

**UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET**

Nada V. Babović, dipl. ing.

**ANTIOKSIDATIVNE OSOBINE FRAKCIJA DOBIJENIH IZ
ODABRANIH BILJAKA FAMILIJE LAMIACEAE POSTUPKOM
NATKRITIČNE EKSTRAKCIJE**

- Doktorska disertacija -

Beograd, 2010.

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Mentor:

dr **Slobodan Petrović**, redovan profesor
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Članovi komisije:

dr **Irena Žižović**, docent
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

dr **Dejan Skala**, redovan profesor
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

dr **Sonja Dilas**, redovan profesor
Tehnološki fakultet, Novi Sad

dr **Snežana Saičić**, naučni savetnik
Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd

Datum odbrane: _____

ANTIOKSIDATIVNE OSOBINE FRAKCIJA DOBIJENIH IZ ODABRANIH BILJAKA FAMILIJE LAMIACEAE POSTUPKOM NATKRITIČNE EKSTRAKCIJE

Izvod

Sintetski antioksidansi danas se sve više zamenjuju prirodnim antioksidansima, zbog njihove toksičnosti i sumnje da su izazivači kancera. Trend zamene sintetskih jedinjenja sa prirodnim aktivnim komponentama usmerava istraživanja u pravcu ispitivanja različitih biljnih materijala i identifikovanja novih jedinjenja sa antioksidativnim dejstvom koji se mogu iz njih izolovati. Zbog toga su veliki naponi uloženi u cilju pronalaženja jeftinih izvora prirodnih antioksidanasa, kao i za razvoj efikasnih i selektivnih tehnika ekstrakcije. Ekstrakcija sa konvencionalnim rastvaračima je ponekad okarakterisana niskom selektivnošću i potrebom za visokim temperaturama, što može dovesti do degradacije željenih jedinjenja. Natkritična ekstrakcija (NKE) je mnogo selektivnija od konvencionalnih načina ekstrakcije što se postiže podešavanjem uslova ekstrakcije (temperature i pritiska). Takođe, NKE predstavlja optimalno rešenje kada se zahtevaju proizvodi bez tragova rastvarača (npr. za prehrambene, kozmetičke i farmaceutske proizvode).

Cilj ovog rada bio je određivanje antioksidativne aktivnosti frakcija ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*), žalfije (*Salvia officinalis*), timijana (*Thymus vulgaris*) i izopa (*Hyssop officinalis*), kao i hemijska analiza izolovanih frakcija. Antioksidativne frakcije su izolovane primenom frakcione ekstrakcije sa natkritičnim ugljenik(IV)-oksidom na pritisku od 35 MPa i temperaturi od 100°C. Za određivanje antioksidativne aktivnosti izolovanih frakcija primenjivana je elektron spin rezonantna (ESR) spektroskopija. Definisane antioksidativne aktivnosti datih frakcija vršilo se merenjem njihove sposobnosti da "hvataju" 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikale (DPPH) i hidroksil radikale. Određivanje sposobnosti antioksidativnih frakcija da inhibiraju lipidnu peroksidaciju vršilo se merenjem peroksidnog broja u suncokretovom ulju prema standardnom postupku ISO 3960:1977. Antioksidativna aktivnost ekstrakata upoređivana je sa aktivnošću butilovanog hidroksianizola (BHA) i komercijalnog ruzmarinskog ekstrakta Flavor' Plus™. Hemijska analiza pomoću HPLC-DAD/ESI-ToF-MS bila je usmerena na kvantitativno određivanje karnosola i karnosolne kiseline, koji predstavljaju jedinjenja za koja se veruje da poseduju najveću antioksidativnu aktivnost u ispitivanim frakcijama. U tom cilju koristili su se čisti standardi ovih jedinjenja dok je identifikacija ostalih jedinjenja bila tentativna.

Na osnovu DPPH radikal metode redosled od najjače do najslabije antioksidativne aktivnosti bio je: BHA, ekstrakt timijana, Flavor' Plus™, ekstrakt ruzmarina, ekstrakt žalfije i ekstrakt izopa, dok je pri hidroksil radikal metodi redosled bio: Flavor' Plus™, ekstrakt žalfije, ekstrakt ruzmarina, ekstrakt izopa, BHA i ekstrakt timijana. Svi ispitivani ekstrakti pokazali su se kao inhibitori lipidne peroksidacije suncokretovog ulja. Najbolju antioksidativnu aktivnost među ispitivanim ekstraktima pokazao je ekstrakt ruzmarina. Na osnovu vrednosti peroksidnog broja antioksidativna aktivnost ispitivanih biljnih ekstrakata posle 12 h čuvanja na 98°C bila je sledeća: ekstrakt ruzmarina > BHA > ekstrakt žalfije > Flavor' Plus™ > ekstrakt timijana > ekstrakt izopa. Rezultati su pokazali da antioksidativne frakcije iz ruzmarina i žalfije imaju najveći sadržaj fenolnih diterpena i da predstavljaju važan izvor za proizvodnju i primenu u prehrambenoj industriji nutritivnih suplemenata, komponenata funkcionalne hrane ili antioksidanasa.

Ključne reči: Prirodni antioksidansi, Antioksidativna aktivnost, Ruzmarin, Žalfija, Timijan, Izop, Natkritična ekstrakcija ugljenik(IV)-oksidom.

SUPERCritical CARBON DIOXIDE EXTRACTION OF ANTIOXIDANT FRACTIONS FROM SELECTED LAMIACEAE HERBS AND THEIR ANTIOXIDANT ACTIVITY

Abstract

Synthetic antioxidants now being replaced by natural antioxidants because of their possible toxicity and due to a suspected action as promoters of carcinogens. Great effort is being devoted to the search for alternative and cheap sources of natural antioxidants, as well as to the development of efficient and selective extraction techniques. Extraction with conventional solvents is sometimes characterized by poor selectivity and requires high temperatures, which could result in degradation of the desired compounds. Supercritical fluid extraction (SFE) is more selective than conventional extraction and is optimal when products free from residual solvents are required (for example, for food, cosmetic, and pharmaceutical purposes).

The aim of the present work was to determine the antioxidant activity of fractions from rosemary (*Rosmarinus officinalis*), sage (*Salvia officinalis*), thyme (*Thymus vulgaris*) and hyssop (*Hyssop officinalis*), and chemical analysis of obtained fractions. In order to isolate antioxidant fractions method of fractional supercritical extraction with carbon dioxide at 35 MPa and 100°C was applied. Antioxidant activity of obtained extracts was determined by measuring their ability to scavenge 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical and hydroxyl radical using electron spin resonance (ESR) spectroscopy. The protective effect of added SFE extracts on the oxidative stability of sunflower oil was followed by determination of its peroxide value (PV) by the official method ISO 3960:1977 during storage at 98°C. The antioxidant activity of the extracts was compared to the activity of butylated hydroxyanisole (BHA) and commercial rosemary extract Flavor' Plus™. Chemical analysis of obtained antioxidant extracts was performed using HPLC-DAD/ESI-ToF-MS. Carnosol and carnosic acid, among the main antioxidant compounds present in examined extracts, were quantified with regard to pure standard. Identification of the other compounds was tentative.

It was shown that in DPPH radical assay the order from the strongest to the weakest antioxidant activity was: BHA, thyme extract, Flavor' Plus™, rosemary and sage extracts, and hyssop extract, while in hydroxyl radical assay order was: Flavor' Plus™, sage extract, rosemary extract, hyssop extract, BHA and thyme extract. All investigating extracts were effective on retarding lipid oxidation of sunflower oil. Among them, rosemary extract exhibited the best antioxidative activity. On the basis of peroxide value assay, antioxidant activity of the investigated plant extracts after 12 h of storage at 98°C followed the order: rosemary extract > BHA > sage extract > Flavor' Plus™ > thyme extract > hyssop extract. Results of the present study demonstrate the positive effects of adding antioxidant fractions from rosemary and sage on retarding lipid oxidation of sunflower oil. This investigation showed that antioxidant fraction from rosemary and sage had the highest amounts of phenolic diterpenes, indicating their potential use in food industry as nutritional supplements, functional food components or food antioxidants.

Keywords: Natural antioxidants, Antioxidant activity, Rosemary, Sage, Thyme, Hyssop, Supercritical carbon dioxide extraction.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Naučni ciljevi rada	2
2. TEORIJSKI DEO	3
2.1. Antioksidansi	4
2.1.1. Definicija antioksidanasa	4
2.1.2. Klasifikacija antioksidanasa	4
2.2. Antioksidansi i zdravlje	7
2.2.1. Slobodni radikali	7
2.2.2. Oksidativni stres	9
2.2.3. Mehanizam lipidne peroksidacije	11
2.3. Izvori prirodnih antioksidanasa	14
2.3.1. Fenolna jedinjenja	14
2.3.2. Tokoferoli i tokotrienoli	17
2.3.3. Karotenoidi	17
2.3.4. Ostali prirodni antioksidansi	19
2.4. Vrste antioksidanasa u prehrambenoj industriji	22
2.4.1. Antioksidansi kao aditivi	22
2.4.2. Sintetski antioksidansi	24
2.4.3. Prirodni antioksidansi	27
2.4.4. Komercijalni ruzmarinski ekstrakti	31
2.4.5. Prednosti i nedostaci prirodnih i sintetskih antioksidanasa	34
2.5. Zakonska regulativa antioksidanasa	36
2.5.1. Regulativa antioksidanasa u Evropskoj Uniji	36
2.5.2. Regulativa antioksidanasa u Americi	38
2.5.3. Regulativa antioksidanasa u Australiji	39
2.5.4. Regulativa antioksidanasa u Japanu	40
2.6. Metode određivanja antioksidativne aktivnosti	41
2.6.1. Pregled metoda	41
2.6.2. Metode procene oksidativnih promena u hrani	45
2.7. Dobijanje antioksidanasa pomoću NKE	51
2.7.1. Natkritična ekstrakcija	51
2.7.2. Uticaj operativnih parametara	54
2.7.3. Šeme procesa za dobijanje antioksidanasa	56
2.8. Ruzmarin	61
2.8.1. Hemijski sastav ekstrakta ruzmarina	61
2.8.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakta ruzmarina	63
2.9. Žalfija	65
2.9.1. Hemijski sastav ekstrakta žalfije	65
2.9.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakta žalfije	66
2.10. Timijan	67
2.10.1. Hemijski sastav ekstrakta timijana	67
2.10.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakta timijana	69
2.11. Izop	70
2.11.1. Hemijski sastav ekstrakta izopa	70
2.11.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakta izopa	70

3. MATERIJAL I METODE	71
3.1. Biljne sirovine i hemikalije	71
3.2. Metode	71
3.2.1. Opis postrojenja za NKE.....	71
3.2.2. Frakciona ekstrakcija.....	72
3.2.3. Tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom (LC-MS)	73
3.2.4. Kvantitativna analiza karnosola i karnosolne kiseline	74
3.2.5. Obrazovanje i detekcija DPPH radikala.....	74
3.2.6. Obrazovanje i detekcija \cdot OH radikala.....	75
3.2.7. Statistička obrada podataka.....	75
3.2.8. Određivanje peroksidnog broja	76
4. REZULTATI I DISKUSIJA	77
4.1. Prinos antioksidativnih frakcija	77
4.2. Hemijski sastav antioksidativnih frakcija	80
4.3. ESR spektralna analiza uticaja antioksidativnih frakcija na DPPH	88
4.4. ESR spektralna analiza uticaja antioksidativnih frakcija na \cdotOH	93
4.5. Peroksidni broj	97
5. ZAKLJUČAK	100
LITERATURA	102
PRILOZI	113
Prilog 1	113
Prilog 2	117
Prilog 3	121

1. UVOD

U prehrambenoj industriji koriste se sintetski i prirodni antioksidansi. Oni su prisutni u mnogim namirnicama i imaju ulogu aditiva jer štite hranu od oksidacije. Oksidacija je hemijski proces i nastaje većinom zbog izloženosti hrane vazduhu, ili pod uticajem toplote i svetlosti. Iako su sintetski antioksidansi jeftiniji, njihova upotreba je zabranjena u nekoliko zemalja zbog njihovih neželjenih dugoročnih toksikoloških efekata, uključujući mutagene, karcinogene i patogene efekte. Takođe, upotreba sintetskih antioksidanasa je ograničena zbog sve većih zahteva potrošača za hranom bez aditiva. Zbog toga je jedan od najvažnijih trendova u prehrambenoj industriji danas potražnja za prirodnim antioksidansima iz biljnog materijala. Većina prirodnih antioksidanasa su fenolna jedinjenja ili polifenoli. Antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja se zasniva na njihovoj strukturi, mogućnosti doniranja vodonikovog atoma slobodnom radikalumu i sposobnosti da heliraju metalne jone. Oni mogu pokazati bolju antioksidativnu aktivnost od endogenih i sintetskih antioksidanasa. Najviše korišćeni prirodni antioksidansi su tokoferoli, askorbinska kiselina, flavonoidi, lecitin, limunska kiselina i polifenoli. Oni se dodaju u veoma malim količinama (0,01 do 0,1 %) uljima, sterolima, emulgatorima, vitaminima koji su rastvorni u mastima, fosfolipidima, pojačivačima arome, čak i karotenima (boja) koji su podložni oksidaciji tokom čuvanja i transporta. Ako se dodaju u većim koncentracijama antioksidansi mogu delovati kao prooksidansi, zbog toga što su sami po sebi podložni oksidaciji. Stoga, u cilju da se obezbedi kvalitet, bezbednost, i produženje roka upotrebe prehrambenih proizvoda, neophodno je strogo poštovati standarde koji postoje u regulativama antioksidanasa u raznim zemljama, imajući u vidu sinergizam između različitih klasa prehrambenih proizvoda i antioksidanasa. Važno je napomenuti da antioksidansi ne mogu delovati na već započeti proces oksidacije u namirnicama tj. ne mogu sprečiti oksidaciju. Oni svojim delovanjem mogu jedino usporiti oksidaciju, čime produžavaju rok upotrebe prehrambenih proizvoda tako što obezbeđuju očuvanje ukusa, boje i nutritivne vrednosti prehrambenih proizvoda. Njihova uloga je posebno važna kako bi se izbegla oksidacija masti i ulja u prehrambrnim proizvodima.

Veliki broj aromatičnih, začinskih, lekovitih i ostalih biljaka sadrži hemijska jedinjenja koja imaju antioksidativne osobine. Brojne studije su vršene sa nekim od ovih biljaka, npr. ruzmarinom, žalfijom i origanom. U primeni su razni procesi za dobijanje biljnih ekstrakata koji sadrže antioksidativna jedinjenja. Najvažniji uslovi koje dobijeni biljni ekstrakti treba da zadovolje su antioksidativno dejstvo pri malim koncentracijama (0,01 do 0,1% u odnosu na supstrat) i da su procesom iz antioksidativnih ekstrakata uklonjene komponente koje mogu dodeliti ukus, miris i boju tretiranom prehrambenom proizvodu. Proces ekstrakcije kojima se mogu dobiti antioksidativni ekstrakti su: (1) ekstrakcija sa polarnim i nepolarnim rastvaračima, npr. etanolom, etil-acetatom, heksanom, acetonom, metil-hloridom (Chang i sar., 1977; Kimura i Kanamori, 1983; Todd, 1989); (2) vodeno-alkalna ekstrakcija (Viani, 1977); (3) ekstrakcija sa biljnim uljima i/ili monogliceridima i digliceridima (Berner i Jacobson, 1973); (4) destilacija vodenom parom; (5) molekulska destilacija; i najsavremenija (6) natkrična ekstrakcija sa ugljenik(IV)-oksidom (Tateo i Fellin, 1988).

Natkrična ekstrakcija sa ugljenik(IV)-oksidom (NK-CO₂) je mnogo selektivnija od konvencionalnih načina ekstrakcije jer se promenom pritiska i temperature, mogu regulisati prinos i sastav ekstrakta koji se dobija. Pomoću NK-CO₂ dobijaju se ekstrakti sa optimalnim fizikohemijskim, biološkim i terapijskim osobinama, jer se dobijaju ekstrakti bez tragova rastvarača i jer je zahvaljujući kritičnim parametrima CO₂ moguće proces NKE izvoditi na

niskim temperaturama. Natkritični ekstrakti koji se dobijaju pomoću NK-CO₂ se smatraju prirodnim i imaju GRAS (*Generally Recognized As Safe*) status. U natkritičnim ekstraktima nisu prisutni mikroorganizmi, spore i enzimi koji doprinose kvarenju hrane, zbog toga što su oni tokom NKE inaktivisani i nije potrebna dodatna sterilizacija, dok odsustvo svetla i kiseonika sprečava reakcije oksidacije.

U nauci se sve više uvodi trend upotrebe čistih tehnologija, gde uslovi proizvodnje obezbeđuju minimalno korišćenje energije pri najmanjem zagađenju životne sredine. Proces pod visokim pritiscima za izolovanje bioaktivnih supstanci imaju među ovim postupcima značajno mesto. Budući razvoj u ekstrakciji antioksidanasa biće sigurno vezan za postupak natkritične ekstrakcije, koji zauzima posebno mesto s obzirom na porast restriktivnih mera u zakonskoj regulativi koja se odnosi na životnu sredinu, toksikologiju i zdravlje ljudi.

1.1. Naučni ciljevi rada

U ovom radu prikazan je postupak izolovanja antioksidativnih frakcija iz začinskih biljaka familije Lamiaceae: ruzmarina (*Rosmarinus officinalis* L.), žalfije (*Sage officinalis* L.), timijana (*Thymus vulgaris* L.) i izopa (*Hyssopus officinalis* L.) pomoću frakcione ekstrakcije sa ugljenik(IV)-oksidom. Postupak frakcione ekstrakcije se sastojao iz dve faze:

1. Izolovanje frakcija etarskog ulja iz biljnog materijala (ruzmarina, žalfije, timijana i izopa) na pritisku od 11,5 MPa i temperaturi od 40 °C.
2. Izolovanje antioksidativnih frakcija iz biljnog materijala (ruzmarina, žalfije, timijana i izopa) na pritisku od 35 MPa i temperaturi od 100 °C.

Naučni ciljevi ove disertacije su:

- a) kvalitativna i kvantitativna hemijska analiza antioksidativnih frakcija iz ruzmarina, žalfije, timijana i izopa.
- b) ispitivanje antioksidativne aktivnosti izolovanih antioksidativnih frakcija.
- c) merenje sposobnosti antioksidativnih frakcija da inhibiraju lipidnu peroksidaciju.
- d) upoređivanje antioksidativne aktivnosti pod b) i c) sa antioksidativnom aktivnošću sintetskog i komercijalnog antioksidansa.

Od rezultata ove disertacije se očekuje da doprinesu novim saznanjima u analizi hemijskog sastava antioksidativnih frakcija jer u do sada objavljenoj fitohemijskoj literaturi ne postoje podaci o hemijskom sastavu antioksidativnih frakcija timijana i izopa dobijenih pomoću natkritične ekstrakcije. U naučnoj literaturi nema podataka o antioksidativnoj aktivnosti i hemijskom sastavu ispitivanih antioksidativnih frakcija dobijenih pomoću NKE na izabranim uslovima ekstrakcije iz ovog rada. Takođe ne postoje objavljeni rezultati o uticaju antioksidativnih frakcija iz žalfije i izopa na oksidativnu stabilnost suncokretovog ulja. Pored toga, rezultati predložene disertacije treba da potvrde da su odabrani predstavnici začinskog bilja koji pripadaju familiji Lamiaceae važan izvor za proizvodnju i primenu u prehrambenoj industriji nutritivnih suplemenata, komponenata funkcionalne hrane ili antioksidanasa.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Antioksidansi

2.1.1. Definicija antioksidanasa

Prema široko korišćenoj definiciji, antioksidansi su supstance koje, prisutne u mnogo nižim koncentracijama od supstrata koji lako podležu oksidaciji (kao što su lipidi, proteini, dezoksiribonukleinska kiselina (DNK) ili ugljeni hidrati) značajno inhibiraju ili potpuno sprečavaju oksidaciju supstrata (Halliwell i Gutteridge, 1989; Halliwell 1995). Ni ova definicija, niti ostale definicije (Huang i sar., 2005) ne ograničavaju antioksidativnu aktivnost na prisustvo specifične grupe jedinjenja ili određeni mehanizam delovanja.

U zakonskoj regulativi koja se odnosi na prehrambenu industriju antioksidansi se definišu kao supstance koje produžavaju rok trajanja namirnica štiteći ih od kvarenja prouzrokovanog procesima oksidacije, kao što su užeglost masti, promena boje i gubitak nutritivne vrednosti (Watson, 2002).

2.1.2. Klasifikacija antioksidanasa

Postoji više klasifikacija antioksidanasa, u zavisnosti od toga na osnovu čega se vrši podela. Najvažnije podele antioksidanasa su na osnovu:

- 1) porekla antioksidanasa,
- 2) načina kako se unose u ljudski organizam,
- 3) hemijske prirode molekula antioksidanasa,
- 4) rastvorljivosti antioksidanasa i
- 5) njihovog mehanizma delovanja.

Na osnovu porekla i hemijske prirode molekuli antioksidanasa se dele na:

- 1) Prirodne antioksidanse (tokoferoli, vitamin C, karotenoidi, flavonoidi itd.) i
- 2) Sintetske antioksidanse (butilovani hidroksianizol, galati itd.)

Na osnovu načina kako se unose u ljudski organizam molekuli antioksidanasa se dele na:

- 1) Antioksidanse koji su sintetisani i kontrolisani endogeno (enzimi, proteini kao i drugi produkti metabolizma) i
- 2) Antioksidanse egzogenog porekla, to jest one koji se unose putem hrane u ljudski organizam (vitamini, flavonoidi, fenolne kiseline, folati, fitoestrogeni itd.)

Na osnovu hemijske prirode molekuli antioksidanasa se dele na:

- 1) Enzimske antioksidanse (superoksid dizmutaza, katalaza, glutation peroksidaza itd.) i
- 2) Neenzimske antioksidanse (albumin, bilirubin, vitamin C, flavonoidi itd.).

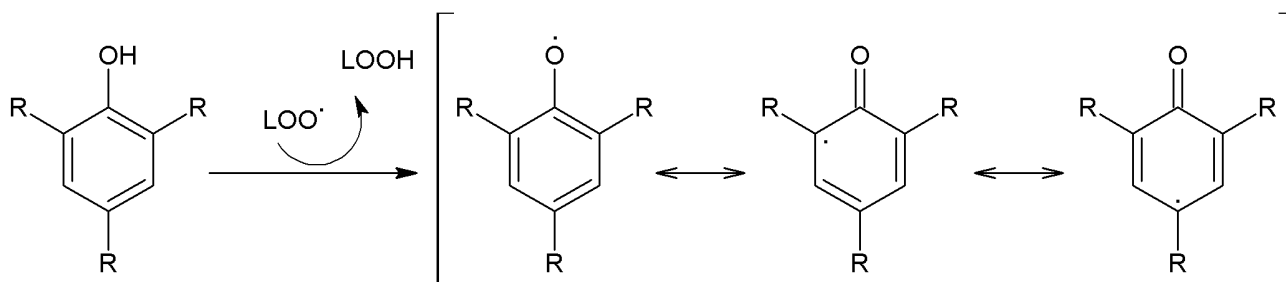
Na osnovu rastvorljivosti molekuli antioksidanasa se dele na:

- 1) Antioksidanse rastvorljive u vodi (vitamin C, albumin, bilirubin itd.) i
- 2) Antioksidanse rastvorljive u mastima (vitamin E, karotenoidi, koenzim Q₁₀ itd.).

Na osnovu različitog mehanizma delovanja antioksidansi mogu biti (tabela 1.1):

- 1) Primarni antioksidansi (butilovani hidroksianizol, galati, flavonoidi, ruzmarinski ekstrakt, vitamin E, fenolna jedinjenja itd.) i
- 2) Sekundarni ili preventivni antioksidansi (limunska kiselina, askorbinska kiselina, sumporna jedinjenja, selen, fosfolipidi, karotenoidi, transferin, ceruloplazmin itd.)
- 3) Sinergisti (askorbinska kiselina, sulfiti, β -karoten, limunska kiselina, etilen-diamin-tetra-sirćetna kiselina (EDTA), fosfati itd.).

Antioksidansi se veoma razlikuju po hemijskoj strukturi i imaju različite mehanizme delovanja. Primarni antioksidansi usporavaju stupanj inicijacije lančane reakcije slobodnih radikala ili prekidaju lančanu reakciju u fazi propagacije donirajući vodonik ili elektrone slobodnim radikalima i transformišući slobodne radikale u stabilnije produkte. Oni obično reaguju sa peroksil ili alkoksil slobodnim radikalima, koji nastaju razlaganjem lipidnih hidroperoksida. Efikasni su pri manjim koncentracijama dok pri višim koncentracijama mogu pokazati prooksidativno dejstvo.



Slika 1.1 *Mehanizam delovanja primarnih antioksidanasa: prelaz vodonikovog atoma sa antioksidansa na peroksil radikal i formiranje stabilnog ariloksi radikala koji je stabilizovan rezonancom*

Sekundarni ili preventivni antioksidansi sprečavaju razlaganje lipidnih hidroperoksida na slobodne radikale tj. redukuju brzinu reakcije inicijacije kod lančanih reakcija pomoću različitih mehanizama inaktivacije metala, raspadanja lipidnih hidroperoksida na neradikalske produkte, uklanjanja kiseonika, vezivanja određenih proteina sa prooksidativnim dejstvom, apsorbujući ultraljubičasto zračenje ili (u slučaju fosfolipida) stvaraju zaštitni sloj između ulja i vazduha. Sekundarni antioksidansi ne transformišu slobodne radikale u stabilnije produkte.

Postoji sinergizam između različitih antioksidanasa. Sinergisti su jedinjenja koja nemaju antioksidativno dejstvo ili imaju veoma slab efekat, ali pojačavaju aktivnost primarnih antioksidanasa. U sinergiste spadaju antioksidansi koji vežu kiseonik ili "skevindžeri" (hvatači) kiseonika (askorbinska kiselina, sulfiti, askorbil-palmitat, eritorbinska kiselina) i helatori metala (limunska kiselina, EDTA, fosfati, amino kiseline, fosfolipidi, produkti Maillard-ove reakcije). Produkti Maillard-ove reakcije nastaju pri povišenim temperaturama u reakciji između redukujućih šećera i različitih aminokiselina, peptida ili proteina i imaju funkciju helatora metala, npr. tiazoli, oksazoli i furanoni koji nastaju u reakciji između L-cisteina i D-glukoze (Madhavi i sar., 1996). Vitamin E pokazuje sinergističko delovanje sa β -karotenom, selenom i naročito sa vitaminom C. Vitamin C deluje sinergistički sa vitaminom E na taj način što učestvuje u regeneraciji vitamina E. U ekstraktu ruzmarina karnosol, rosmanol i druge antioksidativne komponente deluju u sinergiji. Razlaganje hidroperoksida na slobodne radikale katališu teški

metali, međutim ako se vežu za helate metala doći će do inhibicije oksidacije. Neke supstance (proteini, aminokiseline) redukuju lipidne hidroperokside neradikaliskim putem. Singletni kiseonik oksidiše lipide mnogo puta brže od tripletnog kiseonika i stoga hvatači singletnog kiseonika imaju važnu ulogu inhibitora oksidacije.

Tabela 1.1 *Mehanizmi antioksidativne aktivnosti* (Pokorny, 2001; Kochar i Rossell, 1990)

Klasa antioksidanasa	Mehanizam antioksidativne aktivnosti	Primeri antioksidanasa
Primarni antioksidansi	Inaktivacija lipidnih slobodnih radikala	Fenolna jedinjenja (BHA, BHT, TBHQ), tokoferoli
Sekundarni antioksidansi	Sprečavanje razlaganja hidroksiperoksida na slobodne radikale	Fenolna jedinjenja, sumporna jedinjenja, selen, fosfolipidi, transferin, ceruloplazmin
Sinergisti	Pojačavaju aktivnost pravih antioksidanasa	Limunska kiselina, askorbinska kiselina
Helati metala	Vezuju teške metale u neaktivne komponente	Fosforna kiselina, produkti Maillard-ove reakcije, limunska kiselina
Hvatači singletnog kiseonika	Transformacija singletnog kiseonika u tripletni kiseonik	Karoteni
Supstance koje redukuju hidroksiperokside	Redukcija hidroksiperoksida na neradikaliski način	Proteini, aminokiseline

Postoje i druge klasifikacije antioksidanasa. Zavisno od njihove hemijske strukture, antioksidansi se grupišu u fenolna jedinjenja (BHA, BHT, TBHQ, galati), hinone (hidrohinon, tokoferol, hidroksihromani, hidroksikumarini), organske kiseline (askorbinska, limunska, vinska i mlečna kiselina i njihove soli, etilendiamintetrasirćetna kiselina i njene soli), sumporna jedinjenja (neorganska: sulfiti, bisulfiti i metasulfiti; organska: metionin, cistein), i enzimi (katalaze, peroksidaze, superoksiddizmutaza). Prirodni antioksidansi nađeni u biološkim sistemima uključuju četiri opšte grupe: enzimi, veliki molekuli (albumin, ceruloplasmin, feritin, ostali proteini), mali molekuli (askorbinska kiselina, glutation, mokraćna kiselina, tokoferol, karotenoidi, polifenoli), i neki hormoni (estrogen, angiotenzinogen, melatonin) (Prior, 2005).

2.2. Antioksidansi i zdravlje

2.2.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli, koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi, što je preduslov njihove visoke i neselektivne reaktivnosti (Halliwell i Gutteridge, 1989). Nastaju termolizom, elektromagnetnom radijacijom, redoks reakcijama, enzimskim procesima, hemijskim i biohemijskim procesima (Acworth, 2003).

Slobodni radikali nastaju u ćelijama tokom normalnog aerobnog metabolizma i učestvuju u mnogim važnim biohemijskim reakcijama. Međutim, prekomerna produkcija slobodnih radikala i poremećaji u sistemima celularne i ekstracelularne antioksidativne zaštite dovode do mnogih patoloških promena u ljudskom organizmu. Faktori koji prouzrokuju napade slobodnih radikala mogu se podeliti u one endogenog i egzogenog porekla koji ponekad mogu dovesti do oksidativnog stresa. Oksidacija i prateće formiranje slobodnih radikala je takođe sastavni deo ljudskog metabolizma. Kiseonik je krajnji akceptor elektrona u mitohondrijama gde proticanje elektrona na kraju proizvodi energiju u obliku ATP-a (adenozin-trifosfata). Približno 5% elektrona koji prođu transportni lanac elektrona su izloženi kiseoniku što vodi do nastajanja slobodnih radikala. Smatra se da se oko 2% kiseonika koji koristi organizam, prevede u reaktivne kiseonične vrste (*Reactive Oxygen Species* - ROS). ROS su kratkog veka, ali su veoma reaktivni i ako je njihova koncentracija veća od odbrambenih snaga organizma doći će do tzv. oksidativnog stresa. Najvažnije ROS prikazane su u tabeli 2.1.

Tabela 2.1 Najvažnije reaktivne slobodnoradikalne i neradikalne vrste kiseonika (Halliwell i Whiteman, 2004; Somogyi i sar., 2007)

SLOBODNI RADIKALI	NERADIKALSKI OBLICI
<i>Reaktivne kiseonične vrste (ROS)</i>	
Superoksid anjon radikal, $O_2^{\cdot -}$	Vodonik peroksid, H_2O_2
Hidroksil radikal, OH^{\cdot}	Hipobromna kiselina, $HOBr$
Hidroperoksid radikal, HOO^{\cdot}	Hipohlorna kiselina, $HOCl$
Peroksid radikal, LOO^{\cdot}/ROO^{\cdot}	Ozon, O_3
Alkoksil radikal, LO^{\cdot}/RO^{\cdot}	Singletni kiseonik, $O_2^1\Delta_g$
Karbonatni radikal, $CO_3^{\cdot -}$	Organski peroksidi, $ROOH$
Ugljendioksidni radikal, $CO_2^{\cdot -}$	Peroksinitrit, $ONOO^{\cdot}$
Ugljenmonoksidni radikal, $CO^{\cdot -}$	Peroksinitritna kiselina, $ONOOH$

Ako su slobodni radikali i ostale ROS prisutne u višku može doći do oštećenja konstituenata ćelije kao što su lipidne membrane, proteini, DNK i RNK. Pošto su reaktivne kiseonične vrste hemijski nestabilne vrste, ROS oduzimaju elektrone stabilnim molekulima i tako pretvaraju i ove molekule u ROS. Nova naučna disciplina, biologija slobodnih radikala, otkrila je da je temelj iznenađujuće brojnih i vrlo teških bolesti današnjice zapravo oksidativni stres i oštećenja do kojih on dovodi. Mnogi oblici malignih bolesti rezultat su oksidativnog oštećenja DNK i mutacija koje zbog toga nastaju. Neki od simptoma starenja, kao što je arterioskleroza, pripisuju se oksidaciji holesterola vrlo niske gustine (*Low-density lipoprotein – cholesterol*, LDL-C) i upravo slobodnim radikalima. Negativan uticaj slobodnih radikala može dovesti i do

različitih autoimunih bolesti, šećerne bolesti, reumatskih bolesti, srčanog udara, bolesti bubrega, infektivnih bolesti, neurodegenerativnih bolesti na primer Alchajmerova bolest (*Alzheimer's disease*) i Parkinsonova bolest (*Parkinson disease*), dermatoloških poremećaja, na primer fotosenzitivnost, psorijaza. Važnu ulogu imaju i u nastanku alergija, kao što su astma i atopički dermatitis, te upalnih bolesti creva poput ulceroznog kolitisa i Chronove bolesti (*Chron disease*). U tabeli 2.2 dati su faktori koji dovode do oksidativnog stresa.

Tabela 2.2 Faktori oksidativnog stresa (Moller i sar., 1996)

Endogeni faktori	Egzogeni faktori
Intenzivna fizička aktivnost / Slaba fizička aktivnost	<u>Način ishrane :</u> Proteinima i/ili lipidima bogata hrana
Emocionalni stres	Prooksidansi (ksenobiotici)
Infekcije	Smanjeni unos antioksidanasa
Kancer	Piće (alkohol, kafa)
Smrt ćelije	<u>Zagađivanje:</u> Dim cigareta Zagađujuće supstance u vazduhu
	<u>Medicinski lekovi :</u> Antikancerogeni lekovi
	<u>Zračenje :</u> Jonizujuće zračenje Ultraljubičasto zračenje Mikrotalasno zračenje
	<u>Kožni apsorbanti :</u> Insekticidi (eldrin, dihlordifeniltrihloretan (DDT), lindan) Lekovi (derivati lindana i psoralena)

2.2.2. Oksidativni stres

Da bi sprečio štetne reakcije slobodnih radikala na konstituente ćelije, ljudski organizam je razvio kompleksan antioksidativni odbrambeni mehanizam. Ljudski organizam poseduje endogene antioksidativne sisteme koji ga štite od štetnog uticaja slobodnih radikala, ali važan segment antioksidativne odbrane čine i antioksidansi koje svakodnevno treba unositi hranom u adekvatnim dozama. Posmatrano na ćelijskom nivou antioksidativni sistem se sastoji od enzimskih i neenzimskih antioksidanasa koji održavaju balans između prooksidanasa i antioksidanasa u ćeliji. Enzimski antioksidansi su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation peroksidaza (GPx). U tabeli 2.3 date su reakcije koje katališu ova tri endogena antioksidansa. U prvoj reakciji SOD pretvara superoksidne anjon radikale $O_2^{\cdot -}$ u vodonik-peroksid koji ulazi u drugu reakciju gde se posredstvom CAT razlaže na vodu i molekularni kiseonik. GPx takođe detoksikuje perokside.

Tabela 2.3 Reakcije koje katališu SOD, CAT i GPx (Blokina i sar., 2003)

Enzim	EC broj	Reakcija koju katalizuje dati enzim
Superoksid dismutaza	1.15.1.1	$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightleftharpoons 2H_2O_2 + O_2$
Katalaza	1.11.1.6	$2 H_2O_2 \rightleftharpoons O_2 + 2 H_2O$
Glutation peroksidaza	1.11.1.9	$2 GSH + PUFA-OOH (H_2O_2) \rightleftharpoons GSSH + 2 H_2O$

Neenzimska jedinjenja, kao što su albumin, mokraćna kiselina i bilirubin, kao i određena grupa vitamina spadaju u grupu najznačajnijih neenzimskih antioksidativnih jedinjenja koja se nalaze u krvnoj plazmi (tabela 2.4) i koja pokazuju sposobnost prekidanja lančane reakcije. Nevitaminska antioksidativna jedinjenja (albumin, mokraćna kiselina i bilirubin itd.) su odgovorna za 50-80% celokupne sposobnosti prekidanja lančane reakcije koju poseduje krvna plazma, iako to nije njihova glavna uloga. Oksidativni stres se prvenstveno dešava (Somogyi i sar., 2007):

- 1) jer je koncentracija antioksidanasa redukovana (na primer zbog mutacije enzima koji imaju funkciju antioksidanasa u organizmu, ili pri smanjenom unosu prirodnih antioksidanasa preko hrane) i
- 2) jer je broj ROS povećan (na primer u slučaju bolesti).

