



DOVILĖ GRAUZDYTĖ

---

**MAŽAI TIRTŲ  
PHYLLANTHUS  
PHILLYREIFOLIUS IR  
APHLOIA THEIFORMIS  
RŪŠIŲ FITOCHEMINĖ  
SUDĖTIS IR *IN VITRO*  
BIOAKTYVUMAS**

---

DAKTARO DISERTACIJOS  
SANTRAUKA

GAMTOS MOKSLAI,  
CHEMIJA (N 003)

Kaunas  
2020

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

DOVILĖ GRAUZDYTĖ

**MAŽAI TIRTŲ *PHYLLANTHUS PHILLYREIFOLIUS* IR  
*APHLOIA THEIFORMIS* RŪŠIŲ FITOCHEMINĖ SUDĖTIS IR  
*IN VITRO* BIOAKTYVUMAS**

Daktaro disertacijos santrauka  
Gamtos mokslai, chemija (N 003)

2020, Kaunas

Disertacija rengta 2014–2019 metais Kauno technologijos universiteto Cheminės technologijos fakulteto Maisto mokslo ir technologijos katedroje.

**Mokslinis vadovas:**

Prof. dr. Petras Rimantas VENSKUTONIS (Kauno technologijos universitetas, gamtos mokslai, chemija, N 003).

**Redagavo:** Inga Nanartonytė

**Chemijos mokslo krypties disertacijos gynimo taryba:**

Prof. dr. Vytautas MICKEVIČIUS (Kauno technologijos universitetas, gamtos mokslai, chemija, N 003) – **pirmininkas**;

Prof. dr. Vytas MARTYNAITIS (Kauno technologijos universitetas, gamtos mokslai, chemija, N 003);

Dr. Milda PUKALSKIENĖ (Kauno technologijos universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, T 005);

Doc. dr. Vilma KAŠKONIENĖ (Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslai, chemija, N 003);

Dr. RAMINTA VENSKUTONYTĖ (Lundo universitetas (Švedija), gamtos mokslai, biologija, N 010).

Disertacija bus ginama viešame chemijos mokslo krypties disertacijos gynimo tarybos posėdyje 2020 m. liepos 3 d. 11 val. Kauno technologijos universiteto Disertacijų gynimo salėje.

Adresas: K. Donelaičio g. 73-403, 44249 Kaunas, Lietuva.

Tel. + 370 37 300 042; faks. + 370 37 324 144; el. paštas [doktorantura@ktu.lt](mailto:doktorantura@ktu.lt).

Disertacijos santrauka išsiųsta 2020 m. birželio 3 d.

Su disertacija galima susipažinti interneto svetainėje <http://ktu.edu> ir Kauno technologijos universiteto bibliotekoje (K. Donelaičio g. 20, 44239 Kaunas).

## SIMBOLIAI IR SANTRUMPOS

a	aptikta
AA	antioksidacinis aktyvumas
ABTS <sup>+</sup>	2,2'-azinobis-3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgšties katijono laisvasis radikalas
AC	acetonas
AL	augalo liekanoje
BFJK	bendrasis fenolinių junginių kiekis
DCFH-DA	2',7'-dichlorfluoresceino diacetatas
DMD	diodų matricos detektorius
DPPH <sup>•</sup>	2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo laisvasis radikalas
E	ekstraktas
EC	etilacetatas
ESCh	efektyvioji skysčių chromatografija
ET	etanolis:vanduo (70:30)
ETPS	ekstrakcija tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje
f	frakcija
FD	fluorescencijos detektorius
FRAP	geležies redukavimo antioksidacinis aktyvumas
GE	geraniino ekvivalentas
GPx	glutationo peroksidazė
GRE	galo rūgšties ekvivalentas
HE	heksanas
HEK	žmogaus embriono inkstų
HepG2	žmogaus hematomos
HTR	hidroksitormentinė rūgštis
HTRE	hidroksitormentinės rūgšties ekvivalentas
IC50	ekstrakto koncentracija, reikalinga ląstelių gyvybingumui sumažinti 50 proc.
KAT	katalazė
KPGR	kiekybinė realiojo laiko polimerazės grandininė reakcija
L	liekana po ekstrakcijos
MME	maceravimas maišyklėje
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidas
N-Bf	n-butanolis
Nf1	nusėdusi frakcija (1 laikymas)
Nf2	nusėdusi frakcija (2 laikymas)
ORAC	deguonies radikalų sujungimo geba
OS	oksidacinis stresas
p	daugiapakopė ekstrakcija slėgyje
PGR	polimerazės grandininė reakcija

PRAM	pradinėje augalo masėje
RNR	ribonukleino rūgštis
ROS	intrašteliniai laisvieji radikalai
SE	sausasis ekstraktas
SF	sausoji frakcija
Sf	skaidri frakcija
SKE-CO <sub>2</sub>	superkritinė ekstrakcija anglies dioksidu
SM	sausoji augalo masė
SOD1	1 superoksido dismutazė (citoplazmoje)
SOD2	2 superoksido dismutazė (mitochondrijoje)
SOE	Soksleto ekstrakcija
ST	sulaikymo trukmė
StN	standartinis nuokrypis
T	tokoferolis
t	daugiapakopė ekstrakcija tradiciniais metodais
TE	trolokso ekvivalentas
TR	tormentinė rūgštis
TRE	tormentinės rūgšties ekvivalentas
<i>UESCh-QTOF</i>	ultraefektyvioji skysčių chromatografija su kvadrupoliniu skriejimo laiko masių spektrometru
V	vanduo
v	vienpakopė
Žf1	žalia frakcija (1 laikymas)
70 proc. etanolis	etanolio ir vandens (70:30) mišinys

## 1. ĮVADAS

Per pastarąjį dešimtmetį išaugęs žmonių susidomėjimas natūraliais, sveikatai naudingais produktais skatina mokslininkus ieškoti naujų šių produktų šaltinių, kurie ateityje galėtų būti pritaikyti kaip funkcinio maisto, maisto papildų, kosmetikos ar vaistų komponentai. Vaistiniai augalai dėl jų įvairovės ir sudėtyje esančių biologiškai veiklių junginių yra neišsemiamą medžiaga moksliniams tyrimams. Daugybė gerai žinomų vaistų, tokių kaip aspirinas, kodeinas, morfinas ir kt., yra gauti iš augalų, kuriuose esančių junginių nauda atrasta atsigręžus į tradicinę mediciną (Gilani ir Atta-ur-Rahman, 2005). Tikimasi, kad atrasti nauji junginiai ar jų mišiniai bus biologiškai aktyvesni nei dabar žinomos medžiagos.

Nors atlikta daug augalų sudėties ir bioaktyvumo mokslinių tyrimų, vis dar išlieka nemažai neištirtų augalų rūšių, kurios dėl jose esančių bioaktyviųjų junginių galėtų būti sėkmingai pritaikomos tam tikrose srityse. Šiuo atžvilgiu ypatingo mokslininkų dėmesio sulaukia atogrąžų flora, kurios išnykimo grėsmė yra didesnė nei daugelio kitų augalų rūšių skirtingose pasaulio dalyse. Prancūzėjai priklausanti vulkaninė Reunjono sala Indijos vandenyne pasižymi didele biologine įvairove. *Phyllanthus phillyreifolius* ir *Aphloia theiformis* yra endeminės šios salos augalų rūšys. Nors abi šios rūšys yra naudojamos vietinėje medicinoje, mokslinės informacijos apie jas yra nedaug. *Aphloia theiformis* augalas yra labiau tirtas, o apie *Phyllanthus phillyreifolius* beveik nieko nežinoma.

Siekiant iš augalų išgauti vertingus junginius, svarbu ekstrakciją atlikti efektyviai ir saugiai (Rosa, Moreno-Escamilla, Rodrigo-García ir Alvarez-Parrilla, 2019). Šiam tikslui taikomi tiek tradiciniai (distiliacijos, maceravimo maišyklėje, Soksleto), tiek inovatyvūs (superkritinių skysčių, ekstrakcijos tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje, ultragarso ir mikrobangų) ekstrakcijos metodai. Ieškant gautų ekstraktų pritaikymo galimybių, labai svarbu nustatyti jų sudėtį ir aktyvumą. Antioksidacinio aktyvumo įvertinimas yra vienas iš bioaktyvumo nustatymo būdų. Įprastai tai yra nebrangus procesas, suteikiantis vertingos informacijos apie augalų produktus ir padedantis atsirinkti žaliavą tolesniems tyrimams.

### **Darbo tikslas**

Šio darbo tikslas – taikant įvairius bioaktyviųjų junginių ekstrakcijos metodus ir naudojant skirtingo poliškumo tirpiklius išgauti *Phyllanthus phillyreifolius* ir *Aphloia theiformis* ekstraktus ir įvertinti jų antioksidacines savybes bei fenolinių junginių sudėtį.

### **Darbo tikslui pasiekti buvo išsikelti šie uždaviniai:**

1. Nustatyti skirtingų ekstrakcijos schemų, taikomų biologiškai aktyviems ekstraktams išgauti, efektyvumą, ekstrakcijai naudojant skirtingo

- poliškumo tirpiklius ir taikant tradicinius bei didelio slėgio ekstrakcijos metodus.
2. Taikant pasirinktus *in vitro* antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodus, nustatyti gautų ekstraktų, frakcijų ir liekanų po ekstrakcijos antioksidacinį potencialą.
  3. Taikant skysčių chromatografijos ir masių spektrometrijos metodus, nustatyti fitocheminių junginių sudėtį ekstraktuose ir frakcijose.
  4. Ištirti pasirinktų *P. phillyreifolius* ekstraktų citotoksiškumą ir apsauginį poveikį žmogaus embriono inkstų (HEK293) ląstelėms nuo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sukulto oksidacinio streso.

### **Mokslinio darbo naujumas**

1. Iki šiol nebuvo taikyta tiek skirtingų ekstrakcijos metodų ir schemų *P. phillyreifolius* ir *A. theiformis* ekstraktams išgauti.
2. Pirmą kartą įvertintas *P. phillyreifolius* ekstraktų citotoksiškumas, antioksidacinis potencialas, nustatyta fitocheminė sudėtis.
3. Pirmą kartą atliktas 70 proc. etanolinio *A. theiformis* ekstrakto frakcionavimas žemoje temperatūroje davė kelias daug mangiferino turinčias frakcijas.
4. Pirmą kartą *A. theiformis* ekstraktuose buvo aptikti šeši tormentinės ir hidroksitormentinės rūgščių izomerai.
5. Pirmą kartą nustatyti mangiferino, tormentinės ir hidroksitormentinės rūgščių kiekiai *A. theiformis* ekstraktuose ir frakcijose.

### **Praktinė darbo vertė**

Šie tyrimai parodė, kad *A. theiformis* ir *P. phillyreifolius* augalų rūšys yra geras antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčių junginių šaltinis, turintis didelį praktinio pritaikymo farmacijos, maisto papildų ir kosmetikos pramonėje potencialą. Pagrindiniai jų junginiai – atitinkamai mangiferinas ir geraniinas – yra vertinami dėl jų įvairaus bioaktyvumo. Gauti rezultatai gali paskatinti atlikti tolesnius mokslinius tyrimus siekiant išgryninti bioaktyvius junginius, identifikuotus šiose studijose, ištirti galimą jų bioaktyvumą ir pasiūlyti konkrečių jų praktinio pritaikymo būdų. Frakcionuojant išgautos gana grynos frakcijos; jose mangiferino kiekis buvo penkis kartus didesnis nei žaliaviniame ekstrakte.

### **Disertacijos struktūra**

Disertacija parašyta anglų kalba. Ją sudaro santrumpų sąrašas, įvadas, literatūros apžvalga, tyrimų objektų ir metodų pristatymas, rezultatų aptarimas, išvados, naudotos literatūros sąrašas (187 šaltiniai) ir paskelbtų publikacijų disertacijos tema sąrašas. Pagrindinė disertacijos medžiaga išdėstyta 98 puslapiuose. Darbe pateikta 14 lentelių ir 33 paveikslai.

## **Darbo rezultatų publikavimas**

Disertacijos tema paskelbti trys straipsniai *Clarivate Analytics* (buv. *Thomson Reuters*) *WOS* pagrindinio sąrašo leidiniuose. Darbo rezultatai pristatyti šešiose tarptautinėse konferencijose.

### **Ginamieji disertacijos teiginiai:**

1. Taikant tradicinius ir didelio slėgio ekstrakcijos metodus galima išskirti *P. phillyreifolius* ir *A. theiformis* ekstraktus, pasižyminčius stipriomis antioksidacinėmis savybėmis ir turinčius vertingų fitocheminių junginių.
2. Išankstinis HEK293 ląstelių apdorojimas *P. phillyreifolius* ekstraktais padeda apsaugoti ląsteles nuo oksidacinio streso.
3. Taikant skirtingus *A. theiformis* žaliavinio ekstrakto frakcionavimo būdus, galima išgauti frakcijas, turinčias daug mangiferino.



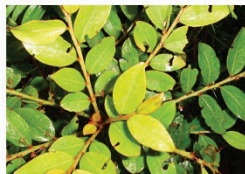
## 2. TYRIMŲ OBJEKTAI IR METODAI

### 2.1. Tyrimų objektai

Tyrimams naudoti Prancūzijai priklausančios, Indijos vandenyne esančios Reunjono salos pietvakariuose užauginti *Phyllanthus phillyreifolius* ir *Aphloia theiformis* augalų lapai (2013 metų derlius). Jie buvo išdžiovinti ir susmulkinti rotoriniu smulkintuvu, naudojant 1 mm akučių dydžio sietelį (**1 pav.**). Paruošti augalai buvo laikomi sandariai uždarytuose stikliniuose induose, tamsioje vietoje. Tyrimams ląstelėse buvo naudojamos žmogaus embriono inkstų (HEK293) ląstelės.



*Aphloia theiformis*

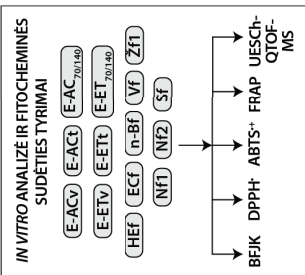
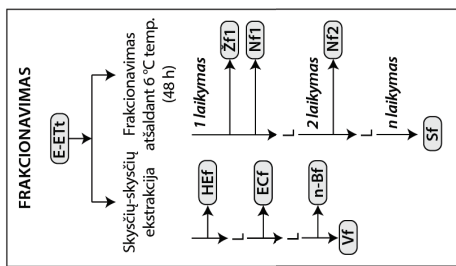
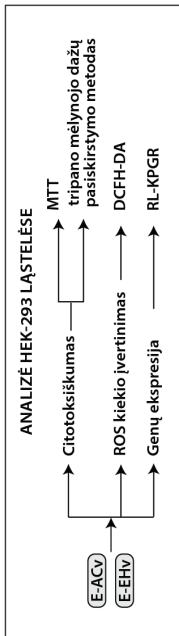
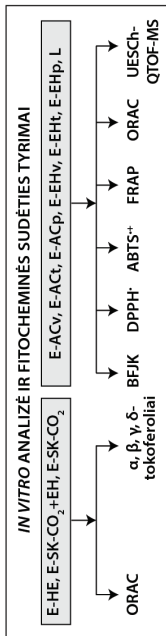
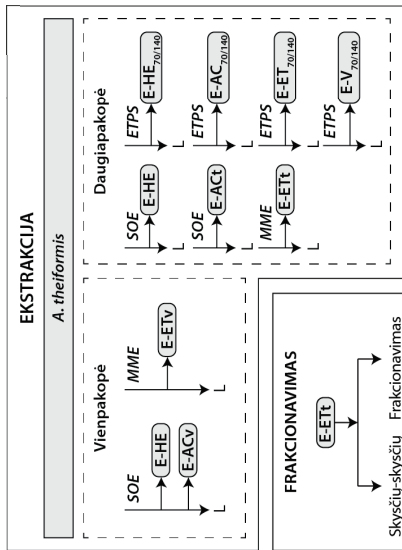
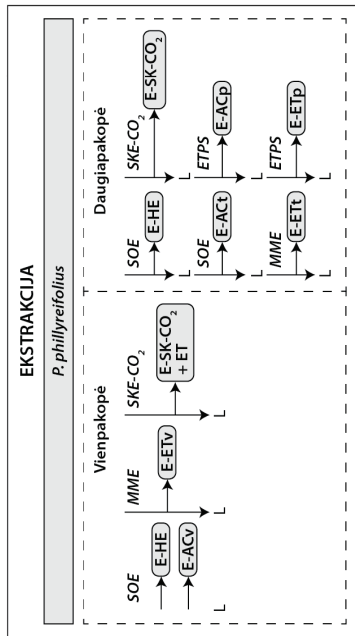


*Phyllanthus phillyreifolius*

**1 pav.** Reunjono sala ir jos endeminės augalų rūšys

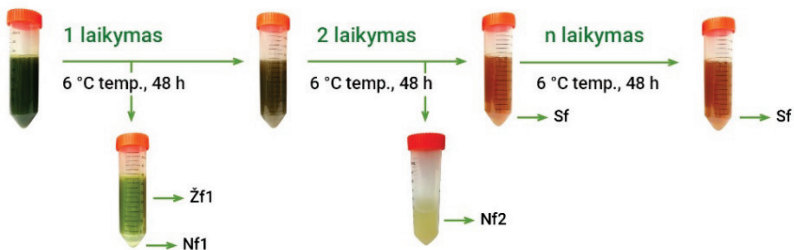
### 2.2. Tyrimų metodai

Tiriamų augalų ekstraktai buvo gauti taikant tradicinius (Soksleto ir maceravimo maišyklėje) bei pažangius, aplinką tausojančius (superkritinės ekstrakcijos anglies dioksidu (išskyrus *A. theiformis*) ir ekstrakcijos tirpikliais padidinto slėgio aplinkoje) žaliavos išgavimo metodus, vykdant vienpakopę arba daugiapakopę ekstrakciją. Tyrimų schema pateikta **2 pav.** Funkcionaliujų komponentų ekstrakcijai naudoti skirtingo poliškumo tirpikliai: heksanas, superkritinis anglies dioksidas, acetonas, vanduo bei etanolio ir vandens (70:30) mišinys. 70 proc. etanolinio *A. theiformis* ekstrakto frakcijos gautos atliekant skysčių-skysčių ekstrakciją didėjančio poliškumo tirpikliais (heksanu, etilacetatu, n-butanoliu) ir ekstraktą atšaldant 6 °C temperatūroje (**3 pav.**).



