



mr Slađana M. Stajčić

**VISOKOVREDNA FUNKCIONALNA JEDINJENJA IZ SPOREDNIH
PROIZVODA PRERADE PARADAJZA**

Doktorska disertacija

Novi Sad, 2012.

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: Doktorska disertacija
VR

Autor: mr Slađana M. Stajčić
AU

Mentor: dr Gordana Četković, red. prof., Tehnološki fakultet
MN Univerzitet u Novom Sadu

Naslov rada: Visokovredna funkcionalna jedinjenja iz sporednih proizvoda prerade paradajza
NR

Jezik publikacije: Srpski (latinica)
JP

Jezik izvoda: Srpski/engleski
JI

Zemlja publikovanja: Srbija
ZP

Uže geografsko područje: Vojvodina
UGP

Godina: 2012.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

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

Fizički opis rada: Broj poglavlja 6, str. 167, lit. citata 377, tabela 33, slika 66
FO

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo
NO

Naučna disciplina: Hemija prirodnih proizvoda
ND

Predmetna odrednica/ključne reči: Trop paradajza, antioksidativna aktivnost, antiproliferativna aktivnost, fenolna jedinjenja, karotenoidi, DPPH, hidroksil radikali, superoksid anjon radikali, HPLC, ESR
PO

UDK :

Čuva se: Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu,
ČU 21000 Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1

Važna napomena: Nema
VN

Izvod/abstrakt: Ekstrakcijom heksanom, a zatim 80% etanolom predhodno pripremljenog tropa od odabranih genotipova Bačka, Knjaz, Novosadski niski, O₂, Rutgers i Saint Pierre paradajza, dobijeni su heksanski i etanolni ekstrakti tropa. Sadržaj karotenoida u heksanskim i polifenolnih jedinjenja, flavonoida i askorbinske kiseline u etanolnim ekstraktima određen je spektrofotometrijskim metodama. Identifikacija i kvantifikacija pojedinih karotenoida u heksanskim i polifenolnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima tropa paradajza izvedena je HPLC analizom. U ostacima nakon ekstrakcija tropa paradajza određen je sadržaj prehrambenih vlakana. Spektrofotometrijskim testovima određena je antiradikalska aktivnost na DPPH radikale i redukciona sposobnost dobijenih ekstrakata. ESR spektroskopijom ispitan je uticaj etanolnih ekstrakata na reaktivne hidroksil i superoksid anjon radikale. Pored toga, ispitana je i helirajuća sposobnost etanolnih ekstrakata. Antiradikalsko delovanje na DPPH radikale ostataka nakon ekstrakcija tropa paradajza radikale, takođe je utvrđeno. Ispitana je *in vitro* antiproliferativna aktivnost frakcija ekstrakata, njihovim delovanjem na rast tri histološki različite humane ćelijske linije: MCF-7 (adenokarcinom dojke), HeLa (epitelni karcinom cerviksa) i MRC-5 (fetalni fibroblastni karcinom pluća). Rezultati ispitivanja hemijskog sastava, antioksidativne i antiproliferativne aktivnosti ekstrakata, kao i ostataka nakon ekstrakcija tropa odabranih genotipova paradajza ukazuju na mogućnost iskorišćenja ovog sporednog proizvoda kao potencijalnog izvora prirodnih antioksidanata, koji bi našli primenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

Datum prihvatanja teme od strane Veća katedre: 14.7.2011.g. na XXXI redovnoj sednici NN Veća
DP Univerziteta

Datum odbrane:
DO

Članovi komisije:
(Naučni stepen/Ime i prezime/Zvanje/Fakultet)
KO

Predsednik: dr Jasna Čanadanović-Brunet, redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu
Član: dr Gordana Četković, redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu
Član: dr Anamarija Mandić, naučni saradnik, Institut za prehrambene tehnologije, Novi Sad

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: Monographic publication
DT

Type of record: Textual material, printed
TR

Contents code: PhD Thesis
CC

Author: Slađana M. Stajčić, MSc
AU

Menthor: dr Gordana Ćetković, Prof., Faculty of Technology, Novi Sad
MN

Title: High-valuable functional compounds from tomato by-products
TI

Language of text: Serbian (roman)
LT

Language of abstract: Serbian/English
LA

Country of publication: Serbia
CP

Locality of publication: Vojvodina
LP

Publication year: 2012
PY

Publisher: Author's reprint
PU

Publishing place: Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1
PP

Physical description: Chapters 6, pages 167, references 377, tables 33, pictures 66
PD

Scientific field: Technological engineering
SF

Scientific discipline: Chemistry of natural products
SD

Subject/key words: Tomato pomace, antioxidant activity, antiproliferative activity, phenolic compounds, carotenoids, DPPH, hidroksil radicals, superoxide anion radicals, HPLC, ESR
SX

UDK:

Holding data: Faculty of Technology (library),
HD 21000 Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1

Note: None
N

Abstract: Tomato pomaces obtained from selected tomato genotypes (Bačka, Knjaz, Novosadski niski, O₂, Rutgers and Saint Pierre) were extracted sequentially with hexane and 80% ethanol. The content of carotenoids in hexane and total polyphenolics, flavonoids and ascorbic acid in ethanolic extracts was determined by spectrophotometric methods. Identification and quantification of individual carotenoids in hexane and polyphenolics in ethanolic extracts was determined by HPLC analysis. The content of dietary fiber was determined in the residues after extraction of tomato pomaces. The scavenging activity on DPPH radicals and reducing power of the obtained extracts were determined spectrophotometrically. The influence of ethanolic extracts on reactive hydroxyl and superoxide anion radicals was examined by electron spin resonance (ESR) spectroscopy. In addition, the chelating ability of ethanolic extracts was investigated. Scavenging effect on DPPH radicals of the residue after extraction of tomato pomace, has also been established. Antiproliferative activity of investigated extracts was determined *in vitro*, testing their influence on the growth of three histologically different human cell lines: MCF-7 (breast adenocarcinoma), HeLa (cervix epithelioid carcinoma) and MRC-5 (fetal lung). Based on the results of chemical analysis, significant antioxidant and antiproliferative activity of the tomato waste extracts, as well as residues after extraction showed that tomato waste obtained from different tomato genotypes should be regarded as potential source of natural antioxidants, which can be used for various purposes in the food, pharmaceutical and cosmetic industry.

Accepted by the Scientific Board on: July 14th, 2011.
ASB

Defended on:
DE

Thesis defend board:
(Degree/Names/Surname/Title/Faculty)
DB

President: dr Jasna Čanadanović-Brunet, Professor, Faculty of Technology, Novi Sad
Member: dr Gordana Četković, Professor, Faculty of Technology, Novi Sad
Member: dr Anamarija Mandić, Institute of Food Technology, Novi Sad

SADRŽAJ

UVOD	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1. Prooksidanti i antioksidanti.....	3
2.1.1. Prooksidativne vrste u humanom organizmu.....	3
2.1.1.1. Oksidativna oštećenja primarnih biomolekula.....	5
2.1.1.2. Oksidativni stres i oboljenja.....	7
2.1.2. Antioksidanti u humanom organizmu.....	11
2.2. Funkcionalna jedinjenja.....	16
2.3. Polifenolna jedinjenja.....	19
2.3.1. Mehanizmi delovanja polifenolnih jedinjenja.....	23
2.3.1.1. Nespecifični mehanizmi delovanja polifenolnih jedinjenja.....	23
2.3.1.2. Specifični mehanizmi delovanja polifenola.....	28
2.3.1.3. Polifenoli i kancerogeneza.....	29
2.3.2. Polifenolna jedinjenja iz sporednih proizvoda prehrambene industrije.....	31
2.4. Karotenoidi.....	32
2.4.1. Mehanizmi delovanja karotenoida	34
2.5. Vitamin C.....	41
2.6. Prehrambena vlakna.....	43
2.6.1. Prehrambena vlakna iz sporednih proizvoda prehrambene industrije.....	44
2.7. Paradajz.....	46
2.7.1. Botaničke karakteristike.....	47
2.7.2. Hemijski sastav.....	48
2.7.3. Antioksidativne i antiproliferativne osobine paradajza i proizvoda od paradajza.....	50
2.7.4. Tehnološki postupci prerade paradajza.....	55
2.7.4.1. Sporedni proizvodi prerade paradajza kao izvori funkcionalnih jedinjenja....	56
3. EKSPERIMENTALNI DEO	58
3.1. Dobijanje tropa od odabranih genotipova paradajza.....	59
3.2. Priprema ekstrakata tropa paradajza.....	59
3.3. Spektrofotometrijska određivanja sadržaja antioksidanata u ekstraktima tropa paradajza.....	60
3.3.1. Određivanje sadržaja karotenoida u lipofilnim ekstraktima.....	60
3.3.2. Određivanje sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja u hidrofilnim ekstraktima.....	61
3.3.3. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u hidrofilnim ekstraktima.....	62
3.3.4. Određivanje sadržaja askorbinske kiseline u hidrofilnim ekstraktima.....	64
3.4. HPLC analiza antioksidativnih jedinjenja u ekstraktima tropa paradajza.....	66
3.4.1. HPLC određivanje sadržaja likopena i β -karotena u lipofilnim ekstraktima	66
3.4.2. HPLC određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja u hidrofilnim ekstraktima.....	68
3.5. Određivanje sadržaja ukupnih, rastvorljivih i nerastvorljivih prehrambenih vlakana u ostacima.....	69

3.6. Određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata tropa paradajza.....	70
3.6.1. Određivanje antiradikalne aktivnosti heksanskih/etanolnih ekstrakata i nerastvorljivih ostataka na DPPH radikale spektrofotometrijskom metodom.....	72
3.6.2. Kinetička ispitivanja reakcije DPPH radikala i heksanskih/etanolnih ekstrakata.....	73
3.6.3. Određivanje redukcijske sposobnosti heksanskih i etanolnih ekstrakata.....	74
3.6.4. Određivanje helirajuće aktivnosti etanolnih ekstrakata.....	75
3.6.5. ESR spektralna analiza uticaja etanolnih ekstrakata tropa paradajza na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala.....	76
3.6.6. ESR spektralna analiza uticaja etanolnih ekstrakata tropa paradajza na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala.....	77
3.7. Određivanje antiproliferativne aktivnosti ekstrakata tropa paradajza.....	78
3.7.1. Fotometrijska metoda za određivanje antiproliferativne aktivnosti ekstrakata tropa paradajza.....	79
3.8. Određivanje indeksa bioaktivnosti.....	80
3.9. Statistička obrada podataka.....	81
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	82
4.1. Dobijanje tropa i ekstrakata tropa od odabranih genotipova paradajza.....	84
4.2. Hemijski sastav ekstrakata i ostataka nakon ekstrakcija tropa paradajza.....	85
4.2.1. Sadržaj lipofilnih antioksidativnih jedinjenja	85
4.2.2. Sadržaj hidrofilnih antioksidativnih jedinjenja.....	89
4.2.3. Sadržaj ukupnih, rastvorljivih i nerastvorljivih prehrambenih vlakana u ostacima nakon ekstrakcija tropa odabranih genotipova paradajza.....	101
4.3. Antioksidativna aktivnost tropa paradajza.....	103
4.3.1. Antioksidativna aktivnost lipofilnih ekstrakata tropa paradajza.....	103
4.3.2. Antioksidativna aktivnost hidrofilnih ekstrakata tropa paradajza.....	110
4.3.3. Antioksidativna aktivnost ostataka nakon ekstrakcija tropa odabranih genotipova paradajza.....	124
4.4. Antiproliferativna aktivnost ekstrakata tropa paradajza.....	126
4.4.1. Antiproliferativna aktivnost lipofilnih ekstrakata.....	126
4.4.2. Antiproliferativna aktivnost hidrofilnih ekstrakata	129
4.5. Korelaciona analiza sadržaja bioaktivnih jedinjenja i antioksidativne/antiproliferativne aktivnosti.....	132
4.6. Indeksi bioaktivnosti heksanskih i etanolnih ekstrakata tropa odabranih genotipova paradajza.....	135
5. ZAKLJUČAK.....	137
6. LITERATURA.....	141

1. UVOD

Danas se od hrane očekuje da zadovolji fiziološke potrebe i da smanji rizik od nastanka hroničnih bolesti, kao što su kardiovaskularne bolesti, dijabetes, kancer i dr, i tako doprinese zdravlju pojedinca. Zato su različite tradicionalne prehrambene tehnologije unapređene, a takođe su razvijene i nove tehnologije, sa ciljem proizvodnje hrane bogate visokovrednim funkcionalnim jedinjenjima. Funkcionalna jedinjenja koja su pokazala brojne pozitivne zdravstvene efekte, različita su po hemijskoj strukturi, tako da se u njih ubrajaju: karotenoidi, prehrambena vlakana, polifenoli (flavonoidi i fenolne kiseline), masne kiseline, izotiocianati, biljni steroli, prebiotici i probiotici, fitoestrogeni, proteini iz soje, vitamini i minerali.

Funkcionalna jedinjenja poseduju različite biološke aktivnosti od kojih je veoma značajna njihova sposobnost stabilizacije i transformacije toksičnih slobodnih radikala, čime se sprečavaju oksidativna oštećenja biomolekula. Ova jedinjenja mogu imati značajnu ulogu i u prehrambenoj tehnologiji, jer sprečavaju ili usporavaju reakciju lipidne peroksidacije, koja je uzročnik kvarenja prehrambenih proizvoda. U cilju sprečavanja ovog procesa tokom proizvodnje i skladištenja ovih proizvoda neophodan im je dodatak antioksidanata. S obzirom na povećane zahteve potrošača za konzumiranjem zdravstveno-bezbedne hrane, u poslednje vreme sintetički antioksidanti se sve više zamenjuju prirodnim.

Sporadni proizvodi prerade voća i povrća predstavljaju značajan izvor antioksidanata i drugih funkcionalnih jedinjenja. U zavisnosti od dostupnosti adekvatne tehnologije i ekonomske isplativosti, sporadni proizvodi se mogu konvertovati u komercijalne proizvode.

Paradajz (*Lycopersicon esculentum* Mill.) je jedna od najrasprostranjenijih vrsta povrća, koja se konzumira kao sveža ili u obliku različitih proizvoda. Pored značajnog sadržaja proteina, masti, ugljenih hidrata i vlakana, paradajz sadrži i mineralne sastojke (gvožđe, kalijum, kalcijum i magnezijum), a od antioksidativnih jedinjenja: vitamin C, E i A, likopen, β -karoten, flavonoide (naringenin-halkon, rutin, kemferol i luteolin), fenolne kiseline (kafena, ferulna, hlorogenska i *p*-kumarinska). Prilikom industrijske prerade paradajza nastaje značajna količina troša, koji se sastoji od ljuske, semena i dela mesa, a sadrži dragocena visokovredna jedinjenja: prehrambena vlakna (59,03%), šećere (25,73%), pektine (7,55%), proteine (19,27%), masti (5,85%), minerale (3,92%) i antioksidante (polifenolna jedinjenja, likopen i dr.). Troš paradajza, s obzirom da se njegove značajne količine generišu pri procesu prerade paradajza u sok, kao i zbog činjenice da sadrži različita funkcionalna jedinjenja, predstavlja veoma važan izvor sa aspekta iskorišćenja.

Predmet ovog istraživanja je trop, sporedni proizvod pri proizvodnji soka od paradajza odabranih genotipova (Bačka, Knjaz, Novosadski niski, O₂, Rutgers i Saint Pierre) paradajza. U cilju ispitivanja sastava funkcionalnih jedinjenja i bioaktivnosti tropa paradajza, rad na izvođenju ove doktorske disertacije podeljen je u sledeće faze istraživanja:

- dobijanje tropa od odabranih genotipova paradajza;
- ekstrakcija tropa paradajza heksanom, a zatim 80% etanolom;
- spektrofotometrijsko određivanje sadržaja hidrofилnih antioksidanata - polifenolnih jedinjenja, flavonoida i askorbinske kiseline u etanolnim ekstraktima, i karotenoida u heksanskim ekstraktima tropa paradajza;
- identifikacija i kvantifikacija polifenolnih jedinjenja u etanolnim i karotenoida u heksanskim ekstraktima određiće se HPLC-DAD analizom;
- određivanje sadržaja ukupnih, rastvorljivih i nerastvorljivih prehrambenih vlakana enzimsko-gravimetrijskom metodom u ostatku nakon ekstrakcije heksanom i 80% etanolom;
- spektrofotometrijsko ispitivanje uticaja različitih koncentracija heksanskih ekstrakata tropa paradajza na stabilne 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikale, kao i njihove redukcionne sposobnosti;
- spektrofotometrijsko ispitivanje uticaja različitih koncentracija etanolnih ekstrakata tropa paradajza na DPPH radikale, kao i njihove redukcionne sposobnosti i helirajuće aktivnosti;
- ispitivanje uticaja različitih koncentracija etanolnih ekstrakata tropa paradajza na reaktivne hidroksil ($\cdot\text{OH}$) i superoksid anjon ($\text{O}_2^{\cdot-}$) radikale elektron spin rezonantnom (ESR) spektrometrijom;
- spektrofotometrijsko ispitivanje antiradikalne aktivnosti na DPPH radikale ostataka nakon ekstrakcije heksanom i 80% etanolom tropa paradajza;
- ispitivanje antiproliferativne aktivnosti ekstrakata tropa paradajza na odabrane humane ćelijske linije kolorimetrijskom metodom;
- korelaciona analiza sadržaja bioaktivnih jedinjenja i antioksidativne/antiproliferativne aktivnosti;
- određivanje indeksa bioaktivnosti heksanskih i etanolnih ekstrakata tropa paradajza.

2. OPŠTI DEO

2.1. Prooksidanti i antioksidanti

Prooksidanti su različite hemijske vrste koje u biološkim i hemijskim sistemima uzrokuju ili ubrzavaju reakcije oksidacije. Reaktivne prooksidativne vrste se dele na slobodnoradikalske (slobodni radikali) i neradikalske vrste (oksidaciona sredstava koja lako prelaze u slobodne radikale). Slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli, koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi. Nesporeni elektroni su uzrok njihove visoke i neselektivne reaktivnosti i nestabilnosti. Slobodni radikali mogu biti i pozitivno (radikal katjon) i negativno (radikal anjon) naelektrisani. Nesporeni elektron može se nalaziti na atomima različitih elemenata, pa se tako slobodni radikali dele na slobodne radikale (odnosno reaktivne slobodnoradikalske vrste) kiseonika, azota, hlora itd (Hermes-Lima, 2005).

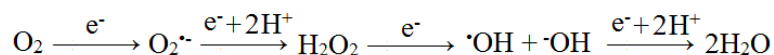
Najšire prihvaćenu definiciju bioloških antioksidanata dao je Halliwell (1990): antioksidanti su supstance koje prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat (biomolekul) koji se oksiduje, značajno usporavaju ili sprečavaju oksidaciju tog supstrata. Takođe, antioksidanti se pojednostavljeno mogu definisati kao supstance koje odlažu, sprečavaju ili otklanjaju oksidativna oštećenja ciljnih biomolekula kao što su proteini, lipidi i DNK (Halliwell i Gutteridge, 2007).

2.1.1. Prooksidativne vrste u humanom organizmu

Od prooksidativnih vrsta u humanom organizmu najznačajnije su reaktivne vrste kiseonika (*eng. reactive oxygen species - ROS*) i azota (*eng. reactive nitrogen species - RNS*) (Wiseman i Halliwell, 1996; Hermes-Lima, 2005). U ROS se ubrajaju slobodni radikali kiseonika: superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikal ($\bullet OH$), hidroperoksil radikal (HO_2^{\bullet}), peroksil radikal (RO_2^{\bullet}) i alkoksil radikal (RO^{\bullet}), kao i neradiaklske vrste: vodonik peroksid (H_2O_2), hipohlorasta kiselina ($HClO$), ozon (O_3), singletni kiseonik ($^1\Delta g O_2$), peroksinitrit ($ONOO^{\bullet}$), itd. RNS obuhvataju slobodne radikale azota: azotmonoksidni radikal (NO^{\bullet}) i azotdioksidni radikal (NO_2^{\bullet}), kao i neradiaklske vrste: azotasta kiselina (HNO_2), nitrozo katjon (NO^+), nitroksidni anjon (NO^-), peroksinitrit ($ONOO^{\bullet}$), azot(IV)-oksid (N_2O_4), azot(III)-oksid (N_2O_3), itd (Wiseman i Halliwell, 1996; Halliwell i Whiteman, 2004; Hermes-Lima, 2005). ROS i RNS nastaju tokom normalnog ćelijskog metabolizma i mogu imati i korisno i štetno delovanje u organizmu (Valko i sar., 2004).

Nastajanje reaktivnih vrsta kiseonika u biološkim sistemima može biti indukovano različitim endogenim (poremećaj u transportnom sistemu elektrona u respiratornom lancu mitohondrija, fagocitoza, smanjenje delovanja enzimskih antioksidativnih sistema zaštite, smanjenje nivoa antioksidanata, destrukcija antioksidanata, itd) i egzogenim (jonizujuće zračenje, veća dostupnost prelaznih metala, sporedno delovanje lekova i otrovnih agenasa, dostupnost i povećanje koncentracije kiseonika, itd) faktorima (Mimić-Oka i sar., 1999).

Preko 90% kiseonika iz vazduha se u organizmu sisara redukuje do vode primanjem četiri elektrona od transportnog sistema elektrona u respiratornom lancu mitohondrija. U toku procesa redukcije molekuskog kiseonika, koji se odigrava kod procesa disanja ćelije, kiseonik se primanjem jednog elektrona prevodi u superoksid anjon radikal, primanjem dva elektrona u vodonik peroksid, primanjem tri elektrona u hidroksil radikal, a četiri u vodu:



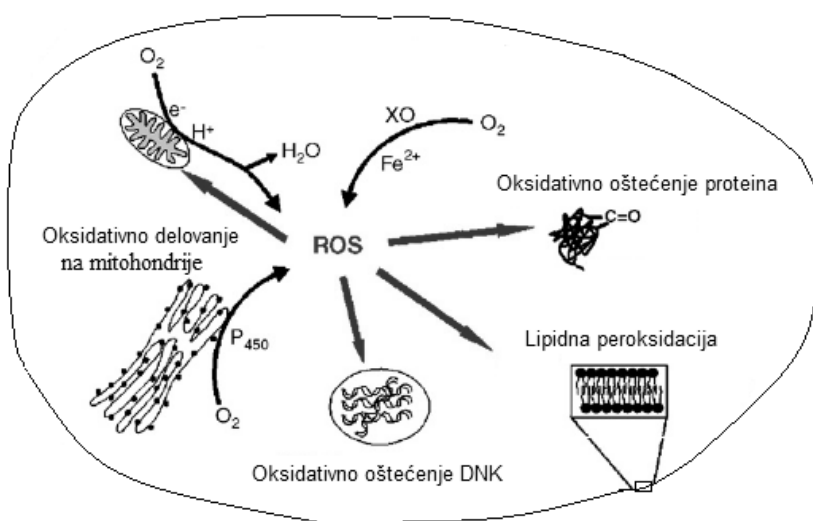
Molekulski kiseonik se u ovom sistemu troši na dobijanje vode, a sukcesivno oslobođena energija u toku transporta elektrona koristi se za dobijanje elektrohemijjskog potencijala i sintezu adenozin-trifosfata (ATP) (Đorđević i sar., 2000).

Od unetog O_2 u mitohondrije oko 2% se transformiše u superoksid anjon radikal, koji nije jak oksidant, ali je prekursor drugih reaktivnih prooksidativnih vrsta (Valdez i sar., 2000; Nordberg i Arnér, 2001). Reakcijom $\text{O}_2^{\bullet -}$ i azotmonoksidnog radikala, koji nastaje transformacijom oko 0,5% unetog kiseonika, nastaje izuzetno citotoksičan peroksinitrit (Valdez i sar., 2000; Beckman i Koppenol, 1996; Nordberg i Arnér, 2001). Takođe, superoksid anjon radikal je u fiziološkim uslovima prekursor vodonik peroksida. Iako je vodonik peroksid najmanje reaktivna kiseonična vrsta, veoma je štetan, jer lako prelazi u hidroksil radikal (Lee i sar., 2004). Hidroksil radikal je najreaktivniji od svih ROS i najodgovorniji je za citotoksične efekte kiseonika. U ćelijama se hidroksil radikal stvara kada postoje uslovi za Haber-Vajsovu ili Fentonovu reakciju. Takođe, ovaj radikal pored troelektronskom redukcijom iz molekuskog kiseonika u respiratornom lancu mitohondrija, nastaje u procesu fagocitoze, kao i iz hipohloraste kiseline (Mimić-Oka i sar., 1999; Lee i sar., 2004; Đorđević i sar., 2000).

Osim u respiratornom lancu mitohondrija, superoksid anjon radikal, vodonik peroksid i hidroksil radikal se generišu u citosolu. U citosolu se superoksid anjon radikal proizvodi pod dejstvom enzima koji sadrže flavin. Superoksid anjon radikal se, spontano ili delovanjem superoksid dismutaze, transformiše na molekulski kiseonik i vodonik peroksid. Vodonik peroksid se delovanjem različitih

enzimskih sistema metaboliše do molekuskog kiseonika i vode ili se, u prisustvu jona prelaznih metala (Fe^{2+} , Cu^+), konvertuje u hidroksil radikal (Nordberg i Arnér, 2001).

Pri niskim ili umerenim koncentracijama neki slobodni radikali imaju važne fiziološke uloge *in vivo*, kao što je odbrana od infektivnih agenasa u procesu fagocitoze, proizvodnja energije, rast ćelija, funkcije u različitim ćelijskim signalnim sistemima itd (Poli i sar., 2004; Sen i sar., 2010). U toku fagocitoze, u procesu tzv. oksidativnog praska (*eng. oxidative burst*), u fagocitnim ćelijama dolazi do intenzivne produkcije ROS, kao odgovor imunog sistema na prisustvo patogena (bakterija i virusa) (Đorđević i sar., 2000). U sredini u kojoj postoji inflamatorni proces, aktivirani neutrofil i makrofagi proizvode značajne količine superoksid anjon radikala i drugih ROS (Keisari i sar., 1983), kao i singletni kiseonik (Valko i sar., 2007). Najznačajniji izvori ROS u ćeliji i njihovi ciljni biomolekuli (proteini, lipidi i DNK) prikazani su na slici 1 (Barber i sar., 2006).

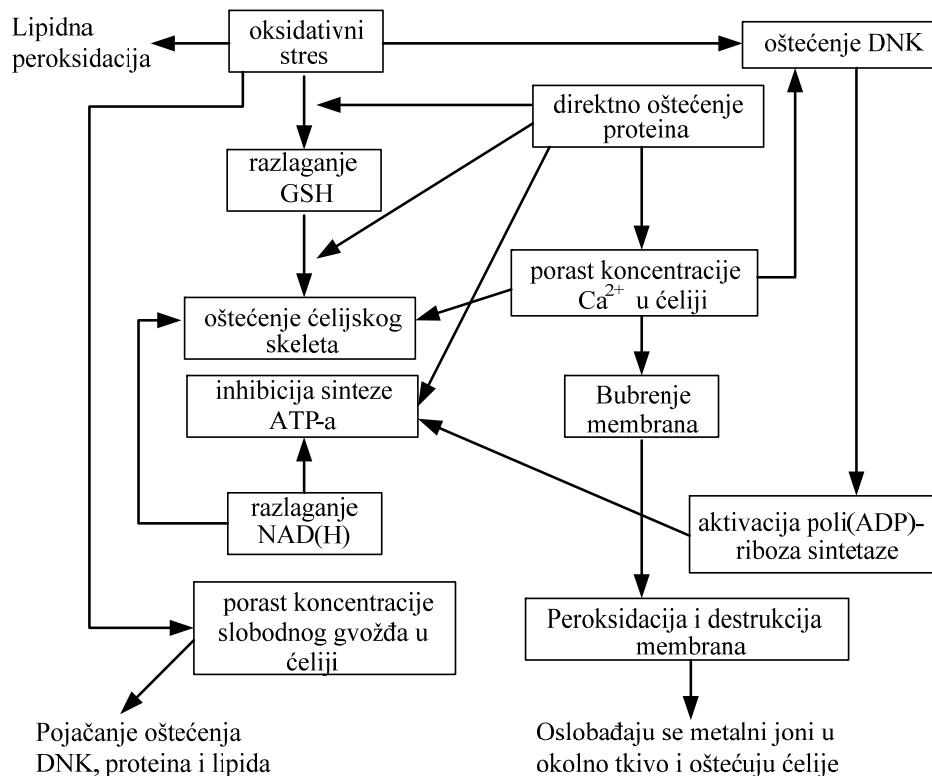


Slika 1. Najznačajniji izvori ROS u ćeliji i njihovi ciljni biomolekuli (proteini, lipidi i DNK); ROS se generišu u toku oksidativne fosforilacije u mitohondrijama, oksidativnim enzimima kao što su enzimi citohroma P450 u endoplazmatičnom retikulumu i u prisustvu ksantin oksidaze (*eng. xanthine oxidase - XO*) i redukovanih metalnih jona u citosolu

2.1.1.1. Oksidativna oštećenja primarnih biomolekula

Svi molekuli prisutni u humanom organizmu mogu biti izloženi delovanju prooksidativnih vrsta. U normalnim uslovima, nastajanje slobodnih radikala je u ravnoteži sa antioksidativnim sistemom odbrane u svakoj ćeliji, odnosno u celom organizmu. Disbalans ovog ravnotežnog stanja, stanje u kome je ravnoteža između oksidanata (ROS/RNS) i antioksidanata u ćeliji pomerena prema

oksidantima (tj. prisustvo visokih koncentracija slobodnih radikala), dovodi do - oksidativnog stresa. U stanju oksidativnog stresa delovanjem slobodnih radikala mogu nastati oksidativna oštećenja primarnih biomolekula, što može da uzrokuje čitav niz poremećaja u metabolizmu, disfunkciju i smrt ćelije (slika 2).



Slika 2. Mehanizam oštećenja ćelije prooksidativnim vrstama

Nekontrolisana produkcija prooksidativnih vrsta oštećuje većinu važnih biomolekula i dovodi do:

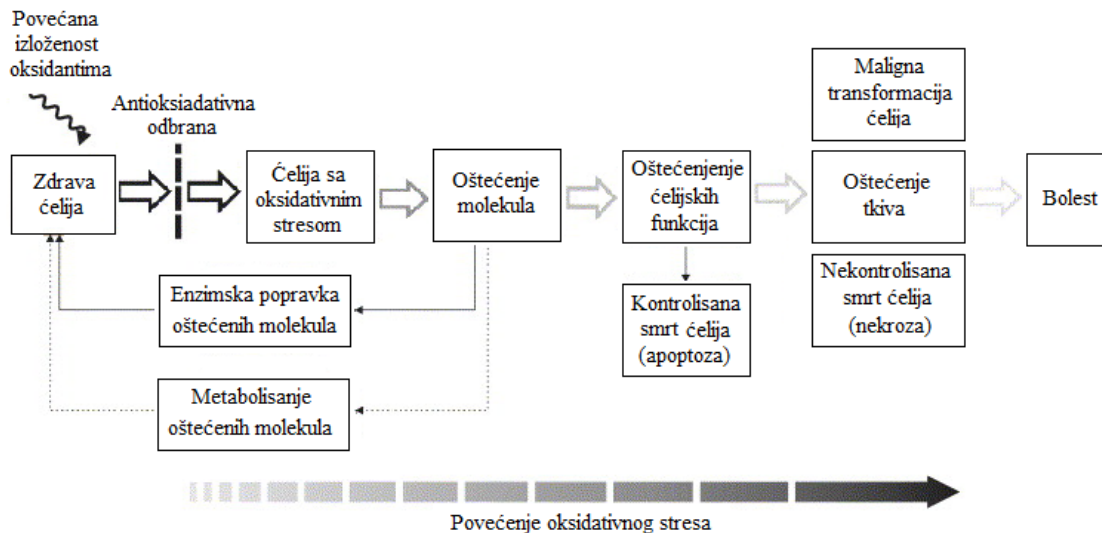
- *Oksidacije lipida* - lančana reakcija, koja dovodi do oštećenja ćelijske membrane menjanjem fluidnosti, permeabilnosti ili integriteta (Nigam i Schewe, 2000; Catalá, 2009);
- *Oksidacije DNK* - oksidativnom degeneracijom DNK dolazi do prekida jednog ili oba lanca, unakrsnog povezivanja, modifikacije 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 (Hosseinian, 2006; Rees i sar., 2008);

- *Oksidacije ugljenih hidrata* - reakcija se odvija izdvajanjem atoma vodonika, raskidanjem C-H veza, preko formiranih α -hidroksialkil i peroksil radikala, pri čemu nastaju vodonikperoksid i karbonilna jedinjenja (Rees i sar., 2008).

2.1.1.2. Oksidativni stres i oboljenja

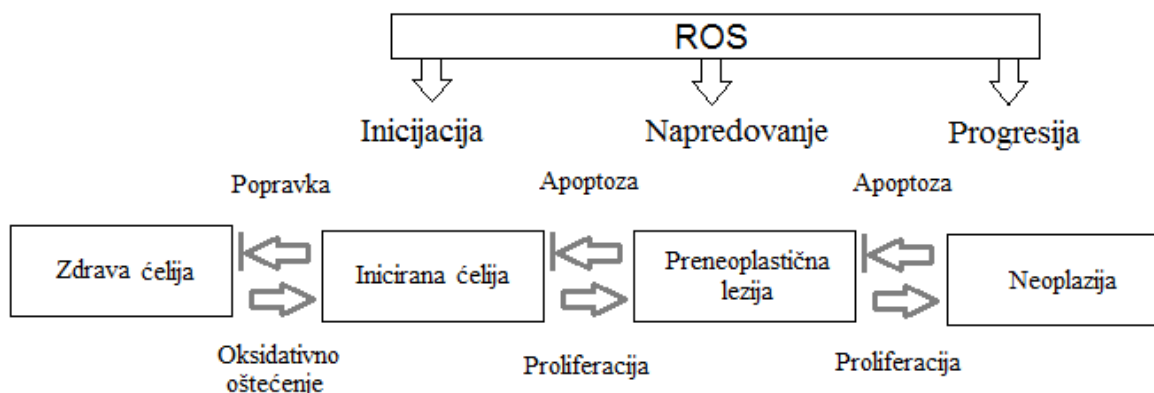
Oksidativni stres ima značajnu ulogu kod nastanka mnogih oboljenja, kao što su kardiovaskularne bolesti, kancer, neurološke bolesti, dijabetes, astma, artritis, gastritis, dermatitis, bolesti jetre, bubrega, zapaljenski procesi, Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest itd (Dalle-Donne i sar., 2006; Dhalla i sar., 2000, Jenner, 2003; Sayre i sar., 2001). Bolesti kod kojih oksidativni stres ima značajnu ulogu mogu se svrstati u dve grupe: (I) prvu grupu čine bolesti koje karakteriše prooksidativna promena tiol/disulfid redoks stanja (npr. 2GSH/GSSG), odnosno koje utiču na toleranciju prema nivou glukoze - takozvana stanja izazvana "mitohondrijskim oksidativnim stresom" (kancer i dijabetes), (II) drugu grupu čine bolesti koje karakterišu "upalna - inflamatorna oksidativna stanja" i povećana aktivnost NAD(P)H oksidaza (što dovodi do ateroskleroze i hroničnih upalnih procesa) ili ksantin oksidazom indukovano formiranje ROS (kod ishemijsko-reperfuzionog oštećenja) (Valko i sar., 2007).

U zavisnosti od stepena narušenog prooksidantnog/antioksidantnog balansa u ćeliji može doći do različitog odgovora ćelije kao što su: fiziološki odgovor ćelije, adaptacija ćelije na oksidativni stres, kancerogenih efekata, pokretanja apoptoze ili iniciranja nekroze (Pavlović i sar., 2002a). Oksidativni stres u početku može biti suzbijen delovanjem antioksidanata. Oštećeni molekuli mogu biti ili regenerisani ili razgrađeni putem metaboličkih procesa, ali isto tako oksidativna oštećenja molekula mogu dovesti i do apoptoze ćelije. Kada oksidativno oštećenje prevazilazi kapacitet odbrambenih mehanizama, dolazi do oksidativnih oštećenja tkiva, maligne transformacije ćelija ili nekroze, kao i do nastanka oboljenja (slika 3) (Lykkesfeldt i Svendsen, 2007).



Slika 3. Odbrana ćelija od oštećenja izazvanih oksidativnim stresom

Terminom kancer obuhvaćen je veliki broj oboljenja kojima je zajednička karakteristika nekontrolisana deoba ćelija. U kontrolu ćelijskog ciklusa uključeni su brojni mehanizmi, kao što je regulacija ciklin zavisnih kinaza (*eng. cyclin-dependent kinases - CDK*) ciklinima, CDK inhibitorima i fosforilacijom, kojima se obezbeđuje ispravna deoba ćelije (Vermeulen i sar., 2003). Ćelijski ciklus sastoji se iz mitoze (M) (proces podele jezgra - kariokineza) sa citokinezom (proces deobe citolazme) i interfaze tj. međufaze između dve faze M. Faze mitoze su profaza, metafaza, anafaza i telofaza. Ćelije koje su u interfazi se uvećavaju, a sama interfaza obuhvata G_1 , S i G_2 faze. Replikacija DNK odvija se u određenom delu interfaze, koja se naziva S faza. Fazi S prethodi G_1 faza, kada se ćelija priprema za sintezu DNK, a sledi je G_2 faza, tokom koje se ćelija priprema za mitozu, pa se ćelijski ciklus prema tome sastoji iz G_1 , S, G_2 i M faze. Ćelije u G_1 fazi mogu, pre izvođenja replikacije DNK, ući u fazu mirovanja G_0 . Ćelije u G_0 fazi predstavljaju osnovni deo nerastućih, neproliferirajućih ćelija u humanom organizmu (Vermeulen i sar., 2003). U stanju mirovanja normalne ćelije (G_0 faza), intracelularni signalni proteini i geni (koje aktiviraju ekstracelularni faktori rasta) nisu aktivni. Kada se normalna ćelija stimuliše ekstracelularnim faktorom rasta, signalni proteini i geni (signalne transdukcione kaskade) postaju aktivni i dolazi do ćelijske proliferacije, odnosno reprodukcije (Alberts i sar., 1998). Kod kancera, dešavaju se promene u genetički kontrolisanoj deobi ćelije, koje dovode do prekomerne proliferacije ćelija. Proces kancerogeneze sastoji se od tri faze: inicijacije, napredovanja i progresije (slika 4) (Loft i Poulsen, 1996; Klaunig i sar., 2011).



Slika 4. Proces kancerogeneze

Inicijacija predstavlja ranu fazu karcinogeneze (Pavlović i sar., 2002b). U ovoj fazi oksidativno oštećenje DNK (npr. 8-hydroxyguanine; 8-OH-G) može dovesti do mutagenih efekata i formiranja inicirane ćelije (Klaunig i sar., 2011; Wiseman i Halliwell, 1996). Ukoliko su ćelije koje se dele oštećene, može doći i do prekida njihovih ćelijskih ciklusa u fazi G_1 , S i G_2 ("kontrolne tačke"), popravke oštećenja i nastavka deljenja (Loft i Poulsen, 1996). Proces inicijacije se nastavlja kroz oksidativnim stresom-indukovane Ca(II) izmene koje dovode do povećanja intracelularnog slobodnog kalcijuma kao rezultat oslobađanja "pohranjenog" intracelularnog Ca(II) i "ulaskom" ekstracelularnog Ca(II) (Dreher i Junod, 1996; Valko i sar., 2006).

Fazu napredovanja karakteriše klonsko širenje iniciranih ćelija, indukcijom proliferacije ćelija i/ili inhibicijom programirane ćelijske smrti (apoptoze). Dok je visok nivo oksidativnog stresa citotoksičan za ćelije i zaustavlja proliferaciju indukcijom apoptoze ili nekroze, nizak nivo oksidativnog stresa zapravo može stimulisati ćelijsku deobu u fazi napredovanja i na takav način stimulisati rast tumora (Dreher i Junod, 1996; Valko i sar., 2006).

Progresija je treća, završna faza kancerogenih procesa (Klaunig i Kamendulis, 2004). Ova faza je nepovratana, a karakteriše je akumulacija dodatnih genetskih oštećenja, koje dovodi do transformacija ćelije iz benignog u maligna stanja. Važana faza u rastu tumora je angiogeneza (generisanje nove vaskularizacije za ishranu malignih ćelija) (Carmeliet, 2000; Valko i sar., 2006). U ovoj fazi metaloproteaze (*eng. matrix metalloproteinases - MMP*) imaju značajnu ulogu (Galis i Khatri, 2002; Valko i sar., 2007).

Oksidativni stres ima važnu ulogu u sve tri faze procesa kancerogeneze. Tokom faze inicijacije, ROS može izazvati oštećenje DNK i strukturne promene u DNK (Reuter i sar., 2010; Klaunig i sar., 1998). Nastalo oksidativno oštećenje i izmene DNK baza mogu dovesti do mutacija, koje mogu imati za posledicu aktiviranje onkogeni i inaktiviranje tumor supresorskih gena, i tako potencijalno dovesti do pokretanja karcinogeneze (Toyokuni, 2006; Klaunig i sar., 2011). U fazi napredovanja, ROS može doprineti prekomernoj ekspresiji gena i blokiranju međucelijske komunikacije (kao što je npr. GJC - *eng. gap junctional communication*) i modifikacije u sistemu sekundarnih glasnika, što za posledicu može imati povećanje proliferacije ili smanjenje apoptoze u iniciranoj ćelijskoj populaciji (Reuter i sar., 2010; Klaunig i sar., 1998). S obzirom da su slobodni radikali i njihovi metaboliti uključeni u kompleksnu mrežu različitih signalnih puteva, oni najverovatnije funkcionišu kao intracelularni i intercelularni posrednici pri čemu transformišu inicijalni signal (stimulaciju receptora) u biohemijski odgovor ćelije. Njihove osnovne karakteristike (veoma mali, visoko reaktivni i/ili difuzibilni molekuli) idu u prilog pretpostavci da slobodni radikali i redoks stres aktivno učestvuju u ćelijskoj signalizaciji kao sekundarni glasnici u aktivaciji faktora transkripcije (kao što su AP-1 i NF- κ B) i indukciji ekspresije gena (Pavlović i sar., 2002a; Klaunig i sar., 2011). Jedan od najčešćih efekata aktiviranja AP-1 transkripcionog faktora jeste povećana proliferacija ćelija (Klaunig i sar., 2011; Shaulian i Karin, 2001). Takođe je i NF- κ B aktiviranje povezano sa procesom karcinogeneze, zbog njegove ključne uloge u upalnim procesima, diferencijaciji i rastu ćelija (Klaunig i sar., 2011; Okamoto i sar., 2007). Kao signalni glasnici, ROS mogu aktivirati molekule, kao što su enzimi proteinske kinaze C (PKC), koji regulišu različite ćelijske funkcije, uključujući proliferaciju, ćelijski ciklus, diferencijaciju, organizaciju citoskeleta, ćelijsku migraciju i apoptozu i imaju važnu ulogu kod progresije tumora (Wu, 2006; Klaunig i sar., 2011). Istraživanja su pokazala da ROS podstiču oslobađanje intracelularno čuvanog kalcijuma, što dovodi do aktiviranja PKC. Najčešće u procesu aktiviranja protein kinaza redoks stresom učestvuju slobodni radikali (H_2O_2 , O_2^{\bullet}), azot monoksid (NO), modulatori redoks statusa (blokatori sinteze glutationa) ili hemijska jedinjenja koja generišu radikale (Pavlović i sar., 2002a). Oksidativni stres može delovati i u fazi progresije procesa kancerogeneze dodavanjem daljih promena kod DNK u iniciranoj ćelijskoj populaciji (Reuter i sar., 2010; Klaunig i sar., 1998).

2.1.2. Antioksidanti u humanom organizmu

Mnoge supstance su pokazale antioksidativne osobine u različitim *in vitro* sistemima, ali u *in vivo* uslovima, mogu izgubiti antioksidativne osobine. Antioksidativne sposobnosti za svaku pojedinu supstancu zavise od brojnih faktora kao što su: antioksidativni mehanizam, ciljni biomolekul, mesto delovanja (ekstracelularno ili intracelularno) i koncentracije potrebne za antioksidativni efekat (Rytter, 2011).

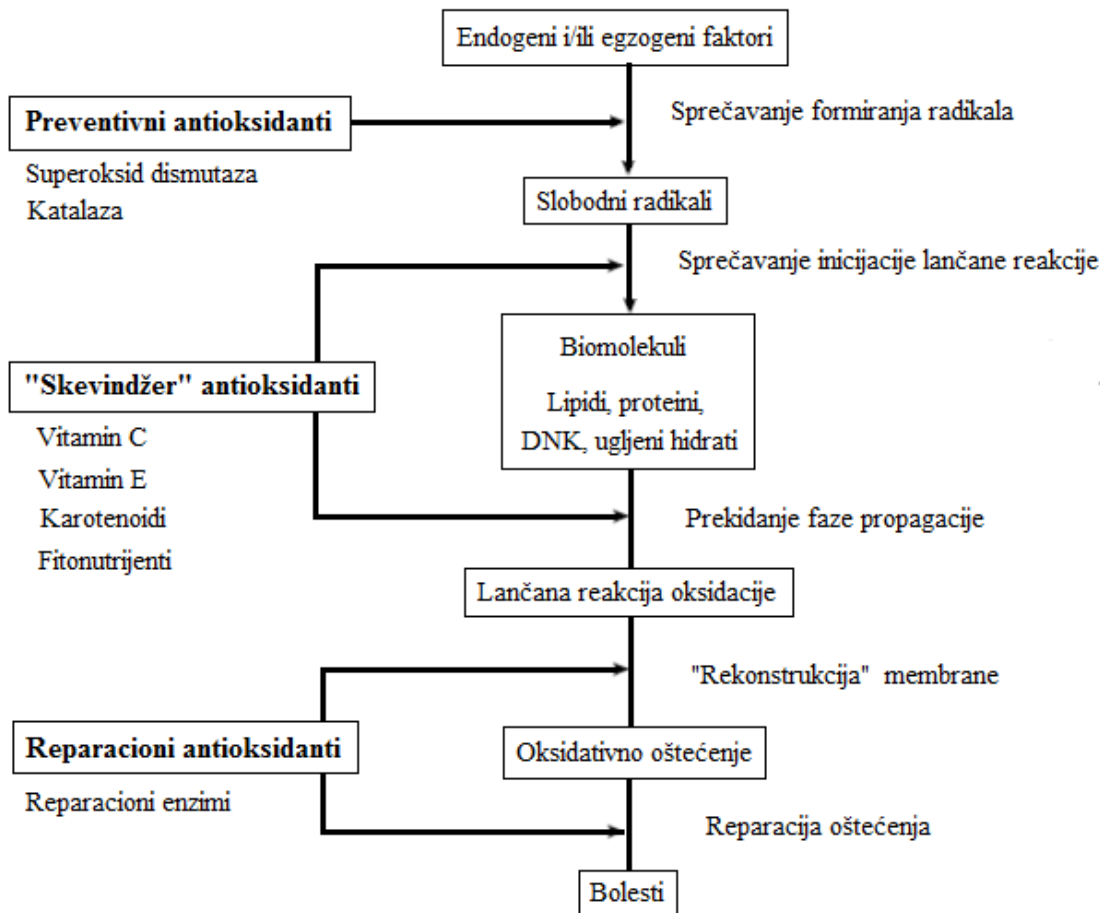
Postoji više načina klasifikovanja antioksidanata. Shi i saradnici (2001) su klasifikovali antioksidante prema nivou i načinu delovanja u humanom organizmu na: preventivne, "skevindžer", reparacione i adaptivne antioksidante (slika 5) (Devasagayam i sar., 2004).

Preventivni antioksidanti sprečavaju formiranje slobodnih radikala i iniciranje lančanih reakcija oksidacije: dekompozicijom vodonik peroksida i lipidnih hidroperoksida (enzimski antioksidanti - katalaza, glutation peroksidaza, glutation-S-transferaza), kompleksiranjem jona metala (proteini - albumin, ceruloplazmin, mioglobin, transferin, itd) i eliminacijom ROS (superoksid dismutaza).

"Skevindžer" antioksidanti (*eng. radical-scavenging antioxidants*) poseduju sposobnost da "hvataju" slobodne radikale (reagujući sa slobodnim radikalima formiraju stabilne proizvode) i tako inhibiraju inicijaciju i prekidaju propagaciju reakcije lipidne oksidacije, pa se zato nazivaju i "chain-breaking" antioksidanti (Halliwell, 1995; Young i Woodside, 2001; Powers i sar., 2004). "Skevindžer" antioksidanti dele se prema rastvorljivosti na: hidrosolubilne antioksidante (vitamin C, mokraćna kiselina, bilirubin, albumin, glutation, neki polifenoli) i liposolubilne antioksidante (vitamin E, vitamin A, karotenoidi, neki polifenoli) (Vaya i Aviram, 2001).

Reparacioni antioksidanti deluju posebnim mehanizmima, obnavljajući ili uklanjajući oštećene biomolekule koji nastaju u uslovima oksidativnog stresa i pored prisustva preventivnih i "skevindžer" antioksidanata. U reparacione antioksidante ubrajaju se: fosfolipaze, proteaze, enzimi koji obnavljaju DNK, transferaze itd.

Adaptivni antioksidanti su generisani odgovarajući antioksidativni enzimi, u odgovarajućem vremenu i koncentraciji, preneti do odgovarajućih mesta delovanja.

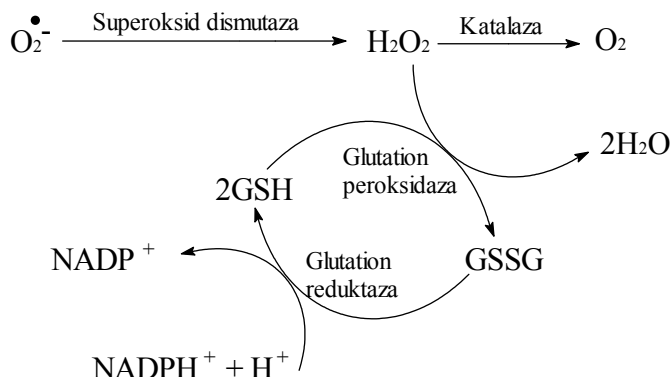


Slika 5. Nivoi antioksidativnog delovanja

Sistem antioksidativne odbrane humanog organizma od slobodnih radikala obuhvata endogene antioksidante (nastaju u organizmu) i egzogene antioksidante (unose se putem hrane, jer se u organizmu ne mogu sintetisati) (Willcox i sar., 2004).

Endogeni antioksidanti se dele na enzimske (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza) i neenzimske, kao što su: mokraćna kiselina, bilirubin, tioli (npr., glutation, lipolna kiselina, N-acetil cistein), NADPH, NADH, koenzim Q10 (ubihinon), proteini koji poseduju sposobnost vezivanja jona metala (albumin - bakar, ceruloplazmin - bakar, feritin - gvožđe, mioglobin - gvožđe, transferin - gvožđe) itd (Powers i sar., 2004; Percival, 1998; Halliwell, 1996; Valko i sar., 2006).

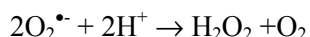
Na slici 6 predstavljena je šema delovanja enzimskih antioksidanata (Lee i sar., 2004).



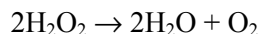
Slika 6. Enzimski antioksidanti i njihovi reakcioni mehanizmi

Neki endogeni antioksidanti za svoju funkciju zahtevaju unošenje minerala (koenzima): Se (koenzim glutation peroksidaze), Fe (koenzim katalaze), Cu, Zn i Mn (koenzimi superoksid dismutaze) (Percival, 1998; Powers i sar., 2004). Dva izuzetno značajna enzimska antioksidanta, superoksid dismutaza i katalaza, kao sastavni deo svojih aktivnih mesta sadrže metalne jone, koji mogu biti odgovorni i za formiranje slobodnih radikala (Jomova i Valko, 2011).

Superoksid dismutaze (SOD) predstavljaju grupu od četiri enzima: bakar-cink SOD (CuZnSOD, EC 1.15.1.1.), mangan SOD (MnSOD), gvožđe SOD (FeSOD) i ekstracelularna SOD (EcSOD). MnSOD je lokalizovana u mitohondrijama, CuZnSOD u citosolu, a EcSOD u ekstracelularnom prostoru. Sve superoksid dismutaze katalizuju transformaciju superoksid anjon radikala u vodonik peroksid (Lakari, 2002; Lee i sar., 2004;):



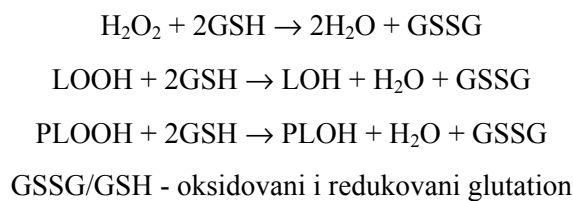
Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6.), lokalizovana u peroksizomima i makrofagima, katalizuje transformaciju nastalog vodonik peroksida do vode i kiseonika (Lakari, 2002; Lee i sar., 2004):



Kada je H_2O_2 prisutan u velikoj koncentraciji u ćeliji, može se razložiti katalazom (reakcija se odigrava sporo), dok se H_2O_2 u maloj koncentraciji metaboliše delovanjem peroksidaza (Bogdanović,

2000). Peroksidaze su enzimi koji razlažu vodonik peroksid, kao i hidroperokside slobodnih masnih kiselina i hidroperokside fosfolipida.

Glutation peroksidaza (GPx, EC 1.11.1.9.) se nalazi u ćeliji ili u plazmi. Ko-supstrat za njegovo delovanje je redukovani glutacion (GSH). Ćelijska glutacion peroksidaza redukuje hidroperokside lipida (ROOH), koji nastaju pri oksidaciji polinezasićenih masnih kiselina, u stabilne hidrokside lipida (ROH), dok plazmatska glutacion peroksidaza, zajedno sa fosfolipazom može transformisati hidroperokside fosfolipida (PLOOH) u hidrokside fosfolipida (PLOH) (Shi i sar., 2001).



Glutation reduktaza (GR, EC 1.6.4.2.) katalizuje redukciju oksidovanog oblika glutaciona u redukovani oblik glutaciona koji je potreban za redukciju lipidnih hidroperoksida i vodonik peroksida pomoću glutacion peroksidaze (Lee i sar., 2004).



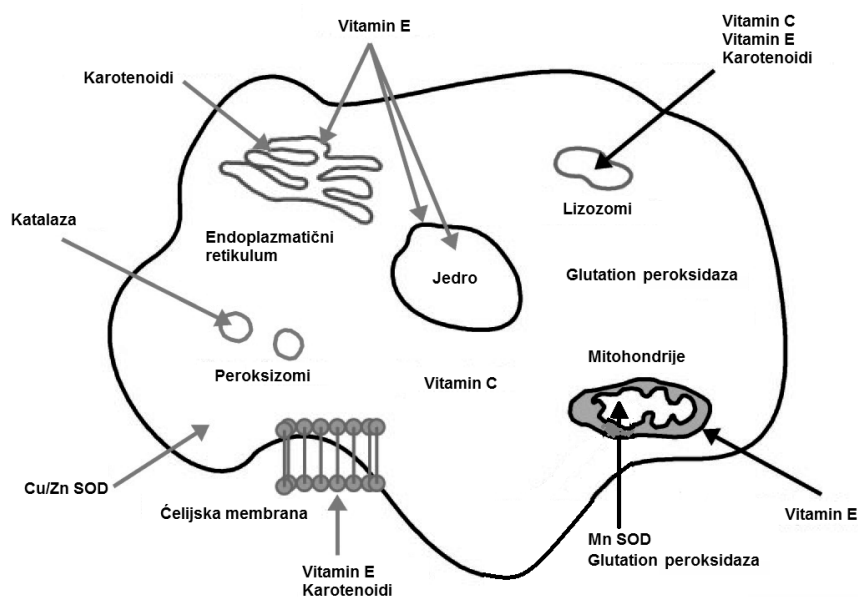
U egzogene (neenzimski) antioksidante ubrajaju se: vitamin C, vitamin E, karotenoidi (β -karoten, likopen itd), polifenoli (flavonoidi, fenolne kiseline, proantocijanidini itd) i drugi (Percival, 1998), kao i esencijalni minerali (koenzimi) potrebni za aktivno mesto enzimskih antioksidanata, npr. selen u glutacion peroksidazi (Powers i sar., 2004; Sen i Chakraborty, 2011; Rytter, 2011).

Pored ovih podela antioksidanti se mogu podeliti i prema mehanizmu delovanja na: katalitičke sisteme neutralizacije ROS (superoksid dismutaza, katalaza, glutacion peroksidaza), antioksidante koji vezuju jone metala i tako sprečavaju nastajanje ROS Haber-Weiss reakcijom (proteini - albumin, ceruloplazmin, feritin, itd), "skevindžer" antioksidante (autodestruktivne) koji prekidaju lančane reakcije (*eng. chain breaking antioxidants*) i destruktivno deluju na ROS (npr. vitamin C, vitamin E, flavonoidi itd) i antioksidante koji svoje delovanje ispoljavaju apsorpcijom energije, elektrona i tako što "gase" (*eng. quenching*) ROS (karotenoidi i antocijani) (Sen i Chakraborty, 2011).

Antioksidativna odbrana ćelije smatra se složenim integrisanim sistemom gde antioksidanti deluju sinergistički. Kada je jedan antioksidant u oksidovanom obliku, drugi antioksidant može takav oksidovani antioksidant regenerisati, odnosno redukovati (Jacob, 1995). Primeri takvog delovanja

utvrđeni *in vivo* su regeneracija tokoferil radikala u prisustvu askorbinske kiseline (Hamilton i sar., 2000) i regeneracija oksidovanog oblika askorbinske kiseline glutationom (Henning i sar., 1991; May i sar., 1996). U *in vitro* studijama takođe je utvrđeno sinergističko delovanje između flavonoida, α -tokoferol, β -karotena i vitamina C (Pedrielli i Skibsted, 2002; Liao i Yin, 2000; Rytter, 2011).

Ćelije se od oksidativnog oštećenja štite složenom mrežom antioksidanata. Enzimski i neenzimski antioksidanti postoje i u intracelularnoj i ekstracelularnoj sredini i deluju kao složene jedinice za uklanjanje različitih reaktivnih vrsta kiseonika, kako bi osigurali maksimalna intracelularnu zaštitu, pa su "strateški" smešteni u različite odeljke u ćeliji (slika 7) (Powers i sar., 2004; Simkó i sar., 2011).



Slika 7. Antioksidativni sistemi u ćeliji

S obzirom da slobodni radikali mogu da napuste ćeliju koja ih je proizvela i raznesu se po organizmu, osim antioksidativne odbrane koja funkcioniše unutar ćelijskih struktura razvila se i vanćelijska antioksidativna odbrana, koju obavljaju: transferin, lakroferin, haptoglobin, hemopeksin, ceruloplazmin, albumini, ekstracelularna izoforma SOD, ekstracelularna glutation-peroksidaza, glukoza, bilirubin, urati i mnogi drugi molekuli (Stevanović i sar., 2011).

Kod vanćelijske antioksidativne odbrane metaloproteini imaju značajnu ulogu, jer zadržavaju gvožđe i bakar u nereaktivnom obliku (u nižem oksidacionom stanju) i tako sprečavaju njihovo delovanje sa vodonik peroksidom i superoksid anjon radikalom (Marklaud i sar., 1982; Marklaud, 1984). Ovakvo ponašanje metaloproteina je značajno, jer u prisustvu jona gvožđa ili bakra lipidni peroksidi stvaraju mnogobrojne produkte razgradnje, pa i aktivne radikale. Transferin i laktoferin

učestvuju u antioksidativnoj odbrani tako što direktno vezuju gvožđe, dok haptoglobin vezuje hemoglobin, a hemopeksin prikuplja hem i tako indirektno vezuju gvožđe. Ceruloplazmin i albumini su antioksidanti, jer vezuju bakar i hem, a uklanjaju i hipohlorastu kiselinu (HOCl). Cerulopazmin ima još i sposobnost uklanjanja fero-jona (Fe^{2+}) iz plazme, uz istovremenu redukciju kiseonika u vodu. Osim toga, reaguje i sa superoksid anjon radikalom i vodonik peroksidom (Bannister i sar., 1980; Gutteridge, 1987; Gutteridge i Smith, 1988). Ekstracelularna SOD (EC-SOD) uklanja superoksid anjon radikal, ekstracelularna glutation-peroksidaza (EC-GSH-Px) odstranjuje hidroperokside, dok glukoza uklanja hidroksil radikal. Bilirubin je antioksidant, jer učestvuje u borbi protiv peroksil radikala, a urati vezuju metale i uklanjaju ROS (Stevanović i sar., 2011).

2.2. Funkcionalna jedinjenja

Mnogobrojna epidemiološka ispitivanja su pokazala da su neke hronične bolesti, kao što su kardiovaskularne bolesti, dijabetes i kancer, povezane sa ishranom, kao i da se rizik od nastanka ovih bolesti može smanjiti konzumiranjem hrane bogate visokovrednim funkcionalnim jedinjenjima. Danas se od hrane ne očekuje samo da zadovolji fiziološke potrebe, već i da doprinese zdravlju pojedinca. Zbog porasta svetske populacije i njene potrebe za hranom, poljoprivredna proizvodnja hrane više nije usmerena samo prema postizanju visokog prinosa ili zaštite biljaka od stresnih uticaja sredine, već i prema proizvodnji sorti sa povećanim sadržajem hranjivih materija, kao i supstanci koje poseduju pozitivne zdravstvene efekte. Različite tradicionalne prehrambene tehnologije su unapređene, a usled primene brojnih inovacija razvijene su i nove tehnologije sa ciljem proizvodnje funkcionalne hrane. Funkcionalna hrana je hrana sa komponentama za koje je utvrđeno da poseduju pozitivne zdravstvene efekte (Hsieh i Ofori, 2007). U poslednje vreme koncept funkcionalne hrane postaje sve popularniji zbog povećane svesti potrošača o povezanosti zdravlja i ishrane. Proizvođačima hrane, takođe odgovara razvoj takvih proizvoda, jer dodatni sastojci povećavaju vrednost hrane, pa se predviđa sve veći rast globalnog tržišta funkcionalne hrane u narednim godinama (Stanton i sar., 2001).

Koncept funkcionalne hrane promovisan je 1984. godine od strane japanskih naučnika koji su proučavali odnose između ishrane, senzornih osobina, obogaćivanja hrane i modulacije fizioloških sistema. Termin funkcionalna hrana definisan je na različite načine (Roberfroid, 2002), ali do sada ne postoji jedinstveno prihvaćena definicija za ovu grupu hrane (Alzamora i sar., 2005). U većini zemalja ne postoji precizna definicija, pa određivanje granice između konvencionalne i funkcionalne hrane predstavlja izazov i za stručnjake iz oblasti hrane i nutricionizma (Mark-Herbert, 2004; Niva, 2007).

Evropska komisija za usklađeno delovanje za nauku o funkcionalnoj hrani u Evropi, FuFoSE (*eng. European Commission's Concerted Action on Functional Food Science in Europe*), kojom koordinira ILSI (*eng. International Life Science Institute*) definisala je funkcionalnu hranu na sledeći način: "Prehrambeni proizvod može se smatrati funkcionalnim ako zajedno sa osnovnim prehrambenim efektima ima pozitivne efekte na jednu ili više funkcija humanog organizma koje dovode do poboljšanja opšteg i fizičkog stanja i/ili smanjenje rizika od nastanka bolesti. Količina unosa i oblik funkcionalne hrane treba biti kao što se uobičajeno očekuje za prehrambene svrhe. Prema tome, funkcionalna hrana ne može biti u obliku tableta ili kapsula, već samo u uobičajenom obliku za hranu" (Diplock i sar., 1999).

Funkcionalna hrana je razvijena za gotovo sve kategorije hrane. Sa aspekta proizvoda, funkcionalne osobine mogu biti uključene na različite načine. Najznačajnije vrste funkcionalne hrane date su u tabeli (Siró i sar., 2008).