Dva najznačajnija antioksidansa rastvorljiva u vodi koja su prisutna u plazmi su mokraćna kiselina i askorbinska kiselina. *Mokraćna kiselina* je inhibitor lipidne peroksidacije putem vezivanja gvožđa i bakra u oblicima koji ne stimulišu formiranje radikala (primarna zaštita) i putem direktnog hvatanja slobodnih radikala kada se formiraju (sekundarna zaštita). *Askorbinska kiselina* ili vitamin C takođe ima ulogu hvatača slobodnih radikala i uključena je u regeneraciju vitamina E. Vitamin C je najefikasniji u citoplazmi (vodeni deo ćelije), jer je on vitamin/antioksidans koji je rastvorljiv u vodi. *Bilirubin* je molekul koji nastaje u metabolizmu hema. Suština velike antioksidativne moći bilirubina je da jedan molekul može biti iskorišćen više puta za uklanjanje visoko reaktivnog kiseonika. Kada bilirubin reaguje sa oksidansom nastaje biliverdin, koji se zatim ponovo prevodi u bilirubin pomoću enzima biliverdin reduktaze. Smatra se da bilirubin štiti ćelijsku membranu dok glutation deluje unutar ćelije. *Glutation*, tripeptid (γ -glutamil-cisteinil-glicin), veoma je važan sulfhidrilni pufer koji održava u

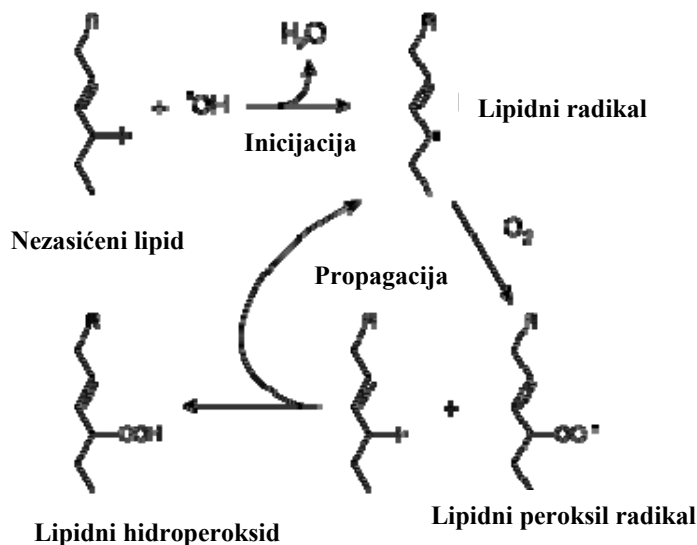
redukovanom obliku ostatke cisteina u hemoglobinu i drugim proteinima eritrocita. Pomoću redukovanog glutationa (GSH) detoksikuje se vodonik-peroksid u reakciji koju katališe enzim GPx. *Vitamin E* je glavni liposolubilni antioksidans i igra veoma važnu ulogu u zaštiti ćelijskih membrana. Pošto je rastvorljiv u mastima najefikasniji je u dvostrukim lipidnim membranama (*Bilayer Lipid Membranes* - BLM) i membranama mitohondrija (lipidni deo ćelije). Deluje na mestima gde je visok parcijalni pritisak kiseonika, na primer na membranama respiratornog trakta. Vitamin E pokazuje sinergističko delovanje sa vitaminom A, β -karotenom, selenom i naročito sa vitaminom C. Vitamin C deluje sinergistički sa vitaminom E na taj način što učestvuje u regeneraciji vitamina E. Postoje različiti mogući mehanizmi putem kojih antioksidansi deluju i pružaju zaštitu od slobodnih radikala. To podrazumeva sprečavanje obrazovanja ROS, zaustavljanje ROS napada hvatanjem reaktivnih metabolita i njihovo pretvaranje u manje reaktivne molekule, sprečavanje obrazovanja štetnih oblika iz manje reaktivnih ROS, olakšavanje oporavka od štetnih ROS i obezbeđivanje povoljne okoline za efikasno delovanje ostalih antioksidanasa (Sen, 1995).

Tabela 2.4 Antioksidansi prisutni u ljudskoj plazmi (Stocker, Frei, 1991)

Antioksidans	Koncentracija ($\mu\text{mol/l}$)	Mehanizam delovanja
Rastvorljivi u vodi		
Askorbati	30-150	Hvatač radikala, regeneracija vitamina E
Urati	160-470	Hvatač radikala, vezuje Cu^{2+} i Fe^{2+}
Glutacioni	1-2	Hvatač radikala i supstrat za GPx
Bilirubin	5-20	Hvatač radikala
Albumin	530-830	Vezuje Cu^{2+} , heme, hvatač HOCl radikala
Ceruloplasmin	Znatno niža	Vezuje Cu^{2+}
Transferin	Znatno niža	Vezuje Fe^{2+}
Rastvorljivi u lipidima		
Vitamin E	25-40	Hvatač peroksil radikala
Vitamin Q (Ubihinon)	0,4-1,0	Hvatač radikala
Likopen	0,5-1,0	Hvatač singletnog kiseonika
β -karoten	0,3-0,6	Hvatač singletnog kiseonika

2.2.3. Mehanizam lipidne peroksidacije

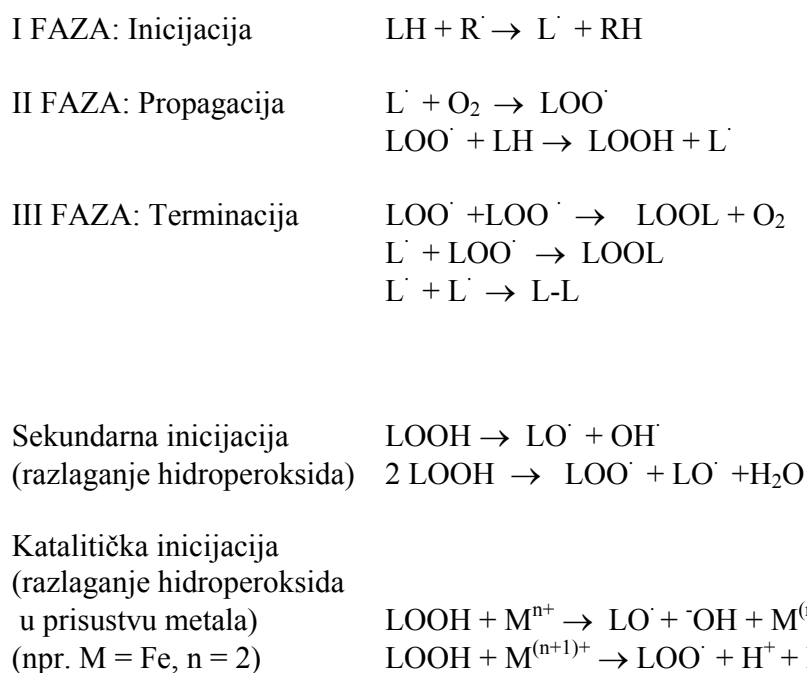
Lipidna peroksidacija je označena kao glavni mehanizam oštećenja ćelija u mnogim biološkim sistemima biljnog i životinjskog porekla. Ovom procesu podležu kako lipidi u biosistemima, tako i lipidi u hrani. Mehanizam ove lančane reakcije uključuje proces stvaranja lipidnih peroksida napadom slobodnih radikala na lipide. Osnovni supstrat za oksidativno oštećenje lipida predstavljaju polinezasićene masne kiseline (*Polyunsaturated Fatty Acids* - PUFA) u fosfolipidima i glikolipidima, kao i holesterol u biološkim membranama. PUFA sadrže najmanje dve dvostruke ugljenik-ugljenik veze između kojih se nalazi metilenska grupa koja sadrži posebno reaktivne vodonikove atome. Lipidna peroksidacija se u biološkim sistemima može odigrati enzimskim (pod dejstvom lipooksigenaza) i neenzimskim putem. Ukoliko se oksidacija odvija u prisustvu atmosferskog kiseonika naziva se autooksidacija. Nezasićene masne kiseline kao što su oleinska, linolna (linoleinska) i linolenska su lipidi koji učestvuju u mehanizmu oksidacije. Brzina oksidacije ovih masnih kiselina raste sa povećanjem nezasićenosti. Opšti mehanizam lipidne peroksidacije sastoji se od tri faze: (1) inicijacije, formiranje slobodnih radikala; (2) propagacije, lančanih reakcija sa slobodnim radikalima; i (3) terminacije, formiranje neradikalnog proizvoda. Mehanizam lipidne peroksidacije prikazan je na slici 2.1.



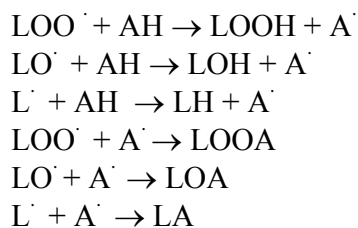
Slika 2.1 Mehanizam lipidne peroksidacije

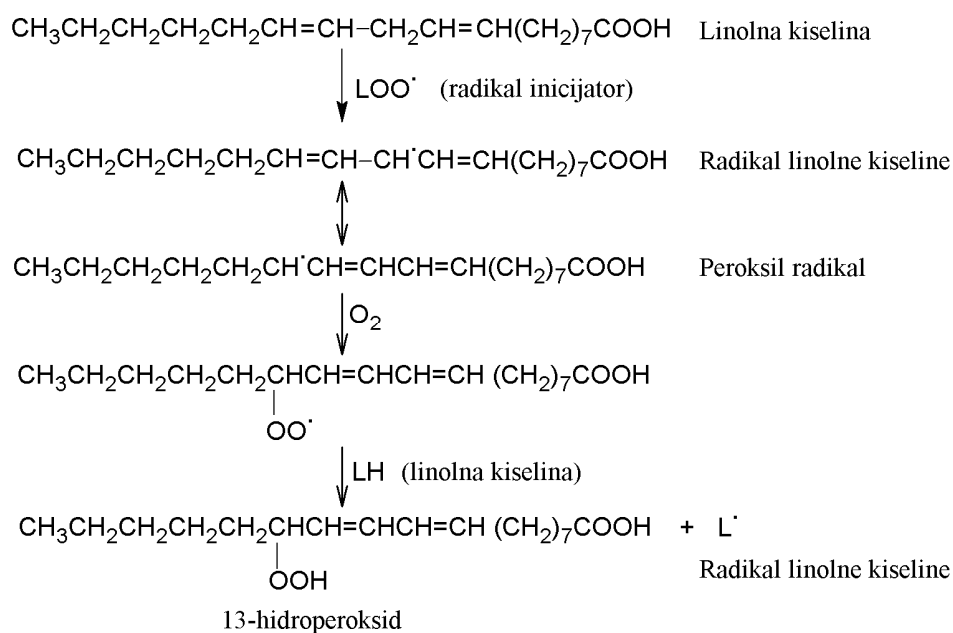
Inicijacija započinje oduzimanjem vodonikovog atoma iz biomolekula. Masna kiselina (LH) se u fazi inicijacije prevodi u radikal masne kiseline (L \cdot). Inicijatori su ROS, na primer hidrosil radikal ($\text{OH}\cdot$), peroksil radikal ($\text{ROO}\cdot$) i alkoksil radikal ($\text{RO}\cdot$) koji imaju sposobnost da oksidišu polinezasićene masne kiseline. Radikal masne kiseline nije stabilan molekul, tako da automatski reaguje sa molekulskim kiseonikom, na taj način stvarajući peroksil radikal masne kiseline ($\text{LOO}\cdot$). Ovaj radikal reaguje sa drugim molekulom masne kiseline i nastaje ponovo radikal masne kiseline i lipidni hidroperoksid (LOOH), jedan od glavnih početnih proizvoda lipidne peroksidacije koji se raspada i formira jedinjenja koja su odgovorna za užeglost namirnica. Takvi sekundarni proizvodi uključuju heksanal, pentanal i malondialdehid.

Mehanizam lipidne peroksidacije na primeru linolne kiseline prikazan je na slikama 2.2 i 2.3. Lančana reakcija se zaustavlja kada dva radikala reaguju i daju neradikalni molekul. Ovo se događa jedino ako je koncentracija radikala dovoljno velika da bi došlo do sudara dva radikala. Lančanu reakciju mogu prekinuti antioksidansi tako što deluju kao "hvatači" ("skevindžeri") slobodnih radikala. Mehanizam kompleksne lančane reakcije lipidne peroksidacije odvija se u tri faze:

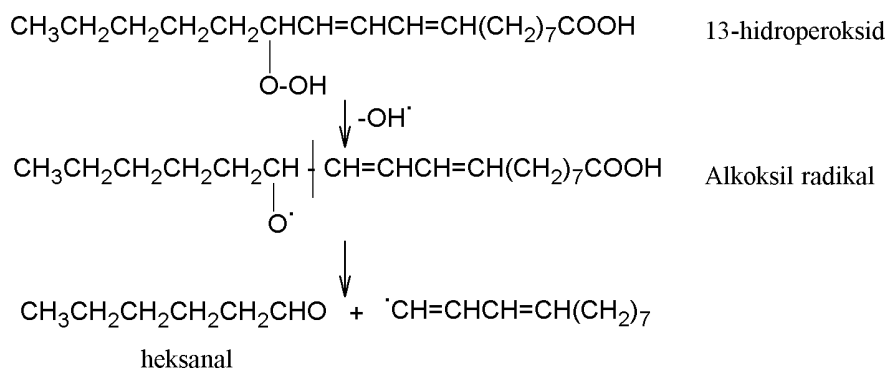


Primarni antioksidansi (AH) deluju kao "hvatači" ("skevindžeri") slobodnih radikala (LOO^{\cdot} , LO^{\cdot} i L^{\cdot}) prekidajući lančanu reakciju u fazi propagacije, redukujući slobodan radikal i formirajući radikal antioksidansa (A^{\cdot}) koji može reagovati mnogo brže sa molekulom slobodnog radikala od nezasićene masne kiseline LOOH.





Slika 2.2 Formiranje 13-hidroperoksida iz linolne kiseline (9-hidroperoksid je drugi glavni proizvod ove reakcije)



Slika 2.3 Nastajanje heksanala iz 13-hidroperoksida (linolne kiseline)

Tabela 2.5 Prag mirisa ("flavour thresholds") nekih od aldehida koji nastaju pri oksidaciji linolne kiseline određen u parafinskom ulju

Jedinjenje	Prag "Threshold" (mg/kg)
Heksanal	0,08–0,6
Heptanal	0,04–0,055
Oktanal	0,04–0,6
<i>trans</i> -2-nonenal	0,04–0,4
<i>cis</i> -2-dekenal	0,1
<i>trans,trans</i> -2,4-nonadienal	0,46
<i>trans,cis</i> -2,4-dekadienal	0,02

2.3. Izvori prirodnih antioksidanasa

2.3.1. Fenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja ili polifenoli, u svojoj strukturi sadrže aromatični prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa. Ovi proizvodi sekundarnog metabolizma biljaka nisu potpuno proučeni zbog složenosti hemijske prirode i zbog široke rasprostranjenosti u biljkama. Najznačajnije grupe fenolnih jedinjenja su:

- 1) *Fenolne kiseline koje su hidroksi derivati benzoeve kiseline (C₆-C₁)* i one su u biljkama prisutne uglavnom u slobodnom stanju kao i u obliku estera i glikozida (*p*-hidroksibenzoeva kiselina, galna kiselina, salicilna kiselina).
- 2) *Fenolne kiseline koje su derivati cimetine kiseline (C₆-C₃)* su široko rasprostranjene u biljkama i retko se nalaze u slobodnom stanju već se češće nalaze u obliku estera i glikozida (kumarinska kiselina, kafeinska kiselina, ferulna kiselina).
- 3) *Glikozidi estera fenilpropanoide.*
- 4) *Flavonoidi*

Flavonoidi čine najzastupljeniju grupu fenolnih jedinjenja u biljkama. Njihova osnovna struktura je difenilpropan (C₆-C₃-C₆). Zavisno od stepena oksidacije centralnog piranskog prstena, flavonoidi se mogu podeliti na : *flavone, flavonole, flavanone, izoflavonoide, flavane, flavanole (katehine) i antocijanine*. Piranski prsten može biti otvoren (halkoni) ili transformisan u furanski prsten (auroni). Oko 90% flavonoida u biljkama nalazi se u obliku glikozida (Škerget i sar., 2005).

Fenolne kiseline koje su derivati cimetine kiseline (C₆-C₃) imaju bolju antioksidativnu aktivnost od fenolnih kiselina koje su derivati benzoeve kiseline (C₆-C₁). Postoji direktna veza između strukture većine fenolnih kiselina i njihove antioksidativne aktivnosti. Monofenoli su manje efikasni od polifenola. Uvođenjem druge hidroksi grupe u *orto* ili *para* položaj povećava se antioksidativna aktivnost (Yanishlieva, 2001). U tabeli 2.6 prikazani su najznačajniji izvori flavonoida i fenolnih kiselina kao najvažnijih prirodnih antioksidanasa koji se nalaze u raznim vrstama voća, povrća, žitarica, čajeva, biljaka i začina.

Tabela 2.6 Najznačajniji izvori flavonoida i fenolnih kiselina

Prirodni proizvod	Antioksidansi	Reference
VOĆE		
Kupine, maline	Flavanoli, hidroksicimetne kiseline, hidroksibenzoeve kis., antocijanini	(Hakkinen i sar., 1998; Belitz i Grosch, 1999; Wang i Lin, 2000; Yanishlieva i Heinonen, 2001; Manach i sar., 2004)
Trešnje	Hidroksicimetne kis., antocijanini	(Belitz i Grosch, 1999; Yanishlieva i Heinonen, 2001; Manach i sar., 2004)
Crno grožđe	Antocijanini, flavonoli	(Belitz i Grosch, 1999; Yanishlieva i Heinonen, 2001; Manach i sar., 2004)
Citrusno voće	Flavanoni, flavonoli, fenolne kis.	(Yanishlieva i Heinonen, 2001; Manach i sar., 2004; Beecher, 2003)
Šljive, suve šljive, jabuke, kruške, kivi	Hidroksicimetne kis., catehini	(Belitz i Grosch, 1999; Yanishlieva i Heinonen, 2001; Manach i sar., 2004)
POVRĆE		
Plavi patličžan	Antocijanini, hidroksicimetne kis.	(Manach i sar., 2004)
Cigura, vodopija, artičoke	Hidroksicimetne kiseline	(Manach i sar., 2004)
Peršun	Flavoni	(Manach i sar., 2004; Beecher, 2003)
Raven	Antocijanini	(Manach i sar., 2004)
Slatki krompir lišće	Flavonoli, flavoni	(Chu i sar. 2000)
Žuti luk, curly	Flavonoli	(Manach i sar., 2004)
Kelj, praziluk	Flavoni	(Manach i sar., 2004)
Pasulj, grašak	Flavanoli	(Manach i sar., 2004)
Spanać	Flavonoidi, <i>p</i> -kumarinska kis.	(Bergman, 2001)
BRAŠNA		
Ovseno, pšenično, pirinčano	Kafeinska i ferulna kiselina	(Yanishlieva i Heinonen, 2001; Manach i sar., 2004)
ČAJEVI		
Crni, zeleni	Flavan-3-oli, flavonoli, catehini	(Manach i sar., 2004; Beecher, 2003)
ALKOHOLNA PIĆA		
Crno vino	Flavan-3-oli, flavonoli, antocijanini	(Manach i sar., 2004; Beecher, 2003)
Jabukovača	Hidroksicimetne kiseline	(Manach i sar., 2004)

Nastavak tabele 2.6

OSTALA PIĆA		
Đus od pomorandže	Flavanoli	(Manach i sar., 2004)
Kafa	Hidroksicimetne kiseline	(Manach i sar., 2004; Sanchez-Gonzales, 2005)
Čokolada	Flavanoli	(Manach i sar., 2004; Beecher, 2003)
BILJKE I ZAČINI		
Ruzmarin (<i>Rosemarinus officinalis</i>)	Diterpeni : karnosolna kiselina, karnosol, ruzmarinska kis., rosmanol	(Yanishlieva i Heinonen, 2001; Ibanez i sar., 2003)
Žalfija (<i>Salvia officinalis</i>)	Karnosol, karnosolna kiselina, luteolin, rosmanol, ruzmarinska kis.	(Yanishlieva i Heinonen, 2001; Zheng i Wang, 2001)
Zeleni čaj (<i>Camelia sinensis</i>)	Katehini	(Ho i sar., 1997)
Crni čaj (<i>Camelia assamica</i>)	Teaflavini, tearubigini	(Ho i sar., 1997)
Sladić (<i>Glycyrrhiza glabra</i>)	Flavonoidi	(Gordon i An, 1995)
Origano (<i>Origanum officinalis</i>)	Derivati fenolnih kis., flavonoidi	(Yanishlieva i Heinonen, 2001; Exarchou i sar., 2003; Belhatab i sar., 2004)
Timijan (<i>Thymus vulgare</i>)	Timol, karvakrol, flavonoidi, lubeolin, <i>p</i> -kumen-2,3-diol	(Yanishlieva i Heinonen, 2001; Zheng i Wang, 2001; Exarchou i sar., 2003)
Čubar (<i>Satureja hortensis</i>)	Ruzmarinska kis, karnosol	(Yanishlieva i Heinonen, 2001)
Đumbir (<i>Zingiber officinale</i>)	Gingerd i slična jedinjenja	(Yanishlieva i Heinonen, 2001; Moure i sar., 2001)
Kurkuma (<i>Curcuma domestica</i>)	Kurkumini	(Yanishlieva i Heinonen, 2001)
Biber (<i>Piper nigrum</i>)	Flavonoidi	(Yanishlieva i Heinonen, 2001)
Crvena paprika (<i>Capsicum annum</i>)	Kapsaicin	(Yanishlieva i Heinonen, 2001)
Čili paprika (<i>Capsicum frutescence</i>)	Kapsaicin, kapsaicinol	(Yanishlieva i Heinonen, 2001)
Karanfilić (<i>Eugenia caryophyllata</i>)	Eugenol, galati	(Yanishlieva i Heinonen, 2001)
Majoran (<i>Marjorana hortensis</i>)	Flavonoidi	(Yanishlieva i Heinonen, 2001)
BILJNA ULJA		
Maslinovo (<i>Olive oil</i>)	Tirosol, hidroksitirosol	(Yanishlieva, 2001)
Susamovo (<i>Sesame oil</i>)	Sesamol	(Yanishlieva, 2001)

2.3.2. Tokoferoli i tokotrienoli

Tokoferoli su najpoznatija grupa prirodnih antioksidanasa. Mogu se klasifikovati u dve grupe:

- 1) Tokoferoli (Toc) u koje spadaju α -, β -, γ - i δ - tokoferol i
- 2) Tokotrienoli (Toc-3) u koje spadaju α -, β -, γ - i δ - tokotrienoli.

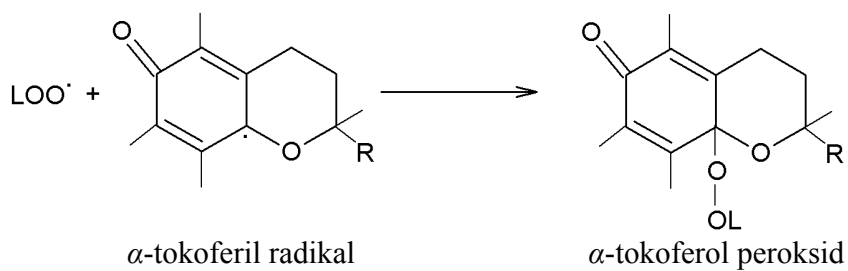
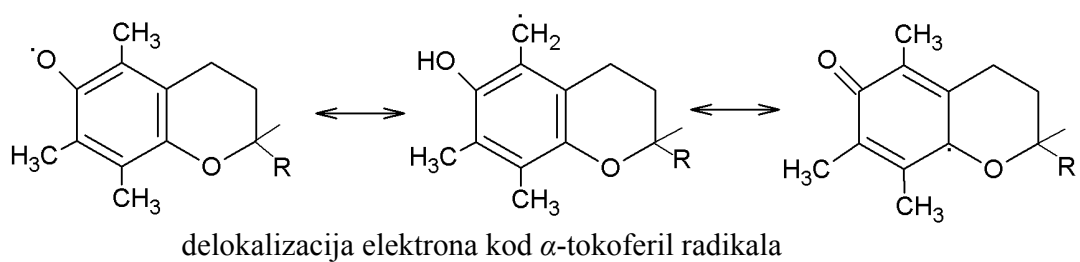
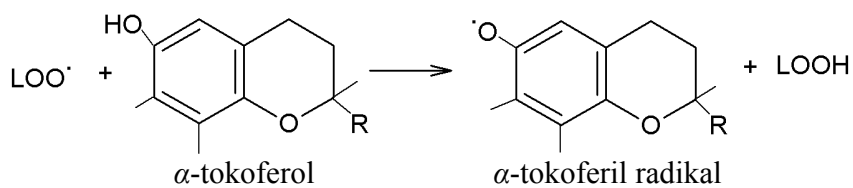
Svi tokoferoli su termostabilna jedinjenja do 200 °C dok ih UV zraci razgrađuju. Najvažnije jedinjenje iz grupe tokoferola je α -tokoferol ili vitamin E, koji poseduje najmanju antioksidativnu aktivnost u poređenju sa ostalim tokoferolima. Naziv vitamin E je zapravo zajedničko ime za svih 8 jedinjenja iz grupe tokoferola. U reakciji sa lipidnim peroksil radikalom α -tokoferoli predstavljaju donore vodonika koji se nalazi na hidroksilnoj grupi. Radikal koji nastaje iz α -tokoferola je stabilizovan zbog delokalizacije elektrona preko aromatičnog prstena. Ovaj radikal formira neradikalni proizvod α -tokoferol-peroksid koji prelazi u α -tokohinone ili tokoferol dimere.

Tokoferoli koji ulaze u sastav hrane predstavljaju relativno slabe antioksidanse, i reakcijom sa slobodnim radikalima prelaze u hinone, spirodimere i kopolimere sa oksidanim lipidima. Obično se koriste za čuvanje biljnih ulja, margarina i kakao proizvoda.

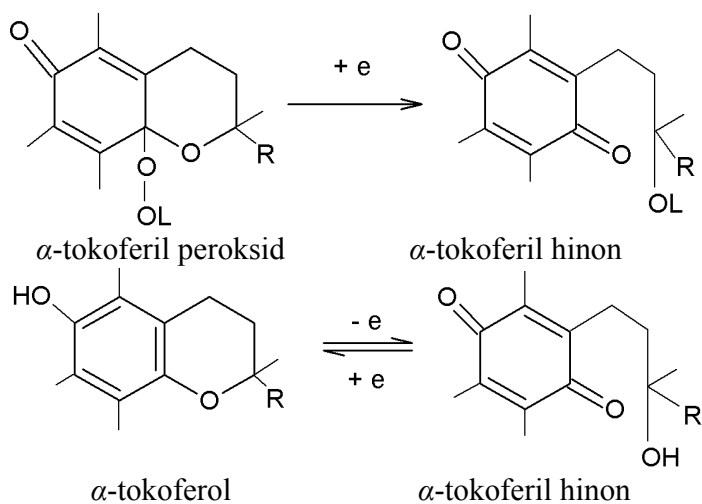
Tokoferoli spadaju u grupu liposolubilnih vitamina (rastvorljivih u mastima). Ulaze u sastav ćelijskih membrana, pa im je glavna antioksidativna uloga da zaštite masne kiseline i druge komponente ćelijske membrane kao i lipoproteine od oksidacije. Imaju važnu ulogu u organizmu zato što štite ćelije od starenja, od dobijanja kancerogenih oboljenja, učestvuju u stvaranju reproduktivnih ćelija i olakšavaju funkcionisanje nervnog sistema. Najviše ih ima u klicama žitarica, biljnim uljima, koštunjavom voću. Dnevne potrebe za ovim vitaminom su 10-15 mg (Mandić, 2007).

2.3.3. Karotenoidi

Skoro 500 karotenoida je identifikovano u povrću i voću koje je zastupljeno u ljudskoj ishrani, ali većinom se ova jedinjenja nalaze u niskim koncentracijama i imaju nisku nutritivnu vrednost. Najvažnije jedinjenje iz grupe karotenoida je β -karoten ili provitamin vitamina A, a poslednjih godina pažnja je usmerena i na ostale karotenoide kao što su likopen i lutein koji se nalaze u paradajzu i obojenom povrću. Vitamin A je rastvorljiv u mastima. Uglavnom se nalazi u voću i povrću u vidu provitamina β -karotena kojeg organizam pretvara u vitamin. Kod hrane životinjskog porekla ima ga u jetri životinja, ali biljna ishrana obezbeđuje sasvim dovoljne količine. Učestvuje u stvaranju pigmenta vida, kao i u stvaranju i održavanju ćelija koje pokrivaju kožu, oči, usta i unutrašnje organe. U slučaju nedostatka ovog vitamina smanjuje se vid noću, a koža postaje suva i krta. Pored navedenog, on sprečava i stvaranje tumora zahvaljujući svom antioksidativnom delovanju. Najviše β -karotena ima u šargarepi, bundevi, spanaću, paradajzu, kelju, dinji, breskvama i kajsijama. Najbolji izvori likopena su paradajz, crveni grejpfrut, lubenica, kajsija i nar, a luteina biljka neven (*Calendula officinalis*), kelj, brokoli, kivi, prokelj i spanać. Dnevne potrebe za vitaminom A su 700 do 900 μ g (Mandić, 2007).



2α -tokoferil radikala \rightarrow α -tokoferol dimer



Slika 2.4 Antioksidativno dejstvo α -tokoferola (Gordon, 2001)

2.3.4. Ostali prirodni antioksidansi

Askorbinska kiselina (vitamin C) koja ulazi u sastav citrusnog voća je prirodni antioksidans i ima veliku primenu u prehrambenoj industriji. Vitamin C i njegove soli dodaju se kao antioksidansi u bezalkoholna pića, džemove, kondenzovano mleko i kobasice. Vitamin C je rastvorljiv u vodi i zbog toga se ne stvaraju zalihe u organizmu, pa se preporučuje svakodnevna konzumacija. Moćan je antioksidans koji koči biohemijske procese starenja ćelija. Nedostatak ovog vitamina dovodi do bolesti koja se zove skorbut, čije su karakteristike slabljenje otpornosti prema infekcijama i krvarenje desni. Najviše ga ima u citrusnom voću (grejpfrut, pomorandže, limun, nar), kiviju, paprici, kupusu, peršunu, zelenom lisatom povrću, jagodama, ribizlama, paradajzu, rotkvicama. Dnevne potrebe za ovim vitaminom su oko 100 mg (Mandić, 2007).

Selen spada u grupu mikroelemenata (oligoelemenata ili elemenata u tragovima). Pored selena u grupu mikroelemenata spadaju cink, mangan, gvožđe, bakar hrom i molibden. Selen sinergistički deluje i sa vitaminom E u antioksidativnoj ulozi. U jetri on podstiče izbacivanje nekih otrova. Uključen je i u proizvodnju hormona štitne žlezde. Neophodan je u ljudskoj ishrani jer ulazi u sastav amino kiseline selenocistein i selenometionin. Proteini koji sadrže jedan ili više ostataka selenocisteina se nazivaju selenoproteini i do sada je identifikovano preko 30 selenoproteina. Prvi identifikovani selenoprotein je bio enzim glutation peroksidaza GPx1 iz citoplazme, dok su u zadnje vreme identifikovane još tri glutation peroksidaze (GPx3, GPx5 i GPx6) u različitim tkivima ljudskog organizma. Sve glutation peroksidaze katališu redukciju vodonik-peroksida i ostalih ROS, uključujući lipidne perokside, na račun tripeptida glutationa, koji se sintetiše unutar ćelije. Selenocistein ulazi u sastav još nekoliko enzima kao na primer tetrajodotirodin 5' dejodinaze, tioredoksin reduktaze, nekih hidrogenaza itd. Pošto je mikroelement, dolazi do trovanja ako se dnevno unese u većoj dozi od 400 µg. Najviše ga ima u Brazilskom orahu, mesu, ribi, školjkama, rakovima, cerealijama i koštunjavom voću. Ljudski organizam ga ne proizvodi, pa treba uzimati najmanje 55 µg selena dnevno, stariji ljudi oko 70-80 µg.

Pored selena iz grupe oligoelemenata sa antioksidativnim osobinama, treba izdvojiti i cink koji je važan za funkcionisanje i formiranje mnogih enzima u telu i za razvoj belih krvnih zrnaca. Cink ulazi u sastav SOD koja katalitički odstranjuje slobodne radikale superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot -}$). Pored cinka SOD sadrži i bakar. Mitohondrijalna SOD sadrži mangan umesto bakra i cinka. Preporučena dnevna doza cinka je 8 mg dnevno za žene i 11 mg za muškarce. Najbolji izvori cinka u hrani su ostrige, ćuretina, teleća i svinjska džigerica, žumance, sir i riba. Integralne žitarice, seme bundeve, mahunarke, orasi, zrna lana i susama takođe sadrže veliku količinu cinka. Apsorpcija cinka iz namirnica biljnog porekla je lošija nego iz namirnica životinjskog porekla (Mandić, 2007).

CoQ₁₀ (koenzim Q₁₀) ili ubihinon je biološki aktivna supstanca koja deluje slično vitaminima. Sastavni je deo respiratornog lanca, ima važnu ulogu u procesima stvaranja i prenosa energije, i neophodan je za normalno odvijanje svih životnih funkcija organizma. Drugim rečima CoQ₁₀ je "akumulator" svake ćelije. Pored toga što je CoQ₁₀ inicijator oksidativnog lanca u mitohondrijama, on u svom redukovanom obliku (ubihinol) deluje kao prirodni intraćelijski antioksidans. Redukovani oblik CoQ₁₀ (sa -OH grupom, ubihinol) otpuštanjem 2 elektrona

pretvara se u oksidovani oblik (sa =O grupom, ubihinon). Isto takvom lakoćom oksidovani oblik CoQ₁₀ preuzima dva elektrona, i u suštini par: ubihinol/ubihinon funkcioniše na identičan način kao neki od prirodnih ćelijskih antioksidanasa, poput para oksidovani glutation (GSH) /redukovani glutation (GSH). Reverzibilna priroda redoks sistema CoQ₁₀ omogućava da prenese elektrone u respiratornom lancu mitohondrija u procesu oksidativne fosforilacije glukoze koja generiše ćelijsku energiju. U novije vreme mnogo se istražuje uticaj ovog koenzima na usporavanje i poboljšanje neurodegenerativnih promena i mikroangiopatija nastalih kao posledica šećerne bolesti. Postoje tri izvora CoQ₁₀: endogena sinteza, ishrana i dijetetski suplementi. Najbogatiji prirodni izvor koenzima CoQ₁₀ su: pečurka kordiceps, reishi, shiitake, ribe skuša, haringa, losos, sardina, goveđe srce, goveđa jetra i piletina. Smatra se da je potrebno da zdrave osobe unose 30 mg CoQ₁₀ dnevno, ali taj unos je teško postići samo putem ishrane. Posebno ljudima iznad 35 godina starosti preporučuje se svakodnevno obavezno uzimanje između 30-60 mg CoQ₁₀ putem suplemenata, jer nivo CoQ₁₀ u organizmu opada sa starenjem (Al-Hasso, 2000).

U prirodi postoji čitav niz različitih derivata folne kiseline (folacin, vitamin B₉) u biljnim i životinjskim tkivima. Oni se nazivaju folati i ima ih nekoliko različitih vrsta i razlikuju se po količini u kojoj se apsorbuju iz hrane. Obično se samo jedna polovina do dve trećine folata iz hrane može apsorbovati. Folati su osetljivi na temperaturu i razgrađuju se u vodi tako da kuvanje znatno smanjuje njihove koncentracije u hrani. Isti je slučaj i kad namirnice predugo stoje. Najviše ih ima u kvascu, jetri, bubregu i u zelenom povrću (po zelenom povrću folna kiselina je i dobila ime: lat. *folium* = list). Dnevne potrebe za folnom kiselinom su 150-200 µg. Hranom dnevno unesemo oko 500 do 700 µg folata, od kojih se apsorbuje 50 do 200 µg, zavisno od potreba metabolizma. U trudnoći su povećane potrebe za folnom kiselinom, oko 400 µg. Neophodna je kod rasta eritrocita i njezin nedostatak može izazvati megaloblastičnu anemiju. Folna kiselina nije aktivna sama po sebi, nego se u organizmu redukuje u tetrahidrofolnu kiselinu, uz pomoć askorbinske kiseline. Osnovna uloga folata je formiranje folatnog kofaktora potrebnog za metaboličke procese u kojima se dešava prenos funkcionalnih grupa sa jednim C atomom, potrebnim za sintezu DNK. Folati učestvuju u sintezi timina iz uracila i u razgradnji histidina u glutaminsku kiselinu. Učestvuju i u procesima pretvaranja serina u glicin i u sintezi metionina iz homocisteina. Treba znati da bez vitamina B₁₂ nije moguća ni funkcija folne kiseline koja je neophodna za sintezu DNK. Naime, vitamin B₁₂ je neophodan za pretvaranje folata u prekursor folatnog kofaktora H₄folat koji je neophodan za sintezu DNK (Mandić, 2007).

Fitoestrogeni su biljni hormoni koje sadrže različite biljke, posebno soja i mahunarke. Sadrže materije slične hemijske strukture kao kod estrogena. Fitoestrogeni se dele na tri velike grupe: izoflavanoidi, lignani i kumestanini. Fitoestrogeni pokazuju i proestrogensko i antiestrogensko delovanje. Kada u organizmu nema dovoljno estrogena tada aktivni metaboliti fitoestrogena zaposedaju receptore za estrogen i pokazuju delovanje slično estrogenu, ali znatno slabije. Ako se konzumira hrana koja pogoduje razgradnji estrogena i njegovoj eliminaciji iz organizma (kupus, kelj, brokula, itd.) dolazi do značajnog sniženja opasnosti od štetnog delovanja estrogena (Thanos i sar., 2006).

Postoji preko 600 izoflavanoida i izoflavoni su najpoznatija grupa. Izoflavoni se nalaze u mahunarkama posebno soji, sočivu, crvenoj detelini, grašku i pasulju. Najpoznatiji izoflavoni su genistein, daidzein, glicitein, biohanin A i formononetrik. Pozitivno delovanje izoflavona nije ograničeno samo na estrogensko delovanje. Postoje i istraživanja koja govore da izoflavoni povećavaju apoptozu ćelija (sama ćelija sprovodi programiranu smrt i ne javlja se zapaljenska reakcija), inhibiraju angiogenezu (nastanak novih krvnih žila potrebnih za rast karcinoma),

smanjuju nastanak slobodnih radikala kiseonika, smanjuju nastanak trombina i aktivaciju pločastih ćelija, povećavaju aktivnost receptora lipoproteina niske gustine, inhibiraju enzim 5-alfa reduktazu koja učestvuje u pretvaranju testosterona u kancerogeni dihidrotestosteron (Setchell i Cassidy, 1999).

