

Mr Vesna T. Tumbas

**ANTIRADIKALSKA I ANTIPROLIFERATIVNA
AKTIVNOST EKSTRAKATA ODABRANIH
BILJAKA IZ FAMILIJA ROSACEAE I ERICACEAE**

Doktorska disertacija

Novi Sad, 2010.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET**

Ključna dokumentacijska informacija

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ

Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): Doktorska disertacija
VR

Ime i prezime autora: mr Vesna T. Tumbas, dipl. ing.
AU

Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): dr Jasna Čanadanović-Brunet, red. prof., Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
MN

Naslov rada: Antiradikalska i antiproliferativna aktivnost ekstrakata odabranih biljaka iz familija Rosaceae i Ericaceae
NR

Jezik publikacije: Srpski (latinica)
JP

Jezik izvoda: Srpski/engleski
JI

Zemlja publikovanja: Srbija
ZP

Uže geografsko područje: AP Vojvodina
UGP

Godina: 2010.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

Mesto i adresa: Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1
MA

Fizički opis rada: Broj poglavlja 6, stranica 156, slika 52, tabela 24, literaturnih navoda 326
FO

Naučna oblast: Organska hemija
NO

Naučna disciplina: Hemija slobodnih radikala
ND

Predmetna odrednica, ključne reči: Bobičasto voće, antiradikalska aktivnost, antiproliferativna aktivnost, polifenolna jedinjenja, vitamin C, superoksid anjon radikali, hidrosil radikali, DPPH[•], HPLC, ESR, SPE
PO

UDK

Čuva se:

ČU

Važna napomena:

VN

Izvod:

IZ

Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, 21000
Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1

nema

Acetonski ekstrakti bobičastog voća iz familija Ericaceae (borovnica, *Vaccinium myrtillus* L., i brusnica, *Vaccinium macrocarpon* L.) i Rosaceae (šipak, *Rosa canina* L., i glog, *Crataegus oxyacantha* L.) prečišćeni su i fracionisani primenom ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE). Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja, flavonoida i antocijana u prečišćenim ekstraktima određeni su spektrofotometrijskim metodama. HPLC analizom utvrđen je kvalitativni i kvantitativni sastav frakcija ekstrakata ispitivanih bobica. ESR spektroskopijom ispitana je antiradikalska aktivnost frakcija ekstrakata bobica na stabilne DPPH• i reaktivne superoksid anjon i hidrosil radikale. ESR spektroskopijom ispitano je i prisustvo slobodnih radikala antioksidanata nastalih tokom reakcije frakcija ekstrakata bobica sa superoksid anjon radikalima. U završnoj fazi rada ispitana je *in vitro* antiproliferativna aktivnost frakcija ekstrakata bobica, njihovim delovanjem na rast tri histološki različite humane ćelijske linije: HeLa (epitelni karcinom cerviksa), HT-29 (adenokarcinom debelog creva) i MCF-7 (adenokarcinom dojke). 29.09.2006.

**Datum prihvatanja
teme od strane NN**

veća:

DP

Datum odbrane:

DO

**Članovi komisije:
(ime i prezime / titula
/ zvanje / naziv
organizacije / status)**

KO

predsednik: dr Neda Mimica-Dukić, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu
član: dr Jasna Čanadanović-Brunet, redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu
član: dr Sonja Đilas, redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY**

Key word documentation

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: Monograph documentation
DT

Type of record: Textual printed material
TR

Contents code: PhD Thesis
CC

Author: Vesna Tumbas, MSc
AU

Mentor: Jasna Čanadanović-Brunet, PhD., prof.
MN

Title: Antiradical and antiproliferative activity of selected plant
TI
extracts from Rosaceae and Ericaceae family

Language of text: Serbian
LT

Language of abstract: Serbian/English
LA

Country of publication: Serbia
CP

Locality of publication: AP Vojvodina
LP

Publication year: 2010
PY

Publisher: Author reprint
PU

Publication place: Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1
PP

Physical description: Chapters 6, pages 156, figures 52, tables 24, ref. 326
PD

Scientific field: Organic chemistry
SF

Scientific discipline: Free radical chemistry
SD

Subject, Key words: Berries, antiradical activity, antiproliferative activity, poly-
SKW
phenolic compounds, vitamin C, superoxide anion radicals,
hydroxyl radicals, DPPH[•], HPLC, ESR, SPE

UC

Holding data: Faculty of Technology (library),
HD 21000 Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1
Note: None
N

Abstract: Acetone extracts of berries from Ericaceae (bilberry, *Vaccinium myrtillus* L., and cranberry, *Vaccinium macrocarpon* L.) and Rosaceae (rose hip, *Rosa canina* L., and hawthorn, *Crataegus oxyacantha* L.) families were purified and fractionated using solid phase extraction (SPE). Contents of total polyphenols, flavonoids and anthocyanins in purified extracts were determined by spectrophotometric methods. HPLC analysis were used for quantitative and qualitative characterization of investigated berry extracts fractions. ESR spectroscopy was used for investigation of antiradical activity of berry extracts fractions on stable DPPH• and reactive superoxide anion and hydroxyl radicals. The presence of antioxidant free radicals formed during reaction of investigated berry extracts fractions with superoxide anion radicals was also investigated by ESR. Antiproliferative activity of investigated berry extracts fractions was determined *in vitro*, testing their influence on the growth of three histologically different human cell lines: HeLa (cervix epithelioid carcinoma), HT-29 (colon adenocarcinoma) i MCF-7 (breast adenocarcinoma).
AB

Accepted on Scientific Board on: September 29th 2006.
AS

Defended:
DE

Thesis Defend Board: **president:** Dr Neda Mimica-Dukić, Professor, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Novi Sad
DB **member:** Dr Jasna Čanadanović-Brunet, Professor, Faculty of Tecnology, Novi Sad
member: Dr Sonja Đilas, Professor, Faculty of Tecnology, Novi Sad

Neizmernu zahvalnost dugujem svom mentoru Prof. dr Jasni Čanadanić-Brunet za ogromnu podršku, znanje, strpljenje i pomoć koju mi je pružila tokom izrade i pisanja doktorske disertacije.

Iskreno se zahvaljujem Prof. dr Sonji Đilas i Prof. dr Gordani Četković za korisne savete, sugestije, podršku i pomoć od prvih dana opredeljivanja za ovu temu.

Zahvaljujem se Prof. dr Nedi Mimici-Dukić na dragocenim sugestijama.

Posebno se zahvaljujem Branislavu Bastaji za prijateljstvo, razumevanje i pomoć pri tehničkoj izradi rada.

Najsrdacnije se zahvaljujem dr sc. med. Gordani Bogdanović i dr Dragani Četojević-Simin na prijateljskoj podršci i određivanju antiproliferativne aktivnosti. Takođe, zahvaljujem se i Prof. dr Radosmiru Malbaši za urađenu HPLC analizu.

Kolegama i prijateljima zahvaljujem se na podršci.

Mojoj porodici se zahvaljujem na ljubavi, strpljenju i razumevanju.

SADRŽAJ

1.0. UVOD	1
2.0. OPŠTI DEO	4
2.1. Prooksidanti	4
2.2. Antioksidativna zaštita	9
2.2.1. <i>In vivo</i> antioksidanti	9
2.2.1.1. <i>Enzimski antioksidanti</i>	10
2.2.1.2. <i>Metaloproteini</i>	13
2.2.1.3. <i>Niskomolekularni antioksidanti</i>	14
2.2.2. Fitohemikalije	17
2.2.2.1. <i>Polifenolna jedinjenja</i>	18
2.2.2.2. <i>Askorbinska kiselina</i>	32
2.2.2.3. <i>Tokoferoli</i>	34
2.2.2.4. <i>Karotenoidi</i>	38
2.2.3. Antioksidanti u hrani	40
2.2.4. Promene antioksidanata tokom termičkih procesa prerade prehrambenih proizvoda	46
2.3. Bobičasto voće iz familija Ericaceae i Rosaceae kao potencijalan izvor antioksidanata	48
2.3.1. Borovnica (<i>Vaccinium myrtillus</i> L., Ericaceae)	54
2.3.2. Brusnica (<i>Vaccinium macrocarpon</i> L., Ericaceae)	55
2.3.3. Šipak (<i>Rosa canina</i> L., Rosaceae)	56
2.3.4. Glog (<i>Crataegus oxyacantha</i> L., Rosaceae)	57
2.4. Prevencija oksidativnog stresa ishranom	58
2.4.1. Uloga funkcionalne hrane	58
2.4.2. Uloga antioksidanta u prevenciji kancerogenih i mutagenih procesa	62
3.0. EKSPERIMENTALNI DEO	66
3.1. Dobijanje ekstrakata bobica	66
3.2. Ekstrakcija na čvrstoj fazi – prečišćavanje i frakcionisanje ekstrakata bobica	67
3.2.1. Postupak prečišćavanja polaznog ekstrakta	67
3.2.2. Frakcionisanje polifenolnih jedinjenja prisutnih u prečišćenom ekstraktu	67
3.3. Određivanje ukupnih polifenolnih jedinjenja u prečišćenim ekstraktima (metoda po Folin-Ciocalteu)	69
3.4. Određivanje ukupnih flavonoida u prečišćenim ekstraktima (metoda po Markamu)	71
3.5. Određivanje antocijana u prečišćenim ekstraktima („singl“ pH i pH diferencijalna metoda)	72
3.6. HPLC analiza frakcija ekstrakata bobica	74
3.7. Ispitivanje antiradikalske aktivnosti frakcija ekstrakata bobica	75
3.7.1. ESR spektralna analiza uticaja frakcija ekstrakata bobica na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala	75
3.7.2. ESR spektralna analiza uticaja frakcija ekstrakata bobica na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala	76

3.7.3. ESR spektralna analiza uticaja frakcija ekstrakata bobica na transformaciju DPPH radikala	77
3.7.4. ESR spektralna analiza slobodnih radikala antioksidanata	78
3.8. Antiproliferativna aktivnost frakcija ekstrakata bobica.....	79
3.8.1. Fotometrijska metoda za određivanje antiproliferativne aktivnosti (MTT test)	80
3.9. Statistička obrada podataka	81
4.0. REZULTATI I DISKUSIJA.....	82
4.1. Spektrofotometrijsko određivanje polifenolnih jedinjenja u ekstraktima bobica....	82
4.2. HPLC analize frakcija ekstrakata bobica.....	83
4.2.1. HPLC analize frakcija ekstrakta borovnice	83
4.2.2. HPLC analize frakcija ekstrakta brusnice.....	84
4.2.3. HPLC analize frakcija ekstrakta šipka.....	86
4.2.4. HPLC analize frakcija ekstrakta gloga	87
4.3. ESR analiza antiradikalske aktivnosti frakcija ekstrakata bobica	90
4.3.1. ESR spektralna analiza uticaja frakcija ekstrakata bobica na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala	90
4.3.2. ESR spektralna analiza uticaja frakcija ekstrakata bobica na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala	95
4.3.3. ESR spektralna analiza uticaja frakcija ekstrakata bobica na transformaciju DPPH radikala.....	99
4.4. ESR spektralna analiza slobodnih radikala antioksidanata	113
4.5. Antiproliferativna aktivnost frakcija ekstrakata bobica.....	121
5.0. ZAKLJUČAK.....	127
6.0. LITERATURA	132

SKRAĆENICE

AlCl₃ – Aluminijumhlorid
AscH₂ – L-askorbinska kiselina
AscH⁻ – Monoanjon L-askorbinske kiseline
AscH²⁻ – Dianjon L-askorbinske kiseline
AscH[•] – Askorbil radikal
Asc⁻ – Anjon semidehidroaskorbil radikala ili askorbil anjon radikal
BHA – Butilovani hidroksianizol
BHT – Butilovani hidroksitoluen
CAT – Katalaza
CA4-H – 4-Hidroksilaza cimetine kiseline
CA4H – 4-Hidroksilaza cimetine kiseline
CH₃COOH – Sirćetna kiselina
CHS – Halkonsintetaza
4CL – Hidroksicinamat:koenzim A ligaza
COMT – Metiltransferaza kumarinske kiseline
DAD (engl. *Diode Array Detector*) – Detektor sa serijom dioda
DHA – Dehidroaskorbinska kiselina
DMF – Dimetilformamid
DMPO – 5,5-Dimetil-1-pirolin-N-oksid
DMSO – Dimetilsulfoniloksid
DNK – Dezoksiribonukleinska kiselina
DPPH[•] – 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil radikal
ECACC (engl. *European Collection of Cell Cultures*) – Evropska kolekcija kultura ćelija
EG(OH)₄ – Elaginska kiselina
EPR – Elektron paramagnetna rezonancija
ESR – Elektron spin rezonancija
FCS (engl. *Fetal Calf Serum*) – Fetalni teleći serum
FIO[•] – Flavonoid radikal
FIOH – Flavonoid
FA-CoA – Koenzim A vezan za masne kiseline
GPx – Glutation peroksidaza
GS[•] – Glutationil radikal
GSH – Glutation
GSST – Glutation disulfid
GST – Glutation-S-transferaza
HCl – Hlorovodonična kiselina
HeLa – Epitelni karcinom cerviksa
HPLC (engl. *High Pressure liquid Chromatography*) – Visokopritisna tečna hromatografija
HRP (engl. *Horseradish Peroxidase*) – Biljna nespecifična peroksidaza izolovana iz rena
H₂SO₄ – Sumporna kiselina
HT-29 – Adenokarcinom debelog creva
KCl – Kalijumhlorid
KO₂ – Kalijum superoksid
LDL (engl. *Low Density Lipoprotein*) – Lipoproteini male gustine
LOOH – Lipidni hidroperoksid
LOO[•] (LO₂[•]) – Lipidni peroksil radikal

L[•] - Lipidni alkil radikal
MCF-7 – Adenokarcinom dojke
MTT – 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid
Na₂CO₃ – Natrijumkarbonat
NADH – Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH – Redukovani oblik nikotinamidadenindinukleotida
NADP – Nikotinamidadenindinukleotid
Na₂MoO₄ – Natrijummolibdat
NaOH – Natrijumhidroksid
Na₂WO₄ – Natrijumvolframat
NMDA – N-metil-D-aspartamska kiselina
•OH – Hidroksil radikal
PAL – Fenilalalinamonium liaza
PG – Propilgalat
PheO[•] – Fenoksil radikal
PheOH – Polifenolno jedinjenje
PhGPx – Glutation peroksidaza vezana za fenolno jezgro
PLA₂ – Fosfolipaza A₂
PQQ – Pirolohinolin hinon
quantum satis (lat.) – Potrebna količina
R[•] – Alkil radikal
RCS (engl. *Reactive Chlorine Species*) – Reaktivne vrste hlora
RNS (engl. *Reactive Nitrogen Species*) – Reaktivne vrste azota
RO[•] – Alkoksil radikal
ROOH – Hidroperoksid
ROS (engl. *Reactive Oxygen Species*) – Reaktivne vrste kiseonika
RP (engl. *Reversed Phase*) – Obrnute faze
SAR (engl. *Structural Activity Relationship*) – Strukturalna aktivnost
SDI (engl. *Succinate dehydrogenase inhibition*) – Inhibicija sukcinat dehidrogenaze
SOD – Superoksid dismutaza
SPE (engl. *Solid Phase Extraction*) – Ekstrakcija na čvrstoj fazi
TBHQ – 2-*tert*-Butilhidroksihinon
TOH – Tokoferol
TO[•] – Tokoferil radikal
UV (engl. *Ultraviolet*) – Ultraljubičasto zračenje
US FDA (engl. *United States Food and Drug Administration*) – Američka uprava za hranu i lekove
WHO (engl. *World Health Organisation*) – Svetska zdravstvena organizacija
λ_{max} – Talasna dužina apsorpcionog maksimuma

1.0. UVOD

Veliki broj eksperimenata, radova i studija ističe da se povećanim konzumiranjem voća i povrća smanjuje rizik od raznih bolesti, kao što su kancer, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti i dijabetes. Naučno je dokazano da biljna hrana sadrži pored minerala i vitamina i između 5000 i 10000 drugih organskih jedinjenja koja imaju svojstvo antioksidanata. Mišljenje mnogih stručnjaka je da upravo ta jedinjenja utiču pozitivno na zdravlje. U novije vreme, upotreba sintetskih antioksidanata se u prehrambenoj industriji napušta iz toksikoloških razloga, a interes za primenu prirodnih antioksidanata stalno raste. Mnoge naučno-istraživačke studije ukazuju na veću efikasnost i zdravstvenu bezbednost prirodnih antioksidanata, izolovanih iz biljaka (fitonutrijenti), mikroorganizama, gljiva i životinjskog tkiva (Moyer i sar., 2002).

Značajnu grupu prirodnih antioksidanata čine biljni sekundarni metaboliti koje čine biljni fenoli (fenolne kiseline, flavoni, izoflavoni, flavan-3-oli, antocijani, proantocijanidini, tanini itd) terpenoidi, tokoferoli, glukozinolati, kao i jedinjenja koja sadrže sumpor, koji pored antioksidativnih poseduju i antimutagena, antikancerogena, anti-inflamatorna, antiulkusna i antimikrobna svojstva, a takođe smanjuju rizik od pojave kardiovaskularnih oboljenja.

Prisustvo antioksidanata u živim organizmima je od vitalnog značaja jer aerobni organizmi *in vivo* kontinualno stvaraju slobodne radikale i reaktivne kiseonične vrste. Slobodni radikali su najčešće vrlo reaktivni i u povećanim koncentracijama mogu da dovedu do oštećenja ćelija i tkiva što može biti uzrok velikog broja obolenja (Nikolić i sar., 1998).

Veliki značaj za efikasno suzbijanje štetnog delovanja slobodnih radikala imaju antioksidanti koji se unose putem ishrane, kao što su vitamin E, vitamin C, karotenoidi i polifenolna jedinjenja biljnog porekla (Dorman i sar., 2004). Uloga biljaka u prevenciji i lečenju bolesti pripisuje se delimično antioksidativnim svojstvima fitohemikalija – liposolubilnim vitaminima A i E, hidrosolubilnom vitaminu C, ali i velikom broju polifenolnih jedinjenja. Istraživanja u oblasti hemije, biohemije i medicine potvrđuju da voće, povrće, začinsko i lekovito bilje, žitarice i druge namirnice biljnog porekla, kao i njihovi ekstrakti,

sadrže prirodne antioksidante: polifenolna jedinjenja, vitamine (vitamin E, vitamin C), terpeene i dr.

Polifenolna jedinjenja su najrasprostranjeniji sekundarni metaboliti u biljkama. Nekoliko hiljada prirodnih polifenolnih jedinjenja identifikovano je u jestivim biljkama (Shahidi i Naczki, 1995). Najznačajniji izvori polifenolnih jedinjenja su razni napitci (čajevi, crno vino, pivo, kafa i voćni sokovi), voće, povrće, čokolada itd (Scalbert i Williamson, 2000). Najnovija istraživanja u oblasti hemije, biohemije i medicine potvrđuju da ekstrakti biljaka sadrže fenolne kiseline, flavone, izoflavone, flavanole, katehine, tokoferole, tanine, terpeene, te da pokazuju antineoplastična, antiviralna, antiinflamatorna, antialergijska i antioksidativna svojstva (Capasso i sar., 2005).

Polifenolna jedinjenja poseduju mnoga biološka i farmakološka dejstva, što ukazuje da oni u značajnoj meri utiču na osnovne ćelijske funkcije kao što su rast, deoba i/ili smrt ćelije (apoptoza). Antioksidativno dejstvo polifenolnih jedinjenja različitog porekla dokazano je u raznim eksperimentalnim sistemima *in vitro* i to tokom: stabilizacije vitamina C, inhibicije lipidne peroksidacije u mikrozomima i mitohondrijama jetre, metabolizma arahidonske kiseline, autooksidacije metil linoleata, tokom inhibicije citotoksičnosti u primarnoj kulturi hepatocita (Bendich i sar., 1986; Ho i sar., 1992). Antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja zasniva se na njihovom redoks potencijalu, pa stoga oni mogu da deluju kao redukujući agensi, „kvenčeri“ singletnog kiseonika, da otpuštaju vodonik i heliraju metale (Ivanova i sar., 2005).

Poznato je da su divlje vrste biljaka vitaminski daleko bogatije od gajenih vrsta. U familijama Rosaceae i Ericaceae veliki je broj divljih, samoniklih biljaka koje rastu na našem području. Stoga su kao predmet istraživanja ove doktorske disertacije odabrane biljke iz ovih familija: borovnica (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae), brusnica (*Vaccinium macrocarpon* L., Ericaceae), šipak (*Rosa canina* L., Rosaceae) i glog (*Crataegus oxyacantha* L., Rosaceae).

Rad na izvođenju ove doktorske disertacije podeljen je u sledeće faze:

1. Dobijanje ekstrakata borovnice, brusnice, šipka i gloga ekstrakcijom 80%-nim acetonom uz dodatak 0,5% sirćetne kiseline;
2. Prečišćavanje i frakcionisanje dobijenih ekstrakata primenom ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE);
3. Spektrofotometrijskom metodom određen je sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja primenom Folin-Ciocalteu reagensa, flavonoida primenom metode po Marka-

- mu, antocijana primenom "singl" pH i pH diferencijalne metode, u prečišćenim ekstraktima borovnice, brusnice, šipka i gloaga;
4. HPLC (visokopritisna tečna hromatografija) metodom određen je kvalitativni i kvantitativni sastav frakcija ekstrakata borovnice, brusnice, šipka i gloaga.
 5. U cilju definisanja antiradikalske aktivnosti ispitan je uticaj različitih koncentracija svih dobijenih frakcija ekstrakata na reaktivne superoksid anjon i hidroksil radikale kao i na stabilne 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikale (DPPH[•]). Sposobnost molekula antioksidanata prisutnih u frakcijama ekstrakata ispitivanih biljaka da stvaraju stabilne slobodne radikale ispitano je tokom reakcije sa superoksid anjon radikalima. Slobodni radikali, nastali u svim ispitivanim sistemima, detektovani su primenom najsavremenije analitičke tehnike za direktnu detekciju i karakterizaciju slobodnih radikala - elektron spin rezonentne (ESR) spektrometrije.
 6. Na osnovu dobijenih rezultata izvršena je korelaciona analiza između sadržaja fitohemikalija u frakcijama ekstrakata ispitivanih bobica i njihove antiradikalske aktivnosti i pretpostavljen mehanizam antioksidativnog delovanja.
 7. U završnoj fazi rada ispitana je *in vitro* antiproliferativna aktivnost frakcija ekstrakata bobica, njihovim delovanjem na rast tri histološki različite humane ćelijske linije: HeLa (epitelni karcinom cerviksa), HT-29 (adenokarcinom debelog creva) i MCF-7 (adenokarcinom dojke).

2.0. OPŠTI DEO

2.1. PROOKSIDANTI

U prooksidante se ubrajaju različite hemijske vrste koje u biološkim i hemijskim sistemima uzrokuju ili ubrzavaju reakcije oksidacije.

Reaktivne prooksidativne vrste se dele na reaktivne slobodnoradikalske i neradikalne vrste (oksidaciona sredstva koja lako prelaze u slobodne radikale). Najvažnije reaktivne vrste kiseonika (ROS), hlora (RCS) i azota (RNS) date su u tabeli 1 (Halliwell i Whiteman, 2004).

Tabela 1. Najvažnije reaktivne slobodnoradikalske i neradikalne vrste

SLOBODNI RADIKALI	NERADIKALSKI OBLICI
Reaktivne kiseonikove vrste (ROS)	
Superoksid anjon radikal, $O_2^{\bullet-}$ Hidroksil radikal, $\bullet OH$ Hidroperoksil radikal, HO_2^{\bullet} Peroksil radikal, RO_2^{\bullet} Alkoksil radikal, RO^{\bullet} Karbonatni radikal, $CO_3^{\bullet-}$ Ugljendioksidni radikal, $CO_2^{\bullet-}$	Vodonik peroksid, H_2O_2 Hipobromna kiselina, $HOBr$ Hiplorna kiselina, $HOCl$ Ozon, O_3 Singletni kiseonik, $O_2^1\Delta_g$ Organski peroksidi, $ROOH$ Peroksinitrit, $ONOO^-$ Peroksinitritna kiselina, $ONOOH$
Reaktivne hlorne vrste (RCS)	
Atomski hlor, Cl^{\bullet}	Hiplorna kiselina, $HOCl$ Nitril (nitronijum) hlorid, NO_2Cl Hloramini
Reaktivne azotove vrste (RNS)	
Azotmonoksidni radikal, NO^{\bullet} Azotdioksidni radikal, NO_2^{\bullet}	Azotasta kiselina, HNO_2 Nitroksil katjon, NO^+ Nitroksil anjon, NO^- Dinitrogen tetroksid, N_2O_4 Dinitrogen trioksid, N_2O_3 Peroksinitrit, $ONOO^-$ Peroksinitritna kiselina, $ONOOH$ Nitronijum (nitril) katjon, NO_2^+ Alkilperoksinitriti, $ROONO$ Nitril (nitronijum) hlorid, NO_2Cl

ROS predstavljaju metabolite nastale iz molekuskog kiseonika (Mimić-Oka i sar., 1999), koji sadrže atom(e) kiseonika i poseduju veću reaktivnost od kiseonika u osnovnom molekuskom stanju (Hu, 2001).

U osnovnom, biradikalskom stanju, molekulski kiseonik poseduje dva nesparena elektrona u spoljnoj orbitali, na svakom atomu po jedan, sa paralelnim elektronskim spinovima. Dovođenjem energije u ove orbitale može se izazvati aktivacija osnovnog stanja molekula, pri čemu nastaju dva reaktivna molekula kiseonika, nazvani singletni oblici kiseonika, $^1\Delta_g\text{O}_2$ i $^1\Sigma_g^+\text{O}_2$. Singletni oblik kiseonika $^1\Delta_g\text{O}_2$ ne sadrži nesparene elektrone, pa se i ne ubraja u njegove slobodnoradikalske, nego u neradikalske vrste. $^1\Sigma_g^+\text{O}_2$ oblik kiseonika poseduje visok sadržaj energije, pa je nestabilan i lako prelazi u stabilniji $^1\Delta_g\text{O}_2$ singletni oblik kiseonika, pre nego reaguje s nekim biomolekulom (Halliwell i Gutteridge, 1984; Čanadanović-Brunet, 1997). Redukcijom molekula kiseonika nastaju redukovani oblici kiseonika: vodonik peroksid, superoksid anjon i hidroksil radikal.

Neradikal se može konvertovati u slobodni radikal gubitkom ili primanjem jednog elektrona, pri čemu se menjaju njegova fizička i hemijska svojstva. Jednom produkovan slobodni radikal može u fazi inicijacije da izazove niz lančanih reakcija, sa drugim manje reaktivnim vrstama.

Slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli, koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi. Nespareni elektroni su uzrok njihove visoke i neselektivne reaktivnosti i nestabilnosti. Slobodni radikali mogu biti neutralni, ali i pozitivno (radikal katjon) i negativno (radikal anjon) naelektrisani. Nespareni elektron se može nalaziti na C-atomu, kao kod alkil radikala (CH_3^\bullet , $\text{CH}_3\text{CH}_2^\bullet$), na O-atomu, kao kod alkoksil-, hidroksil-, peroksil-, superoksid anjon radikala (RO^\bullet , $^\bullet\text{OH}$, ROO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$), ili na S-atomu, kao kod tiil radikala ($n\text{-C}_6\text{H}_9\text{S}^\bullet$). Neretko, nesparen elektron mogu imati i atomi halogena (Cl^\bullet), alkalnih metala (Na^\bullet), ali i joni nekih drugih metala: Cu^{2+} , Fe^{3+} (Tumbas, 2005).

Slobodni radikali spadaju u najreaktivnije hemijske vrste, i zbog svoje visoke hemijske reaktivnosti oni lako stupaju u reakciju, međusobno ili sa drugim molekulima, pri čemu nespareni elektroni obrazuju hemijske veze, oslobađa se energija, a sistem prelazi u niže energetska stanje.

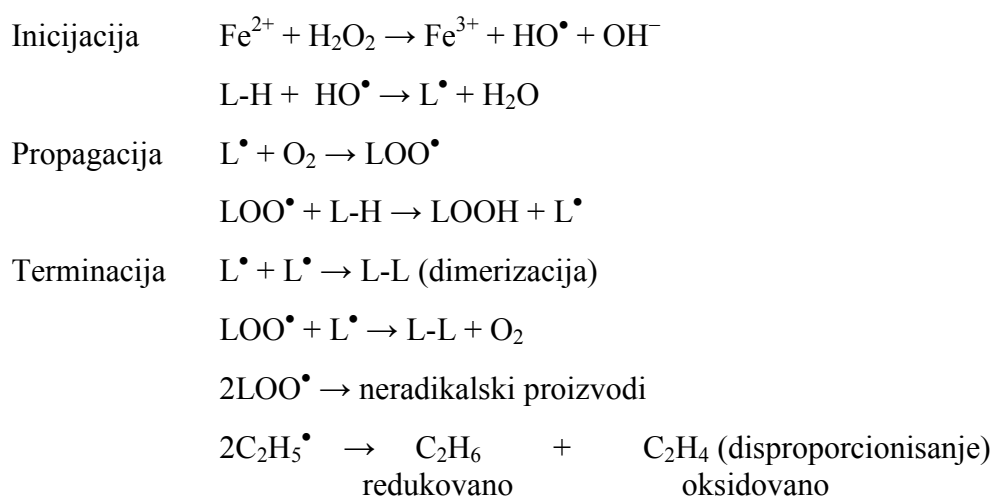
Reaktivni slobodni radikali mogu nastati brojnim reakcijama koje se uglavnom svode na četiri osnovna tipa: termolizu, fotolizu, oksido-redukcijske procese i iradijaciju visoke energije (Piletić i sar., 1993).

U biosistemima se produkcija slobodnih radikala dešava tokom sledećih procesa: apsorpcije radijacije, oksidativne fosforilacije u mitohondrijama, fagocitoze, biotransformacije egzogenih i endogenih supstrata u endoplazmatičnom retikulumu, metabolizma etanola, enzimskih reakcija koje katalizuju oksidaze, sinteze eikosanoida, oksidoredukcije u prisustvu metala sa promenljivom valencom, lipidne peroksidacije nezasićenih masnih kiselina.

Na osnovu relativne stabilnosti, slobodni radikali se dele na *nepostojane* (*kratkoživeće*) i *postojane* (*dugoživeće*). Stabilnost slobodnih radikala predstavlja termodinamičku karakteristiku, koja zavisi od sposobnosti ostalog dela molekula da stabilizuje nespareni elektron, a rezonancija i sterna efekat su dva glavna faktora koji utiču na tu stabilnost. Delokalizacija nesparenog spina povećava stabilnost radikala i omogućava reagovanje preko više različitih položaja. Vreme života slobodnih radikala zavisi i od sternog zaklanjanja centra radikala, ili celine radikala, od strane velikih supstituisanih grupa koje se nalaze u okolini i ometaju reakcije radikal-radikal ili reakcije slobodnih radikala sa nekim supstratom. Ukoliko ne postoji mogućnost stabilizacije (npr. delokalizacija ili sterne smetnje), oni se brzo razlažu. Razlaganje se odvija najčešće putem:

- *Monomolekulske reakcije* (npr. fragmentacija ili premeštanje);
- *Bimolekulske reakcije između radikala* (npr. dimerizacija ili disproporcionisanje);
- *Bimolekulske reakcije između radikala i drugih molekula* (npr. adicija, supstitucija ili otpuštanje atoma, najčešće vodonikovog).

U biološkim sistemima najpoznatija slobodnoradikalska reakcija je lančana reakcija peroksidacije lipida:

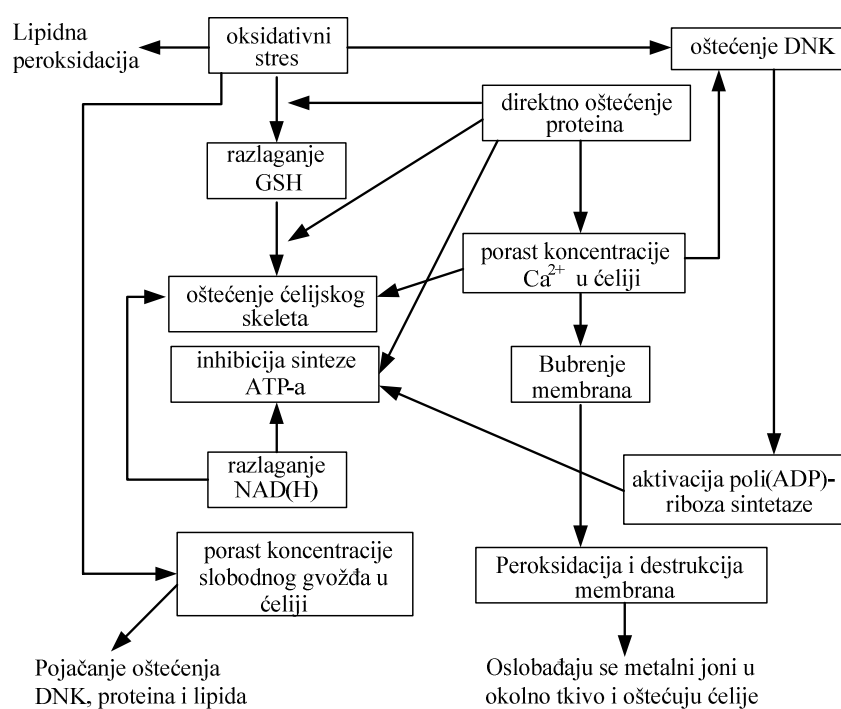


Nakon inicijacije, koju može izazvati „prooksidativna vrsta“, visoka temperatura, zračenje itd, odvija se destrukcija viših masnih kiselina. Ovaj proces može uticati ne samo

na fluidnost ćelijske membrane i odvijanje mnogih biohemijskih procesa, već se tokom ove reakcije stvaraju i citotoksična karbonilna jedinjenja kao proizvodi razlaganja. Biološki sistemi imaju mehanizme za sprečavanje oksidacije lipida. Na prvom mestu su antioksidativni sistemi, enzimi, proteini i drugi biomolekuli, koji inhibiraju fazu inicijacije, propagacije ili pak obnavljaju strukture oštećene dejstvom slobodnih radikala.

Ćelije aerobnih organizama su konstantno izložene dejstvu prooksidativnih vrsta. Kao posledica ovog dejstva, DNK, proteini i lipidi se konstantno razaraju (slika 1). Nekontrolisana produkcija prooksidativnih vrsta oštećuje većinu važnih biomolekula i dovodi do:

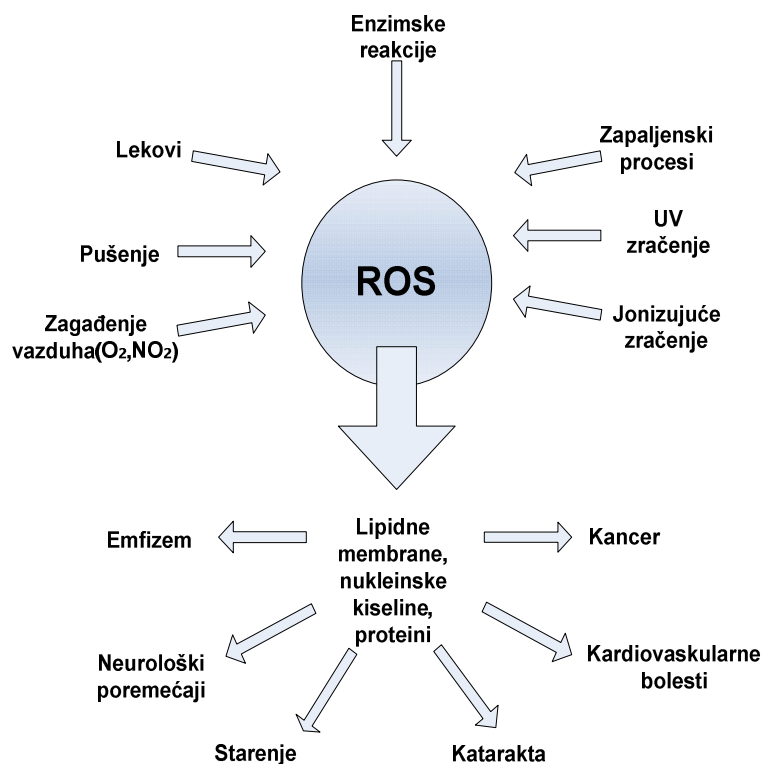
- *Oksidacije lipida* – lančana reakcija, koja dovodi do oštećenja ćelijske membrane menjanjem fluidnosti, permeabilnosti ili integriteta;
- *Oksidacije DNK* - oksidativnom degeneracijom DNK dolazi do prekida jednog ili oba lanca, unakrsnog povezivanja, modifikacije baza i promena u šećernoj i fosfornoj komponenti nukleotida, što ima za posledicu mutacije, starenje i smrt ćelije (Lewis i sar., 1995);
- *Oksidacije proteina* - u reakciji sa amino grupama bočnih lanaca aminokiselina, dolazi do promene naelektrisanja i osobina proteina, što dovodi do promena enzimske aktivnosti, fragmentacija i agregacija proteina;
- *Oksidacije ugljenih hidrata* - reakcija se odvija u prisustvu jona prelaznih metala, pri čemu nastaju vodonikperoksid i reaktivni dikarbonili.



Slika 1. Mehanizam oštećenja ćelije prooksidativnim vrstama

S obzirom da prooksidativne vrste nastaju kao sporedni proizvodi veoma važnih biokemijskih procesa, tokom evolucije razvijeni su zaštitni mehanizmi koji sprečavaju nastanak ili razlažu već nastale prooksidativne vrste, popravljaju i menjaju oštećene molekule. Aerobni organizmi, takođe, koriste mnoge prooksidativne vrste kao „mesindžere“ – signalne i odbrambene molekule.

Pod normalnim uslovima produkcija prooksidativnih vrsta, naročito ROS, je u ravnoteži sa antioksidativnom zaštitom organizma. Povećana produkcija prooksidanata i/ili smanjena antioksidativna zaštita organizma dovodi do oštećenja tkiva i oboljenja. Dakle, ukoliko postoji genetska predispozicija ili izlaganje spoljašnjim faktorima koji deluju stresno (dim cigarete, sunčeva svetlost, zagađenje itd.) ravnoteža prooksidanti/antioksidanti može biti narušena. Ovakvo stanje naziva se *oksidativni stres*, koji je uzrok ili prateći faktor u patologiji mnogih oboljenja (slika 2).



Slika 2. Reaktivne kiseonične vrste: nastanak i glavne posledice na ljudski organizam

I pored niza neželjenih efekata do kojih dovodi povećana produkcija ROS oni u pojedinim fiziološkim uslovima imaju značajnu ulogu - učestvuju u odbrani organizma od infekcija, ubijanjem ili inaktiviranjem mikroorganizama i neživih agresora. Određen fiziološki nivo ROS je od velikog značaja i za regulaciju drugih ćelijskih funkcija, poput intracelularne signalizacije, aktivacije transkripcije, ćelijske proliferacije i apoptoze (Herrera i sar., 2001). Kao korisni efekti kontrolisane proizvodnje ROS od strane ćelija može se

navesti i njihova uloga u biosintezi aktivnih molekula kao što su prostangladini (Halliwell, 1994).

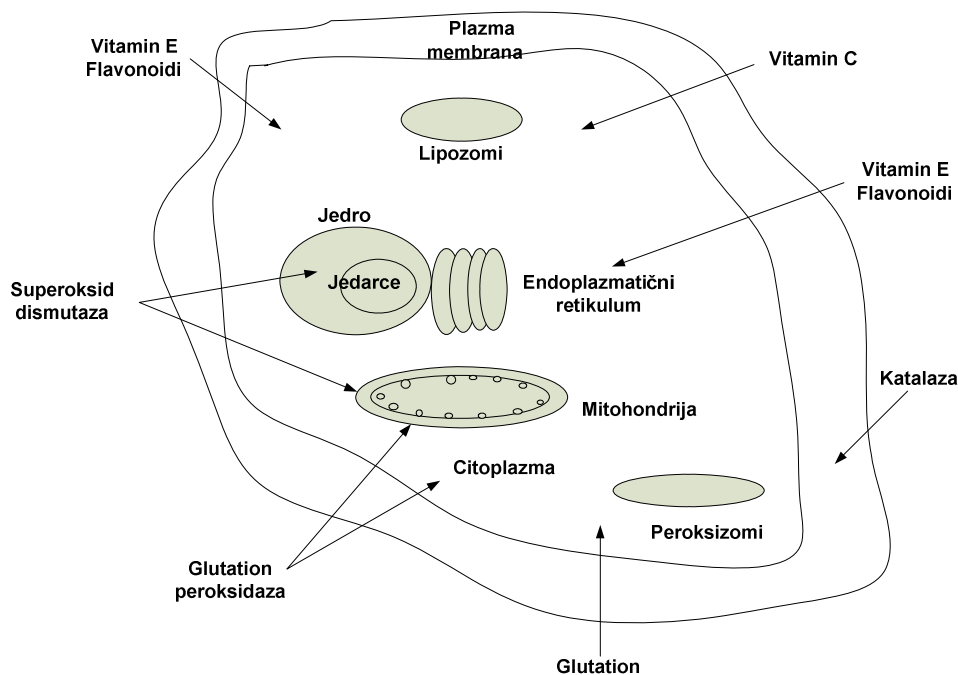
Lipidna peroksidacija je proces koji je odgovoran za kvarenje hrane. Tokom zagrevanja i skladištenja konstituenti hrane podležu hemijskim transformacijama od kojih su najvažnije reakcije oksidacije i dekompozicije proizvoda oksidacije. Posledice su smanjenje nutritivne vrednosti i promena senzornih karakteristika hrane. Tokom proizvodnje i manipulacije hranom, uključuju se novi procesi koji imaju za cilj sprečavanje ovih reakcija, npr. inaktivacija enzima koji izazivaju oksidaciju, smanjenje sadržaja kiseonika, upotreba određenih ambalažnih materijala i metoda pakovanja, sniženje temperature i mnoge druge. Metod sprečavanja oksidacije u hrani koji je od najvećeg interesa u naučnoistraživačkim studijama u poslednje vreme je upotreba *antioksidanata* kao inhibitora oksidacije.

Delovanje antioksidanata zasniva se na njihovoj sposobnosti da deluju kao hvatači slobodnih radikala, odaju elektrone, razgrađuju hidroperokside lipida nastale u fazi propagacije, eliminišu dejstvo singletnih oblika kiseonika, inhibiraju neke enzime (Cheesman i Slater, 1993). Singletni kiseonik može hemijski reagovati sa brojnim molekulima, ili im samo predati deo energije u procesu označenom kao kvenčing (quenching).

2.2. ANTIOKSIDATIVNA ZAŠTITA

2.2.1. *In vivo* antioksidanti

Prvi stepen ćelijskog odgovora na oksidativni stres je antioksidativna odbrana i aktiviranje sistema za reparaciju ćelijskih struktura oštećenih dejstvom slobodnih radikala. Iako živi organizmi podležu starenju izazvanom dejstvom prooksidanata, minimalna akumulacija oštećenih ćelijskih komponenata se postiže višestrukim dejstvom antioksidativnih jedinjenja i enzima koji repariraju ili uklanjaju oštećene komponente. Antioksidanti *in vivo* deluju tako što se sami oksiduju da bi zaštitili važne ćelijske komponente od oksidacije ili katalitički konvertuju prooksidante u manje reaktivna jedinjenja, a takođe i razlažu i uklanjaju oksidacione proizvode. Na slici 3 šematski je prikazana antioksidativna odbrana ćelijskog sistema.



Slika 3. Intracelularna organizacija antioksidativnog odbrambenog sistema

Antioksidanti koji se nalaze u *in vivo* sistemima se generalno mogu svrstati u tri grupe:

- *Enzimi;*
- *Metaloproteini;*
- *Niskomolekularni antioksidanti.*

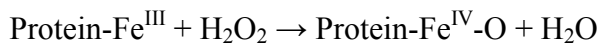
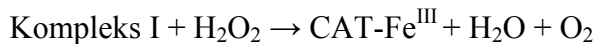
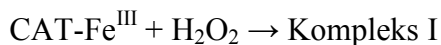
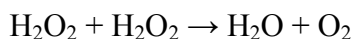
Najbolju i trenutno važeću definiciju antioksidanta dali su Halliwell i Gutteridge (1990) po kojoj je „antioksidant supstanca koja, prisutna u malim koncentracijama u odnosu na supstrat koji se oksidiše, značajno odlaže ili inhibira oksidaciju supstrata“. Međutim, ova definicija ima i niz nedostataka (Packer, 1994). Ova definicija je pogodna za molekule malih molekulskih masa, ali ne uzima u obzir dejstvo enzima i metaloproteina kao antioksidanata.

2.2.1.1. Enzimski antioksidanti

U toku evolucije kod živih organizama razvili su se mnogobrojni mehanizmi antioksidativne zaštite. Primarnu ulogu u tome imaju enzimi. Oni se mogu podeliti na:

- *Primarne* – reaguju direktno sa prooksidativnim vrstama (katalaza i superoksid dismutaza);
- *Sekundarne* – regenerišu molekule antioksidanata malih molekulskih masa (askorbat dehidrogenaza i glutation reduktaza).

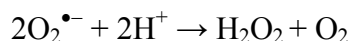
Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6) je veoma rekativan enzim koji je odgovoran za razlaganje vodonikperoksida. Mehanizam delovanja katalaze prikazan je reakcijama:



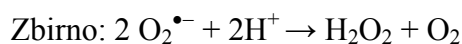
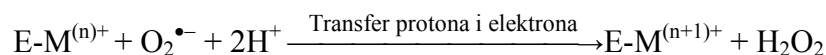
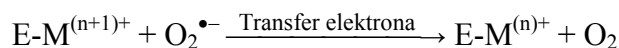
Kompleks I sadrži gvožđe u protein-Fe^{IV}-O formi.

Aktivnost katalaze je lokalizovana isključivo u peroksizomima. U peroksizomima nastaje vodonikperoksid, odigrava se njegov katabolizam pomoću CAT, kao i dismutacija superoksid anjon radikala (pomoću superoksid dismutaze - SOD, EC 1.15.1.1), i metabolizam lipida.

Superoksid dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1) je odgovorna za dismutaciju superoksid anjon radikala. Ona je jedini enzim koji reaguje direktno sa slobodnim radikalom. Dismutacija superoksid anjon radikala se odigrava i spontano na fiziološkom pH, ali je daleko sporija nego kada je enzimski katalizovana.



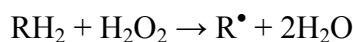
Mehanizam dismutacije superoksid anjon radikala uključuje promene oksidacionog stanja metala (M - bakar, gvožđe, mangan, cink) koji je vezan za enzim (E):



Proizvodi reakcija nekih SOD (CuZn-SOD i Fe-SOD) mogu, pod određenim uslovima, da inaktiviraju sam enzim i deluju prooksidativno, odnosno da značajno povećaju nivo hidroksil radikala. Promene u aktivnosti SOD mogu dovesti do oboljenja i čak ubrzanog starenja. Pored superoksid anjon radikala, nivo peroksinitrita i azot oksida takođe zavise od aktivnosti SOD.

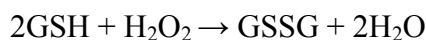
Vodonik peroksid se metaboliše i delovanjem peroksidaze: selen-nezavisna, selen-zavisna i fosfolipid hidroperoksid peroksidaza.

Peroksidaze (EC 1.11.1.x) katalizuju reakcije sledećeg tipa:



Selen-nezavisna glutathion peroksidaza katalizuje redukciju organskih hidroperoksida.

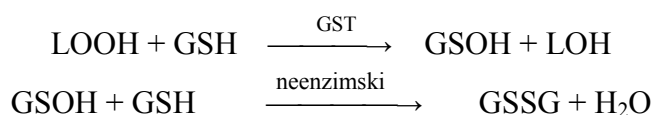
Selen-zavisna glutathion peroksidaza (GPx, EC 1.11.1.9.) sadrži selenocistein, katalizuje redukciju vodonik peroksida do vode, a organske hidroperoksidge (ROOH) redukuje do odgovarajućih alkohola (ROH). Kosupstrat za enzimsko delovanje je redukovani glutathion (GSH). U ovim reakcijama glutathion se oksiduje u dipeptid glutathiona (GSSG):



Glutathion peroksidaze spadaju među najvažnije antioksidativne enzime. Zahtevaju glutathion kao kofaktor i selen koji je vezan kovalentno za enzim i lociran u aktivnom centru. Neke nespecifične peroksidaze su pronađene u životnjskim organizmima, kao što su mijeloperoksidaze (proizvode hipohlornu kiselinu i imaju snažno baktericidno dejstvo), tiroid peroksidaza (odgovorna je za vezivanje joda za tirozinske ostatke na proteinu tiroglobulinu), laktoperoksidaze (prisutna u mleku i odgovorna je za oksidaciju tiocijanata u hipotocijanat koji je toksičan za neke patogene mikroorganizme i na taj način štiti bebe od infekcije gastrointestinalnog trakta). Pored ovih poznate su i citohrom c peroksidaza (EC 1.11.1.5) iz kvasaca, bakterijska NADH peroksidaza (EC 1.11.1.1), biljna nespecifična peroksidaza izolovana iz rena (HRP, EC 1.11.1.7), nespecifična hlorperoksidaza iz gljivica i biljna askorbat peroksidaza.

Fosfolipid-zavisna glutathion peroksidaza (PHGPx, EC 1.11.1.12) može, za razliku od GPx, da redukuje fosfolipidne hidroperoksidge, kao i holesterol hidroperoksidge u ćelijskoj membrani, bez prethodnog odvajanja oksidovanih masnih kiselina fosfolipazom. Za njenu aktivnost je važno da lipidne membrane sadrže optimalnu količinu vitamina E.

Glutathion-S-transferaza (GST, EC 2.5.1.18) ima slično dejstvo kao GPx, ali ne reaguje sa vodonikperoksidom. Ovaj enzim redukuje hidroperoksidge:



Glutathion S-transferaza je uključena u detoksifikaciju mnogih ksenobiotika, hepatičkih toksina, kancerogena, epoksida i drugih potencijalno toksičnih supstanci.

Hem oksigenaza (HO, EC 1.14.99.3). Hem ima nekoliko vrlo važnih uloga u organizmu, ali sa druge strane pod određenim uslovima (oštećenje tkiva, metabolizam hemoproteina i crvenih krvnih zrnaca - regeneraciju hemoproteina i crvenih krvnih zrnaca) mogu izazvati oksidaciju lipida ili reagovati sa vodonikperoksidom i osloboditi redoks-aktivno

gvožđe. Tokom Fentonove reakcije gvožđe sa vodonikperoksidom generiše hidroksil radikal. Hem oksigenaza sprečava ovo prooksidativno delovanje hema.

2.2.1.2. Metaloproteini

Gvožđe i bakar su esencijalni nutrijenti, ali su potencijalno veoma štetni. Njihova sposobnost promene oksidativnog stanja omogućava im da budu moćni katalizatori, npr. katalizuju konverziju H_2O_2 u $\cdot OH$, dekompoziciju lipidnih hidroperoksida u reaktivne peroksil i alkoksil radikale itd. Pored toga, metali mogu da izazovu oštećenja proteina i membrane kada su vezani na njihovoj površini. Ljudski organizam je tokom evolucije razvio antioksidativne sisteme odbrane za uklanjanje i vezivanje metala u forme koje im onemogućavaju katalitičko delovanje (Halliwell and Gutteridge, 1989).

Prelazni metali pod određenim uslovima, mogu biti „prooksidativne vrste“ i izazvati prooksidativan efekat, na primer inicirati oksidaciju lipida ili produkciju hidroksil radikala putem Fentonove reakcije itd. Od svih metala prisutnih *in vivo*, gvožđe i bakar su najzastupljeniji i najproblematičniji. Jedan od načina sprečavanja prooksidativnog dejstva gvožđa i bakra je njihova eliminacija iz biološkog sistema. Obzirom da su ovi metali esencijalni mikronutrijenti i da ulaze u sastav nekih enzima, elektrontransportnog lanca i igraju značajnu ulogu u izgradnji imuniteta, fiziološki je neprihvatljivo uklanjanje gvožđa i bakra iz organizma (Harris i Gitlin, 1996). Metali se stoga vezuju u redoks-neaktivne komplekse. Oni se nalaze u veoma malim količinama u slobodnom stanju, uglavnom su vezani za proteine i neproteinske helirajuće agense (tabela 2).

Tabela 2. Heliranje bakra i gvožđa

METAL	PROTEIN	PROCESI U KOJIMA METALOPROTEINI UČESTVUJU
Gvožđe	Transferin (laktoferin, melano-transferin, ovotransferin, plazmatransferin, uteroferin)	Transport Fe^{3+} jona u ćeliju do feritina ili mitohondrijalne ferohelataze za biosintezu hema.
Gvožđe	Feritin	Skladištenje Fe^{3+} jona.
Gvožđe	Neuromelanin	Skladištenje Fe^{3+} jona.
Gvožđe	Hemosiderin	Rezervni sistem za skladištenje Fe^{3+} jona u slučaju prekomerne produkcije gvožđa.
Bakar	Ceruloplazmin	Transport bakra u ćeliju za ugradnju u enzime (SOD, citohrom oksidaza), transport gvožđa do transferina, antioksidativna aktivnost, regulacija plazma biogenih amina, uloga u procesu inflamacije, promotor rasta nekih ćelija, feroksidaza aktivnost.
Bakar	Albumin	Transport jona bakra.
Bakar	Transkuprein	Transport jona bakra.
Bakar	Metalotionein	Skladištenje jona bakra.
Bakar	Kompleksi aminokiselina	Transport/skladištenje jona bakra.

2.2.1.3. Niskomolekularni antioksidanti

U ovu grupu antioksidanata ubrajaju se neki vitamini, tioli, mokraćna kiselina, hinoni i hidrohinoni, žučni pigmenti, biogeni amini, estrogen, derivati histidina, melanini, α -lipoična, dihidrolipoična kiselina i njihovi analozi, α -ketokiseline, indoli i jedinjenja slična indolu i melatonin.

Tioli

Glutation je tripeptid (γ -glutamil-cisteinil-glicin - GSH) koji se sintetise u jetri ili unosi putem ishrane (Anderson, 1998). GSH se lako oksiduje u disulfid, GSSG. GSH je jedan od najjačih redukcionih sredstava među egzogenim niskomolekularnim antioksidantima. GSH je neophodan peroksidazama u razgradnji peroksida. Nivo GSH/GSSG odnosa u ćeliji se održava na visokom nivou da bi se favorizovale reakcije redukcije. U uslovima oksidativnog stresa, jetra i srce mogu aktivno da izbace GSSG izvan ćelije, sprečavajući njegovo štetno dejstvo. U mitohondrijama odnos GSH/GSSG je takođe visok, u cilju održavanja aktivnosti transportnih proteina i enzima. GSH reaguje sa nizom slobodnih radikala, prelazeći u tiil radikale koji imaju dalju mogućnost metabolisanja. GSH igra značajnu ulogu i u procesu regeneracije drugih antioksidanata (askorbinske kiseline, tokoferola itd).

GSH ima sposobnost detoksifikacije organizma od egzogenih štetnih materija i ksenobiotika.

Homocistein je ključni metabolit u biohemiji sumpora i aminokiselina. Deluje kao antioksidant zbog mogućnosti oksidacije u disulfid (Baker i sar., 1996), ali i kao prooksidant koji indukuje lipidnu peroksidaciju i oštećenje proteina (Halvorsen i sar., 1996) i kao neurotoksin (Kim i Pae, 1996).

Druga jedinjenja koja sadrže sumpor, a poseduju antioksidativnu aktivnost su: koenzim A, cisteamin, cisteinska kiselina, hipotaurin, S-adenozil-L-metionin i pantotenska kiselina (Aruoma i sar., 1988).

Mokraćna kiselina je tokom evolucije zamenila askorbinsku kiselinu kao glavnog antioksidanta u metabolizmu ljudskog organizma. Mokraćna kiselina doprinosi 60% totalnog antioksidativnog kapaciteta plazme zdravih ljudi. Ona reaguje sa singletnim kiseonikom, azot-dioksidom, alkilperoksil radikalima, peroksinitritom i hidroksil radikalima. Mokraćna kiselina ima sposobnost heliranja gvožđa i bakra. Interesantno je da mokraćna kiselina ne reaguje sa superoksid anjon radikalom i ima ograničeno zaštitno dejstvo od toksičnog uticaja hipohlorne kiseline. Proizvodi razlaganja mokraćne kiseline su potencijalno toksični i mogu se koristiti kao markeri oksidativnog stresa. Benzie i Strain (1996) su utvrdili sinergističko delovanje askorbinske kiseline i mokraćne kiseline, tako što askorbinska kiselina regeneriše uril radikal nastao tokom oksidacionih procesa.

Hinoni i hidrohinoni

Koenzim Q (ubihinon, ubihinol) se sintetiše u svim životinjskim ćelijama. Egzistira u tri biološki relevantne forme: potpuno oksidovani hinon, delimično redukovani semihinon radikal (semiubihinon) i potpuno redukovani ubihinol. Služi kao nosač elektrona i protona u respiratornom lancu u mitohondrijama, ali i izvan njih. Pod određenim uslovima može pokazati i prooksidativno delovanje. Ubihinol direktno sprečava fazu inicijacije (redukcijom perferil radikala) i propagacije (redukcijom lipidnog peroksil radikala) reakcije peroksidacije lipida (Beyer, 1990). Takođe, ubihinol ima sposobnost regeneracije radikala α -tokoferola koji nastaje inhibiranjem faze propagacije tokom reakcije lipidne peroksidacije.

Plastohinon je strukturno sličan ubihinonu i takođe učestvuje u redoks reakcijama. Nalazi se u hloroplastu viših biljaka i drugih organizama koji vrše fotosintezu gde ima ulogu elektron akceptora. Redoks reakcije mogu biti jedno- (nastaje semiplastohinon) ili dvoelektronske (nastaje plastohinon). U ovim reakcijama mogu nastati reaktivne kiseonične vrste (ROS) i izazvati oksidativni stres kod biljaka.

Vitamin K se sastoji iz dve grupe naftohinona: filohinona (vitamin K₁) i menahinona (vitamin K₂) i razlikuju se u dužini fitilnog ostatka. Vitamin K je esencijalni nutrijent za sisare. Pored značajnih bioloških funkcija (npr. aktivacija protrombina), filohinon i menahinon, u svojim redukovanim formama, deluju kao inhibitori lipidne peroksidacije (Fiorentini, 1997).

Pirolohinolin hinon (PQQ) je veoma zastupljen redoks-aktivan kofaktor i esencijalni nutrijent. PQQ je kofaktor velikom broju enzima (dehidrogenaze, oksidaze itd.) i učestvuje u velikom broju reakcija (hidroksilovanja, transaminacije, dekarboksilacije i hidriranja). Pored toga, PQQ katalizuje interkonverziju dioksigen-superoksida i učestvuje i u produkciji (tokom ćelijskog disanja) i u hvatanju (kao antioksidant) superoksid anjon radikala. Kao antioksidant PQQ ima sposobnost hvatanja ROS, konverzije ksantin oksidaze u ksantin dehidrogenazu, čuva GSH, štiti neurone od neurotoksičnog dejstva NMDA, i generalno organizam od oksidativnog stresa (Gallop i sar., 1993). Pod određenim uslovima može imati prooksidativno dejstvo - tokom autooksidacije katalizovane prisustvom metala proizvodi vodonikperoksid (He i sar., 2003).

Žučni pigmenti - biliverdin i bilirubin se proizvode tokom metabolizma hema. Bilirubin bitno doprinosi ukupnom antioksidativnom kapacitetu plazme novorođenčadi i ima sposobnost hvatanja superoksid anjon i peroksid radikala, RNS, sprečava LDL lipidnu peroksidaciju, štiti neurone od oksidativnog stresa (Nakagami i sar., 1993). Konjugovani bilirubin i biliverdin imaju antioksidativno delovanje i na hipohlornu kiselinu.

Biogeni amini (npr. kateholamini i serotonin) imaju sposobnost hvatanja ROS i sprečavanja peroksidacije lipida *in vitro* (Huether, 1997). Međutim, monoamini mogu imati i štetno dejstvo, grade veoma reaktivne aldehide (npr. dopamin gradi dopaldehyd) koji daju šifove baze sa aminima, enzimskom autooksidacijom grade reaktivne hinone, semihinone, ROS, citotoksične aminochrome, neuromelanin (Bindoli i sar., 1989), reaguju sa nukleofilima (npr. cisteinom) gradeći toksične adukte koji doprinose neurodegenerativnim promenama.