Tabela 1. Najznačajnije vrste funkcionalne hrane

Vrsta funkcionalne hrane	Definicija	Primer
Proizvod povećane vrednosti (<i>eng. Fortified product</i>)	Hrana sa povećanim sadržajem postojećih hranljivih materija	Voćni sokovi obogaćeni sa vitaminom C
Obogaćeni proizvodi (<i>eng. Enriched products</i>)	Hrana sa dodatkom novih hranljivih materija ili komponenata koje inače nisu prisutne u određenoj hrani	Margarin sa estrima biljnih sterola
Izmenjeni proizvodi (<i>eng. Altered products</i>)	Hrana iz koje je štetna komponenta uklonjena, njen sadržaj smanjen ili zamenjen drugom supstancom sa korisnim efektima	Mesni proizvodi ili sladoledi kod kojih su prehrambenim vlaknima zamenjene masti
Poboljšani ili unapređeni proizvodi (<i>eng. Enhanced commodities</i>)	Hrana u kojoj je jedna od komponenti prirodno poboljšana kroz posebne uslove gajenja, novim sastavom hranjivih materija, genetskom manipulacijom, ili na drugi način	Jaja s povećanim sadržajem omega-3 masnih kiselina što se postiže izmenama u živinskoj hrani

Često se funkcionalna hrana dobija iz tradicionalne hrane obogaćene sastojcima (tzv. funkcionalnim jedinjenjima), koji mogu pružiti ili unapređivati korisno delovanje na zdravlje ljudi. Potrošači preferiraju ove sastojke, jer imaju prirodno (tj. nesintetičko) poreklo (najčešće su izolovani iz

biljnog materijala) (Herrero i sar., 2006). Postoji jasna razlika između ovih sastojaka i klasičnih aditiva u hrani. Klasični aditivi se dodaju hrani zbog hranljivih vrednosti ili tehnoloških funkcionalnosti. Nasuprot tome, nova generacija komponenata koje se dodaju hrani su u vezi sa doprinosom pozitivnim efektima na zdravlje potrošača. Danas je poznato da neke komponente, koje nisu neophodne za egzistenciju čoveka, mogu značajno uticati na brojne faktore fizioloških procesa, pa i na smanjenje rizika od nastanka oboljenja (Milner, 2000). Zbog pozitivnih zdravstvenih efekata koji su posledica bioloških i fizioloških aktivnosti komponenata, termini "bioaktivni sastojci" ili "funkcionalni sastojci" obuhvataju ovu klasu jedinjenja - funkcionalna jedinjenja (Meisel, 1997; Xu, 1998; FitzGerald i Meisel, 2000; Greeson i sar., 2001; Kruger i Mann, 2003).

Funkcionalna jedinjenja su potencijalno korisni sastojci hrane, različita po hemijskoj strukturi (Kruger i Mann, 2003), tako da se u njih ubrajaju: karotenoidi, prehrambena vlakna, polifenoli (flavonoidi i fenolne kiseline), masne kiseline, izotiocianati, biljni steroli, prebiotici i probiotici, fitoestrogeni, proteini iz soje, vitamini i minerali (<http://www.ipv.pt>). Od svih jedinjenja sa funkcionalnim svojstvima, najviše su ispitana jedinjenja sa antioksidativnom aktivnošću (Bhat i Madyastha, 2000; Piñero-Estrada i sar., 2001). Ova jedinjenja imaju važnu ulogu u prehrambenoj tehnologiji, jer poseduju sposobnost sprečavanja ili usporavanja lipidne peroksidacije. Tokom proizvodnje i čuvanja hrane može doći do smanjenja sadržaja antioksidanata što ograničava zaštitu prehrambenog proizvoda od lipidne oksidacije. Pored toga, utvrđeno je da antioksidanti imaju važnu ulogu u ljudskom zdravlju, pa je zato povećan interes potrošača za takve proizvode (Borowitzka i Borowitzka, 1988; Herrero i sar., 2006).

Određivanje bezbednosti funkcionalnih jedinjenja obuhvata mnoge elemente: analiza hemijskog sastava, strukture/toksičnosti, ispitivanja na životinjama, klinička/epidemiološka ispitivanja, kao i posebna ispitivanja (npr. interakcije sa hranom i lekovima). Kod ispitivanja treba uzeti u obzir specifične razlike za vrste proizvoda kao što su: (1) konvencionalne, sintetske ili izolovane komponente, (2) biljne ekstrakte i kompleksne smeše različitih komponenata, i (3) proizvode dobijene iz novih izvora ili procesa, kao što su proizvodi fermentacije ili biotehnologije (Kruger i Mann, 2003). Biljni ekstrakti posebno predstavljaju kompleksne smeše komponenti koje mogu ili ne moraju pripadati istoj klasi jedinjenja. Zbog širokog spektra različitih hemijskih jedinjenja iz biljnih ekstrakata koja mogu biti prisutna u proizvodu, zahteva se primena različitih analitičkih metoda za adekvatnu karakterizaciju proizvoda. Tako se HPLC (*eng. high performance liquid chromatography*) primenjuje za adekvatnu karakterizaciju proizvoda, dodatne analitičke metode zahtevaju se da bi se mogle kvantifikovati aktivne komponente, kao i druge komponente (npr. nečistoće) (Kruger i Mann, 2003).

U prehrambenoj industriji zaostaju značajne količine sporednih proizvoda, koji se najčešće sastoje od delova sirovina čija je ekonomska vrednost manja od vrednosti koja je potrebna za njihovo sakupljanje radi neke druge primene, pa se zato odbacuju. Ipak, sporedni proizvodi mogu se smatrati i vrednim, ako se primenom odgovarajućih tehničkih sredstva dobija novi proizvod, čija je vrednost veća od troškova njegove proizvodnje. Ostaci se u ovom slučaju ne smatraju sporednim proizvodom, već mogu biti i izvor prirodnih supstanci, odnosno različitih funkcionalnih jedinjenja. Prerada i eventualno iskorišćenje sporednih proizvoda predstavljaju potencijal kojima ovi proizvodi mogu naći svoju primenu umesto da zagađuju životnu sredinu. Uspešna prerada sporednih proizvoda podrazumeva: (a) procenu da li je sporedni proizvod pogodan da se korisno upotrebi, (b) procenu ekonomske isplativnosti, (c) primenu procesne tehnologije i (d) formiranje procesa (preduzeća) koje je prihvatljivo sa ekonomskog aspekta (<http://www.unido.org>). Sporedni proizvodi prerade biljne hrane pored toga što predstavljaju veliki problem za odlaganje, oni su i potencijalni izvor bioaktivnih jedinjenja koja mogu naći primenu u prehrambenoj industriji zbog svojih povoljnih tehnoloških ili nutritivnih osobina. Funkcionalna jedinjenja koja se najčešće izoluju iz sporednih proizvoda danas se uglavnom razvrstavaju prema rastvorljivosti na: nerastvorljiva (npr. prehrambena vlakna), hidrosolubilna (npr. polifenolna jedinjenja) i liposolubilna (npr. karotenoidi) (Schieber i sar., 2001).

2.3. Polifenolna jedinjenja

Polifenolna jedinjenja (polifenoli, fenolna jedinjenja) predstavljaju široko rasprostranjenu heterogenu grupu sekundarnih biljnih metabolita i jednu od najvažnijih klasa prirodnih antioksidanata (Mimica-Dukić i sar., 2004). Zajednička osobina polifenolnih jedinjenja je da u svojoj strukturi sadrže aromatični prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa (Robards i sar., 1999; Milić i sar., 2000).

Klasifikacija polifenolnih jedinjenja se najčešće izvodi na osnovu broja ugljenikovih atoma koji se nalaze u osnovnom skeletu (tabela 2) (Antolovich i sar., 2000; Urquiaga i Leighton, 2000).

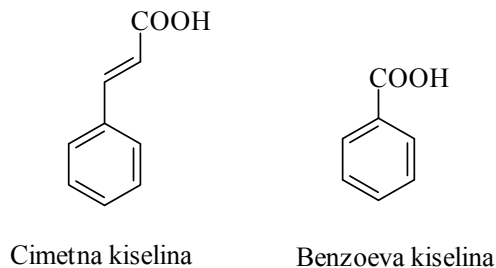
Tabela 2. Osnovne klase biljnih polifenola

Osnovni skelet	Klasa	Primer
C ₆	Prosti fenoli	Katehol, hidrohinon, rezorcinol
	Benzohinoni	2,6-Dimetoksibenzohinon
C ₆ -C ₁	Fenolne kiseline	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina, salicilna kiselina
C ₆ -C ₂	Fenilsirćetne kiseline	<i>p</i> -Hidroksifenilsirćetna kiselina
	Acetofenoni	3-Acetil-6-metoksibenzaldehid
C ₆ -C ₃	Derivati tirozina	Tirozol
	Cimetne kiseline	Kafena kiselina, ferulna kiselina
	Fenilpropeni	Eugenol, miristicin
	Kumarini	Umbeliferon, eskuletin, skopolin
C ₆ -C ₄	Hromoni	Eugenin
	Naftohinoni	Juglon
C ₆ -C ₁ -C ₆	Ksantoni	Mangostin, mangiferin
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbeni	Rezveratrol
	Antrahinoni	Emodin
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoidi	Kvercetin, katehin, naringenin
	Izoflavonoidi	Genistein
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignani	Pinorezinol
	Neolignani	Eusiderin
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoidi	Agatisflavon, amentoflavon
(C ₆ -C ₃) _n	Lignini	Polimeri: <i>p</i> -kumaril i sinapil alkohola
(C ₆) _n	Katehol melanini	Katehol melanin
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Kondenzovani tanini	Procijanidin B1, Procijanidin B2

U prirodi se polifenolna jedinjenja mogu nalaziti u slobodnom obliku, ili češće u obliku glikozida. Glikozidi sadrže aglikonski deo fenolne strukture i različit broj monosaharidnih jedinica. Za biološku aktivnost polifenolnih jedinjenja zaslužan je isključivo aglikonski deo molekula (Sakakibara i sar., 2003). Izuzetno značajne grupe polifenolnih jedinjenja su fenolne kiseline i flavonoidi.

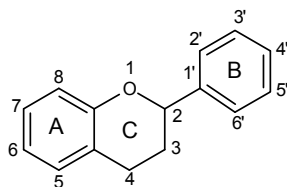
Fenolne kiseline su hidroksi i/ili drugi funkcionalni derivati cimetne i benzoeeve kiseline (slika 8). Fenolne kiseline se u prirodi (biljnom materijalu) javljaju u slobodnom ili u vezanom obliku. Češće se javljaju u vezanom obliku, kao estari i glikozidi (Andjelković i sar., 2006). Cimetne kiseline pripadaju seriji *trans*-fenil-3-propenskih kiselina koje su različito supstituisane. One su široko rasprostranjene u konjugovanom obliku u biljnom materijalu, a relativno retko su prisutne kao

slobodne. Najzastupljenija je kafena kiselina (3,4-dihidroksicimetna kiselina), a ferulna (3-metoksi-4-hidroksicimetna kiselina), sinapinska (3,5-dimetoksi-4-hidroksicimetna kiselina) i *p*-kumarinska (4-hidroksicimetna kiselina) su takođe široko rasprostranjene. U biljnom materijalu retko se mogu naći 2-hidroksicimetna i 3,4-dimetoksicimetna kiselina (Clifford, 2000). Najznačajnije benzoeve kiseline su: salicilna kiselina, 4-hidroksibenzoeva kiselina, protokatehinska kiselina, gentisinska kiselina, vanilinska kiselina, siringinska kiselina, galna kiselina, elaginska kiselina (Tomás-Barberán i Clifford, 2000; Robards i sar., 1999).

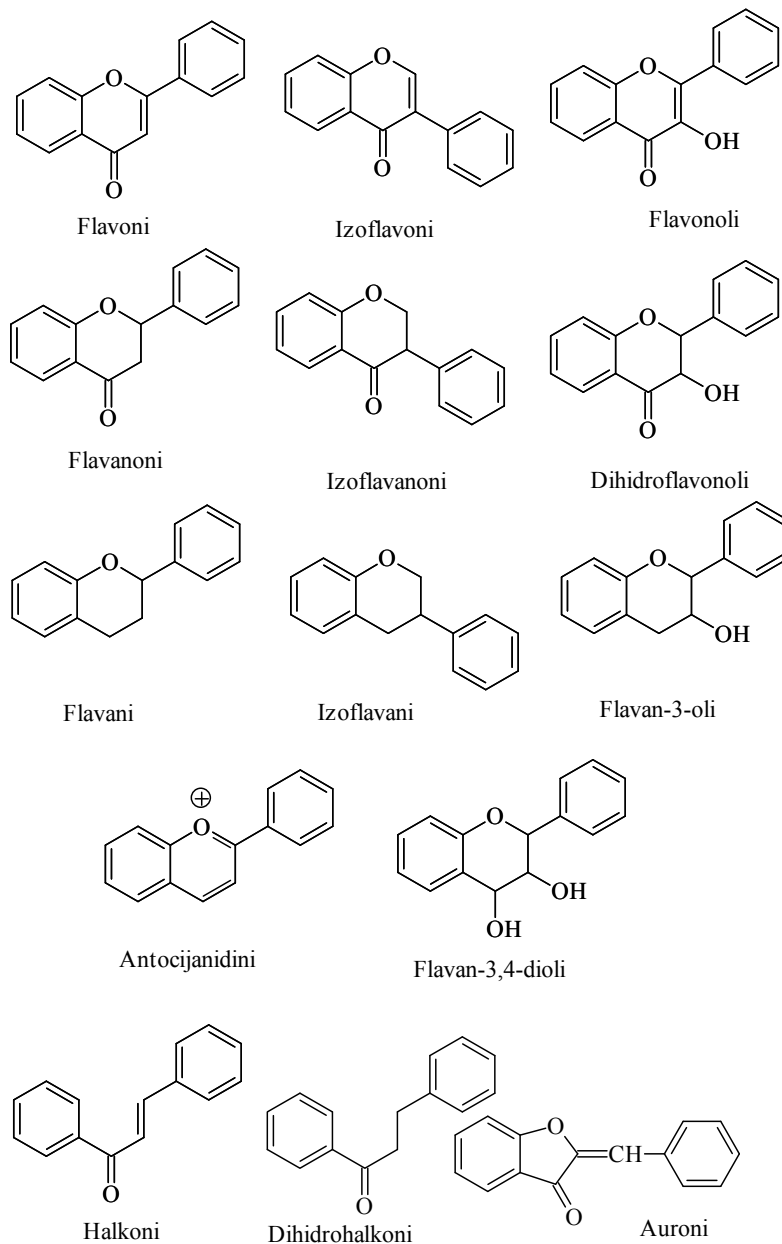


Slika 8. Hemijske strukture cimetne i benzoeve kiseline

Flavonoidi predstavljaju veliku grupu polifenolnih jedinjenja koja je izdvojena u posebnu klasu, zbog brojnosti i rasprostranjenosti, kao i zbog značaja ovih jedinjenja za biologiju, hemiju i medicinu. Ugljenikov skelet flavonoida ($C_6-C_3-C_6$) sastoji se iz dva benzenova prstena (A i B) međusobno povezana tročlanim alifatičnim ugljeničnim nizom koji sa atomom kiseonika formira heterociklični prsten C (slika 9). Strukture osnovnih klasa flavonoida date su na slici 10 (Robards i sar., 1999).



Slika 9. Hemijska formula ugljenikovog skeleta flavonoida



Slika 10. Strukture osnovnih klasa flavonoida

Flavonoidi se u prirodi najčešće nalaze u obliku glikozida, jer se za slobodne hidroksilne grupe u molekulima flavonoida mogu vezati ostaci monosaharidnih jedinica. Od monosaharidnih jedinica najčešće su za fenolnu strukturu vezane jedinice: glukoze, galaktoze, ramnoze, ksiloze i arabinoza, dok su ređe vezane jedinice manoze i fruktoze (Duthie i sar., 2003).

Mada se smatra da flavonoidi učestvuju u istim procesima kao i ostali prirodni pigmenti, ipak se njihova prava uloga u biljkama ne zna. Nađeno je, da se ova jedinjenja u biološkim sistemima mogu ponašati kao antioksidanti, enzimski inhibitori, fotosenzibilizatori i prenosioci energije, respiratori u biosinteza, kao i da imaju estrogene i antikancerogene osobine (Lajšić i Grujić-Injac, 1998).

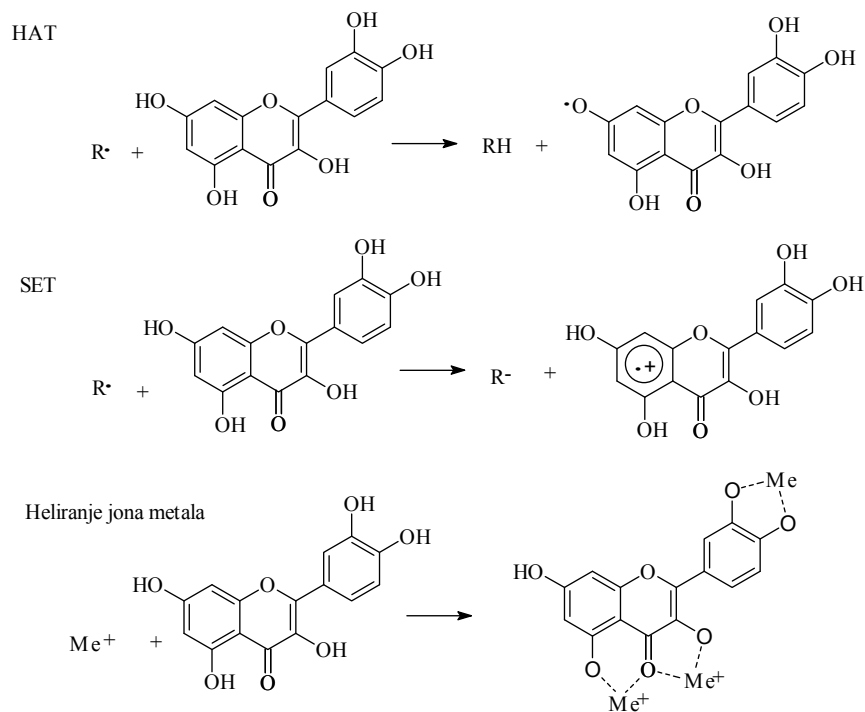
2.3.1. Mehanizmi delovanja polifenolnih jedinjenja

Polifenoli poseduju različite biološke aktivnosti, kojima mogu preventivno delovati na nastanak, kao i na tok različitih bolesti (npr. modulirati kancerogenezu) (Dai i Mumper, 2010; Fraga i sar., 2010). Predloženo je nekoliko mehanizama kojima je moguće objasniti biološke aktivnosti biljnih polifenola. Fraga i saradnici (2010) su ove mehanizme klasifikovali prema specifičnosti u dve grupe: I) nespecifične mehanizme (zavise od prisustva fenolnih grupa) i II) specifične mehanizme (zavise od posebnih hemijskih i strukturnih karakteristika polifenolnola). U nespecifične mehanizme ubrajaju se: antioksidativno delovanje ("hvatanje" slobodnih radikala i heliranje metalnih jona) i interakcija polifenola sa lipidima i proteinima membrana, a u specifične: interakcija polifenola sa enzimima, transkripcionim faktorima i receptorima.

2.3.1.1. Nespecifični mehanizmi delovanja polifenolnih jedinjenja

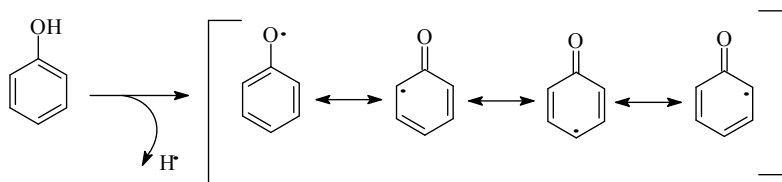
Antioksidativno delovanje polifenolnih jedinjenja odigrava se mehanizmima koji proizlaze iz direktne reakcije sa slobodnim radikalima (Leopoldini i sar., 2011), kao i heliranjem jona metala (Jovanović i sar., 1998).

Polifenoli deaktiviraju slobodne radikale sledećim mehanizmima: prenosom atoma vodonika (*eng. hydrogen atom transfer* - HAT) i prenosom elektrona (*eng. single electron transfer* - SET) (slika 11).



Slika 11. Mehanizmi antioksidativnog delovanja polifenolnih jedinjenja

Kod HAT mehanizma, polifenolno jedinjenje (ArOH) reaguje sa slobodnim radikalom (R^\bullet), prenosom atoma vodonika, posle homolitičkog raskidanja O-H veze. Kao proizvod reakcije nastaje "bezopasna" RH vrsta i oksidovani aroksil (ArO^\bullet) radikal (slika 11), koji je, zbog stabilizacije delokalizacijom elektrona (slika 12), manje reaktivan u odnosu na R^\bullet .



Slika 12. Nastajanje i formiranje rezonantnih struktura aroksil radikala

Kod HAT mehanizma, entalpija raskidanja (*eng. bond dissociation enthalpy - BDE*) fenolnih O-H veza važan je parametar u proceni antioksidativnog delovanja; što je manja BDE vrednost, lakše je raskidanje fenolne O-H veze, kao i reakcija sa slobodnim radikalom. BDE vrednost nekih polifenolnih jedinjenja opadaju sledećim redosledom: apigenin, kemferol, cijanidin, luteolin, katehin, epikatehin, kafena kiselina, kvercetin i galna kiselina (tabela 3).

Tabela 3. BDE (kcal/mol) i IP (kcal/mol) polifenolnih jedinjenja

Polifenolna jedinjenja	BDE (kcal/mol)	IP (kcal/mol)
Galna kiselina	72,2	189,1
Kafena kisleina	73,6	181,1
Katehin	74,2	169,7
Epikatehin	73,7	170,8
Kemferol	80,9	168,0
Cijanidin	79,4	246,2
Kvercetin	72,3	166,1
Apigenin	82,2	176,0
Luteolin	74,5	174,4

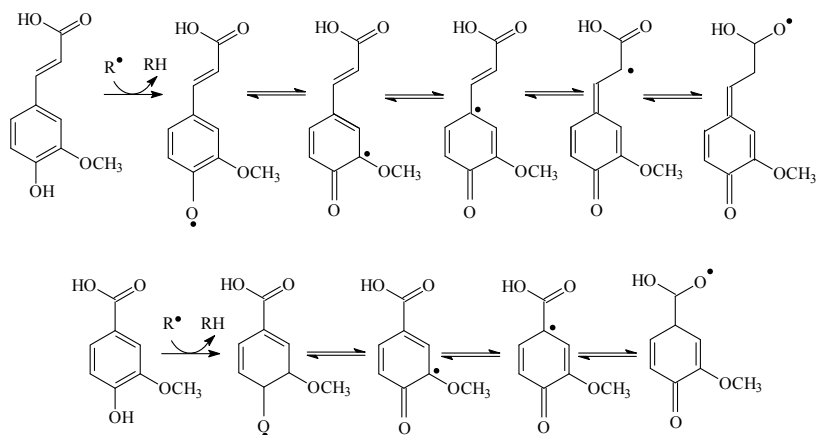
U SET mehanizmu (slika 11) dolazi do prenosa elektrona na radikal R^\bullet . Nastali anjon R^- je energetski stabilnija vrsta, dok je aroksil radikal katjon ($ArOH^{+\bullet}$) takođe manje reaktivan od R^\bullet . ArO^\bullet i $ArOH^{+\bullet}$ su aromatične strukture kod kojih nesporeni elektron, nastao u reakciji sa slobodnim radikalom, poseduje sposobnost rasprostiranja po celom molekulu, što dovodi do stabilizacije radikala delokalizacijom elektrona (Leopoldini i sar., 2011). Kod SET mehanizma, jonizacioni potencijal (*eng. ionisation potential - IP*) je značajan parametar za ispitivanje antioksidativnog delovanja; što je niža IP vrijednost, lakše se izdvaja elektron i dolazi do reakcija sa slobodnim radikalom. IP vrijednosti nekih polifenolnih jedinjenja opadaju sledećim redosledom: cijanidin, galna kiselina, kafena kiselina, apigenin, luteolin, epikatehin, katehin, kemferol i kvercetin (tabela 3).

Sposobnost polifenola da heliraju jone metala (slika 11) je takođe veoma značajna za antioksidativnu aktivnosti (Jovanović i sar., 1998). Joni metala mogu imati značajnu ulogu u reakcijama generisanja slobodnih radikala, pa tako reakcijom nekih metala u niskom oksidacionom stanju (uglavnom Fe^{2+}) sa vodonik peroksidom može nastati izuzetno reaktivan hidroksil radikal ($\bullet OH$) (Schulz i sar., 2000).

Antioksidativno delovanje polifenolnih jedinjenja odnosno sposobnost prekidanja slobodnoradikalnih lančanih reakcija (npr. inhibiranje ili zaustavljanje oksidacije lipida) uslovljeno je njihovim strukturnim karakteristikama. Elektron donorske karakteristike hidroksilne grupe i rezonancija nastalog aroksil radikala su osobine polifenolnih jedinjenja značajne za njihovo antioksidativno delovanje (Bors i sar., 1990; Fraga i sar., 2010).

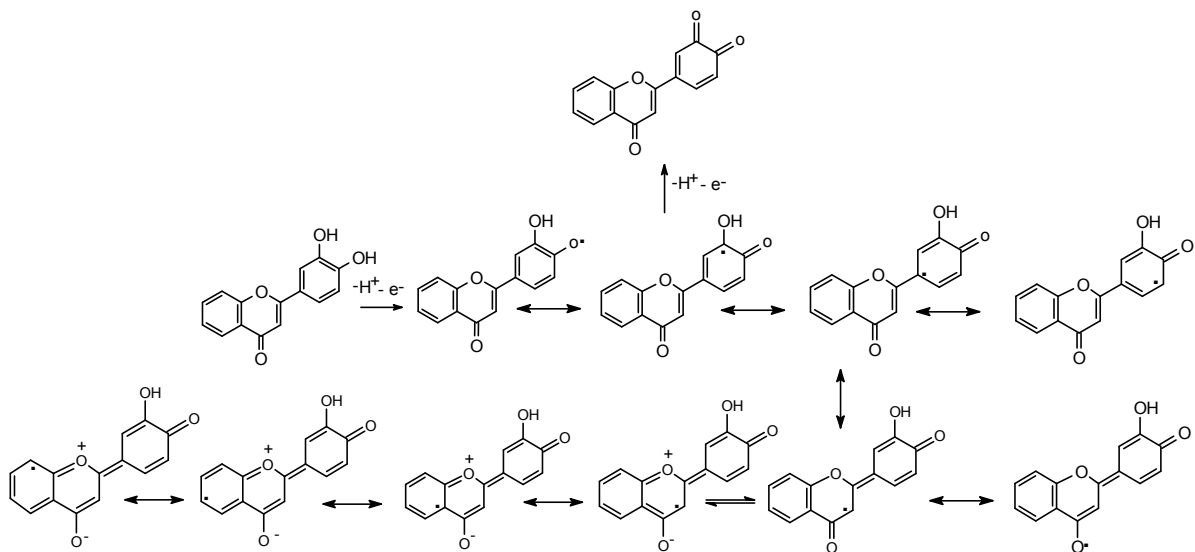
Broj hidroksilnih grupa u molekulu fenolnih kiselina utiče na antioksidativnu aktivnost; sa povećanjem broja hidroksilnih grupa raste i antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina. Karboksilna grupa u molekulima derivata benzojeve kiseline, zbog svojih elektronakceptorskih osobina, umanjuje sposobnost odavanja atoma vodonika iz hidroksilnih grupa. Hidroksi derivati cimetine kiseline poseduju veću antioksidativnu aktivnost od odgovarajućih hidroksi derivata benzojeve kiseline (Rice-

Evans i sar., 1996). Mehanizam antioksidativnog delovanja derivata cimetine i benzoeve kiseline otpuštanjem atoma vodonika prikazan je na slici 13 (Zhou i sar., 2006).



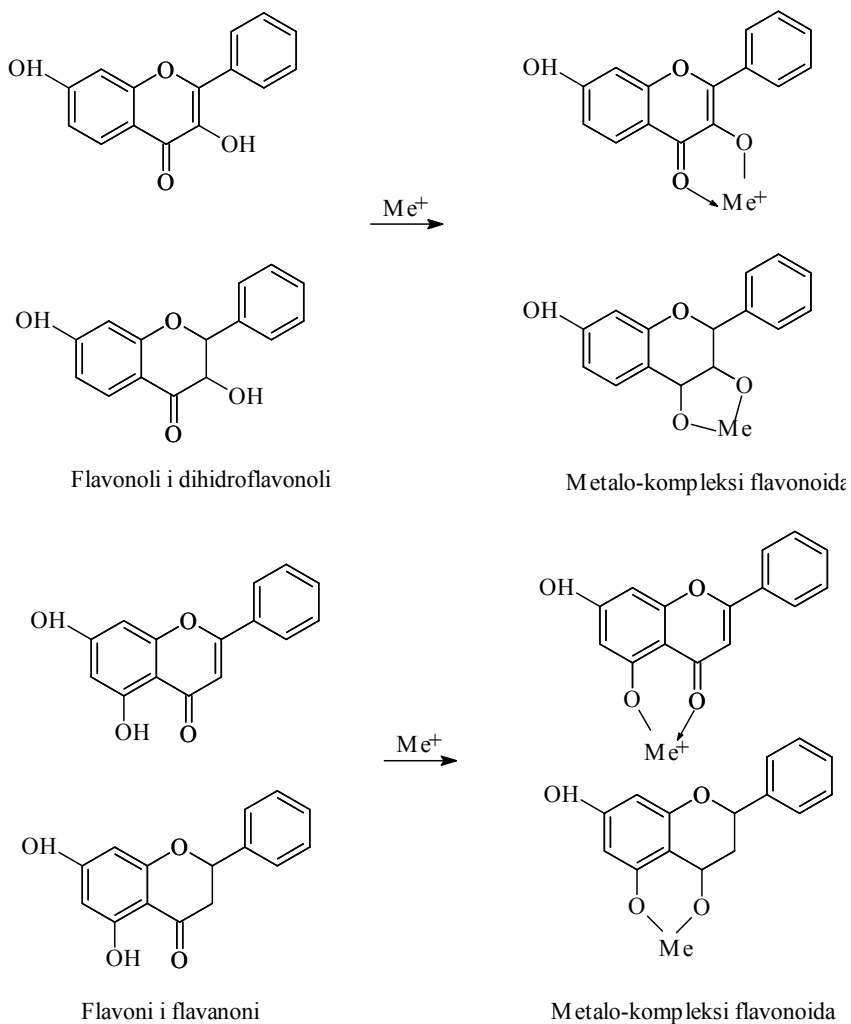
Slika 13. Nastajanje aroksil radikala i formiranje rezonantnih struktura kod derivata cimetine i benzoeve kiseline

Strukturne karakteristike od značaja u proceni antioksidativnog potencijala flavonoida su: prisustvo hidroksilnih grupa na C₃ i C₅-atomima, prisustvo dvostruke veze između C₂ i C₃-atoma, prisustvo keto grupe na C₄-atomu, broj hidroksilnih grupa, međusobni položaj hidroksilnih grupa, prisustvo šećernog ostatka, prisustvo metoksi grupa, itd (Pietta, 2000; Heim i sar., 2002). Mehanizam antioksidativnog delovanja flavonoida otpuštanjem atoma vodonika prikazan je na slici 14 (Seyoum i sar., 2006).



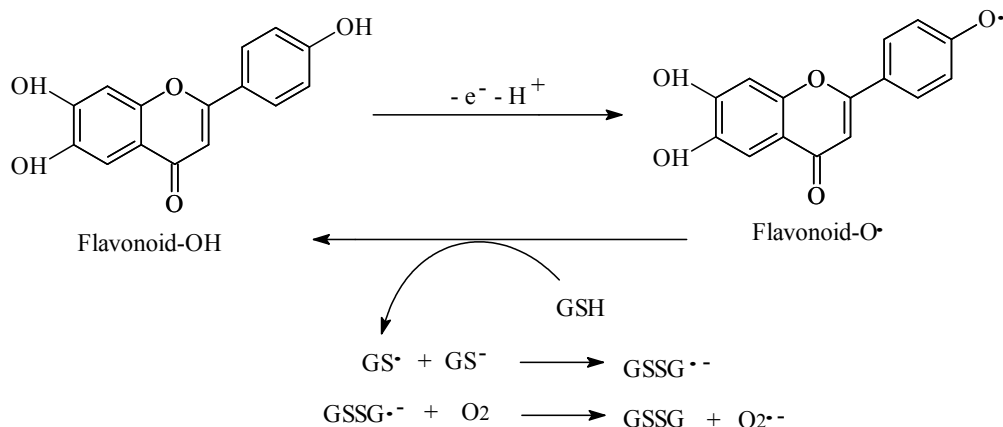
Slika 14. Nastajanje aroksil radikala i formiranje rezonantnih struktura kod flavonoida

Flavonoidi mogu ispoljavati antioksidativne osobine zahvaljujući mehanizmu heliranja tragova jona metala, koje omogućavaju 3'- i 4'-hidroksi grupe, 3-hidroksi i 4-oksi grupe, 4-oksi grupa i 5-hidroksi grupa (slika 15) (Guo i sar, 1996;. Ren i sar, 2008.), kao i 6 i 7-hidroksi grupe (Perez i sar., 2009).



Slika 15. Helirajući mehanizam flavonoida

Flavonoidi pod uslovima oksidativnog stresa mogu delovati prooksidativno, pa umesto "hvatanja", mogu formirati slobodne radikale. Mehanizam prooksidativnog delovanja flavonoida prikazan je na slici 16 (Rietjens i sar., 2002).



Slika 16. Mehanizam prooksidativnog delovanja flavonoida

Polifenoli nespecifičnim mehanizmima, pored antioksidativnog delovanja mogu uzrokovati promene strukture i fizičkih karakteristika membrane, kao što su fluidnost i električni potencijal. Postojanje i hidrofobnih i hidrofilnih delova kod većine molekula polifenola, omogućava im da se lokaliziraju na različitim nivoima u membrani: I) na površini, na hidrofilnim delovima lipida, i/ili II) između slojeva, pri čemu može doći do interakcije polifenola sa hidrofobnim delovima lipida (Hendrich i sar., 2002; Yoshioka i sar., 2006; Sirk i sar., 2009). Polifenoli kada su adsorbirani na površini membrane predstavljaju fizičku prepreku za hidrosolubilne radikale (Verstraeten i sar., 2003), a kada su nalaze unutar slojeva u membrani, mogu "hvataći" LOO^\bullet , L^\bullet i druge liposolubilne radikale (Verstraeten i sar., 2003; Verstraeten i sar., 2005).

2.3.1.2. Specifični mehanizmi delovanja polifenola

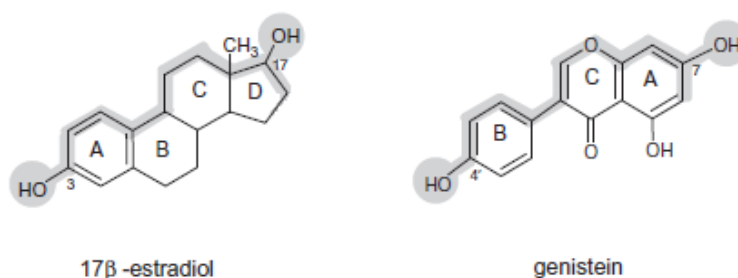
Kod nespecifičnih mehanizama biološku aktivnost određuju hemijske karakteristike zajedničke za sve polifenole (prisustvo fenolnih grupa). S druge strane, kod specifičnih mehanizama za delovanje određenih polifenolnih jedinjenja značajne su njihove posebne hemijske karakteristike. Od specifičnih mehanizama delovanja polifenola značajna je interakcija polifenola sa proteinima, jer može dovesti do različitih bioloških efekata u zavisnosti od funkcije proteina koji učestvuje u interakciji. Tako ove interakcije mogu prouzrokovati promenu enzimske aktivnosti, vezivanje transkripcionih faktora za specifična mesta u DNK, itd.

Različita polifenolna jedinjenja su efikasni inhibitori aktivnosti velikog broja enzima. Značajan broj enzima koji su uključeni kao meta polifenola su enzimi sa: I) purinima (npr. ATP) kao supstratima (kinaze, ATP-aze, ciklična nukleotid fosfodiesteraza, adenilat ciklaza, reverzne

transkriptaza, ksantin oksidaza, RNA i DNA polimeraze, ribonukleaza, humana DNK ligaza) i II) enzimi sa NADPH kao koenzimom (aldoza reduktaza, malat dehidrogenaza, laktoza dehidrogenaza, glutation reduktaze, itd) (Middleton i sar., 2000). Postavljena je hipoteza da neki polifenoli deluju kao inhibitori ATP-zavisnih enzima, putem kompeticije za ATP vezivno mesto na enzimu. Strukturne karakteristike koje su značajne kod ovog delovanja su prisutnost: dve hidroksilne grupe u 5 i 7 pozicijama kod flavonoida u prstenu A i nezasićena veza između atoma C₂ i C₃ zajedno sa 4-keto grupom u C prstenu (Lotito i Frei, 2006).

Nespecifičnim mehanizmima može se odigravati interakcija polifenola sa transkripcionim faktorima. Među polifenolima, određeni flavanoli (kao što su epikatehin, (+)-katehina i neki procijanidini) mogu modulirati brojne NF- κ B - regulisane gene koji su uključeni u inflamatorni proces i karcinogenezu (Park i sar., 2000; Mackenzie i sar., 2004; Mackenzie i Oteiza, 2006; Erlejman i sar., 2008; Mackenzie i sar., 2008). Epikatehin i dimer proantocijanidin B2 mogu inhibirati aktiviranje transkripcionog faktora NF- κ B (Mackenzie i sar., 2004).

Polifenoli sa različitim receptorima mogu takođe stupiti u interakciju nespecifičnim mehanizmima. Životinjski estrogene su steroidna jedinjenja čiji fiziološki odgovori su posredovani interakcijama sa dva estrogena receptora (ER): ER α i ER β . Izoflavoni poseduju estrogenu aktivnost kod životinja koja se zasniva na direktnoj interakciji između izoflavona i estrogennih receptora (Kuiper i sar., 1998). Sličnost između struktura estrogena i izoflavona daje sposobnost ovim polifenolnim jedinjenjima da deluju kao agonisti ili antagonisti estrogena (slika 17) (Messina, 2010).

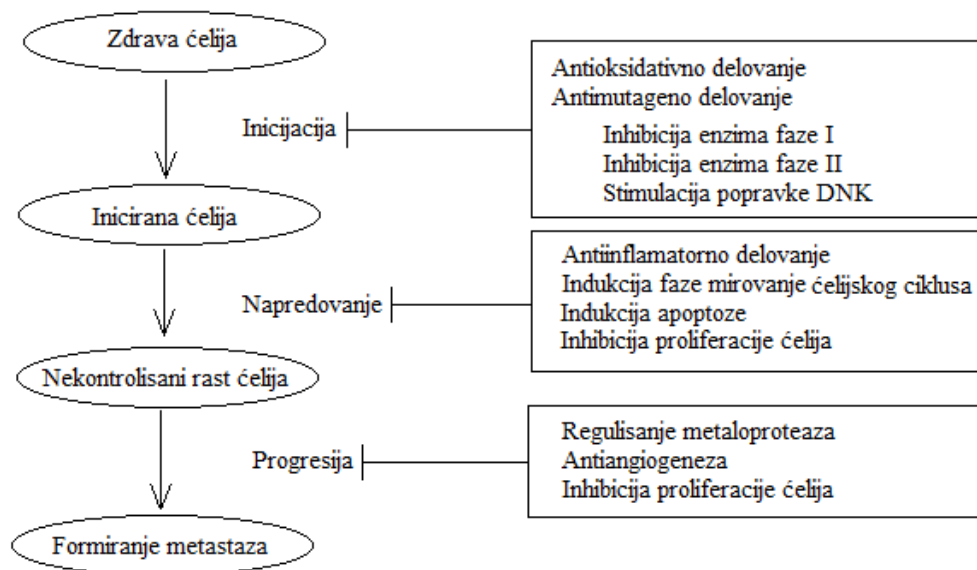


Slika 17. Sličnost između struktura estrogena i izoflavona

2.3.1.3. Polifenoli i kancerogeneza

Polifenoli i specifičnim i nespecifičnim mehanizmima delovanja mogu ispoljavati biološke funkcije koje se odnose na modulaciju karcinogeneze (Dai i Mumper, 2010; Fraga i sar., 2010). Različiti *in vitro* i *in vivo* sistemi su primenjivani kako bi se ispitaio antikancerogeni i antitumorski

potencijal prirodnih polifenolnih jedinjenja ili njihovih ekstrakata. Utvrđeno je da se inhibitorni efekat prirodnih polifenolnih jedinjenja u procesu kancerogeneze odigrava preko dva osnovna mehanizma: I) modifikacijom (promenom) redoks statusa i, II) učestvovanjem u osnovnim ćelijskim funkcijama (ćelijskom ciklusu, apoptozi, inflamaciji - upalnom procesu, angiogenezi i metastaziranju). Na slici 18 su prikazani potencijalni antikancerogeni mehanizmi biljnih polifenola pri kancerogenezi (Dai i Mumper, 2010).



Slika18. Potencijalni mehanizmi antikancerogenog delovanja biljnih polifenola pri kancerogenezi

Oksidativno oštećenje se smatra osnovnim faktorom koji doprinosi kancerogenezi. Zbog svoje sposobnosti "hvatanja" i smanjenja proizvodnje slobodnih radikala, kao i heliranja prelaznih metala, prirodna polifenolna jedinjenja mogu imati značanu hemopreventivnu aktivnost (Kampa i sar., 2007).

Sa druge strane, *in vitro* ispitivanja takođe upućuju da polifenoli mogu vršiti svoje inhibitorno delovanje kao prooksidanti na ćelije kancera. Utvrđeno je da mnogi polifenoli, kao što su flavonoidi - kvercetin, rutin, apigenin i fenolne kiseline - galna kiselina i kafena kiselina, mogu dovesti do oksidativnog prekidanja lanca DNK *in vitro* (Azmi i sar., 2006; Elbling i sar., 2005). Prema tome, antiproliferativni efekat nekih polifenolnih antioksidanata na ćelije kancera delimično je posledica njihovog prooksidativnog delovanja. Ipak, pretpostavljeno je da ova oksidativna osobina zavisi od količine kiseonika rastvorenog u test medijumu (Agullo i sar., 1996). Parcijalni pritisak kiseonika u kulturi ćelija (160 mmHg) je značajno veći nego u krvi ili tkivu (<40 mmHg), pa nije jasno da li bi se sličan mehanizam mogao pojaviti *in vivo*.

Prirodni polifenoli mogu uticati na osnovne ćelijske funkcije koje su povezane sa nastankom kancera brojnim različitim mehanizmima. U fazi inicijacije, polifenoli mogu sprečiti aktiviranje prokarcinogena inhibiranjem metaboličkih enzima faze I, kao što je citohrom P450 (Hodek i sar., 2002) i olakšavanjem detoksifikacije i uklanjanjem karcinogena indukcijom metaboličkih enzima faze II, kao što su glutation S-transferaza (GST), NAD(P)H kinin oksidoreduktaza (NQO) i UDP-glukuroniltransferaza (UGT-a) (Galati i sar., 2000). Oni takođe mogu ograničiti stvaranje iniciranih ćelija stimulišući DNK reparaciju (popravku) (Webster i sar., 1996; Imanishi i sar., 1991). Polifenolna jedinjenja mogu sprečiti formiranje i rast tumora indukcijom zaustavljanja ćelijskog ciklusa i indukcijom apoptoze. Maligne ćelije karakteriše prekomerna proliferacija, nemogućnost terminalne diferencijacije ili apoptoze pri normalnim uslovima. Regulacija ćelijskog ciklusa je izmenjena u ovim ćelijama. Prema tome ometanjem specifičnih proteina ćelijskog ciklusa, polifenoli potencijalno mogu blokirati kontinuirano širenje tumorogenih ćelija. Za polifenole je utvrđeno da utiču na rast ćelija indukcijom apoptoze, kod mnogih ćelijskih linija: jetre (HepG2), debelog creva (SW620, HT-29, CaCO-2, a HCT-116), prostate (DU-145 i LNCaP), pluća (A549), dojke (MCF-7), melanoma (SK-MEL-28 i SK-MEL-1) (Ramos i sar., 2005; Ramos, 2007). Indukcija apoptoze i/ili inhibicija proliferacije polifenolnim jedinjenjima može biti rezultat brojnih mehanizama, kao što su zaustavljanje ćelijskog ciklusa, blokiranjem ekstracelularno regulisane kinaze, inhibicijom aktiviranja transkripcionih faktora, NF- κ B i aktivator protein-1 (AP-1), suzbijanjem protein kinaze C i drugim (Fresco i sar., 2006; Ramos, 2008). Takođe, za polifenolna jedinjenja kao što je kvercetin (Chaumontet i sar., 1996) i resveratrol (Nielsen i sar., 2000) utvrđeno je da blokiraju indukovanu inhibiciju međućelijske GJC (*eng. gap junctional communication*). Važan faktor procesa karcinogeneze može predstavljati i proces inflamacije, jer hronična upala predisponira karcinogenezu. Polifenoli su pokazali i antiinflamatorne osobine. Takođe, utvrđeno je da polifenoli pokazuju i antiangiogenozni efekat (Mojzis i sar., 2008), što može biti važan faktor inhibicije rasta tumora.

2.3.2. Polifenolna jedinjenja iz sporednih proizvoda prehrambene industrije

Moure i saradnici (2001) su istakli da značajne količine polifenolnih jedinjenja zaostaju u različitim sporednim poljoprivrednim i industrijskim proizvodima. Pri industrijskoj preradi citrusa nastaje velika količina sporednih proizvoda (i do 50% ukupne mase ploda) (Bocco i sar., 1998), koji mogu biti značajni izvori polifenola. Naime, kora citrus voća sadrži veće količine ukupnih polifenola u odnosu na jestive delove plodova. Gorinstein i saradnici (2001) su utvrdili da je ukupni sadržaj polifenolnih jedinjenja u kori limuna, narandže i grejpfruta 15% veći od sadržaja u mesu voća. Ljuske

jabuke, breskve i kruške sadrže dva puta više ukupnih polifenolnih jedinjenja od mesa voća (Gorinstein i sar., 2002). Chang i saradnici (2000) su ispitujući osam sorti breskvi utvrdili da ljuska sadrži 2-2,5 puta veću količinu ukupnih polifenolnih jedinjenja u odnosu na meso. Prisustvo značajne količine polifenolnih jedinjenja utvrđeno je u tropu jabuka - ostatka nakon ceđenja soka koji se sastoji iz ljuske, semena i dela mesa jabuka (Ćetković i sar., 2008). Jestivi deo banana sadrži 232 mg polifenolnih jedinjenja/100 g suve materije, a ta količina predstavlja oko 25% polifenola koji se nalaze u kori (Someya i sar., 2002). Slično tome, Li i saradnici (2006) su utvrdili da kora nara sadrži 249,4 mg/g polifenolnih jedinjenja, dok sadržaj polifenolnih jedinjenja u mesu nara iznosi samo 24,4 mg/g. Sadržaj polifenola u ljusci jabuke iznosi i do 3300 mg/100 g suve materije (Wolfe i Liu, 2003), a u liofilizatu tropa jabuke oko 118 mg/g (Schieber i sar., 2003). Sporedni proizvodi prerade maslina, posebno postekstrakciona pogača nastala posle ceđenja maslinovog ulja, takođe predstavljaju izvor polifenola (Ranalli i sar., 2003). Semenke i pokožica grožđa, sporedni proizvodi soka od grožđa i od vina, takođe su bogat izvor polifenolnih jedinjenja, posebno proantocianidina (Mandić i sar., 2008; Shrikhande, 2000; Torres i Bobet, 2001).

2.4. Karotenoidi

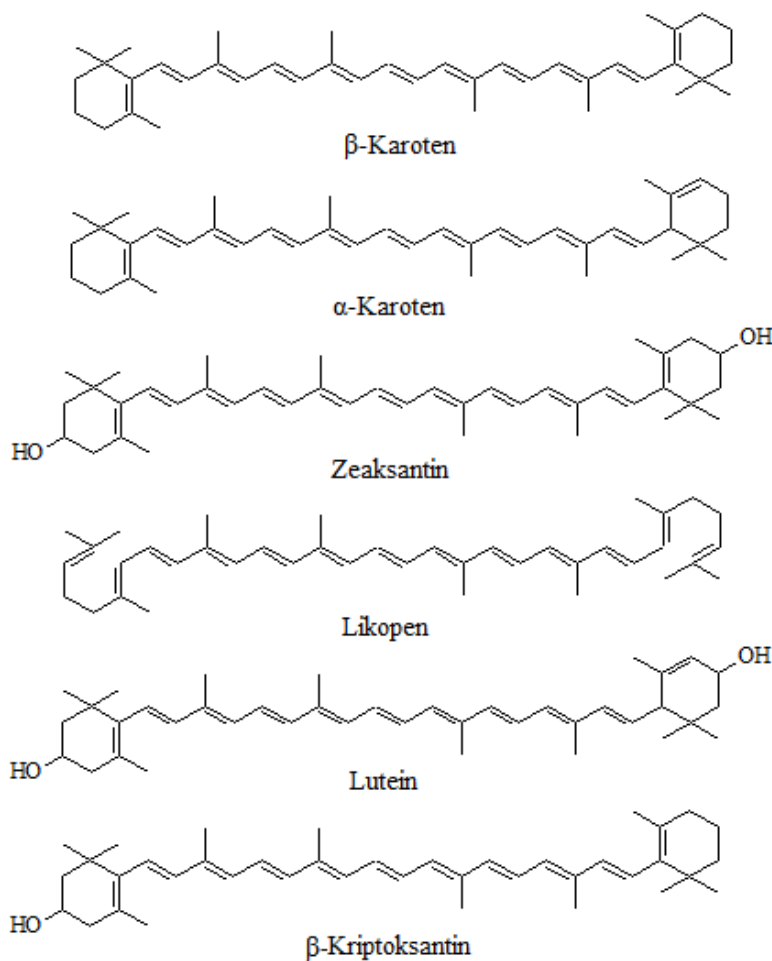
Karotenoidi su žuti, narandžasti ili crveni prirodni pigmenti odgovorni za boju mnogih plodova voća, povrća, cveća i lišća. Takođe, ima ih u jajima, algama i gljivama, kao i kod insekata, ptica i riba. Samo biljke, bakterije, gljive i alge mogu sintetisati karotenoide, dok životinje u svoj organizam karotenoide unose hranom (Stahl i Sies, 2003). Po hemijskoj strukturi, karotenoidi su tetraterpeni, a po hemijskim i fizičkim osobinama pripadaju klasi lipida (Lajšić i Grujić-Injac, 1998).

Najznačajnija strukturna karakteristika karotenoida je sistem naizmeničnih dvostrukih i jednostrukih veza koje formiraju centralni deo ovog molekula. Konjugovani sistem u kome su π -elektroni delokalizovani duž čitavog polienskog lanca karotenoidima daje karakterističan oblik molekula, hemijsku reaktivnost i sposobnost apsorpcije svetlosti, odnosno boju. Krajevi molekula karotenoida mogu biti otvoreni (aciklični) i ciklizovani (aliciklični i aromatični) (Britton, 1995; Dutta i sar., 2005; Lajšić i Grujić-Injac, 1998). Polienska struktura čini karotenoide vrlo nestabilnim jedinjenjima, pa se dejstvom kiseonika i svetlosti lako oksiduju, ciklizuju i izomerizuju (Lajšić i Grujić-Injac, 1998).

Karotenoidi se dele u dve osnovne grupe. Prvu grupu čine karoteni (ugljovodonici) čija je jedna od osobina da se rastvaraju u nepolarnim rastvaračima. Drugu grupu čine oksidacioni proizvodi

karotenoida - ksantofili, koji se rastvaraju u polarnim rastvaračima (alkohol), a javljaju se kao alkoholi, aldehidi, ketoni, estri i druga jedinjenja (Stahl i Sies, 2003; Lajšić i Grujić-Injac, 1998).

Do sada je poznato više od 600 karotenoida, među kojima su sa aspekta ishrane ljudi najznačajniji: α -karoten, β -karoten, likopen, lutein, zeaksantin i β -kriptoksantin (slika 19) (Padovani i Amaya-Farfán, 2006).



Slika 19. Najznačajniji predstavnici karotenoida

Najvažnija uloga karotenoida u prirodi je da učestvuju u procesima fotosinteze. Karotenoidi biljaka nalaze se u hloroplastima gde su vezani za proteine, odnosno nalaze se u obliku hromoproteina. Smatra se da karotenoidi u fotosintezi imaju zaštitnu ulogu, odnosno štite hlorofil od fotodestrukcije kratkim svetlosnim talasima (ispod 400 nm) (Lajšić i Grujić-Injac, 1998). Takođe, smatra se da karotenoidi u fotosintezi imaju i pomoćnu ulogu u prenošenju kiseonika ili transformaciji i prenošenju energije u fotohemijским reakcijama.

2.4.1. Mehanizmi delovanja karotenoida

Različiti karotenoidi: ciklični (npr., β -karoten, α -karoten) i aciklični (npr. likopen, fitoen) karoteni, kao i brojni ksantofili (npr. zeaksantin, lutein i β -kriptoksantin) identifikovani su u humanoj plazmi i tkivima. Pored toga, u plazmi su pronađeni i brojni metaboliti karotenoida i oksidacioni proizvodi koji nastaju kao posledica interakcije karotenoida sa ROS (Young i Lowe, 2001).

U humanom organizmu karotenoidi, od kojih su najznačajniji α -karoten, β -karoten i β -kriptoksantin, imaju provitaminsku funkciju (provitamin-A karotenoidi) (Kadian i Garg, 2012). Pored provitaminske funkcije, karotenoidima se pripisuje antioksidativna i protektivna (hemopreventivna) uloga u humanom organizmu (Padovani i Amaya-Farfán, 2006). Brojne studije ukazuju da je ishrana bogata karotenoidima povezana sa smanjenjem rizika od nekih degenerativnih bolesti, uključujući različite vrste kancera, kardiovaskularne ili oftalmološke bolesti. Preventivni efekat je povezan sa njihovom antioksidativnom aktivnošću kojom štite ćelije i tkiva od oksidativnih oštećenja (Stahl i Sies, 2003). Uopšte, karotenoidi štite tkiva na osnovu svojih fizičko-hemijskih osobina, različitim biohemijskim mehanizmima: antioksidativnim delovanjem ("gašenjem" singletnog kiseonika ili peroksil radikala), inhibicijom abnormalne proliferacije ćelija, podsticanjem interćelijske komunikacije, poboljšanjem imunološkog odgovora, modulacijom metabolizma kancerogenih supstanci, itd (Olson, 1999; Padovani i Amaya-Farfán, 2006).

Sposobnost karotenoida da deluju kao antioksidanti (ili prooksidanti) u biološkim sistemima zavisi od brojnih faktora (Britton, 1995; Young i Lowe, 2001), od kojih su najznačajniji:

- (I) struktura molekula i fizičke osobine karotenoida;
- (II) mesto delovanja karotenoida u ćeliji;
- (III) sposobnost karotenoida za interakciju sa drugim karotenoidima ili antioksidantima (posebno, vitaminima C i E);
- (IV) koncentracija karotenoida i
- (V) parcijalni pritisak kiseonika.

(I) Struktura molekula (veličina i oblik molekula, kao i priroda, pozicija i broj supstituenata) i fizičke osobine (agregati ili monomeri, *cis*- ili *trans*- konfiguracije) karotenoida su veoma značajne za njihove antioksidativne osobine. Pretpostavlja se da je sistem konjugovanih dvostrukih C=C veza najvažniji faktor u procesima prenosa energije, kao što je fotosinteza. Priroda i položaj supstituenta molekula karotenoida takođe značajno utiče na antioksidativne osobine. Razlike u antioksidativnoj

aktivnosti karotenoida posledica su različite gustine elektrona. Na primer, prisustvo ketonske (astaksantin i kantaksantin) ili hidroksilne (izozeaksantin) grupe na C₄ atomu kod ksantofila utiče na smanjenje reaktivnosti ovih molekula, jer sprečava izdvajanje atoma vodonika.

Osim od strukturalnih karakteristika karotenoida, mehanizam i brzina njihovog reagovanja sa slobodnim radikalima značajno zavisi od prirode oksidativne vrste. Karotenoidi deluju kao antioksidanti tako što najčešće vezuju dve reaktivne vrste kiseonika, singletnog molekulskog kiseonika (¹O₂) i peroksil radikala (Stahl i Sies, 2003). Takođe, oni su i efikasni deaktivatori elektronski pobuđenih osetljivih molekula koji su uključeni u nastajanje radikala i singletnog kiseonika (Truscott, 1990; Young i Lowe, 2001; Stahl i Sies, 2003).

Karotenoidi poseduju sposobnost fizičkog i hemijskog "gašenja" ¹O₂, pri čemu je u oba slučaja neophodna bliska interakcija između karotenoida i ¹O₂ molekula (Stahl i Sies, 2003; Young i Lowe, 2001). Kod fizičkog "gašenja" ¹O₂ dešava se direktna razmena energije između karotenoida i ¹O₂. Energija singletnog molekulskog kiseonika se prenosi na molekul karotenoida, pri čemu nastaje kiseonik u osnovnom stanju i pobuđeni molekul karotenoida. Pobuđeni molekul karotenoida se vraća u osnovno stanje tako što svoju energiju prenosi na molekule rastvarača (Stahl i Sies, 2003). Konstante brzine fizičkog "gašenja" ¹O₂, koje su određene za različite karotenoide, pokazuju jasnu vezu između strukture karotenoida i njegove sposobnosti da se "uhvati" ¹O₂ putem prenosa energije. Ova sposobnost je direktno povezana sa energetske nivoom ekscitovanog stanja na koje prvenstveno utiče dužina konjugovanog C=C lanca, ali od uticaja mogu biti i druge strukturne karakteristike. Značajnu sposobnost "gašenja" ¹O₂ pokazuju α-karoten, β-karoten, zeaksantin i kriptoksantin, a najveću efikasnost fizičkog "gašenja" ¹O₂ poseduje likopen (Di Mascio i sar., 1989; Stahl i Sies, 2003). Hemijsko "gašenje" ¹O₂ može dovesti do destrukcije molekula karotenoida (Young i Lowe, 2001). Nasuprot fizičkom "gašenju", hemijske reakcije između pobuđenog kiseonika i karotenoida su od manjeg značaja, doprinoseći manje od 0,05% ukupnoj brzini "gašenja" pobuđenog kiseonika (Stahl i Sies, 2003).

Od različitih radikala koji nastaju pod oksidativnim uslovima u organizmu, karotenoidi najefikasnije reaguju sa peroksil radikalima. Vezivanjem ovih vrsta karotenoidi prekidaju slobodnoradikalnu reakciju lipidne oksidacije. Zahvaljujući lipofilnosti i sposobnosti karotenoida da vezuju peroksil radikale, smatra se da oni imaju važnu ulogu u zaštiti ćelijskih membrana i lipoproteina od oksidativnog oštećenja. Antioksidativno delovanje karotenoida u pogledu deaktivacije peroksil radikala najverovatnije zavisi od mogućnosti nastajanja radikalskih adukata koji formiraju rezonantno stabilizovani radikal ugljenika (Stahl i Sies, 2003).

Karotenoidi (CAR) sa peroksil radikalima (ROO[•]) mogu reagovati sledećim mehanizmima:

- formiranjem adukta (ROO[•] + CAR → [ROO-CAR][•]);
- otpuštanjem elektrona (ROO[•] + CAR → ROO⁻ + CAR^{•+}) i
- otpuštanjem atoma vodonika (ROO[•] + CAR → ROOH + CAR[•]).

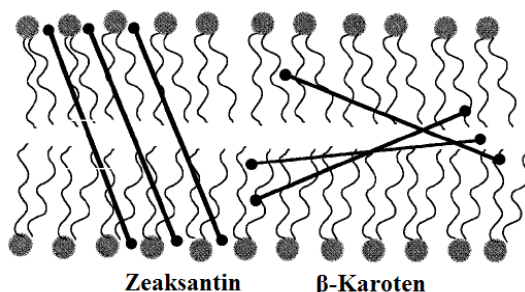
Većina podataka o antioksidativnom potencijalu karotenoida prema različitim ROS (posebno radikalima) dobijena je u *in vitro* ispitivanjima. Ova istraživanja izvedena su u organskim rastvaračima, jednostavnim micelama ili lipozomima, a dobijeni rezultati daju samo osnovne informacije o interakciji između karotenoida i ROS. *In vivo* uslovi, kao što su koncentracija karotenoida i heterogeni sastav većine tkiva, su kompleksniji od uslova u *in vitro* ispitivanjima. Naime, karotenoidi su u tkivima prisutni u zanačajno nižim koncentracijama od onih koje se obično primenjuju kod *in vitro* ispitivanja. Pored toga karotenoidi se u *in vitro* ispitivanjima nalaze slobodni, a ne u obliku kompleksa sa lipoproteinom, koji se najčešće nalaze u tkivima (Young i Lowe, 2001). Da bi delovali kao antioksidanti u *in vivo* uslovima, karotenoidi moraju biti inkorporirani u tkivo na tačno određenom mestu i u odgovarajućoj koncentraciji u odnosu na oksidujućeg agens i molekul koji treba da štite (Seabra i Pedrosa, 2010).

Strukturne karakteristike karotenoida, kao i prisustvo i priroda supstituenata (polarnih grupa), i *cis/trans* izomerizacija utiču i na druge osobine ovih molekula, npr. na rastvorljivost. Slaba rastvorljivost karotenoida u vodenoj sredini, odnosno dobra rastvorljivost u lipidnim slojevima posledica je navedenih faktora.

(II) Mesto delovanja karotenoida u ćeliji određeno je time što se u biološkim sistemima karotenoidi uglavnom ne nalaze slobodni nego vezani za proteinske ili lipoproteinske strukture. S obzirom na hidrofobni karakter karotenoida i njihovih proteinskih i lipoproteinskih kompleksa, delovanje karotenoida uglavnom je ograničeno na hidrofobne delove bioloških sistema, odnosno na hidrofobne delove osnovne membrane i membranskih struktura ćelije.

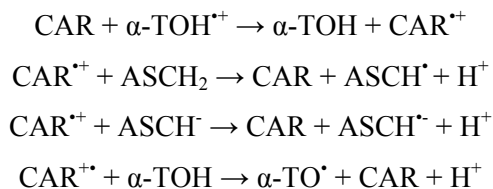
Inkorporacija odnosno orijentacija molekula karotenoida u lipidnom sloju membrane i membranskih struktura zavisi od strukture karotenoida i sastava membrane. Karoteni, kao što su likopen i β-karoten, se nalaze duboko u hidrofobnim delovima membrane, paralelno sa njenom površinom (slika 20). Nasuprot tome, ksantofili (npr. zeaksantin) u celini obuhvataju membranu (praktično se protežu od spoljašnje prema unutrašnjoj površini membrane), tako da je reakcija konjugovanih C=C veza moguća u svim slojevima membrane (slika 20) (Young i Lowe, 2001). S obzirom na položaj u membrani, zeaksantin deluje i kao važan faktor jačanja membrane. Takođe, ni svi ksantofili se ne ponašaju isto, jer i male strukturne razlike utiču na njihovo ponašanje. Na primer,

zeaksantin i lutein, ksantofili sa dve hidroksilne grupe, su različito orijentisani u membrani. Lutein se, zbog sposobnosti rotacije oko jednostruke C₆-C₇ veze, postavlja paralelno s površinom membrane.

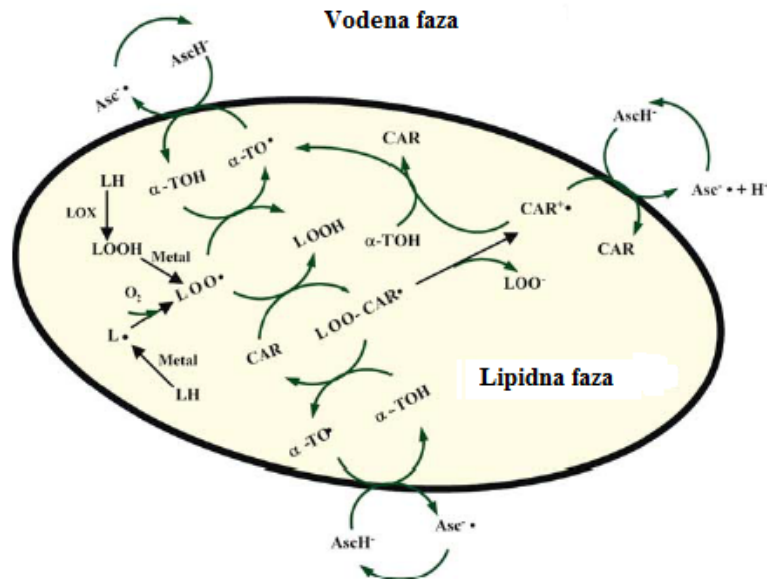


Slika 20. Shema membrane koja sadrži karotenoide (zeaksantin i β-karoten)

(III) Sposobnost karotenoida za interakciju sa drugim antioksidantima (posebno sa vitaminom C i E) omogućava sinergističko delovanje različitih antioksidanata čime se obezbeđuje efikasna barijera prema oksidaciji (Halliwell i Gutteridge, 1999). Sinergističko delovanje između karotenoida, vitamina E i C zasniva se na sledećim reakcijama (Truscott, 1996; Mortensen i Skibsted, 1997a; Edge i sar., 1998):



Prema navedenim reakcijama, molekul karotenoida, prenosom elektrona na tokoferol radikal katjon ($\alpha\text{-TOH}^{+\bullet}$), regeneriše vitamin E, pri čemu nastaje karotenoid katjon radikal ($\text{CAR}^{+\bullet}$). U prisustvu vitamina C (ASCH_2 i ASCH^{\bullet}) karotenoid katjon radikal može biti preveden u neradikalški oblik. Takođe, redukcijom karotenoid katjon radikala, vitamin E regeneriše karotenoid. Interakcija karotenoida, vitamina E i C u lipofilnim i hidrofilnim delovima plazme prikazani su na slici 21.