Lignane sadrže žitarice, voće i povrće. Najviše ih ima u semenkama lana, pšenici, žitu, ječmu, hmelju, pirinču, susamu, crvenoj detelini, maslinovom ulju, kajsijama, breskvama i jagodama. Lignani su vrsta vlakna, a u isto vreme i vrsta fitoestrogena – hemijski slični ljudskom hormonu estrogenu. Seme lana je najbogatiji izvor lignana. Lignani se delovanjem bakterija u digestivnom traktu pretvaraju u supstance kao što je estrogen – nazivaju se enterodiol i enterolakton, a smatra se da imaju preventivno dejstvo protiv tumora. Lignani i ostali sastojci lanenog semena imaju antioksidativne karakteristike – odnosno mogu da smanje štetno dejstvo slobodnih radikala koji uništavaju ćelije. Ulju lanenog semena nedostaju lignani, ali ih neki obrađivači dodaju u ulje. Osim lignana, laneno seme i njegovo ulje su, takođe, najbolji hranljivi izvor esencijalne masne kiseline α -linolenske kiseline. Esencijalne masne kiseline su važne za ćelijske membrane, regulaciju krvnog pritiska i ostale funkcije. α -Linolenska kiselina (ω -3) slična je nekim masnim kiselinama u ribljem ulju. Kao aspirin, ω -3 kiseline mogu da smanje zgrušavanje krvi, pa samim tim smanjuju šansu od smrtonosnog srčanog udara. Seme lana i njihovo ulje mogu takođe da snize ukupan holesterol u krvi, kao i LDL ("loš" holesterol). Osim ulja lanenog semena i kanola ulja, α -linolenska kiselina je pronađena i u ulju soje i oraha (Burdge i Calder, 2005).

Kumestanini se nalaze u klicama. Najpoznatiji kumestan je kumestrol iz sojinih klica, crvene deteline, lucerke i brokolija. Neke studije su pokazale da kumestatini iz crvene deteline imaju šest puta veću aktivnost za regulaciju estrogena u organizmu od izoflavonoida koji se nalaze u soji. Pored toga, glavna razlika između izoflavonoida koji se mogu ekstrahovati iz semena soje i izoflavonoida koji se mogu izolovati iz crvene deteline je u tome što crvena detelina sadrži četiri izoflavonoida: genistein, daidzein, biohanin A i formononetrik, dok seme soje sadrži samo genistein i daidzein (Medjakovic i Jungbauer, 2008).

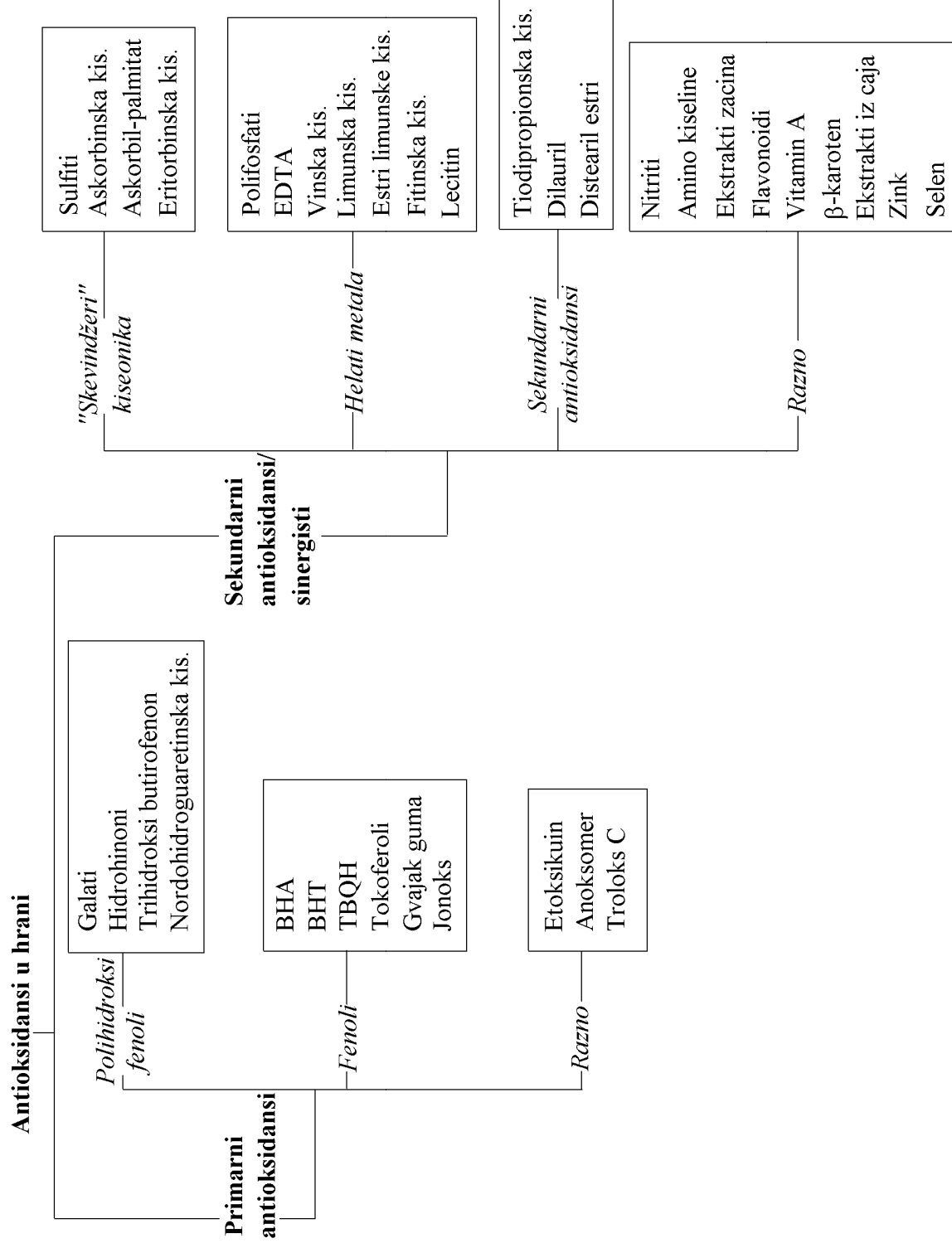
2.4. Vrste antioksidanasa u prehrambenoj industriji

2.4.1. Antioksidansi kao aditivi

Masti, ulja i hrana koja sadrži lipide se zagrevanjem ili dugotrajnim skladištenjem kvare jer pod navedenim uslovima podležu degradacionim procesima. Glavni proces koji se pri tome odigrava su reakcije oksidacije lipida i razlaganje oksidacionih proizvoda, koji rezultuju smanjenjem nutritivne vrednosti, senzornog kvaliteta i, na kraju, bezbednosti hrane usled formiranja potencijalno toksičnih jedinjenja. Usporavanje ovih procesa oksidacije je važno kako za proizvođače tako i za potrošače. Oksidacija prehrambenih proizvoda se može inhibirati pakovanjem u modifikovanu atmosferu, korišćenjem niskih temperatura, inaktivacijom enzima koji katališu oksidaciju, sniženjem pritiska kiseonika i korišćenjem odgovarajućeg pakovanja (Pokorny, 2001).

Pored toga, u cilju zaštite od oksidacije koriste se specifični aditivi koji inhibiraju oksidaciju. Oni se pravilno nazivaju inhibitori oksidacije, ali je rasprostranjeniji naziv antioksidansi. Antioksidativno dejstvo jedinjenja koja inhibiraju oksidaciju tj. antioksidanasa zavisi od mnogih faktora, kao što su sastav lipida, koncentracija antioksidansa, temperatura, pritisak kiseonika, prisustvo ostalih antioksidanasa i drugih uobičajenih sastojaka hrane, na primer proteina i vode. Prvi antioksidansi koji su se koristili za konzervisanje hrane su bili začini. Oni su međutim zamenjeni sintetskim supstancama koje su jeftinije, utvrđene čistoće i poseduju ujednačenija antioksidativna svojstva. Zbog toksikoloških razloga prekomerna upotreba sintetskih antioksidanasa je dovedena u pitanje, a zahtevi potrošača su usmereni ka korišćenju prirodnih antioksidanasa (Pokorny, 2001).

Aditivi predstavljaju svaki sastojak koji se iz tehnoloških razloga dodaje namirnici tokom proizvodnje, prerade, obrade, pakovanja, transporta ili čuvanja, sa svrhom da poboljšaju bezbednost, hranljivu vrednost, izgled, ukus, konzistenciju i boju. Pored toga što se antioksidansi već duže vreme koriste kao aditivi u prehrambenoj industriji, njihova upotreba ima značajnu biološku ulogu jer ujedno unosimo i hranjive materije. Da bi se mogli koristiti u prehrambenoj industriji antioksidansi treba da zadovolje nekoliko uslova. Antioksidansi ne treba da daju nesvojstvenu boju, miris ili ukus namirnicama čak i posle dužeg skladištenja. Trebali bi da budu delotvorni najmanje jednu godinu na temperaturama između 25 i 30 °C, i da budu stabilni prema termičkoj obradi ("carry-through" efekat), da se lako inkorporiraju i da budu efikasni i u niskim koncentracijama. Antioksidansi koji su rastvorljivi u mastima/ulju mogu biti dodati direktno istopljenim životinjskim mastima ili biljnom ulju. U nekim slučajevima, ipak bolji rezultati su postignuti kada je antioksidans primenjen u sredstvu za razblaživanje (propilen glikol ili isparljivi rastvarači). Namirnice mogu biti poprskane ili potopljene u rastvore ili suspenzije antioksidanasa, ili mogu biti pakovane u slojeve koji sadrže antioksidanse. Opšte je pravilo da ako se želi zaštititi komponenta koja je rastvorljiva u vodi koristi u vodi rastvorljiv antioksidans, dok ako se žele zaštititi masti/ulja bira se u mastima/uljima rastvorljiv antioksidans (Watson, 2002). Tehnološki zahtevi za antioksidanse koji se koriste u prehrambenoj industriji uključuju nisku isparljivost i stabilnost (da bi se izbegli gubici tokom prerade i čuvanja), sposobnost da štite od oksidacije pri niskim koncentracijama, rastvorljivost i kompatibilnost sa ostalim komponentama supstrata koji podleže oksidaciji, netoksičnost i neiritirajući karakter pri efikasnim koncentracijama, i sposobnost da ne dodeljuju boju, miris ili ukus finalnom proizvodu (Watson, 2002).

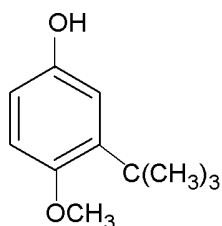


Slika 2.5 Klasifikacija antioksidanasa u hrani (Madhavi i sar., 1996)

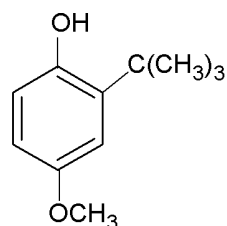
2.4.2. Sintetski antioksidansi

U prehrambenoj industriji najčešće se koriste sledeći sintetski fenolni antioksidansi:

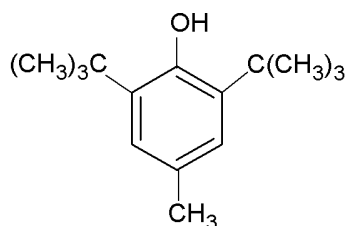
- 1) Butilovani hidroksianizol (BHA, E 320) predstavlja smešu izomera 2-*terc*-butil-4-hidroksianizola (15 %) i 3-*terc*-butil-4-hidroksianizola (85 %). BHA je bela kristalna supstanca, lipofilan i nerastvoran u vodi koristi se u žitaricama, životinjskim mastima, biljnim uljima, krompirima, suvim kvascima, žvakaćim gumama, pekarskim i mesnim proizvodima.
- 2) Butilovani hidroksitoluen (BHT, E 321) je bela kristalna supstanca, slična BHA s kojim pokazuje dobar sinergizam. Manje je termički otporan od BHA.
- 3) *Terc*-butilhidrohinon (TBHQ, E 319) je smeđi puder, najdelotvorniji je za većinu masti i ulja, koristi se za stabilizaciju visoko nezasićenih biljnih ulja, i
- 4) Estri galne kiseline, galati (E 310 - E 312), na primer propilgalat (PG, E 310) - bela kristalna supstanca, koristi se za stabilizaciju životinjskih masti i biljnih ulja, ali nije preporučljiv kod prženja pri temperaturama većim od 190 °C jer veže jone gvožđa.



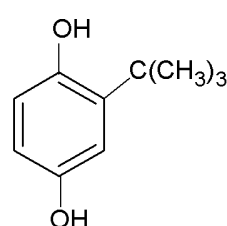
2-*terc*-butil-4-hidroksianizol (2-BHA)



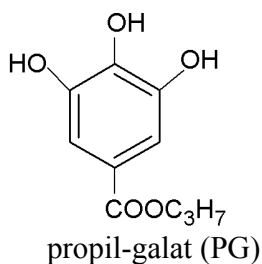
3-*terc*-butil-4-hidroksianizol (3-BHA)



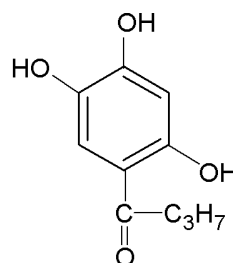
2,6-di-*terc*-butil-4-metilfeno (BHT)



terc-butil-hidrohinon (TBHQ)



propil-galat (PG)

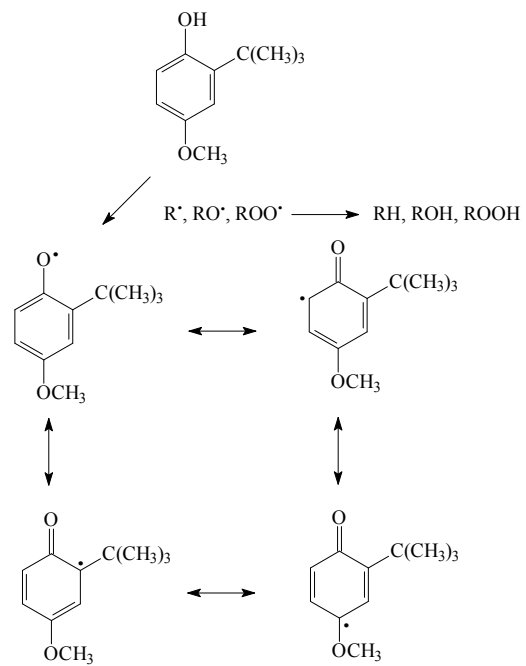


2,4,5-trihidroksibutirofeno (THBP)

Slika 2.6 Sintetski antioksidansi

Sintetski antioksidansi kao što su BHA, BHT i galati su uvedeni 1940. Oni su uvek supstituisani sa alkil grupama da bi se pospešilo njihovo rastvaranje u mastima i uljima. Maksimalna količina sintetskih antioksidanasa koja je dozvoljena da uđe u sastav namirnice je 0,02 % u odnosu na sadržaj masti ili ulja u namirnici. TBHQ ima najveću primenu za usporavanje oksidacije biljnih ulja. BHA i BHT su prilično termički stabilni, i zato se uvek koriste za stabilizaciju masti u pečenim i prženim proizvodima. Antioksidansi koji su termički stabilni nazivaju se "carry-through" antioksidansi. Nedostatak upotrebe galata je taj što grade komplekse sa jonima metala (Fe, Cu i dr.), koji mogu obojiti masti i ulja i to što su termički osetljivi. Zbog toga često se BHA i BHT koriste u kombinaciji sa galatima i pokazuju sinergističko dejstvo. Nakon pojave sintetskih antioksidanasa u prehrambenoj industriji često se nametalo pitanje njihove sigurnosti po zdravlje čoveka. Od 1980. postoji velika potražnja za prirodnim antioksidansima većinom zbog nepovoljnih toksikoloških izveštaja mnogih sintetskih antioksidanasa. Upotreba nekih sintetskih antioksidanasa je potpuno zabranjena u industriji hrane zbog mogućih neželjenih efekata, kao što su alergije i mogući kancerogeni efekti koji su nađeni u studijama na laboratorijskim životinjama (Rizvi, 1994). Stoga, veliki broj novijih istraživanja bio je usmeren prema identifikaciji novih antioksidanasa iz prirodnih izvora (Yanishlieva, 2001).

Prilični naponi takođe su učinjeni ka razvoju novih jedinjenja sa jačim antioksidativnim osobinama. Rađena su ispitivanja novih sintetskih polimernih jedinjenja koja nisu apsorptivna i nisu toksična. Ovo se generalno odnosi na hidroksi-aromatične polimere sa različitim alkil- i alkoholnim supstuentima. Ova jedinjenja su obično glomazni molekuli i njihova apsorpcija iz intestinalnog trakta je praktično nula. Pored njihove ustanovljene visoke antioksidativne aktivnosti, oni su neisparljivi pod uslovima "deep-fat" prženja, ali još nisu dozvoljeni za upotrebu od strane *Food and Drug Administration* (FDA). Takođe, sintetski analozi ili derivati α -tokoferola koji imaju bolje antioksidativno dejstvo od α -tokoferola ispituju se za moguću primenu. Mnogo prirodnih antioksidanasa kao što su flavonoli, flavoni, katehini iz lišća čaja, antioksidansi iz ruzmarina i ekstrakti začina pokazali su se aktivnijim od BHA, BHT ili tokoferola u modelovanim sistemima, ali primena ovih jedinjenja treba da bude ispitana dalje. Toksikološki efekti antioksidanasa u hrani bili su u središtu diskusije u poslednje vreme. Toksikološke studije su većinom izvođene da bi se ustanovila dozvoljena dnevna doza (*Acceptable Daily Intake* – ADI - definisana kao proračun količine aditiva u hrani ili piću, izražena na osnovu telesne težine osobe, koja se može uneti u organizam dnevno, za vreme životnog veka bez određenog rizika). Upotreba sintetskih antioksidanasa kao što su BHT, BHA, i galati nije dozvoljena u Evropskoj Uniji (EU) kada su u pitanju neke specifične namirnice kao što su hrana za bebe i mlađu decu (Watson, 2002).



Slika 2.7 Antioksidativno delovanje BHA

2.4.3. Prirodni antioksidansi

Prirodni antioksidansi igraju važnu ulogu u različitim sistemima:

1) u biljkama, deluju kao zaštitno sredstvo protiv zračenja ili mikrobnih infekcija,
2) u hrani oni inhibiraju ili potpuno sprečavaju nastajanje toksičnih produkata koji nastaju pri oksidaciji lipida, i na taj način održavaju nutritivni kvalitet i produžavaju rok trajanja namirnica; i

3) u biološkim sistemima, zajedno sa endogenom odbranom (enzimi, vitamini, proteini itd.), antioksidansi u obliku dijetetskih preparata mogu sprečiti ili usporiti oksidativni stres prouzrokovan slobodnim radikalima (Willcox i sar., 2004).

Empirijska upotreba prirodnih jedinjenja kao antioksidanasa je veoma duga. Najviše se koriste za pripremu i konzervisanje mesa, ribe, sira i ostale hrane bogate mastima/uljima. Prirodni antioksidansi se odnose na supstance koje nastaju i koje se mogu ekstrahovati iz biljnog ili životinjskog tkiva, i na one supstance koje se mogu formirati kao rezultat kuvanja ili pripreme biljnih i životinjskih sastojaka hrane. Prirodni antioksidansi se mogu naći u skoro svim biljkama, mikroorganizmima, gljivama, pa čak i u životinjskom tkivu. Većina prirodnih antioksidanasa su fenolna jedinjenja tj. polifenoli, a najvažnije grupe prirodnih antioksidanasa su *tokoferoli*, *flavonoidi* i *fenolne kiseline* (Yanishlieva, 2001).

Začini i biljke se dodaju hrani ne samo radi poboljšanja ukusa i mirisa, već i za produženje roka trajanja namirnica. Pod začinima se podrazumevaju proizvodi biljnog porekla, svojstvenog mirisa i ukusa, koji se dodaju prehrambenim proizvodima i pićima radi postizanja odgovarajućeg mirisa i ukusa ili radi bolje svarljivosti tih proizvoda. To su u širem smislu pravilnika (Sl. list SFRJ, broj: 4/85 i 84/87) aromatični delovi (koren, kora, list, cvet, plod ili semenka) sledećih začinskih biljaka:

- 1) ANIS (*Pimpinella anisum* L.)
- 2) BELI BIBER (*Piper nigrum* L.)
- 3) CRNI BIBER (*Piper nigrum* L.)
- 4) BOSILJAK (*Ocimum basilicum* L.)
- 5) CELER (*Apium graveolens* L.)
- 6) CIMET (*Cinnamomum zeylancium blume* i *Cinnamomum aromaticum* C. G. Ness)
- 7) ČILI (*Capsicum frutescens* L.)
- 8) ČUBAR (*Saturela hortensis* L.)
- 9) DESPIK (*Lavandula spica* L.)
- 10) ĐUMBIR (*Zingiber officinale* Roscoe)

- 11) ESTRAGON (*Artemisia dracunculus* L.)
- 12) IĐIROT (*Acorus calamus* L.)
- 13) ISIOT (*Cucurbita zedoaria* Rose)
- 14) KARANFILIĆ (*Eugenia caryophyllus* C. Sprengel)
- 15) KIM (*Carum carvi* L.)
- 16) KORIANDER (*Coriandrum sativum* L.)
- 17) KARDOMOM (*Elettaria cordamomum* L. Maton var. *miniscula* Burkill)
- 18) KADULJA (*Salvia officinalis* L.)
- 19) KLEKOVE BOBE (*Juniperus communis* L.)
- 20) KURKUMA (*Curcuma longa* L.)
- 21) KUMIN (*Cuminum cyminum* L.)
- 22) LOVOR (*Laurus nobilis* L.)
- 23) BELI LUK U PRAHU (*Allium sativum* L.)
- 24) CRNI LUK U PRAHU (*Allium cepa* L.)
- 25) MAJORAN (*Majorana hortensis* Moench syn. *Origanum majorana* L.)
- 26) MIROĐIJA (*Anethum graveolens* L.)
- 27) MORAČ (*Foeniculum vulgare* P. Miller)
- 28) MUSKATNI ORAH (*Muristica fragrans* Houttuyn)
- 29) PAPUANSKI MUSKATNI ORAH (*Myristica argentea* L.)
- 30) MUSKATNI CVET (*Myristica fragrans* Houtt., *Myristica argentea* L.)
- 31) NANA (*Mentha piperita* L.)
- 32) PAPRIKA ZAČINSKA (*Capsicum annum* L.)
- 33) PIMENT (*Pimenta officinalis* Berg)

- 34) PERŠUN (*Petroselinum crispum* P. Miller, Nyman ex A. W. Hill)
- 35) RUZMARIN (*Rosmarinus officinalis* L.)
- 36) ROGAČIĆ-TRIPLAT (*Trigonella foenum-graccum* L.)
- 37) SELEN (*Levisticum officinale* Koch)
- 38) BELA SLAČICA (*Sinapis alba* L.)
- 39) CRNA SLAČICA (*Brassica nigra* L., W.D.J. Koch)
- 40) ŠAFRAN (*Crocus sativus* L.)
- 41) ŠAFRANIKA (*Carthamus tinctorius* L.)
- 42) TIMIJAN (*Thumus vulgaris* L.)
- 43) VANILA (*Vanilla fragrans* - Salisburi Ames scyn. *Vanilla planifolia* Andrews)
- 44) ORIGANO (*Origanum vulgare* L.)
- 45) ZVEZDASTI ANIS (*Illicium verum* J.D. Hooker).

Propisani kriterijumu za ocenu kvaliteta začina su:

- 1) organoleptička svojstva,
- 2) maksimalno dopuštena količina pepela i peska,
- 3) minimalna količina etarskog ulja i
- 4) stepen kontaminacije bakterijama.

Prva sistematska studija o antioksidativnim osobinama biljaka je nastala pedesetih godina dvadesetog veka, kada su Chipault i sar. izvršili upoređivanje antioksidativne aktivnosti 72 različita začina u različitim supstratima. Chipault i sar. (1952. i 1956) su pokazali da 32 začina imaju antioksidativnu aktivnost, među kojima ruzmarin i žalfija predstavljaju najbolje izvore antioksidanasa. Pored njih piment, karanfilić, muskatni orah, čubar, origano, kurkuma, đumbir, majoran, menta i timijan takođe pokazuju značajnu antioksidativnu aktivnost. Od svih ovih začina origano je najefikasniji u hrani bogatoj lipidima. Karnosolna i ruzmarinska kiselina su najznačajnija fenolna jedinjenja u ekstraktu ruzmarina i veruje se da karnosolna kiselina najviše doprinosi antioksidativnoj aktivnosti ekstrakta ruzmarina i žalfije (Schwarz i Ternes, 1992; Okamura i sar, 1994; Cuvelier i sar., 1996). Brojne kasnije studije su potvrdile antioksidativnu aktivnost ruzmarina i žalfije i dovele do komercijalne primene ovih biljaka (Bracco i sar., 1981). Antimikrobno i antioksidativno dejstvo začina je različito i zavisi od sadržaja aktivnih komponenti tj. od sadržaja etarskih ulja i fenolnih jedinjenja. Aktivne komponente prisutne u začinima koje pokazuju antioksidativne osobine su fenolne kiseline, flavonoidi, prirodni pigmenti

(npr. kapsaicin u paprici) i diterpeni (npr. rosmanol, karnosol, karnosolna kiselina, epirosmanol, izorosmanol iz ruzmarina i žalfije) (Cuvelier i sar., 1994). Upotrebom začina u hrani se ne rešava problem kontaminacije namirnica, jer treba znati da količine začina koje se koriste u prehrambenim proizvodima i pićima, i koje se obično koriste radi postizanja određenih senzornih svojstava hrane, nisu dovoljne da ispolje antibakterijsko i antioksidativno dejstvo začina. S druge strane, mnogi začini, njihove smeše ili ekstrakti začina ponekad mogu i sami biti kontaminirani, što znači da se moraju pre upotrebe u prehrambenim proizvodima, primeniti odgovarajući postupci dekontaminacije (sterilizacija ekstrakata začina, sterilizacija začina gama zracima, fumigacija začina etilenoksidom, itd.). Zahvaljujući sadržaju etarskih ulja, neki začini (paprika, beli luk, crveni luk) deluju bakteriostatski, pa čak i baktericidno na određene vrste sporegenih bakterija *Streptococcus*, *Staphylococcus*, koliformne bakterije, *Proteus* vrste. Beli luk pokazuje jako baktericidno delovanje i prema sporegenim aerobnim bacilima.

U tabeli 2.7 prikazana je vrednost stabilizirajućeg faktora ($F=IP_{add}/IP_0$) nekoliko začina gde je IP_{add} – indukcioni period ili stabilnost prema oksidaciji u prehrambenom proizvodu kome je dodat aditiv, i IP_0 – indukcioni period u odsustvu aditiva. U tabeli 2.8 data je relativna antioksidativna efikasnost (RAE) začina u različitim supstratima. Može se zaključiti da je veoma važan uticaj supstrata koji se koristi za procenu antioksidativne aktivnosti začina (Yanishlieva i Heinonen, 2001).

Tabela 2.7 Stabilizirajući faktor F različitih začina u četiri prehrambena proizvoda

Supstrat	Mast/salo	Emulzija ulje u vodi	Komadi svinjskog mesa	Majonez
Temperatura čuvanja, °C	99	63	-5	20
Koncentracija začina u masti,%	0,2	0,1	0,25	0,2
Karanfilić	1,8	16,7	<5,3	1,4
Ruzmarin	17,6	10,2	<5,3	2,2
Žalfija	14,2	7,8	<5,3	2,4
Origano	3,8	7,9	<7,2	8,5
Čubar	1,6	7,9	1,0	1,5
Timijan	3,0	6,8	6,0	1,8
Đumbir	1,8	8,8	1,3	1,0
Kurkuma	2,9	15,9	4,5	0,9
Muškatni oraščić	3,1	9,2	5,3	0,9

Ograničenost primene prirodnih antioksidanasa u hrani uprkos njihovoj značajnoj antioksidativnoj aktivnosti uslovljeno je karakterističnom aromom biljnih ekstrakata i nepotpunim toksikološkim ispitivanjima. Ekstrakti biljaka koji štite prehrambene proizvode od lipidne peroksidacije, sadrže polifenole koji utiču na senzorna i organoleptična svojstva hrane, funkcionalnu i nutritivnu vrednost proteina prisutnih u hrani i kao i na teksturu hrane. Biljni ekstrakti poseduju veoma snažnu antioksidativnu aktivnost, pa nekad mogu delovati prooksidativno. Poznato je da neki biljni ekstrakti deluju prooksidativno pri primenjenim niskim koncentracijama, a da poseduju antioksidativnu aktivnost pri višim koncentracijama. Takođe je zapažen i suprotan efekat, tj. efekat antioksidativnog delovanja pri niskim koncentracijama i prooksidativno delovanje pri višim koncentracijama prirodnog antioksidansa u ispitivanom sistemu.

Tabela 2.8 RAE začina (cela biljka) u različitim supstratima

Začini	Supstrat	RAE
Majoran, muškatni oraščić, ruzmarin, beli biber, koriander, crni biber	Salo/mast	ruzmarin> žalfija> muškatni oraščić> beli biber> majoran
32 začina	Salo/mast	ruzmarin> žalfija> origano> muškatni oraščić > timijan
19 začina	Ulje-voda emulzija	karanfilić> cimet> žalfija> oraščić> origano
32 začina	Ulje-voda emulzija	karanfilić> kurkuma> piment> oraščić> ruzmarin
10 začina	Ulje-voda emulzija	karanfilić> piment> cimet> muškatni oraščić> đumbir
Piment, crvena paprika, majoran, beli biber, koriander, crni biber	čubar, Kobasica, voda	piment> crvena paprika> čubar> majoran > crni biber
15 začina	Kobasica, voda	žalfija> ruzmarin> paprika> majoran > anis
12 začina	Iseckano pileće meso	majoran> kim> nana> karanfilić

2.4.4. Komercijalni ruzmarinski ekstrakti

Ruzmarinski ekstrakt je jedini začin koji je komercijalno dostupan za upotrebu kao antioksidans u Evropi i Americi. Ruzmarinski ekstrakti sa antioksidativnim osobinama u Americi imaju status GRAS supstanci i deklarirani su da se mogu koristiti u bilo kojoj koncentraciji u svakoj od različitih vrsta primena. Oni su klasifikovani kao začinski ekstrakti (FDA 21 CFR 101.22) ili kao prirodni začini u direktivi Evropske Unije (EC 88/338). Proizvodi sa ovim ruzmarinskim ekstraktima imaju oznaku "clean" (Yanishlieva i Heinonen, 2001). "Clean label" je neformalni izraz koji se koristi da opiše funkcionalne sastojke za proizvodnju hrane koji su dobijeni bez hemijskih promena i koji sadrže vrlo male količine ili ne sadrže nimalo aditiva, konzervansa ili sintetskih sastojaka.

Prednosti upotrebe ruzmarinskih ekstrakata sa antioksidantskom aktivnošću su:

- njihova upotreba obezbeđuje "clean label"
- nema alergija, imaju status GRAS
- imaju oznaku "začinski ekstrakti" (FDA 21 CFR 101.22) ili "prirodni začini" (EU direktiva EC 88/338)
- nema legalnih restrikcija u upotrebi u EU, USA i Japanu.
- proizvodi bez GMO (genetički modifikovanih organizama)

Slovenačka firma Vitiva je proizvođač ruzmarinskih ekstrakata u Evropi. Ekstrakti ruzmarina koji se proizvode u Vitivi su:

- 1) VivOX[®] linija, ekstrakti koji su rastvorljivi u mastima
- 2) AquaROX[®] linija, ekstrakti koji su rastvorljivi u vodi
- 3) Inolens[®] linija, ekstrakti koji su visoko dearomatizovani i rastvorljivi u mastima
- 4) SineROX[®] linija, ekstrakti koji su rastvorljivi u mastima ili u vodi kojima su dodati sinergisti (supstance koje pojačavaju dejstvo)

Vitivini ruzmarinski ekstrakti su dostupni u praškastom i tečnom obliku, standardizovani na karnosolnu ili ruzmarinsku kiselinu, termički stabilni i pogodni za različite primene u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Antioksidanse bi trebalo dodati proizvodu u toku samog procesa proizvodnje da bi se obezbedila efikasna zaštita od samog početka. Za homogenu distribuciju antioksidansa unutar proizvoda, postoje rastvori koji omogućavaju aplikaciju putem raspršivanja, injektiranja, mešanja, gnječenja itd. Gotovi proizvodi se odlikuju dobrom rastvorljivošću aktivnih sastojaka, što dalje obezbeđuje uniformnu raspodelu unutar proizvoda. U tabelama 2.9 - 2.17 dati su primeri korišćenja određenih ruzmarinskih ekstrakata koji se dodaju mesu i mesnim proizvodima, uljima i mastima, ribi i ribljim proizvodima, različitim mešavinama začina, različitim vrstama sosova i preliva, konditorskim proizvodima i brzoj hrani, pekarskim proizvodima, različitim vrstama pića, različitim suplementima u ishrani da bi povećali antioksidativni kapacitet i uopšte nutritivnu vrednost ovih suplemenata.

Tabela 2.9 Ekstrakti ruzmarina koji se dodaju u mesne proizvode

Mesni proizvod	Ekstrakt ruzmarina	Preporučena doza
Šunka	VivOX 4 (301931)	1 g/kg računato na sadržaj masti Šunka koja sadrži malo masti: 0,3-0,5 g/kg
Trajna kobasica/salama	VivOX 4 (301847)	1 g/kg računato na sadržaj masti
Kobasice (sušene) Mortadela, Bologna, i slični tipovi kuvanih kobasica Frankfurter (dimljene kobasice), Hot dog	VivOX 4 (301847)	1 g/kg računato na sadržaj masti
Mozak	SineROX 4 (302008)	0,5-1 g/kg računato na finalni proizvod

Tabela 2.10 Ekstrakti ruzmarina koji se dodaju u ulja i masti

Vrsta ulja/masti	Ekstrakt ruzmarina	Preporučena doza
Jestivo ulje	Inolens 4 (301889)	0,7-1 g/kg
Ulje za prženje	Inolens 4 (301889)	1 g/kg
Pileća, svinjska mast	Inolens 4 (301889)	1 g/kg
Salo	Inolens 4 (301889), SineROX 3(302000)	1-1,5 g/kg

Tabela 2.11 Ekstrakti ruzmarina koji se dodaju ribi i ribljim proizvodima

Vrsta ribljeg proizvoda	Ekstrakt ruzmarina	Preporučena doza
Surimmi	Inolens 4 (301974), Inolens 4 (301924)	0,5-1 g/kg
Salate	Inolens 4 (301924)	0,5-1 g/kg
Komadi ribe u rastvoru,bride	Inolens 4 (301974)	0,5-1 g/kg
Komadi ribe u ulju	Inolens 4 (301889)	0,5-1 g/kg
Dimljena riba	Inolens 4 (301974)	0,5-1 g/kg
Pohovana riba	Inolens 4 (301974), Inolens 4 (301924)	0,5-1 g/kg
Riblje ulje i omega ulja (esencijalne masne kiseline)	Inolens 4(301889),SineROX4 (302002)	0,5-1 g/kg
Ribljji odresci	Inolens 4 (301974), Inolens 4 (301924)	0,5-1 g/kg

Tabela 2.12 Ekstrakti ruzmarina koji se dodaju u različite mešavine začina

Vrsta mešavine začina	Ekstrakt ruzmarina	Preporučena doza
Sušene mešavine za mesnu industriju	VivOX 20 (301801)	0,2 g/kg računato na sadržaj masti
	VivOX 4 (301803)	0,1 g/kg računato na sadržaj masti
Sušene supe	VivOX 20 (301801)	0,2 g/kg računato na sadržaj masti
Sos u prahu	VivOX 20 (301801)	0,2 g/kg računato na sadržaj masti
Različiti začini	VivOX 20 (301801)	0,2 g/kg računato na sadržaj masti

Tabela 2.13 Ekstrakti ruzmarina koji se dodaju u različite vrste sosova i preliva

Vrsta preliva/sosa	Ekstrakt ruzmarina	Preporučena doza
Majonez i prelivi sa majonezom	Inolens 4 (301889) ili VivOX 4 (301807)	0,5-1 g/kg
Prelivi za salate	Inolens 4 (301924)	0,5-1 g/kg
Kečap	Inolens 4 (301924)	0,5-1 g/kg
Mustard pasta	Inolens 4 (301924) ili VivOX 4 (301916)	0,5-1 g/kg
Pasta	VivOX 4 (301807)	0,5-1 g/kg
Kari sos	VivOX 4 (301807)	0,5-1 g/kg

Tabela 2.14 Ekstrakti ruzmarina koji se dodaju u industriji pića

Vrsta proizvoda	Ekstrakt ruzmarina	Preporučena doza
Napitci sa aromom limuna	Inolens 4 (301986)	1 g/kg računato na sadržaj etarskog ulja limuna
Za čuvanje svežine napitaka	AquaROX 10 (301984)	0,15-0,2 g/kg

Tabela 2.15 Ekstrakti ruzmarina koji se dodaju u konditorskoj industriji i brzjoj hrani

Vrsta hrane	Ekstrakt ruzmarina	Preporučena doza
Brza hrana, grickalice	Inolens 4 (301894) ili	1 g/kg računato na sadržaj masti
	VivOX 20 (301801)	
	Inolens 4 (301889) ili	1 g/kg računato na sadržaj masti
	VivOX 4 (301807)	
Pekarski proizvodi, konditorska industrija, premazi za sladolede	Inolens 4 (301986) ili	1 g/kg računato na sadržaj masti
	VivOX 2 (301919)	
Čokolada	Inolens 12 (301888)	0,2-0,3 g/kg
Punjenje za praline	Inolens 12 (301888)	0,2-0,3 g/kg

Tabela 2.16 Ekstrakti ruzmarina koji se dodaju u pekarstvu

Vrsta proizvoda	Ekstrakt ruzmarina	Preporučena doza
Torte i slatkiši	Inolens 12 (301888)	0,15-0,3 g/kg
Specijalni hlebovi	Inolens 12 (301888)	0,15-0,3 g/kg
Smrznuto testo i peciva	Inolens 12 (301888)	0,15-0,3 g/kg
Mrvice hleba	Inolens 12 (301888)	0,15-0,3 g/kg

Tabela 2.17 Ekstrakti ruzmarina koji se dodaju u suplemente u ishrani

Vrsta proizvoda	Ekstrakt ruzmarina	Preporučena doza
Kapsule, pilule, energetski napici u prahu	AquaROX 15 (301822)	Prema potrebnoj ORAC vrednosti,
	AquaROX 6 (301930)	AquaROX 6: ORAC: 5929 μ moleTE/g
	AquaROX 40 (301910)	AquaROX 40: ORAC: 14111 μ moleTE/g

ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)

2.4.5. Prednosti i nedostaci prirodnih i sintetskih antioksidanasa

Postoji velika razlika između načina proizvodnje sintetskih i prirodnih antioksidanasa koji se koriste u prehrambenoj industriji. Sintetski antioksidansi se proizvode kao čiste supstance konstantnog sastava, i primenjuju se pojedinačno ili u dobro definisanim smešama sa drugim čistim supstancama. Njihova upotreba je relativno laka, bez značajnih modifikacija procesa i radnih uslova. Suprotno od njih, prirodni antioksidansi su dostupni iz sirovog materijala koji je različitog sastava. Sadržaj aktivnih supstanci (obično je to smeša od nekoliko jedinjenja) kao i sadržaj ostalih supstanci, bilo da su neaktivne ili da poseduju veoma slabu aktivnost, zavisi od vrste biljke, agrotehnologije, klimatskih uslova, stepena zrelosti i mnogo drugih faktora. Njihov sastav trebalo bi određivati pri svakoj obradi, i ukoliko je potrebno, postupak pripreme i primene, kao i količina koja se dodaje u namirnicu trebalo bi prilagoditi prema analitičkim rezultatima. Najraširenija je upotreba onih "prirodnih" antioksidanasa koji se sintetski proizvode, ali su iste strukture kao i strukture prirodnih supstanci. U tu grupu spadaju tokoferoli, askorbinska i limunska kiselina, β -karoten itd. Mnogi drugi sastojci hrane koji poseduju antioksidativnu

aktivnost se koriste u svojoj prirodnoj formi, i to kao začini. Prethodna priprema ovih sastojaka hrane može biti sušenje (u slučaju lista ili stabljike), mlevenje osušenog materijala (kao što je seme), ili neki drugi mehanički tretman. Problem je što količine začina koje se koriste u prehrambenim proizvodima i pićima, imaju mali sadržaj antioksidanasa. Dodavanje velikih količina začina imalo bi negativan efekat na senzorne i funkcionalne osobine prehrambenih proizvoda.