E – ekstraktas; f – frakcija; SOE – Sokaleto ekstrakcija; MME – maceravimas maišyklije; ETPS – ekstrakcija tirpikliais padidintu slėgio aplinkoje; HE – heksanas; AC – acetonas; ET – etanolis; vanduo (70:30); V – vanduo; ECF – etilacetatas; n-Bf – n-butanolis; L – liekana po ekstrakcijos; Zf1 – žalia frakcija (1 laikymas); Nf1 – nusėdusi frakcija (1 laikymas); Nf2 – nusėdusi frakcija (2 laikymas); Sf – nusėdusi frakcija (n laikymais); Vf – vienpakopė; t – daugiapakopė ekstrakcija tradiciniai metodais; p – daugiapakopė ekstrakcija slėgyje.

2 pav. Tyrimų schema



**3 pav.** 70 proc. etanolinio *A. theiformis* ekstrakto frakcionavimo jį atšaldant žemoje temperatūroje schema

Ekstraktuose ir frakcijose esančių junginių kokybinė ir kiekybinė analizė buvo atlikta taikant ultraefektyviąją skysčių chromatografiją su kvadropoliniu skriejimo laiko masių detektoriumi (*UESCh-QTOF*) ir efektyviąją skysčių chromatografiją (ESCh) su diodų matricos detektoriumi (DMD). Kadangi antioksidantų veikimas gali pasireikšti keliais mechanizmais – vandenilio atomo atidavimu (radikalų surišimo mechanizmas) arba elektrono perkėlimu (radikalo redukcija), – ekstraktų ir frakcijų antioksidacinis aktyvumas *in vitro* sistemose buvo įvertintas bendrojo fenolinių junginių kiekio (BFJK), geležies redukcijos antioksidacinės galios (FRAP), deguonies radikalų (ORAC), ABTS<sup>+</sup> ir DPPH<sup>•</sup> laisvųjų radikalų surišimo gebos nustatymo metodais. Pradinės *P. phillyreifolius* žaliavos ir liekanų po ekstrakcijos antioksidacinis aktyvumas (AA) buvo įvertintas atliekant *QUENCHER* procedūrą. Acetoninio ir 70 proc. etanolinio *P. phillyreifolius* ekstraktų citotoksiškumas ir AA taip pat buvo įvertinti HEK293 ląstelėse. Ekstraktų citotoksiškumas įvertintas taikant MTT ir tripano mėlynojo dažų pasiskirstymo testus. Siekiant įvertinti AA ląstelėse, laisvųjų radikalų susidarymas buvo nustatytas naudojant 2',7'-dichlorfluoresceino diacetatą (DCFH-DA). Jis, patekęs į ląstelę, fluorescuoja dėl oksiduojančiųjų medžiagų poveikio ir fluorescencijos intensyvumas yra tiesiogiai proporcingas intraląstelinių laisvųjų radikalų kiekiui. Antioksidacinių fermentų genų ekspresija ląstelėse, apdorotose *P. phillyreifolius* ekstraktais ir paveiktose H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, buvo įvertinta atliekant kiekybinę realiojo laiko polimerazės grandininę reakciją (KPCR). Ląstelių RNR buvo ekstrahuota naudojantis *RNeasy kit* pagal gamintojų rekomendacijas.

Visi eksperimentiniai matavimai atlikti bent tris kartus. Prie rezultatų pateikiamas šių matavimų duomenų vidurkis kartu su standartiniu nuokrypiu (StN). Vidurkiai ir reikšmingi skirtumai tarp jų įvertinti statistinės informacijos apdorojimo programa *GraphPad Prism* (5 versija). Koreliacijos koeficientai nustatyti ir kiti papildomi skaičiavimai atlikti programa *MS Excel*.

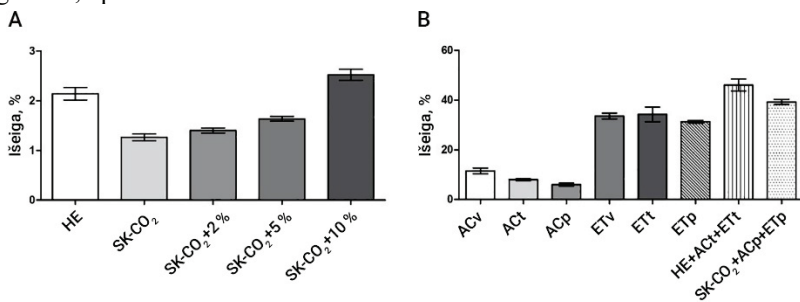
### 3. DARBO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1. *P. phillyreifolius* ekstraktų išskyrimas ir išsamus jų antioksidacinių savybių bei fitocheminės sudėties įvertinimas

##### 3.1.1. Skirtingų ekstrakcijos tirpiklių ir metodų įtaka *P. phillyreifolius* ekstraktų išeigoms

Tyrimais nustatyta, kad *P. phillyreifolius* lapų ekstraktų išeiga priklauso nuo ekstrakcijos būdo ir jai naudoto tirpiklio (4 pav.). Lipofiliški heksano ir SK-CO<sub>2</sub> ekstraktai pasižymėjo mažiausiomis išeigomis – atitinkamai 2,14 ir 1,26 proc. Ekstrahuojant mažo poliškumo tirpikliais buvo siekiama pašalinti lipofilinius junginius, kurie galėtų trukdyti tolesnei ekstrakcijai, taip pat įvertinti tokoferolių kiekį ir AA. Siekiant padidinti SKE-CO<sub>2</sub> ekstraktų išeigą, į SKE-CO<sub>2</sub> sistemą buvo įtrauktas skirtingas kiekis etanolio (2, 5, 10 proc.). Tai turėjo teigiamos įtakos ekstraktų išeigoms: didėjant etanolio kiekiui, jos padidėjo nuo 1,26 iki 2,52 proc.

Acetoninių ekstraktų išeigos svyravo nuo 5,98 iki 11,5 proc. Didžiausios išeigos buvo gautos ekstrahuojant 70 proc. etanolium – vidutiniškai 31,3–34,3 proc. Daugiapakopė ekstrakcija taikant tradicinius (Soksleto ir maceravimo maišyklėje) metodus buvo pranašesnė už vienkopę ekstrakciją. Minėtos daugiapakopės ekstrakcijos bendra išeiga buvo 44,4 proc., o didžiausia vienkopės ekstrakcijos išeiga – 36,8 proc.



4 pav. Lipofilinių (A) ir hidrofiliinių (B) *P. phillyreifolius* ekstraktų, gautų ekstrahuojant skirtingais tirpikliais ir ekstrakcijos metodais, išeigos

##### 3.1.2. Bendras *P. phillyreifolius* ekstraktuose esančių tokoferolių kiekis ir šių ekstraktų antioksidacinio aktyvumo įvertinimas

Šiame tyrime lipofiliniai *P. phillyreifolius* ekstraktai buvo charakterizuojami įvertinus tokoferolių kiekį ir ORAC AA. Taikant ESCh analizę ekstraktuose buvo nustatyti trys tokoferolių (T) izomerai ( $\alpha$ -,  $\beta$ - ir  $\gamma$ -T). Pagrindinis iš jų –  $\alpha$ -T izomeras, sudarantis apie 87 proc. visų identifikuotų tokoferolių.  $\beta$ - ir  $\gamma$ -T sudarė atitinkamai 9,86–12,7 proc. ir 2,11–2,87 proc. visų tokoferolių (1 lent.). Bendras tokoferolių kiekis ekstraktuose svyravo nuo 13,4 iki

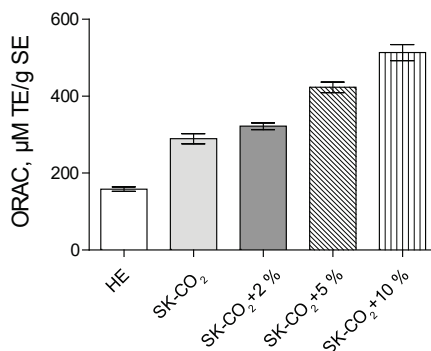
28,4 mg/g SE ir buvo didžiausias SK-CO<sub>2</sub>+2 % ekstrakte. Įvertinus ekstraktų išėigas bendras tokoferolių kiekis sausajai augalo masei (SM) kito nuo 0,3 iki 0,44 mg/g SM. Daugiausia tokoferolių išgauta ekstrakcijai naudojant heksaną.

**1 lentelė.** Tokoferolių kiekis *P. phillyreifolius* ekstraktuose (mg/g SE)

Mėginys	$\alpha$ -T	$\beta$ -T	$\gamma$ -T	Bendras tokoferolių kiekis
HE	17,9±0,55 <sup>b</sup>	2,19±0,08 <sup>b</sup>	0,48±0,00 <sup>b</sup>	20,6±0,63 <sup>b</sup>
SK-CO <sub>2</sub>	21,1±0,93 <sup>c</sup>	2,38±0,11 <sup>c</sup>	0,59±0,00 <sup>d</sup>	24,1±1,04 <sup>c</sup>
SK-CO <sub>2</sub> +2 %	24,9±0,41 <sup>d</sup>	2,96±0,06 <sup>d</sup>	0,60±0,01 <sup>d</sup>	28,4±0,48 <sup>d</sup>
SK-CO <sub>2</sub> +5 %	16,8±0,52 <sup>b</sup>	2,47±0,11 <sup>c</sup>	0,53±0,02 <sup>c</sup>	19,8±0,65 <sup>b</sup>
SK-CO <sub>2</sub> +10 %	11,3±0,33 <sup>a</sup>	1,70±0,06 <sup>a</sup>	0,39±0,01 <sup>a</sup>	13,4±0,40 <sup>a</sup>

Nurodytos vidutinės trijų matavimų vertės ± StN; a–d raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp ekstraktų (Tukey testas, ANOVA,  $p < 0,05$ ).

ORAC analizė parodė, kad, didėjant etanolio kiekiui SK-CO<sub>2</sub> ekstraktuose, didėja antioksidacinė deguonies radikalų surišimo geba ir ji gerokai didesnė nei HE ekstrakto (**5 pav.**). Nors tokoferolių kiekis SK-CO<sub>2</sub>+10 % ekstrakte buvo mažiausias, tačiau šis ekstraktas pasižymėjo didžiausiu AA. Tai galėjo lemti didesnis polinių antioksidantų, kurie dažnai būna stiprūs antioksidantai, išgavimas naudojant etanolį kaip SKE-CO<sub>2</sub> ekstrakcijos modifikatorių.



**5 pav.** Lipofilinių *P. phillyreifolius* ekstraktų deguonies radikalų surišimo (ORAC) geba (µM TE/g SE)

Didesnio poliškumo *P. phillyreifolius* ekstraktų AA įvertintas taikant įvairius *in vitro* AA įvertinimo metodus. Vieni ekstraktai gali pasižymėti dideliu AA, tačiau išgaunamas jų kiekis gali būti nedidelis, todėl, norint tiksliau interpretuoti gautus rezultatus ir galimą ekstraktų panaudojimą praktikoje, jų

antioksidacinis aktyvumas buvo išreikštas dviem būdais – sausojo ekstrakto masei (SE) ir sausajai augalo masei (SM).

Fenoliniai junginiai augaluose sudaro pagrindinę AA pasižyminčių junginių grupę. Tirtuose ekstraktuose BFJK buvo panašus ir kito intervale nuo  $420 \pm 14,8$  iki  $510 \pm 24$  mg GRE/g SE (2 lent.). BFJK kitose anksčiau tirtose *Phyllanthus* genties rūšyse buvo mažesnis: pvz., *P. amarus* BFJK buvo  $171 \pm 15,6$  mg GRE/g SE, *P. urinaria* –  $325 \pm 17,8$  mg GRE/g SE, o *P. debilis* –  $380 \pm 22,8$  mg GRE/g SE (Kumaran ir Karunakaran, 2006). Įvertinus ekstrakcijos išėigą ir rezultatus perskaičius mg GRE/g SM, matyti, kad 70 proc. etanolis buvo tinkamesnis tirpiklis fenoliniams junginiams išgauti nei acetonas.

*P. phillyreifolius* ekstraktų antioksidacinis aktyvumas priklausė nuo ekstrakcijos tirpiklio ir taikyto ekstrakcijos metodo. Tirti ekstraktai pasižymėjo didele DPPH<sup>\*</sup>, ABTS<sup>\*\*</sup> ir deguonies radikalų sujungimo geba bei geležies redukcijos antioksidacine geba ( $2834 \div 8190$  μMTE/g SE). Didžiausiu AA pasižymintys ekstraktai skyrėsi priklausomai nuo AA įvertinti taikyto metodo, tačiau daugeliu atvejų acetoniniai ekstraktai buvo stipresni antioksidantai nei 70 proc. etanoliniai. Tik DPPH<sup>\*</sup> analizėje geriausiomis savybėmis pasižymėjo ETp ekstraktas. Perskaičius gautus rezultatus SM matyti, kad 70 proc. etanolis buvo efektyvesnis tirpiklis nei acetonas – jį naudojant išgauti didesni kiekiai AA pasižyminčių junginių.

### 3.1.3. Kietosios *P. phillyreifolius* frakcijos antioksidacinio aktyvumo įvertinimas *QUENCHER* metodu

Antioksidantai su kitais augalo matricoje esančiais junginiais gali būti sujungti stipriais ryšiais, kurie ekstrakcijos metu lieka netirpūs. Siekiant gauti naudingos informacijos apie ekstrakcijos efektyvumą, svarbu įvertinti kietosios augalo frakcijos aktyvumą prieš ekstrakciją ir po jos. Šiam tikslui taikomas *QUENCHER* metodas, kuris dėl oksidacijos-redukcijos reakcijų kietosios ir skystosios fazių paviršiuje leidžia įvertinti tirpios ir netirpios frakcijų antioksidacinį aktyvumą (Gökmen, Serpen, Pellegrini ir Fogliano, 2009).

Kaip matyti iš 3 lent., didžiausiu BFJK ir AA pasižymėjo pradinė žaliava. Liekanose po ekstrakcijos AA mažėjo dėl laipsniško aktyviųjų junginių pašalinimo ekstrakcijos metu. Nustatyta, kad 70 proc. etanolis iš *P. phillyreifolius* augalo matricos pašalina daugiausia antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčių junginių, pvz., vienpakopė ekstrakcija maceravimo maišyklėje būdu su 70 proc. etanolium pradinės žaliavos DPPH<sup>\*</sup> radikalų surišimo gebą sumažino nuo  $1503 \pm 58,8$  iki  $241 \pm 13,0$  μM TE/g SM.