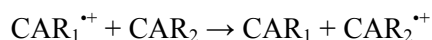


Slika 21. Interakcija karotenoida, vitamina E i C u lipofilnim i hidrofilnim delovima plazme

Karotenoidi mogu "uhvatiti" radikale sa jedne strane membrane (npr. sa luminalne strane membrane gde je visok nivo ROS), a sa druge strane (s obzirom da poseduju konjugovani polienski lanac koji omogućava karotenoidima da se prostiru kroz membranu), odmah mogu biti regenerisani vitaminom C (npr. sa citosolne strane membrane gde je nizak nivo ROS). Zbog ovog mehanizma delovanja karotenoidima je pripisana uloga transmembranskih radikalskih kanala. Karoteni, kao što su likopen i β -karoten, mogu biti regenerisani vitaminom C na površini membrane (Offord i sar., 2002). Karotenoidi kao transmembranski kanali radikala svrstavaju se prema tome u jedinstvenu kategoriju antioksidanata, odnosno mogu imati posebno značajnu ulogu u održavanju redoks homeostaze u toku povećane produkcije radikala (Johnson, 2009).

Böhm i saradnici (1998) su pokazali da je interakcija karotenoida sa vitaminima E i C moguća *in vitro*. Sinergističko delovanje koje pokazuju karotenoidi i drugi ko-antioksidanti zavisi od ravnoteže između svih tih komponenata. Povećanje koncentracije jedne od tih komponenti može poremetiti tu ravnotežu i smanjiti antioksidativnu sposobnost. Povećana koncentracija karotenoida može dovesti do stvaranja karotenoid katjon radikala ili adukata iznad nivoa na koje tokoferol/askorbat sprega može efikasno delovati, a što može dovesti do prooksidativnih efekata (Young i Lowe, 2001).

Karotenoidi su u biološkim sistemima najčešće prisutni kao heterogena smeša karotena i ksantofila, što daje mogućnost za interakciju između različitih karotenoida. Prenos elektrona između različitih karotenoida su ispitali Edge i saradnici (1998, 1999) ističući sposobnost karotenoid - karotenoid interakcije u biološkim sistemima:



Utvrđeno je sinergističko delovanje između različitih karotenoida (Stahl i sar., 1998), a kombinacija luteina i likopena pokazala se kao najefikasnije prema AMVN (2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitril) indukovanoj oksidaciji kod multilamelarnih lipozoma. Od ispitanih karotenoida, likopen je pokazao najbolje redukcijske sposobnosti, kao i sposobnost redukcije radikalskih katjona luteina i zeaksantina.

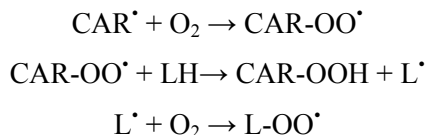
(IV) Koncentracija karotenoida može značajno uticati na antioksidativno delovanje karotenoida. U *in vitro* uslovima utvrđeno je da pri visokim koncentracijama karotenoida ili njihovih oksidacionih proizvoda može doći do promene u antioksidativnoj aktivnosti, odnosno ovi molekuli mogu delovati i prooksidativno. U prisustvu H₂O₂ ili ksantin/ksantin oksidaze (egzogeni izvor H₂O₂ i O₂^{•-}) u HT29 ćelijama adenokarcinoma, sposobnost β-karotena i likopena da zaštite ćelije od oštećenja DNK uočeno je samo pri niskim koncentracijama (~1-2 μM), dok je zaštitno delovanje nestalo pri povećanoj dozi karotenoida (>4 μM) (Lowe i sar., 1999). Relativno visoke koncentracije β-karotena takođe nisu delovale zaštitno na H₂O₂-indukovana oštećenja DNK u HepG2 ćelijama (Woods i sar., 1999).

Koncentracija karotenoida utiče i na osobine ćelijske membrane, tako npr. pri visokim dozama karotenoida, membrana HT29 ćelija postaje permeabilnija (Lowe i sar., 1999). Korelacija između oštećenja DNK i permeabilnosti membrane, ukazuje da prisutnost karotena (β-karoten i likopen) može povećati propustljivost za ROS prisutne u vodenoj fazi. Sa povećanjem koncentracije uočena su smanjenja u antioksidativnoj efikasnosti karotena, dok prooksidativni efekti nisu uočeni. Nasuprot tome, ksantofil, zeaksantin, pokazao je koncentracijski zavisnu zaštitu HT29 ćelija prema ksantin/ksantin oksidaza izazvanim DNK oštećenjima. Ovakvo ponašanje zeaksantina može se objasniti na osnovu činjenice da zeaksantin smanjuje fluidnost membrane, efikasno smanjujući brzinu propagacije lipidnog peroksil radikalskog lanca i permeabilnost membrane. Takođe, različite orijentacije zeaksantina i karotena u membranama mogu dovesti do toga da su ksantofili efikasniji u zaštiti od ROS (Young i Lowe, 2001).

Pri visokim koncentracijama, karotenoidi pokazuju sklonost prema formiranju agregata. *Cis*-izomeri karotenoida imaju manju tendenciju prema agregaciji u poređenju sa *trans*-izomerima (Britton, 1995). Agregati karotenoida su identifikovani u membranama i pretpostavlja se da njihova prisutnost ima značajan uticaj na osobine membrane odnosno da dovode do povećanja fluidnosti i propustljivosti membrana, pa prema tome i do efekata prooksidativnog tipa (Gruszecki, 1999; Young i Lowe, 2001).

(V) Parcijalni pritisak kiseonika takođe je važan faktor koji može uticati na antioksidativno delovanje karotenoida. Burton i Ingold (1984) su prvi ukazali da antioksidativno delovanje β -karotena zavisi od parcijalnog pritiska kiseonika. Pri niskom parcijalnom pritisku kiseonika (pO_2), β -karoten pokazuje antioksidativno delovanje, dok pri višim vrednostima pO_2 , ne samo da gubi antioksidativnu sposobnost, već pokazuje prooksidativno delovanje, kao posledicu autoksidacije.

Vrednost parcijalnog pritiska kiseonika utiče na interakciju karotenoida i peroksil radikala. Pri niskim vrednostima pO_2 karotenoidi poseduju sposobnost hvatanja peroksil radikala i prekidanja slobodnoradikalskih lančanih reakcija lipidne oksidacije. Pri visokim vrednostima pO_2 , autooksidacijom karotenoid radikala mogu nastati karotenoid peroksil radikali, koji imaju prooksidativno delovanje:



Iako ove reakcije nisu uočene *in vivo*, može se pretpostaviti da parcijalni pritisak kiseonika značajno utiče na delovanje karotenoida u biološkim sistemima, jer su pO_2 u različitim tkivima i organima u humanom organizmu značajno različiti (npr. plućna alveola - 100 mm Hg, venska krv - 40 mm Hg, u tkivima 5-15 mm Hg) (Halliwell i Gutteridge, 1999). Tumorska tkiva takođe imaju različite vrednosti parcijalnog pritiska kiseonika u odnosu na zdrava tkiva (Cruickshank i Rampling, 1994). Brojna *in vitro* i *in vivo* ispitivanja izvedena su pri visokim parcijalnim pritiscima kiseonika (760 mm Hg), pri kojima može doći do prooksidativnog efekta karotenoida, iako ovi uslovi nisu fiziološki. Prema tome, može se očekivati da će se karotenoidi različito ponašati u različitim delovima organizma, npr. mogu biti manje efikasni antioksidanti u plućima u odnosu na druga tkiva, što ne znači nužno da će karotenoidi delovati prooksidativno. Relativna efikasnost karotenoida u odnosu na druge antioksidante, posebno α -tokoferol takođe zavisi od parcijalnog pritiska kiseonika (Palozza i Krinsky, 1992). α -Tokoferol je kao antioksidant efikasniji pri visokom parcijalnom pritisku kiseonika, dok je β -karoten efikasniji pri niskom parcijalnom pritisku kiseonika.

Pored antioksidativnog mehanizma delovanja karotenoidi pokazuju i fotoprotektivni mehanizam delovanja. Fotooksidativni procesi imaju značajnu ulogu u patobiohemijskim procesima kod nekoliko bolesti tkiva izloženih svetlu. Zaštita od fotooksidativnih procesa je povezana sa antioksidativnim delovanjem karotenoida i/ili njihovim efektima filtriranja svetla (Bohm i sar, 2001; Stahl i sar, 2000). U jednom ispitivanju, kada je koža bila izložena stresu usled UV svetla, više

likopena je uništeno nego β -karotena, što je ukazuje na zaštitne efekte likopena prema oštećenjima nastalim usled oksidativnog stresa (Ribaya-Mercado i sar., 1995).

Likopen poseduje sposobnost inhibicije proliferacije ćelija kancera dojke, pluća i endometrijuma (Heber i Lu, 2002). U istraživanju Amir i saradnika (1999) utvrđeno je da sa povećanjem koncentracije likopena dolazi do inhibicije rasta ćelija promijelocitne leukemije (HL-60), odnosno do inhibicije ćelijskog ciklusa u G_0/G_1 fazi. Takođe, utvrđen je inhibitorski efekat likopena na rast MCF-7 ćelija, koji je pripisan smetnjama do kojih dovodi likopen u IGF-I receptor signalizaciji i progresiji ćelijskog ciklusa (Karas i sar., 2000).

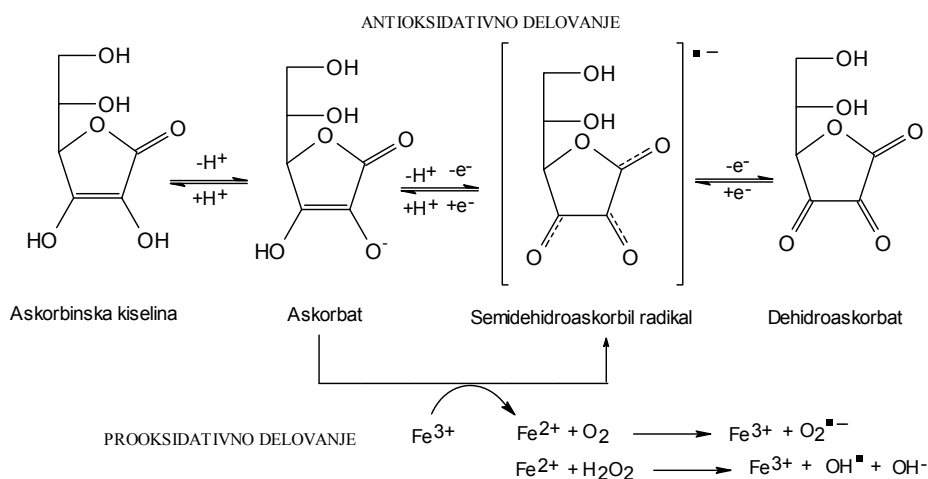
Karotenoidi stimulatивно deluju, odnosno povećavaju međućelijsku intercelularnu komunikaciju (*eng. gap junctional communication - GJC*). Ova međućelijska veza se sastoji iz dvanaest proteina, od kojih je po šest smešteno u membranama susednih ćelija. Putem ove veze moguća je komunikacija između dve ćelije, razmena molekula i jona, nutrijenata, otpadnih proizvoda i informacija. GJC ima važnu ulogu u kontroli ćelijskog rasta (diferencijaciji, proliferaciji i apoptozi) (Aust i sar., 2003; Kumar i Gilula, 1996). Netumorske ćelije komuniciraju preko GJC, dok je većina tumorskih ćelija imaju disfunkcionalnu GJC. Brojni dokazi ukazuju da je gubitak GJC pokazatelj karcinogeneze. Karotenoidi poseduju sposobnost ponovnog uspostavljanja ili povećanja GJC između "normalne" i "izmenjene" ćelije, što se pripisuje njihovim kancer-preventivnim osobinama (Heber i Lu, 2002). S obzirom da korelacija između indukcije GJC i "gašenja" singletnog kiseonika nije utvrđena, pretpostavljeno je da GJC i antioksidativna aktivnost u prevenciji kancera deluju nezavisno (Charleux, 1996; Kadian i Garg, 2012).

2.5. Vitamin C

Vitamin C (askorbinska kiselina) je esencijalni nutrijent, koji je neophodan za mnoge metaboličke procese u ljudskom organizmu. Sposobnost doniranja elektrona vitamina C ima najvažniju ulogu kod svih njegovih do sada poznatih funkcija. S obzirom na njegovu prirodu i elektrondonorske osobine, vitamin C je hidrofilni antioksidant u humanom organizmu (Padayatty i sar., 2003). Mnoge biljke i životinje same mogu sintetisati vitamin C, dok se u humanom organizmu vitamin C ne može sintetisati zbog nedostatka enzima gulonolakton oksidaze, pa se mora unositi putem hrane. Vitamin C je neophodan pri sintezi kolagena, karnitina i neurotransmitera, ima značajnu ulogu donora elektrona kod važnih enzima, poseduje antioksidativna, antiaterogena, antikancerogena, imunomodulatorska i druga svojstva. Međutim, pretpostavlja se da je osnovna uloga vitamina C u ćeliji, uloga redukcionog sredstva (Naidu, 2003; D'Silva i sar., 2011).

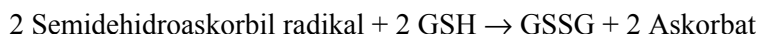
Oksidacijom vitamina C nastaje semidehidroaskorbil radikal, koji gubeći još jedan elektron, daje dehidroaskorbat. Antioksidativna svojstva vitamina C proizilaze iz sposobnosti da deluje kao donor H-atoma i elektrona, pa je veoma dobar "hvatač" mnogih slobodnih radikala i neradikalnih vrsta (Carr i Frei, 1999; Lee i sar., 2004).

Vitamin C može delovati i prooksidativno, ako je prisutan u većoj koncentraciji, jer redukuje jone prelaznih metala (slika 22). Redukovani joni prelaznih metala, reagujući sa vodonik peroksidom ili lipidnim hidroperoksidom, mogu dovesti do produkcije hidroksil ili alkoksil radikala i inicirati proces lipidne oksidacije. S obzirom da su joni metala *in vivo* kompleksno vezani za proteine, u normalnim fiziološkim uslovima, vitamin C poseduje antioksidativna svojstva. Izuzetno, s unosom visokih doza, ali i u uslovima visokih koncentracija gvožđa ili pri oslobađanju jona metala iz kompleksa sa proteinima, vitamin C može ispoljiti prooksidativna svojstva (Rietjens i sar., 2002).

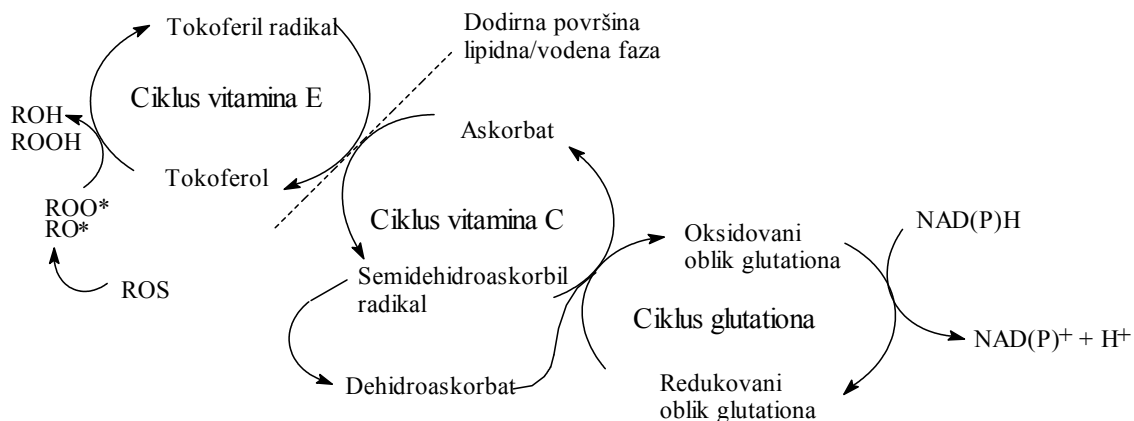


Slika 22. Antioksidativno i prooksidativno delovanje vitamina C

Regeneracija vitamina C se vrši redukcijom dehidroaskorbata ili semi-dehidroaskorbil radikala koju katalizuje enzim dehidroaskorbat reduktaza:



Vitamin C poseduje sposobnost regeneracije drugih antioksidanata kao što su: α -tokoferol, mokraćna kiselina i β -karoten iz njihovih radikalnih oblika (Carr i Frei, 1999). Redukcija askorbinskom kiselinom *in vivo* se događa na površini membrane i lipoproteina. Shema ciklusa glutationa i vitamina C i E je prikazana na slici 23 (Packer i sar., 2001).



Slika 23. Šema ciklusa glutaciona i vitamina C i E

2.6. Prehrambena vlakna

Prema najšire prihvaćenoj definiciji, prehrambena vlakna (hemiceluloza, celuloza, lignin, oligosaharidi, pektini, gume i voskovi) su delovi biljnih ćelija koji su otporni na hidrolizu (varenje) humanim enzimima (Trowell, 1974). Asp i Johansson (1984), kao i Selvendran i Robertson (1994) definišu vlakana kao grupu neskrobnih polisaharida i lignina, koja obuhvata i nekoliko nesvarljivih polisaharida pored osnovnih komponenata ćelijskog zida, dok Cummings i Englyst (1991) podrazumevaju da prehrambena vlakna čine samo neskrobni polisaharidi. Mongeau i saradnici (1999) smatraju da se biljni materijal može definisati kao prehrambena vlakna ako dolazi iz ćelijskog zida biljnog tkiva (hrane), pri čemu je njegoova struktura netaknuta, a koja se mogu odrediti metodama analize prehrambenih vlakana. Hemičari Američkog udruženja za žitarice (*eng. American Association of Cereal Chemists*) su usvojili definiciju, prema kojoj su prehrambena vlakana jestivi delovi biljke ili odgovarajući ugljeni hidrati koji su otporni na varenje i apsorpciju u humanom tankom crevu sa potpunim ili delimičnom fermentacijom u debelom crijevu (Rodríguez i sar., 2006). Meyer (2004) je predložio da vlakna čine sastavni deo hrane koja se konzumira svakodnevno, pri čemu su glavni izvor vlakna biljke, povrće, žitarice, drvenaste biljke, voće, mahunarke, itd. Na osnovu simulirane crevne rastvorljivosti, prehrambena vlakna su klasifikovana kao nerastvorljiva i rastvorljiva vlakna. Nerastvorljiva vlakna su lignini, celuloze i hemiceluloze, a rastvorljiva vlakna su pektini, beta-glukani, galaktomani, gume i veliki broj nedigestibilnih oligosaharida uključujući i inulin.

Prehrambena vlakna sadrže sve karakteristike potrebne da se mogu smatrati funkcionalnim jedinjenjima, zbog korisnih efekata, kao što su: smanjenje vremena prolaska hrane kroz creva, smanjenje nivoa holesterola i šećera, uklanjanje supstanci koje mogu biti opasne za humani organizam

(mutageni i kancerogeni agens), podsticanje revitalizacije crevne flore, itd (Heredia i sar., 2002). Takođe, deluju kao zaštitno sredstvo protiv kardiovaskularnih oboljenja, divertikuloza, zatvora, iritacije i kancera debelog creva, kao i dijabetesa (Tavaini i LaVecchi, 1995; Pietinen, 2001). Nerastvorljiva vlakna deluju na regulisanje rada creva, dok je delovanje rastvorljivih vlakana povezano sa smanjenjem nivoa holesterola i adsorpcije crevne glukoze (Scheneeman, 1987; Schneeman, 1999; Tudorica i sar., 2002; Brown i sar., 1999; Esposito i sar., 2005). Takođe, rastvorljiva vlakna predstavljaju dobru podlogu (supstrat) za bakterije mlečno-kiselinskog vrenja i bifidobacteria vrste koje imaju pozitivne efekte na zdravlje creva (prebiotsko delovanje) (Grizard i Barthelemy, 1999).

Prehrambena vlakna (neskrobnii polisaharidi) poseduju antioksidativne osobine. Nekoliko frakcija polisaharida pirinčanih mekinja pokazalo je protektivne osobine u odnosu na superoksid i hidrosil radikale, peroksidaciju ulja, kao i redukciju i helirajuću sposobnost (Zha i sar., 2009; Elleuch i sar, 2011). Utvrđena je inverzna korelacija između unosa rastvorljivih vlakana (prisutnih u cerealijama, mahunarkama, voću i povrću) i rizika od kardiovaskularnih bolesti i kancera, međutim mehanizmi koji su odgovorni za aktivnosti prehrambenih vlakana su samo delimično razjašnjeni (Esposito i sar., 2005).

Vlakana sa značajnom antioksidativnom aktivnošću mogu se koristiti kao dodatak koji poboljšava oksidativnu stabilnost namirnica sa visokim sadržajem masti, čime se produžava i vek trajnosti. Pored povećanja oksidativne stabilnosti, prehrambena vlakna kao dodatak proizvodu mogu unaprediti i druge tehnološke osobine (kapacitet vezivanja masti, kapacitet zadržavanja vode, sposobnost formiranja gela, teksturu i viskoznost), a takođe mogu poboljšati i fiziološke funkcije (laksativi, smanjenje nivoa holesterola i šećera u krvi, smanjenje rizika od hroničnih bolesti srca, dijabetesa, gojaznosti i nekih oblika kancera). Posebno kod fitnes hrane prehrambena vlakana kao dodatak mogu naći primenu radi smanjenja kalorija, holesterola ili masti (Elleuch i sar, 2011).

2.6.1. Prehrambena vlakna iz sporednih proizvoda prehrambene industrije

Značaj prehrambenih vlakana doveo je poslednjih godina do sve većeg zahteva potrošača i razvoja tržišta za proizvode bogate prehrambenim vlaknima, koja poseduju pozitivne zdravstvene efekte (Chi-Fai i sar., 2003). Poslednjih godina postoji značajan trend za pronalaženjem novih izvora prehrambenih vlakana, koja se mogu primenjivati u različitim proizvodima (Chau i Huang, 2003). Jedan od mogućih izvora prehrambenih vlakana su sporedni proizvodi prehrambene industrije. Prehrambena vlakna primenu mogu naći kao dodatak prehrambenim proizvodima sa niskim sadržajem prehrambenih vlakana (Rodríguez i sar., 2006).

Sporedni proizvodi koji sadrže značajne količine ljuske i semena, mogu biti ograničavajući faktor sa aspekta komercijalizacije nekog proizvoda, jer predstavljaju značajne gubitke u odnosu na sirovine, što povećava cenu proizvoda (Schieber i sar., 2001). Od mnogih bioaktivnih jedinjenja, značajne količine pektina i polifenolnih jedinjenja se mogu izolovati iz sporednih proizvoda nastalih pri preradi jabuka. Brojne vrste voća, posebno pomorandže, jabuke i breskve se često primenjuju za proizvodnju soka. Sporedni proizvodi zaostali posle ceđenja soka sadrže značajne količine različitih jedinjenja, među kojima frakcija prehrambenih vlakana ima veliki potencijal za proizvodnju funkcionalne hrane. Takođe, neke vrste povrća, kao što su biber, artičoke, luk i špangle, tokom prerade generišu sporedne proizvode bogate i rastvorljivim i nerastvorljivim vlaknima koja mogu biti primenjena u dizajniranju nove funkcionalne hrane (Rodriguez i sar., 1999).

Značajan izvor visoko razgranatih pektina predstavlja pokožica manga (Sudahakar i Maini, 2000). Sporedni proizvodi prerade kivija sadrže 25% vlakana izraženo na suvu materiju (Martin-Cabrejas i sar., 1995). Ljuska ananasa sadrži visok procenat (oko 70%) nerastvorljivih vlakana (Salvi i Rajput, 1995; Larrauri i sar., 1997). Sporedni proizvodi prerade maslina pri proizvodnji ulja takođe predstavljaju bogate izvore bioaktivnih jedinjenja (polifenola i prehrambenih vlakana) (Heredia i sar., 1993).

Najpoznatije namirnice obogaćene vlaknima su žitalice za doručak i pekarski proizvodi (integralni hleb i kolači) (Cho i Prosky, 1999; Nelson, 2001), kao i mleko i proizvodi od mesa. Obogaćivanjem pekarskih proizvoda prehrambenim vlaknima iz voća, postiže se bolji nutritivni kvalitet, veće količine ukupnih i rastvorljivih vlakana, niža kalorijska vrednost, veći antioksidativni kapacitet, bolja fermentabilnost i sposobnost zadržavanja vode (Grigelmo-Miguel i Martín-Belloso, 1999a; Larrauri i sar., 1996; Saura-Calixto, 1998). Dodatak prehrambenih vlakana pekarskim proizvodima se može poboljšati nutritivni kvalitet, jer se primenom prehrambenih vlakana smanjuje sadržaj masti, pri čemu ne dolazi do smanjenja kvaliteta (Byrne, 1997; Martin, 1999).

U slučaju napitaka, dodatak prehrambenih vlakana povećava njihovu viskoznost i stabilnost. Rastvorljiva vlakna se češće primenjuju zbog bolje disperznosti u vodi od nerastvorljivih vlakana. Rastvorljiva vlakana, kao što su pektini, inulin, karboksimetilceluloza primenjena su kao funkcionalni dodaci mleku (Nelson, 2001).

Prehrambena vlakna čija su osnova pektini, celuloza, izolati soje, pšenice, kukuruza i pirinča mogu poboljšati strukturu mesnih proizvoda, kao što su kobasice, salame i paštete, pri čemu se dobijaju proizvodi sa niskim sadržajem masti. Takođe, s obzirom da prehrambena vlakna poseduju sposobnost zadržavanja vode, ona će doprineti njihovom ukusu (sočnosti), jer će se iz matriksa mesa

isparljive komponente (koje utiču na ukus) izdvajati sporije (Chevance i sar., 2000; Desmond i sar., 1998; Mansour i Khalil, 1999).

Kod džemova i marmelada najčešće se dodaju pektini sa različitim stepenom esterifikacije, koji predstavljaju značajan faktor stabilnosti proizvoda (Grigelmo-Miguel i Martín-Belloso, 1999b; Grigelmo-Miguel i Martín-Belloso, 2000). Kod čokolade sa niskom kalorijskom vrednošću prehrambena vlakna, kao što su inulin i oligofruktoza, mogu primeniti kao zamena za šećer (Gonze i Van der Schueren, 1997).

2.7. Paradajz

Paradajz je jednogodišnja dikotiledona biljka čiji se plod koristi za ishranu u botaničkoj zrelosti (slika 24), ali i kao zelen (kišeljenje). Botanički zreli plod se koristi u ishrani kao ukusna salata, dodatak različitim jelima i sirovina za različite oblike prerade. Za ljudsku shranu u svežem stanju je posebno značajan zbog sadržaja ugljenih hidrata, organskih kiselina i vitamina C, visokog sadržaja kalijuma i male kalorijske vrednosti. Od ploda se dobija sok, pire, može da se suši, marinira i kiseli u zelenom stanju. Iz semena se rafinira jestivo ulje, a kao hrana za životinje koriste se ostaci ploda (sadrže oko 38% belančevina, do 12% ulja i dr.) (Lazić i sar., 1998).



Slika 24. Plod paradajza

Kultivisane sorte paradajza vode poreklo od divljih srodnika, koji su i danas deo spontane vegetacije na prostorima oko Anda u Južnoj Americi. Migracijama indijanskog stanovništva na područje centralne Amerike i Meksika s područja Anda, prenesene su divlje forme paradajza, gde su ih kultivisali i koristili za jelo početkom sedmog veka (Matotan, 2008). U kultivisanju paradajza značajnu ulogu imalo je indijansko pleme Asteci koji su ga nazvali "xtomatl". Od tog imena potiče naziv tomati, kojim su paradajz nazvala druga indijanska plemena centralne Amerike i koji je koren reči paradajz u mnogim jezicima. U Evropu je paradajz najverovatnije prenet početkom XVI veka, prvo u Španiju, Italiju i Portugal, a zatim i u ostale delove. Paradajz je u početku bio uzgajan kao ukrasna biljka i nije

se koristio za jelo. Smatralo se da su njegovi plodovi otrovni zbog sličnosti sa nekim srodnim rasprostranjenim vrstama iste botaničke porodice, čija je otrovnost bila poznata. Prvi opis biljke paradajz napravio je talijanski botaničar Mattioli 1544. godine nazvavši je "pomi d'oro", zlatna jabuka, što ukazuje da su prvodonešene biljke imale žute plodove. Od tog opisa vodi poreklo i današnji talijanski naziv za paradajz "pomodoro". Smatra se da se paradajz za jelo u Evropi prvo počeo koristiti u Italiji sredinom šesnaestog veka, a zatim se njegova upotreba proširila u ostale mediteranske zemlje, a kasnije i na područje severne Evrope. U Francusku su se najverovatnije proširile nove forme krupnijih crvenih plodova, zbog čega su ih Francuzi nazvali "pomme d'amour" ili jabuka ljubavi. Novopridošlo povrće je u Nemačkoj dobilo naziv "paradiesapfel" što znači rajska jabuka. Današnji naučni naziv paradajza *Lycopersicon esculentum* predložio je engleski botaničar Miller 1768. godine, što bi u prevodu značilo vučja jestiva jabuka (Matotan, 2008). Kao povrće paradajz se počeo gajiti početkom devetnaestog veka, i to prvo u Španiji, Italiji i Holandiji. U našim krajevima paradajz se počeo koristiti za ishranu krajem devetnaestog veka, ali samo zelen, za kišljenje (turšija) (Lazić i sar., 1998).

2.7.1. Botaničke karakteristike

Paradajz pripada familiji *Solanaceae*, rodu *Lycopersicon Tourn.* U savremenoj klasifikaciji navodi se devet vrsta i to gajena vrsta, *Lycopersicon esculentum* i osam divljih vrsta. Odlikuje se dobro razvijenim korenovim sistemom snažne moći upijanja. Mlada biljka paradajza prvo razvija centralni vretenasti koren, a vrlo brzo i bočno korenje koje po svojoj razvijenosti skoro dostiže razvijenost glavnog korena. Gotovo koliko duboko koren prodire u tlo, toliko se i širi i bočno (i do 1,5 m). Stabljika paradajza je zeljasta člankovita, a kod pune razvijenosti biljke, u donjem delu, odrveni i dostiže prečnik 2-4 cm. Stabljika je zelene boje, s jače ili slabije izraženom ljubičastom nijansom. Kod mladih biljaka stabljika je okruglog preseka, a starenjem postaje rebrasta. Površinski je obrasla gustim sitnim dlačicama koje luče želatinoznu masu bogatu solaninom, što biljci daje specifičan prepoznatljiv miris. Pri slobodnom razvoju stabljika paradajza je jako razgranata i grmolikog je izgleda. Postoje dva osnovna tipa rasta stabljike paradajza, indeterminantan i determinantan. Sorte i hibridi indeterminantnog tipa rasta stabljike imaju kontinuirani rast i razvoj generativnih organa. Karakterišu ih dugi internodiji koji su često 15 cm i duži, a sama biljka može narasti i do nekoliko metara dužine. Vegetacijski vrh je aktivan tokom cele vegetacije, dajući nove listove i cvetne grančice. Bočne grane (zaperci) koje se redovno razvijaju iz osnove listova kod gajenja indeterminantnih sorti redovno se zakidaju, jer bi u suprotnom biljka imala grmoliki izgled. Zbog visoke stabljike takav tip sorti uzgaja

se uz oslonac. Sorte i hibridi determinantnog tipa rasta stabljike imaju kratke internodije dužine najčešće oko 3 cm. U uzgoju determinantnih sorti bočne grane se ne zakidaju, pa biljka ima grmolik izgled, visine je najčešće 60-80 cm i ne uzgaja se uz oslonac. Zbog istovremenog razvoja više bočnih grana, cvatnja i plodonošenje je dosta kratko, sazrevanje plodova je ujednačeno, pa se ovakav tip sorti može jednokratno brati kombajnima, što se uglavnom koristi u proizvodnji paradajza za preradu. Osim ova dva osnovna tipa sorti, zavisno od načina rasta stabljike, postoji i treći, prelazni ili poludeterminantne, koji je bujniji determinantni tip s nešto dužim internodijima.

Prvi kotiledonski listovi, obrasli sitnim dlačicama, pojavljuju se sa nicanjem paradajza. Pravi listovi, koji se nakon toga razvijaju, neparno perastog su oblika, sastoje se od dugačke peteljke i nekoliko jače ili slabije urezanih liski, različite veličine. Cvetovi paradajza sakupljeni su u grozdaste cvatove, koje čine cvetne grančice. Razvoj cvetova odvija se sukcesivno, prvo se otvaraju cvetovi najbliži stabljici, a poslednji oni na vrhu. Istim redom dozrevaju i plodovi u grozdu. Plod paradajza je dvo- ili višekomorna sočna bobica, različitog oblika, boje i veličine. Oblik ploda može biti pravilan (ovalni, eliptičan i izdužen), a pored toga plodovi mogu biti kruškolikog, šljivolikog i srcolikog oblika. Plodovi paradajza raznih sorti značajno se mogu razlikovati po veličini. Postoje sorte čiji su plodovi teški svega nekoliko grama do onih s težinom većom od pola kilograma. Površina ploda paradajza najčešće je glatka, ali može biti i rebrasta. Boja ploda najčešće je crvena, ali ima i sorti narandžastih, žutih, ljubičastih, ružičastih i belih plodova (Matotan, 2008).

2.7.2. Hemijski sastav

Poznavanje hemijskog sastava ploda paradajza je veoma značajno za ishranu i tehnologiju prerade i konzervisanja. Od hemijskog sastava zavisi hranljiva i dijetetska vrednost proizvoda, njegov kvalitet, izbor tehnološkog postupka, prinos i ponašanje sirovine u toku prerade, konzervisanja i skladištenja, kao i količina proizvoda. Komponente, koje se nalaze u paradajzu, količinom i međusobnim odnosom, formiraju organoleptička, hranljiva i biološka svojstva proizvoda. Sa tehnološkog aspekta značajan je sadržaj suve materije. Kvalitetnijim se smatraju one sorte koje imaju veći sadržaj suve materije. Kako veći sadržaj suve materije uslovljava i veći sadržaj pojedinih sastojaka, može se smatrati da takva sirovina ima veću hranljivu vrednost i povoljnija organoleptička svojstva.

Hemijski sastav ploda paradajza zavisi od sorte, mesta i načina proizvodnje (uzgajanja, agrotehničkih mera). Prosečan hemijski sastav ploda paradajza je: 94,2% vode, 0,95% proteina, 0,21% masti i 0,61% mineralnih materija (Đurovka, 2008). Od ugljenih hidrata, plod najviše sadrži glukozu i

fruktozu (1,5-2 puta manje od glukoze). Sadržaj pektina je mali (0,13-0,23%), ali je on značajan za strukturu i čvrstinu ploda, odnosno za konzistenciju prerađevina. Zreli plod sadrži organske kiseline, pre svega limunsku i jabučnu, a zatim i oksalnu. U plodu u prezrelom stanju smanjuje se sadržaj limunske i jabučne, a povećava sadržaj ćilibarne kiseline. Plod paradajza sadrži značajne količine mineralnih materija, posebno kalijuma, fosfora, magnezijuma i gvožđa. Od vitamina paradajz sadrži askorbinsku kiselinu, vitamine B₁ i B₂. Crvenu boju paradajzu daje likopen. Kod žutih plodova likopen je prisutan samo u tragovima. Plod paradajza sadrži i druge bojene materije (β-karoten i ksantofili). List i stablo paradajza sadrže tomatin, glikoalkaloid, koji je karakterističanog mirisa i gorkog ukusa, a ima i fungicidno svojstvo (Lazić i sar., 1998).

Najznačajnija antioksidativna jedinjenja prisutna u paradajzu su karotenoidi, polifenolna jedinjenja i askorbinska kiselina (Giovanelli i sar., 1999). Interval sadržaja antioksidativnih jedinjenja prisutnih u paradajzu dat u literaturi prikazan je u tabeli 4 (Frusciante i sar., 2007).

Tabela 4. Sadržaj antioksidativnih jedinjenja prisutnih u paradajzu

Antioksidanti	Sadržaj (mg/100 g paradajza)
Likopen	1,86-14,62
β-karoten	0,11-1,07
Fitoen	0,47-1,34
Fitofluen	0,23-1,16
Lutein	0,08-0,34
Vitamin E	0,11-1,84
Fenolne kiseline	2,75-4,68
Flavonoidi	1,15-8,16
Vitamin C	2,20-21
Prehrambena vlakna	0,8-1,3

Sadržaj antioksidativnih jedinjenja u semenu, ljusci i mesu paradajza se značajno razlikuje. U istraživanju kojim je obuhvaćeno 12 različitih genotipova paradajza, utvrđeno je da ljuska sadrži oko 2,5 puta više likopena u odnosu na meso paradajza (George i sar., 2004). Takođe, utvrđeno je da se u ljusci paradajza nalaze značajne količine polifenolnih jedinjenja i askorbinske kiseline. Sadržaj polifenolnih jedinjenja (izražen u mg katehina/100 g svežeg biljnog materijala) u mesu iznosi 9,2-27,0 mg/100 g, a u ljusci 10,4-40,0 mg/100 g; za svaki od ispitanih genotipova paradajza, sadržaj polifenolnih jedinjenja u ljusci je veći nego u mesu paradajza. Stewart i saradnici (2000) su određivali sadržaj flavonola u "cherry" paradajzu. U celom podu sadržaj flavonola iznosi 25,3 mg/kg svežeg paradajza. Ljuska paradajza sadrži najviše flavonola (143,3 mg/kg, 98% najzastupljenijeg flavonola - konjugovanog kvercetina iz paradajza nalazi se u ljusci), dok je sadržaj flavonola u mesu (1,2 mg/kg) i semenu (1,5 mg/kg) značajno niži. Sadržaj askorbinske kiseline u mesu paradajza iznosi 8,4-32,4

mg/100 g (George i sar., 2004). Značajan sadržaj askorbinske kiseline utvrđen je i u ljusci paradajza (9,0-56,0 mg/100 g). Toor i Savage (2005) su utvrdili da u tri ispitana genotipa paradajza, ljuska i seme u proseku sadrže 53% polifenola, 52% flavonoida, 48% likopena i 43% askorbinske kiseline prisutnih u celom paradajzu. Ljuska paradajza poseduje i veći sadržaj likopena u odnosu na meso i seme (Al-Wandawi i sar., 1985; Sharma i Le Maguer, 1996). Ovi rezultati ukazuju da ljuska i seme paradajza predstavljaju vrlo bogat izvor antioksidativnih jedinjenja.

Od polifenolnih jedinjenja paradajz sadrži flavonoide (halkonaringenin, naringenin, kemferol, kvercetin, miricetin i njihove glikozode) i fenolne kiseline (*p*-hidroksibenzoeva, salicilna, cimetna protokatehinska, *m*-kumarinska, *p*-kumarinska, *p*-kumaroilhinska, vanilinska, kafena, hlorogenska, ferulna i sinapinska kiselina) (Slimestad i Verheul, 2009). Sadržaj flavonoida (aglikona) u svežem paradajzu iznosi 15 mg/kg. Od flavonoida paradajz sadrži najviše naringenina (45%), kvercetina (39%), miricetina (10%) i kemferola (5%) (Slimestad i Verheul, 2009). Sadržaj polifenolnih jedinjenja zavisi od stepena zrelosti ploda i lokalizacije u plodu; najveća koncentracija je utvrđena u epidermalnom i placentalnom tkivu (Slimestad i Verheul, 2009).

Paradajz je izuzetno bogat izvor likopena (9,27 mg/100 g), a sadrži i druge karotenoide, kao što su fitoen (1,86 mg/100 g), fitofluen (0,82 mg/100 g), β -karoten (0,23 mg/100 g), γ -karoten (1,50 mg/100 g), ζ -karoten (0,21 mg/100 g), neurosporen (1,11 mg/100 g) i lutein (0,08 mg/100 g) (Khachik i sar., 2002).

Najznačajnija jedinjenja odgovorna za aromu paradajza su *cis*-3-heksenal, heksanal, *cis*-3-heksenol, β -jonon, β -damascenon, 1-penten-3-one, 3-metilbutanal, 2-isobutiltiazol (Yilmaz, 2001).

U semenu paradajza prisutno je 18-27% ulja (Board, 2002), koje sadrži više nezasićenih masnih kiselina (oko 80%) nego zasićenih. Od nezasićenih masnih kiselina u ulju semena su prisutne linolenska kiselina (C 18:2) i oleinska kiselina (C 18:1), u koncentraciji od 54%, odnosno 22%, dok je od zasićenih masnih kiselina kao dominantna palmitinska kiselina (C 16:0), u koncentraciji od 14% (Lazos i sar., 1998).

2.7.3. Antioksidativne i antiproliferativne osobine paradajza i proizvoda od paradajza

S obzirom na hemijski sastav paradajza, utvrđivanje antioksidativne aktivnosti paradajza i proizvoda od paradajza bio je predmet mnogih istraživanja (Toor i Savage, 2005; Rao i Agarwal, 1998; Gahler i sar., 2003; Dewanto i sar., 2002). Danas postoje brojne metode za ispitivanje antioksidativne aktivnosti, ali se uglavnom ističe da ispitivanja treba da uključe više različitih antioksidativnih testova da bi se precizno ispitala i definisala antioksidativna aktivnost (Chang i Liu, 2008).

Paradajz sadži hidrofilne i lipofilne antioksidante, pa se antioksidativna aktivnost ispituje ne samo u vodenim sistemima, nego i u ekstraktima koji su dobijeni ekstrakcijom paradajza organskim rastvaračima različite polarnosti (Arnao i sar., 2001). George i saradnici (2004) su ispitali antioksidativnu aktivnost heksanskih i metanolnih ekstrakata dvanaest genotipova paradajza na osnovu sposobnosti sprečavanja formiranja konjugovanih diena, pri čemu su utvrdili značajne razlike u antioksidativnoj aktivnosti pojedinih genotipova. Veća antioksidativna aktivnost zabeležena je kod heksanskih ekstrakata, koji sadrže likopen i druge karotenoide kao antioksidativne komponente, nego u metanolnim ekstraktima, koji sadrže polifenolna jedinjenja. Ispitivanjem antioksidativne aktivnosti metanolnih i heksanskih ekstrakata četrnaest "cherry" genotipova paradajza i četiri hibrida paradajza sa visokim sadržajem pigmenata, primenom FRAP (*eng. ferric reducing antioxidant power*) metode, Lenuci i saradnici (2006) su utvrdili da antioksidativna aktivnost i lipofilnih i hidrofilnih ekstrakata značajno zavisi od genotipa odnosno značajnu ulogu u antioksidativnoj aktivnosti paradajza imaju genetski faktori. Ovi rezultati ukazuju na potrebu da se proceni biodiverzitet zbog unapređenja programa oplemenjavanja, odnosno za poboljšanje hranljive vrednosti paradajza. Takođe, utvrđeno je da antioksidativna aktivnost lipofilnih ekstrakata ima niže vrednosti, što se može objasniti i nepouzdanošću FRAP metode u proceni antioksidativne aktivnosti lipofilnih ekstrakata, jer karotenoidi ne poseduju mogućnost redukcije gvožđe(II)-hlorida (George i sar., 2004; Pulido i sar., 2000). Ilahy i saradnici (2011) su ispitali antioksidativnu aktivnost, kao sposobnost "hvatanja" ABTS (*eng. 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt*) radikala, lipofilnih i hidrofilnih ekstrakata pet genotipova paradajza sa visokim sadržajem likopena (Lyc0 1, Lyc0 2, HLY 02, HLY 13, HLY 18 i Kalvert) i jedne sorte sa prosečnim sadržajem likopena (Donald). Antioksidativnu aktivnost hidrofilnih i lipofilnih ekstrakata paradajza izrazili su kao ekvivalent troloksa (*eng. trolox equivalent antioxidant capacity - TEAC*). Lipofilni ekstrakti genotipova paradajza sa visokim sadržajem likopena pokazali su od 2,7 do 4 puta, a hidrofilni od 1,2 do 1,4 puta veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na genotip Donald. Doprinos hidrofilnih ekstrakata ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti iznosio je od 50% do 75,2%.

Guil-Guerrero i Reboloso-Fuentes (2009) su ispitali antioksidativnu aktivnost ekstrakata osam genotipova paradajza na osnovu njihove sposobnosti da smanje oksidativne gubitke β -karotena u emulziji β -karoten/linolna kiselina i DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) testom. Rezultati ovog ispitivanja ukazali su da su vrednosti antioksidativne aktivnosti ekstrakata paradajza uporedive sa vrednostima antioksidativne aktivnosti komercijalnih antioksidanata.

Na antioksidativnu aktivnost paradajza značaj uticaj ima stepen zrelosti (Cano i sar., 2003; Raffo i sar., 2002). Antioksidativna aktivnost hidrofilnih i lipofilnih ekstrakata više genotipova

paradajza različitog stepena zrelosti ispitana je primenom ABTS metode i izražena kao TEAC vrednosti. TEAC vrednosti ukazuju da tokom sazrevanja paradajza dolazi do značajne promene u antioksidativnoj aktivnosti lipofilnih ekstrakata, što je pripisano povećanju sadržaja likopena. Antioksidativna aktivnost hidrofilnih ekstrakata ostala je gotovo nepromenjena (Cano i sar., 2003).

Toor i Savage (2005) su ispitali antioksidativnu aktivnost lipofilnih i hidrofilnih ekstrakata ljuske, semena i mesa tri genotipa paradajza (Excell, Tradiro i Flavourine) primenom ABTS metode. Izraženiju antioksidativnu aktivnost pokazali su hidrofilni i lipofilni ekstrakti ljuske, u odnosu na ekstrakte semena i mesa. Takođe je utvrđeno da antioksidativna aktivnost hidrofilnih ekstrakata ljuske, semena i mesa značajno doprinosi (91-93%) ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti (hidrofilnih + lipofilnih ekstrakata) svake pojedine frakcije. Doprinos antioksidativne aktivnosti ljuske i semena u proseku za tri ispitana genotipa paradajza iznosi 52% od ukupne antioksidativne aktivnosti paradajza. Rezultati ovog ispitivanja ukazuju da antioksidativna jedinjenja iz ljuske i semena značajno doprinose antioksidativnoj aktivnosti paradajza i da uklanjanjem semena i ljuske u toku kuvanja, odnosno konzumiranja paradajza dolazi do značajnog gubitka antioksidanata. Chandra i Ramalingam (2011) su ispitali antioksidativnu aktivnost metanolnih ekstrakata ljuske, semena i mesa sedam genotipova paradajza (PKM1, CO3, Pusa ruby, Vaishnavi, Ruchikar, Sindhu i Shalimar) primenom DPPH i FRAP metode. Veću antioksidativnu aktivnost za sve ispitane genotipove pokazali su ekstrakti ljuske, u odnosu na ekstrakte semena i mesa.

S obzirom da se paradajz ne koristi samo u svežem stanju, nego predstavlja i sirovinu za različite oblike prerade, mnogobrojna istraživanja su posvećena ispitivanju uticaja različitih procesa prerade na antioksidativnu aktivnost dobijenih proizvoda. Van Boekl i Jongen (1997) su prehrambene proizvode predstavili kao kompleksne smeše u kojima postoje brojne interakcije i istakli su neophodnost merenja antioksidativne aktivnosti različitih proizvoda kako bi se procenili njihovi pozitivni efekti na zdravlje.

Paradajz se često pre konzumiranja čuva i/ili prolazi toplotni tretman tokom kojih se remeti ćelijski matriks paradajza (Van het Hof i sar., 2000a; Van het Hof i sar., 2000b). Intaktnost ćelijskog matriksa određuje bioraspoloživost različitih nutrijenata. U toku prerade može doći i do oslobađanja antioksidanata koji se nalaze u vezanom obliku (Stahl i Sies, 1992; Tonucci i sar., 1995), ali takode nestabilni antioksidanti mogu biti i razgrađeni (Abushita i sar., 2000); antioksidativna aktivnost proizvoda zavisi od nastalih promena (Sahlin i sar., 2004). Chang i saradnici (2006) su ispitali uticaj različitih procesa sušenja, liofilizacije (*eng. freeze-dried - FD*) i struje toplog vazduha (*eng. hot-air-dried - AD*), na antioksidativna svojstva paradajza sorti "I-Tien-Hung (ITH)" i "Sheng-Neu (SN)". FD paradajz oba genotipa je pokazao bolje redukcione osobine, dok je AD paradajz pokazao veću

sposobnost heliranja i DPPH antiradikalnu aktivnost. Primenom ABTS testa, Toor i Savage (2006) su ispitali antioksidativnu aktivnost lipofilnih i hidrofilnih ekstrakata poluosušenog (sušenog na 42°C 18 h) i svežeg paradajza tri genotipa (Excell, Tradiro i Flavourine). Poluosušeni paradajz pokazao je značajno nižu ukupnu antioksidativnu aktivnost u odnosu na svež paradajz. Smanjenje antioksidativne aktivnosti hidrofilnih ekstrakata poluosušenog paradajza ispitanih genotipova u odnosu na sveži iznosi 28-38%, a kod lipofilnih ekstrakata 35-42%.

Primenom ABTS metode, Arnao i saradnici (2001) su ispitali doprinos antioksidanata različite polarnosti antioksidativnoj aktivnosti čorbe od paradajza. Doprinos lipofilnog ekstrakta ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti čorbe od paradajza iznosi 21%, a doprinos hidrofilnog ekstrakta 79%. Ishida i Chapman (2004) su ispitali antioksidativnu aktivnost lipofilnih i hidrofilnih ekstrakata trinaest uzoraka kečapa primenom ABTS metode i izrazili je kao TEAC vrednosti. Antioksidativna aktivnost lipofilnih ekstrakata iznosila je od 79,5 do 201 mgTEAC/100g, a hidrofilnih od 92 do 239 mgTEAC/100 g. Doprinos lipofilnog ekstrakta ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti čorbe od paradajza iznosi od 37,9% do 59,9%. Ove vrednosti su veće od vrednosti koje su Arnao i saradnici (2001) utvrdili za čorbu od paradajza. Podseedek i saradnici (2003) su ispitali antioksidativnu aktivnost lipofilnih i hidrofilnih ekstrakata sokova od paradajza, paradajza u konzervi i pasti od paradajza ABTS testom i na osnovu sposobnosti sprečavanja oksidacije linolne kiseline primenom TBA (*eng. thiobarbituric acid* - TBA) metode. Hidrofilni ekstrakti pokazali su veću antioksidativnu aktivnost od lipofilnih. Srednje vrednosti antioksidativne aktivnosti za hidrofilne ekstrakte dobijene na osnovu ABTS testa iznose 1,40 $\mu\text{mol TEAC/g}$ za sok od paradajza, 1,32 $\mu\text{mol TEAC/g}$ za konzervirani paradajz i 7,42 $\mu\text{mol TEAC/g}$ za pastu od paradajza. Srednje vrednosti antioksidativne aktivnosti za lipofilne ekstrakte soka od paradajza, konzervirani paradajz i pastu od paradajza, iznose 0,31, 0,40 i 1,43 $\mu\text{mol TEAC/g}$. Lavelli i saradnici (2000) su ispitali antioksidativnu aktivnost lipofilnih i hidrofilnih ekstrakata svežeg paradajza, kao i paste i pirea od paradajza primenom tri model sistema. Kod ksantin oksidaza/ksantin sistema (u kome su generisani superoksid radikal i vodonik peroksid) hidrofilni ekstrakti svežeg i proizvoda od paradajza pokazali su veću antioksidativnu aktivnost od lipofilnih ekstrakata. U ovom sistemu hidrofilni ekstrakti svežeg paradajza pokazali su značajno veću antioksidativnu aktivnost od ekstrakata proizvoda od paradajza, dok je antioksidativna aktivnost lipofilnih ekstrakata svežeg paradajza neznatno veća od antioksidativne aktivnosti proizvoda od paradajza. U mieloperoksidaza/NaCl/H₂O₂ sistemu (u kome je generisana hipohloritna kiselina) hidrofilni ekstrakti pokazali su veću sposobnost inhibicije oksidacije od lipofilnih ekstrakata. U sistemu linolna kiselina/CuSO₄ lipofilni ekstrakti su pokazali sposobnost inhibicije lipidne oksidacije, dok je kod hidrofilnih ekstrakata primećen prooksidativni efekat. S obzirom da su model sistemi,

primenjeni u ovom ispitivanju, uključeni i u patogenezu nekih oboljenja, ovi rezultati su značajni i za *in vivo* aktivnost ekstrakata paradajza, kao i za unapređenje tehnoloških procesa prerade paradajza. Takeoka i saradnici (2001) su na osnovu sposobnosti sprečavanja formiranja konjugovanih diena metanolnih i heksanskih ekstrakata svežeg paradajza i njegove paste zaključili da antioksidativnu aktivnost pored likopena, prisutnog u heksanskim ekstraktima, treba pripisati i polifenolnim jedinjenjima, prisutnim u metanolnim ekstraktima.

Poznato je da polifenolna jedinjenja i karotenoidi, jedinjenja prisutna u paradajzu, imaju pored antioksidativnih i antiproliferativne osobine, pa su u nekim radovima ispitane i antiproliferativne aktivnosti ekstrakata paradajza.

Saunders (2009) je ispitala uticaj ekstrakata tri genotipa paradajza, koji sadrže različite količine polifenolnih jedinjenja i flavonoida, na rast ćelija adenokarcinoma debelog creva. Ispitivanjem je utvrđeno da su ispitivani ekstrakti pokazali značajno inhibitorno delovanje na rast (proliferaciju) ćelija kancera debelog creva. Antiproliferativni efekat ekstrakata paradajza pokazao je zavisnost od sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja. Mehanizam inhibicije proliferacije povezan je sa uticajem polifenolnih jedinjenja na ćelijski ciklus, jer je delovanje ekstrakta paradajza dovelo do smanjenja procenta ćelija u S fazi, odnosno onih ćelija koje aktivno sintetišu DNK. Rezultati ovog ispitivanja su pokazali da paradajz može pomoći u sprečavanju nastanka kancera debelog creva.

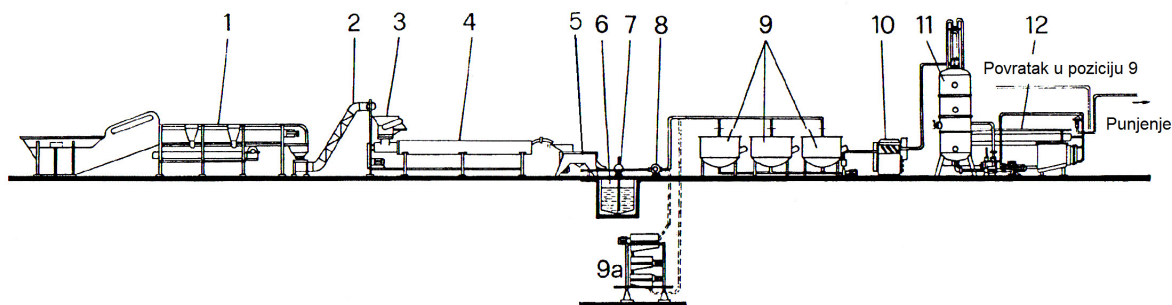
Shen i saradnici (2008) su ispitivali efekat polifenolnih jedinjenja prisutnih u svežem i kuvanom paradajzu genotipa Santa (plod malog prečnika) i Farmers301 (plod velikog prečnika) na suzbijanje ekspresije ciklooksigenaze 2 (COX-2). Ispitan je efekat polifenolnih ekstrakata paradajza na regulaciju 12-*o*-teradekanoilforbol-13-acetat indukovanih zapaljenja KB ćelija (KB ćelijska linija izvedena je iz humanog karcinoma nazofarniksa). U poređenju sa ekstraktima svežeg paradajza, ekstrakti kuvanog paradajza pokazali su značajnije suzbijanje ekspresije ciklooksigenaze 2. Frakcije svežeg paradajza koje sadrže nekondenzovane tanine, kao i frakcije koje sadrže kondenzovane i nekondenzovane tanine kuvanog paradajza pokazale su značajan efekat na suzbijanje ekspresije ciklooksigenaze 2. Rezultati ovog ispitivanja ukazuju da polifenoli iz paradajza mogu imati važnu ulogu u hemoprevenciji.

Hwang i Bowen (2005) su ispitivali uticaj heksanskog i vodenog ekstrakta paste na proliferaciju ćelija, progresiju ćelijskog ciklusa i apoptozu na LNCaP ćelija humanog kancera prostate, radi utvrđivanja bioaktivnosti različitih frakcija paradajza. Rezultati ovog ispitivanja ukazuju da je likopen iz heksanskog ekstrakta paste paradajza poseduje sposobnost usporavanja ćelijskog ciklusa. Paradajz prema tome predstavlja značajan izvor i poseduje potencijal za ispitivanja hemopreventivnih/hemoterapeutskih sredstava.

2.7.4. Tehnološki postupci prerade paradajza

Vrednost paradajza, kao sirovine za preradu, ocenjuje se na osnovu fizičkih osobina i hemijskog sastava, tj. količine sporednih proizvoda i pogodnosti samog ploda za preradu, kao i intezitetu i karakteru promena hemijskog sastava prerađenog proizvoda u odnosu na polaznu sirovinu. U poređenju sa mnogim drugim vrstama povrća, pa i voća, paradajz ima značajan udeo korisnog dela ploda, koji se kod nekih sorti kreće i preko 90%. Sa aspekta hemijskog sastava paradajz se može smatrati postojan pri preradi. Zbog značajnog sadržaja organskih kiselina, uspešno se konzervišu i na temperaturama nižim od 100°C. Najtipičnije prerađevine paradajza su: sok od paradajza, koncentrat paradajza, pelati (konzervisani celi plodovi), kečap (umak od paradajza) i sušeni proizvodi od paradajza.

Po fizičkim svojstvima, kao i tehnološkom postupku, sok od paradajza pripada grupi kašastih sokova, jer pored tečnog dela sadrži i deo tkiva ploda. Karakteristike soka od paradajza su lepa, jasno crvena boja, prijatan osvežavajući ukus i značajna vrednost sa stanovišta ishrane. Za proizvodnju soka paradajza potrebno je da plodovi budu potpuno zreli, zdravi, bez mehaničkih oštećenja, sa velikim sadržajem suve materije i intenzivno crvene boje. Linija za proizvodnju soka paradajza data je na slici 25.



Slika 25. Linija za proizvodnju soka paradajza (1 – uređaj za pranje i probiranje, 2 – elevator sa koficama, 3 – mlin (ili dezintegrator), 4 – uređaj za toplotno tretiranje, 5 – pužni ekstraktor, 6 – bazen, 7 – pumpa za guste mase, 8 – centrifugalna pumpa, 9 – bazen za korekciju, 9a – uređaj za pasiranje, 10 – homogenizator, 11- deaeratorska stanica, 12 – cevni pasterizator)

Pranje plodova paradajza odvija se u dve faze, kretanjem plodova u struji vode i tuširanjem. S obzirom da i neznatan deo ploda lošeg kvaliteta u velikoj meri menja ukus i svojstva soka, pregled plodova vrlo pažljivo se obavlja, kako bi se odstranili svi plodovi koji su oštećeni, plesnivi ili zeleni.

Mlevenjem se plodovi sitne, delimično se izdvaja sok, a semenke odvajaju u posebnom uređaju. Cilj mlevenja je da se obezbedi brže zagrevanje i lakše i brže pasiranje. Samlevena masa se zagreva u protoku indirektno parom do 85°C, što omogućuje inaktivaciju enzima i povećanje sadržaja rastvorljivih pektinskih materija u soku. Na taj način se povećava viskozitet i umanjuje mogućnost razdvajanja faza. Pasiranjem se izdvajaju pokožica i celulozna vlakna, a tkivo ploda usitnjava i homogenizuje. Pasiranje se obavlja na sitima prečnika otvora od 1,2 do 0,4 mm. Nakon pasiranja izvodi se korekcija soka dodavanjem vode, kuhinjske soli i drugih dozvoljenih dodataka do određene suve materije. Homogenizacija se obavlja radi sprečavanja razdvajanja tečne faze od čestica tkiva u gotovom proizvodu, a deaeracijom se odstranjuje vazduh iz soka, kako bi se sprečila naknadna oksidacija gotovog proizvoda. Pasterizacija se obavlja ili u protočnom pasterizatoru, gde se sok zagreva na temperaturi od 100°C ili ako se sok prvo puni u staklenu ambalažu, onda se pasterizacija obavlja na nešto nižoj temperaturi od oko 85°C u trajanju od 15 do 20 minuta (Cvejanov i sar., 2002).

2.7.4.1. Sporedni proizvodi prerade paradajza kao izvori funkcionalnih jedinjenja

Sporedni proizvodi koji nastaju prilikom proizvodnje soka, pirea i umaka od paradajza predstavljaju značajan izvor različitih funkcionalnih jedinjenja. Sok od paradajza je najznačajniji sok od povrća s obzirom na njegovu potrošnju po stanovniku. U toku proizvodnje soka, sporedni proizvod (trop) predstavlja 3-7% sirovine. S obzirom da se njegove značajne količine generišu pri procesu prerade paradajza u sok, kao i zbog činjenice da sadrži jedinjenja iz sve tri grupe najčešće izolovanih jedinjenja predstavlja veoma važan izvor sa aspekta iskorišćenja.

Trop paradajza se sastoji od ljuske, semena i dela mesa paradajza. Seme paradajza čini oko 60% tropa, i predstavlja izvor proteina (35%) i lipida (25%). Ulje ekstrahovano iz semena paradajza je bogato nezasićenim masnim kiselinama, posebno linolnom kiselinom. Ispitivanjima je utvrđeno da ne postoje značajne razlike u senzornim osobinama suncokretovog ulja i ulja semena paradajza.

U tropu paradajza takođe zaostaju značajne količine likopena; posebno je ljuska paradajza bogata likopenom. U cilju dobijanja najvećeg prinosa likopena iz ljuski paradajza, brojna istraživanja su se bavila postupcima izolovanja likopena iz sporednih proizvoda prerade paradajza i optimizacijom odabranih metoda (Kong i sar., 2010). Likopen je iz tropa ekstrahovan različitim organskim rastvaračima (heksan, etilacetat, metilenhlorid, aceton, etil-laktat), primenom enzima, superkritičnim CO₂, kao i vodom pod visokim pritiskom (<http://www.unido.org>; Ishida i Chapman, 2009).

Postupkom ekstrakcije pod visokim pritiskom, bez termičke obrade sporednog proizvoda prerade paradajza, značajno je povećan prinos likopena (Jun, 2006); postupkom ekstrakcije pod visokim pritiskom iz sporednog proizvoda (nastalog pri preradi paradajza u pastu) za 1 min dobijen je veći prinos likopena nego klasičnim postupkom ekstrakcije primenom organskog rastvarača za 30 min (Xi, 2006). Ovim postupkom ekstrakcije, primenom vode sa minimalnim sadržajem organskog rastvarača kao ekstragensa iz sporednih proizvoda prerade paradajza moguće je dobiti likopen značajne čistoće, dok sa ostatak nakon ekstrakcije može koristiti kao hrana za životinje (Naviglio i sar., 2008a; Naviglio i sar., 2008b). Enzimskim tretiranjem sporednih proizvoda prerade paradajza celulazama i pektinazama takođe je moguće značajno povećati prinos likopena (Choudhari i Ananthanarayan, 2007; Lavecchia i Zuorro, 2008). Pored toga, značajne rezultate dala su ispitivanja ekstrakcije likopena iz različitih sporednih proizvoda prerade paradajza superkritičnim fluidom (Rozzi i sar., 2002; Vagi i sar., 2007).

S obzirom da je poslednjih nekoliko godina povećan interes za funkcionalnom hranom, ispitivane su mogućnosti primene sporednih proizvoda prerade paradajza kao dodatka različitim prehrambenim proizvodama. Altan i saradnici (2008) su pokazali da smeša ječma i sušenog tropa paradajza može biti prerađena u ekstrudirane proizvode. Osim toga, obogaćivanjem jestivih ulja niskog kvaliteta, kao što su rafinisano maslinovo ulje i suncokretovo ulje, likopenom iz ljuske paradajza, dokazano je povećanje termičke stabilnosti ovih jestivih ulja (Benakmoum i sar., 2008). Obogaćivanje likopenom suvih fermentisanih kobasica izvedeno je dodavanjem osušenih ljuski paradajza smesi mesa tokom proizvodnje, pri čemu su dobijene kobasice dobre teksture (Calvo i sar., 2008).