Estrogeni imaju antioksidativnu aktivnost, nezavisno od njihove sposobnosti vezivanja za estrogenske receptore, zahvaljujući njihovoj sposobnosti sprečavanja lipidne peroksidacije, hvatanja ROS i heliranja gvožđa (Goodman i sar., 1998). Estrogeni se hidroksiluju NADPH zavisnim citohromom P450, dajući kateholestrogene koji su prooksidanti i potencijalni endogeni inicijatori tumora (Cavalieri i sar., 2002). Reverzibilnim redoks reakcijama nastaju hinoni, semihinoni i ROS, DNK adukti.

Derivati histidina - anserin, karnozin i homokarnozin su hvatači radikala, helirajući agensi, stabilizatori membrana, imunomodulatori, neuroprotektori (Klebanov i sar., 1998).

Indoli i jedinjenja slična indolu (triptofan i njegovi metaboliti, serotonin, melatonin i indol-3-propionska kiselina) su efektivni hvatači ROS i inhibitori lipidne peroksidacije (Bendheim i sar., 2002). Katabolizam triptofana može dovesti do stvaranja jedinjenja sa antioksidativnim, prooksidativnim i neurotoksičnim dejstvom.

α -Ketokiseline (piruvat, oksaloacetat, α -ketoglutarat itd.) učestvuju u intermedijarnom metabolizmu. Antioksidativno delovanje se zasniva na uklanjanju vodonikperoksida, pa su α -ketokiseline uvek povezane sa procesima u kojima nastaje vodonikperoksid (Maz-zio i Soliman, 2003).

α -Lipoična kiselina je lipofilna supstanca prisutna u organizmu, ali se i konzumira kao dodatak ishrani. Nije esencijalni nutrijent i sintetišu je i životinje i ljudi. Nakon konzumiranja redukuje se do dihidrolipoične kiseline koja prolazi kroz lipidni dvosloj. Redoks sistem lipoična kiselina/dihidrolipoična kiselina deluje kao antioksidativni sistem kroz redukciju GSSG, dehidroaskorbinske kiseline, tokoferoksil radikala, ubihinona, „hvatanjem“ ROS, RNS, heliranjem jona prelaznih metala, ali i kao regulator ćelijskih funkcija (Packer i sar., 1995). Unos α -lipoične kiseline kao dodatak ishrani se preporučuje kod mnogih patoloških stanja (AIDS, dijabetes, trovanje teškim metalima, bolesti jetre, prekomerno izlaganje štetnom zračenju, posledice pušenja itd.).

Melanini su pigmenti koji se nalaze u melanocitima. Imaju antioksidativno delovanje slično SOD, inhibiraju lipidnu peroksidaciju i vezuju redoks-aktivne metale (Bilgihan i sar., 1995). Oni štite kožu od velike količine slobodnih radikala kojima je ona izložena tokom sunčanja. Kada se zasiti vezanim gvožđem, melanin postaje prooksidativna i citotoksična supstanca.

Melatonin je neurohormon koji se nalazi i u organizmu i u dodacima ishrani. Fiziološka funkcija melatonina je regulacija sna i polne zrelosti (Dawson i Encel, 1993). Antioksidativna aktivnost melatonina je pripisana njegovoj sposobnosti otpuštanja elektrona i prelaska u energetski stabilniji oblik melatonin radikal.

2.2.2. Fitohemikalije

Lekovita svojstva biljaka poznata su od najranijih vremena ljudske civilizacije. Od tada pa sve do današnjih dana biljke su se upotrebljavale kao hrana, lekovi, konzervansi, u religiozne svrhe, za ukras, itd. Sve do razvoja hemije, a naročito sinteze organskih molekula

la u XIX veku, izvor farmakološki aktivnih supstanci bile su isključivo biljke (Kujundžić, 2002). Veliki broj eksperimenata, radova i studija ističe pozitivnu ulogu voća, povrća, žitarica i drugih jestivih biljaka, u preventivi i lečenju mnogih oboljenja kod čoveka (Moyer i sar., 2002). Takođe, rezultati dobijeni u poslednjih nekoliko godina ukazuju na visok sadržaj prirodnih antioksidanata u biljkama (Keli i sar., 1996; Croft, 1999; Lea i Leegod, 1999).

Fitohemikalije su sekundarni metaboliti biljaka koji imaju potencijalan pozitivan efekat na zdravlje, a nisu esencijalni nutrijenti (Micronutrient Information Center, Linus Pauling Institute). Fitohemikalije sa najizraženijim antioksidativnim delovanjem su polifenolna jedinjenja, askorbinska kiselina, tokoferoli i karotenoidi.

2.2.2.1. Polifenolna jedinjenja

Pored mnoštva fitonutrijenata, biljke sadrže i polifenolna jedinjenja - veliku i heterogenu grupu biološki aktivnih nenutrijenata. Veliki broj fitohemikalija ima antioksidativno delovanje, ali su polifenolna jedinjenja privukla najveću pažnju istraživača. Polifenolna jedinjenja su sekundarni metaboliti biljaka različitih strukturnih karakteristika, sa fenolnim jezgrom kao osnovnim konstituentom.

Fenolne kiseline i flavonoidi su od svih polifenola najčešće predmet naučnih istraživanja. U flavonoide se ubrajaju: flavoni, izoflavoni, flavanoni, flavonoli, flavanoli, flavani, katehini, antocijanidini, leukoantocijanidin, halkoni, dihidrohalkoni i auron. Fenolne kiseline koje su zastupljene u biljnom svetu su hidroksi derivati benzoeve i cimetine kiseline.

Polifenolna jedinjenja su veoma značajna kako za organoleptičke osobine hrane tako i za njene pozitivne zdravstvene efekte.

Najvažnija dejstva fitohemikalija su (Lampe, 1999):

- *Antioksidativna aktivnost;*
- *Modulacija enzima koji učestvuju u detoksifikaciji;*
- *Sprečavanje agregacije trombocita;*
- *Promene u metabolizmu holesterola;*
- *Kontrola koncentracije steroidnih hormona i endokrinog metabolizma;*
- *Redukcija krvnog pritiska;*
- *Antibakterijsko i antivirusno dejstvo.*

U literaturi se najčešće kao prirodni izvori polifenolnih jedinjenja spominju začinsko i lekovito bilje. Međutim, polifenolna jedinjenja su zastupljena i u drugim prirodnim izvorima kao što su mahune, koštičavo voće, seme uljarica, žitarice, životinjski i mikrobiološki proizvodi. Najvažniji izvori polifenolnih jedinjenja su prikazani u tabeli 3 (Naczki i Shahidi, 2006).

Tabela 3. Izvori polifenolnih jedinjenja

POLIFENOLNA JEDINJENJA	IZVOR
Fenolne kiseline	
Hidroksicimetne kiseline	Breskva, američka borovnica, šargarepa, žitarice, kruška, trešnja, citrus voće, seme uljarica, kajsija, šljiva, spanać, paradajz, patlidžan
Hidroksibenzojeve kiseline	Američka borovnica, žitarice, brusnica, seme uljarica
Flavonoidi	
Antocijani	Borovnica, crna i crvena ribizla, američka borovnica, trešnja, sremza, grožđe, jagoda
Halkoni	Jabuka
Flavanoli	Jabuka, američka borovnica, grožđe, luk, zelena salata
Flavanonoli	Grožđe
Flavanoni	Citrus voće
Flavonoli	Jabuka, pasulj, američka borovnica, heljda, brusnica, endivija, praziluk, zelena salata, luk, maslina, paprika, paradajz
Flavoni	Citrus voće, celer, peršun, spanać
Izoflavoni	Soja
Ksantoni	Mango
Tanini	
Kondenzovani	Jabuka, grožđe, breskva, šljiva, kruška
Hidrolizovani	Nar, malina
Ostala polifenolna jedinjenja	
Alk(en)ilrezorcinoli	Cerealije
Arbutin	Kruška
Avenantramidi	Ovas
Kapsaicinoidi	Paprika
Kumarini	Šargarepa, celer, citrus voće, peršun, paškanat
Lignani	Heljda, seme lana, seme susama, raž, žito
Sekoiridoidi	Maslina
Stilbeni	Grožđe

Strukture polifenolnih jedinjenja mogu biti različite, od najprostijih koje sadrže hidrosilovani aromatični prsten do kompleksnih polimernih struktura (Strube i sar., 1993;

Harborne, 1994). Prirodna aromatična jedinjenja nastaju tokom dva biosintetička puta: a) putem biosinteze aromatičnih aminokiselina preko šikimske kiseline kao intermedijera i b) putem biosinteze benzenovog prstena iz acetata (acetogeninski put). Davis (1955) je pokazao da aromatične komponente nastaju iz ugljenih hidrata, sa šikimskom kiselinom kao intermedijerom. Putem biosinteze šikimske kiseline nastaju derivati benzoeve kiseline (galna i protokatehinska kiselina), a iz aromatičnih aminokiselina nastaju derivati cimetne kiseline. Dalje, iz derivata cimetnih kiselina ciklizacijom nastaju kumarini, a najverovatnije β -oksidacijom odgovarajućeg derivata benzoeve kiseline. Na kraju, i B prsten kod flavonoida se formira ovim putem, sa hidroksicimetnim kiselinama kao intermedijerima.

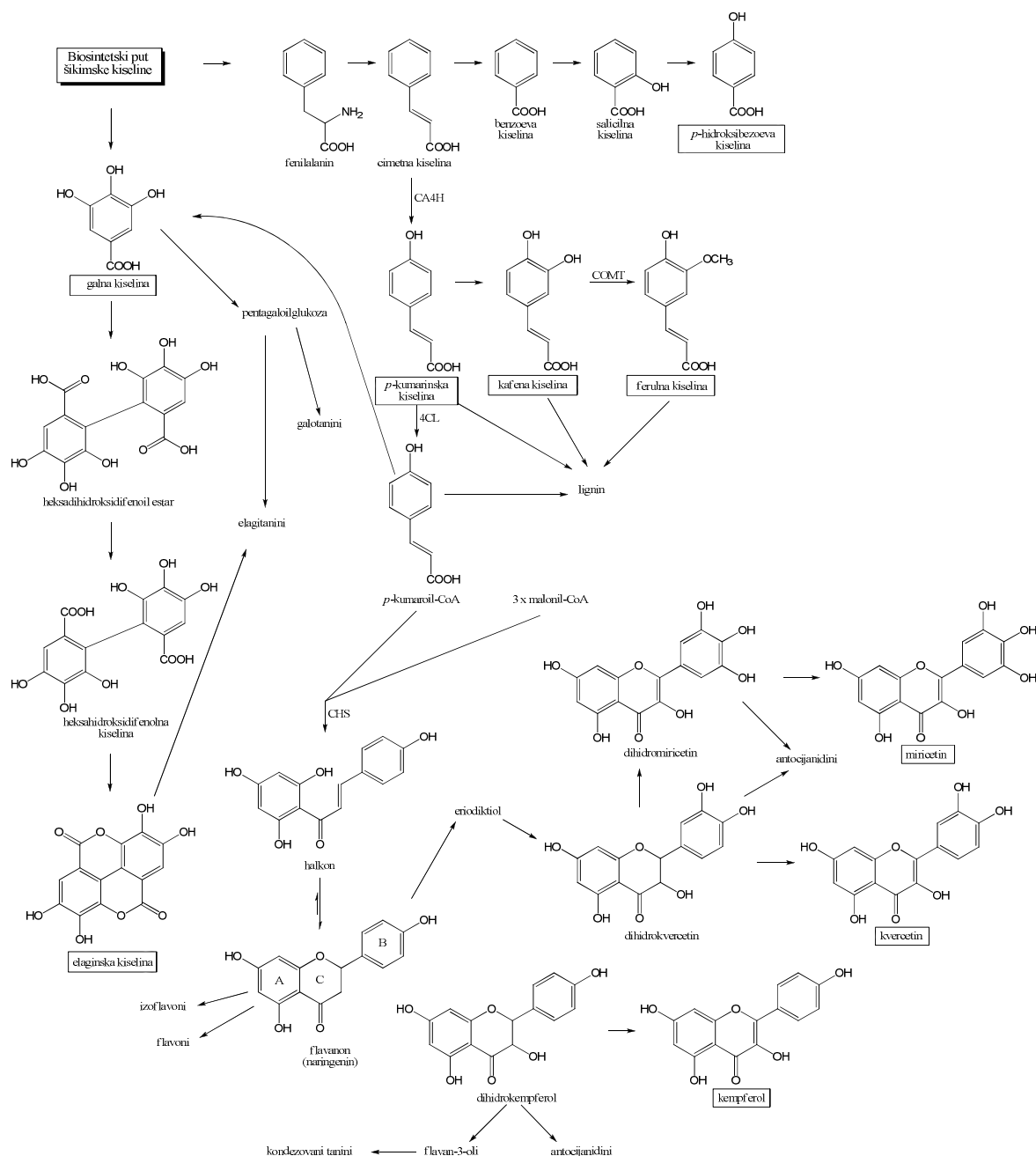
Birch i Donovan (1953) su predložili drugi, alternativni put biosinteze aromatičnog jezgra iz acetatnih jedinica – acetogeninski put. Ovim biosintetskim putem aromatični prsten nastaje kondenzacijom sirćetne kiseline u linearni niz sastavljen od naizmeničnih ketonskih i metilenskih grupa koje dalje podležu ciklizaciji po mehanizmu aldolne ili Claisen-ove kondenzacije. Prsten A flavonoida potiče od poliacetilnog niza, a prsten B iz ugljenih hidrata preko šikimske kiseline. Na slici 4 prikazani su biosintetički putevi nekih flavonoida i fenolnih kiselina.

Biosinteza i akumulacija polifenolnih jedinjenja se kontroliše, endogeno, tokom rasta (Macheix i sar., 1990; Strack, 1997) ili se reguliše egzogenim faktorima kao što su svetlost, temperatura, oštećenja i drugi stresni faktori (Dixon i Paiva, 1995). Fenilalanin, koji nastaje biosintetskim putem šikimske kiseline, je prekursor većine polifenolnih jedinjenja u biljkama. Hidroksicimetne kiseline, naročito njihovi estri sa koenzimom A, su najčešće strukturni elementi polifenolnih jedinjenja, kao što su estri i amidi cimetne kiseline, lignini, flavonoidi i kondenzovani tanini (Macheix i sar., 1990).

Polifenolna jedinjenja se akumuliraju uglavnom u ćelijskim zidovima (Guern i sar., 1987; Monties, 1989) i to najvećim delom na površini ploda (epidermalni i subepidermalni slojevi), jer biosinteza ovih jedinjenja zavisi od svetlosti (Wollenweber, 1994; Macheix i sar., 1990). Akumulacija polifenolnih jedinjenja varira i u zavisnosti od fiziološkog stanja biljke, kao rezultat ravnoteže između biosinteze i daljeg metabolizma (Macheix i sar., 1990; Harborne, 1994). Brojna istraživanja potvrđuju da je koncentracija polifenolnih jedinjenja manja u zrelom plodu, osim kod crvenih plodova kod kojih se flavonoidi i antocijani akumuliraju na kraju sazrevanja (Britton, 1983; Macheix i sar., 1990).

Polifenolna jedinjenja su od velike važnosti za biljke jer grade integralni deo strukture ćelijskog zida, uglavnom kao polimeri (lignini). Ove strukture služe kao mehanička

barijera u odbrani od mikroorganizama. Lignini su, posle celuloze, najzastupljenije organske strukture na zemlji (Wallace i Fry, 1994; Strack, 1997).



Slika 4. Biosintetski putevi nekih polifenolnih jedinjenja

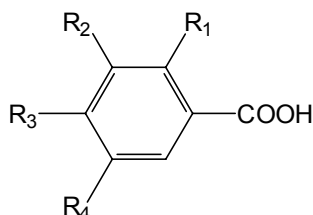
Enzimi: PAL – Fenilalanin amonijum liaza; CA4-H – 4-hidroksilaza cimetne kiseline; 4CL – hidroksicinat koenzim A ligaza; CHS – halkonsintetaza; COMT – metiltransferaza kumarinske kiseline

Najvažnija uloga flavonoida, naročito antocijana, u kombinaciji sa flavonima i flavonolima kao kopigmentima, je u formiranju boje voća i cveća (Harborne, 1994; Strack, 1997). Boja cvetova i plodova je veoma bitna za privlačenje insekata i ptica u cilju oprašivanja i raznošenja semena. Pored dobro poznatih isparljivih terpena, polifenolna jedinjenja

rastvorna u vodi, kao što su derivati benzojeve i cimetine kiseline, mogu poslužiti kao alelo-patske supstance. Polifenolna jedinjenja mogu biti i signalni molekuli u interakcijama biljke i bakterija koje fiksiraju azot kod mahunarki (Strack, 1997). Značajna uloga flavonoida i fenolnih kiselina je njihovo učešće u odbrambenom mehanizmu biljke. Dokazano je da se u uslovima stresa (prekomerno UV zračenje, oštećenje tkiva, infekcija) u biljkama indukuje sinteza polifenolnih jedinjenja (Britton, 1983; Dixon i Paiva, 1995). Polifenolna jedinjenja se mogu akumulirati pre i posle napada mikroorganizama. Pre infekcije su u formi toksina, dok su postinfekcijska polifenolna jedinjenja u formi tzv. fitoaleksina. Među polifenolnim toksinima i fitoaleksinima najvažnije su hidroksikumarini, derivati hidroksicimetine kiseline i flavonoli (Strack, 1997).

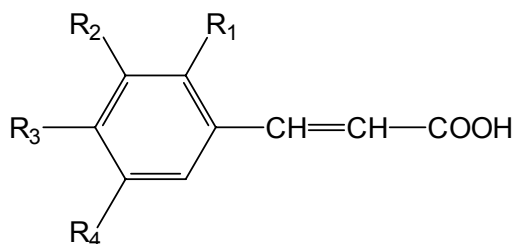
Fenolne kiseline se sastoje od fenolnog jezgra i bočnog niza koji sadrži jedan (derivati benzojeve kiseline) ili tri (derivati cimetine kiseline) ugljenikova atoma. Fenolne kiseline obuhvataju hidroksi i druge funkcionalne derivate benzojeve i cimetine kiseline.

Derivati hidroksibenzojeve kiseline imaju C₆-C₁ strukturu:



Varijacije u strukturi derivata hidroksibenzojeve kiseline nastaju hidroksilovanjem ili metilovanjem aromatičnog jezgra. U biljnom svetu se najčešće javljaju *p*-hidroksibenzojeva (R₁=R₂=R₄=H; R₃=OH), vanilinska (R₁=R₄=H; R₂=OCH₃; R₃=OH), siringinska (R₁=H; R₂=R₄=OCH₃; R₃=OH) i protokatehinska kiselina (R₁=R₄=H, R₂=R₃=OH). One mogu biti prisutne u rastvornoj formi konjugovane šećerima ili organskim kiselinama, ili vezane za ćelijski zid, npr. u ligninima. Galna kiselina učestvuje u stvaranju hirolizujućih galotanina, a njenom kondenzacijom nastaje dimer - elaginska kiselina. Elaginska kiselina takođe ulazi u sastav elagitanina.

Derivati hidroksicimetine kiseline imaju C₆-C₃ strukturu:



Najzastupljeniji derivati hidroksicimetne kiseline su *p*-kumarinska ($R_1=R_2=R_4=H$; $R_3=OH$), kafena ($R_1=R_4=H$; $R_2=R_3=OH$), ferulna ($R_1=R_4=H$; $R_2=OCH_3$; $R_3=OH$) i sinapinska kiselina ($R_1=H$; $R_2=R_4=OCH_3$; $R_3=OH$). Derivati hidroksicimetne kiseline su prisutni u različitim konjugovanim formama. Konjugovane forme su estri hidroksikiselina kao što su hinska kiselina, šikimska kiselina i vinska kiselina, kao i njihovi glikozidi. Slobodne forme ukazuju na enzimsku hidrolizu u biljnom tkivu tokom ekstrakcije (Macheix i sar., 1990; Shahidi i Naczk, 1995).

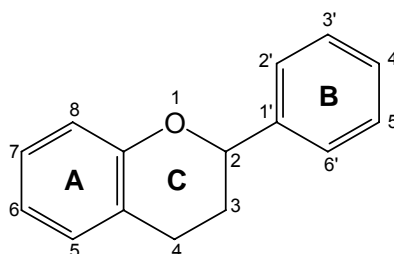
Sintetički antioksidanti koji se upotrebljavaju u prehrambenoj industriji su po strukturnim karakteristikama takođe fenolna jedinjenja: BHA – butilovani hidroksianizol, BHT – butilovani hidroksitoluen, TBHQ – 2-*terc*-butilhidroksihinon i PG – propilgalat. Njihova antioksidativna aktivnost je u tesnoj vezi sa strukturom, naročito sa njihovom sposobnošću otpuštanja vodonikovog atoma i stabilizacije proizvoda delokalizacijom elektrona u aromatičnom jezgru. Monofenoli i fenolne kiseline učestvuju u reakciji otpuštanja vodonikovog atoma i reakcijama „hvatanja“ slobodnih radikala. Cuvelier i sar. (1992) potvrdili su da su polifenoli efikasniji antioksidanti od monofenola, kao i da uvođenje druge hidroksilne grupe u *orto* i *para* položaj značajno povećava ovu aktivnost. Tako je antioksidativna aktivnost *orto*-difenolnih kiselina, protokatehinske i kafene, veća od odgovarajućih monofenolnih kiselina iste strukture, *p*-hidroksibenzoeve i *p*-kumarinske kiseline. Galna kiselina sa tri hidroksilne grupe je efikasniji antioksidant od protokatehinske kiseline. Ipak, Pokorny i sar. (1987) su saopštili da prisustvo više od tri hidroksilne grupe na aromatičnom jezgru ne poboljšava antioksidativnu efikasnost molekula. Rezultati Cuvelier i sar. (1992) su pokazali i da prisustvo jedne ili dve metoksi grupe u *orto* položaju povećava antioksidativnu aktivnost monofenola: sinapinska kiselina je aktivnija od ferulne kiseline, a ferulna je aktivnija od *p*-kumarinske kiseline; siringinska kiselina je efikasnija od vanilinske i *p*-hidroksibenzoeve kiseline. Više autora (Cort, 1974; Chimi i sar., 1988; Pokorny, 1987) je zaključilo da prisustvo elektrondonorne (hidroksi ili metoksi) grupe u *orto* položaju značajno doprinosi stabilnosti nastalih aroksil radikala. Ferulna i vanilinska kiselina su pokazale značajno slabije antioksidativno delovanje od kafene i protokatehinske kiseline. Pratt i Birac (1979) su zaključili da metoksi grupa u *orto* položaju kod ferulne kiseline stabilizuje fenoksil radikal koji nastaje u reakciji sa slobodnim radikalima, i na taj način povećava njen antioksidativni potencijal u odnosu na *p*-kumarinsku kiselinu.

Derivati hidroksicimetne kiseline su generalno bolji antioksidanti od derivata hidroksibenzoeve kiseline zbog prisustva $CH=CH-COOH$ grupe, odnosno dvostruke veze koja učestvuje u stabilizaciji nastalog aroksil radikala rezonancijom. Slična antioksidativna ak-

tivnost galne kiseline i propilgalata ukazuje na slab uticaj esterifikacije na antioksidativnu aktivnost fenolnih kiselina. Pratt i Birac (1979) su saopštili da je aktivnost kafene kiseline veća od ferulne i *p*-kumarinske kiseline zbog prisustva druge hidroksilne grupe i stvaranja intramolekularnih vodoničnih veza. Proton iz karboksilne grupe ima mali uticaj na antioksidativnu aktivnost. Tako su aktivnosti hlorogenske kiseline i kafene kiseline tokom inhibicije lipidne peroksidacije slične. Proton karboksilne grupe kafene kiseline supstituisan je hinskom kiselinom u molekulu hlorogenske kiseline. Alilna grupa, koja je prisutna kod derivata cimetine kiseline, povećava antioksidativni potencijal u odnosu na derivate benzojeve kiseline. Pratt i Hudson (1990) su saopštili da je zaštitni efekat kafene kiseline (3,4-dihidroksicimetna kiselina) tokom oksidacije masti veći od protokatehinske kiseline (3,4-dihidroksibenzoeva kiselina). Prihvatljivo je objašnjenje da rezonancija alilnog ostatka povećava stabilnost fenoksil radikala.

Flavonoidi

Termin „flavonoid“ predložili su Geisman i Hinseinner 1952. godine za determinaciju svih biljnih pigmenata, koji imaju C₆-C₃-C₆ skelet, u kojima su dva benzenova prstena povezana preko C-3 jedinice (Janićijević i sar., 2008):



To su u vodi rastvorni žuti, crveni ili ljubičasti pigmenti rasprostranjeni u svim biljnim organima. Iz biljaka je izolovano i proučeno preko 3000 flavonoida koji su, s obzirom na stepen oksidacije centralnog piranskog prstena, podeljeni u dvanaest klasa: *flavoni*, *izoflavoni*, *flavanoni*, *flavonoli*, *flavanoli*, *flavani*, *katehini*, *antocijanidini*, *leukoantocijanidin*, *halkoni*, *dihidrohalkoni* i *auroni*.

Raznovrsnost i veliki broj struktura flavonoida rezultat su brojnih modifikacija njihovih osnovnih struktura kao što su: dodatne hidroksilacije, O-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezivanje neorganskog sulfata i najvažnije glikolizacija hidroksilnih grupa (nastajanje O-glikozida) ili flavonoidnog jezgra (nastajanje C-glikozida).

Flavonoidi su rasprostranjeni u svim zelenim biljkama, a nađeni su i u nižim organizmima. Najrasprostranjeniji su flavonoli, koji imaju oko 200 - 300 poznatih aglikona, i

flavoni. Najzastupljeniji flavonoli su kvercetin, kampferol i miricetin, a od flavona najpoznatiji su luteolin i apigenin. Halkoni, auron, flavanoni, dihidrohalkoni i izoflavoni se pojavljuju mestimično i u manjem broju biljnih vrsta. Flavanoni i izoflavoni su bezbojni, dok halkoni i auron predstavljaju žute cvetne pigmente.

Pozitivni efekti flavonoida na zdravlje (tabela 4) doprineli su naglom porastu upotrebe biljnih flavonoida kao konstituenata funkcionalne hrane. Međutim, povećan i nekontrolisan unos flavonoida može da ima prooksidativnu aktivnost, prouzrokuje mutagene procese i inhibira ključne enzime u metabolizmu hormona (Skibola i Smith, 2000).

Tabela 4. Pozitivan uticaj flavonoida na zdravlje

EFEKAT	ISPITANI FLAVONOIDI	LITERATURNI PODACI
Pozitivan uticaj na kardiovaskularna oboljenja	Kvercetin Kampferol Miricetin Apigenin Luteolin	Hertog i sar., 1993. Knekt i sar., 1996. Hertog i sar., 1997a. Yochum i sar., 1999. Rimm i sar., 1996. Knekt i sar., 2000. Hertog i sar., 1997b. Keli i sar., 1996. Hirvonen i sar., 2000.
Pozitivan uticaj na kancerogene i mutagene promene	Kvercetin Kampferol Miricetin Apigenin Luteolin Naringin Ekvol	Hertog i sar., 1994. Goldbohm i sar., 1995. Garcia-Closas i sar., 1998. Knekt i sar., 1997. le Marchand i sar., 2000. Garcia-Closas i sar., 1999. Ingram i sar., 1997.

Antioksidativni mehanizmi koji su karakteristični za flavonoide su otpuštanje vodonika, „hvatanje“ radikala i heliranje metala. Kao i kod ostalih polifenolnih antioksidanata, broj i položaj hidroksilnih grupa utiče na antioksidativnu aktivnost. Miricetin (tri hidroksilne grupe) je aktivniji od kvercetina (dve hidroksilne grupe) i hesperitina (jedna hidroksilna grupa).

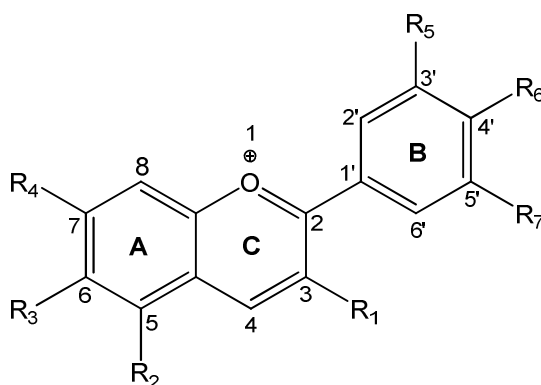
Efektivno otpuštanje vodonika uslovljeno je prisustvom dve hidroksilne grupe u *orto* položaju u B prstenu. Hidroksilna grupa u položaju 5' B prstena i položaju 3 C prstena dodatno povećava sposobnost otpuštanja vodonikovog atoma. Na povećanje sposobnosti otpuštanja vodonikovog atoma takođe imaju uticaj hidroksilne grupe u položajima 5, 8 ili 7, 8, ali ne i 5, 7 u A prstenu. Karbonilna grupa u položaju 4 i 2, 3 dvostruka veza u C prstenu nema uticaja na ovaj mehanizam antioksidativne aktivnosti.

Na antioksidativnu aktivnost flavonoida utiču: prisustvo dve hidroksilne grupe u *orto* položaju u B prstenu, karbonilna grupa u položaju 4 C prstena. Hidroksilna grupa u položaju 3 C prstena nema uticaja na antioksidativnu aktivnost, dok je uticaj 2, 3 dvostruke veze u C prstenu još uvek nejasan. Naime, Husain i sar. (1987) su saopštili da ova strukturna karakteristika nema uticaja na antioksidativnu aktivnost flavonoida, dok Foti i sar. (1996) i Bors i sar. (1990) smatraju da je ova dvostruka veza u konjugaciji sa karbonilnom grupom u položaju 4 C prstena i učestvuje u stabilizaciji radikala flavonoida delokalizacijom elektrona.

Za heliranje metala potrebno je da molekul flavonoida sadrži hidroksilne grupe u položajima 3' i 4' B prstena i, još važnije, karbonilnu grupu u položaju 4 C prstena i hidroksilnu grupu u položajima 3 ili 5 u C prstenu. Hidrogenovanjem 2, 3 dvostruke veze u C prstenu rezultiralo je gubitkom sposobnosti heliranja metala, verovatno zbog nemogućnosti delokalizacije elektrona koja se odigrava tokom stvaranja kompleksa flavonoida sa metalom.

Izoflavoni su strukturno slični flavonoidima i zastupljeni su najčešće u biljkama iz Leguminosae familije. Wei i sar. (1995) su saopštili redosled reaktivnosti izoflavona: genistein > genistin > daidžein > formononetin > 4'-metilgenistein. Glikozidi izoflavona imaju vezan šećer u položaju 7 A prstena. Položaj 7 ima mali uticaj na antioksidativnu aktivnost izoflavona pa su stoga aktivnosti glikozida i njihovih aglikona slične. Najvažnija strukturna karakterisitika za antioksidativnu aktivnost izoflavona je hidroksilna grupa u položaju 4' B prstena, naročito u kombinaciji sa hidroksilnom grupom u položaju 5 A prstena. Hu i sar. (1995) su zaključili da nedostatak 2, 3 dvostruke veze i karbonilne grupe u položaju 4 ima mali uticaj na povećanje antioksidativne aktivnosti izoflavona.

Antocijani i antocijanidini su metabolički produkti flavanona. Antocijani su glikozidi antocijanidina, flavonoida koji su zaslužni za plavu, ljubičastu i crvenu boju. Osnovna struktura antocijana je 2-fenilbenzopirilijum ili flavilijum katjon:



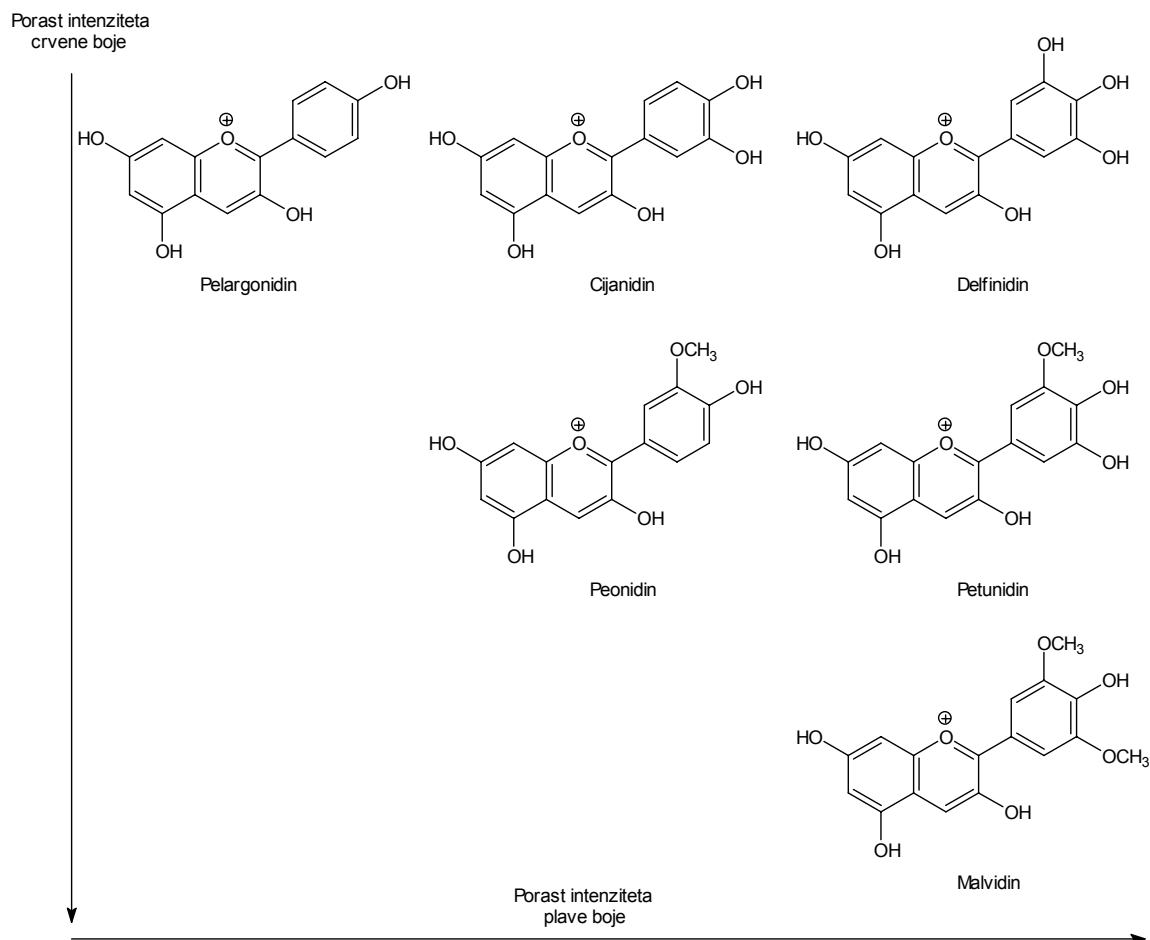
Svi antocijanidini imaju hidroksilnu grupu na položaju 3 C prstena, a većina antocijana su penta- ili heksa-supstituisani, pri čemu se supstituenti (hidroksilna ili metoksi grupa) nalaze u položajima 5 i 7 A prstena, i 3', 4' i 5' B prstena. Na osnovu broja i položaja hidroksilnih grupa u B prstenu razlikuju se tri osnovna jedinjenja antocijana: pelargonidin, cijanidin i delfinidin, a metilovanjem ovih hidroksilnih grupa nastaju: peonidin, petunidin i malvidin (tabela 5).

Tabela 5. Strukture antocijanidina rasprostranjenih u biljnom svetu

ANTOCIJANIDIN	R₅	R₇	BOJA
Pelargonidin	H	H	Narandžasto-crvena
Cijanidin	OH	H	Crvena
Delfinidin	OH	OH	Roze
Peonidin	OCH ₃	H	Plavo-ljubičasta
Petunidin	OCH ₃	OH	Ljubičasta
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃	Crveno-ljubičasta

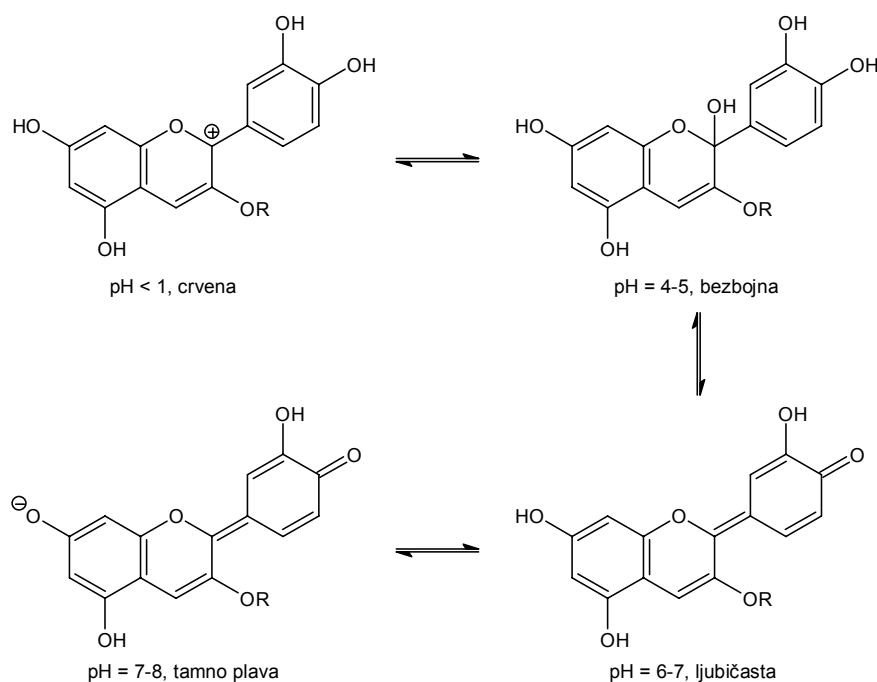
Metilovanje hidroksilnih grupa u prstenu B osnovnih antocijana ograničeno je na hidroksilne grupe u položaju 3' i 5', a slobodna hidroksilna grupa u 4' položaju ima značajnu ulogu u promeni boje antocijana. Većina antocijana ima jednu ili dve monosaharidne jedinice, najčešće vezane u položaju 3, ponekad u položajima 3 i 5, a ređe u položajima 3 i 7 C i A prstena. Od šećera antocijani najčešće sadrže glukozu, galaktozu, arabinozu, ksilozu i ramnozu, a kiseline koje najčešće aciluju šećere su kafena, kumarinska, sinapinska, *p*-hidroksibenzoeva, ferulna, malonska, sukcijska i sirćetna.

Boja antocijana i antocijanidina je posledica pobuđivanja (ekscitacije) molekula vidljivom svetlošću. Lakoća kojom se molekul ekscituje zavisi od relativne pokretljivosti elektrona u strukturi. Dvostruke veze, kojih u antocijanima ima mnogo, pobuđuju se veoma lako, i njihovo prisustvo je najvažnije za boju. Porast supstitucije molekula takođe ima značajan uticaj i ima za posledicu tamnjenje boje. Supstitucija metoksi grupom, koja ima veći elektron-donorni kapacitet od hidroksilnih grupa, izaziva jači batohromni efekat, odnosno pomeranje apsorpcionog maksimuma ka većim talasnim dužinama (slika 5).



Slika 5. Promena boje antocijana u zavisnosti od broja i vrste supstituenata u B prstenu

I drugi faktori mogu biti uzrok promene boje antocijana, kao što su promena pH, stvaranje metalnih kompleksa i kopigmentacija. Tako su antocijani crveno obojeni u kiseljoj, bezbojni pri pH 4, a plavi pri neutralnoj pH vrednosti. U kiseljoj sredini antocijani se nalaze u formi flavilijum katjona, pri pH vrednostima 4-5 prelazi u hemiacetal, a na pH 6-7 su u obliku hinona koji u baznoj sredini disosuje u anjonski oblik. Na slici 6 prikazane su strukturne forme antocijana pri različitim pH vrednostima.



Slika 6. Boja cijanidina pri različitim pH vrednostima

Generalno, profil antocijana u biljnom tkivu je karakterističan i koristi se u taksonomiji i određivanju stepena kvarenja sokova i vina. Sve je veći interes za izolovanje i upotrebu antocijana, ne samo zbog toga što su oni netoksični prirodni pigmenti, rastvorni u vodi i mogu zameniti sintetičke boje već i zbog njihovih bioaktivnih osobina.

Antocijani su dodavani u hranu još od davnina. Bili su komponente tradicionalnih herbalnih preparata koje su koristili Indijanci, Evropljani i Kinezi. Izolovani su iz lišća, voća, korenja ili semena. Ekstrakti bogati antocijanima su se koristili za lečenje hipertenzije, piroksije, oboljenja jetre, dizenterije, dijareje, infekcija urinarnog trakta i kamena u bubregu. Zabeležen je njihov uticaj na poboljšanje vida i cirkulacije.

Iz biljaka je izolovano ukupno 539 različitih molekula antocijana (Brouillard i Delaporte, 1977). Ipak, u hrani je prisutan mnogo manji broj ovih jedinjenja. Standardizovani voćni koncentrat koji ima visok sadržaj antocijana deklarisan je kao prirodna prehrambena boja sa oznakom E163 i dozvoljen je za upotrebu u Evropskoj Uniji, SAD, Kanadi i Japanu (Fennema, 1996).

Faktori koji utiču na stabilnost antocijana su: struktura - prisustvo šećera vezanih glikozidnim vezama i/ili kiseline koje aciluju šećer, pH, temperatura, svetlost, prisustvo metala, kiseonika itd. Utvrđeno je da je najznačajniji faktor temperatura skladištenja i da pri-

sustvo aromatične kiseline kao i dva molekula šećera povećavaju značajno stabilnost antocijana. Antocijani su najstabilniji u kiseloj sredini, u opsegu pH od 1 do 2 jer je flavilijum katjon njihova najstabilnija forma. Vrednosti pH iznad 4,5 su veoma nepovoljne za antocijane (Nielsen i sar., 2003). Nestabilnost antocijana može negativno da utiče na stabilnost boje proizvoda, njegove senzorne osobine i na njegove potencijalne zdravstvene efekte. Eiro i Heinonen (2002) su pokazali da fenolne kiseline imaju zaštitni i stabilizacioni efekat na antocijane. Kafena kiselina i rutin sprečavaju promenu boje soka od crvene narandže (Maccarone i sar., 1985), dok sinapinska kiselina doprinosi boji soka od jagode, a ferulna i sinapinska pojačavaju intenzitet boje soka od maline (Rein i Heinonen, 2004). Ovaj efekat je pripisan kopigmentaciji antocijana sa novim jedinjenjima koja se sintetišu u ovim smešama. Generalno, kopigmentacijom antocijana stvaraju se jedinjenja koja su intenzivnije boje i koja su stabilnija od samih antocijana. U literaturi se navode dve vrste reakcija kopigmentacije:

- *Intramolekularne interakcije* koje se ostvaruju putem kovalentnih veza između hromofornih grupa u molekulu antocijana i organskih kiselina, aromatičnih grupa ili flavonoida (ili kombinacija sve tri interakcije);
- *Intramolekularne interakcije* koje se ostvaruju putem slabih hidrofobnih veza između flavonoida i antocijana.

Antocijan-flavonoid interakcija stabilizuje i boju i biološku aktivnost antocijana. Isti efekat pokazuju i fenolne kiseline, ali je taj efekat značajno slabiji (Gomez-Míguez i sar., 2006).

Kopigmentacija može da se odrazi dvojako na apsorpcioni spektar antocijana i boju proizvoda i to kao:

- *Hiperhromni efekat* – povećanje intenziteta apsorbanse molekula na talasnoj dužini apsorpcionog maksimuma (λ_{\max});
- *Batohromni efekat* – pomeranje apsorpcionog maksimuma (λ_{\max}) ka većim talasnim dužinama.

Generalno, povećanje temperature negativno utiče na stabilnost svih prehrambenih boja, pa i antocijana. Antocijani podležu i fotohemijskoj razgradnji. Ispitivanja Wybraniec i Mizrahi (2002) ukazala su na prisustvo 2,4,6-trihidroksibenzaldehida kod svih antocijana izloženih fotohemijskoj i termičkoj razgradnji, kao produkta razgradnje prstena A, dok razgradnjom prstena B nastaju različiti derivati hidroksibenzojeve kiseline, u zavisnosti od strukture molekula antocijana. Takođe, vezivanje šećera u položaju 3 C prstena ubrzava fotohemijsku degradaciju antocijana.

Dodatak askorbinske kiseline značajno ubrzava razgradnju antocijana (Garcia-Viguera i Bridle, 1999). Pretpostavljena su dva mehanizma ove interakcije: direktna kondenzacija askorbinske kiseline u položaju 4 C prstena molekula antocijana (Jurd, 1972; Poel-Langston i Wrolstad, 2000) ili oksidativna razgradnja pirilijumskog prstena antocijana slobodnoradikalnim mehanizmom gde askorbinska kiselina deluje kao aktivator molekulskog kiseonika i stvaranja slobodnih radikala (Iacobucci i Sweeny, 1983). Utvrđeno je da se ove reakcije sprečavaju dodatkom flavonola koji se kondenzuju sa antocijanima i na taj način ih stabilizuju (Shrikhande i Francis, 1974). Dodatak šećera takođe utiče na stabilnost antocijana, u zavisnosti od strukture antocijana, tipa šećera i koncentracije. Iako je većina ekstrakata antocijana pokazala smanjenu stabilnost nakon dodatka šećera, nisu sprovedene statističke analize da bi se dokazala statistička značajnost ovih podataka (Mercadante i Bobbio, 2008).

Zbog nedostatka karbonilne grupe u položaju 4 C prstena, heliranje metala se odigrava samo u prisustvu *orto* hidroksilnih grupa u B prstenu, i to u položajima 3' i 4'. Antocijanidini imaju manju antioksidativnu aktivnost od flavona, i to usled nedostatka 2, 3 dvostruke veze i karbonilne grupe u položaju 4 C prstena (Cao i sar., 1997; Wang i sar., 1997). Hidroksilne grupe u *orto* položaju i kod antocijanidina imaju veliki uticaj na aktivnost. Treća hidroksilna grupa u 5' položaju B prstena ne doprinosi povećanju aktivnosti kao kod ostalih flavonoida. Wang i sar. (1997) su utvrdili da je antioksidativna aktivnost antocijana veća od antocijanidina, ukazujući na pozitivan uticaj prisustva šećerne komponente na aktivnost. Glukoza je pokazala veći uticaj na povećanje aktivnosti od ramnogluoze i galaktoze. Razlike u strukturi šećera mogu povećati ili smanjiti mogućnost stvaranja stabilnih radikalnih formi.

Kondenzacijom antocijana sa drugim flavonoidima u položaju 4 C prstena nastaju proantocijanidinski polimeri (kondenzovani tanini). Salah i sar. (1995) navode da je aktivnost kondenzovanih tanina koji se sastoje od galne kiseline i epikatehina velika i da se povećava sa brojem hidroksilnih grupa. Hidrolizujući tanini sastoje se od glukoze vezane estarskim vezama za nekoliko jedinica galne kiseline i heksahidroksidifenilne kiseline. Veliki broj hidroksilnih grupa u molekulima tanina presudno utiče na njihovu antioksidativnu aktivnost.

Na sadržaj polifenolnih jedinjenja u hrani značajno utiču procesi prerade i pripreme hrane (termički tretmani, enzimski tretmani, ceđenje, fermentacija, smrzavanje, sušenje, kuvanje itd.). Prvi negativan efekat prerade biljaka koje sadrže polifenolna jedinjenja je zaustavljanje procesa njihove biosinteze usled razaranja enzima ili ćelijskog zida. Prerada

može i direktno da utiče na degradaciju polifenolnih jedinjenja, hemijskim ili enzimskim putevima. Saopšteno je da kuvanjem spanać izgubi više od 50% polifenolnih jedinjenja (Gil i sar., 1999). Häkinnen i sar. (2000) su saopštili da proces ceđenja značajno smanjuje sadržaj flavonola u donosu na njihov sadržaj u svežem bobičastom voću.

2.2.2.2. Askorbinska kiselina

Askorbinska kiselina ili vitamin C je esencijalni nutrijent za ljudski organizam. Vitamin C je neophodan za mnoge metaboličke procese. Sintetiše ga većina biljaka i životinja iz D-glukoze i D-galaktoze. Ljudski organizam nema L-gulonolakton oksidazu, terminalni enzim u biosintezi askorbinske kiseline neophodan za pretvaranje L-gulonske kiseline u L-askorbinsku kiselinu. Stoga čovek mora da unosi askorbinsku kiselinu putem ishrane. Kod čoveka, kao i kod životinja, vitamin C se deponuje u tkivima visoke metaboličke aktivnosti. Najviše je skoncentrisan u mrežnjači, a manje u kori nadbubrežne žlezde, mozgu, jetri, testisima, jajnicima, bubrezima, krvnim pločicama, crvenim i belim krvnim zrnima i krvnoj plazmi. Sadržaj vitamina C u tkivima opada starenjem tkiva. Vitamin C je potreban za normalno funkcionisanje ćelija, tkiva i organa i ima niz važnih fizioloških uloga. Neophodan je za pravilan razvoj i funkciju mezenhimskog tkiva. Značajan je za metabolizam kalcijuma i svih materija iz hrane koje učestvuju u rastu i razvoju kostiju. Vitamin C potpomaže pravilno zarastanje rana, a ima i važnu korelacionu ulogu sa korom nadbubrežne žlezde omogućujući sintezu i metabolizam njenih hormona. Uloga vitamina C je značajna za metabolizam aminokiselina (prolina, lizina i naročito tirozina), jona metala (bakra i gvožđa), vitamina B grupe (Kolarov, 1999). Cameron (1979) je dokazao važnost ovog vitamina u poboljšanju zdravlja i otpornosti prema infektivnim bolestima.

Hipovitaminoza vitamina C se najčešće ispoljava kao dremljivost, nevoljnost, umor, opšta slabost, bol u nogama, česte glavobolje i naročito krvarenje desni (Karlson, 1988). Potpuni nedostatak vitamina C, odnosno avitaminoza vitamina C uzrokuje bolest skorbut (skorbek na holandskom jeziku znači groznica u ustima). Voće i povrće su bogati izvori vitamina C. U tabeli 6 naveden je sadržaj vitamina C u odabranom voću i povrću (Bánhegyi i sar., 1997; Dawes i sar., 1991; Mapson, 1970).

Tabela 6. Sadržaj askorbinske kiseline u odabranom voću i povrću (Davey i sar., 2000)

IZVOR	SADRŽAJ (mg/100 g)	SADRŽAJ (μmol/g svežeg uzorka)
Jabuka	2 – 10	0,11 – 0,56
Kajsija	7 – 10	0,39 – 0,56
Banana	10 – 30	0,56 – 1,68
Borovnica	15	0,84
Brokoli	113	6,35
Kupus	46 – 47	2,64
Šargarepa	6	0,34
Brusnica	12	0,67
Crna ribizla	200 – 210	11,2 – 11,8
Grejpfrut	40	1,18
Kivi	60	3,41
Limun	50	2,84
Zelena salata	15	0,85
Lubenica	10 – 35	0,57 – 1,97
Narandža	50	2,84
Breskva	7 – 31	0,39 – 1,76
Šljiva	3	0,17
Kruška	3 – 4	0,17 – 0,23
Ananas	12	0,68
Krompir	30	1,68
Malina	25	1,40
Šipak	1000	5,62
Spanać	51	2,86
Jagoda	59 – 60	3,37
Paradajz	20 – 25	1,14 – 1,40

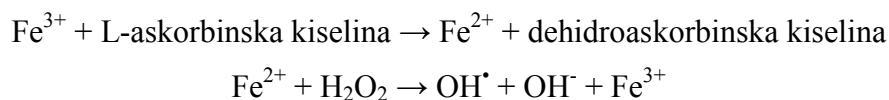
Veliki broj radova je objavljen o primeni askorbinske kiseline u prehrambenoj industriji. Bauernfeind je 1953. godine objavio rad sa 406 i 1970. godine rad sa 520 literaturnih navoda o korišćenju askorbinske kiseline u proizvodnji hrane. L-Askorbinska kiselina se može dodati hrani ili sastojcima hrane kao hranljiva materija (da poboljša prirodnu hranu koja nema vitamina C ili ga ima malo), da nadoknadi nastale gubitke vitamina C, ili poveća hranljivu vrednost hrani (Kolarov, 1999). Pored dobro poznatih antioksidativnih osobina, vitamin C se koristi i za kontrolu enzimskog tamnjenja. Vitamin C inhibira enzimsko tamnjenje redukcijom *o*-hinonskih struktura koje nastaju pri katalitičkoj oksidaciji polifenolnih jedinjenja u hrani. Upotrebljava se i kao agens za sprečavanje korozije konzervi, za zaštitu ukusa, arome i bistrine vina, inhibiciju formiranja nitrozoamina i sprečavanje promene boje konzervisanog i ambalažiranog mesa, poboljšanje kvaliteta testa itd. Sintetički dobijena askorbinska kiselina klasifikovana je kao bezbedan prehrambeni aditiv.

Vitamin C je najefikasniji redukujući hidrosolubilni antioksidant. Pri pH 7,4 čak 99,95% vitamina C je u obliku monoaniona AscH^- (askorbat), 0,05% kao AscH_2 i 0,004% kao dianjon AscH^{2-} , što ukazuje da je antioksidativna hemija vitamina C hemija AscH^- .

AscH^- je donorski antioksidant koji predaje vodonokov atom reaktivnim slobodnim radikalima R^\bullet sa visokim vrednostima redukcionog potencijala ($\bullet\text{OH}$, RO^\bullet , LOO^\bullet , GS^\bullet , TO^\bullet), formirajući stabilan askorbil radikal, koji u biološkim sistemima nije protonovan (AscH^\bullet), već je prisutan u formi anjona semidehidroaskorbil radikala ili askorbil anjon radikala ($\text{Asc}^{\bullet-}$).

Daljim oksidacionim reakcijama askorbil radikala nastaju dehidroaskorbinska kiselina, zatim 2,3-diketo-L-gulonska kiselina i, kao krajnji proizvod, veoma toksična oksalna kiselina.

Smatra se da je dnevna potreba ljudi za vitaminom C oko 75 mg. Višak vitamina unet hranom se izlučuje urinom, te ne postoji opasnost od predoziranja (Kolarov, 1999). Izuzetno, unosom velikih doza ovoga vitamina, kao i u uslovima povećane koncentracije metala, odnosno u procesu destrukcije tkiva i oslobađanja metala iz kompleksa sa proteinima, vitamin C može delovati prooksidativno. Tokom te reakcije ovaj vitamin može da redukuje Fe(III) u Fe(II) , uslovljavajući Fentonovu reakciju i nastajanje hidroksil radikala:

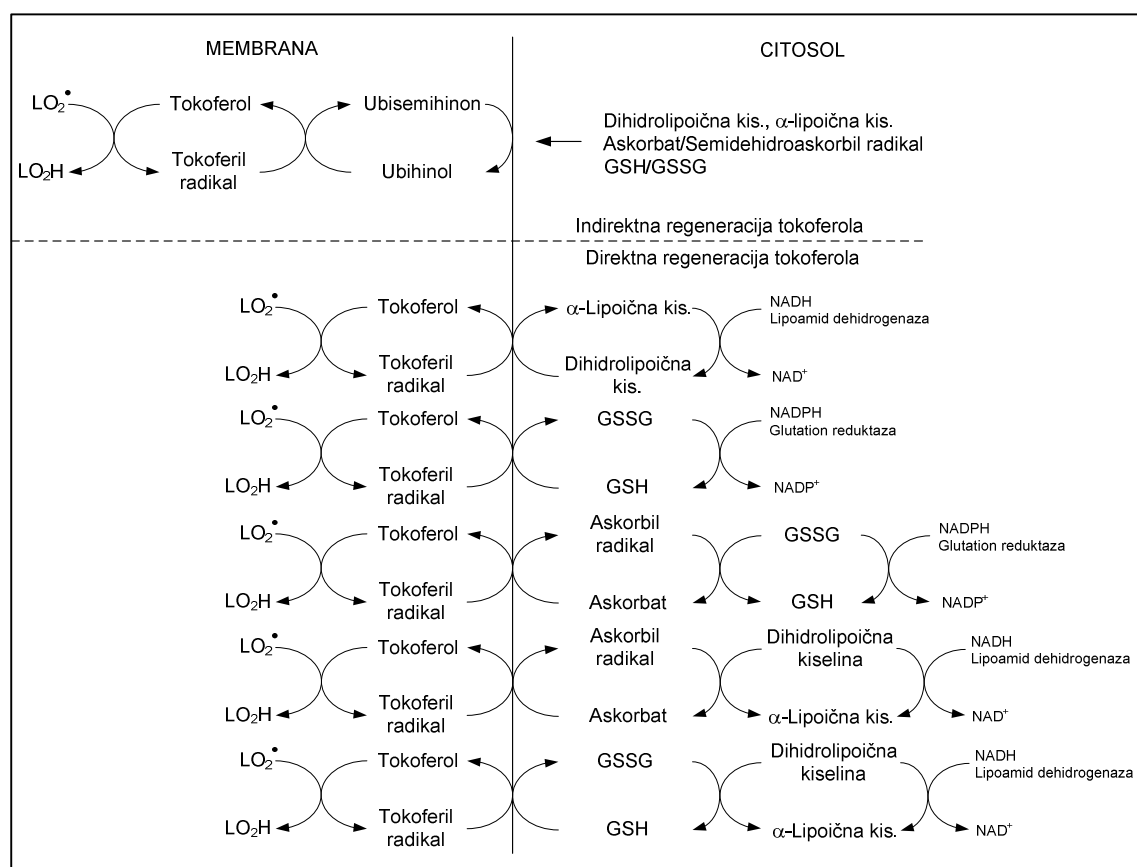


2.2.2.3. Tokoferoli

U literaturi se pod vitaminom E podrazumeva njegova najzastupljenija forma α -tokoferol (2,5,7,8-tetrametil-2-(4',8',12'-trimetil-tridecil)-6-hromanol). Zapravo, vitamin E predstavlja grupu od osam prirodnih lipofilnih molekula, tokoferola (α -, β -, γ - i σ -tokoferol) i tokotrienola (α -, β -, γ - i σ -tokotrienol). Tokom oksidacije ova jedinjenja formiraju tokoferil i tokotrienil hinone. Ostali tokoferoli i tokotrienoli takođe imaju značajnu biološku (uticaj na propustljivost membrane, kontrolu sinteze prostaglandina i leukotriena, regulaciju sinteze nukleinskih kiselina i genske ekspresije) i antioksidativnu aktivnost.

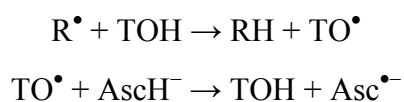
γ -Tokoferol je za 50% slabiji antioksidant od α -tokoferola, i pokazuje samo 10-30% biološke aktivnosti u odnosu na α -tokoferol. Sa druge strane α -tokotrienol ima višu (Serbinova i sar., 1993) ili jednaku (Suarna i sar., 1993) antioksidativnu aktivnost kao α -toko-

ferol, ali samo 30% biološke aktivnosti α -tokoferola. Tokoferoli su esencijalni nutrijenti i moraju se unositi putem ishrane. Prisutni su u biljnim uljima, od kojih je najbogatije palmينو ulje. Veoma važne biološke uloge tokoferola su sposobnost hvatanja lipidnih peroksil radikala i sposobnost uklanjanja slobodnih radikala, kao i prekidanje ili zaustavljanje lančane reakcije peroksidacije lipida (Wolf i sar., 1998). α -Tokoferol je glavni liposolubilni antioksidant u plazmi i česticama LDL-a (Esterbauer i sar., 1990). U membranama, na svakih 2000 do 3000 molekula dolazi 1 molekul α -tokoferola koji deluje kao antioksidant i prekida ili zaustavlja lančanu reakciju peroksidacije lipida, a takođe je i kvenčer singletnog kiseonika, regulator enzimske aktivnosti i membranske propustljivosti, a reaguje i sa superoksid anjon radikalom (Ha i Csallany, 1992). Tokoferoli reaguju sa alkil, hidroperoksil, peroksininitrit i hidrosil radikalima. Prekidanje propagacije lančane reakcije lipidne oksidacije odigrava se reakcijom otpuštanja protona tokoferola lipidnim peroksil radikalima (LO_2^\bullet) koji tako prelaze u stabilnije produkte, lipidne hidroperokside (LOOH). Tokom ove reakcije tokoferol prelazi u slobodnoradikaliski oblik – tokoferil radikal (slika 7).