Teško je dati precizna uputstva za sprečavanje lipidne oksidacije u hrani. Svaka namirnica ima svoju specifičnu podložnost oksidacionim promenama, zavisno od svog sastava, načina obrade, pakovanja i uslova čuvanja.

Prirodni antioksidansi se sve više traže od strane kupaca, i mogu dobiti zakonsku dozvolu mnogo lakše od sintetskih aditiva. Međutim, činjenica da je supstanca prirodnog porekla nije garancija da je ta supstanca potpuno netoksična. Sintetski antioksidansi su testirani na kancerogene i mutagene efekte, dok većina prirodnih antioksidanasa još uvek nisu testirani. Polje budućih ispitivanja je ispitivanje interakcija između antioksidanasa koji se primenjuju kao aditivi u prehrambenoj industriji i nutritivnih komponenti u hrani. Većina antioksidanasa koji se dodaju hrani kao na primer propil-galat, flavonoidi, α -tokoferol, karnosolna kiselina, katehini i vitamini mogu ubrzati oštećenje nelipidnih komponenti kao što su ugljeni hidrati i DNK slobodnim radikalima (Yanishlieva, 2001). Prednosti i nedostaci sintetskih i prirodnih antioksidanasa prikazani su u tabeli 2.18.

Tabela 2.18 Prednosti i nedostaci sintetskih i prirodnih antioksidanasa (Yanishlieva, 2001)

Sintetski antioksidansi	Prirodni antioksidansi
Jeftini	Skupi
Imaju široku primenu	Imaju ograničenu primenu
Tačno definisan hemijski sastav	Sadržaj aktivnih komponenti promenljiv
Sredstva sa jakim antioksidativnom aktivnošću	Pokazuju širok stepen antioksidativne aktivnosti
Smatraju se manje bezbednim za upotrebu	Ne smatraju se štetnim supstancama
Zabranjena je upotreba nekih	Sve više u upotrebi i veći broj primena
Slabo su rastvorljivi u vodi	Veliki spektar rastvorljivosti
Interes za njima opada	Interes za njima raste

2.5. Zakonska regulativa antioksidanasa

Upotreba prirodnih i sintetskih jedinjenja koja poseduju antioksidativne osobine u prehrambenoj industriji je ograničena precizno definisanim zakonskim regulativama. Usled različite molekulske strukture, različiti antioksidansi pokazuju velike razlike u efikasnosti kada se koriste u različitim vrstama namirnica i/ili kada su podvrgnuti različitim vrstama obrade i/ili različitim radnim uslovima. Problem izbora optimalnog antioksidansa komplikuje se i zbog teškoće u predviđanju kako će dodati antioksidans delovati u prisustvu prooksidanasa i antioksidanasa koji su već prisutni u namirnici. Toksikološka ispitivanja su odlučujuća u određivanju bezbednosti upotrebe antioksidanasa i u određivanju dozvoljene dnevne doze API.

Codex Alimentarius je zbirka međunarodno usvojenih standarda za prehrambene proizvode. Samo nekoliko sintetskih i prirodnih antioksidanasa je prihvaćeno kao GRAS supstance za upotrebu u prehrambenim proizvodima, od strane Food and Agriculture Organisation and World Health Organisation of United Nations (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - JECFA) i European Community's Scientific Committee for Food (SCF) (Watson, 2002).

Za mnoge antioksidanse i ostale aditive koji se smatraju bezbednim pod pretpostavljenim uslovima korišćenja, smatra se da nije uvek neophodno propisati maksimalnu količinu. U ovom slučaju koristi se izraz *quantum satis*. Većina prirodnih antioksidanasa može se dodati svim namirnicama po principu *quantum satis* (Watson, 2002).

2.5.1. Regulativa antioksidanasa u Evropskoj Uniji

Regulativa antioksidanasa u Evropskoj Uniji je detaljno opisana u direktivi European Parliament i Council Directive No. 95/2/EC od 20. februara 1995. godine i odnosi se na aditive u hrani koji ne pripadaju grupi boja i zaslađivača. Samo antioksidansi koji zadovoljavaju zahteve donešene od strane SCF mogu biti korišćeni u namirnicama. Imajući u vidu do sada dobijene naučne i toksikološke informacije o ovim supstancama, neke od njih su dozvoljene isključivo za određene namirnice i pod određenim uslovima korišćenja. U tabeli 2.19 prikazani su antioksidansi koji su opšte dozvoljeni i koji su uslovno dozvoljeni u hrani i namirnice u kojima se mogu koristiti (Watson, 2002; Mikova, 2001).

Tabela 2.19 *Regulativa antioksidanasa u Evropskoj Uniji*

Antioksidansi koji su opšte dozvoljeni u hrani			
E broj	Ime		Maksimalna količina (mg kg⁻¹)
E 300	Askorbinska kiselina		
	Estri masnih kis. sa askorbinskom kis.		
E 304	(i) askorbil-palmitat		
	(ii) askorbil-stearat		
E 306	Ekstrakti bogati tokoferolom		
E 307	α-tokoferol		<i>quantum satis</i>
E 308	γ-tokoferol		
E 309	β-tokoferol		
E 322	Lecitini		
E 330	Limunska kiselina		
E 334	Vinska kiselina		
Antioksidansi koji su uslovno dozvoljeni u hrani			
E broj	Ime	Hrana	Maksimalna količina (mg kg⁻¹)
E 310	Propil-galat		200* (galati i BHA
E 311	Oktil-galat		pojedinačno ili u
		Masti i ulja (za termički tretirane namirnice)	kombinaciji)
E 312	Dodecil-galat		izraženo u odnosu na
			masti
		Ulje i masti za prženje (izuzev maslinovog); riblje	100* (BHT) izraženo u
		ulje; goveđa, svinjska, ovčija i živinska mast	odnosu na masti
		Smesa za torte i kolače	
		Žitne kaše	
		Mleko u prahu	200* (galati i BHA
		Supe (dehidratisane)	pojedinačno ili u
E 320	BHA	Sos	kombinaciji)
		Meso (dehidratisane)	izraženo u odnosu na
		Prerađeno koštunjavo voće	masti
E 321	BHT	Začini	
		Unapred pripremljeni obroci od žita	
		Dehidratisan krompir	25 (galati i BHA,
			pojedinačno ili u
		Žvakaće gume	kombinaciji)
		Dodaci u ishrani	400 (galati, BHT i BHA,
			pojedinačno ili u
E 315	Eritorbinska kiselina	Polu-konzervisani i konzervisani mesni proizvodi	500 izraženo u odnosu na
			eritorbinsku kiselinu
E 316	Na-eritorbat	Polu-konzervisani i konzervisani proizvodi od ribe;	1500 izraženo u odnosu
		zamrznuta riba	na eritorbinsku kiselinu
		Emulgovan sos	75
		Konzervisane mahunarke, pečurke i artičoke	250
E 385	Ca-di-Na-etilendianim tetraacetat (EDTA)	Konzervisana	75
		riba, rakovi, jastog, puževi, školjke, hobotnice	
		Zamrznuti rakovi, jastog	75
		Minarine	100
E 512	Kalaj-hlorid	Konzervisane bele špargle	25 kao Sn

* Kada se koristi kombinacija galata, BHA i BHT, pojedinačna doza mora se smanjiti proporcionalno

2.5.2. Regulatoriva antioksidanasa u Americi

Neke od razlika između regulatorive antioksidanasa u Evropskoj Uniji i u Americi su:

- Upotreba sintetskih antioksidanasa kao što su TBHQ, THBP (trihidroksibutirofenon), anoksomer, etoksikvin, gvajak guma i derivati tioidipropionske kiseline nije dozvoljena u Evropskoj Uniji, a dozvoljena je u Americi.
- Upotreba sumpor(IV)-oksida i sulfita, limunske i vinske kiseline i njihovih soli, i soli EDTA nije dozvoljena u Americi, a dozvoljena je u Evropskoj Uniji.

Antioksidansi koji su propisani za određenu vrstu namirnica prikazani su u tabeli 2.20 (Watson, 2002; Mikova, 2001). Za namirnice za koje nije propisan standard, antioksidansi se dodaju prema uslovima i ograničenjima upotrebe koji su definisani u regulativama (*Code of Federal Regulations Title 21*, 1993). Za neke namirnice kao što su mlečni proizvodi, voćni sladoledi i proizvodi sa jajima propisan je standard da se u njih ne dodaju antioksidansi.

Tabela 2.20 Standardizovani proizvodi u kojima se koristi ograničen broj antioksidanasa

Namirnica	Antioksidans	Maksimalna količina (mg kg ⁻¹)
Nealkoholna pića (iz suvih smeša)	BHA	2
	BHT	zabranjen
Suve smeše za pića	BHA	90
	BHT	zabranjen
Žvakaće gume	BHA	1000
	BHT	
Životinjska mast, čvarena životinjska mast sa/bez biljnog ulja	Propil-galat	
	BHA	100 pojedinačno ili
	BHT	200 u kombinaciji
	Glicin	TBHQ ne bi trebalo koristiti u
	Propil-galat	kombinaciji sa glicinom, propil-
	Gvajak guma	galatom ili gvajak gumom
Margarin	TBHQ	
	Tokoferoli	300
	Propil-, oktil-, ili dodecil-galati	200
	BHA	
	BHT	TBHQ ne bi trebalo koristiti u
	Askorbil-palmitat	kombinaciji sa galatima, askorbil-
Račići, zamrznuti, sirovi	Askorbil-stearat	palmitatom i askorbil-stearatom
	TBHQ	
	BHA	200 (ukupni sadržaj)
	BHT	
	Askorbinska kiselina	
	Eritorbinska kiselina	
Voćni puteri, džemovi, žele, slatko	Kalcijum-, natrijum-askorbati	
	Tokoferoli	
	Askorbinska kiselina	1000
	Voće, glazirano, u kockama, sušeno	BHA
Voćni nektar	Askorbinska kiselina	150
Krompir, granule	BHA	10

Nastavak tabele 2.20

Namirnica	Antioksidans	Maksimalna količina (mg kg ⁻¹)
Krompir, pahuljice	BHT	50
Slanina, konzervisana	α -tokoferol	500
Mesa, sušena	BHA	100 pojedinačno ili u kombinaciji
	BHT	TBHQ i propil-galat ne bi trebalo koristiti u kombinaciji
	Propil-galat	
	TBHQ	
	Tokoferoli	30 ne treba koristiti u kombinaciji sa ostalim antioksidansima
Meso, prerađeno	Tokoferoli	30
Kobasice, sušene	BHA	30 pojedinačno
	BHT	60 u kombinaciji
	Propil-galat	TBHQ i propil-galat ne bi trebalo koristiti u kombinaciji
	TBHQ	
	Tokoferoli	30 ne treba koristiti u kombinaciji sa ostalim antioksidansima
Kobasice, govede paštete, preliv za pice, ćufte, živinsko meso, kuvano ili sirovo	BHA	100 pojedinačno
	BHT	200 u kombinaciji
	Propil-galat	TBHQ i propil-galat ne bi trebalo koristiti u kombinaciji
	TBHQ	
Živinsko meso	Tokoferoli	300 (200 u kombinaciji sa ostalim antioksidansima izuzev sa TBHQ)
	Lecitini	<i>quantum satis</i>
Cerealije za doručak, sušene	BHA	50
	BHT	
Čili puder, paprika	Etoksikvin	100
Dezerti (iz suvih smeša)	BHA	2
Stabilizatori emulzija	BHA	200
	BHT	
Supstance za začine	BHA	5000 u odnosu na sadržaj ulja
Smeše za dezerte	BHA	90
Kvasac (sirov, suv)	BHA	1000

2.5.3. Reglativa antioksidanasa u Australiji

Antioksidansi koji se smatraju dozvoljenim u Australiji propisani od strane NFA (*National Food Authority*) su:

- Galati (propil-, oktil-, i dodecil-, ili bilo koja smeša od toga)
- BHA
- BHT
- Lecitini (uključujući fosfolipide iz prirodnih izvora)
- Tokoferoli - mogu biti korišćeni sa ili bez limunske kiseline, jabučne kiseline, vinske kiseline, mlečne kiseline (pojedinačno ili u kombinaciji)
- Askorbinska kiselina i njena so sa natrijumom
- Eritorbinska kiselina i njena so sa natrijumom
- Askorbil-palmitat
- BHT (jedino za jezgra oraha, vitamin A i vitamin D)

Dozvoljeni antioksidansi koji se dodaju u ulja i masti su galati, BHA, TBHQ, tokoferoli, lecitini, askorbil-palmitat, tako da je maksimalna količina 0,1 % u odnosu na masti/ulja. Antioksidansi koji su dozvoljeni za upotrebu u ribljim proizvodima, proizvodima od voća i povrća i mesnim proizvodima su jedino askorbinska kiselina, eritorbinska kiselina i njihove soli sa natrijumom (Watson, 2002; Mikova, 2001).

2.5.4. Regulativa antioksidanasa u Japanu

Lista dozvoljenih antioksidanasa u regulativi Japana se odnosi samo na sintetske antioksidanse. Antioksidansi i namirnice u kojima se može koristiti propisana količina antioksidanasa prikazani su u tabeli 2.21. Izuzetak je α -tokoferol koji se obično i koristi u hrani kao antioksidans (Watson, 2002; Mikova, 2001).

Tabela 2.21 Regulativa antioksidanasa u Japanu

Antioksidans	Ograničenje	Maksimalna količina (mg kg ⁻¹)
BHA, ako se koristi u kombinaciji sa BHT, količina oba antioksidansa ne sme da prelazi propisanu količinu	Maslac	200
	Masti i ulja	200
	Zamrznuta riba, ljuskari, i meso kita	1000
	Pire od krompira (suvi)	200
	Slana riba, ljuskari	200
	Osušena riba, ljuskari	200
BHT, ako se koristi u kombinaciji sa BHA, količina oba antioksidansa, izuzev kod žvakaće gume, ne sme da prelazi propisanu količinu	Maslac	200
	Žvakaće gume	750
	Masti i ulja	200
	Zamrznuta riba, ljuskari, i meso kita	1000
	Pire od krompira (suvi)	200
	Slana riba, ljuskari	200
Izopropil-citrat (kao monopropil citrat)	Osušena riba, ljuskari	200
	Masti i ulja	100
	Konzervisana ili flaširana bezalkoholna pića	35
EDTA CaNa ₂ , EDTA Na ₂ (kao EDTA CaNa ₂)	Konzervisana ili flaširana hrana (izuzev bezalkoholnih pića)	250
	Jedino za upotrebu kao antioksidans	
Eritorbinska kiselina	Jedino za upotrebu kao antioksidans	
Na-eritorbat	Jedino za upotrebu kao antioksidans	
Norhidroguaiaretinska kiselina	Maslac	100
	Masti i ulja	100
Propil-galat	Maslac	100
	Masti i ulja	100
Gvajak guma	Maslac	1000
	Masti i ulja	1000
α -tokoferol	Jedino za upotrebu kao antioksidans	

2.6. Metode određivanja antioksidativne aktivnosti

2.6.1. Pregled metoda

Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti se mogu podeliti na više načina:

- 1) prema sistemu ispitivanja (*in vivo* i *in vitro*),
- 2) prema metodi detekcije (spektrofotometrijske, fluorimetrijske, hemiluminiscentne i ESR spektrometrijske) i
- 3) prema direktnosti određivanja (direktne sa ROS ili indirektne sa metalnim jonima). Ove metode se mogu podeliti i prema prisustvu lipida u sistemu (stepen inhibicije oksidacije lipidnog supstrata i merenje antioksidativne sposobnosti slobodnih radikala u sistemu koji ne sadrže lipide) i prema mehanizmu reakcije (prenos atoma vodonika, HAT (*hydrogen atom transfer*) metode i prenos jednog elektrona, SET (*single electron transfer*) metode) koja se odigrava između antioksidativnih jedinjenja i slobodnih radikala za koje se određuje antioksidativna aktivnost (Sanchez-Moreno, 2002; Prior i sar., 2005; Robards i sar., 1999).

Antioksidativni potencijal/aktivnost direktno je povezan s mogućnošću ispitivanog uzorka da preda elektron ili vodonik i na taj način "ugasi" radikal i spreči njegovu reaktivnost u daljim lančanim reakcijama. Postoji nekoliko različitih metoda za merenje ukupnog antioksidativnog kapaciteta (*Total Antioxidant Capacity* - TAC) i njihov broj još uvek je u porastu. Sve dok se ne postigne međunarodna saglasnost koja će se metoda ili metode primenjivati za ovu oblast istraživanja, teško je predstaviti jednostavnu i kompletnu sliku dosadašnjih saznanja o količini, opštoj efikasnosti (apsorpciji) i moći antioksidanasa u hrani koju koristimo.

Antioksidativna aktivnost se može izraziti na različite načine, uključujući procenat korišćenog reagensa, meru inhibicije oksidacije itd. Jednostavniji način da se predstavi antioksidativna aktivnost je da se pozove na zajednički usvojen standard (referentni standard). Npr. jedan od referentnih standarda je (S)-(-)-hidroksi-2,5,7,8-tetraetilhroman-2-karboksilna kiselina, takođe poznata kao Trolox, koja se koristi za izražavanje rezultata dobijenih pomoću nekih od metoda određivanja antioksidativne aktivnosti.

Tri glavne grupe metoda za merenje TAC (*Total Antioxidant Capacity*) su:

1. Reakcije prenosa atoma vodonika ili HAT (*hydrogen atom transfer*)

Većina metoda koje se baziraju na prenosu atoma vodonika odnose se na reakcije u kojima se antioksidans i supstrat "takmiče" prema peroksil radikalima proizvedenim putem termičkog razlaganja azo-jedinjenja (Somogyi i sar., 2007).

a) *Inhibition of induced low-density lipoprotein autooxidation*

Inhibicija indukovane autooksidacije lipoproteina niske gustine. Inicijatori oksidacije su Cu^{2+} joni ili AAPH (2,2-azobis(2-amidinopropane) dihidrohlorid).

b) ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

Kapacitet apsorpcije kiseonikovog radikala. Zasniva se na merenju efikasnosti različitih prirodnih antioksidanasa u sprečavanju oksidativne degradacije fluoresceina, nakon mešanja sa peroksil radikalima. Fluorescentni intenzitet fluoresceina slabi u toku njegove oksidacije, a u prisustvu antioksidanasa oksidativno raspadanje fluoresceina je sporije. Termičko raspadanje azo-jedinjenja kao što je AAPH (2,2-azobis(2-amidinopropan) dihidrohlorid) se koristi za nastajanje

peroksid radikala. Još uvek postoji niz ograničenja ORAC analize, kao npr. to da sušeno voće uvek daje veće vrednosti ORAC broja nego isto sveže voće. ORAC vrednost označava kolika količina analiziranog proizvoda ima isti kapacitet "hvatanja" slobodnih radikala kao i poznata količina oblika vitamina E koji je rastvorljiv u vodi, prema kom je ispitivanje standardizovano. U radu Wu i sar. (2004a) određivan je ukupni antioksidativni kapacitet (TAC) za veliki broj voća, povrća, koštunjavog voća, suvog voća, začina i žitarica. TAC je određivan kao suma ORAC vrednosti koja se odnosi na hidrofilne antioksidanse (H-ORAC) i ORAC vrednosti koja se odnosi na lipofilne antioksidanse (L-ORAC). U tabeli 2.22 prikazane su ORAC vrednosti za neke vrsta voća i povrća – TAC ($\mu\text{mol TE/ g hrane}$).

Tabela 2.22 Ukupni antioksidativni kapacitet (Wu i sar., 2004a)

Hrana	TAC	Hrana	TAC
Karanfilić (samleven)	3144,50	Avokado	19,30
Cimet (samleven)	2675,40	Kruške	19,10
Origano (osušeni)	2001,30	Breskve	18,60
Kurkuma (osušeni)	1592,80	Pomorandže	18,10
Peršun (suvi)	743,50	Ovas	17,10
Bosiljak (suvi)	675,50	Mandarine	16,20
Kari (puder)	485,00	Brokoli	15,90
Crni biber	301,40	Krompir	15,55
Slačica (puder)	292,60	Grejpfrut	15,50
Đumbir (samleven)	288,10	Integralni hleb	14,20
Čili (puder)	236,35	Brazilski orah	14,20
Paprika	179,20	Kupus	13,60
Pasulj	144,00	Kajsije	13,40
Orah	135,40	Krompir (crveni)	13,30
Lešnik	96,45	Crno grožđe	12,60
Brusnica	94,60	Šargarepa	12,20
Borovnice	92,60	Belo grožđe	11,20
Suve šljive	85,80	Krompir (beli)	10,80
Pistaći	79,80	Luk	10,30
Šljive	62,40	Mango	10,00
Kupina	53,48	Zelena salata	9,89
Malina	49,30	Rotkvice	9,50
Badem	44,50	Kivi	9,20
Jabuka	42,75	Banane	8,80
Urme	38,95	Ananas	7,90
Jagode	35,80	Artičoka	7,90
Smokve	33,80	Nektarine	7,50
Trešnja, višnja	33,60	Karfiol	6,50
Kikiriki	31,66	Grašak	6,00
Suvo grožđe	30,40	Celer	5,70
Spanać	26,40	Paradajz	3,40
Kupus	22,50	Dinja	3,10
Indijski orah	20,00	Lubenica	1,40

c) TRAP (*Total radical trapping antioxidant parameter*)

Ukupna sposobnost "hvatanja" radikala. Bazira se na merenju potrošnje kiseonika tokom kontrolisane lipidne peroksidacije, koja je indukovana peroksil radikalima koji se proizvode putem termičkog razlaganja azo-jedinjenja AAPH.

d) Carotenoid (*crocic*) bleaching assays

Stepen beljenja karotenoida "crocic" iz šafrana, određuje se kolorimetrijski. Peroksil radikali se stvaraju tokom termičkog razlaganja azo inicijatora AAPH. Antioksidativni potencijal supstance dodate u inkubacionu smešu je u funkciji inhibicije beljenja karotenoida "crocic".

e) TOSC (*Total oxidant Scavenging Capacity*) ili ukupni kapacitet "hvatanja" oksidansa.

Reakcijom između različitih ROS (peroksil radikala, hidroksil radikala i peroksinitrita) i α -keto- γ -metiltio-buterne kiseline (KMBA) koja se oksiduje i dobija se etilen koji može biti odvojen od ostalih sastojaka i kvantitativno određen pomoću gasne hromatografije (GC). Antioksidativni kapacitet testiranog jedinjenja se meri sposobnošću inhibicije formiranja etilena iz KMBA.

2. Reakcije prenosa jednog elektrona ili SET (single electron transfer)

Metodama koje se baziraju na prenosu jednog elektrona meri se kapacitet antioksidansa tokom redukcije oksidansa koji menja boju kada se redukuje. Stepem promene boje proporcionalan je koncentraciji antioksidansa (Somogyi i sar., 2007).

a) FCR (*Folin-Ciocalteu reagent*), određivanje ukupnog sadržaja fenola

Folin Ciocalteu-ova metoda određivanja ukupnih fenola. Metoda se bazira na reakcija Folin Ciocalteu-ovog (*Folin-Ciocalteu*) reagensa (kompleks fosfomolibden/fosfovolframne kiseline) sa redukujućim reagensom (fenolnim jedinjenjem/antioksidansom) pri čemu dolazi do pojave plave boje. Nakon sat vremena reakcije, u kojoj sva fenolna jedinjenja izreaguju sa Folin Ciocalteu-ovim (*Folin-Ciocalteu*) reagensom, spektrofotometrijski se odredi apsorbancija na 765 nm. Određena apsorbancija proporcionalna je intenzitetu nastale plave boje i koncentraciji antioksidansa. Kao standard se najčešće koristi galna kiselina i antioksidativna aktivnost uzoraka izražava u ekvivalentima galne kiseline (GAE).

b) FRAP (*Ferric ion reducing antioxidant power*)

Antioksidativni kapacitet zasniva se na merenju stepena redukcije kompleksa Fe(III)-tripiridiltriazina u plavi Fe(II)-kompleks.

c) CUPRAC (*Total antioxidant potential* koristeći Cu(II) kompleks)

Ukupni antioksidativni kapacitet, zasniva se na merenju stepena redukcije Cu (II) kompleksa

3. Kombinacija HAT (hydrogen atom transfer) i SET (single electron transfer)

a) TEAC (*Trolox equivalence antioxidant capacity*)

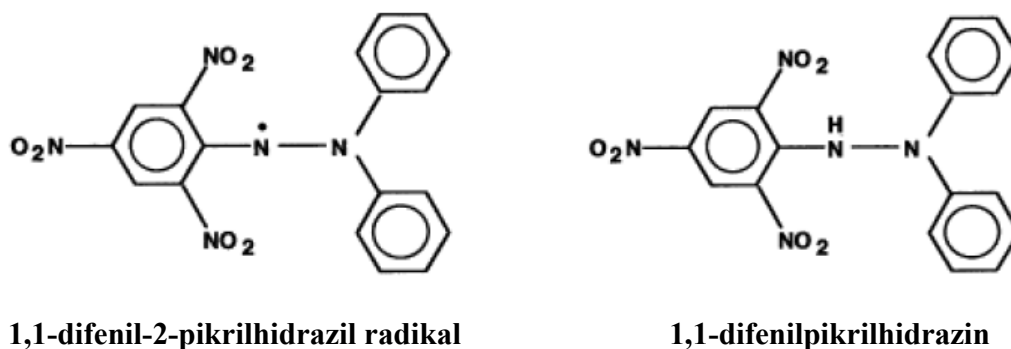
Antioksidativni kapacitet izražen kao koncentracija analoga vitamina E rastvorenog u vodi tj. u *Trolox* ekvivalentima, zasniva se na redukciji obojenog (plavo-zelenog) katjon radikala 2,2'-azonobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonata) (ABTS⁺). Obično se koristi kalijum-persulfat za oksidaciju ABTS radikala u radikal katjon ABTS⁺. Rezultati dobijeni ovom metodom se izražavaju kao TEAC.

b) DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal) metoda

DPPH metoda merenja antioksidativnog kapaciteta podrazumeva korišćenje stabilnog slobodnog radikala DPPH. Metoda se bazira na redukciji DPPH radikala. DPPH metoda je široko korišćena za ispitivanje sposobnosti antioksidativnih jedinjenja da se ponašaju kao "hvatači" slobodnih radikala, ili donori vodonika. Sa metodološkog stanovišta, smatra se da je ova metoda jednostavna i pouzdana za određivanje antioksidativne aktivnosti voća, povrća i biljnih ekstrakata, jer je ovaj radikal veoma stabilan (Sanchez-Moreno, 2002). Ova metoda se može

koristiti za uzorke u čvrstom i tečnom stanju, i nije vezana ni za jednu određenu antioksidativnu komponentu, nego se odnosi na ukupni antioksidativni kapacitet uzorka. Za prikazivanje rezultata DPPH metode koristi se parametar "efikasna koncentracija" EC_{50} vrednost (IC_{50}) koja se definiše kao koncentracija antioksidansa potrebna da smanji početnu koncentraciju DPPH radikala za 50% i određuje se spektrofotometrijski ili pomoću elektron spin rezonantne spektrometrije. Jača antioksidativna aktivnost znači da antioksidans ima nižu EC_{50} vrednost (Cuvelier i sar., 1992). Recipročna vrednost EC_{50} vrednosti $1/EC_{50}$ predstavlja parametar antiradikalske moći (*Antiradical Power* - ARP) (Becker i sar., 2004). Rastvor stabilnog DPPH radikala (zbog delokalizacije nesparenog elektrona) u etanolu daje jak maksimum apsorpcije na oko 520 nm i ružičaste je boje. Nakon reakcije DPPH radikala sa antioksidansom, smanjenje apsorpcije na određenoj talasnoj dužini prati se spektrofotometrijski. Rezultujuća dekolorizacija je stehiometrijska, uzimajući u obzir broj vezanih elektrona (Becker i sar., 2004). Predstavljanjem DPPH radikala sa Z i antioksidansa sa AH, pojednostavljena reakcija je: $Z + AH \rightarrow ZH + A^{\cdot}$.

Elektron spin rezonantna (Electron Spin Resonance, ESR) spektrometrija je metoda kojom je moguće direktno određivanje koncentracije slobodnih radikala. Antioksidativna aktivnost se određuje na osnovu relativnog smanjenja intenziteta ESR signala slobodnih radikala u prisustvu antioksidanasa, u odnosu na intenzitet ESR signala kada antioksidans nije prisutan (Becker i sar., 2004). Ova metoda se koristi za ispitivanje antioksidativne aktivnosti antioksidanasa na stabilne i nestabilne slobodne radikale. Isto kao u spektrofotometrijskoj metodi rezultati se predstavljaju pomoću parametra EC_{50} . Struktura DPPH radikala pre i posle redukcije pomoću antioksidansa je prikazana na slici 2.8.



Slika 2.8 Struktura DPPH radikala i DPPH nakon redukcije antioksidansom

2.6.2. Metode procene oksidativnih promena u hrani

Aktivnost prirodnih antioksidanasa, koji predstavljaju smeše ili multifunkcionalne sisteme koji deluju u kompleksnom medijumu, ne može biti pouzdano određena jednostavnom metodom, a primenom više različitih metoda za ispitivanje aktivnosti antioksidanasa dobijaju se kontradiktorni rezultati. Komparativna procena antioksidanasa je različita, jer u prehrambenim proizvodima i biološkim sistemima aktivnost zavisi od supstrata, medijuma, uslova oksidacije, međupovršinskih pojava, i raspodele svojstava antioksidanasa između faza. Afinitet antioksidanasa prema vazduhu, ulju, vodi i njihovo međudejstvo objašnjava zašto su polarni antioksidansi aktivniji u uljima dok su nepolarni antioksidansi aktivniji u emulzijama, pojava poznata kao "polarni paradoks". Naročito je važna potreba za priznatim, standardizovanim metodama za poređenje hrane i dijetetskih suplemenata radi obezbeđivanja kvalitetnih kriterijuma koji se tiču pitanja zakonske regulative i zdravstvenih zahteva. Određivanje antioksidativne aktivnosti je predloženo na različitim nivoima (Miquel i sar., 2004):

- 1) kvantifikacija i identifikacija aktivnih jedinjenja.
- 2) određivanje sposobnosti "hvatanja" radikala sa više metoda i u različitim rastvaračima.
- 3) određivanje inhibicije i zaštite od lipidne peroksidacije u modelovanim sistemima.
- 4) studije koje su od značaja za primenu u prehrambenim proizvodima, kliničke studije sa biomarkerima oksidativnog stresa.

Mnoge *in vitro* metode se izvode u odsustvu lipida pa ove metode ne mogu da predvide sposobnost antioksidanasa da inhibiraju lipidnu peroksidaciju u hrani ili u biološkim sistemima. Realnije informacije mogu se postići izvođenjem nekoliko metoda i imajući u vidu nekoliko opštih preporuka:

- 1) supstrati i uslovi oksidacije trebali bi da simuliraju hemijske, fizičke i uslove okoline u hrani i biološkim sistemima.
- 2) nizak nivo oksidacije takođe treba da bude razmatran.
- 3) treba meriti i primarne i sekundarne proizvode oksidacije.
- 4) koncentracije katalizatora, antioksidanasa i supstrata treba da budu pažljivo uspostavljene, i podaci o hemijskom sastavu treba da budu poznati kako bi se uzorci mogli upoređivati (Huang i sar., 2005; Frankel i Meyer, 2000; Antolovich i sar., 2002; Prior i sar., 2005; Gordon, 2001).

Ubrzana oksidacija ulja, masti i emulzija ulje-voda mogu se javiti pri preradi hrane i pri upotrebi u domaćinstvu, pa su zato ovakve metode od velikog značaja. Međutim, pod određenim uslovima primenjenim u metodi (temperatura, parcijalni pritisak kiseonika, metalni katalizatori i ostali inicijatori, svetlo i UV zračenje) mehanizam oksidacije može da se promeni (Antolovich i sar., 2002). Metode za izražavanje antioksidativne aktivnosti po Antolovich i sar. (2002) uključuju indukcioni period, procenat inhibicije brzine oksidacije, EC_{50} (koncentracija antioksidansa da bi se postiglo 50 % inhibicije), i opseg merenja (apsorbanca, provodljivost).

Aktivnost antioksidanasa koji se koriste u prehrambenim proizvodima može varirati zavisno od temperature na kojoj se hrana proizvodi i skladišti, sastava hrane (udeo sastojaka kao što su voda, proteini, ugljeni hidrati, vitamini, minerali u hrani je promenljiv), strukture hrane i od izloženosti hrane kiseoniku. Prema tome treba voditi računa o sledećem (Gordon, 2001):

1) Koji modelovani sistem je najbolje koristiti za merenje antioksidativne aktivnosti?

Većina metoda su vršene u ulju, tako da dobijeni podaci mogu poslužiti jedino kod ulja ili kod emulzija voda-ulje (margarin), a primena istih podataka bi bila pogrešna u slučaju emulzije ulje-voda. Takav je slučaj kod nepolarnog antioksidansa α -tokoferola, koji ne pokazuje značajnu antioksidativnu aktivnost u ulju, dok u emulziji ulje-voda pokazuje jaku antioksidativnu aktivnost. Suprotno, polarni antioksidansi kao na primer askorbinska kiselina ili troloks (derivat α -tokoferola koji je rastvorljiv u vodi) su mnogo efikasniji u ulju nego u emulziji. Ovo je opisano kao "polarni paradoks". Neke od informacija o antioksidativnoj aktivnosti mogu se dobiti i metodama "hvatanja" radikala koje se izvode u organskim rastvaračima.

2) Koji faktori utiču na brzinu oksidacije u uzorku?

Najčešće se ubrzavanje procesa oksidacije vrši tako što se povisi temperatura i poveća izloženost kiseoniku. Tako na primer, užeglost rafinisanog maslinovog ulja nastaje posle 103 dana na temperaturi od 20°C, dok je Rancimat metodom izmereno da na temperaturi od 100°C užeglost ulja nastaje nakon 20,4 časa. Ostali faktori koji utiču na brzinu oksidacije su: sadržaj metalnih jona u testiranom uzorku, stanje u kom se uzorak nalazio pre dodavanja antioksidansa i izloženost UV zracima.

3) Na koji način se meri antioksidativna aktivnost ili oksidacija u hrani ?

U principu, može se uzeti u obzir merenje gubitka lipidnog materijala na početku, na primer masnih kiselina ili triglicerida, ili se može meriti formiranje produkata koji nastaju kao posledica lipidne peroksidacije. U praksi, formiranje oksidacionih proizvoda je mnogo osetljiviji metod, ali nije lak zadatak jer se formira kompleksna smeša oksidacionih proizvoda, a relativne količine ovih proizvoda zavise od raznih varijabli uključujući temperaturu, sastav metalnih jona, sadržaja drugih komponenti, kao na primer vode, pri čemu je jako važno odlučiti koje komponente će se kontrolisati. Kontrolisanje antioksidativne aktivnosti ulja preko merenja produkata oksidacije, pod uslovima prženja zahteva praćenje drugih parametara u odnosu na procenu aktivnosti pod normalnim uslovima.

Metode koje se najviše koriste za procenu oksidativnih promena u hrani su (Gordon, 2001):

1) Metode koje se koriste za određivanje kapaciteta "hvatanja" sintetskih radikala.

Reakcija između radikala i antioksidanasa, odvija se u polarnim organskim rastvaračima (npr. metanolu) i na sobnoj temperaturi ($\text{DPPH} + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}^\cdot$). Ove metode se moraju kombinovati i sa ostalim metodama zato što aktivnost antioksidanasa u hrani zavisi od mnogo drugih faktora kao što su polarnost, rastvorljivost, aktivnost metalnih helata. Najviše se koriste DPPH metoda i TEAC metoda koje su objašnjene u prethodnom poglavlju (Gordon, 2001).