Zbog veće bezbednosti u odnosu na sintetičke boje, nezavisno o svim nedostacima (skuplji su, manje stabilni, poseduju manju snagu za bojenje i manje sjaja, primenjuju se u većim dozama, nalaze su u obliku smeše, razlikuju se po sezoni, regiji i sorti), prirodni koloranti se sve više primenjuju u prehrambenoj industriji. S obzirom da su značajne količine likopena prisutne u sporednim proizvodama prerade paradajza, ovaj prirodni kolorant narančasto-crvene prirodne boje mogao bi se primenjivati kod različitih namirnica, kao što su: maslac, margarin, biljna ulja/masti, testenine, supe i umaci itd (Francis, 2000).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

Ekperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u laboratorijama Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu i Instituta za onkologiju u Sremskoj Kamenici. Dobijanje tropa paradajza, priprema ekstrakata tropa paradajza, spektrofotometrijska određivanja sadržaja polifenolnih jedinjenja, flavonoida, askorbinske kiseline i karotenoida, spektrofotometrijsko određivanje antiradikalske aktivnosti na DPPH radikale, redukcionu sposobnost, Fe^{2+} helirajuće aktivnosti, kao i ESR spektrometrijska određivanja antioksidativne aktivnosti urađena su u laboratoriji Odeljenja Organske hemije - Katedre za primenjene i inženjerske hemije, Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu. Određivanje sadržaja ukupnih, nerastvorljivih i rastvorljivih prehrambenih vlakana izvedeno je na Katedri za inženjerstvo ugljenohidratne hrane, Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu. HPLC analiza sastava karotenoida i polifenolnih jedinjenja u dobijenim ekstraktima izvedena je u laboratoriji Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu. Antiproliferativna aktivnost svih ekstrakata tropa paradajza ispitana je na Odeljenju za ekperimentalnu onkologiju, Instituta za onkologiju u Sremskoj Kamenici.

Svi reagensi i hemikalije upotrebljeni u eksperimentalnom radu bili su analitičke čistoće. Metanol, etanol, aceton, natrijum-karbonat, proizvedeni su u fabrici Zorka, Šabac. Folin-Ciocalteu reagens, rutin, 2,6-dihlorfenolindofenola (DIF), askorbinska kiselina, kvercetin, kafena kiselina, hlorogenska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulna kiselina, ruzmarinska kiselina, galna kiselina, naringenin, trihlorsirćetna kiselina, likopen, β -karoten, gvožđe(II)-hlorid, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), 5,5-dimetil-pirolin-N-oksidi (DMPO), ferozin, kalijumsuperoksid i 2-*tert*-butil-4-hidroksianizol (BHA), natrijumova so etilendiamintetrasirćetne kiseline-dihidrat (EDTA), trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kiselina) pribavljeni su iz Sigma Chemical Company, SAD. Kalijum-fericijanid, natrijum-dihidrogenfosfat-2-hidrat, dinatrijum-hidrogenfosfat-12-hidrat, natrijumnitrit, natrijum-hidroksid i hlorovodonična kiselina su iz Lach-Ner, Brno, Češka. Dinatrijum-hidrogenfosfat-2-hidrat proizveden je u Merck-Alkaloid, Skoplje, Makedonija, a kalijum-dihidrogenfosfat i heksan u Centrohem, Stara Pazova, Srbija. Mravlja kiselina i kraunetar su iz Merck, Darmstadt, Germany, a aluminijum hlorid-6-hidrat iz Alfa Aesar GmbH & KG, Karlsruhe, Germany. Ferihlorid, vodonik peroksid, dimetilformamid (DMF) i dimetilsulfoniloksid (DMSO) proizvedeni su u J.T.Baker, Deventer, Holandija, a *m*-fosforna kiselina u "Riedel-de Haën", Nemačka. Za HPLC analizu korišćena je ultračista voda dobijena primenom uređaja za prečišćavanje vode (Elix UV i Simplicity Water Purification system, Millipore, Molsheim, France). Materijal i hemikalije za određivanje sadržaja prehrambenih vlakana, kao i antiproliferativne aktivnosti navedeni su pri opisu ekperimentalnog izvođenja rada.

Za ispitivanje su korišćeni uzorci paradajza novostvorenih (Bačka, Knjaz, Novosadski niski i O₂) i tradicionalnih (Rutgers i Saint Pierre) genotipova (Gvozdenović i sar., 2001; Jovićević i sar., 2009; Glogovac i Takač, 2010; Takač i Gvozdenović, 2001; <http://store.tomatofest.com>), uzgajani 2008.g. na oglednim poljima Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad.

3.1. Dobijanje tropa od odabranih genotipova paradajza

Ceđenjem soka paradajza (1 kg) u sokovniku Neo, tip SK-400 dobijen je trop, koji je osušen u vakuumu (25°C, 1,03 mbar, 15 h; 30°C, 0,001 mbar, 4 h i 30 min), primenom liofilizatora (Alpha 2-4 LSC Martin Christ, Osterode, Germany). U tabeli 5 su date mase dobijenog tropa posle ceđenja soka od 1 kg paradajza, kao i suvog tropa.

Tabela 5. Mase tropa i suvog tropa paradajza dobijene od 1 kg paradajza

Genotip	Masa tropa (g)	Masa suvog tropa (g)
Bačka	197,2 ± 8,51	19,46 ± 1,25
Knjaz	100,8 ± 4,76	13,21 ± 0,50
Novosadski niski	113,9 ± 5,32	18,53 ± 0,72
O ₂	85,4 ± 3,68	11,58 ± 1,20
Rutgers	57,3 ± 2,60	8,76 ± 0,86
Saint Pierre	189,2 ± 8,96	20,04 ± 1,60

3.2. Priprema ekstrakata tropa paradajza

Osušeni trop paradajza (10 g) ekstrahovan je heksanom (160 ml) toku 10 min primenom homogenizatora, Heidolph, tip DIAX 900. Postupak ekstrakcije je ponovljen tri puta. Dobijeni heksanski ekstrakti su spojeni i koncentrovani na rotacionom vakuum uparivaču do suva, pri čemu su dobijeni suvi heksanski ekstrakti.

Ostatak nakon ekstrakcije heksanom, ekstrahovan je 80% etanolom primenom homogenizatora, Heidolph, tip DIAX 900. Postupak ekstrakcije je ponovljen tri puta sa različitim zapreminama 80% etanola: 160 ml u toku 30 min, 80 ml u toku 30 min i 80 ml u toku 15 min. Dobijeni etanolni ekstrakti su spojeni i koncentrovani na rotacionom vakuum uparivaču do suva, pri čemu su dobijeni suvi etanolni ekstrakti.

Dobijeni ostaci nakon ekstrakcije 80% etanolom su osušeni do konstantne mase u sušnici na 50°C, pri čemu su dobijeni suvi ostaci. Mase suvih heksanskih i etanolnih ekstrakata, kao i mase suvih ostataka date su u tabeli 6.

Tabela 6. Mase suvih heksanskih i etanolnih ekstrakata, kao i mase dobijenih ostataka nakon ekstrakcija tropa paradajza

Genotip	Masa heksanskog ekstrakta (g)	Masa etanolnog ekstrakta (g)	Masa suvog ostatka (g)
Bačka	0,121 ± 0,005	3,62 ± 0,16	5,18 ± 0,25
Knjaz	0,085 ± 0,004	4,06 ± 0,17	5,39 ± 0,08
Novosadski niski	0,706 ± 0,034	3,42 ± 0,16	5,00 ± 0,24
O ₂	0,517 ± 0,025	3,64 ± 0,11	5,36 ± 0,25
Rutgers	0,828 ± 0,041	3,49 ± 0,15	4,31 ± 0,15
Saint Pierre	0,461 ± 0,023	4,43 ± 0,19	3,78 ± 0,18

3.3. Spektrofotometrijska određivanja sadržaja antioksidanata u ekstraktima tropa paradajza

Spektrofotometrijska određivanja sadržaja karotenoida (β -karotena i likopena) u lipofilnim ekstraktima, kao i polifenolnih jedinjenja, flavonoida i askorbinske kiseline u hidrofilnim ekstraktima izvedena su na UV-1800 spektrofotometru (Shimadzu, Kyoto, Japan).

3.3.1. Određivanje sadržaja karotenoida u lipofilnim ekstraktima

Sadržaj likopena i β -karotena u heksanskom ekstraktu tropa paradajza određen je spektrofotometrijski metodom po Nagati i Yamashiti (1992).

Rastvori i reagensi:

1. Heksan
2. Aceton

Spektrofotometrijsko određivanje:

Heksanski ekstrakt (2 mg) rastvoren je u 20 ml smeše rastvarača aceton-heksan (4:6) i izmerena je apsorbancija dobijenog rastvora na 663 nm, 645 nm, 505 nm i 453 nm. Kao slepa proba primenjena je smeša rastvarača aceton-heksan (4:6). Koncentracija likopena i β -karotena određena je na osnovu sledećih jednačina:

$$C_{\text{Likopen}} \text{ (mg/100 ml)} = -0,0458A_{663} + 0,204A_{645} + 0,372A_{505} - 0,0806A_{453};$$

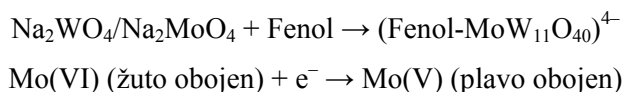
$$C_{\beta\text{-karoten}} \text{ (mg/100 ml)} = 0,216A_{663} - 1,22A_{645} - 0,304A_{505} + 0,452A_{453};$$

gde su: A_{663} , A_{645} , A_{505} i A_{453} apsorbance rastvora ekstrakta na 663 nm, 645 nm, 505 nm i 453 nm.

Na osnovu izračunatih koncentracija likopena i β -karotena, određen je sadržaj likopena i β -karotena u suvom heksanskom ekstraktu (mg/g), kao i u suvom tropu (mg/100 g).

3.3.2. Određivanje sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja u hidrofilnim ekstraktima

Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u etanolnom ekstraktu tropa paradajza određen je spektrofotometrijski, metodom po Folin-Ciocalteu (Singleton i sar., 1999). Ova metoda zasnovana je na merenju redukujućeg kapaciteta polifenolnih jedinjenja, čijom disocijacijom nastaje proton i fenoksidni anjon, koji redukuje Folin-Ciocalteu reagens do plavo obojenog jona (Fenol-MoW₁₁O₄₀)⁴⁻:



Rastvori i reagensi:

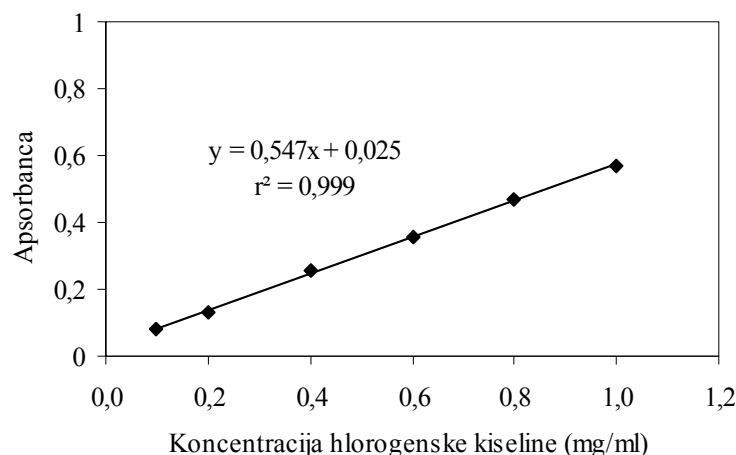
1. 20% rastvor Na₂CO₃,
10 g Na₂CO₃ rastvoreno je uz zagrevanje u 40 ml vode;
2. Rastvor Folin-Ciocalteu (FC) reagensa,
Folin-Ciocalteu reagens razblažen sa H₂O u odnosu 1:2 i
3. Standardni rastvor hlorogenske kiseline koncentracije 1 mg/ml,
5 mg hlorogenske kiseline rastvoreno je u 5 ml metanola.

Spektrofotometrijsko određivanje:

Reakcione smeše za izradu kalibracionog dijagrama pripremljene su mešanjem: 0,1 ml metanolnog rastvora hlorogenske kiseline (koncentracija 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 i 1 mg/ml), 7,9 ml destilovane vode, 0,5 ml rastvora Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 ml 20% rastvora Na₂CO₃. Slepa proba pripremljena je mešanjem 0,1 ml metanola, 7,9 ml destilovane vode, 0,5 ml rastvora Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 ml 20% rastvora Na₂CO₃.

Reakciona smeša za određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja u etanolnom ekstraktu pripremljena je mešanjem: 0,1 ml vodenog rastvora etanolnog ekstrakta (koncentracije 25 mg/ml), 7,9 ml destilovane vode, 0,5 ml rastvora Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 ml 20% rastvora Na₂CO₃. Slepa proba pripremljena je mešanjem 8 ml destilovane vode, 0,5 ml rastvora Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 ml 20% rastvora Na₂CO₃. Nakon 2 h izmerene su apsorbance reakcionih smeša standarda i ekstrakta na 750 nm.

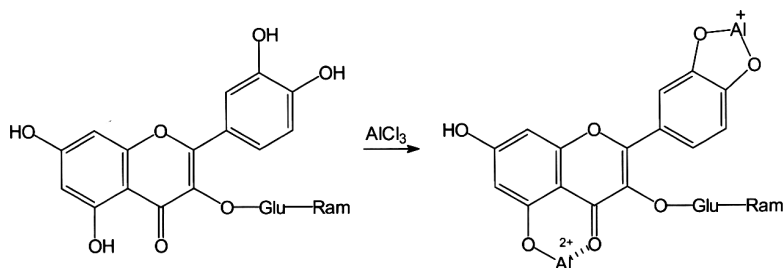
Na osnovu izmerenih apsorbanci, sa kalibracionog dijagrama standardnog rastvora hlorogenske kiseline (slika 26) očitana je koncentracija (mg/ml) polifenolnih jedinjenja, a zatim je izračunat sadržaj polifenolnih jedinjenja kao ekvivalent hlorogenske kiseline u suvom etanolnom ekstraktu (mg/g), kao i u suvom tropu (mg/100 g).



Slika 26. Kalibracioni dijagram standardnog rastvora hlorogenske kiseline

3.3.3. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u hidrofилnim ekstraktima

Sadržaj ukupnih flavonoida u etanolnom ekstraktu tropa paradajza određen je spektrofotometrijski (Zhishen i sar., 1999). Flavonoidi iz biljnog materijala imaju osobinu da sa metalima grade odgovarajuće metalo-komplekse, pri čemu je naročito značajan kompleks sa Al^{3+} (slika 27).



Slika 27. Struktura rutina i njegovog kompleksa sa aluminijumom

Rastvori i reagensi:

1. 5% rastvor Na-nitrita ($NaNO_2$), 0,5 g $NaNO_2$ rastvoreno je u 10 g destilovane vode;
2. 10% rastvor $AlCl_3$, 1,7 g $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ rastvoreno je u 10 g destilovane vode;
3. 1 mol/l rastvor NaOH, 2 g NaOH rastvoreno je u 50 ml destilovane vode i

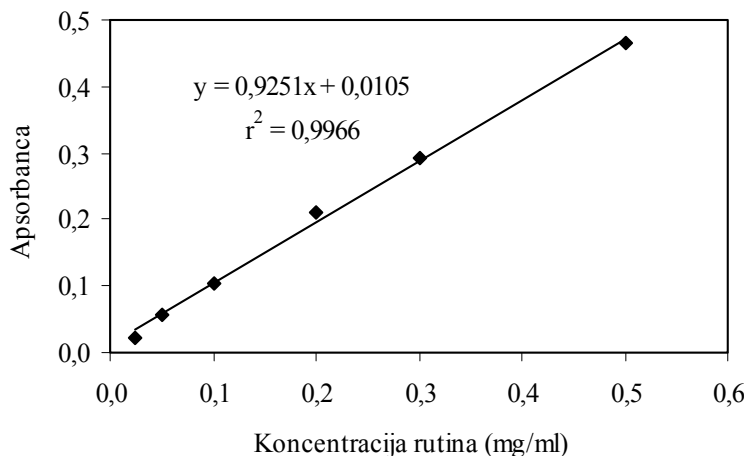
4. Standardni rastvor rutina koncentracije 0,5 mg/ml,
2,5 mg rutina rastvoreno je u 5 ml destilovane vode.

Spektrofotometrijsko određivanje:

Reakcione smeše za izradu kalibracionog dijagrama pripremljene su mešanjem: 1 ml rastvora rutina (koncentracije 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 i 0,5 mg/ml) ili destilovane vode ako je u pitanju slepa proba, 4 ml destilovane vode i 0,3 ml 5% rastvora Na-nitrita u odmernom sudu od 10 ml. Posle 5 min, dodato je 0,3 ml 10% rastvora AlCl_3 , a nakon 6 min dodato je 2 ml rastvora NaOH, koncentracije 1 mol/l i odmerni sud od 10 ml dopunjen je destilovanom vodom.

Reakciona smeša za određivanje sadržaja flavonoida u etanolnom ekstraktu pripremljena je na isti način, samo je umesto rastvora rutina korišćen rastvor suvog etanolnog ekstrakta. Zapremina od 1 ml vodenog rastvora etanolnog ekstrakta, koncentracije 10 mg/ml, odnosno destilovane vode ako je u pitanju slepa proba, preneti je u odmerni sud od 10 ml u koji su zatim dodata 4 ml destilovane vode i 0,3 ml 5% rastvora Na-nitrita. Posle 5 min, dodato je 0,3 ml 10% rastvora AlCl_3 , a nakon 6 min dodato je 2 ml rastvora NaOH, koncentracije 1 mol/l i odmerni sud od 10 ml dopunjen je destilovanom vodom. Reakcione smeše su promućkane i apsorbance su izmerene odmah na talasnoj dužini od 510 nm.

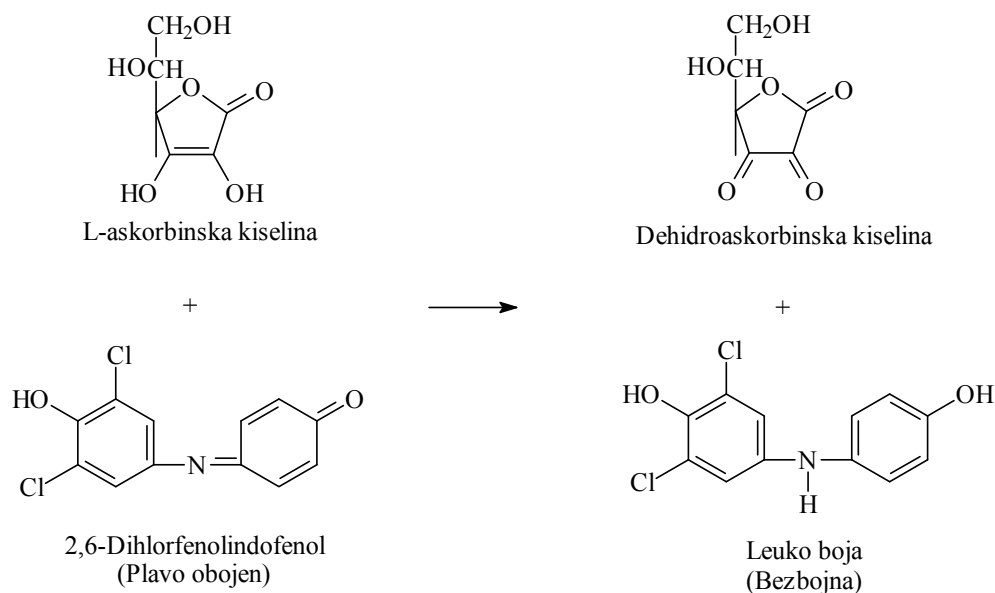
Na osnovu izmerenih apsorbanci, sa kalibracionog dijagrama standardnog rastvora rutina (slika 28) očitana je koncentracija (mg/ml) ukupnih flavonoida, a zatim je izračunat sadržaj ukupnih flavonoida kao ekvivalent rutina u suvom etanolnom ekstraktu (mg/g), kao i u suvom tropu (mg/100 g).



Slika 28. Kalibracioni dijagram standardnog rastvora rutina

3.3.4. Određivanje sadržaja askorbinske kiseline u hidrofiličnim ekstraktima

Sadržaj askorbinske kiseline u etanolnom ekstraktu određen je spektrofotometrijski, na osnovu njene redukcijske sposobnosti, modifikovanom metodom po Klein i Perry (1982). Kao reagens je korišćen tamno plavo obojen rastvor 2,6-dihlorfenolindofenola (DIF), koji u prisustvu askorbinske kiseline prelazi u bezbojni redukovani oblik (slika 29).



Slika 29. Oksidacija askorbinske kiseline 2,6-dihlorfenolindofenolom (DIF)

Rastvori i reagensi:

1. Fosfatni pufer, pripremljen mešanjem rastvora natrijum-hidrogenfosfata-dihidrata (11,8660 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ u 1l) i kalijum-dihidrogen-fosfata (9,0730 g KH_2PO_4 u 1l) u odnosu 6:4;
2. Rastvor DIF-a, koncentracije 0,001 mol/l. (U 1 ml tople redestilovane vode rastvoreno je 0,02 g DIF-a, a zatim je dodato 30 ml fosfatnog pufera. Nakon stajanja od 24h, rastvor je profiltriran u odmereni sud od 100 ml, koji je zatim dopunjen fosfatnim puferom);
3. 1% metafosforna kiselina, 1 g metafosforne kiseline je rastvoren u 100 ml destilovane vode;
4. Rastvor askorbinske kiseline u 1% metafosfornoj kiselini, koncentracije 0,2 mg/ml, 2 mg askorbinske kiseline rastvoreno je u 10 ml 1% metafosforne kiseline i
5. Rastvor etanolnog ekstrakta u 1% metafosfornoj kiselini, koncentracije 100 mg/ml, 200 mg etanolnog ekstrakta rastvoreno je u 2 ml 1% metafosforne kiseline, a zatim je izvedeno centrifugiranje na 3000 o/min 15 min i odvojen je supernatant.

Spektrofotometrijsko određivanje:

Reakciona smeša za izradu standardnog dijagrama askorbinske kiseline pripremljene su mešanjem: 2 ml rastvora DIF-a, 7 ml fosfatnog pufera i 1 ml rastvora askorbinske kiseline u 1% metafosfornoj kiselini (koncentracije 0,02; 0,1; 0,12; 0,16 i 0,2 mg/ml) (proba). Takođe, pripremljena je i slepa proba koja se sastojala od: 2 ml rastvora DIF-a, 7 ml fosfatnog pufera i 1 ml rastvora 1% metafosforne kiseline.

Za određivanje sadržaja askorbinske kiseline u etanolnom ekstraktu reakciona smeša (proba) pripremljena je mešanjem: 2 ml rastvora DIF-a, 7 ml fosfatnog pufera i 1 ml supernatanta (dobijenog nakon centrifugiranja rastvora etanolnog ekstrakta u 1% metafosfornoj kiselini, koncentracije 100 mg/ml). Apsorbance reakcionih smeša izmerene su nakon 10 minuta, na talasnoj dužini od 515 nm u odnosu na referentni rastvor koji se sastojao od 9 ml fosfatnog pufera i 1 ml rastvora 1% metafosforne kiseline u destilovanoj vodi.

Smanjenje koncentracije DIF-a izračunato je na osnovu apsorbanci za različite koncentracije askorbinske kiseline, kao i za ekstrakt prema izrazu:

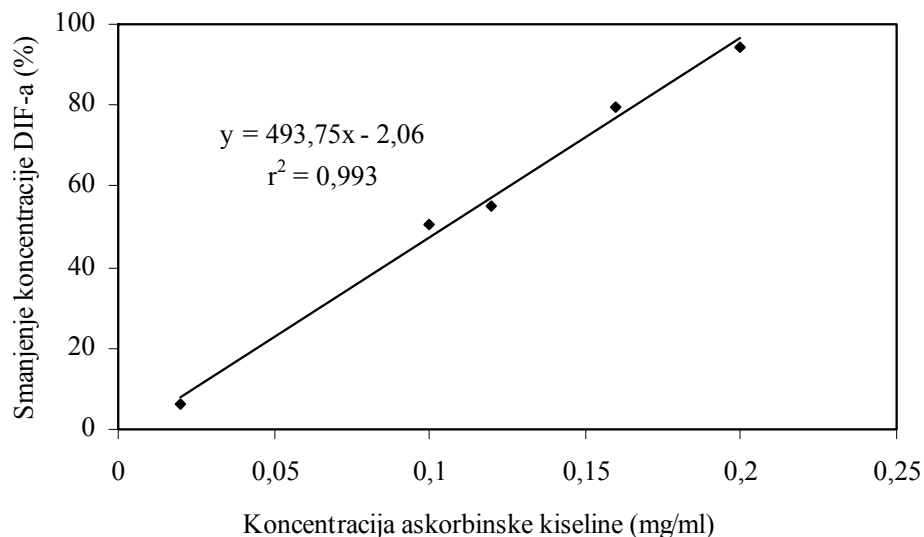
$$\text{Smanjenje koncentracije DIF-a} = (A_{\text{slepe probe}} - A_{\text{probe}}) / A_{\text{slepe probe}} \times 100 (\%),$$

gde su:

A_{probe} - apsorbance probe sa askorbinskom kiselinom ili ekstraktom i

$A_{\text{slepe probe}}$ - apsorbance slepe probe koja ne sadrži askorbinsku kiselinu.

Na osnovu smanjenja koncentracije DIF-a izračunatog pri različitim koncentracijama askorbinske kiseline konstruisan je kalibracioni dijagram (slika 30). Takođe je, izračunato i smanjenje koncentracije DIF-a u reakcionoj smeši pripremljenoj za određivanje sadržaja askorbinske kiseline u etanolnom ekstraktu, pa je sa kalibracionog dijagrama standardnog rastvora askorbinske kiseline očitana koncentracija askorbinske kiseline, a zatim je izračunat sadržaj askorbinske kiseline u suvom etanolnom ekstraktu (mg/g), kao i u suvom tropu (mg/100 g).



Slika 30. Kalibracioni dijagram standardnog rastvora askorbinske kiseline

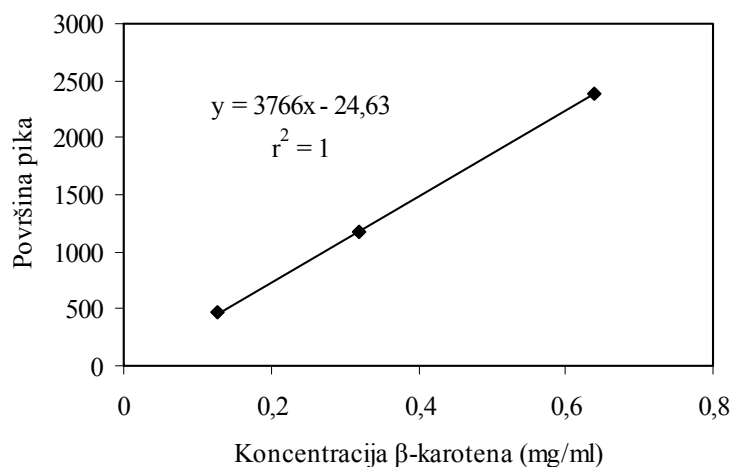
3.4. HPLC analiza antioksidativnih jedinjenja u ekstraktima tropa paradajza

3.4.1. HPLC određivanje sadržaja likopena i β -karotena u lipofilnim ekstraktima

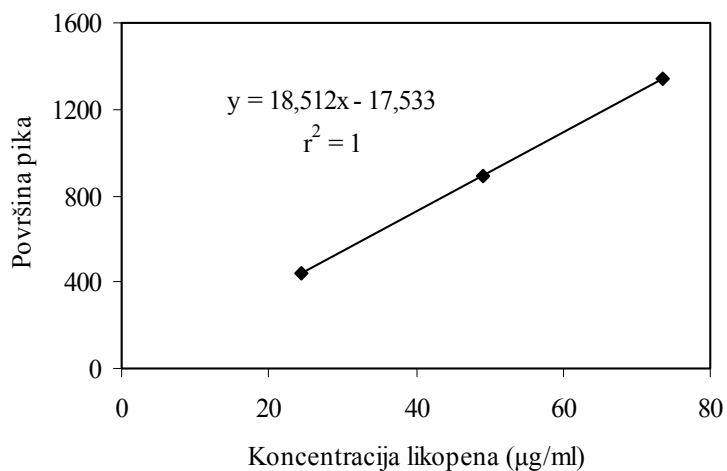
Identifikacija i kvantifikacija karotenoida (likopena i β -karotena) u heksanskim ekstraktima tropa paradajza izvedena je HPLC analizom na tečnom hromatografu Agilent 1200 series (Paolo Alto, CA, USA) sa kolonom Agilent, ZORBAX[®] SB-C18 (5 μ m, 3,0 \times 250 mm) i DAD (*eng. diode array detector*) detektorom sa serijom dioda. Kao mobilna faza korišćena je smeša rastvarača aceton/metanol (75:25, v/v). Ukupno vreme analize je 5 min. Protok mobilne faze iznosio je 1,5 ml/min. Profiltrirani rastvori ekstrakata i standarda injektovani su automatski u zapremini od 10 μ l. Razdvojene komponente su detektovane na 473/10 nm sa referentnom talasnom dužinom 360/1 nm, a spektri su snimljeni u opsegu talasnih dužina 350-600 nm. Kolona je termostatirana na 26°C.

Za HPLC određivanja su korišćeni rastvori suvih heksanskih ekstrakata koncentracije 10 mg/ml, pripremljeni rastvaranjem 10 mg suvih heksanskih ekstrakata u 1 ml smeše rastvarača aceton/metanol (75:25, v/v) uz homogenizaciju na ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 1 min. Pre injektovanja rastvori su profiltrirani kroz filtere Iso-Disc[™], PTFE 25-4, 25 mm \times 0,45 μ m (SUPLECO, Bellefonte, PA, USA).

Identifikacija i kvantifikacija karotenoida u ispitivanim ekstraktima izvršena je poređenjem retencionih vremena (t_r) i spektroskopskih karakteristika (UV_{max}) sa karakteristikama analitičkih standarda karotenoida. Identifikacija pika za pojedine prisutne karotenoide potvrđena je proverom čistoće pika. Za kvantifikaciju je upotrebljena metoda eksternog standarda. Za svaki standard pripremljen je osnovni rastvor u smeši aceton/metanol (75:25, v/v) koncentracije 1,0 mg/ml. Za kalibraciju je pripremljena serija razblaženja rastvora standarda. Konstruisana je kalibraciona kriva za svaki karotenoid (u opsegu koncentracija koje se očekuju u ispitivanim ekstraktima) na osnovu dobijenih površina pikova na hromatogramu u zavisnosti od koncentracije standarda (slike 31 i 32). Iz dobijenih jednačina linearne zavisnosti izračunate su koncentracije pojedinih karotenoida u ispitivanim ekstraktima tropa paradajza.



Slika 31. Zavisnosti površine pika i koncentracije standarda likopena



Slika 32. Zavisnost površine pika od koncentracije standarda β -karotena

3.4.2. HPLC određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja u hidrofилnim ekstraktima

Identifikacija i kvantifikacija polifenolnih jedinjenja u ispitivanim ekstraktima izvedena je metodom po Mišan i saradnicima (2011), sa malim modifikacijama. HPLC analiza ekstrakata tropa urađena je na tečnom hromatografu Agilent 1200 series (Paolo Alto, CA, USA) sa kolonom Agilent, Eclipse XDB-C18 (1,8 μm , 4,6 \times 50 mm) i DAD (*eng. diode array detector*) detektorom sa serijom dioda. Kao mobilna faza korišćena je smeša rastvarača A (metanol) i B (1% vodeni rastvor mravlje kiseline, v/v) primenom linearnog gradijenta: 85% B (0-6,2 min), 85-75% B (6,2-8 min), 75-61% B (8-13 min), 61% B (13-15 min), 61-40% B (15-20 min) i 40-0% B (20-25 min). Nakon isteka analize sistem je uravnotežavan na početne uslove 10 min. Protok mobilne faze je bio 1 ml/min. Profiltrirani rastvori ekstrakata i standarda injektovani su u zapremini od 5 μl . Hromatogrami su prikazani na 280, 330 i 350 nm/4 nm sa referentnom talasnom dužinom 500/100 nm, a spektri su snimljeni u opsegu talasnih dužina 190-400 nm. Kolona je termostatorirana na 30°C.

Za HPLC određivanja su korišćeni rastvori etanolnih ekstrakata koncentracije 20 mg/ml, pripremljeni su rastvaranjem 20 mg etanolnih ekstrakata u 1 ml smeše rastvarača metanol:1% vodeni rastvor mravlje kiseline (50:50, v/v) na ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 10 min. Pre injektovanja rastvori su profiltrirani kroz filtere od regenerisane celuloze sa veličinom pora 0,45 μm (Agilent, Paolo Alto, CA, USA).

Identifikacija i kvantifikacija polifenolnih jedinjenja u ispitivanim ekstraktima izvršena je poređenjem retencionih vremena (t_r) i spektroskopskih karakteristika (UV_{max}) sa karakteristikama analitičkih standarda polifenolnih jedinjenja detektovanih na karakterističnoj talasnoj dužini. Identifikacija pika polifenolnog jedinjenja potvrđena je proverom čistoće pika. Za kvantifikaciju je upotrebljena metoda eksternog standarda. Za svaki standard pripremljen je osnovni rastvor u metanolu koncentracije 1,0 mg/ml. Za kalibraciju je pripremljena serija razblaženja rastvora standarda. Konstruisana je kalibraciona kriva za svako polifenolno jedinjenje (u opsegu koncentracija koje se očekuju u ispitivanim ekstraktima) na osnovu dobijenih površina pikova na hromatogramu u zavisnosti od koncentracije standarda. Iz dobijene jednačine linearne zavisnosti izračunate su koncentracije polifenolnih jedinjenja u ispitivanim ekstraktima tropa paradajza (tabela). Za polifenolna jedinjenja prisutna u ekstraktima za koje nije bio dostupan analitički standard, kvantifikacija je izvedena na osnovu kalibracione krive za hlorogensku kiselinu na 330 nm i izražena kao ekvivalent hlorogenske kiseline.

Tabela 7. Jednačine linearne zavisnosti analitičkih standarda polifenolnih jedinjenja

Polifenolna jedinjenja	Jednačina linearne zavisnosti	λ (nm)*
Kafena kiselina	$A = 9,6460 \times c \text{ (mg/ml)} + 0,7338$	330
Hlorogenska kiselina	$A = 33,8927 \times c \text{ (mg/ml)} + 0,3680$	330
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	$A = 19,9604 \times c \text{ (mg/ml)} + 0,9235$	330
Ferulna kiselina	$A = 24,6438 \times c \text{ (mg/ml)} + 1,1095$	330
Ruzmarinska kiselina	$A = 11,1306 \times c \text{ (mg/ml)} + 0,9699$	330
Rutin	$A = 8,2234 \times c \text{ (mg/ml)} + 0,0520$	350
Kvercetin	$A = 9,6460 \times c \text{ (mg/ml)} + 0,7338$	280
Naringenin	$A = 9,6460 \times c \text{ (mg/ml)} + 0,7338$	350

*talasna dužina na kojoj je izvršena kvantifikacija polifenolnih jedinjenja

3.5. Određivanje sadržaja ukupnih, rastvorljivih i nerastvorljivih prehrambenih vlakana u ostacima

Određivanje sadržaja ukupnih, rastvorljivih i nerastvorljivih prehrambenih vlakana u ostacima nakon ekstrakcija tropa odabranih genotipova paradajza izvedeno je AOAC metodom 991.43 (AOAC, 2007) i AACC Metodom 32-07 (AACC, 2000) pri čemu je korišćen enzimski kit Megazyme TDFR (International Ireland Ltd., Wicklow, Irska).

Rastvori i reagensi:

1. Etanol, 95% (v/v);
2. Etanol, 78% (v/v);
3. Aceton;
4. Enzimski kit (α -amilaza, proteaza i amiloglukozidaza)
5. Celit;
6. MES/TRIS pufer, 0,05 M, pH 8,2. Rastvoreno je 19,52 g 2(N-morfolino)etansulfonske kiseline (MES) (Sigma, M 8250) i 14,2 g tris(hidroksimetil)aminometan (TRIS) (Sigma, T1503) u 1,7l destilovane vode. 6,0 M NaOH pH je podešen na 8,2, a zatim je odmerni sud dopunjen do 2l destilovanom vodom.
7. 0,56 M HCl;
8. pH standardi – rastvori pufera pH 4,0, 7,0 i 10,0;
9. Rastvor NaOH, 6M; 240 g NaOH je rastvoreno u 1l destilovane vode i
10. Rastvor HCl, 6M; 517,24 g HCl je rastvoreno u 1l destilovane vode.

Postupak:

Za određivanje sadržaja ukupnih (UPV) i nerastvorljivih (NPV) prehrambenih vlakana odmereno je četiri puta po 0,5 g uzorka u visoke čaše od 400 ml ($m_{\text{uzorak,UPV}}$ i $m_{\text{uzorak,NPV}}$). U sve uzorke dodato je 40 ml MES/TRIS puferske smeše (pH=8,2), a zatim su sadržaji u čašama mešani na magnetnoj mešalici, do potpunog dispergovanja uzorka.

Inkubacija sa termostabilnom α -amilazom: U uzorke je dodato 50 μ l rastvora termostabilne α -amilaze tokom mešanja na maloj brzini, a zatim su poklopljene čaše sa uzorkom stavljene u vodeno kupatilo temperature 95-100°C i uzorci su inkubirani 35 min uz konstantno mešanje. Čaše sa uzorcima izvađene su iz vodenog kupatila i ohlađene na 60°C.

Inkubacija sa proteazom: U uzorke je dodat rastvor proteaze (100 μ l), a zatim su poklopljene čaše stavljene u vodeno kupatilo temperature $60 \pm 1^\circ\text{C}$ i uzorci su inkubirani uz konstantno mešanje 30 min. Čaše sa uzorcima su izvađene iz vodenog kupatila, a zatim je dodato 5 ml 0,56 M rastvora HCl uz mešanje (pH 4,1-4,8).

Inkubacija sa amiloglukozidazom: Svakom uzorku dodato je 200 μ l rastvora amiloglukozidaze uz mešanje na magnetnoj mešalici. Zatim su poklopljene čaše inkubirane uz mešanje u vodenom kupatilu na 60°C 30 min.

Taloženje rastvorljivih prehrambenih vlakana etanolom, filtriranje i ispiranje (kod određivanja sadržaja ukupnih prehrambenih vlakana): Svakom uzorku dodato je 225 ml 95% etanola (temperature 60°C), a zatim su ostavljeni da se formira talog u toku 60 min. Enzimski digestat je filtriran kroz izmereni tigl sa Celitom ($m_{\text{tigl+celit}}$) koji je postavljen u CSF6 aparat za filtraciju (VELP scientifica, Usmate, Italy). Uzorak iz čaše kvantitativno je prenešen u tigl 78% etanolom. Talog je sukcesivno ispran 75% etanolom (2×15 ml), 78% etanolom (2×15 ml) i acetonom (2×15 ml). Tigl sa talogom sušen je preko noći u sušnici na 103°C, ohlađen u eksikatoru, a zatim je izmerena masa tigla koji sadrži talog sa vlaknima i Celit (m_1) i izračunata masa taloga: $m_{\text{taloga,NPV}} = m_1 - m_{\text{tigl+celit}}$.

Filtriranje i ispiranje (kod određivanja sadržaja nerastvorljivih prehrambenih vlakana): Enzimski digestat je filtriran kroz izmereni tigl sa Celitom ($m_{\text{tigl+celit}}$) koji je postavljen u CSF aparat za filtraciju. Uzorak iz čaše kvantitativno je prenešen u tigl 78% etanolom. Talog je sukcesivno ispran 75% etanolom (2×10 ml) i acetonom (2×10 ml). Tigl sa talogom sušen je preko noći u sušnici na 103°C, ohlađen u eksikatoru, a zatim je izmerena masa tigla koji sadrži talog sa vlaknima i Celit (m_1) i izračunata masa taloga: $m_{\text{taloga,RPV}} = m_1 - m_{\text{tigl+celit}}$.

Određivanje sadržaja proteina i pepela u talozima (kod određivanja sadržaja ukupnih, kao i kod određivanja sadržaja nerastvorljivih prehrambenih vlakana): U jednom od taloga određen je

sadržaj proteina postupkom po Kjeldahl-u (JUS ISO 1871:1992), a u drugom sadržaj pepela (žarenjem 5h na 525°C).

Sadržaj ukupnih prehrambenih vlakana (UPV), kao i nerastvorljivih prehrambenih vlakana (NPV) određen je na osnovu izraza:

$$UPV = (m_{\text{taloga,UPV}} \times (100 - S_{\text{proteina}} - S_{\text{pepela}})) / m_{\text{uzorka,UPV}} (\%),$$

$$NPV = (m_{\text{taloga,NPV}} \times (100 - S_{\text{proteina}} - S_{\text{pepela}})) / m_{\text{uzorka,NPV}} (\%),$$

gde je:

$m_{\text{uzorka,UPV}}$ - srednja vrednost mase uzorka u g za određivanje sadržaja ukupnih prehrambenih vlakana,

$m_{\text{uzorka,NPV}}$ - srednja vrednost mase uzorka u g za određivanje sadržaja nerastvorljivih prehrambenih vlakana,

$m_{\text{taloga,UPV}}$ - srednja vrednost mase taloga u g kod određivanje sadržaja ukupnih prehrambenih vlakana,

$m_{\text{taloga,NPV}}$ - srednja vrednost mase taloga u g kod određivanje sadržaja rastvorljivih prehrambenih vlakana,

S_{proteina} - sadržaj proteina u talogu izražen u % i

S_{pepela} - sadržaj pepela u talogu izražen u %.

Sadržaj rastvorljivih prehrambenih vlakana izračunat je kao razlika sadržaja ukupnih i nerastvorljivih prehrambenih vlakana.

3.6. Određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata tropa paradajza

Antioksidativna aktivnost heksanskih ekstrakata tropa paradajza određena je spektrofotometrijskim ispitivanjem redukcione sposobnosti i antiradikalske aktivnosti na stabilne DPPH radikale.

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti etanolnih ekstrakata tropa paradajza, izvedeno je spektrofotometrijskim ispitivanjima antiradikalske aktivnosti na stabilne DPPH radikale, određivanjem redukcione sposobnosti i helirajuće aktivnosti. Antiradikalska aktivnost na reaktivne hidrosil i superoksid anjon radikale određena je elektron spin rezonantnom (ESR) spektroskopijom.

Antiradikalska aktivnost na DPPH radikale ispitana je i za nerastvorljive ostatake tropa nakon ekstrakcija heksanom i etanolom.

3.6.1. Određivanje antiradikalske aktivnosti heksanskih/etanolnih ekstrakata i nerastvorljivih ostataka na DPPH radikale spektrofotometrijskom metodom

Određivanje antiradikalske aktivnosti ekstrakata na DPPH radikale izvedeno je spektrofotometrijski, modifikovanom metodom po Espin i saradnicima (2000), odnosno po Jiménez-Escrig i saradnicima (2000). Za određivanja DPPH antiradikalske aktivnosti nerastvorljivih ostataka nakon ekstrakcija primenjena je modifikovana metoda po Serpenu i saradnicima (2007).

Rastvori i reagensi:

1. Metanol i
2. Rastvor DPPH radikala u metanolu koncentracije $90 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$,
1,8 mg DPPH radikala rastvoreno je u 50 ml metanola.

Spektrofotometrijsko određivanje:

Postupak određivanja antiradikalske aktivnosti ekstrakta se zasniva na pripremi reakcionih smeša u epruvetama tako što je u njih dodato po 0,5 ml rastvora etanolnog ekstrakta (u destilovanoj vodi), odnosno heksanskog ekstrakata (u smeši aceton:metanol; 50:50, v/v) različitih koncentracija (0,1; 0,2; 1; 2; 3; 4; 5 i 10 mg/ml), 1,5 ml rastvora DPPH radikala ($90 \mu\text{M}$) i 3 ml metanola (probe). Slepa proba pripremljena je isto kao i probe, ali bez ekstrakta. Reakcione smeše su promućkane i apsorbance proba i slepe probe su merene nakon 30 min na talasnoj dužini od 515 nm za etanolne ekstrakte, odnosno 580 nm za heksanske ekstrakte (UV-1800 spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan).

Postupak određivanja antiradikalske aktivnosti nerastvorljivog ostatka se zasniva na pripremi reakcionih smeša u epruvetama tako što je u njih dodat nerastvorljivi ostatak (1; 5; 10 i 20 mg), 0,5 ml destilovane vode, 1,5 ml rastvora DPPH radikala ($90 \mu\text{M}$) i 3 ml metanola (probe). Slepa proba pripremljena je isto kao i probe, ali bez nerastvorljivog ostatka. Reakcione smeše su promućkane 3 min, nakon pripreme reakcione smeše, kao i posle 15 i 25 min, a zatim centrifugirane na 3000 o/min 2 min i apsorbance proba (bistrih supernatanta) i slepe probe su merene nakon 30 min od pripreme reakcione smeše nerastvorljivog ostatka i DPPH radikala na talasnoj dužini od 515 nm.

Trolox, BHA, askorbinska kiselina i kafena kiselina su korištene kao standardni antioksidanti za DPPH antiradikalnu aktivnost.

Antiradikalska aktivnost (AA_{DPPH}) ekstrakta, nerastvorljivog ostatka i antioksidativnih jedinjenja (trolox-a, BHA, askorbinske kiseline i kafene kiseline) na DPPH radikale definisana je izrazom:

$$AA_{DPPH} = (A_{\text{lepe probe}} - A_{\text{probe}}) / A_{\text{lepe probe}} \times 100 (\%),$$

gde su:

A_{probe} - apsorbancija probe sa ekstraktom, nerastvorljivim ostatkom ili standardnim antioksidantom i

$A_{\text{lepe probe}}$ - apsorbancija slepe probe.

Na osnovu AA_{DPPH} vrednosti određena je IC_{50} vrednost koja je definisana kao inhibitorna koncentracija ekstrakta/antioksidativnog jedinjenja neophodna za 50% antiradiakalske aktivnosti na DPPH radikale.

3.6.2. Kinetička ispitivanja reakcije DPPH radikala i heksanskih/etanolnih ekstrakata

Kinetička ispitivanja reakcije DPPH radikala i ekstrakata se izvode radi procene antiradiakalske aktivnosti ekstrakata u zavisnosti od vremena (Bukhari i sar., 2008).

Rastvori i reagensi:

1. Metanol i
2. Rastvor DPPH radikala u metanolu koncentracije $90 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$,
1,8 mg DPPH radikala rastvoreno je u 50 ml metanola.

Spektrofotometrijsko određivanje:

Postupak se zasniva na pripremi reakcionih smeša u epruvetama tako što je u njih dodato po 0,5 ml rastvora etanolnog ekstrakta (u destilovanoj vodi), odnosno heksanskog ekstrakata (u smeši aceton:metanol; 50:50, v/v) različitih koncentracija (0,1 - 10 mg/ml), 1,5 ml rastvora DPPH radikala ($90 \mu\text{M}$) i 3 ml metanola (probe). Slepa proba pripremljena je isto kao i probe, ali bez ekstrakta. Reakcione smeše su promućkane i apsorbance proba i slepe probe su merene nakon 10, 20, 30, 60, 120, 150 i 180 min na talasnoj dužini od 515 nm, odnosno 580 nm (UV-1800 spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan). BHA, askorbinska kiselina i kafena kiselina su korištene kao standardni antioksidanti.

Za različite vremenske intervale izračunata je preostala količina DPPH radikala (Rem_{DPPH}^{\bullet} ; Rem - eng. *Remaining*) prema sledećem izrazu:

$$Rem_{DPPH}^{\bullet} = A_{\text{probe}} / A_{\text{lepe probe}} \times 100 (\%),$$

gde su:

A_{probe} - apsorbanca probe sa ekstraktom ili standardnim antioksidantom i

$A_{\text{slepe probe}}$ - apsorbanca slepe probe, koje su merene za različite vremenske intervale.

Efikasna koncentracija pri različitim vremenskim intervalima $EC_{50,t}$ (mg ekstrakta ili standardnog antioksidanta/mg DPPH[•]), odnosno količina ekstrakta/standardnog antioksidanta u odnosu na polaznu količinu DPPH[•] izračunata je na osnovu izraza:

$$EC_{50,t} = IC_{50,t} / [DPPH^{\bullet}]_{t=0}$$

gde je:

$IC_{50,t}$ - inhibitorna koncentracija pri različitim vremenskim intervalima, definisana kao koncentracija ekstrakta/ standardnog antioksidanta (mg/ml) neophodna za 50% antiradikalske aktivnosti na DPPH[•], a $[DPPH^{\bullet}]_{t=0}$ - polazna koncentracija DPPH[•] (mg/ml).

3.6.3. Određivanje redukcionne sposobnosti heksanskih i etanolnih ekstrakata

Redukciona sposobnost (*eng. reducing power - RP*) ekstrakta određena je metodom po Oyaizu (1986), koja se zasniva na praćenju promene apsorbanca na talasnoj dužini od 700 nm u zavisnosti od koncentracije ekstrakta.

Rastvori i reagensi:

1. 1% kalijum-fericijanid, 1 g $K_3[Fe(CN)_6]$ rastvoreno je u 100 g destilovane vode;
2. 10% trihlorsirćetna kiselina,
10 g CCl_3COOH rastvoreno je u destilovanoj vodi u normalnom sudu od 100 ml;
3. 0,1% ferihlorid, 0,1 g $FeCl_3$ rastvoreno je u 100 g destilovane vode i
4. Na-fosfatni pufer pH 6,6, Na-fosfatni pufer pH 6,6 je dobijen mešanjem 62,5 ml rastvora A i 37,5 ml rastvora B:
- rastvor A: 200 mmol/l NaH_2PO_4
(7,8 g $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ rastvoreno je u 250 ml destilovane vode) i
- rastvor B: 200 mmol/l Na_2HPO_4
(17,9 g $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$ rastvoreno je u 250 ml destilovane vode).

Spektrofotometrijsko određivanje:

U kivetama je pomešano 1 ml rastvora etanolnih ekstrakata (u destilovanoj vodi), odnosno heksanskih ekstrakata (u smeši aceton:metanol; 50:50, v/v) sledećih koncentracija (0,25; 0,5; 1,25; 2,5;

5; i 12,5 mg/ml) ili 1 ml destilovane vode (slepa proba za etanolne ekstrakate), odnosno smeše aceton:metanol (50:50, v/v) (slepa proba za heksanske ekstrakate), 1 ml Na-fosfatnog pufera pH 6,6 i 1 ml 1% kalijum-fericijanida. Rastvori su temperirani u vodenom kupatilu 20 min na 50°C. Zatim su kivete izvađene iz vodenog kupatila, prohlađene, obrisane sa spoljne strane i u rastvore je dodat 1 ml 10% trihlorsirćetne kiseline. Potom je izvedeno centrifugiranje na 3000 o/min 10 min. Nakon centrifugiranja u 2 ml pažljivo odvojenog supernatanta (rastvor iznad taloga) dodato je 2 ml destilovane vode i 0,4 ml 0,1% ferihlorida. Apsorbance su izmerene odmah na talasnoj dužini od 700 nm (UV-1800 spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan). BHA i askorbinska kiselina su korišteni kao standardni antioksidanti za redukcionu sposobnost.

Na osnovu vrednosti apsorbanci određena je IC_{50} vrednost koja je definisana kao koncentracija ekstrakta/standardnog antioksidanta pri kojoj je apsorbanca 0,5.

3.6.4. Određivanje helirajuće aktivnosti etanolnih ekstrakata

Helirajuća aktivnost ekstrakta na fero (Fe^{2+}) jone određena je metodom po Decker i Welch (1990), sa malim modifikacijama.

Rastvori i reagensi:

1. Rastvor $FeSO_4$ koncentracije 2 Mm,
0,0556 g $FeSO_4 \times 7H_2O$ rastvoreno je u 100 ml dejonizovane vode i
2. Rastvor ferozina koncentracije 5 Mm,
0,0246 g ferozina rastvoreno je u 10 ml dejonizovane vode.

Spektrofotometrijsko određivanje:

Postupak se zasniva na pripremi reakcionih smeša u epruvetama tako što je u njih dodato po 1 ml rastvora etanolnog ekstrakta u dejonizovanoj vodi, različitih koncentracija (5; 10; 25; 50 i 100 mg/ml) ili 1 ml dejonizovane vode (slepa proba) i 3,7 ml dejonizovane vode. Zatim je u epruvete dodat 0,1 ml rastvora $FeSO_4$ (koncentracije 2 Mm) i reakcione smeše su intenzivno mućkane 1 min. Nakon 20 min dodato je 0,2 ml rastvora ferozina (koncentracije 5 Mm). Posle 10 min izmerena je apsorbanca reakcionih smeša na 562 nm (UV-1800 spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan) u odnosu na referentni rastvor koji je pripremljen kao i proba samo je umesto rastvora ferozina sadržao dejonizovanu vodu. EDTA je korištena kao standardna supstanca za helirajuću aktivnost.

Helirajuća aktivnost (HA) etanolnog ekstrakta i EDTA na fero jone, odnosno inhibicija formiranja ferozin-Fe²⁺ kompleksa definisana je kao:

$$HA = (A_{\text{slepe probe}} - A_{\text{probe}}) / A_{\text{slepe probe}} \times 100 (\%),$$

gde su:

A_{probe} - apsorbanca probe sa ekstraktom ili sa EDTA i

$A_{\text{slepe probe}}$ - apsorbanca slepe probe.

Na osnovu HA vrednosti određena je IC₅₀ vrednost koja je definisana kao koncentracija ekstrakta, odnosno EDTA pri kojoj helirajuća aktivnost iznosi 50%.

3.6.5. ESR spektralna analiza uticaja etanolnih ekstrakata tropa paradajza na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala

Hidroksil radikali dobijeni su u Fentonovoj reakciji i detektovani "spin trapping" metodom u sistemu koji je dobijen mešanjem: 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 etanolnog ekstrakta tropa paradajza na koncentraciju "spin adukata" hidroksil radikala ispitan je dodavanjem njegovih dimetilformamidnih rastvora u reakcioni sistem. Opseg koncentracija ekstrakata iznosio je 0,025 - 1 mg/ml.

Paralelno je ispitan i uticaj standardnih antioksidanata BHA i hlorogenske kiseline na formiranje i transformaciju hidroksil radikala.

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 sledećim uslovima:

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

Antiradikalna aktivnost ($AA\bullet_{OH}$) ekstrakta i standardnih antioksidanata (hlorogenske kiseline i BHA) definisana je izrazom:

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

gde je:

h_o - visina drugog pika ESR signala DMPO-OH spin adukta slepe probe;

h_x - visina drugog pika ESR signala DMPO-OH spin adukta probe sa ekstraktom ili sa standardnim antioksidantom.

Na osnovu $AA\bullet_{OH}$ vrednosti određena je IC_{50} vrednost koja je definisana kao koncentracija ekstrakta/standardnog antioksidanta neophodna za 50% antiradiakalske aktivnosti na hidroksil radikale.

3.6.6. ESR spektralna analiza uticaja etanolnih ekstrakata tropa paradajza na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala

Superoksid anjon radikali su pripremljeni rastvaranjem KO_2 /kraunetar (10 mM/20 mM) u DMSO. Reakciona smeša se sastojala od 5 μ l ove smeše, 0,5 ml osušenog DMSO i 5 μ l rastvora DMPO u DMSO (2 M). Uticaj etanolnog ekstrakta tropa paradajza na formiranje i transformaciju DMPO/OOH "spin adukata" ispitan je dodavanjem njegovih dimetilformamidnih rastvora u reakcioni sistem. Opseg koncentracija ekstrakta iznosio je 0,25 - 10 mg/ml.

Paralelno je ispitan i uticaj standardnih antioksidanata BHA i hlorogenske kiseline na formiranje i transformaciju superoksid anjon radikala.

Reakcione smeše su prenete u Bruker ER-160FC kvarcnu kivetu za vodene rastvove, a spektri su snimljeni na ESR spektrometru Bruker 300E (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
- frekvencija mikrotalasa	9,64 GHz
- centar polja	3440 G
- ukupan opseg merenja	100 G
- snaga mikrotalasnog područja	20 mW
- temperatura merenja	23°C
- jačina struje	$1,00 \times 10^4$

Antiradikalna aktivnost ($AAO_2^{\bullet-}$) ekstrakta i standardnog antioksidanta (hlorogenske kiseline i BHA) definisana je izrazom:

$$AAO_2^{\bullet-} = (h_0 - h_x)/h_0 \times 100 (\%),$$

gde je:

h_0 - visina drugog pika ESR signala DMPO-OOH spin adukta slepe probe;

h_x - visina drugog pika ESR signala DMPO-OOH spin adukta probe sa ekstraktom ili standardnim antioksidantom.

Na osnovu $AAO_2^{\bullet-}$ vrednosti određena je IC_{50} vrednost koja je definisana kao koncentracija ekstrakta/standardnog antioksidanta neophodna za 50% antiradiakalske aktivnosti na superoksid anjon radikale.

3.7. Određivanje antiproliferativne aktivnosti ekstrakata tropa paradajza

Ćelijske linije MCF7 (humani adenokarcinom dojke), HeLa (humani epitelni karcinom cerviksa) i MRC-5 (humani fetalni fibroblasti pluća) (tabela 8) kultivisane su u DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium) (PAA, Pashing, Austrija), sa dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma (FCS) (PAA, Pashing, Austrija), 100 μ g/ml streptomocina i 100 IU/ml penicilina (Galenika, Srbija) u Kartel (Kartel, Švajcarska) 25 cm^2 flaskovima, na 37°C u atmosferi 95% vazduha i 5% CO_2 , pri visokoj relativnoj vlažnosti vazduha. Sve ćelijske linije su adherentne (tabela 8), a subkultivisane su dva puta nedeljno upotrebom 0,1% tripsina (Sigma, SAD) u 0,04% EDTA i tretirane u logaritamskoj fazi rasta.

Tabela 8. Osnovne karakteristike ćelijskih linija

Ćelijska linija	Kataloški broj	Histološki tip/obolenje	Afinitet za podlogu	Vreme udvajanja [h]*
MCF7	ECACC** 86012803	Epitelne/ adenokarcinom dojke		35
HeLa	ECACC** 93021013	Epitelne/ karcinom grlića materice	adherentne	21
MRC-5	ECACC** 05090501	Fetalni fibroblasti/ zdravo tkivo		27

*Vreme potrebno da se broj ćelija uveća dva puta

**eng. *European Collection of Cell Cultures*

Suspenzije ćelija gustine $4-5 \times 10^3$ ćelija/180 μ l/otvoru, zavisno od vremena udvajanja, inokulisane su u Corning (Corning, SAD) mikrotitar ploče sa 96 otvora i preinkubirane 24h (pre dodavanja uzoraka).

Nakon preinkubacije od 24h ćelije su tokom tretmana inkubirane još 48h, što je adekvatno vremenu od 2-3 generacije ćelija u kontroli. Za analizu ćelijskog rasta pripremljena su serijska razblaženja uzoraka u 0,9% NaCl. Uzorci su filtrirani 0,22 μ m špric mikrofilterima. Ćelije u kulturi su bile izložene delovanju ispitanih uzoraka u trajanju od 48h, nakon čega su dobijeni efekti kvantifikovani sulforodamin B (SRB) kolorimetrijskim testom. Finalne koncentracije dobijene su dodavanjem 20 μ l uzorka u 180 μ l medijuma za kulturu ćelijskih linija sa 5% fetalnog telećeg seruma (FCS) i kod heksanskih ekstrakata bile su u opsegu 1,9-1000 μ g/ml, a etanolnih ekstrakata 0,05-25 mg/ml. Kontrola ćelija dobijena je dodavanjem 20 μ l 0,9% NaCl (rastvarača).

3.7.1. Fotometrijska metoda za određivanje antiproliferativne aktivnosti ekstrakata tropa paradajza

Ukupna količina proteina merena je sulforodamin B (SRB) kvantitativnim kolorimetrijskim testom po Skehan-u (Skehan i sar., 1990). Sulforodamin B ($C_{27}H_{29}N_2O_7T_2Na$) (Sigma, SAD) je anjonska boja koja se u blago kiseloj sredini elektrostatički vezuje za pozitivno naelektrisane aminokiselinske ostatke ćelijskih proteina. U blago baznoj sredini SRB je moguće rastvoriti, kvantitativno ekstrahovati iz ćelije i optički izmeriti da bi se utvrdio relativni ćelijski rast.

Ćelije su fiksirane *in situ* hladnom 50% trihlorsirćetnom kiselinom (TCA) (50 μ l/otvoru) 1h na temperaturi od 4°C. Ploče su isprane destilovanom vodom (4 puta) automatski (Wellwash 4, Labsystems) da bi se uklonila TCA, medijum, niskomolekularni metaboliti i proteini seruma. Nakon sušenja ploče su bojene 0,4% sulforodaminom B (0,4% u 1% sirćetnoj kiselini) (w/v) (75 μ l/otvoru) 30 minuta, na sobnoj temperturi. Boja je isprana (4 puta) 1% sirćetnom kiselinom automatski, a ploče ponovo osušene. Vezana boja ekstrahovana je 10 mM (*eng. tris (hydroxymethyl) aminomethane - TRIS*) bazom (200 μ l/otvoru).

Fotometrijska merenja su izvođena na Multiscan Ascent filter fotometru sa jednokanalnim, vertikalnim izvorom svetlosti za izvođenje standardnih fotometrijskih merenja. Multiscan Ascent koristi koncept vertikalne fotometrije pri kome 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 (A) se izražava kao:

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

gde je:

a - molarna apsorpcija supstance,

S - poprečni presek površine upravne na izvor svetlosti i

m - masa ispitivane supstance.

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 absorbance pozadine; oblast crvene svetlosti 620-750 nm). Apsorbanca je dobijena kao:

$$A = A_{540 \text{ nm}} - A_{690 \text{ nm}}.$$

Procenat ćelijskog rasta je izračunat u odnosu na kontrolu, po formuli:

$$\text{Rast ćelija (\%)} = (A_x/A_0) \times 100$$

gde je:

A_x - apsorbanca test otvora i

A_0 - apsorbanca kontrolnog otvora.

Na osnovu vrednosti rasta ćelija određena je IC_{50} vrednost koja je definisana kao koncentracija ekstrakta/citotoksičnog leka (doksorubicin i gemcitabin)/antioksidativnog jedinjenja (β -karoten, BHA, askorbinska kiselina, kafena kiselina, hlorogenska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulna kiselina, ruzmarinska kiselina, rutin, kvercetin i naringenin) koja izaziva inhibiciju rasta ćelija za 50%.

3.8. Određivanje indeksa bioaktivnosti

Indeks bioaktivnosti (*eng. bioactivity index - BI*) heksanskih i etanolnih ekstrakata tropa odabranih genotipova paradajza određen je metodom po Sun i saradnicima (2002). BI izračunat je na osnovu sledećih izraza:

$BI = (\text{Rezultat ispitivanja antioksidativne aktivnosti} + \text{Rezultat ispitivanja antiproliferativne aktivnosti na ćelije kancera})/2,$

gde je:

Rezultat ispitivanja antioksidativne aktivnosti = $(\sum_{i=1}^n \text{najmanja } IC_{50} \text{ vrednost} / IC_{50,i} \text{ vrednost})/n$

Rezultat ispitivanja antiproliferativne aktivnosti = $(\sum_{i=1}^n \text{najmanja } IC_{50} \text{ vrednost} / IC_{50,i} \text{ vrednost})/n$

n – broj testova za ispitivanje antioksidativne i antiproliferativne aktivnosti na ćelije kancera.

3.9. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišćeni su kompjuterski softverski programi Microsoft Excel v. 2003. i Origin 7.0. (OriginLab Corporation, Northampton, USA, 1991-2002). Rezultati ispitivanja hemijskog sastava i antioksidativne aktivnosti, koja su rađena u tri ponavljanja, predstavljani su kao srednja vrednost \pm standardna devijacija, osim ako nije naznačeno drugačije. Rezultati određivanja antiproliferativne aktivnosti su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD) dva nezavisna eksperimenta izvedena u kvadriplikatu. Razlike između kontrolnih i eksperimentalnih grupa određene su upotrebom jednostrane analize varijanse, na nivou značajnosti od 0,01 (Microsoft Office Excel 2003 software). IC₅₀ vrednosti određene su programom Calcsyn for Windows (Version 1.1.0.0.; Biosoft).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

U ovom radu, nakon ceđenja soka od odabranih genotipova paradajza, dobijen je trop, sporedni proizvod, koji se sastoji od ljuske, semena i dela mesa. Trop paradajza osušen je pod vakuumom, a suvi trop ekstrahovan je heksanom, a zatim 80% etanolom. Sadržaj lipofilnih i hidrofilnih antioksidativnih jedinjenja u ekstraktima određen je spektrofotometrijskim metodama, kao i HPLC analizama. Ispitana je i antioksidativna i antiproliferativna aktivnosti dobijenih ekstrakata različitim metodama. Takođe je u ostatku (nakon ekstrakcija heksanom, a zatim 80% etanolom) određen sadržaj ukupnih, kao i rastvorljivih i nerastvorljivih prehrambenih vlakana, kao i njegova antioksidativna aktivnost.