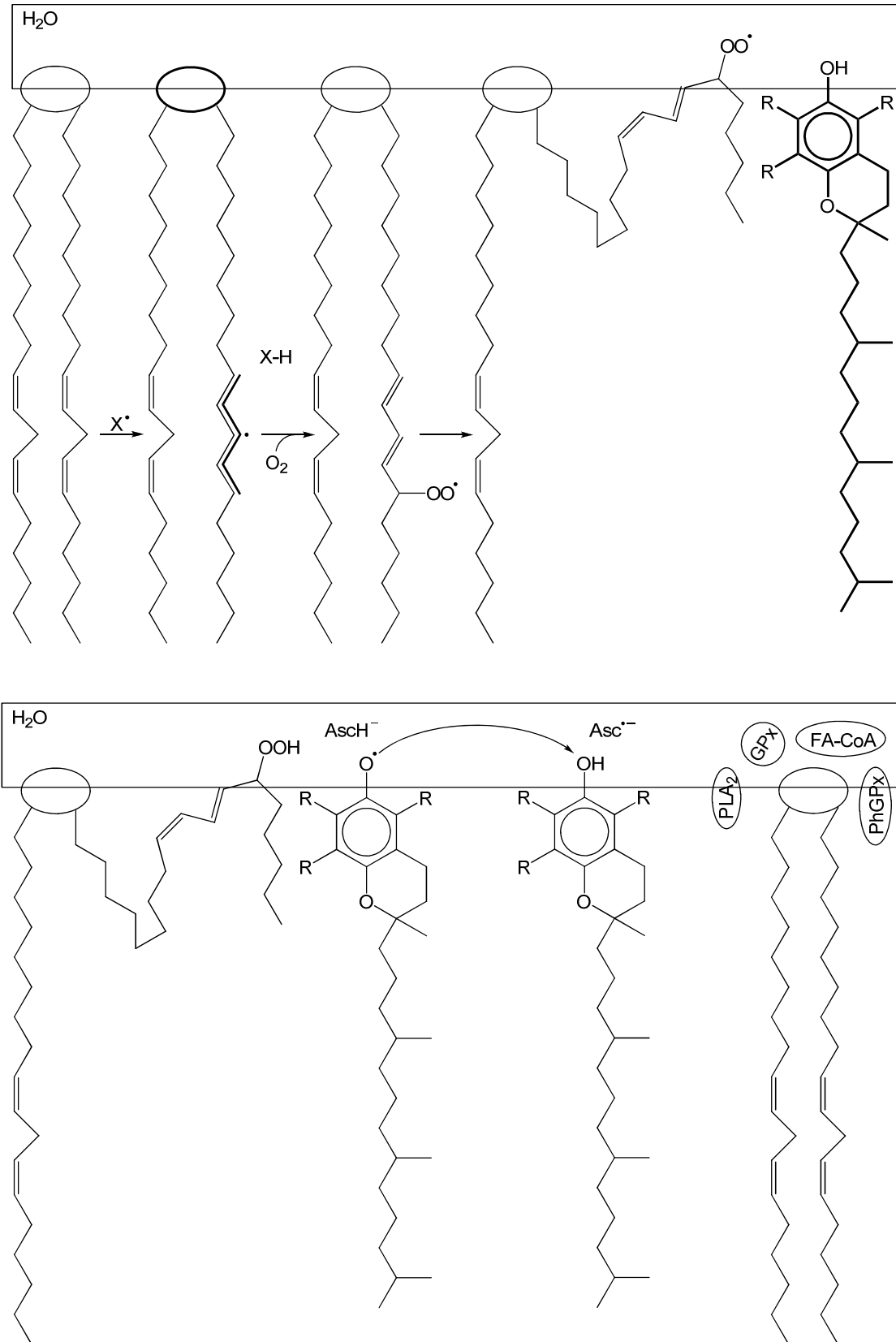


Slika 7. Sprečavanje lipidne peroksidacije tokoferolima i mogući direktni i indirektni putevi regeneracije tokoferola liposolubilnim i hidrosolubilnim antioksidantima

Tokoferil radikal (TO[•]) se stabilizuje delokalizacijom nesparenog elektrona i kao takav ne reaguje sa drugim molekulima i ne izaziva dalja oštećenja. Tokoferil radikal se regeneriše endogenim reduktantima koji su prisutni u membrani (npr. ubihinol) (Kagan i sar., 1990) ili u citoplazmi (GSH, askorbinska kiselina i dihidrolipoična kiselina) (Nohl i Gille, 1998). Sinergizam između tokoferola (TOH) i askorbata (AscH⁻) zasniva se na reakcijama:



Šematski prikaz sinergizma tokoferola i askorbata u ćelijskoj membrani prikazan je na slici 8 (Buettner, 1993).

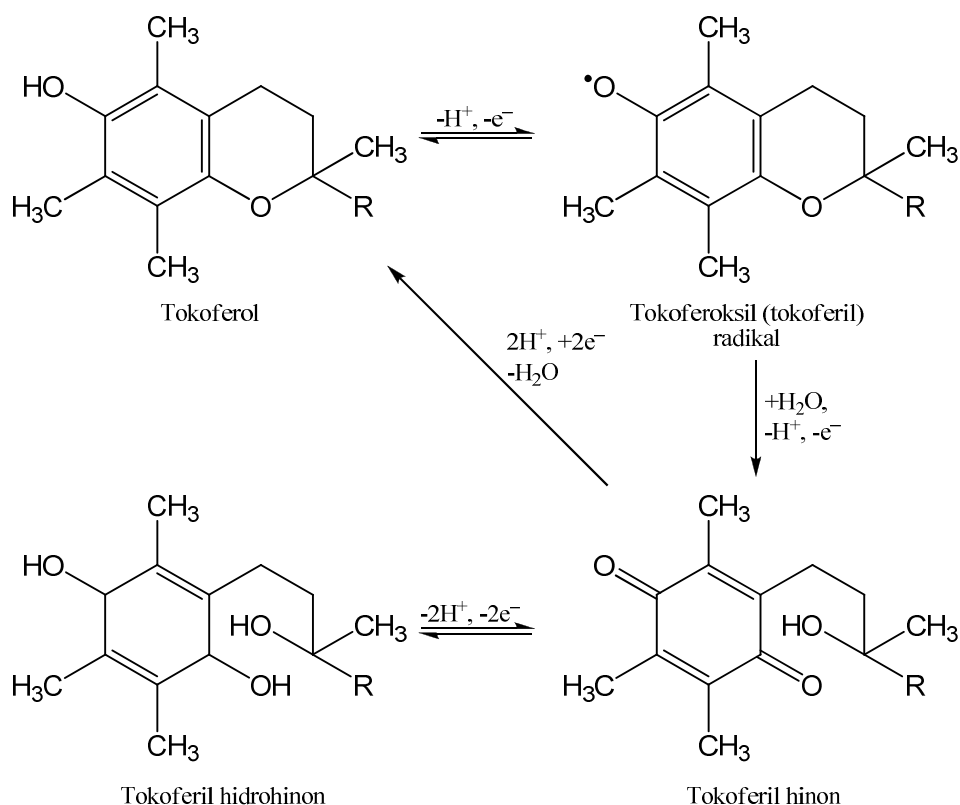


Slika 8. Sinergističko delovanje tokoferola i askorbata u ćelijskoj membrani

Enzimi: FA-CoA – koenzim A vezan za masne kiseline; GPx – glutation peroksidaza;

PhGPx – glutation peroksidaza vezana za fenolno jezgro; PLA₂ – fosfolipaza A₂

Redoks reakcije tokoferola prikazane su na slici 9.



Slika 9. Redoks reakcije tokoferola

Najčešća oksidacija tokoferola u biološkim sistemima (u reakciji sa ROS) je jednoelektronska oksidacija koja dovodi do stvaranja tokoferil radikala. Dvoelektronska oksidacija otvara prsten tokoferola i nastaje tokoferil hinon, finalni proizvod oksidacije tokoferola. Redukcijom tokoferil hinona nastaje tokoferil hidrohinon.

U prisustvu RNS tokoferoli se mnogo brže oksiduju, pa se pretpostavlja da je upravo ova činjenica uzrok citotoksičnosti RNS (Bowery i sar., 1992).

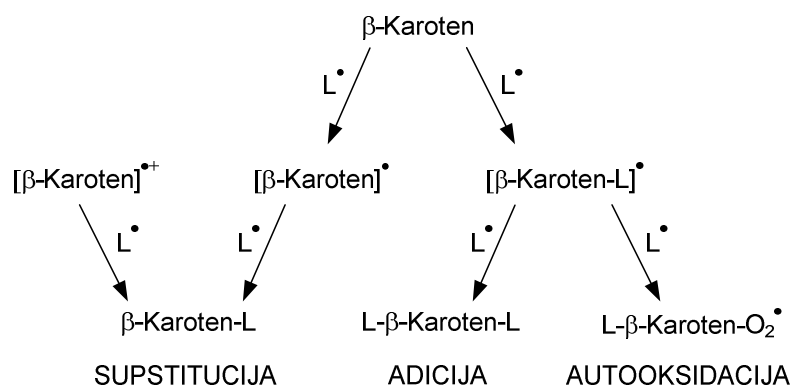
Antioksidativna svojstva α -tokoferola su povezana sa prevencijom kardiovaskularnih i neuroloških oboljenja, kancera i starenja (Gey, 1998).

2.2.2.4. Karotenoidi

Karotenoidi su veoma značajna klasa biljnih pigmenata žuto-crvene boje. Njihova uloga u biljkama je višestruka. U biljkama karotenoidi apsorbuju svetlost i sprečavaju fotooksidativno oštećenje, a privlače i pažnju oprašivača (insekata). Njihovo delovanje kao antioksidanata u biljkama pokazuje sličnost sa njihovom potencijalnom antioksidativnom

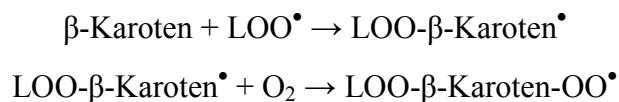
ulogom u namirnicama i čovekovom organizmu. Karotenoidi su po strukturi tetraterpeni. Poliizoprenoidna struktura karotenoida se sastoji iz dugačkog sistema konjugovanih dvostrukih veza i omogućava im apsorpciju svetlosti u UV i vidljivoj oblasti spektra. Takođe, oni poseduju elektrohemijsku aktivnost i snažno antioksidativno delovanje. Terao (1989) je utvrdio da prisustvo okso grupa u 4(4') položaju β -jononskog prstena povećava značajno antioksidativnu aktivnost. Karbonilna grupa na prstenu povećava stabilnost radikala antioksidanta i sprečava njihovu dalju aktivnost. Polienski sistem konjugovanih veza takođe može da "hvata" slobodne radikale.

Karotenoidi se sintetišu u biljkama i mikroorganizmima, a životinjama i ljudima su esencijalni nutrijenti. To su jedinjenja bogata elektronima i reaguju lako sa jedinjenjima kojima nedostaju elektroni tj. slobodnim radikalima. Nespareni elektron na karotenoidnom molekulu, koji nastaje u reakciji sa slobodnim radikalom, se delokalizuje hiperkonjugacijom, i na taj način povećava svoju stabilnost (Rice-Evans i sar., 1997). Mehanizam antioksidativnog delovanja reakcijama supstitucije, adicije i autooksidacije je:



Antioksidativno delovanje karotenoida zavisi od njihove strukture, tačnije od broja konjugovanih dvostrukih veza, sternih smetnji i prisustva funkcionalnih grupa na terminalnim (β -jononskim) prstenovima. Na primer, likopen (11 konjugovanih dvostrukih veza i bez terminalnog cikloheksenskog prstena) je oko tri puta efikasniji hvatač slobodnih radikala od β -karotena (9 konjugovanih dvostrukih veza i dva terminalna cikloheksenska prstena) i sto puta efikasniji od astaksantina (11 konjugovanih dvostrukih veza i elektronakceptorska karbonilna i hidroksilna grupa na terminalnom cikloheksenskom prstenu) (Miller i sar., 1996). Utvrđena efikasnost hvatanja hidroksil i peroksil radikala je likopen > β -karoten = zeaksantin > izozeaksantin > astaksantin (Woodall i sar., 1997). Karotenoidi deluju kao „hvatači“ peroksil radikala, peroksinitrita, hipohlorne kiseline, i kao kvenčeri singlet-

nog kiseonika. Potvrđeno je da pri visokim parcijalnim pritiscima kiseonika karotenoidi podležu autooksidaciji delujući prooksidativno. Pretpostavljeni mehanizam predstavljen je reakcijom adicije kiseonika na lipidni peroksil-karoten radikal (LOO-β-Karoten[•]) pri čemu nastaje peroksil radikal adukt (LOO-β-Karoten-OO[•]), koji dalje izaziva oksidaciju lipida (Palozza, 1998):



Retinoidi su karotenoidi koji imaju vitaminsku aktivnost tj. spadaju u provitamine vitamina A. Od 600 karotenoida prisutnih u prirodi oko 50 su retinoidi. Ovi karotenoidi se enzimskim putem prevode u intestinalnom traktu u retinal i na kraju retinol (vitamin A₁) koji se skladišti u jetri. Većina retinoida su toksični i teratogeni i prekomeran unos može izazvati razna oboljenja. Retinoidi imaju niz značajnih bioloških uloga u organizmu: prenos signala u oku, očuvanje epitela, regulaciju odgovora imunog sistema, regulaciju proliferacije i diferencijacije mnogih tipova ćelija i zaštitnu ulogu kod kardiovaskularnih oboljenja (Olson, 1996). Kao i karotenoidi, retinoidi imaju konjugovani sistem dvostrukih veza koji im daje mogućnost antioksidativnog delovanja. Retinoidi imaju manji broj dvostrukih veza pa su stoga i manje efikasni antioksidanti.

2.2.3. Antioksidanti u hrani

Oksidacija je jedan od najznačajnijih procesa koji se odvija u hrani i koji dovodi do pogoršanja njenog kvaliteta, odnosno do njenog kvarenja. Reakcije oksidacije se ubrzavaju porastom temperature, delovanjem svetlosti, tragova metala i pigmenata. Sprečavanje i usporavanje oksidacionih procesa u mnogim prehrambenim proizvodima se postiže smrzavanjem, poboljšavanjem higijenske obrade i metoda pakovanja. Međutim, često ovi faktori nisu dovoljni, pa se tokom procesa proizvodnje prehrambenim proizvodima dodaju antioksidanti – specifični aditivi koji inhibiraju reakcije oksidacije. Sa aspekta prehrambene industrije antioksidanti su supstance koje produžavaju rok trajanja hrane, sprečavanjem oksidacionih procesa koji pogoršavaju njen kvalitet (Pokorny i sar., 2001).

Američka uprava za hranu i lekove (US FDA – United States Food and Drug Administration) definiše antioksidante kao prehrambene aditive, konzervanse, koji sprečavaju kvarenje hrane, odnosno užeglost masti i diskoloracije izazvane oksidacijom.

Za stabilizaciju masti, kao antioksidanti, upotrebljavaju se najčešće oktilgalat, dodecilgalat, PG, BHA, BHT, α -tokoferol i askorbinska kiselina, a kao antioksidanti sinergisti limunska kiselina i soli mlečne kiseline. U literature postoje podaci da BHA, BHT i PG deluju štetno i da su toksični za eksperimentalne životinje, ali takav uticaj nije potvrđen kod čoveka pa su dozvoljeni za upotrebu u ograničenoj količini.

Maksimalno dozvoljena količina aditiva propisana Pravilnikom o kvalitetu proizvoda od mesa živine za stabilizaciju živinske masti za galate iznosi 100 mg/kg, a za BHA i BHT 200 mg/kg, dok se α -tokoferol, askorbinska i limunska kiselina koriste u količini “*quantum satis*”. Za stabilizaciju svinjske i goveđe masti antioksidanti su dozvoljeni za upotrebu, ali vrsta i količina tih aditiva nije precizirana (Zakonska regulativa, 2004).

Askorbinska kiselina i eritorbinska kiselina, kao i natrijumaskorbat i natrijumeritorbat, značajni su i za stabilizaciju boje proizvoda od mesa. Ovi aditivi održavaju nizak redoks-potencijal supstrata, pri čemu u salamurenim proizvodima stvaraju povoljne uslove za redukciju nitrita i formiranje nitrozilmioglobina. U proizvodima od usitnjenog mesa, u koje se ne dodaju nitriti i nitrati, ovi antioksidanti sprečavaju brzu oksidaciju oksimioglobina u met-mioglobin, čineći tako boju svežeg mesa stabilnijom. Utvrđeno je, takođe, da askorbinska kiselina u manjoj količini (0,02%) u salamurenim proizvodima pojačava baktericidni efekat nitrita na *Clostridium botulinum*, dok u količini od 0,05% smanjuje nivo rezidua nitrita u proizvodu i stvara povoljnije uslove za razmnožavanje ovih bakterija.

Prirodna polifenolna jedinjenja se koriste u prehrambenoj industriji za poboljšanje organoleptičkih osobina i za povećanje, odnosno očuvanje biološke vrednosti hrane, u toku tehnoloških postupaka proizvodnje i skladištenja (Čanadanović-Brunet, 1998). Polifenolna jedinjenja imaju višestruki uticaj na osobine hrane, i to na:

- *Boju*

Na primer, antocijani su odgovorni za plavu, purpurnu, ljubičastu, crvenu i naranđastu boju. Ostali flavonoidi su obojeni belo ili žuto (flavonoli), a tanini svetlo žuto i smeđe. Smeđa i crna boja se mogu pojaviti i kao rezultat oksidacije polifenolnih jedinjenja;

- *Ukus*

Flavonoidi i tanini daju gorak, opor i oštar ukus hrani;

- *Antimikrobnu aktivnost;*

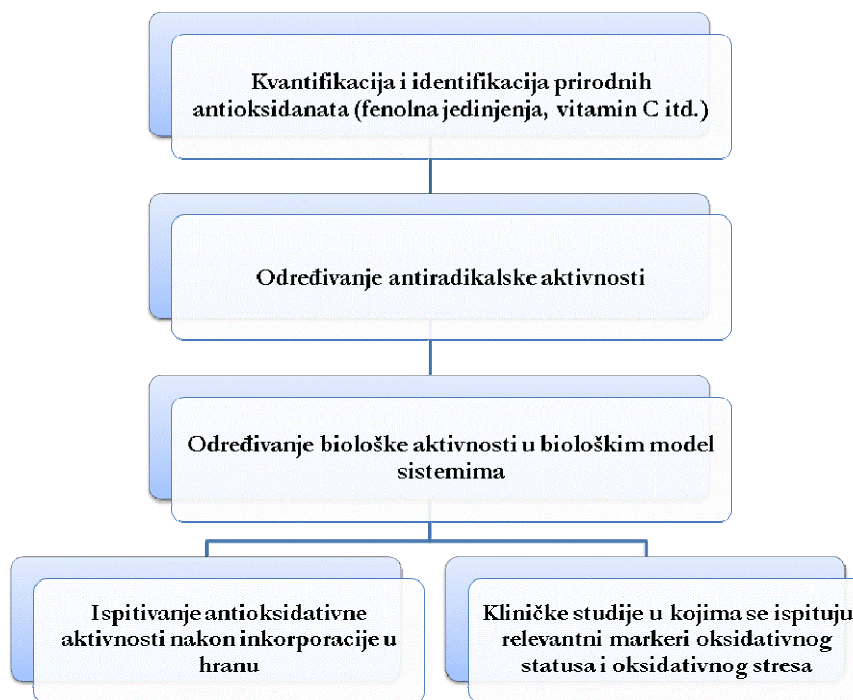
- *Antioksidativnu aktivnost.*

Uticaj polifenolnih jedinjenja na ukus hrane prikazan je u tabeli 7 (Tomás-Barberán i Espín, 2001).

Tabela 7. Polifenolna jedinjenja i ukus hrane

BILJKA	POLIFENOLNO JEDINJENJE	KOMENTAR
Opor ukus		
Jabuka (<i>Malus pumila</i>)	Procijanidini	Naročito zastupljeni u nekim vrstama
Datula (<i>Phoenix dactylifera</i>)	Procijanidini	Nagomilavaju se tokom sazrevanja
Grožđe (<i>Vitis vinifera</i>)	Procijanidini	Prisutni u semenkama i opni
Breskva (<i>Prunus persica</i>)	Procijanidini	Naročito zastupljeni u nekim vrstama
Smokva (<i>Diospyros kaki</i>)	Procijanidini	Uklanjaju se tretiranjem acetaldehidom
Šljiva (<i>Prunus salicina</i>)	Procijanidini	Naročito zastupljeni u nekim vrstama
Nar (<i>Punica granatum</i>)	Elagitanini, galna kiselina i galotanini	Prisutni u komercijalnim sokovima
Dunja (<i>Cydonia oblonga</i>)	Procijanidini	
Malina (<i>Rubus idaeus</i>)	Elagitanini	
Jagoda (<i>Fragaria ananassa</i>)	Elagitanini	
Gorak ukus		
Šargarepa (<i>Daucus carota</i>)	Kumarini	Stvaraju se nakon oštećenja na biljci
Citrus voće (<i>Citrus aurantium, Citrus paradisi</i>)	Flavanon neohesperidozidi	Flavanon rutinozidi su bezukusni
Maslina (<i>Olea europaea</i>)	Oleuropein	Razaraju se fermentacijom
Ljut ukus		
Paprika (<i>Capsicum anuum</i>)	Kapsaicini	Naročito zastupljeni u nekim vrstama
Šafran (<i>Curcuma longa</i>)	Kurkuminoidi	

Da bi se antioksidanti uspešno aplicirali kao prehrambeni aditivi, neophodno je pre upotrebe izvršiti njihovo testiranje. Antioksidanati u hrani imaju dvojaki značaj: i kao aditivi za očuvanje stabilnosti hrane i kao izvori esencijalnih antioksidanata *in vivo*. Protokol za testiranje antioksidanata pre upotrebe u hrani prikazan je na slici 10 (Becker i sar., 2004).



Slika 10. Protokol za testiranje antioksidanata

Mehanizmi dejstva antioksidanata u hrani mogu biti različiti i prikazani su u tabeli 8 (Pokorny i sar., 2001).

Tabela 8. Mehanizmi delovanja antioksidanata u hrani

VRSTE ANTIOKSIDATIVNOG DELOVANJA	MEHANIZAM ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI	ANTIOKSIDANT
Pravi antioksidanti	Inaktivacija lipidnih radikala	Polifenolna jedinjenja
Stabilizatori lipidnih hidroperoksida	Sprečavanje razlaganja lipidnih hidroperoksida na radikale	Polifenolna jedinjenja
Sinergisti	Podsticanje aktivnosti pravih antioksidanata	Limunska kiselina, askorbinska kiselina
Helirajući agensi	Vezivanje metala u neaktivna jedinjenja	Fosforna kiselina, proizvodi Maillardovih reakcija, limunska kiselina
Kvenčeri singletnog kiseonika	Prevođenje singletnog kiseonika u triplet kiseonik	Karotenoidi
Supstance koje redukuju hidroperokside	Redukcija hidroperoksida bez učešća radikala	Proteini, aminokiseline

Faktori koji utiču na aktivnost antioksidanata u hrani su: pH, temperatura, fermentacija, prisustvo metala. Na primer, sposobnost heliranja antocijana u kiseloj sredini je znat-

no slabija nego u baznoj sredini, dok je sposobnost otpuštanja vodonikovog atoma povećana. Proces deodorizacije sojinog ulja prouzrokuje gubitak 20% tokoferola, a proces beljenja 12% (Pokorny, 1987).

Veliki interes za prirodne antioksidante rezultat je svetskog trenda minimiziranja upotrebe ili potpunog eliminisanja sintetičkih prehrambenih aditiva zbog njihovog potencijalnog štetnog dejstva. Međutim, i prirodni antioksidanti imaju nedostatke, na primer slaba otpornost prema kiseoniku, svetlosti, visokim temperaturama i sušenju. Prema tome, i antioksidanti prisutni u hrani, kao i ostale komponente, se menjaju tokom procesa prerade hrane. U tabeli 9 su navedeni termički procesi prerade hrane koji imaju uticaj na oksidativnu stabilnost hrane i antioksidanata.

Tabela 9. Termički procesi prerade hrane

TERMIČKI PROCESI PRERADE	PRIMERI
Prerada na povišenoj temperaturi gde je voda medijum za prenos toplote	Pasterizacija Sterilizacija Blanširanje Uparavanje Ekstrudiranje
Prerada na povišenoj temperaturi gde je vazduh medijum za prenos toplote	Sušenje Pečenje
Prerada na povišenoj temperaturi gde je ulje medijum za prenos toplote	Prženje
Prerada na povišenoj temperaturi gde su talasi izvor energije	Zagrevanje mikrotalasima Zagrevanje infracrvenim zracima
Prerada na sobnoj temperaturi uz uticaj enzima	Fermentacija
Prerada na sobnoj temperaturi uz uticaj hemikalija	Dimljenje, sušenje
Prerada na sobnoj temperaturi uz uticaj vremena	Skladištenje (i u ohlađenom i u zamrznutom stanju)

Promene u antioksidativnoj aktivnosti hrane rezultat su hemijskih promena antioksidativnih jedinjenja prisutnih u proizvodu. Rezultat ovih promena može različito da utiče na krajnji antioksidativni status prehrambenog proizvoda, kao što je prikazano u tabeli 10.

Tabela 10. Promene antioksidativne aktivnosti hrane tokom procesa proizvodnje, prerade i skladištenja hrane

REZULTUJUĆA OTPORNOST HRANE PREMA OKSIDACIJI	PRIMERI PROMENA U HRANI KOJI UTIČU NA ANTIOKSIDATIVNU AKTIVNOST
Procesi pri kojima se povećava otpornost prema oksidaciji	<ul style="list-style-type: none"> • Transformacija antioksidanata u aktivnija jedinjenja (na primer glikozidi prelaze u aglikone, proizvodi Maillardovih reakcija); • Destrukcija prooksidanata (na primer supstance koje izazivaju fotosenzitivni efekat kod teških metala); • Sprečavanje pristupa kiseonika (na primer enkapsulacija).
Procesi pri kojima se smanjuje otpornost prema oksidaciji	<ul style="list-style-type: none"> • Destrukcija antioksidanata oksidacijom ili interakcija sa drugim komponentama hrane; • Gubitak antioksidanata isparavanjem; • Pобољшан pristup kiseonika (na primer tokom sušenja); • Stvaranje prooksidanata ili njihovo oslobađanje iz neaktivnih kompleksa.

Najintenzivnije promene nastaju pri brzom zagrevanju ili tokom dužeg stajanja. Hemijske promene koje se odigravaju su reakcije oksidacije, i to:

- *Oksidacija produktima oksidacije lipida* (lipidnim slobodnim radikalima (LOO^\bullet i LO^\bullet) i lipidnim hidroperoksidima LOOH);
- *Oksidacija singletnim kiseonikom* (u prisustvu pigmenta hlorofila);
- *Oksidacija tripletnim kiseonikom* (oksidacija radikala antioksidanata A^\bullet i formiranje hinona iz polifenolnih jedinjenja);
- *Oksidacija teškim metalima* (metalni joni u višim oksidacionim stanjima).

2.2.4. Promene antioksidanata tokom termičkih procesa prerade prehrambenih proizvoda

Iako termički tretmani imaju za cilj poboljšanje senzorne vrednosti hrane, kao posledica izlaganju visokim temperaturama mogu nastati i promene konstituenata hrane, smanjenje njihove nutritivne vrednosti, promene teksture, ali i hemijske promene antioksidanata. Promene koje se odigravaju tokom procesa koji zahtevaju povišene temperature, gde je voda medijum za prenos toplote, navedeni su u tabeli 11.

Tabela 11. Promene antioksidanata tokom termičke obrade hrane gde je voda medijum za prenos toplote

TIP REAKCIJE	PREKURSORI	PROIZVODI REAKCIJE
Denaturacija enzima	Oksidoreduktaze	Inaktivirani enzimi
Hidroliza	Heteroglikozidi	Aglikoni
Piroliza	Askorbinska kiselina	Produkti degradacije
Ekstrakcija	Vitamini, polifenoli	Prelazak u vodu za kuvanje

Umerene temperature, do 100°C, izazivaju denaturaciju proteina, inaktivaciju enzima i uklanjanje mikroorganizama. Neželjene prateće promene tokom umerenog zagrevanja su promena teksture, boje, ukusa i destrukcija termolabilnih nutrijenata. Gubitak vitamina je najbolji pokazatelj negativnih promena tokom termičkog tretmana. Transformacije tokoferola i destrukcija askorbinske kiseline su najčešći negativni efekti termičkih tretmana. Blanširanjem se inaktiviraju lipoksigenaze i na taj način sprečava njihovo katalitičko dejstvo tokom oksidacije lipida. Promena boje u voćnim sokovima je rezultat enzimskog tamnjenja polifenola, tj. njihove oksidacije u hinone koji nemaju antioksidativnu aktivnost. Oksidaciju polifenola katalizuju polifenoloksidaze u prisustvu kiseonika. Blanširanjem se inaktiviraju i polifenoloksidaze tako da polifenoli zadržavaju svoju strukturu i antioksidativnu aktivnost. Gubitak askorbinske kiseline i karotenoida se sprečava deaeracijom. Pasterizacija i sterilizacija su procesi koji imaju za cilj eliminisanje mikroorganizama. Pasterizacija se odvija na nižim temperaturama pa je stoga i bezbednija za konstituente hrane i antioksidante. Sterilizacija se odvija na višim temperaturama, pa ovaj proces utiče na značajniju promenu kvaliteta hrane. Uticaj kuvanja u vreloj vodi (barenje) na antioksidante

sličan je uticaju sterilizacije. Pozitivni efekti su inaktivacija oksidoreduktaza, dok su negativni efekti brojniji, na primer denaturacija proteina koji imaju antioksidativnu aktivnost, denaturacija hem pigmenata kojom se povećava mogućnost prooksidativne aktivnosti gvožđa, ekstrakcija antioksidanata u vodu koja se odbacuje. Uparavanje i koncentrovanje, takođe imaju negativan efekat na termalno labilne antioksidante. Ovim tehnološkim postupcima se katalizuje oksidacija lipida i smanjuje nutritivna vrednost hrane. Sa druge strane, kao posledica povišenih temperatura, katalizuju se reakcije karamelizacije i Maillardove reakcije, čiji proizvodi imaju takođe antioksidativno delovanje.

Kada se tokom tehnoloških procesa prerade kao medijum za prenos toplote koristi vazduh, promene antioksidanata se odigravaju daleko intenzivnije. Zbog primenjene više temperature i dužeg trajanja samog procesa, ove promene se odigravaju daleko intenzivnije na površini nego u unutrašnjosti proizvoda.

Spoljašnja temperatura proizvoda, tokom pečenja i prženja dostiže od 120 do 200°C, dok u unutrašnjim slojevima ne prelazi 100°C, što znači da je u unutrašnjosti, efekat ovih procesa isti kao kod kuvanja. Na površini su veoma intenzivni procesi pirolize, karamelizacije i Maillardovih reakcija. Najvažnije promene antioksidanata tokom ovih procesa prikazane su u tabeli 12.

Tabela 12. Promene antioksidanata tokom termičke obrade hrane kada je vazduh medijum za prenos toplote

REAKCIJA	PREKURSORI	PROIZVODI REAKCIJE
Karamelizacija	Šećeri, askorbinska kiselina	Helirajući makromolekuli
Maillardove reakcije	Šećeri, aminokiseline	Helirajući makromolekuli
Štrekerova degradacija	Dikarbonili, aminokiseline	Dihidroheterocikli
Oksidacija	Polifenolna jedinjenja	Hinoni
Hidroliza	Glikozidi, estri	Aglikoni, fenolne kiseline

Maillardove reakcije počinju da se odigravaju na temperaturama od 100 do 120°C, a iznad 150°C su veoma intenzivne. Međuproizvodi i proizvodi ovih reakcija mogu da redukuju hidroperokside, heliraju jone metala i imaju sposobnost „hvatanja“ slobodnih radikala. Proizvodi Maillardovih reakcija su inhibitori oksidacije lipida u biskvitima, poslastičarskim proizvodima, kobasicama i ekstrudiranim proizvodima (Yamaguchi, 1988; Yokota i sar., 1987).

2.3. BOBIČASTO VOĆE IZ FAMILIJA ERICACEAE I ROSACEAE KAO POTENCIJALAN IZVOR ANTIOKSIDANATA

Dobro je poznato da se povećanim konzumiranjem voća i povrća smanjuje rizik od raznih bolesti kao što su kancer, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti i dijabetes. Preporučene dnevne doze unosa voća i povrća iznose 400 g.

Bobičasto voće je uglavnom zastupljeno u familijama Ericaceae i Rosaceae. Porodica vriješovki, Ericaceae, obuhvata više od 1500 vrsta. To su drvenaste biljke koje većinom imaju oblik malih grmova. Listovi su im često zimzeleni, kožasti i sjajni. Biljke iz porodice Ericaceae imaju jestive plodove (bobice), koji su bogati šećerom i kiselinama, vitaminima (A i C), mineralima, biljnim vlaknima i brojnim bioflavonoidima. Jedu se u svježem ili prerađenom obliku, a neke od njih se koriste i u medicini.

Porodica ruža, Rosaceae, predstavlja najrašireniju i najvažniju vrstu gajenog i divljeg voća, a obuhvata više od 3000 vrsta. Plodovi mogu biti veoma različite građe, oblika i veličine. Mnoge samonikle vrste (šumsko voće) su kultivisane, a neke se sakupljaju i cene zbog posebnog ukusa i visoke vitaminske vrednosti. Plodovi divljih vrsta biljaka iz ove familije mogu se preraditi na različite načine: u voćne sokove, kompote, marmelade, žele, voćno vino, rakiju, likere itd. Ti su proizvodi vitaminski daleko vredniji od prerađevina kultivisanog voća. Kod većine ovih plodova najviše vitamina C i provitamina A je koncentrovano na kori ili neposredno ispod nje. Osušeni plodovi mogu se upotrebiti za spremanje ukusnih čajnih napitaka. Listovi ovih biljaka mogu se koristiti za salate i variva, pripremu čaja i u medicini (Grlić, 1986).

Bobičasto voće je bogato vlaknima i esencijalnim vitaminima i mineralima. Pored toga, značajan su izvor fitohemikalija, koje imaju značajnu biološku aktivnost i potencijalne doprinose zdravstvenom stanju. Pozitivni efekti su dokazani tokom oksidativnih oštećenja, na enzime za detoksifikaciju, imuni sistem, krvni pritisak, a takođe imaju i antiinflamatorno, antibakterijsko i antivirusno dejstvo (Duthie i sar., 2003). Sadržaj fitohemikalija u bobičastom voću zavisi od niza faktora, kao što su klimatski uslovi, stepen zrelosti, uslovi i mesto gajenja, postupka obrade i skladištenja voća (Häkkinen i Törrönen, 2000; Boyles i Wrolstad, 1993).

U poređenju sa drugim voćem, bobičasto voće je poznato po visokom sadržaju antocijana.

Najzastupljeniji aglikoni flavonoida u bobičastom voću su miricetin, kvercetin i kampferol (Häkkinen i sar., 1999). Pored toga, jestive bobice mogu imati i znatnu količinu

monomera flavan-3-ola, (+)-katehina i (-)-epikatehina, kao i dimere, trimere i polimere proantocijanidina. Koncentracija polimera je uglavnom veća od monomera i dimera. U tabeli 13 prikazan je pregled sadržaja najzastupljenijih polifenolnih jedinjenja u pojedinim predstavnicima bobičastog voća.

Tabela 13. Najzastupljenija polifenolna jedinjenja u pojedinim predstavnicima bobičastog voća

NARODNI NAZIV	ROD I VRSTA	FAMILIJA	POLIFENOLNA JEDINJENJA	LITERATURNI PODACI
Ribizla	<i>Ribes nigrum</i>	Grossulariaceae	Del-3-Rut; Cy-3-Rut; Del-3-Glc; Peo-3-Rut; Mal-3-Rut; Mal-3-Glc; Myr-3-Rut; Myr-3-Glc; Q-3-Rut; K-3-Glc	Matsumoto i sar., 2001. Frøytlog i sar., 1998. Hakkiinen in Auriola, 1998. Määttä i sar., 2003.
Ribizla	<i>Ribes nigrum</i>	Grossulariaceae	Cy-3-Glc-Rut; Cy-3-Soph; Cy-3-Glc; Cy-3-Xyl-Rut; Cy-3-Rut	Goiffon i sar., 1999.
Jagoda	<i>Fragaria ananassa</i>	Rosaceae	Pel-3-Glc; Cy-3-Glc; Pel-3-Ara; Ellagic acid	Goiffon i sar., 1999.; Bridle i Garcia-Viguera, 1997.; Amakura i sar., 2000.
Kupina	<i>Rubus spp.</i>	Rosaceae	Cy-3-Sop; Cy-3-Glc-Rut; Cy-3-Glc; Cy-3-Rut; Q-3-Gal; Q-3-Glc; Q-3-Rut; Q-3-XylGlcAc, lambertianin C	Hong i Wrolstad, 1990.; Cho i sar., 2004.; Degénéve, 2004.
Malina	<i>Rubus idaeus</i>	Rosaceae	Cy-3-Sop; Cy-3-Glc-Rut; Cy-3-Rut; Cy-3-Glc; Pel-3-Sop; Pel-3-Glc-Rut; Cy-3,5-DiGlc; Cy-3-Samb; Pel-3-Glc; Pel-3-Rut; sanguin H-6; lambertianin C; Q-3-Rut; Q-3-Glc; Q-3Glc-AC	Boyles i Wrolstad, 1993.; Mullen i sar., 2002.
Američka borovnica	<i>Vaccinium corymbosum</i>	Ericaceae	Del-3-Gal; Del-3-Glc; Cy-3-Gal; Del-3-Ara; Cy-3-Glc; Pet-3-Gal; Cy-3-Arab; Pet-3-Glc; Peo-3-Gal; Pet-3-Arab; Peo-3-Glc; Mal-3-Gal; Peo-3-Arab; Mal-3-Glc; Mal-3-Arab; kafeoilhinske kiseline; Q-3-Gal; Q-3-Glc; Q-3-Rut	Kader i sar., 1996. Goiffon i sar., 1999. Prior i sar., 2001. Cho i sar., 2004.
Brusnica	<i>Vaccinium macrocarpum</i>	Ericaceae	Cy-3-Gal; Cy-3-Ala; Cy-3-Gal; Cy-3-Ara; Myr-3-Gal; Q-3-Gal; Q-3-Rham	Huopalahti i sar., 2000. Prior i sar., 2001. Vvedenskaya i sar., 2004.
Zova	<i>Sambucus nigra</i>	Caprifoliaceae	Cy-3-Samb-5-Glc; Cy-3,5-DiGlc; Cy-3-Samb; Cy-3-Glc	Bridle i Garcia-Viguera, 1997.

Skraćenice: Cijanidin (Cy), Pelargonidin (Pel), Peonodin (Peo), Petunidin (Pet), Malvidin (Mal), Kvercetin (Q), Miricetin (Myr), Kampferol (K), Glukozid (Glc), Diglukozid (DiGlc), Soforozid (Sop), Ksilozid (Xyl), Acetilksilozid (XylAc), Arabinozid (Ara), Acetil-arabinozid (AraAc), Glukuronid (GlcAc), Ksilozilglukuronid (XylGlcAc), Acetilglukozid (GlcAc), Galaktozid (Gal), Ramnozid (Rham), Rutinozid (Rut), Sambubiozid (Samb)

Po navodima mnogih autora elaginska kiselina je zastupljena u većini jestivih bobica (Amakura i sar., 2000). Utvrđeno je da ona zauzima više od 50% ukupnih polifenolnih jedinjenja u jagodama i malinama (Häkkinen i sar., 1999). Ipak, slobodne elaginske kiseline je jako malo, ali je njena značajna količina detektovana nakon hidrolize, zajedno sa galnom kiselinom, kao proizvoda razgradnje elagitanina.

Jestive bobice sadrže i derivate hidroksicimetne kiseline, u manjim količinama, uključujući i kafeoil/feruloil estre (Maatta i sar., 2004).

Jestivo bobičasto voće (bobice) ima visok sadržaj vitamina C. Utvrđeno je da je količina bobica koja staje u ruku dovoljna da zadovolji preporučeni dnevni unos vitamina C. Bobičasto voće je bogato i folnom kiselinom, koja takođe snižava rizik od srčanih oboljenja i kancera, smanjenjem nivoa homocisteina, katalizovanjem reakcija nastajanja azot oksida i održavanjem stabilnosti DNK (Verhaar i sar., 2002; Key i sar., 2002).

Brojne *in vitro* studije potvrdile su da sekundarni metaboliti imaju pozitivne efekte na procese u ćelijama sisara, npr. na ekspresiju gena, apoptozu, zgrušavanje krvi, oksidaciju LDL, dilataciju krvnih sudova, signalizaciju između ćelija, modulaciju enzimske aktivnosti, deaktivaciju kancerogena i detoksifikaciju i da, na osnovu toga, mogu *in vivo* ispoljiti antikancerogeno dejstvo (Duthie i sar., 2000). Katsube i sar. (2003) saopštili su da ekstrakti borovnice, jer su bogati glikozidima delfinidina i malvidina, indukuju apoptozu leukemičnih ćelija HL60, ali i inhibiraju rast ćelija kancera debelog creva HCT116.

Flavonoli prisutni u bobičastom voću, npr. kvercetin, pokazali su inhibitorno delovanje na ciklooksigenazu i lipoksigenazu, enzime uključene u proces otpuštanja arahidonske kiseline, inicijatora inflamatornog odgovora u organizmu (Nijveldt i sar., 2001). Agullo i sar. (1994) su saopštili da kvercetin ispoljava citotoksičan efekat na ćelije karcinoma creva HT29 i CACO2 ćelije, indukuje apoptozu i inhibira rast leukemičnih ćelija HL60.

Epidemiološke studije koje povezuju unos bobičastog voća sa smanjenjem rizika od pojave patoloških oboljenja su još uvek relativno ograničene. Veći broj naučnih studija je urađen sa ciljem ispitivanja uticaja čistih (izolovanih) jedinjenja flavonoida na određena patološka stanja. Na primer, u studiji, koja je uključila ispitivanja u 7 zemalja tokom 25 godina, utvrđena je pozitivna korelacija između unosa flavonola i flavona i smrtnosti od kardiovaskularnih oboljenja (Hertog i sar., 1995). Studije sprovedene na životinjama potvrđuju da unos kvercetina putem ishrane smanjuje učestalost pojave kancera dojke i pluća (Verma i sar., 1988; Khanduja i sar., 1999). Intenzivna istraživanja usmerena su na ispitivanje antikancerogenih osobina elaginske kiseline. Otkrivena je sposobnost elaginske kiseline da inhibira metaboličku aktivaciju kancerogena (Das i sar., 1985), štiti DNK od alkilo-

vanja na mestima gde se vezuju kancerogeni (Barch i Fox, 1988), i reguliše ciklus i smrt ćelije (apoptozu) kancera. Ispitivanja uticaja ekstrakta maline na vazorelaksacionu aktivnost aorte, kod laboratorijskih zečeva, pokazala su da su elagitaninini aktivne komponente zaslužne za sprečavanje kardiovaskularnih oboljenja (Mullen i sar., 2002). Flavonoli, kvercetin i katehin, ispoljili su sinergističko delovanje tokom inhibicije zgrušavanja krvi i adhezije na kolagen (Pignatelli i sar., 2000).

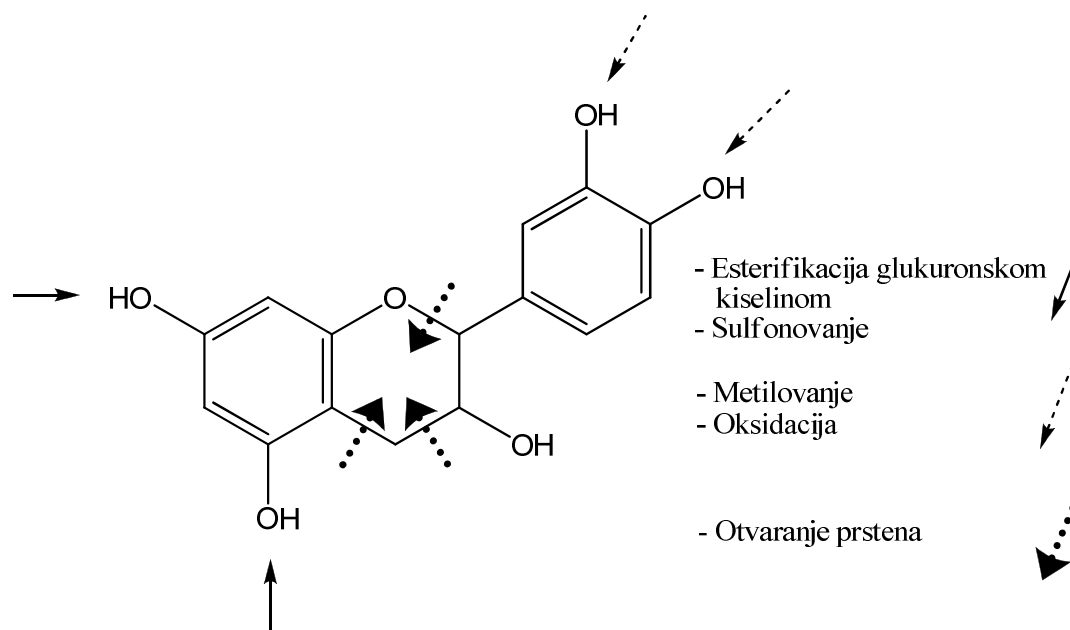
Veliki broj eksperimentalnih i epidemioloških studija se bavi određivanjem adekvatnih doza unosa poznatih prirodnih antioksidanata, kao što su vitamin E, vitamin C i karotenoidi. Neadekvatne doze antioksidanata mogu *in vivo* izazvati oksidativna oštećenja proteina, lipida i DNK i na taj način stvoriti predispoziciju za mnoga hronična oboljenja (Diplock i sar., 1998).

Iako su fitohemikalije iz bobičastog voća pokazale pozitivne efekte *in vitro*, da bi ispoljile sličan efekat i u ćelijama i tkivima, neophodno je da se apsorbuju iz creva. Apsorpcija zavisi od mnogobrojnih faktora, kao što su molekulska struktura, unete doze, osobine matriksa u kojem se nalaze fitohemikalije, stepen biokonverzije u crevima i tkivima, zdravstveni status, genetski faktori itd. Unos 240 g svežih jagoda ili 100 g smrznutih borovnica povećava antioksidativni kapacitet krvne plazme za 14 - 30%, što ukazuje da se fitohemikalije sa antioksidativnom aktivnošću nakon unošenja i apsorbuju u organizmu (Cao i sar., 1998; Kay i sar., 2002).

Nakon konzumiranja svežeg bobičastog voća ili sokova od bobičastog voća, zabeležene su male količine antocijana (manje od 0,1%) u neizmenjenom obliku u urinu (McGhie i sar., 2003). Antocijani su pronađeni i u plazmi, takođe u malim koncentracijama, 0,5 - 1 h nakon ingestije. Glikozidi antocijanidina se, za razliku od glikozida flavonola, pojavljuju u krvi jer ne podležu hidrolizi pod uticajem β -glukozidaza (Nemeth i sar., 2003). Savremene instrumentalne metode su ipak potvrdile i male količine glukuronida, metilovanih i sulfonovanih metabolita antocijana u urinu.

Aglikoni flavonola, kao što je kvercetin, su hidrofilnog karaktera i mogu pasivno difundovati kroz biološke membrane. Sa druge strane, glikozidi flavonola su hidrofilniji, što im značajno otežava difuziju kroz ćelijske membrane. Stoga je za njihovu apsorpciju neophodan neki transportni sistem (Hollman i sar., 1995; Wolfram i sar., 2002). U tom cilju Day i sar. (2001) su analizirali humanu plazmu 1,5 časova nakon ingestije luka. HPLC/MS analiza ukazala je na prisustvo glukuronida, sulfata i metilovanih konjugata kvercetina. Dakle, intenzivan metabolizam glikozida flavonola uključuje deglikozilaciju, esterifikaciju glukuronskom kiselinom, sulfonovanje i metilovanje. Nakon konzumiranja

luka utvrđeno je prisustvo ukupno 23 metabolita kvercetina u plazmi i urinu (Mullen i sar., 2004). Glukozidi kvercetina se deglikolizuju dejstvom β -glukozidaza u tankom crevu. Dobijeni aglikon se ne akumulira, već se metaboliše uridin-5'-difosfatglukuroniltransferazama, sulfotransferazama i/ili katehol-O-metiltransferazama (O'Leary i sar., 2003). Metaboliti kvercetina, koji uđu u cirkulaciju i imaju pristup jetri, mogu dalje da se metiluju, esterifikuju glukuronskom kiselinom i sulfonuju. Nemeth i sar. (2003) su saopštili da se glikozidi flavonola iz bobičastog voća mogu apsorbovati i u debelom crevu gde ih razlaže bakterijska flora creva. Na slici 11 su prikazana karakteristična mesta u molekulu kvercetina na kojima se odigravaju metaboličke modifikacije flavonola.



Slika 11. Metaboličke modifikacije molekula kvercetina

Flavan-3-oli, kao i njihovi dimeri, trimeri i oligomeri, zastupljeni su u bobičastom voću u većim količinama, ali su ispitivani samo apsorpcija i metabolizam (-)-epikatehina, (+)-katehina, čokoladei ekstrakta semenki grožđa. (-)-Epikatehin i (+)-katehin se nakon apsorpcije u organizmu pojavljuju u plazmi i urinu kao metilovani i sulfonovani metaboliti (Piskula i Terao, 1998). Ispitivanjem koncentracije metabolita (+)-katehina u urinu Donovan i sar. (2002) su zaključili da se flavan-3-oli veoma efikasno apsorbuju iz gastrointestinalnog trakta u cirkulaciju, i to oko 37% od unete doze. Ovo su značajno veće vrednosti procenta apsorpcije od flavonola i antocijana. Sa druge strane dimeri, trimeri i oligomeri flavan-3-ola se veoma slabo apsorbuju u organizmu (Gonthier i sar., 2003). Utvrđeno je da su molekuli čija je molekulska masa veća od 1000 g/mol preveliki da bi se apsorbovali u cirkulaciju (Degeneve, 2004). Ipak, oni su snažni antioksidanti koji prolaze kroz gastroin-

testinalni trakt i ispoljavaju aktivnost u organizmu. Takođe, postoji i mogućnost depolimerizacije makromolekula, i oslobađanja galne i elaginske kiseline koje se lakše apsorbuju.

Pored apsorpcije, aktivnost fitohemikalija *in vivo* zavisi i od intenziteta i načina njihovog metabolisanja u jetri i bubrezima i stepena njihove distribucije u tkivima. Polifenolna jedinjenja i njihovi metaboliti koji se ne apsorbuju u tankom crevu, prelaze u debelo crevo, gde ih bakterije prisutne u crevima katabolišu, odnosno dolazi do otvaranja aromatičnog prstena uz nastajanje katabolita niskih molekulskih masa (hipurna kiselina, benzoeva kiselina, derivati hidrosifenilsirćetne kiseline itd.) (Manach i sar., 2004).

Antocijani se pojavljuju u plazmi i izlučuju u urinu u daleko manjim količinama nego flavonoli. Aziz i sar. (1998) su detektovali 0,98% kvercetina u urinu, u odnosu na unetu dozu, dok su McGhie i sar. (2003) saopštili da je količina antocijana u urinu manja od 0,1% od unete doze. Nije razjašnjeno zašto su koncentracije antocijana u plazmi i urinu mnogo manje od koncentracija flavonola. Prva pretpostavka je, kao što je već rečeno, da se antocijani ne hidrolizuju sa β -glukozidazama i kao takvi su veliki da bi ušli u cirkulaciju. Drugi faktor koji smanjuje njihovu koncentraciju u humanim tečnostima je nizak pH, pri kojem se antocijani nalaze u obliku flavilijum katjona, ali podležu i strukturnim promenama (Clifford, 2000). U gastrointestinalnom traktu, cirkulaciji i tkivima gde pH vrednosti iznose oko 6, antocijani su u obliku halkona, čija je identifikacija mnogo teža u odnosu na crveno obojeni flavilijum katjon.

Termin biološka raspoloživost odnosi se na *in vivo* količinu i identitet molekula i njihovih metabolita koji se javljaju u cirkulaciji nakon njihovog unosa. Da bi se pojavila slobodna forma molekula ili metabolita u cirkulaciji, neophodno je zasićenje metaboličkih puteva sa „farmakološkim“ dozama (Scalbert i Williamson, 2000). Unos nutritivno relevantnih količina rezultuje intenzivnom deglikozilacijom, glukuronidacijom, sulfonovanjem i metilovanjem, u prisustvu brojnih enzima u jetri, tankom i debelom crevu.

Brojne *in vitro* studije ukazuju na uticaj ekstrakata bobičastog voća na proces stvaranja kancera putem inhibicije rasta i proliferacije ćelija kancera i indukcijom apoptoze (Katsube i sar., 2003; Liu i sar., 2002). Dodavanje smrznutih malina i jagoda u ishranu pacova sa iniciranim tumorom jednjaka, rezultovalo je smanjenjem njegove progresije (Kresty i sar., 2001). Sa druge strane, istraživanja Aziz i sar. (2002) nisu pokazala uspeh u sličnoj studiji. Ispitivanja na ljudima su pokazala da se nakon 5 nedelja konzumiranja soka od bobičastog voća (aronija, borovnica i ribizla) smanjuje broj oksidovanih baza DNK u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (Bub i sar., 2003).

In vitro studije pokazuju da ekstrakti borovnice, višnje, maline, ribizli, američke borovnice inhibiraju oksidaciju LDL (Heinonen i sar., 1998; Laplaud i sar., 1997).

Konzumiranje 330 ml soka od bobičastog voća dnevno u toku 2 nedelje povećava odgovor limfocita na aktivaciju mitogena i povećanje imune funkcije (Bub i sar., 2003).

Ishrana može uticati na poboljšanje neuroloških funkcija kod starijih osoba (Youdim i Joseph, 2001). Epidemiološke studije sa miševima ukazuju na zaštitno dejstvo ekstrakata bobičastog voća na gubitak moždanih funkcija izazvanih starenjem, kao što su pamćenje, učenje, motorika i neurološka transdukcija signala (Youdim i sar., 2002; Youdim i sar., 2000; Joseph i sar., 1998; Joseph i sar., 1999).

Uticaj brusnice na urinarni trakt se intenzivno ispituje još od dvadesetih godina XIX veka. Prvobitno mišljenje je bilo da je sniženje pH urina nakon konzumiranja brusnice odgovorno za pozitivne efekte kod infekcija urinarnog trakta. Međutim, brusnica sadrži proantocijanidine koji sprečavaju vezivanje *E. Coli* za epitelne ćelije urinarnog trakta (Howell i sar., 1998; Sobota, 1984). Objavljeno je nekoliko kliničkih studija koje potvrđuju zaštitni efekat soka i tableta brusnice kod infekcija urinarnog trakta (Kiel i Nashelsky, 2003). Na primer, kod žena koje su konzumirale 50 ml koncentrata brusnice tokom 6 meseci procenat recidiva iznosio je 16%, dok je u kontrolnoj grupi bio 36% (Kontiokari i sar., 2001). Stothers (2002) je saopštio da je redukcija rizika od urinarnih infekcija nakon uzimanja tableta od brusnice ukupno 14%, a nakon konzumiranja soka od brusnice 12%.

2.3.1. Borovnica (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae)



Borovnica je grm, visok do 50 cm. Raste u velikom mnoštvu gradeći prizemnu floru mnogih vlažnih i hladnih planinskih bukovih i četinarskih šuma i čistina. Borovnica cveta od maja do juna, a ukusni plodovi u obliku bobica sazrevaju od juna do septembra. Lekoviti su zreli plodovi i lišće. Plod je crnkastoplava okrugla i sočna bobica veličine graška, sa mnogo smeđih semenki. Bobice su dosta prijatnog, nakiselo-slatkog i malo oporog ukusa. Plava boja potiče od antocijana miritlina. Kod droga se koristi zreo plod (*Myrtilli fructus*) i list (*Myrtilli folium*). Hemijski sastav ploda je:

- *Organske kiseline, posebno limunska i jabučna*

- Šećer (do 30%)
- Vitamin C (oko 6%)
- Tanini
- Kompleks B vitamina
- Karoten (oko 1%)
- Masne kiseline (30%)
- Proteini (oko 18%)

Listovi borovnice su bogati izvor minerala (kalijum, natrijum, mangan, hrom, gvožđe, bakar i dr.), vitamina C, organskih kiselina, a sadrže i saponine, šećer (oko 18%) i tanine.

Kao lek se upotrebljava sveža i suva bobica, sok iz zrelih bobica, sirup i vino. Zbog visokog sadržaja tanina i pektina borovnica deluje kao blago sredstvo protiv dijareja, katar creva i raznih upala sluznice itd. Iz zrelih plodova borovnice spravlja se ekstrakt, i od njega se izrađuju dražeje za jačanje očnog vida, jer povoljno deluje na vidni purpur. Zrele bobice se koriste kao dijetetsko sredstvo, sredstvo za jačanje, protiv dečijih proliva i akutnog enterokolita odraslih. Zbog prisutnog arbutozida, list deluje diuretično. Takođe, list ima dejstvo kardiotonika, holerika i adstringensa. Borovnica nije škodljiva i može se stalno upotrebljavati.

2.3.2. Brusnica (*Vaccinium macrocarpon* L., Ericaceae)



Brusnica je zimzeleni polugrm čiji su tvrdi, crveni, sočni plodovi bogat izvor različitih zaštitnih i hranljivih sastojaka. Brusnica potiče iz Severne Amerike.

Razlikuje se evropska brusnica (*Vaccinium vitis-idaea*) i američka brusnica (*Vaccinium macrocarpon*), a plodovi američke brusnice su dosta krupniji od evropske. Kao i ostalo bobičasto voće, brusnica je bogat izvor flavonoida, uključujući antocijane, flavonol glikozide i proantocijanidine (kondenzovane tanine), kao i fenolnih kiselina. Pigmenti brusnice, uglavnom antocijani, su peonidin i cijanidin galaktozidi. U ekstraktu su otkriveni brojni bioflavonoidi (npr. kvercetin i miricetin), fenolne kiseline (*p*-kumarinska,

sinapinska, kafena i ferulna kiselina) i β -karoten. Brusnica je bogat izvor vitamina C, a sadrži i vitamine B grupe, kao i različite minerale (kalijum, natrijum, fosfor, magnezijum, gvožđe i bakar).

Zahvaljujući ovakvom hemijskom sastavu, brusnica ispoljava različite pozitivne efekte na zdravlje. Flavonoidi imaju snažno antioksidativno delovanje, čime smanjuju rizik oboljevanja od različitih karcinoma (posebno raka dojke i raka debelog creva). U eksperimentima sa životinjama u laboratorijskim uslovima, primena brusnice je ne samo sprečavala rast ćelija raka, već i usporila njihovo metastaziranje, što se pripisuje njenom visokom sadržaju bioflavonoida. Različita antioksidativna jedinjenja brusnice osim toga pomažu i u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja. *p*-Hidroksi benzoeva kiselina, prisutna u velikoj koncentraciji u brusnici, se u jetri metaboliše u hipurnu kiselinu koja predstavlja prirodni antibiotik, tako da se brusnici pripisuju antibakterijska i antifungalna svojstva. Budući da flavonoidi iz brusnice imaju posebno antibakterijsko delovanje zahvaljujući sposobnosti vezivanja za receptore u urinarnom traktu, preporučuje se njena svakodnevna upotreba osobama sa čestim upalama urinarnih puteva. Klinička istraživanja su pokazala da sastojci iz brusnice uništavaju i *Helicobacter pylori*, koji se smatra uzročnikom čira na želucu. Osim toga, brusnica uništava i bakterije koje su naseljene u ustima i koje vremenom dovode do raznih bolesti zuba i desni.

Antocijani i proantocijanidini brusnice, osim antikancerogenog delovanja, pomažu i pri obnovi ćelija koje su odgovorne za vid. Brusnica, uz sve to, deluje i na snižavanje nivoa glukoze u krvi, pa se preporučuje dijabetičarima.

2.3.3. Šipak (*Rosa canina* L., Rosaceae)



Šipak je listopadni grm visine 2 - 3 m i obrastao bodljama. Raste uz ograde, rubove šuma i po šikarama. Cvetovi su bele do belo-ružičaste boje. Plodovi su crvene boje, veličine oko 2 cm i sadrže veliki broj tvrdih semenki. Veoma je rasprostranjen u celoj Evropi, severnoj Africi, kao i u severnoj i zapadnoj Aziji.