**2 lentelė.** BFJK ir antioksidacinis aktyvumas skirtinguose *P. phillyreifolius* ekstraktuose

Mėginys	BEJK, mg GR/g		DPPH <sup>•</sup> , μM TE/g		ABTS <sup>•+</sup> , μM TE/g		FRAP, μM TE/g		ORAC, μM TE/g	
	SE	SM	SE	SM	SE	SM	SE	SM	SE	SM
<i>Vienpakopė ekstraktacija</i>										
ACv (SOE)	449±20,0 <sup>a</sup>	51,7 <sup>c</sup>	3395±121 <sup>a</sup>	391 <sup>c</sup>	7655±444 <sup>c</sup>	883 <sup>c</sup>	6062±212 <sup>b</sup>	699 <sup>c</sup>	3443±113 <sup>c</sup>	397 <sup>c</sup>
ETv (MME)	454±13,5 <sup>a</sup>	153 <sup>f</sup>	3317±79,0 <sup>a</sup>	1116 <sup>c</sup>	6887±138 <sup>b</sup>	2316 <sup>f</sup>	5568±185 <sup>a</sup>	1907 <sup>f</sup>	3205±128 <sup>b</sup>	1077 <sup>f</sup>
<i>Daugiapakopė ekstraktacija</i>										
Act (SOE)	429±1,10 <sup>a</sup>	33,5b	3559±21,8 <sup>a</sup>	278 <sup>b</sup>	8190±319 <sup>c</sup>	640 <sup>b</sup>	5465±103 <sup>a</sup>	427 <sup>b</sup>	3669±142 <sup>d</sup>	287 <sup>b</sup>
ETt (MME)	429±1,19 <sup>a</sup>	133d	3278±55,1 <sup>a</sup>	1012 <sup>d</sup>	5804±170 <sup>a</sup>	1791 <sup>d3</sup>	5649±210 <sup>a</sup>	1743 <sup>c</sup>	3259±127 <sup>b</sup>	1006 <sup>c</sup>
Σ		167		1290		2431		2170		1293
ACp (ETPS)	420±14,8 <sup>a</sup>	24,6a	4094±130 <sup>b</sup>	240 <sup>a</sup>	7963±241 <sup>c</sup>	466 <sup>a</sup>	6262±302 <sup>b</sup>	366 <sup>a</sup>	2834±96,6 <sup>a</sup>	166 <sup>a</sup>
ETp (ETPS)	510±24,0 <sup>b</sup>	147e	4288±137 <sup>c</sup>	1235 <sup>f</sup>	7311±269 <sup>c</sup>	2106 <sup>c</sup>	5349±217 <sup>a</sup>	1541 <sup>d</sup>	2918±94,1 <sup>a</sup>	841 <sup>d</sup>
Σ		172		1475		2572		1907		1007

Nurodytos vidutinės trijų matavimų vertės ± StN; a–f raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp ekstraktų (Tukey testas, ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Tyrimai su ekstraktais taip pat parodė, kad daugiausia antioksidantų išgaunama ekstrahuojant 70 proc. etanoliu. Ekstrakcija nepoliniais heksano ir superkritinio CO<sub>2</sub> tirpikliais *P. phillyreifolius* pradinės žaliavos antioksidacinį aktyvumą sumažino apie 10 proc., o ekstrakcija poliniais acetono ir 70 proc. etanolio tirpikliais AA sumažino atitinkamai 20 ir 70 proc.

**3 lentelė.** Pradinės *P. phillyreifolius* žaliavos ir liekanų po ekstrakcijos antioksidacinis aktyvumas

Mėginys	BFJK (mg GRE/g SM)	DPPH* (μM TE/g SM)	ABTS** (μM TE/g SM)	FRAP (μM TE/g SM)	ORAC (μM TE/g SM)
Pradinė žaliava					
	172±4,46 <sup>d,e</sup>	1503±58,8 <sup>d,f</sup>	3025±104 <sup>d,e</sup>	2023±52,9 <sup>f,e</sup>	2132±105 <sup>f</sup>
Liekanos po ekstrakcijos					
HE (SOE)	154±2,31 <sup>d</sup>	1259 ±70,8 <sup>c</sup>	2820±113 <sup>c,d</sup>	1827±109 <sup>d</sup>	1834±106 <sup>e</sup>
SK-CO <sub>2</sub>	164±9,31 <sup>d,e</sup>	14861±96,6 <sup>d</sup>	2990±85,5 <sup>d</sup>	1962±125 <sup>e</sup>	1905±126 <sup>e</sup>
SK-CO <sub>2</sub> +2 %	161±9,25 <sup>d</sup>	1444±76,0 <sup>d</sup>	2858±150 <sup>c,d</sup>	1885±87,7 <sup>d,e</sup>	1886±87,8 <sup>e</sup>
SK-CO <sub>2</sub> +5 %	155±10,5 <sup>d</sup>	1376±129 <sup>c,d</sup>	2840±109 <sup>c,d</sup>	1882±89,9 <sup>d,e</sup>	1787±135 <sup>d</sup>
SK-CO <sub>2</sub> +10 %	161±10,6 <sup>d</sup>	1349±102 <sup>c,d</sup>	2907±129 <sup>d</sup>	1856±87,4 <sup>d</sup>	1730±129 <sup>d</sup>
ACv (SOE)	156±10,4 <sup>d</sup>	962±64,0 <sup>b</sup>	2634±90,8 <sup>c</sup>	1778±85,2 <sup>d</sup>	1721±93,4 <sup>e</sup>
ACt (SOE)	123±7,58 <sup>c</sup>	980±70,2 <sup>b</sup>	2694±121 <sup>c</sup>	1727±38,5 <sup>d</sup>	1661±98,6 <sup>e</sup>
ACp (ETPS)	147±12,4 <sup>d</sup>	1101±44,0 <sup>c</sup>	2514±111 <sup>c</sup>	1793±39,9 <sup>d</sup>	1673±114 <sup>e</sup>
ETv (MME)	45,4±1,96 <sup>a</sup>	241±13,0 <sup>a</sup>	728±39,0 <sup>a</sup>	344,9±18,6 <sup>a</sup>	711±48,5 <sup>a,b</sup>
ETt (MME)	71,4±3,75 <sup>b</sup>	315±17,3 <sup>a</sup>	1114±29,1 <sup>b</sup>	603±39,8 <sup>b</sup>	606±30,8 <sup>a</sup>
ETp (ETPS)	91,4±3,40 <sup>c</sup>	468±24,4 <sup>b</sup>	1293±63,8 <sup>b</sup>	765±38,6 <sup>c</sup>	865±38,4 <sup>b</sup>

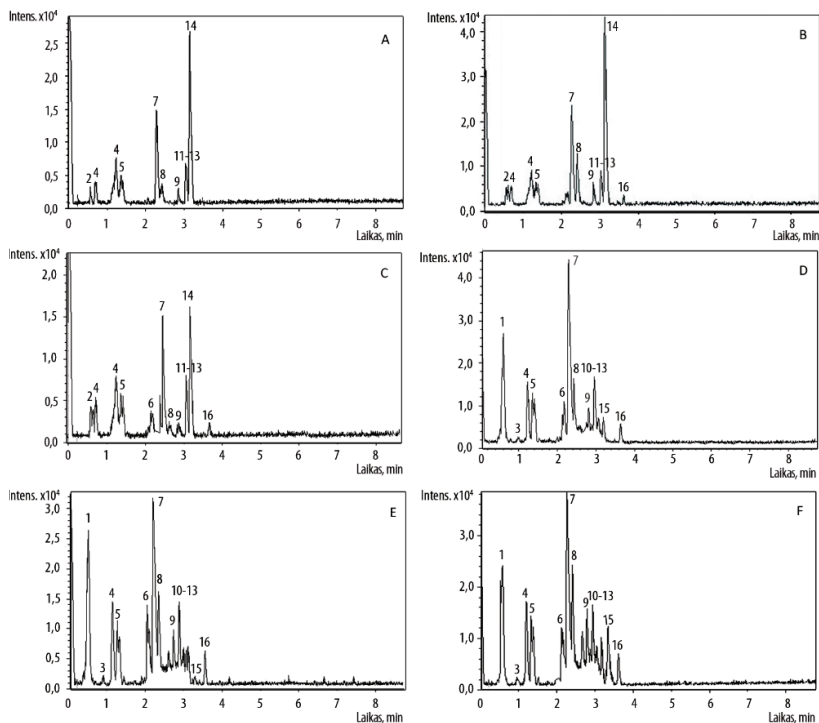
Nurodytos vidutinės trijų matavimų vertės ± StN; a–f raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp mėginių (Tukey testas, ANOVA, p < 0,05).

### 3.1.4. Fitocheminių *P. phillyreifolius* junginių identifikavimas

Fitocheminiams junginiams identifikuoti buvo taikoma ultraefektyvioji skysčių chromatografija su kvadrupoliniu skiejimo laiko masių spektrometru (*UESCh-QTOF*). *P. phillyreifolius* ekstraktuose esantys junginiai buvo identifikuoti palyginus jų molekulinės mases, formules ir sulaikymo laiką su standartinių junginių duomenimis. Kai kurie junginiai buvo atpažinti preliminariai palyginus MS/MS fragmentus su literatūroje aprašytais junginių spektrinėmis



charakteristikomis. *P. phillyreifolius* ekstraktų chromatogramos ir kiekiai pateikti 6 pav., 4 ir 5 lent.



6 pav. ACv (A), ACt (B), ACp (C), ETv (D), ETt (E) ETp (F) ekstraktų chromatogramos, gautos atliekant UESCh-QTOF analizę. Smailes atitinkantys junginiai paaiškinti 4 lent.

UESCh-QTOF analizė parodė, kad *P. phillyreifolius*, kaip ir kitos anksčiau tirtos *Phyllanthus* genties rūšys, turi daug elagotaninų. Šiame tyrime nustatyta, kad prie elagotaninų priskiriamas geraniinas, turintis molekulinį joną  $[M-H]^-$  m/z 951,0740, atitinkantį  $C_{41}H_{27}O_{27}$  molekulinę formulę, yra dominuojantis *P. phillyreifolius* junginys. Tai patvirtinta palyginus su etaloniniu geraniino standartu. Japonijoje geraniinas yra sertifikuotas kaip oficialus vaistas nuo diarėjos (Luger ir kt., 1998), todėl ne veltui *P. phillyreifolius* naudojamas tradicinėje medicinoje šiai ligai gydyti. Geraniino kiekis ekstraktuose svyravo nuo 226 iki 327 mg/g SE ir nuo 13,2 iki 110 mg/g SM.

Acetoniniuose ekstraktuose junginys, turintis molekulinį joną  $[M-H]^-$  m/z 991,1062, atitinkantį  $C_{44}H_{31}O_{27}$  molekulinę formulę, buvo preliminariai identifikuotas kaip filantusinas D, kuris anksčiau buvo išskirtas iš 70 proc. acetoninio *Phyllanthus amarus* ekstrakto (Yeap Foo ir Wong, 1992). Filantusinas D susidaro ekstrakcijos metu kaip kondensacijos produktas,

reaguojant geraniinui su acetonu. Kitas kondensacijos produktas, gautas iš geraniino ir askorbo rūgšties, turintis molekulinį joną  $[M-H]^-$  m/z 1109,0943 ir  $C_{47}H_{33}O_{32}$  molekulinę formulę, buvo preliminariai identifikuotas kaip elaeokarpusinas. Šis junginys buvo rastas visuose poliniuose ekstraktuose. Dėl didelio struktūrinio šių junginių panašumo į geraniiną ir nesant galimybės įsigyti standartų filantusino D ir elaeokarpusino kiekiams ekstraktuose įvertinti buvo naudojama geraniino kalibracinė kreivė ir šių junginių kiekiai išreikšti geraniino ekvivalentu (GE). Filantusino D koncentracija acetoniniuose ekstraktuose kito nuo 35,6 iki 178 mg/g SE ir nuo 2,08 iki 18,1 mg GE/g SM. Elaeokarpusino koncentracija tirtuose ekstraktuose svyravo nuo 14,2 iki 30,3 mg GE/g SE ir nuo 1,77 iki 6,54 mg GE/g SM.

Prie flavonoidų ir fenolinių rūgščių priskiriami junginiai taip pat buvo nustatyti *P. phillyreifolius* ekstraktuose. Fenolinės galo ir elago rūgšties ekstraktuose identifikuotos palyginus spektrinius duomenis su etaloniniais šių junginių standartais. Elago rūgšties koncentracija skirtinguose ekstraktuose buvo nuo 31,5 iki 56,6 mg/g SE ir nuo 2,25 iki 15 mg/g SM. Atitinkamos galo rūgšties vertės buvo mažesnės nei 1 mg/g. Flavonoidų rutino ir kvercitrino koncentracija ekstraktuose siekė atitinkamai iki 1,29 ir 0,42 mg/g SM. Junginys, kurio molekulinis jonas  $[M-H]^-$  m/z 477,0667, atitinkantis  $C_{21}H_{17}O_8$  molekulinę formulę ir turintis charakteringą kvercetinui fragmento joną  $[M-H]^-$  m/z 301, buvo preliminariai identifikuotas kaip kvercetino-3-gliukuronidas. Šis junginys, kaip ir kiti identifikuoti flavonoidai ir fenolinės rūgštys, buvo rastas kitose *Phyllanthus* genties rūšyse (Sprenger ir Cass, 2013). Mahomoodally ir kt. (2018), tirdami kito *P. phillyreifolius* porūšio, paplitusio Mauricijoje, – *P. phillyreifolius* var. *commersonii* Müll. – sudėtį, taip pat nustatė, kad pagrindiniai tirtu augalo junginiai yra elagotanių ir galo rūgšties dariniai, tačiau nei geraniino, nei jo darinių šiame porūšyje nebuvo rasta. Kaip ir šiose studijose, abiejuose *P. phillyreifolius* porūšiuose buvo nustatyti kvercetino-3-gliukuronidas, galo ir elago rūgštys.

Ekstrakcijos tirpiklis ir metodas turėjo įtakos išgaunamų fenolinių junginių kiekiui. Daugiausia kiekybiškai įvertintų junginių buvo ETv ekstrakte, po jo išsidėsto ETt, ETp, ACv, ACT ir ACP ekstraktai. Didesni fenolinių junginių kiekiai buvo nustatyti ekstraktuose, gautuose taikant tradicinius ekstrakcijos metodus, pvz., geraniino kiekis ACT ir ETt ekstraktuose buvo 93,2 mg/g SM, o ACP ir ETp ekstraktuose – 84,7 mg/g SM.

Ankstesnės kitų autorių studijos parodė, kad geraniinas pasižymi įvairiu bioaktyvumu, pvz., antivirusiniu (Yang, Zhang, Fan, Qin ir Liu, 2012), antibakteriniu (Funatogawa ir kt., 2004), antioksidaciniu, antivėžiniu (Liu ir kt., 2012) ir kt., todėl tikėtina, kad didžiulis geraniino ir jo darinių kiekis ekstraktuose lemia stiprų *P. phillyreifolius* AA. Ne veltui nustatytas stiprus koreliacinis ryšys ( $0,911 \pm 0,969$ ) tarp geraniino kiekio ir ekstraktų AA. Anksčiau išsiaiškinta, kad geraniino AA yra kur kas didesnis nei gerai žinomų antioksidantų, tokių kaip galo

rūgštis, rutinas, elago rūgštis, kvercetas, chlorogeninė rūgštis, ir yra panašus į epigalokatechino galato AA (Tabata ir kt., 2008).

**4 lentelė.** *P. phillyreifolius* ekstraktuose *UESCh-QTOF* metodu atskirti junginiai

Nr.	ST, min	Junginys	Molekulinė formulė	m/z		
				[M-H] <sup>-</sup>	[M-2H] <sup>2-</sup>	MS fragmentai
1.	0,50	Muciko rūgšties laktonas (Sousa ir kt., 2016) <sup>b</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	191,0195	-	-
2.	0,55	Fruktozė <sup>b</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	179,0559	-	-
3.	1,00	Galo rūgštis <sup>a</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	169,0141	-	-
4.	0,75; 1,25	Nežinomas junginys	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	359,0983	-	-
5.	1,45	Katalpolis, antirhinozidas <sup>b</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	361,1139	-	-
6.	2,15	Filanturino laktonas <sup>b</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	313,0935	-	-
7.	2,20	Geraniinas <sup>a</sup>	C <sub>41</sub> H <sub>28</sub> O <sub>27</sub>	951,0740	475,033	-
8.	2,55	Elaeokarpusinas <sup>b</sup>	C <sub>47</sub> H <sub>34</sub> O <sub>32</sub>	1109,0943	554,0445	1048,48, 972,56, 300,91 [EA-H] <sup>-</sup>
9.	2,85	Trigaloil-HHDP-gliukozė (Regueiro ir kt., 2014) <sup>b</sup>	C <sub>41</sub> H <sub>28</sub> O <sub>27</sub>	951,0742	475,0341	-
10.	3,00	Nežinomas junginys	C <sub>42</sub> H <sub>32</sub> O <sub>27</sub>	965,0889	-	-
11.	3,05	Elago rūgštis <sup>a</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	300,9984	-	-
12.	3,10	Rutinas <sup>a</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	609,1454	-	-
13.	3,10	Nežinomas junginys	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>10</sub>	433,2074	-	-
14.	3,15	Filantusinas D <sup>b</sup>	C <sub>44</sub> H <sub>32</sub> O <sub>27</sub>	991,1062	495,0490	990,61, 300,91 [EA-H] <sup>-</sup> 477,07, 301,04 [EA-H] <sup>-</sup>
15.	3,25	Kvercetino-3-gliukuronidas <sup>b</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	477,0667	-	477,07, 301,04 [EA-H] <sup>-</sup>
16.	3,55	Kvercitrinas <sup>a</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	447,3761	-	-

ST – sulaikymo trukmė; <sup>a</sup> identifiukuota naudojant standartą; <sup>b</sup> identifiukuota naudojantis literatūros duomenimis bei *ChemSpider* duomenų baze.