Za ispitivanje su korišćeni uzorci paradajza - novostvorenih (Bačka, Knjaz, Novosadski niski i O₂) i tradicionalnih (Rutgers i Saint Pierre) genotipova (slika 33).

Knjaz: srednje rana, savremena sorta Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad (priznata 2000. godine). Biljka je uspravna, determinantnog rasta, visine 70-75 cm. Plod je krupan, sa 5-8 komora, okrugao, crvene boje, mase 140-160 g. Karakteristika sorte je visok sadržaj suve materije u plodu (6,5%). Plod ima prijatan ukus zbog izbalansiranog odnosa šećera i kiselina.

Bačka: srednje kasna, savremena sorta Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad (priznata 1998. godine). Stablo je determinantnog rasta, bujno, visine od 70 do 75 cm. Plod je crven, čvrst, krupan, prosečne mase 160-180 g. Zbog čvrstine ploda pogodan je za transport. Takođe, bitna osobina sorte je da je masa ploda ujednačena po etažama. Proizvodi se direktnom setvom ili iz rasada.

Novosadsku niski: rana, savremena sorta Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad (priznata 1993. godine). Biljka je determinantnog rasta. Plodovi su okrugli, glatki, mase 100-120 g, združenog zrenja. Prosečan sadržaj suve materije u plodu iznosi 5-5,5%. Gaji se bez oslonca, direktnom setvom ili iz rasada. Koristi se u prerađivačkoj industriji, ali zbog oblika i boje ploda može i za svežu potrošnju.

O₂: obojena oplemenjivačka linija, narandžaste boje ploda, indeterminantnog tipa rasta. Plod je blago spljošten do okrugao, prosečne težine 157 g, sa 4-5 komora u plodu i sadržajem suve materije oko 6%.

Rutgers: tradicionalna sorta, američkog porekla, indeterminantnog tipa rasta. Plod je blago spljošten, glatak, krupan, prosečne mase 200 g i sadržaja suve materije 5,9%. Posедуje odlične osobine pogodne za preradu.

Saint Pierre: tradicionalna sorta, francuskog porekla, indeterminantnog tipa rasta. Plod je blago spljoštenog oblika, intenzivno crvene boje, prosečne mase 150 g, sadržaja suve materije oko 6,3%. Posедуje odlične osobine pogodne za preradu.



Bačka



Knjaz



Novosadski niski

O₂

Rutgers



Saint Pierre

Slika 33. Plodovi odabranih genotipova paradajza

4.1. Dobijanje tropa i ekstrakata tropa od odabranih genotipova paradajza

Trop paradajza, dobijen kao sporedni proizvod nakon ceđenja soka paradajza osušen je u vakuumu, i prinosi suvog tropa paradajza genotipova Bačka, Knjaz, Novosadski niski, O₂, Rutgers i Saint Pierre prikazani su u tabeli 9.

Tabela 9. Prinos suvog tropa paradajza

Genotip	Prinos (%)*
Bačka	1,95 ± 0,13
Knjaz	1,32 ± 0,05
Novosadski niski	1,85 ± 0,07
O ₂	1,16 ± 0,12
Rutgers	0,88 ± 0,09
Saint Pierre	2,00 ± 0,16

*Prinos suvog tropa izražen u % u odnosu na masu paradajza.

Najveći prinos suvog tropa u odnosu na masu paradajza dobijen je za genotip Saint Pierre (2,00%), a najmanji za genotip Rutgers (0,88%).

Osušeni trop odabranih genotipova paradajza, ekstrahovan je heksanom, a zatim je ostatak ekstrahovan 80% etanolom. Prinosi suvih heksanskih i etanolnih ekstrakata, kao i ostataka dobijenih nakon ekstrakcija dati su u tabeli 10.

Tabela 10. Prinos heksanskih i etanolnih ekstrakata, kao i ostataka dobijenih nakon ekstrakcija

Genotip	Prinos (%)*		
	Heksanski ekstrakt	Etanolni ekstrakt	Ostatak
Bačka	1,21 ± 0,05	36,18 ± 1,61	51,81 ± 2,50
Knjaz	0,85 ± 0,04	40,61 ± 1,73	53,92 ± 0,81
Novosadski niski	7,06 ± 0,34	34,18 ± 1,62	50,02 ± 2,42
O ₂	5,17 ± 0,25	36,41 ± 1,11	53,60 ± 2,51
Rutgers	8,29 ± 0,41	34,86 ± 1,50	43,12 ± 1,54
Saint Pierre	4,61 ± 0,23	44,35 ± 1,91	37,84 ± 1,80

*Prinos heksanskih i etanolnih ekstrakata, kao i ostataka dobijenih nakon ekstrakcija izražen u % u odnosu na masu suvog tropa paradajza.

Najveći prinos heksanskog ekstrakta ostvaren je pri ekstrakciji tropa paradajza genotipa Rutgers (8,29%), a etanolnog ekstrakta pri ekstrakciji tropa paradajza genotipa Saint Pierre (44,35%). Ostatak nakon ekstrakcija tropa genotipa Knjaz dobijen je u najvećem prinosu (53,92%).

4.2. Hemijski sastav ekstrakata i ostataka nakon ekstrakcija tropa paradajza

Sadržaji lipofilnih i hidrofilnih antioksidativnih jedinjenja u heksanskim i etanolnim ekstraktima tropa odabranih genotipova paradajza određeni su odgovarajućim spektrofotometrijskim metodama, kao i HPLC analizama. Sadržaji ukupnih, rastvorljivih i nerastvorljivih vlakana u ostacima nakon ekstrakcija tropa određeni su odgovarajućim enzimskim metodama.

4.2.1. Sadržaj lipofilnih antioksidativnih jedinjenja

Sadržaji lipofilnih antioksidativnih jedinjenja (likopena i β -karotena), određeni spektrofotometrijskom metodom po Nagata i Yamashita (1992), u heksanskim ekstraktima tropa odnosno u suvom tropu odabranih genotipova paradajza, prikazani su u tabeli 11.

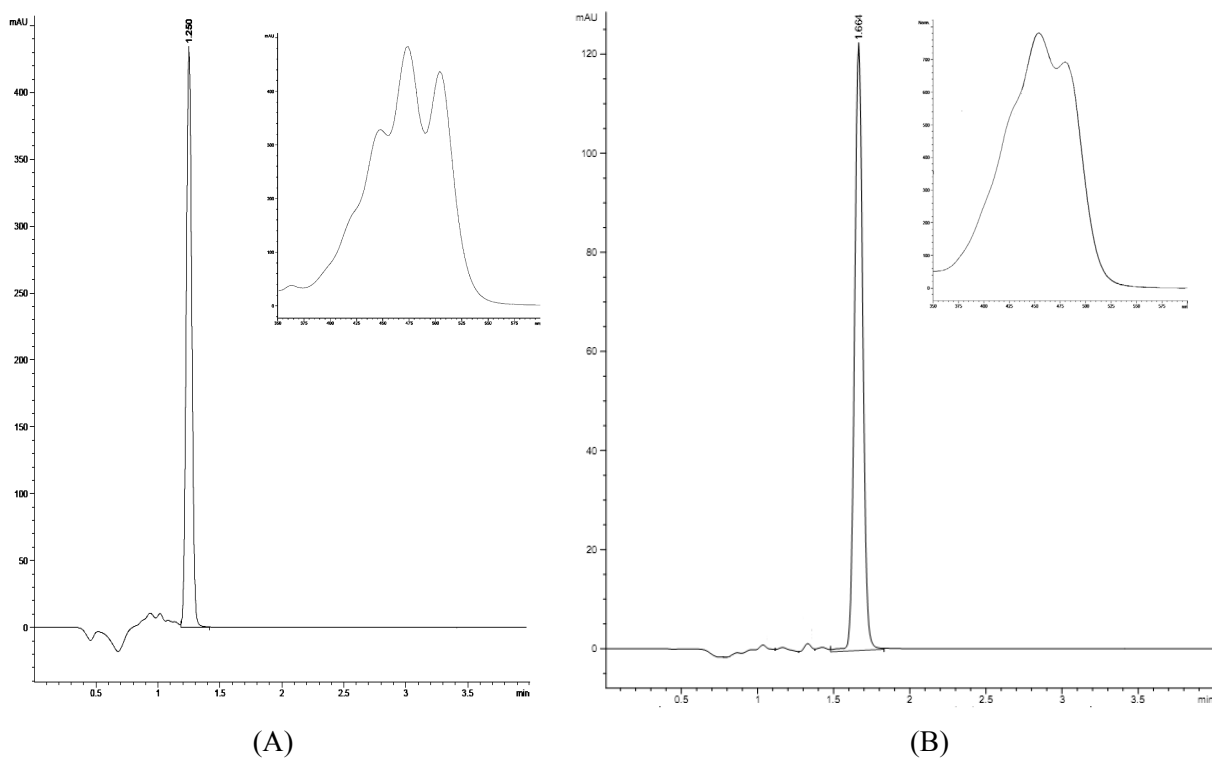
Tabela 11. Sadržaj likopena i β -karotena u heksanskim ekstraktima tropa i suvom tropu paradajza

Genotip	Likopen		β -Karoten	
	mg/g*	mg/100 g**	mg/g*	mg/100 g**
Bačka	13,10 \pm 0,45	15,84 \pm 0,54	14,87 \pm 0,62	17,98 \pm 0,75
Knjaz	22,64 \pm 0,86	19,33 \pm 0,73	15,93 \pm 0,56	13,60 \pm 0,48
Novosadski niski	6,43 \pm 0,23	45,39 \pm 1,62	2,48 \pm 0,09	17,51 \pm 0,64
O ₂	0,33 \pm 0,01	1,71 \pm 0,05	11,83 \pm 0,44	61,13 \pm 2,27
Rutgers	4,29 \pm 0,14	35,55 \pm 1,16	6,22 \pm 0,18	51,55 \pm 1,49
Saint Pierre	9,08 \pm 0,37	41,86 \pm 1,71	2,50 \pm 0,10	11,53 \pm 0,46

* po suvom heksanskom ekstraktu; ** po suvom tropu.

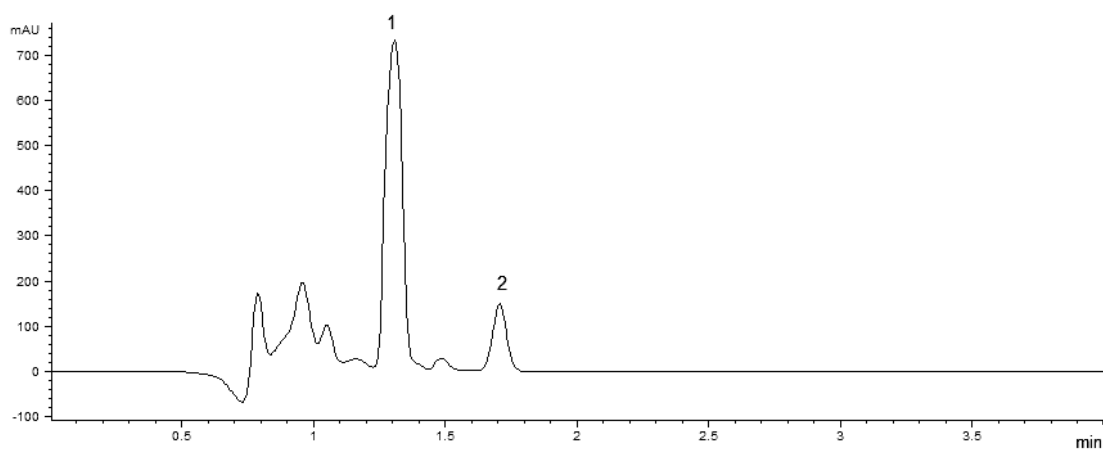
Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da je sadržaj likopena i β -karotena najveći u heksanskom ekstraktu tropa paradajza genotipa Knjaz (22,64 mg/g; 15,93 mg/g). Najmanji sadržaj likopena određen je u heksanskom ekstraktu tropa paradajza genotipa O₂ (0,33 mg/g), a β -karotena u heksanskom ekstraktu tropa paradajza genotipa Novosadski niski (2,48 mg/g). S obzirom da su heksanski ekstrakti tropa paradajza dobijeni u različitim prinosima u zavisnosti od genotipa, trop paradajza genotipa Novosadski niski ima najveći sadržaj likopena (45,39 mg/100 g), dok je najveći sadržaj β -karotena određen u tropu paradajza genotipa O₂ (61,13 mg/100 g).

HPLC analizom utvrđeno je prisustvo likopena i β -karotena u heksanskim ekstraktima tropa odabranih genotipova paradajza poređenjem njihovih retencionih vremena (t_r) i spektralnih karakteristika (UV_{max}) sa odgovarajućim parametrima analitičkih standarda karotenoida. HPLC hromatogrami i UV spektri analitičkih standarda likopena i β -karotena prikazani su na slici 34.

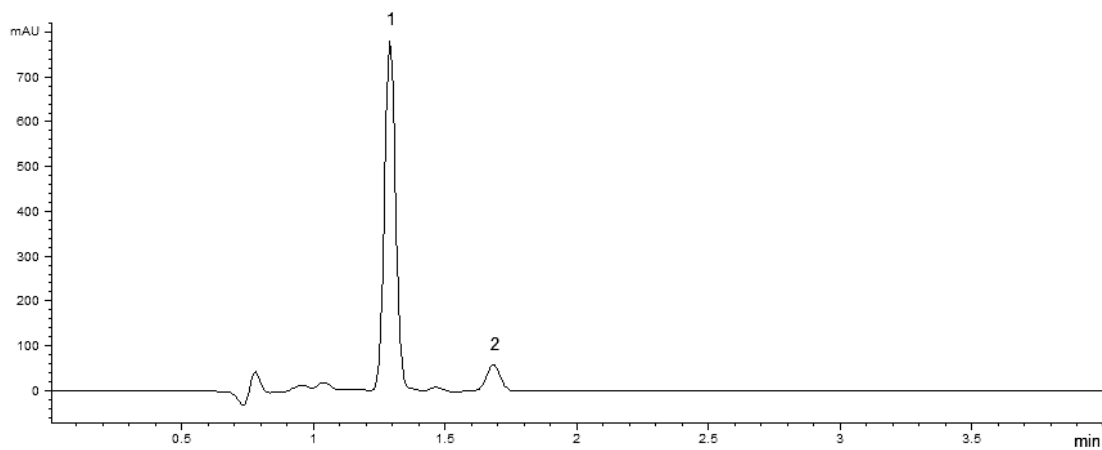


Slika 34. HPLC hromatogrami snimljen na 473 nm i UV spektri standarda likopena (A) i β -karotena (B)

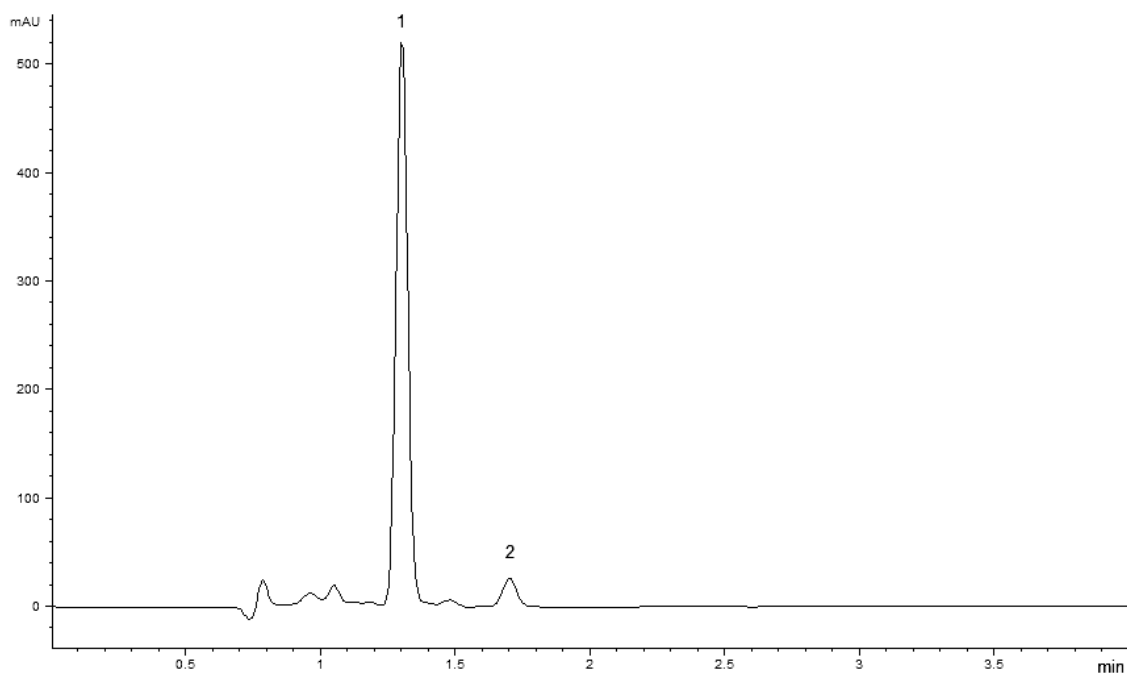
Na slikama 35 - 38 prikazani su HPLC hromatogrami heksanskih ekstrakata tropa paradajza genotipova Bačka, Knjaz, Novosadski niski i Saint Pierre.



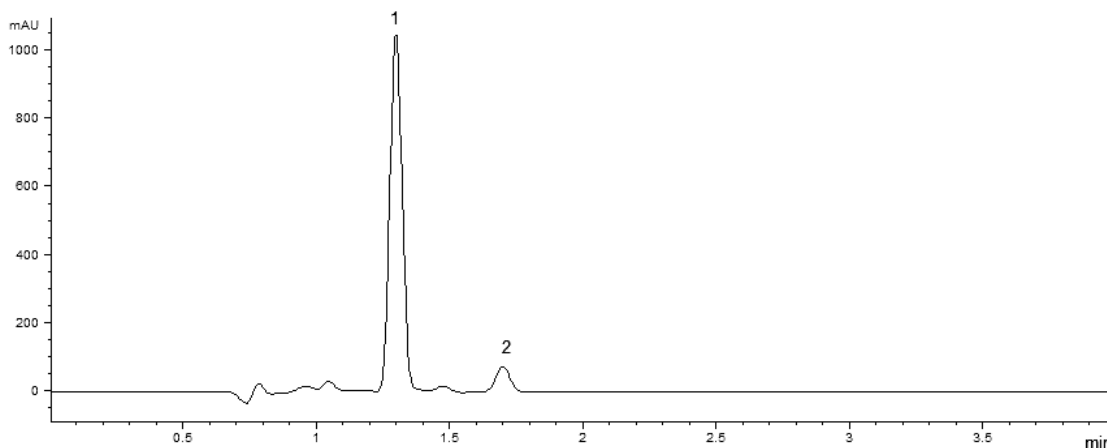
Slika 35. HPLC hromatogram snimljen na 473 nm heksanskog ekstrakta tropa paradajza genotipa Bačka (Pik: 1 - likopen i 2 - β -karoten)



Slika 36. HPLC hromatogram snimljen na 473 nm heksanskog ekstrakta tropa paradajza genotipa Knjaz (Pik: 1 - likopen i 2 - β -karoten)



Slika 37. HPLC hromatogram snimljen na 473 nm heksanskog ekstrakta tropa paradajza genotipa Novosadski niski (Pik: 1 - likopen i 2 - β -karoten)



Slika 38. HPLC hromatogram snimljen na 473 nm heksanskog ekstrakta tropa paradajza genotipa Saint Pierre (Pik: 1 - likopen i 2 - β -karoten)

Na osnovu zavisnosti površine pika na hromatogramu od koncentracije standarda likopena i β -karotena određeni su sadržaji ovih karotenoida u ispitivanim heksanskim ekstraktima, a zatim je njihov sadržaj izražen po suvom tropu (tabela 12).

Tabela 12. Sadržaj likopena i β -karotena u heksanskim ekstraktima tropa i suvom tropu paradajza

Genotip	Likopen		β -karoten	
	mg/g*	mg/100 g**	mg/g*	mg/100 g**
Bačka	13,63 \pm 0,11	16,48 \pm 0,13	11,95 \pm 0,25	14,45 \pm 0,30
Knjaz	15,69 \pm 0,11	13,40 \pm 0,09	10,12 \pm 0,43	8,64 \pm 0,37
Novosadski niski	6,34 \pm 0,03	44,77 \pm 0,21	2,73 \pm 0,29	19,28 \pm 2,05
Saint Pierre	9,34 \pm 0,08	43,04 \pm 0,37	5,02 \pm 0,17	23,16 \pm 0,78

* po suvom heksanskom ekstraktu; ** po suvom tropu.

Heksanski ekstrakt tropa paradajza Knjaz imao je najveći sadržaj likopena (15,69 mg/g), dok je sadržaj β -karotena bio najveći u heksanskom ekstraktu tropa paradajza Bačka (11,95 mg/g). Najmanji sadržaji likopena i β -karotena određeni su u heksanskom ekstraktu tropa paradajza Novosadski niski (6,34 mg/g; 2,73 mg/g). S obzirom na različite prinose heksanskih ekstrakata, najveći sadržaj likopena određen je u tropu paradajza genotipa Novosadski niski (44,77 mg/100 g), dok je trop paradajza genotipa Saint Pierre imao najveći sadržaj β -karotena (23,16 mg/100 g).

Sadržaji lipofilnih antioksidativnih jedinjenja (likopena i β -karotena) u tropu odabranih genotipova paradajza u saglasnosti su sa istraživanjima Knoblich i saradnika (2005). Sadržaj likopena i β -karotena u sporednom proizvodu, koji se sastojao od ljuske paradajza, iznosio je 73,4 i 13,0 mg/100 g, dok je sadržaj likopena i β -karotena u sporednom proizvodu, koji se sastojao od semena paradajza, iznosio 2,93 i 1,44 mg/100 g suvog sporednog proizvoda.

4.2.2. Sadržaj hidrofilnih antioksidativnih jedinjenja

Sadržaji hidrofilnih antioksidativnih jedinjenja (polifenola, flavonoida i askorbinske kiseline) u etanolnim ekstraktima tropa odabranih genotipova paradajza određeni su odgovarajućim spektrofotometrijskim metodama. U tabeli 13 su prikazani sadržaji polifenola (Ph), flavonoida (Fl) i askorbinske kiseline (Asc), kao i odnos flavonoidi/polifenoli u ispitivanim ekstraktima, dok je u tabeli 14 prikazan sadržaj ovih jedinjenja u suvom tropu odabranih genotipova paradajza.

Tabela 13. Sadržaj hidrofilnih antioksidativnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima tropa paradajza

Genotip	Ph (mg/g)	Fl (mg/g)	Asc (mg/g)	Odnos Fl/Ph
Bačka	11,7 ± 0,51	7,73 ± 0,31	0,51 ± 0,02	0,66
Knjaz	14,6 ± 0,67	7,62 ± 0,35	0,89 ± 0,03	0,52
Novosadski niski	16,5 ± 0,82	11,7 ± 0,54	1,89 ± 0,08	0,71
O ₂	18,6 ± 0,73	11,2 ± 0,53	0,35 ± 0,01	0,60
Rutgers	14,0 ± 0,59	11,9 ± 0,57	1,57 ± 0,06	0,85
Saint Pierre	16,2 ± 0,74	12,1 ± 0,49	0,39 ± 0,01	0,74

Tabela 14. Sadržaj hidrofilnih antioksidativnih jedinjenja u suvom tropu paradajza

Genotip	Ph (mg/100 g)	Fl (mg/100 g)	Asc (mg/100 g)
Bačka	423,43 ± 18,45	279,65 ± 11,22	18,29 ± 0,72
Knjaz	590,92 ± 27,21	309,50 ± 14,21	36,34 ± 1,22
Novosadski niski	564,68 ± 28,03	400,85 ± 18,46	64,43 ± 2,73
O ₂	678,55 ± 26,58	407,31 ± 19,30	12,69 ± 0,36
Rutgers	489,32 ± 20,56	416,33 ± 19,87	54,64 ± 2,09
Saint Pierre	719,73 ± 32,82	534,52 ± 21,73	17,12 ± 0,44

Sadržaj polifenolnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima tropa paradajza određen je spektrofotometrijskom metodom po Folin-Ciocalteu. Ova metoda se zasniva na redukcionoj sposobnosti fenolnih hidroksilnih grupa, ali je poznato da različita fenolna jedinjenja imaju različit odziv na Folin-Ciocalteu reagens. Takođe je poznato da prisustvo interferirajućih jedinjenja (šećeri, aromatični amini, sumpor-dioksid, vitamin C, organske kiseline, Fe(II) i ostale supstance koje nisu polifenolnog porekla) u ekstraktima može uticati na nerealno povećanje rezultata sadržaja polifenolnih jedinjenja određenih ovom metodom (Prior i sar., 2005). Sadržaji ukupnih rastvorljivih polifenolnih jedinjenja u ispitivanim ekstraktima, izraženi kao ekvivalent hlorogenske kiseline, iznose od 11,7 mg/g u ekstraktu tropa genotipa Bačka do 18,6 mg/g u ekstraktu tropa genotipa O₂. S obzirom na ostvarene prinose etanolnih ekstrakata, najveći sadržaj polifenolnih jedinjenja utvrđen je u tropu paradajza genotipa Saint Pierre (719,73 mg/100 g). Sadržaji polifenolnih jedinjenja u ispitivanim ekstraktima tropa odabranih genotipova paradajza izraženi kao ekvivalent galne kiseline (8,13-12,55 mg GAE/g suvog ekstrakta) bili su slični sadržaju polifenolnih jedinjenja u vodenom ekstraktu (12,15 ± 0,83 mg GAE/g suvog ekstrakta), a manji od sadržaja polifenolnih jedinjenja u etanolnom ekstraktu (42,00 ± 6,19 mg GAE/g suvog ekstrakta) tropa paradajza određenih u istraživanju Peschel i saradnika (2006).

Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u etanolnim ekstraktima tropa paradajza izvedeno je spektrofotometrijskom metodom po Zhishen i saradnicima (1999), koja se zasniva na sposobnosti flavonoida da sa Al³⁺ grade odgovarajuće flavonoid-aluminijum komplekse. Sadržaj flavonoida, izražen kao ekvivalent rutina, je najmanji u ekstraktu tropa genotipa Knjaz (7,62 mg/g), dok ekstrakt tropa odnosno trop genotipa Saint Pierre ima najveći sadržaj flavonoida (12,1 mg/g odnosno 534,52 mg/100 g). Na osnovu spektrofotometrijskih određivanja, može se zaključiti da su flavonoidi najznačajnija grupa polifenolnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima tropa paradajza; odnos flavonoidi/polifenoli iznosi od 0,52 (trop genotipa Knjaz) do 0,85 (trop genotipa Rutgers). U ispitivanju Lenucci i saradnika (2006) utvrđeno je da odnos flavonoidi/polifenoli (0,12-0,49) značajno zavisi od genotipa paradajza.

Spektrofotometrijskom metodom po Klein i Perry (1982) određen je sadržaj askorbinske kiseline u etanolnim ekstraktima tropa paradajza. Etanolni ekstrakt tropa paradajza genotipa Novosadski niski imao je najveći sadržaj askorbinske kiseline (1,89 mg/g), dok je najniži sadržaj askorbinske kiseline utvrđen u etanolnom ekstraktu tropa paradajza genotipa O₂ (0,35 mg/g). Najveći sadržaj askorbinske kiseline utvrđen je u tropu paradajza genotipa Novosadski niski (64,43 mg/100 g).

Sadržaj polifenolnih jedinjenja, flavonoida i askorbinske kiseline u paradajzu zavisi od genotipa, uslova gajenja, kao i od zrelosti biljke (Gahler i sar., 2003; Raffo i sar., 2002). Takođe, spoljašnji faktori poput svetlosti, temperature, prisustva hranljivih materija u zemljištu mogu uticati na fenilpropanoidni metabolizam (Dixon i Paiva, 1995).

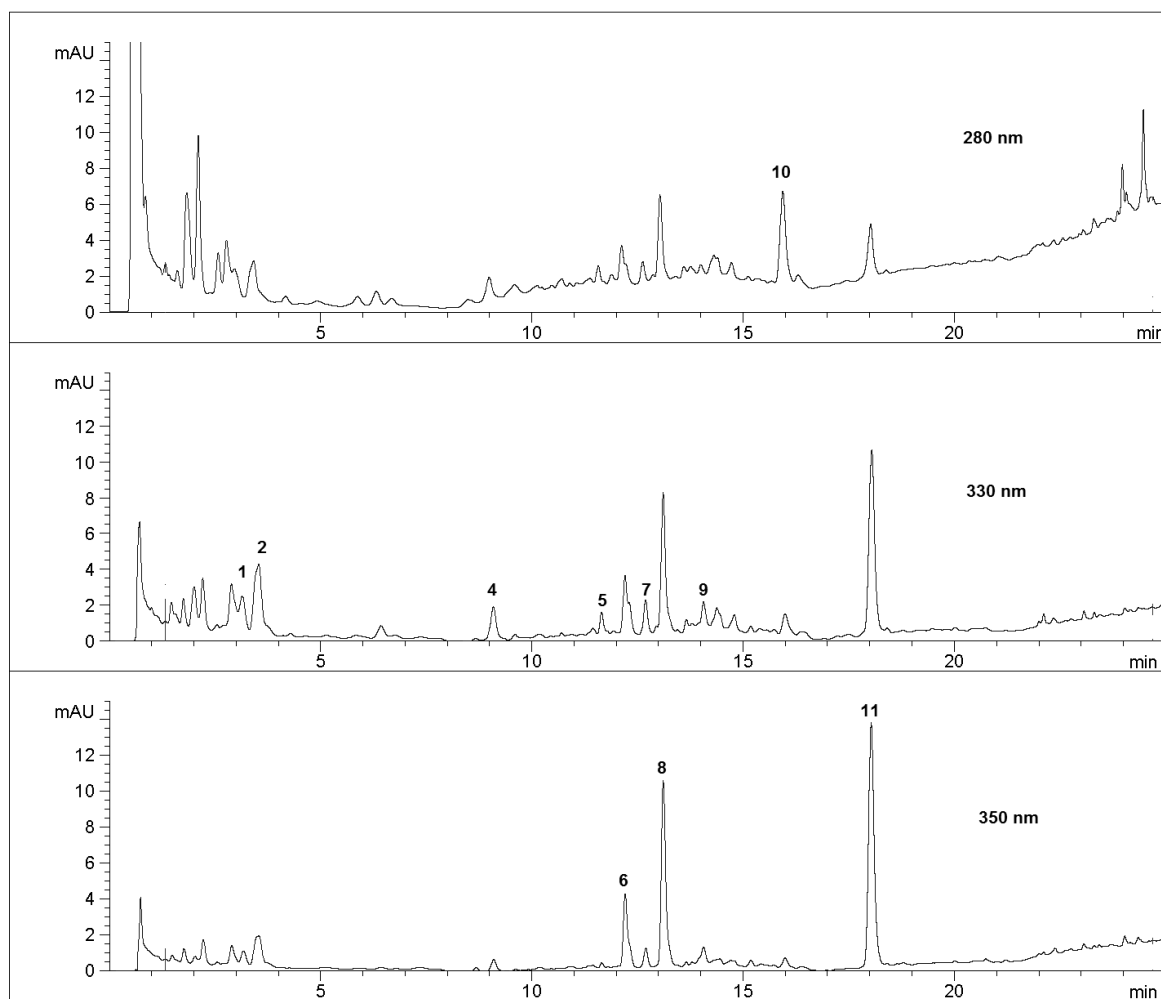
Kvalitativni i kvantitativni sastav polifenolnih jedinjenja tropa odabranih genotipova paradajza utvrđen je HPLC analizom etanolnih ekstrakata tropa, poređenjem retencionih vremena (t_r) i spektroskopskih karakteristika (UV_{max}) sa ovim karakteristikama dostupnih standarda polifenolnih jedinjenja. Retenciona vremena (t_r) i spektroskopske karakteristike (UV_{max}) standardnih polifenolnih jedinjenja prikazani su u tabeli 15.

Tabela 15. Retenciona vremena (t_r) i spektroskopske karakteristike (UV_{max}) standardnih polifenolnih jedinjenja

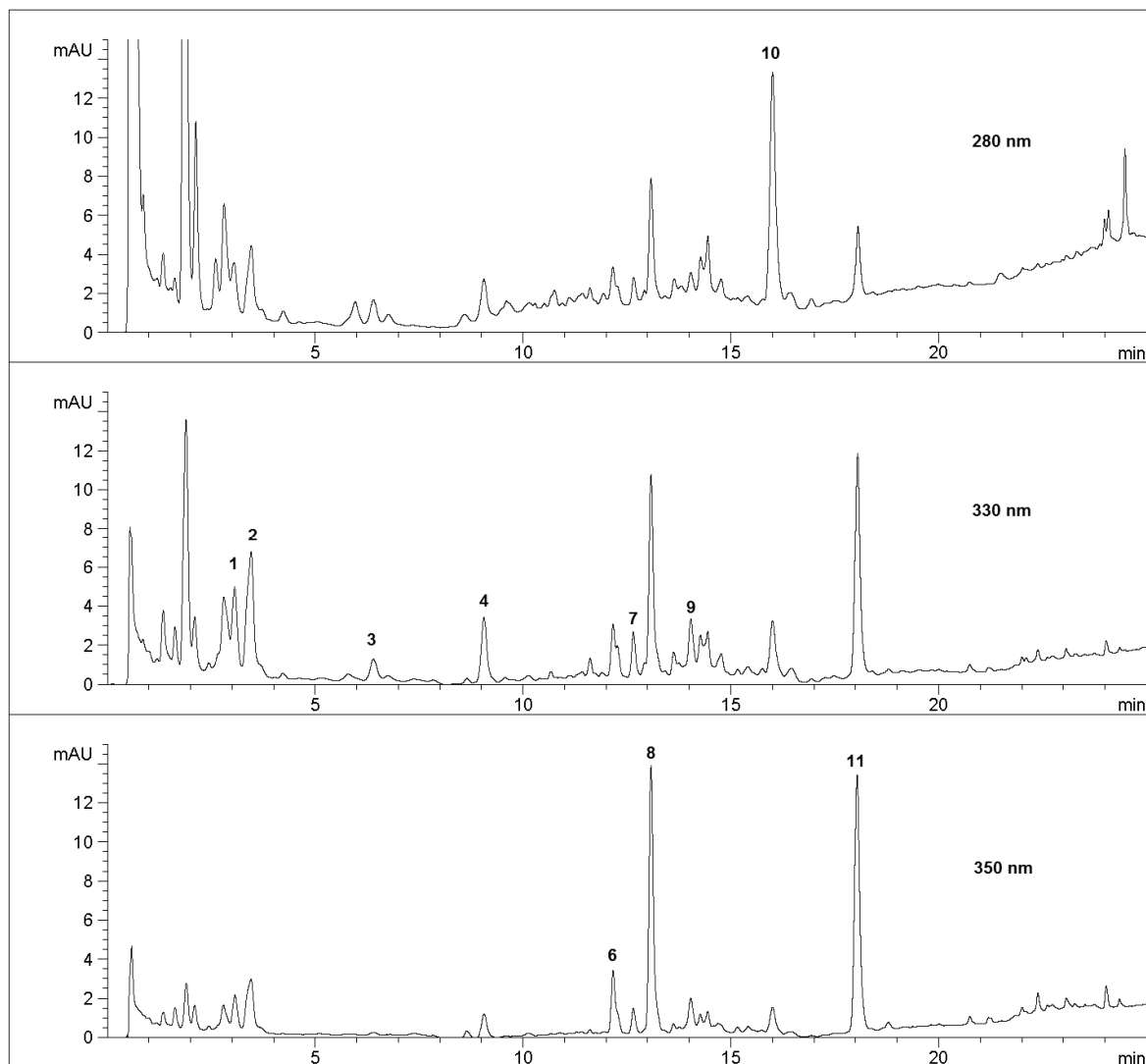
Polifenolna jedinjenja	t_r (min)	UV_{max}
Kafena kiselina	3,24	240, 302 (b.m.)*, 324
Hlorogenska kiselina	3,69	238, 298 (b.m.), 324
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	6,88	234, 298 (b.m.), 310
Ferulna kiselina	9,41	238, 296 (b.m.), 322
Ruzmarinska kiselina	14,19	234, 290 (b.m.), 330
Rutin	13,25	256, 266 (b.m.), 600 (b.m.), 356
Kvercetin	16,45	256, 302 (b.m.), 370
Naringenin	16,78	230, 290

*b.m. - bočni maksimum

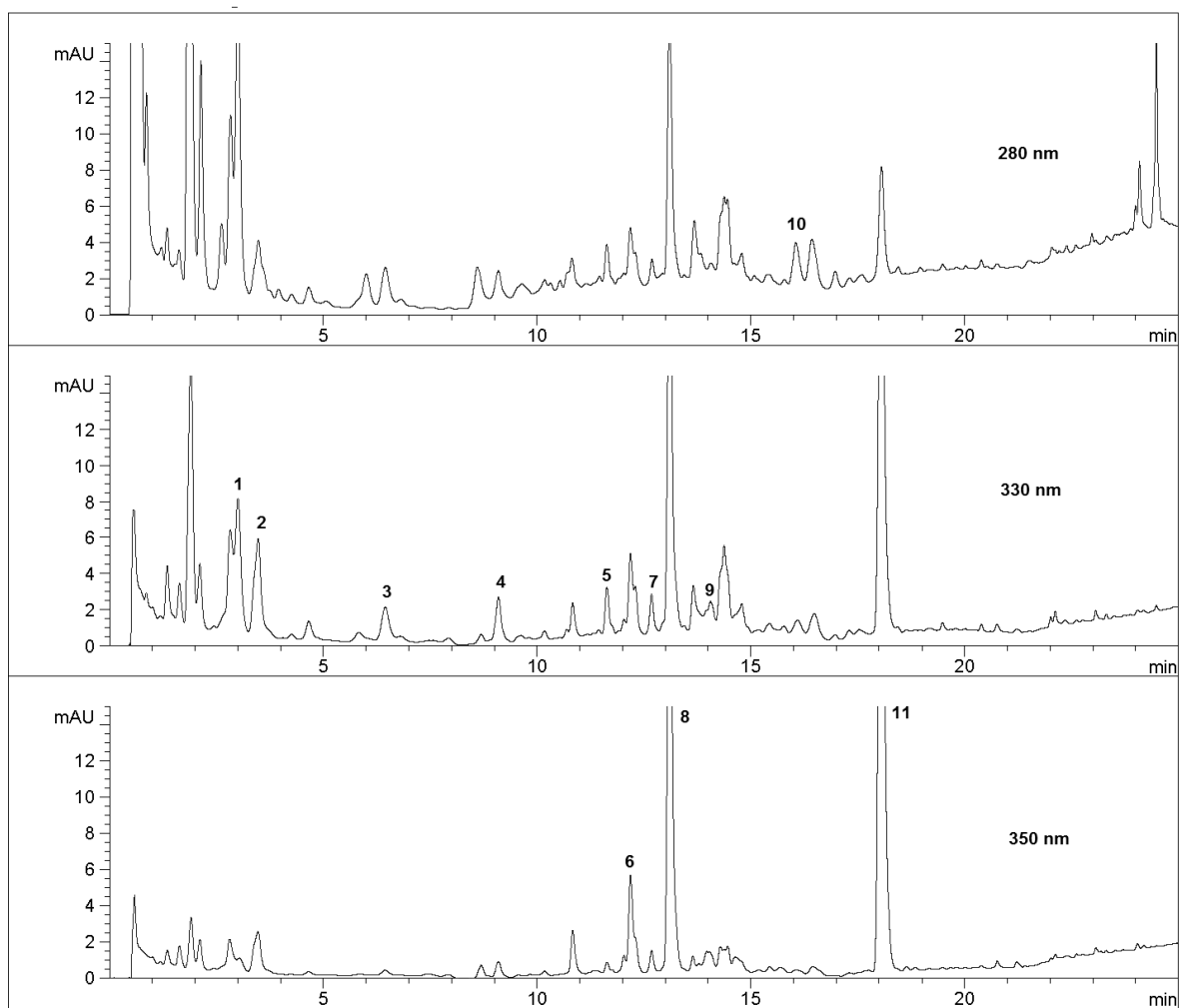
HPLC hromatogrami etanolnih ekstrakata tropa odabranih genotipova paradajza prikazani su na slikama 39-44. U ekstraktima tropa paradajza identifikovane su fenolne kiseline (kafena, hlorogenska, *p*-kumarinska, ferulna i ruzmarinska kiselina) i flavonoli (kvercetin i rutin). Takođe, nekoliko drugih pikova (označenih brojevima 6, 7, 9 i 11), s obzirom na sličnost njihovih spektara sa spektrima ruzmarinske kiseline, rutina ili naringenina identifikovani su kao njihovi derivati.



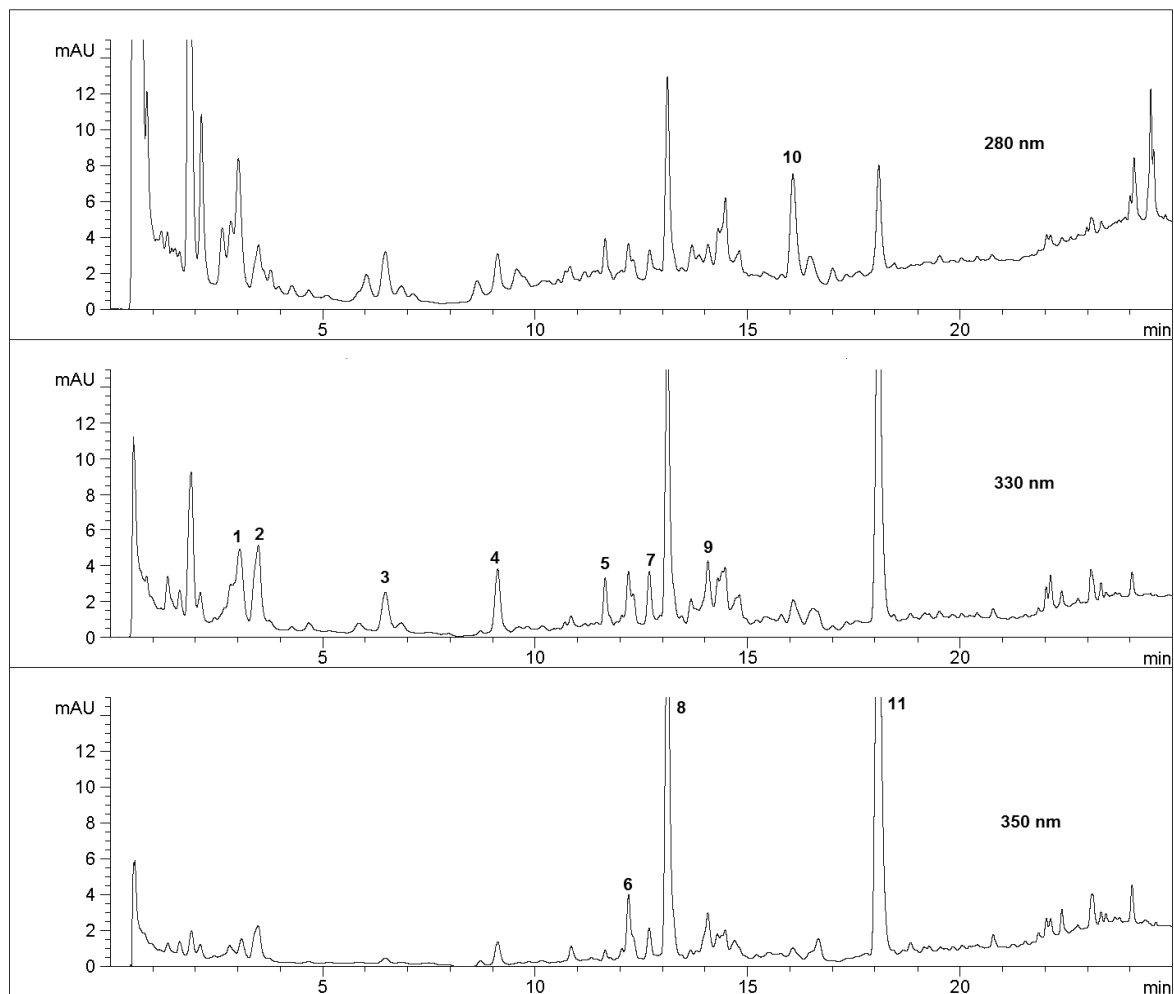
Slika 39. HPLC hromatogrami polifenolnih jedinjenja u etanolnom ekstraktu troja paradajza genotipa Bačka na 280, 330 i 350 nm; pik: 1 - kafena kiselina, 2 - hlorogenska kiselina, 3 - *p*-kumarinska kiselina, 4 - ferulna kiselina, 5 - ruzmarinska kiselina, 6 - derivat rutina, 7 - derivat ruzmarinske kiseline-I, 8 - rutin, 9 - derivat ruzmarinske kiseline-II, 10 - kvercetin i 11 - naringenin-derivat



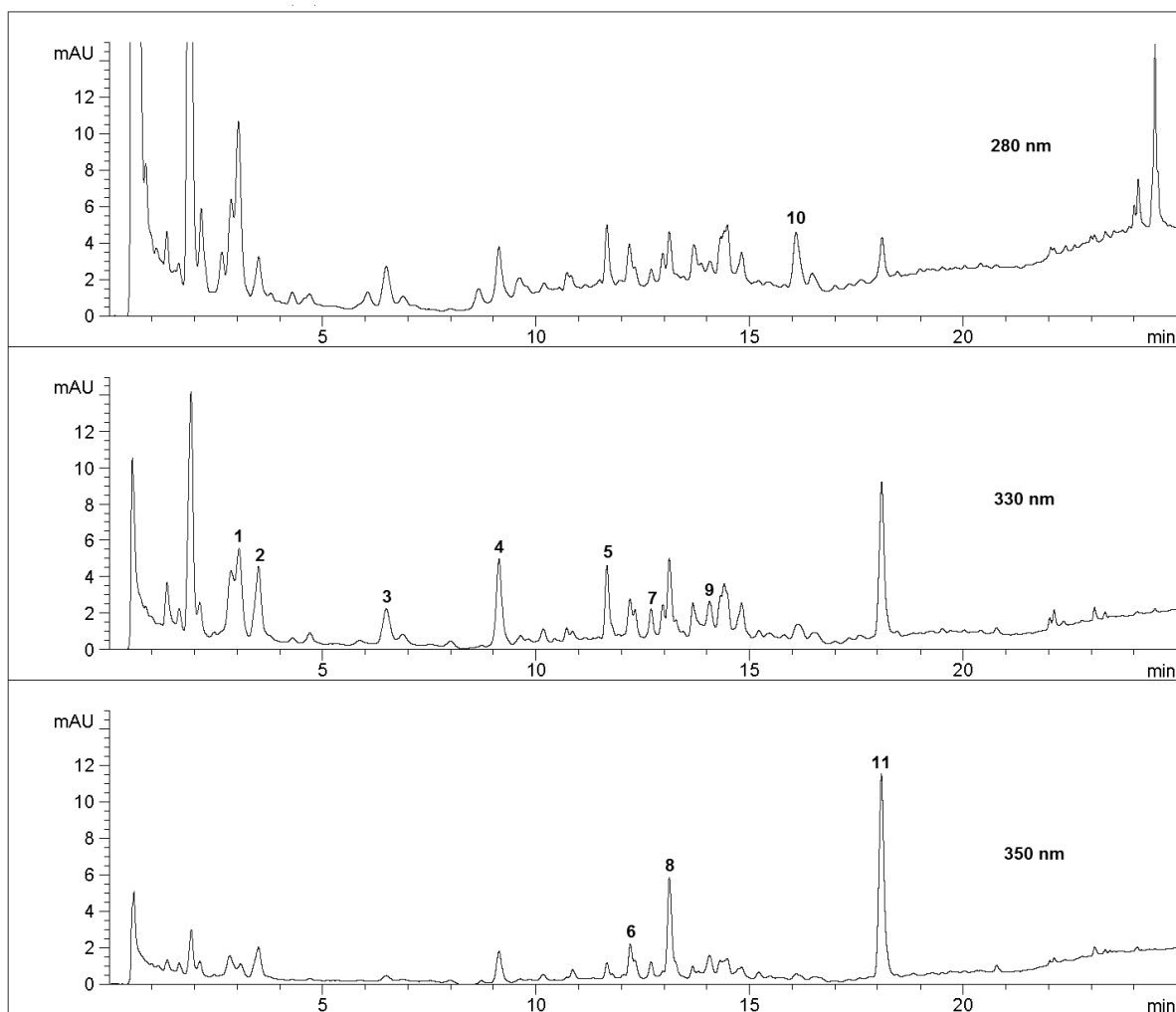
Slika 40. HPLC hromatogrami polifenolnih jedinjenja u etanolnom ekstraktu troja paradajza genotipa Knjaz na 280, 330 i 350 nm; oznake pikova su iste kao oznake na slici 39



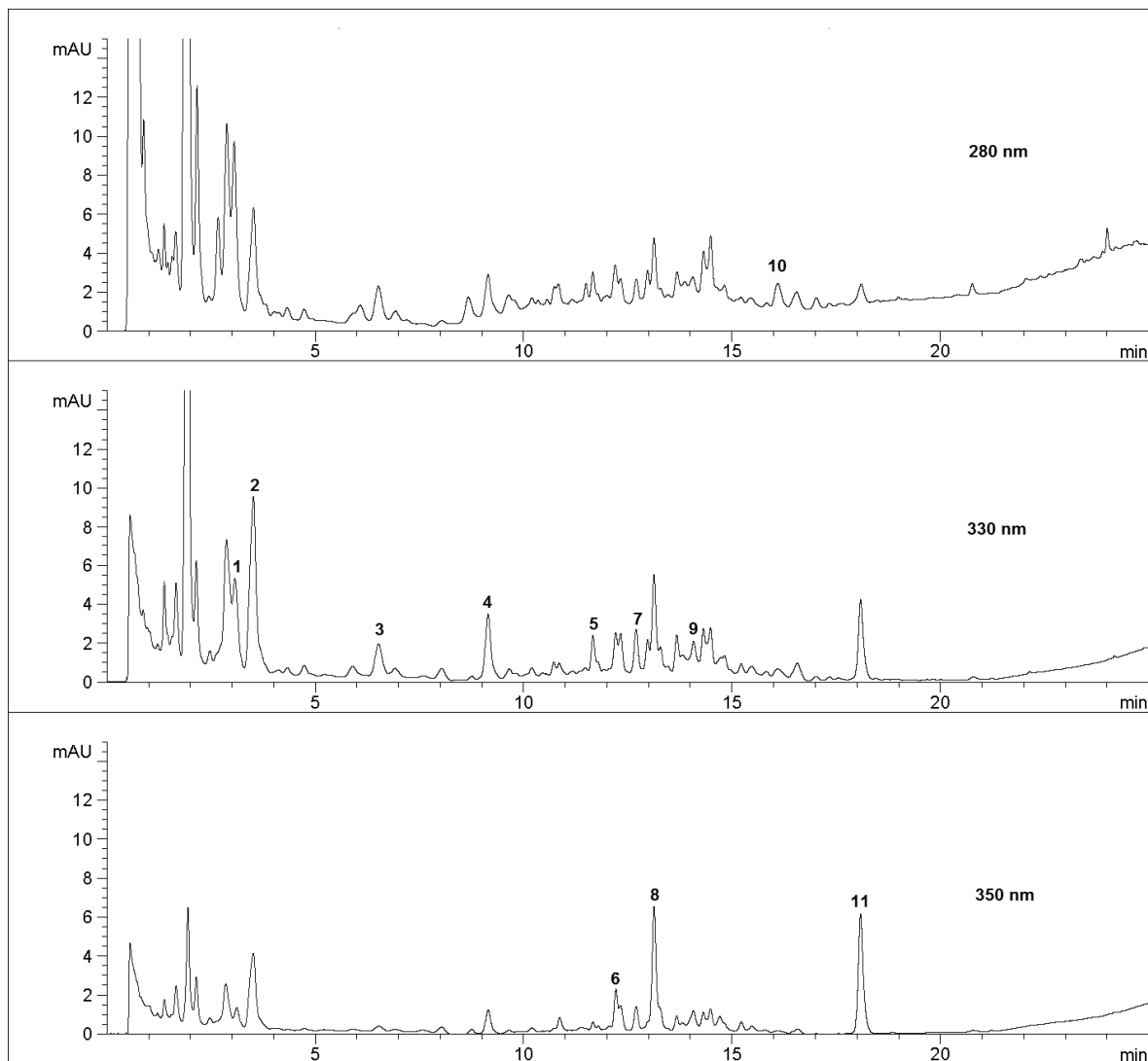
Slika 41. HPLC hromatogrami polifenolnih jedinjenja u etanolnom ekstraktu troja paradajza genotipa Novosadski niski na 280, 330 i 350 nm; oznake pikova su iste kao oznake na slici 39



Slika 42. HPLC hromatogrami polifenolnih jedinjenja u etanolnom ekstraktu tropa paradajza genotipa O₂ na 280, 330 i 350 nm; oznake pikova su iste kao oznake na slici 39

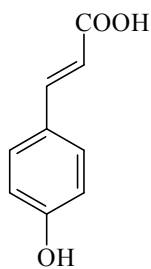
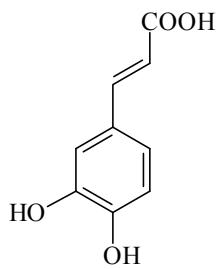


Slika 43. HPLC hromatogrami polifenolnih jedinjenja u etanolnom ekstraktu tropa paradajza genotipa Rutgers na 280, 330 i 350 nm; oznake pikova su iste kao oznake na slici 39

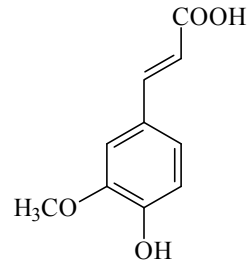


Slika 44. HPLC hromatogrami polifenolnih jedinjenja u etanolnom ekstraktu troja paradajza genotipa Saint Pierre na 280, 330 i 350 nm; oznake pikova su iste kao oznake na slici 39

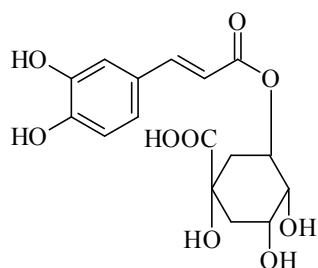
Na slici 45 prikazane su hemijske strukture flavonoida i fenolnih kiselina koji su identifikovani u ispitivanim ekstraktima troja odabranih genotipova paradajza.

*p*-Kumarinska kiselina

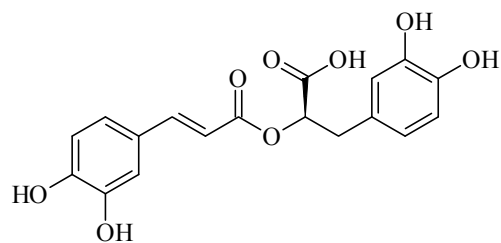
Kafena kiselina



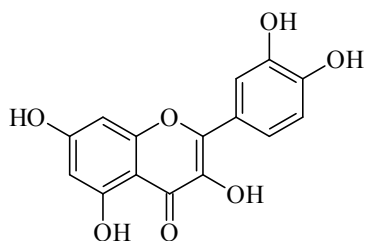
Ferulna kiselina



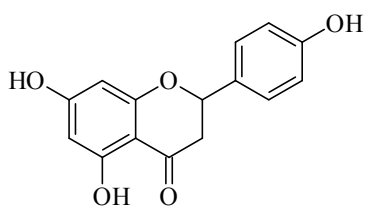
Hlorogenska kiselina



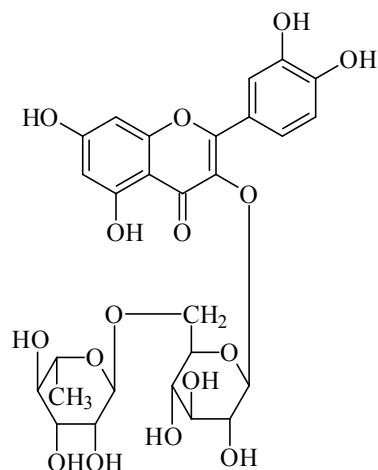
Ruzmarinska kiselina



Kvercetin



Naringenin



Rutin

Slika 45. Hemijske strukture flavonoida i fenolnih kiselina identifikovanih u ispitivanim ekstraktima troja paradajza

Sadržaji pojedinačnih polifenolnih jedinjenja kvantifikovani su na 280, 330 ili 350 nm, u zavisnosti od toga na kojoj talasnoj dužini je njihov odziv maksimalan. Kod kvantifikacije jedinjenja za čije pikove nisu bili dostupni analitički standardi, korišćena je kalibraciona kriva hlorogenske kiseline na 330 nm. U tabelama 16 i 17 su dati sadržaji pojedinačnih polifenolnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima tropa, odnosno u suvom tropu odabranih genotipova paradajza.

Tabela 16. Sadržaj pojedinačnih polifenolnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima tropa paradajza

Polifenolno jedinjenje	Sadržaj pojedinačnih polifenolnih jedinjenja ($\mu\text{g/g}$)					
	Bačka	Knjaz	Novosadski niski	O ₂	Rutgers	Saint Pierre
Kafena kiselina	79,5 ± 2,29	227 ± 2,30	305 ± 1,84	285 ± 1,79	219 ± 2,18	169 ± 1,97
Horogenska kiselina	67,0 ± 0,26	119 ± 0,22	76,7 ± 0,22	64,4 ± 0,23	55,0 ± 0,28	115 ± 0,17
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	n.d.*	27,1 ± 1,56	46,6 ± 1,33	45,6 ± 1,29	42,9 ± 1,47	33,4 ± 1,31
Ferulna kiselina	29,2 ± 1,38	58,7 ± 1,46	36,0 ± 1,28	50,2 ± 1,21	79,6 ± 1,35	48,5 ± 1,23
Ruzmarinska kiselina	26,1 ± 2,64	n.d.	62,2 ± 2,31	60,0 ± 2,24	106 ± 2,40	43,4 ± 2,34
Rutin-derivat Ruzmarinska kiselina - derivat I	169 ± 0,06	147 ± 0,01	230 ± 0,17	151 ± 0,06	90,4 ± 0,06	97,5 ± 0,03
Rutin Ruzmarinska kiselina - derivat II	48,7 ± 2,55	61,0 ± 2,73	50,4 ± 2,36	71,6 ± 2,19	41,8 ± 2,65	49,8 ± 2,31
Rutin	417 ± 0,45	596 ± 0,71	1255 ± 1,77	873 ± 1,18	238 ± 0,17	250 ± 0,21
Ruzmarinska kiselina - derivat II	64,3 ± 2,49	110 ± 2,53	70,4 ± 2,28	126 ± 1,97	86,4 ± 2,47	38,3 ± 2,36
Kvercetin	104 ± 0,17	267 ± 0,16	51,1 ± 0,16	119 ± 0,15	75,4 ± 0,17	25,8 ± 0,16
Naringenin-derivat	721 ± 0,10	728 ± 0,15	2366 ± 1,16	1637 ± 0,64	563 ± 0,23	279 ± 0,37
Ukupno	1930 ± 13,3	2947 ± 13,1	5206 ± 14,3	3974 ± 14,2	2072 ± 15,6	1789 ± 13,9

*n.d.: nije detektovano

Tabela 17. Sadržaj pojedinačnih polifenolnih jedinjenja u suvom tropu paradajza

Polifenolno jedinjenje	Sadržaj pojedinačnih polifenolnih jedinjenja u suvom tropu paradajza (mg/100 g)					
	Bačka	Knjaz	Novosadski niski	O ₂	Rutgers	Saint Pierre
Kafena kiselina	2,88 ± 0,08	9,22 ± 0,09	10,42 ± 0,06	10,38 ± 0,07	7,63 ± 0,08	7,49 ± 0,09
Horogenska kiselina	2,42 ± 0,01	4,83 ± 0,01	2,62 ± 0,01	2,34 ± 0,01	1,92 ± 0,01	5,10 ± 0,01
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	n.d.*	1,10 ± 0,06	1,59 ± 0,05	1,66 ± 0,05	1,50 ± 0,05	1,48 ± 0,06
Ferulna kiselina	1,06 ± 0,05	2,38 ± 0,06	1,23 ± 0,04	1,83 ± 0,04	2,77 ± 0,05	2,15 ± 0,05
Ruzmarinska kiselina	0,94 ± 0,01	n.d.	2,13 ± 0,08	2,18 ± 0,08	3,69 ± 0,08	1,92 ± 0,10
Rutin-derivat Ruzmarinska kiselina - derivat I	6,11 ± 0,00	5,97 ± 0,00	7,86 ± 0,01	5,50 ± 0,00	3,15 ± 0,00	4,32 ± 0,00
Rutin Ruzmarinska kiselina - derivat II	15,09 ± 0,02	24,21 ± 0,03	42,89 ± 0,06	31,78 ± 0,04	8,30 ± 0,01	11,09 ± 0,01
Kvercetin	2,33 ± 0,09	4,47 ± 0,10	2,41 ± 0,08	4,59 ± 0,07	3,01 ± 0,09	1,70 ± 0,10
Naringenin-derivat	3,76 ± 0,01	10,84 ± 0,01	1,75 ± 0,01	4,33 ± 0,01	2,63 ± 0,01	1,14 ± 0,01
Ukupno	26,09 ± 0,00	29,57 ± 0,01	80,87 ± 0,04	59,60 ± 0,02	19,62 ± 0,01	12,37 ± 0,02
	69,83 ± 0,48	119,69 ± 0,53	177,94 ± 0,49	144,68 ± 0,52	72,22 ± 0,54	79,34 ± 0,62

*n.d.: nije detektovano

Etanolni ekstrakt tropa, kao i trop paradajza Novosadski niski imaju najveći sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja (5206 µg/g odnosno 177,94 mg/100g). Od polifenolnih jedinjenja u najvećoj koncentraciji u etanolnom ekstraktu tropa paradajza Novosadski niski prisutni su flavonoli (kvercetin, rutin i njegov derivat; 1537 µg/g odnosno 52,50 mg/100g) i flavanoni (naringenin-derivat; 2366 µg/g odnosno 80,87 mg/100g). Najveći sadržaj fenolnih kiselina (kafene, hlorogenske, *p*-kumarinske, ferulne i ruzmarinske kiselina, kao i derivata ruzmarinske kiseline I i II) pronađen je u etanolnom ekstraktu tropa O₂ paradajza (703 µg/g odnosno 25,59 mg/100g).

4.2.3. Sadržaj ukupnih, rastvorljivih i nerastvorljivih prehrambenih vlakana u ostacima nakon ekstrakcija tropa odabranih genotipova paradajza

Sadržaji ukupnih, rastvorljivih i nerastvorljivih vlakana u ostacima nakon ekstrakcija tropa paradajza, određeni su enzimskim metodama AOAC 991.43 (AOAC, 2007) i AACC 32-07 (AACC, 2000). Određivanje prehrambenih vlakana zasnovano je na termičkom tretiranju (na 100°C) suvog uzorka u prisustvu termostabilne α -amilaze (radi želiranja, hidrolize i depolimerizacije skroba); inkubiranju na 60°C u prisustvu proteaze (radi solubilizacije i depolimrizacije proteina) i amiloglukozidaze (radi hidrolize fragmenata skroba na glukozu).

Sadržaji ukupnih (UPV), rastvorljivih (RPV) i nerastvorljivih (NPV) prehrambenih vlakana, u ostacima nakon ekstrakcija (heksanom i 80% etanolom) tropa, odnosno u suvom tropu, odabranih genotipova paradajza prikazani su u tabelama 18 i 19.