2) **Metode za merenje trenutnog stanja ulja ili uzoraka hrane.** Antioksidansi su inkorporisani u uzorke hrane koji su uskladišteni pod kontrolisanim uslovima. Hrana bogata lipidima koja nije pogodna za potrošnju ima "off-flavour" komponente. Pod terminom "off-flavour" označen je nepoženjan miris, ukus ili aroma koji su posledica promena u samom proizvodu. U ove metode spadaju (Gordon, 2001):

2.1) **Senzorne analize** kojima se mere senzorna svojstva kvaliteta prehrambenih proizvoda pomoću ljudskih čula preko: vizuelnog utiska (izgled, boja, površina, sjaj); ocenjivanjem mirisa; ocenjivanjem ukusa; i ocenjivanjem teksture/konzistencije. Ocenjivačka komisija ocenjuje kontrolisana senzorna svojstva uzoraka i odlučuje da li su ispitivani uzorci senzorno prihvatljivi. Naviše se koristi kod proizvoda od mesa i ribe.

2.2) **"Headspace"** instrumentalne analize ili gasno-hromatografske analize isparljivih proizvoda koji nastaju kao posledica lipidne peroksidacije. Ovi isparljivi proizvodi su "off-flavour" komponente u hrani i predstavljaju samo mali procenat produkata oksidacije. Razvijeno je nekoliko postupaka:

SHS-Statički headspace

HS-SPME - Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi u headspace-u

DHS – Dinamički headspace

2.3) **Peroksidni broj** (*Peroxide value* - PV) - hemijska analiza određivanja ukupne količine nastalih hidroperoksida lipida. Daljom razgradnjom hidroperoksida nastaju sekundarni proizvodi oksidacije lipida čije merenje treba pratiti kako bi se stekla potpunija slika o procesu oksidacije u prehrambenim proizvodima. Određivanje PV je široko primenjivana metoda određivanja stepena oksidacije u *in vitro* sistemima, naročito kod masti i ulja. Metoda određivanja PV zasniva se na titraciji uzorka ulja kome je dodat kalijum-jodid u smeši hloroforma i sirćetne kiseline (AOCS metoda Cd 8-53). Hidroperoksidi oksiduju kalijum-jodid u jod, što se određuje titracijom sa natrijum-tiosulfatom. Rezultati se daju u miliekvivalentima peroksida u 1000 g ispitivanog uzorka. AOCS (*American Oil Chemists Society*) su razvili metodu gde se kao rastvarač koristi izo-oktan, ali je ova metoda ograničena da daje ispravne rezultate do 70 meq/kg (AOCS metoda Cd 8b-90). Navedene metode određivanja peroksidnog broja ne bi trebala da se koristi kod ulja koja služe za prženje, jer se peroksidi iznad temperature od 150°C razlažu. Za ulja koja služe za prženje bolje je koristiti analizu polarnih komponenta koja je opisana u metodi Cd 20-91 (AOCS, 1990). Peroksidni broj pri kom se oksidacija ulja može detektovati kao "off-flavour" promena, zavisi od same prirode ulja. Uzorci maslinovog ulja smatraju se užeglim kad PV ima vrednost od 20 meq/kg, dok riblje ulje sa < 1 meq/kg (Gordon, 2001).

2.4) **UV detekcija konjugovanih diena.** Formiranje hidroperoksida iz PUFA dovodi i do formiranja konjugovanih diena, koji se mogu detektovati merenjem UV apsorpcije na 233-234 nm. Ova metoda predstavlja brz i jednostavan način praćenja oksidativnih promena u uljima, ali je manje tačna od metode merenja peroksidnog broja.

2.5) ***p*-anizidinska vrednost.** *p*-anizidin je reagens koji reaguje sa aldehydima dajući proizvod koji se detektuje merenjem apsorpcije na 350 nm. *p*-anizidinska vrednost je definisana kao apsorpcija rastvora koji nastaje u reakciji između 1g masti i 100 ml rastvora izooktana sa *p*-anizidinom (0,25% u glacijalnoj sirćetnoj kiselini). Proizvodi koji nastaju u reakciji sa nezasićenim aldehydima (2-alkenalima) apsorbuju se mnogo jače na 350 nm, i zbog toga test je naročito osetljiv na proizvode sa nezasićenim aldehydima. Pošto test ne pravi razliku između isparljivih i neisparljivih proizvoda, a osetljiviji je prema merenju nezasićenih aldehyda nego zasićenih aldehyda, onda se ovim testom mogu proceniti sekundarni oksidacioni proizvodi.

Merenje *p*-anizidinske vrednosti se kombinuje sa merenjem PV, da bi se odredio ukupni stepen oksidacije ili Trolox vrednost, koja je jednaka zbiru *p*-anizidinske vrednosti i dvostruke vrednosti PV. Međutim Trolox vrednost je empirijski parametar jer predstavlja zbir dve vrednosti sa različitim mernim jedinicama.

2.6) Vrednost tiobarbiturne kiseline (TBA). Malondialdehid (MDA) sekundarni oksidacioni proizvod oksidacije lipida, može nastati iz PUFA koje imaju najmanje tri nezasićene veze. Koncentracija MDA može se odrediti u reakciji između tiobarbituratne kiseline (TBA) i MDA u kojoj nastaje proizvod ružičaste boje koji se detektuje merenjem apsorpcije na 532-535 nm sa molarnom apsorptivnošću od 27,5 apsorptivnih jedinica/ μmol . Međutim, reakcija nije specifična i mnoga druga jedinjenja mogu formirati proizvode koji doprinose apsorpciji. Na primer, 2,4-alkadienali kao što je 2,4-dekadienal takođe reaguje sa TBA i pokazuje jaku apsorpciju na 532 nm. Nekoliko komponenata iz hrane kao što su proteini, Maillardova jedinjenja i produkti degradacije šećera utiču na rezultate dobijene ovom metodom. Zbog tog nedostatka specifičnosti, vrednosti koje se dobijaju ovom metodom date su kao TBARS (TBA reaktivne supstance). Rezultati TBARS metode daju se u mg MDA/ kg testiranog uzorka.

2.7) Oktanoat vrednost. Oktanoat vrednost određuje količinu vezanog oktanoata prisutnog u ulju. Oktanoat nastaje razlaganjem 9-hidroperoksida linoleinske kiseline. Metod podrazumeva trans-metilaciju ulja bazom kao što je natrijum-metoksid, i GC analizu metil-oktanoata koji se pri tom formira.

2.8) Konjugovani oksidacioni proizvodi. Analiza konjugovanih oksidacionih proizvoda zasniva se na činjenici da se hidroperoksidi nastali iz PUFA i nekih produkata razgradnje mogu redukovati sa natrijum-borhidridom i dehidracijom dati konjugovane triene i tetraene, koji se mogu detektovati merenjem apsorpcije na 268 nm i 301 nm, respektivno.

2.9) FT infracrvena spektroskopija. FTIR spektroskopija (Fourier transform infrared spectroscopy) koristi se za određivanje hidroperoksida u uljima. Podrazumeva kalibraciju sa poznatim standardima, i podesna je zbog brzine metode i zato što se ne koriste hemijske supstance u analizi. Međutim, poboljšanje specifičnosti metode i preciznosti, može biti ostvareno dodavanjem trifenilfosfina (TPP) ulju koje sadrži hidroperokside, što dovodi do formiranja trifenilfosfin oksida (TPPO) koji se detektuje merenjem apsorpcije na 542 cm^{-1} .

3) Metode za kontrolisanje oksidacionih promena u hrani. U njih spadaju (Gordon, 2001):

3.1) Gubitak PUFA. Analize u promeni sastava masnih kiselina su jedan od načina procene oksidativnih promena u hrani. Na primer ako se promene u sastavu linolenske kiseline određuju gasnom gromatografijom metil estara masne kiseline, promena sa $50,0 \pm 0,1\%$ na $49,6 \pm 0,1\%$ označava promenu u sastavu masne kiseline od 0,4%. Radi poređenja, oksidacija 0,4% PUFA u monohidroperokside će označavati promenu peroksidnog broja za 16 meq kg^{-1} , a promene manje od 1 meq kg^{-1} mogu lako biti detektovane merenjem PV.

3.2) Povećanje težine ulja. Jestiva ulja postaju teža u ranim fazama lipidne oksidacije, kada se masne kiseline spajaju sa kiseonikom tokom formiranja hidroperoksida. Povećanje u težini zagrejanog uzorka tokom skladištenja koristi se za određivanje indukcionog perioda masti. Brzo povećanje težine, dešava se posle indukcionog perioda, ili se vreme za koje nastaje veća promena u težini može odrediti.

4) **Metode za predviđanje promena.** To su metode gde se uzorci neprekidno kontrolišu tokom uslova pri kojima je oksidacija ubrzana. Tu spadaju (Gordon, 2001):

4.1) **DSC** (Differential scanning calorimetry) je instrumentalna metoda kojom se kontrolišu egzotermne i endotermne promene zbog faznih promena ili hemijskih reakcija u uzorku. Kraj indukcionog perioda označen je povećanjem toplote reakcije zbog mnogo brže reakcije nezasićenih lipida sa kiseonikom.

4.2) **Indeks stabilnosti ulja** (OSI, *Oil stability index*). OSI je automatizovano razvijena metoda AOM (*Active Oxygen Method*). U AOM vreme za koje ulje dostigne PV od 100 meq kg⁻¹, tokom oksidacije na 97,8°C, sa protokom vazduha od 2,33 ml u cevi, određuje se u sekundama. Instrumenti za određivanje OSI su RANCIMAT™ koji proizvodi Metrohm, Švajcarska, zatim Basel ili OSI koji proizvodi Omnion, Amerika. Ovi instrumenti zavise od povećanja u električnoj provodljivosti, kada se isparavanja iz oksidisanih ulja propuste kroz vodu. Isparljive karboksilne kiseline se stvaraju u oksidisanim uljima, što utiče na povećanje električne provodljivosti. Uzorci koji se procenjuju pomoću OSI metoda, se drže na 100°C, 110°C, 120°C, 130°C ili na 140°C. Temperatura može da se reguliše tako da indukcion period može biti od 4 h do 15 h. Veličina uzorka je 2,5 g ili 5 g zavisno od upotrebe instrumenta. Faktor zaštite (*Protection factor*, PF) predstavlja odnos između indukcionog perioda uzorka ulja kome je dodat antioksidans i uzorka ulja kome nije dodat antioksidans. Na taj način, ako se dobije PF>1 to ukazuje da antioksidans pokazuje antioksidativno dejstvo u uzorku ulja. Ako je PF<1 to ukazuje na pro-oksidativnu aktivnost antioksidansa. Iako su ovi instrumenti korisni za kontrolu kvaliteta ulja, oni se ne preporučuju za određivanje antioksidativne aktivnosti zbog više razloga. Visoke temperature ne dozvoljavaju pouzdana predviđanja antioksidativne aktivnosti na nižim temperaturama. Isparljivi antioksidansi mogu biti uklonjeni iz ulja zbog veličine protoka vazduha koji se koristi u metodi, i ulja su veoma oksidovana na kraju indukcionog perioda.

4.3) **Oxipres**. Oxipres™ proizvodi Mikrolab Aarhus, predstavlja metod za ispitivanje stabilnosti prema oksidaciji heterogenih proizvoda kao što su čips-krompir, margarin i majonez. Oksidacija se ubrzava zagrevanjem i upotrebom kiseonika pod pritiskom.

4.4) **Oxidograf**. Oxidograf™ proizvodi Mikrolab Aarhus, je instrument baziran na FIRA-Astell aparaturi koja radi po principu Sylvester testa. Uzorak ulja ili masti se izlaže kiseoniku ili vazduhu na povišenim temperaturama, uz mešanje kako bi se ubrzao test.

U ostale poznate metode za ispitivanje antioksidativne sposobnosti antioksidanasa u hrani ubrajaju se TRAP, TOSC, Folin-Ciocalteu-ova metoda određivanja ukupnih fenola i ORAC metoda. Sve metode za ispitivanje antioksidativne aktivnosti imaju svoje prednosti i ograničenja, s tim što ORAC metoda ima prednost jer se može primeniti na mnogo više uzoraka hrane, i ima pogodnu analizu rezultata. Postoji znatna nedoslednost između rezultata dobijenih pomoću različitih metoda kao što se može videti u tabeli 2.23 (Zheng i Wang, 2001; Ahn i sar., 2002).

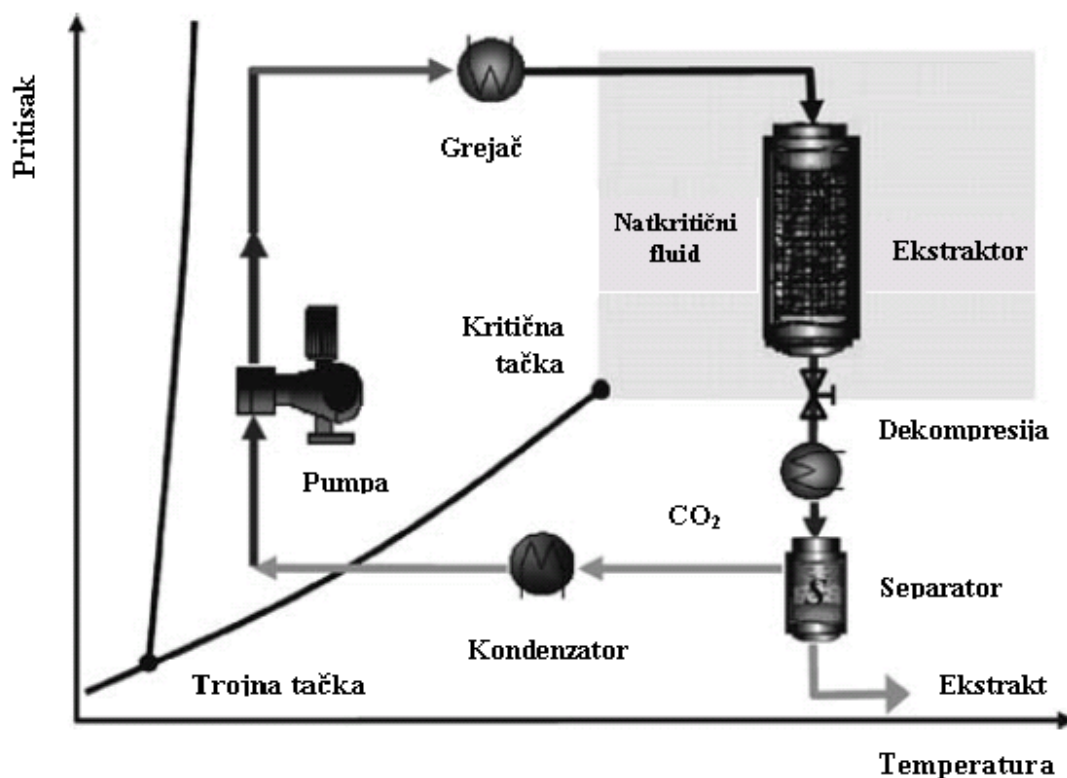
Tabela 2.23 Poređenje različitih rezultata dobijenih pomoću četiri različite metode za merenje antioksidativne aktivnosti (Pellegrini i sar., 2003; Wu i sar., 2004b)

Roba	ORAC (mmol/kg)	FRAP (mmol/kg)	TRAP (mmol/kg)	TEAC (mmol/kg)
Povrće				
Brokoli	15,9	11,7	3,1	3,0
Šargarepa	12,2	1,1	0,7	0,4
Celer	5,7	1,2	0,5	0,5
Zelena salata	4,5	4,9	2,3	1,3
Krompir	13,2	3,7	0,9	0,8
Rotkvice	9,5	3,8	3,6	2,2
Paradajz	3,4	5,1	1,3	1,7
Voće				
Borovnice	62,2	18,6	9,3	7,4
Dinja (cantaloupe)	3,1	5,7	1,0	1,2
Grejpfrut	15,5	10,2	4,0	3,0
Dinja (honeydew)	2,4	2,3	1,1	0,7
Kivi	9,2	7,4	2,3	2,3
Šljive	62,4	12,8	8,1	5,1
Maline	49,3	43,0	10,5	16,8
Jagode	35,8	22,7	8,6	10,9
Lubenica	1,4	1,1	0,5	0,7

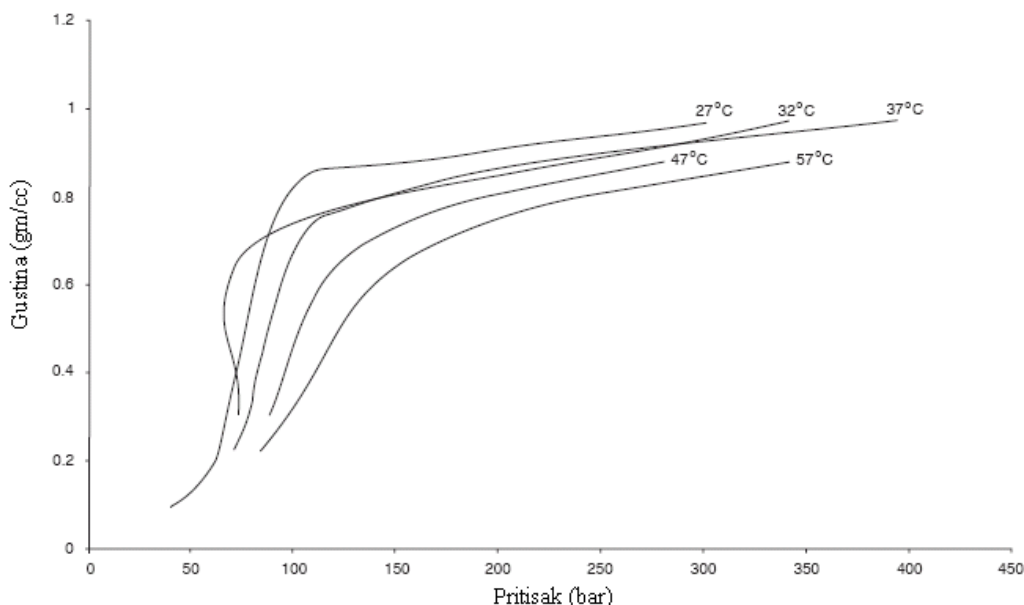
2.7. Dobijanje antioksidanasa pomoću NKE

2.7.1. Natkrična ekstrakcija

Natkrična ekstrakcija (NKE) se pokazala kao jedan od najboljih postupaka za izdvajanje aktivnih komponenti iz biljnog materijala važnih za ljudsku ishranu i farmaceutsku industriju, pre svega što se ovim postupkom dobijaju ekstrakti bez tragova rastvarača, što nije slučaj sa konvencionalnim načinima ekstrakcije. NKE je postupak ekstrakcije fluidom koji se nalazi u natkričnom stanju tj. u stanju ugušćenog gasa - na temperaturi iznad svoje kritične temperature i pritisku iznad svog kritičnog pritiska (slika 2.9). Gustina fluida u natkričnom stanju je relativno visoka pa zbog toga je velika i rastvorljivost komponenti u natkričnom fluidu. Gustina fluida se može lako menjati sa malim promenama pritiska i temperatura, uglavnom u oblasti blizu kritične tačke (slika 2.10). Kao najpogodniji rastvarač u procesima NKE pokazao se ugljenik(IV)-oksid zbog toga što je GRAS (*Generally Recognized As Safe*), zbog netoksičnosti, nezapaljivosti, lake dostupnosti, niske cene i niskih vrednosti kritičnih parametara (31°C i 7,38 MPa) koji omogućuju ekstrakciju na relativno niskim temperaturama i njegovo lako odvajanje od supstance koja je rastvorena u ugljenik(IV)-oksidu snižavanjem pritiska ili temperature ispod njegovih kritičnih vrednosti, što je od velikog značaja za ekstrakciju termički degradibilnih supstanci. Natkrični ugljenik(IV)-oksid (NK-CO₂) je dobar rastvarač za hidrofobna i slabo hidrofилna jedinjenja.



Slika 2.9 Dijagram procesa NKE (Meireles, 2009)



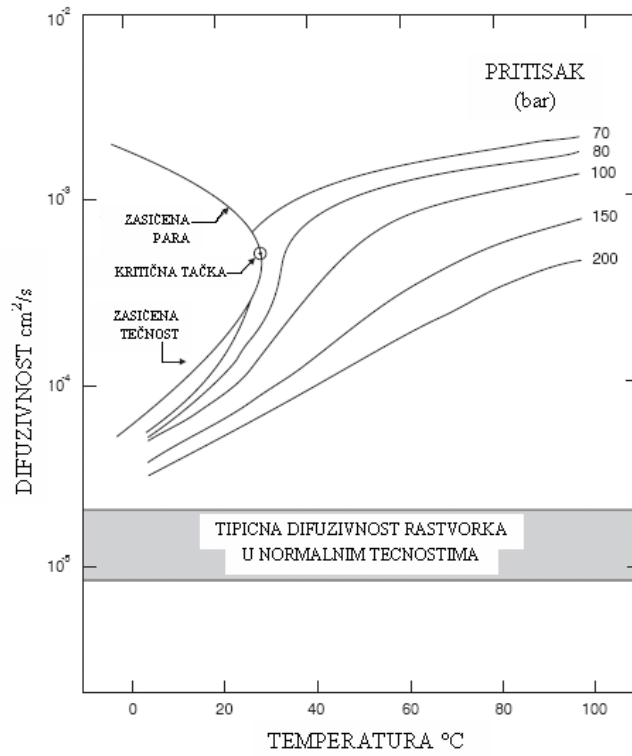
Slika 2.10 Zavisnost gustine CO_2 od pritiska na datim izotermama (Mukhopadhyay, 2000)

Ekstrakcija organskim rastvaračama ima niz mana koje se odnose na negativan uticaj na životnu sredinu i zdravlje ljudi (emisija volatilnih organskih jedinjenja, emisija supstanci koje oštećuju ozonski omotač). Pored neželjenog ostatka organskog rastvarača u ekstraktu, tu je i nedovoljna selektivnost organskih rastvarača prema antioksidativnim komponentama tako da dolazi do ekstrakcije i aromatskih komponenti. Rastvorljivost rastvorka u natkritičnom fluidu je slična rastvorljivosti rastvorka u organskim rastvaračima, međutim natkritični fluidi imaju veću difuzivnost, manju viskoznost i manji površinski napon od organskih rastvarača što utiče na kraće vreme procesa i manju potrošnja rastvarača (Wang i sar., 2001).

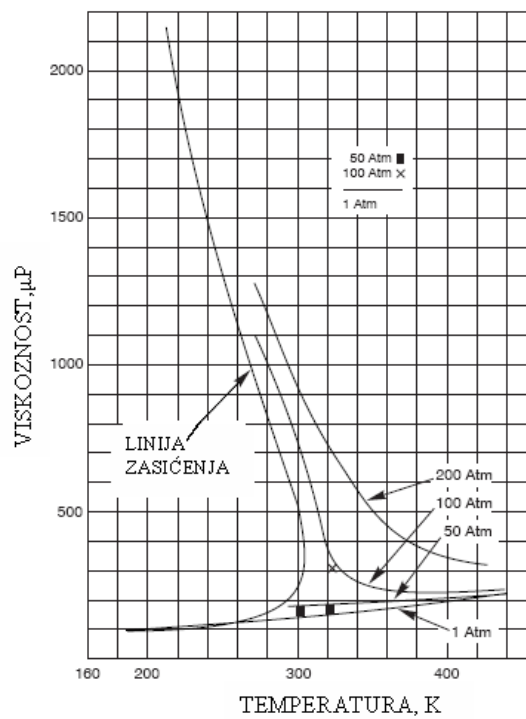
Osobine ugljenik(IV)-oksida u natkritičnom stanju, koje se nalaze između onih koje poseduje gas i onih koje poseduje tečnost (tabela 2.24), omogućavaju izvođenje procesa selektivne ekstrakcije specifičnih komponenta iz složenih smeša. Karakteristike kao što su gustina, difuzivnost, dielektrična konstanta, viskoznost i rastvorljivost su najvažnije za projektovanje procesa NKE. Rastvorljivost komponenti (rastvorka) u natkritičnom fluidu zavisi od njegove gustine i masenog transporta koji je jači kada fluid ima veliku difuzivnosti i nisku viskoznost zbog lakšeg prodiranja fluida u poroznu strukturu biljnog materijala (Shi i King, 2006). Promena difuzivnosti i viskoznosti CO_2 u zavisnosti od pritiska i temperature prikazana je na slikama 2.11 i 2.12.

Tabela 2.24 Fizičke karakteristike natkritičnog ugljen(IV)-oksida (Brunner, 1994)

Fluid	p/T (MPa)/(K)	Gustina ρ (kg/m ³)	Difuzivnost D_{ij} (m ² /s)	Viskoznost η (kg/ms)
Gas	0,1/298	0,6 – 2	0,1 – 0,4	(1 – 3) 10^{-4}
NKE	Pc/Tc	200 – 500	0,7 10^{-3}	(1 – 3) 10^{-4}
Tečnost	0,1/298	600 – 1600	(0,2 – 2) 10^{-5}	(0,2 – 3) 10^{-2}



Slika 2.11 Difuзивnost CO₂ (Mchugh i Krukoniš, 1986)



Slika 2.12 Viskoznost CO₂ (Mukhopadhyay, 2000)

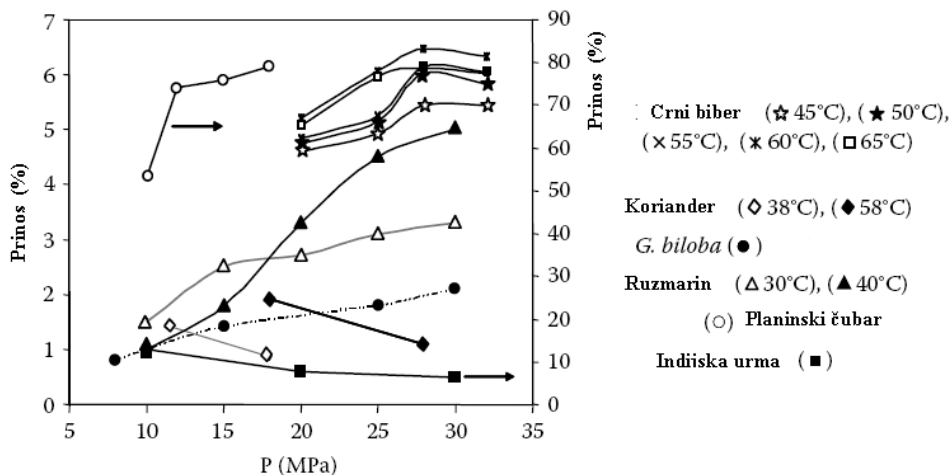
2.7.2. Uticaj operativnih parametara

Prethodno stanje i priprema početnog materijala, kao i eksperimentalni uslovi koji se koriste pri ekstrakciji i separaciji utiču na performanse NKE. Priroda i osobine sirovog materijala (zrelost, gajenje, sorta, zemljišni (edafski) i klimatski uslovi) veoma utiču na ekstrakciju terpenoida i fenolnih jedinjenja, karotenoida i tokoferola iz čvrstog materijala. Biljni materijal je kompleksne prirode, i ekstrakcija supstanci koje se nalaze u biljnom materijalu zavisi od prirode rastvarača koji se koristi za NKE, njegove polarnosti i izbora operativnih parametara. U slučaju antioksidanasa izolovanih iz začina kao što su ruzmarin i žalfija, glavne polarne komponente su karnosol, ruzmarinska i karnosolna kiselina; origano sadrži ruzmarinsku kiselinu, nekoliko flavonoida, i supstance koje se mogu ekstrahovati pomoću vode, za koje je dokazano da pokazuju veliku antioksidativnu aktivnost (Moller i sar., 1999). U ruzmarinu, žalfiji i origanu antioksidativna jedinjenja su locirana na površini lišća, dok kod nekih drugih vrsta antioksidativna jedinjenja mogu biti locirana unutar semena i korena. Zbog toga osim izbora rastvarača važan je predtretman sirovog materijala kako bi se izdvojile željene komponente i dobio visok prinos. Koekstrahovane supstance koje nemaju antioksidativnu aktivnost same po sebi, mogu povećati antioksidativno dejstvo ekstrakta (Pokorny i Schmidt, 2003). Među ovim jedinjenjima (sinergistima) nalaze se polivalentne organske kiseline, amino kiseline, fosfolipidi (lecitin), i helatirajući agensi.

Glavni operativni parametri koji utiču na NKE antioksidanasa (pritiskak, temperatura, protok rastvarača, odnos mase rastvarača i mase čvrstog materijala, vrsta i koncentracija kosolventa) moraju biti optimizovani pre procesa. Rastvaranje sirovog materijala pomoću NK-CO₂ zavisi od pritiska i temperature. Zajednički efekat ovih dveju promenljivih na sposobnost rastvaranja dat je preko gustine.

Sa povećanjem pritiska raste gustina fluida u natkritičnom stanju i rastvorljivost željenih komponenti (rastvorka), kao i interakcije između fluida i čvrstog supstrata, što omogućava veći prinos ekstrakcije. Pritisci u opsegu 8-15 MPa se preporučuju za ekstrakciju etarskih ulja, dok se pritisci u opsegu 15-40 MPa najčešće koriste za ekstrakciju fenolnih jedinjenja i terpenoida (Meireles, 2009). Prilikom NKE antioksidanasa, povećanje pritiska može dovesti do smanjenja selektivnosti što dovodi do koekstrakcije komponenti koje smanjuju čistoću i mogu dodeliti boju ekstraktu, kao i prooksidativno dejstvo NKE ekstrakata. Kada je cilj izdvojiti neželjene komponente koncentrisanjem antioksidanasa u reziduu, povećanje pritiska može biti korisno (zbog veće rastvorljivosti i brže ekstrakcije), međutim koekstrakcija željenih komponenti može ograničiti selektivnost procesa. Povećavanje pritiska uzrokuje povećanje viskoznosti i smanjenje difuzivnosti što otežava interakciju fluida sa čvrstim supstratom (matricom).

Temperatura ima efekat na rastvorljivost željenih komponenti (rastvorka) u fluida, termičku stabilnost rastvorka, napon pare rastvorka i osobine čvrstog supstrata koje mogu dovesti do otežanog masenog transporta. Ekstrakcija antioksidanasa (fenolnih kiselina, flavonoida, terpenoida, karotenoida i tokoferola) iz biljnog materijala se najčešće vrši pri nižim temperaturama u opsegu 40-60°C. Na pritisku u blizini kritičnog sa porastom temperature dolazi do smanjenja gustine i rastvorljivosti rastvorka u NK-CO₂, ali takođe i do povećanja napona pare rastvorka. Pošto na visokim temperaturama, veći uticaj na rastvorljivost ima povećanje napona pare od smanjenja gustine rastvarača, doći će do porasta rastvorljivosti. Temperatura i pritisak pokazuju "crossover" efekat, pri čemu visoke temperature favorizuju ekstrakciju na visokim pritiscima a niske temperature favorizuju ekstrakciju na niskim pritiscima.



Slika 2.13 Uticaj pritiska i temperature na ekstrakciju antioksidanasa (Martinez, 2008)

Pored operativnih uslova, rastvorljivost čiste supstance u NK-CO₂ zavisi od njene molekulske mase, polarnosti i prisustva pojedinih funkcionalnih grupa u njenom molekulu. U tabeli 2.25 klasifikovane su neke od komponenata prirodnog porekla kao veoma rastvorljive, umereno rastvorljive i skoro nerastvorljive u NK-CO₂. Kod NKE sa čvrstim supstratom kinetika i prinos takođe zavise od interakcija sa čvrstim matricom.

Na primer, ugljovodonicima i ostala organska jedinjenja niske molekulske mase ili relativno slabe polarnosti kao što su: estri, etri, aldehidi, ketoni, laktoni i epoksidi se mogu lako ekstrahovati pomoću NK-CO₂ na niskim pritiscima u opsegu 7,5-10 MPa, dok umereno polarna jedinjenja kao što su derivati benzena sa jednom karboksilnom i dve hidroksilne grupe su umereno rastvorljiva u NK-CO₂. Jako polarna jedinjenja kao što su ona sa jednom karboksilnom i dve ili više hidroksilne grupe su jedva rastvorljiva u NK-CO₂. Za ekstrakciju određene klase jedinjenja često se dodaju kosolventi u NK-CO₂ koji povećavaju polarnost a samim tim i rastvaranje u NK-CO₂. Etanol, etil-acetat i voda su najbolji kosolventi za dobijanje ekstrakata u prehrambenoj industriji (Mukhopadhyay, 2000). Uticaj pritiska i temperature na prinos fenolnih jedinjenja i terpenoida iz crnog bibera (Tipsrisukond i sar., 1998), koriandera (Yepez i sar., 2002), ginko bilobe (Yang i sar., 2002), ruzmarina (Carvalho i sar., 2005), planinskog čubra (Esquivel i sar., 1999) i Indijske urme (Luengthanaphol i sar., 2004) prikazana je na slici 2.13.

Tabela 2.25 Rastvorljivost biljnih komponenti u NK-CO₂ (Moyler, 1994)

Veoma rastvorljive	Umereno rastvorljive	Skoro nerastvorljive
Nepolarna i slabo polarna jedinjenja; Molekulske mase (<250); Npr. monoterpeni, seskviterpeni, tioli, pirazini, tiazoli, sirćetna kiselina, acetati, benzaldehid, heksanol, glicerol	Molekulske mase (<400); Npr. supstituisani terpeni i seskviterpeni, voda, oleinska kiselina, glicerol, dekanol, zasićeni lipidi do C ₁₂	Molekulske mase(>400); Npr. šećeri, proteini, tanini, smole, neorganske soli, hlorofil, karotenoidi, limunska kis., jabučna kis., amino kis., nitrati, pesticidi, insekticidi, glicin itd.

2.7.3. Šeme procesa za dobijanje antioksidanasa

Najviše proučavani antioksidansi ekstrahovani iz biljne biomase pomoću natkritične ekstrakcije sa ugljenik(IV)-oksidom su fenolna jedinjenja, terpenoidi, karotenoidi i tokoferoli. Kako dostupni podaci pokazuju uporedno višu antioksidativnu aktivnost imaju fenolna jedinjenja i detaljniji literaturni podaci su dostupni za ova jedinjenja. Zavisno od sirovog materijala i proizvoda koji se želi dobiti, različite konfiguracije procesa su predložene za ekstrahovanje glavnih grupa antioksidativnih jedinjenja (fenoli, terpenoidi, karotenoidi, i tokoferoli). Ostale grupe jedinjenja (kao što su proteini, oligosaharidi, i produkti Maillard-ove reakcije) takođe pokazuju antioksidativnu aktivnost, ali njihova rastvorljivost u NK-CO₂ je niska. Na slikama 2.14a do 2.14d prikazane su uobičajene procesne šeme za NKE antioksidativnih jedinjenja iz prirodnih izvora:

- 1) **Jednostepena ekstrakcija i frakciono odvajanja u nekoliko separatora.** Dobijeni ekstrakt pomoću natkritične ekstrakcije se može dalje frakcionisati oslobađanjem pritiska u separatorima. Ovaj raspored se široko koristi za obradu čvrstih uzoraka i u analitičke svrhe (Dapkevicus i sar., 1998; Carvalho i sar., 2005). Neki primeri izvođeni po ovom principu i antioksidativna sposobnost ekstrakata koji sadrže fenolna jedinjenja i terpenoide (upoređivana u odnosu na standardne antioksidanse) prikazani su u tabeli 2.26.

Tabela 2.26 Literaturni pregled ekstrakcije antioksidanasa pomoću jednostepene NKE-CO₂ sa frakcionim odvajanjem

Sirovi materijal	NKE: ZE; p; T; bS	Antioksidativna aktivnost	Literatura
Aloja	1; 45; 323; 2	DPPH: T > KE > BHT > NKE > αT	Hu i sar., 2005
Bosiljak	<0,1; 15; 313; 1	LK-βk: NKE > βk	Leal i sar., 2006
Eukaliptus	<0,1; 20; 323; 1	BHT > BHA > NKE > KE OLK: KE ≈ BHT > NKE ≈ BHA	Fadel i sar., 1999 El-Ghorab i sar., 2003
Origano	4; 50; 368; 2 5; 45; 323; 1 <0,1; 30; 313; 1	OS: BHA:BHT > NKE KE ≈ BHT > NKE LK-βk: BHT > NKE	Nguyen i sar., 1991 Dapkevicus i sar., 1998 Vagi i sar., 2005
Ruzmarin	4; 50; 373; 2 0,3; 30; 313; 1 0,28; 25; 313; 2	OS: NKE > BHA:BHT LK-βk: NKE > βk DPPH: AK > NKE	Nguyen i sar., 1991 Carvalho i sar., 2005 Cavero i sar., 2005
Žalfija	1; 25-35; 373; 3 <0,1; 30; 313; 1	NKE ₃ > NKE ₂ > NKE ₁ > BHT LK-βk: BHT > NKE	Daukšas i sar., 2001 Dapkevicus i sar., 1998
Timijan	<0,1; 30; 313; 1 5; 40; 333; -	LK-βk: BHT > NKE OSU: BHT ≈ KE ≈ NKE	Dapkevicus i sar., 1998 Simandi i sar., 2001

ZE: zapremina ekstraktora (l); p: pritisak (MPa); T: temperatura (K); bS: broj separatora.

NKE: natkritični rezidu, NKE_i: natkritični ekstrakt iz i separatora.

AK: askorbinska kiselina; BHA: butilovani hidroksianizol; BHT: butilovani hidroksitoluen; βk: β-karoten.

KE: ekstrakt dobijen konvencionalnom ekstrakcijom; T: troloks; αT: α-tokoferol.

DPPH: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal; LK-βk: linoleinska kiselina- β-karoten; OLK: oksidacija linoleinske kiseline; OS: oksidacija sala; OSU: oksidacija suncokretovog ulja.

2) **Frakciona ekstrakcija sa postepenim povećanjem pritiska.** Posle prve faze pri niskim pritiscima (9-15 MPa) u kojoj se izdvajaju nepolarna jedinjenja (etarsko ulje i voskovi), čvrsti ostatak (rezidu) se podvrgava NKE-CO₂ na povišenom pritisku (20-50 MPa) da bi se izdvojili polarni antioksidansi (Ashraf-Khorassani i Taylor, 2004; Nguyen i sar., 1991). Rastvorljivost antioksidanasa u NK-CO₂ može se podešavati promenom pritiska i/ili temperature i upotrebom kosolvenata. Kod frakcione ekstrakcije troši se više rastvarača nego kod obične ekstrakcije sa frakcionim odvajanjem ekstrakata pod 1), iako ekstrakcioni prinosi mogu biti veoma slični (Mukhopadhyay, 2000; Simandi i sar., 1998). U tabeli 2.27 sumirani su primeri i antioksidativna aktivnost ekstrakta dobijenog u drugoj fazi frakcione ekstrakcije.