**5 lentelė.** Fenolinių junginių kiekis (mg/g) hidrofiliniuose *P. phyllireifolius* ekstraktuose

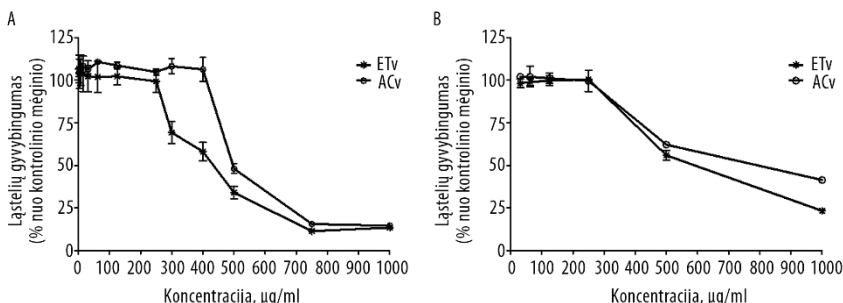
Mėginys	Galio rūgštis		Elago rūgštis <sup>a</sup>		Geraninas <sup>a</sup>		*Elaokarpusinas <sup>b</sup>	
	SE	SM	SE	SM	SE	SM	SE	SM
<i>Vienpakopė ekstraktacija</i>								
ACv (SOE)	0,78±0,06 <sup>d</sup>	0,09 <sup>b</sup>	51,5±1,15 <sup>c</sup>	5,94 <sup>c</sup>	288±19,5 <sup>b,c</sup>	33,2 <sup>b</sup>	27,0±1,15 <sup>b,c</sup>	3,11 <sup>b</sup>
ETv (MME)	0,52±0,03 <sup>a</sup>	0,18 <sup>c</sup>	40,1±0,09 <sup>b</sup>	13,5 <sup>c</sup>	327±7,66 <sup>c</sup>	110 <sup>d</sup>	19,4±0,93 <sup>b</sup>	6,54 <sup>c</sup>
<i>Daugiapakopė ekstraktacija</i>								
ACt (SOE)	0,67±0,01 <sup>b,c</sup>	0,05 <sup>a</sup>	56,6±0,80 <sup>d</sup>	4,42 <sup>b</sup>	262±7,66 <sup>b</sup>	20,5 <sup>b,b</sup>	24,9±0,93 <sup>b</sup>	1,95 <sup>a</sup>
ETt (MME)	0,59±0,01 <sup>a,b</sup>	0,18 <sup>c</sup>	48,7±0,53 <sup>c</sup>	15,0 <sup>f</sup>	236±12,3 <sup>a</sup>	72,7 <sup>c</sup>	15,5±0,57 <sup>a</sup>	4,08 <sup>c</sup>
Σ		<b>0,23</b>		<b>19,4</b>		<b>93,2</b>		<b>6,03</b>
ACp (ETPS)	0,59±0,03 <sup>a,b,c</sup>	0,04 <sup>a</sup>	38,5±0,05 <sup>b</sup>	2,25 <sup>a</sup>	226±14,6 <sup>a</sup>	13,2 <sup>a</sup>	30,3±0,97 <sup>c</sup>	1,77 <sup>a</sup>
ETp (ETPS)	0,61±0,03 <sup>b</sup>	0,17 <sup>c</sup>	31,5±1,38 <sup>a</sup>	9,06 <sup>d</sup>	248±6,66 <sup>b</sup>	71,5 <sup>c</sup>	14,2±0,77 <sup>a</sup>	4,77 <sup>d</sup>
Σ		<b>0,21</b>		<b>11,3</b>		<b>84,7</b>		<b>6,54</b>
<b>*Flantusinas D<sup>b</sup></b>								
	SE	SM	SE	SM	SE	SM	SE	SM
<i>Vienpakopė ekstraktacija</i>								
ACv (SOE)	157±6,86 <sup>b</sup>	18,1 <sup>c</sup>	1,63±0,06 <sup>c</sup>	0,19 <sup>c</sup>	0,24±0,01 <sup>a</sup>	0,03 <sup>a</sup>		
ETv (MME)	-	-	3,68±0,05 <sup>d</sup>	1,24 <sup>d</sup>	1,04±0,01 <sup>c</sup>	0,35 <sup>b</sup>		
<i>Daugiapakopė ekstraktacija</i>								
ACt (SOE)	178±6,19 <sup>b</sup>	13,9 <sup>b</sup>	1,43±0,00 <sup>b</sup>	0,11 <sup>b</sup>	0,57±0,03 <sup>b</sup>	0,04 <sup>a</sup>		
ETt (MME)	-	-	4,19±0,04 <sup>c</sup>	1,29 <sup>f</sup>	1,22±0,05 <sup>d</sup>	0,38 <sup>c</sup>		
Σ		<b>13,9</b>		<b>1,4</b>		<b>0,42</b>		
ACp (ETPS)	35,6±2,01 <sup>a</sup>	2,08 <sup>a</sup>	0,19±0,00 <sup>b</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,54±0,01 <sup>b</sup>	0,03 <sup>a</sup>		
ETp (ETPS)	-	-	4,38±0,03 <sup>f</sup>	1,26 <sup>e</sup>	1,12±0,01 <sup>c,d</sup>	0,32 <sup>b</sup>		
Σ		<b>2,08</b>		<b>1,27</b>		<b>0,35</b>		

\* išreikšta geranino ekvivalentu; <sup>a</sup> identifiukuota naudojantis literatūros duomenimis bei *ChemSpider* duomenų baze.

### 3.2. *P. phillyreifolius* ekstraktų įtaka oksidaciniam stresui ląstelėse

#### 3.2.1. *P. phillyreifolius* ekstraktų įtaka HEK293 ląstelių gyvybingumui

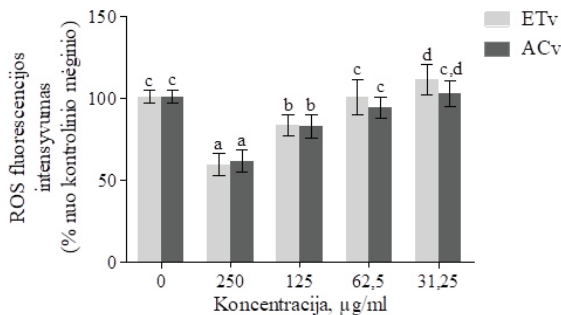
*P. phillyreifolius* ACv ir ETv ekstraktų citotoksiškumas (koncentracijos ribose nuo 12,5 iki 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) buvo įvertintas ląstelių gyvybingumo MTT ir tripano mėlynojo dažų pasiskirstymo testais. HEK293 ląstelės ACv ir ETv ekstraktais buvo veikiamos 24 h. Citotoksiškumo įvertinimo testai parodė, kad abu ekstraktai toksiški esant didesnei nei 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  koncentracijai, tačiau ląstelės, paveiktos mažesnės nei 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  koncentracijos ekstraktais, išlaikė didesnę nei 90 proc. gyvybingumą ir šios koncentracijos ekstraktai buvo netoksiški (7 pav.). Norint geriau įvertinti skirtumus tarp tirtų ekstraktų, iš MTT testo rezultatų buvo apskaičiuotos koncentracijos, reikalingos ląstelių gyvybingumui sumažinti 50 proc. (IC50). ACv ir ETv ekstraktų IC50 reikšmės buvo atitinkamai  $489 \pm 31,8$  ir  $387 \pm 6,84$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Vadinas, ETv ekstraktas pasižymėjo didesniu citotoksiškumu nei ACv ekstraktas.



7 pav. *P. phillyreifolius* ekstraktų įtaka HEK293 ląstelių gyvybingumui, įvertinta MTT (A) ir tripano mėlynojo dažų pasiskirstymo (B) metodais. Ląstelės ekstraktais buvo veikiamos 24 h

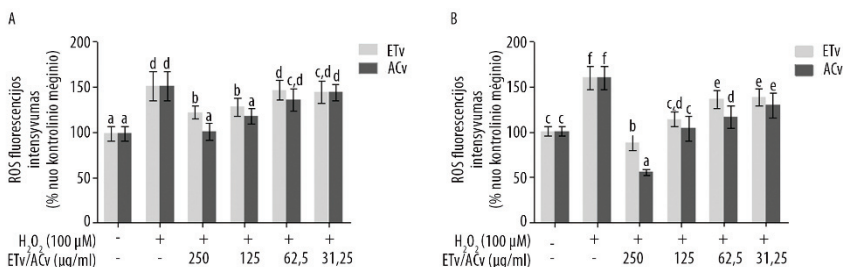
#### 3.2.2. *P. phillyreifolius* ekstraktų įtaka ROS lygiui HEK293 ląstelėse

Siekiant įvertinti AA ląstelėse, buvo nustatytas laisvųjų radikalų susidarymas tam naudojant 2',7'-dichlorfluoresceino diacetatą (DCFH-DA). Jis, patekęs į ląstelę, fluorescuoja dėl oksiduojančiųjų medžiagų poveikio ir fluorescencijos intensyvumas yra tiesiogiai proporcingas intraląstelinių laisvųjų radikalų (ROS) kiekiui. Pirmiausia buvo įvertinta ekstraktų įtaka ROS kiekiui HEK293 ląstelėse nesukeliant išorinio oksidacinio streso. Kaip matyti iš 8 pav., ACv ir ETv ekstraktai, esant 125 ir 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  koncentracijai, reikšmingai sumažino bazinį ROS lygį ląstelėse. Ankstesnės Septembre-Malaterre, Stanislaso, Douraguos ir Gonthier (2016) studijos taip pat parodė, kad pelių 3T3-L1 ląstelėse, paveiktose ličių, pasiflorų vaisių, Amerikos mangų ekstraktais, sumažėjo bazinis ROS lygis.



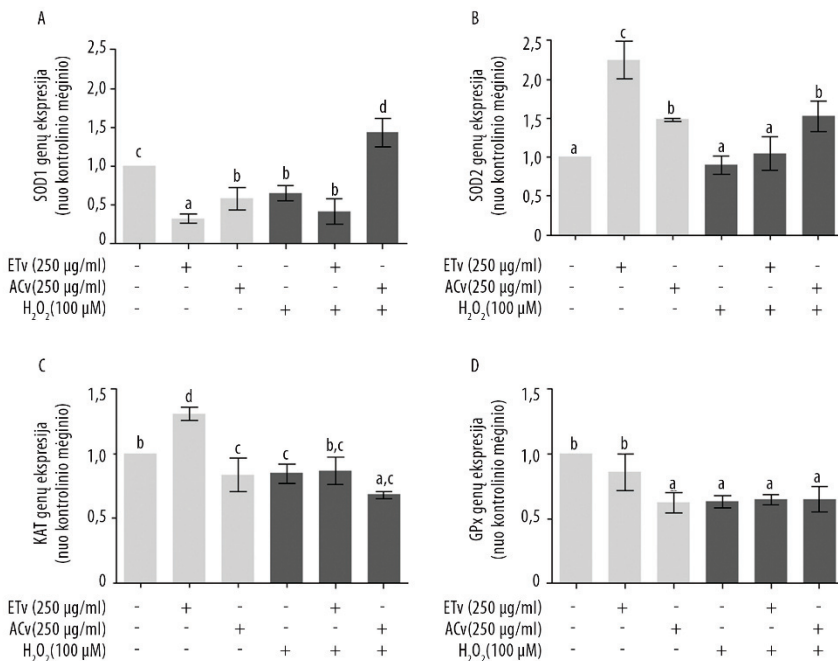
**8 pav.** *P. phillyreifolius* ekstraktų įtaka baziniam ROS lygiui HEK293 ląstelėse. Ląstelės ekstraktais buvo veikiamos 24 h

Oksidaciniam stresui (OS) ląstelėse sumodeliuoti kaip oksiduojantysis agentas buvo pasirinktas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dėl galimos ekstraktų ir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiesioginės reakcijos ląstelės ekstraktais buvo veikiamos 3 ir 24 h, tada praplautos fiziologiniu skysčiu ir tik tada imtos veikti DCFH-DA. Iš **9 pav.** matyti, kad H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ROS susidarymą padidino nuo 98,7±5,74 iki 150,9±7,89 proc., palyginti su kontroliniu mėginiu. Išankstinis ląstelių apdorojimas ACv ir ETv ekstraktais, priklausomai nuo koncentracijos, reikšmingai sumažino ROS susidarymą ląstelėse. Nors 3 h išankstinis ląstelių apdorojimas su ekstraktais ROS susidarymą sumažino, tačiau 24 h trukmės ląstelių inkubavimas didesnės koncentracijos (125 ir 250 µg/ml) ACv ir ETv ekstraktais visiškai neutralizavo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sukeltą OS. ACv ekstraktas pasižymėjo geresniu AA ląstelėse nei ETv ekstraktas. Tikėtina, kad geraniinas taip pat, kaip ir kiti elagotaninai, gali daryti įtaką *P. phillyreifolius* gebai sumažinti ROS susidarymą. Tai leidžia patvirtinti Wango ir kt. (2015) tyrimai, kuriuose geraniinas, priklausomai nuo koncentracijos, sumažino ROS susidarymą žmogaus hematomos (HepG2) ląstelėse.



**9 pav.** *P. phillyreifolius* ekstraktų įtaka ROS lygiui HEK293 ląstelėse, paveiktose H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ląstelės su ACv ir ETv ekstraktais inkubuotos: A – 3 h, B – 24 h

ROS susidarymo sumažėjimas ląstelėse, paveiktose *P. phillyreifolius* ekstraktais, gali būti susijęs su tiesioginiu laisvųjų radikalų surišimo mechanizmu arba kitais netiesioginiais apsaugos nuo OS būdais. Atsiranda vis daugiau įrodymų, kad kai kurie antioksidantai turi įtakos antioksidacinių fermentų lygio ląstelėse reguliavimui (Wang ir kt., 2010). Šiose studijose tirta, kaip išankstinis ląstelių apdorojimas *P. phillyreifolius* ekstraktais veikia superoksido dismutazių (SOD1 ir SOD2), katalazės (KAT) ir glutationo peroksidazės (GPx) antioksidacinių fermentų genų ekspresiją HEK293 ląstelėse (**10 pav.**).



**10 pav.** *P. phillyreifolius* ekstraktų įtaka genų ekspresijai HEK293 ląstelėse: *A* – SOD1, *B* – SOD2, *C* – KAT, *D* – GPx

Antioksidacinių fermentų genų ekspresija ląstelėse, inkubuotose ACv ir ETv ekstraktais, buvo reguliuojama skirtingai. Ląstelėse, paveiktose ETv ekstraktu, SOD2 ir KAT genų ekspresija buvo aktyvinama, o SOD1 slopinama. Ląsteles apdorojus ACv ekstraktu, SOD2 genų ekspresija padidėjo, o SOD1, KAT ir GPx genų ekspresija sumažėjo. Kiti mokslininkai, tirdami kvercetino (gerai žinomo antioksidanto) įtaką tam tikrų antioksidacinių fermentų genų ekspresijai, nustatė, kad kvercetinas antioksidacinių fermentų genų ekspresiją taip pat veikia įvairiai: vienų fermentų genų ekspresiją padidina, kitų – sumažina (Alía ir kt., 2006). Ląstelėse, paveiktose H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nors ir nedaug, bet reikšmingai sumažėjo

SOD1, KAT ir GPx genų ekspresija. Sowndhararajano ir kt. (2015) studijose buvo nustatyta panaši H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> įtaka žmogaus hematomos HepG2 ląstelių SOD1, SOD2, KAT ir GPx genų ekspresijai – ši sumažėjo, palyginti su H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nepaveiktomis ląstelėmis. Išankstinis ląstelių apdorojimas *P. phillyreifolius* ekstraktais prieš juos paveikiant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> neturėjo įtakos antioksidacinių fermentų genų ekspresijai, išskyrus atvejus, kai ląstelės buvo apdorotos ACv ekstraktu. ACv ekstraktas gerokai padidino SOD1 ir SOD2 genų ekspresiją. Ankstesnėse studijose (Marimoutou ir kt., 2015; Wang ir kt., 2010) augalų ekstraktų įtaka antioksidacinių fermentų genų ekspresijai buvo skirtinga: vienu antioksidacinių fermentų genų ekspresiją padidino, kitų – sumažino ar neturėjo įtakos. Remiantis gautais rezultatais, galima daryti prielaidą, kad *P. phillyreifolius* ekstraktų antioksidacinis aktyvumas prieš H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suaktyvintą ROS gamybą ląstelėse buvo labiau susijęs su kitais veikimo mechanizmais nei su antioksidacinių fermentų lygio reguliavimu.