Tabela 18. Sadržaj ukupnih, rastvorljivih i nerastvorljivih prehrambenih vlakana u ostacima nakon ekstrakcija tropa paradajza

Ostaci	NPV (%)	RPV (%)	UPV (%)
Bačka	69,88	0,13	70,01
Knjaz	52,50	13,71	66,21
Novosadski niski	56,46	13,80	70,26
O ₂	77,53	3,70	81,23
Rutgers	54,92	13,89	68,81
Saint Pierre	70,86	1,01	71,86

Tabela 19. Sadržaj ukupnih, rastvorljivih i nerastvorljivih prehrambenih vlakana u suvom tropu paradajza

Ostaci	NPV (%)	RPV (%)	UPV (%)
Bačka	36,20	0,07	36,27
Knjaz	28,30	7,39	35,69
Novosadski niski	28,23	6,90	35,13
O ₂	41,56	1,98	43,54
Rutgers	23,67	5,99	29,66
Saint Pierre	26,79	0,38	27,17

Sadržaj ukupnih prehrambenih vlakana u ostacima tropa odabranih genotipova paradajza iznosio je od 66,21% za genotip Knjaz do 81,23% za genotip O₂ (tabela 18), dok je sadržaj ukupnih prehrambenih vlakana izražen po suvom tropu iznosio od 27,17% za genotip Saint Pierre do 43,54% za genotip O₂ (tabela 19). Sadržaj ukupnih prehrambenih vlakana u suvom tropu ispitivanih genotipova paradajza je u saglasnosti sa sadržajima prehrambenih vlakana određenim u tropu paradajza u nekoliko

istraživanja, a koji se nalaze u opsegu od 250,4 do 510,3 g/kg suve materije odnosno od 25% do 51% (Del Valle i sar., 2006).

Poređenjem sadržaja prehrambenih vlakana u suvom tropu paradajza sa sadržajem prehrambenih vlakana u drugim sporednim proizvodima (izraženim u % po suvoj materiji), kao što su: pirinčane mekinje (27,04%), pšenične mekinje (44,46%), kukuruzne mekinje (87,86%), kora limuna (66,7-70,4%), trop jabuke (78,2-89,8%), kora pomorandže (64,3%), kora grejpfruta (44,2-62,6%), može se utvrditi da se sadržaj vlakana u suvom tropu paradajza nalazi u opsegu sadržaja vlakana u drugim sporednim proizvodima prerade različite biljne hrane (Elleuch i sar., 2011).

Sadržaj nerastvorljivih vlakana, značajno je veći od sadržaja rastvorljivih vlakana u svim ispitanim ostacima tropa paradajza i iznosio je od 52,50% za genotip Knjaz do 77,53% za genotip O₂ (tabela 18), dok je sadržaj nerastvorljivih prehrambenih vlakana izražen po suvom tropu iznosio od 23,67% za genotip Rutgers do 41,56% za genotip O₂ (tabela 19). Sadržaj rastvorljivih vlakana u ispitanim ostacima tropa paradajza iznosio je od 0,13% za genotip Bačka do 13,89% za genotip Rutgers (tabela 18), a sadržaj rastvorljivih prehrambenih vlakana izražen po suvom tropu iznosio od 0,07% za genotip Bačka do 7,39% za genotip Knjaz (tabela 19). Rezultati dobijeni u ovom ispitivanju su u saglasnosti sa rezultatima ispitivanja Del Valle (2004), koji su takođe utvrdili da je sadržaj nerastvorljivih vlakana (803,9 g/kg) u sporednom proizvodu prerade paradajza značajno veći od sadržaja rastvorljivih vlakana (85,36 g/kg); takav odnos nerastvorljivih i rastvorljivih vlakana približniji je odnosu nerastvorljivih i rastvorljivih vlakana (~10:1) žitarica, nego različitim proizvodima od povrća (Grigeldo-Miguel i Martín-Belloso, 1999b; García Herrera i sar., 2010).

Značajan sadržaj nerastvorljivih vlakana (funkcionalna jedinjenja koja poseduju pozitivne zdravstvene efekte) u svim ispitanim ostacima nakon ekstrakcija tropa odabranih genotipova paradajza može opravdati primenu ovih ostataka. Dodavanjem svih ostataka u proizvode sa niskim sadržajem prehrambenih vlakana, moguće je značajno povećati sadržaj nerastvorljivih vlakana u ovim proizvodima, pa tako povećati i unos vlakana konzumiranjem takvih proizvoda.

Ostaci nakon ekstrakcija heksanom i 80% etanolom tropa odabranih genotipova paradajza mogu se okarakterisati kao "izvor vlakana", jer je sadržaj vlakana u ovim ostacima veći od 3 g/100 g (García Herrera i sar., 2010). S obzirom na sadržaj vlakana u ostacima, minimalni dodatak od 4,75 g ostataka genotipa Knjaz (čiji ostaci od ispitanih imaju najmanji sadržaj ukupnih vlakana) po 100 g proizvoda koji je potrebno obogatiti dovoljan je za ispunjavanje zahteva da se i obogaćeni proizvod smatra "izvorom vlakana".

Dodavanje prehrambenih vlakana utiče na teksturu proizvoda, pa se ona uglavnom primenjuju za izmenu teksture ili stabilizaciju. Rastvorljiva prehrambena vlakna doprinose stabilizaciji strukture

hrane (disperzije, emulzije i sl.) npr. formiranjem gela, a nerastvorljiva prehrambena vlakna povećavaju čvrstoću proizvoda i kapacitet apsorpcije masti. Zato je značajan izbor komponente sa odgovarajućim odnosom rastvorljivih i nerastvorljivih prehrambena vlakna radi postizanja željenih tehnoloških osobina obogaćenog proizvoda (Oreopoulou i Tzia, 2007).

4.3. Antioksidativna aktivnost tropa paradajza

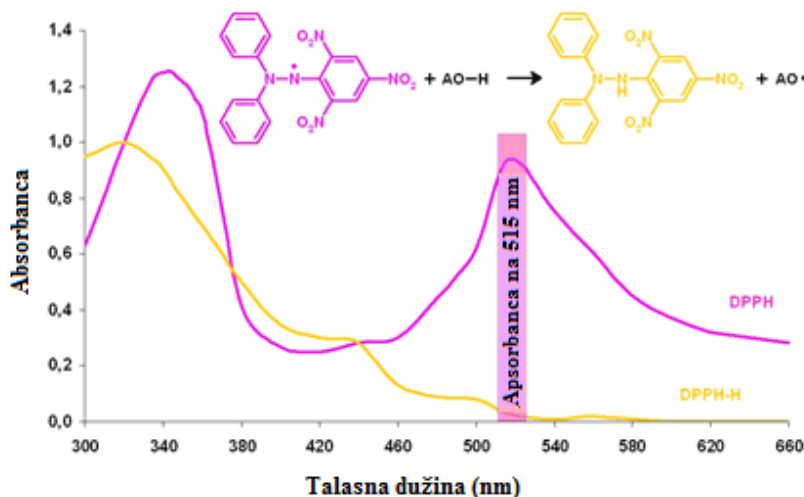
Metode za ispitivanje antioksidativne aktivnosti mogu podeliti na više načina: prema sistemu ispitivanja (*in vivo* i *in vitro*), prema metodi detekcije (hemiluminiscentne, spektrofotometrijske, fluorometrijske, spektroskopske metode-ESR), prema direktnosti određivanja (direktne i indirektne), prema prisustvu lipida u sistemu i prema mehanizmu reakcije koja se odigrava između antioksidativnih jedinjenja i slobodnih radikala na koje se antioksidativna aktivnost određuje (Robards i sar., 1999; Antolovich i sar., 2002; Sanchez-Moreno, 2002; Aruoma, 2003; Huang i sar., 2005; Prior i sar., 2005; Roginsky i Lissi, 2005). Za ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata biljnog materijala primenjuju se različite metode (Pellegrini i sar., 2003; Zargar i sar., 2011). Rezultati dobijeni primenom različitih metoda često nisu u međusobnoj saglasnosti, s obzirom da ekstrakti mogu delovati različitim mehanizmima (Zargar i sar., 2011). Takođe, brojni faktori utiču na sposobnost antioksidativnog delovanja ekstrakata (npr. hidrofilna ili lipofilna priroda antioksidanata prisutnih u ekstraktima, primenjeni rastvarač u procesu ekstrakcije, primenjene metode ekstrakcije, uslovi u test sistemu), pa je neophodno primeniti više od jedne metode za procenu antioksidativne aktivnosti ekstrakta (tj. da bi se dobio sveobuhvatniji profil njegovog antioksidativnog delovanja) (Zargar i sar., 2011; Prior i sar., 2005).

4.3.1. Antioksidativna aktivnost lipofilnih ekstrakata tropa paradajza

Antioksidativna aktivnost heksanskih ekstrakata tropa paradajza ispitana je spektrofotometrijski, DPPH testom, a određena je i njihova redukciona sposobnost. DPPH test najčešće se primenjuje za određivanje antiradikalske aktivnosti ekstrakata biljnog materijala, zbog njegove jednostavnosti, brzine, osetljivosti i reproduktivnosti (Özcelik i sar., 2003).

Spektrofotometrijsko određivanje antiradikalske aktivnosti ekstrakta na DPPH radikale zasnovano je na merenju sposobnosti neutralizacije DPPH radikala, tj. redukcije DPPH radikala u reakciji sa antioksidativnom komponentom. U toj reakciji, ljubičasto obojeni, stabilni DPPH radikal

prelazi u žuto obojenu formu DPPH-H, što se može pratiti spektrofotometrijski na 515 nm (slika 46) (Amarowicz i sar., 2004). Promena intenziteta ljubičaste boje srazmerna je broju "uhvaćenih" radikala.

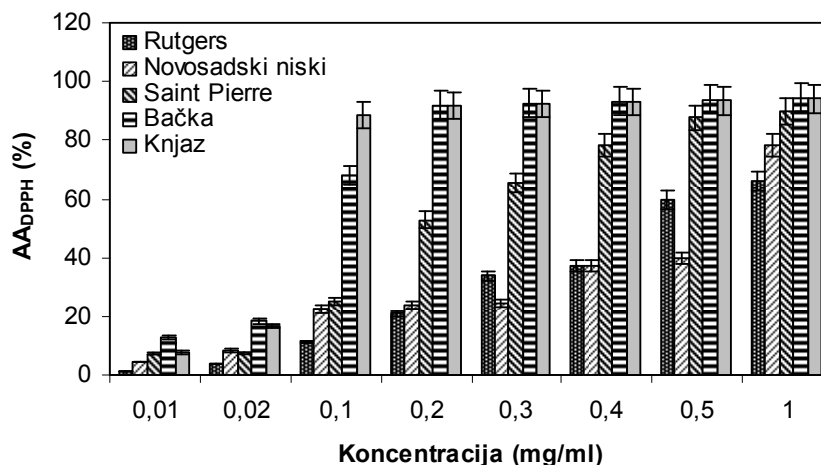


Slika 46. Reakcija DPPH radikala i antioksidata (AO-H) i spektri DPPH radikala i njegovog neutralisanog DPPH-H oblika

Iako se kod DPPH radikala nesparesni elektron nalazi 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). Zbog toga su DPPH radikali pogodan model sistem za ispitivanje antiradikaliskog delovanja lipofilnih antioksidanata, a rezultati ovog antiradikaliskog testa daju informaciju i o zaštitnom efektu antioksidanata tokom oksidacije lipida (Ingold i sar., 1993).

S obzirom da su u heksanskim ekstraktima tropa odabranih genotipova paradajza prisutni lipofilni antioksidanti - karotenoidi, za ispitivanje antiradikaliskog delovanja ovih ekstrakata korišćen je DPPH test. Uticaj heksanskih ekstrakata tropa paradajza genotipova: Bačka, Knjaz, Novosadski niski, Rutgers i Saint Pierre, na transformaciju DPPH radikala prikazan je na slici 47.

Heksanski ekstrakti tropa paradajza, osim tropa genotipa O₂, pokazuju značajnu, koncentracijski zavisnu, antiradikalisku aktivnost na DPPH radikale. Ekstrakt tropa genotipa O₂ u ispitivanom opsegu koncentracija (0,01 - 1 mg/ml) nije pokazao antiradikalisku aktivnost na DPPH radikale. Na osnovu prikazanih rezultata (slika 47) može se zaključiti da su ekstrakti tropa paradajza Knjaz i Bačka najefikasniji, s obzirom da pri koncentraciji od 0,2 mg/ml pokazuju značajnu antiradikalisku aktivnost ($SA_{DPPH} \sim 90\%$).



Slika 47. Uticaj heksanskih ekstrakata tropa paradajza genotipova: Bačka, Knjaz, Novosadski niski, Rutgers i Saint Pierre, na transformaciju DPPH radikala

IC_{50} vrednost (koncentracija antioksidanta neophodna za 50% antiradikalne aktivnosti) je parametar koji se često koristi kao merilo antioksidativne aktivnosti (Cuvelier i sar., 1992), pri čemu niže IC_{50} vrednosti ukazuju na značajniju antioksidativnu aktivnost. U tabeli 20 su date IC_{50} vrednosti, izračunate na osnovu vrednosti AA_{DPPH} ekstrakata tropa odabranih genotipova paradajza i sintetičkog antioksidanta BHA.

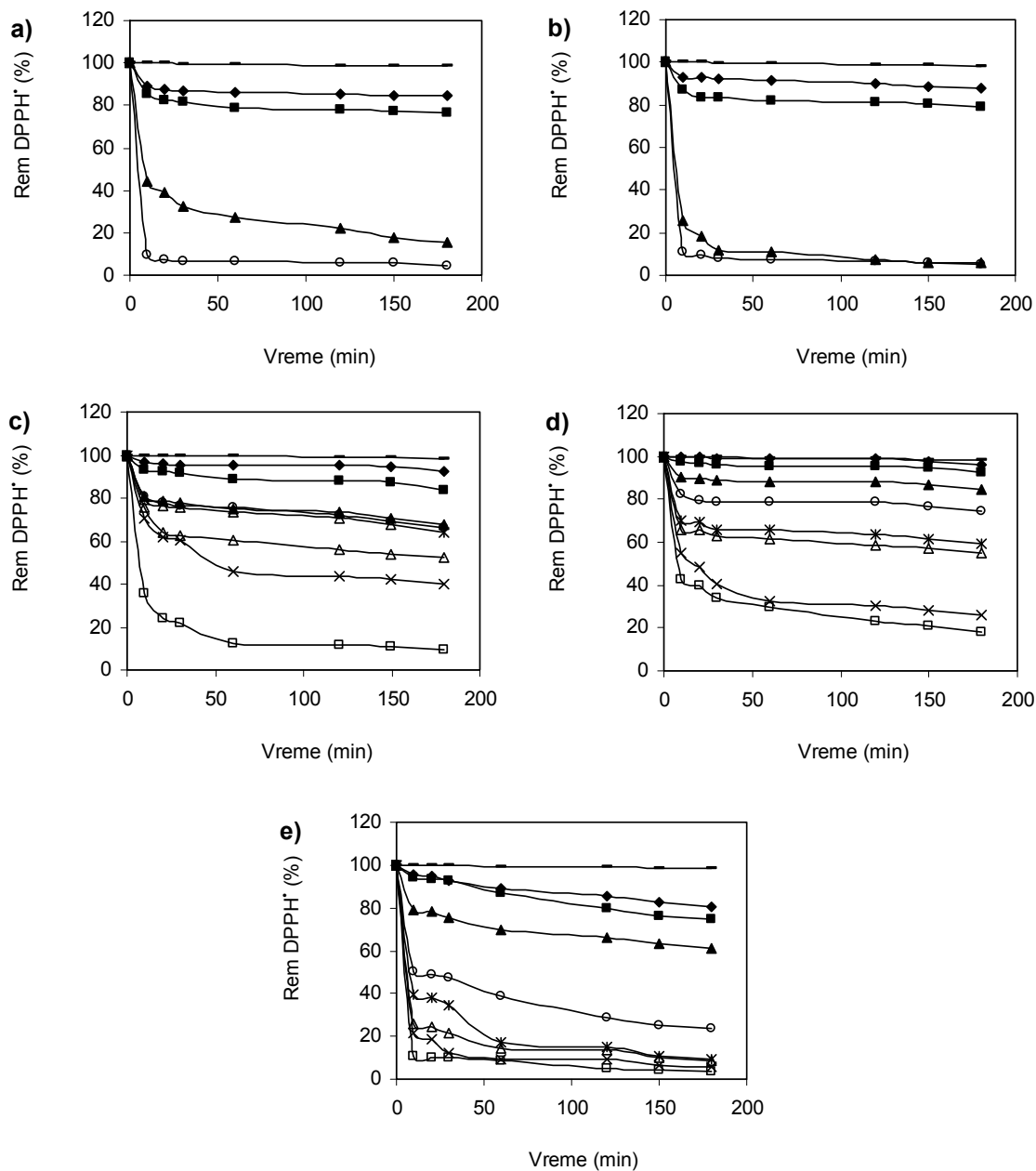
Table 20. IC_{50} vrednosi heksanskih ekstrakata tropa odabranih genotipova paradajza i BHA

Genotip i standardni antioksidant	IC_{50} (mg/ml)	
	DPPH	RP
Bačka	$0,071 \pm 0,003$	$2,12 \pm 0,09$
Knjaz	$0,057 \pm 0,002$	> 12,5
Novosadski niski	$0,633 \pm 0,022$	> 12,5
O ₂	-	-
Rutgers	$0,457 \pm 0,018$	> 12,5
Saint Pierre	$0,190 \pm 0,006$	> 12,5
BHA	$0,0025 \pm 0,0001$	$0,0288 \pm 0,0001$

Antiradikalna aktivnost na DPPH radikale ekstrakata tropa odabranih genotipova paradajza i sintetičkog antioksidanta BHA, izražena kao IC_{50} vrednost, opada sledećim redosledom: BHA > Knjaz > Bačka > Saint Pierre > Rutgers > Novosadski niski.

Kinetička ispitivanja reakcije DPPH radikala i antioksidanata odnosno ekstrakata, koji sadrže antioksidante, izvode se radi ispitivanja njihove antiradikalne aktivnosti u zavisnosti od vremena. S obzirom da su DPPH radikali vrlo stabilni, i duže od 180 minuta na 20°C, u toku tog vremena moguće je ispitivanje antiradikalne aktivnosti ekstrakata i standardnog antioksidanta BHA. Na slici 48 je

prikazana kinetika smanjenja koncentracije DPPH radikala (Rem DPPH') u prisustvu heksanskih ekstrakata odabranih genotipova tropa paradajza. Nakon dodatka ovih ekstrakata tropa paradajza reakcionoj smeši dolazi do smanjenja apsorbance, kao posledica smanjenja koncentracije DPPH radikala. Najznačajnije smanjenje koncentracije DPPH radikala deševa se u prvih 10 min reakcije.



Slika 48. Rem DPPH' (%) u zavisnosti od vremena za heksanske ekstrakte tropa paradajza genotipova:

a) Bačka, b) Knjaz, c) Novosadski niski, d) Rutgers i e) Saint Pierre; koncentracija heksanskih ekstrakata u reakcionom sistemu izražene u mg ekstrakta/mg DPPH, su: - 0; ♦ 0,93; ■ 1,85; ▲ 9,26;

○ 18,52; * 27,50; △ 37,04; × 46,30 i □ 92,59

Na osnovu kinetičkog ponašanja ispitivanih ekstrakata i BHA određene su njihove koncentracije pri kojima se koncentracija DPPH radikala smanjuje za 50%, za svako od ispitivanih vremena, $EC_{50,t}$ (tabela 21).

Tabela 21. $EC_{50,t}$ vrednosi i kinetička klasifikacija heksanskih ekstrakata tropa paradajza i BHA

	Genotip					BHA
	Bačka	Knjaz	Novosadski niski	Rutgers	Saint Pierre	
$EC_{50,t}^*$						
10 min	8,16 ± 0,35	6,34 ± 0,30	73,23 ± 3,22	64,17 ± 3,08	18,87 ± 0,84	0,32
20 min	7,38 ± 0,32	5,65 ± 0,26	60,95 ± 2,60	45,41 ± 2,64	18,12 ± 0,87	0,27
30 min	6,57 ± 0,30	5,29 ± 0,22	58,65 ± 2,87	42,32 ± 1,87	17,56 ± 0,76	0,24
60 min	5,95 ± 0,25	5,17 ± 0,23	43,69 ± 2,10	40,77 ± 1,79	15,19 ± 0,65	0,17
120 min	5,56 ± 0,26	4,98 ± 0,20	41,67 ± 1,80	39,91 ± 1,63	13,27 ± 0,59	0,15
150 min	5,24 ± 0,21	4,88 ± 0,18	39,86 ± 1,64	39,31 ± 1,57	12,45 ± 0,54	0,13
180 min	5,10 ± 0,18	4,78 ± 0,16	38,74 ± 1,85	39,31 ± 1,80	12,04 ± 0,43	0,11
Vreme u kome je postignuto ravnotežno stanje	≥ 150 min					
Kinetička klasifikacija	Spori					

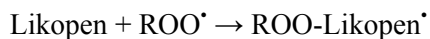
* $EC_{50,t}$ vrednost - izražena u mg ekstrakta/mg DPPH, odnosno mg BHA/mg DPPH.

Poređenjem $EC_{50,t}$ vrednosti može se uočiti da sposobnost "hvatanja" DPPH radikala heksanskih ekstrakata tropa paradajza opada sledećim redom: Knjaz > Bačka > Saint Pierre > Rutgers > Novosadski niski. Takođe, može se uočiti da su $EC_{50,t}$ vrednosti heksanskih ekstrakata tropa paradajza veće u odnosu na $EC_{50,t}$ vrednosti BHA. Na osnovu kinetičkih ispitivanja heksanski ekstrakti tropa paradajza mogu se svrstati u spore antioksidante.

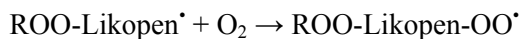
Heksanski ekstrakti tropa paradajza sa većim sadržajem likopena (Knjaz i Bačka) pokazali su izuzetnu antiradikalnu aktivnost na DPPH radikale, pa se može pretpostaviti da likopen značajno doprinosi antioksidativnoj aktivnosti ovih ekstrakata. Delovanje likopena prema reaktivnim vrstama (R^{\bullet}) može se odvijati mehanizmima (Kong i sar., 2010):

- nastajanjem adukta: $Likopen + R^{\bullet} \rightarrow R-Likopen^{\bullet}$;
- prenosom elektrona: $Likopen + R^{\bullet} \rightarrow Likopen^{++} + R^{\ominus}$;
- otpuštanjem atoma vodonika: $Likopen + R^{\bullet} \rightarrow Likopen^{\bullet} + RH$

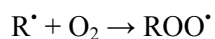
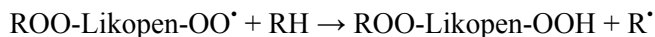
Likopen poseduje sposobnost "hvatanja" singletnog kiseonika (1O_2) i peroksil radikala (Stahl i Sies, 2003). Peroksil radikal (ROO^{\bullet}) vezuje se za polienski lanac likopena koji sadrži veliki broj dvostrukih konjugovanih veza, pri čemu nastaje peroksil radikal - likopen adukt ($ROO-Likopen^{\bullet}$):



Pri visokim koncentracijama kiseonika, ROO-Likopen[•] može reagovati sa O₂ pri čemu nastaje novi radikal:



Likopen može ispoljavati i prooksidativni efekat odnosno može delovati kao prooksidant ili pokretač lipidne peroksidacije. Naime, reakcijom ROO-Likopen-OO[•] radikala i lipida (RH) nastaje R[•], koji sa molekulskim kiseonikom formira novi peroksil radikal (ROO[•]):



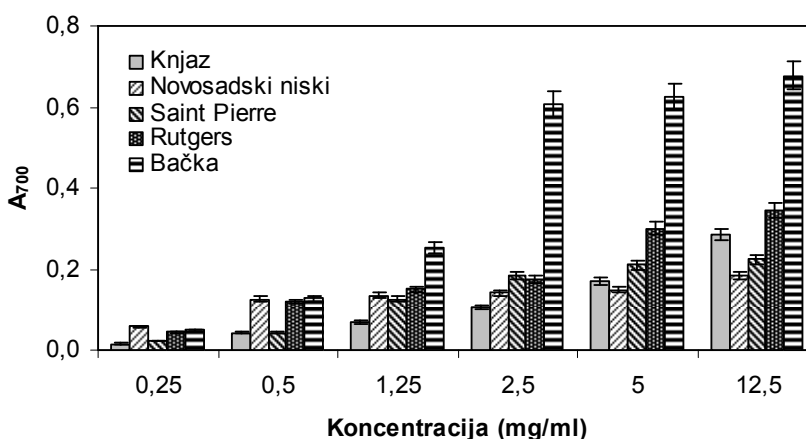
Takođe, peroksil radikal-likopen adukt može reagovati sa drugim peroksil radikalom formirajući neaktivni krajnji proizvod (Kong i sar., 2010).

DPPH antiradikalska aktivnost karotenoida smanjuje se sledećim redosledom: likopen > β-kriptoksantin > α-karoten > β-karoten > zeaksantin > lutein (Jiménez-Escrig i sar., 2000). U poređenju sa ostalim karotenoidima likopen je pokazao značajno veću antioksidativnu aktivnost. Od strukturnih osobina karotenoida za njihovu antioksidativnu aktivnost značajno je prisustvo sistema dvostrukih konjugovanih veza i β-jononskog prstena. Sa povećanjem broja dvostrukih konjugovanih veza u molekulu karotenoida raste i njihova antiradikalska aktivnost na DPPH radikale. Likopen i β-karoten poseduju jednak broj dvostrukih konjugovanih veza u molekulu, ali se dve dvostruke veze u molekulu β-karotena nalaze u cikloheksenskim prstenovima. Upravo ovim smanjenjem efektivne dužine konjugovanog sistema može se objasniti veća efikasnost likopena u odnosu na β-karoten (Jiménez-Escrig i sar., 2000).

Redukciona sposobnost, odnosno sposobnost doniranja elektrona, antioksidativnih jedinjenja, kao i ekstrakta koji ih sadrže, može biti indikator njihove potencijalne antioksidativne aktivnosti (Siddhuraju i sar., 2002; Arabshahi-Delouee i Urooj, 2007). Prema tome, antioksidanti se mogu posmatrati i kao redukciona sredstva. Antioksidanti prisutni u ekstraktima mogu dovesti do redukcije Fe³⁺ u Fe²⁺ jon, što se može uočiti promenom žute boje (potiče od Fe³⁺ jona) reakcione smeše u različite nijanse zelene i plave boje (potiče od Fe²⁺ jona u rastvoru), u zavisnosti od redukcionne sposobnosti antioksidativnih jedinjenja (Chung i sar., 2002).

Za određivanje redukcionne sposobnosti heksanskih ekstrakata tropa paradajza primenjena je metoda po Oyaizu (Oyaizu, 1986), kod koje se prisustvo Fe²⁺ prati merenjem apsorpcije na 700 nm (Chung i sar., 2002). Na slici 49 je prikazana zavisnost redukcionne sposobnosti od koncentracije heksanskih ekstrakata tropa paradajza genotipova: Bačka, Knjaz, Novosadski niski, Rutgers i Saint

Pierre. U ispitivanom opsegu koncentracija (0,25 - 12,5 mg/ml) heksanski ekstrakt tropa paradajza genotipa O₂ nije pokazao redukcionu sposobnost.



Slika 49. Redukciona sposobnost heksanskih ekstrakata tropa paradajza genotipova: Bačka, Knjaz, Novosadski niski, Rutgers i Saint Pierre

U tabeli 20 su date IC₅₀ vrednosti izračunate na osnovu redukcionne sposobnosti heksanskih ekstrakata tropa odabranih genotipova paradajza i sintetičkog antioksidanta BHA. Sintetički antioksidant BHA pokazao je značajno veću redukcionu sposobnost (IC₅₀ = 0,0288 mg/ml) od ispitivanih ekstrakata; najveću redukcionu sposobnost (IC₅₀ = 2,12 mg/ml) pokazao je ekstrakt tropa paradajza genotipa Bačka.

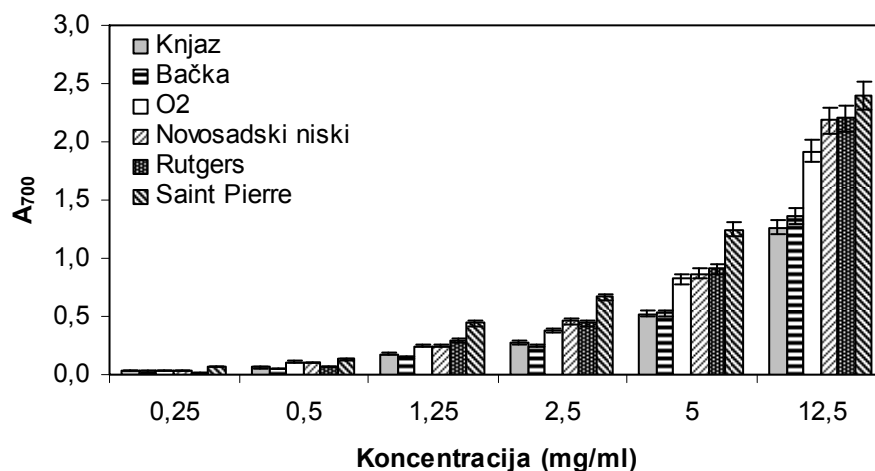
Primenom FRAP (*eng. ferric reducing antioxidant power*) metode, Lenuci i saradnici (2006) su utvrdili da antioksidativna aktivnost i lipofilnih i hidrofilnih ekstrakata različitih genotipova paradajza značajno zavisi od genotipa odnosno genetskih faktora, kao i da hidrofilni ekstrakti pokazuju izraženiju antioksidativnu aktivnost. Müller i saradnici (2011) su pokazali da većina karotenoida poseduje sposobnost redukcije gvožđe(II)-hlorida, pri čemu neki od njih imaju i veću sposobnost redukcije gvožđe(II)-hlorida od α -tokoferola. Redukciona sposobnost karotenoida zavisi od broja konjugovanih dvostrukih veza u molekulu. Od svih ispitanih karotena najveću redukcionu sposobnost gvožđe(II)-hlorida pokazao je likopen. Bezbojni aciklični karotenoidi (fitoen, fitofluen i neurosporen) nisu pokazali značajniju sposobnost redukcije gvožđe(II)-hlorida, što je posledica manjeg broja konjugovanih dvostrukih veza, 3, 5, odnosno 9. Likopen, aciklički karotenoid koji sadrži sistem od 11 konjugovanih dvostrukih veza, poseduje sposobnost da formira stabilni karotenoid radikal (Mortensen i Skibsted, 1997b), kao i da pokaže FRAP aktivnost. Poređenje sposobnost redukcije likopena sa sposobnošću redukcije cikličnih struktura β -karotena (11 konjugovanih dvostrukih veza) i α -karotena

(10 konjugovanih dvostrukih veza) pokazuje da β -jononski prsten utiče na reakciju karotenoida sa gvožđe(III)-di-2,4,6-tripiridiltriazin kompleksom (Müller i sar., 2011).

4.3.2. Antioksidativna aktivnost hidrofилnih ekstrakata tropa paradajza

Redukciona sposobnost i sposobnost heliranja, kao i DPPH antiradikalska aktivnost etanolnih ekstrakata tropa paradajza ispitane su spektrofotometrijski, a antiradikalska aktivnost na hidroksil i superoksid anjon radikale određena je primenom elektron spin rezonantne (ESR) spektrometrije.

S obzirom da je redukciona sposobnost bioaktivnih jedinjenja, odnosno njihova sposobnost otpuštanja elektrona, indikator potencijalne antioksidativne aktivnosti, metodom po Oyaizu (1986) određena je redukciona sposobnost i etanolnih ekstrakata tropa ispitivanih genotipova paradajza. Zavisnost redukcione sposobnosti od koncentracije etanolnih ekstrakata tropa paradajza prikazana je na slici 50. U ispitivanom opsegu koncentracija (0,25-12,5 mg/ml) utvrđena je, koncentracijski zavisna, redukcionu sposobnost etanolnih ekstrakata tropa paradajza.



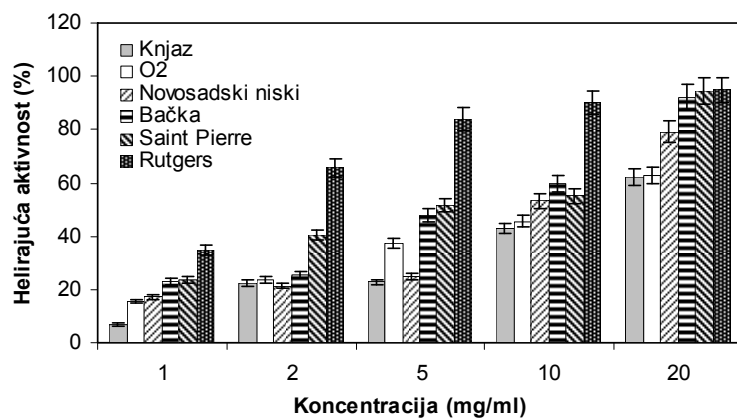
Slika 50. Zavisnost redukcione sposobnosti od koncentracije etanolnih ekstrakata tropa paradajza

Redukciona sposobnost etanolnih ekstrakata tropa odabranih genotipova paradajza i antioksidativnih jedinjenja (BHA i askorbinske kiseline) izražena kao IC_{50} vrednost (tabela 22), opada sledećim redosledom: askorbinska kiselina > BHA > Saint Pierre > Novosadski niski > Rutgers > O₂ > Bačka > Knjaz. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da elektron-donorske sposobnosti hidrofилnih antioksidanata prisutnih u etanolnim ekstraktima tropa paradajza, mogu zaustaviti štetne slobodno-radikalne lančane reakcije.

Tabela 22. IC₅₀ vrednosti etanolnih ekstrakata tropa odabranih genotipova paradajza i antioksidativnih jedinjenja (kafene kiseline, hlorogenska kiselina, askorbinske kiseline, BHA i EDTA)

Genotip i standardni antioksidant	IC ₅₀ (mg/ml)				
	RP	HA	DPPH	•OH	O ₂ ^{•-}
Bačka	4,74 ± 0,12	5,86 ± 0,28	0,24 ± 0,01	0,07 ± 0,00	2,35 ± 0,10
Knjaz	4,75 ± 0,23	13,7 ± 0,65	0,22 ± 0,01	0,13 ± 0,00	4,44 ± 0,21
Novosadski niski	2,73 ± 0,12	9,41 ± 0,40	0,34 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,84 ± 0,03
O ₂	3,16 ± 0,14	12,6 ± 0,61	0,18 ± 0,01	0,07 ± 0,00	2,23 ± 0,09
Rutgers	2,82 ± 0,13	1,49 ± 0,07	0,33 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,45 ± 0,02
Saint Pierre	1,57 ± 0,07	4,53 ± 0,21	0,28 ± 0,01	0,20 ± 0,01	1,85 ± 0,08
EDTA	-	7,20 × 10 ⁻³	-	-	-
BHA	28,8 × 10 ⁻³	-	2,55 × 10 ⁻³	1,51 ± 0,06	2,68 ± 0,13
Hlorogenska kiselina	-	-	-	17,7 × 10 ⁻³	0,83 × 10 ⁻³
Kafena kiselina	-	-	0,92 × 10 ⁻³	-	-
Askorbinska kiselina	25,2 × 10 ⁻³	-	1,49 × 10 ⁻³	-	-

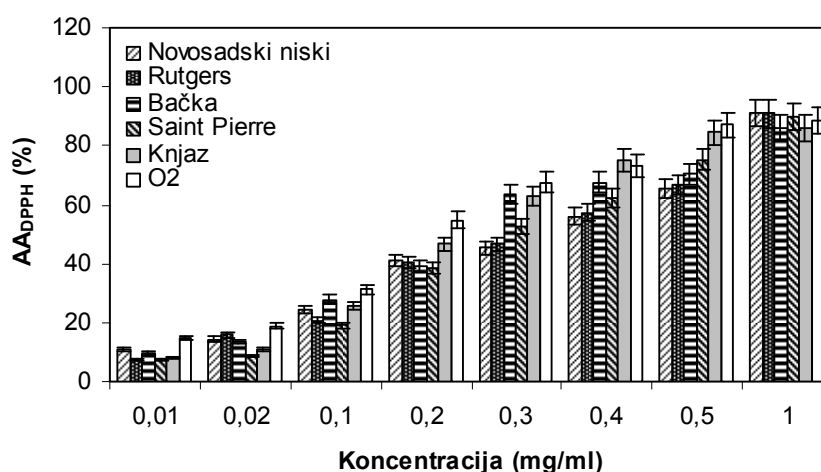
Od različitih vrsta metalnih jona, fero joni (Fe²⁺) naj snažnije utiču na formiranje prooksidativnih vrsta (npr. ROS) u živim sistemima (Halliwell i Gutteridge, 1984). Efikasna helirajuća sredstva, uklanjanjem nepoželjnih fero jona, mogu inhibirati produkciju ROS i pružiti zaštitu od oksidativnog oštećenja. Prema tome, sposobnost heliranja metalnih jona jeste značajna antioksidativna osobina (Kehrer, 2000). Sposobnost etanolnih ekstrakata tropa paradajza da heliraju jona gvožđa određena je metodom po Decker i Welch (1990), kod koje prisustvo helirajućeg sredstva ometa stvaranje crveno obojenog kompleksa ferozina sa Fe²⁺ (Yamaguchi i sar., 2000). Merenje smanjenja obojenja omogućava određivanje helirajuće aktivnosti koegzistirajućih helirajućih sredstava, pri čemu manja apsorpcija ukazuje na veću Fe²⁺ helirajuću aktivnost. Na slici 51 je prikazana helirajuća aktivnost etanolnih ekstrakata tropa paradajza odabranih genotipova.



Slika 51. Helirajuća aktivnost etanolnih ekstrakata tropa paradajza

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da etanolni ekstrakti tropa paradajza ometaju formiranje gvožđe-ferozin kompleksa, odnosno poseduju helirajuću aktivnost koja raste sa porastom koncentracije ekstrakta. Helirajuća aktivnost etanolnih ekstrakata tropa paradajza i EDTA, na osnovu IC_{50} vrednosti (tabela 22), opada sledećim redosledom: EDTA > Rutgers > Saint Pierre > Bačka > Novosadski niski > O₂ > Knjaz. Helirajuća sredstva su efikasni sekundarni antioksidanti, jer smanjuju redoks potencijal i tako stabilizuju oksidovani oblik jona metala (Juntachote i Berghofer, 2005).

Uticaj etanolnih ekstrakata tropa odabranih genotipova paradajza na transformaciju DPPH radikala prikazan je na slici 52.



Slika 52. Uticaj etanolnih ekstrakata tropa odabranih genotipova paradajza na transformaciju DPPH radikala

U ispitivanom opsegu koncentracija (0,01 - 1 mg/ml) utvrđena je značajna, relativno slična, koncentracijski zavisna, antiradikalska aktivnost na DPPH radikale etanolnih ekstrakata tropa svih genotipova paradajza.

U tabeli 22 date su IC_{50} vrednosti na DPPH radikale etanolnih ekstrakata tropa odabranih genotipova paradajza, sintetičkog antioksidanta (BHA), kao i antioksidativnih jedinjenja (kafene kiseline i askorbinske kiseline). Antiradikalska aktivnost na DPPH radikale ekstrakata tropa odabranih genotipova paradajza i antioksidativnih jedinjenja, izražena kao IC_{50} vrednost, opada sledećim redosledom: kafena kiselina > askorbinska kiselina > BHA > O₂ > Knjaz > Bačka > Saint Pierre > Rutgers > Novosadski niski.

Wijngaard i saradnici (2009) su DPPH antiradikalnu aktivnost sporednih proizvoda prerade različitog voća i povrća izrazili kao trolox ekvivalent (mg TE/100 g suve materije). U ovom ispitivanju

sporedni proizvodi prerade brokolija pokazali su veću antioksidativnu aktivnost (512 mg TE/100 g), od spoljašnjih listova kupusa (284 mg TE/100 g) i karfiola (200 mg TE/100 g). Približne DPPH antiradikalne aktivnosti utvrđene su i za ekstrakte tropa odabranih genotipova paradajza. Antiradikalna aktivnost ispitivanih etanolnih ekstrakata tropa paradajza na DPPH radikale, izražena kao trolox ekvivalent (mg TE/100 g suvog tropa paradajza) iznosi od 199 mg TE/100 g za trop paradajza genotipa Novosadski niski do 404 mg TE/100 g za tropa paradajza genotipa O₂ (tabela 23).

Tabela 23. Antiradikalna aktivnost etanolnih ekstrakata tropa paradajza na DPPH radikale izražena kao trolox ekvivalent

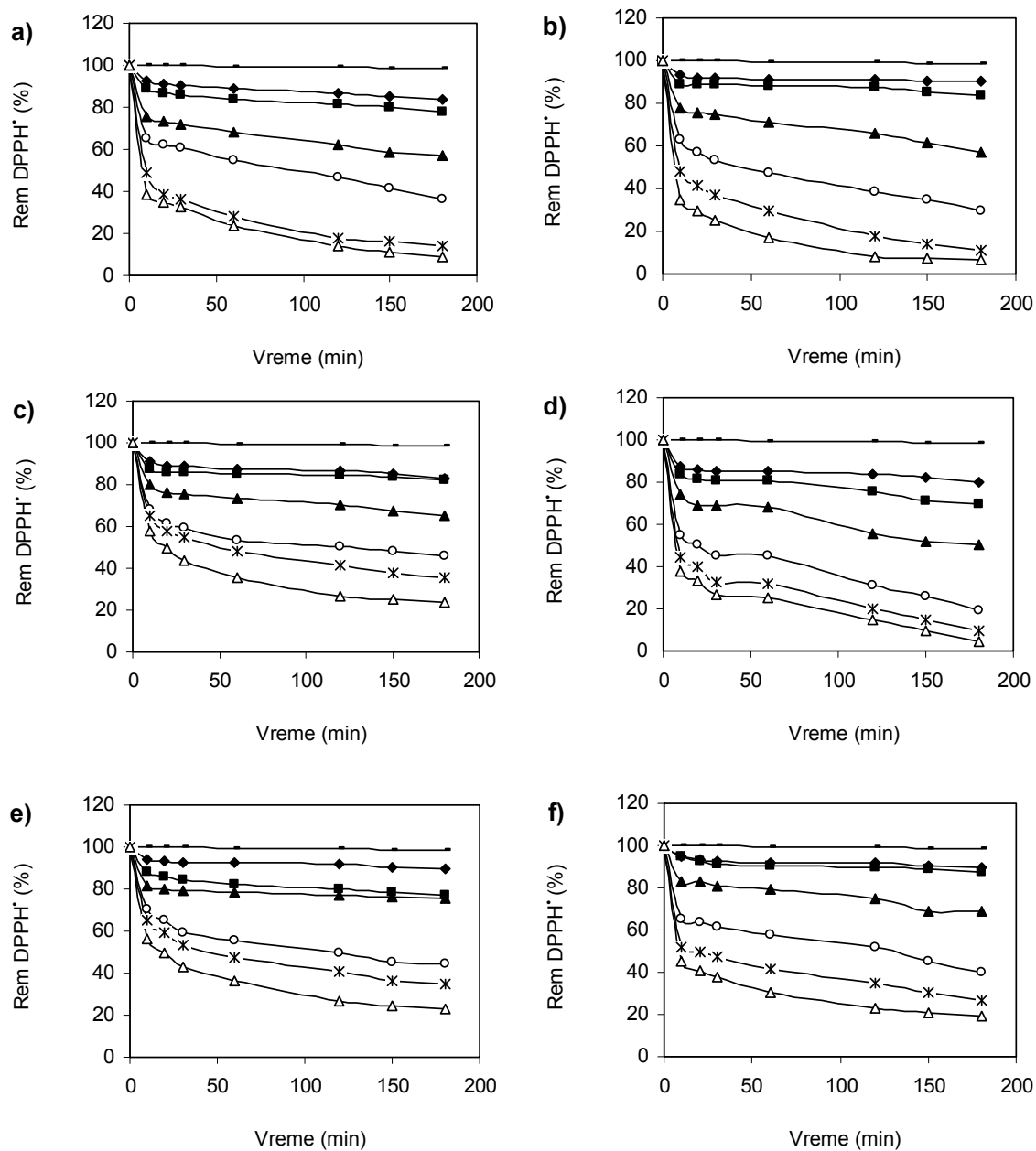
Genotip	IC ₅₀	
	DPPH (mg TE/100 g)*	DPPH (µmol TE/100 g)**
Bačka	296 ± 13,4	1184 ± 53,5
Knjaz	367 ± 16,9	1468 ± 67,3
Novosadski niski	199 ± 8,58	794 ± 34,3
O ₂	404 ± 18,2	1614 ± 27,8
Rutgers	210 ± 9,33	839 ± 37,3
Saint Pierre	315 ± 13,4	1260 ± 53,5

* mg trolox ekvivalent/100 g suvog tropa paradajza,

** µmol trolox ekvivalent/100 g suvog tropa paradajza.

Capanoglu i saradnici (2008) su DPPH antiradikalnu aktivnost uzoraka semena i ljuske, uzetog nakon odvajanja pulpe prilikom proizvodnje paste od paradajza, prikazali kao trolox ekvivalent antioksidativnog kapaciteta (µmol TEAC/100 g). TEAC vrednost za ispitivani uzorak iznosi 879,4 µmol TEAC/100 g. Približne TEAC vrednosti utvrđene su i za ekstrakte tropa odabranih genotipova paradajza. Antiradikalna aktivnost ispitivanih ekstrakata, izražena kao trolox ekvivalent antiradikalnog kapaciteta (µmol TEAC/100 g suvog tropa), iznosi od 794 µmol od TEAC/100 g za trop paradajza Novosadski niski do 1614 µmol TEAC/100 g za trop paradajza O₂ (tabela 23).

U cilju procene kinetičkog ponašanja etanolnih ekstrakata tropa odabranih genotipova paradajza ispitana je njihova DPPH antiradikalna aktivnost u zavisnosti od vremena. Kao i kod heksanskih ekstrakata, kinetička ispitivanja reakcije DPPH radikala i etanolnih ekstrakata tropa paradajza izvršena su u toku 180 minuta na 20°C. Kinetika smanjenja koncentracije DPPH radikala u prisustvu etanolnih ekstrakata tropa paradajza prikazana je na slici 53. Nakon dodatka ovih ekstrakata reakcionoj smeši dolazi do smanjenja apsorbance, kao posledica smanjenja koncentracije DPPH radikala. Najveće smanjenje koncentracije DPPH radikala dešava se u prvih 10 min reakcije, a svi ispitani etanolni ekstrakti zadržali su antioksidativni efekat tokom celokupnog vremena analize (180 min).



Slika 53. Rem DPPH* (%) u zavisnosti od vremena za etanolne ekstrakte tropa paradajza genotipova: a) Bačka, b) Knjaz, c) Novosadski niski, d) O₂, e) Rutgers i f) Saint Pierre etanolnog ekstrakta tropa paradajza; koncentracija etanolnih ekstrakata u reakcionom sistemu izražene u mg ekstrakta/mg DPPH, su: - 0; ♦ 0,93; ■ 1,85; ▲ 9,26; ○ 18,52; * 27,50 i Δ 37,04

Na osnovu kinetičkog ponašanja ispitivanih ekstrakata određene su njihove koncentracije pri kojima se koncentracija DPPH radikala smanjuje za 50%, za svako od ispitivanih vremena, $EC_{50,t}$ (tabela 24).

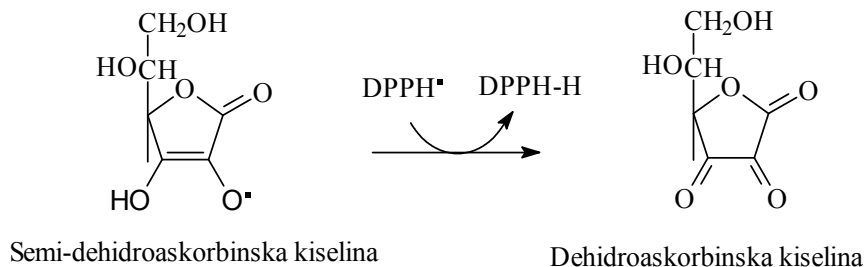
Tabela 24. $EC_{50,t}$ vrednosi i kinetička klasifikacija etanolnih ekstrakata tropa paradajza

		Genotip					
		Bačka	Knjaz	Novosadski niski	O ₂	Rutgers	Saint Pierre
EC _{50,t} *	10 min	27,3 ± 1,21	26,6 ± 1,24	47,1 ± 2,15	22,9 ± 1,06	46,8 ± 2,15	30,0 ± 1,35
	20 min	23,3 ± 1,08	22,7 ± 1,04	36,9 ± 1,64	18,9 ± 0,87	36,6 ± 1,71	27,6 ± 1,26
	30 min	22,5 ± 1,05	20,4 ± 0,98	31,8 ± 1,35	16,6 ± 0,71	30,7 ± 1,36	26,0 ± 1,02
	60 min	20,3 ± 0,96	17,4 ± 0,76	25,4 ± 1,20	16,6 ± 0,65	25,0 ± 1,05	23,0 ± 1,00
	120 min	16,5 ± 0,72	14,6 ± 0,65	19,1 ± 0,90	11,3 ± 0,50	18,4 ± 0,86	17,3 ± 0,60
	150 min	13,9 ± 0,54	13,2 ± 0,52	17,6 ± 0,85	9,9 ± 0,42	17,1 ± 0,64	16,6 ± 0,63
	180 min	12,5 ± 0,52	11,7 ± 0,51	16,4 ± 0,74	9,4 ± 0,38	16,9 ± 0,70	15,3 ± 0,59
	Vreme u kome je postignuto ravnotežno stanje		≥ 180 min				
Kinetička klasifikacija		Veoma spori					

* $EC_{50,t}$ vrednost - izražena u mg ekstrakta/mg DPPH.

Poređenjem $EC_{50,t}$ vrednosti može se uočiti da DPPH antiradikalna aktivnost etanolnih ekstrakata tropa paradajza opada sledećim redom: O₂ > Knjaz > Bačka > Saint Pierre > Rutgers > Novosadski niski. Askorbinska kiselina može se klasifikovati kao brz antioksidant s obzirom da $EC_{50,t}$ iznosi 0,14 mg/mg DPPH* posle 5 min (ravnotežno stanje < 5 min, brz antioksidant). $EC_{50,t}$ kafene kiseline iznosi 0,09 mg/mg DPPH* posle 20 minuta, pa je ova fenolna kiselina umereno-brz antioksidant (5 min < ravnotežno stanje < 20 min, umereno-brz antioksidant). Na osnovu kinetičkih ispitivanja etanolni ekstrakti mogu se klasifikovati kao veoma spori antioksidanti.

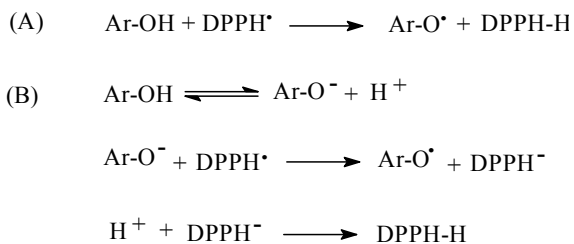
Ispitivanjem hemijskog sastava utvrđeno je da etanolni ekstrakti tropa paradajza sadrže hidrofilne antioksidante, askorbinsku kiselinu i polifenolna jedinjenja. Od polifenolnih jedinjenja u ispitivanim ekstraktima prisutni su: fenolne kiseline (kafena, hlorogenska, *p*-kumarinska, ferulna i ruzmarinska kiselina) i flavonoli (kvercetin i rutin), kao i derivati ruzmarinske kiseline, rutina i naringenina. Mehanizam delovanja askorbinske kiseline sa DPPH radikalima dat je na slici 54.



Slika 54. Reakcija askorbinske kiseline sa DPPH radikalima

Antioksidativno delovanje polifenolnih jedinjenja posledica je njihove strukture odnosno broja i položaja hidroksilnih grupa, kao i sposobnosti stabilizacije aroksil radikala delokalizacijom. Zahvaljujući različitim hemijskim osobinama, polifenolna jedinjenja ispoljavaju svoju antioksidativnu aktivnost odavanjem atoma vodonika slobodnim radikalima i/ili transferom jednog elektrona što zavisi od primenjenog rastvarača, kao i direktnom reakcijom aroksil i hidroksil radikala uz nastajanje stabilnih proizvoda hinonske strukture (Villāno i sar., 2007).

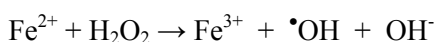
Mehanizam DPPH antiradikalne aktivnosti polifenola (ArOH) se odvija: (I) prenosom atoma vodonika sa ArOH na DPPH radikal, tj. HAT mehanizmom i/ili (II) prenosom elektrona sa ArOH ili njegovog aroksidnog anjona (ArO⁻) na DPPH radikal, tj. SET mehanizmom (Foti i sar., 2004; Samadi i sar., 2011) (slika 55). Kinetička ispitivanja koja su izveli Foti i saradnici (2004), ipak upućuju da se reakcija između polifenola i DPPH radikala odigrava SET mehanizmom. Naime, brzinu reakcije određuje brza faza reakcije, odnosno proces prenosa elektrona sa aroksidnog anjona na DPPH radikal, dok prenošenje atoma vodonika sa molekula polifenola na DPPH radikal predstavlja sporedni reakcioni mehanizam.



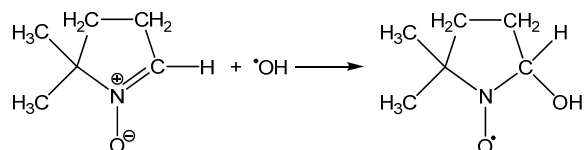
Slika 55. Reakcija polifenola sa DPPH radikalima: (A) HAT i (B) SET mehanizmom

Nedostatak metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti na DPPH stabilne slobodne radikale je što ova radikalska vrsta nije prisutna u biološkim sistemima. Kako se u oksidativnim procesima kao intermedijeri javljaju kiseonikovi slobodni radikali, određivanje antioksidativne aktivnosti je potrebno izvesti i na reaktivne radikalske vrste kiseonika. Direktna detekcija ovih radikalskih vrsta je praktično nemoguća zbog toga što imaju vrlo kratko vreme života. Jedna od metoda koja omogućava njihovu detekciju je "spin trapping" metoda kojom se nestabilni slobodni radikali "hvataju" određenim organskim jedinjenjima tzv. "trapom" i nastaju stabilni radikali tzv. "spin adukti" koji se mogu detektovati ESR spektroskopijom (Čanadanović-Brunet, 1997; Đilas i sar., 2003).

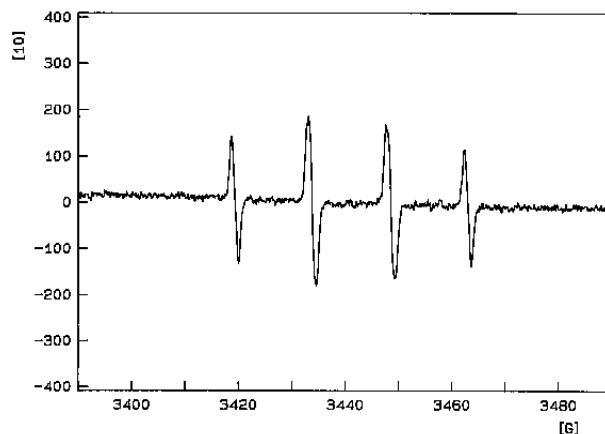
U cilju određivanja antioksidativne aktivnosti etanolnih ekstrakata tropa paradajza na hidroksil radikale, pripremljen je Fentonov reakcioni sistem za generisanje hidroksil radikala:



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



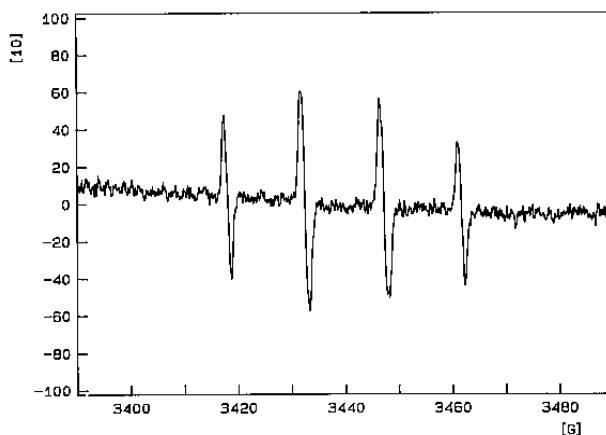
Nastali stabilni DMPO-OH "spin adukti" imaju relativno dugo vreme života, te su pogodni za detekciju ESR-om. Na slici 56 prikazan je ESR spektar DMPO-OH "spin adukata" nastalih u Fentonovom model sistemu (slepa proba).



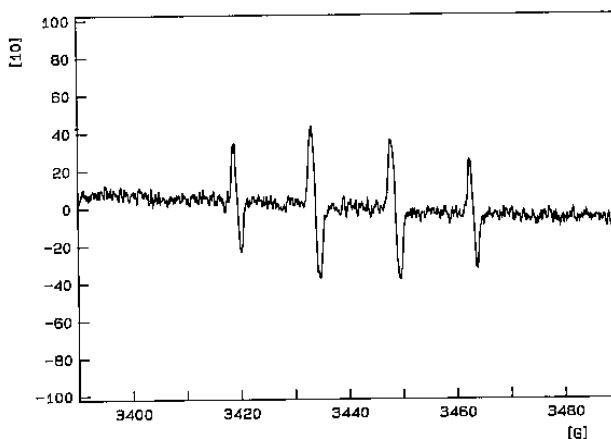
Slika 56. ESR spektar DMPO-OH "spin adukata" nastalih u Fentonovom model sistemu (slepa proba)

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 slikama 57 i 58 prikazani su ESR spektri DMPO-OH "spin adukata" nastalih u Fentonovom model sistemu u prisustvu etanolnog ekstrakta tropa paradajza genotipa Novosadski niski, koncentracija 0,05 i 0,15 mg/ml. Poređenjem ESR spektra slepe probe sa ESR spektrima proba, uočava se da je hiperfina struktura spektra očuvana, a intenziteti linija ESR signala se snižavaju.

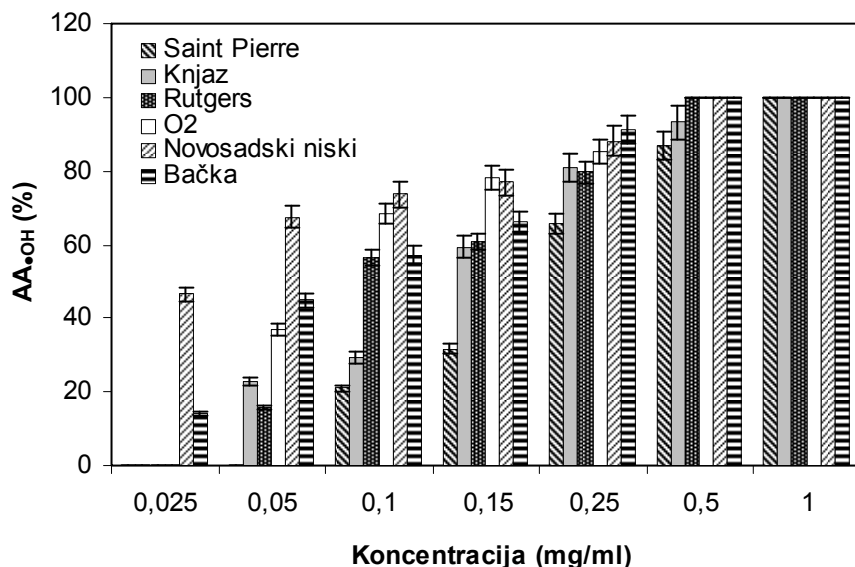


Slika 57. ESR spektar DMPO-OH "spin adukata" Fentonovog model sistema u prisustvu 0,05 mg/ml etanolnog ekstrakta tropa paradajza genotipa Novosadski niski



Slika 58. ESR spektar DMPO-OH "spin adukata" Fentonovog model sistema u prisustvu 0,15 mg/ml etanolnog ekstrakta tropa paradajza genotipa Novosadski niski

Na slici 59 prikazana je antiradikalska aktivnosti ($AA_{\bullet OH}$) etanolnih ekstrakata tropa paradajza na hidroksil radikale u Fentonovom model sistemu.

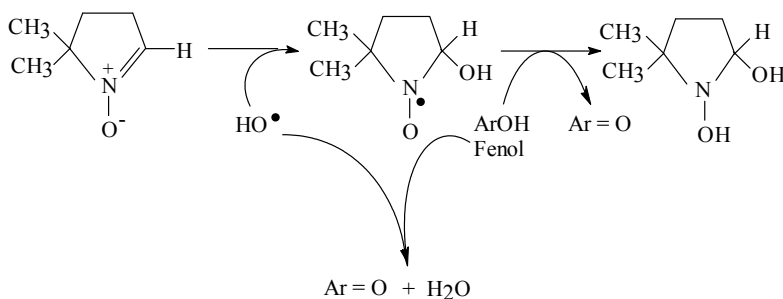


Slika 59. Uticaj etanolnih ekstrakata tropa paradajza na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala u Fentonovom model sistemu

Etanolni ekstrakti tropa svih genotipova paradajza, u ispitivanom opsegu koncentracija (0,025 - 1 mg/ml) pokazali su koncentracijski zavisnu antiradikalsku aktivnost na hidroksil radikale generisane u Fentonovom model sistemu. Ipak, na osnovu prikazanih rezultata, može se uočiti da etanolni ekstrakti tropa paradajza genotipova Bačka, Novosadski niski, O₂ i Rutgers gase ESR signal hidroksil radikala ($AA_{\bullet OH} = 100\%$) pri koncentraciji od 0,5 mg/ml, dok etanolni ekstrakti tropa paradajza genotipova Knjaz i Saint Pierre isti efekat postižu pri koncentraciji 1 mg/ml.

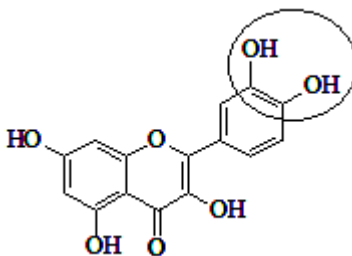
IC₅₀ vrednosti etanolnih ekstrakata tropa odabranih genotipova paradajza, dobijene na osnovu $AA_{\bullet OH}$, nalaze se u opsegu od 0,03 mg/ml do 0,20 mg/ml (tabela 22). Etanolni ekstrakti tropa paradajza pokazali su manju sposobnost "hvatanja" hidroksil radikala od hlorogenske kiseline (IC₅₀ = $17,7 \times 10^{-3}$ mg/ml), a veću od BHA (IC₅₀ = 1,51 mg/ml). S obzirom da je najniža IC₅₀ vrednost (0,03 mg/ml) utvrđena za etanolni ekstrakt tropa paradajza genotipa Novosadski niski, može se zaključiti da ovaj trop poseduje najznačajniju antiradiaklsku aktivnost na hidroksil radikale.

U Fentonovom reakcionom sistemu u prisustvu "spin trapa", hidroksil radikali mogu da reaguju i sa polifenolnim jedinjenjima i sa DMPO. Pretpostavljeni reakcioni mehanizam u smeši polifenolnih jedinjenja, hidroksil radikala i "spin trapa" DMPO, može se prikazati šematski (Hiramoto i sar., 1996):

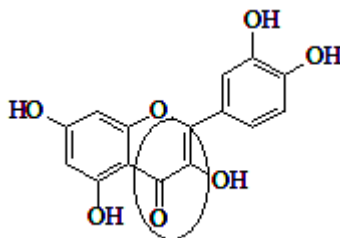


Rice-Evans i saradnici (1996) su dokazali da inhibitorni efekat fenolnih kiselina zavisi od broja hidroksilnih grupa u molekulu. Fenolne kiseline sa *o*-dihidroksi grupama, kao što su hlorogenska i kafena, doprinose višim vrednostima AA•_{OH}. Visokim AA•_{OH} vrednostima ovih kiselina sigurno doprinosi i velika stabilnost nastalih aroksil radikala (Bors i sar., 1990). Najznačajniji elementi za antioksidativno delovanje flavonoida su:

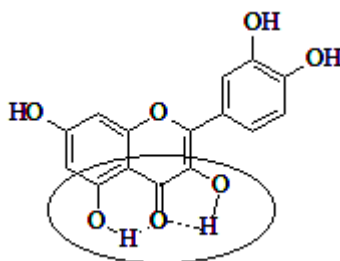
1. broj hidroksilnih grupa u B prstenu,
2. *o*-dihidroksilne grupe B prstena,



3. 2,3-dvostruka veza piranskog prstena u konjugaciji sa keto-grupom na C₄-atomu (zbog delokalizacije),

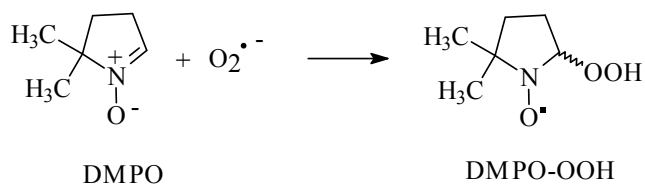


4. Hidroksilne grupe na položajima C₃ i C₅ kao "hvatači" slobodnih radikala, i njihova sposobnost stvaranja vodoničnih veza sa keto grupom.