Tabela 2.27 Literaturni pregled ekstrakcije antioksidanasa pomoću frakcione ekstrakcije sa postepenim povećavanjem pritiska

Sirovi materijal	NKE: ZE; p; T; bS	Antioksidativna aktivnost	Literatura
Matičnjak	1) 0,4; 9; 323; - 2) 0,4; 30; 323; -	ALK: BHA > αT > NKE>	Marongiu i sar., 2004
Koriander	1) <0,1; 10; 313; - 2) <0,1; 18,8; 331; -	DPPH: Eu > NKE	Yepez i sar., 2002
Origano	1) 4; 30; 313; 1 2) 4; 50; 313; 1	OS: BHA:BHT > NKE	Nguyen i sar., 1991
Ruzmarin	1) 4; 30; 313; 1 2) 4; 50; 313; 1	OS: NKE > BHA:BHT	Nguyen i sar., 1991
Ruzmarin	1) 0,01; 10; 313; - 2) 0,01; 40; 333; -	DPPH: NKE ₂ > NKE ₁ LK-βk: BHT > NKE	Reglero i sar., 1999 Ibanez i sar., 1999
Žalfija	1) 4; 30; 313; 1 2) 4; 50; 313; 1	OS: NKE > BHA:BHT	Nguyen i sar., 1991

ZE: zapremina ekstraktora (l); p: pritisak (MPa); T: temperatura (K); bS: broj separatora.

NKE: natkritični rezidu, NKE_i: natkritični ekstrakt iz i separatora.

BHA: butilovani hidroksianizol; BHT:butilovani hidroksitoluen; BHA:BHT: smeša (1:1); Eu: eugenol; βk: β-karoten; αT: α-tokoferol.

DPPH: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal; LK-βk: linoleinska kiselina- β-karoten; ALK: autooksidacija linoleinske kiseline; OS: oksidacija sala.

- 3) **Kombinacija NKE-CO₂ i konvencionalne ekstrakcije.** Prva faza je NKE-CO₂ pri niskim pritiscima u kojoj se izdvajaju aromatična, lako isparljiva jedinjenja i voskovi iz čvrstog supstrata pre ekstrakcije sa konvencionalnim rastvaračem (Esquivel i sar., 1999; del Valle i sar., 2004). Hidrotermalni tretman je korišćen za ekstrakciju biološki aktivnih jedinjenja iz natkritičnog ekstrakta bambusa (Quitain i sar., 2004). U tabeli 2.28 sumirani su primeri i antioksidativna aktivnost ekstrakta dobijenog pomoću NKE-CO₂ i iz natkritičnog rezidua pomoću konvencionalne ekstrakcije (NKE-KE).

Tabela 2.28 Literaturni pregled ekstrakcije antioksidanasa pomoću NKE-CO₂ i kasnije ekstrakcije NKE rezidua pomoću konvencionalne ekstrakcije

Sirovi materijal	NKE: ZE; p; T; bS KE: R; T; v	Antioksidativna aktivnost	Literatura
Matičnjak	1) 0,5; 10; 308; 2 2) V; 373; 1,5	PF: NKE > BHT	Ribeiro i sar., 2001
Origano	1) 4; 30; 313; 1 2) 95 % E; -; -	OS: BHA:BHT > NKE > NKE-KE	Nguyen i sar., 1991
Ruzmarin	1) 4; 30; 313; 1 2) 95 % E; -; -	OS: NKE > BHA:BHT > NKE-KE	Nguyen i sar., 1991
Ruzmarin	1) -; 7,5; 305; 1 2) 50 % E; -; 1	RIM:BHT > NKE-KE > αT	Nakatsu i Yamasaki., 2000
Žalfija	1) 4; 30; 313; 1 2) 95 % E; -; -	OS: NKE > BHA:BHT > NKE-KE	Nguyen i sar., 1991
Timijan	1) 4; 30; 313; 1 2) 95 % E; -; -	OS: BHA:BHT > NKE > NKE-KE	Nguyen i sar., 1991

ZE: zapremina ekstraktora (l); p: pritisak (MPa); T: temperatura (K); R: rastvarač; v: vreme; bS: broj separatora.

V: Voda; E: etanol.

NKE: natkritični rezidu; NKE-KE: ekstrakt dobijen iz natkritičnog rezidua pomoću konvencionalne ekstrakcije.

BHA: butilovani hidroksianizol; BHT:butilovani hidroksitoluen; BHA:BHT: smeša (1:1); αT: α-tokoferol.

OS: oksidacija sala; RIM: Rodin iron method; PF: Protection factor.

- 4) **Prečišćavanje ekstrakata dobijenog konvencionalnom ekstrakcijom pomoću NKE.** NKE-CO₂ se može koristiti za prečišćavanje komercijalnih ekstrakata, osušenih ekstrakata dobijenih konvencionalnom ekstrakcijom, ili jedinjenja koja se nalaze u čvrstom ostatku (reziduu) koji zaostaje nakon konvencionalne ekstrakcije (Lopez-Sebastian, 1998; Hadolin i sar., 2004). Sušenje ekstrakta pre procesa NKE-CO₂ je neophodno, jer prisustvo vode može da smanji efikasnost tako što ograničava kontakt sa apolarnim rastvorkom ili tako što voda deluje kao kosolvent. Blago sušenje se preporučuje kod aromatičnih biljaka, kako bi se sprečila degradacija ciljanih termolabilnih jedinjenja. Obično prirodni sirovi materijal za NKE pokazuje ograničenja u smislu malog sadržaja ciljanih jedinjenja koja se žele izvojiti i zato je neophodna upotreba ekstraktora velike zapremine (Ribeiro i sar., 2001). Zbog toga, procesi koji uključuju konvencionalnu ekstrakciju a zatim dalje prečišćavanje sirovog ekstrakta pomoću NKE su povoljniji jer daju veći prinos i/ili nižu potrošnju CO₂ u poređenju sa direktnom ekstrakcijom. Primeri i antioksidativna aktivnost ekstrakata dobijenih na ovaj način su prikazani u tabeli 2.29.

Tabela 2.29 Literaturni pregled ekstrakcije antioksidanasa pomoću konvencionalne ekstrakcije i kasnije ekstrakcije ekstrakta pomoću NKE-CO₂

Sirovi materijal	KE: R; T; v NKE: ZE; p; T; bS	Antioksidativna aktivnost	Literatura
Trop grožđa	Etil-acetat; -; - 0,4; 25; 318; 1	DPPH: NKE ≈ KE ≈ KRE	Louli i sar., 2004
Ruzmarin	Komercijalni ekstrakt 0,5; 10; 308; 1	OSU: NKE > KRE	Hadolin i sar., 2004
Ruzmarin	2-propanol; -; - 0,005; 20; 333; -	DPPH: KE > NKE	Lopez-Sebastian i sar., 1998
Žalfija	izopropanol; -; - 0,005; 10; 333; -	OSU: NKE > BHT	Ibanez i sar., 2001
Žalfija	etanol; 333; - -; 20-40; 333; -	OSU: NKE > BHT > KE	Đarmati i sar., 1991

ZE: zapremina ekstraktora (l); p: pritisak (MPa); T: temperatura (K); R: rastvarač; v: vreme; bS: broj separatora.

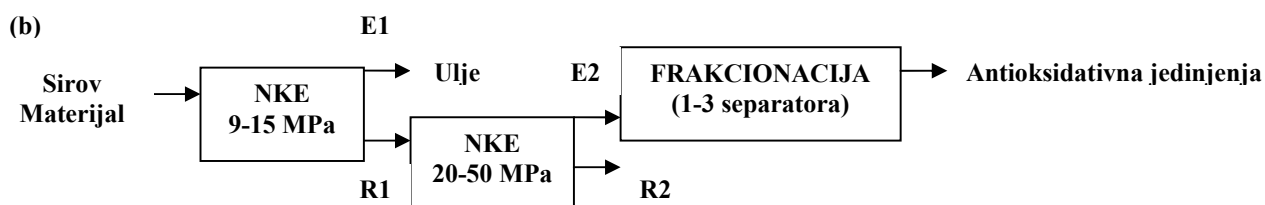
NKE: natkritični rezidu, KE: ekstrakt dobijen konvencionalnom ekstrakcijom; KRE: komercijalni ruzmarinski ekstrakt.

BHT: butilovani hidroksitoluen.

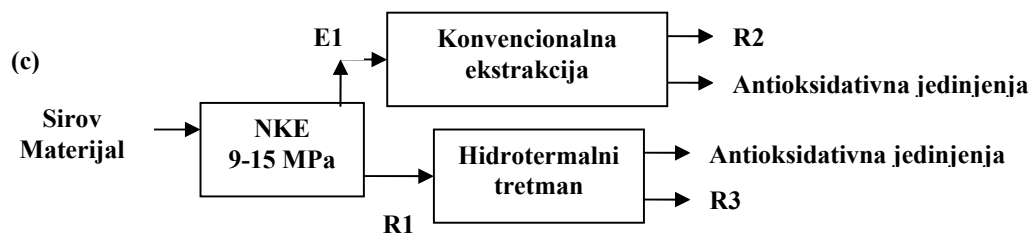
DPPH: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal; OSU: oksidacija suncokretovog ulja.



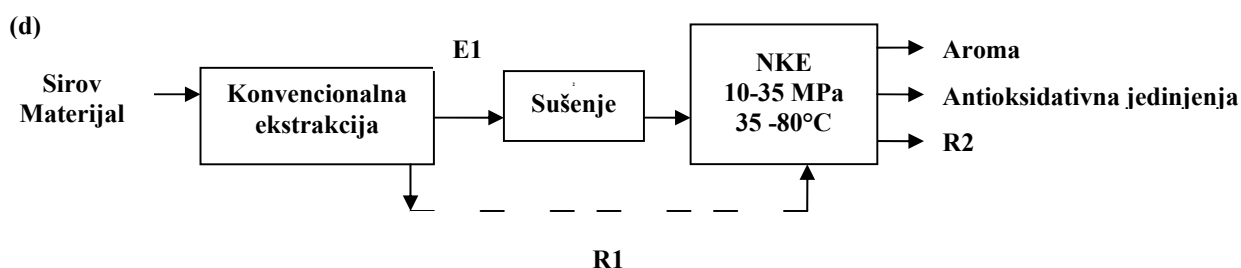
Sirovi materijal	Cvetovi, voće, listovi, začini, lekovite biljke, semenje, ljuske, korenje	Ljuskari, mikroalge, paradajz	Lišće masline, lekovite biljke, pšenična klica, semenje
Antioksidativna jedinjenja	Fenolna jedinjenja i terpenoidi	Karotenoidi	Vitamin E



Sirovi materijal	Listovi, lekovite biljke, semenje	Paprika
Antioksidativna jedinjenja	Fenolna jedinjenja i terpenoidi	Karotenoidi



Sirovi materijal	Lekovite biljke, stabljike
Antioksidativna jedinjenja	Fenolna jedinjenja i terpenoidi



Sirovi materijal	Semenke grožđa, trop grožđa
Antioksidativna jedinjenja	Fenolna jedinjenja i terpenoidi

Slika 2.14 Procesne šeme za ekstrakciju antioksidativnih jedinjenja pomoću NKE-CO₂
 Oznake: E1, E2: ekstrakti; R1, R2, R3: čvrsti ostaci (rezidui) (Martinez, 2008)

2.8. Ruzmarin

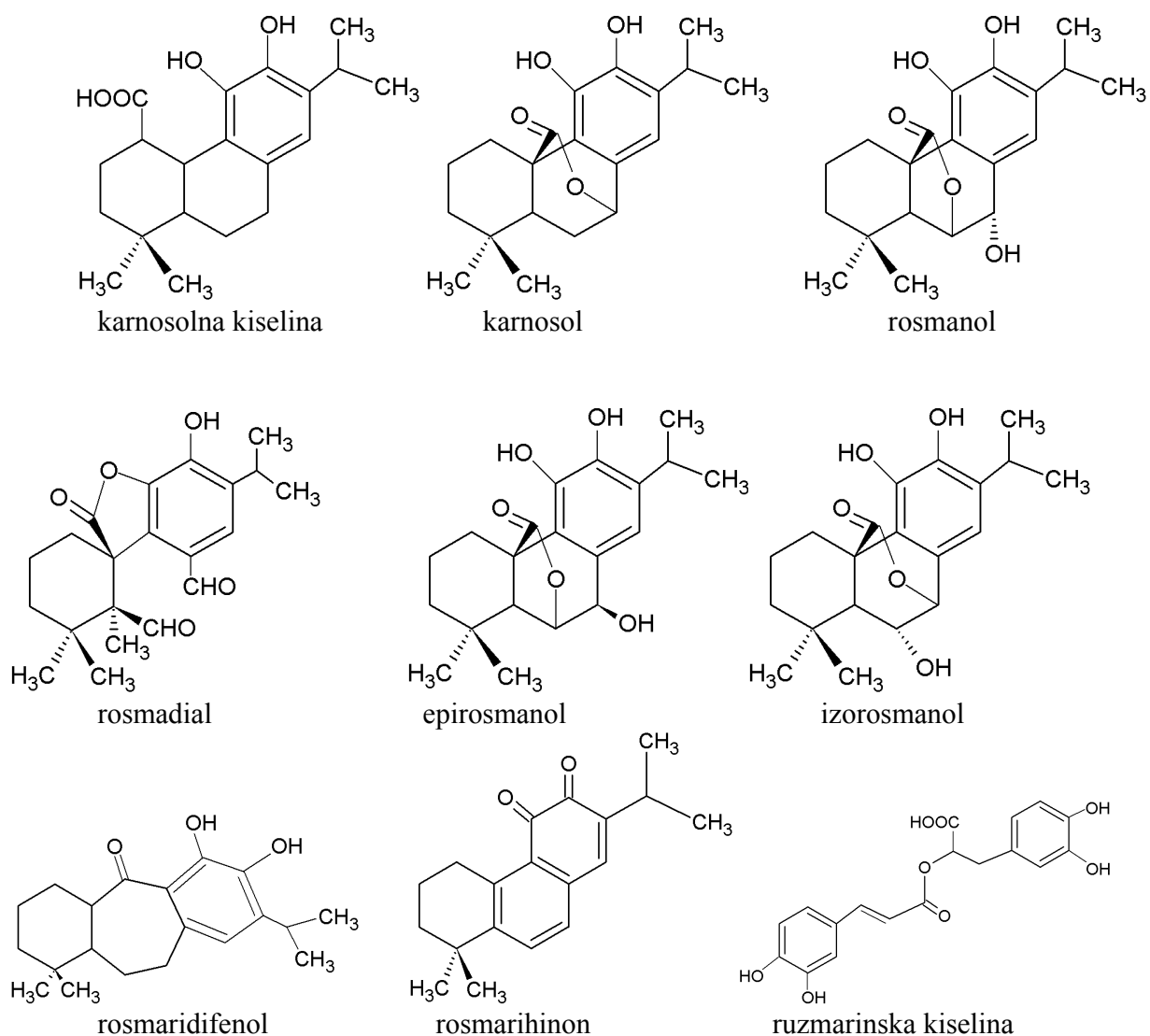
2.8.1. Hemijski sastav ekstrakta ruzmarina

Lišće ruzmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) i ekstrakti ruzmarina se koriste u prehrambenim proizvodima, ne samo kao začini, već i zbog njihovih antioksidativnih osobina. Ruzmarin je poznat kao biljka koja poseduje najvišu antioksidativnu aktivnost. Fenolna jedinjenja prisutna u ekstraktu ruzmarina mogu se podeliti u tri grupe: fenolni diterpeni, flavonoidi i fenolne kiseline (Cuvelier i sar., 1996). Prema Ibanez i sar. (2003), jedinjenja koja doprinose antioksidativnoj aktivnosti su fenolni diterpeni kao što su karnosol, rosmanol, 7- metilepirosmanol, izorosmanol, rosmadial, karnosolna kiselina, i metil karnosat i fenolne kiseline poput kafeinske i ruzmarinske kiseline. Među svim ovim jedinjenjima veruje se da najveću antioksidativnu aktivnost pokazuju karnosolna kiselina, karnosol i ruzmarinska kiselina. Karnosol nastaje oksidacijom karnosolne kiseline. Ovi fenolni diterpeni su dobri hvatači peroksil radikala. Ruzmarinska kiselina je drugi najčešće dobijani estar kafeinske kiseline, posle hlorogene kiseline i poseduje ekvivalentnu antioksidativnu aktivnost kao kafeinska kiselina. Ruzmarinska kiselina u poređenju sa askorbinskom kiselinom je u velikoj meri bolji hvatač superoksid anjon radikala. Karnosolna kiselina, karnosol i ruzmarinska kiselina imaju ulogu jakih inhibitora lipidne peroksidacije i ulogu helata metala. Karnosolna kiselina zajedno sa karnosolom, rosmanolom i izorosmanolom je jedino nađena u hloroplastima lista ruzmarina, dok *o*-metilovani oblici karnosolne kiseline i izorosmanola, 12-*o*-metilkarnosolna kiselina i 11,12-di-*o*-metilizorosmanol su nađeni u hloroplastima, endoplazmatičnom retikulumu, Goldžijevom (*Golgi*) aparatu, i plazma-membranama. Metilovanjem *o*-fenolnih hidroksilnih grupa gubi se aktivnost kao hvatača slobodnih radikala karnosolne kiseline i izorosmanola (Munne-Bosch i Alegre, 2001). Postoji mali broj radova u kojima je ispitivan hemijski sastav ekstrakta ruzmarina dobijen pomoću NKE (tabeli 2.30).

Tabela 2.30 Hemijski sastav natkritičnog ruzmarinskog ekstrakta

NKE: p; T; kosolvent	Identifikovana antioksidativna jedinjenja	Literatura
250 atm; 60°C; metanol 150-350 bar; 60°C; -	Karnosol i karnosolna kiselina Epirosmanol, skutelarein, rosmanol, rosmanol isomer, genkvanin, epirosmanol metil etar, karnosol, karnosol izomer, karnosolna kiselina, rosmadial, metil karnosat, cirsimaritin	Bicchi i sar., 2000 Cavero i sar., 2005
300-350 bar; 40-60°C; etanol	Rosmanol, epirosmanol, skutelarein, karnosol, karnosol isomer, karnosolna kiselina, rosmadial, cirsimaritin, metil karnosat	Senorans i sar., 2000
350 bar; 100°C; -	Karnosol i karnosolna kiselina	Yesil-Celiktas i sar., 2007

Hemijski sastav ekstrakta ruzmarina zavisi pored ostalih faktora, najviše od mesta kultivacije i postupka ekstrakcije. Među ostalim biljnim vrstama iz familije Lamiaceae, ruzmarin je najviše proučavan kao izvor prirodnih antioksidanasa i jedini začin koji je komercijalno dostupan kao antioksidans u Evropi i Americi (Yanishlieva i sar., 2006). Na slici 2.15 prikazana su najvažnija antioksidativna jedinjenja iz *Rosmarinus officinalis*. Skorašnja istraživanja (Yesil i sar., 2007) pokazala su različite vrednosti rezultata antioksidativne aktivnosti iz natkritičnih ekstrakata ruzmarina dobijenih iz biljnog materijala poreklom iz različitih područja u Turskoj i prikupljenog u različito vreme žetve u toku godine. Autori su takođe potvrdili da ruzmarinski ekstrakti sa različitih lokaliteta pokazuju značajnu razliku u antioksidativnoj aktivnosti kao i u sadržaju karnosola i karnosolne kiseline.



Slika 2.15 Antioksidativna jedinjenja iz *Rosmarinus officinalis* (Yanishlieva i sar., 2006)

2.8.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakta ruzmarina

Ruzmarinski ekstrakt pokazuje veliku antioksidativnu aktivnost i ima široku primenu u prehrambenoj industriji. Antioksidativna aktivnost ekstrakta iz ruzmarina je povezana sa prisustvom nekoliko fenolnih diterpena kao što su karnosolna kiselina, karnosol, rosmanol, rosmaridin i rosmaridifenol, koji su u stanju da prekidaju lančane reakcije donirajući vodonik slobodnim radikalima i transformišući slobodne radikale u stabilnije produkte (Frankel i sar., 1996; Basaga i sar., 1997; Thorsen i Hildebrandt, 2003). Osim jake antioksidativne aktivnosti ruzmarinski ekstrakt pokazuje i dobru termičku stabilnost (Che-Man i Jaswir, 2000). Karnosolna kiselina koja ulazi u sastav ruzmarinskog ekstrakta je lipofilni antioksidans, dobar "skevindžer" singletnog kiseonika, hidroksil i peroksil radikala, koji sprečava lipidnu peroksidaciju i razgradnju bioloških membrana (Aruoma i sar., 1992; Haraguchi i sar., 1995). U studiji Bracco i sar. (1981) pokazalo se da od 16 jedinjenja izolovanih iz ruzmarina karnosolna kiselina i karnosol doprinose najviše antioksidativnoj aktivnosti ruzmarinskog ekstrakta, usled uzajamnog dejstva njihovih *o*-fenolnih grupa sa njihovim izopropil-grupama. Tokom skladištenja i ekstrakcije iz ruzmarina karnosolna kiselina može se delimično transformisati u karnosol ili neki drugi diterpen kao što je rosmanol. Nakatani i Inatani (1981) su pokazali da je antioksidativna aktivnost rosmanola i karnosola identifikovanih u ruzmarinskom ekstraktu mnogo veća od aktivnosti α -tokoferola, BHA i BHT. Rosmanol iz ekstrakta ruzmarina je pokazao veću antioksidativnu aktivnost od α -tokoferola i BHT, kada se primeni u masti (Nakatani, 1994). Antioksidativna aktivnost ruzmarinskog ekstrakta može se povećati dodatkom askorbinske kiseline, askorbil-palmitata, limunske kiseline ili α -tokoferola zbog sinergizma između ovih jedinjenja i karnosolne kiseline (Pongracz i sar., 1990; Rizner i sar., 2000).

Podaci o antioksidativnoj aktivnosti natkritičnih ruzmarinskih ekstrakata izolovanih različitim postupcima NKE i upoređivanim sa aktivnošću sintetskih, komercijalnih i ekstrakata dobijenih konvencionalnom ekstrakcijom prikazani su u tabeli 2.31. Hadolin i sar. (2004) ispitivali su antioksidativnu aktivnost sirovog ruzmarinskog ekstrakta dobijenog konvencionalnom ekstrakcijom i prečišćenog ruzmarinskog ekstrakta dobijenog pomoću NKE-CO₂ iz sirovog ruzmarinskog ekstrakta, koristeći merenje peroksidne vrednosti u suncokretovom ulju. Prečišćeni ruzmarinski ekstrakt je pokazao veću aktivnost u odnosu na sirovi ekstrakt. Natkritični ekstrakt ruzmarina je pokazao bolju antioksidativnu efikasnost od smeše BHA/BHT (1:1) u kanola ulju i margarinu (Nguyen i sar., 1991). U istom patentu (Nguyen i sar., 1991) vršeno je ispitivanje antioksidativne sposobnosti natkritičnog ekstrakta ruzmarina rastvorenog u oleorezinu paprike. Ispitivanja su pokazala da ruzmarinska antioksidativna frakcija sprečava gubitak boje karotenskih pigmenta u tretiranom uzorku oleorezina paprike. Natkritični ekstrakt ruzmarina rastvoren je u oleorezinu paprike. Posle inkubiranja na temperaturi od 100°C, nije došlo do gubitka boje nakon 18 h, dok je u netretiranom uzorku gubitak boje iznosio 12%. Takođe, antioksidativne aktivnosti ruzmarinskog ekstrakta i ekstrakta žalfije bile su veće od aktivnosti smeše BHA/BHT (1:1) u parenom loju (Nguyen i sar., 1991).

Postoji mnogo više radova u kojima je ispitivana antioksidativna aktivnost ruzmarinskog ekstrakta dobijenog konvencionalnim načinima ekstrakcije (destilacijom ili pomoću organskih ratvarača) u nekoliko vrsta hrane: pilećim kobasicama (Riznar i sar., 2006), govedini (Georgantelis i sar., 2007; Ahn i sar., 2002), svinjskim kobasicama (Sebranek i sar., 2005), tretiranoj svinjskoj masti (Iriarte i sar., 1992), govećim paštetama (Formanek i sar., 2001; Thongtan i sar., 2005), pilećem mesu (Nissen i sar., 2000), ribljim proizvodima (Duxbury, 1992; Pokorny i sar., 1998), i dehidratisanim jajima (Duxbury, 1992).

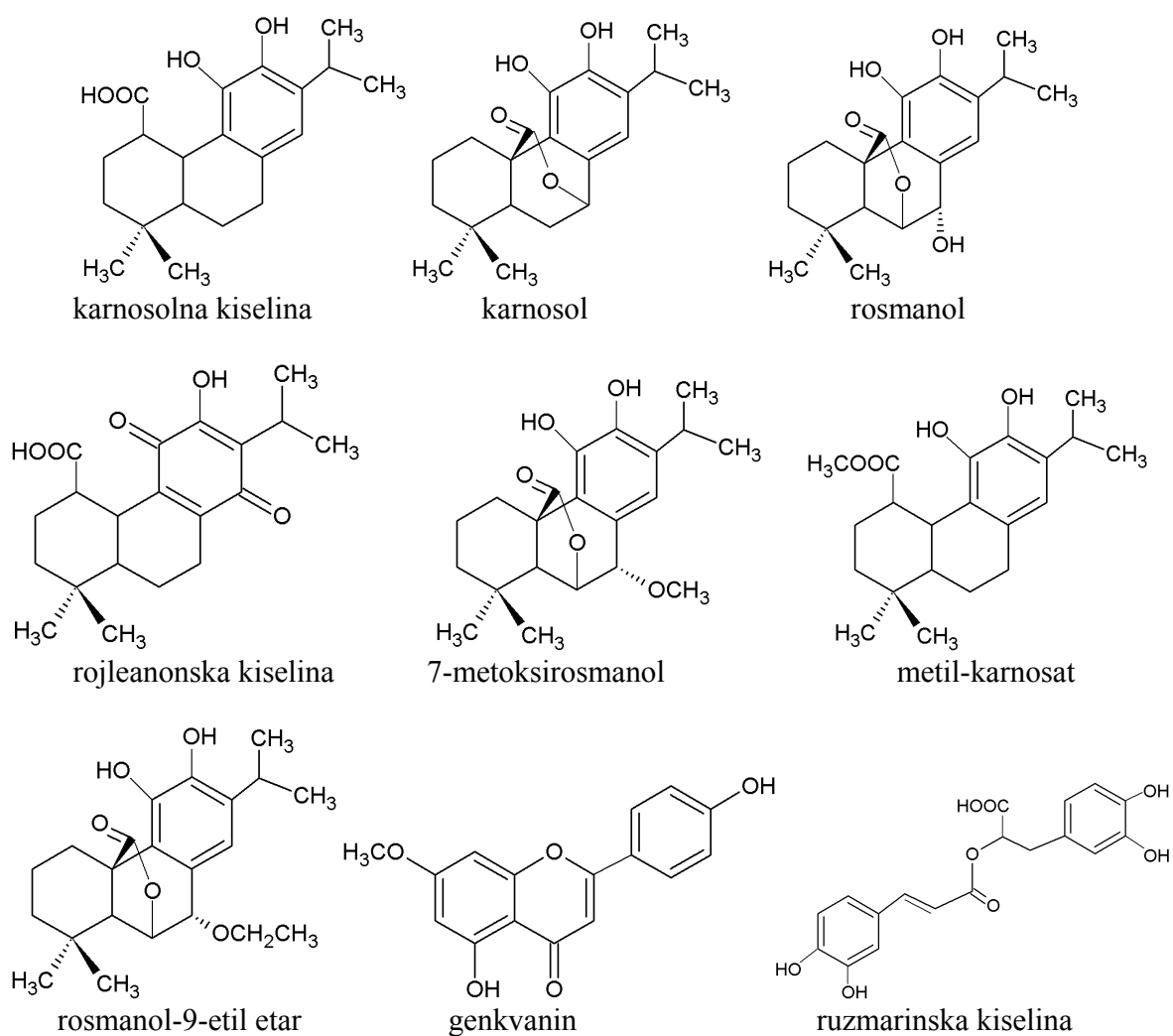
Tabela 2.31 *Antioksidativna aktivnost natkritičnog ruzmarinskog ekstrakta*

Opis procesa NKE	Antioksidativna aktivnost	Literatura
Jednostepena ekstrakcija		
NKE: ZE, p; T; bS		
4; 50; 373; 2	OS: NKE > BHA:BHT	Nguyen i sar., 1991
0,3; 30; 313; 1	LK-βk: NKE > βk	Carvalho i sar., 2005
0,28; 25; 313; 2	DPPH: AK > NKE	Cavero i sar., 2005
<0,1; 30; 313; 1	LK-βk: BHT > NKE	Dapkevicius i sar., 1998
Višestepena ekstrakcija		
1) NKE₁: ZE, p; T; bS		
2) NKE₂: ZE, p; T; bS		
1) 4; 30; 313; 1	OS: NKE > BHA:BHT	Nguyen i sar., 1991
2) 4; 50; 313; 1		
1) 0,01; 10; 313; -	DPPH: NKE ₂ > NKE ₁	Reglero i sar., 1999
2) 0,01; 40; 333; -	LK-βk: BHT > NKE	Ibanez i sar., 1999
Kombinovana (NKE-KE)		
1) NKE: ZE, p; T; bS		
2) KE: R; T; v		
1) 4; 30; 313; 1	OS: NKE > BHA:BHT > NKE-KE	Nguyen i sar., 1991
2) 95 % E; -; -		
1) -; 7,5; 305; 1	RIM:BHT > NKE-KE > αT	Nakatsu i Yamasaki., 2000
2) 50 % E; -; 1		
Kombinovana (KE-NKE)		
1) KE: R; T; v		
2) NKE: ZE; p; T; bS		
1) Komercijalni ekstrakt	OSU: NKE > KRE	Hadolin i sar., 2004
2) 0,5; 10; 308; 1		
1) 2-propanol: -; -; -	DPPH: KE > NKE	Lopez-Sebastian i sar., 1998
2) 0,005; 20; 333; -		
ZE: zapremina ekstraktora (l); p: pritisak (MPa); T: temperatura (K); R: rastvarač; v: vreme; bS: broj separatora.		
V: Voda; E: etanol.		
NKE: natkritični rezidu; NKE _i : natkritični ekstrakt iz i separatora; NKE-KE: ekstrakt dobijen iz natkritičnog rezidua pomoću konvencionalne ekstrakcije; KE: ekstrakt dobijen konvencionalnom ekstrakcijom; KRE: komercijalni ruzmarinski ekstrakt; AK-askorbinska kiselina.		
BHA: butilovani hidroksianizol; BHT:butilovani hidroksitoluen; BHA:BHT: smeša (1:1); αT: α-tokoferol.		
DPPH: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal; OS: oksidacija sala; OSU –oksidacija suncokretovog ulja; RIM: Rodin iron metod; LK-βk: linoleinska kiselina- β-karoten.		

2.9. Žalfija

2.9.1. Hemijski sastav ekstrakta žalfije

Antioksidativna aktivnost ekstrakata žalfije pripisuje se prisustvu fenolnih diterpena kao što su karnosol i karnosolna kiselina (Schwarz i Ternes, 1992), rojleanonska kiselina i 7-metoksirosmanol (Ninomiya i sar., 2004), metil-karnosat, rosmanol, epirosmanol, rosmadial (Cuvelier i sar., 1994), rosmanol-9-etil etar (Đarmati i sar., 1991); flavonoida kao što su genkvanin, cirstimaritin, i skutelarein; i fenolnih kiselina kao što je ruzmarinska kiselina (Cuvelier i sar., 1996). Na slici 2.16 prikazana su najvažnija antioksidativna jedinjenja iz *Salvia officinalis*.



Slika 2.16 Antioksidativna jedinjenja iz *Salvia officinalis* (Yanishlieva i sar., 2006)

2.8.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakta žalfije

Žalfija, *Salvia officinalis* L., je najviše poznata kao začin i kao lekovita biljka koja se koristi protiv upale grla, dispepsije i kao regulator laktacije (Ninomiya i sar., 2004). Zajedno sa *Rosmarinus officinalis* L., *S.officinalis* L. poseduje najjaču antioksidativnu aktivnost među ostalim biljkama. Antioksidativna aktivnost ekstrakta ruzmarina i žalfije dobijenog natkritičnom ekstrakcijom sa ugljenik(IV)-oksidom je uporediva sa aktivnošću sintetskih antioksidanasa kao što su BHA i BHT bez citotoksičnog i karcinogenog rizika koji imaju sintetski antioksidansi (Huang i sar., 1994; Ito i sar., 1983; Đarmati i sar., 1991). Đarmati i sar. (1991) reekstrahovali su etanolni ekstrakt žalfije sa natkritičnim ugljenik(IV)-oksidom i izolovali antioksidativno jedinjenje (rosmanol-9-etil etar) koje poseduje mnogo veću antioksidativnu aktivnost od BHT. U patentu (Nguyen i sar., 1991) opisana je antioksidativna aktivnost smeše natkritičnih ekstrakata ruzmarina i žalfije primenjenih na uzorke pilećeg mesa. Ekstrakti žalfije i ruzmarina (smeša 40 g ekstrakta žalfije i 15 g ruzmarina) dodati su u 100 g rafinisanog kanola ulja na 85°C da bi se pospešilo njihovo rastvaranje. Ovakav rastvor je dodat u 550 kg pilećeg mesa bez kostiju sa 20% masnoće u toku procesa povezivanja mesa (antioksidantni ekstrakt dodat je u koncentraciji 0,01% u odnosu na meso, odnosno 0,05% u odnosu na mast). Drugih 550 kg mesa je povezano bez dodatka ekstrakta. Meso je uskladišteno na 4°C. Merene su vrednosti oksidativne užeglosti tiobarbituratnom metodom (TBA). Nakon 4 nedelje TBA vrednosti tretiranog mesa su bile ispod 2 (dozvoljene), dok su vrednosti netretiranih (kontrolnih) uzoraka bile veće od 6 (neprihvatljive). Ovaj test je pokazao da infuzija smeše ekstrakta u masi od 0,01% u odnosu na meso omogućuje prodaju u svežem, umesto u smrznutom stanju. Podaci o antioksidativnoj aktivnosti natkritičnih ekstrakata iz žalfije izolovanih različitim postupcima NKE i upoređivanim sa aktivnošću sintetskih antioksidanasa prikazani su u tabeli 2.32.

Tabela 2.32 Antioksidativna aktivnost natkritičnog ekstrakta žalfije

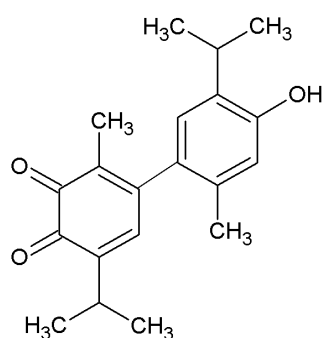
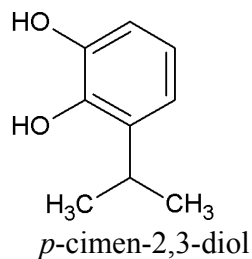
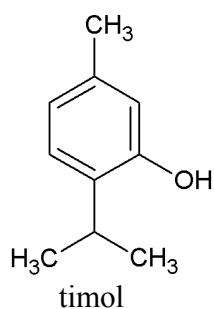
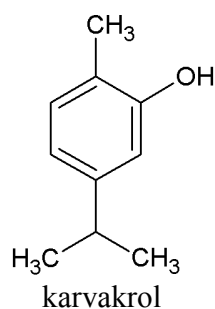
Opis procesa NKE	Antioksidativna aktivnost	Literatura
Jednostepena ekstrakcija		
NKE: ZE, p; T; bS		
1) 25-35; 373; 3	NKE ₃ > NKE ₂ > NKE ₁ > BHT	Daukšas i sar., 2001
<0,1; 30; 313; 1	LK-βk: BHT > NKE	Dapkevicius i sar., 1998
Višestepena ekstrakcija		
1) NKE₁: ZE, p; T; bS		
2) NKE₂: ZE, p; T; bS		
1) 4; 30; 313; 1	OS: NKE > BHA:BHT	Nguyen i sar., 1991
2) 4; 50; 313; 1		
Kombinovana (NKE-KE)		
1) NKE: ZE, p; T; bS		
2) KE: R; T; v		
1) 4; 30; 313; 1	OS: NKE > BHA:BHT > NKE-KE	Nguyen i sar., 1991
2) 95 % E; -; -		
ZE: zapremina ekstraktora (l); p: pritisak (MPa); T: temperatura (K); R: rastvarač; v: vreme; bS: broj separatora. E: etanol.		
NKE: natkritični rezidu; NKE _i : natkritični ekstrakt iz i separatora; NKE-KE: ekstrakt dobijen iz natkritičnog rezidua pomoću konvencionalne ekstrakcije.		
BHA: butilovani hidroksianizol; BHT:butilovani hidroksitoluen; BHA:BHT: smeša (1:1); OS: oksidacija sala; LK-βk: linoleinska kiselina- β-karoten.		