Šipak je lekovita biljka koja, uz crnu ribizlu, ima najviše vitamina C (400 - 1400 mg/100 g). Pored toga ima mnogo vitamina P, karotena (provitamin A), vitamina B₂ i E kao i 40 bioloških jedinica vitamina K po gramu. U zelenom i prezrelom šipku ima manje vitamina nego u poluzrelom. Šipak sadrži i flavonoide, tanine, limunsku i jabučnu kiselinu,

pektin, šećere (saharozu i invertni), malo neutralnih lipida i vrlo malo etarskog ulja, od koga potiče prijatan miris čaja, koncentrata i raznih galenskih preparata od šipka.

Plod ima specifičan miris i slatko-kiseli ukus. Od plodova se može praviti lekovito vino koje predstavlja odličan vitaminski napitak. Ipak, najčešće se koristi kao čaj za uživanje i osveženje koji povoljno deluje na rad srca i bubrega. Može se uzimati u većim količinama bez štetnih posledica jer je prirodni adstrigent, antibakterijski agens, antioksidant, arteriosklerotik, antiskorbut, antidiroik, diuretik, depurativ, holeretik.

Proizvodi od šipka otklanjaju prolećni umor, malaksalost, bledolikost i nervozu, kao i sve ostale tegobe povezane sa smanjenim sadržajem vitamina C. Šipak povoljno deluje na probavni trakt i na izlučivanje urina bez ikakvih nadražaja bubrega. Čaj od šipka preporučuje se za sprečavanje stvaranja kamena u bubrezima i urinarnim kanalima. Isto tako, koristi se kod upalnih procesa bubrega, bubrežne čašice i bešike. Cvetne latice šipka upotrebljavaju se za pripremanje čaja kod krvarenja iz želuca, creva, pluća i hemoroida, kao i za smirivanje proliva i želudačnih grčeva.

2.3.4. Glog (*Crataegus oxyacantha* L., Rosaceae)



Beli i crveni glog su trnoviti žbunovi ili nisko drveće. Više je rasprostranjen beli glog. Glog raste po suvljim hrastovim i bukovim šumama, često u šikarama, kao i uz ograde i živice. Kao droga se koristi osušeni list, cvet i zreo plod. Cvet i list gloga sadrže, kao aktivne principe, komplekse flavonoidnih heterozida u količini od 1 - 2%. Kompozicija ovog kompleksa zavisi od biljne vrste i porekla. U cvetovima dominiraju hiperozid i viteksin. Pored toga, u drogama se može nalaziti i 3% oligomernih procijanidina (jedinjenja nastala međusobnom kondenzacijom 2 - 8 molekula katehina i/ili epikatehina). Plodovi sadrže mnogo manje flavonoida (oko 0,1%), ali u njima ima više šećera, organskih kiselina, karotenoida i vitamina C.

Glog se smatra jednom od najvrednijih i najdelotvornijih kardioprotetorskih biljaka za srce. Potvrđeno je da procijanidini i flavonoidi gloga imaju pozitivan inotropni, dromotropni, negativan batmotropni efekat, da pojačavaju koronarni i protok krvi kroz miokard i da smanjuju periferni otpor u krvnim sudovima. Izvanredan je regulator krvnog pritiska (ne

samo da snižava povišen, već povišava prenizak) kod oslabljenog srca. Njegova upotreba daje dobre rezultate kod oštećenog srčanog mišića u starosti, kod upale srčanog mišića, kod zakrećenja krvnih sudova srca i angine pektoris.

Svež sok, droga, jednostavni galenski preparati, alkoholno-vodeni ekstrakti i fitopreparati izrađeni od gloga, koriste se kao dopunska terapija srčane insuficijencije. Preparati gloga deluju i kao blagi diuretici.

2.4. PREVENCIJA OKSIDATIVNOG STRESA ISHRANOM

2.4.1. Uloga funkcionalne hrane

Naučnici su odavno otkrili vezu između hrane i zdravlja. Nauka o ishrani odavno je utvrdila kompleksnu interakciju hrane i našeg prirodnog sistema odbrane.

Proučavajući sve štetne uticaje procesa oksidacije u biološkim sistemima, ne smeju se zanemariti i štetni efekti oksidacije koje ovaj proces izaziva u hrani. Kvarenje hrane sa vremenom je neizbežno, a sa hemijskog stanovišta, kiseonik je direktan uzročnik ovoga procesa (Shahidi i sar., 1992). Podaci ukazuju da čak polovina proizvedenog voća i povrća propadne nakon branja kao posledica kvarenja.

Višestruko je istaknut značaj i funkcija antioksidanata u prevenciji mnogih bolesti. S obzirom da naš endogeni antioksidativni sistem odbrane nije adekvatan da spreči u potpunosti prekomernu produkciju slobodnih radikala i oksidativni stres, neophodno je unošenje dodatnih količina antioksidanata u vidu dodataka ishrani.

Zbog dokazanih toksičnih efekata sintetskih antioksidanata opšti trend u svetu je iznalaženje prirodnih izvora za njihovo dobijanje.

Dodatna zaštita i očuvanje antioksidativnog statusa organizma postiže se sa ishranom obogaćenom prirodnim antioksidantima. Dodaci ishrani pružaju prednost zbog olakšanog unosa i veće biološke raspoloživosti u ljudskom organizmu.

Tako, hrana dobija status tzv. „funkcionalne hrane“ i tada mora da ima dvojaku funkciju:

- *da ispunjava nutritivne zahteve;*
- *da sprečava i odlaže pojavu hroničnih bolesti.*

Sam termin *funkcionalna hrana* ušao je u upotrebu još 80-tih godina prošlog veka, i danas se definiše kao *hrana ili sastojak hrane, dodat u količini koja obezbeđuje nutritivnu vrednost i pozitivno deluje na zdravlje pojedinca, njegovu fizičku sposobnost i mentalno zdravlje* (Bowry i Stocker, 1993).

Razvoj industrije i popularizacija upotrebe industrijski obrađene hrane, postao je ozbiljan atak civilizacije na zdravlje. Hrana koja se masovno konzumira, poput mlečnih proizvoda, hleba, sokova i napitaka, mesa, prerađenog povrća, znatno bi doprinela boljem zdravlju, ukoliko bi se proizvodila kao funkcionalna hrana, uz dodatak antioksidanata prirodno porekla.

Epidemiološka ispitivanja potvrđuju teoriju, da prirodni antioksidanti mogu da spreče rani razvoj bolesti uzrokovanih reaktivnim kiseoničnim vrstama. Stoga, konzumiranje hrane bogate prirodnim antioksidantima (voće, povrće, prirodni sokovi, žitarice, vino, čokolada, itd.) kao i prerađene hrane obogaćene istim, obezbeđuje željeni antioksidativni status i pomaže prevenciji razvoja bolesti u kojima je oksidativni stres ključni uzročnik. Na slici 12 prikazana je zdravstvena korist upotrebe hrane obogaćene prirodnim antioksidantima (Hardy, 2000).

Veliki izazov koji se nameće naučnicima na polju nutricionizma, hemije hrane i fiziologije, je određivanje optimalnog unosa prirodnih antioksidanata u funkcionalnu hranu. Za to je potrebno dobro poznavanje metabolizma ovih supstanci, apsorpcije, distribucije i biološke raspoloživosti, njihovih mehanizama konjugacije u organizmu i samog eliminisanja metabolita.



Slika 12. Prirodni antioksidanti, funkcionalna hrana i zdravstvena korist

Sve više se radi na pronalaženju novih antioksidanata visoke antioksidativne moći, niske toksičnosti, i dobre rastvorljivosti u vodenoj i lipidnoj fazi, u cilju proizvodnje nove i raznovrsne funkcionalne hrane koja bi uticala na poboljšanje kvaliteta života.

Američka asocijacija za ishranu je objavila osnovne definicije pojmova koji se koriste u terminologiji kvalitetne ishrane (Bloch i Thomson, 1995):

- *Obogaćena hrana* – obrađena hrana u koju su dodati sastojci bogati prirodnim lekovitim supstancama. Ovo uključuje i genetski modifikovanu hranu;
- *Funkcionalna hrana* – hrana ili modifikovani sastojak hrane koji može pozitivno delovati na zdravlje, u većoj meri od uobičajenih nutrijenata;
- *Lekovita hrana* – hrana ili nutrijent koji ima potencijalnu upotrebu u lečenju i medicini, uključujući i prevenciju i lečenje bolesti;
- *Fitoheikalije* – supstance prisutne u voću i povrću koje se unose svakodnevno (u količinama od po nekoliko grama) i imaju potencijal da menjaju metabolizam, te sprečavaju kancerogene i mutagene procese;
- *Nutrijent* – hrana ili sastojak hrane koji ima povoljan uticaj na zdravlje, uključujući prevenciju i lečenje bolesti. Takođe, nutrijent je definisan i kao prehrambeni proizvod koji se unosi ili primenjuje enteralno, pod medicinskim nadzorom i u dozama koje su preporučene kod nekih oboljenja;
- *Hemopreventivni agensi* – nutritivni ili drugi sastojci hrane koji se naučno ispituju kao potencijalni inhibitori kancerogeneze (Hardy, 2000).

U tabeli 14 su navedeni funkcionalni sastojci ishrane (International Food Information Council Foundation, 2006).

Utvrđeno je da je antioksidativna aktivnost jedne čaše crnog vina (150 ml) ekvivalentna aktivnosti 12 čaša belog vina, dve šolje čaja, 3,5 čaše soka od borovnice ili piva, 4 jabuke, 5 glavica luka, 5,5 patlidžana, 7 čaša soka od pomorandže i 20 čaša soka od jabuke (Paganga i sar., 1999). Prilikom ispitivanja sposobnosti inhibicije LDL oksidacije za crno vino utvrđena je manja IC_{50} vrednost ($1,7 \mu M$) nego za belo vino ($2,9 \mu M$) (Vinson i Hontz, 1995). Renaud i Lorgeril (1992) su objavili da umereno konzumiranje crnog vina smanjuje rizik od kardiovaskularnih oboljenja zbog sposobnosti polifenolnih jedinjenja prisutnih u vinu da sprečavaju agregaciju trombocita. U grožđu su prisutni: antocijani, fenolne kiseline, flavonoli, flavanonoli i flavan-3-oli (Kinsella i sar., 1993).

Tabela 14. Funkcionalni sastojci ishrane

KLASA/KOMPONENTE	IZVOR	POTENCIJALNO DEJSTVO
Karotenoidi		
β-Karoten	Šargarepa, voće	Neutrališe slobodne radikale, jača ćelijski antioksidativni sistem odbrane
Lutein, zeaksantin	Kelj, spanać, kukuruz, jaja, citrusi	Štite vid
Likopen	Paradajz i proizvodi od paradajza	Štiti prostatu
Flavonoidi		
Antocijani	Bobičasto voće, grožđe, višnje, trešnje	Jačaju ćelijski antioksidativni sistem odbrane
Flavanoli – katehini, epikatehini, procijanidini	Čaj, kakao, čokolada, jabuke, grožđe	Štite kardiovaskularni sistem
Flavanoni	Citrus voće	Neutrališu slobodne radikale, jačaju ćelijski antioksidativni sistem odbrane
Flavonoli	Luk, jabuke, čaj, brokoli	Neutrališu slobodne radikale, jačaju ćelijski antioksidativni sistem odbrane
Proantocijanidini	Brusnica, kakao, jabuke, jagode, grožđe, vino, kikiriki, cimet	Štite urinarni trakt i kardiovaskularni sistem
Izotiocijanati		
Sulforafan	Karfiol, brokoli, kupus, kelj	Potpomaže detoksifikaciju i jača ćelijski antioksidativni sistem odbrane
Fenolne kisline		
Kafena kiselina, ferulna kiselina	Jabuke, kruške, citrusi, neke vrste povrća	Jačaju ćelijski antioksidativni sistem odbrane, štite kardiovaskularni sistem i vid
Sulfidi/Tioli		
Dialil sulfid, alilmetil trisulfid	Beli i crni luk, praziluk, vlašac	Potpomažu detoksifikaciju, štite kardiovaskularni i imuni sistem
Ditioltioni	Povrće iz familije Cruciferae – brokoli, kupus, kineski kupus	Štite imuni sistem

U 1 gramu soje ima 1 mg izoflavona koji pokazuju antitumorska dejstva. Dnevni unos od 25 - 50 mg izoflavona značajno smanjuje rizik od kardiovaskularnih oboljenja (Gibaldi, 2001).

Kakao i proizvodi od kaka (mlečna i crna čokolada) imaju visok sadržaj polifenola. U svežem semenu kaka zastupljeni su monomeri procijanidina i oligomeri epikatehina

(Dreosti, 2000). Pored njih prisutni su i kvercetin i njegovi glikozidi, izoviteksin, polifenoli klovamid i deoksiklovamid, kao i antocijani koji daju ružičastu boju semenu. Tokom prerade, antocijani, procijanidini i katehini prelaze u hinone koji se dalje polimerizuju ili povezuju sa proteinima u smeđa nerastvorna jedinjenja. Utvrđeno je da 41 g mlečne čokolade ima isti sadržaj polifenola kao i jedna čaša crnog vina. Čokolada ima sposobnost inhibicije oksidacije LDL *in vitro* (Dreosti, 2000). Po navodima Duke (2000) svakodnevno konzumiranje dve kašike kakaa u šolji mleka ili vode potpomažu u lečenju Parkinsonove bolesti, mastitisa, oboljenja jetre, groznice, cistitisa, prehlade, opekotine, astme, bronhitisa, dijabetesa i gojaznosti. Takođe, utvrđeno je da čokoladni napitak redukuje mutagenu aktivnost heterocikličnih amina u Amesovom testu *in vitro* i *ex vivo* (Yamagishi i sar., 2000).

2.4.2. Uloga antioksidanta u prevenciji kancerogenih i mutagenih procesa

Kancer je oboljenje kod kojeg su procesi proliferacije, razvitka i smrti ćelije poremećeni. Proliferacija predstavlja proces deobe ćelije i ona se odigrava tokom celog života. Ovaj proces je znatno intenzivniji kod ćelija embriona dok se nakon završetka razvitka ćelije svodi na minimum. Ipak, u nekim tkivima ćelije nastavljaju intenzivnu proliferaciju (ćelije krvnih zrnaca, epitelne ćelije pokrovnog tkiva, ćelije reproduktivnih organa itd.).

Kancerogeneza je složeni proces prelaska normalne ćelije u maligno stanje, a agensi koji indukuju taj proces zovu se kancerogeni. Eksperimentalne studije na životinjama ukazale su da se proces kancerogeneze odvija u tri faze: inicijacija, promocija (propagacija) i progresija. U fazi inicijacije nastaju promene na DNK koje mogu da se ustale u nekoliko narednih ciklusa proliferacije ćelija, ukoliko se ne izvrši reparacija oštećenja. Fazu promocije karakteriše ekspresija izmenjenog segmenta DNK. Promene nastale u ovoj fazi klinički se karakterišu kao premaligna stanja. U fazi progresije premaligna lezija se razvija u malignu. Opšta osobina maligno transformisanih ćelija jeste da gube neka svojstva normalnih ćelija od kojih potiču i da ne podležu kontrolnim mehanizmima regulacije rasta, deobe i diferencijacije ćelija (Bogdanović, 2000).

Kancerogeni procesi mogu da započnu u gotovo svakom organu, ali tkiva kod kojih je proliferacija ćelija inače intenzivnija i koja su hronično izložena spoljašnjim uticajima (pluća, creva itd.) su posebno podložna.

Tumor je svako nagomilavanje ćelija preko one količine koja je potrebna za razvoj, oporavak ili funkciju ćelije. Tumor može biti benigni i maligni, gde maligni tumor brže raste i ima tendenciju invazije na susedna tkiva.

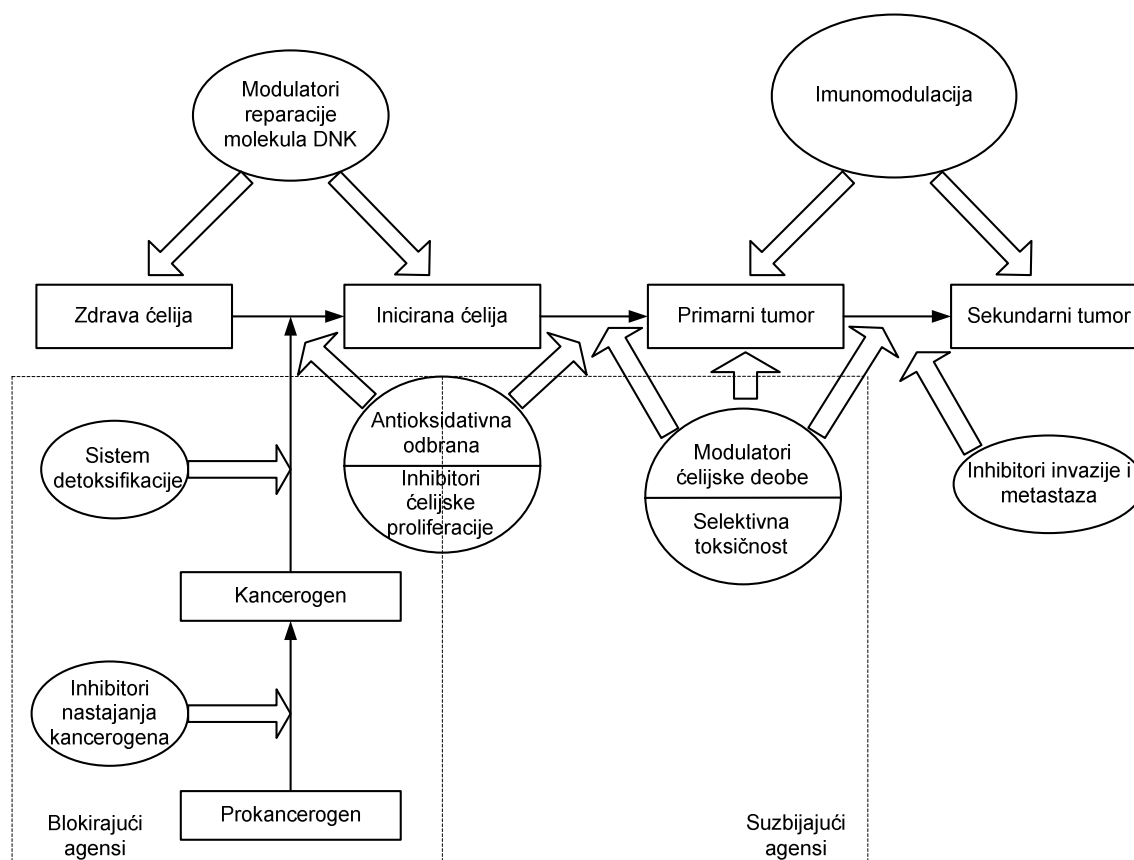
Tokom rane faze razvoja kancera dešavaju se greške u DNK kodiranju gena koji određuju fenotip ćelije, odnosno onih koji nose informaciju o strukturi, funkciji i životnom ciklusu ćelije. Kod ćelija kancera mutacijama na protoonkogenima (geni koji su veoma osetljivi na mutacije) formiraju se onkogeni koji dalje kontrolišu deobu, diferencijaciju i smrt ćelije, kao i efikasnost obnavljanja oštećene DNK (Anderson i sar., 1991; Fearon i Vogelstein, 1990). Normalne ćelije prolaze ograničen broj deoba pre starenja i smrti, a kada je oštećena normalna ćelija ona se eliminiše apoptozom. Bez obzira na poreklo mutacije DNK u protoonkogenu, karakteristika ovakvih ćelija je da one favorizuju proliferaciju i preživljavanje oštećene populacije ćelija umesto eliminacije apoptozom (Nowell, 1976). Tako transformisane ćelije mogu postati besmrtne i stvoriti kontinuiranu ćelijsku liniju.

U savremenoj populaciji sve veći procenat uzroka smrtnosti su hronična oboljenja kao što su infarkt, šlog i kancer. Još u XIX veku konstatovano je da porast industrijalizacije povećava broj obolelih od kancera (Tanchou, 1843; World Health Organization, 1997). Ni nakon brojnih laboratorijskih i epidemioloških istraživanja nisu u potpunosti objašnjeni faktori koji uslovljavaju pojavu kancerogenih oboljenja. Doll i Peto (1981) su utvrdili da je za 35% kancera odgovorna ishrana. Centralnu ulogu ishrane u sprečavanju kancerogenih pojava potvrdio je i Svetski fond za ispitivanje kancera (World Cancer Research Fund, 1997). Interakcije između ishrane i bioloških procesa koji vode ka pojavi kancera su veoma kompleksne. Iako je pronađen veliki broj kancerogenih supstanci u ishrani, ljudski organizam poseduje svoje odbrambene mehanizme zaštite, koji su dovoljni, ukoliko izlaganje nije hronično. Još od ranih '80-ih veliki broj istraživanja potvrđuje zaštitni efekat biljne ishrane (voće, povrće itd.) koji je i prihvaćen od strane nutricionista (World Cancer Research Fund, 1997; Block i sar., 1992; Steinmetz i Potter, 1996). Nakon brojnih ispitivanja objavljeno je da je dnevno neophodno unositi pet porcija od po 80 g voća i povrća, jer je utvrđeno da najveći konzumenti voća i povrća u populaciji imaju dva puta manji rizik od nastajanja kancera (Steinmetz i Potter, 1991).

Razvoj onkologije, naučna ispitivanja i kliničko lečenje tumora otpočeli su početkom XX veka, ali je tek '80-ih godina, razvojem molekularne biologije, omogućeno bolje razumevanje biologije tumora. Ispitivanja se vrše na izolovanim ćelijama koje se uzgajaju *in vitro* kao i na eksperimentalnim životinjama. Ispitivanja na eksperimentalnim životinjama obično zahtevaju velike doze kancerogena da bi se dobio veliki prinos ćelija kancera u toku eksperimenta. Međutim, indukcija kancera u ljudskom organizmu zahteva njegovo izlaganje kompleksnom sklopu kancerogenih stimulanasa tokom dužeg vremenskog perioda. *In*

in vitro biološki testovi na ćelijskim linijama se mogu koristiti za skrining prirodnih proizvoda ili sintetskih organskih jedinjenja radi otkrivanja njihove potencijalne aktivnosti u terapiji tumora. U ovim testovima koriste se neoplastične ćelijske linije humanog porekla ili poreklom od tumora drugih sisara. Sposobnost jedinjenja, koje se testira, da inhibira rast ovih tumorskih ćelija u kulturi predstavlja indicaciju njegove potencijalne vrednosti kao terapijskog sredstva *in vivo* (Lieberman i sar., 2001).

Antikancerogene supstance koje su prisutne u ishrani generalno se mogu podeliti na blokirajuće agense – oni koji deluju tokom faze inicijacije kancerogeneze, i suzbijajuće agense – oni koji usporavaju ili vraćaju proces kancerogeneze unazad u kasnijim fazama (Johnson i sar., 1994; Wattenberg, 1990). Šematski prikaz mehanizma dejstva prikazan je na slici 13.



Slika 13. Hipotetička mesta dejstva antikancerogenih supstanci iz hrane tokom progresivne kancerogeneze

Iako smanjen unos energije, proteina i mikronutrijenata može da poveća rizik od kancera zbog smanjenja imuniteta, utvrđeno je da je u populacijama gde je neuhranjenost česta pojava, kancer manje zastupljen. Sa druge strane, u razvijenijim zapadnim zemljama prevelik unos hrane i nedostatak fizičke aktivnosti se smatraju glavnim uzročnicima sve

učestalijoj smrtnosti od kancera. Svetski fond za ispitivanje kancera (World Cancer Research Fund, 1997) je objavio neke generalne preporuke: ishrana treba da bude nutritivno adekvatna i raznovrsna, bazirana na voću i povrću, mahunarkama i minimalno obrađenim ugljenohidratnim proizvodima. Nije dokazano da su masnoće direktno povezane sa rizikom od pojave kancera, ali je preporučeno da masnoće ne treba da učestvuju sa više od 30% unete energije, zbog rizika od gojaznosti.

Mutacije nastaju kao rezultat oksidativnog oštećenja DNK delovanjem slobodnih radikala nastalih tokom aerobnog metabolizma (Feig i sar., 1994). Čelije biljaka i životinja su izgradile odbrambene sisteme koji uključuju dejstvo antioksidanata. Mnoštvo lipo- i hidrosolubilnih antioksidativnih jedinjenja i enzima nalaze se u intra- i ekstracelularnim prostorima gde je najveća opasnost od prooksidativnog oštećenja. Većina ovih sistema zavisi od vrste i količine antioksidanata unetih ishranom. Dnevni unos polifenolnih jedinjenja može da dostigne i 1 g, gde su od toga nekoliko desetina grama flavonoidi.

Ferrari i Torres (2003) su grupisali nutrijente po mehanizmu antikancerogenog delovanja na:

- *Antioksidante koji štite ćelijske membrane, organele i DNK od štetnog dejstva ROS;*
- *Promotore popravke oštećenja na DNK;*
- *Antiangiogene agense;*
- *Antagoniste estrogena;*
- *Promotore apoptoze.*

3.0. EKSPERIMENTALNI DEO

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen u laboratorijama: Odeljenja za Organsku hemiju i Analitičku hemiju Tehnološkog Fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, Zavoda za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici, Departmana za biomedicinske nauke Instituta za Molekularnu farmakologiju i toksikologiju Univerziteta veterinarske medicine u Beču i Centra za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu.

Svi reagensi i hemikalije upotrebljeni u eksperimentalnom radu bili su analitičke čistoće. Metanol, natrijumkarbonat, sirćetna kiselina, aluminijum(III)-hlorid, natrijumacetat, proizvedeni su u "Zorki", Šabac.

Folin-Ciocalteu reagens, hlorogenska kiselina, rutin, galna kiselina, protokatehinska kiselina, genistinska kiselina, vanilinska kiselina, kafena kiselina, hlorogenska kiselina, kumarinska kiselina, ferulna kiselina, gvožđe(II)-hlorid, 5,5-dimetil-1-pirolin-N-oksid (DMPO), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH*), Na₂HPO₄, kalijumsuperoksid, 2-*terc*-butil-4-hidroksianizol (BHA), su proizvedeni u Sigma Chemical Company, SAD.

Vodonik peroksid, acetonitril, dimetilformamid (DMF), dimetilsulfoniloksid (DMSO), pufer pH 1 (KCl/HCl) kao i Chromabond C18 kolone za SPE proizvedeni su u J.T.Baker, Deventer, Holandija.

Amonijumacetat je proizveden u „Kemika“, Zagreb, Hrvatska, a *m*-fosforna kiselina u „Riedel-de Haën“, Nemačka.

Pufer pH 4,5 (sirćetna kiselina/natijumacetat) i kraunetar su proizvedeni u Merck, Darmstadt, Germany.

Kao biljni materijal korišćeni su osušeni plodovi bobičastog voća tj. bobice: borovnice, *Vaccinium myrtillus* L.; brusnice, *Vaccinium macrocarpon* L.; šipka, *Rosa canina* L. i gloga, *Crataegus oxyacantha* L., kupljeni u biljnoj apoteci.

3.1. DOBIJANJE EKSTRAKATA BOBICA

Osušeni plodovi bobičastog voća (20 g) macerirani su 80% acetonom (250 ml), uz dodatak 0,5% glacijalne sirćetne kiseline, na sobnoj temperaturi, u toku 24 h. Dobijeni

macerat je profiltriran, a postupak maceracije je ponovljen još jednom. Dobijeni ekstrakti su spojeni i koncentrovani na rotacionom vakuum uparivaču do suva, pri čemu su izmerene mase suvih ostataka iznosile:

Borovnica, <i>Vaccinium myrtillus</i> L.:	$m = 9,9756 \pm 0,1457$ g
Brusnica, <i>Vaccinium macrocarpon</i> L.:	$m = 15,2499 \pm 0,2469$ g
Šipak, <i>Rosa canina</i> L.:	$m = 4,2010 \pm 0,1021$ g
Glog, <i>Crataegus oxyacantha</i> L.:	$m = 5,3334 \pm 0,1753$ g

Dobijeni ekstrakti prečišćeni su i frakcionisani primenom ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE) (slika 14).

3.2. EKSTRAKCIJA NA ČVRSTOJ FAZI – PREČIŠĆAVANJE I FRAKCIONISANJE EKSTRAKATA BOBICA

3.2.1. Postupak prečišćavanja polaznog ekstrakta

Za uklanjanje organskih kiselina, ostataka šećera, aminokiselina, proteina, vitamina C i drugih interferirajućih komponenti, kao i za prevođenje polifenolnih jedinjenja iz vodeno u metanolni rastvor, kao čvrsta faza korišćena je CHROMABOND C18 kolona.

Postupak se sastojao od sledećih faza:

Priprema uzorka: Suvi ostatak polaznog ekstrakta je rastvoren u 0,5 M H₂SO₄.

Kondicioniranje kolone: 2ml metanola i 5 ml 5mM H₂SO₄.

Retencija uzorka: Propuštanje uzorka kroz kolonu pod vakuumom. Nakon izlaska iz kolone uzorak je aplikovan na kolonu za frakcionisanje polifenolnih jedinjenja.

Ispiranje: 2 ml 5 mM H₂SO₄.

Eluiranje: 2 ml metanola i 5 ml destilovane dejonizovane vode.

3.2.2. Frakcionisanje polifenolnih jedinjenja prisutnih u prečišćenom ekstraktu

Za frakcionisanje polifenolnih jedinjenja, takođe je kao čvrsta faza korišćena CHROMABOND C18 kolona.

Postupak za izdvajanje neutralnih polifenolnih jedinjenja je bio sledeći:

Priprema uzorka: pH rastvora prečišćenog ekstrakta podešen je na 7,0 sa razblaženim rastvorom NaOH.

Kondicioniranje kolone: 8 ml metanola i 4 ml destilovane dejonizovane vode.

Retencija uzorka: propuštanje uzorka kroz kolonu pod vakuumom. Nakon izlaska iz kolone uzorak je aplikovan na kolonu za izdvajanje kiselih polifenolnih jedinjenja.

Ispiranje: 10 ml destilovane vode.

Eluiranje: 12 ml metanola.

Postupak za izdvajanje kiselih polifenolnih jedinjenja je bio sledeći:

Priprema uzorka: pH rastvora nakon odvajanja frakcije neutralnih polifenolnih jedinjenja podešen je na 2,0 sa 2 M HCl.

Kondicioniranje kolone: 8 ml metanola i 4 ml 0,01 M HCl.

Retencija uzorka: propuštanje uzorka kroz kolonu pod vakuumom.

Ispiranje: 5 ml 0,01 M HCl.

Eluiranje: 12 ml metanola.

Dobijene frakcije su koncentrovane na rotacionom vakuum uparivaču do suva, pri čemu su dobijene sledeće mase suvih ostataka:

Borovnica, *Vaccinium myrtillus* L.:

$Fr_1 = 0,1329 \pm 0,0066$ g (Fr_1 - frakcija koja sadrži vitamin C i polarna jedinjenja)

$Fr_2 = 0,0578 \pm 0,0021$ g (Fr_2 - frakcija koja sadrži neutralna polifenolna jedinjenja)

$Fr_3 = 0,0733 \pm 0,0029$ g (Fr_3 - frakcija koja sadrži kisela polifenolna jedinjenja)

Brusnica, *Vaccinium macrocarpon* L.:

$Fr_1 = 0,4363 \pm 0,0135$ g (Fr_1 - frakcija koja sadrži vitamin C i polarna jedinjenja)

$Fr_2 = 0,0320 \pm 0,0011$ g (Fr_2 - frakcija koja sadrži neutralna polifenolna jedinjenja)

$Fr_3 = 0,0407 \pm 0,0019$ g (Fr_3 - frakcija koja sadrži kisela polifenolna jedinjenja)

Šipak, *Rosa canina* L.:

$Fr_1 = 0,4568 \pm 0,0214$ g (Fr_1 - frakcija koja sadrži vitamin C i polarna jedinjenja)

$Fr_2 = 0,0410 \pm 0,0016$ g (Fr_2 - frakcija koja sadrži neutralna polifenolna jedinjenja)

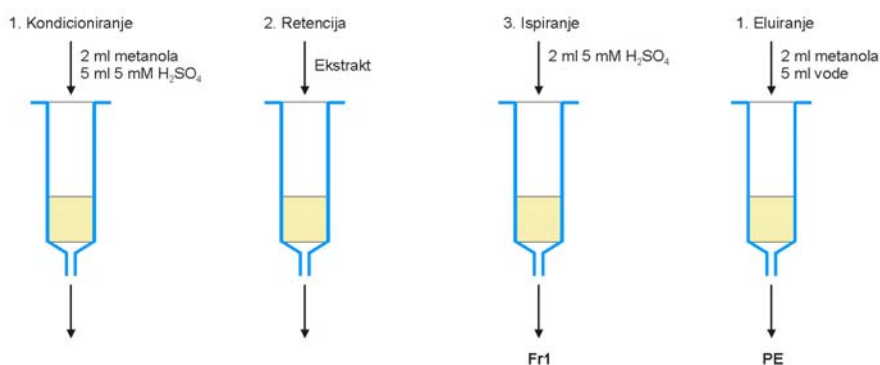
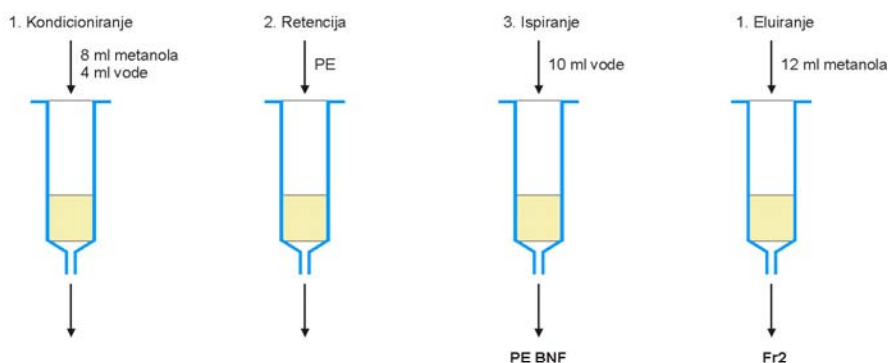
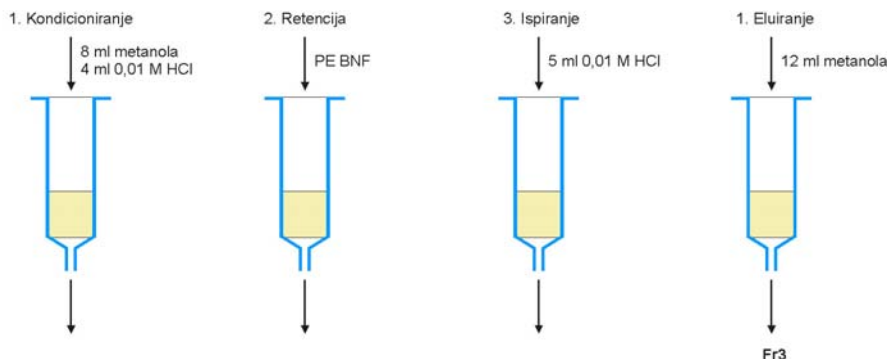
$Fr_3 = 0,0220 \pm 0,0009$ g (Fr_3 - frakcija koja sadrži kisela polifenolna jedinjenja)

Glog, *Crataegus oxyacantha* L.:

$Fr_1 = 0,2546 \pm 0,0093$ g (Fr_1 - frakcija koja sadrži vitamin C i polarna jedinjenja)

$Fr_2 = 0,0254 \pm 0,0008$ g (Fr_2 - frakcija koja sadrži neutralna polifenolna jedinjenja)

$Fr_3 = 0,1948 \pm 0,0076$ g (Fr_3 - frakcija koja sadrži kisela polifenolna jedinjenja)

A) Prečišćavanje polaznog ekstrakta**B) Frakcionisanje polifenolnih jedinjenja****- CHROMABOND C18 kolona - neutralni polifenoli (pH uzorka podešen na 7)****- CHROMABOND C18 koloni - kiseli polifenoli (pH uzorka podešen na 2)**

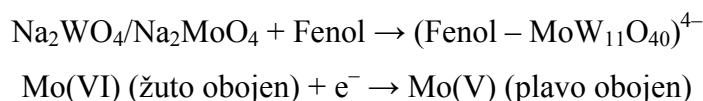
PE – prečišćeni ekstrakt; PE BNF - prečišćeni ekstrakt bez neutralnih polifenolnih jedinjenja

Slika 14. Šema prečišćavanja i frakcionisanja ekstrakata bobica primenom ekstrakcije na čvrstoj fazi

3.3. ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLNIH JEDINJENJA U PREČIŠĆENIM EKSTRAKTIMA (METODA PO FOLIN-CIOCALTEU)

Metoda po Folin-Ciocalteu je zasnovana na merenju redukujućeg kapaciteta polifenolnih jedinjenja, čijom disocijacijom nastaje proton i fenoksidni anjon. Nastali fenok-

sidni anjon redukuje Folin-Ciocalteu reagens do plavo obojenog jona (Fenol – MoW₁₁O₄₀)⁴⁻:



Rastvori i reagensi:

1. 20% rastvor Na₂CO₃:

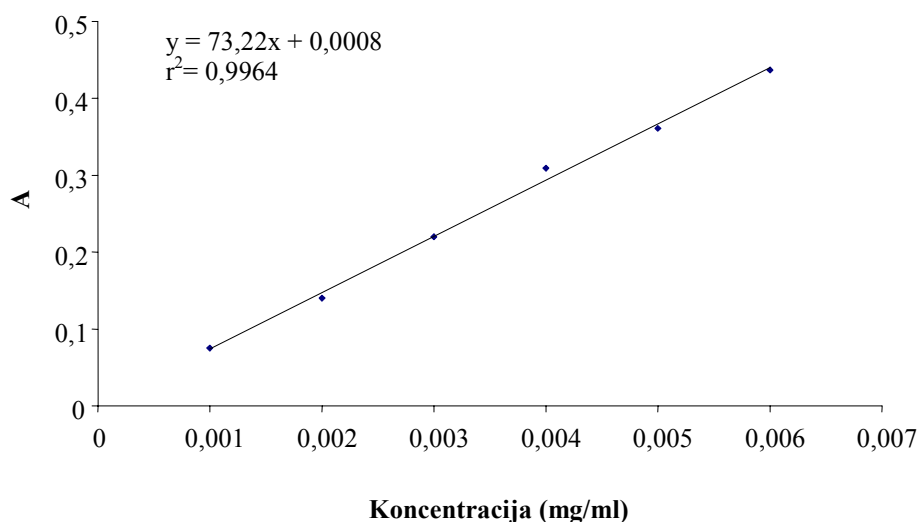
U 16 ml vode, uz zagrevanje (70°C) je rastvoreno 4 g Na₂CO₃;

2. Folin-Ciocalteu reagens;
3. Standardni rastvor hlorogenske kiseline: 50 mg hlorogenske kiseline rastvoreno je u 500 ml destilovane vode.

Spektrofotometrijsko određivanje:

Reakciona smeša pripremljena je mešanjem 0,01 ml prečišćenog ekstrakta, 7,99 ml destilovane vode, 0,5 ml Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 ml 20% rastvora Na₂CO₃. Uporedo je pripremljena i slepa proba: 8 ml destilovane vode, 0,5 ml Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 ml 20% rastvora Na₂CO₃. Nakon 2 h izmerene su apsorbance na $\lambda_{\text{max}} = 750 \text{ nm}$.

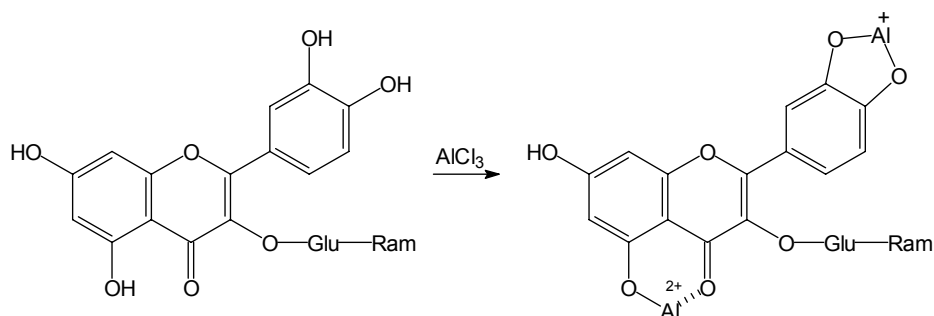
Na osnovu izmerenih apsorbanci, sa kalibracione krive standardnog rastvora hlorogenske kiseline (slika 15) očitana je koncentracija (mg/ml) polifenolnih jedinjenja, a zatim je sadržaj polifenolnih jedinjenja u prečišćenom ekstraktu izražen kao ekvivalent hlorogenske kiseline (mg hlorogenske kiseline/g suvog ekstrakta).



Slika 15. Kalibraciona kriva standardnog rastvora hlorogenske kiseline

3.4. ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA U PREČIŠĆENIM EKSTRAKTIMA (METODA PO MARKAMU)

Određivanje ukupnih flavonoida zasnovano je na njihovoj osobini da sa metalima daju odgovarajuće metalo - komplekse. Naročito važan je Al^{3+} kompleks (slika 16).



Slika 16. Struktura rutina i njegov kompleks sa aluminijumom

Rastvori i reagensi:

1. Rastvor za ekstrakciju:

U 14 ml metanola doda se 5 ml destilovane vode i 1 ml cc CH_3COOH .

2. Reagens $AlCl_3$:

13,3 mg $AlCl_3 \times 6H_2O$ i 40 mg natrijumacetata rastvoreno je u malo vode i dopunjeno do 10 ml.

3. Standardni rastvor rutina:

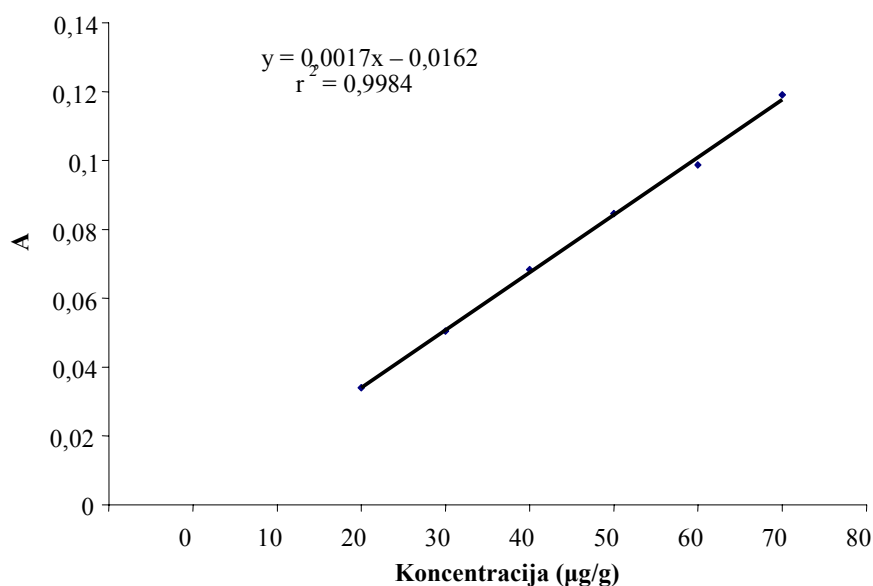
50 mg rutina rastvoreno je u malo metanola i dopunjeno do 50 ml. Od toga je odpipetiran 1 ml i prenet u odmerni sud od 100 ml koji je dopunjen metanolom do crte.

Ekstrakcija flavonoida: Do suva je upareno 0,5 ml prečišćenog ekstrakta, pri čemu je dobijena masa suvog ostatka iznosila 0,012 g. Suvi ekstrakt je ekstrahovan sa 1 ml rastvora za ekstrakciju u toku 60 min, uz mućkanje. Ekstrakt je zatim proceden u normalni sud od 5 ml, ostatak je ispran sa po 1 ml ekstrakcionog medijuma. Normalni sud dopunjen je istim do 5 ml. Nakon toga, 0,5 ml ovog rastvora preneto je u normalni sud od 10 ml koji je dopunjen destilovanom vodom do crte.

Spektrofotometrijsko određivanje: U 5 ml ekstrakta dodato je 1 ml vode i 2,5 ml $AlCl_3$ reagensa. Paralelno je pripremljena i slepa proba: 5 ml ekstrakta i 3,5 ml vode (bez dodavanja $AlCl_3$). Apsorbancija je očitana na $\lambda_{max} = 430$ nm.

Na osnovu izmerenih apsorbanci, sa kalibracione krive standardnog rastvora rutina (slika 17) očitana je koncentracija ($\mu g/g$) ukupnih flavonoida, a zatim je sadržaj ukupnih

flavonoida u prečišćenom ekstraktu izražen kao ekvivalent rutina (mg rutina/g suvog ekstrakta).



Slika 17. Kalibraciona kriva standardnog rastvora rutina

3.5. ODREĐIVANJE ANTOCIJANA U PREČIŠĆENIM EKSTRAKTIMA („SINGL“ PH I PH DIFERENCIJALNA METODA)

Kvantitativno određivanje ukupnih antocijana (nedegradiranih monomera i proizvoda njihove degradacije) zasniva se na osobini antocijana, da pri promeni pH sredine, reverzibilno menjaju svoju strukturu, pri čemu dolazi i do promena apsorpcionog spektra.

Tokom vremena, kao i pod uticajem različitih faktora (temperatura, kiseonik, vitamin C i dr.) dolazi do degradacije monomera antocijana, koji se povezuju međusobno ili sa drugim prisutnim jedinjenjima, formirajući na taj način proizvode razgradnje. Iako količina monomera antocijana opada, intenzitet boje se ne menja, jer u reakcijama kondenzacije nastaju obojeni kondenzacioni proizvodi koji su čak i stabilniji nego monomeri (slobodni) antocijani.

Sadržaj ukupnih antocijana određuje se „singl“ metodom, jer je izmerena apsorbanija rastvora antocijana pri pH 1, proporcionalna sadržaju ukupnih antocijana.

Određivanje sadržaja monomera antocijana izvodi se pH diferencijalnom metodom, koja se zasniva na osobini monomera antocijana da su pri pH 1 u obliku oksonijum jona (crveno obojeni), dok su pri pH 4,5 antocijani u poluketalnom obliku (bezbojni).

Rastvori i reagensi:

1. Pufer pH 1
2. Pufer pH 4,5

Spektrofotometrijsko određivanje

Odmerena je zapremina od po 0,25 ml prečišćenog ekstrakta i preneti u dva odmerni suda od 10 ml, koji su zatim dopunjeni puferom pH 1, odnosno pH 4,5. Nakon 15 minuta izmerene su apsorbancije na 515 nm i 700 nm (zbog korekcije zamućenja).

Koncentracija ukupnih antocijana u prečišćenom ekstraktu (C_{uk}) izračunata je kao ekvivalent cijanidin-3-glukozida prema formuli:

$$C_{uk} = (A_{uk} \times M \times F \times 1000) / \varepsilon \times l \text{ (mg/l)}$$

gde su: $A_{uk} = (A_{500} - A_{700})_{pH 1}$

$M = 449,2$ g/mol (molekulska masa cijanidin-3-glukozida)

$F = 20$ (faktor razblaženja ekstrakta)

$\varepsilon = 26900 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (molarni koeficijent apsorpcije cijanidin-3-glukozida)

$l = 1$ cm (debljina kivete)

Koncentracija nedegradiranih - monomernih antocijana (C_{mon}) u prečišćenom ekstraktu izračunata je kao ekvivalent cijanidin-3-glukozida prema formuli:

$$C_{mon} = (A_{mon} \times M \times F \times 1000) / \varepsilon \times l \text{ (mg/l)}$$

gde je: A_{mon} – apsorbancia razblaženog ekstrakta, koja je izračunata prema formuli:

$$A_{mon} = (A_{515} - A_{700})_{pH 1} - (A_{515} - A_{700})_{pH 4,5}$$

Izračunate koncentracije ukupnih antocijana (C_{uk}) i koncentracije nedegradiranih – monomernih antocijana (C_{mon}) u prečišćenim ekstraktima izražene su kao ekvivalent cijanidin-3-glukozida (mg cijanidin-3-glukozida/g suvog ekstrakta).

Spektrofotometrijska određivanja rađena su na spektrofotometru Camspec M105.

3.6. HPLC ANALIZA FRAKCIJA EKSTRAKATA BOBICA

Svi uzorci i rastvarači filtrirani su kroz membranske filtre veličine 0.45 μm (veličina pora) (Millipore, Bedford, MA) pre analize.

Kvantifikacija polifenolnih jedinjenja u dobijenim frakcijama Fr2 i Fr3 izvršena je tečnom hromatografijom visoke rezolucije (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) na aparatu Waters Breeze (Waters, Milford, MA), koji sadrži 1525 binarnu pumpu, termostat i 717+ automatski dozator povezan sa Waters 2996 detektorom sa serijom dioda - Diode Array Detector, DAD (Waters, Milford, USA). Hromatogrami su snimljeni u 3D modu, pri različitim talasnim dužinama (326 i 310 nm za derivate hidroksicimetne kiseline, 265 za galnu, protokatehinsku i siringinsku kiselinu, i 367 nm za flavonoide). Razdvajanje je izvršeno na Symmetry C-18 RP coloni, 5 μm , 125 x 4 mm (Waters, Milford, USA) zaštićena odgovarajućom predkolumnom. Kao mobilna faza korišćen je sistem rastvarača: A (0,1% fosforna kiselina) i B acetonitril pri protoku od 1 ml/min i primenom sledećeg linearnog gradijenta: 0 - 20 min od 10 do 22% B; 20 - 40 min linearan porast do 40% B, 40 do 50 min 55% B. Kolona je uravnotežena na početne uslove, 10% B, 10 min uz dodatnih 5 min za stabilizaciju. Standardi polifenolnih jedinjenja i uzorci su rastvarani/ekstrahovani u metanolu. Identifikacija i kvantifikacija dobijenih pikova izvršena je sa Waters Empower 2 Software (Waters, Milford, USA).

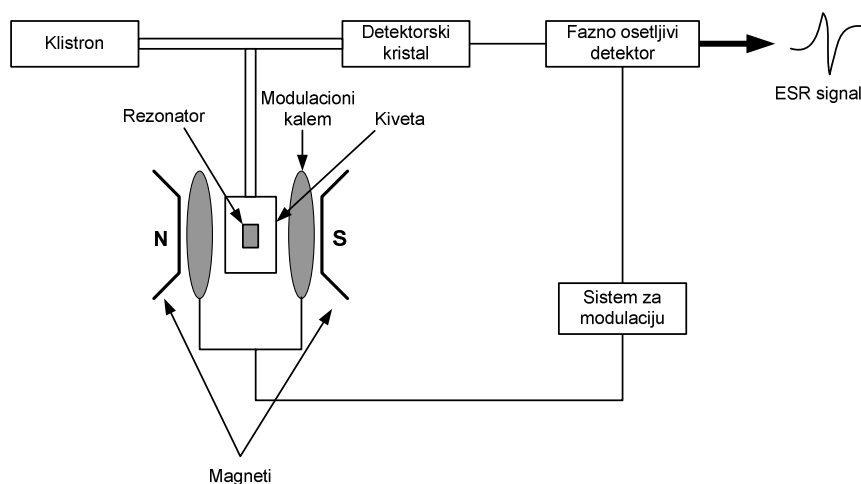
Za kvantifikaciju vitamina C u dobijenim frakcijama Fr1 korišćen je HPLC sistem „Agilent 1100“, SAD, sa petljom injektora od 20 μl , C-18 kolonom prečnika čestica 5 μm , i UV-DAD detektorom. Protok pokretne faze je bio 0,4 ml/min, a temperatura kolone 37°C. Analize su trajale 6 minuta. Standard vitamina C i uzorci su rastvarani/ekstrahovani 3%-nim rastvorom meta-fosforne kiseline, koja je rastvarana u 8%-tnom rastvoru sirćetne kiseline. Rastvor amonijum acetata, koncentracije 0,1 mol/l, pH 5,1, je korišćen kao pokretna faza u HPLC analizi. Rastvori su pripremani u bidestilovanoj vodi, koja je odgovarala HPLC kvalitetu.

Sve analize su izvršene u tri ponavljanja.

3.7. ISPITIVANJE ANTIRADIKALSKE AKTIVNOSTI FRAKCIJA EKSTRAKATA

BOBICA

Antiradikalska aktivnost frakcija ekstrakata bobica određena je elektron spin rezonantnom (ESR) spektroskopijom. Blok šema ESR spektrometra prikazana je na slici 18.



Slika 18. Blok šema ESR spektrometra

3.7.1. ESR spektralna analiza uticaja frakcija ekstrakata bobica na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala

Superoksid anjon radikali su pripremljeni rastvaranjem KO_2 /kraunetar (10 mM/20 mM) u osušenom DMSO. Reakciona smeša se sastojala od 5 μl ove smeše, 0,5 ml osušenog DMSO i 5 μl rastvora DMPO u DMSO (2 M). Uticaj frakcija ekstrakata bobica na formiranje i transformaciju njihovih DMPO/OOH “spin adukata” ispitana je dodavanjem dimetilformamidnih rastvora koncentracije 10 mg/ml, u reakcioni sistem u opsegu koncentracija:

Borovnica, <i>Vaccinium myrtillus</i> L.:	0,025 - 2 mg/ml
Brusnica, <i>Vaccinium macrocarpon</i> L.:	0,25 - 3 mg/ml
Šipak, <i>Rosa canina</i> L.:	0,01 - 1,5 mg/ml
Glog, <i>Crataegus oxyacantha</i> L.:	0,005 - 1,75 mg/ml

Paralelno je ispitan i uticaj sintetičkog antioksidanta BHA na transformaciju superoksid anjon radikala, u opsegu koncentracija 0,1 - 3 mg/ml.

Reakcione smeše su prenete u Bruker ER-160FT kvarenu kivetu za rastvore, a spektri su snimljeni na EMX Bruker spektrometru (Rheinstetten, Germany) pri sledećim uslovima:

- frekvencija modulacije	100 kHz
- amplituda modulacije	4,00 G
- vremenska konstanta	40,96 ms
- vremenski opseg merenja	327,68 ms
- centar polja	3440,00 G
- ukupan opseg merenja	100,00 G
- frekvencija mikrotalasnog područja	9,64 GHz
- jačina struje	1,00 x 10 ⁴
- snaga mikrotalasnog područja	20 mW
- temperatura merenja	23°C

Antiradikalska aktivnost (AA_{O₂•}) frakcija ekstrakata bobica definisana je izrazom:

$$AA_{O_2\bullet} = (h_0 - h_x)/h_0 \times 100 (\%)$$

gde je: h_0 – visina drugog pika ESR signala slepe probe;

h_x – visina drugog pika ESR signala uzorka sa ekstraktom ili sa BHA.

3.7.2. ESR spektralna analiza uticaja frakcija ekstrakata bobica na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala

Hidroksil radikali dobijeni su u Fentonovoj reakciji i detektovani “spin trapping” metodom u sistemu koji se sastojao od: 0,2 ml H₂O₂ (2 mM), 0,2 ml FeCl₂ (0,3 mM), 0,2 ml N,N-dimetilformamida (DMF) i 0,2 ml DMPO (112 mM) kao “spin trapa” (slepa proba). Uticaj frakcija ekstrakata bobica na koncentraciju “spin adukata” hidroksil radikala ispitan je dodavanjem njihovih dimetilformamidnih rastvora, koncentracije 10 mg/ml, u reakcioni sistem u opsegu koncentracija:

Borovnica, <i>Vaccinium myrtillus</i> L.:	0,001 - 1 mg/ml
Brusnica, <i>Vaccinium macrocarpon</i> L.:	0,05 - 3 mg/ml
Šipak, <i>Rosa canina</i> L.:	0,001 - 1 mg/ml
Glog, <i>Crataegus oxyacantha</i> L.:	0,0005 - 1 mg/ml

Paralelno je ispitan i uticaj sintetičkog antioksidanta BHA na transformaciju “spin adukata” hidroksil radikala, u opsegu koncentracija 0,1 - 3 mg/ml.

ESR spektri snimljeni su 2,5 min nakon mešanja i prenošenja u Bruker ER-160FC kvarcnu kivetu za vodene rastvore, na ESR spektrometru Bruker 300E (Rheinstetten, Germany), pri sledećim radnim karakteristikama:

- frekvencija modulacije	100 kHz
- amplituda modulacije	0,226 G
- vremenska konstanta	80,72 ms
- vremenski opseg merenja	327,68 ms
- centar polja	3440,00 G
- ukupan opseg merenja	100,00 G
- frekvencija mikrotalasnog područja	9,64 GHz
- jačina struje	5,00 x 10 ⁵
- snaga mikrotalasnog područja	20 mW
- temperatura merenja	23°C

Antiradikalska aktivnost (AA•_{OH}) frakcija ekstrakata bobica definisana je izrazom:

$$AA\bullet_{OH} = (h_o - h_x)/h_o \times 100 (\%)$$

gde je: h_o – visina drugog pika ESR signala slepe probe;

h_x – visina drugog pika ESR signala uzorka sa ekstraktom ili sa BHA.

3.7.3. ESR spektralna analiza uticaja frakcija ekstrakata bobica na transformaciju DPPH radikala

Stabilni DPPH slobodni radikali ispitivani su u reakcionoj smeši koja je dobijena mešanjem 0,2 ml N,N-dimetilformamida (DMF) i 0,4 ml 0,4 mM metanolnog rastvora DPPH• (slepa proba).

Uticaj frakcija ekstrakata bobica na transformaciju DPPH• analiziran je u rastvoru koji je dobijen mešanjem: x ml dimetilformamidnog rastvora frakcije ekstrakta bobice koncentracije 10 mg/ml, (0,2 - x) ml metanola i 0,4 ml 0,4 mM metanolnog rastvora DPPH•. Finalne koncentracije ispitivanih ekstrakata bile su u opsegu:

Borovnica, <i>Vaccinium myrtillus</i> L.:	0,005 - 0,75 mg/ml
Brusnica, <i>Vaccinium macrocarpon</i> L.:	0,025 - 2,5 mg/ml
Šipak, <i>Rosa canina</i> L.:	0,01 - 0,75 mg/ml
Glog, <i>Crataegus oxyacantha</i> L.:	0,01 - 1,5 mg/ml

Paralelno je ispitan i uticaj sintetičkog antioksidanta BHA na transformaciju DPPH[•], pri koncentracijama 0,005 - 0,2 mg/ml.

Smeša je intezivno mešana u toku 2 minuta i prenetu u Bruker ER-160 FC kvarcnu kivetu za rastvore. ESR spektri su snimani na sobnoj temperaturi na ESR spektrometru Bruker 300E pri sledećim uslovima:

- frekvencija modulacije	100 kHz
- amplituda modulacije	0,256 G
- vremenska konstanta	40,96 ms
- vremenski opseg merenja	335,544 ms
- ukupan opseg merenja	100,00 G
- centar polja	3442,00 G
- frekvencija mikrotalasnog područja	9,45 GHz
- snaga mikrotalasnog područja	7,96 mW
- temperatura merenja	23°C

Antiradikalska aktivnost ($AA_{DPPH^{\bullet}}$ (%)) frakcija ekstrakata bobica definisana je izrazom:

$$AA_{DPPH^{\bullet}} = (h_o - h_x)/h_o \times 100 (\%)$$

gde je : h_o - visina drugog pika ESR signala slepe probe;

h_x - visina drugog pika signala uzorka sa ekstraktom ili sa BHA.

3.7.4. ESR spektralna analiza slobodnih radikala antioksidanata

Slobodni radikali antioksidanata određivani su u reakcionom sistemu koji se sastojao od 0,5 ml dimetilsulfoksidnih rastvora KO_2 /kraunetar (10 mM/20 mM) i 0,5 ml dimetilformamidnih rastvora frakcija ekstrakata bobica (5 mg/ml). Rastvori su injektovani pomoću špriceva u Bruker ER-160FT kvarcnu kivetu za rastvore u TE_{102} -rezonator Bruker EMX spektrometra (Rheinstetten, Germany). Rastvori su izmešani u donjem delu kivete, pre ulaska u aktivnu zonu kvarcne kivete, a merenja su izvršena 20 s nakon mešanja, pri sledećim uslovima:

- frekvencija modulacije	100 kHz
- amplituda modulacije	0,48 G
- vremenska konstanta	163,00 ms
- brzina merenja	35,77 G/min

- centar polja	3491,10 G
- ukupan opseg merenja	25,00 G
- frekvencija mikrotalasnog područja	9,73 GHz
- jačina struje	8,00 x 10 ⁵
- snaga mikrotalasnog područja	20 mW
- temperatura merenja	23°C

ESR spektri su obrađeni WINSIM programom (Duling, 1994) i određene su konstante hiperfinog cepanja.