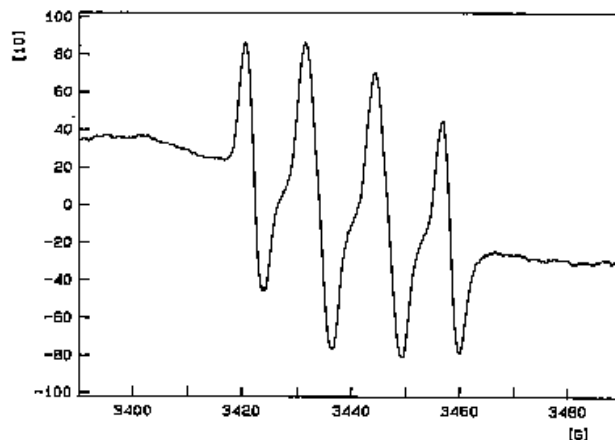


Flavonoidi sa *o*-dihidroksi strukturom u B prstenu i 3- i/ili 5-OH grupama sa 4-okso funkcionalnom grupom u A i C prstenovima flavonola, i fenolne kiseline sa *o*-dihidroksi grupama mogu ispoljiti svoju antioksidativnu aktivnost heliranjem jona metala u toku Fentonove reakcije (Morel i sar., 1994).

Superoksid anjon radikal je slab oksidacioni agens, ali je prekursor u stvaranju vrlo reaktivnih hidrosil radikala i singlet kiseonika, koji značajno mogu povećati nivo oksidativnog stresa (Liu i sar., 2008). Ovaj radikal se može generisati enzimatski, sistemom ksantin/ksantin oksidaza ili hemijskim putem, 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. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti etanolnih ekstrakata tropa paradajza na slobodne superoksid anjon radikale, nastale u model sistemu kalijum superoksid/kraunetar, izvršeno je "spin trapping" metodom upotrebom DMPO kao "spin trap" jedinjenja. Nastali reaktivni O₂^{•-} u prisustvu "spin trapa" DMPO formiraju stabilne nitroksid radikale, odnosno DMPO-OH "spin adukte", sledećim reakcionim mehanizmom:

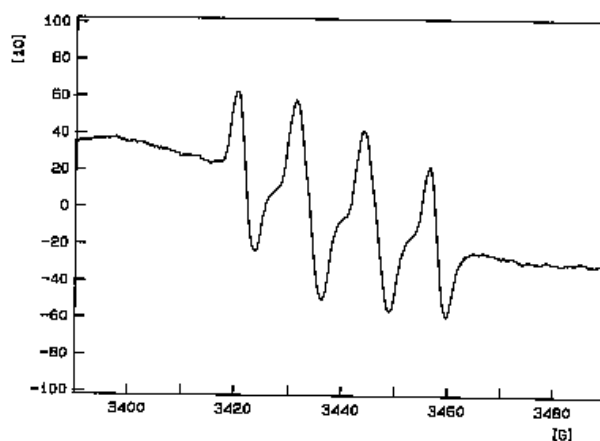


Hiperfina struktura ESR signala stabilizovanih superoksid anjon radikala, odnosno DMPO-OOH "spin adukata" (slika 60) sastoji se od četiri linije, a konstante cepanja imaju vrednosti: $a_N = 12,65$ G, $a_{H\beta} = 10,4$ G i $a_{H\gamma} = 1,3$ G, koje su u saglasnosti sa literaturom (Carmichael i sar., 1985).

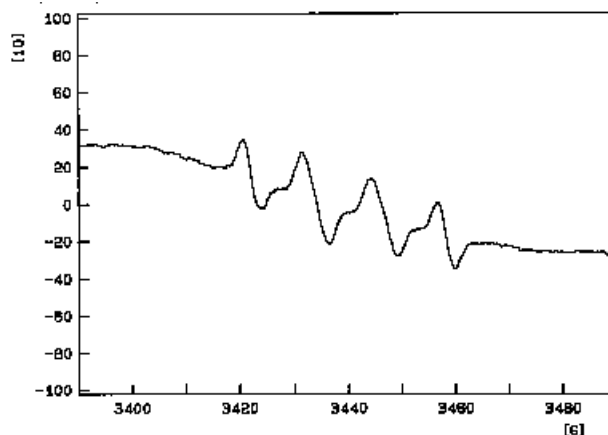


Slika 60. ESR spektar DMPO-OOH "spin adukata" superoksid anjon radikala (slepa proba)

Na slikama 61 i 62 prikazani su ESR spektri DMPO-OOH "spin adukata" superoksid anjon radikala nastalih u model sistemu u prisustvu etanolnog ekstrakta tropa paradajza genotipa Rutgers, koncentracije 0,25 i 1 mg/ml. U ESR spektrima proba sa ispitivanim ekstraktima očuvana je hiperfina struktura spektra, a intenziteti linija ESR signala se snižavaju u odnosu na ESR spektar slepe probe.

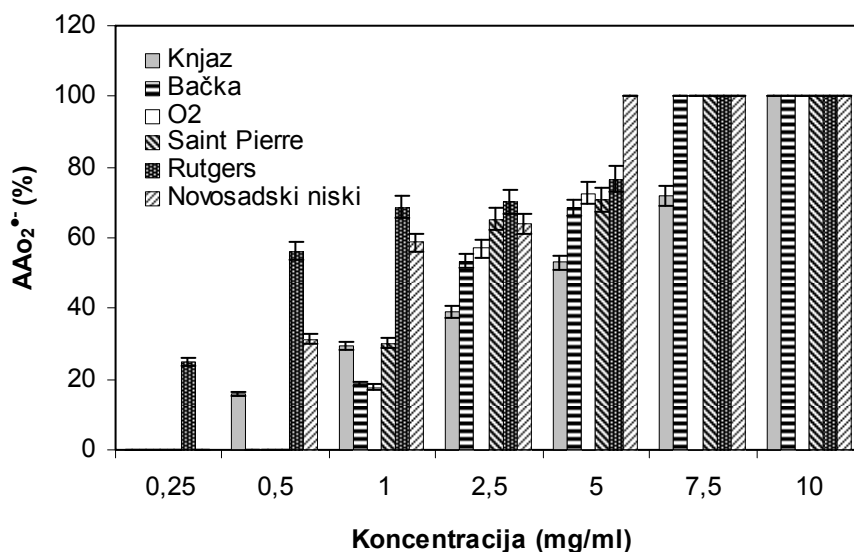


Slika 61. ESR spektar DMPO-OOH "spin adukata" superoksid anjon radikala nastalih u model sistemu kalijum superoksid/kraunetar u prisustvu 0,25 mg/ml etanolnog ekstrakta tropa Rutgers paradajza



Slika 62. ESR spektar DMPO-OOH "spin adukata" superoksid anjon radikala nastalih u model sistemu kalijum superoksid/kraunetar u prisustvu 1 mg/ml etanolnog ekstrakta tropa Rutgers paradajza

Antiradikalska aktivnositi (AAO₂^{•-}) etanolnih ekstrakata tropa paradajza na superoksid anjon radikale prikazana je na slici 63.



Slika 63. Uticaj etanolnih ekstrakata tropa paradajza na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala

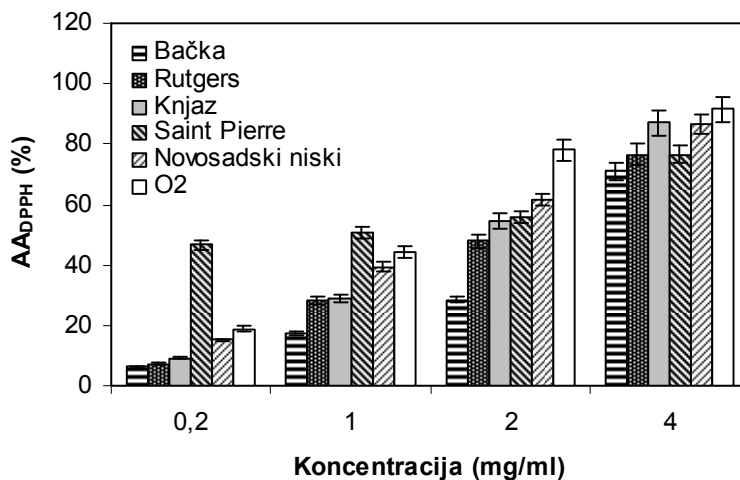
Etanolni ekstrakti tropa paradajza, u opsegu ispitivanih koncentracija (0,25-10 mg/ml), efikasno su uticali na stvaranje i/ili transformaciju superoksid anjon radikala. Na osnovu rezultata prikazanih na slici 63, može se uočiti da etanolni ekstrakt tropa Novosadski niski u potpunosti gasi

(eliminiraju) ESR signal superoksid anjon radikala pri koncentraciji od 5 mg/ml, dok ostali etanolni ekstrakti isti efekat postižu pri većim koncentracijama.

IC₅₀ vrednosti etanolnih ekstrakata tropa odabranih genotipova paradajza, određene na osnovu AA_{O₂•-}, su u opsegu od 0,45 mg/ml do 4,44 mg/ml (tabela 22). Etanolni ekstrakti tropa paradajza pokazali su manju sposobnost "hvatanja" superoksid anjon radikala od hlorogenske kiseline (IC₅₀ = 0,83 × 10⁻³ mg/ml), dok je njihova efikasnost na superoksid anjon radikale veća od BHA (IC₅₀ = 2,68 mg/ml), osim u slučaju etanolnog ekstrakta genotipa Knjaz. Od svih ispitanih etanolnih ekstrakata tropa paradajza, najniža IC₅₀ vrednost (0,45 mg/ml), odnosno najznačajnija antioksidativnu aktivnost na superoksid anjon radikale utvrđena je za etanolni ekstrakt tropa paradajza genotipa Rutgers.

4.3.3. Antioksidativna aktivnost ostataka nakon ekstrakcija tropa odabranih genotipova paradajza

Antioksidativna aktivnost nerastvorljivih ostataka nakon ekstrakcija tropa odabranih genotipova paradajza ispitana je spektrofotometrijskim DPPH testom (Serpen i sar., 2007; Espin i sar., 2000). Ovim testom moguće je odrediti antioksidativnu aktivnost nerastvorljivih komponenata. Uticaj ostataka nakon ekstrakcija tropa odabranih genotipova paradajza na transformaciju DPPH radikala prikazan je na slici 64.



Slika 64. Uticaj ostataka nakon ekstrakcija tropa odabranih genotipova paradajza na transformaciju DPPH radikala

U ispitivanom opsegu koncentracija (0,2 - 4 mg/ml) utvrđena je značajna, koncentracijski zavisna, antiradikalska aktivnost na DPPH radikale ostataka tropa paradajza. U tabeli 25 su date IC_{50} vrednosti ostataka dobijenih nakon ekstrakcija tropa, izračunate na osnovu AA_{DPPH} . Antiradikalska aktivnost na DPPH radikale ovih ostataka, izražena kao IC_{50} vrednost, opada sledećim redosledom: Saint Pierre > O₂ > Novosadski niski > Knjaz > Rutgers > Bačka.

Tabela 25. IC_{50} vrednosti na DPPH radikale ostataka nakon ekstrakcija tropa odabranih genotipova paradajza

Genotip	IC_{50}^{DPPH} (mg/ml)
Bačka	3,01
Knjaz	1,82
Novosadski niski	1,48
O ₂	1,17
Rutgers	2,15
Saint Pierre	0,85

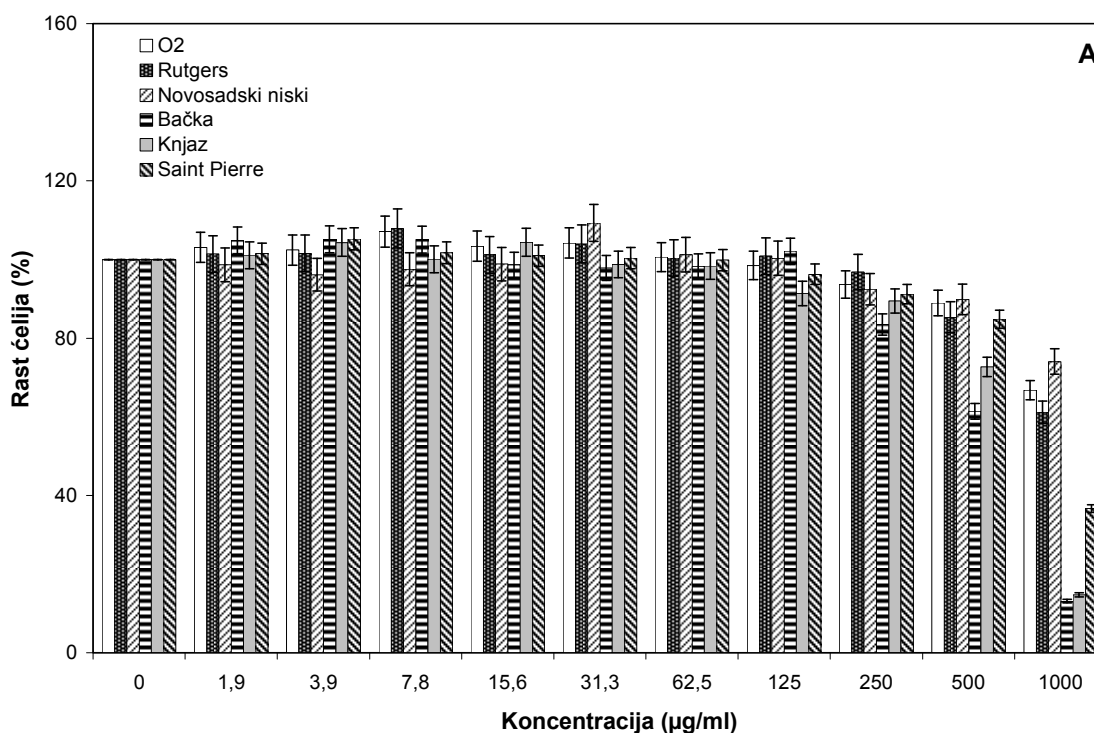
Savremeni trendovi u oblasti prehrambeno-tehnoloških istraživanja su usmerena prema razvoju obogaćenih funkcionalnih namirnica, posebno biljnog porekala. Unos prehrambenih vlakana je poželjan ne samo zbog nutritivnih, nego i zbog funkcionalnih osobina (Thebaudin i sar., 1997). Zato je sve veći broj istraživanja novih sirovina koja mogu biti izvor prehrambenih vlakana (García Herrera i sar., 2010). Kriterijumi koje treba da ispune izvori vlakana da bi se smatrali "idealnim prehrambenim vlaknima" su: da ne poseduju nutritivno neodgovarajuće komponente; da budu što je moguće više koncentrisani (tako da minimalne količine mogu imati maksimalni fiziološki efekat); da budu blagog ukusa, boje, teksture i mirisa; da imaju uravnotežen sastav (nerastvorljivih i rastvorljivih vlakana) i dovoljne količine bioaktivnih jedinjenja; da imaju dug vek trajanja i da ne utiču negativno na druge dodate komponente; da budu kompatibilni sa procesom prerade hrane; da imaju pozitivan efekat u očima potrošača s obzirom na poreklo, korisnost, itd.; da imaju očekivano fiziološko delovanje i da imaju nisku cenu (Larrauri, 1999). Prema navedenim kriterijumima, rezultati dobijeni ovim ispitivanjem pokazuju da se ostaci nakon ekstrakcija tropa odabranih genotipova paradajza mogu smatrati "izvorom vlakana", kao i potencijalno "idealnim prehrambenim vlaknima". Takođe, neophodna su dalja istraživanja u proceni fizioloških efekata vlakana iz tropa paradajza na humani organizam, kao i fizičko-hemijskih efekata u prehrambenim proizvodima obogaćenim prehrambenim vlaknima paradajza.

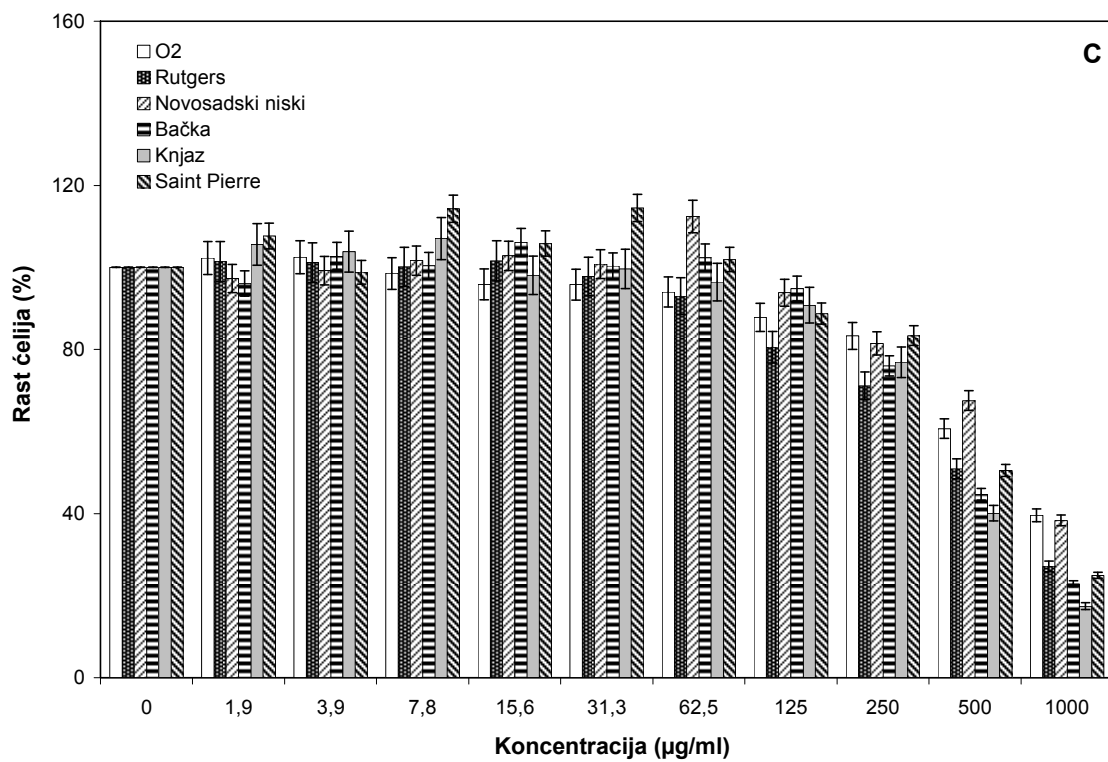
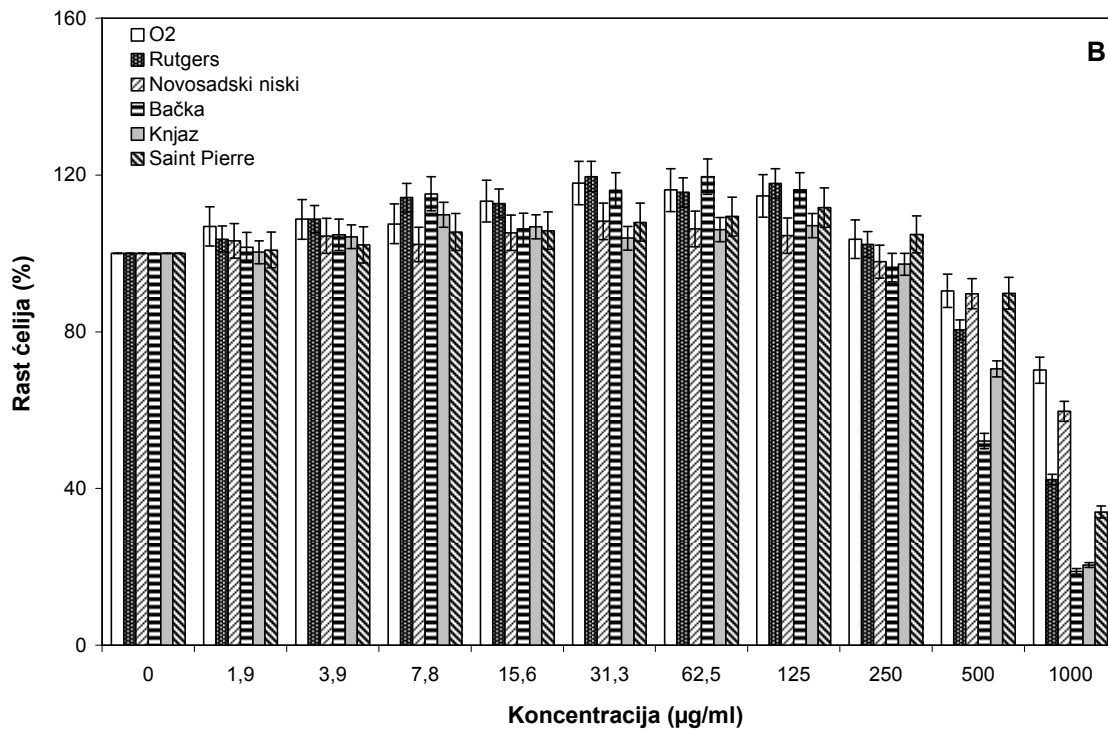
4.4. Antiproliferativna aktivnost ekstrakata tropa paradajza

Biološki testovi na humanim ćelijskim linijama, koji se baziraju na odgovoru cele ćelije, su značajan pokazatelj metaboličkih, biohemijskih i genetskih promena koje nastaju pod uticajem ispitivanih jedinjenja. Antiproliferativna aktivnost ekstrakata tropa ispitana je *in vitro*, njihovim delovanjem na rast tri histološki različite humane ćelijske linije: MCF7 (humani adenokarcinom dojke), HeLa (humani epitelni karcinom cerviksa) i MRC-5 (humani karcinom pluća) primenom SRB testa (Skehan i sar., 1990). Ispitivanje uticaja heksanskih ekstrakata izvedeno je u opsegu koncentracija 1,9-1000 $\mu\text{g/ml}$, a etanolnih u opsegu 0,05-25 mg/ml. Ekstrakti tropa uticali su na rast tumorskih ćelija u zavisnosti od vrste ekstrakta, primenjene koncentracije i vrste ćelijske linije.

4.4.1. Antiproliferativna aktivnost lipofilnih ekstrakata

Na slici 65 prikazan je uticaj heksanskih ekstrakata tropa odabranih genotipova paradajza na rast HeLa, MCF7 i MRC-5 ćelija.





Slika 65. Uticaj heksanskih ekstrakata tropa paradajza na rast HeLa (A), MCF7 (B) i MRC-5 (C) ćelija

Antiproliferativni efekat heksanskih ekstrakata tropa paradajza uočen je samo pri višim koncentracijama ($\geq 125 \mu\text{g/ml}$) i izraženiji je kod MRC-5 ćelijske linije nego kod HeLa i MCF7 ćelijske linije. U opsegu koncentracija 1,9-125 $\mu\text{g/ml}$ značajniji ($p < 0,01$) proliferativni efekat pokazali su ekstrakti tropa paradajza genotipova O₂, Rutgers, Bačka i Saint Pierre na MCF7 ćelijskoj liniji (slika 65B), ekstrakti tropa paradajza genotipova Novosadski niski i Saint Pierre na MRC-5 ćelijskoj liniji (slika 65C), a ekstrakti tropa paradajza genotipova Rutgers i Novosadski niski na HeLa ćelijskoj liniji (slika 65A).

Na osnovu prikazanih antiproliferativnih aktivnosti heksanskih ekstrakata tropa paradajza, kao i antioksidativnih jedinjenja (β -karotena i BHA) i dva poznata citotoksična leka (doksorubicin i gemcitabin) izračunate su IC₅₀ vrednosti, tj. koncentracije ekstrakata/antioksidativnih jedinjenja/citotoksičnih lekova koje izazivaju inhibiciju rasta za 50% svake od tri ispitivane ćelijske linije (tabela 26).

Tabela 26. IC₅₀ vrednosti heksanskih ekstrakata tropa paradajza, antioksidativnih jedinjenja (β -karotena i BHA) i dva poznata citotoksična leka (doksorubicin i gemcitabin)

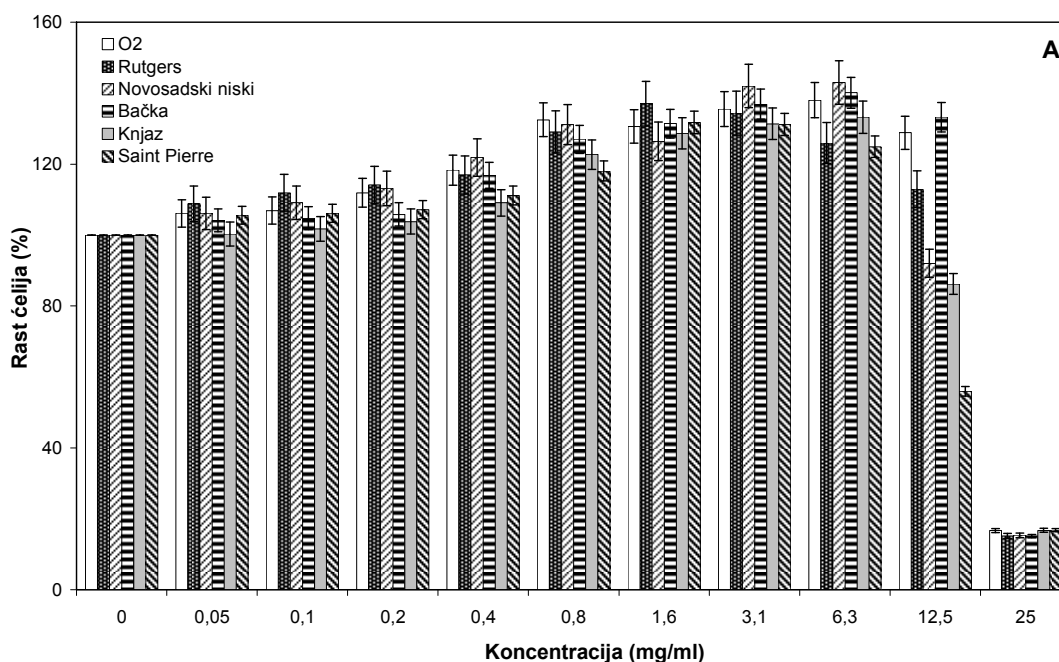
Genotip i standardno jedinjenje	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)		
	HeLa	MCF7	MRC-5
Bačka	513,12 \pm 18,99	601,94 \pm 22,87	467,57 \pm 14,96
Knjaz	572,11 \pm 26,32	667,43 \pm 19,36	425,14 \pm 20,41
Novosadski niski	3079,88 \pm 133,05	1000,32 \pm 43,01	746,41 \pm 26,12
O ₂	1612,27 \pm 59,65	1533,40 \pm 72,07	761,64 \pm 29,70
Rutgers	1203,76 \pm 55,37	882,56 \pm 28,24	469,96 \pm 22,56
Saint Pierre	810,48 \pm 21,88	850,06 \pm 38,25	530,05 \pm 15,37
β -karoten	13,83 \pm 10,87	10,65 \pm 1,71	17,33 \pm 1,31
BHA	7,87 \pm 0,06	8,23 \pm 0,40	10,94 \pm 2,26
Doksorubicin	0,339	0,414	1,046
Gemcitabin	0,388	0,473	7,804

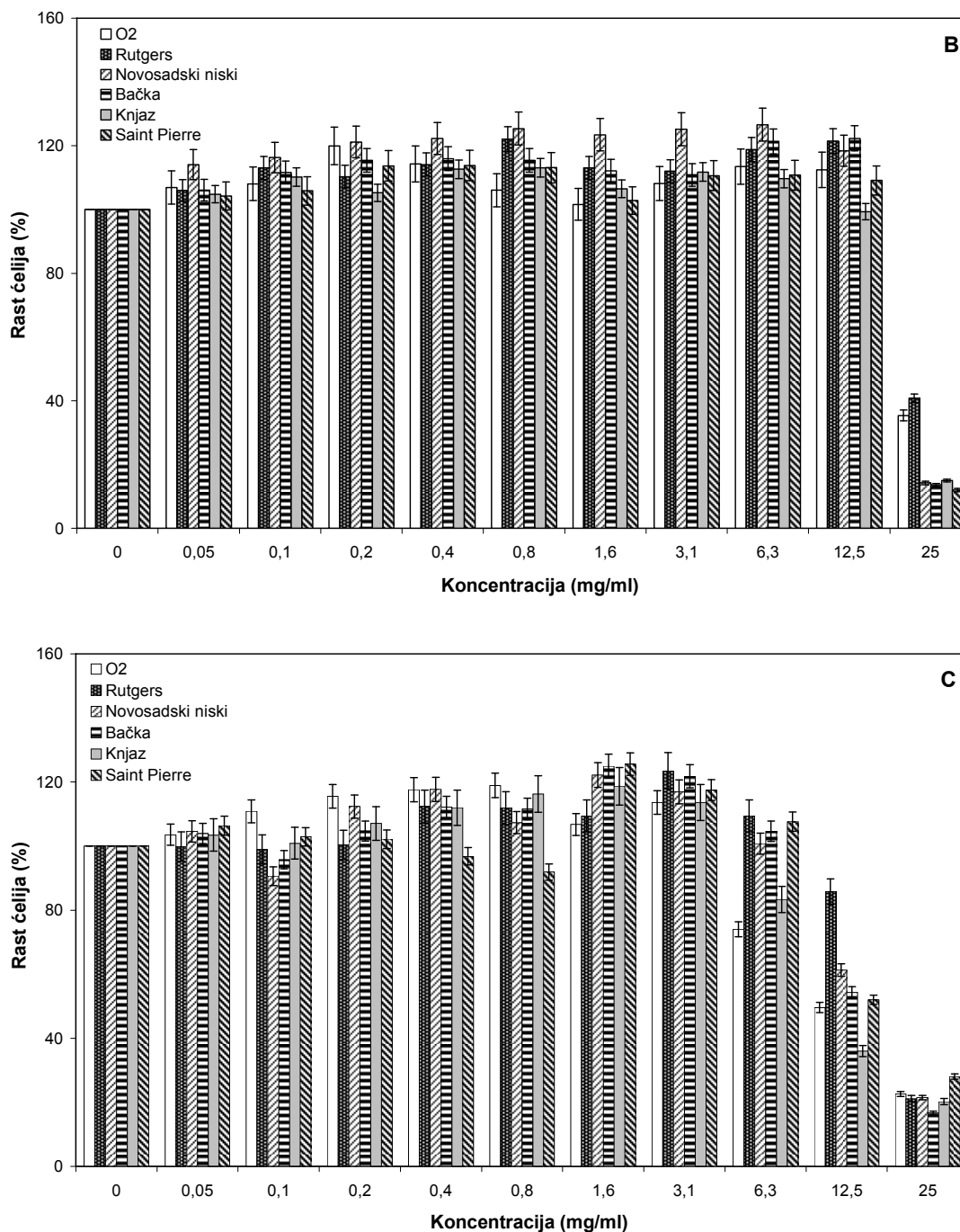
Od svih ispitanih heksanskih ekstrakata tropa paradajza, ekstrakt genotipa Knjaz pokazao je najizraženiji antiproliferativni efekat na MRC-5 ćelijskoj liniji (IC₅₀=425,1 $\mu\text{g/ml}$). Najizraženiju antiproliferativnu aktivnost na HeLa (IC₅₀=513,12 $\mu\text{g/ml}$) i MCF7 (IC₅₀=601,94 $\mu\text{g/ml}$) ćelijskoj liniji pokazao je ekstrakt tropa paradajza genotipa Bačka. IC₅₀ vrednosti β -karotena, BHA, kao i dva poznata citotoksična leka (doksorubicin i gemcitabin) (Četojevic-Simin i sar., 2011), određene su na istim ćelijskim linijama radi upoređivanja delovanja ekstrakata tropa paradajza. Ispitivani ekstrakti imaju veće IC₅₀ vrednosti odnosno slabije izraženu antiproliferativnu aktivnosti u odnosu na doksorubicin i gemcitabin. Takođe, β -karoten i BHA su pokazali snažniju antiproliferativnu aktivnost na sve tri ćelijske linije od ispitivanih ekstrakata.

Ispitivanjem sadržaja antioksidativnih jedinjenja, utvrđeno je da heksanski ekstrakti tropa paradajza različitih genotipova sadrže karotenoide (likopen i β -karoten). Antiproliferativno delovanje heksanskih ekstrakata može se pripisati prisutnim karotenoidima. Mehanizmi na kojima se zasniva antikancerogena i/ili hemopreventivna aktivnost karotenoida zasnivaju se na promenama u signalnim putevima koji dovode do rasta ili smrti ćelija. Značajan pozitivan efekat karotenoida jeste njihova sposobnost da povećaju međućelijsku komunikaciju. Kod kancerogene transformacije prisutno je smanjenje međućelijske komunikacije, pa njeno ponovno uspostavljanje može izmeniti (usporiti ili sprečiti) kancerogeni proces (Tanaka i sar., 2012). Inhibitorno delovanje likopena na rast MCF7 ćelija utvrđeno je u ispitivanju Fornelli i saradnika (2007) i predloženo je da modulacija međućelijske komunikacije može biti jedan od mehanizama delovanja.

4.4.2. Antiproliferativna aktivnost hidrofилnih ekstrakata

Uticaj etanolnih ekstrakata tropa paradajza odabranih genotipova paradajza na rast HeLa, MCF7 i MRC-5 ćelija prikazan je na slici 66.





Slika 66. Uticaj etanolnih ekstrakata tropa paradajza na rast HeLa (A), MCF7 (B) i MRC-5 (C) ćelija

Antiproliferativni efekat etanolnih ekstrakata uočen je samo pri višim koncentracijama ($\geq 6,3$ mg/ml) i izraženiji je kod MRC-5 ćelijske linije nego na HeLa i MCF7 ćelijske linije. U opsegu koncentracija 0,05-12,5 mg/ml svi ispitani etanolni ekstrakti pokazali su značajan ($p < 0,01$) proliferativni efekat na sve tri ćelijske linije.

IC₅₀ vrednosti etanolnih ekstrakata tropa paradajza, određene na osnovu prikazanih antiproliferativnih aktivnosti na sve tri ćelijske linije, date su u tabeli 27.

Tabela 27. IC₅₀ vrednosti etanolnih ekstrakata tropa paradajza različitih genotipova

Genotip	IC ₅₀ (mg/ml)		
	HeLa	MCF7	MRC-5
Bačka	20,7 ± 0,64	20,5 ± 0,66	13,4 ± 0,40
Knjaz	18,1 ± 0,62	20,9 ± 0,54	11,9 ± 0,60
Novosadski niski	18,8 ± 0,81	20,6 ± 0,84	15,0 ± 0,48
O ₂	20,9 ± 0,75	23,1 ± 1,16	12,0 ± 0,38
Rutgers	20,7 ± 0,95	23,7 ± 0,76	18,7 ± 0,86
Saint Pierre	13,7 ± 0,33	20,3 ± 0,85	13,2 ± 0,37

Od svih ispitanih etanolnih ekstrakata tropa paradajza, ekstrakt genotipa Saint Pierre pokazao je najizraženiji antiproliferativni efekat na HeLa ćelijskoj liniji (IC₅₀=13,7 mg/ml), kao i na MCF7 ćelijskoj liniji (IC₅₀=20,3 mg/ml). Najizraženiji antiproliferativni efekat na MRC-5 ćelijskoj liniji (IC₅₀=11,9 mg/ml) pokazao je etanolni ekstrakt tropa paradajza genotipa Knjaz.

Za procenu antiproliferativne aktivnosti etanolnih ekstrakata tropa paradajza određene su IC₅₀ vrednosti askorbinske kiseline, polifenolnih jedinjenja (kafene kiseline, hlorogenske kiseline, *p*-kumarinske kiseline, ferulne kiseline, ruzmarinske kiseline, rutina, kvercetina i naringenina), kao i dva citotoksična leka (doksorubicina i gemcitabina) na istom panelu ćelijskih linija (tabele 26 i 28). Svi ispitivani ekstrakti pokazali su veće IC₅₀ vrednosti odnosno slabiju antiproliferativnu aktivnosti u odnosu na doksorubicin, gemcitabin, kao i u odnosu na većinu ispitanih standardnih antioksidanata.

Tabela 28. IC₅₀ vrednosti askorbinske kiseline i polifenolnih jedinjenja

Standardni antioksidanti	IC ₅₀ (µg/ml)		
	HeLa	MCF7	MRC-5
Kumarinska kiselina	144,72 ± 21,70	284,91 ± 42,43	276,19 ± 49,19
Kafena kiselina	19,73 ± 4,93	75,02 ± 10,42	34,16 ± 1,77
Ruzmarinska kiselina	>250	185,80 ± 9,10	>250
Hlorogenska kiselina	>250	203,99 ± 29,11	>250
Naringenin	9,93 ± 1,75	68,70 ± 10,83	83,39 ± 13,59
Rutin	>500	>500	>500
Kvercetin	38,91 ± 5,89	12,77 ± 1,23	12,22 ± 0,60
Ferulna kiselina	>500	114,35 ± 16,46	202,69 ± 15,43
Askorbinska kiselina	26,69 ± 5,07	32,93 ± 1,84	398,60 ± 24,96

Pretpostavlja se da polifenoli mogu delovati na različite signalne puteve aktiviranih proteinskih kinaza (MAPK), aktivatora proteina-1 (AP-1) ili nuklearnog faktora-κB (NF-κB)

pojedinačno ili u nizu, pa uz moguće interakcije između tih puteva, može doći od preklapanja i međusobnog nadopunjavanja u mehanizmu delovanja (Yang i Liu, 2009). Postavljena je hipoteza da su aditivni i sinergistički efekti fitohemikalija iz voća i povrća odgovorni za njihove izrazite antioksidativne i antitumorske aktivnosti, kao i da su korisni efekti prehrane sa većim sadržajem voća i povrća pripisani složenoj smeši fitohemikalija prisutnih u hrani u celini (Liu, 2004).

4.5. Korelaciona analiza sadržaja bioaktivnih jedinjenja i antioksidativne/antiproliferativne aktivnosti

U cilju utvrđivanja značaja bioaktivnih jedinjenja u antioksidativnoj/antiproliferativnoj aktivnosti ekstrakata tropa paradajza urađena je korelaciona analiza između pojedinih parametara.

Koeficijent korelacije (r) sadržaja karotenoida (likopena i β -karotena) određenih spektrofotometrijski i HPLC analizom i antioksidativne/antiproliferativne aktivnosti heksanskih prikazani su u tabeli 29.

Tabela 29. Koeficijent korelacije (r) sadržaja karotenoida (likopena i β -karotena) i antioksidativne/antiproliferativne aktivnosti

Komponenta	DPPH*	MCF7	HeLa	MRC-5
Likopen*	-0,77	-0,78	-0,53	-0,69
β -Karoten*	-0,75	-0,18	-0,58	-0,37
Likopen**	-0,89	-0,94	-0,83	-0,93
β -Karoten**	-0,86	-0,99	-0,80	-0,86

*Određen spektrofotometrijski; ** određen HPLC analizom.

Rezultati korelacione analize između IC_{50}^{DPPH} vrednosti heksanskih ekstrakata i sadržaja likopena i β -karotena određenih HPLC metodom ($r = -0,89$, $r = -0,86$), kao i sadržaja likopena i β -karotena određenih spektrofotometrijski ($r = -0,77$, $r = -0,75$) ukazuju da se antiradikalna aktivnost na DPPH radikale heksanskih ekstrakata tropa paradajza može pripisati likopenu, kao i β -karotenu. Koeficijenti korelacije između IC_{50}^{MCF7} , IC_{50}^{HeLa} i IC_{50}^{MRC-5} vrednosti heksanskih ekstrakata i sadržaja likopena (određenog HPLC metodom) u heksanskim ekstraktima tropa paradajza ($r = -0,94$, $r = -0,83$ i $r = -0,93$), kao i između IC_{50}^{MCF7} , IC_{50}^{HeLa} i IC_{50}^{MRC-5} vrednosti heksanskih ekstrakata i sadržaja β -karotena (određenog HPLC metodom) u heksanskim ekstraktima tropa paradajza ($r = -0,99$, $r = -0,80$ i $r = -0,86$), ukazuju da se i antiproliferativna aktivnost heksanskih ekstrakata na MCF7, HeLa i MRC-5 ćelijske linije može pripisati likopenu i β -karotenu. Na isti zaključak ukazuju i rezultati korelacione analize između IC_{50}^{MCF7} , IC_{50}^{HeLa} i IC_{50}^{MRC-5} vrednosti heksanskih ekstrakata i sadržaja likopena,

određenog spektrofotometrijski ($r = -0,78$, $r = -0,53$ i $r = -0,69$), kao i rezultati korelacione analize između IC_{50}^{HeLa} i sadržaja β -karotena, određenog spektrofotometrijski ($r = -0,58$).

Doprinos karotenoida antioksidativnoj aktivnosti utvrđen je takođe u nekim ispitivanjima (Arnao i sar., 2001; Dewanto i sar., 2002; Di Vaio i sar., 2008; Grassmann i sar., 2007; Zanfini i sar., 2010), dok u drugima korelacija između karotenoida i antioksidativne aktivnosti nije potvrđena (Ancos i sar., 2002; Choi i sar., 2007; Lavelli i sar., 2009). U istraživanju Olsson i saradnika (2004) inverzna korelacija utvrđena je za zbir sadržaja luteina i β -karotena i proliferacije MCF7 ćelija. Koeficijent korelacije luteina i proliferacije MCF7 ćelija iznosio je $-0,72$.

Antioksidativna aktivnost nije uvek u korelaciji sa sadržajem polifenola (Kahkonen i sar., 1999). Raffo i saradnici (2002) su utvrdili da je korelacija između antioksidativne aktivnosti "cherry" paradajza i polifenola zavisi od sadržaja pojedinih polifenolnih jedinjenja; antioksidativna aktivnost sa sadržajem kafene kiseline pokazala je dobru korelaciju, dok sa sadržajem hlorogenske kiseline, *p*-kumarinske kiseline, rutina, kvercetina i naringenina korelacija nije postojala. Ilahy i saradnici (2011) su izneli da za antioksidativnu aktivnost paradajza nisu odgovorni polifenoli i flavonoidi. Podaci o uticaju polifenolnih jedinjenja na rast (proliferaciju) različitih ćelija kancera su često kontroverzni. Neki autori su utvrdili da polifenoli iz voća i povrća inhibiraju proliferaciju ćelija kancera *in vitro* (Kim i sar., 2011; Kim i sar., 2010), dok u nekim ispitivanjima korelacija između inhibicije rasta ćelija kancera i sadržaja polifenola i flavonoida u ekstraktima nekih vrsta bobičastog voća nije postojala (Olsson i sar., 2004).

Koeficijent korelacije (r) sadržaja polifenolnih jedinjenja i askorbinske kiseline određenih spektrofotometrijski, odnosno HPLC analizom i IC_{50} vrednosti dobijenih na osnovu ispitivanja antioksidativne/antiproliferativne aktivnosti prikazani su u tabelama 30 i 31. U ovom ispitivanju, značajna korelacija utvrđena je između sadržaja rutina, rutin derivata i naringenin derivata i IC_{50}^{OH} vrednosti etanolnih ekstrakata ($r = -0,68$, $r = -0,72$, odnosno $r = -0,77$) i između sadržaja ruzmarinske kiseline i $IC_{50}^{O_2^{\cdot-}}$ vrednosti etanolnih ekstrakata ($r = -0,90$). Ispitana je korelacija i između IC_{50}^{DPPH} , IC_{50}^{RP} i IC_{50}^{HA} vrednosti etanolnih ekstrakata i sadržaja pojedinih polifenolnih jedinjenja, odnosno klasa polifenolnih jedinjenja prisutnih u etanolnim ekstraktima tropa paradajza. Najbolja korelacija uočena je između IC_{50}^{DPPH} vrednosti etanolnih ekstrakata i sadržaja derivata I i II ruzmarinske kiseline, kao i kvercetina ($r = -0,83$, $r = -0,57$, odnosno $r = -0,58$); između IC_{50}^{RP} vrednosti etanolnih ekstrakata i sadržaja flavonoida određenog spektrofotometrijski ($r = -0,94$) i između IC_{50}^{HA} vrednosti etanolnih ekstrakata i sadržaja ruzmarinske kiseline ($r = -0,59$). IC_{50}^{MCF7} , IC_{50}^{HeLa} i IC_{50}^{MRC-5} vrednosti etanolnih ekstrakata pokazale su dobru korelaciju sa sadržajem hlorogenske kiseline ($r = -0,63$, $r = -0,82$ i $r = -0,55$).

Tabela 30. Koeficijent korelacije (r) sadržaja polifenolnih jedinjenja i askorbinske kiseline određenih spektrofotometrijski, odnosno HPLC analizom i antioksidativne aktivnosti

Komponenta etanolnog ekstrakta	\bullet OH	$O_2^{\bullet-}$	DPPH \bullet	RP	HA
Kafena kiselina**	-0,35	-0,18	0,12	-0,32	0,48
Horogenska kiselina**	0,74	0,64	-0,17	-0,04	0,33
<i>p</i> -Kumarinska kiselina**	-0,11	-0,44	0,30	-0,65	0,11
Ferulna kiselina**	0,27	-0,12	0,17	-0,19	-0,26
Ruzmarinska kiselina	-0,29	-0,90	0,57	-0,58	-0,59
Rutin-derivat**	-0,72	0,02	0,06	0,30	0,51
Ruzmarinska kiselina - derivat I**	-0,07	0,57	-0,83	0,23	0,87
Rutin**	-0,68	-0,06	0,02	0,04	0,64
Ruzmarinska kiselina - derivat II	-0,37	0,38	-0,57	0,45	0,66
Kvercetin**	0,03	0,86	-0,58	0,78	0,68
Naringenin - derivat**	-0,77	-0,26	0,11	-0,04	0,49
Ukupno**	-0,65	-0,13	0,08	-0,06	0,61
Fenolne kiseline**	-0,21	-0,15	0,05	-0,33	0,39
Flavonoli**	-0,67	0,11	-0,09	0,22	0,75
Rutin i derivati rutina**	-0,69	-0,05	0,02	0,07	0,64
Polifenoli*	0,01	-0,11	-0,18	-0,57	0,45
Flavonoidi*	0,05	-0,79	0,52	-0,94	-0,40
Askorbinska kiselina*	-0,51	-0,52	0,81	-0,12	-0,18

*Određen spektrofotometrijski; **određen HPLC analizom.

Tabela 31. Koeficijent korelacije (r) sadržaja polifenolnih jedinjenja i askorbinske kiseline određenih spektrofotometrijski, odnosno HPLC analizom i antiproliferativne aktivnosti

Komponenta etanolnog ekstrakta	MCF7	HeLa	MRC-5
Kafena kiselina*	0,36	0,11	0,06
Horogenska kiselina**	-0,63	-0,82	-0,55
<i>p</i> -Kumarinska kiselina**	0,50	-0,06	0,30
Ferulna kiselina**	0,73	0,08	0,53
Ruzmarinska kiselina	0,71	0,30	0,83
Rutin-derivat**	-0,42	0,28	-0,25
Ruzmarinska kiselina -derivat I**	0,13	0,14	-0,77
Rutin**	-0,13	0,24	-0,23
Ruzmarinska kiselina -derivat II**	0,61	0,61	-0,23
Kvercetin**	0,02	0,22	-0,46
Naringenin-derivat**	0,01	0,35	-0,06
Ukupno**	0,00	0,24	-0,13
Fenolne kiseline**	0,57	0,13	0,13
Flavonoli**	-0,15	0,28	-0,32
Rutin i derivati rutina**	-0,16	0,25	-0,24
Polifenoli*	0,23	-0,20	-0,27
Flavonoidi*	0,36	-0,24	0,49
Askorbinska kiselina*	0,15	0,22	0,70

*Određen spektrofotometrijski; **određen HPLC analizom.

Rezultati korelacione analize ukazuje da nije određeno polifenolno jedinjenje, odnosno klasa polifenolnih jedinjenja odgovorna za antioksidativnu, odnosno antiproliferativnu aktivnost etanolnih ekstrakata tropa odabranih genotipova paradajza. Za antioksidativnu, odnosno antiproliferativnu aktivnost etanolnih ekstrakata najverovatnije su odgovorni sinergistički efekti između hidrofilnih antioksidativnih jedinjenja, kao i između hidrofilnih antioksidativnih jedinjenja i drugih konstituenata etanolnih ekstrakata tropa paradajza.

4.6. Indeksi bioaktivnosti heksanskih i etanolnih ekstrakata tropa odabranih genotipova paradajza

Indeks bioaktivnosti (*eng. bioactivity index* - BI), koji se izračunava na osnovu IC_{50} vrednosti, predstavlja alternativni parametar za klasifikaciju ekstrakata na osnovu njihove ukupne aktivnosti. BI je značajniji pokazatelj bioaktivnosti ekstrakata od pojedinačnog antioksidativnog ili antiproliferativnog delovanja. Takođe, BI može biti značajan kriterijum i za potrošače pri odabiru voća i povrća sa pozitivnim zdravstvenim efektima, ili kao karakteristika za rangiranje podataka u epidemiološkim studijama (Sun i sar., 2002).

U tabeli 32 su dati rezultati ispitivanja antioksidativne i antiproliferativne aktivnosti, kao i BI heksanskih ekstrakata tropa paradajza odabranih genotipova.

Tabela 32. Rezultat ispitivanja antioksidativne, antiproliferativne aktivnosti i BI heksanskih ekstrakata tropa paradajza odabranih genotipova

Genotip	Rezultat ispitivanja antioksidativne aktivnosti	Rezultat ispitivanja antiproliferativne aktivnosti	BI
Bačka	0,80	1,00	0,90
Knjaz	1,00	0,90	0,95
Novosadski niski	0,09	0,38	0,24
O ₂	-	0,36	-
Rutgers	0,12	0,55	0,34
Saint Pierre	0,30	0,67	0,49

Od ispitanih heksanskih ekstrakata, heksanski ekstrakt tropa paradajza genotipa Knjaz (BI = 0,95) pokazao je najveću bioaktivnost, a zatim slede heksanski ekstrakti tropa paradajza genotipova Bačka (BI = 0,90) > Saint Pierre (BI = 0,49) > Rutgers (BI = 0,34) > Novosadski niski (BI = 0,24). S obzirom da heksanski ekstrakt tropa paradajza genotipa O₂ nije pokazao antioksidativnu aktivnost na DPPH radikale, za ovaj ekstrakt nije moguće izračunati BI.

Rezultati ispitivanja antioksidativne i antiproliferativne aktivnosti, kao i BI etanolnih ekstrakata tropa paradajza odabranih genotipova dati su u tabeli 33.

Tabela 33. Rezultat ispitivanja antioksidativne, antiproliferativne aktivnosti i BI etanolnih ekstrakata tropa paradajza odabranih genotipova

Genotip	Rezultat ispitivanja antioksidativne aktivnosti	Rezultat ispitivanja antiproliferativne aktivnosti	BI
Bačka	0,39	0,82	0,61
Knjaz	0,32	0,86	0,59
Novosadski niski	0,56	0,86	0,71
O ₂	0,45	0,77	0,61
Rutgers	0,69	0,76	0,72
Saint Pierre	0,47	1,00	0,74

Etanolni ekstrakti tropa odabranih genotipova paradajza pokazali su približne vrednosti indeksa bioaktivnosti, u opsegu od 0,59 do 0,74. Etanolni ekstrakt tropa paradajza genotipa Saint Pierre (BI = 0,74) pokazao je najveću bioaktivnost od svih ispitanih etanolnih ekstrakata, a zatim slede ekstrakti tropa paradajza genotipova: Rutgers (BI = 0,72) > Novosadski niski (BI = 0,71), Bačka (BI = 0,61) = O₂ (BI = 0,61) > Knjaz (BI = 0,59).

Iako je ovaj model određivanja biološke aktivnosti relativno jednostavan, da bi se preciznije i realnije odredio BI potrebno je izvršiti detaljnija i sveobuhvatnija epidemiološka ispitivanja.

5. ZAKLJUČAK

U radu je ispitan hemijski sastav, antioksidativna i antiproliferativna aktivnost ekstrakata tropa tradicionalnih (Rutgers i Saint Pierre) i novostvorenih (Bačka, Knjaz, Novosadski niski i O₂) genotipova paradajza. Trop paradajza, sporedni proizvod nakon ceđenja soka, osušen je pod vakuumom, ekstrahovan heksanom, a zatim 80% etanolom.

Ispitivanja hemijskog sastava ekstrakata tropa paradajza obuhvatila su spektrofotometrijska određivanja sadržaja karotenoida u heksanskim ekstraktima i polifenolnih jedinjenja, flavonoida i askorbinske kiseline u etanolnim ekstraktima. Identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih karotenoida (likopena i β -karotena) u heksanskim ekstraktima i polifenolnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima izvedena je HPLC analizom. Takođe je u ostatku nakon ekstrakcije heksanom i 80% etanolom određen sadržaj ukupnih, rastvorljivih i nerastvorljivih prehrambenih vlakana enzimsko-gravimetrijskom metodom.

Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da je sadržaj likopena i β -karotena određen spektrofotometrijski, najveći u heksanskom ekstraktu tropa paradajza genotipa Knjaz (22,64 mg/g). HPLC analizom najveći sadržaj likopena određen je u heksanskom ekstraktu tropa paradajza Knjaz (15,69 mg/g), dok je sadržaj β -karotena bio najveći u heksanskom ekstraktu tropa paradajza Bačka (11,95 mg/g).

Najveći sadržaj polifenolnih jedinjenja, određen spektrofotometrijski kao ekvivalent hlorogenske kiseline, imao je etanolni ekstrakt tropa genotipa O₂ (18,6 mg/g). Sadržaj flavonoida, izražen kao ekvivalent rutina, bio je najveći u etanolnom ekstraktu tropa genotipa Saint Pierre (12,1 mg/g). Na osnovu spektrofotometrijskih određivanja, može se zaključiti da su flavonoidi najznačajnija grupa polifenolnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima tropa paradajza; odnos flavonoidi/polifenoli iznosi od 0,52 (trop genotipa Knjaz) do 0,85 (trop genotipa Rutgers). Najveći sadržaj askorbinske kiseline određen je u etanolnom ekstraktu tropa paradajza genotipa Novosadski niski (1,89 mg/g).

U etanolnim ekstraktima tropa paradajza HPLC analizom identifikovane su fenolne kiseline (kafena, hlorogenska, *p*-kumarinska, ferulna i ruzmarinska kiselina) i flavonoli (kvercetin i rutin), kao i derivati ruzmarinske kiseline, rutina i naringenina. Ekstrakt tropa paradajza Novosadski niski imao je najveći sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja (5206 μ g/g). Od polifenolnih jedinjenja u najvećoj koncentraciji u etanolnom ekstraktu tropa paradajza Novosadski niski prisutni su flavonoli (kvercetin, rutin i njegov derivat; 1537 μ g/g) i flavanoni (naringenin-derivat; 2366 μ g/g). Najveći sadržaj fenolnih kiselina (kafene, hlorogenske, *p*-kumarinske, ferulne i ruzmarinske kiselina, kao i derivata ruzmarinske kiseline pronađen je u etanolnom ekstraktu tropa O₂ paradajza (703 μ g/g).

Najveći sadržaj ukupnih prehrambenih i nerastvorljivih vlakana određen je u ostatku nakon ekstrakcija tropa genotipa O₂ (81,23% odnosno 77,53%), a rastvorljivih u ostatku Rutgers (13,89%) paradajza. Sadržaj nerastvorljivih vlakana, značajno je veći od sadržaja rastvorljivih vlakana u svim ispitanim ostacima tropa paradajza i iznosio je od 52,50% za genotip Knjaz do 77,53% za genotip O₂, dok je sadržaj nerastvorljivih prehrambenih vlakana izražen po suvom tropu iznosio od 23,67% za genotip Rutgers do 41,56% za genotip O₂.

Antioksidativna aktivnost heksanskih ekstrakata tropa paradajza ispitana je spektrofotometrijski, DPPH testom, a određena je i njihova redukciona sposobnost. Redukciona sposobnost, sposobnost heliranja i DPPH antiradikalska aktivnost etanolnih ekstrakata tropa paradajza ispitana je spektrofotometrijski, a antiradikalska aktivnost na hidroksil i superoksid anjon radikale određena je ESR spektrometrijom. Takođe, ispitana je i DPPH antiradikalska aktivnost ostataka nakon ekstrakcija tropa paradajza.

Na osnovu rezultata ispitivanja redukcionne sposobnosti heksanskih ekstrakata utvrđeno je da je najveću redukcionu sposobnost pokazao ekstrakt tropa paradajza genotipa Bačka ($IC_{50} = 2,12$ mg/ml). Ispitivanjem DPPH antiradikalske aktivnosti heksanskih ekstrakata tropa paradajza može se zaključiti da su ekstrakti paradajza Knjaz i Bačka pokazali najveću DPPH antiradikalsku aktivnost ($IC_{50} = 0,057$ mg/ml; $IC_{50} = 0,071$ mg/ml). Na osnovu kinetičkih ispitivanja heksanski ekstrakti tropa paradajza mogu se svrstati u spore antioksidante.

Najveća IC_{50} vrednost, određena na osnovu ispitivanja redukcionne sposobnosti etanolnih ekstrakata tropa odabranih genotipova paradajza, dobijena je za ekstrakt paradajza Saint Pierre ($IC_{50} = 1,57$ mg/ml), dok je najveću helirajuću sposobnost pokazao ekstrakt tropa paradajza Rutgers ($IC_{50} = 1,49$ mg/ml). Najizraženiju antiradikalsku aktivnost na DPPH radikale ($IC_{50} = 0,18$ mg/ml) pokazao ekstrakt paradajza O₂. Na osnovu kinetičkih ispitivanja etanolni ekstrakti mogu se klasifikovati kao veoma spori antioksidanti.

ESR spektroskopijom i "spin trapping" tehnikom utvrđeno je da etanolni ekstrakti tropa paradajza utiču na stvaranje i/ili transformaciju hidroksil radikala u Fentonovom reakcionom sistemu, kao i na superoksid anjon radikale generisane smešom kalijum superoksida i kraunetra. S obzirom da je najniža IC_{50} vrednost utvrđena za ekstrakt tropa paradajza genotipa Novosadski niski ($IC_{50} = 0,03$ mg/ml), može se zaključiti da ovaj trop poseduje najznačajniju antiradiaklsku aktivnost na hidroksil radikale. Od svih ispitanih etanolnih ekstrakata tropa paradajza, najniža IC_{50} vrednost, odnosno najznačajnija antiradikalska aktivnost na superoksid anjon radikale utvrđena je za ekstrakt tropa paradajza genotipa Rutgers ($IC_{50} = 0,45$ mg/ml).

Na osnovu rezultata ispitivanja DPPH antiradikalne aktivnosti ostataka nakon ekstrakcija, može se zaključiti da je ostatak paradajza Saint Pierre ($IC_{50} = 0,85$ mg/ml) pokazao najizraženiju antiradikalnu aktivnost na DPPH radikale.

Antiproliferativna aktivnost heksanskih i etanolnih ekstrakata tropa paradajza ispitana je *in vitro*, njihovim delovanjem na rast tri histološki različite humane ćelijske linije: MCF7 (humani adenokarcinom dojke), HeLa (humani epitelni karcinom cerviksa) i MRC-5 (humani karcinom pluća) primenom SRB testa.

Ekstrakti tropa uticali su na rast tumorskih ćelija u zavisnosti od vrste ekstrakta, primenjene koncentracije i vrste ćelijske linije. Od heksanskih ekstrakata tropa paradajza, ekstrakt genotipa Knjaz pokazao je najizraženiji antiproliferativni efekat na MRC-5 ćelijskoj liniji ($IC_{50} = 425,1$ μ g/ml). Najizraženiju antiproliferativnu aktivnost na HeLa ($IC_{50} = 513,12$ μ g/ml) i MCF7 ($IC_{50} = 601,94$ μ g/ml) ćelijskim linijama pokazao je heksanski ekstrakt tropa paradajza genotipa Bačka. Od ispitanih etanolnih ekstrakata tropa paradajza, ekstrakt genotipa Saint Pierre pokazao je najizraženiji antiproliferativni efekat na HeLa ćelijskoj liniji ($IC_{50} = 13,7$ mg/ml), kao i na MCF7 ćelijskoj liniji ($IC_{50} = 20,3$ mg/ml). Najizraženiji antiproliferativni efekat na MRC-5 ćelijskoj liniji ($IC_{50} = 11,9$ mg/ml) pokazao je etanolni ekstrakt tropa paradajza genotipa Knjaz.

Rezultati korelacione analize između IC_{50}^{DPPH} vrednosti heksanskih ekstrakata i sadržaja likopena i β -karotena određenih HPLC metodom ($r = -0,89$, $r = -0,86$), kao i sadržaja likopena i β -karotena određenih spektrofotometrijski ($r = -0,77$, $r = -0,75$) ukazuju da se antiradikalna aktivnost na DPPH radikale heksanskih ekstrakata tropa paradajza može pripisati likopenu, kao i β -karotenu. Koeficijenti korelacije između IC_{50}^{MCF7} , IC_{50}^{HeLa} i IC_{50}^{MRC-5} vrednosti heksanskih ekstrakata i sadržaja likopena (određenog HPLC metodom) u heksanskim ekstraktima tropa paradajza ($r = -0,94$, $r = -0,83$ i $r = -0,93$), kao i između IC_{50}^{MCF7} , IC_{50}^{HeLa} i IC_{50}^{MRC-5} vrednosti heksanskih ekstrakata i sadržaja β -karotena (određenog HPLC metodom) u heksanskim ekstraktima tropa paradajza ($r = -0,99$, $r = -0,80$ i $r = -0,86$), ukazuju da se i antiproliferativna aktivnost heksanskih ekstrakata na MCF7, HeLa i MRC-5 ćelijske linije može pripisati likopenu i β -karotenu. Na isti zaključak ukazuju i rezultati korelacione analize između IC_{50}^{MCF7} , IC_{50}^{HeLa} i IC_{50}^{MRC-5} vrednosti heksanskih ekstrakata i sadržaja likopena, određenog spektrofotometrijski ($r = -0,78$, $r = -0,53$ i $r = -0,69$), kao i rezultati korelacione analize između IC_{50}^{HeLa} i sadržaja β -karotena, određenog spektrofotometrijski ($r = -0,58$).

Značajna korelacija utvrđena je između sadržaja rutina, rutin derivata i naringenin derivata i IC_{50}^{OH} vrednosti etanolnih ekstrakata ($r = -0,68$, $r = -0,72$, odnosno $r = -0,77$) i između sadržaja ruzmarinaske kiseline i $IC_{50}^{O_2^{\cdot-}}$ vrednosti etanolnih ekstrakata ($r = -0,90$). Ispitana je korelacija i između IC_{50}^{DPPH} , IC_{50}^{RP} i IC_{50}^{HA} vrednosti etanolnih ekstrakata i sadržaja pojedinih polifenolnih

jedinjenja, odnosno klasa polifenolnih jedinjenja prisutnih u etanolnim ekstraktima tropa paradajza. Najbolja korelacija uočena je između IC_{50}^{DPPH} vrednosti etanolnih ekstrakata i sadržaja derivata I i II ruzmarinske kiseline, kao i kvercetina ($r = -0,83$, $r = -0,57$, odnosno $r = -0,58$); između IC_{50}^{RP} vrednosti etanolnih ekstrakata i sadržaja flavonoida određenog spektrofotometrijski ($r = -0,94$) i između IC_{50}^{HA} vrednosti etanolnih ekstrakata i sadržaja ruzmarinske kiseline ($r = -0,59$). IC_{50}^{MCF7} , IC_{50}^{HeLa} i IC_{50}^{MRC-5} vrednosti etanolnih ekstrakata pokazale su dobru korelaciju sa sadržajem hlorogenske kiseline ($r = -0,63$, $r = -0,82$ i $r = -0,55$). Rezultati korelacione analize ukazuju da za antioksidativnu odnosno antiproliferativnu aktivnost etanolnih ekstrakata tropa odabranih genotipova paradajza, nije odgovorno određeno polifenolno jedinjenje, odnosno klasa polifenolnih jedinjenja odgovorna. Za bioaktivnost ovih ekstrakata najverovatnije su odgovorni sinergistički efekti između hidrofilnih antioksidativnih jedinjenja, kao i između hidrofilnih antioksidativnih jedinjenja i drugih konstituenata etanolnih ekstrakata tropa paradajza.

Na osnovu indeksa bioaktivnosti (BI) može se zaključiti da je heksanski ekstrakt tropa paradajza Knjaz (BI = 0,95) pokazao je najveću bioaktivnost, a zatim slede ekstrakti tropa Bačka (BI = 0,90) > Saint Pierre (BI = 0,49) > Rutgers (BI = 0,34) > Novosadski niski (BI = 0,24). Etanolni ekstrakt tropa paradajza Saint Pierre (BI = 0,74) pokazao je najveću bioaktivnost, a zatim slede ekstrakti tropa Rutgers (BI = 0,72) > Novosadski niski (BI = 0,71), Bačka (BI = 0,61) = O₂ (BI = 0,61) > Knjaz (BI = 0,59).