### **3.3. Išsamus *A. theiformis* ekstraktų ir frakcijų antioksidacinio aktyvumo ir mangiferino kiekio įvertinimas**

#### **3.3.1. Skirtingų ekstrakcijos metodų ir tirpiklių įtaka *A. theiformis* ekstraktų išėigoms**

Kadangi augalai yra sudaryti iš įvairiausių junginių grupių, todėl norint gauti pageidaujamos sudėties ir savybių produktą labai svarbu parinkti tinkamą ekstrakcijos tirpiklį ir metodą (Kraujalienė, Pukalskas ir Venskutonis, 2017). Fenoliniai junginiai dėl jų bioaktyvumo yra vertinami ir plačiai pritaikomi vaistų, kosmetikos, maisto papildų gamyboje, todėl dažnai ekstrakcijos tikslas yra išgauti fenolinių junginių turinčius ekstraktus. Šiose studijose *A. theiformis* lapų ekstraktai buvo išgauti naudojant didėjančio poliškumo tirpiklius, taikant tradicinius ir didelio slėgio ekstrakcijos metodus. Ekstraktai gauti taikant vienpakopę arba daugiapakopę ekstrakciją. Kaip ir tikėtasi, mažiausia ekstraktų išėiga buvo gauta ekstrahuojant heksanu ir didėjo didėjant tirpiklių poliškumui (**6 lent.**). Heksanas buvo naudojamas augalų žaliavos riebalams pašalinti. Didžiausiomis ekstraktų išėigomis pasižymėjo 70 proc. etanoliniai ekstraktai. Daugiapakopėje ekstrakcijoje bendros ekstraktų išėigos buvo labai panašios, nepriklausomai nuo taikytų ekstrakcijos metodų, ir svyravo nuo 36,98 iki 40,81 proc. Taip pat buvo nustatyta, kad ETPS ekstraktų išėigos esant 140 °C temperatūrai didesnės nei 70 °C temperatūroje.

#### **3.3.2. Skirtingų ekstrakcijos metodų ir tirpiklių įtaka *A. theiformis* ekstraktų antioksidaciniam aktyvumui**

Hidrofilinių *A. theiformis* ekstraktų AA įvertinti buvo taikomi įvairūs gerai žinomi AA įvertinimo metodai, kurie paremti elektrono arba vandenilio atomo mainais. Tirtų *A. theiformis* ekstraktų antioksidacinė galia priklausė nuo ekstrakcijos tirpiklio ir metodo (**7 lent.**). Didžiausiu BFJK ir AA pasižymėjo 70 proc. etanoliniai ekstraktai. 70 proc. etanolis buvo tinkamiausias tirpiklis



*A. theiformis* antioksidantams išgauti. Tai matyti iš perskaičiuotų į sausąją žaliavos masę AA reikšmių, kurios daugiau nei du kartus didesnės nei acetoninių ekstraktų. Tradiciniais ekstrakcijos būdais gautų ekstraktų AA buvo gerokai didesnis nei gautų ekstrakcijai taikant didelį slėgį. Didesnė ETPS temperatūra (140 °C) nors ir padidino ekstraktų išėigas, tačiau turėjo neigiamos įtakos ekstraktų AA – jis buvo kur kas mažesnis nei ekstraktų, gautų 70 °C temperatūroje. Ypač sumažėjo vandeninio ekstrakto (V<sub>140</sub>), gauto ekstrahuojant 140 °C temperatūroje, aktyvumas. Maceravimo maišyklėje būdu ekstrakcijai naudojant 70 proc. etanolį antioksidantų buvo išgauta daugiau nei atliekant daugiapakopę ekstrakciją. Be to, taikant tam tikrus metodus didelio slėgio ekstrakcija buvo pranašesnė už tradicinius ekstrakcijos metodus. Priešingi rezultatai buvo gauti Turkmen, Sari ir Velioglu (2006) studijose – jos parodė, kad vienkopė ekstrakcija, palyginti su daugiapakope, yra nepakankama antioksidantams išgauti. Vienas iš galimų paaiškinimų būtų toks, kad daugiapakopė ekstrakcija skirtingais tirpikliais iš dalies sugrupuoja fenolinius junginius pagal jų poliškumą ir taip sugrupuoti junginiai gali pasižymėti antagonistiniu arba sinerginiu veikimu. Įvertinus gautus rezultatus tikėtina, kad ETv ekstrakto junginiai veikė vienas kitą sinergiškai ir tai padidino ekstrakto antioksidacinį aktyvumą.

**6 lentelė.** *A. theiformis* ekstraktų išėigos (AL – augalo liekanoje, PRAM – pradinėje augalo masėje)

Mėginys	Išėiga, %	
	AL	PRAM
<i>Tiesioginė ekstrakcija</i>		
HE (SOE)	2,62±0,04 <sup>a</sup>	2,62 <sup>a</sup>
ACv (SOE)	10,97±0,79 <sup>e</sup>	11,0 <sup>e</sup>
ETv (MME)	34,07 ± 0,66 <sup>i</sup>	34,1 <sup>g</sup>
<i>Pakopinė ekstrakcija</i>		
HE (SOE)	2,62±0,04 <sup>a</sup>	2,62 <sup>a</sup>
ACt (SOE)	9,40 ± 0,37 <sup>d</sup>	9,15 <sup>d</sup>
ETt (MME)	28,79±0,33 <sup>i</sup>	25,3 <sup>f</sup>
Σ		<b>37,1</b>
HE <sub>70</sub> (ETPS)	2,47±0,23 <sup>a</sup>	2,47 <sup>a</sup>
AC <sub>70</sub> (ETPS)	6,65±0,02 <sup>c</sup>	6,49 <sup>c</sup>
ET <sub>70</sub> (ETPS)	27,86±0,36 <sup>h</sup>	25,4 <sup>f</sup>
V <sub>70</sub> (ETPS)	13,45±0,29 <sup>f</sup>	8,83 <sup>d</sup>
Σ		<b>43,2</b>
HE <sub>140</sub> (ETPS)	3,59±0,13 <sup>b</sup>	3,59 <sup>b</sup>
AC <sub>140</sub> (ETPS)	6,72±0,01 <sup>c</sup>	6,48 <sup>c</sup>
ET <sub>140</sub> (ETPS)	28,80±0,13 <sup>i</sup>	25,9 <sup>f</sup>
V <sub>140</sub> (ETPS)	14,65±0,10 <sup>g</sup>	9,38 <sup>d</sup>
Σ		<b>45,4</b>

Nurodytos vidutinės trijų matavimų vertės ± StN; a–j raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp ekstraktų (Tukey testas, ANOVA,  $p < 0,05$ ).

**7 lentelė.** BFJK ir antioksidacinis aktyvumas skirtinguose *A. theiformis* ekstraktuose

Mėginys	BFJK, mg GRE/g		DPPH <sup>•</sup> , μM TE/g		ABTS <sup>•+</sup> , μM TE/g		FRAP, μM TE/g	
	SE	SM	SE	SM	SE	SM	SE	SM
<i>Vienapakopė ekstrakcija</i>								
HE (SOE)	-	-	-	-	-	-	-	-
ACv (SOE)	247±13,0 <sup>d</sup>	27,1	2451±96,8 <sup>e</sup>	269 <sup>e</sup>	4533±77,6 <sup>e</sup>	497 <sup>e</sup>	3360±176 <sup>d</sup>	369 <sup>d</sup>
ETv (MME)	330±11,9 <sup>f</sup>	112	3267±81,5 <sup>e</sup>	1113 <sup>f</sup>	4595±111 <sup>f,g</sup>	1566 <sup>f</sup>	4473±129 <sup>f</sup>	1524 <sup>f</sup>
<i>Daugiapakopė ekstrakcija</i>								
HE (SOE)	-	-	-	-	-	-	-	-
ACt (SOE)	275±14,0 <sup>e</sup>	25,1	2902±46,8 <sup>d</sup>	266 <sup>e</sup>	5091±118 <sup>h</sup>	466 <sup>e</sup>	3905±45,1 <sup>e</sup>	367 <sup>d</sup>
ETt (MME)	317±6,76 <sup>f</sup>	80,2	3121±93,8 <sup>e</sup>	791 <sup>e</sup>	4313±54,2 <sup>e,f</sup>	1093 <sup>d</sup>	3388±117 <sup>d</sup>	858 <sup>e</sup>
Σ		<b>105</b>		<b>1057</b>		<b>1559</b>		<b>1225</b>
HE <sub>70</sub> (ETPS)	-	-	-	-	-	-	-	-
AC <sub>70</sub> (ETPS)	172±5,00 <sup>e</sup>	11,2	1884±51,1 <sup>b</sup>	122 <sup>a</sup>	3025±76,8 <sup>d</sup>	196 <sup>b</sup>	2160±79,5 <sup>b</sup>	144 <sup>b</sup>
ET <sub>70</sub> (ETPS)	322±23,4 <sup>f</sup>	88,5	2867±34,4 <sup>d</sup>	824 <sup>e</sup>	4598±146 <sup>g</sup>	1166 <sup>e</sup>	3504±102 <sup>d,e</sup>	889 <sup>e</sup>
V <sub>70</sub> (ETPS)	138±3,65 <sup>b</sup>	12,2	2314±89,9 <sup>e</sup>	204 <sup>b</sup>	2378±30,9 <sup>b</sup>	210 <sup>b</sup>	2317±34,1 <sup>e</sup>	205 <sup>c</sup>
Σ		<b>112</b>		<b>1053</b>		<b>1572</b>		<b>1238</b>
HE <sub>140</sub> (ETPS)	-	-	-	-	-	-	-	-
AC <sub>140</sub> (ETPS)	154±4,05 <sup>e</sup>	10,0	1748±26,4 <sup>b</sup>	113 <sup>a</sup>	2683±87,4 <sup>c</sup>	174 <sup>b</sup>	2119±28,7 <sup>b</sup>	142 <sup>b</sup>
ET <sub>140</sub> (ETPS)	291±1,98 <sup>e</sup>	75,4	2837±76,4 <sup>d</sup>	735 <sup>d</sup>	4165±138 <sup>e</sup>	1079 <sup>d</sup>	3362±97,3 <sup>d</sup>	871 <sup>e</sup>
V <sub>140</sub> (ETPS)	7,59±0,55 <sup>a</sup>	0,71	1395±111 <sup>a</sup>	131 <sup>a</sup>	107±2,89 <sup>a</sup>	10,1 <sup>a</sup>	290±26,3 <sup>a</sup>	30,7 <sup>a</sup>
Σ		<b>86</b>		<b>979</b>		<b>1263</b>		<b>1044</b>

Nurodytos vidutinės trijų matavimų vertės ± StN; a–j raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp ekstraktų (Tukey testas, ANOVA; p < 0,05).

### 3.3.3. 70 proc. etanolinio *A. theiformis* ekstrakto frakcionavimas ir gautų frakcijų charakterizavimas

Įprastai augalų ekstraktai turi daugybę junginių, kurie gali pasižymėti skirtingu AA, tam tikrais atvejais prooksidaciniu aktyvumu arba būti neutralūs radikalų sujungimo procesuose (Pukalskas, Venskutonis, Salido, Waard ir Van Beek, 2012). Ekstraktų frakcionavimas suteikia vertingos informacijos apie ekstraktuose esančių junginių savybes, kartais net apie sinerginį arba antagonistinį veikimą. 70 proc. etanolinis *A. theiformis* ekstraktas (ETv) frakcionuotas skysčių-skysčių ekstrakcijos būdu. Iš gautų frakcijų didžiausia išeiga pasižymėjo n-butanolio frakcija (48 proc.), toliau išsidėsto vandens, etilacetato ir heksano frakcijos (**8 lent.**). Pagrindinis *A. theiformis* junginys – mangiferinas – yra linkęs nusėsti žemoje temperatūroje (Danthu ir kt., 2010), todėl šviežiai paruoštas ETv ekstraktas taip pat buvo frakcionuotas atšaldant 6 °C temperatūroje. Frakcionuojant žemoje temperatūroje gautų frakcijų išeigos svyravo gana plačiose ribose, tačiau buvo nustatyta, kad apie 36,3 proc. visų ekstrakto medžiagų yra linkusios nusėsti žemoje temperatūroje.

**8 lentelė.** Žaliavinio ETv ekstrakto ir jo frakcijų išeiga, BFKJ ir antioksidacinis aktyvumas

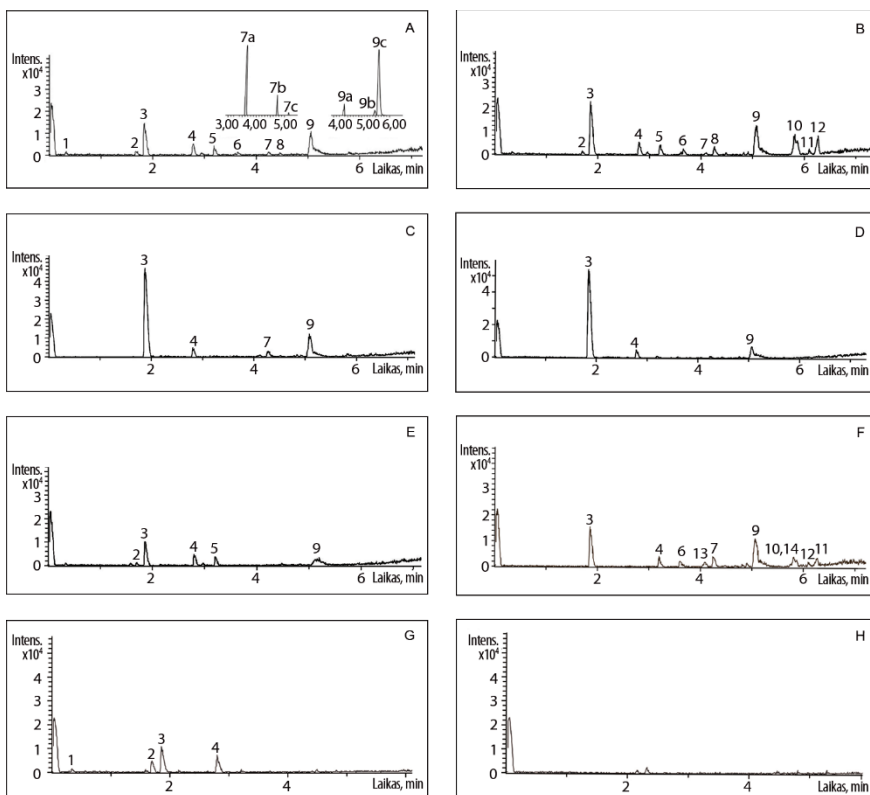
Mėginys	Išeiga, %	BFKJ, mg GRE/g SE/SF	DPPH <sup>+</sup> , μM TE/g SE/SF	ABTS <sup>+</sup> , μM TE/g SE/SF	FRAP, μM TE/g SE/SF
Žaliavinis (ETv)	-	362± 6,28 <sup>e</sup>	3267±81,5 <sup>f</sup>	4595±111 <sup>e</sup>	4473±129 <sup>e</sup>
Frakcijos, gautos skysčių-skysčių ekstrakcijos būdu					
Heksano (Hef)	14,2±0,3	42,4±0,62 <sup>a</sup>	302±5,98 <sup>a</sup>	511±21,8 <sup>a</sup>	461±17,1 <sup>a</sup>
Etilacetato (ECf)	17,0±0,81	208±2,77 <sup>b</sup>	1340±26,3 <sup>b</sup>	2106±46,0 <sup>b</sup>	2030±104 <sup>c</sup>
n-butanolio (n-Bf)	48,0±0,91	423±4,79 <sup>f</sup>	3496±28,4 <sup>e</sup>	4555±26,2 <sup>c</sup>	4818±85,5 <sup>g</sup>
Vandens (Vf)	17,7±2,41	257±4,78 <sup>c</sup>	1969±92,4 <sup>d</sup>	2589±14,1 <sup>c</sup>	1476±68,8 <sup>b</sup>
Frakcijos, gautos šaldant ekstraktą 6 °C temperatūroje					
1 laikymas, žalia (Žf1)	2,06÷8,23	201±3,68 <sup>b</sup>	1568±51,5 <sup>e</sup>	1946±47,5 <sup>b</sup>	1857±109 <sup>c</sup>
1 laikymas, nusėdusi (Nf1)	14,14÷29,12	491±16,6 <sup>g</sup>	4333±21,0 <sup>b</sup>	6878±47,8 <sup>f</sup>	4298±129 <sup>e</sup>
2 laikymas, nusėdusi (Nf2)	2,06÷19,54	599±4,40 <sup>h</sup>	4816±62,3 <sup>i</sup>	7951±360 <sup>g</sup>	5582±87,7 <sup>f</sup>
Skaidri (Sf)	63,7	300±3,56 <sup>d</sup>	2359±39,7 <sup>e</sup>	4054±175 <sup>d</sup>	2656±54,6 <sup>d</sup>
Mangiferinas	-	668±8,58 <sup>i</sup>	4282±246 <sup>h</sup>	7227±226 <sup>f</sup>	6750±2,13 <sup>h</sup>

Nurodytos vidutinės trijų matavimų vertės ± StN; a–i raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp mėginių (Tukey testas, ANOVA, p < 0,05).