3.8. ANTIPROLIFERATIVNA AKTIVNOST FRAKCIJA EKSTRAKATA BOBICA

Ćelijske linije MCF7 (humani adenokarcinom dojke), HeLa (humani epitelni karcinom cerviksa) i HT-29 (humani adenokarcinom debelog creva) (tabela 15) kultivisane su u DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium) (Gibco BRL, Velika Britanija) medijumu sa dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma (FCS) (NIVNS, Srbija), 100 µg/ml streptomocina i 100 IU/ml penicilina (ICN Galenika, Srbija), u Kartel (Kartel, Švajcarska) 25cm² flaskovima, na 37°C u atmosferi 95% vazduha i 5% CO₂, pri relativnoj vlažnosti od 100%. Sve tri ćelijske linije su adherentne, a subkultivisane su dva puta nedeljno upotrebom 0,5% tripsina (SIGMA, USA) i tretirane u logaritamskoj fazi rasta.

Tabela 15. Karakteristike ćelijskih linija

Ćelijska linija	ECACC* kataloški broj	Ćelijski tip	Afinitet za podlogu	Morfologija	Vreme udvajanja (h)
MCF7	86012803	Humani adenokarcinom dojke	adherentne	epitelne	35
HeLa	93021013	Humani epitelni karcinom cerviksa		epitelne	21
HT-29	91072201	Humani adenokarcinom debelog creva		epitelne	42

* eng. *European Collection of Cell Cultures*

Suspenzija ćelija gustine 2,5 - 5 x 10³ ćelija/180 µl/otvoru, zavisno od vremena udvajanja ćelijske linije, inokulisana je u Corning (Corning, USA) mikrotitar ploče sa 96 otvora. Nakon inokulacije ploče su inkubirane 24 h pre dodavanja rastvora frakcija ekstrakata.

Nakon inkubacije od 24 h, po 20 μ l rastvora frakcije ekstrakta je dodato u ploče sa 180 μ l medijuma, tako da je finalna koncentracija rastvora ekstrakta bila deset puta manja od radne. Za svaki eksperiment pripremljeno je pet koncentracija rastvora frakcije ekstrakta i kontrola ćelija, svaka u kvadriplikat. Nakon dodavanja rastvora frakcije ekstrakta ploče su inkubirane još 48 h kontinuirano.

3.8.1. Fotometrijska metoda za određivanje antiproliferativne aktivnosti (MTT test)

Inhibicija sukcinat dehidrogenaze (Succinate dehydrogenase inhibition – SDI test) merena je MTT kvantitativnim kolorimetrijskim testom po Mosmann-u (Mosmann, 1983). MTT ($C_{18}H_{16}N_5SBr$) (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid) (Sigma, USA) je tetrazolijum so koju aktivne mitohondrije dehidrogenaznim enzimima metabolički redukuju u formazan. Reakcija raskidanja tetrazolijumovog prstena dešava se samo u živim ćelijama. Generisani signal je zavisao od stepena aktivacije ćelije.

Nakon 48 h kontinuiranog delovanja rastvora ekstrakta, na ćelije u mikrotitar ploči sa 96 otvora dodato je 20 μ l/otvoru MTT-a, rastvorenog u DMEM medijumu bez seruma (5mg/ml). Rastvoreni MTT prethodno je profiltriran kroz 0,45 μ m filter (Sartorius,UK) da bi se odstranili kristali nerastvorene boje. Ploče su inkubirane na 37°C tokom 3 h, nakon čega je celokupan medijum pažljivo odstranjen mikropipetom. Vezani formazan ekstrahovan je 0,04 M HCl-izopropanolom (100 μ l/otvoru).

Fotometrijska merenja su izvođena na Multiskan Ascent filter fotometru sa jednokanalnim vertikalnim izvorom svetlosti. Multiskan Ascent koristi koncept vertikalne fotometrije pri kojem snop svetlosti prolazi kroz ceo uzorak. Izvor svetlosti je kvarc-halogen lamp. Talasna dužina vrši se izborom jednog od osam filtera interferencije. Kvarcno optičko vlakno i sočiva daju visoko fokusiran svetlosni snop, koji prolazi kroz kivetu do detektora. Detektorsko kućište sastoji se od silikonskog fotodetektora, amplifikatora i optičkih sočiva.

U vertikalnoj fotometriji, apsorpcija svetlosti proporcionalna je količini supstance u otvoru. Apsorbanca se izražava kao:

$$A = a/S \times m$$

gde je: a - molarna apsorbanca supstance;

S - poprečni presek površine upravne na izvor svetlosti;

m - masa ispitivane supstance.

Eksperimentalne mikrotitar ploče su očitane na talasnim dužinama: $\lambda_1 = 540$ nm (test talasna dužina; oblast zelene svetlosti 500 - 580 nm) i $\lambda_2 = 690$ nm (referentna talasna dužina za uklanjanje background apsorbanca; oblast crvene svetlosti 620 - 750 nm), a apsorbanca je izračunata kao:

$$A = A_{540nm} - A_{690nm}$$

Uticaj frakcija ekstrakata ispitivanih bobica izražen je kao procenat inhibicije ćelijskog rasta, odnosno procenat citotoksičnosti, izračunat u odnosu na kontrolu (%K), po formuli:

$$\%K = (A_x/A_0) \times 100 (\%)$$

gde su: A_x - apsorbanca test otvora;

A_0 - apsorbanca kontrolnog otvora.

EC₅₀ vrednosti antiproliferativnih aktivnosti frakcija ekstrakata ispitivanih bobica (koncentracije frakcija ekstrakata bobica koje izazivaju inhibiciju rasta ćelija za 50%) određene su programom Calcsyn for Windows (Verzija 1.1.0.0.; Biosoft).

3.9. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Za statističku obradu podataka korišćeni su kompjuterski softverski programi Microsoft Excel v. 2007. i Origin 7.0. (OriginLab Corporation, Northampton, USA, 1991-2002). Svi rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja \pm standardna greška, osim ako nije naznačeno drugačije. Statistička značajnost utvrđena je ANOVA testom, gde je statistički značajna razlika utvrđena na nivou greške od 5% ($p < 0,05$).

4.0. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE POLIFENOLNIH JEDINJENJA U EKSTRAKTIMA BOBICA

U tabeli 16 prikazani su rezultati spektrofotometrijskih određivanja polifenolnih jedinjenja u prečišćenim ekstraktima ispitivanih bobica iz familija Ericaceae i Rosaceae.

Tabela 16. Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja, flavonoida, antocijana i monomera antocijana u prečišćenim ekstraktima bobica određen spektrofotometrijskim metodama

BOBICA	UKUPNA POLIFENOLNA JEDINJENJA ^a	FLAVONOIDI ^b	ANTOCIJANI ^c	MONOMERI ANTOCIJANA ^c
BOROVNICA <i>Vaccinium myrtillus</i> L.	273,25 ± 10,69	224,71 ± 7,34	78,50 ± 3,34	58,45 ± 2,28
BRUSNICA <i>Vaccinium macrocarpon</i> L.	111,22 ± 4,89	115,73 ± 5,21	81,63 ± 3,29	12,24 ± 0,49
ŠIPAK <i>Rosa canina</i> L.	457,45 ± 18,32	196,26 ± 8,67	39,57 ± 1,91	1,42 ± 0,07
GLOG <i>Crataegus oxyacantha</i> L.	306 ± 12,65	165,16 ± 7,28	63,46 ± 2,76	4 ± 0,16

^a mg ekvivalenata hlorogenske kiseline/g suvog ostatka

^b mg rutin ekvivalenata/g suvog ostatka

^c mg cijanidin-3-glikozid ekvivalenata/g suvog ostatka

Rezultati spektrofotometrijskih ispitivanja ukazuju da je najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja kod ekstrakta šipka, flavonoida kod ekstrakta borovnice, antocijana kod ekstrakta brusnice, a monomera antocijana kod ekstrakta borovnice. Generalno, veći sadržaj antocijana zabeležen je kod bobica iz familije Ericaceae, dok je količina ukupnih polifenolnih jedinjenja veća kod bobica familije Rosaceae.

Ercisli (2007) je objavio studiju u kojoj su ispitivane bobice iz familije Rosaceae, gde je kod šipka određen najveći sadržaj polifenolnih jedinjenja, 96 mg/g. Ova vrednost je mnogo veća od ostalih vrednosti objavljenih za drugo bobičasto voće bogato vitaminom C, kao što su ribizle (3 - 4 mg/g), američka borovnica (2,7 - 3,5 mg/g), jagoda (1,6 - 2,9 mg/g)

i malina (2,7 - 3,0 mg/g). Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja kod roda *Rosa* familije Rosaceae varirao je u opsegu od 55 do 122 mg/g (Gao et al., 2000; Olsson et al., 2005).

Saopšteno je da na sadržaj polifenolnih jedinjenja utiču genotip, mesto i tehnika gajenja, kao i razlike u zrelosti biljke (Orhan i sar., 2007). Takođe, spoljašnji faktori poput svetlosti, temperature, prisustva hranljivih materija u zemljištu mogu uticati na fenilpropanoidni metabolizam (Dixon i Paiva, 1995).

Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja izmeren metodom po Folin-Ciocalteu ne pruža kompletnu sliku o kvantitetu i kvalitetu polifenolnih jedinjenja u ekstraktima, zbog mogućeg prisustva interferirajućih jedinjenja (šećeri, aromatični amini, sumpor-dioksid, vitamin C, organske kiseline, Fe(II) i ostale supstance koje nisu polifenolnog porekla) koja utiču na nerealno povećanje rezultata (Singelton i sar., 1999). Interferirajuće supstance poput vitamina C, šećera, organskih kiselina i polarnih jedinjenja u eksperimentalnom radu su uklonjene ekstrakcijom na čvrstoj fazi, tzv. prečišćavanjem ekstrakta, ali se na osnovu visokih dobijenih vrednosti za sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u ekstraktima ispitivanih vrsta bobica, u odnosu na literaturne podatke, pretpostavlja da je deo interferirajućih jedinjenja koja reaguju sa Folin-Ciocalteu reagensom i dalje ostao prisutan. Zbog toga je kompletna kvalitativna i kvantitativna identifikacija polifenolnih jedinjenja, kao i vitamina C u frakcijama ekstrakata bobica izvršena primenom HPLC metode.

4.2. HPLC ANALIZA FRAKCIJA EKSTRAKATA BOBICA

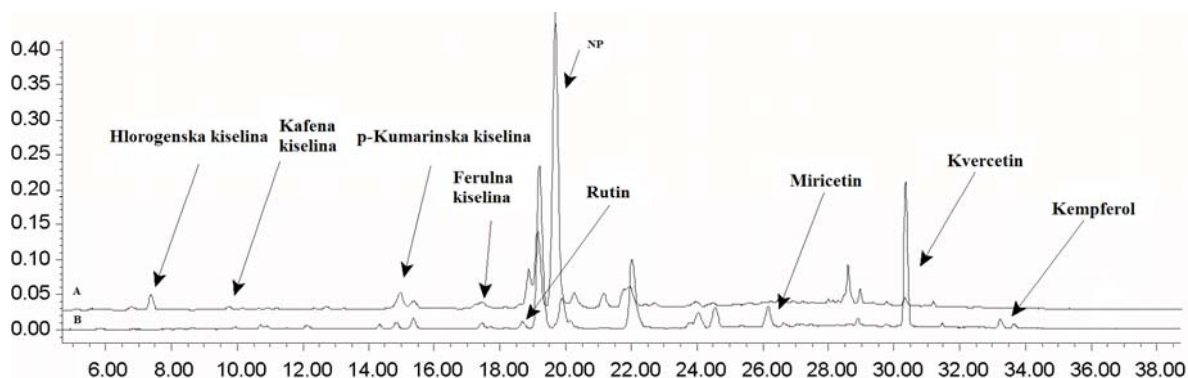
4.2.1. HPLC analiza frakcija ekstrakta borovnice

U tabeli 17 prikazani su rezultati HPLC analize frakcija Fr1, Fr2 i Fr3 dobijenih iz ekstrakta borovnice.

Tabela 17. Kvalitativan i kvantitativan sastav frakcija ekstrakta borovnice

Fr1		Fr2		Fr3	
Jedinjenja	Sadržaj (µg/g)	Jedinjenja	Sadržaj (µg/g)	Jedinjenja	Sadržaj (µg/g)
Vitamin C	1529 ± 146	Katehin Umbeliferon Rutin Kvercetin Kampferol Miricetin	52,0241 ± 1,98 60,6295 ± 3,01 179,2368 ± 7,26 41,8575 ± 25,78 54,1265 ± 2,59 140,7074 ± 5,34	Galna kiselina Protokatehinska kiselina Hlorogenska kiselina Kafena kiselina Siringinska kiselina p-Kumarinska kiselina Ferulna kiselina Elaginska kiselina	19,7438 ± 0,87 53,1795 ± 2,39 57,2902 ± 1,98 41,9964 ± 1,76 74,8545 ± 3,09 157,8911 ± 6,89 62,0902 ± 2,79 27,2647 ± 1,13
Ukupno	1529		1328,5818		494,3104

Kvalitativnom HPLC analizom frakcija ekstrakta borovnice određeno je prisustvo vitamina C u frakciji Fr1, flavonoida u frakciji Fr2 dok je u frakciji Fr3 detektovano prisustvo fenolnih kiselina. U frakciji Fr2 je od šest detektovanih flavonoida kvercetin dominantan flavonoid, čija masa (841,8575 $\mu\text{g/g}$) predstavlja 63,64% od ukupne mase flavonoida. Pored kvercetina, u frakciji Fr2 prisutni su i rutin, miricetin, umbeliferon, kampferol i katehin u manjim količinama. U frakciji Fr3 je određeno prisustvo osam fenolnih kiselina, od kojih je *p*-kumarinska kiselina imala najveći udeo, 31,94%. Takođe, siringinska, ferulna, hlorogenska, protokatehinska i kafena kiselina su detektovane u ovoj frakciji. Sadržaj vitamina C u frakciji Fr1 je nešto veći od ukupnog sadržaja flavonoida u frakciji Fr2, dok je sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u frakciji Fr3 2,5 puta manji od ukupnog sadržaja flavonoida u frakciji Fr2. Na slici 19 A i 19 B prikazani su HPLC hromatogrami frakcija Fr3 i Fr2 ekstrakta borovnice. Neidentifikovani pik (NP) na hromatogramu frakcije Fr3 ima UV spektar sličan izoferulnoj kiselini pa se može pretpostaviti da pik pripada izomernoj formi ferulne kiseline.



Slika 19. HPLC hromatogrami frakcija Fr3 (A) i Fr2 (B) ekstrakta borovnice

4.2.2. HPLC analiza frakcija ekstrakta brusnice

U tabeli 18 prikazani su rezultati HPLC analize frakcija ekstrakta brusnice.

HPLC analiza frakcija ekstrakta brusnice su takođe ukazale na prisustvo vitamina C u frakciji Fr1, flavonoida u frakciji Fr2 i fenolnih kiselina u frakciji Fr3. Sadržaj vitamina C u frakciji Fr1 ekstrakta brusnice je duplo manji od njegovog sadržaja u istoj frakciji ekstrakta borovnice. U frakciji Fr2 detektovan je vrlo mali sadržaj pet flavonoida (kvercetina, katehina, kampferola, miricetina i umbeliferona), gde je udeo kvercetina iznosio 52,77%

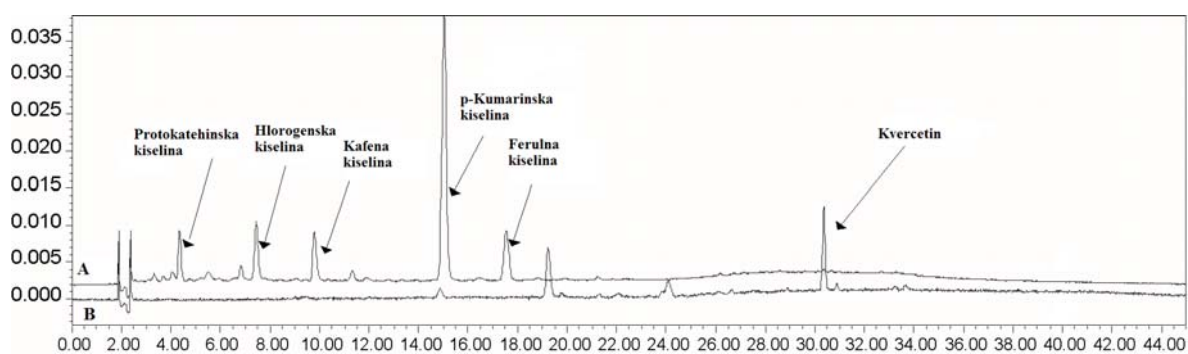
od ukupne mase flavonoida. U frakciji Fr3 prisutno je devet fenolnih kiselina (*p*-kumarinska, ferulna, protokatehinska, kafena, hlorogenska, siringinska, elaginska, vanilinska i galna kiselina), takođe u malim količinama, od kojih je *p*-kumarinska kiselina imala 35,02% udela u ukupnoj masi fenolnih kiselina u ovoj frakciji. Za razliku od borovnice, sadržaj vitamina C u frakciji Fr1 brusnice je značajno veći od sadržaja polifenolnih jedinjenja u frakcijama Fr2 i Fr3, dok je sadržaj ukupnih flavonoida u frakciji Fr2 oko dva puta manji od ukupnog sadržaja fenolnih kiselina u frakciji Fr3.

Tabela 18. Kvalitativan i kvantitativan sastav frakcija ekstrakta brusnice

Fr1		Fr2		Fr3	
Jedinjenja	Sadržaj (µg/g)	Jedinjenja	Sadržaj (µg/g)	Jedinjenja	Sadržaj (µg/g)
Vitamin C	754 ± 25	Katehin Umbeliferon Kvercetin Kampferol Miricetin	4,2284 ± 0,20 0,9147 ± 0,03 9,6217 ± 0,42 1,9504 ± 0,07 1,5164 ± 0,05	Galna kiselina Protokatehinska kiselina Hlorogenska kiselina Kafena kiselina Siringinska kiselina <i>p</i>-Kumarinska kiselina Vanilinska kiselina Ferulna kiselina Elaginska kiselina	0,5788 ± 0,02 4,7223 ± 0,21 2,8752 ± 0,11 2,9732 ± 0,03 2,2566 ± 0,08 10,8800 ± 0,53 1,2086 ± 0,04 6,0710 ± 0,28 1,5029 ± 0,04
Ukupno	754		18,2316		31,0686

Na slici 20 A i 20 B prikazani su HPLC hromatogrami frakcija Fr3 i Fr2 ekstrakta brusnice.

Chen i sar. (2001) su sličnom, kombinovanom SPE-HPLC, metodom razdvojili i odredili sadržaj neutralnih polifenola (flavonoida) i kiselih polifenola (fenolnih kiselina) u svežem soku od brusnice i kandiranoj brusnici. Dominantni flavonoid je bio kvercetin, dok je najzastupljenija kiselina bila benzojeva kiselina, u oba ispitivana uzorka. Takođe, zabeležena je značajna razlika u sadržaju polifenolnih jedinjenja u svežem soku od brusnice i kandiranoj brusnici što ukazuje da se ova jedinjenja gube tokom procesa prerade.



Slika 20. HPLC hromatogrami frakcija Fr3 (A) i Fr2 (B) ekstrakta brusnice

4.2.3. HPLC analiza frakcija ekstrakta šipka

U tabeli 19 prikazani su rezultati HPLC analize frakcija ekstrakta šipka.

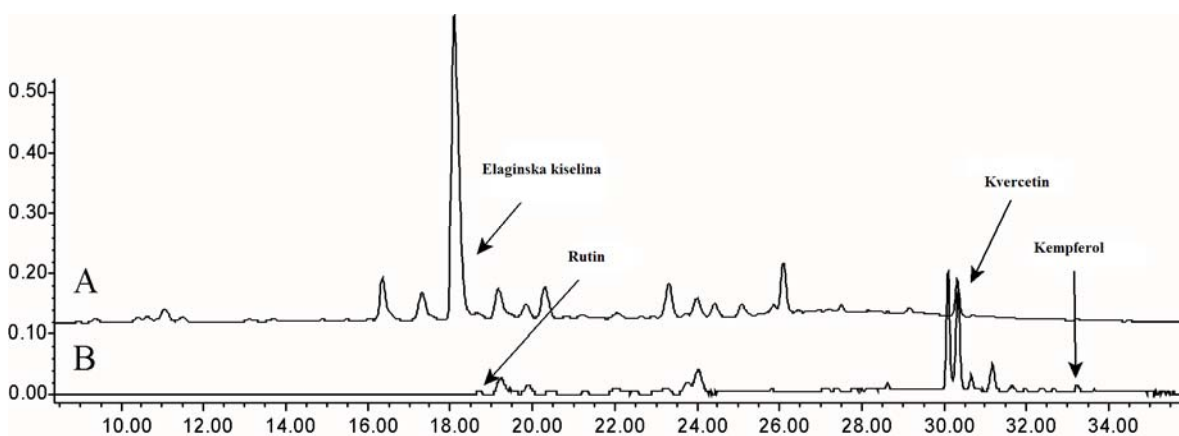
Tabela 19. Kvalitativan i kvantitativan sastav frakcija ekstrakta šipka

Fr1		Fr2		Fr3	
Jedinjenja	Sadržaj (μg/g)	Jedinjenja	Sadržaj (μg/g)	Jedinjenja	Sadržaj (μg/g)
Vitamin C	1715 ± 117	Katehin	6,1409 ± 0,21	Galna kiselina	3,0109 ± 0,12
		Umbeliferon	3,1388 ± 0,09	Protokatehinska kiselina	6,3127 ± 0,28
		Rutin	30,9033 ± 1,34	Kafena kiselina	4,6045 ± 0,21
		Kvercetin	144,6467 ± 6,78	Siringinska kiselina	10,0386 ± 0,35
		Kampferol	26,0404 ± 1,29	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	12,0717 ± 0,43
		Mricetin	12,3140 ± 0,48	Vanilinska kiselina	13,0800 ± 0,56
				Ferulna kiselina	5,5212 ± 0,25
				Elaginska kiselina	404,1942 ± 16,89
Ukupno	1715		224,0993		454,2292

Kvalitativna i kvantitativna HPLC analiza frakcija ekstrakta šipka potvrdila je prisustvo vitamina C u frakciji Fr1, šest flavonoida u frakciji Fr2 i osam fenolnih kiselina u frakciji Fr3. Najzastupljeniji flavonoid je kvercetin sa 64,55% od ukupnog prinosa flavonoida. Takođe, u ovoj frakciji identifikovani su i kampferol (26,04 μg/g) i rutina (30,90 μg/g). Sadržaj miricetina, katehina i umbeliferona u frakciji Fr2 je relativno nizak. Profil fenolnih kiselina u frakciji Fr3 ukazuje na vrlo visok sadržaj elaginske kiseline, 404,1942 μg/g tj. 88,98% od ukupne mase fenolnih kiselina prisutnih u ovoj frakciji. Sadržaj vanilinske, *p*-kumarinske i siringinske kiseline su bili slični ($p \leq 0,05$), dok su ferulna, protokatehinska, kafena i galna kiselina identifikovane u vrlo malim količinama. Iz rezultata prikazanih u tabeli 19 može se zaključiti da je sadržaj fenolnih kiselina u šipku dva puta veći od sadržaja flavonoida.

Ercisli (2007) je saopštio da je od većine voća i povrća šipak bogatiji vitaminom C. Razlike u sadržaju vitamina C određenog u ovoj studiji (880 mg/100 g) i rezultata prikazanih u tabeli 19 (171,5 mg/100 g) ovog rada se mogu objasniti različitim osobinama uzorka

upotrebljenog za ekstrakciju. U navedenoj studiji ekstrahovani su sveži plodovi šipka, dok su za ispitivanje u ovoj disertaciji korišćeni osušeni plodovi šipka. Uzimajući u obzir termičku labilnost vitamina C, niže vrednosti za osušene plodove su opravdane. Na slici 21 A i 21 B prikazani su hromatogrami frakcija Fr3 i Fr2 ekstrakta šipka.



Slika 21. HPLC hromatogrami frakcija Fr3 (A) i Fr2 (B) ekstrakta šipka

4.2.4. HPLC analiza frakcija ekstrakta gloga

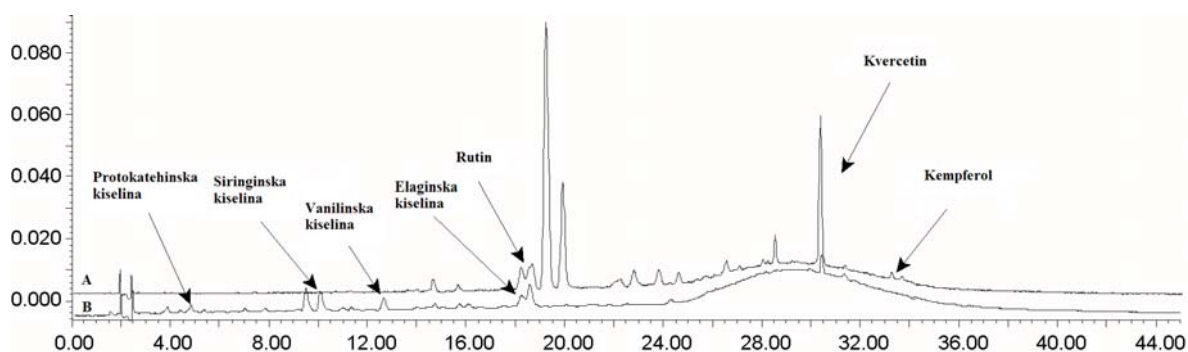
Kvalitativna i kvantitativna HPLC identifikacija jedinjenja prisutnih u frakcijama ekstrakta gloga prikazana je u tabeli 20.

Tabela 20. Kvalitativan i kvantitativan sastav frakcija ekstrakta gloga

Fr1		Fr2		Fr3	
Jedinjenja	Sadržaj (µg/g)	Jedinjenja	Sadržaj (µg/g)	Jedinjenja	Sadržaj (µg/g)
Vitamin C	2043 ± 160	Katehin	3,7498 ± 1,75	Protokatehinska kiselina	17,2489 ± 0,59
		Umbeliferon	6,2726 ± 0,28	Hlorogenska kiselina	15,0556 ± 0,71
		Kvercetin	39,3934 ± 1,66	Kafena kiselina	4,6207 ± 0,21
		Rutin	24,9315 ± 1,04	Siringinska kiselina	30,3655 ± 1,43
		Kampferol	16,8235 ± 0,68	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	4,4729 ± 0,19
				Vanilinska kiselina	20,7434 ± 0,98
		Ferulna kiselina	11,3226 ± 0,41		
		Elaginska kiselina	32,8156 ± 1,57		
Ukupno	2043		74,3473		136,6452

Rezultati HPLC analize frakcija ekstrakta gloga ukazuju na visok sadržaj vitamina C u frakciji Fr1. U frakciji Fr2 detektovani su flavonoidi, a u frakciji Fr3 fenolne kiseline. Udeo kvercetina u ukupnom zbiru pet identifikovanih flavonoida u frakciji Fr2 iznosio je

52,99%. Pored kvercetina, u ovoj frakciji identifikovani su i rutin (33,53%) i kampferol (22,63%), dok su udeli umbeliferona i katehina bili manji od 10% ukupne mase flavonoida. Elaginska kiselina ima najveći sadržaj u frakciji Fr3, 32,8156 $\mu\text{g/g}$ odnosno 24,02% od ukupnog sadržaja fenolnih kiselina u ovoj frakciji. Najmanje prinose u frakciji Fr3 imale su kafena i *p*-kumarinska kiselina, 4,6207 $\mu\text{g/g}$ i 4,4729 $\mu\text{g/g}$. Sadržaj ukupnih flavonoida u frakciji Fr2 je dva puta manji od ukupnog sadržaja svih identifikovanih fenolnih kiselina u frakciji Fr3. Na slici 22 A i 22 B prikazani su hromatogrami frakcija Fr3 i Fr2 ekstrakta gloga.



Slika 22. HPLC hromatogrami frakcija Fr3 (A) i Fr2 (B) ekstrakta gloga

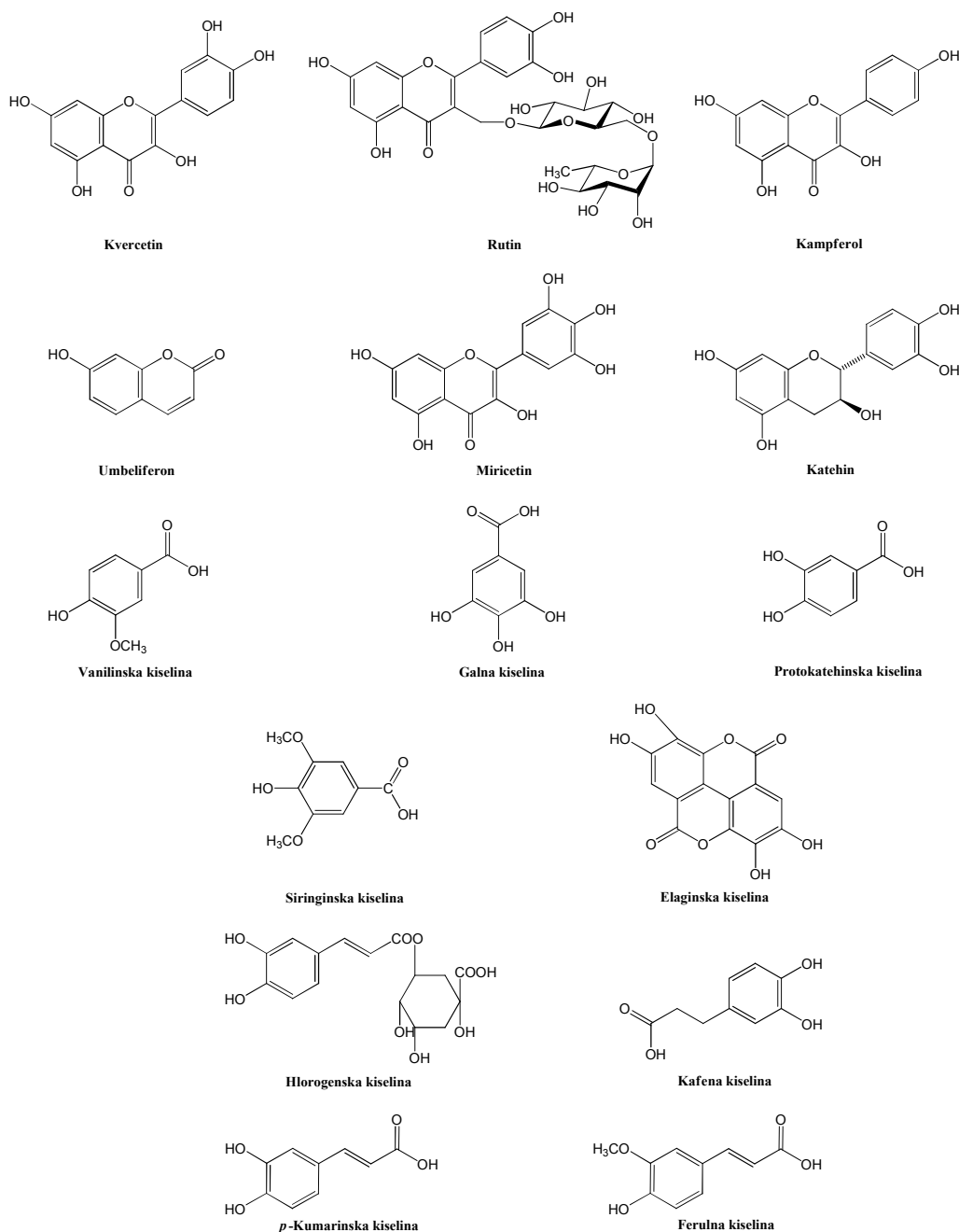
Na osnovu rezultata HPLC analize četiri ispitivane vrste bobica iz familija Ericaceae i Rosaceae mogu se izvesti neki generalni zaključci u vezi njihovog hemijskog sastava. Najzastupljeniji flavonoid u svim frakcijama Fr2 bio je kvercetin, gde su njegovi udeli u ukupnom prinosu flavonoida u svim slučajevima bili preko 50%. Häkinnen (2000) je saopštio da je, generalno, sadržaj flavonola (naročito kvercetina) veći od sadržaja flavan-3-ola u bobicama. Dominantna fenolna kiselina kod ispitivanih bobica iz familije Ericaceae, borovnice i brusnice, je *p*-kumarinska kiselina, dok je kod bobica iz familije Rosaceae, šipka i gloga, to bila elaginska kiselina čiji sadržaj u šipku dostiže skoro 90%. I drugi autori su potvrdili da je elaginska kiselina dominantno polifenolno jedinjenje u bobicama iz familije Rosaceae (Häkinnen, 2000), kao na primer kod malina i jagoda (Hollman i Venema, 1993). Bobice iz familije Rosaceae su bogatije vitaminom C, i kod gloga identifikovana najveća količina ovog vitamina. Kod svih ispitanih bobica sadržaj vitamina C je veći od ukupnog sadržaja flavonoida i ukupnog sadržaja fenolnih kiselina. Takođe, sadržaj ukupnih fenolnih kiselina je duplo veći od sadržaja ukupnih flavonoida, kod svih ispitanih bobica, osim kod borovnice.

I drugi autori su utvrdili da su u bobičastom voću najzastupljeniji flavonoidi kampferol, kvercetin, miricetin, katehin i epikatehin, a od fenolnih kiselina *p*-kumarinska, ka-

fena, ferulna (hidroksi derivati cimetne kiseline), galna (hidroksi derivat benzoeeve kiseline) i elaginska kiselina (Häkkinen i sar., 1998; Strube i sar., 1993; Hertog i Hollman, 1996).

Pored navedenih flavonoida, u bobičastom voću su prisutni i antocijani delfinidin, petunidin, cijanidin i peonidin i to u obliku 3-glukozida i 3-galaktozida (Macheix i sar., 1990), ali su oni u ovom radu određeni spektrofotometrijski, kao ukupni i monomerni antocijani, zbog nedostatka standarda.

Na slici 23 prikazane su hemijske strukture flavonoida i fenolnih kiselina koje su detektovane u ispitivanim frakcijama ekstrakata borovnice, brusnice, šipka i gloga.



Slika 23. Hemijske strukture polifenolnih jedinjenja identifikovanih u frakcijama ekstrakata ispitivanih bobica

Prilikom evaluacije antiradikalske aktivnosti frakcija ekstrakata bobica, hemijske strukture identifikovanih jedinjenja se moraju uzeti u obzir. Ovakav pristup se u literaturi naziva *strukturnalna aktivnost* (structural activity relationship - SAR). Povezivanje strukture i aktivnosti je tradicionalan pristup u medicinskoj hemiji gde se modifikacijom hemijske strukture utiče na potencijal (npr. aktivnost) bioaktivnih jedinjenja. Osnovna pretpostavka za sve hipoteze bazirane na molekulskoj osnovi je da slični molekuli imaju slično dejstvo.

4.3. ESR ANALIZA ANTIRADIKALSKE AKTIVNOSTI FRAKCIJA EKSTRAKATA BOBICA

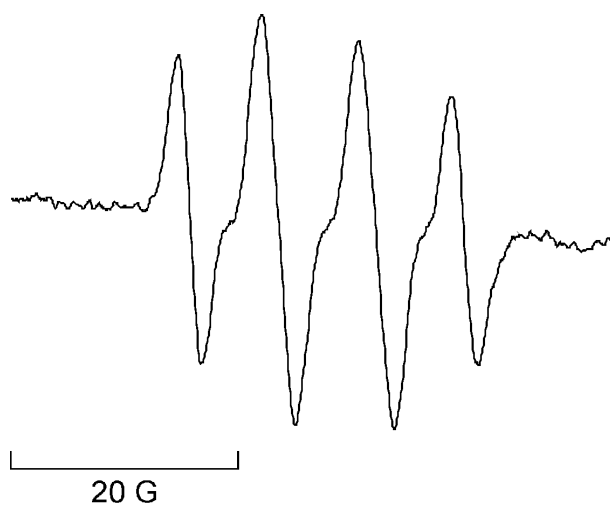
4.3.1. ESR spektralna analiza uticaja frakcija ekstrakata bobica na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala

Iako je superoksid anjon radikal slab oksidacioni agens, on je prekursor u stvaranju vrlo reaktivnih hidroksil radikala i singlet kiseonika. Superoksid anjon radikal se može generisati enzimatski, sistemom ksantin/ksantin oksidaza ili hemijskim putem, sa smešom kalijum superoksida i kraunetra. Prednost hemijskog generisanja superoksid anjon radikala za određivanje antiradikalske aktivnosti je jednoznačnost interpretiranih rezultata. Naime, jedinjenja prisutna u ekstraktima mogu imati i inhibitorno dejstvo na enzimski sistem ksantin/ksantin oksidaza, pored antiradikalske aktivnosti. Ovaj problem je prevaziđen kada je izvor superoksid anjon radikala hemijski sistem.

Elektron spin rezonantna (ESR) spektroskopija je jedina metoda koja omogućava direktnu detekciju slobodnih radikala. Iako je osetljivost ove metode veoma visoka (10^{-10} M), detekcija kratkoživećih, relativno nestabilnih, reaktivnih slobodnoradikalnih vrsta poput superoksid anjon i hidroksil radikala nije moguća zbog njihovog kratkog vremena života. Jedna od metoda koja omogućava njihovu detekciju je "spin trapping" metoda kojom se nestabilni slobodni radikali "hvataju" pomoću određenih organskih jedinjenja tzv. "spin trapova" i nastaju stabilni radikali tzv. "spin adukti" koji se mogu detektovati ESR spektroskopijom (Čanadanović-Brunet, 1998).

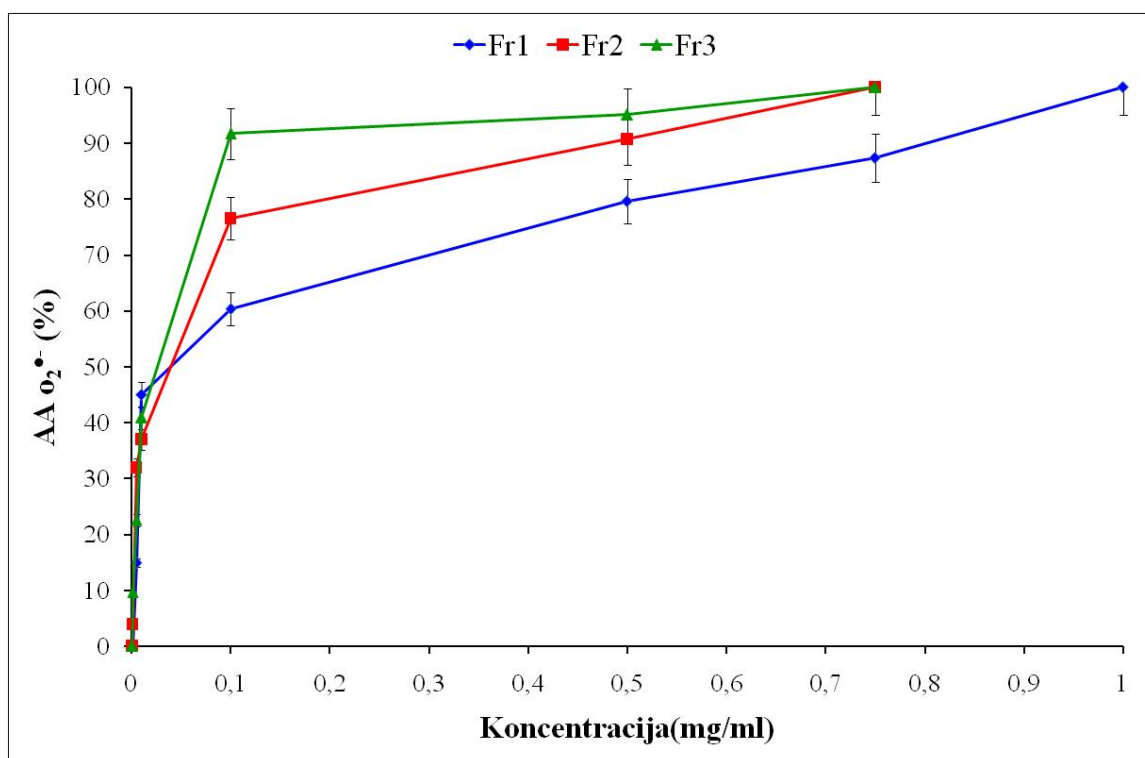
ESR spektralna određivanja slobodnih superoksid anjon radikala u navedenom model sistemu izvršena su "spin trapping" metodom upotrebom DMPO kao "spin trap" jedinjenja.

Hiperfina struktura ESR signala stabilizovanih superoksid anjon radikala, odnosno DMPO-OOH "spin adukata" (slika 24) sastoji se od četiri linije, a konstante cepanja imaju vrednost $a_N = 12,65$ G, $a_{H\beta} = 10,4$ G i $a_{H\gamma} = 1,3$ G.



Slika 24. ESR spektar DMPO-OOH "spin adukata" superoksid anjon radikala (slepa proba)

Na slici 25 prikazan je uticaj frakcija ekstrakta borovnice na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala.

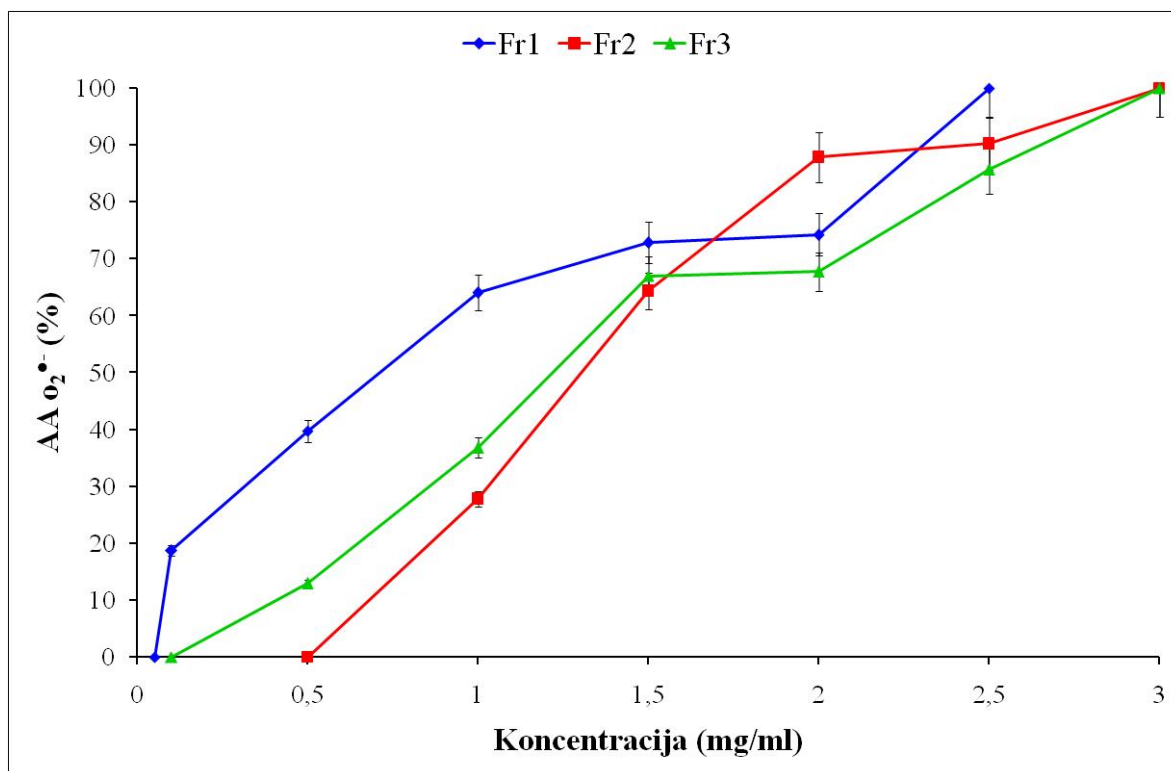


Slika 25. Uticaj frakcija ekstrakta borovnice na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala

Sve frakcije ekstrakta borovnice efikasno su uticale na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala. Pri nižim ispitivanim koncentracijama (0,001 - 0,01 mg/ml) ne postoji statistički značajna ($p < 0,05$) razlika u antiradikalnim aktivnostima sve tri frakcije ekstrakta borovnice. Frakcije Fr2 i Fr3 potpuno eliminišu superoksid anjon radikale iz reakcione smeše ($AA_{O_2^{\bullet-}} = 100\%$) pri istoj primenjenoj koncentraciji od 0,75 mg/ml. Isti efekat se postiže sa 1 mg/ml frakcije Fr1.

ESR spektralnom analizom antiradikalne aktivnosti frakcija ekstrakta borovnice na superoksid anjon radikale dobijen je sledeći redosled njihovog uticaja: Fr3 > Fr2 > Fr1.

Slika 26 predstavlja uticaj različitih koncentracija frakcija ekstrakta brusnice na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala.



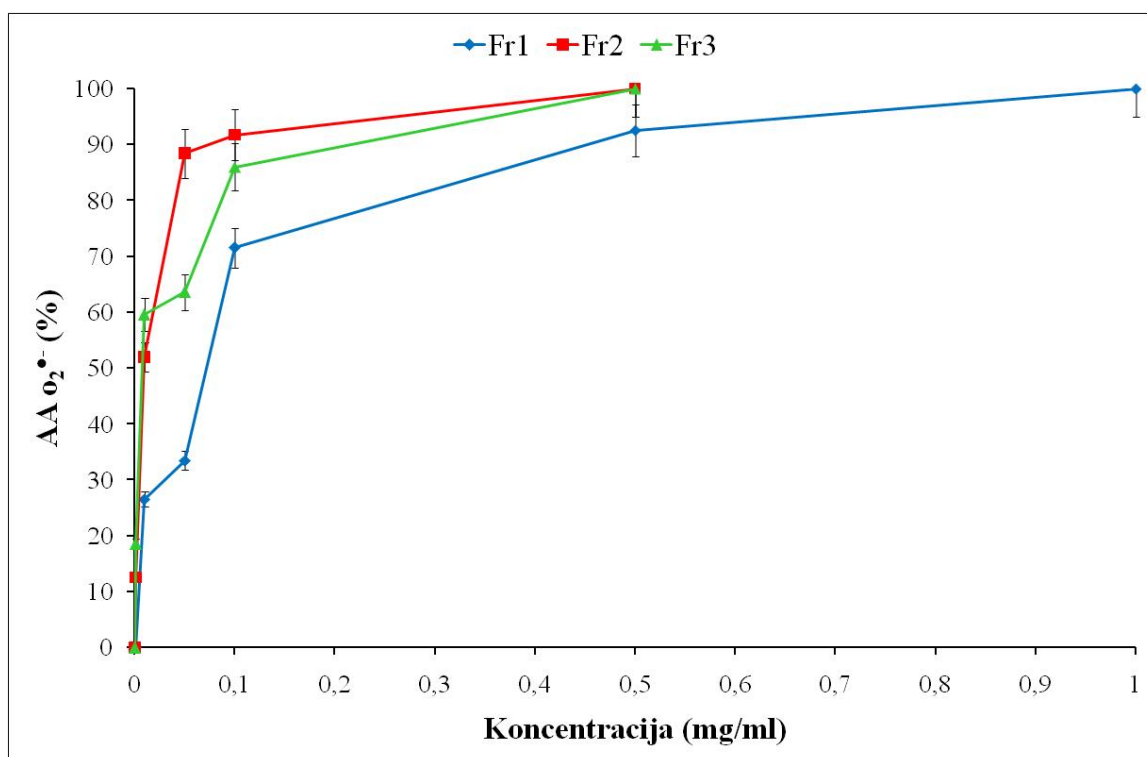
Slika 26. Uticaj frakcija ekstrakta brusnice na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala

Frakcije ekstrakta brusnice pokazale su relativno niže vrednosti antiradikalnih aktivnosti u odnosu na frakcije ekstrakta borovnice. Sve tri frakcije imale su slične antiradikalne aktivnosti, gde je aktivnost frakcije Fr1, osim u slučaju primenjene koncentracije 2 mg/ml, bila najizraženija. Frakcija Fr3 je pri nižim ispitivanim koncentracijama (0,05 - 1,5 mg/ml) imala veći uticaj na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala, dok je pri

većim primenjenim koncentracijama (1,5 - 3 mg/ml) veću aktivnost pokazala frakcija Fr2. Antiradikalska aktivnost $AA_{O_2\bullet}$ od 100% je postignuta pri koncentraciji od 3 mg/ml frakcija Fr2 i Fr3, i pri koncentraciji 2,5 mg/ml frakcije Fr1.

ESR analiza antiradikalske aktivnosti frakcija ekstrakta brusnice u model sistemu koji sadrži superoksid anjon radikale ukazuje na zavisnost aktivnosti od tipa i koncentracije primenjene frakcije po sledećem redosledu: Fr1 > Fr2 \approx Fr3.

Na slici 27 predstavljene su antiradikalske aktivnosti $AA_{O_2\bullet}$ frakcija ekstrakta šipka.

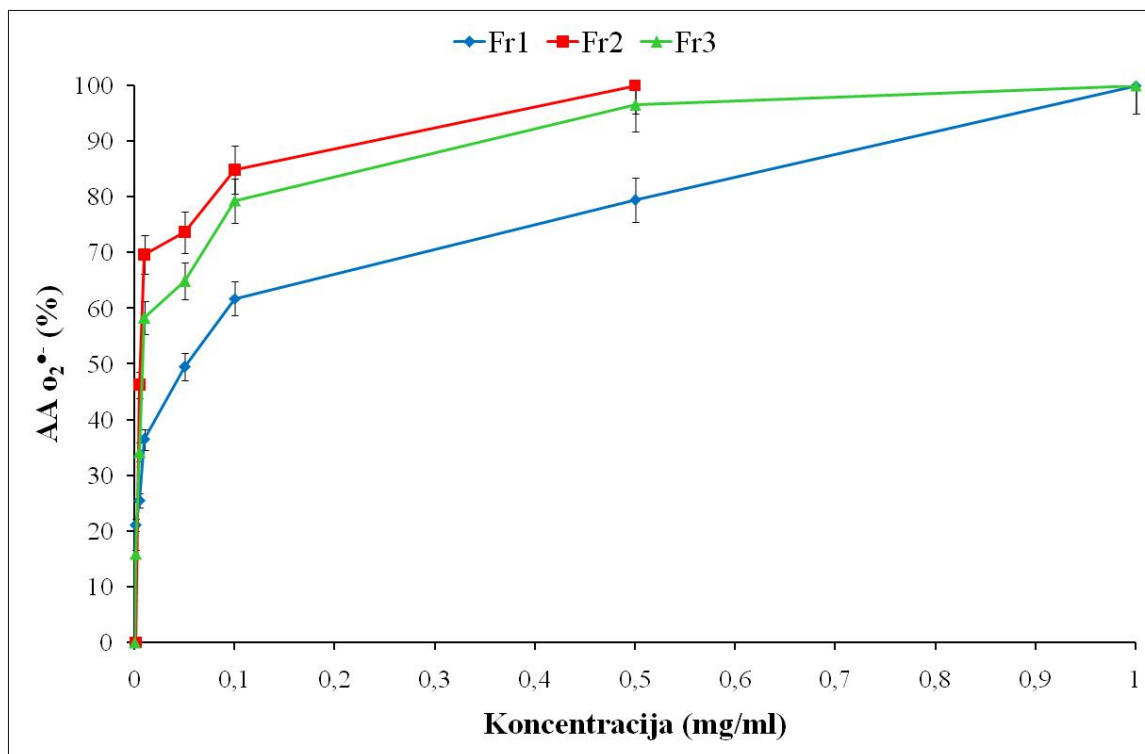


Slika 27. Uticaj frakcija ekstrakta šipka na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala

Frakcije ekstrakta šipka značajno su uticale na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala već pri relativno niskim ispitivanim koncentracijama (0,001 - 1 mg/ml), kao i frakcije ekstrakta borovnice. Frakcije Fr2 i Fr3 su pri nižim ispitivanim koncentracijama imale statistički značajne slične vrednosti ($p < 0,05$) antiradikalske aktivnosti, a pri koncentraciji od 0,5 mg/ml obe frakcije su gasile ESR signal superoksid anjon radikala. Nešto nižu aktivnost pokazala je frakcija Fr1 koja je pri koncentraciji od 1 mg/ml dostigla maksimalnu vrednost $AA_{O_2\bullet}$ od 100%.

Redosled antiradikalske aktivnosti ($AA_{O_2^{\bullet-}}$) frakcija ekstrakta šipka na superoksid anjon radikale je: $Fr2 \geq Fr3 > Fr1$.

Frakcije ekstrakta gloga su uticale na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala kao što je prikazano na slici 28.



Slika 28. Uticaj frakcija ekstrakta gloga na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala

Frakcije ekstrakta gloga su uticale na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala u istom opsegu ispitivanih koncentracija kao i frakcije ekstrakta borovnice i šipka, 0,001 - 1 mg/ml. Trend aktivnosti je isti kao kod frakcije ekstrakta šipka, gde su aktivnosti Fr2 i Fr3 pri nižim ispitivanim koncentracijama statistički značajno slične ($p < 0,05$). U ovom slučaju frakcije Fr1 i Fr3 gase ESR signal superoksid anjon radikala pri istoj koncentraciji od 1 mg/ml, dok je ovaj efekat frakcija Fr2 postigla već pri duplo nižoj koncentraciji od 0,5 mg/ml.

Redosled antiradikalske aktivnosti ($AA_{O_2^{\bullet-}}$) frakcija ekstrakta gloga na superoksid anjon radikale je: $Fr2 \geq Fr3 > Fr1$.

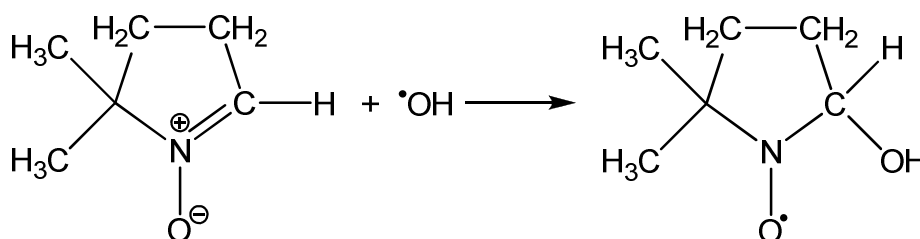
4.3.2. ESR spektralna analiza uticaja frakcija ekstrakata bobica na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala

Za određivanje antiradikalne aktivnosti frakcija ekstrakata bobica na reaktivne hidroksil radikale korišćen je 5,5-dimetil-1-pirolin-N-oxid (DMPO) kao "spin trap" jedinjenje. Nastali DMPO-OH "spin adukti" su relativno stabilni i pogodni za detekciju ESR-om.

Reaktivni hidroksil radikali generisani su Fentonovom reakcijom:

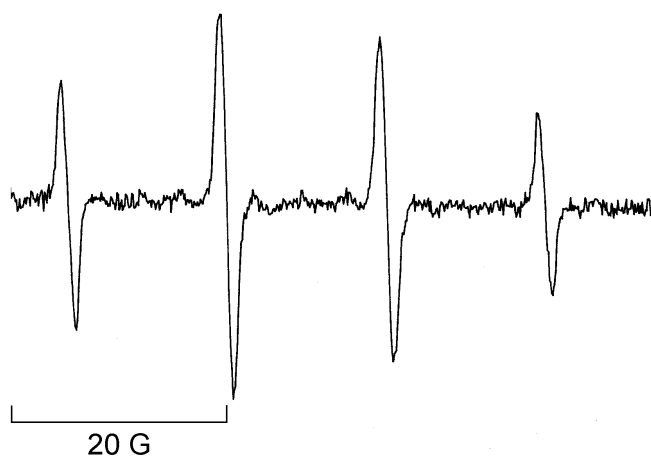


Nastali reaktivni $\cdot\text{OH}$ radikali u prisustvu "spin trapa" DMPO formiraju stabilne nitroksid radikale, odnosno DMPO-OH "spin adukate", sledećim reakcionim mehanizmom:



Ovaj antiradikalni test daje informaciju ne samo o antiradikalnoj ("skevindžer") aktivnosti ekstrakata na slobodne hidroksil radikale već i o sposobnosti jedinjenja prisutnih u ekstraktima da stvaraju komplekse sa jonima gvožđa i da na taj način sprečavaju stvaranje hidroksil radikala Fentonovom reakcijom.

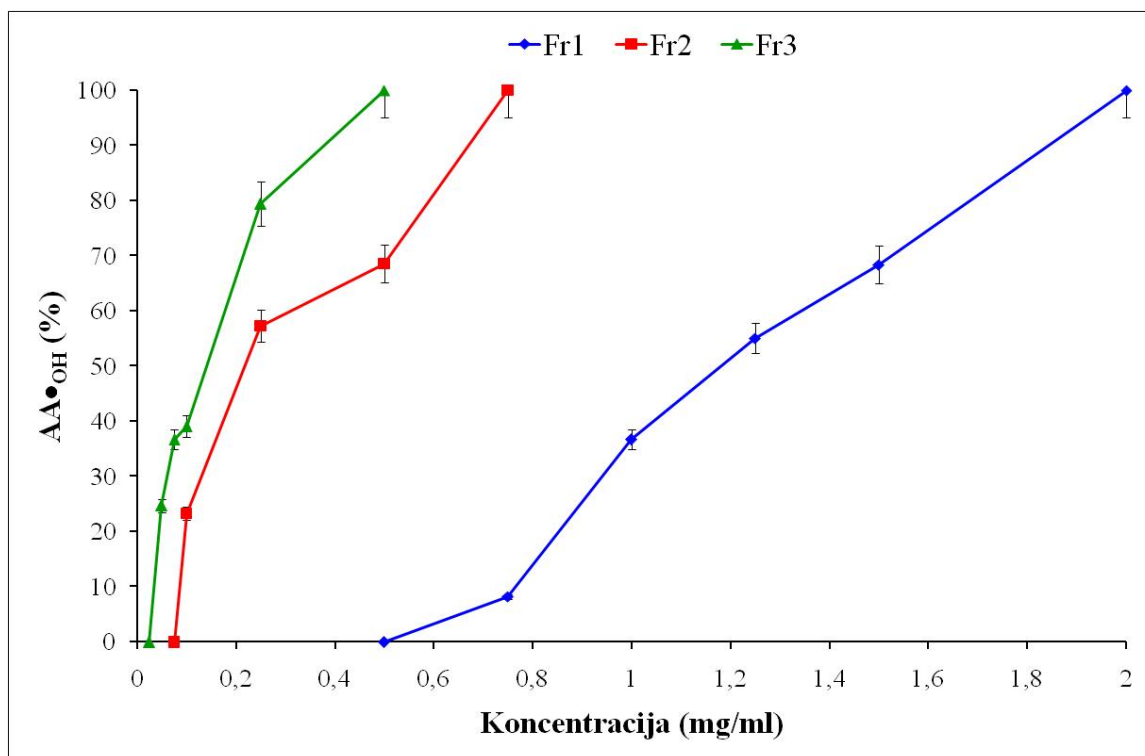
Na slici 29 je prikazan ESR spektar DMPO-OH „spin adukata“ nastalih u Fentonovom model sistemu.



Slika 29. ESR spektar DMPO-OH "spin adukata" nastalih u Fentonovom model sistemu (slepa proba)

Hiperfina struktura ovog ESR spektra je predstavljena sa četiri linije relativnog intenziteta 1:2:2:1 i istih konstanti hiperfinog cepanja za jedan ^{14}N -atom ($I = 1$) $a_{\text{N}} = 14,9$ G, i za jedan ^1H -atom ($I = 1/2$) $a_{\text{H}} = 14,9$ G.

Na slici 30 prikazane su antiradikalske aktivnosti ($\text{AA}\cdot_{\text{OH}}$) frakcija ekstrakta borovnice na hidroksil radikale u Fentonovom model sistemu.