Rezultati ispitivanja hemijskog sastava, antioksidativne i antiproliferativne aktivnosti ekstrakata, kao i ostataka nakon ekstrakcija tropa odabranih genotipova paradajza ukazuju na mogućnost iskorišćenja ovog sporednog proizvoda kao potencijalnog izvora prirodnih antioksidanata, koji bi našli primenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

6. LITERATURA

- AACC Method 32-07 "Determination of Soluble, Insoluble, and Total Dietary Fiber in Foods and Food Products" (Approved 1991), U: Approved Methods of the AACC (10th), AACC (American Association of Cereal Chemists), St Paul, MN, 2000.
- Abushita, A.A., Daood, H.G., Biacs, P.A., Change in carotenoids and antioxidant vitamins in tomato as a function of varietal and technological factors, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 2075-2081, 2000.
- Agullo, G., Gamet-Payraastre, L., Fernandez, Y., Anciaux, N., Demigne, C., Remesy, C., Comparative effects of flavonoids on the growth, viability and metabolism of a colonic adenocarcinoma cell line (HT29 cells), *Cancer Lett.*, **105**, 61-70, 1996.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., Cell Proliferation, Garland Publishing, Taylor & Francis Group, 1998.
- Altan, A., McCarthy, K.L., Maskan, M., Evaluation of snack foods from barley-tomato pomace blends by extrusion processing, *J. Food Eng.*, **84**, 231-242, 2008.
- Al-Wandawi, H., Abdul-Rahman, M., Al-Shaikhly, K., Tomato processing wastes as essential raw material sources, *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 804-807, 1985.
- Alzamora, S.M., Salvatori, D., Tapia, S.M., López-Malo, A., Welti-Chanes, J., Fito, P., Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds, *J. Food Eng.*, **67**, 205-214, 2005.
- Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J.A., Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies, *Food Chem.*, **84**, 551-562, 2004.
- Amir, H., Karas, M., Giat, J., Danilenko, M., Levy, R., Yermiahu, T., Levy, J., Sharoni, Y., Lycopene and 1,25-dihydroxyvitamin D3 cooperate in the inhibition of cell cycle progression and induction of differentiation in HL-60 leukemic cells, *Nutr Cancer.*, **33**, 105-112, 1999.
- Ancos de, B., Sgroppo, S., Plaza, L., Cano, M.P., Possible nutritional and healthrelated value promotion in orange juice preserved by high-pressure treatment, *J. Sci. Food Agr.*, **82**, 790-796, 2002.
- Andjelković, M., Camp, J.V., Meulenaer, B.D., Depaemelaere, G., Socaciu, C., Verloo, M., Verhe, R., Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups, *Food Chem.*, **98**, 23-31, 2006.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Ryan, D., Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits, *Analyst*, **125**, 989-1009, 2000.

- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K., Methods for testing antioxidant activity, *Analyst*, **127**, 183-198, 2002.
- AOAC Official Method 2001.11 "Protein (Crude) in Animal Feed, Forage (Plant Tissue), Grain and Oilseeds", 991.43 "Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fiber in Foods" (First Action 1991), U: Official Methods of Analysis of AOAC (18), AOAC (Association of Official Analytical Chemists), Washington, DC, 2007.
- Arabshahi-Delouee, S., Urooj, A., Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves, *Food Chem.*, **102**, 1233-1240, 2007.
- Arnao, M.B., Cano, A., Acosta, M., The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity, *Food Chem.*, **73**, 239-244, 2001.
- Aruoma, O.I., Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods, *Mut. Res.*, **523-524**, 9-20, 2003.
- Asp, N.G., Johansson, C.G., Dietary fibre analysis, *Nutrition Abstract Review*, **54**, 735-752, 1984.
- Aust, O., Ale-Agha, N., Zhang, L., Wollersen, H., Sies, H., Stahl, W., Lycopene oxidation product enhances gap junctional Communication, *Food chem. Toxicol.*, **41**, 1399-1407, 2003.
- Azmi, A.S., Bhat, S.H., Hanif, S., Hadi, S.M., Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for anticancer properties, *FEBS Lett.*, **580**, 533-538, 2006.
- Bannister, J.V., Bannister, W.H., Hill, H.A.O., Mahood, J.F., Willson, R.L., Wolfenden, B.S., Does ceruloplasmin dismutate Superoxide? No, *FEBS Lett.*, **118**, 127-129, 1980.
- Barber, S.C., Mead, R.J., Shaw, P.J., Review, Oxidative stress in ALS: A mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target, *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, **1762**, 1051-1067, 2006.
- Beckman, J.S., Koppenol, W.H., Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly, *Am. J. Physiol.*, **271**, C1424-C1437, 1996.
- Benakmoum, A., Abbeddou, S., Ammouche, A., Kefalas, P., Gerasopoulos, D., Valorisation of low quality edible oil with tomato peel waste, *Food Chem.*, **110**, 684-690, 2008.
- Bhat, V.B., Madyastha, K.M. C-Phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **275**, 20-25, 2000.
- Bocco, A., Cuvelier, M.-E., Richard, H., Berset, C., Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 2123-2129, 1998.
- Bogdanović, G., Citoprotektivni efekti flavonskih jedinjenja na ćelijske linije, Magistarski rad, Medicinski fakultet, Beograd, 2000.

- Bohm, F., Edge, R., Foley, S., Lange, L., Truscott, G., Antioxidant inhibition of porphyrin induced cellular phototoxicity, *J. Photochemistry and Photobiology B. Biology.*, **65**, 177-183, 2001.
- Böhm, F., Edge, R., McGarvey, D.J., Truscott, T.G., Beta-carotene with vitamins E and C offers synergistic cell protection against NOx, *FEBS Lett.*, **436**, 387-389, 1998.
- Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J., Micro-algal biotechnology, Cambridge University Press, UK, 1988.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M., Flavonoids as Antioxidants: Determination of Radical-Scavenging Efficiencies, *Meth. Enzymol.*, **186**, 343-355, 1990.
- 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., Structure and properties of carotenoids in relation to function, *FASEB J.*, **9**, 1551-1558, 1995.
- Brown, L., Rosner, B., Willett, W.W., Sacks, F.M., Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis, *Am. J. Clin. Nutr.*, **69**, 30-42, 1999.
- Bukhari, S.B., Bhangar, M.I., Memon, S., Antioxidative Activity of Extracts from Fenugreek Seeds (*Trigonella foenum-graecum*), *Pak. J. Anal. Environ. Chem.*, **9**, 78-83, 2008.
- Burton, G.W., Ingold, K.U., Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant, *Science*, **224**, 569-573, 1984.
- Byrne, M., Low-fat with taste, *Food Enginery International*, **22**, 36-41, 1997.
- Calvo, M.M., García, M.L., Selgas, M.D., Dry fermented sausages enriched with lycopene from tomato peel, *Meat Sci.*, **80**, 167-172, 2008.
- Cano, A., Acosta, M., Arnao, M.B., Hydrophilic and lipophilic antioxidant activity changes during on-vine ripening of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.), *Postharvest Biology and Technology*, **28**, 59-65, 2003.
- Capanoglu, E., Beekwilder, J., Boyacioglu, D., Hall, R., de Vos, R., Changes in antioxidant and metabolite profiles during production of tomato paste, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 964-973, 2008.
- Carmeliet, P., Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis, *Nat. Med.*, **6**, 389-395, 2000.
- Carmichael, A.J., Samuni, A., Riesz, P., Photogeneration of superoxide and decarboxylated peptide radicals by carboquone, mitomycin C and streptonigrin, an electron spin resonance and spin trapping study, *Photochem. Photobiol.*, **41**, 635-642, 1985.
- Carr, A.C., Frei, B., Does vitamin C act as pro-oxidant under physiological conditions?, *FASEB J.*, **13**, 1007-1024, 1999.

- Catalá, A., Review, Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions, *Chem. Phys. Lipids*, **157**, 1-11, 2009.
- Chandra, H.M., Ramalingam, S., Antioxidant Potentials of Skin, Pulp, and Seed Fractions of Commercially Important Tomato Cultivars, *Food Sci. Biotechnol.*, **20**, 15-21, 2011.
- Chang, C.-H., Lin, H.-Y., Chang, C.-Y., Liu, Y.-C., Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes, *J. Food Eng.*, **77**, 478-485, 2006.
- Chang, C.-H., Liu, Y.-C., Evaluation of antioxidative performance of tomato extracts obtained by different methods, *J. Sci. Food Agric.*, **88**, 612-618, 2008.
- Chang, S., Tan, C., Frankel, E.N., Barrett, D.M., Lowdensity lipoprotein antioxidant activity of phenolic compounds and polyphenol oxidase activity in selected clingstone peach cultivars, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 147-151, 2000.
- Charleux, J.L., Beta-carotene vitamin C and vitamin E: the protective micronutrients, *Nut. Rev.*, **4**, 109-114, 1996.
- Chau, Ch.F., Huang, Y.L., Comparison of the chemical composition and physicochemical properties of different fibers prepared from peel of *Citrus sinensis* L. Cv. Liucheng, *J. Agric. Food. Chem.*, **51**, 2615-2618, 2003.
- Chaumontet, C., Suschetet, M., Honikman-Leban, E., Krutovskikh, V.A., Berges, R., Le Bon, A.M., Heberden, C., Shahin, M.M., Yamasaki, H., Martel, P., Lack of tumor-promoting effects of flavonoids: studies on rat liver preneoplastic foci and on *in vivo* and *in vitro* gap junctional intercellular communication, *Nutr. Cancer*, **26**, 251-263, 1996.
- Chevance, F.F., Farmer, L.J., Desmond, E.M., Novelli, E., Troy, D.J., Chizzolini, R., Effect of some fat replacers on the release of volatile aroma compounds from low-fat meat products, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 3476-3484, 2000.
- Chi-Fai, Ch., Ya-Ling, H., Mao-Hsiang, L., *In vitro* hypoglycaemic effects of different insoluble fiber-rich fractions prepared from the peel of *Citrus sinensis* L. Cv. Liucheng, *J. Agric. Food. Chem.*, **51**, 6623-6626, 2003.
- Cho, S.S., Prosky, L., Application of complex carbohydrates to food product fat mimetics, U: Complex carbohydrates in foods, Cho, S.S., Prosky, L., Dreher, M., Eds., Marcel Dekker, New York, 1999.
- Choi, Y., Jeong, H.-S., Lee, J., Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea, *Food Chem.*, **103**, 130-138, 2007.

- Choudhari S.M., Ananthanarayan, L., Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues, *Food Chem.*, **102**, 77-81, 2007.
- Chung, Y.C., Chang, C.T., Chao, W.W., Lin, C.F., Chou, S.T., Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2454-2458, 2002.
- Clifford, M.N., Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism, *J Sci. Food Agr.*, **80**, 1033-1043, 2000.
- Cruikshank, G.S., Rampling, R., Peri-tumoural hypoxia in human brain: peroperative measurement of the tissue oxygen tension around malignant brain tumours, *Acta Neurochir. Suppl.*, **60**, 378-380, 1994.
- Cummings, J.H., Englyst, H.N., What is dietary fibre?, *Trends Food Sci. Tech.*, **2**, 99-103, 1991.
- Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C., Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: Structure-activity relationships, *Biosci. Biotechnol. and Biochem.*, **56**, 324-325, 1992.
- Cvejanov, S., Tošić, B., Gavrilović, M., Pejin, D., Grujić, O., Ružić, N., Prehrambena tehnologija, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 2002.
- Čanadanović-Brunet, J.M. Kiseonikovi slobodni radikali prirodnih i model sistema, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 1997.
- Četojević-Simin, D.D, Velićanski, S.A, Cvetković, D.D, Markov, L.S, Mrđanović, Z.J, Bogdanović, V.V, Šolajić, V.S., Bioactivity of Lemon Balm Kombucha, *Food Bioprocess Technol.*, **5**, 1756-1765, 2012.
- Ćetković, G., Čanadanović-Brunet, J., Djilas, S., Savatović, S., Mandić, A., Tumbas, V., Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace, *Food Chem.*, **109**, 340-347, 2008.
- D'Silva V.B.S., Kumari S.N., Naveen, P., Shetty, V., Shetty, L., A Comparative Study of oxidative stress in Diabetic and Non-diabetic osteomyelitis, *Res. J. Pharmaceut. Biol. Chem. Sci.*, **2**, 342-347, 2011.
- Dai, J., Mumper, R.J., Review, Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, *Molecules*, **15**, 7313-7352, 2010.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A., Biomarkers of oxidative damage in human disease, *Clin.Chem.*, **52**, 601-623, 2006.
- Decker, E.A., Welch, B., Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food, *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 674-677, 1990.

- Del Valle, M., Utilidad del subproducto obtenido en la elaboración de derivados de tomate, Doctoral thesis, Universidad Complutense de Madrid, Spain, 2004.
- Del Valle, M., Cámara, M., Torija, M.-E., Chemical characterization of tomato pomace, *J. Sci. Food Agric.*, **86**, 1232-1236, 2006.
- Desmond, E.M., Troy, D.J., Buckley, D.J., The effects of tapioca starch, oat fibre and whey protein on the physical and sensory properties on low-fat beef burgers, *LWT*, **31**, 653-657, 1998.
- Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Bloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., Lele, R.D., Review Article, Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects, *J. Assoc. Physicians India.*, **52**, 794-804, 2004.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K.K., Liu, R.H., Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3010-3014, 2002.
- Dhalla, N.S., Temsah, R.M., Netticadan, T., Role of oxidative stress in cardiovascular diseases, *J. Hypertens.*, **18**, 655-673, 2000.
- Di Mascio, P., Kaiser, S., Sies, H., Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher, *Arch. Biochem. Biophys.*, **274**, 532-538, 1989.
- Di Vaio, C., Graziani, G., Marra, L., Cascone, A., Ritieni, A., Antioxidant capacities, carotenoids and polyphenols evaluation of fresh and refrigerated peach and nectarine cultivars from Italy, *Eur. Food Res. Tech.*, **227**, 1225-1231, 2008.
- Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E.B., Roberfroid, M.B., Scientific concepts of functional foods in Europe: Concensus document, *Br. J. Nutr.*, **81**, S1-27, 1999.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L., Stress-induced phenylpropanoid metabolism, *Plant Cell*, **7**, 1085-1097, 1995.
- Dreher, D., Junod, A.F., Role of oxygen free radicals in cancer development, *Eur. J. Cancer*, **32A**, 30-38, 1996.
- Duthie, G.G., Gardner, P.T., Kyle, J.A.M., Plant polyphenols: are they the new magic bullet?, *Proc. Nutr. Soc.*, **62**, 599-603, 2003.
- Dutta, D., Chaudhuri, U.R., Chakraborty, R., Review, Structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids, *Afr. J. Biotechnol.*, **4**, 1510-1520, 2005.
- Đilas, S.M., Čanadanović-Brunet, J.M. Ćetković, G.S., Tumbas, V.T., Antioxidant activity of some herbs and spices – A review of ESR studies, *Magnetic Resonance in Food Science*, pp. 110-120, 2003.
- Đorđević, V., Pavlović, D., Kocić, G., Biohemija slobodnih radikala, Medicinski fakultet, Niš, 2000.
- Đurovka, M., Gajenje povrća na otvorenom polju, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2008.

- Edge, R., Land, E.J., McGarvey, D., Mulroy, L., Truscott, T.G., Relative one-electron reduction potentials of carotenoid radical cations and the interactions of carotenoids with the vitamin E radical cation, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 4087-4090, 1998.
- Edge, R., Truscott, T.G., U: The Photochemistry of Carotenoids, Frank, H.A., Young, A.J., Britton, G., Cogdell, R.J., Eds., Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, pp. 223-234, 1999.
- Elbling, L., Weiss, R.M., Teufelhofer, O., Uhl, M., Knasmueller, S., Schulte-Hermann, R., Berger, W., Micksche, M., Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities, *FASEB J.*, **19**, 807-809, 2005.
- Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., Attia, H., Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review, *Food Chem.*, **124**, 411-421, 2011.
- Erlejman, A.G., Jagers, G., Fraga, C.G., Oteiza, P.I., TNFalpha-induced NF-kappaB activation and cell oxidant production are modulated by hexameric procyanidins in Caco-2 cells, *Arch. Biochem. Biophys.*, **476**, 186-195, 2008.
- Espin, J.C., Soler-Rivas, C, Wichers, H.J., Characterisation of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, *J.Agric. Food Chem.*, **48**, 648-656, 2000.
- Esposito, F., Arlotti, G., Bonifati, A.M., Napolitano, A., Vitale, D., Fogliano, V., Antioxidant activity and dietary fibre in durum wheat bran by-products, *Food Res. Int.*, **38**, 1167-1173, 2005.
- FitzGerald, R.J., Meisel, H., Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme, *Br. J. Nutr.*, **84**, S33-S37, 2000.
- Fornelli, F., Leone, A., Verdesca, I., Minervini, F., Zacheo, G., The influence of lycopene on the proliferation of human breast cell line (MCF-7), *Toxicol. Vitro*, **21**, 217-223, 2007.
- Foti, M.C., Daquino, C., Geraci, C., Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions, *J. Org. Chem.*, **69**, 2309-2314, 2004.
- Foti, M.C., Johnson, E.R., Vinqvist, M.R., Wright, J.S., Barclay, L.R., Ingold, K.U., Naphtalene diols: a new class of antioxidants intramolecular hydrogen bonding in catechols, naphthalene diols, and their aryloxy radicals, *J. Org. Chem.*, **67**, 5190-5196, 2002.
- Fraga, C.G., Galleano, M., Verstraeten, S.V. Oteiza, P. I., Review, Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols, *Mol. Aspect. Med.*, **31**, 435-445, 2010.
- Francis, F.J., Carotenoid as food colorant, *Cereal Food World.*, **45**, 198-203, 2000.
- Fresco, P., Borges, F., Diniz, C., Marques, M.P., New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols, *Med. Res. Rev.*, **26**, 747-766, 2006.

- Frusciante, L., Carli, P., Ercolano, M.R., Pernice, R., Di Matteo, A., Fogliano, V., Pellegrini, N., Antioxidant nutritional quality of tomato, *Mol. Nutr. Food Res.*, **51**, 609-617, 2007.
- Gahler, S., Otto, K., Böhm, V., Alterations of vitamin C, total phenolics, and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 7962-7968, 2003.
- Galati, G., Teng, S., Moridani, M.Y., Chan, T.S., O'Brien, P.J., Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics, *Drug Metabol. Drug Interact.*, **17**, 311-349, 2000.
- Galis, Z.S., Khatri, J.J., Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis - The good, the bad, and the ugly, *Circ. Res.*, **90**, 251-262, 2002.
- García Herrera, P., Sánchez-Mata, M.C., Cámara, M., Nutritional characterization of tomato fiber as a useful ingredient for food industry, *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.*, **11**, 707-711, 2010.
- George, B., Kaur, C., Khurdiya, D.S., Kapoor, H.C., Antioxidants in tomato (*Lycopersium esculentum*) as a function of genotype, *Food Chem.*, **84**, 45-51, 2004.
- Giovanelli, G., Lavelli, V., Peri, C., Nobili, S., Variation in antioxidant components of tomato during vine and post-harvest ripening, *J. Sci. Food Agr.*, **79**, 1583-1588, 1999.
- Glogovac, S., Takač, A., Korišćenje starih sorti i lokalnih populacija paradajza kao izvora genetičke varijabilnosti u oplemenjivanju, *Ratar. Povrt.*, **47**, 493-498, 2010.
- Gonze, M., Van der Schueren, F., Sugar-free chocolate, *Candy Industry*, **162**, 42-45, 1997.
- Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Lojek, A., Číž, M., Soliva-Fortuny, R., Park, Y.-S., Caspi, A., Libman, I., Trakhtenberg, S., Comparative content of some phytochemicals in Spanish apples, peaches and pears, *J. Sci. Food Agr.*, **82**, 1166-1170, 2002.
- Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Park, Y.-S., Haruenkit, R., Lojek, A., Číž, M., Caspi, A., Libman, I., Trakhtenberg, S., Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits, *Food Chem.*, **74**, 309-315, 2001.
- Grassmann, J., Schnitzler, W.H., Habegger, R., Evaluation of different coloured carrot cultivars on antioxidative capacity based on their carotenoid and phenolic contents, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **58**, 603-611, 2007.
- Greeson, J.M., Sanford, B., Monti, D.A., St. John's Wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature, *Psychopharmacology*, **153**, 402-414, 2001.

- 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, *J. Org. Chem.*, **70**, 3472-3483, 2005.
- Grigelmo-Miguel, N., Martín-Belloso, O., Influence of fruit dietary fibre addition on physical and sensorial properties of strawberry jams, *J. Food Eng.*, **41**, 13-21, 1999a.
- Grigelmo-Miguel, N., Martín-Belloso, O., Comparison of dietary fiber from byproducts of processing fruits and greens and from cereals, *LWT*, **32**, 503-508, 1999b.
- Grigelmo-Miguel, N., Martín-Belloso, O., The quality of peach jams stabilized with dietary fiber, *Eur. Food Res. Tech.*, **211**, 336-341, 2000.
- Grizard, D., Barthomeuf, C., Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: mode of production and beneficial effects on animal and human health, *Reprod. Nutr. Dev.*, **39**, 563-588, 1999.
- Gruszecki, W.I., U: The Photochemistry of Carotenoids, Frank, H.A., Young, A.J., Britton, G., Cogdell, R.J., Eds., Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, 1999.
- Guil-Guerrero, J.L., Reboloso-Fuentes, M.M., Nutrient composition and antioxidant activity of eight tomato (*Lycopersicon esculentum*) varieties, *J. Food Compos. Anal.*, **22**, 123-129, 2009.
- Guo, Q., Zhao, B., Li, M., Shen, S., Xin, W., Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1304**, 210-222, 1996.
- Gutteridge, J.M., Smith, A., Antioxidant protection by haemopexin of haem-stimulated lipid peroxidation, *Biochem. J.*, **256**, 861-865, 1988.
- Gutteridge, J.M., The antioxidant activity of haptoglobin towards haemoglobin stimulated lipid peroxidation, *Biochim. Biophys. Acta.*, **917**, 219-223, 1987.
- Gvozdenović, Đ., Vasić, M., Gvozdanović-Varga, J., Takač, A., *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo*, **35**, 331-340, 2001.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Free Radicals in Biology and Medicine, 4th Edition, Clarendon Press, Oxford, UK, 2007.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd Edition, Oxford Univ. Press, Oxford, UK, 1999.
- Halliwell, B., Antioxidants in Human Health and Disease, *Anna. Rev. Nutr.*, **16**, 33-50, 1996.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochem. J.*, **219**, 1-4, 1984.
- Halliwell, B., How to characterize a biological antioxidant, *Free Radical Res. Commun.*, **9**, 1-32, 1990.

- Halliwell, B., How to characterize an antioxidant: an update, *Biochem. Soc. Symp.*, **61**, 73-101, 1995.
- 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.
- Hamilton, I.M., Gilmore, W.S., Benzie, I.F., Mulholland, C.W., Strain, J.J., Interactions between vitamins C and E in human subjects, *Br. J. Nutr.*, **84**, 261-267, 2000.
- Heber, D., Lu, Q.Y., Overview of mechanisms of action of lycopene, *Exp. Biol. Med.*, **227**, 920-923, 2002.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *J. Nutr. Biochem.*, **13**, 572-584, 2002.
- Hendrich, A.B., Malon, R., Pola, A., Shirataki, Y., Motohashi, N., Michalak, K., Differential interaction of Sophora isoflavonoids with lipid bilayers, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **16**, 201-208, 2002.
- Henning, S.M., Zhang, J.Z., McKee, R.W., Swendseid, M.E., Jacob, R.A., Glutathione blood levels and other oxidant defense indices in men fed diets low in vitamin C, *J. Nutr.*, **121**, 1969-1975, 1991.
- Heredia, A., Jiménez, A., Fernández-Bolaños, J., Guillén, R., Rodríguez, R., Fibra Alimentaria, Madrid, Spain, Biblioteca de Ciencias, 2002.
- Heredia, A., Ruiz-Gutierrez, V., Felizón, B., Guillén, R., Jiménez, A., Fernández-Bolaños, J., Apparent digestibility of dietary fibre and other components in table olives, *Die Nahrung*, **37**, 226-233, 1993.
- Hermes-Lima, M. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals, U: Functional Metabolism: Regulation and Adaptation, Storey, K.B., Ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2005.
- Herrero, M., Cifuentes, A., Ibañez, E., A review, Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae, *Food Chem.*, **98**, 136-148, 2006.
- 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**, 558-563, 1996.
- Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M., Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450, *Chem. Biol. Interact.*, **139**, 1-21, 2002.

- Hosseinian, F., Antioxidant properties of flaxseed lignans using in vitro model systems, A Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada, 2006.
- Hsieh, Y-H.P., Ofori, J.A., Review Article, Innovations in food technology for health, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, **16**, 65-73, 2007.
- http://store.tomatofest.com/Saint_Pierre_Tomato_Seeds_p/tf-0440.htm
- <http://store.tomatofest.com/SearchResults.asp?Search=rutgers>
- <http://www.ipv.pt/millennium/Millennium37/3.pdf>
- http://www.unido.org/fileadmin/import/32068_35FoodWastes
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 1841-1856, 2005.
- Hwang, E.-S., Bowen, P.E., Effects of tomato paste extracts on cell proliferation, cell-cycle arrest and apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells, *BioFactors*, **23**, 75-84, 2005.
- Ilahy, R., Hdidier, C., Lenucci, M. S., Tlili, I., Dalessandro, G., Phytochemical composition and antioxidant activity of high-lycopene tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivars grown in Southern Italy, *Scientia Horticulturae*, **127**, 255-261, 2011.
- Imanishi, H., Sasaki, Y.F., Ohta, T., Watanabe, M., Kato, T., Shirasu, Y., Tea tannin components modify the induction of sister-chromatid exchanges and chromosome aberrations in mutagentreated cultured mammalian cells and mice, *Mutat. Res.*, **259**, 79-87, 1991.
- Ingold, K.U., Bowry, V.W., Stocker, R., Walling, C., Autoxidation of lipids and antioxidation by alpha-tocopherol and ubiquinol in homogeneous solution and in aqueous dispersions of lipids: unrecognized consequences of lipid particle size as exemplified by oxidation of human low density lipoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**, 45-49, 1993.
- Ishida, B.K., Chapman, M.H., A comparison of carotenoid content and total antioxidant activity in catsup from several commercial sources in the United States, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 8017-8020, 2004.
- Ishida, B.K., Chapman, M.H., Carotenoid Extraction from Plants Using a Novel, Environmentally Friendly Solvent, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 1051-1059, 2009.
- Jacob, R.A., The integrated antioxidant system, *Nutr. Res.*, **15**, 755-766, 1995.
- Jenner, P., Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, **53**, S26-S36, 2003.
- Jiménez-Escrig, A., Jiménez-Jiménez, I., Sánchez-Moreno, C., Saura-Calixto, F., Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 1686-1690, 2000.

- Johnson, J.D., Hypothesis Paper, Do carotenoids serve as transmembrane radical channels?, *Free Radic. Biol. Med.*, **47**, 321-323, 2009.
- Jomova, K., Valko, M., Review, Advances in metal-induced oxidative stress and human disease, *Toxicology*, **283**, 65-87, 2011.
- Jovanović, S.V., Steenken, S., Simić, M.G., Hara, Y., Antioxidant properties of flavonoids: Reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoids radicals, U: Rice-Evans, C., Packer, L., Eds., *Flavonoids in health and disease*, New York, Marcel Dekker, pp. 137-161, 1998.
- Jovičević, D., Gvozdrenović, Đ., Vasić, M., Bugarski, D., Gvozdrenović-Varga, J., Takač, A., Červenski, J., Dolapčev, S., Stručni članak, Karakteristike priznatih sorti povrća Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u našoj zemlji i u inostranstvu, *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo*, **46**, 155-165, 2009.
- Jun, X. Application of high hydrostatic pressure processing of food to extracting lycopene from tomato paste waste, *High Pressure Res.*, **26**, 33-41, 2006.
- Juntachote, T., Berghofer, E., Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of Holy basil and Galangal, *Food Chem.*, **92**, 193-202, 2005.
- JUS ISO 1871:1992, Poljoprivredno-prehrambeni proizvodi - opšta uputstva za određivanje azota metodom po Kjeldalu.
- Kadian, S.S., Garg, M., Pharmacological effects of carotenoids: A review, *Int. J. Pharmaceut. Sci. Res.*, **3**, 42-48, 2012.
- Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M., Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3954-3962, 1999.
- Kampa, M., Nifli, A.P., Notas, G., Castanas, E., Polyphenols and cancer cell growth, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **159**, 79-113, 2007.
- Karas, M., Amir, H., Fishman, D., Danilenko, M., Segal, S., Nahum, A., Koifmann, A., Giat, Y., Levy, J., Sharoni, Y., Lycopene interferes with cell cycle progression and insulin-like growth factor I signaling in mammary cancer cells, *Nutr. Cancer*, **36**, 101-111, 2000.
- Kehrer, J.P., The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity, *Toxicology*, **149**, 43-50, 2000.
- Keisari, Y., Braun, L., Flescher, E., The oxidative burst and related phenomena in mouse macrophages elicited by different sterile inflammatory stimuli, *Immunobiology*, **165**, 78-89, 1983.
- Khachik, F., Carvalho, L., Bernstein, P.S., Muir, G.J., Zhao, D-Y., Katz, N.B., Chemistry, Distribution, and Metabolism of Tomato Carotenoids and Their Impact on Human Health, *Exp Biol. Med.*, **227**, 845-851, 2002.

- Kim, H., Choi, H.-K., Moon, J.Y., Kim, Y.S., Mosaddik, A., Cho, S.K., Comparative antioxidant and antiproliferative activities of red and white pitayas and their correlation with flavonoid and polyphenol content, *J. Food Sci.*, **76**, C38-C45, 2011.
- Kim, H., Moon, J.Y., Kim, H., Lee, D.-S., Cho, M., Choi, H.-K., Kim, Y.S., Mosaddik, A., Cho, S.K., Antioxidant and antiproliferative activities of mango (*Mangifera indica* L.) flesh and peel, *Food Chem.*, **121**, 429-436, 2010.
- Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M., The role of oxidative stress in carcinogenesis, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **44**, 239-267, 2004.
- Klaunig, J.E., Wang, Z., Pu, X., Zhou, S., Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **254**, 86-99, 2011.
- Klaunig, J.E., Xu, Y., Isenberg, J.S., Bachowski, S., Kolaja, K.L., Jiang, J., Stevenson, D.E., Walborg Jr.E.F., The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis, *Environ. Health Perspect.*, **106**, 289-295, 1998.
- Klein, B.P., Perry, A.K., Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States, *J. Food Sci.*, **47**, 941-945, 1982.
- Knoblich, M., Anderson, B., Latshaw, D., Analyses of tomato peel and seed byproducts and their use as a source of carotenoids, *J. Sci. Food Agric.*, **85**, 1166-1170, 2005.
- Kong, K.-W., Khoo, H.-E., Prasad, K.N., Ismail, A., Tan, C.-P., Rajab, N.F., Review, Revealing the Power of the Natural Red Pigment Lycopene, *Molecules*, **15**, 959-987, 2010.
- Kruger, C.L., Mann, S.W., Safety evaluation of functional ingredients, *Food Chem. Toxicol.*, **41**, 793-805, 2003.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B., Gustafsson, J.A., Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta, *Endocrinology*, **139**, 4252-4263, 1998.
- Kumar, N.M., Gilula, N.B., The Gap Junction Communication Channel, *Cell*, **84**, 381-388, 1996.
- Lajšić, S., Grujić-Injac, B., Hemija prirodnih proizvoda, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, 1998.
- Lakari, E., Expression of oxidant and antioxidant enzymes in human lung and interstitial lung diseases, Academic Dissertation, Faculty of Medicine, University of Oulu, 2002.
- Larrauri, J.A., Goñi, I., Martín-Carrón, N., Rupérez, P., Saura-Calixto, F., Measurement of health-promoting properties in fruit dietary fibres: Antioxidant capacity, fermentability and glucose retardation index, *J. Sci. Food Agr.*, **71**, 515-519, 1996.

- Larrauri, J.A., New approaches in the preparation of high dietary fibre powders from fruit by-products, *Trends Food Sci. Tech.*, **10**, 3-8, 1999.
- Larrauri, J.A., Rupérez, P., Saura-Calixto, F., Pineapple shell as a source of dietary fiber with associated polyphenols, *J. Agric. Food. Chem.*, **45**, 4028-4031, 1997.
- Lavecchia, R., Zuorro, A., Improved lycopene extraction from tomato peels using cell-wall degrading enzymes, *Eur. Food Res. Technol.*, **228**, 153-158, 2008.
- Lavelli, V., Hidalgo, A., Pompei, C., Brandolini, A., Radical scavenging activity of einkorn (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) whole meal flour and its relationship to soluble phenolic and lipophilic antioxidant content, *J. Cereal Sci.*, **49**, 319-321, 2009.
- Lavelli, V., Peri, C., Rizzolo, A., Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using xanthine oxidase, myeloperoxidase, and copper-induced lipid peroxidation, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1442-1448, 2000.
- Lazić, B., Đurovka, M., Marković, V., Ilin, Ž., Povrtarstvo, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 1998.
- Lazos, E.S., Tsaknis, J., Lalas, S., Characteristics and composition of tomato seed oil, *Grasas y Aceites*, **49**, 440-445, 1998.
- Lee, J., Koo, N., Min, D.B., Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **3**, 21-33, 2004.
- Lenucci, M.S., Cadinu, D., Taurino, M., Piro, G., Dalessandro, G., Antioxidant Composition in Cherry and High-Pigment Tomato Cultivars, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 2606-2613, 2006.
- Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M., Review, The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants, *Food Chem.*, **125**, 288-306, 2011.
- 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.
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., Cheng, S., Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract, *Food Chem.*, **96**, 254-260, 2006.
- Liao, K., Yin, M., Individual and combined antioxidant effects of seven phenolic agents in human erythrocyte membrane ghosts and phosphatidylcholine liposome systems: importance of the partition coefficient, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 2266-2270, 2000.
- Liu, R.H., Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action, *J. Nutr.*, **134**, 3479-3485, 2004.

- Liu, X., Zhao, M., Wang, J., Yang, B., Jiang, Y., Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China, *J. Food Compos. Anal.*, **21**, 219-228, 2008.
- Loft, S., Poulsen, H.E., Cancer risk and oxidative DNA damage in man, *J. Mol. Med.*, **74**, 297-312, 1996.
- Lotito, S.B., Frei, B., Dietary flavonoids attenuate tumor necrosis factor alpha-induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. Structure–function relationships and activity after first pass metabolism, *J. Biol. Chem.*, **281**, 37102-37110, 2006.
- Lowe, G.M., Booth, L.A., Bilton, R.F., Young, A.J., Lycopene and beta-carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentrations but rapidly lose this capacity at higher doses, *Free Radical. Res.*, **30**, 141-151, 1999.
- Lykkesfeldt, J., Svendsen, O., Review, Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals, *Vet. J.*, **173**, 502-511, 2007.
- Mackenzie, G.G., Adamo, A.M., Decker, N.P., Oteiza, P.I., Dimeric procyanidin B2 inhibits constitutively active NF-kappaB in Hodgkin's lymphoma cells independently of the presence of IkappaB mutations, *Biochem. Pharmacol.*, **75**, 1461-1471, 2008.
- Mackenzie, G.G., Carrasquedo, F., Delfino, J.M., Keen, C.L., Fraga, C.G., Oteiza, P.I., Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF-kappaB activation at multiple steps in Jurkat T cells, *FASEB J.*, **18**, 167-169, 2004.
- Mackenzie, G.G., Oteiza, P.I., Modulation of transcription factor NF-kappaB in Hodgkin's lymphoma cell lines: effect of (-)-epicatechin, *Free Radic. Res.*, **40**, 1086-1094, 2006.
- Mandić, A.I., Đilas, S.M., Četković, G.S., Čanadanović-Brunet, J.M., Tumbas, V.T., Polyphenolic Composition and Antioxidant Activities of Grape Seed Extract, *Int. J. Food Prop.*, **11**, 713-726, 2008.
- Mansour, E.H., Khaliul, A.H., Characteristics of low-fat beef burgers as influenced by various types of wheat fibres, *J. Sci. Food Agr.*, **79**, 493-498, 1999.
- Mark-Herbert, C., Innovation of a new product category - Functional foods, *Technovation*, **24**, 713-719, 2004.
- Marklund, S.L., Holme, E., Hellner, L., Superoxide dismutase in extracellular fluids, *Clin. Chim. Acta*, **125**, 41-51, 1982.
- Marklund, S.L., Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species, *Biochem. J.*, **222**, 649-655, 1984.
- Martin, K., Replacing fat, retaining taste, *Food Enginry International*, **24**, 57-59, 1999.

- Martín-Cabrejas, M.A., Esteban, R.M., López-Andreu, F.J., Waldron, K., Selvendran, R.R., Dietary fiber content of pear and kiwi pomaces, *J. Agric. Food. Chem.*, **43**, 662-666, 1995.
- Matotan, Z., Plodovito povrće, Neron, Bjelovar, 2008.
- May, J.M., Qu, Z.C., Whitesell, R.R., Cobb, C.E., Ascorbate recycling in human erythrocytes: role of GSH in reducing dehydroascorbate, *Free Radic. Biol. Med.*, **20**, 543-551, 1996.
- Meisel, H., Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications, *Livest. Prod. Sci.*, **50**, 125-138, 1997.
- Messina, M., A brief historical overview of the past two decades of soy and isoflavone research, *J. Nutr.*, **140**, 1350S-1354S, 2010.
- Meyer, P.D., Nondigestible oligosaccharides as dietary fiber, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **87**, 718-726, 2004.
- Middleton Jr., E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacol. Rev.*, **52**, 673-751, 2000.
- Milić, B.Lj., Đilas, S.M., Čanadanović-Brunet, J.M., Sakač, M.B., Biljni polifenoli, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2000.
- Milner, J.A., Functional foods: the US perspective, *Am. J. Clin. Nutr.*, **71**, 1654S-1659S, 2000.
- Mimica-Dukić, N., Božin, B., Soković, M., Simin, N., M., Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) Essential Oil, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 2485-2489, 2004.
- Mimić-Oka, J., Simić, D.V., Simić, T.P., Free radicals in cardiovascular diseases, *Facta Univ., Series: Medicine and Biology*, **6**, 11-22, 1999.
- Mišan, A.Č., Mimica-Dukić, N.M., Mandić, A.I., Sakač, M.B., Milovanović, I.Lj., Sedej, I.J., Development of a rapid resolution HPLC method for the separation and determination of 17 phenolic compounds in crude plant extracts, *Cent. Eur. J. Chem.*, **9**, 133-142, 2011.
- Mojzis, J., Varinska, L., Mojzisova, G., Kostova, I., Mirossay, L., Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones, *Pharmacol. Res.*, **57**, 259-265, 2008.
- Mongeau, R., Scott, F.W., Brassard, R., Definition and analysis of dietary fiber, U: Cho, S.S., Prosky, L., Dreher, M., Eds., Complex carbohydrates in foods, Marcel Dekker, New York, pp. 305-325, 1999.
- Morel, I., Lescoat, G., Cillard, P., Cillard, J., Role of flavonoids and iron chelation in antioxidant action, *Meth. Enzymol.*, **234**, 437-443, 1994.
- Mortensen, A., Skibsted, L.H., Real time detection of reactions between radicals of lycopene and tocopherol homologues, *Free Radic. Res.*, **27**, 229-234, 1997a.

- Mortensen, A., Skibsted, L.H., Importance of carotenoid structure in radical-scavenging reactions, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 2970-2977, 1997b.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Domínguez, J.M., Sineiro, J., Dominguez, H., Núñez, M.J., Parajó, J.C., Natural antioxidants from residual sources, *Food Chem.*, **72**, 145-171, 2001.
- Müller, L., Fröhlich, K., Böhm, V., Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay, *Food Chem.*, **129**, 139-148, 2011.
- Nagata, M., Yamashita, I., Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit, *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, **39**, 925-928, 1992.
- Naidu, K.A., Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview, *Nutr. J.*, **2**, 7-16, 2003.
- Naviglio, D., Caruso, T., Iannece, P., Aragòn, A., Santini, A., Characterization of high purity lycopene from tomato wastes using a new pressurized extraction approach, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 6227-6231, 2008a.
- Naviglio, D., Pizzolongo, F., Ferrara, L., Naviglio, B., Aragòn, A., Santini, A., Extraction of pure lycopene from industrial tomato waste in water using the extractor Naviglio, *Afr. J. Food Sci.*, **2**, 37-44, 2008b.
- Nelson, A.L., High-fiber ingredients, Eagan press handbook series, Eagan Press, St Paul, MN, 2001.
- Nielsen, M., Ruch, R.J., Vang, O., Resveratrol reverses tumor-promoter-induced inhibition of gap-junctional intercellular communication, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **275**, 804-809, 2000.
- Nigam, S., Schewe, T., Phospholipase A2s and lipid peroxidation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1488**, 167-181, 2000.
- Niva, M., 'All foods affect health': Understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns, *Appetite*, **48**, 384-393, 2007.
- Nordberg, J., Arnér, E.S.J., Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system, *Free Radic. Biol. Med.*, **31**, 1287-1312, 2001.
- Offord, E.A., Gautier, J.-C., Avanti, O., Scaletta, C., Runge, F., Kramer, K., Applegate, L.A., Photoprotective potential of lycopene, β -carotene, vitamin E, vitamin C, and carnosic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts, *Free Radic. Biol. Med.*, **32**, 1293-1303, 2002.
- Okamoto, T., Sanda, T., Asamitsu, K., NF-kappa B signaling and carcinogenesis, *Curr. Pharm. Des.*, **13**, 447-462, 2007.

- Olson, J.A., Carotenoids, U: Olson, S., Ross, S., Eds., Modern Nutrition in Health and Disease, 9th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1999.
- Olsson, M.E., Gustavsson, K.E., Andersson, S., Nilsson, A., Duan, R.D. Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 7264-7271, 2004.
- Oreopoulou, V., Tzia, C., Utilization of Plant By-Products for the Recovery of Proteins, Dietary Fibers, Antioxidants, and Colorants, U: Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry, Oreopoulou, V., Russ, W., Eds., Springer, US, 2007.
- Oyaizu, M., Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine, *Jpn. J. Nutr.*, **44**, 307-315, 1986.
- Özcelik, B., Lee, J.H., Min., D.B., Effects of light, oxygen and pH on the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants, *J. Food Sci.*, **68**, 487-490, 2003.
- Packer, L., Weber, S.U., Rimbach, G., Molecular Aspects of α -Tocotrienol Antioxidant Action and Cell Signalling, Symposium: Molecular Mechanisms of Protective Effects of Vitamin E in Atherosclerosis, American Society for Nutritional Sciences, 2001.
- Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K., Levine, M., Review, Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention, *J. Am. Coll. Nutr.*, **22**, 18-35, 2003.
- Padovani, R.M., Amaya-Farfán, J., Procurement of β -carotene, lycopene, lutein and zeaxanthin in households of Brazil's urban areas, *Segurança Alimentar e Nutricional*, **13**, 49-63, 2006.
- Palozza, P., Krinsky, N.I., Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model, *Arch. Biochem. Biophys.*, **297**, 184-187, 1992.
- Park, Y.C., Rimbach, G., Saliou, C., Valacchi, G., Packer, L., Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production, TNF-alpha secretion, and NF-kappaB-dependent gene expression in RAW 264.7 macrophages, *FEBS Lett.*, **465**, 93-97, 2000.
- Pavlović, D., Đorđević, V., Kocić, G., Ćelijska signalna transdukcija - modulacija slobodnim radikalima, *Jugoslav. Med. Biochem.*, **21**, 69-84, 2002a.
- Pavlović, D., Kocić, G., Đorđević, V., Ćelijska signalizacija u kontroli ćelijskog ciklusa, apoptoze i maligne transformacije, *Acta Fac. Med. Naiss.*, **19**, 12-18, 2002b.
- Pedrielli, P., Skibsted, L.H., Antioxidant synergy and regeneration effect of quercetin, (-)-epicatechin, and (+)-catechin on α -tocopherol in homogeneous solutions of peroxidating methyl linoleate, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 7138-7144, 2002.

- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F., Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different *In Vitro* Assays, *J. Nutr.*, **133**, 2812-2819, 2003.
- Percival, M., Antioxidants, Clinical nutrition insights, Advanced Nutrition Publications, Inc., 1998.
- Perez, C.A., Wei, Y., Guo, M., Iron-binding and anti-Fenton properties of baicalein and baicalin, *J. Inorg. Biochem.*, **103**, 326-332, 2009.
- Peschel, W., Sánchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzía, I., Jiménez, D., Lamuela-Raventós, R., Buxaderas, S., Codina, C., An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes, *Food Chem.*, **97**, 137-150, 2006.
- Pietinen, P., Dietary fiber and coronary heart disease: Epidemiology. In COST action bioactive micronutrients in mediterranean diet and health, European Commission, 2001.
- Pietta, P.G., Flavonoids as Antioxidants, *J. Nat. Prod.*, **63**, 1035-1042, 2000.
- Piñero-Estrada, J.E., Bermejo Bascós, P., Villar del Fresno, A.M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract, *Il Farmaco*, **56**, 497-500, 2001.
- Podsedek, A., Sosnowska, D., Anders B., Antioxidative capacity of tomato products, *Eur. Food Res. Technol.*, **217**, 296-300, 2003.
- Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F., Chiarpotto, E., Oxidative stress and cell signaling, *Curr. Med. Chem.*, **11**, 1163-1182, 2004.
- Powers, S.K., Keith, C., Deruisseau, K.C., Quindry, J., Karyn, L., Hamilton dietary antioxidants and exercise, *J. Sports Sci.*, **22**, 81-94, 2004.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4290-4302, 2005.
- Pulido, R.L., Bravo, L., Calixto, S., Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing antioxidant power assay, *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 3396-3402, 2000.
- Raffo, A., Cherubino, L., Vincenzo, F., Ambrozino, P., Salucci, M., Gennaro, L., Bugianesi, R., Giuffrida, F., Quaglia, G., Nutritional value of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Cv. Naomi F1) harvested at different ripening stages, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 6550-6556, 2002.
- Ramos, S., Alia, M., Bravo, L., Goya, L., Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2), *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 1271-1280, 2005.
- Ramos, S., Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways, *Mol. Nutr. Food Res.*, **52**, 507-526, 2008.

- Ramos, S., Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention, *J. Nutr. Biochem.*, **18**, 427-442, 2007.
- Ranalli, A., Lucera, L., Contento, S., Antioxidizing potency of phenol compounds in olive mill wastewater, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 7636-7641, 2003.
- Rao, A.V., Agarwal, S., Bioavailability and *in vivo* antioxidant properties of lycopene from tomato products and their possible role in the prevention of cancer, *Nutr. Cancer*, **31**, 199-203, 1998.
- Rees, M.D., Kennett, E.C., Whitelock, J.M., Davies, M.J., Review Article, Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies, *Free Radic. Biol. Med.*, **44**, 1973-2001, 2008.
- Ren, J., Meng, S., Lekka, C.E., Kaxiras, E., Complexation of flavonoids with iron: structure and optical signatures, *J. Phys. Chem. B*, **112**, 1845-1850, 2008.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B., Review Article, Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?, *Free Radic. Biol. Med.*, **49**, 1603-1616, 2010.
- Ribaya-Mercado, J.D., Garmyn, M., Gilcrest, B.A., Russell, R.M., Skin lycopene is destroyed preferentially over β -carotene during ultraviolet irradiation on humans, *J. Nutr.*, **125**, 1854-1859, 1995.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic. Biol. Med.*, **20**, 933-956, 1996.
- Rietjens, I.M.C.M., Boersma, M.G., de Haan, L., Spenkelink, B., Awad, H.M., Cnubben, N.H.P., Van Zanden, J.J., Van der Woude, H., Alink, G.M., Koeman, J.H., The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **11**, 321-333, 2002.
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W., Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chem.*, **66**, 401-436, 1999.
- Roberfroid, M.B., Global view on functional foods: European perspectives, *Br. J. Nutr.*, **88**, S133-S138, 2002.
- Rodríguez, R., Jiménez, A., Fernández-Bolaños, J., Guillén, R., Heredia, A., Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients, *Trends Food Sci. Tech.*, **17**, 3-15, 2006.
- Rodríguez, R., Jiménez, A., Guillén, R., Heredia, A., Fernández-Bolaños, J., Postharvest changes in white asparagus during refrigerated storage, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3551-3557, 1999.
- Roginsky, V., Lissi, E.A., Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food, *Food Chem.*, **92**, 235-254, 2005.

- Rozzi, N.L., Singh, R.K., Vierling, R.A., Watkins, B.A., Supercritical fluid extraction of lycopene from tomato processing byproducts, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2638-2643, 2002.
- Rytter, E., Effect of Dietary Antioxidants on Oxidative Stress, Inflammation and Metabolic Factors: Studies in Subjects with Overweight and with Type 2 Diabetes, Doctoral thesis, Uppsala University, Faculty of Medicine, Sweden, 2011.
- Sahlin, E., Savage, G.P., Lister, C.E., Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing, *J. Food Compos. Anal.*, **17**, 635-647, 2004.
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., Kanazawa, K., Simultaneous Determination of all Polyphenols in Vegetables, Fruits and Teas, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 571-581, 2003.
- Salvi, M.J., Rajput, C., Pineapple, U: Handbook of food science and technology. Production, composition, storage and processing, Salunke, D.K., Kadam, S.S., Eds., Marcel Dekker, New York, 1995.
- Samadi, A., Soriano, E., Revuelta, J., Valderas, C., Chioua, M., Garrido, I., Bartolomé, B., Tomassolli, I., Ismaili, L., González-Lafuente, L., Villarroja, M., García, A.G., Oset-Gasque, M.J., Marco-Contelles, J., Synthesis, structure, theoretical and experimental in vitro antioxidant/pharmacological properties of α -aryl, *N*-alkyl nitrones, as potential agents for the treatment of cerebral ischemia, *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 951-960, 2011.
- Sanchez-Moreno, C., Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems, Review: Free Radical Scavenging Activity in Foods, *Food Sci. Tech. Int.*, **8**, 121-137, 2002.
- Saunders, C., The anti-proliferative effect of different tomato varieties on the human colon adenocarcinoma cells, *Bioscience Horizons*, **2**, 172-179, 2009.
- Saura-Calixto, F., Antioxidant dietary fiber product: A new concept and a potential food ingredient, *J. Agric. Food. Chem.*, **46**, 4303-4306, 1998.
- Sayre, L.M., Smith, M.A., Perry, G., Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr. Med. Chem.*, **8**, 721-738, 2001.
- Scheneeman, B.O., Soluble vs. insoluble fibre-different physiological responses, *Food Tech.*, **41**, 81-82, 1987.
- Schieber, A., Hilt, P., Streker, P., Endres, H.-U., Rentschler, C., Carle, R., A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace, *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.*, **4**, 99-107, 2003.
- Schieber, A., Stintzing, F.C., Carle, R., By-products of plant food processing as a source of functional compounds: Recent developments, *Trends Food Sci. Tech.*, **12**, 401-413, 2001.

- Schneeman, B.O., Building scientific consensus: the importance of dietary fiber, *Am. J. Clin. Nutr.*, **25**, 691-699, 1999.
- Schulz, J.B., Lindenau, J., Seyfried, J., Dichganz, J., Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 4904-4911, 2000.
- Seabra, L.M.A.J., Pedrosa, L.F.C., Astaxanthin: structural and functional aspects, *Rev. Nutr.*, **23**, 1041-1050, 2010.
- Selvendran, R.R., Robertson, J.A., Dietary fibre in foods: Amount and type, U: COST-92 Metabolic and physiological aspects of dietary fibre in food, Luxembourg: Commission of the European Communities, Amado, R., Barry, J.L., Eds., 1994.
- Sen S., Chakraborty R., Sridhar, C. Reddy Y.S.R., De B., Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect, *Int. J. Pharmaceut. Sci. Res.*, **3**, 91-100, 2010.
- Sen, S., Chakraborty, R., The Role of Antioxidants in Human Health, U: Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy, Andreescu, S., i sar., Eds., ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 1-37, 2011.
- Serpen, A., Capuano, E., Fogliano, V., Gökmen, V., A New Procedure To Measure the Antioxidant Activity of Insoluble Food Components, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 7676-7681, 2007.
- Seyoum, A., Asres, K., El-Fiky, F.K., Structure - radical scavenging activity relationships of flavonoids, *Phytochemistry*, **67**, 2058-2070, 2006.
- Sharma, S.K., Le Maguer, M., Lycopene in tomatoes and tomato pulp fractions, *Ital. J. Food Sci.*, **2**, 1996, 107-113.
- Shaulian, E., Karin, M., AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, **20**, 2390-2400, 2001.
- Shen, Y.-C. Chen, S.-L. Zhuang, S.-R., Wang C.-K., Contribution of tomato phenolics to suppression of COX-2 expression in KB cells, *J. Food Sci.*, **73**, 1-10, 2008.
- Shi, H., Noguchi, N., Niki, E., Introducing natural antioxidants, U: Antioxidants in food, Practical applications, Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., Eds., Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, pp. 147-158, 2001.
- Shrikhande, A.J., Wine by-products with health benefits, *Food Res. Int.*, **33**, 469-474, 2000.
- Siddhuraju, P., Mohan, P.S., Becker, K., Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): A preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp, *Food Chem.*, **79**, 61-67, 2002.
- Simkó, M., Gázsó, A., Fiedeler, U., Nentwich, M., Nanoparticles, free radicals and oxidative stress, Institut für Technikfolgen-Abschätzung (ITA), Wien, 2011.

- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M., Analysis of total phenols and others oxidation substrates and oxidant by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Meth. Enzymol.*, **299**, 152-178, 1999.
- Sirk, T.W., Brown, E.F., Friedman, M., Sum, A.K., Molecular binding of catechins to biomembranes: relationship to biological activity, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 6720-6728, 2009.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., Lugasi, A., A review, Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance, *Appetite*, **51**, 456-467, 2008.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R., New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 1107-1112, 1990.
- Slimestad, R., Verheul, M., Review of flavonoids and other phenolics from fruits of different tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars, *J. Sci. Food Agric.*, **89**, 1255-1270, 2009.
- Someya, S., Yoshiki, Y., Okubo, K., Antioxidant compounds from bananas (*Musa cavendish*), *Food Chem.*, **79**, 351-354, 2002.
- Stahl, W., Heinrich, U., Jungmann, H., Sies, H., Tronnier, H., Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet lightinduced erythema in humans, *Am. J. Clin. Nutr.*, **71**, 795-798, 2000.
- Stahl, W., Junghans, A., de Boer, B., Driomina, E.S., Briviba, K., Sies, H., Carotenoid mixtures protect multi-lamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effects of lycopene and lutein, *FEBS Lett.* **427**, 305-308, 1998.
- Stahl, W., Sies, H., Antioxidant activity of carotenoids, *Mol. Aspects Med.*, **24**, 345-351, 2003.
- Stahl, W., Sies, H., Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans, *J. Nutr.*, **122**, 2161-2166, 1992.
- Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., Lynch, P.B., Ross, R.P., Market potential for probiotics, *Am. J. Clin. Nutr.*, **73**, 476S-483S, 2001.
- Stevanović, J., Borozan, S., Jović, S., Ignjatović, I., Antioksidativna odbrana, *Vet. Glasnik*, **65**, 247-256, 2011.
- Stewart, A.J., Bozonnet, S., Mullen, W., Jenkins, G.I., Lean, M.E.J., Crozier, A., Occurrence of Flavonols in Tomatoes and Tomato-Based Products, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 2663-2669, 2000.
- Sudhakar, D.V., Maini, S.B., Isolation and characterization of mango peel pectins, *Journal of Food Processing and Preservation*, **24**, 209-227, 2000.

- Sun, J., Chu, Y.-F., Wu, X., Liu, R.H., Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 7449-7454, 2002.
- Takač, A., Gvozdrenović, Đ., Alparac i Bačka - nove sorte determinantnog paradajza, *Savremena poljoprivreda*, **50**, 85-88, 2001.
- Takeoka, G.R., Dao, L., Flessa, S., Gillespie, D.M., Jewell, W.T., Huebner, B., Bertow, D., Ebeler, S.E., Processing effects on lycopene content and antioxidant activity of tomatoes, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 3713-3717, 2001.
- Tanaka, T., Shnimizu, M., Moriwaki, H., Review, Cancer Chemoprevention by Carotenoids, *Molecules*, **17**, 2012, 3202-3242.
- Tavani, A., La Vecchia, C., Fruit and vegetable consumption and cancer risk in a Mediterranean population, *Am. J. Clin. Nutr.*, **61**, 1374-1377, 1995.
- Thebaudin, J.Y., Lefebvre, A.C., Harrington, M., Bourgeois, C.M., Dietary fibers: Nutritional and technological interest, *Trends Food Sci. Tech.*, **8**, 41-48, 1997.
- Tomás-Barberán, F.A., Clifford, M.N., Dietary hydroxybenzoic acid derivatives – nature, occurrence and dietary burden, *J. Sci. Food Agr.*, **80**, 1024-1032, 2000.
- Tonucci, L.H., Holden, J.M., Beecher, G.R., Khachik, F., Davis, C.S., Mulokozi, G., Carotenoid content of thermally processed tomato-based food products, *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 579-586, 1995.
- Toor, R.K., Savage, G.P., Antioxidant activity in different fractions of tomatoes, *Food Res. Int.*, **38**, 487-494, 2005.
- Toor, R.K., Savage, G.P., Effect of semi-drying on the antioxidant components of tomatoes, *Food Chem.*, **94**, 90-97, 2006.
- Torres, J.L., Bobet, R., New flavanol derivatives from grape (*Vitis vinifera*) byproducts: antioxidant aminoethylthio-flavan-3-ol conjugates from a polymeric waste fraction used as a source of Flavanols, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4627-4634, 2001.
- Toyokuni, S., Novel aspects of oxidative stress-associated carcinogenesis, *Antioxid. Redox Signal.*, **8**, 1373-1377, 2006.
- Trowell, H.C., Definitions of fibre, *Lancet*, **1**, 503, 1974.
- Truscott, T.G., The photophysics and photochemistry of the carotenoids, *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*, **6**, 359-371, 1990.
- Truscott, T.G., β -carotene and disease: a suggested pro-oxidant and anti-oxidant mechanism and speculations concerning its role in cigarette smoking, *J. Photochem. Photobiol. B.*, **35**, 233-235, 1996.

- Tudorica, C.M., Kuri, V., Brennan, C.S., Nutritional and physicochemical characteristics of dietary fiber enriched pasta, *J. Agric. Food. Chem.*, **50**, 347-356, 2002.
- Urquiaga, I., Leighton, F., Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress, *Biol. Res.*, **33**, 55-64, 2000.
- Vagi, E., Simandi, B., Vasarhelyine, K.P., Daood, H., Kery, A., Doleschall, F., Nagy, B., Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids, tocopherols and sitosterols from industrial tomato by-products, *J. Supercrit. Fluids*, **40**, 218-226, 2007.
- Valdez, L.B., Arnaiz, S.L., Bustamante, J., Alvarez, S., Costa, L.E., Boveris, A., Free radical chemistry in biological systems, *Biol. Res.*, **33**, 65-70, 2000.
- Valko M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J., Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Mol. Cell. Biochem.*, **266**, 37-56, 2004.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M.T.D., Mazura, M., Telser, J., Review, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39**, 44-84, 2007.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., Mini-review, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Interact.*, **160**, 1-40, 2006.
- Van Boekl, M.A.J.S., Jongen, W.M.F., Product quality and food processing: how to quantify the healthiness of a product, *Canc. Lett.*, **114**, 65-69, 1997.
- Van het Hof, K.H., De Boer, B.C.J., Tijburg, L.B.M., Lucius, B.R.H.M., Zijp, I., West, C.E., Hautvast, J.G.A.J., Weststrate, J.A., Carotenoid bioavailability in humans from tomatoes processed in different ways determined from the carotenoid response in the triglyceride-rich lipoprotein fraction of plasma after a single consumption and in plasma after four days of consumption, *J. Nutr.*, **130**, 1189-1196, 2000a.
- Van het Hof, K.H., West, C.E., Weststrate, J.A., Hautvast, J.G.A.J., Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids, *J. Nutr.*, **130**, 2000b, 503-506.
- Vaya, J., Aviram, M., Nutritional Antioxidants: Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications, *Curr. Med. Chem. - Imm., Endoc. & Metab. Agents*, **1**, 99-117, 2001.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele D.R., Berneman, Z.N., The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer, *Cell Prolif.*, **36**, 131-149, 2003.
- Verstraeten, S.V., Hammerstone, J.F., Keen, C.L., Fraga, C.G., Oteiza, P.I., Antioxidant and membrane effects of procyanidin dimers and trimers isolated from peanut and cocoa, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 5041-5048, 2005.

- Verstraeten, S.V., Keen, C.L., Schmitz, H.H., Fraga, C.G., Oteiza, P.I., Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure, *Free Radic. Biol. Med.*, **34**, 84-92, 2003.
- Villano, D., Fernández-Pachón, M.S., Moyá, M.L., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C., Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical, *Talanta*, **71**, 230-235, 2007.
- Webster, R.P., Gawde, M.D., Bhattacharya, R.K., Protective effect of rutin, a flavonol glycoside, on the carcinogen-induced DNA damage and repair enzymes in rats, *Cancer Lett.*, **109**, 185-191, 1996.
- Wijngaard, H.H., Rößle, C., Brunton, N., A survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants, *Food Chem.*, **116**, 202-207, 2009.
- Willcox, J.K., Ash, S.L., Catignani, G.L., Antioxidants and prevention of chronic disease, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **44**, 275-295, 2004.
- Wiseman, H., Halliwell, B., Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer, *Biochem. J.*, **313**, 17-29, 1996.
- Wolfe, K.L., Liu, R.H., Apple peels as a value-added food ingredient, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 1676-1683, 2003.
- Woods, J.A., Young, A.J., Bilton, R.F., Beta-carotene enhances hydrogen peroxide-induced DNA damage in human hepatocellular HepG2 cells, *FEBS Lett.*, **449**, 255-258, 1999.
- Wu, W.S., The signaling mechanism of ROS in tumor progression, *Canc. Metastasis Rev.*, **25**, 695-705, 2006.
- Xi, J. Effect of high pressure processing on the extraction of lycopene in tomato paste waste, *Chem. Eng. Technol.*, **29**, 736-739, 2006.
- Xu, R.-J., Bioactive peptides in milk and their biological and health implications, *Food Rev. Int.*, **14**, 1-16, 1998.
- Yamaguchi, F., Ariga, T., Yoshimira, Y., Nakazawa, H., Antioxidant and anti-glycation of carcinol from *Garcinia indica* fruit rind, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 180-185, 2000.
- Yang, J., Liu, R.H., Synergistic effect of Apple extracts and quercetin 3-β-D-Glucoside Combination of Antiproliferative activity in MCF-7 Human Breast Cancer Cells *in Vitro*, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 8581-8586, 2009.
- Yilmaz, E., The Chemistry of Fresh Tomato Flavor, *Turk. J. Agric. For.*, **25**, 149-155, 2001.
- Yoshioka, H., Haga, H., Kubota, M., Sakai, Y., Interaction of (+)-catechin with a lipid bilayer studied by the spin probe method, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 395-400, 2006.

- Young, A.J., Lowe, G.M., Minireview, Antioxidant and Prooxidant properties of carotenoids, *Arch. Biochem. Biophys.*, **385**, 20-27, 2001.
- Young, I.S., Woodside, J.V., Antioxidants in health and disease, *J. Clin. Pathol.*, **54**, 176-186, 2001.
- Zanfini, A., Corbini, G., La Rosa, C., Dreassi, E., Antioxidant activity of tomato lipophilic extracts and interactions between carotenoids and atocopherol in synthetic mixtures, *LWT*, **43**, 67-72, 2010.
- Zargar, M., Azizah, A.H., Roheeyati, A.M., Fatimah, A.B., Jahanshiri, F., Pak-Dek, M.S., Bioactive compounds and antioxidant activity of different extracts from *Vitex negundo* leaf, *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**, 2525-2532, 2011.
- Zha, X.-Q., Wang, J.-H., Yang, X.-F., Liang, H., Zhao, L.-L., Bao, S. H., J-P., Luo, Y.-Y., Xu, B-B., Zhou, Antioxidant properties of polysaccharide fraction with different molecular mass extracted with hot-water from rice bran, *Carbohydr Polymer.*, **78**, 570-575, 2009.
- Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, *Food Chem.*, **64**, 555-559, 1999.
- Zhou, K., Yin, J.J., Yu, L.L., ESR determination of the reactions between selected phenolic acids and free radicals or transition metals, *Food Chem.*, **95**, 446-457, 2006.