2.10. Timijan

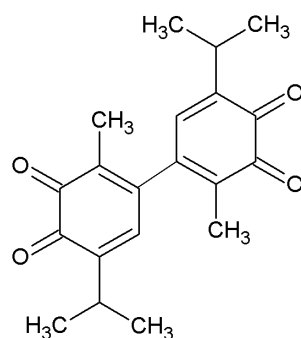
2.10.1. Hemijski sastav ekstrakta timijana

Timijan se najviše koristi zbog svojih antiseptičkih i antioksidativnih osobina (Miura i Nakatani, 1989; Schwarz i sar., 1996; Economou i sar., 1991), dezodoransnog dejstva (Nakatani i sar., 1989) i kao antikoagulans (Okazaki i sar., 2002). Timijan je bogat etarskim uljem i zbog toga poseduje fungicidno, antiseptičko i antioksidativno dejstvo. Etarsko ulje iz lišća se koristi u parfemima, sapunima i pastama za zube. Osim primene u kozmetici, timijan se koristi kao začim. Fenolni monoterpeni u timijanu, timol i karvakrol najviše doprinose prijatnom mirisu njegovog etarskog ulja, a poznato je i da inhibiraju lipidnu peroksidaciju (Yanishlieva i sar., 1999; Schwarz i sar., 1996). *p*-kumen-2,3-diol izolovan iz timijana pokazuje jaču antioksidativnu aktivnost od BHA i α -tokoferola (Schwarz i sar., 1996). Pet različitih *Thymus* vrsta (*T. vulgaris*, *T. pseudolanuginosw*, *T. citriodorus*, *T. serpyllm* i *T. doerfleri*) analizirane su pomoću High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) na prisustvo timola, karvakrola i *p*-kumen-2,3-diola. Najveći sadržaj ova tri jedinjenja nađen je u *T. vulgaris*.

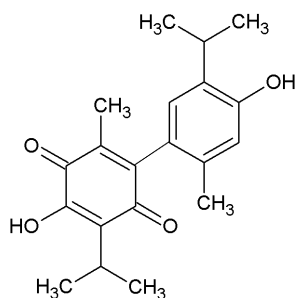
Od ostalih jedinjenja izolovanih iz timijana jaku antioksidativnu aktivnost imaju kafeinska kiselina (Schulz i Herrmann, 1980), bifenilna jedinjenja (Miura i sar., 1989; Nakatani i sar., 1989; Haraguchi et al., 1996; Dapkevicius et al., 2002), flavonoidi supstituisani sa metoksi grupama (Miura i Nakatani, 1989), eriodiktol (Haraguchi i sar., 1996), ruzmarinska kiselina, metil-rosmarinat (Fecka i Turek, 2008) i 7-*o*-metil-luteolin (Miura i sar., 1989). U literaturi ne postoje objavljeni podaci o hemijskom sastavu natkritičnog ekstrakta timijana. Na slici 2.17 prikazana su najvažnija antioksidativna jedinjenja iz *Thymus vulgaris*.



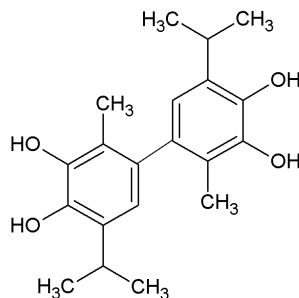
4'-hidroksi-5,5'-diizopropil-2,2'-
dimetilbifenil-3,4-dion



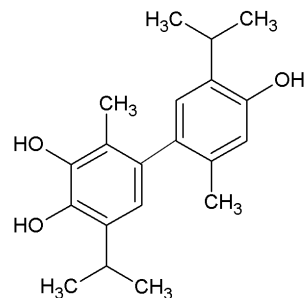
5,5'-diizopropil-2,2'-
dimetilbifenil-3,4,3',4'-tetraon



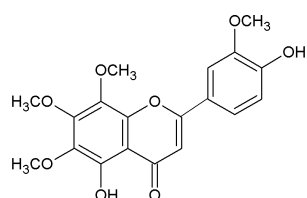
4,4'-dihidroksi-5,5'-diizopropil-
2,2'-dimetilbifenil-3,6-dion



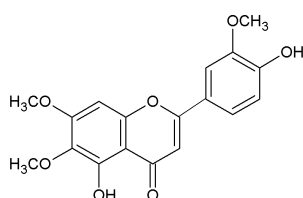
3,4,3',4'-tetrahidroksi-5,5'-
diizopropil-2,2'-dimetilbifenil



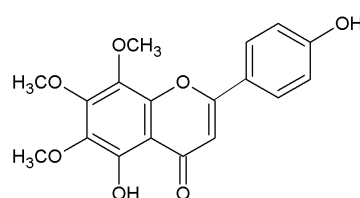
3,4,4'-trihidroksi-5,5'-diizopropil-
2,2'-dimetilbifenil



5,4'-dihidroksi-6,7,8,3'-
tetrametoksiflavon



5,4'-dihidroksi-6,7,3'-
trimetoksiflavon



5,4'-dihidroksi-6,7,8-
trimetoksiflavon

Slika 2.17 Antioksidativna jedinjenja iz *Thymus vulgaris* (Yanishlieva i sar., 2006)

2.10.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakta timijana

Istraživanje Lee-a i sar.(2005) pokazalo je da glavne komponente u ekstraktu timijana, posebno eugenol, timol i karvakrol imaju veću antioksidativnu aktivnost od BHT i α -tokoferola. Etarsko ulje timijana poseduje antibakterijsko dejstvo i Rota i sar. (2008) su potvrdili da su etarska ulja vrste *Thymus*, posebno *Thymus hyemalis*, *T. zygis*, i *T. vulgaris*, jaka baktericidna sredstva koja mogu da se koriste u prehrambenoj industriji za produženje roka trajanja namirnica. Novija istraživanja (Simandi i sar., 2001) su potvrdila antioksidativnu aktivnost ekstrakta timijana dobijenog pomoću natkritične ekstrakcije. Antioksidativna aktivnost natkritičnog ekstrakta timijana bila je neznatno manja od aktivnosti smeše BHA/BHT (1:1) u parenom loju (Nguyen i sar., 1991). Podaci o antioksidativnoj aktivnosti natkritičnih ekstrakata iz timijana izolovanih različitim postupcima NKE i upoređivanim sa aktivnošću sintetskih i ekstrakta dobijenog konvencionalnom ekstrakcijom prikazani su u tabeli 2.33.

Bifenilna jedinjenja iz timijana pokazuju dobro antioksidativno i dezodoransno dejstvo (Schwarz i sar., 1996). Budinčević i sar. (1995) ispitivali su antioksidativnu aktivnost etanolnog ekstrakta timijana koristeći masti životinjskog porekla kao supstrate na 60 °C pomoću Rancimat testa. Ekstrakti su pokazali antioksidativno dejstvo na 60°C ali ne i na temperaturi od 100°C.

Tabela 2.33 Antioksidativna aktivnost natkritičnog ekstrakta timijana

Opis procesa NKE	Antioksidativna aktivnost	Literatura
Jednostepena ekstrakcija		
NKE: ZE, p; T; bS		
<0,1; 30; 313; 1	LK- β k: BHT > NKE	Dapkevicius i sar., 1998
5; 40; 333; -	OSU: BHT \approx KE \approx NKE	Simandi i sar., 2001
Kombinovana (NKE-KE)		
1) NKE: ZE, p; T; bS		
2) KE: R; T; v		
1) 4; 30; 313; 1	OS: NKE > BHA:BHT > NKE-KE	Nguyen i sar., 1991
2) 95 % E; -; -		
ZE: zapremina ekstraktora (l); p: pritisak (MPa); T: temperatura (K); R: rastvarač; v: vreme; bS: broj separatora. E: etanol.		
NKE: natkritični rezidu; KE: ekstrakt dobijen konvencionalnom ekstrakcijom; NKE-KE: ekstrakt dobijen iz natkritičnog rezidua pomoću konvencionalne ekstrakcije.		
BHA: butilovani hidroksianizol; BHT:butilovani hidroksitoluen; BHA:BHT: smeša (1:1);		
OS: oksidacija sala; OSU: oksidacija suncokretovog ulja; LK- β k: linoleinska kiselina- β -karoten.		

2.11. Izop

2.11.1. Hemijski sastav ekstrakta izopa

Izop (*Hyssopus officinalis* L.) ima najveću primenu kao začín i kao sastojak raznih soseva. Koristi se kao karminativ, emenagog, stomahik i tonik. Među ostalim aromatičnim i lekovitim biljkama izop nije dovoljno proučavan. Ne postoje literaturni podaci o hemijskom sastavu natkritičnog ekstrakta izopa niti ekstrakta izopa dobijenog konvencionalnim postupcima.

2.11.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakta izopa

Dapkevicius i sar. (1998) su objavili da je antioksidativna aktivnost dezodorisanog ekstrakta izopa veoma mala u poređenju sa ruzmarinom, timijanom, majoranom i žalfijom. Đarmati i sar. (1991) su izolovali antioksidans rosmanol-9-etil etar iz alkoholnog ekstrakta izopa koji je pokazao jaču antioksidativnu aktivnost od BHT. U radu Fernandez-Lopez i sar. (2003) ekstrakt izopa je inhibirao lipidnu peroksidaciju i razgradnju hem pigmenata u svinjskom mesu. Međutim, nađeno je da ekstrakti izopa mogu da pokažu i prooksidativno dejstvo, pri čemu se povećava formiranje konjugovanih diena u suncokretovom ulju (Abdalla i Roozen, 1999).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Biljne sirovine i hemikalije

Za eksperimentalna istraživanja u ovom radu korišćeni su osušeni listovi ruzmarina, žalfije, timijana i izopa sa područja Južnog Balkana. Za ekstrakcije je korišćen komercijalni ugljenik(IV)-oksid (čistoća 99%, Messer, Beograd, Srbija). Za ispitivanje antioksidativne aktivnosti korišćeni su 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH), 5,5-dimetil-1-pirolin-N-oksid (DMPO), butilovani hidroksianizol (BHA) proizvođača Sigma Chemical Co. (St. Louis, SAD) i komercijalni ruzmarinski ekstrakt Flavor'Plus™ (Naturex, Francuska). Za hemijsku analizu pomoću LC-MS korišćeni su sledeći rastvarači: metanol ph grade (Burdick & Jackson, Mashegon, MI, SAD.), acetonitril (Merck KgaA, Darmstadt, Nemačka), mravlja kiselina (Lach-Ner, s.r.o. Neratovice, Češka Republika) i Milli Q voda 18.2 MΩ cm koja je dobijena iz sistema za prečišćavanje Millipore Simplicity 185. Standardna jedinjenja potrebna za hemijsku analizu bili su karnosolna kiselina i karnosol (čistoće $\geq 91\%$, Sigma Chemical Co. (St. Louis, SAD)).

Reagensi korišćeni za određivanje peroksidnog broja (kalijum-jodid, hloroform, glacijalna sirćetna kiselina, skrob i natrijum-tiosulfat) bili su od proizvođača Merck (Darmstadt, Nemačka). Komercijalno suncokretovo ulje bilo je iz fabrike ulja i biljnih masti Vital (Vrbas, Srbija).

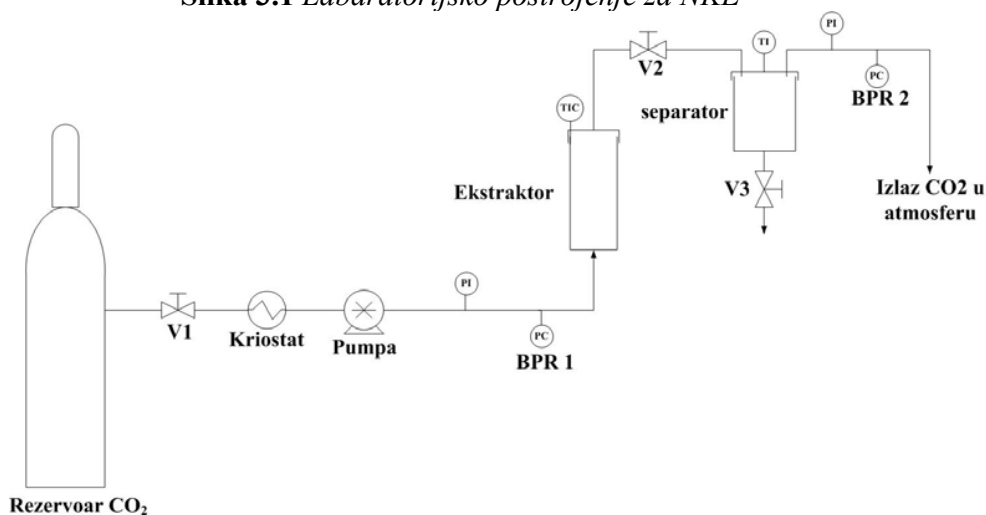
3.2. Metode

3.2.1. Opis postrojenja za NKE

Ekstrakcije sa natkritičnim ugljenik (IV)-oksidom su izvršene na laboratorijskom postrojenju za NKE (Autoclave Engineers Screening System) (slika 3.1). Šema ovog postrojenja prikazana je na slici 3.2. Ovaj sistem predviđen je za laboratorijska ispitivanja sa šaržama biljnog materijala, uz korišćenje ugljenik (IV)-oksida kao natkritičnog medijuma uz najveći dozvoljeni radni pritisak od 41,3 MPa na 138°C. Tečni ugljenik(IV)-oksid pritiče iz boce sa sifonom. Između izlaza iz boce i pumpe visokog pritiska za tečnosti, tečni ugljenik(IV)-oksid se hladi u kriostatu kako bi se sprečilo njegovo isparavanje. Pumpa visokog pritiska (Milton Roy, Francuska) je pumpa sa maksimalnim izlaznim pritiskom 48 MPa pri protoku od 0,5 l/h. Glava pumpe se dodatno hladi radi obezbeđenja ravnomernog rada i konstantnog protoka tečne faze. Regulacija pritiska u ekstraktoru i separatoru vrši se pomoću dva povratna regulatora pritiska (BPR1 i BPR2). Radna zapremina ekstraktora iznosi 150 cm³. Ekstraktor je izrađen od nerđajućeg čelika 316SS i opremljen je sa dva grejača radi održavanja neophodne temperature. Natkritični ugljenik (IV)-oksid napušta ekstraktor i ulazi u separator gde se promenom pritiska vrši odvajanje rastvarača od rastvorka. Zapremina separatora iznosi 500 cm³. Uzorci ekstrakta mogu se uzeti otvaranjem ventila na dnu separatora. Za indikaciju protoka ugljenik(IV)-oksida kroz sistem predviđen je merač protoka. Ugljenik(IV)-oksid koji napušta separator, nakon prolaska kroz merač protoka, odlazi u atmosferu.



Slika 3.1 Laboratorijsko postrojenje za NKE

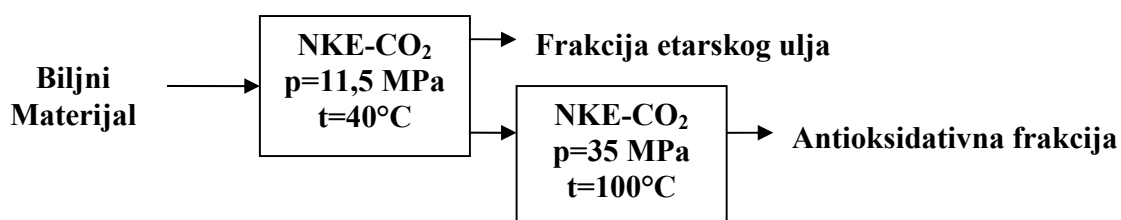


Slika 3.2 Šema laboratorijskog postrojenja za NKE

3.2.2. Frakciona ekstrakcija

U cilju izolovanja antioksidativnih frakcija primenjen je postupak frakcione ekstrakcije sa natkritičnim ugljenik(IV)-oksidom. Šematski prikaz frakcione ekstrakcije sa natkritičnim CO₂ dat je na slici 3.3. Prvo je izolovana frakcija etarskog ulja iz biljnog materijala na pritisku od 11,5 MPa i temperaturi od 40°C, koja se sastojala od lako isparljivih, aromatičnih komponenata, pretežno monoterpena i seskviterpena i njihovih oksidacionih proizvoda sa smolama. Zatim je na pritisku od 35 MPa i na temperaturi od 100°C izdvojena antioksidativna frakcija iz ruzmarina, žalfije, timijana i izopa. Dati parametri ekstrakcije (100°C i 35 MPa) su izabrani na osnovu ranijih istraživanja (Nguyen i sar., 1991), koji pokazuju da je temperaturni opseg 90-110°C najpogodniji za izolovanje antioksidativnih frakcija iz biljnih vrsta familije Lamiaceae. Kasnije su Rižnar i sar. (2008) pokazali da je rastvorljivost karnosola iz ruzmarinskog natkritičnog ekstrakta najveća na pritisku od 35 MPa i povećava se sa porastom temperature od 40°C do 80 °C. Uporedo sa ekstrakcijom na pritisku od 35 MPa i na temperaturi od 100°C, izvršena je i ekstrakcija frakcija iz ruzmarina, žalfije, timijana i izopa na nižem pritisku i temperaturi (30 MPa i 40°C). Hemijska analiza i antioksidativna aktivnost određivana je samo u slučaju frakcija izolovanih na pritisku od 35 MPa i na temperaturi od 100°C.

Biljni materijal je usitnjen do granulacije 0,400 mm. Protok natkritičnog CO₂ bio je 0,6 kg/h pri ekstrakciji etarskog ulja i 0,3 kg/h pri ekstrakciji antioksidativne frakcije. Početna masa biljnog materijala bila je: 56 g ruzmarina, 56,5 g žalfije, 54 g timijana i 55 g izopa. Svi eksperimenti su rađeni u tri ponavljanja.



Slika 3.3 Šematski prikaz frakcione ekstrakcije sa natkritičnim CO₂

3.2.3. Tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom (LC-MS)

Hemijski sastav antioksidativnih frakcija iz biljnog materijala (ruzmarin, žalfija, timijan i izop) je analiziran pomoću HPLC-DAD/ESI-ToF. Natkritični ekstrakti rastvarani su u metanolu do koncentracije 10,000 mg/ml. Uzorci su profiltrirani kroz 0,45 µm poli-tetrafluoroetilenski (PTFE) filter (Agilent Technologies).

LC/DAD/MS analiza izvršena je na tečnom hromatografu Agilent 1200 Series HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Nemačka) sa binarnom pumpom, autosemplerom, Zorbax Eclipse Plus C18 kolonom (1,8 µm, 4,6×150 mm, Agilent) i DAD detektorom (diode-array detector) povezanim sa 6210 Time-of-Flight LC/MS sistemom (Agilent Technologies). Za mobilnu fazu korišćena je smeša rastvarača A (0,2% mravlje kiseline u vodi) i rastvarača B (acetonitril). Sadržaj rastvarača B se menjao po sledećem programu: 0–1,5 min 5% B, 1,5–26 min, linearna promena od 5% B do 95% B, 26–35 min, 95% B. Protok mobilne faze bio je 1,40 ml/min, temperatura kolone 40°C i injekciona zapremina 5 µl. Detekcija svih pikova je vršena pomoću DAD detektora u opsegu talasnih dužina od 190-450 nm i hromatograf je beležio na 240 nm. Za dobijanje i obradu podataka korišćen je softver Mass Hunter Workstation.

Za dobijanje negativno naelektrisanih molekulskih jona korišćena je jonizacija na atmosferskom pritisku. U cilju dobijanja osetljivih molekulskih jona bila je neophodna odgovarajuća kalibracija ESI (electrospray ionization) parametara (potencijal igle, temperatura gasa, pritisak raspršivača i napon fragmentatora). Određeni MS parametri bili su: potencijal igle 4000 V, temperatura gasa, 350°C, protok gasa za sušenje 12 ml/min, pritisak mlaznice 45 psig; napon fragmentatora 140 V i maseni opseg 100-2000 m/z. Organska kiselina je dodata u mobilnu fazu da bi se poboljšao oblik pika. Različite organske kiseline u različitim koncentracijama su testirane i došlo se do zaključka da je najpogodnije dodati mravlju kiselinu u koncentraciji od 0,2%. Pozitivna i negativna naelektrisanja fenolnih jedinjenja su testirana i došlo se do zaključka da su negativno naelektrisani molekulski joni mnogo osetljiviji.

Jedinjenja su određivana na osnovu svojih retencionih vremena (t_R), masenog spektra i UV spektra. Izvršena je tentativna identifikacija jedinjenja koja se zasnivala na prethodno objavljenim literaturnim podacima. Potpuna identifikacija jedinjenja nije bila moguća zbog toga što potpun snimak masenog spektra hromatografski odvojenih jedinjenja daje jedino deprotonovane $[M-H]^-$ jone, i MS/MS eksperimenti nisu bili mogući sa dostupnom opremom.

Za UV-Vis identifikaciju i kvantifikaciju karnosola i karnosolne kiseline, UV detektor je beležio na 240 nm, a spektar pikova je sniman između 190 i 450 nm pomoću DAD detektora. Karnosol i karnosolna kiselina, među glavnim jedinjenjima prisutnim u ispitivanim ekstraktima su kvantifikovani u odnosu na čiste standarde.

3.2.4. Kvantitativna analiza karnosola i karnosolne kiseline

Kvantitativna analiza je vršena na istom tečnom hromatografu Agilent 1200 Series HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Nemačka) korišćenom za kvalitativnu analizu. Kolona, mobilna faza, gradijent rastvarača, protok mobilne faze i injekciona zapremina bili su takođe isti kao kod LC-MS analize. UV detekcija vršena je na 240 nm. Snimane su četiri kalibracione krive sa rastvorima poznate koncentracije standardnih jedinjenja karnosola i karnosolne kiseline. Uzorci su rastvarani u metanolu do koncentracije 10,000 mg/ml, i profiltrirani kroz 0,45 µm politetrafluoroetilenski (PTFE) filter (Agilent Technologies).

3.2.5. Obrazovanje i detekcija DPPH radikala

Za slepu probu 400 µl 0,4 mM metanolnog rastvora DPPH radikala pomešano je sa 200 µl DMF (N,N-dimetilformamid). Zapremina of x µl DMF rastvora (koncentracije 10 mg/ml) ispitivanih ekstrakata dobijenih na pritisku od 35 MPa i temperaturi od 100°C dodata je smeši (200-x) µl DMF i 400 µl 0,4 mM metanolnog rastvora DPPH radikala (proba sa ekstraktima). Opseg koncentracija ispitivanih natkritičnih ekstrakata bio je 0,05-0,4 mg/ml za ruzmarin i žalfiju, 0,01-0,3 mg/ml za timijan i 1,0-20,0 mg/ml za izop. Opseg koncentracija ispitivanih komercijalnih ekstrakata bio je 0,005-0,2 mg/ml za BHA i 0,01-0,5 mg/ml za Flavor'Plus™. Nakon toga smeša je mešana 2 min i prebačena u kvarcnu pločastu ćeliju ER-160FT. ESR spektri su snimani na ESR spektrometru Bruker 300E (Rheinstetten, Nemačka) pod sledećom uslovima: frekvencija modulacije, 100 kHz; amplituda modulacije, 0,256 G; vremenska konstanta, 40,96 ms; vremenski opseg merenja, 327,68 ms; centar polja, 3440,00 G; ukupan opseg merenja, 100,00 G; frekvencija mikrotalasnog područja, 9,64 GHz; snaga mikrotalasnog područja, 20 mW; i temperatura merenja, 23°C.

Antioksidativna aktivnost (AA_{DPPH}) definisana je izrazom:

$$AA_{DPPH} (\%) = 100 \cdot (h_o - h_x) / h_o$$

gde su:

h_o - visina drugog pika ESR signala DPPH radikala slepe probe, i

h_x - visina drugog pika ESR signala DPPH radikala probe sa ekstraktima.

Konstruisana je zavisnost AA_{DPPH} u procentima od koncentracije ispitivanih natkritičnih ekstrakata i komercijalnih antioksidanasa u mg/ml.

3.2.6. Obrazovanje i detekcija $\cdot\text{OH}$ radikala

S obzirom na veliku reaktivnost, hidroksilne radikale nije moguće snimati ESR spektrometrijom. Primenom tzv. "spin-trapping" tehnike moguće je prevazići ovaj problem. Hidroksilni radikali dobijeni su Fentonovom reakcijom u sistemu: 0,2 ml 2 mM H_2O_2 , 0,2 ml 0,3 mM $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ i 0,2 ml 112 mM DMPO kao "spin trap" jedinjenje (slepa proba). Uticaj ispitivanih ekstrakata na formiranje i transformaciju hidroksilnih radikala ispitivan je dodavanjem DMF rastvora ispitivanih natkritičnih ekstrakata ruzmarina, žalfije, timijana i izopa i komercijalnih antioksidanasa u Fenton reakcionu sistem u opsegu sledećih koncentracija 0,1-3,0 mg/ml za ruzmarin i izop, 0,1-2,0 mg/ml za žalfiju, 0,5-3,0 mg/ml za timijan, 0,1-3,0 mg/ml za BHA i 0,1-1,75 mg/ml za Flavor'Plus™. ESR spektri snimani su nakon 2,5 min, pod sledećim uslovima: frekvencija modulacije, 100 kHz; amplituda modulacije, 0,512G; vremenska konstanta, 81,92 ms; vremenski opseg merenja, 163,84ms; centar polja, 3440,00 G; ukupan opseg merenja, 100,00 G; frekvencija mikrotalasnog područja, 9,64 GHz; snaga mikrotalasnog područja, 20 mW; i temperatura merenja, 23°C.

Vrednost AA_{OH} je dobijena na osnovu izraza:

$$AA_{\text{OH}}(\%) = 100 \cdot (h_o - h_x) / h_o$$

gde su:

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

h_x - visina drugog pika ESR signala DMPO-OH spin adukta probe sa ekstraktima.

Konstruisana je zavisnost AA_{OH} u procentima od koncentracije ispitivanih natkritičnih ekstrakata i komercijalnih antioksidanasa u mg/ml.

3.2.7. Statistička obrada podataka

Origin 6.0 software (OriginLab Corporation, USA) je korišćen za statističku obradu podataka AA_{DPPH} i AA_{OH} rezultata. Određena je standardna devijacija (SD). Svi eksperimenti su izvedeni u tri ponavljanja, a rezultati predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD).

3.2.8. Određivanje peroksidnog broja

Peroksidni broj (*PV*) određivan je prema standardnom postupku ISO 3960:1977. Svaka od antioksidativnih frakcija je rastvorena u suncokretovom ulju u koncentraciji od 200 mg/kg ulja i uzorci su čuvani u sušnici na temperaturi od 98°C. Svaka dva sata uzorci su uzimani za analizu tako što se približno 2 g uzorka merilo na analitičkoj vagi i stavljalo u erlenmajer zapremine 250 ml sa brušenim čepom. Dodatkom 10 ml hloroforma uzorak se brzo rastvorio mešanjem. Zatim se dodalo 15 ml glacijalne sirćetne kiseline i 1 ml zasićenog vodenog rastvora kalijum-jodida. Boca se odmah zatvorila, mučkala 1 minut i ostavila 5 minuta u mraku na temperaturi od 15 do 25°C. Posle dodavanja 75 ml destilovane vode i nekoliko kapi 1% rastvora skroba, smeša se titrisala standardnim rastvorom natrijum-tiosulfata koncentracije 0,002 mol/l sve dok se plava boja nije izgubila. Slepa proba se takođe određivala. Peroksidni broj (*PV*), izražen u miliekvivalentima nastalih peroksida po 1 kg uzorka (meq O₂/kg), određivana je na osnovu formule:

$$PV = (V_1 - V_0) \cdot c \cdot 1000 / m$$

gde su:

V_1 – zapremina (ml) standardnog rastvora natrijum-tiosulfata utrošenog za titraciju uzorka,

V_0 – zapremina (ml) standardnog rastvora natrijum-tiosulfata utrošenog za titraciju slepe probe

c – tačna koncentracija rastvora natrijum-tiosulfata (mol/l), i

m – masa uzorka (g).

PV za svaki uzorak je analiziran tri puta. Rezultati su upoređivani sa kontrolnim uzorkom tj. uzorkom bez dodatka antioksidativne frakcije. Vremenski period merenja *PV* je računat na broj časova potrebnih da peroksidni broj uzorka dostigne vrednost od 10 meq O₂/kg ulja, prema Pravilniku o kvalitetu i drugim zahtevima za jestiva biljna ulja i masti, margarin i druge masne namaze, majonez i srodne proizvode gde maksimalna dozvoljena vrednost za *PV* iznosi 10 meq O₂/kg ulja.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

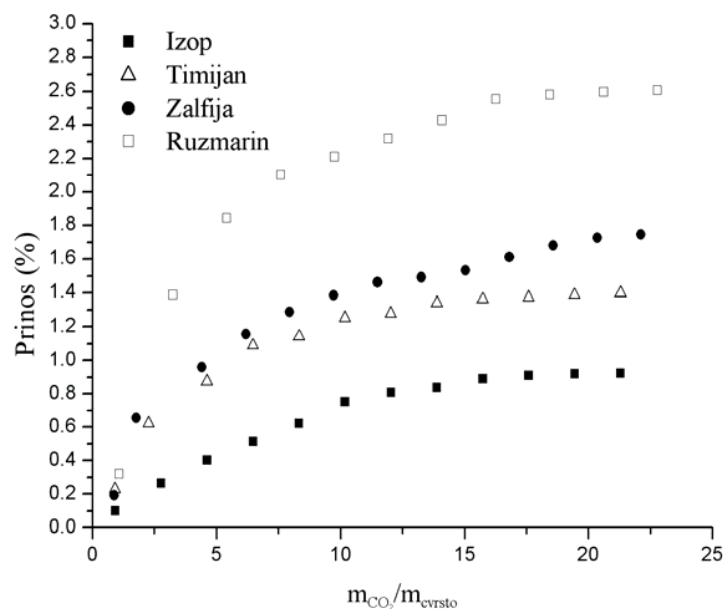
4.1. Prinos antioksidativnih frakcija

Natkritičnom ekstrakcijom ugljenik(IV)-oksidom na 40°C i 11,5 MPa izolovano je 0,676 mas% etarskog ulja iz ruzmarina, 2,32 mas% etarskog ulja iz žalfije, 0,754 mas% etarskog ulja iz timijana i 0,651 mas% etarskog ulja iz izopa. Nakon izdvajanja frakcije etarskog ulja koja sadrži lako isparljiva aromatična jedinjenja, iz biljnog materijala odmah zatim je re-ekstrakcijom na višem pritisku i temperaturi (35 MPa i 100°C; i 30 MPa i 40°C) izolovana antioksidativna frakcija. Ostvareni prinosi antioksidativnih frakcija prikazani su u tabeli 4.1. Ekstrakcione krive prikazane su na slici 4.1 (a,b). Na slici 4.2 date su krive ekstrakcije za etarska ulja. Cavero i sar. (2005) su izolovali natkritični ekstrakt ruzmarina na pritiscima u opsegu od 15 MPa do 35 MPa i temperaturnom opsegu od 40°C do 60°C. Prinosi ekstrakata kretali su se od 0,03 do 0,13% za ekstrakte izolovane bez dodatka kosolventa, i od 3,93 do 6,78% u slučaju ekstrakcija u kojima je etanol upotrebljen kao kosolvent. Ibanez i sar. (1999) izolovali su ruzmarinsku antioksidativnu frakciju na pritisku od 40 MPa i temperaturi od 60°C. Ostvareni prinosi kretali su se u opsegu od 1 do 1,5%. Daukšas i sar. (2001) objavili su rezultate NKE žalfije na temperaturi od 100°C i pritiscima 25-35 MPa sa ili bez dodavanja 1% ili 2% etanola kao kosolventa. Oni su došli do zaključka da se na pritiscima između 25 MPa i 30 MPa rastvara približno 50% komponenti iz žalfije koje se rastvaraju u natkritičnom ugljenik(IV)-oksidu na 35 MPa sa dodatkom 1% etanola. Prinos ekstrakta žalfije na 35 MPa je značajno povećan dodatkom 1% of etanola, dok je daljim dodavanjem etanola od 2% prinos počeo da opada. Dapkevicius i sar. (1998) objavili su da je prinos ekstrakata ruzmarina, žalfije, timijana i izopa dobijen pomoću NKE na 30 MPa i 40°C iznosio 71, 5 g/kg, 50,2 g/kg, 54,6 g/kg i 37,1 g/kg, respektivno. Simandi i sar. (2001) izolovali su natkritični ekstrakt timijana na pritisku od 40 MPa i temperaturi od 60°C. Ostvareni prinos iznosio je 4,92 mas%.

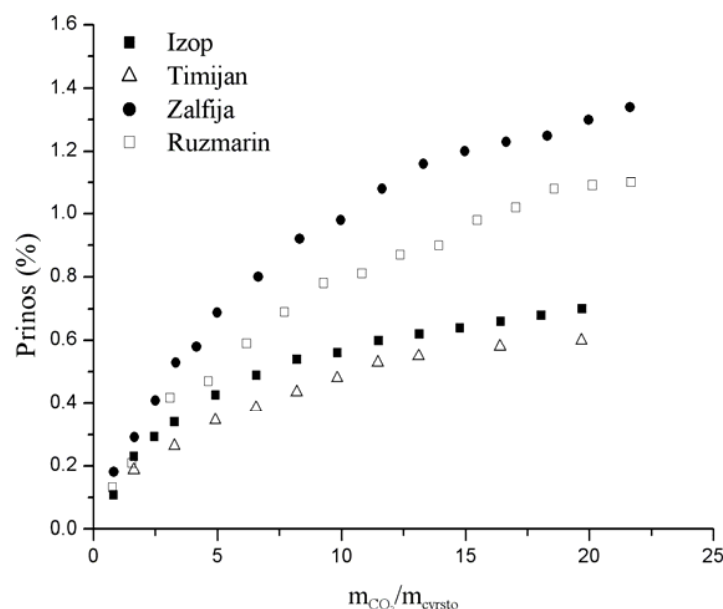
Razlike u ostvarenim prinosima antioksidativnih ekstrakata mogu se objasniti na osnovu različitog kvaliteta biljnog materijala, geografskog porekla, vremena žetve, klimatskih uslova i različitih operativnih uslova ekstrakcije.

Tabela 4.1 Ostvareni prinosi antioksidativnih frakcija

Biljni materijal	Pritisak, MPa	Temperatura, °C	Prinos, mas%
Ruzmarin	35	100	2,61
	30	40	1,10
Žalfija	35	100	1,75
	30	40	1,34
Timijan	35	100	1,40
	30	40	0,60
Izop	35	100	0,925
	30	40	0,70



Slika 4.1a Prinos antioksidativne frakcije iz ruzmarin, žalfije, timijana i izopa kao funkcija specifične količine rastvarača $m_{CO_2}/m_{\text{čvrsto}}$ (kg CO_2 /kg biljnog materijala) za natkritičnu ekstrakciju na pritisku od 35 MPa i temperaturi od 100°C



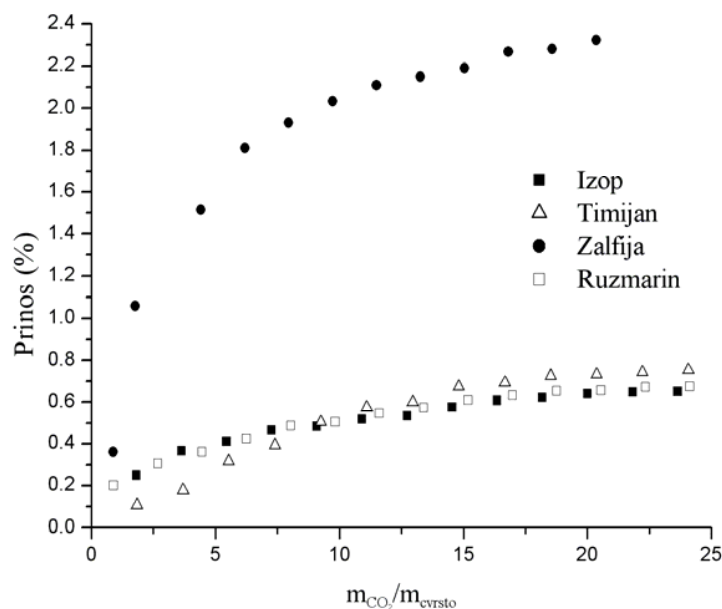
Slika 4.1b Prinos antioksidativne frakcije iz ruzmarin, žalfije, timijana i izopa kao funkcija specifične količine rastvarača $m_{CO_2}/m_{\text{čvrsto}}$ (kg CO_2 /kg biljnog materijala) za natkritičnu ekstrakciju na pritisku od 30 MPa i temperaturi od 40°C

Kao što se može videti na slici 4.1 (a, b) i u tabeli 4.1 ostvareni prinosi antioksidativnih frakcija na 35 MPa i 100°C su veći u odnosu na prinose antioksidativnih frakcija izolovanih na 30 MPa i 40°C. Veći prinos ekstrakcije je postignut na većem pritisku jer sa povećanjem pritiska raste gustina natkritičnog fluida i rastvorljivost rastvorka u NK-CO₂. S druge strane povećanje pritiska može dovesti do smanjenja selektivnosti NK-CO₂. Veći prinos ekstrakcije je postignut na većoj temperaturi jer sa porastom temperature na pritisku u blizini kritičnog dolazi do smanjenja gustine i rastvorljivosti rastvorka u NK-CO₂, takođe dolazi i do povećanja napona pare rastvorka. Pošto na visokim temperaturama, veći uticaj na rastvorljivost ima povećanje napona pare rastvorka od smanjenja gustine natkritičnog rastvarača, dolazi do porasta rastvorljivosti u NK-CO₂. Ranija istraživanja (Nguyen i sar., 1991) su pokazala da je temperaturni opseg 90-110°C najpogodniji za izolovanje antioksidativnih frakcija iz biljnih vrsta porodice Lamiaceae i da na temperaturama većim od 110°C može doći do degradacije komponenti u izolovanom ekstraktu. Isti autori su pokazali da je najpogodnije koristiti čist NK-CO₂ bez dodatka kosolventa jer bi to imalo za posledicu smanjenje selektivnosti NK-CO₂ (povećanje prinosa ekstrakcije koekstrakcijom jedinjenja koja ne poseduju antioksidativne osobine). Postignuti prinosi antioksidativnih frakcija u ovom radu (tabela 4.1) su znatno niži od prinosa antioksidativnih frakcija koji su dati u US Patentu 5, 017, 397 (ruzmarin 5,2%, žalfija 5,7%, timijan 2,0% i origano 3,2%), s tim što su ovi ekstrakti izolovani na znatno višem pritisku od 50 MPa i temperaturi od 95-100°C (Nguyen i sar., 1991).