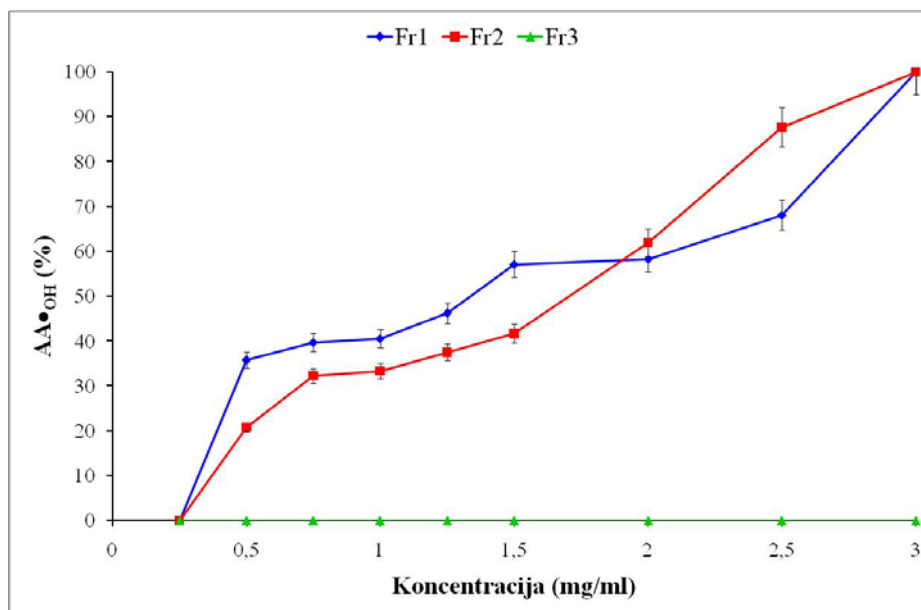


Slika 30. Uticaj frakcija ekstrakta borovnice na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala

Sve frakcije ekstrakta borovnice pokazale su koncentracijski zavisnu antiradikalnu aktivnost na hidroksil radikale u Fentonovom model sistemu. Frakcija koja sadrži fenolne kiseline, Fr3, pokazala je najizrazitije delovanje dok je najmanju antiradikalnu aktivnost pokazala frakcija Fr1 u celom opsegu ispitivanih koncentracija. Frakcija Fr3 pri koncentraciji od 0,5 mg/ml postigla je antiradikalnu aktivnost od 100%, dok je aktivnost frakcije Fr1 pri istoj ispitivanoj koncentraciji bila 0%.

Redosled uticaja frakcija ekstrakta borovnice na reaktivne hidroksil radikale je: $\text{Fr3} > \text{Fr2} > \text{Fr1}$.

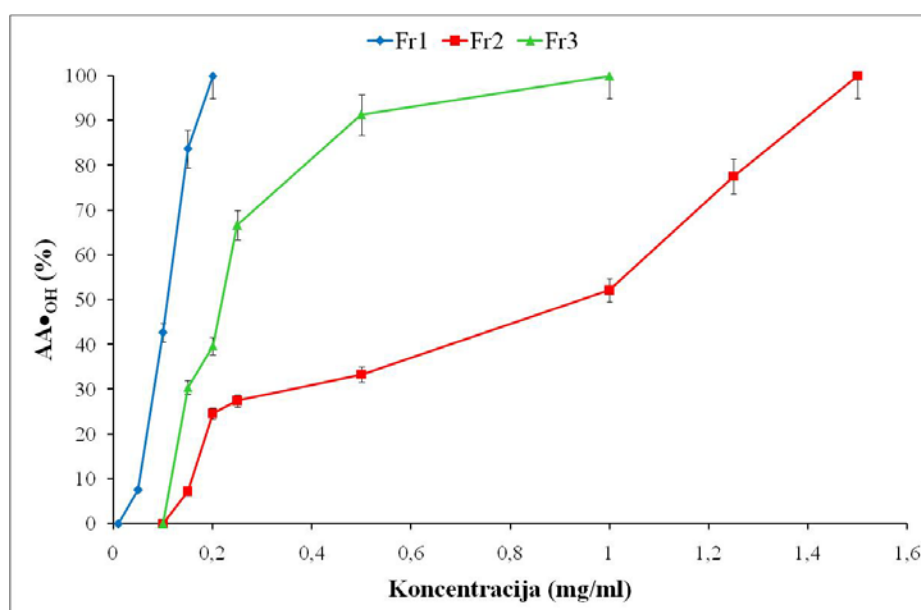
Na slici 31 prikazan je uticaj frakcija ekstrakta brusnice na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala.



Slika 31. Uticaj frakcija ekstrakta brusnice na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala

Frakcije ekstrakta brusnice pokazale su značajno niže vrednosti antiradikalske aktivnosti na reaktivne hidroksil radikale od frakcija ekstrakta borovnice. Frakcija Fr3 nije uticala na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala u ispitivanom opsegu koncentracija 0,25 - 3 mg/ml. U navedenom opsegu koncentracija frakcije Fr1 i Fr2 imale su sličan uticaj na hidroksil radikale, gde je pri nižim koncentracijama frakcija Fr1 imala izraženiju aktivnost, a pri višim frakcija Fr2.

Uticaj frakcija ekstrakta šipka na stvaranje i transformaciju reaktivnih hidroksil radikala u Fentonovom model sistemu prikazan je na slici 32.

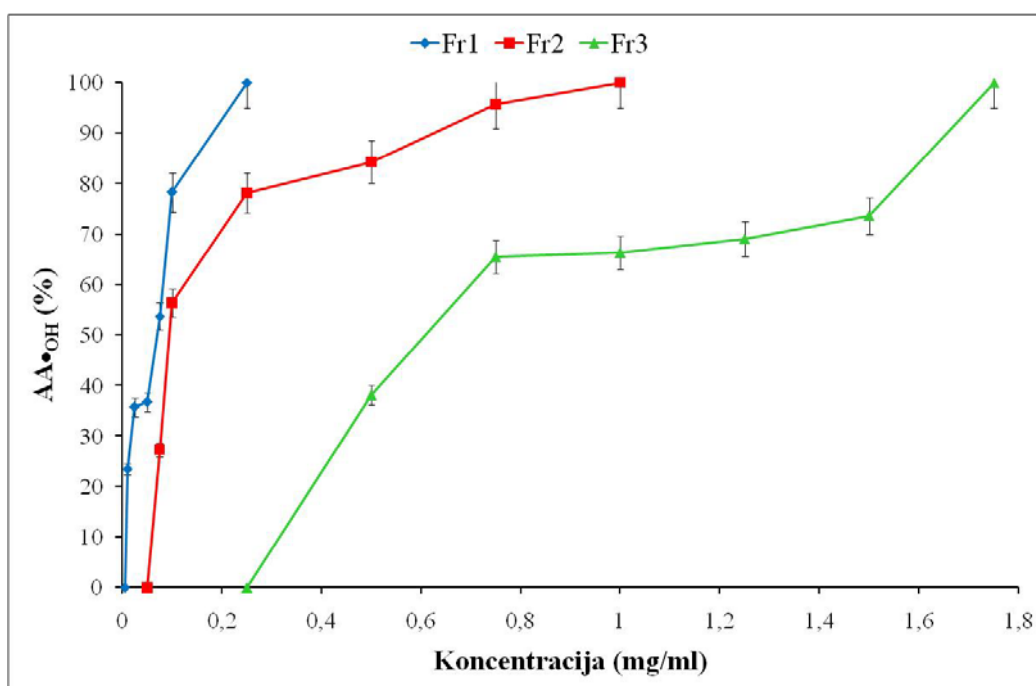


Slika 32. Uticaj frakcija ekstrakta šipka na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala

Sve frakcije ekstrakta šipka pokazale su uticaj na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala nastalih u Fentonovoj reakciji. Na osnovu prikazanih rezultata na slici 32 može se zaključiti da je najveću $AA\bullet_{OH}$ postigla frakcija Fr1, a frakcija Fr2 je najmanje uticala na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala. Tako, na primer, pri ispitivanoj koncentraciji od 0,1 mg/ml frakcija Fr1 je potpuno ugasila ESR signal DMPO-OH “spin adukata” hidroksil radikala ($AA\bullet_{OH} = 100\%$) dok pri istoj primenjenoj koncentraciji frakcija Fr2 i Fr3 nije došlo do sniženja ESR signala DMPO-OH “spin adukata” hidroksil radikala u donosu na slepu probu ($AA\bullet_{OH} = 0\%$). Frakcije Fr3 i Fr2 su potpuno uklonile hidroksil radikale iz reakcionog sistema ($AA\bullet_{OH} = 100\%$) pri koncentracijama od 1 i 1,5 mg/ml.

Utvrđeni redosled uticaja frakcija ekstrakta šipka na hidroksil radikale u Fentonovom model sistemu je: Fr1 > Fr3 > Fr2.

Na slici 33 prikazani su rezultati ispitivanja antiradikalske aktivnosti frakcija ekstrakta gloga na hidroksil radikale.



Slika 33. Uticaj frakcija ekstrakta gloga na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala

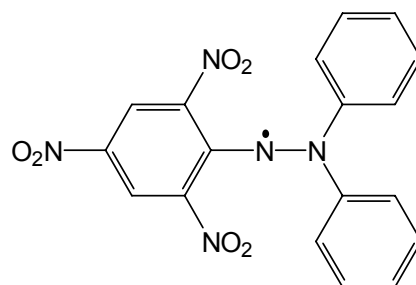
Analizom ESR spektara DMPO-OH “spin adukata” nastalih dodavanjem frakcija ekstrakta gloga u Fentonov model sistem može se zaključiti da su sve ispitivane frakcije uticale na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala. $AA\bullet_{OH}$ je zavisila od vrste i koncentracije primenjene frakcije. Kao i u slučaju šipka, najveću antiradikalsku aktivnost pokazala je frakcija Fr1. Tako je ova frakcija pri ispitivanoj koncentraciji od 0,075 mg/ml

imala aktivnost od 53,76%. Dodavanjem ove frakcije u koncentraciji od 0,25 mg/ml u reakcioni sistem potpuno se eliminiše prisustvo hidroksil radikala. Frakcije Fr2 i Fr3 isti efekat ($AA\bullet_{OH} = 100\%$) su postigle pri višim ispitivanim koncentracijama, i to 1 i 1,75 mg/ml.

Na osnovu rezultata ESR ipitivanja antiradikalske aktivnosti frakcija ekstrakta gloga utvrđen je sledeći redosled njihovog uticaja na reaktivne hidroksil radikale: Fr1 > Fr2 > Fr3.

4.3.3. ESR spektralna analiza uticaja frakcija ekstrakata bobica na transformaciju DPPH radikala

Slobodni DPPH radikali se najčešće upotrebljavaju u antioksidativnim testovima za određivanje sposobnosti prirodnih sekundarnih metabolita prisutnih u ekstraktima da predaju labilan vodonikov atom slobodnim radikalima. Ovaj mehanizam predstavlja najčešći i najjednostavniji mehanizam antioksidativne zaštite ($DPPH\bullet + AH \rightarrow DPPH-H + A\bullet$) (Goupy, Dufour, Loonis & Dangles, 2003). DPPH radikal je stabilan slobodni radikal i ima sledeću hemijsku strukturu:

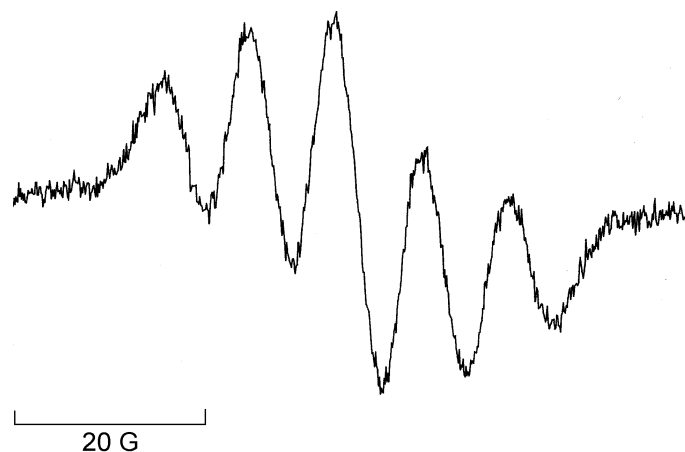


Iako je DPPH[•] azotov radikal (nespareni elektron nalazi se na azotovom atomu), konstante brzina reakcija antioksidanata sa ovim radikalom se mogu dobro aproksimirati sa konstantama za reakcije sa lipidnim peroksil radikalima (Brand-Williams i sar., 1995; Foti i sar., 2002; Gregor i sar., 2005). Stoga rezultati ovog antiradikalskog testa daju informaciju i o zaštitnom efektu antioksidanata tokom oksidacije lipida.

Zbog nesparenog elektrona DPPH[•] apsorbuje svetlost u vidljivom delu spektra, na talasnoj dužini od 517 nm (jarko ljubičasta boja). Kada se ovaj elektron spari u prisustvu antioksidanata, apsorbanca na ovoj talasnoj dužini opada. Ova promena se može pratiti i ESR spektrometrijski, direktnim praćenjem promene koncentracije DPPH[•]. Transformacija boje iz ljubičaste u žutu, i sniženje ESR signala je stehiometrijski proporcionalna broju elektrona koji su predati.

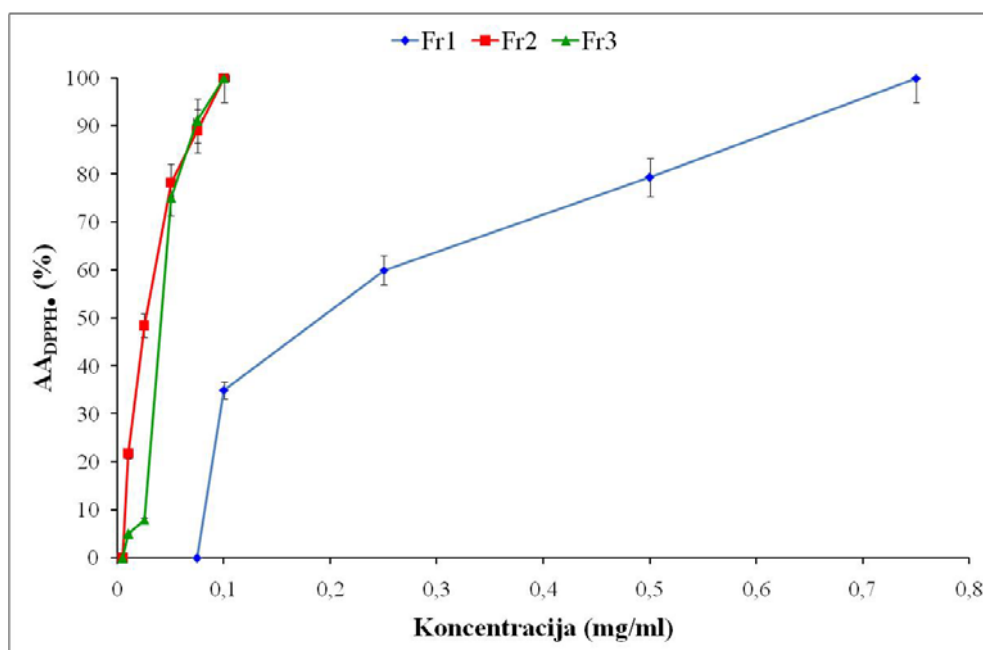
Hiperfina struktura ESR spektra stabilnih DPPH radikala potiče od interakcije ne-sporenog elektrona i dva ^{14}N atoma ($I = 1$). Sastoji se od pet linija relativnog intenziteta 1:2:3:2:1. Konstanta hiperfinog cepanja ima vrednost $a_{\text{N}} = 9,03\text{G}$.

Na slici 29 prikazan je ESR spektar stabilnih DPPH slobodnih radikala slepe probe (0,4 mM metanolni rastvor DPPH $^{\bullet}$).



Slika 34. ESR spektar DPPH radikala (slepa proba)

Uticaj različitih koncentracija frakcija ekstrakta borovnice na transformaciju DPPH $^{\bullet}$ prikazan je na slici 35.



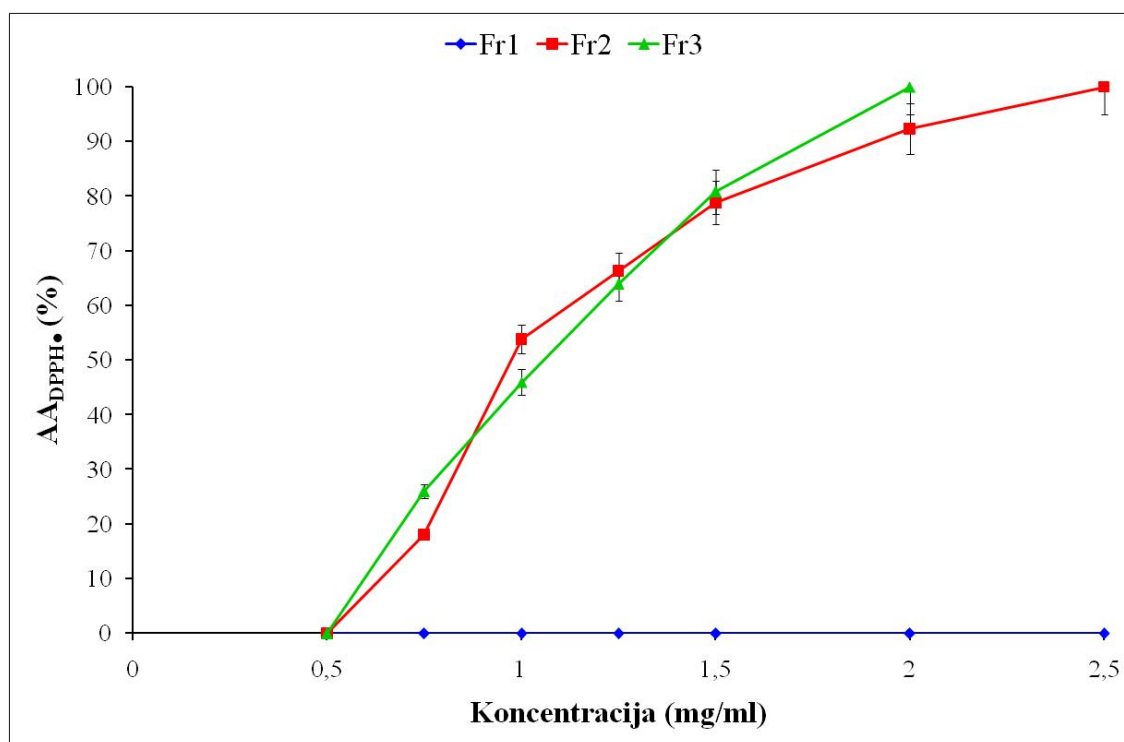
Slika 35. Uticaj frakcija ekstrakta borovnice na transformaciju DPPH $^{\bullet}$

ESR spektralnom analizom utvrđeno je da su frakcije ekstrakta borovnice uticale na transformaciju DPPH $^{\bullet}$ u zavisnosti od koncentracije i vrste primenjene frakcije. Antira-

dikalne aktivnosti frakcija Fr2 i Fr3 su slične u ispitivanom opsegu koncentracija od 0,005 - 0,1 mg/ml. Pored toga, ne postoji statistički značajna razlika u aktivnosti Fr2 i Fr3 pri koncentracijama 0,05 i 0,075 mg/ml ($p < 0,05$). Frakcija Fr1 je ispoljila antiradikalno delovanje na DPPH• u opsegu koncentracija od 0,075 do 0,75 mg/ml.

Utvrđen redosled antiradikalne aktivnosti frakcija ekstrakta borovnice na DPPH radikale u ispitivanom sistemu je: $Fr2 \geq Fr3 > Fr1$.

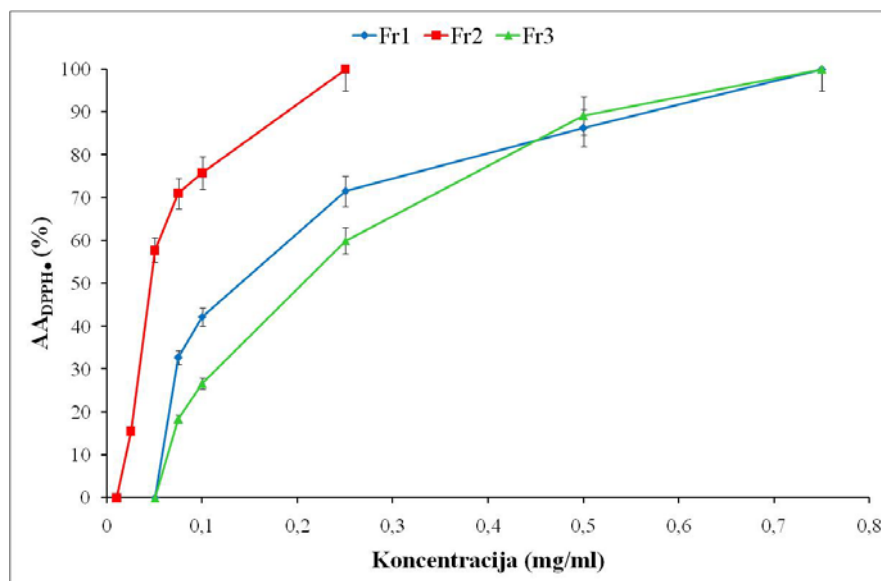
Slika 36 predstavlja antiradikalne aktivnosti frakcija ekstrakta brusnice na stabilne DPPH radikale.



Slika 36. Uticaj frakcija ekstrakta brusnice na transformaciju DPPH•

Kao i u slučaju antiradikalne aktivnosti u model sistemu sa superoksid anjon i hidrokso radikalima, aktivnosti frakcija ekstrakta brusnice na stabilne DPPH radikale su bile manje od aktivnosti frakcija ekstrakta borovnice. Frakcije Fr2 i Fr3 pokazale su slično dejstvo, bez statistički značajne razlike ($p < 0,05$), na DPPH•. Potpuna eliminacija DPPH• postignuta je primenom Fr2 u koncentraciji 2,5 mg/ml, a Fr3 u koncentraciji 2,0 mg/ml. Frakcija Fr1 nije uticala na koncentraciju prisutnih DPPH• u ispitivanom opsegu koncentracija 0,5 - 2,5 mg/ml.

Uticaj frakcija ekstrakta brusnice na stabilne DPPH radikale u ispitivanom sistemu je: $Fr3 \geq Fr2 > Fr1$.

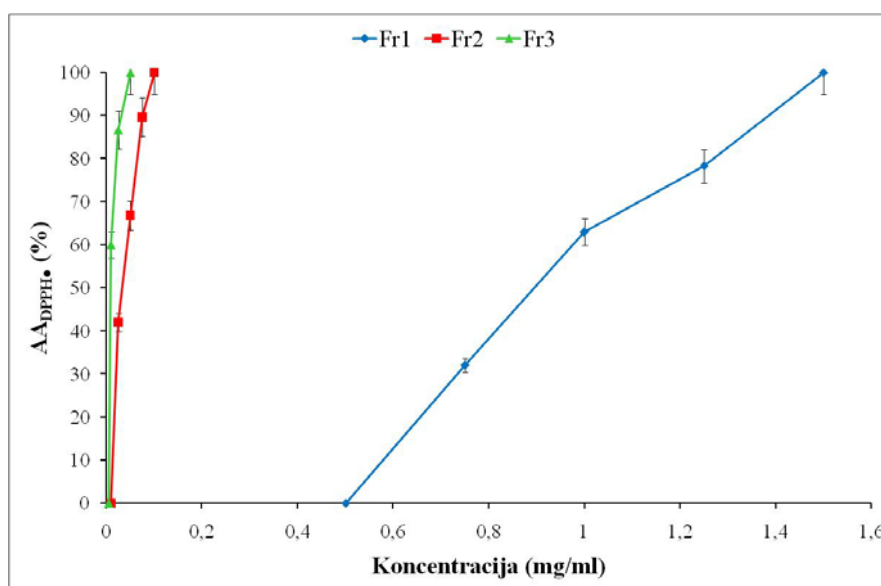


Slika 37. Uticaj frakcija ekstrakta šipka na transformaciju DPPH•

Frakcije ekstrakta šipka pokazale su visoku antiradikalnu aktivnost na DPPH• koja je zavisila od vrste i koncentracije primenjene frakcije (slika 37). Rezultati ukazuju na najizraženiju antiradikalnu aktivnost frakcije Fr2, i niže aktivnosti frakcija Fr1 i Fr3. Razlike u aktivnosti frakcija Fr1 i Fr3 nisu bile statističke značajne ($p < 0,05$), a gašenje ESR signala DPPH• postignuto je primenom ovih frakcija pri istoj koncentraciji od 0,25 mg/ml.

Redosled antiradikalne aktivnosti ($AA_{DPPH•}$) frakcija ekstrakta šipka na stabilne DPPH radikale je: $Fr2 > Fr1 \geq Fr3$.

Na slici 38 su predstavljeni rezultati ESR spektralne analize uticaja frakcija ekstrakta gloga na transformaciju DPPH radikala.



Slika 38. Uticaj frakcija ekstrakta gloga na transformaciju DPPH•

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da sve frakcije ekstrakta gloga utiču na transformaciju DPPH[•] u zavisnosti od njihove primenjene koncentracije. Vrlo visoke antiradikalske aktivnosti u ispitivanom sistemu pokazale su frakcije Fr2 i Fr3, gde je potpuna redukcija DPPH[•] postignuta pri ispitivanim koncentracijama ovih frakcija od 0,1 mg/ml i 0,05 mg/ml. Frakcija Fr1 pokazala je uticaj na DPPH[•] tek pri koncentraciji od 0,75 mg/ml ($AA_{DPPH^{\bullet}} = 32\%$), a gašenje ESR signala ova frakcija postigla je pri koncentraciji od 1,5 mg/ml.

Utvrđen je sledeći redosled uticaja frakcija ekstrakta gloga na transformaciju DPPH[•]: Fr3 > Fr2 > Fr1.

U tabeli 21 prikazane su EC₅₀ vrednosti frakcija ekstrakata ispitivanih bobica i sintetičkog antioksidanta BHA dobijenih u sva tri ispitivana model sistema.

Tabela 21. EC₅₀ vrednosti frakcija ekstrakata borovnice, brusnice, šipka i gloga i sintetičkog antioksidanta BHA

FRAKCIJE EKSTRAKATA BOBICA		EC ₅₀ ^{O₂^{•-}} (mg/ml)	EC ₅₀ ^{•OH} (mg/ml)	EC ₅₀ ^{DPPH[•]} (mg/ml)
BOROVNICA <i>Vaccinium myrtillus L.</i>	Fr1	0,049 ± 0,002	1,213 ± 0,058	0,204 ± 0,009
	Fr2	0,021 ± 0,001	0,233 ± 0,010	0,025 ± 0,001
	Fr3	0,015 ± 0,001	0,117 ± 0,004	0,042 ± 0,002
BRUSNICA <i>Vaccinium macrocarpon L.</i>	Fr1	0,679 ± 0,03	1,231 ± 0,043	0
	Fr2	1,322 ± 0,062	1,747 ± 0,076	1,031 ± 0,042
	Fr3	1,231 ± 0,054	0	1,066 ± 0,003
ŠIPAK <i>Rosa canina L.</i>	Fr1	0,063 ± 0,002	0,089 ± 0,004	0,145 ± 0,006
	Fr2	0,012 ± 0,001	0,815 ± 0,032	0,049 ± 0,002
	Fr3	0,013 ± 0,001	0,212 ± 0,009	0,204 ± 0,089
GLOG <i>Crataegus oxyacantha L.</i>	Fr1	0,031 ± 0,001	0,057 ± 0,002	0,920 ± 0,042
	Fr2	0,012 ± 0,001	0,254 ± 0,011	0,034 ± 0,002
	Fr3	0,014 ± 0,001	0,644 ± 0,028	0,017 ± 0,001
BHA		2,680 ± 0,125	1,505 ± 0,062	0,028 ± 0,001

Na osnovu prikazanih EC₅₀ vrednost u tabeli 21 evidentno je da su sve frakcije ekstrakata ispitivanih bobica pokazale veće antiradikalske aktivnosti na superoksid anjon i hidroksil radikale, dok su samo frakcija Fr2 borovnice i frakcija Fr3 gloga efikasnije eliminisale DPPH[•] od sintetičkog antioksidanta BHA.

Frakcije Fr1 ekstrakata ispitivanih bobica koje sadrže vitamin C (tabele 17, 18, 19 i 20), su pokazale najbolje antiradikalno delovanje na superoksid anjon radikale u odnosu na druge ispitivane slobodnoradikalne vrste, odnosno imale su najniže EC_{50} vrednosti. Najniža $EC_{50}^{O_2^{\bullet-}}$ vrednost je zabeležena za frakciju Fr1 gloga koji i sadrži najviše vitamina C (2043 $\mu\text{g/g}$), a najveća za frakciju Fr1 brusnice kod koje je HPLC analizom utvrđena najmanja količina vitamina C (754 $\mu\text{g/g}$), pa se može zaključiti da su rezultati antiradikalne aktivnosti u saglasnosti sa sadržajem vitamina C u frakcijama Fr1 ekstrakata bobica.

Sve frakcije Fr1 ekstrakata bobica, osim u slučaju brusnice, su pokazale niže antiradikalne aktivnosti u model sistemu sa superoksid anjon radikalima od frakcija koje sadrže polifenolna jedinjenja, flavonoide (Fr2) i fenolne kiseline (Fr3). Saopšteno je da je konstanta brzine reakcije askorbata sa superoksid anjon radikalom manja od konstante brzine reakcije glutaciona, nekih polifenola i hinona sa superoksid anjon radikalom (tabela 22), što je u saglasnosti sa $EC_{50}^{O_2^{\bullet-}}$ vrednostima prikazanim u tabeli 21.

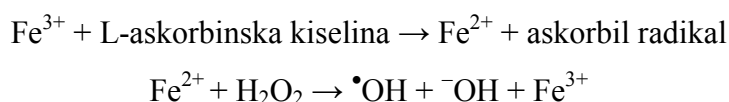
Tabela 22. Konstante brzina reakcija pojedinih antioksidanata

JEDINJENJE	RADIKAL	KONSTANTA BRZINE ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	LITERATURNI PODACI
Askorbat	$O_2^{\bullet-}$	$2,7 - 6,5 \times 10^5$	Niki, 1991.; Halliwell i Gutteridge, 1999.
	$\bullet\text{OH}$	$1,1 \times 10^{10}$	Buettner i Jurkiewicz, 1996.
Benzohinon (i ostali hinoni)	$O_2^{\bullet-}$	1×10^9	Halliwell i Gutteridge, 1999.
Katehol (i ostali difenoli)	$O_2^{\bullet-}$	1×10^9	Halliwell i Gutteridge, 1999.
Glutation	$O_2^{\bullet-}$	$7,7 \times 10^5$	Halliwell i Gutteridge, 1999.
Elaginska kiselina	$\bullet\text{OH}$	$8,9 \times 10^9$	Priyadarsini i sar., 2002.
p-Kumarinska kiselina	$\bullet\text{OH}$	$8,2 \times 10^9$	Larson, 1997.
Siringinska kiselina	$\bullet\text{OH}$	$1,6 \times 10^{10}$	Larson, 1997.
Ferulna kiselina	$\bullet\text{OH}$	$4,6 \times 10^{10}$	Larson, 1997.
Vanilinska kiselina	$\bullet\text{OH}$	$1,6 \times 10^{10}$	Larson, 1997.
Kvercetin	$\bullet\text{OH}$	$5,1 \times 10^9$	Bors i sar., 1992.
Katehin	$\bullet\text{OH}$	$6,6 \times 10^9$	Bors i sar., 1992.

Nešto niže antiradikalne aktivnosti, odnosno veće $EC_{50}^{\bullet\text{OH}}$ vrednosti, frakcija Fr1 ekstrakata bobica detektovane su u Fentonovom model sistemu. Pored toga, ove aktivnosti su bile bolje od aktivnosti drugih frakcija bobica na reaktivne hidroksil radikale, osim u

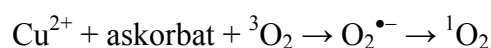
slučaju frakcije Fr1 borovnice. Rezultati antiradikalnih aktivnosti na reaktivne hidroksil radikale frakcija Fr1 su u saglasnosti sa sadržajem vitamina C u ovim frakcijama. Naime, frakcije Fr1 dobijene iz ekstrakata bobica koje pripadaju porodici Rosaceae (šipak i glog) su imale izraženiji uticaj na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala od istih frakcija ekstrakata bobica iz porodice Ericaceae (borovnica i brusnica), što ukazuje da vitamin C ima veću antiradikalnu aktivnost na hidroksil radikale.

Poznata je činjenica da, u pojedinim slučajevima, unosom velikih doza vitamina C, kao i u uslovima povećane koncentracije metala, askorbinska kiselina može delovati prooksidativno. Tokom te reakcije dolazi do prelaska metalnih jona, Fe(III) i Cu(II), u njihov redukovani oblik. Ovi metalni joni dalje mogu reagovati sa vodonik-peroksidom, mehanizmom Fentonove reakcije, i stvarati povećanu koncentraciju hidroksil radikala:



Pored toga, redukovani joni gvožđa mogu reagovati i sa lipidnim hidroperoksidima, i dovesti do stvaranja vrlo reaktivnih alkoksil radikala i tako katalizovati reakciju lipidne peroksidacije (Buettner, 1986).

Takođe, joni metala autooksidacijom mogu generisati superoksid anjon radikale ili singletni kiseonik, koji su promotori/inicijatori oksidacije lipida (Aurand i sar., 1977):

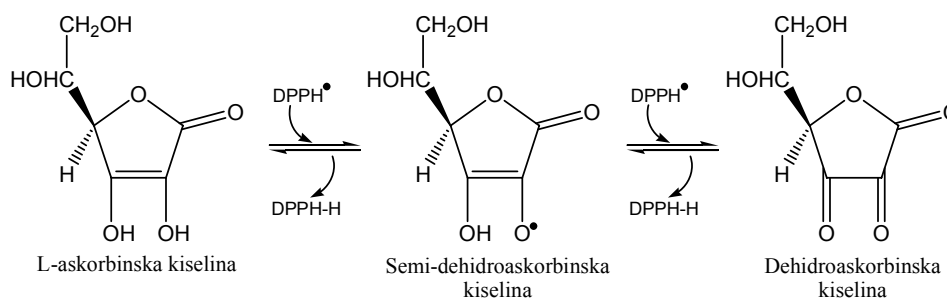


Navedene reakcije objašnjavaju prooksidativno delovanje vitamina C. Uzimajući u obzir da su prelazni metali vezani za proteine u normalnim fiziološkim uslovima, vitamin C uglavnom deluje kao antioksidant u organizmu.

Kod određivanja antioksidativne aktivnosti vitamina C tj. askorbinske kiseline, veoma je značajno utvrditi ospeg koncentracija u kojima vitamin C pokazuje anti-, a ne prooksidativne efekte (Allen i Joseph, 1985).

U model sistemu sa DPPH radikalima frakcije ekstrakata svih ispitivanih bobica koje sadrže vitamin C ispoljile su niže antiradikalne aktivnosti u odnosu na frakcije koje sadrže polifenolna jedinjenja.

Antiradikalna svojstva vitamina C zasnivaju se, između ostalog, i na sposobnosti vitamina C da deluje kao „hvatač“ slobodnih radikala. Mehanizam antioksidativnog delovanja vitamina C sa DPPH radikalom prikazan je sledećim reakcionim mehanizmom (Brand-Williams i sar., 1995):



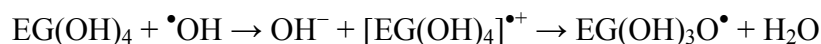
Stehiometrija reakcije antioksidanta sa DPPH radikalima zavisi od njegove hemijske strukture. Tako je molarni odnos radikal/antioksidant 2:1 za askorbinsku kiselinu, Trolox, α -tokoferol i neka polifenolna jedinjenja (Benzie i Strain, 1999; Arnao, 2000). Ruzmarinska kiselina u svojoj strukturi ima veći broj hidroksilnih grupa pa je molarni odnos u reakciji sa DPPH radikalima 3:1, kao i kod nekih derivata cimetine kiseline (Arnao, 2000).

Rezultati HPLC analize ukazali su na prisustvo flavonoida u ekstraktima borovnice, brusnice, šipka i gloga u frakcijama Fr2 i fenolnih kiselina u frakcijama Fr3. Poređenjem $EC_{50}^{O_2^{\bullet-}}$ vrednosti frakcija Fr2 i frakcija Fr3 ekstrakata četiri ispitivane vrste bobica, uočeno je da se njihove antiradikalne aktivnosti nisu statistički značajno razlikovale ($p < 0,05$). Takođe, ove vrednosti su manje od EC_{50} vrednosti dobijenih u ostalim antiradikalnim testovima. Aktivnosti frakcija Fr2 i Fr3 ekstrakta brusnice su manje od aktivnosti ovih frakcija ekstrakata borovnice, šipka i gloga, što je u saglasnosti sa njihovim nižim sadržajem polifenolnih jedinjenja, i flavonoida i fenolnih kiselina, utvrđenim HPLC analizom.

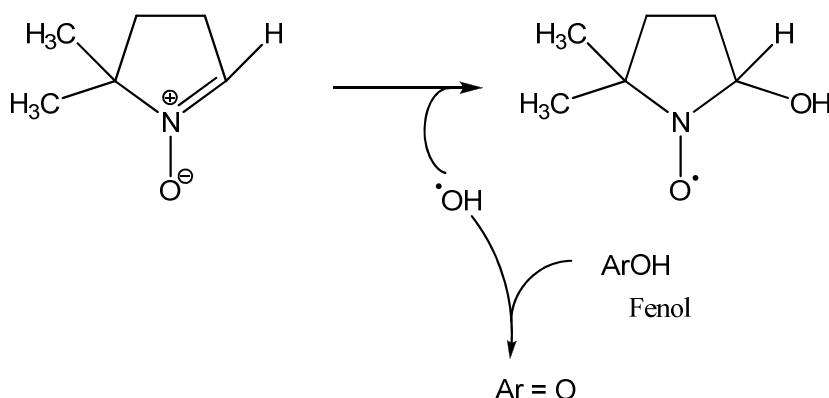
Međusobnim poređenjem $EC_{50}^{\bullet OH}$ vrednosti dobijenih za frakcije Fr2 ekstrakata ispitivanih bobica, može se zaključiti da je frakcija Fr2 ekstrakta borovnice imala najveću antiradikalnu aktivnost, a ekstrakta brusnice najmanju. Ovi su rezultati u skladu sa utvrđenim sadržajem flavonoida u navedenim frakcijama, gde je najviše flavonoida zabeleženo kod frakcije Fr2 ekstrakta borovnice, a najmanje kod iste frakcije ekstrakta brusnice. Isti zaključak se može izvesti i za frakcije Fr3 ekstrakata ispitivanih bobica, gde frakcija Fr3 ekstrakta brusnice sa najnižim sadržajem fenolnih kiselina nije imala uticaj na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala ($EC_{50}^{\bullet OH} = 0$), dok je najbolja aktivnost zabeležena u slučaju frakcije Fr3 ekstrakta borovnice ($EC_{50}^{\bullet OH} = 0,117$ mg/ml). Fenolne kiseline, koje su prisutne u frakcijama Fr3, imaju visoke konstante brzina hemijske reakcije sa hidroksil radikalima, dok su ove konstante za flavonoide nešto niže (tabela 22), što je verovatno uticalo na bolju aktivnost frakcija Fr3 od frakcija Fr2 u slučajevima ekstrakata borovnice i šipka.

Frakcija Fr3 ekstrakta šipka je takođe pokazala dobru antiradikalnu aktivnost na hidroksil radikale ($EC_{50}^{\bullet OH} = 0,212 \text{ mg/ml}$). Ova frakcija sadrži značajnu količinu elaginske kiseline (tabela 19) koja je dimer galne kiseline, odnosno dilakton heksahidroksidifenilne kiseline.

Elaginska kiselina je rasprostranjena u prirodi u voću (jagode, maline, orah, grožđe, ribizle) i destilovanim napitcima (Priyadarsini i sar., 2002). Mnogi autori su saopštili antimutagena i antioksidativna svojstva elaginske kiseline (Narayanan i sar., 1999; Mertens-Talcott i sar., 2003). Njena zaštitna svojstva se pripisuju sposobnostima elaginske kiseline da se vezuje za DNK, da inhibira stvaranje i „hvata“ reaktivne kiseonične vrste i da sprečava oštećenja DNK prouzrokovana alkilovanjem. Na osnovu hemijske strukture molekula elaginske kiseline zaključeno je da su i hidroksilne grupe i laktonski prsten značajni za njenu antiradikalnu aktivnost (Priyadarsini i sar., 2002). Naime, elaginska kiselina ima dva para hidroksilnih grupa, oba u *orto* položaju, koji su pogodni za heliranje jona gvožđa i sprečavanje iniciranja Fentonove reakcije. Elaginska kiselina je pokazala snažno inhibirno dejstvo tokom reakcije autooksidacije askorbinske kiseline koja je katalizovana Cu(II) jonima (Okuda i sar., 1992). Po navodim Priyadarsini i sar. (2002) konstanta brzine reakcije elaginske kiseline sa hidroksil radikalima je visoka (tabela 22), a predloženi mehanizam njihove interakcije je:



Pretpostavlja se da se pod reakcionim uslovima koji su postavljeni u Fentonovom model sistemu odigravaju dve paralelne reakcije:



Najpre, hidroksil radikali nastali u Fentonovoj reakciji reaguju različitim mehanizmima sa polifenolnim jedinjenjima i stvaraju neradikalne proizvode, hinone. Preostali hidroksil radikali, koji nisu reagovali sa polifenolnim jedinjenjima, u prisustvu “spin trapa”

DMPO daju stabilne “spin adukte”. Rezultujući ESR signal predstavlja “spin adukte” hidrokso radikala koji su preostali u sistemu nakon reakcije sa antioksidantom (Hiramoto i sar., 1996).

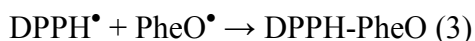
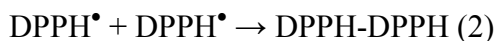
U model sistemu sa stabilnim DPPH radikalima najbolje antiradikalne aktivnosti, odnosno najniže $EC_{50}^{DPPH^{\bullet}}$ vrednosti, pokazale su frakcije Fr2 ekstrakata bobica koje sadrže flavonoide, i to frakcija Fr2 ekstrakta borovnice ($EC_{50}^{DPPH^{\bullet}} = 0,025 \text{ mg/g}$) koja je i najbogatija flavonoidima ($1328,5818 \text{ } \mu\text{g/g}$), naročito kvercetinom ($841,8575 \text{ } \mu\text{g/g}$). Međusobnim poređenjem $EC_{50}^{DPPH^{\bullet}}$ vrednosti ovih frakcija može se uočiti da ne postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između vrednosti dobijenih za frakcije ekstrakta borovnice, šipka i gloga, dok je značajno veća vrednost kod frakcije ekstrakta brusnice verovatno posledica znatno manje količine flavonoida prisutnih u ovoj frakciji. Frakcije ekstrakata borovnice, brusnice, šipka i gloga koje sadrže fenolne kiseline, Fr3, imale su veće $EC_{50}^{DPPH^{\bullet}}$ vrednosti i, stoga manje antiradikalne aktivnosti na stabilne DPPH radikale. Najveću antiradikalnu aktivnost je pokazala frakcija Fr3 ekstrakta gloga ($EC_{50}^{DPPH^{\bullet}} = 0,017 \text{ } \mu\text{g/g}$), a najmanju frakcija Fr3 ekstrakta brusnice ($EC_{50}^{DPPH^{\bullet}} = 1,066 \text{ } \mu\text{g/g}$).

Polifenolna jedinjenja se smatraju antioksidantima koji imaju sposobnost terminacije slobodnoradikalnih reakcija. Njihova aktivnost zavisi od mnogih faktora kao što su energija disocijacije veze O-H, mogućnost delokalizacije i rezonantne stabilizacije nesparenog elektrona slobodnog radikala polifenolnog jedinjenja i sternih smetnji voluminoznih grupa vezanih za aromatični prsten (Shahidi i Naczk, 1995). Konstante brzina reakcija polifenolnih jedinjenja sa slobodnim radikalima određuju njihovu antioksidativnu efikasnost (Sánchez-Moreno i sar., 1998). Osnovna reakcija polifenolnog jedinjenja (PheOH) sa $DPPH^{\bullet}$ je:

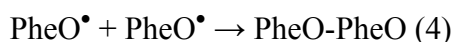


gde su (I), (II), (III)...rezonantne strukture fenoksil radikala ($PheO^{\bullet}$).

Koncentracija preostalog $DPPH^{\bullet}$, nakon reakcije sa polifenolnim jedinjenjem, zavisi isključivo od koncentracije i strukture polifenolnog jedinjenja, jer postoje dva teoretska načina za terminaciju slobodnoradikalne reakcije:

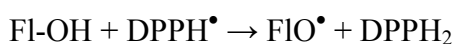


Reakcija (2) je onemogućena sternim smetnjama, dok se reakcija (3) može odigravati u određenim slučajevima, kada supstituenti u molekulu polifenolnog jedinjenja ne stvaraju sterne smetnje. Reakcija (3) će biti konkurentna reakcija sa reakcijom sudara dva radikala polifenolnog jedinjenja:

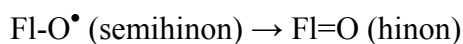
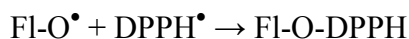
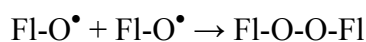


Okuda i sar. (1993) su potvrdili mehanizam terminacije slobodnoradikalske reakcije prikazan reakcijom (4), sudarom dva galoil radikala nakon reakcije se DPPH radikalom.

I drugi autori su potvrdili mehanizam delovanja polifenolnih jedinjenja sa DPPH[•] putem otpuštanja vodonikovih atoma, na primeru flavonoida (FIOH) (van Acker i sar., 1996; Cotelle, 2001; Amić i sar., 2003).



Tri mehanizma završavanja slobodnoradikalske reakcije u prisustvu flavonoida su predložena:



Reakcije koje su predložene ne vode obavezno završavanju slobodnoradikalskih reakcija jer njihovi produkti (dimeri ili hinoni) i proizvodi njihovog razlaganja mogu dalje reagovati sa DPPH radikalima (Dangles i sar., 1999).

Od svih već navedenih strukturnih elemenata u molekulu flavonoida koje su značajne za njihovu antiradikalsku aktivnost, hidroksilne grupe imaju najveći značaj (Cotelle, 2001; Yang i sar., 2001; Heim i sar., 2002; Amić i sar., 2003). Utvrđeno je da položaj hidroksilnih grupa ima mnogo veći uticaj na aktivnost nego njihov broj. Hidroksilne grupe utiču na antioksidativnu aktivnost kinetičkim ili termodinamičkim svojstvima: (1) kao izvori vodonikovih atoma potrebnih za neutralizaciju slobodnih radikala i (2) mogućnošću povećanja stabilnosti radikala flavonoida otpuštanjem još jednog vodonikovog atoma iz druge hidroksilne grupe.

Različita polifenolna jedinjenja imaju različite odgovore u antiradikalskim testovima. U osnovi, razlike u „rangiranju“ antioksidativne aktivnosti mogu biti posledica: (1) različitog sadržaja i (2) različite reaktivnosti prisutnih jedinjenja (Espinoza i sar., 2009). Pored

toga, efikasnost antioksidanata u značajnoj meri zavisi od oksidacionih uslova sistema u kojem se ispituje antiradikalna aktivnost. Različiti antiradikalni testovi pružaju različite mogućnosti antioksidantima da ispolje svoju aktivnost.

U tabeli 23 su prikazani koeficijenti korelacije (r) rezultata HPLC analiza sa rezultatima antiradikalnih testova.

Tabela 23. Korelacija rezultata HPLC analiza i rezultata antiradikalnih testova

JEDINJENJE	KOEFIČIJENT KORELACIJE		
	$r_{O_2^{\bullet-}}$	$r_{OH^{\bullet}}$	$r_{DPPH^{\bullet}}$
Ukupni flavonoidi	0,180	0,302	0,196
Ukupne fenolne kiseline	0,512	0,023	0,672
Vitamin C	0,868	0,623	0,602
Kvercetin	0,173	0,173	0,189
Katehin	0,115	0,115	0,13
Umbeliferon	0,148	0,148	0,164
Rutin	0,998	0,248	0,583
Kampferol	0,472	0,525	0,490
Miricetin	0,307	0,307	0,332
Galna kiselina	0,355	0,03	0,337
Protokatehinska kiselina	0,212	0,003	0,231
Hlorogenska kiselina	0,452	0,018	0,600
Kafena kiselina	0,137	0,072	0,182
Kumarinska kiselina	0,100	0,113	0,145
Ferulna kiselina	0,136	0,046	0,202
Elaginska kiselina	0,159	0	0,233
Vanilinska kiselina	0,847	0,902	0,010
Siringinska kiselina	0,307	0,004	0,313

Vrlo dobra korelacija ($r > 0,8$) utvrđena je između sadržaja vitamina C, rutina i vanilinske kiseline sa antiradikalnim aktivnostima na superoksid anjon radikale, kao i vanilinske kiseline i antiradikalne aktivnosti na hidroksil radikale. Dobra korelacija ($r > 0,5$) zabeležena je između ukupnog sadržaja fenolnih kiselina i $AA_{O_2^{\bullet-}}$ i $AA_{DPPH^{\bullet}}$, sadržaja vitamina C i $AA_{OH^{\bullet}}$ i $AA_{DPPH^{\bullet}}$, sadržaja rutina i hlorogenske kiseline sa $AA_{DPPH^{\bullet}}$ i sadržaja kampferola i $AA_{OH^{\bullet}}$. Ostali korelacioni koeficijenti ukazali su na osrednju ($r < 0,5$) ili slabu ($r < 0,3$), ali pozitivnu uzajamnu zavisnost između sadržaja antioksidanata i antiradikalne aktivnosti.

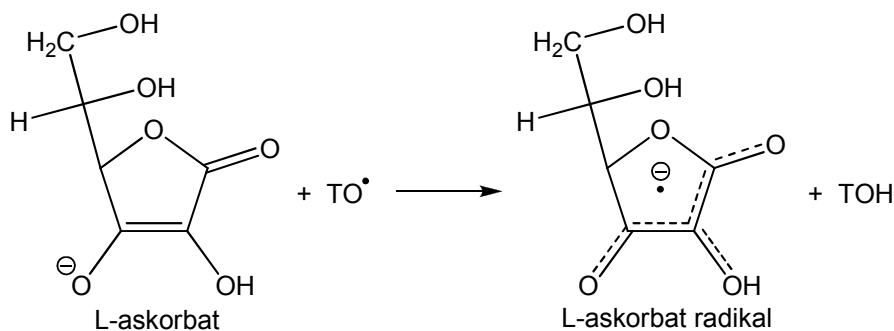
Kao što se može videti iz rezultata korelacione analize prikazanih u tabeli 23, antiradikalna aktivnost nije obavezno u korelaciji sa sadržajem polifenolnih jedinjenja pa je stoga neophodno ispitivanje i sadržaja i antiradikalne aktivnosti prilikom razmatranja antioksidativnog potencijala uzorka. Takođe, neophodno je uzeti u obzir i činjenicu da su eks-

trakti kompleksne smeše prirodnih jedinjenja i da njihova antiradikalska aktivnost nije rezultat aktivnosti samo jedne komponente. Vrlo često prisutna jedinjenja pokazuju sinergističke efekte. Parker (1969) ističe da antioksidanti u organizmu ne funkcionišu sami već da povećavaju snagu jedan drugom i da je suma dejstava veća od pojedinačnog dejstva. Sinergizam je definisao Uri (1961) kao „fenomen kod kojeg veći broj komponenata prisutnih u istom sistemu ima veći efekat (izražajnije dejstvo) nego zbir efekata pojedinačnih komponenata“. Ispitivanja su pokazala da sinergistička kombinacija antioksidanata u hrani povećava preživljavanje laboratorijskih životinja i smanjuje verovatnoću pojave kancera. Ovo ukazuje na činjenicu da ukupan profil fitohemikalija određuje funkcionalnost hrane kao rezultat sinergističkog dejstva pojedinačnih konstituenata (Vattem i sar., 2005). Stoga, antioksidativni sinergizam, koji ispoljavaju prirodni antioksidanti prisutni u voću i povrću, pruža veću zaštitu od hroničnih oboljenja, naročito kancera i srčanih oboljenja (Liu, 2004).

Pored sinergističkog dejstva, moguća su i antagonistička dejstva. Po analogiji sa sinergizmom, antagonizam je definisan kao „fenomen kod kojeg veći broj komponenata prisutnih u istom sistemu ima manji efekat nego zbir efekata pojedinačnih komponenata“ (Becker i sar., 2004). Kaur i Kapoor (2001) smatraju da su razlike u antioksidativnoj aktivnosti prirodnih ekstrakata posledica različite aktivnosti pojedinačnih polifenolnih jedinjenja, ali i njihovih međusobnih antagonističkih i sinergističkih delovanja.

Liebler i sar. (1986) su utvrdili da glutation deluje antagonistički na antioksidativno delovanje smeše α -tokoferola i askorbinske kiseline tokom oksidacije lipozoma fosfatidilholina soje. Murakami i sar. (2003) nisu potvrdili antioksidativni sinergizam između askorbinske kiseline, α -tokoferola i polifenolnih jedinjenja primenom DPPH-HPLC metode. Hraš i sar. (2000) su ispitali antioksidativno delovanje ekstrakta ruzmarina u smeši sa askorbil palmitatom, limunskom kiselinom i α -tokoferolom tokom termičke oksidacije suncokretovog ulja. Prisustvo primarnih i sekundarnih proizvoda lipidne peroksidacije su pokazali da α -tokoferol umanjuje antioksidativnu aktivnost ekstrakta ruzmarina, što je u saglasnosti sa ispitivanjima Banijs i sar. (1992) koja su takođe ukazala na isti efekat α -tokoferola i sa drugim biljnim ekstraktima. Sa druge strane Hraš i sar. (2000) su potvrdili snažan pozitivan sinergizam između ekstrakta ruzmarina i askoribil palmitata, i slab pozitivan sinergizam u smeši ekstrakta ruzmarina i limunske kiseline.

Najčešći primer sinergizma naveden u literaturi je između vitamina C i vitamina E. Askorbatni jon regeneriše tokoferil radikale otpuštanjem atoma vodonika, kao što je prikazano na slici 39 (Niki i sar., 1982; Frankel, 2005).



Slika 39. Mehanizam “hvatanja” slobodnih radikala pomoću askorbata (TO^\bullet - tokoferil radikal; TOH – tokoferol)

Još 1941. godine Golumbic i Mattill su saopštili da askorbat ima sposobnost redukcije potrošnje α -tokoferola (αTOH) tokom sprečavanja oksidacije jestivih ulja, i to po mehanizmu:

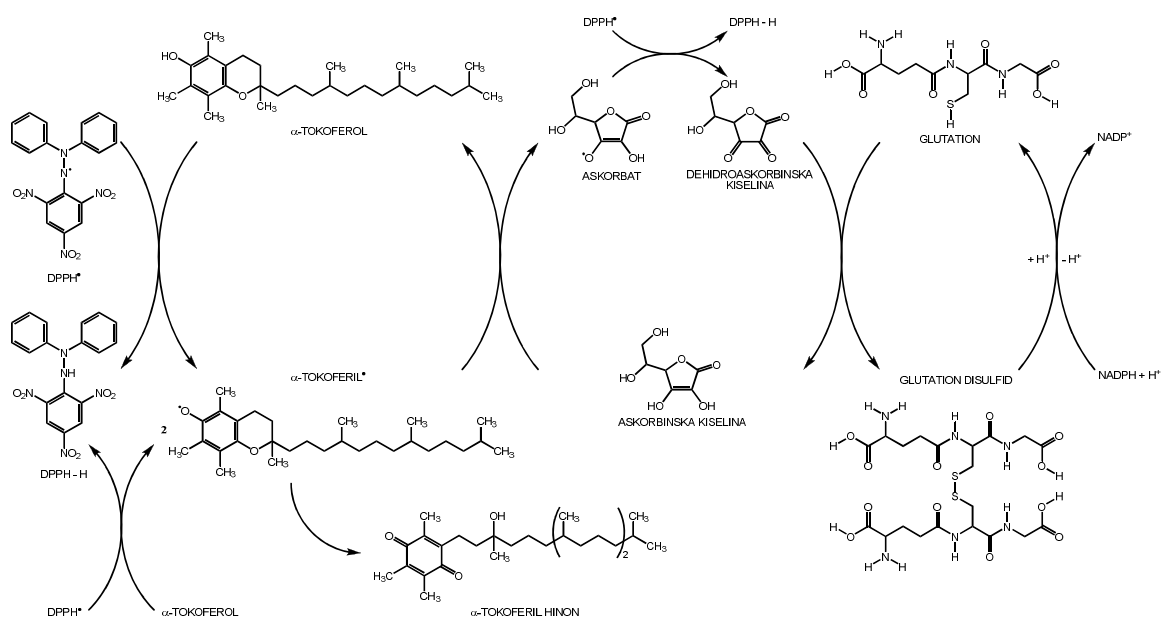


Askorbinska kiselina i α -tokoferol su prirodni antioksidanti koji pored vitaminske uloge pokazuju i antioksidativno delovanje u organizmu, a pored toga se upotrebljavaju i u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji kao aditivi.

Zbog sinergističkog dejstva sa vitaminom E i polifenolnim antioksidantima, vitamin C se često dodaje hrani radi sprečavanja kvarenja hrane uzrokovane dejstvom slobodnih radikala. Kako askorbat sinergistički deluje sa vitaminom E i polifenolnim antioksidantima, kao što su BHA i BHT, često se dodaje hrani zajedno sa polifenolnim antioksidantima.

Castro i sar. (2006) su ispitali sinergističko delovanje između askorbinske kiseline, α -tokoferola i L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina tj. glutaciona u model sistemu sa DPPH radikalima. Predloženi mehanizam reakcija koji se odigrava u ovom sistemu prikazan je na slici 40.

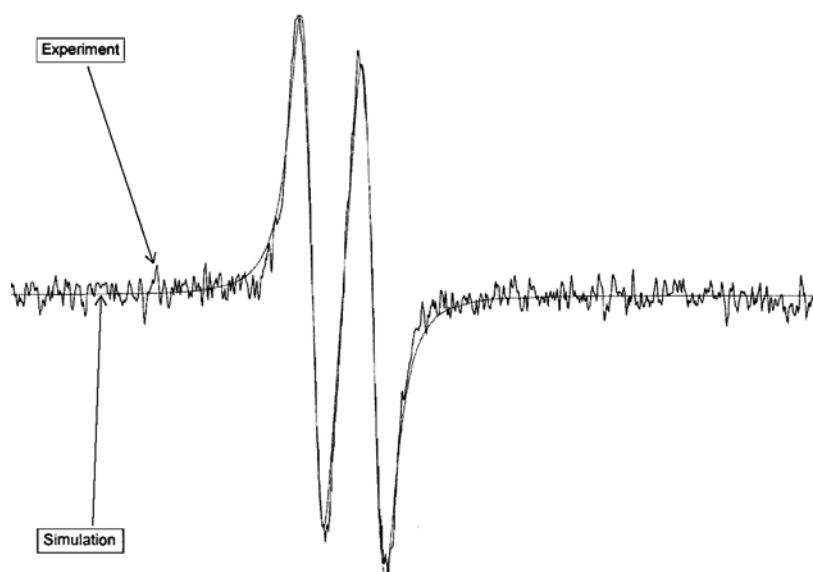
Glutacion je veoma značajan intracelularni antioksidant. Mnogi autori su potvrdili da askorbat i glutacion „čuvaju“ α -tokoferol od oksidacije (Castro i sar., 2006).



Slika 40. Sinergističko delovanje između askorbinske kiseline, α -tokoferola i glutationa u model sistemu sa DPPH radikalima

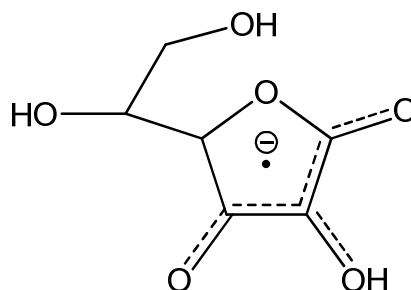
4.4. ESR SPEKTRALNA ANALIZA SLOBODNIH RADIKALA ANTIOKSIDANATA

Kada su frakcije Fr1 ekstrakata ispitivanih bobica podvrgnute ESR spektralnoj analizi u prisustvu superoksid anjon radikala, a bez dodatka “spin trapa” (DMPO), detektovani su dubleti u ESR spektrima u slučaju sve četiri ispitivane frakcije Fr1. Na slici 41 prikazan je ESR spektar dobijen pod navedenim uslovima, reakcijom superoksid anjon radikala sa frakcijom Fr1 ekstrakta gloga.



