmis apsauginėmis priemonėmis nuostatai. Valstybės žinios, 2007, Nr. 123-5055
70. HN 23:2011. Cheminių medžiagų profesinio poveikio ribiniai dydžiai. Matavimo ir poveikio vertinimo bendrieji reikalavimai. Valstybės žinios, 2011, Nr. 112-5274
71. Aplinkos apsaugos agentūra. CLP reglamentas, klasifikavimas, ženklėjimas ir pakavimas. 2024. Prieiga per: <https://aaa.lrv.lt/lt/veiklos-sritys/chemines-medziagos-ir-misiniai/clp-reglamentas-klasifikavimas-zenklinimas-ir-pakavimas/clp-reglamentas/>
72. Lietuvos Respublikos darbuotojų saugos ir sveikatos įstatymas. Valstybės žinios, 2003, Nr. 70-3170
73. Europos Komisija. Sveikata ir sauga. Pavojingumo simboliai. Prieiga per: https://ec.europa.eu/taxation_customs/dds2/SAMANCTA/LT/Safety/SymbolsOfHazard_LT.htm
74. Europos Komisija. Sveikata ir sauga. Pavojingumo ir atsargumo frazės. Prieiga per: https://ec.europa.eu/taxation_customs/dds2/SAMANCTA/LT/Safety/HP_LT.htm
75. Elektros įrenginių įrengimo bendrosios taisyklės. Valstybės žinios, 2012, Nr. 18-816
76. Ergonominių profesinės rizikos veiksnių tyrimo metodiniai nurodymai. Valstybės žinios, 2005-08-06, Nr. 95- 3536 (Aktuali redakcija: Nr. A1-626/V-1933, 2021-08-25, paskelbta TAR 2021-08-25, i. k. 2021-17898)
77. Gaisrinės saugos pagrindiniai reikalavimai. Valstybės žinios, 2010, Nr. 146 -7510 (Aktuali redakcija: Valstybės žinios, 2011-06-21, Žin., 2011, Nr.: 75-3661; 2011-02-24, Žin., 2011, Nr. 23-1137)
78. Bendrosios gaisrinės saugos taisyklės. Valstybės žinios, 2010, Nr. 99 - 5167 (Aktuali redakcija: Valstybės žinios Nr. 118-5970) <https://e-seimas.lrs.lt/portal/legalAct/lt/TAD/TAIS.250714/asr>

Priedai

1 priedas. Cheminių medžiagų charakteristika

Cheminė medžiaga	H (pavojingumo) frazė	P (atsargumo) frazė	GHS klasifikavimas	Pavojingumo simbolis
HgCl ₂	H300, H310, H330, H373	P260, P280, P301+P310	• Ūmus toksiškumas, 2 pavojingumo kategorija (žr. 4.1 pav.) • Specifinis toksiškumas organams, 2 pavojingumo kategorija • Pavojinga aplinkai, 1 pavojingumo kategorija (žr. 4.2 pav.) [73]	 4.1 pav. Simbolis: šauktukas  4.2 pav. Simbolis: aplinka
FeCl ₂	H314, H302	P280, P305+P351+P338	• Odos ėsdinimas, 1B kategorija (žr. 4.3 pav.). • Stiprus akių pažeidimas 1 kategorija.	 4.3 pav. Simbolis: kaukolė ir sukryžiuoti kaulai
Trichloracto rūgštis	H314, H332	P260, P280, P301+P330	• Odos ėsdinimas, 1B kategorija. • Stiprus akių pažeidimas, 1 kategorija. • Ūmus toksiškumas, 3 kategorija (žr. 4.4 pav.).	 4.4 pav. Simbolis: korozija

DMSO	H319, H361	P280, P305+P351	Toksinis poveikis vaisiui, 2 kategorija (žr. 4.5 pav.).	 4.5 pav. Simbolis: pavojai sveikatai
PMSF	H301, H311, H331	P261, P280, P302+P352 [74]	Ūmus toksiškumas, 3 kategorija.	-