BFJK ir antioksidacinis gautų frakcijų aktyvumas pateikti **8 lent.** Kaip daugelyje ankstesnių studijų, šiose studijose kai kurios išgrynintos frakcijos taip pat pasižymėjo kur kas didesniu AA nei žaliavinis ekstraktas. Geriausiomis antioksidacinėmis savybėmis pasižymėjo n-butanolio, etilacetato, vandens ir Nf2 frakcijos. Taip pat buvo įvertintas mangiferino standarto AA – jis buvo panašus į kai kurių frakcijų aktyvumą. Atkreiptinas dėmesys į Nf2 frakciją, kurios DPPH<sup>•</sup> ir ABTS<sup>•+</sup> radikalų surišimo geba buvo net didesnė nei mangiferino. Tai parodo, kad kiti *A. theiformis* junginiai taip pat gali turėti reikšmingos įtakos AA arba veikti sinergiškai.

### 3.3.4. Fitocheminė *A. theiformis* ekstraktų ir frakcijų sudėtis

Fitocheminė analizė parodė, kad *A. theiformis* ekstraktuose yra gausu mangiferino ir saponinų (**11 pav., 9 lent.**).



**11 pav.** *A. theiformis* ETv ekstrakto (A) ir jo frakcijų (B–H) chromatogramos: Žf1 (B), Nf1 (C), Nf2(D), Sf (E), n-Bf (F), ECf (G), Vf (H). Smailes atitinkantys junginiai paašikinti 9 lent.

Kiekybinė *UESCh-QTOF* analizė buvo atlikta naudojant etaloninius standartus ir junginio kiekis apskaičiuotas pagal smailės plotą iš etaloninio junginio kalibracinės kreivės. Identifikuotų junginių kiekiai ekstraktuose ir frakcijose pateikti atitinkamai **10** ir **11** lent.

**9 lentelė.** *A. theiformis* ekstraktuose *UESCh-QTOF* metodu atskirti junginiai

Nr.	ST	Junginys	Molekulinė formulė	m/z	
				[M-H] <sup>-</sup>	MS fragmentai
1.	0,35	Fruktozė <sup>b</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	179,0563	-
2.	1,70	Iriflofenono-3-C-beta-D-gliukopiranozidas <sup>b</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	407,0984	-
3.	1,85	Mangiferinas <sup>a</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	421,0777	-
4.	2,75	Nežinomas saponinas	C <sub>37</sub> H <sub>60</sub> O <sub>14</sub>	727,3910	-
5.	3,20	Hidroksitormentinės rūgšties darinys*	C <sub>37</sub> H <sub>60</sub> O <sub>13</sub>	711,3961	503,3371 [HTA-H] <sup>-</sup> 649,3949, 487,3427 [TA-H] <sup>-</sup>
6.	3,60	Tormentinės rūgšties darinys*	C <sub>37</sub> H <sub>60</sub> O <sub>12</sub>	695,4012	
7a.	3,61	23-hidroksitormentinės rūgšties izomeras*	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>6</sub>	503,3372	-
7b.	4,73	23-hidroksitormentinė rūgštis <sup>a</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>6</sub>	503,3372	-
7c.	5,14	23-hidroksitormentinės rūgšties izomeras*	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>6</sub>	503,3372	-
8.	4,45	Nežinomas junginys	C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>	315,1813	-
9a.	4,34	Tormentinės rūgšties izomeras*	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>	487,3429	-
9b.	5,60	Tormentinė rūgštis <sup>a</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>	487,3429	-
9c.	5,74	Tormentinės rūgšties izomeras*	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>	487,3429	-
10.	5,85	Nežinomas junginys	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	293,2027	-
11.	6,35	Maslininė / korosolinė rūgštis <sup>b</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	471,3480	-
12.	6,40	Nežinomas junginys	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	295,2279	-
13.	4,13	Nežinomas junginys	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>7</sub>	520,7039	-
14.	5,90	Kilainė rūgštis <sup>b</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>5</sub>	485,3272	-

ST – sulaikymo trukmė; <sup>a</sup> identifikuota naudojant standartą; <sup>b</sup> identifikuota naudojantis literatūros duomenimis bei *ChemSpider* duomenų baze; \* preliminariai identifikuota.

Mangiferinas, tormentinė (TR) ir hidroksitormentinė (HTR) rūgštys buvo identifikuoti ir kiekybiškai įvertinti atliekant *UESCh-QTOF* analizę. Rezultatai patvirtinti palyginus spektrinius duomenis su etaloninių standartų spektriniais duomenimis (tikslia mase, molekuline formule ir išėjimo laiku).

**10 lentelė.** Fenolinių junginių kiekis (mg/g SM) hidrofiliniuose *A. theiformis* ekstraktuose

Mėginys	Mangiferinas	TR (RT 5,60)	*TR izomeras (RT 4,34)	*TR izomeras (RT 5,74)	HTR (RT 4,73)	*HTR izomeras (RT 3,61)	*HTR izomeras (RT 5,14)
<i>Tiesioginė ekstrakcija</i>							
ACv (SOE)	4,18 <sup>b</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,02 <sup>c</sup>	0,40 <sup>d</sup>	0,30 <sup>e</sup>	0,35 <sup>d</sup>	0,02 <sup>a</sup>
ETv (MME)	35,6 <sup>f</sup>	0,05 <sup>c</sup>	0,08 <sup>d</sup>	0,59 <sup>e</sup>	0,43 <sup>e</sup>	0,58 <sup>e</sup>	a
<i>Pakopinė ekstrakcija</i>							
ACt (SOE)	3,94 <sup>b</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,02 <sup>a</sup>	0,32 <sup>c</sup>	0,28 <sup>c</sup>	0,31 <sup>b,c,d</sup>	0,02 <sup>a</sup>
ETt (MME)	25,6 <sup>e</sup>	-	d	0,26 <sup>b,c</sup>	0,09 <sup>b</sup>	0,22 <sup>b,c</sup>	-
Σ	<b>29,5</b>	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	<b>0,58</b>	<b>0,37</b>	<b>0,53</b>	<b>0,02</b>
AC <sub>70</sub> (ETPS)	3,16 <sup>b</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,02 <sup>a</sup>	0,28 <sup>b,c</sup>	0,26 <sup>e</sup>	0,24 <sup>c</sup>	0,02 <sup>a</sup>
ET <sub>70</sub> (ETPS)	23,0 <sup>d</sup>	-	d	0,25 <sup>b</sup>	0,08 <sup>b</sup>	0,24 <sup>c</sup>	-
V <sub>70</sub> (ETPS)	7,69 <sup>c</sup>	-	d	0,05 <sup>a</sup>	d	0,02 <sup>a</sup>	-
Σ	<b>33,9</b>	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	<b>0,58</b>	<b>0,34</b>	<b>0,50</b>	<b>0,02</b>
AC <sub>140</sub> (ETPS)	4,68 <sup>b</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,26 <sup>b,c</sup>	0,36 <sup>d</sup>	0,21 <sup>b,c</sup>	0,02 <sup>b</sup>
ET <sub>140</sub> (ETPS)	22,4 <sup>d</sup>	-	a	a	0,04 <sup>a</sup>	0,14 <sup>b</sup>	-
V <sub>140</sub> (ETPS)	1,14 <sup>a</sup>	-	-	a	a	a	-
Σ	<b>28,2</b>	<b>0,01</b>	<b>0,02</b>	<b>0,26</b>	<b>0,40</b>	<b>0,35</b>	<b>0,02</b>

\* išreikšta TR arba HTR ekvivalentu; – neaptikta; a – aptikta ekstraktuose, bet dėl mažos koncentracijos kiekybiškai neįvertinta. a–f raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp ekstraktų (Tukey testas, ANOVA,  $p < 0,05$ ).

**11 lentelė.** Fenolinių junginių kiekis ETv ekstrakto frakcijose (mg/g SF)

Mėginytis	Mangiferinas	TR (RT 5,60)	*TR izomeras (RT 4,34)	*TR izomeras (RT 4,34)	HTR (RT 4,73)	*HTR izomeras (RT 3,61)	*HTR izomeras (RT 5,14)
<i>Ekstraktas</i>							
ETv	104,6±3,99 <sup>b</sup>	0,15±0,00 <sup>a</sup>	0,24±0,00 <sup>a</sup>	1,72±0,12 <sup>b</sup>	1,26±0,04 <sup>b</sup>	1,70±0,21 <sup>c</sup>	0,01±0,00 <sup>a</sup>
<i>Frakcijos, gautos skysčių-skysčių ekstrakcijos būdu</i>							
Etilacetato (ECf)	191,7±3,21 <sup>d</sup>	a	a	8,51±0,01 <sup>c</sup>	4,02±0,22 <sup>c</sup>	5,83±0,06 <sup>c</sup>	a
n-butanolio (n-Bf)	416,3±3,77 <sup>c</sup>	-	-	a	-	1,30±0,06 <sup>b</sup>	-
Vandens (Vf)	12,57±0,10 <sup>a</sup>	-	-	a	a	a	-
<i>Frakcijos, gautos šaldant ekstraktą 6 °C temperatūroje</i>							
1 laikymas žalia (Žf1)	152,5±7,11 <sup>c</sup>	a	-	1,00±0,01 <sup>a</sup>	6,31±0,01 <sup>d</sup>	0,59±0,03 <sup>a</sup>	0,05±0,00 <sup>b</sup>
1 laikymas nusėdusi (NF1)	459,7±11,2 <sup>f</sup>	a	-	9,98±0,10 <sup>d</sup>	4,59±0,28 <sup>c</sup>	-	a
2 laikymas nusėdusi (NF2)	557,0±15,4 <sup>g</sup>	-	-	8,30±0,09 <sup>c</sup>	0,10±0,00 <sup>a</sup>	a	a
Skaidri (Sf)	182,6±5,97 <sup>d</sup>	-	a	a	a	3,19±0,03 <sup>d</sup>	-

\* išreikšta TR arba HTR ekvivalentu; – neaptikta; a – aptikta ekstraktuose, bet dėl mažos koncentracijos kietkybiškai neįvertinta. a–g raidės prie skaičių tame pačiame stulpelyje nurodo reikšmingus skirtumus tarp ekstraktų (Tukey testas, ANOVA, p < 0,05).

Nors šie junginiai jau anksčiau buvo identifikuoti *A. theiformis* augale, tačiau mokslinėje literatūroje nepavyko rasti nustatytų jų kiekių. Ankstesniuose *A. theiformis* fitocheminės sudėties tyrimuose taip pat buvo identifikuoti trys triterpenų gliukozidai: tormentinės rūgšties esterio gliukozidas ( $C_{36}H_{58}O_{10}$ ), 2β-hidroksitormentinės rūgšties esterio gliukozidas ( $C_{36}H_{58}O_{11}$ ) ir 6β-hidroksitormentinės rūgšties esterio gliukozidas ( $C_{36}H_{58}O_{11}$ ) (Gopalsamy, Vargas, Guého, Ricaud ir Hostettmann, 1988). Šiose studijose šie junginiai nebuvo identifikuoti, tačiau vietoj jų buvo rasti kiti didelės molekulinės masės junginiai, turintys molekulinės formules  $C_{37}H_{60}O_{14}$ ,  $C_{37}H_{60}O_{13}$  ir  $C_{37}H_{60}O_{12}$ . Junginys, kurio molekulinė formulė  $C_{37}H_{60}O_{12}$ , po MS/MS fragmentavimo turėjo du fragmento jonus: m/z 649,3949 ir 487,3427. Fragmento jonas, kurio m/z 487,3427, atitinka TR jono formulę, taigi šis junginys preliminariai buvo identifikuotas kaip TR darinys. Tommasi, Rastrelli, Cumandos, Speranzos ir Pizzos (1996) studijose TR darinys (tormentinės rūgšties 3fl-O-a-L-ramnopiranosidas) taip pat po fragmentavimo turėjo šį fragmentą.

Nesant pakankamai informacijos apie junginių struktūras, ne visus *A. theiformis* junginius pavyko atpažinti. Keli iš jų buvo identifikuoti naudojantis masių spektrų bibliotekomis. Tikėtina, kad identifikuoti junginiai dėl anksčiau nustatyto didelio bioaktyvumo (antioksidacinio, uždegimo slopinamojo ir kitų) turi didelę įtaką *A. theiformis* ekstraktų AA. Iš kiekybiškai įvertintų junginių mangiferino koncentracija buvo didžiausia ir svyravo nuo 1,14 iki 35,6 mg/g SM.

Buvo nustatyta stipri koreliacija (0,892–0,969) tarp mangiferino kiekio ir frakcijų AA, tačiau koreliacija tarp mangiferino kiekio ir ekstraktų AA buvo kur kas silpnesnė (0,487–0,689). Stipriausia koreliacija buvo tarp mangiferino kiekio ir DPPH<sup>•</sup> verčių (ekstraktų) bei FRAP verčių (frakcijų). Šie rezultatai parodo, kad mangiferinas yra atsakingas už stiprų frakcijų AA. Tikėtina, kad ekstraktuose esantys kiti junginiai taip pat turi reikšmingos įtakos *A. theiformis* AA.

### **3.4. Teorinės galimybės panaudoti tirtus augalus kaip funkcionalius ingredientus kuriant maisto papildus, farmacijos ir kosmetikos produktus**

OS yra pagrindinė kai kurių ligų, tarp jų vėžio, širdies ir kraujagyslių ligų, vystymosi ir progresavimo priežastis. Norint kovoti su nepageidaujamu laisvųjų radikalų sukeltu OS, naudinga mitybą papildyti antioksidantais. Augalai, pasižymintys dideliu AA, gerai tinka šiam tikslui (Kasote, Katyare, Hegde ir Bae, 2015). Ne veltui atliekama daugybė tyrimų ieškant naujų augalų, pasižyminčių įvairiu bioaktyvumu.

Tirti *P. phillyreifolius* ir *A. theiformis* ekstraktai pasižymi išskirtinai dideliu AA, artimu kitų augalų rūšių, kurių AA pripažintas visame pasaulyje, AA ar didesniu. Tarp šių augalų – bazilikai (Juliani ir Simon, 2002), raudonėliai (Brandstetter, Berthold, Isnardy, Solar ir Elmadfa, 2009), indiniai mangai (Surveswaran, Cai, Corke ir Sun, 2007) ir *Salvia* genties augalai (Šulniūtė,



Ragažinskienė ir Venskutonis, 2016). Didelio AA augalai neretai pasižymi ir kitokiu biologiniu aktyvumu, pvz., uždegimo slopinamuoju, antivirusiniu poveikiu ir kt. Todėl kituose darbuose būtų galima toliau tirti *P. phillyreifolius* ir *A. theiformis* augalus siekiant nustatyti kitokį jų bioaktyvumą ir rasti daugiau jų pritaikymo būdų.

Didelis AA yra neatsiejamas nuo bioaktyviųjų junginių, esančių šiose augalų rūšyse. Nustatyta, kad geraniinas yra dominuojantis *P. phillyreifolius* junginys; jo kiekis ekstraktuose siekė iki 110 mg/g SM. Palyginimui: geraniino kiekis kitame jo daug turinčiame augale – *G. thunbergi* – buvo apie 8,65 mg/g SM (Luger ir kt., 1998). Japonijoje šis augalas dėl jame esančio geraniino yra sertifikuotas kaip oficialus vaistas nuo diarėjos. Daugybė ankstesnių studijų parodė, kad geraniinas pasižymi įvairiu bioaktyvumu, todėl šis junginys ir jo turinčios augalų rūšys yra perspektyvus tolesnių tyrimų objektas. Aktualu ieškoti šio junginio pritaikymo būdų farmacijos, maisto papildų ir kosmetikos pramonėse.

*P. phillyreifolius* ekstraktuose taip pat gausu elago rūgšties – jos kiekis siekė iki 8,65 mg/g SM. Įvairios uogos yra puikūs elago rūgšties šaltiniai: 100 g šviežių uogų gali būti apie 71 mg šios rūgšties (Häkkinen, Kärenlampi, Mykkänen ir Törrönen, 2000). Kosmetikos pramonė yra pritaikiusi elago rūgštį komerciniuose produktuose (pvz., „L'Oréal“ kreme „White Perfect Laser“) – šie gaminiai pašalina dėmes odoje.

Šie tyrimai parodė, kad mangiferinas yra pagrindinis *A. theiformis* junginys; jo kiekis ekstraktuose siekė iki 35,6 mg/g SM. Palyginimui: mangiferino kiekis skirtingose indinio mango (*Mangifera indica*) dalyse svyravo nuo 2,59 iki 12,94 mg/g SM (Marcela ir kt., 2017; Vo, Nguyen, Nguyen ir Ushakova, 2017). Ankstesnėse studijose nustatyta, kad mangiferinas turi apsauginį poveikį nuo tokių degeneracinių ligų kaip aterosklerozė, krūties, storosios žarnos, odos, gimdos vėžys, diabetas (Imran ir kt., 2017). Kuboje daug mangiferino turintis mangų žievės ekstraktas „Vimang“ naudojamas tradicinėje medicinoje gydant storosios žarnos vėžį. Nustatyta, kad „Vimang“ padeda pagerinti ŽIV ar sisteminę raudonąja vilklige sergančių pacientų gyvenimo kokybę. Pastaraisiais metais buvo išleista daugybė patentų, susijusių su mangiferino ir jo darinių terapiniu ar kosmetiniu pritaikymu (Telang, Dhulap, Mandhare ir Hirwani, 2013).