Slika 41. ESR spektar i simulacioni spektar slobodnih radikala dobijenih nakon reakcije frakcije Fr1 ekstrakta gloga sa superoksid anjon radikalima

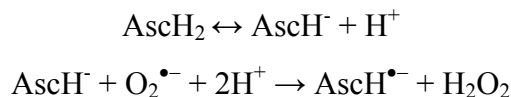
Nakon obrade spektara kompjuterskom simulacijom, dobijena je konstanta hiperfinog cepanja $a_H = 1.84$ G. Poređenjem ove vrednosti sa literaturnim podacima (Minetti, Forte, Soriani, Quaresima, Menditto & Ferrari, 1992; Gille, Kleiter, Willmann & Nohl, 2002), a u skladu sa visokim sadržajem vitamina C određenim HPLC analizama u ovim frakcijama (tabele 17, 18, 19 i 20), može se tvrditi da je detektovana slobodnoradikalaska vrsta askorbil anjon radikal. Buettner i Jurkiewicz (1996) su takođe saopštili da u reakciji askorbinske kiseline sa agresivnijim slobodnim radikalima nastaje slabo reaktivan askorbil anjon radikal kao međuproizvod. Smanjena hemijska aktivnost askorbil anjon radikala potiče od njegove sposobnosti da delokalizuje nespareni elektron u π sistemu između C_2 - C_3 konjugovanog endiolnog sistema i karbonilne grupe (slika 42).



Slika 42. Askorbil anjon radikal

Rezultat ovakve stabilizacije je slaba oksidaciona i redukciona moć askorbil anjon radikala. Askorbil anjon radikal je termodinamički relativno nereaktivan sa jednoelektronskim redukcionim potencijalom od samo +282 mV. Zbog svega navedenog, vitamin C se smatra terminalnim niskomolekularnim antioksidantom.

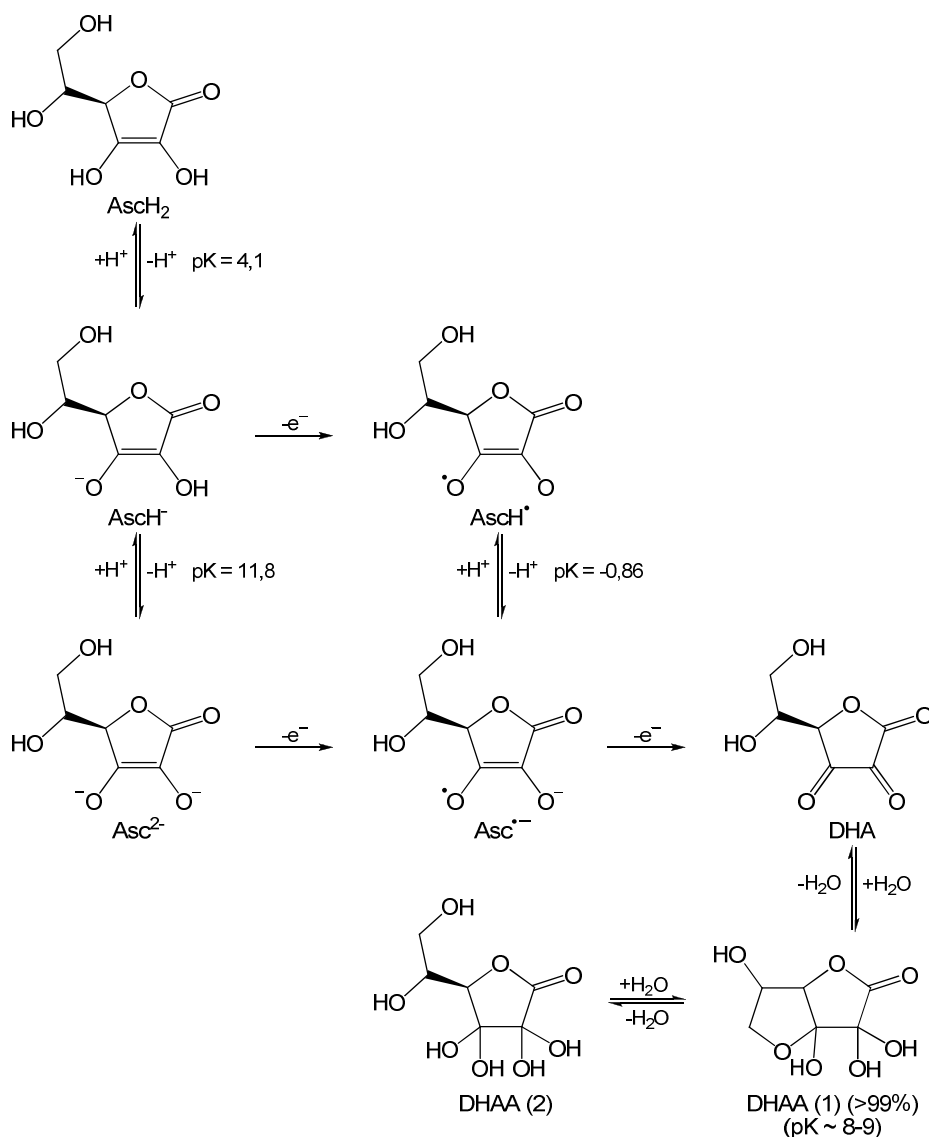
Scarpa i sar. (1983) su predložili mehanizam reakcije između askorbinske kiseline ($AscH_2$) i superoksid anjon radikala:



Prikazani mehanizam je u skladu sa ESR spektralnim ispitivanjima slobodnih radikala antioksidanata u frakcijama Fr1 ekstrakata ispitivanih bobica nastalih tokom oksidacije superoksid anjon radikalima.

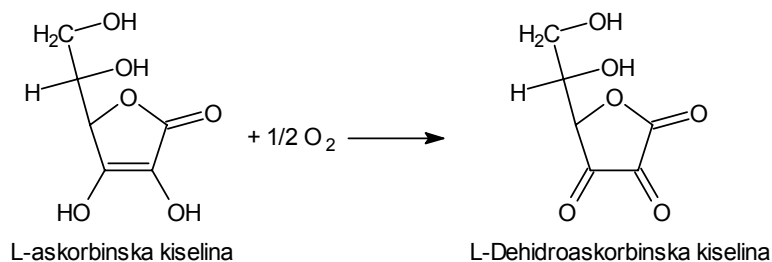
L-Askorbinska kiselina ili vitamin C je verovatno napoznatiji i najrasprostranjeniji vitamin. Pri fiziološkoj vrednosti pH, L-askorbinska kiselina postoji kao monovalentni anjon L-askorbat ($AscH^-$). U telu životinja i biljaka uporedo sa oksidovanim oblikom L-askorbinske kiseline uvek nastaje i dehidroaskorbinska kiselina (DHA), redukovani oblik.

Ovo svojstvo omogućava vodeću ulogu askorbinske kiseline u tkivnom metabolizmu koji je vezan za procese transporta elektrona. Proces oksidacije askorbinske kiseline katalizuje niz enzima i metala. Na slici 43 prikazan je mehanizam oksidacije vitamina C i njegovi ravnotežni redoks oblici u sistemu askorbinska kiselina/dehidroaskorbinska kiselina (Bors i Buettner, 1997).



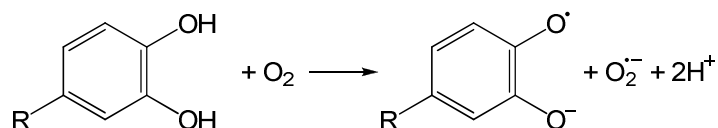
Slika 43. Mehanizam oksidacije vitamina C

“Hvatanje” molekula kiseonika predstavlja jedan od mehanizama antioksidativne aktivnosti askorbinske kiseline u hrani. Hrana koja je flaširana ili konzervisana uvek sadrži zaostale molekule kiseonika koji mogu da reaguju sa različitim molekulima iz hrane i uzrokuju njeno kvarenje, promenu boje, itd. Askorbinska kiselina, koja se dodaje hrani, može da “uhvati” molekule kiseonika i tako spreči njeno kvarenje (slika 44).

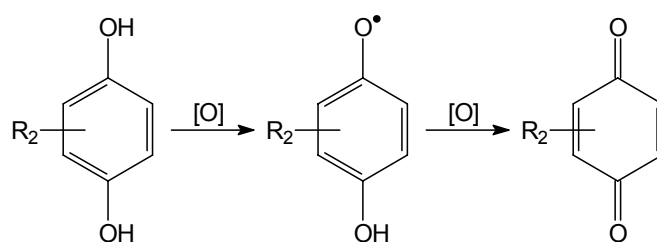


Slika 44. Mehanizam “hvatanja” molekula kiseonika pomoću askorbata

Mnogi autori su potvrdili da polifenolni antioksidanti, poput vitamina E, reaguju sa superoksid anjon radikalom dajući slobodnoradikalni međuproizvod čije je postojanje potvrđeno ESR spektroskopijom. Pretpostavka, koja je potkrepljena i mnogim dokazima, je da su detektovani radikali fenoskil radikali (Tsujimoto i sar., 1993). Konstante reakcija polifenola sa superoksid anjon radikalima su u obrnutoj korelaciji sa njihovim jednoelektronskim redoks potencijalima. Fenosil radikali dalje reaguju sa superoksid anjon radikalima reakcijom adicije (Larson, 1997). Reakcije flavonoida sa superoksid anjon radikalima su intenzivno ispitivane (Jovanovic i sar., 1994). Najbrže reakcije su zabeležene sa flavonoidima koji imaju najviše hidroksilnih grupa u B-prstenu. U ovim reakcijama flavonoidi su oksidovani, što je potvrđeno prisustvom vodonikperoksida kao proizvoda redukcije superoksid anjon radikala (Mochizuki i sar., 2002):

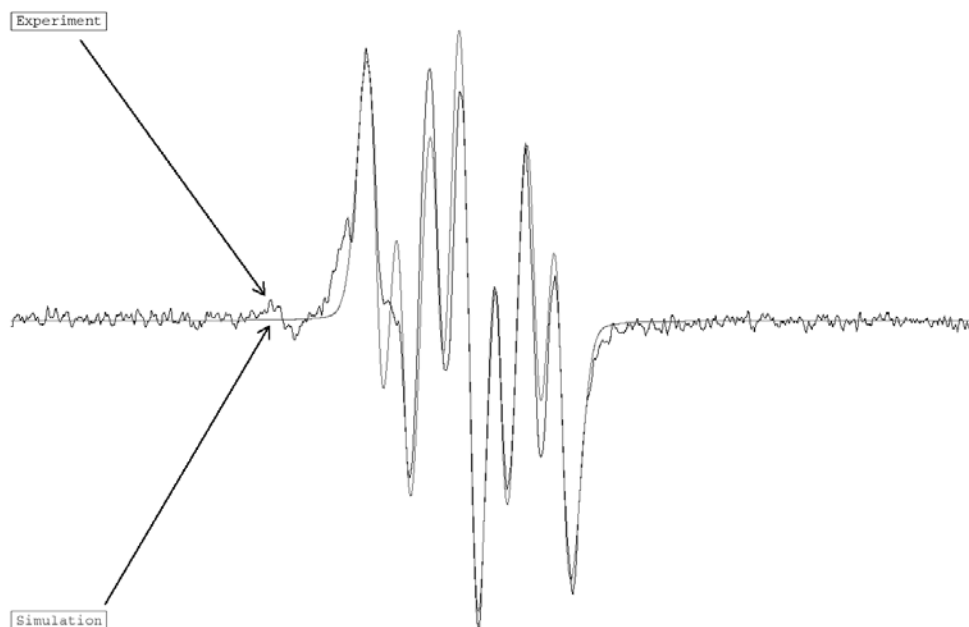


Antioksidativna aktivnost je u literaturi često povezana sa sposobnošću molekula antioksidanta da stvaraju stabilne slobodne radikale. Poznato je da aromatična jedinjenja koja u svojoj strukturi imaju hidroksilne grupe, naročito *ortho* di- ili trihidroksi derivati, stvaraju slobodnoradikalne forme koje su dovoljno stabilne za detekciju ESR spektroskopijom (Cotelle i sar., 1996). Hidrohinoni, derivati 1,4-dihidroksibenzena, oksidišu se vrlo lako do 1,4-benzohinona preko semihinona kao intermedijera (slika 45) (Larson, 1997):



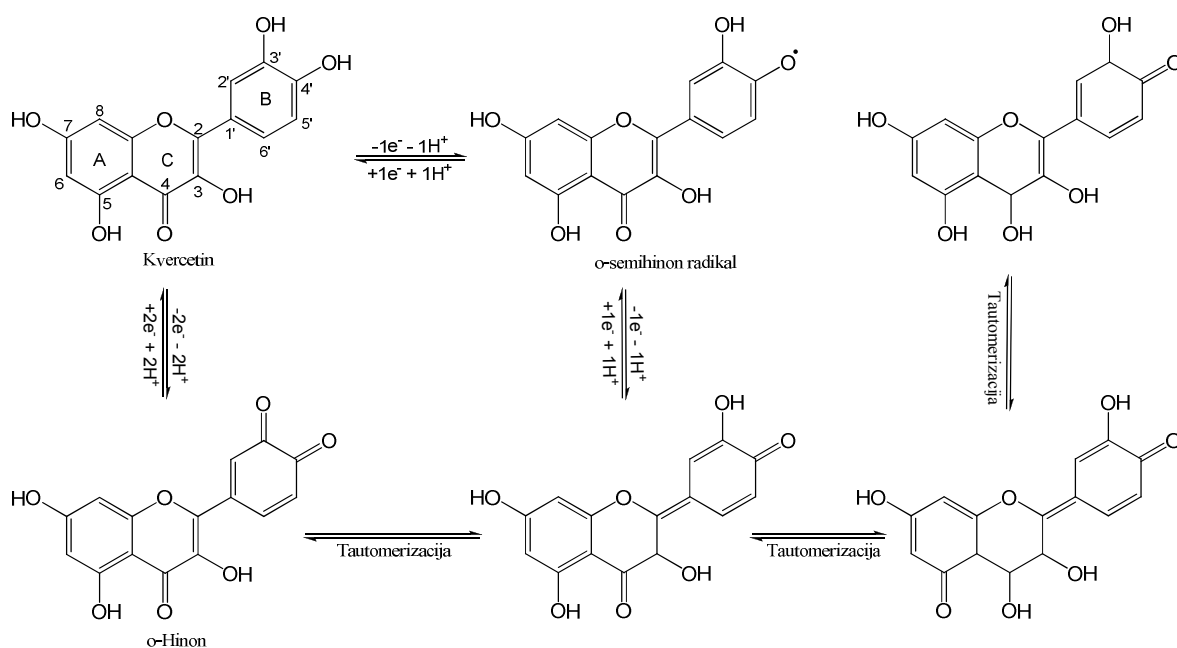
Slika 45. Oksidacija hidrohinona

ESR signal slobodnih radikala nastalih tokom reakcije frakcije Fr2 ekstrakta borovnice sa superoksid anjon radikalima, bez prisustva “spin trap” jedinjenja (DMPO) prikazan je na slici 46.



Slika 46. ESR spektar i simulacioni spektar slobodnih radikala dobijenih nakon reakcije frakcije Fr2 ekstrakata borovnice sa superoksid anjon radikalima

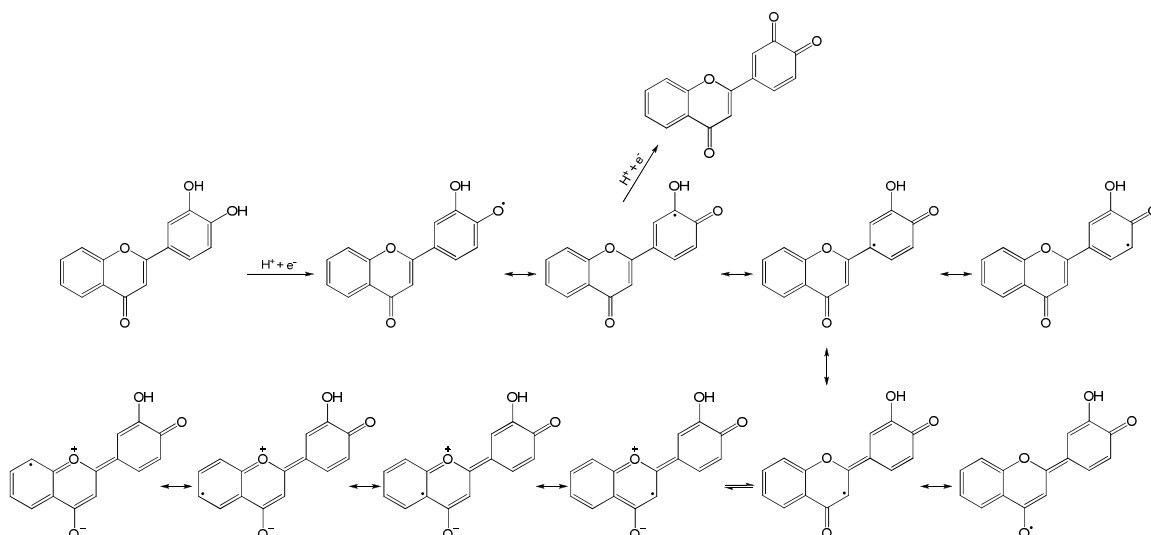
Isti oblik, položaj i širina, a različit intenzitet apsorpcionih linija u ESR spektrima dobijen je nakon reakcija frakcija Fr2 ekstrakata brusnice, šipka i gloga sa superoksid anjon radikalima, bez prisustva “spin trap” jedinjenja. Nakon analize dobijenog ESR spektra (slika 46) kompjuterskom simulacijom dobijene su konstante hiperfinog cepanja ($a_{H^{2'}} = 1,7$ G; $a_{H^{5'}} = 0,8$ G and $a_{H^{6'}} = 2,8$ G). U literaturi su navedene konstante hiperfinog cepanja za kvercetin semihinon radikal i iznose: $a_{H^{2'}} = 1,5$ G; $a_{H^{5'}} = 0,7$ G and $a_{H^{6'}} = 2,7$ G (Čanadnović-Brunet i sar., 2005), i $a_{H^{2'}} = 1,36$ G; $a_{H^{5'}} = 0,76$ G and $a_{H^{6'}} = 2,56$ G (Hodaka i sar., 2007). Potvrda porekla dobijenog slobodnog radikala u sve četiri frakcije Fr2 ekstrakata ispitivanih bobica su i rezultati HPLC analiza koji su pokazali da je kvercetin najdominantniji flavonoid u navedenim frakcijama sa masenim udelom većim od 50% od ukupnih detektovanih flavonoida (tabele 17, 18, 19 i 20 i slike 19, 20, 21 i 22). Mnogi autori su takođe saopštili da superoksid anjon radikal oksiduje kvercetin u semihinon radikal (Jovanović i sar., 1994; Zhou i Sadik, 2008; Ochiai i sar., 1984; Hodnick i sar., 1988). Na slici 47 prikazan je mehanizam oksidacije kvercetina koji potvrđuje prisustvo hinonskih struktura kao intermedijera tokom oksidacije.



Slika 47. Mehanizam oksidacije kvercetina

Kvercetin, kao i ostali polifenoli, ima snažan potencijal inhibicije slobodnoradikal-skih procesa u ćeliji, i to na tri različita nivoa: tokom faze inicijacije “hvatanjem” superoksid anjon radikala (Jovanović i sar., 1994; Hu i sar., 1995), tokom lipidne preoksidacije reakcijom sa peroksil ili lipidnim peroksil radikalima (Jovanović i sar., 1994; Terao i sar., 1994.) i inhibicijom stvaranja hidroksil radikala, verovatno heliranjem jona gvožđa (Morel i sar., 1993). Pretpostavlja se da su biološki efekti kvercetina posledica njegovih antioksidativnih svojstava (Cody i sar., 1986; Middleton i Kandaswami, 1993; Rice-Evans i sar., 1996). Utvrđeno je da kvercetin može pokazati i antioksidativna i prooksidativna svojstva, u zavisnosti od koncentracije i izvora slobodnih radikala (Laughton i sar., 1989; Cao i sar., 1997).

Seyoum i sar. (2006) su predložili mehanizam antioksidativnog delovanja flavonoida putem otpuštanja vodonikovog atoma, stvaranjem radikala flavonoida koji može naknadno da otpusti još jedan vodonikov atom disproporcionisanjem i na taj način završi reakciju (slika 48).



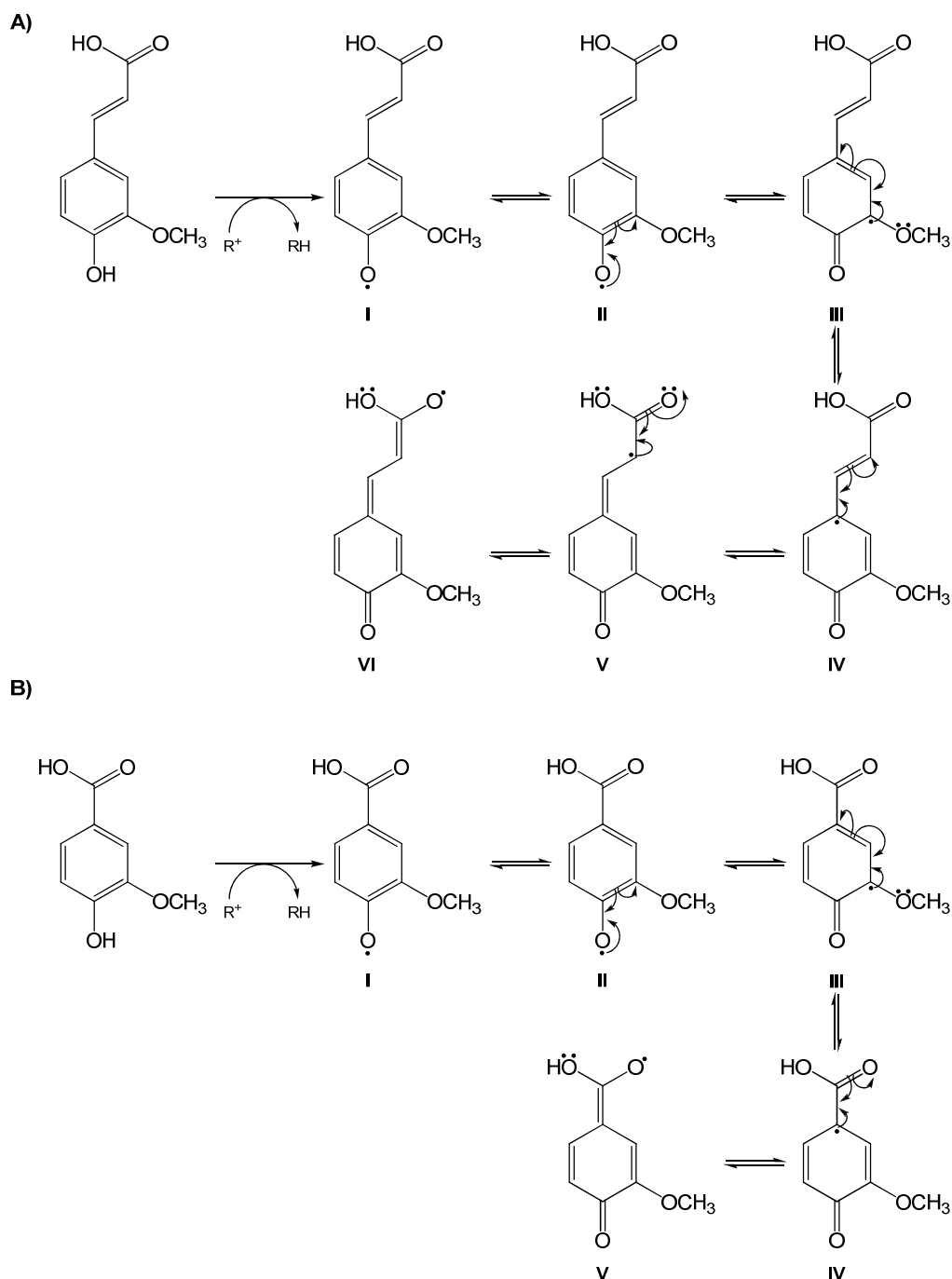
Slika 48. Rezonantne strukture radikala flavonoida

Naknadno otpuštanje vodonikovog atoma je alternativni put i može biti dominantan mehanizam terminacije slobodnoradikalske reakcije u kojem se radikal prevodi u hinon. Isti autori takođe ukazuju na značajnu ulogu konjugacije između prstena A i B u stabilizaciji putem rezonancionog efekta.

Na osnovu strukture kvercetina (slika 23) može se pretpostaviti da on poseduje potencijalno dobru sposobnost hvatanja slobodnih radikala. Naime, u njegovoj strukturi su prisutna tri strukturalna elementa koji su značajni za antiradikalsko delovanje (Metodięwa i sar., 1999):

- *o*-Dihidroksilne grupe u B prstenu;
- 2,3-Dvostruka veza piranskog prstena u konjugaciji sa keto-grupom na C₄-atomu (zbog delokalizacije)
- Prisustvo hidroksilnih grupa u 3- i 5-položaju prstena A.

Reakcije superoksid anjon radikala sa frakcijama Fr3 ekstrakta borovnice, brusnice, šipka i gloga bez prisustva "spin trapa" nisu rezultovale stvaranjem proizvoda koji se može detektovati ESR spektroskopijom. Moguće objašnjenje bi moglo biti da intermedijarno formirani slobodni radikali fenolnih kiselina imaju malu stabilnost konjugovanog sistema u poređenju sa radikalima flavonoida. Po navodima autora Zhou i sar. (2006) derivati cimetine i benzove kiseline koji imaju hidroksilnu grupu u položaju 4 formiraju fenoksil radikale koji se stabilizuju rezonancijom kao što je prikazano na slici 49 A i 49 B na primeru ferulne i vanilinske kiseline.



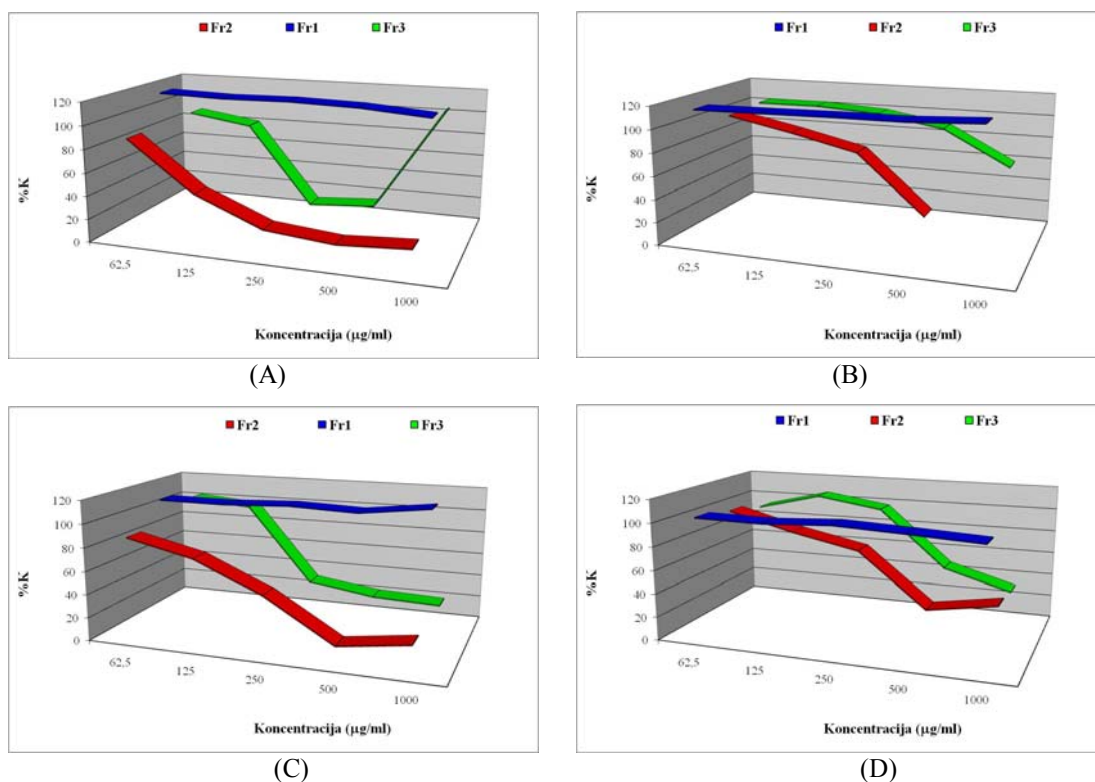
Slika 49. Mehanizam nastajanja fenoksil radikala derivata cimetine i benzove kiseline na primeru ferulne (A) i vanilinske kiseline (B)

Fenoksil radikal se primarno formira otpuštanjem vodonikovog atoma sa 4-OH grupe u oba slučaja. Derivati cimetine kiseline delokalizuju nesporeni elektron kroz šest mogućih graničnih struktura, dok derivati benzoeve kiseline imaju samo pet rezonantnih struktura, zbog prisustva propenskog bočnog niza. Natella i sar. (1999) su zaključili da je ova činjenica uzrok veće stabilnosti fenoksil radikala derivata cimetine kiseline i njihove izraženije antiradikalne aktivnosti.

4.5. ANTIPROLIFERATIVNA AKTIVNOST FRAKCIJA EKSTRAKATA BOBICA

Antiproliferativna aktivnost frakcija ekstrakata bobica ispitana je *in vitro*, njihovim delovanjem na rast tri histološki različite humane ćelijske linije: HeLa (epitelni karcinom cerviksa), HT-29 (adenokarcinom debelog creva) i MCF-7 (adenokarcinom dojke) u opsegu koncentracija koje su iznosile 62,5 - 1000 µg/ml. Frakcije ekstrakata ispitivanih bobica uticale su na rast tumorskih ćelija u zavisnosti od primenjene koncentracije i vrste ćelijske linije.

Na slici 50 prikazane su inhibitorne aktivnosti frakcija ekstrakta borovnice (A), brusnice (B), šipka (C) i gloga (D) na rast ćelija adenokarcinoma dojke, odnosno MCF-7 ćelijske linije.

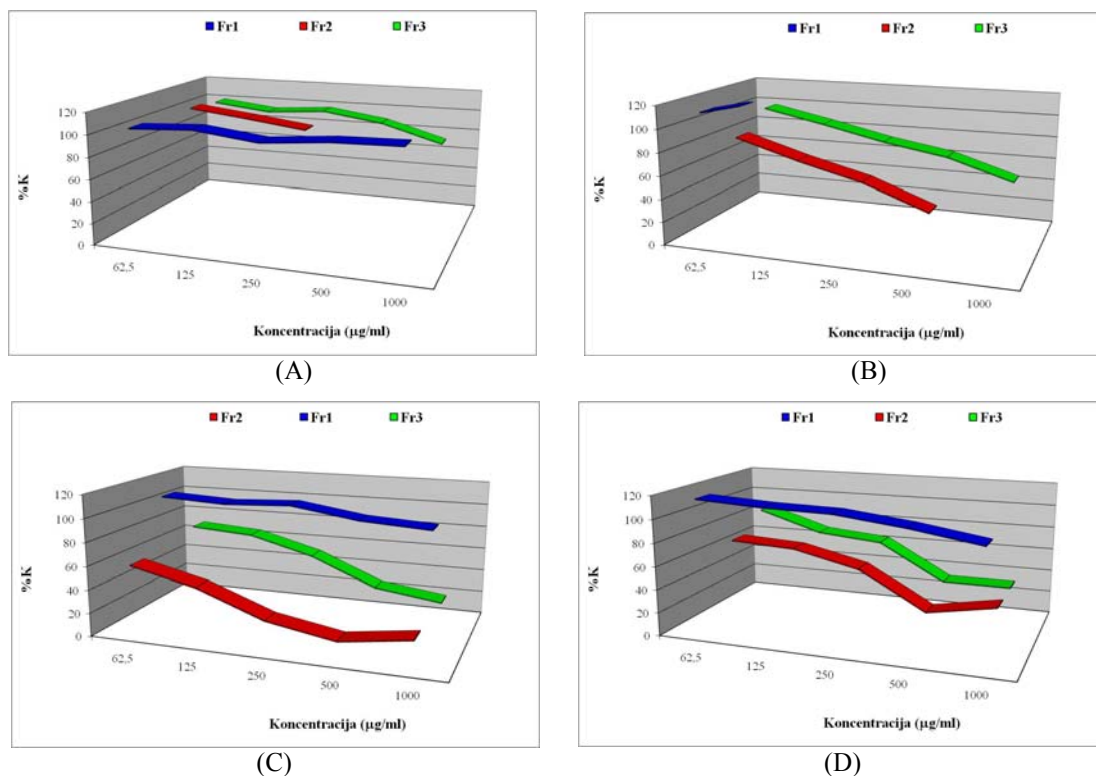


Slika 50. Antiproliferativna aktivnost frakcija ekstrakta borovnice (A), brusnice (B), šipka (C) i gloga (D) na rast MCF-7 ćelijske linije

Na osnovu prikazanih rezultata na slici 50, može se uočiti da su frakcije ekstrakata ispitivanih bobica koje sadrže vitamin C, odnosno Fr1, ispoljile stimulatívno dejstvo na rast MCF-7 ćelijske linije, odnosno da nisu pokazale antiproliferativno delovanje u ispitivanom opsegu koncentracija. Blago stimulatívno dejstvo pokazale su frakcije Fr3 ekstrakata gloga i brusnice pri nižim koncentracijama (62,5 - 125 µg/ml), i frakcije Fr2 eks-

trakata šipka i gloga pri većim ispitivanim koncentracijama (500 - 1000 $\mu\text{g/ml}$). Nešto izraženija stimulacija rasta ćelija zabeležena je primenom frakcije Fr3 ekstrakta borovnice pri višim koncentracijama (500 - 1000 $\mu\text{g/ml}$). U slučaju sve četiri ispitivane bobice, frakcije ekstrakata koje sadrže flavonoide, Fr2, pokazale su izraženiji antiproliferativni efekat na rast MCF-7 ćelijsku liniju od frakcija ekstrakata koje sadrže fenolne kiseline.

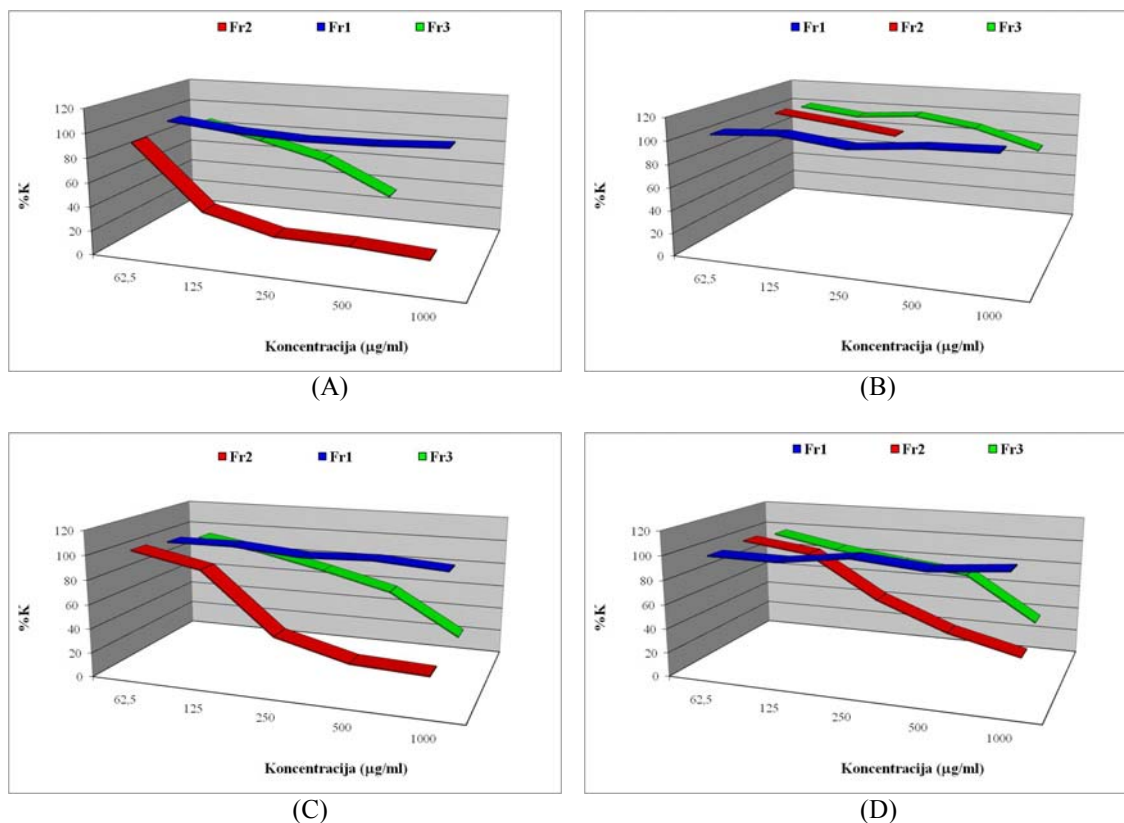
Antiproliferativne aktivnosti frakcija ekstrakta borovnice (A), brusnice (B), šipka (C) i gloga (D) na rast HeLa ćelijske linije prikazane su na slici 51.



Slika 51. Antiproliferativna aktivnost frakcija ekstrakta borovnice (A), brusnice (B), šipka (C) i gloga (D) na rast HeLa ćelijske linije

Kao i u slučaju MCF-7 ćelijske linije, sve frakcije Fr1 ekstrakata ispitivanih bobica imale su stimulativan efekat na rast ćelija epitelnog karcinoma cerviksa, tj. HeLa ćelijske linije u ispitanom opsegu koncentracija. Blaga stimulacija rasta HeLa ćelija primećena je primenom visokih koncentracija (500 - 1000 $\mu\text{g/ml}$) frakcija Fr2 ekstrakata šipka i gloga i frakcije Fr3 ekstrakta borovnice. Kao i MCF-7 ćelijska linija, i HeLa ćelijska linija je bila najosetljivija na delovanje frakcija ekstrakata bobica koje sadrže flavonoide, Fr2.

Na slici 52 su prikazani uticaji frakcija ekstrakata borovnice (A), brusnice (B), šipka (C) i gloga (D) na rast ćelija adenokarcinoma debelog creva - HT-29 ćelijske linije.



Slika 52. Antiproliferativna aktivnost frakcija ekstrakta borovnice (A), brusnice (B), šipka (C) i gloga (D) na rast HT-29 ćelijske linije

Frakcije Fr1 ekstrakata borovnice, brusnice, šipka i gloga nisu imale antiproliferativno dejstvo na HT-29 ćelijsku liniju, u ispitivanom opsegu koncentracija, kao i u slučaju MCF-7 i HeLa ćelijskih linija. Ove frakcije su izazvale stimulaciju rasta HT-29 ćelija. Blaga stimulacija rasta ove ćelijske linije zabeležena je i primenom frakcije Fr3 ekstrakta brusnice u niskim koncentracijama (120 - 250 µg/ml). Najizraženija antiproliferativna aktivnost je, kao i kod ćelijskih linija MCF-7 i HeLa, zabeležena primenom frakcija Fr2 ekstrakata ispitivanih bobica koje sadrže flavonoide.

Na osnovu prikazanih vrednosti antiproliferativnih aktivnosti frakcija ekstrakata ispitivanih bobica izračunate su EC_{50} vrednosti, tj. koncentracije frakcija ekstrakata bobica koje izazivaju inhibiciju rasta ćelija za 50%. Obzirom da su frakcije Fr1 ekstrakata svih ispitivanih bobica pokazale stimulatívno delovanje na rast sve tri ispitane ćelijske linije, EC_{50} vrednosti u ispitivanom opsegu koncentracija nije bilo moguće očitati. Dakle, antiproliferativnu aktivnost pokazale su frakcije koje sadrže polifenolna jedinjenja, flavonoide i fenolne kiseline, i njihove EC_{50} vrednosti prikazane su u tabeli 24.

Tabela 24. EC₅₀ vrednosti antiproliferativnih aktivnosti frakcija ekstrakata ispitivanih bobica

FRAKCIJE EKSTRAKATA BOBICA		EC ₅₀ ^{MCF-7} (µg/ml)	EC ₅₀ ^{HeLa} (µg/ml)	EC ₅₀ ^{HT-29} (µg/ml)
BOROVNICA <i>Vaccinium myrtillus L.</i>	Fr2	166,84 ± 4,35	167,08 ± 7,43	194,62 ± 4,97
	Fr3	167,06 ± 7,56	125,80 ± 5,82	300,48 ± 14,37
BRUSNICA <i>Vaccinium macrocarpon L.</i>	Fr2	337,56 ± 10,76	217,41 ± 8,97	909,23 ± 32,65
	Fr3	>1000	714,34 ± 10,89	>1000
ŠIPAK <i>Rosa canina L.</i>	Fr2	248,03 ± 9,74	80,63 ± 3,91	363,95 ± 8,69
	Fr3	349,35 ± 8,42	192,75 ± 8,58	466,88 ± 25,34
GLOG <i>Crataegus oxyacantha L.</i>	Fr2	445,20 ± 12,92	206,75 ± 7,35	410,26 ± 12,35
	Fr3	792,50 ± 18,06	340,13 ± 15,82	708,62 ± 29,67

Na osnovu EC₅₀ vrednosti prikazanih u tabeli 24 uočljivo je da su najizraženija anti-proliferativna dejstva, bez statistički značajne međusobne razlike ($p < 0,05$), pokazale frakcija Fr2 ekstrakta borovnice na MCF-7 ($EC_{50}^{MCF-7} = 166,84 \mu\text{g/ml}$) i HT-29 ćelijske linije ($EC_{50}^{HT-29} = 194,62 \mu\text{g/ml}$), i frakcija Fr2 ekstrakta šipka u slučaju HeLa ćelijske linije ($EC_{50}^{HeLa} = 80,63 \mu\text{g/ml}$). Uzimajući u obzir rezultate HPLC analiza kojima je potvrđen najveći sadržaj flavonoida u frakcijama Fr2 borovnice i šipka, ovi rezultati ukazuju na činjenicu da su flavonoidi bili efikasniji u inhibiciji rasta tumorskih ćelija od fenolnih kiselina. Najmanju osetljivost pokazale su ćelijske linije MCF-7 i HT-29 prema frakciji Fr3 ekstrakta brusnice, gde antiproliferativna aktivnost ove frakcije na rast navedenih ćelijskih linija nije dostigla 50% u ispitivanom opsegu koncentracija. Pored toga, frakcija Fr3 ekstrakta brusnice imala je vrlo nizak sadržaj fenolnih kiselina (tabela 18). Poređenjem aktivnosti frakcija ekstrakata ispitivanih bobica koje sadrže fenolne kiseline, Fr3, utvrđeno je da je ova frakcija ekstrakta borovnice pokazala najbolje antiproliferativno dejstvo na sve tri ćelijske linije. Isti zaključak se može izvesti i u slučaju frakcija koje sadrže flavonoide, Fr2, osim kod ćelijske linije epitelnog karcinoma cerviksa, HeLa, kod koje je najveću inhibiciju izazvala frakcija Fr2 ekstrakta šipka.

Generalno, može se zaključiti da su frakcije ekstrakta borovnice koje sadrže polifenolna jedinjenja pokazale najizraženiji uticaj na rast sve tri ispitane ćelijske linije. Uzimajući u obzir i rezultate HPLC analiza koji su potvrdili najveći sadržaj polifenolnih

jedinjenja upravo kod ovih frakcija (tabela 17), može se pretpostaviti da su polifenolna jedinjenja zaslužna za antiproliferativno delovanje frakcija ekstrakata bobica. Nakon HPLC analiza i antiradikalnih testova, moguće je pretpostaviti da frakcije ekstrakata ispitanih bobica koje sadrže polifenolna jedinjenja, kao snažni antioksidanti, mogu uticati na redoks stanje ćelije i na taj način dovesti do smanjenja ćelijske proliferacije. I drugi autori su potvrdili da su polifenolna jedinjenja snažni antioksidanti sa potencijalom da sprečavaju oksidativna oštećenja izazvana reaktivnim kiseoničnim vrstama i na taj način štite organizam od kardiovaskularnih oboljenja i kancera (Ioku i sar., 2001; Pietta, 2000; Gamez i sar., 1998; Vinson i sar., 1995). Bomser i sar. (1996) saopštili su da bobice iz familije Ericaceae, rod *Vaccinium*, imaju sposobnost inhibicije enzima ornitin dekarboksilaze koji učestvuje u proliferaciji tumorskih ćelija, kao i da indukuju enzim hinon reduktazu koja ima sposobnost inaktivacije nekih kancerogena. Po navodima Guthrie (2000) ekstrakt brusnice snažno inhibira rast MCF-7, MDA-MB-435 ćelijske linije kancera dojke. Yan i sar. (2002) izvršili su frakcionisanje ekstrakta brusnice i utvrdili da je frakcija koja je pokazala najveću inhibiciju na svih sedam testiranih ćelijskih linija (H460, ME180, DU145, MCF-7, HT-29, PC3 i K562) i visoku antiradikalnu aktivnost u DPPH testu, bogata flavonoidima, tačnije flavonol glikozidima. Elaginska kiselina je pokazala preventivno i antikancerogeno dejstvo u mnogim *in vivo* i *in vitro* studijama (Hirose i sar., 2002; Juranić i sar., 2001; Khanduja i sar., 1999; Thiem i Berge, 2003).

Juranić i sar. (2005) sprovedli su paralelno ispitivanje antiproliferativne aktivnosti vodenog ekstrakta semena i mesnatog dela pet sorti malina u poređenju sa standardom elaginske kiseline na ćelije kancera debelog creva, LS174. Ekstrakti mesnatog dela maline pokazali su izraženiju sposobnost inhibicije rasta ćelija kancera koja nije bila u korelaciji sa sadržajem elaginske kiseline. Sa druge strane, antiproliferativne aktivnosti ekstrakata semena malina su u korelaciji sa sadržajem elaginske kiseline i veće su od aktivnosti iste količine same elaginske kiseline. Ovo je u skladu i sa navodima drugih autora koji su utvrdili da kombinacija elaginske kiseline sa drugim konstituentima bobica doprinosi njenoj većoj citotoksičnosti (Bagchi i sar., 2004; Huang i sar., 2002; Liu i sar., 2002; Meyers i sar., 2003; Seeram i sar., 2004). Takođe, rezultati naučnih istraživanja potvrđuju mogućnost sinergističkog antiproliferativnog, antiangiogenog, antioksidativnog i antikancerogenog potencijala antocijana, proantocijanidina, flavonol glikozida i drugih polifenolnih jedinjenja u ekstraktima bobica (Bagchi i sar., 2004; Huang i sar., 2002; Liu i sar., 2002; Seeram i sar., 2004). Pored toga autori su na osnovu dobijenih rezultata izračunali da je dnevna doza od 121 g malina sorte Willamette dovoljna da spreči rast ćelija kancera debelog creva.

Lin i sar. (2007) ispitali su delovanje 13 odabranih vrsta voća i povrća na proliferaciju ćelija splenocita *in vivo*. Nakon korelacione analize utvrđeno je da ne postoji značajna korelacija između proliferacije ćelija splenocita u prisustvu ispitanih ekstrakata sa ukupnim sadržajem flavonoida u ekstraktima, što je verovatno zbog toga što samo neki flavonoidi poseduju antiproliferativnu aktivnost u datom sistemu.

Rezultati prikazani na slikama 50, 51 i 52 i u tabeli 24 ukazuju na inhibitorno dejstvo komponenta prisutnih u ekstraktima bobica na proliferaciju ćelija kancera *in vitro*. Ipak, teško je odrediti doprinos pojedinačnih komponenta za ukupan antikancerogeni efekat. Često, aktivnost ekstrakata može biti rezultat aditivnog tj. sinergističkog efekta nekoliko jedinjenja. Martens-Talcott i sar. (2003) zabeležili su povećanje apoptoze i inhibiciju ćelijske proliferacije kod humanih leukemičnih ćelija nakon njihovog tretiranja smešom kvercetina i elaginske kiseline, u poređenju sa uticajem pojedinačnih jedinjenja.

Značaj ishrane u prevenciji kancera je dobro dokumentovan i potvrđen u novije vreme. Svetska zdravstvena organizacija (WHO) preporučuje dnevni unos od najmanje 400 g voća i povrća u cilju smanjenja kancerogenih oboljenja i bolesti izazvanih starenjem (Hoffmann i sar., 2003). Na osnovu epidemioloških istraživanja Block i sar. (1992) i Steinmetz i sar. (1996) procenili su da pojava kancera može biti redukovana za najmanje 20-30% zdravom ishranom.

5.0. ZAKLJUČAK

U radu su ispitani hemijski sastav, antiradikalska i antiproliferativna aktivnost frakcionisanih ekstrakata bobica iz familija Ericaceae, borovnica (*Vaccinium myrtillus* L.) i brusnica (*Vaccinium macrocarpon* L.) i familije Rosaceae, šipak (*Rosa canina* L.) i glog (*Crataegus oxyacantha* L.).

Ispitivanja hemijskog sastava biljnih ekstrakata obuhvatila su spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja, flavonoida i antocijana, kao i kvalitativnu i kvantitativnu HPLC analizu.

Rezultati spektrofotometrijskih ispitivanja ukazuju da je najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja kod ekstrakta šipka (457,45 mg/g), flavonoida kod ekstrakta borovnice (224,71 mg/g), antocijana kod ekstrakta brusnice (81,63 mg/g), a monomera antocijana kod ekstrakta borovnice (58,45 mg/g). Generalno, veći sadržaj antocijana zabeležen je kod bobica iz familije Ericaceae, dok je količina ukupnih polifenolnih jedinjenja veća kod bobica familije Rosaceae.

Kvalitativnom HPLC analizom utvrđeno je da frakcije ekstrakata ispitivanih bobica sadrže polarna jedinjenja - vitamin C (Fr1), neutralna polifenolna jedinjenja – flavonoide (Fr2) i kisela polifenolna jedinjenja (Fr3).

Na osnovu kvantitativne HPLC analize četiri ispitivane vrste bobica iz familija Ericaceae i Rosaceae može se zaključiti da je najzastupljeniji flavonoid u svim frakcijama Fr2 bio kvercetin, gde su njegovi udeli u ukupnom prinosu flavonoida u svim slučajevima bili preko 50%. Dominantna fenolna kiselina kod ispitivanih bobica iz familije Ericaceae, borovnice i brusnice, je *p*-kumarinska kiselina, dok je kod bobica iz familije Rosaceae, šipka i gloga, to bila elaginska kiselina, čiji sadržaj u šipku dostiže skoro 90% (404,1942 µg/g) od ukupnog sadržaja fenolnih kiselina u frakciji Fr3 (454,2292 µg/g). Bobice iz familije Rosaceae su bogatije vitaminom C, gde je kod gloga zabeležena najveća količina ovog vitamina (2043 µg/g). Kod svih ispitanih bobica sadržaj vitamina C je veći od ukupnog sadržaja flavonoida i ukupnog sadržaja fenolnih kiselina. Takođe, sadržaj ukupnih fenolnih kiselina je duplo veći od sadržaja ukupnih flavonoida, kod svih ispitanih bobica, osim kod borovnice.

Primenom ESR spektroskopije određena je antiradikalska aktivnost frakcija ekstrakata borovnice, brusnice, šipka i gloga na reaktivne superoksid anjon i hidroksil radikale, kao i na stabilne DPPH radikale.

Frakcije Fr1 ekstrakata ispitivanih bobica, koje sadrže vitamin C, su pokazale najbolje antiradikalsko delovanje na superoksid anjon radikale u odnosu na druge ispitivane slobodnoradikalske vrste, odnosno imale su najniže $EC_{50}^{O_2^{\bullet-}}$ vrednosti. Najniža $EC_{50}^{O_2^{\bullet-}}$ vrednost je zabeležena za frakciju Fr1 gloga koji i sadrži najviše vitamina C (2043 $\mu\text{g/g}$), a najveća za frakciju Fr1 brusnice kod koje je HPLC analizom utvrđena najmanja količina vitamina C (754 $\mu\text{g/g}$). Može se zaključiti da su ovi rezultati u saglasnosti sa sadržajem vitamina C u frakcijama Fr1 ekstrakata bobica. Sve frakcije Fr1 ekstrakata bobica, osim u slučaju brusnice, su pokazale niže antiradikalske aktivnosti u model sistemu sa superoksid anjon radikalima od frakcija koje sadrže polifenolna jedinjenja, flavonoide (Fr2) i fenolne kiseline (Fr3). Najizraženiju aktivnost u ovom sistemu pokazale su frakcije Fr2 šipka i gloga koje redukciju ESR signala od 50%, odnosno 100% postigle pri istim koncentracijama od 0,012 mg/ml, odnosno 0,5 mg/ml. Frakcije ekstrakta brusnice Fr2 i Fr3 gase ESR signal superoksid anjon radikala pri koncentraciji od 3 mg/ml.

Nešto niže antiradikalske aktivnosti frakcija Fr1 ekstrakata bobica detektovane su u Fentonovom model sistemu. Pored toga, ove aktivnosti su bile bolje od aktivnosti drugih frakcija bobica na reaktivne hidroksil radikale, osim u slučaju frakcije Fr1 borovnice. Rezultati antiradikalske aktivnosti frakcija Fr1 su u saglasnosti sa sadržajem vitamina C u ovim frakcijama. Naime, frakcije Fr1 dobijene iz ekstrakata bobica koje pripadaju familiji Rosaceae (šipak i glog) su imale izraženiji uticaj na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala od istih frakcija ekstrakata bobica iz familije Ericaceae (borovnica i brusnica) što ukazuje da vitamin C ima veću antiradikalsku aktivnost na hidroksil radikale. Fr1 šipka gasi ESR signal hidroksil radikala pri koncentraciji od 0,1 mg/ml, Fr1 gloga pri koncentraciji od 0,25 mg/ml dok frakcije Fr1 borovnice i brusnice postižu isti efekat pri koncentracijama 2 i 3 mg/ml.

U model sistemu sa DPPH radikalima frakcije ekstrakata svih ispitivanih bobica koje sadrže vitamin C ispoljile su lošije antiradikalske aktivnosti u odnosu na frakcije koje sadrže polifenolna jedinjenja. Tako frakcija Fr1 brusnice nije pokazala nikakvu antiradikalsku aktivnost na DPPH \bullet u opsegu koncentracija 0,5 – 0,25 mg/ml.

Poređenjem antiradikalske aktivnosti u model sistemu sa superoksid anjon radikalima, tj. $EC_{50}^{O_2^{\bullet-}}$ vrednosti frakcija Fr2 i frakcija Fr3 ekstrakata četiri ispitivane vrste bo-

bica, uočeno je da se njihove antiradikalske aktivnosti nisu statistički značajno razlikovale ($p < 0,05$). Takođe, ove vrednosti su manje od EC_{50} vrednosti dobijenih u ostalim antiradikalnim testovima. Aktivnosti frakcija Fr2 i Fr3 ekstrakta brusnice su manje od aktivnosti ovih frakcija ekstrakata borovnice, šipka i gloja, što je u saglasnosti sa njihovim nižim sadržajem polifenolnih jedinjenja, i flavonoida i fenolnih kiselina, utvrđenim HPLC analizom.

Međusobnim poređenjem antiradikalnih aktivnosti frakcija Fr2 ekstrakata ispitivanih bobica u Fentonovom model sistemu, može se zaključiti da je frakcija Fr2 ekstrakta borovnice imala najveću antiradikalnu aktivnost, a ekstrakta brusnice najmanju. Ovi su rezultati u skladu sa utvrđenim sadržajem flavonoida u navedenim frakcijama, gde je najviše flavonoida zabeleženo kod frakcije Fr2 ekstrakta borovnice (1328,5818 $\mu\text{g/g}$), a najmanje kod iste frakcije ekstrakta brusnice (18,2316 $\mu\text{g/g}$). Isti zaključak se može izvesti i za frakcije Fr3 ekstrakata ispitivanih bobica, gde frakcija Fr3 ekstrakta brusnice sa najnižim sadržajem fenolnih kiselina nije imala uticaj na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala u opsegu koncentracija 0,25 – 3 mg/ml, dok je najbolja aktivnost zabeležena u slučaju frakcije Fr3 ekstrakta borovnice (pri koncentraciji od 0,5 mg/ml postiže $AA\cdot_{OH} = 100\%$, $EC_{50}^{\cdot OH} = 0,117$ mg/ml). Frakcija Fr3 ekstrakta šipka je takođe pokazala dobru antiradikalnu aktivnost na hidroksil radikale ($EC_{50}^{\cdot OH} = 0,212$ mg/ml). Ova frakcija sadrži značajnu količinu elaginske kiseline koja je dimer galne kiseline, odnosno dilakton heksahidroksidifenilne kiseline.

U model sistemu sa stabilnim DPPH radikalima najbolje antiradikalske aktivnosti, pokazale su frakcije Fr2 ekstrakata bobica koje sadrže flavonoide, i to frakcija Fr2 ekstrakta borovnice. Prisustvo Fr2 koja je i najbogatija flavonoidima (1328,5818 $\mu\text{g/g}$), naročito kvercetinom (841,8575 $\mu\text{g/g}$), eliminiše DPPH \cdot pri koncentraciji od 0,075 mg/ml, $EC_{50}^{DPPH\cdot} = 0,025$ mg/g). Međusobnim poređenjem $EC_{50}^{DPPH\cdot}$ vrednosti ovih frakcija može se uočiti da ne postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između vrednosti dobijenih za frakcije ekstrakta borovnice, šipka i gloja, dok je značajno veća vrednost kod frakcije ekstrakta brusnice verovatno posledica znatno manje količine flavonoida prisutnih u ovoj frakciji. Frakcije ekstrakata borovnice, brusnice, šipka i gloja koje sadrže fenolne kiseline, Fr3, imale su manje antiradikalske aktivnosti na stabilne DPPH radikale. Najveću antiradikalnu aktivnost je pokazala frakcija Fr3 ekstrakta borovnice koja postiže potpuno eliminisanje DPPH \cdot pri koncentraciji od 0,05 mg/ml ($EC_{50}^{DPPH\cdot} = 0,017$ $\mu\text{g/g}$). Najmanju

antiradikalnu aktivnost je ispoljila frakcija Fr3 ekstrakta brusnice koja postiže $AA_{DPPH\bullet} = 100\%$ pri ispitivanoj koncentraciji od 2 mg/ml, a $EC_{50}^{DPPH\bullet}$ vrednost je 1,066 $\mu\text{g/g}$.

Sve frakcije ekstrakata ispitivanih bobica su pokazale veće antiradikalne aktivnosti na superoksid anjon i hidroksil radikale, dok su samo frakcija Fr2 borovnice i frakcija Fr3 gloga efikasnije eliminisale $DPPH\bullet$ od sintetičkog antioksidanta BHA.

Vrlo dobra korelacija ($r > 0,8$) utvrđena je između sadržaja vitamina C, rutina i vanilinske kiseline sa antiradikalnim aktivnostima na superoksid anjon radikale, kao i vanilinske kiseline i antiradikalne aktivnosti na hidroksil radikale. Dobra korelacija ($r > 0,5$) zabeležena je između ukupnog sadržaja fenolnih kiselina i $AA_{O_2\bullet}$ i $AA_{DPPH\bullet}$, sadržaja vitamina C i $AA_{OH\bullet}$ i $AA_{DPPH\bullet}$, sadržaja rutina i hlorogenske kiseline sa $AA_{DPPH\bullet}$ i sadržaja kampferola i $AA_{OH\bullet}$. Ostali korelacioni koeficijenti ukazali su na osrednju ($r < 0,5$) ili slabu ($r < 0,3$), ali pozitivnu uzajamnu zavisnost između sadržaja antioksidanata i antiradikalne aktivnosti. Takođe, neophodno je uzeti u obzir i činjenicu da su ekstrakti kompleksne smeše prirodnih jedinjenja i da njihova antiradikalna aktivnost nije rezultat aktivnosti samo jedne komponente. Razlike u antioksidativnoj aktivnosti prirodnih ekstrakata posledica je različite aktivnosti pojedinačnih polifenolnih jedinjenja, ali i njihovih međusobnih antagonističkih i sinergističkih delovanja.