Keletas sėkmingų *P. phillyreifolius* ir *A. theiformis* augaluose esančių bioaktyviųjų junginių pritaikymo įvairiems tikslams pavyzdžių parodė, kad šios augalų rūšys gali būti naudojamos kaip funkcionalūs ingredientai kuriant maisto papildus, medicinos ar kosmetikos produktus. Šie tyrimai yra tik pirmas žingsnis atkreipiant dėmesį į šių augalų rūšių svarbą. Kad šie augalai galėtų būti pritaikomi praktiškai, reikia atlikti daugiau tyrimų.

## IŠVADOS

1. Skirtingų ekstrakcijos schemų taikymas turėjo įtakos bioaktyvių *Phyllanthus phillyreifolius* (PP) ir *Aphloia theiformis* (AT) ekstraktų išgavimui. Didžiausios ekstraktų išeigos buvo gautos ekstrahuojant vandens ir etanolio (3:7) mišiniu (27,86–34,03 proc.), gerokai mažesnės – ekstrahuojant vandeniu (13,45–14,65 proc.), acetonu (5,98–11,5 proc.), heksanu (2,14–2,62 proc.) ir SKE-CO<sub>2</sub> (1,26–2,52 proc.). Tradiciniais metodais gautos ekstraktų išeigos buvo didesnės nei gautos didelio slėgio ekstrakcijos metodais. Daugiapakopė ekstrakcija lėmė didesnes PP ekstraktų išeigas nei vienpakopė ekstrakcija.
2. Sistemingai vertinant ekstraktų antioksidacinį aktyvumą (AA) nustatyta, kad hidrofiliniai PP ir AT ekstraktai yra labai stiprūs antioksidantai. Vandens ir etanolio (3:7) mišinys buvo tinkamiausias tirpiklis antioksidaciniu aktyvumu pasižymintiems PP ir AT junginiams išgauti. Tiesioginis žaliavos ekstrahavimas maceruojant maišyklėje efektyviausiai sumažino pradinės PP žaliavos AA. Frakcionuojant 70 proc. etanolinį AT ekstraktą, gautos kelios frakcijos, pasižymintios itin stipriu AA, kuris prilygo mangiferino AA. PP ir AT ekstraktuose buvo nustatyta stipri koreliacija tarp bendrojo fenolinių junginių kiekio ir AA, įvertinto taikant skirtingas *in vitro* AA įvertinimo metodikas, atitinkamai (0,975–0,994) ir (0,936–0,994).
3. Geraniinas buvo vyraujantis junginys hidrofiliniuose PP ekstraktuose, jo koncentracija svyravo nuo 13,2 iki 110 mg/g SM. Lipofiliniuose PP ekstraktuose buvo gausu  $\alpha$ -tokoferolio (0,27–0,38 mg/g SM). Mangiferinas buvo dominuojantis AT junginys, jo koncentracija ekstraktuose siekė iki 36,5 mg/g SM, o frakcijose – iki 557 mg/g SF.
4. Išankstinis HEK293 ląstelių apdorojimas skirtingos koncentracijos acetoniniais ir 70 proc. etanoliniais PP ekstraktais reikšmingai sumažino arba visiškai inhibavo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> padidintą ROS gamybą ir taip apsaugojo ląsteles nuo oksidacinio streso. Antioksidacinių fermentų genų ekspresija buvo veikiamą išankstinio HEK293 ląstelių apdorojimo PP ekstraktais. Citotoksiškumo tyrimai parodė, kad abu tirti ekstraktai netoksiški esant 250  $\mu$ g/ml ir mažesnei koncentracijai.

## LITERATŪRA

1. ALÍA, M., RAMOS, S., MATEOS, R., GRANADO-SERRANO, A. B., BRAVO, L. and GOYA, L. Quercetin Protects Human Hepatoma HepG2 Against Oxidative Stress Induced by Tert-butyl Hydroperoxide. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2006, 212(2), 110–118. ISSN 0041-008X.
2. BRANDSTETTER, S., BERTHOLD, C., ISNARDY, B., SOLAR, S. and ELMADFA, I. Impact of Gamma-Irradiation on the Antioxidative Properties of Sage, Thyme, and Oregano. *Food and Chemical Toxicology*. 2009, 47(9), 2230–2235. ISSN 0278-6915.
3. DANTHU, P., LUBRANO, C., FLAVET, L., RAHAJANIRINA, V., BEHRA, O., FROMAGEOT, C., RABEVOHITRA, R. and ROGER, E. Biological Factors Influencing Production of Xanthones in *Aphloia Theiformis*. *Chemistry and Biodiversity*. 2010, 7, 140–150. ISSN 1612-1880.
4. FUNATOGAWA, K., HAYASHI, S., SHIMOMURA, H., YOSHIDA, T., HATANO, T., ITO, H. and HIRAI, Y. Antibacterial Activity of Hydrolyzable Tannins Derived from Medicinal Plants Against *Helicobacter Pylori*. *Microbiology and Immunology*. 2004, 48(4), 251–261. ISSN 1348-0421.
5. GILANI, A. H. and ATTA-UR-RAHMAN. Trends in Ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005, 100(1–2), 43–49. ISSN 0378-8741.
6. GÖKMEN, V., SERPEN, A., PELLEGRINI, N. and FOGLIANO, V. Direct Measurement of the Total Antioxidant Capacity of Cereal Products. *Journal of Cereal Science*. 2009, 48, 816–820. ISSN 0733-5210.
7. GOPALSAMY, N., VARGAS, D., GUÉHO, J., RICAUD, C. and HOSTETTMANN, K. Saponins from Leaves of *Aphloia Theiformis*. *Phytochemistry*. 1988, 27(11), 3593–3595. ISSN 0031-9422.
8. HÄKKINEN, S. H., KÄRENLAMPI, S. O., MYKKÄNEN, H. M. and TÖRRÖNEN, A. R. Influence of Domestic Processing and Storage on Flavonol Contents in Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, 48(7), 2960–2965. ISSN 1520-5188.
9. IMRAN, M., ARSHAD, M. S., BUTT, M. S., KWON, J. H., ARSHAD, M. U. and SULTAN, M. T. Mangiferin: A Natural Miracle Bioactive Compound Against Lifestyle Related Disorders. *Lipids in Health and Disease*. 2017, 16(1), 1–17. ISSN 1476-511X.
10. YANG, Y., ZHANG, L., FAN, X., QIN, C. and LIU, J. Antiviral Effect of Geraniin on Human Enterovirus 71 *In Vitro* and *In Vivo*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2012, 22(6), 2209–2211. ISSN 0960-894X.
11. YEAP FOO, L. and WONG, H. Phyllanthusiin D, an Unusual Hydrolysable Tannin from *Phyllanthus Amarus*. *Phytochemistry*. 1992, 31(2), 711–713. ISSN 0031-9422.

12. JULIANI, H. R. and SIMON, J. E. Antioxidant Activity of Basil. *Trends in New Crops and New Uses*. 2002, 575–579. ISSN 0157-9711.
13. KASOTE, D. M., KATYARE, S. S., HEGDE, M. V. and BAE, H. Significance of Antioxidant Potential of Plants and Its Relevance to Therapeutic Applications. *International Journal of Biological Sciences*. 2015, 11(8), 982–991. ISSN 1449-2288.
14. KRAUJALIENĖ, V., PUKALSKAS, A. and VENSKUTONIS, P. R. Biorefining of Goldenrod (*Solidago Virgaurea* L.) Leaves by Supercritical Fluid and Pressurized Liquid Extraction and Evaluation of Antioxidant Properties and Main Phytochemicals in the Fractions and Plant Material. *Journal of Functional Foods*. 2017, 37, 200–208. ISSN 1756-4646.
15. KUMARAN, A. and KARUNAKARAN, R. J. Nitric Oxide Radical Scavenging Active Components from *Phyllanthus Emblica* L. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2006, 61(1), 1–5. ISSN 0921-9668.
16. LIU, X., ZHAO, M., WU, K., CHAI, X., YU, H., TAO, Z. and WANG, J. Immunomodulatory and Anticancer Activities of Phenolics from Emblica Fruit (*Phyllanthus Emblica* L.). *Food Chemistry*. 2012, 131(2), 685–690. ISSN 0308-8146.
17. LUGER, P., WEBER, M., KASHINO, S., AMAKURA, Y., YOSHIDA, T., OKUDA, T., BEURSKEN, G. and DAUTER, Z. Structure of the Tannin Geraniin Based on Conventional X-ray Data at 295 K and on Synchrotron Data at 293 and 120 K. *Acta Crystallographica Section B Structural Science*. 1998, 54(5), 687–694. ISSN 2052-5206.
18. MAHOMOODALLY, M. F., YERLIKAYA, S., LLORENT-MARTÍNEZ, E. J., UĞURLU, A., BALOGLU, M. C., ALTUNOGLU, Y. C., MOLLICA, A., DARDENNE, K. K., AUMEERUDDY, M. Z., PUCHOOA, D. and ZENGIN, G. Pharmacological and Polyphenolic Profiles of *Phyllanthus Phillyreifolius* Var. *Commersonii* Müll. Arg: An Unexplored Endemic Species from Mauritius. *Food Research International*. 2018, 115, 425–438. ISSN 0963-9969.
19. MARCELA, M., SANTIAGO, Z., TANIA, R. J., STEPHANIA, R., ANDRÉS, F. A., MALDONADO, M. E., ZAMORANO, P. and BENJAMÍN, A. R. Mangiferin Content, Carotenoids, Tannins and Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Values of Six Mango (*Mangifera Indica*) Cultivars from the Colombian Caribbean. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2017, 11(7), 144–152. ISSN 1996-0875.
20. MARIMOUTOU, M., Le SAGE, F., SMADJA, J., LEFEBVRE, C., GONTHIER, M. and SILVA, C. R. (2015). Antioxidant Polyphenol-Rich Extracts from the Medicinal Plants *Antirhea Borbonica*, *Doratoxylon Apetalum* and *Gouania Mauritiana* Protect 3T3-L1 Preadipocytes Against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TNF and LPS Inflammatory Mediators by Regulating the Expression

- of Superoxide. *Journal of Inflammation*. 2015, 12(10), 1–15. ISSN 1476-9255.
21. PUKALSKAS, A., VENSKUTONIS, P. R., SALIDO, S., WAARD, P. D., VAN BEEK, T. A. Isolation, Identification and Activity of Natural Antioxidants from Horehound (*Marrubium Vulgare* L.) Cultivated In Lithuania. *Food Chemistry*. 2012, 130(3), 695–701. ISSN 0308-8146.
  22. REGUEIRO, J., SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, C., VALLVERDÚ-QUERALT, A., SIMAL-GÁNDARA, J., LAMUELA-RAVENTÓS, R. and IZQUIERDO-PULIDO, M. Comprehensive Identification of Walnut Polyphenols by Liquid Chromatography Coupled to Linear Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometry. *Food Chemistry*. 2014, 152, 340–348. ISSN 0308-8146.
  23. ROSA, L. A., MORENO-ESCAMILLA, J. O., RODRIGO-GARCÍA, J. and ALVAREZ-PARRILLA, E. Phenolic Compounds. In *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Elsevier Inc. 2019. ISBN: 9780128132791.
  24. SEPTEMBRE-MALATERRE, A., STANISLAS, G., DOURAGUIA, E. and GONTHIER, M. Evaluation of Nutritional and Antioxidant Properties of the Tropical Fruits Banana, Litchi, Mango, Papaya, Passion Fruit and Pineapple Cultivated in Réunion French Island. *Food Chemistry*. 2016, 212, 225–233. ISSN 0308-8146.
  25. SOUSA, A. D., MAIA, A. I. V., RODRIGUES, T. H. S., CANUTO, K. M., RIBEIRO, P. R. V., VIEIRA, R. F. and DE BRITO E. S. Ultrasound-assisted and Pressurized Liquid Extraction of Phenolic Compounds From *Phyllanthus Amarus* and Its Composition Evaluation by UPLC-QTOF. *Industrial Crops and Products*. 2016, 79, 91–103. ISSN 0926-6690.
  26. SOWNDHARARAJAN, K., HONG, S., JHOO, J. W., KIM, S. and CHIN, N. L. Effect of Acetone Extract from Stem Bark of *Acacia* Species (*A. Dealbata*, *A. Ferruginea* and *A. Leucophloea*) on Antioxidant Enzymes Status in Hydrogen Peroxide-Induced Hepg2 Cells. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2015, 22(6), 685–691. ISSN 1319-562X.
  27. SPRENGER, R. D. F. and CASS, Q. B. Characterization of Four *Phyllanthus* Species Using Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography*. 2013, 1291, 97–103. ISSN 0021-9673.
  28. SURVESWARAN, S., CAI, Y. Z., CORKE, H. and SUN, M. Systematic Evaluation of Natural Phenolic Antioxidants from 133 Indian Medicinal Plants. *Food Chemistry*. 2007, 102(3), 938–953. ISSN 0308-8146.
  29. ŠULNIŪTĒ, V., RAGAŽINSKIENĒ, O. and VENSKUTONIS, P. R. Comprehensive Evaluation of Antioxidant Potential of 10 *Salvia* Species Using High Pressure Methods for the Isolation of Lipophilic and Hydrophilic

- Plant Fractions. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2016, 71(1), 64–71. ISSN 1573-9104.
30. TABATA, H., KATSUBE, T., TSUMA, T., OHTA, Y., IMAWAKA, N. and UTSUMI, T. Isolation and Evaluation of the Radical-Scavenging Activity of the Antioxidants in the Leaves of an Edible Plant, *Mallotus Japonicus*. *Food Chemistry*. 2008, 109(1), 64–71. ISSN 0308-8146.
  31. TELANG, M., DHULAP, S., MANDHARE, A. and HIRWANI, R. Therapeutic and Cosmetic Applications of Mangiferin: A Patent Review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2013, 23(12), 1561–1580. ISSN 1744-7674.
  32. TOMMASI, N. D. E., RASTRELLI, L., CUMANDA, J., SPERANZA, G. and PIZZA, C. Aryl and Triterpenic Glycosides from *Margyricarpus Setosus*. *Phytochemistry*. 1996, 42(1), 163–167. ISSN 0031-9422.
  33. TURKMEN, N., SARI, F. and VELIOGLU, Y. S. Effects of Extraction Solvents on Concentration and Antioxidant Activity of Black and Black Mate Tea Polyphenols Determined by Ferrous Tartrate and Folin-Ciocalteu Methods. *Food Chemistry*. 2006, 99(4), 835–841. ISSN 0308-8146.
  34. VO, T. H. T., NGUYEN, T. D., NGUYEN, Q. H. and USHAKOVA, N. A. Extraction of Mangiferin from the Leaves of the Mango Tree *Mangifera Indica* and Evaluation of Its Biological Activity in Terms of Blockade of  $\alpha$ -Glucosidase. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2017, 51(9), 806–810. ISSN 0091-150X.
  35. WANG, P., PENG, X., WEI, Z. F., WEI, F. Y., WANG, W., MA, W. D., YAO, L. P., FU, Y. J. and ZU, Y. G. Geraniin Exerts Cytoprotective Effect Against Cellular Oxidative Stress by Upregulation of Nrf2-Mediated Antioxidant Enzyme Expression via PI3K/AKT and ERK1/2 Pathway. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*. 2015, 1850(9), 1751–1761. ISSN 0304-4165.
  36. WANG, X., HAI, C. X., LIANG, X., YU, S. X., ZHANG, W. and LI, Y. L. The Protective Effects of *Acanthopanax Senticosus* Harms Aqueous Extracts Against Oxidative Stress: Role of Nrf2 and Antioxidant Enzymes. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010, 127(2), 424–432. ISSN 0378-8741.

## MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

### Mokslinės publikacijos disertacijos tema, paskelbtos mokslinės informacijos *Clarivate Analytics* (buv. *Thomson Reuters*) WOS sąrašo leidiniuose:

1. GRAUZDYTĖ, D., PUKALSKAS, A., VIRANAICKEN, W., EL KALAMOUNI, C. and VENSKUTONIS, P. R. Protective effects of *Phyllanthus phillyreifolius* extracts against hydrogen peroxide induced oxidative stress in HEK293 cells. *PLoS One*. San Francisco, CA: Public library of science. eISSN 1932-6203. 2018, vol. 13, iss. 11, art. no. e0207672, p. 1–15. (IF: 2,766 (2018)).
2. GRAUZDYTĖ, D., PUKALSKAS, A., EL KALAMOUNI, C. and VENSKUTONIS, P. R. Antioxidant potential and phytochemical composition of extracts obtained from *Phyllanthus phillyreifolius* by different extraction methods. *Natural Product Research*. Abingdon, UK: Taylor & Francis. ISSN 1478-6419. eISSN 1478-6427. 2018, vol. 34, iss. 5, p. 706–709. (IF: 1,999 (2018)).
3. GRAUZDYTĖ, D., PUKALSKAS, A., EL KALAMOUNI, C., and VENSKUTONIS, P. R. Mangiferin rich products from *Aphloia theiformis* (vahl) benn leaves: extraction, fractionation, phytochemical characterization, and antioxidant properties. *Molecules*. 2020, Basel: MDPI AG. ISSN 1420-3049. 2020, vol. 25, iss. 9, art. no. 2081, p. 1–16. (IF: 3,060 (2018)).

### Kitos mokslinės publikacijos, paskelbtos mokslinės informacijos *Clarivate Analytics* (buv. *Thomson Reuters*) WOS sąrašo leidiniuose:

1. BENDIF, H., MIARA, M. D., KALBOUSSI, Z., GRAUZDYTĖ, D., POVILAITIS, D., VENSKUTONIS, P. R. and MAGGI, F. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Rosmarinus eriocalyx* growing in Algeria: chemical composition and antioxidant activity of extracts and their solid plant materials. *Industrial Crops and Products*. Amsterdam: Elsevier. ISSN 0926-6690. eISSN 1872-633X. 2018, vol. 111, p. 768–774. (IF: 4,191 (2018)).
2. GRAUZDYTĖ, D., RAUDONIŪTĖ, J., KULVINSKIENĖ, I., BAGDONAS, E., STASIULAITIENĖ, I., MARTUZEVIČIUS, D., BIRONAITĖ, D., ALDONYTĖ, R. and VENSKUTONIS, P. R. Cytoprotective effects of mangiferin and Z-ligustilide in PAH-exposed human airway epithelium *in vitro*. *Nutrients*. Basel: MDPI AG. eISSN 2072-6643. 2019, vol. 11, iss. 2, art. no. 218, p. 1–15. (IF: 4,171 (2018)).
3. HADDAD, J. G., GRAUZDYTE, D., KOISHI, A. C., VIRANAICKEN, W., VENSKUTONIS, P. R., DOS SANTOS, C. N. D., DESPRÈS, P., DIOTEL, N., EL KALAMOUNI, C. The geraniin-rich extract from Reunion Island endemic medicinal plant *Phyllanthus phillyreifolius* inhibits Zika and



Dengue virus infection at non-toxic effect doses in zebrafish. *Molecules*: MDPI AG. ISSN 1420–3049. 2020, vol. 25, iss. 10, art. no. 2316, p. 1–17. (IF: 3,060 (2018)).

**Pranešimai disertacijos tema, išspausdinti Lietuvos ir užsienio konferencijų pranešimų medžiagoje:**

1. GRAUZDYTĖ, D., VENSKUTONIS, P. R., PUKALSKAS, A. and EL KALAMOUNI, C. Antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Aphloia theiformis* extracts/fractions and chemical characterization of major phenolic compounds. In: *FoodBalt – 2018: 12th Baltic conference on food science and technology “Food R&D in the Baltics and beyond”, May 17–18, 2018 Kaunas, Lithuania: abstract book*. Kaunas University of Technology, Department of Food Science and Technology. Kaunas: Kauno technologijos universitetas, 2018, p. 29. eISBN 9786090214626.
2. GRAUZDYTĖ, D., VENSKUTONIS, P. R., PUKALSKAS, A. and EL KALAMOUNI, C. Antioxidant properties and phytochemical composition of *Aphloia theiformis*. In: *ISNFF 2017: the 10th international conference and exhibition on nutraceuticals & functional foods, October 22–25, 2017, Gunsan, Jeonbuk, Korea*. Organized by International Society for Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF). [S. l.]: [s. n.], 2017, P2-33, p. 219.
3. GRAUZDYTĖ, D., PUKALSKAS, A., EL KALAMOUNI, C. and VENSKUTONIS, P. R. Antioxidant properties and phytochemical composition of *Phyllanthus phillyreifolius*. In: *ISNFF 2017: the 10th international conference and exhibition on nutraceuticals & functional foods, October 22–25, 2017, Gunsan, Jeonbuk, Korea*. Organized by International Society for Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF). [S. l.]: [s. n.], 2017, P3-40, p. 277.
4. GRAUZDYTĖ, D., VENSKUTONIS, P. R., PUKALSKAS, A. and EL KALAMOUNI, C. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Phyllanthus phillyreifolius*. In: *4TH North and East European congress on food, 10–13 September, 2017, Kaunas, Lithuania: abstract book*. Kaunas: Kaunas University of Technology, 2017, p. 28. ISBN 9786090213735.
5. GRAUZDYTĖ, D., VENSKUTONIS, P. R. and EL KALAMOUNI, C. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Phyllanthus phillyreifolius*. In: *Foodbalt 2017: 11th Baltic Conference on Food Science and Technology “Food science and technology in a changing world”, Jelgava, April 27–28, 2017: abstract book*. Latvia University of Agriculture, Faculty of Food Technology. [S. l.]: [s. n.], 2017, p. 43. ISSN 2501-0190.
6. GRAUZDYTĖ, D. and VENSKUTONIS, P. R. *Phyllanthus phillyreifolius* ekstraktų antioksidacinės savybės ir fitocheminė sudėtis. In: *Mokslas –*



- sveikatai: X nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija, 2017 m. balandžio 7 d., Kaunas: konferencijos tezių knyga. Lietuvos sveikatos mokslų universitetas. Kaunas: Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Leidybos namai, 2017, p. 10–12. ISBN 9789955154808.*
7. GRAUZDYTĖ, D., VENSKUTONIS, P. R. and EL KALAMOUNI, C. Antioxidant potential of *Phyllanthus phillyreifolius* – the tropical plant from Reunion Island. In: *Foodbalt – 2015 [elektroninis išteklius]: 10th Baltic conference on food science and technology "Future food: innovations, science and technology", May 21–22, 2015, Kaunas, Lithuania: abstract book. Kaunas University of Technology, Department of Food Science and Technology. Kaunas: KTU, 2015, p. 53. eISBN 9786090211380.*

## TRUMPA INFORMACIJA APIE AUTORE

Dovilė Grauzdytė gimė 1989 m. liepos 7 d. Kaune.

### Išsilavinimas:

2008	Baigė Kauno Stepono Dariaus ir Stasio Girėno gimnaziją.
2008–2012	Studijavo Kauno technologijos universiteto Cheminės technologijos fakultete, baigė Maisto technologijos ir inžinerijos studijų programą ir įgijo chemijos inžinerijos bakalauro kvalifikacinį laipsnį.
2012–2014	Studijavo Kauno technologijos universiteto Cheminės technologijos fakultete, baigė maisto technologijų studijų krypties Maisto mokslo ir saugos studijų programą ir įgijo maisto technologijų magistro kvalifikacinį laipsnį.
2014–2019	Studijavo Kauno technologijos universiteto Cheminės technologijos fakultete chemijos krypties doktorantūroje.

### Stažuotės:

2013 10 01–2014 03 01	„Erasmus“ stažuotė Miuncheno technologijos universitete (Vokietija).
2015 04 01–2015 09 30	„Erasmus“ stažuotė Reunjono salos universitete (Reunjono sala, Prancūzija).

## PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo mokslinio darbo vadovui prof. dr. Petriui Rimantui Venskutoniui už disertacijos temos idėją, palaikymą, suteiktą galimybę stažuotis Reunjono universitete, visokeriopą pagalbą vykdant mokslinius tyrimus, rašant straipsnius ir rengiant disertaciją. Dr. Chaker El Kalamouni ir kitiems Reunjono universiteto kolegoms – už labai šiltą priėmimą ir pagalbą stažuotės metu atliekant mokslinius tyrimus. Taip pat esu dėkinga visiems KTU Maisto mokslo ir technologijų katedros kolegoms, ypač doc. Audriui Pukalskui už pagalbą atliekant mokslinius tyrimus, Ramutei Maždzierienei, Renatai Baranauskienei ir Ritai Kazernavičiūtei už puikią darbinę atmosferą ir visokeriopą pagalbą.

Labai ačiū mano sesei, tėvams, artimiesiems ir draugams už moralinį palaikymą, kantrybę, rūpinimąsi ir supratingumą.

# PHYTOCHEMICAL COMPOSITION AND *IN VITRO* BIOACTIVITY OF LOW INVESTIGATED *PHYLLANTHUS PHILLYREIFOLIUS* AND *APHLOIA THEIFORMIS* PLANT SPECIES INDIGENOUS TO REUNION ISLAND

## INTRODUCTION

Throughout the ages, plants have formed the basis of various traditional medicine systems and folk medicine. Until now, plants are still highly valued as a rich source of therapeutic agents. Most clinical drugs that are currently in use (e.g., aspirin, codeine, morphine, atropine) were derived from plants and were discovered because of their use in the traditional medicine (Gilani and Atta-ur-Rahman, 2005). It is well known that the medicinal value of plants depends on the presence of biologically active ingredients (Pan *et al.*, 2013) which can be utilized in the pharmaceutical industry as natural drug agents and/or for the purposes of synthesis, while in the food and cosmetic industry, many of them are regarded as health promoting/disease preventing compounds and as antioxidant and antimicrobial additives. It is therefore not surprising that, in the last few decades, the identification of new phytochemicals and the development of bioactive ingredients from various plants has become an important area in the health and medicinal food related research (Dai and Mumper, 2010). The trend of potential applications for natural compounds is constantly growing, and it may be expected that newly discovered compounds could possess even stronger bioactivities than the already known substances.

Nevertheless, a large number of botanicals still remain poorly investigated, and, therefore, they lack scientific valorization for wider application of their phytochemical constituents. From this point of view, the tropical flora, which is more seriously threatened with extinction than many other species in different parts of the world, is of particular interest. Considering all these aspects, systematic scientific evaluation of less studied plant species is an important objective which may lead to finding new sources of valuable natural substances (Jonville *et al.*, 2008). Reunion Island, a French volcanic island in the Indian Ocean, is listed among the world's top biodiversity areas. *Phyllanthus phillyreifolius* and *Aphloia theiformis* belong to the plant species which are indigenous to this island. Although both species are locally used in the folk medicine, scientific information on them is fairly limited.

In order to obtain valuable ingredients, they must be efficiently and safely extracted from their plant sources (Rosa, Moreno-Escamilla, Rodrigo-García and Alvarez-Parrilla, 2019). Various extraction methods are used for this purpose including conventional (Soxhlet, maceration by stirring, distillation) and innovative (supercritical fluid, pressurized liquid, ultrasound, microwave assisted) extractions. The assessment of the phytochemical composition and activity of the

obtained products is a very important task in finding further application for these products. The evaluation of antioxidant activity is usually a financially cheap procedure which provides valuable information about plant samples.

### **The aim and objectives of the research**

The aim of this work was to comprehensively evaluate the phytochemical composition and antioxidant potential of *Phyllanthus phillyreifolius* and *Aphloia theiformis* leaves extracts isolated by conventional and innovative extractions methods with solvents of various polarity.

The following objectives were outlined in order to achieve this aim:

1. To evaluate the effectiveness of various extraction schemes when using different polarity solvents and applying the traditional and high pressure extraction methods.
2. To investigate the antioxidant properties of the obtained extracts, fractions and extraction residues by using the selected *in vitro* antioxidant activity assays.
3. To determine the phytochemical composition of the obtained extracts and fractions by using chromatographic and mass spectrometric methods.
4. To evaluate the cytotoxicity and the protective effect of selected *P. phillyreifolius* extracts on human embryonic kidney (HEK293) cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative stress.

### **Scientific novelty**

1. Application of comprehensive extraction procedures to obtain valuable extracts of *P. phillyreifolius* and *A. theiformis* has not been reported previously.
2. To the best of our knowledge, the evaluation of cytotoxicity, antioxidant properties and phytochemical characterization of *P. phillyreifolius* extracts has been performed for the first time.
3. The fractionation of crude hydroethanolic extract of *A. theiformis* by precipitation at a low temperature has not been performed previously.
4. Six isomers of tormentic and hydroxytormentic acids have been observed for the first time in *A. theiformis* extracts.
5. The quantity evaluation of mangiferin, tormentic and hydroxytormentic acids in *A. theiformis* extracts and fractions has not been reported previously.

### **Practical significance**

The study revealed that both investigated plant species are good sources of antioxidant active compounds which have high potential for their practical application in the pharmaceutical, nutraceutical, food and cosmetics industries. It is known that major compounds – mangiferin and geraniin – identified in *A. theiformis* and *P. phillyreifolius*, respectively – are valued for their various bioactivities. The present study may foster further studies on the isolation of these

compounds and further investigation of their practical application. It is important to underline that the fractionation of the crude hydroethanolic extract of *A. theiformis* yielded some quite pure mangiferin rich fractions where the content of mangiferin was up to 5 times higher than in the crude extract.

### **Key points of the thesis**

Application of various extraction techniques and concepts is feasible with the objective to obtain natural products of poorly investigated medicinal plants which are indigenous to Reunion Island, namely *Phyllanthus phillyreifolius* and *Aphloia theiformis*, as they may be further used as valuable functional ingredients in pharmaceutical, nutraceutical and cosmetical industries due to the richness in bioactive phytochemicals and antioxidant activity.

### **Publication of the research results**

The results of this research have been presented in 3 publications in the journals indexed by *Clarivate Analytics Web of Science* and reported at 6 international scientific conferences.

### **Structure and content of the dissertation**

The thesis is written in English. It consists of the list of abbreviations; introduction; literature review; materials and methods; results and discussion; conclusions; references (in total, 187 references were used) and a list of publications on the dissertation topic. The dissertation has 98 pages, 14 tables and 33 figures.

### **Statements presented for the defence**

1. The application of the conventional and high pressure extraction methods allows the extraction of extracts of *P. phillyreifolius* and *A. theiformis* with strong antioxidant properties and valuable phytochemicals.

2. The preconditioning of HEK293 cells with *P. phillyreifolius* extracts has a positive effect on protecting cells against oxidative stress.

3. By the application of different fractionation methods, mangiferin rich fractions of the crude *A. theiformis* extract can be obtained. application of conventional and high pressure extraction methods allows the extraction of extracts of *P. phillyreifolius* and *A. Theiformis* with strong antioxidant properties and valuable phytochemicals.

## CONCLUSIONS

1. The application of different extract preparation schemes affected the yield of the extracts of *Phyllanthus phillyreifolius* (PP) and *Aphloia theiformis* (AT). The yields obtained with the water/ethanol (3:7) mixture were higher (27.86–34.03%) compared to water (13.45–14.65%), acetone (5.98–11.5%), hexane (2.14–2.62%), and SFE-CO<sub>2</sub> (1.26–2.52%). The conventional extraction methods gave higher yields than the high pressure extraction techniques. In the PP case, consecutive extraction was more effective in the recovery of bioactive extracts than the single step extraction.
2. *In vitro* antioxidant activity (AA) assays indicated that the hydrophilic extracts of the investigated plants were very strong antioxidants. A considerable amount of the antioxidant active material remained after the extraction of PP. Direct maceration by stirring with the water/ethanol (3:7) mixture most efficiently decreased the antioxidant potential of the PP plant material. The fractionation of the hydroethanolic extract of the AT extract gave some fractions with a very high AA, which was comparable to mangiferin AA. A strong correlation between the total content of polyphenols and the AA measured by *in vitro* AA assays was observed in PP and AT extracts, (0.975–0.994) and (0.936–0.994), respectively.
3. Geraniin was the major quantified compound of hydrophilic extracts of PP in concentrations ranging from 13.2 to 110 mg/g DWP. Among the quantified tocopherols,  $\alpha$ -tocopherol was most abundant (0.27–0.38 mg/g DWP) in the lipophilic extracts of PP. Mangiferin was the main constituent of AT whose concentration reached 36.5 mg/g DWP. The content of mangiferin in the fractions ranged from 12.57 to 557.0 mg/g DF. Tormentic and hydroxytormentic acids as well their derivatives and isomers were also present in AT extracts and fractions.
4. The preconditioning of HEK293 cells with the acetonic and hydroethanolic extracts of PP extracts strongly inhibited the generation of ROS induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> thus protecting cells against oxidative stress. The gene expression of antioxidant enzymes was also affected by the pretreatment cells with PP extracts. The cytotoxicity assay indicated that both investigated extracts were nontoxic at 250  $\mu$ g/ml and lower concentrations.

## INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Dovilė Grauzdytė was born on the 7<sup>th</sup> of July of 1989 in Kaunas, Lithuania.

In 2008, graduation from Kaunas S. Darius ir S. Girėnas Gymnasium.

2008–2012 Bachelor's degree studies at Kaunas University of Technology, Faculty of Chemical Technology, Bachelor of Chemical Engineering.

2012–2014 Master's degree studies at Kaunas University of Technology, Faculty of Chemical Technology, Master of Food Technology.

2014–2020 Doctoral degree studies at Kaunas University of Technology, Faculty of Chemical Technology.

### **Interships:**

October 01, 2013–March 01, 2014 Erasmus Internship at the Technical University of Munich (Germany).

April 01, 2015–September 30, 2015 Erasmus Internship at the University of Reunion Island (Reunion Island, France Overseas Territories, France).

UDK 615.322(043.3)

SL344. 2020-05-25, 3 leidyb. apsk. I. Tiražas 50 egz.

Išleido Kauno technologijos universitetas, K. Donelaičio g. 73, 44249 Kaunas  
Spausdino leidyklos „Technologija“ spaustuvė, Studentų g. 54, 51424 Kaunas