Kada su frakcije Fr1 ekstrakata ispitivanih bobica podvrgnute ESR spektralnoj analizi u prisustvu superoksid anjon radikala, a bez dodatka "spin trapa" (DMPO), detektovani su dubleti u ESR spektrima u slučaju sve četiri ispitivane frakcije Fr1. Nakon obrade spektara kompjuterskom simulacijom i poređenjem dobijene konstante hiperfinog cepanja sa literarnim podacima, a u skladu sa visokim sadržajem vitamina C određenim HPLC analizama u ovim frakcijama, može se tvrditi da je detektovana slobodnoradikalna vrsta askorbil anjon radikal. Nakon analize ESR signala slobodnih radikala nastalih tokom reakcije frakcije Fr2 ekstrakta borovnice sa superoksid anjon radikalima, bez prisustva "spin trap" jedinjenja (DMPO) kompjuterskom simulacijom dobijene su konstante hiperfinog cepanja koje, po literarnim navodima, odgovaraju kvercetin semihinon radikalima. Potvrda porekla dobijenog slobodnog radikala u sve četiri frakcije Fr2 ekstrakata ispitivanih bobica su i rezultati HPLC analiza koji su pokazali da je kvercetin najdominantniji flavonoid u navedenim frakcijama sa masenim udelom većim od 50% od ukupnih detektovanih flavonoida.

Na osnovu rezultata ispitivanja dejstva frakcija ekstrakata bobica na rast tri histološki različite humane ćelijske linije može se uočiti da su frakcije ekstrakata ispitivanih bobica

koje sadrže vitamin C, odnosno Fr1, ispoljile stimulatívno dejstvo na rast sve tri ćelijske linije, odnosno da nisu pokazale antiproliferativno delovanje u ispitivanom opsegu koncentracija. Frakcije ekstrakata svih ispitivanih bobica koje sadrže flavonoide, Fr2, pokazale su izraženiji efekat na rast sve tri ćelijske linije od frakcija Fr3 koje sadrže fenolne kiseline. Na osnovu izračunatih EC_{50} vrednosti može se zaključiti da su najizraženija antiproliferativna dejstva, bez statistički značajne međusobne razlike ($p < 0,05$), pokazale frakcija Fr2 ekstrakta borovnice na MCF-7 ($EC_{50}^{MCF-7} = 166,84 \mu\text{g/ml}$) i HT-29 ćelijske linije ($EC_{50}^{HT-29} = 194,62 \mu\text{g/ml}$), i frakcija Fr2 ekstrakta šipka u slučaju HeLa ćelijske linije ($EC_{50}^{HeLa} = 80,63 \mu\text{g/ml}$). Uzimajući u obzir rezultate HPLC analiza kojima je potvrđen najveći sadržaj flavonoida u frakcijama Fr2 borovnice i šipka, ovi rezultati ukazuju na činjenicu da su flavonoidi bili efikasniji u inhibiciji rasta tumorskih ćelija od fenolnih kiselina. Najmanju osetljivost pokazale su ćelijske linije MCF-7 i HT-29 prema frakciji Fr3 ekstrakta brusnice, gde antiproliferativna aktivnost ove frakcije na rast navedenih ćelijskih linija nije dostigla 50% u ispitivanom opsegu koncentracija. Uzimajući u obzir i rezultate HPLC analiza koji su potvrdili najveći sadržaj polifenolnih jedinjenja upravo kod ovih frakcija, može se pretpostaviti da su polifenolna jedinjenja zaslužna za antiproliferativno delovanje frakcija ekstrakata bobica.

6.0. LITERATURA

- Acworth, I.A. The handbook of redox biochemistry, ESA Inc., Chelmsford, USA, 2003.
- Agullo, G., Gamet, L., Besson, C., Demigne, C., Remesy, C. Quercetin exerts a preferential cytotoxic effect on active dividing colon carcinoma HT29 and CACO2 cells, *Canc. Lett.*, 87(1), 55-63, 1994.
- Allen, J.C., Joseph, G. Deterioration of milk on storage, *J. Dairy Res.*, 52, 469-487, 1985.
- Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S., Tonagai Y. High performance liquid chromatographic determination with photo diode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits, *J Chrom.*, 896, 87-93, 2000.
- Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., Trinajstić, N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids, *Croat. Chem. Acta*, 76, 55-61, 2003.
- Anderson, M.W., You, M., Reynolds, S.H. Proto-oncogene activation in rodent and human tumors, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 283, 235-243, 1991.
- Anderson, M.E. Glutathione: An overview of biosynthesis and modulation, *Chem. Biol. Interact.*, 111-112, 1-14, 1998.
- AOAC Official Method 2005.02. Total monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines, pH Differential Method, AOAC International, 2006.
- Arnao, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case, *Trends Food Sci. Tech.*, 11, 419-421, 2000.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., Butler, J. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors, *Biochem. J.*, 256, 251-255, 1988.
- Aurand, L.W., Boone, N.H., Giddings, G.G. Superoxide and singlet oxygen in milk lipid oxidation, *J. Dairy Sci.*, 363-369, 1977.
- Aziz, A.A., Edwards, C.A., Lean, M.E.J., Crozier, A. Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4'-o-b-glucoside and isorhamnetin-4'-o-b-glucoside by human volunteers, *Free Radic. Res.*, 29, 257-269, 1998.

- Aziz, R.M., Nines, R., Rodrigo, K., Harris, K., Hudson, T., Gupta, A., Morse, M., Carlton, P., Stoner, G. D. The effect of freeze dried blueberries on N-nitrosomethylbenzylamine tumorigenesis in the rat esophagus, *Pharmaceut. Biol.*, 40, 43-49, 2002.
- Baker, H., DeAngelis, B., Frank, O., Khalil, M., Hunter, S.H., Baker, E.R. Antioxidant survey to assess antagonism to redox stress using a prokaryotic and eukaryotic system, *Experientia*, 52, 597-599, 1996.
- Barch, D.H., Fox, C.C. Selective inhibition of methylbenzyl nitrosamine induced formation of esophageal O6 methylguanine by dietary ellagic acid in rats. *Canc. Res.*, 48(24), 7088-7092, 1988.
- Bauernfeind, J.C. Ascorbic acid Technology in Agricultural Pharmaceutical, Food and Industrial Applications, U: Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism and Uses, Seib, P.A., Tolbert, B.M. (Eds.), *Advances in Chemistry Series 200*, American Chemical Society, Washington D.C., p. 397, 1982.
- Banias, C., Oreopoulou, V., Thomopoulos, C.D., The effect of primary antioxidants and synergists on the activity of plant extracts in lard, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 520-524, 1992.
- Bánhegyi, G., Braun, L., Csala, M., Puskás, F., Mandl, J. Ascorbate metabolism and its regulation in animals, *Free Radic. Biol. Med.*, 23, 793-803, 1997.
- Becker, E.M., Nissen, L.R., Skibsted, L.H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects, *Eur. Food Res. Tech. Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 219, 561-571, 2004.
- Bendheim, P.E., Poeggeler, B., Neria, E., Ziv, V., Pappolla, M.A., Chian, D.G. Development of indole-3-propionic acid (Oxigon) for Alzheimer's disease, *J. Mol. Neurosci.*, 19, 213-217, 2002.
- Bendich, A., Machlin, L.J., Scandurra, O., Burton, G.W., Wayne, D.D.M. The antioxidant role of vitamin C, *Adv. Free Radic. Biol. Med.*, 2, 419-444, 1986.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration, U: *Methods in Enzymology: Oxidants and Antioxidants Part A*, 1st ed., Vol. 299, Packer, L. (Ed.), 15-27 Academic Press Limited, London, 1999.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. Uric acid: friend and foe, *Redox Rep.*, 2, 231-234, 1996.
- Beyer, R.E. The production of coenzyme Q in free radical production and antioxidation, *Free Radic. Biol. Med.*, 8, 545-565, 1990.

- Bilgihan, A., Bilgihan, M.K., Akata, R.F., Aricioglu, A., Hasanreisoglu, B. Antioxidative role of ocular melanin pigment in the model of lens induced uveitis, *Free Radic. Biol. Med.*, 19, 883-885, 1995.
- Bindoli, A., Rigobello, M.P., Galzina, L. Toxicity of aminochromes, *Toxicol. Lett.*, 48, 3-20, 1989.
- Birch, A. J., Donovan, F. W. Studies in relation to biosynthesis. I. Some possible routes to derivatives of orcinol and phloroglucinol, *Aust. J. Chem.*, 6, 360-368, 1953.
- Bloch, A., Thomson, C.A. Position of the American Dietetic Association: phytochemicals and functional foods, *J. Am. Diet. Assoc.*, 95, 493-496, 1995.
- Block, G., Patterson, B., Subar, A. Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence, *Nutr. Cancer* 18, 1-29, 1992.
- Block, G. Vitamin C and cancer prevention: the epidemiological evidence, *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 270S-282S, 1991.
- Bogdanović, G. Citoprotektivni efekti flavonskih jedinjenja na ćelijske linije, Magistarska teza, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, 2000.
- Bomser, J., Madhavi, D. L., Singletary, K., Smith, M.A. *In Vitro* anticancer activity of fruit extracts from *Vaccinium* species, *Planta Med.*, 62, 212-216, 1996.
- Bors, W., Buettner, G.R. The Vitamin C Radical and its Reactions, U: *Vitamin C in Health and Disease*, Packer, L., Fuchs, J. (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 1997.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies, *Methods Enzymol.*, 186, 343-355, 1990.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. Structural Principles of Flavonoid Antioxidants, U: *Free Radicals and the Liver*, Csomos, G., Feher, J. (Eds.), Springer, Berlin, pp. 77-95, 1992.
- Bowery VW, Ingold KU, Stocker R. Vitamin E in human low-density lipoprotein. When and how this antioxidant becomes a pro-oxidant, *Biochem J.*, 288, 341-344, 1992.
- Bowry, V.W., Stocker, R., A. Tocopherol-mediated peroxidation. The prooxidant effect of vitamin E on the radical-initiated oxidation of human low-density lipoprotein, *Chem. Soc.*, 115, 6039, 1993.
- Boyles, M.J., Wrolstad, R.E. Anthocyanin composition of red raspberry juice: Influences of cultivar processing and environmental factors, *J. Food Sci.*, 58(5), 1135-1141, 1993.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, *LWT*, 28, 25-30, 1995.

- Britton, G. *The Biochemistry of Natural Pigments*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1983.
- Brouillard, R., Delaporte, B. Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton-transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin-3-glucoside, *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 8461, 1977.
- Bub, A., Watzl, B., Blockhaus, M., *et al.* Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage, *J. Nutr. Biochem.*, 14, 90-98, 2003.
- Buettner, G.R. Ascorbate autooxidation in the presence of iron and copper chelates, *Free Radic. Res. Comm.*, 6(1), 349-353, 1986.
- Buettner, G.R., Jurkiewicz, B.A. Catalytic metals, ascorbate, and free radicals: combinations to avoid, *Radic. Res.*, 145, 532-541, 1996.
- Buettner, G.R. The packing order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate, *Arch. Biochem. Biophys.*, 300, 535-543, 1993.
- Cameron, E., Pauling, L., Leibovitz, B. Ascorbic acid and cancer: a review, *Cancer Res.*, 39, 663-681, 1979.
- Cao, G., Russell, R.M., Lischner, N., Prior, R.L. Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women, *J. Nutr.*, 128, 2383-2390, 1998.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, *Free Radic. Biol. Med.*, 22(5), 749-760, 1997.
- Capasso, F., Gaginella, T. S., Grandolini, G., Izzo, A. A. *Fitoterapija – Priručnik biljne medicine*, Prometej, Novi Sad, 2005.
- Castro, I.A., Rogero, M.M., Junqueira, R.M., Carrapeiro, M.M. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazil free radical scavenging activity of antioxidant mixtures evaluated by response surface methodology, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 41, 59-67, 2006.
- Cavalieri, E., Devanesan, P., Bostland, M.C., Badawi, A.F., Rogan, E.G. Catechol estrogen metabolites and conjugates in different regions of the prostate of Noble rats treated with 4-hydroxyestradiol: Implications for estrogen-induced initiation of prostate cancer, *Carcinogen*, 23, 329-333, 2002.
- Cheng, G.W., Breen, P.J. Activity of Phenylalanine Ammonialyase (PAL) and Concentrations of Anthocyanins and Phenolics in Developing Strawberry Fruits, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116, 865-869, 1991.

- Chan, T.A., Morin, P.J., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. Mechanisms underlying non-steroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 681-686, 1998.
- Chen, H., Zuo, Y., Deng, Y. Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography, *J. Chrom.*, 913, 387-395, 2001.
- Cheesman, H.K., Slater, F.T. An introduction to free radical biochemistry, *Br. Med. Bulletin*, 49, 481-493, 1993.
- Chimi, H., Sadik, A., Le Tutour, B., Rahmani, M. Contribution a` l'e`tude comparative des pouvoirs antioxydants dans l'huile d'olive du tyrosol, de l'hydroxytyrosol, de l'acide cafe`ique, de l'oleoeurope`ine et du BHT, *Rev. Fr. Corps Gras.*, 35, 339-344, 1988.
- Clifford, M.N. Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden, *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1063-1072, 2000.
- Cody, V., Middleton, E., Harborne, J.B. Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical pharmacological and structure-activity relationships, Alan R. Liss, New York, 1986.
- Cort, W. Haemoglobin peroxidation test screens antioxidants, *Food Technol.*, 28, 60-66, 1974.
- Cotelle, N., Bernier, J. -L., Catteau, J. -P., Pommery, J., Wallet, J. -C., Gaydou, E. M. Antioxidant properties of hydroxy flavones, *Free Radic. Biol. Med.*, 20, 35-43, 1996.
- Cotelle, N. Role of flavonoids in oxidative stress, *Curr. Top. Med. Chem.*, 1, 569-590, 2001.
- Croft, K.D. Antioxidant Effects of Plant Phenolic Compounds, U: Antioxidants in Human Health, Basu, T.K., Temple, N.J., Garg, M.L. (Eds.), CAB International, 1999.
- Cuvelier, M.-E., Richard, H., Berset, C. Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-phenols: Structure-Activity Relationship, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 324-325, 1992.
- Czapski, J. The effect of heating conditions on losses and regeneration of betacyanins, *Ztschr. Lebensm. Unters. Forsch.*, 180, 21, 1985.
- Čanadanović-Brunet, J.M. Kiseonikovi slobodni radikali i prirodni antioksidanti, *Zadužbina Andrejević*, Beograd, p. 36, 1998.
- Čanadanović-Brunet, J.M. Kiseonikovi slobodni radikali prirodnih i model sistema, *Doktorska disertacija*, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 1997.

- Dangles, O., Fargeix, G., Dufour, C. One-electron oxidation of quercetin and quercetin derivatives in protic and non protic media, *Journal of Chemical Society, Perkin Transitions*, 2, 1387-1395, 1999.
- Das, M., Bickers, D.R., Mukhtar, H. Effects of ellagic acid on hepatic and pulmonary xenobiotic metabolism in mice - studies on the mechanism of its anticarcinogenic action, *Carcinogenesis*, 6(10), 1409-1413, 1985.
- Davey, M-W., Van Montagu, M., Inzé, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, I.J.J., Strain, J.J., Favell, D., Fletcher, J. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing, *J. Sci. Food Agric.*, 80(7), 825-860, 2000.
- Davis, B. D., Amino Acid Metabolism, McElroy, W.D., and Glass, B. (Eds.), The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md., p. 799, 1955.
- Dawes, M.B., Austin, J., Partridge, D.A. Inorganic and analytical aspects of vitamin C chemistry, U: Vitamin C: its Chemistry and Biochemistry, Dawes, M.B., Austin, J., Partridge, D.A. (Eds.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, 115-146, 1991.
- Dawson, D., Encel, N. Melatonin and sleep in humans, *J. Pineal. Res.*, 15, 1-12, 1993.
- Day, A.J., Mellon, F., Barron, D., Sarrazin, G., Morgan, M.R.A., Williamson, G. Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin, *Free Radic. Res.*, 35(6), 941-952, 2001.
- Degeneve, A. Antioxidants in fruits and vegetables, *Magistarska teza, Univerzitet u Glazgovu, Glazgov*, 2004.
- Diplock, A.T., Charleux, J.-L., Crozier-Willi, G., Kok, F.J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., Vina-Ribes, J. Functional food science and defence against reactive oxidative species, *Br. J. Nutr.*, 80(S1), S77-S112, 1998.
- Dixon, R. A., Paiva, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism, *Plant Cell*, 7, 1085-1097, 1995.
- Doll, R., Peto, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today, *J. Nat. Cancer Inst.*, 66, 1191-308, 1981.
- Donovan, J.L., Manach, C., Rios, L., Morand, C., Scalbert, A., Remesy, C. Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grape seed extract or the procyanidin dimer B3, *Br. J. Nutr.*, 87, 299-306, 2002.
- Dorman, H.J.D., Bachmayer, O., Kosar, M., Hiltunen, R. Antioxidant Properties of Aqueous Extracts from Selected Lamiaceae Species Grown in Turkey, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 762-770, 2004.

- Dreosti, I.E. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine, *Nutrition*, 16(7/8), 692-694, 2000.
- Duke, J.A. Biological activity summary for cacao (*Theobroma cacao* L.), *J. Med. Food*, 3, 115-119, 2000.
- Duthie, G.G., Gardner, P.T., Kyle, J.A. Plant polyphenols: Are they the new magic bullet? *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(3), 599-603, 2003.
- Eiro, M.J., Heinonen, M. Anthocyanin color behavior and stability during storage: effect on intermolecular copigmentation, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 7461, 2002.
- Ercisli, S. Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa* spp.) species, *Food Chem.*, 104, 1379-1384, 2007.
- Espinoza, M., Olea-Azar, C., Speisky, H., Rodríguez, J. Determination of reactions between free radicals and selected Chilean wines and transition metals by ESR and UV-vis technique, *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectros.*, 71(5), 1638-1643, 2009.
- Esterbauer, H., Dieber-Rothenender, M., Waeg, G., Puhl, H., Tatzber, F. Endogenous antioxidants and lipoprotein oxidation, *Biochem. Soc. Trans.*, 18, 1059-1061, 1990.
- Fearon, E.R., Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis, *Cell*, 16, 759-767, 1990.
- Feig, D.I., Reid, T.M., Loeb, L.A. Reactive oxygen species in tumorigenesis, *Cancer Res.*, 54, 1890-1894, 1994.
- Fennema, O.R. *Food Chemistry*. 3rd ed. Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, 1996.
- Ferrari, C.K.B., Torres, E.A.F.S. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging, *Biomed. Pharmacother.*, 57, 251-260, 2003.
- Fiorentini, D., Cipollone, M., Galli, M.C., Landi, L. Antioxidant activity of reduced menadione in solvent solution and in model membranes, *Free Radic. Res.*, 26, 419-429, 1997.
- Formica, J.V., Regelson, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids, *Food Chem. Toxicol.*, 33, 1061-1080, 1995.
- Foti, M.C., Johnson, E.R., Vinqvist, M.R., Wright, J.S., Barclay, L.R., Ingold, K.U. Naphthalene diols: a new class of antioxidants intramolecular hydrogen bonding in catechols, naphthalene diols, and their aryloxy radicals, *J. Org. Chem.*, 67(15), 5190-5196, 2002.
- Foti, M., Piatelli, M., Baratta, M.T., Ruberto, G. Flavonoids, coumarins and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-activity relationship, *J. Agric. Food Chem.* 44, 497-501, 1996.

- Frei, B., England, L., Ames, B.N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human plasma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6377-6381, 1989.
- Gallop, P.M.; Paz, M.A.; Fluckinger, R.; Henson, E. Is the antioxidant, anti-inflammatory putative new vitamin, PQQ, involved with nitric oxide in bone metabolism?, *Connect. Tissue Res.*, 29, 153-161, 1993.
- Gamez, E. J. C., Luyengi, L., Lee, S. K., Zhu, L.-F., Zhou, B.-N., Fong, H.H.S., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A.S. Antioxidant flavonoid glycosides from *Daphniphyllum calycinum*, *J. Nat. Prod.*, 61, 706-708, 1998.
- Gao, X., Bjork, L., Trajkovski, V., Uggla, M. Evaluation of antioxidant activities of rose hip ethanol extracts in different test systems, *J. Sci. Food Agric.*, 80, 2021–2027, 2000.
- Garcia-Closas, R., Agudo, A., Gonzalez, C.A., Riboli, E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of lung cancer in women in Barcelona, Spain, *Nutr. Cancer*, 32(3), 154-158, 1998.
- Garcia-Closas, R., Gonzalez, C.A., Agudo, A., Riboli, E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain, *Canc. Causes Contr.*, 10(1), 71-75, 1999.
- Garcia-Viguera, C., Bridle, P. Influence of structure on colour stability of anthocyanins and flavylum salts with ascorbic acid, *Food Chem.*, 64, 21, 1999.
- Gey, K.F. Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. A critical and constructive review of epidemiology and supplementation data regarding cardiovascular disease and cancer, *Biofactors*, 7, 113-174, 1998.
- Gibaldi, M. Are phytoestrogens a „natural alternative“ to estrogen replacement therapy?, *West J. Med.*, 173-273, 2001.
- Gil, M.I., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A. Effect of postharvest storage and processing on the antioxidant constituents (flavonoids and vitamin C) of fresh-cut spinach, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2213/2217, 1999.
- Goldbohm, R.A., van den Brandt, P.A., Hertog, M.G.L., Brants, H.A.M., van Poppel, G. Flavonoid intake and risk of cancer: A prospective cohort study, *Am. J. Epidemiol. Suppl.*, 141-61S, 1995.
- Golumbic, C., Mattill, H.A. Antioxidants and the autoxidation of fats. XIII. The anti-oxygenic action of ascorbic acid in association with tocopherols, hydroquinones and related compounds, *J. Am. Chem. Soc.*, 63, 1279-1280, 1941.

- Gomez-Miguez, M., Susana González-Manzano, S., Escribano-Bailón, M.T.; Heredia, F.J., Santos-Buelga, C. Influence of Different Phenolic Copigments on the Color of Malvidin 3-Glucoside, *J. Agric. Food Chem.*, 54(15), 5422–5429, 2006.
- Gonthier, M.-P., Donovan, J.L., Texier, O., Felgines, C., Remesy, C., Scalbert, A. Metabolism of dietary procyanidins in rats, *Free Radic. Biol. Med.*, 35, 837-844, 2003.
- Goodman, M.T., Wilkens, L.R., Hankin, J.H., Lyu, L.-C., Wu, A.H., Kolonel, L.N. Association of soy and fiber consumption with the risk of endometrial cancer, *Am. J. Epidemiol.*, 146, 294-306, 1997.
- Goodman, Y., Bruce, A.J., Cheng, B., Mattson, M.P. Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid β -peptide toxicity in hippocampal neurons, *J. Neurochem.*, 66, 1836-1844, 1996.
- Goupy, P., Dufour, C., Loonis, M., Dangles, O. Quantitative Kinetic Analysis of Hydrogen Transfer Reactions from Dietary Polyphenols to the DPPH Radical, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 615-622, 2003.
- Greenwald, P., Nixon, D.W., Malone, W.F., Kelloff, G.J., Stern, H.R., Witkin, K.M. Concepts in cancer chemoprevention research, *Cancer*, 65, 1483-1490, 1990.
- Gregor, W., Grabner, G., Adelwohrer, C., Rosenau, T., Gille, L. Antioxidant Properties of Natural and Synthetic Chromanol Derivatives: Study by Fast Kinetics and Electron Spin Resonance Spectroscopy, *Journal of Organic Chemistry*, 70(9), 3472-3483, 2005.
- Grić, Lj. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, August Cesarec, Zagreb, 1986.
- Guern, J., Renaudin J.P., Brown S.C. The compartmentation of secondary metabolites in plant cell cultures. U: *Cell Culture in Phytochemistry*, Constabel, F., Vasil, I.K., (Eds.), Academic Press, London, UK, pp. 43–76, 1987.
- Guthrie, N. Effect of cranberry juice and products on human breast cancer cell growth, *Proc. Exper. Biology Conf.*, 53, 13, 2000.
- Halliwel, B. Free radicals and antioxidants: a personal view, *Nutr. Rev.*, 52, 253-264, 1994.
- Halliwel, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 344, 721-724, 1994.
- Halliwel, B., Gutteridge, M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford, UK, 1989.
- Halliwel, B., Gutteridge, M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford University Press, Oxford, UK, 1999.

- Halliwell, B., Gutteridge, M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochem. J.*, 219, 1-14, 1984.
- Halliwell, B., Gutteridge, M.C. The antioxidants of human extracellular fluids, *Arch. Biochem. Biophys.*, 280, 1-8, 1990.
- Halliwell, B., Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?, *Br. J. Pharmacol.*, 142, 231-255, 2004.
- Halvorsen, B., Brude, I., Drevon, C.A., Nysom, J., Ose, L., Christiansen, E.N., Nenseter, M.S. Effect of homocysteine on copper ion-catalyzed, azo compound initiated, and mononuclear cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein, *J. Lipid Res.*, 37, 1591-1600, 1996.
- Harborne, J.B. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Chapman & Hall, Cambridge, UK, 1994.
- Hardy, G. Nutraceuticals and functional foods: introducing and meaning, *Nutrition*, 16, 688, 2000.
- Harris, Z.L., Gitlin, J.D. Genetic and molecular basis for copper toxicity, *Am. J. Clin. Nutr.*, 63, 836S-841S, 1996.
- Ha, Y.L., Csallany, A.S. α -Tocopherol oxidation mediated by superoxide ($O_2^{\cdot-}$). II. Identification of the stable α -tocopherol oxidation products, *Lipids*, 27, 201-205, 1992.
- Häkkinen, S. *Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products*, Kuopio University Publications D. Medical Sciences 221, Kuopio, Finland, 2000.
- Häkkinen, S.H., Heinonen, I.M., Kärenlampi, S.O., Mykkänen, H.M., Ruuskanen, J., Törrönen, A.R. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries, *Food Res. Int.*, 32, 345-353, 1999.
- Häkkinen, S.H., Kärenlampi, S.I., Mykkänen, H.M., Törrönen, A.R. Influence of domestic processing and storage on flavonol contents in berries, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2960-2965, 2000.
- Häkkinen, S.H., Kärenlampi, S.O., Heinonen, I.M., Mykkänen, H.M., Törrönen, A.R. HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries, *J. Food Sci. Agric.*, 77, 543-551, 1998.
- Häkkinen, S.H., Törrönen, A.R. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and vaccinium species: influence of cultivar, cultivation site and technique, *Food Res. Int.*, 33, 517-524, 2000.

- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *J. Nutr. Biochem.*, 13, 572-584, 2002.
- Heinonen, I.M., Meyer, A.S., Frankel, E.N. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4107-4112, 1998.
- He, K., Nukada, H., Urakami, T., Murphy, M.P. Antioxidant and pro-oxidant properties of pyrroloquinoline quinone (PQQ): Implications for its function in biological systems, *Biochem. Pharmacol.*, 65, 67-74, 2003.
- Herrera, B., Alvarez, A.M., Sanchez, A. Reactive oxygen species (ROS) mediate the mitochondrial-dependent apoptosis induced hepatocytes, *FASEB J.*, 15, 74, 2001.
- Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollmann, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study, *Lancet*, 342(8878), 1007-1011, 1993.
- Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Kromhout, D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk, *Lancet*, 349(9053), 699, 1997a.
- Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., Pekkarinen, M., Simic, B.S., Toshima, H., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B. Flavonoids intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the 7 countries study, *Arch. Intern. Med.*, 155, 381-386, 1995.
- Hertog, M.G.L., Sweetnam, P.M., Fehily, A.M., Elwood, P.C., Kromhout, D. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly study, *Am. J. Clin. Nutr.*, 65(5), 1489-1494, 1997b.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H. Potential health effects of the dietary flavonol quercetin, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 50, 63-71, 1996.
- Hiramoto, K., Ojima, N., Sako, K-I., Kikugawa, K., Effect of Plant Phenolics on the formation of the Spin-Adduct of Hydroxyl Radical and the DNA Strand Breaking by Hydroxyl Radical, *Biol. Pharm. Bull.*, 19, 4, 558-563, 1996.
- Hirvonen, T., Virtamo, J., Korhonen, P., Albanes, D., Pietinen, P. Intake of flavonoids, carotenoids, vitamins C and E, and risk of stroke in male smokers, *Stroke*, 31(10), 2301-2306, 2000.
- Ho, C-T., Lee, C.Y., Huang, M-T. Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health, pp. 506-507, ACS Symposium Series. Developed from a symposium Sponsored by the Division of Agricultural and Food Chemistry of the American Chemical

- Society at the Fourth Chemical Congress of North America, Washington D.C., ACS Press, 1992.
- Hodaka, S., Komatsu-Watanabe, R., Ideguchi, T., Sakamoto, S., Ichimori, K., Kanaori, K., Tajima, K. Stopped-flow-optical and -ESR Study on Oxidative Reaction of Quercetin by Nitrosodisulfonate Radical as a Model of Reactive Oxygen Species, *Chem. Lett.*, 11 (36), 1388-1389, 2007.
- Hodnick, W.F., Kalyanaraman, B., Pritsos, C.A., Pardini, R.S. The production of hydroxyl and semiquinone radicals during the autoxidation of redox active flavonoids, *Basic Life Sci.*, 49, 149-152, 1988.
- Hollman, P.C.H., de Vries, J.H.M., van Leeuwen, P.A.M., Mengelers, M.J.B., Katan, M.B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers, *Am. J. Clin. Nutr.*, 62, 1276-82, 1995.
- Hollman, P.C.H., Venema, D.P. The content of the potentially anticarcinogenic ellagic acid in plant foods, U: *Food and Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspects*, Waldron, K.W., Johnson, I. T., Fenwick, G. R. (Eds.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 203-208, 1993.
- Howell, A.B., Vorsa, N., Der Marderosian, A., Foo, L.Y. Inhibition of the adherence of P-Fimbriated E Coli to uroepithelial cell surfaces by proanthocyanidin extracts from cranberries, *New Engl. J. Med.*, 339(15), 1085, 1998.
- Hraš, A.R., Hadolin, M., Knez, Ž., Bauman, D. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil, *Food Chem.*, 71, 229-233, 2000.
- Huether, G., Fettkotter, I., Keilhoff, G., Wolf, G. Serotonin acts as a radical scavenger and its and is oxidised to a dimer during the respiratory burst of activated microglia, *J. Neurochem.* 69, 2096-2101, 1997.
- Husain, S.R., Cillard, J., Cillard, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids, *Phytochemistry*, 26, 2489-2491, 1987.
- Hu, J. *Oxidative Stress and Aging*, Free Radical and Radiation Biology Program, The University of Iowa, 2001.
- Hu, J.P., Calomme, M., Jasure, A., De Bruyne, T., Pieters, L., Vlietinck, A., Vanden Berghe, D.A. Structure-activity relationships of flavonoids with superoxide scavenging ability, *Biol. Trace Elem. Res.*, 47, 327-331, 1995.
- Iacobucci, G.A., Sweeny, J.G. The chemistry of anthocyanins and related flavylum salts, *Tetrahedron*, 39, 3005, 1983.

- Ingram, D., Sanders, K., Kolybaba, M., Lopez, D. Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer, *Lancet*, 350(9083), 990-994, 1997.
- International Food Information Council Foundation: Media Guide on Food Safety and Nutrition: 2004-2006.
- Ioku, K., Tsushida, T., Takei, Y., Nakatani, N., Terao, J. Antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta*, 1234, 99-104, 1995.
- Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T., Yankova, T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants, *J. Ethnopharm.*, 96, 145-150, 2005.
- Janićijević, H.S., Kenić, J., Arsić-Komljenović, G. Antioksidantni potencijal biljke matičina (*Mellitis Melisophyllum*), *Praxis Medica*, 36(3-4), 083-087, 2008.
- Johnson, I.T., Williamson, G.M., Musk, S.R.R. Anticarcinogenic factors in plant foods: a new class of nutrients?, *Nutr. Res. Rev.*, 7, 175-204, 1994.
- Joseph, J.A., Shukitt, -H.B., Denisova, N.A., Prior, R.L., Cao, G., Martin, A., Tagliabue, G., Bickford, P. C. Long-term dietary strawberry, spinach or vitamin E supplementation retards the onset of age related neuronal signal transduction and cognitive behavioural deficits, *J. Neurosci.*, 18, 8047-8055, 1998.
- Joseph, J.A., Shukitt, -H.B., Denisova, N.A., Bielinski, D., Martin, A., McEwen, J.J., Bickford, P.C. Reversals of age related declines in neuronal signal transduction, cognitive and motor behavioural deficits with blueberry spinach or strawberry dietary supplementation, *J. Neurosci.*, 19(18), 8114-8121, 1999.
- Jovanović, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., Simic, M.G. Flavonoids as antioxidants, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 4846-4851, 1994.
- Jurd, L. Some advances in the chemistry of anthocyanins-type plant pigments, U: The Chemistry of Plant Pigments, Chichester, C.O. (Ed.), Academic Press, New York, 123, 1972.
- Kagan, V.E., Serbinova, E.A., Koynova, G.M., Kitanova, S.A., Tyurin, V.A., Stoytchev, T.S., Quinn, P.J., Packer, L. Antioxidant action of ubiquinol homologues with different isoprenoid chain length in biomembranes, *Free Radic. Biol. Med.*, 9, 117-126, 1990.
- Karlson, P. Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 1988.
- Katsube, N., Iwashita, K., Tsushida, T., Yamaki, K., Kobori, M. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins, *J. Agric. Food Chem.*, 51(1), 68-75, 2003.

- Kaur, C., Kapoor, H.C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millenium's health, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 36, 703-725, 2001.
- Kay, C.D., Holub, B.J. The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on postprandial serum antioxidant status in human subjects, *Br. J. Nutr.*, 88, 389-397, 2002.
- Keli, S.O., Hertog, M.G., Feskens, E.J., Kromhout, D. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study, *Arch. Intern. Med.*, 156, 637-642, 1996.
- Key, T.J.A., Allen, N.E., Spencer, E.A., Travis, R.C. The effect of diet on risk of cancer, *Lancet*, 360, 861-868, 2002.
- Khanduja, K.L., Gandhi, R.K., Pathania, V., Syal, N. Prevention of Nnitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice, *Food Chem. Toxicol.*, 37(4), 313-318, 1999.
- Kiel, R.J., Nashelsky, J. Does cranberry juice prevent or treat urinary tract infection?, *The Journal of Family Practice*, 52(2), 154-155, 2003.
- Kim, W.K., Pae, Y.S. Involvement of the N-methyl-d-aspartate receptor and free radical in homocysteine mediated toxicity on rat cerebella granule cells in culture, *Neurosci. Lett.*, 216, 117-120, 1996.
- Kinsella, J.E., Frankel, E., German, B., Kanner, J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods, *Food Technol.*, 47, 85-89, 1993.
- Klebanov, G.I., Teselkin, Y.O., Babenkova, I.V., Lyubitsky, O.B., Rebrova, O.Y., Boldyrev, A.A., Vladimirov, Y.A. Effects of carnosine and its components on free-radical reactions, *Membr. Cell Biol.*, 12, 89-99, 1998.
- Knekt, P., Järvinen, R., Reunanen, A., Maatela, J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study, *BMJ*, 312(7029), 478-481, 1996.
- Knekt, P., Järvinen, R., Seppänen, R., Heliövaara, M., Teppo, L., Pukkala, E., Aromaa, A. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms, *Am. J. Epidemiol.*, 146(3), 223-230, 1997.
- Knekt, P., Isotupa, S., Rissanen, H., Heliövaara, M., Järvinen, R., Häkkinen, S., Aromaa, A., Reunanen, A. Quercetin intake and the incidence of cerebrovascular disease, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 54(5), 415-417, 2000.
- Kolarov, Lj.A. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 1999.

- Kontiokari, T., Sundqvist, K., Nuutinen, M., Pokka, T., Kaskela, M., Uhari, M. Randomised trial of cranberry-lingonberry juice and Lactobacillus GG drink for the prevention of urinary tract infections in women, *Br. Med. J.*, 322, 1571-1573, 2001.
- Kresty, L.A., Morse, M.A., Morgan, C., Carlton, P.S., Lu, J., Gupta, A., Blackwood, M., Stoner, G.D. Chemoprevention of esophageal tumourigenesis by dietary administration of lyophilized black raspberries, *Canc. Res.*, 61, 6112-6119, 2001.
- Kujundžić, S. Biohemijska ispitivanja biljnih vrsta porodice *Apiaceae*, Magistrska teza, Prirodno-matematički fakultet, Institut za hemiju, Novi Sad, 2002.
- Lampe, J.W. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies, *Am. J. Clin. Nutr.*, 70, 475-490, 1999.
- Laplaud, P.M., Lelubre, A., Chapman, M.J. Antioxidant action of *Vaccinium myrtillus* extract on human low density lipoproteins *in vitro*: initial observations, *Fund. Clin. Pharmacol.*, 11(1), 35-40, 1997.
- Larson, A. Naturally occurring antioxidants, Lewis Publishers, New York, 1997.
- Laughton, M.J., Halliwell, B., Evans, P.J., Hoult, J.R.S. Antioxidant and prooxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin, *Biochem. Pharmacol.*, 38, 2859-2865, 1989.
- le Marchand, L., Murphy, S.P., Hankin, J.H., Wilkens, L.R., Kolonel, L.N. Intake of flavonoids and lung cancer, *J. Natl. Cancer Inst.*, 92(2), 154-160, 2000.
- Lea, P.J., Leegod, R.C. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd edition, John Wiley & Sons, Chichester, 1999.
- Lewis, S.E., Boyle, P.M., McKinney, K.A., Young, I.S., Thompson, W. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men, *Fertil. Steril.*, 64, 868-870, 1995.
- Lieberman, M.M., Patterson, G.M.L., Moore, R.E. *In vitro* bioassays for anticancer drug screening: effects of cell concentration and other assay parameters on growth inhibitory activity, *Cancer Lett.*, 173, 21-29, 2001.
- Liebler, D.C., Kling, D.S., Reed, D.J. Antioxidant protection of phospholipid bilayers by alpha-tocopherol. Control of alpha-tocopherol status and lipid peroxidation by ascorbic acid and glutathione, *J. Biol. Chem.*, 261, 12114-12119, 1986.
- Liu, M., Li, X.Q., Weber, C., Lee, C.Y., Brown, J., Liu, R.H. Antioxidant and anti-proliferative activities of raspberries, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2926-2930, 2002.
- Liu, R.H. Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action, *J. Nutr.*, 134, 3479S-3485S, 2004.

- Maccarone, E., Maccarrone, A., Rapisarda, P. Stabilization of Anthocyanins of Blood Orange Fruit Juice, *J. Food Sci.*, 50, 901, 1985.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J. Fruit Phenolics, CRC Press, Boca Raton, FL, 1990.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.*, 79, 727-747, 2004.
- Mapson, L.W. Vitamins in fruits, U: *The Biochemistry of Fruits and their Products*, Hulme, E.C. (Ed.), Academic Press, London, 369-383, 1970.
- Markham, K. R. *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, London, pp. 197-237, 1989.
- Mazzio, E., Soliman, K.F. Pyruvic acid cytoprotection against MPTP, 6-hydroxydopamine and hydrogen peroxide toxicities *in vitro*, *Neurosci. Letts.*, 337, 77-80, 2003.
- Määttä-Riihinen, K.R., Kamal-Eldin, A., Törrönen A.R. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (Family Rosaceae), *J. Agric. Food Chem.*, 52(20), 6178-6187, 2004.
- McGhie, T.K., Ainge, G.D., Barnett, L.E., Cooney, J.M., Jensen, D.J. Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4539-4548, 2003.
- Mercadante, A.Z., Bobbio, F.O. Anthocyanins in Foods: Occurrence and Physicochemical Properties, U: *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*, Socaciu, C. (Ed.), CRC Press, New York, 241, 2008.
- Mertens-Talcott, S.U., Talcott, S.T., Percival, S.S. Low concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis 19 in MOLT-4 human leukemia cells, *J. Nutr.*, 133, 2669-74, 2003.
- Metodiewa, D., Jaiswal, A.K., Cenas, N., Dickançaité, E., Segura-Aguilar, J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product, *Free Radic. Biol. Med.*, 1/2(26), 107-116, 1999.
- Micronutrient Information Center, Linus Pauling Institute, Oregon State University, www.lpi.oregonstate.edu
- Middleton, E.Jr., Kandaswami, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer, U: *The flavonoids: advances in research since 1986*, Harborne, J.B. (Ed.), Chapman and Hall, New York, pp. 619-652, 1993.

- Miller, J.W., Selhub, J., Joseph, J.A. Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autoxidation: Protective effects of O-methylation and melatonin, *Free Radic. Biol. Med.*, 21, 241-249, 1996.
- Mimić-Oka, J., Simić, T., Đukanović, L., Reljić, Z., Davičević, Z. Alteration in plasma antioxidant capacity in various degrees of chronic renal failure, *Clin. Nephrol.*, 51(4), 233-41, 1999.
- Mochizuki, M., Yamazaki, S., Kano, K., Ikeda, T. Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins, *Biochim. Biophys. Acta*, 1569, 35-44, 2002.
- Monties B. Lignins, U: *Methods in Plant Biochemistry*, Dey P.M., Harborne J.B., (Eds.) Academic Press, London, UK, pp. 113–157, 1989.
- Morel, J., Lescoat, G., Cogrel, P., Sergent, O., Padeloup, N., Brissot, P., Cillard, J. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loads rat hepatocyte cultures, *Biochem. Pharmacol.*, 45(1), 13-19, 1993.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63, 1983.
- Moyer, R.A., Hummer, K.E., Finn, C.E., Frei, B., Wrolstad, R.E. Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: *Vaccinium*, *Rubus* and *Ribes*, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 519-525, 2002.
- Mullen, W., Boitier, A., Stewart, A.J., Crozier, A. Flavonoid metabolites in human plasma and urine after consumption of red onions: analysis by liquid chromatography with photodiode array and full scan tandem mass spectrometric detection, *J. Chrom.*, 1058(1-2), 163-168, 2004.
- Mullen, W., McGinn, J., Lean, M.E.J., MacLean, M.R., Gardner, P., Duthie, G.G., Crozier, A. Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5191-5196, 2002.
- Murakami, M., Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T. Effects of ascorbic acid and α -tocopherol on antioxidant activity of polyphenolic compounds, *J. Food Sci.*, 68, 1622-1625, 2003.
- Naczki, M., Shahidi, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 41, 1523–1542, 2006.

- Nakagami, T., Toyomura, K., Kinoshita, T., Morisawa, S. A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: Anti-complement effects of biliverdin and conjugated bilirubin, *Biochem. Biophys. Acta*, 1158, 189-193, 1993.
- Narayanan, B.A., Geoffrey, O., Willingham, M.C., Re, G.G., Nixon, D.W. p53/p21 (WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in 13 ellagic acid treated cancer cells, *Cancer Lett.*, 136, 215-21, 1999.
- Natella, F., Nardini, M., Felice, M.D., Scaccini, C. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1453-1459, 1999.
- Németh, K., Plumb, G.W., Berrin, J.G., Juge, N., Jacob, R., Naim, H.Y., Williamson, G., Swallow, D.M., Kroon, P.A. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans, *Eur. J. Nutr.*, 42, 29-42, 2003.
- Nielsen, I.L.F., Haren, G.R., Magnussen, E.L., Dragsted, L.O., Rasmussen, S.E. Quantification of anthocyanins in commercial black currant juices by simple high-performance liquid chromatography: investigation of their pH stability and antioxidative potency, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 5861, 2003.
- Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E.C., Boelens, P.G., van Norren, K., van Leeuwen, P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am. J. Clin. Nutr.*, 74, 418-425, 2001.
- Niki, E. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals, *Am. J. Clin. Nutr.*, 54, 119S-124S, 1991.
- Nikolić, G., Nikolić, S., Milić, B., Čanadanović-Brunet, J. Primena metode elektronske spinske rezonance za proučavanje antioksidantnih svojstava prirodnih fenolnih jedinjenja, *Acta Fac. Med. Naiss.*, 15 (4), 183-188, 1998.
- Noda, Y., Anzai, K., Morri, A., Klino, M., Shinmei, M., Packer, L. Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES-FR30 ESR spectrometer system, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 42, 35-44, 1997.
- Nohl, H., Gille, L. Evaluation of the antioxidant capacity of ubiquinol and dihydrolipoic acid, *Z. Naturforsch.*, 53, 250-253, 1998.
- Nowell, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations, *Science*, 194, 23-28, 1976.

- Ochiai, M., Nagao, M., Wakabayashi, K., Sigimura, T. Superoxide dismutase acts an enhancing factor for quercetin mutagenesis in rat-liver cytosol by preventing its decomposition, *Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mutagen.*, 129, 19-24, 1978.
- Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T. Antioxidant effects of tannins and related polyphenols, U: Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health. II. Antioxidants and cancer prevention, Huang, M.-T., Ho, C.-T., Lee, C.Y. (Eds.), American Chemical Society Symposium Series, 507, pp. 87-97, American Chemical Society, USA, 1992.
- O'Leary, K.A., Day, A.J., Needs, P.W., Mellon, F.A., O'Brien, N.M., Williamson, G. Metabolism of quercetin-7-and quercetin-3-glucuronides by an *in vitro* hepatic model: the role of human β -glucuronidase, sulfotransferase, catechol-*O*-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism, *Biochem. Pharmacol.*, 65, 479-491, 2003.
- Olson, J.A. Benefits and liabilities of vitamin A and carotenoids, *J. Nutr.*, 126, 1208S-796S, 1996.
- Olsson, M.E., Andersson, S., Werlemark, G., Uggla, M., Gustavsson, K.E. Carotenoids and phenolics in rose hips, *Acta Horticulturae*, 490, 249-25, 2005.
- Orhan, D.D., Hartevioğlu, A., Küpeli, E., Yesilada, E. *In vivo* anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from *Rosa canina* L. fruits, *J. Ethnopharmacol.*, 112, 394-400, 2007.
- Palozza, P. Pro-oxidant actions of carotenoids in biological systems, *Nutr. Rev.*, 56, 257-265, 1998.
- Packer, L. Antioxidant properties of lipoic acid and its therapeutic effects in prevention of diabetes complications and cataracts, *N. Y. Acad. Sci.*, 738, 257-264, 1994.
- Packer, L. *The Antioxidant Miracle*, John Wiley and Sons, New York, 1969.
- Packer, L., Witt, E.H., Trischler, H.J. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant, *Free Radic. Biol. Med.*, 19, 227-250, 1995.
- Paganga, G., Miller, N., Rice-Evans, C.A. The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute?, *Free Rad. Res.*, 30, 153-162, 1999.
- Pietta, P.-G. Flavonoids as antioxidants, *J. Nat. Prod.*, 63, 1035-1042, 2000.
- Pignatelli, P., Pulcinella, F.M., Celestini, A., Lenti, L., Ghiselli, A., Gazzaniga, P.P. The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonising the intracellular production of hydrogen peroxide, *Am. J. Clin. Nutr.*, 72, 1150-1155, 2000.

- Piletić, M.V., Milić, B.Lj., Dilas, S.M. *Organska hemija II deo, Prometej*, Novi Sad, 1992.
- Piskula, M.K., Terao, J. Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues, *J. Nutr.*, 128, 1172-1178, 1998.
- Poei-Langston, M.S., Wrolstad, R.E. Color degradation in an ascorbic acid-anthocyanin-flavonol model system, *J. Food Sci.*, 46, 1218, 1981.
- Pokorny, J. *Autoxidation of Unsaturated Lipids*, Chan, H. (Ed.) Academic Press, London, 141-206, 1987.
- Pokorny, J., Janishlieva, N., Gordon, M. *Antioxidants in food*, Woodhead Publishing Ltd., Abington, England i CRC Press LLC, New York, USA, 2001.
- Pratt, D.E., Birac, P.M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products, *J. Food Sci.*, 44, 1720–1722, 1979.
- Pratt, D.E., Hudson, B.J.F. Natural antioxidants not exploited commercially. U: *Food antioxidants*, Hudson, B.J.F. (Ed.) Science Publishers Ltd, Essex, pp. 171–192, 1990.
- Primiano, T., Egner, P.A., Sutter, T.R., Kelloff, G.J., Roebuck, B.D., Kensler, T.W. Intermittent dosing with oltipraz: relationship between chemoprevention of aflatoxin-induced tumorigenesis and induction of glutathione S-transferases, *Cancer Res.*, 55, 4319-4324, 1995.
- Priyadarsini, K.I., Khopde, S.M., Kumar, S.S., Mohan, H. Free Radical Studies of Ellagic Acid, a natural Phenolic Antioxidant, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2200-2206, 2002.
- Rein, M.J., Heinonen, M. Stability and enhancement of berry juice color, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 3106, 2004.
- Renaud, S., de Lorgeril, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary hearth disease, *Lancet*, 339, 1523-1526, 1992.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. Structure-Antioxidant Activity Relationship of Flavonoids and Phenolic Acids, *Free Radic. Biol. Med.*, 20(7), 933-956, 1996.
- Rice-Evans, C.A., Sampson, J., Bramley, P.M., Holloway, D.E. Why do we expect carotenoids to be antioxidants?, *Free Radic. Res.*, 26, 381-198, 1997.
- Rimm, E.B., Katan, M.B., Ascherio, A., Stampfer, M.J., Willett, W.C. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals, *Ann. Intern. Med.*, 125(5), 384-389, 1996.
- Rosen, G.M., Rauckman, E.J., Finkelstein, E. *Antioxidation in Food and Biological Systems*, Simic, M.S., Karel, M. (Eds.), Plenum Pres, New York, pp. 43-70, 1980.
- Rusznayák, S., Szent-Györgi, A. Vitamin nature of flavones, *Nature*, 139, 798, 1936.

- Salah N., Miller N. J., Paganga G., Tijburg L., Bolwell G. P. and Riceevans C. Polyphenolic Flavonols as Scavengers of Aqueous Phase Radicals and as Chain-Breaking Antioxidants, *Arch. Biochem. Biophys.*, 322(2), 339-346, 1995.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols, *J. Food Sci. Agric.*, 76, 270-276, 1998.
- Scalbert, A., Williamson, G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols in Chocolate: Modern Science Investigates an Ancient Medicine, *Am. Soc. Nut. Sci.*, 2073S-2085S, 2000.
- Scarpa, M., Stevanato, R., Viglino, P., Rigo, A. Superoxide Ion as Active Intermediate in the Autoxidation of Ascorbate by Molecular Oxygen, *J. Biol. Chem.*, 258(11), 6695-6697, 1983.
- Serbinova, E.A., Tsuchiya, M., Goth, S., Kagan, V.E., Packer, L. Antioxidant action of α -tocopherol and α -tocotrienol in membranes, U: *Vitamin E in Health and Disease*. Packer, L., Fuchs, J. (Eds.), Marcel Dekker, Inc. New York, 235-243, 1993.
- Setchell, K.D.R., Cassidy, A. Dietary isoflavones: Biological effects and relevance to health, *J. Nutr.*, 129, 758S-767S, 1999.
- Seyoum, A., Asres, K., Kandeel El-Fiky, F. Structure radical scavenging activity relationships of flavonoids, *Phytochemistry*, 67(18), 2058-2070, 2006.
- Sgarbieri, V.C., Pacheco, M.T.B. Alimentos funcionais fisiológicos, *Braz. J. Food Technol.*, 2, 7-19, 1999.
- Shahidi, F., Janitha, P.K., Wanasundara, P.D. Phenolic Antioxidants, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32, 67, 1992.
- Shahidi, F., Naczk, M. Food phenolics: an overview, U: *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications*, Technomic Publishing Co, Pennsylvania, USA, pp. 1-4, 1995.
- Shrikhande, A.J., Francis, F.J. Effect of flavonols on ascorbic and anthocyanin stability in model systems, *J. Food Sci.*, 39, 904, 1974.
- Shu, X.O., Jin, F., Dai, Q., Wen, W., Potter, J.D., Kushi, L.H. Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women, *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 10, 483-488, 2001.
- Singelton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Meth. Enzymol.*, 299, 152-178, 1999.

- Singelton, V.L., Rossi, J.A.J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144-158, 1965.
- Skibola, C.F., Smith, M.T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake, *Free Radic. Biol. Med.*, 29(3-4), 375-83, 2000.
- Sobota, A.E. Inhibition of bacterial adherence by cranberry juice: potential use for the treatment of urinary tract infections, *J. Urol.*, 131, 1013-1016, 1984.
- Steinmetz, K.A., Potter, J.D. Vegetables, fruit and cancer. I. Epidemiology, *Canc. Causes Contr.*, 2, 325-357, 1991.
- Steinmetz, K.A., Potter, J.D. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review, *J. Am. Diet Assoc.*, 96, 1027-39, 1996.
- Stothers, L. A randomized control trial to evaluate effectiveness and cost effectiveness of naturopathic cranberry products as prophylaxis against urinary tract infection in women, *Can. J. Urol.*, 9(3): 1558-1562, 2002.
- Strack, D. Phenolic metabolism, U: *Plant Biochemistry*, Dey, P.M., Harborne, J.B. (Eds.), Academic Press, New York, pp. 387-437, 1997.
- Strube, M., Dragsted, L.O., Larsen, J.C. Naturally occurring antitumorigens. I. Plant Phenols. *Nordiske Seminar- og Arbejdsrapporter 605*, Nordic Council of Ministers, Copenhagen, Denmark, 1993.
- Stryer, L. *Biochemistry*, Freeman, New York, 1988.
- Suarna, C., Food, R.L., Dean, R.T., Stocker, R. Comparative antioxidant activity of tocotrienols and other natural lipid-soluble antioxidants in a homogenous system, and in rat and human lipoproteins, *Biochem. Biophys. Acta*, 1166, 163-170, 1993.
- Tanchou, S. Recherches sur la fréquence du cancer, *Gazette des hôpitaux*, 6, 1843.
- Terao, J. Antioxidant activity of β -carotene-related carotenoids in solution, *Lipids*, 24, 659-661, 1989.
- Terao, J., Piskula, M., Yao, Q. Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers, *Arch. Biochem. Biophys.*, 308, 278-284, 1994.
- Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables, *J. Sci. Food Agric.*, 81, 853-876, 2001.
- Tsujimoto, Y., Hashizume, H., Yamazaki, M. Superoxide radical scavenging activity of phenolic compounds, *Int. J. Biochem.*, 25, 491-494, 1993.
- Tumbas, V. Antioksidativna aktivnost ekstraktata biljaka iz familije *Lamiaceae*, Magistrski rad, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, 2005.

- Uri, N. Mechanism of antioxidation. U: Autoxidation and Antioxidants, Lundberg, W.O. (Ed.), Wiley, New York, pp. 133-169, 1961.
- Uslovi upotrebe aditiva, deklarisanje i obeležavanje namirnica. Zakonska regulativa. Ministarstvo za unutrašnje ekonomske odnose državne zajednice Srbija i Crna Gora, Beograd, 2004.
- Van Acker, S.A.B.E, van den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., van Benekom, W.P., van der Vijgh, W.J.F., Bast, A., Structural Aspects of Antioxidant Activity of Flavonoids, *Free Rad. Biol. Med.*, 20, 331-342, 1996.
- Vattem, D.A., Ghaedian, R., Shetty, K. Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 14(2), 120-130, 2005.
- Verhaar, M.C., Stroes, E., Rabelink, T.J. Foliates and cardiovascular disease, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 22(1), 6-13, 2002.
- Verma, A.K., Johnson, J.A., Gould, M.N., Tanner, M.A. Inhibition of induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin, *Canc. Res.*, 48, 5754-5758, 1988.
- Vicente, M.L., Empis, J.A., Deighton, W., Glidewell, S.M., Goodman, B.A., Rowlands, C.C. Use of EPR and ENDOR spectroscopy in conjunction with the spin trapping technique to study the high-temperature oxidative degradation of fatty acid methyl esters, *Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2(2), 449-454, 1998.
- Vinson, J.A., Dabbagh, Y.A., Serry, M.M., Jang, J. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2800-2802, 1995.
- Vinson, J.A., Hontz, B.A. Phenol antioxidant index: comparative antioxidant effectiveness of red and white wines, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 401-403.
- Von Elbe, J.H. Stability of betalaines as food colors, *Food Technol.*, 29, 42, 1975.
- Wallace, G., Fry, S. C. Phenolic components of the plant cell wall, *Int. Rev. Cytol.*, 151, 229-267, 1994.
- Wang, H., Cao, G., Prior, R. Oxygen absorbing capacity of anthocyanins, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 304-309, 1997.
- Wattenberg, L.W. Inhibition of carcinogenesis by minor nutrient constituents of the diet, *Proc. Nutr. Soc.*, 49, 173-183, 1990.
- Wattenburg, L.W. Inhibition of carcinogen-induced neoplasia by sodium cyanate, tert-butylisocyanate and benzyl isothiocyanate administered subsequent to carcinogen exposure, *Cancer Res.*, 41, 2991-2994, 1981.

- Wei, H., Bowen, R., Cai, Q., Barnes, S., Wang, Y. Antioxidant and antipromotional effects of soybean isoflavone genistein, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208, 124-130, 1995.
- Weisburger, J.H. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea, *Food Chem. Toxicol.*, 37, 943-948, 1999.
- Weisburger, J.H. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea, *Food Chem. Toxicol.*, 37, 943-948, 1999.
- Wolffram, S., Block, M., Ader, P. Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine, *J. Nutr.*, 132, 630-635, 2002.
- Wolf, R., Wolf, D., Ruocco, V. Vitamin E: The radical protector, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 10, 103-117, 1998.
- Wollenweber E. Flavones and flavonols, U: *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, Harborne, J.B. (Ed.), Chapman & Hall, Cambridge, UK, pp. 259–335, 1994.
- Woodall, A.A., Lee, S.W., Weesie, R.J., Jackson, M.J., Britton, G. Oxidation of the carotenoids by free radicals: Relationship between structure and reactivity, *Biochem. Biophys. Acta*, 1336, 33-42, 1997.
- World Cancer Research Fund. Colon, rectum. *Food Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*, Washington DC, American Institute for Cancer Research, 216-51, 1997.
- World Health Organization. *The World Health Report*, Geneva, WHO, 1997.
- Wrolstad, R.E. Anthocyanins, U: *Natural Food Colorants*, 2nd ed., Hendry, G.F., Houghton, J.D. (Eds.), Marcel Dekker, Basel, 2000, 237.
- Wybraniec, S., Mizrahi, Y. Fruit flesh betacyanin pigments in *Hylocereus cacti*, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6086, 2002.
- Yamagishi, M., Natsume, M., Nagaki, A., Adachi, T., Osakabe, N., Takizawa, T. Anti-mutagenic activity of cacao: inhibitory effect of cacao liquor polyphenols on the mutagenic action of heterocyclic amines, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5074-5078, 2000.
- Yamaguchi, N. Aminocarbonyl reaction. Antioxidant activity of the reactants, eg in biscuits, rice confectionery, sausages and margarine, *Shokuhin-no Hoso*, 20, 41-48, 1988.
- Yang, B., Kotani, A., Arai, K., Kusu, F. Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials, *Ann. Sci.*, 17, 599-604, 2001.

- Yan, X., Murphy, B.T., Hammond, G.B., Vinson, J.A., Neto, C.C. Antioxidant activities and antitumor screening of extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*), *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5844–5849, 2002.
- Yochum, L., Kushi, L.H., Meyer, K., Folsom, A.R. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women, *Am. J. Epidemiol.*, 149(10), 943-949, 1999.
- Yokota, A., Miyata, K., Muraguchi, H., Takahashi, A. Effect of glucose on the antioxidative activity of Maillard reaction products during extrusion cooking, *Nippon No-geikagaku Kaishi*, 61, 1273-1278, 1987.
- Yoshida, M., Sakai, T., Hosokawa, N., Marui, N., Matsumoto, K., Fujioka, A., Nishino, H., Aoike, A. The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells, *FEBS Lett.*, 260, 10-13, 1990.
- Youdim, K.A., Joseph, J.A. A possible role in phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects, *Free Radic. Biol. Med.*, 30(6), 583-594, 2001.
- Youdim, K.A., McDonald, J., Kalt, W., Joseph, J.A. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults, *J. Nutr. Biochem.*, 13, 282-288, 2002.
- Youdim, K.A., Shukitt, -H.B., Martin, A., *et al.* Short term dietary supplementation of blueberry polyphenolics: beneficial effects on aging brain performance and peripheral tissue function, *Nutr. Neurosci.*, 3(6), 383-397, 2000.
- Zhou, A., Sadik, O.A. Comparative Analysis of Quercetin Oxidation by Electrochemical, Enzymatic, Autoxidation, and Free Radical Generation Techniques: A Mechanistic Study, *J. Agric. Food Chem.*, 56(24), 12081-12091, 2008.
- Zhou, K., Yin, J-J., Yu, L. ESR determination of the reactions between selected phenolic acids and free radicals or transition metals, *Food Chem.*, 95, 446-457, 2006.