Ivanović i sar. (2009) su izolovali antioksidativne frakcije ruzmarina, žalfije, timijana i izopa postupkom frakcione ekstrakcije pomoću NK-CO₂ na pritisku od 30 MPa i temperaturi od 100°C. Postignuti prinosi antioksidativnih frakcija u ovom radu na 35 MPa i 100°C su veći u odnosu na prinose antioksidativnih frakcija izolovanih na pritisku od 30 MPa i temperaturi od 100°C. Ostvareni prinosi antioksidativnih frakcija u ovom radu na 30 MPa i 40°C su niži u odnosu na prinose antioksidativnih frakcija izolovanih na 30 MPa i 100°C. Pošto je za ekstrakciju antioksidativnih frakcija u ovom radu i u radu Ivanović i sar. (2009) korišćena ista biljna sirovina, treba napomenuti još da je razlog za razlike u postignutim prinosima pored različitih operativnih parametara ekstrakcije (pritiska i temperature) i činjenica da biljna sirovina u džaku nije bila prečišćena od grančica i stabljika, odnosno da različite žarže nisu imale homogen sastav. Zbog toga je za očekivati da će se i hemijski sastav, pa prema tome i antioksidativna aktivnost frakcija međusobno razlikovati.

Tabela 4.2 Ostvareni prinosi antioksidativnih frakcija 30 MPa i 100°C (Ivanović i sar., 2009)

Biljni materijal	Prinos, mas%
Ruzmarin	1,57
Žalfija	1,74
Timijan	1,26
Izop	0,85



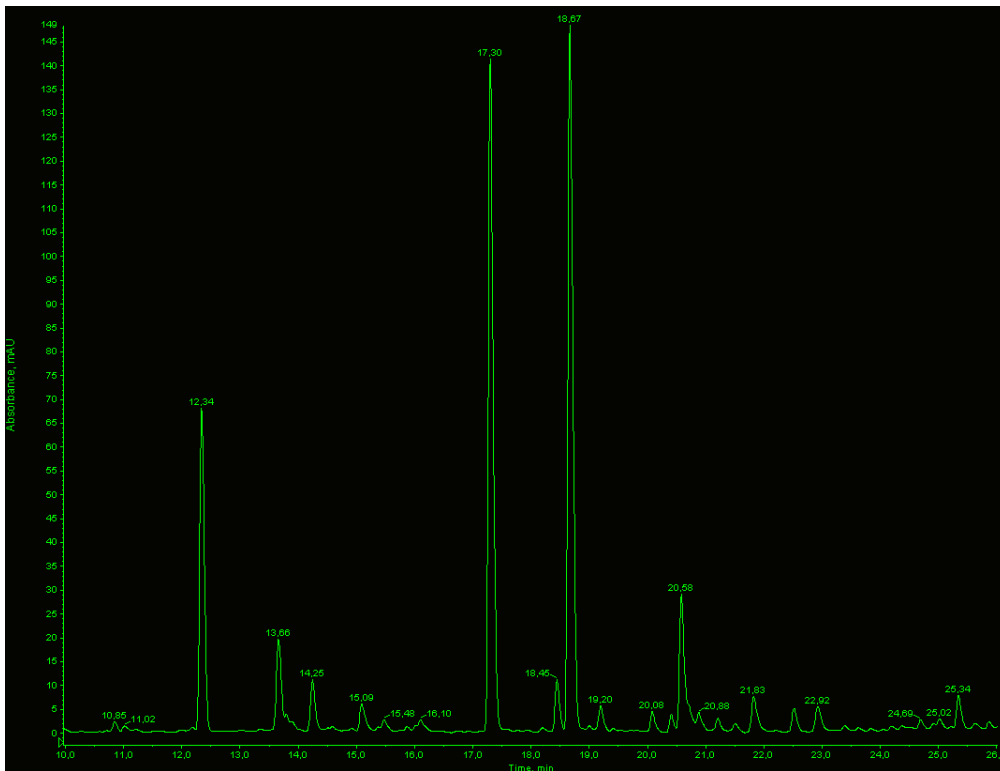
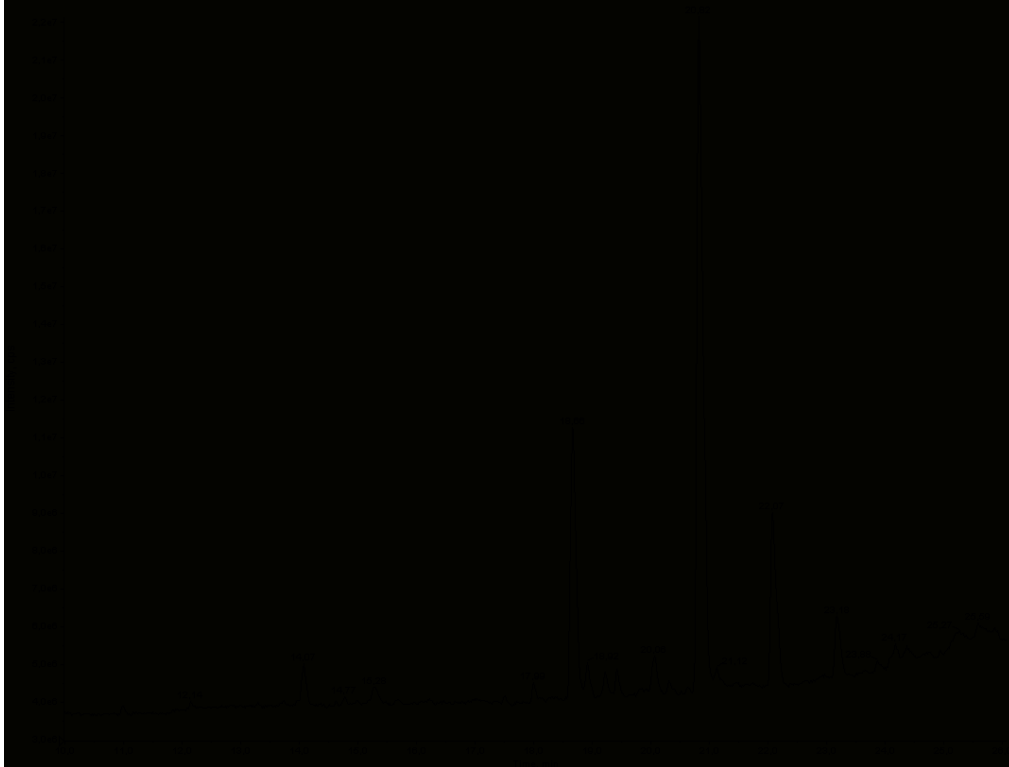
Slika 4.2 Prinos etarskog ulja iz ruzmarin, žalfije, timijana i izopa kao funkcija specifične količine rastvarača $m_{CO_2}/m_{\text{čvrsto}}$ (kg CO₂/kg biljnog materijala) za natkritičnu ekstrakciju na pritisku od 11,5 MPa i temperaturi od 40°C

4.2. Hemijski sastav antioksidativnih frakcija

Slika 4.3 prikazuje hromatografske profile za ruzmarinski ekstrakt dobijene pomoću ESI (-) i DAD detektora na 240 nm. Sadržaj karnosola i karnosolne kiseline u različitim biljnim ekstraktima izražen je kao g/100 g ekstrakta i dat je u tabeli 4.3. Pošto UV detektor (u opsegu 190-450 nm) ima različit odziv za svako jedinjenje identifikovano pomoću LC-MS, izvršena je semi-kvantitativna analiza zasnovana na ESI(-) površini pika. Identifikovana jedinjenja su selektovana i njihov relativni procentualni udeo (koji se odnosi na ukupnu površinu selektovanih jedinjenja prema ESI(-) površini pika) je prikazan u tabelama 37, 39, 41 i 42.

Tabela 4.3 Sadržaj karnosola i karnosolne kiseline u antioksidativnim frakcijama izolovanim na 35 MPa i 100°C

Antioksidativna frakcija	Karnosol g/100 g ekstrakta na 240 nm	Karnosolna kiselina g/100 g ekstrakta na 240 nm
Ruzmarin	3,9368	4,7596
Žalfija	6,9729	13,7639
Timijan	/	/
Izop	7,3341	/



Slika 4.3 Hromatografski profili dobijeni za ruzmarinski ekstrakt, na vrhu, signal ESI(-), na dnu, signal DAD detektora na 240 nm, videti tabelu 4.4

U Tabeli 4.4 prikazani su retenciono vreme (t_R), apsorpcioni maksimum nadenih pikova, površina pikova, podaci o masenom spektru antioksidativne frakcije ruzmarina i tentativna identifikacija na osnovu spektralnih podataka i referenci u literaturi (Yesil-Celiktas i sar., 2007; Senorans i sar., 2000; Zheng i Wang, 2001; Almela i sar., 2006; Nakatani i Inatani, 1983; Cuvelier i sar., 1994; Richheimer i sar., 1996; Houlihan i sar., 1984).

Tabela 4.4 Hemijski sastav ruzmarinske antioksidativne frakcije izolovane na 35 MPa i 100°C

Pik br.	t_R (min)	Molekulska formula	[M-H] ⁻ m/z	Apsorpcioni maksimum (nm)	% površina	Jedinjenje*
2	12,1	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	209	250, 280	0,2	Jasmonska kiselina
3	14,0	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	313	250, 282	0,5	Cirsimaritin
4	14,1	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	345	252 _{sh} , 276, 334	2,9	Rosmanol, izorosmanol, epirosmanol
5	14,6	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	345	252, 282, 312 _{sh}	0,3	Rosmanol, izorosmanol, epirosmanol
6	14,8	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	331	252, 278	0,5	Karnosolna kiselina izomer
7	15,3	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283	254 _{sh} , 268, 288 _{sh} , 336	1,2	Vogonin, Oroksilin A, Biokanin A, Genkvanin
8	15,3	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	345	252, 270, 334	0,3	Rosmanol, izorosmanol, epirosmanol
11	18,7	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	329	248, 284	21,8	Karnosol
13	19,2	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	329	268, 424	0,9	Karnosol izomer
14	19,5	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	343	254 _{sh} , 286	2,3	Rosmadial
15	20,1	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	315	254, 278	1,8	Rosmaridifenol, Cafestol
16	20,8	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	331	242, 286	46,9	Karnosolna kiselina
18	22,1	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	345	256 _{sh} , 282	12,2	Metil-karnosat, 12-metoksikarnosolna kiselina

* za karnosol i karnosolnu kiselinu analiza pomoću standarda. Za ostala jedinjenja identifikacija je tentativna

Tentativna analiza hemijskog sastava antioksidativne frakcije ruzmarina izolovane na 30 MPa i 100°C (Ivanović, 2009) prikazana je u tabeli 4.5. Rezultati analize hemijskog sastava antioksidativne frakcije ruzmarina izolovane na 30 MPa i 100°C se neznatno razlikuje od frakcije ruzmarina izolovane u ovom radu na 35 MPa i 100°C. U frakciji izolovanoj na 30 MPa nisu tentativno identifikovani cirsimaritin, rosmanol, izorosmanol, epirosmanol i izomer karnosolne kiseline. Ova jedinjenja su identifikovana u ranije objavljenim rezultatima ispitivanja hemijskog sastava natkritičnih ruzmarinskih ekstrakata i poznato je da pokazuju antioksidativnu aktivnost (Cavero i sar., 2005; Senorans i sar., 2000). Kvantitativno određivanje sadržaja karnosola i karnosolne kiseline u frakciji izolovanoj na 30 MPa i 100°C nije rađeno.

Tabela 4.5 Hemijski sastav ruzmarinske antioksidativne frakcije izolovane na 30 MPa i 100°C (Ivanović, 2009)

Molekulska formula	Molska masa	t _R , min	Naziv jedinjenja
C ₁₂ H ₁₈ O ₃	210	12,33	Jasmonska kiselina, vanilil butil etar
C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284	15,08	Vogonin, genkvanin, oroksilin A, biočanin A, acacetin, prunetin, 5,7 dihidroksi-6-metoksiflavon
C ₁₈ H ₃₂ O ₄	312	17,27	Oksiranoktanska kiselina
C ₁₉ H ₂₈ O ₄	320	17,89	Ubikinol-10
C ₂₀ H ₂₆ O ₄	330	18,41	Karnosol
C ₂₀ H ₂₆ O ₄	330	18,64	Izomer karnosola
C ₂₀ H ₂₄ O ₅	344	19,16	Rosmadiol
C ₂₀ H ₂₈ O ₃	316	19,98	Rosemaridifenol, kafestol, <i>seco</i> -hinokiol
C ₂₀ H ₂₈ O ₄	332	20,53	Karnosolna kiselina
C ₂₁ H ₃₀ O ₄	346	21,747	Metil-karnosat, 12-metoksikarnozolna kiselina
C ₂₀ H ₃₀ O ₃	318	22,83	[9]-šogaol

* za karnosol i karnosolnu kiselinu analiza pomoću standarda. Za ostala jedinjenja identifikacija je tentativna

Analiziranjem radova koji sadrže podatke o hemijskom sastavu žalfije, *Salvia officinalis* (Santos-Gomes i sar., 2002; Miura i sar., 2002; Ninomiya i sar., 2004; Masterova, i sar., 1996; Tada i sar., 1994; Kavvadias i sar., 2003; Fowler i sar., 2008) neka jedinjenja sadržana u antioksidativnoj frakciji žalfije izolovanoj na 35 MPa i 100°C su tentativno identifikovana (tabela 4.6). Pikovi 10, (12, 20), 22, 29 i 30 su tentativno identifikovani kao paramiltionska kiselina, salvikanarinska kiselina, rojleanon, salviviridinol, α -linoleinska i α -linolna kiselina, respektivno. Ova jedinjenja su izolovana iz različitih pripadnika vrste *Salvia* (Sun i sar., 1991; Topcu i sar., 2008; de Saizieu i sar., 2008; Ulubelen, 2000; Kilic, 2007; Chicco i sar., 2009).

Tentativna analiza hemijskog sastava antioksidativne frakcije žalfije izolovane na 30 MPa i 100°C (Ivanović, 2009) prikazana je u tabeli 4.7. Frakcija žalfije izolovana na 30 MPa je takođe sadržala karnosol i karnosolnu kiselinu ali njihov sadržaj nije kvantitativno određivan. Poređenjem rezultata prikazanih u tabelama 4.6 i 4.7 primećuje se značajna razlika u hemijskom sastavu frakcija žalfije izolovanih na pritisku od 30 MPa i 35 MPa.

Tabela 4.6 Hemijski sastav antioksidativne frakcije žalfije izolovane na 35 MPa i 100°C

Pik br.	t _R (min)	Molekulska formula	[M-H] ⁻ m/z	Apsorpcioni maksimum (nm)	% površina	Jedinjenje*
2	14,0	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	345	244, 284	9,6	Rosmanol, epirosmanol, izorosmanol, rojleanonska kiselina, epiizorosmanol
3	14,5	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	345	248, 290, 314	1,3	
6	15,2	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	345	250, 270 _{sh} , 288, 336	0,9	
11	18,2	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	345	258, 286	1,2	
4	14,7	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	331	252, 278	0,4	Horminon, hidroksirojleanon
5	15,1	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283	254 _{sh} , 268, 336	0,2	Fiskion, genkvanin
8	17,8	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	343	254, 286	0,2	Rosmadiol, galdosol, saficinolid
17	19,3	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	343	242, 286	5,6	
18	19,8	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	343	258, 284, 434	1,3	
10	18,0	C ₁₉ H ₂₄ O ₅	331	252, 278, 320 _{sh}	0,7	Paramiltionska kiselina
12	18,3	C ₁₉ H ₂₆ O ₅	333	250 _{sh} , 280, 354	0,4	Salvikanarinska kiselina
20	20,1	C ₁₉ H ₂₆ O ₅	333	280	0,6	
13	18,3	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	359	250 _{sh} , 280, 354	1,0	7-metoksirosmanol, epirosmanol metil etar
14	18,5	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	329	240, 284	18,5	Karnosol (Pikrosalvin)
19	19,9	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	315	248, 278	2,8	Rojleanon, 20-deoksokarnosol
21	20,6	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	331	198, 218 _{sh} , 232, 286	26,4	Karnosolna kiselina (Salvin)
22	21,4	C ₂₁ H ₃₂ O ₄	347	254 _{sh} , 284	0,4	Salviviridinol
23	21,9	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	345	272, 298 _{sh}	4,3	12- <i>o</i> -metilkarnosolna kiselina, metil-karnosat
24	22,0	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	317	254 _{sh} , 280	6,7	8,11,13-abietatrien-11,12,20-triol
25	23,0	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	317	250, 286, 304 _{sh}	7,1	
29	24,0	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	277	378, 304 _{sh}	0,5	α- linoleinska kiselina
30	25,4	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	279	284	0,3	α- linolna kiselina

* za karnosol i karnosolnu kiselinu analiza pomoću standarda. Za ostala jedinjenja identifikacija je tentativna

Tabela 4.7 Hemijski sastav antioksidativne frakcije žalfije izolovane na 30 MPa i 100°C (Ivanović, 2009)

Molekulska formula	Molska masa	t _R , min	Naziv jedinjenja
C ₁₀ H ₁₆ O ₃	184	9,62	α-kamflonska kiselina cis-pinonska kiselina Rosmanol
C ₂₀ H ₂₆ O ₅	346	13,96; 14,50; 15,19; 18,16	Epirosmanol Izorosmanol Rojleanonska kiselina Epiizorosmanol
C ₂₀ H ₂₈ O ₄	332	14,66	Horminon Hidroksirojleanon Rosmadial
C ₂₀ H ₂₄ O ₅	344	17,72; 19,27; 19,77	Karnosol <i>p</i> -hinon Galdosol Saficinolid
C ₂₁ H ₂₈ O ₅	360	18,27	7-metoksirosmanol Epirosmanol metil etar
C ₂₀ H ₂₆ O ₄	330	18,53	Karnosol (pikrosalvin)
C ₂₀ H ₂₆ O ₄	330	19,07	11,12-di- <i>O</i> -metil-pikrosalvin Rojleanon
C ₂₀ H ₂₈ O ₃	316	19,90	Rosmaridifenol 20-deoksokarnosol
C ₂₀ H ₂₈ O ₄	332	20,64	Karnosolna kiselina (Salvin)
C ₂₁ H ₃₀ O ₄	346	21,88	12- <i>O</i> -metilkarnosolna kiselina Metil karnosat
C ₂₀ H ₃₀ O ₃	318	21,96; 22,97	Benzoeva kiselina, 2-hidroksi-6-(6 <i>Z</i>)-6-tridecenil- (9CI) Retinolna kiselina
C ₂₀ H ₂₈ O ₂	300	23,66	Dehidroabietanska kiselina Dehidro-4-epiabietanska kiselina Linoleinska kiselina
C ₁₈ H ₃₀ O ₂	279	23,97; 25,36	<i>trans</i> -10- <i>cis</i> -12-octadekadien Karboksilna kiselina <i>trans</i> -11- <i>cis</i> -9-oktadekadien karboksilna kiselina
C ₃₀ H ₄₄ O ₄	468	28,68; 30,12; 30,49	Alobetulonlakton-1-en-2-ol

* za karnosol i karnosolnu kiselinu analiza pomoću standarda. Za ostala jedinjenja identifikacija je tentativna

Rezultati analize hemijskog sastava antioksidativne frakcije timijana prikazani su u tabeli 4.8. Pikovi 3, 6 i 10 su tentativno identifikovani kao naringenin, cirsimaritin i metil-rosmarinat (Fecka i Turek, 2008). Pretraživanjem objavljenih radova u kojima je analiziran hemijski sastav timijana (*Thymus vulgaris*), pikovi 12, (13,14,19,21, 23, 25) i 16, su tentativno identifikovani kao 3,4,3',4'-tetrahidroksi-5,5'-diizopropil-2,2'-dimetilbifenil, 3,4,4'-trihidroksi-5,5'-diizopropil-2,2'-dimetil-3,6-bifenil i 4,4'-dihidroksi-5,5'-diizopropil-2,2'-dimetil-3,6-bifenildion, respektivno (Miura i sar., 1989; Nakatani i Inatani, 1989; Okazaki i sar., 2002; Dapkevicius i sar., 2002; Haraguchi i sar., 1996). Pikovi 7, 8, 9 i 31 su tentativno identifikovani kao cirsilineol, timohidrohinon, ksantomikrol i 9,12-oktadekadienska kiselina (Horwath i sar., 2008; Takeuchi i sar., 2004; Guillen i Manzanos, 1998).

Tabela 4.8 Hemijski sastav antioksidativne frakcije timijana izolovane na 35 MPa i 100°C

Pik br.	t _R (min)	Molekulska formula	[M-H] ⁻ m/z	Apsorpcioni maksimum (nm)	% površina	Jedinjenje
3	11,9	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271	286, 338	0,3	Naringenin
6	14,0	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	313	262 _{sh} , 276, 332	0,5	Cirsimaritin
7	14,4	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	343	254, 276, 344	1,9	Cirsilineol
8	14,5	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	165	200, 226, 274, 344	20,3	Timohidrohinon, <i>p</i> -cimen-2,3-diol
9	15,0	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	343	260 _{sh} , 282, 294 _{sh} , 332	0,7	Ksantomikrol
10	15,4	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	373	254, 280, 344	2,0	Metil-rosmarinat
12	16,6	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	329	200, 226, 276	26,4	3,4,3',4'- tetrahidroksi-5,5'- diizopropil- 2,2'-dimetilbifenil
13,	17,3	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	313	254, 280, 344	0,4	3,4,4'-trihidroksi- 5,5'-diizopropil-2,2'- dimetilbifenil
14,	17,9	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	313	248, 282	8,8	
19,	19,8	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	313	260 _{sh} , 278, 364	0,2	
21,	21,0	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	313	272, 362	0,2	
23,	21,7	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	313	252, 278	8,8	
25	22,0	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	313	258, 278, 358	1,9	4,4'-dihidroksi-5,5'- diizopropil-2,2'- dimetilbifenil-3,6- dion
16	18,3	C ₂₀ H ₂₄ O ₄	327	256, 280, 302 _{sh} , 318, 340 _{sh}	0,4	
31	25,6	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	279	272, 348	0,9	α- linolna kiselina

HPLC-DAD/ESI-ToF rezultati analize antioksidativne frakcije *Hyssopus officinalis* su sumirani u tabeli 4.9. Jedan od pikova je identifikovan kao karnosol. Hemijska analiza antioksidativne frakcije izopa nije mogla da se uporedi sa literaturnim podacima jer u njima nema objavljenih rezultata hemijske analize ekstrakta izopa.

Tabela 4.9 Hemijski sastav antioksidativne frakcije izopa izolovane na 35 MPa i 100°C

Pik br.	t _R (min)	Molekulska formula	[M-H] ⁻ m/z	Apsorpcioni maksimum (nm)	% površina	Jedinjenje*
1	8,9	C ₁₀ H ₁₆ O ₃	183	248	2,9	Pinonska kiselina
21	18,7	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	329	242, 284	10,2	Karnosol
22	18,8	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	293	242, 278 _{sh} , 358	10,9	9-okso-10(E),12(Z)- oktadekadienska kiselina
23	18,9	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	293	242, 352	8,1	
30	20,5	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	293	258, 370	0,3	
31	20,7	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	293	278, 356	0,5	
33	21,0	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	293	278, 388	0,6	
29	20,1	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	295	246, 280 _{sh} , 348	4,8	Vernolna kiselina Koronarna kiselina Dimorfekoloinska kiselina Korialna kiselina, 13(S)-Hidroksioktadeka- 9Z,11E-dienonska kiselina
32	20,8	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	331	276, 366	4,9	Marubiin, Horminon, Glaukokaliksini A
34	22,1	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	331	270, 356	0,7	
38	24,2	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	277	266, 368	12,8	α- linoleinska kiselina
40	25,6	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	279	266, 364	5,0	α- linolna kiselina
43	26,7	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	255	268, 368	10,5	Palmitinska kiselina Etiltetradekanoat

* za karnosol analiza pomoću standarda. Za ostala jedinjenja identifikacija je tentativna

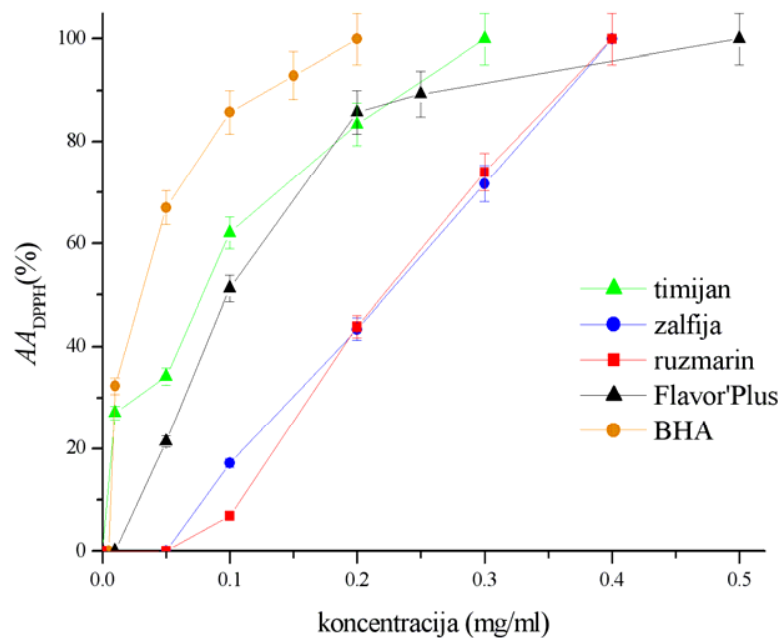
4.3. ESR spektralna analiza uticaja antioksidativnih frakcija na DPPH

Antioksidativna aktivnost (AA_{DPPH}) ispitivanih ekstrakata (antioksidativnih frakcija) i komercijalnih antioksidanasa prikazana je na slici 4.4 (a, b). Ekstrakt izopa je pokazao znatno slabiju antioksidativnu aktivnost u poređenju sa ostalim ekstraktima.

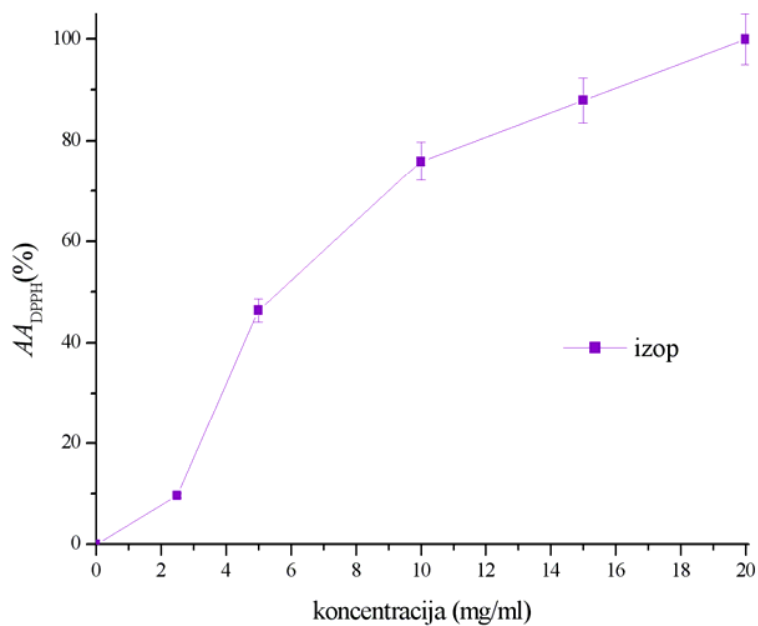
Efektivna koncentracija, EC_{50} vrednost (koncentracija antioksidanasa potrebna da smanji koncentraciju radikala 50%) je parameter koji se široko koristi kao mera sposobnosti ekstrakata za "hvatanje" radikala (Cuvelier i sar., 1992). Niže vrednosti EC_{50} ukazuju na jaču antioksidativnu aktivnost. EC_{50} vrednosti ispitivanih ekstrakata su prikazane u tabeli 4.10. Očigledno je da interakcija ispitivanih ekstrakata sa DPPH radikalom zavisi od tipa i koncentracije ispitivanih ekstrakata. Kao što se može videti na slici 4.4 (a, b) i u tabeli 4.10 redosled od najjače do najslabije antioksidativne aktivnosti je sledeći: BHA, ekstrakt timijana, Flavor' PlusTM, ekstrakti ruzmarina i žalfije i ekstrakt izopa. Kao što se može videti na slici 4.4 (a) koncentracije BHA, ekstrakta timijana, ekstrakta ruzmarina, ekstrakta žalfije i Flavor' PlusTM koji su potrebni za potpuno redukovanje DPPH radikala bile su 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,4 mg/ml i 0,5 mg/ml, respektivno. Koncentracija ekstrakta izopa koja je bila potrebna za potpunu redukciju molekula DPPH radikala bila je 20 mg/ml (slika 4.4 (b)). Na primer, AA_{DPPH} antioksidativne frakcije timijana pri koncentraciji od 0,3 mg/ml bila je 100%, što je bilo uporedivo sa BHA i Flavor' PlusTM, dok je AA_{DPPH} antioksidativne frakcije ruzmarina i žalfije bila samo 73,97% and 71,69%, respektivno. Antioksidativna frakcija izopa pri koncentracijama manjim od 2,5 mg/ml nije pokazivala antioksidativnu aktivnost (AA_{DPPH}). Pri koncentracijama manjim od 0,1 mg/ml pored BHA i Flavor' PlusTM jedino je antioksidativna frakcija timijana pokazivala antioksidativnu aktivnost (AA_{DPPH}).

Tabela 4.10 $EC_{50 DPPH}$ vrednost ekstrakata izolovanih na 35 MPa i 100 °C, BHA i Flavor' PlusTM

Antioksidans	$EC_{50 DPPH}$ (mg/ml)
Ruzmarin	0,23
Žalfija	0,23
Timijan	0,08
Izop	6,14
BHA	0,03
Flavor' Plus TM	0,09



Slika 4.4a Antioksidativna aktivnost različitih koncentracija antioksidativnih frakcija ruzmarina, žalfije i timijana izolovanih na 35 MPa i 100°C, BHA i Flavor'Plus™ na DPPH radikale

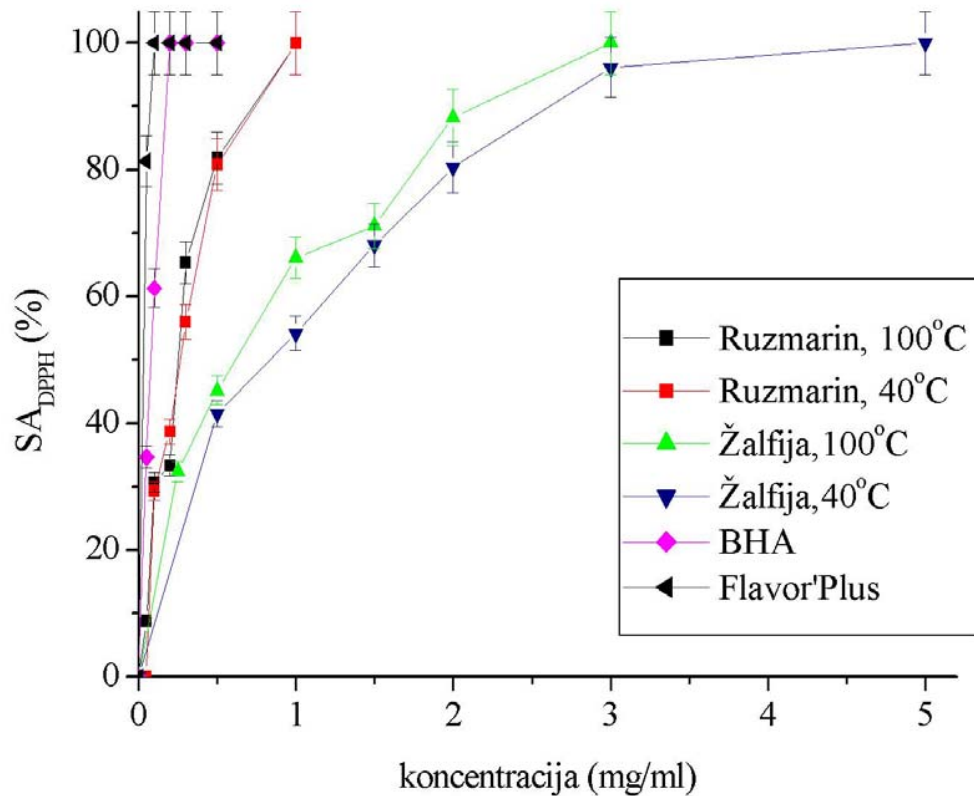


Slika 4.4b Antioksidativna aktivnost različitih koncentracija antioksidativne frakcije izopa izolovane na 35 MPa i 100°C, BHA i Flavor'Plus™ na DPPH radikale

Dapkevicius i sar. (1998) objavili su da natkritični ekstrakti ruzmarina, žalfije i timijana poseduju visoku antioksidativnu aktivnost, dok ekstrakt izopa pokazuje nisku antioksidativnu aktivnost što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim pomoću DPPH metode. Novija istraživanja (Yesil-Celiktas i sar., 2007) pokazala su različite rezultate ispitivanja antioksidativne aktivnosti natkritičnih ekstrakata ruzmarina dobijenih iz biljnog materijala poreklom iz različitih područja u Turskoj i prikupljenog u različito vreme u toku godine. Autori su takođe potvrdili da ruzmarinski ekstrakti sa različitih lokaliteta pokazuju veliku razliku u antioksidativnoj aktivnosti kao i u sadržaju karnosola i karnosolne kiseline. Topal i sar. (2008) upoređivali su antioksidativne osobine etarskih ulja izolovanih pomoću natkritične ekstrakcije sa CO₂ iz devet različitih biljnih vrsta koristeći ESR spektrometrijsko određivanje DPPH radikala. U pomenutom radu ruzmarinski ekstrakt je pokazao neznatno jaču antioksidativnu aktivnost od BHT. Među antioksidativnim jedinjenjima iz ruzmarina i žalfije veruje se da karnosolna kiselina poseduje najveću antioksidativnu aktivnost (Schwarz i Waldemar, 1992; Okamura i sar., 1994; Cuvelier i sar., 1996; Richheimer i sar., 1996; Caverio i sar., 2005). Kao što je prikazano u tabeli 4.3, karnosolna kiselina je nađena u ekstraktu ruzmarina i ekstraktu žalfije u količini od 4,7596 i 13,7639 g /100 g ekstrakta, respektivno. Karnosolna kiselina nije nađena u ekstraktu timijana i izopa. Rezultati dobijeni hemijskom analizom ekstrakta timijana i ESR spektrometrijskim određivanjem DPPH radikala ukazuju da se bifenilna jedinjenja javljaju kao glavna jedinjenja odgovorna za antioksidativnu aktivnost ekstrakta timijana. Ekstrakt timijana pokazao je sličnu antioksidativnu aktivnost kao komercijalni ruzmarinski ekstrakt Flavor' Plus™ i pokazao je mnogo jaču antioksidativnu aktivnost u poređenju sa ispitivanim ekstraktima ruzmarina i žalfije. Ranije je pokazano da su *p*-cimen-2,3-diol i bifenilna jedinjenja izolovana iz timijana jaki antioksidansi (Schwarz i sar., 1996; Miura i sar., 1989; Nakatani i sar., 1989; Haraguchi i sar., 1996; Dapkevicius i sar., 2002).

Rezultati dobijeni ispitivanjem AA_{DPPH} natkritičnih ekstrakata ruzmarina i žalfije izolovanih na pritisku od 30 MPa i temperaturi od 100°C (Ivanović i sar., 2009) pomoću ESR spektroskopije prikazani su na slici 4.5. Na osnovu vrednosti $EC_{50\text{ DPPH}}$ može se zaključiti da ekstrakti ruzmarina i žalfije izolovani na 30 MPa pokazuju slabiju antioksidativnu aktivnost od ekstrakata ruzmarina i žalfije izolovanih na 35 MPa (tabela 4.11).

Fenolna jedinjenja pokazuju antioksidativnu aktivnost zbog svojih redoks osobina, simultanog odvijanja reakcija u kojima učestvuju kao donori vodonikovog atoma, transferi elektrona i helati metala (Calliste i sar., 2001). Ispitivani natkritični ekstrakti ruzmarina, žalfije i timijana poseduju antioksidativnu aktivnost prema DPPH radikalima prvenstveno zbog sposobnosti fenolnih jedinjenja da se ponašaju kao donori vodonikovog atoma DPPH radikalu.



Slika 4.5 Antioksidativna aktivnost različite koncentracije antioksidativnih frakcija ruzmarina i žalfije izolovanih na 30 MPa i 100°C, BHA i Flavor'Plus™ na DPPH radikale (Ivanović, 2009)

Tabela 4.11 $EC_{50\text{ DPPH}}$ vrednost ekstrakata, BHA i Flavor'Plus™

Antioksidans	Pritisak, MPa	Temperatura, °C	$EC_{50\text{ DPPH}}$ (mg/ml)
Ruzmarin	30	100	0,24
	30	40	0,25
	35	100	0,23
Žalfija	30	100	0,66
	30	40	0,84
	35	100	0,23
Timijan	35	100	0,08
Izop	35	100	6,14
BHA	/	/	0,03
Flavor'Plus™	/	/	0,09

Tabela 4.12 Antioksidativna aktivnost, AA_{DPPH} (%) različitih koncentracija NKE ruzmarina, žalfije, timijana i izopa, BHA i Flavor'Plus™

Uzorak	Koncentracija, mg/ml																		
	0,01	0,05	0,1	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5	1	1,5	2	2,5	3,0	5,0	10	15	20		
R1		8,8	30,67	33,33	65,33	81,87	100												
R2		0	29,33	38,67	56	80,8	100												
R3		0	6,85	43,84	73,97	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
S1					32,35	45,18	66,15	71,12	88,25	100									
S2					18,15	41,55	54,18	68,10	80,35	96,18	100								
S3		0	17,17	43,37	71,69	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
I3		0	0	0	0	0	0	0	0	9,64				46,39	75,9	87,95	100		
T3		27,08	34,17	62,05	83,33	100													
Flavor'Plus™		34,67	61,33	100	100	100													
BHA		81,33	100	100	100	100													

R1, S1 - ruzmarin i žalfija na 100°C, 30 MPa

R2, S2 - ruzmarin i žalfija na 40°C, 30 MPa

R3- ruzmarin na 100°C, 35 MPa

S3- žalfija na 100°C, 35 MPa

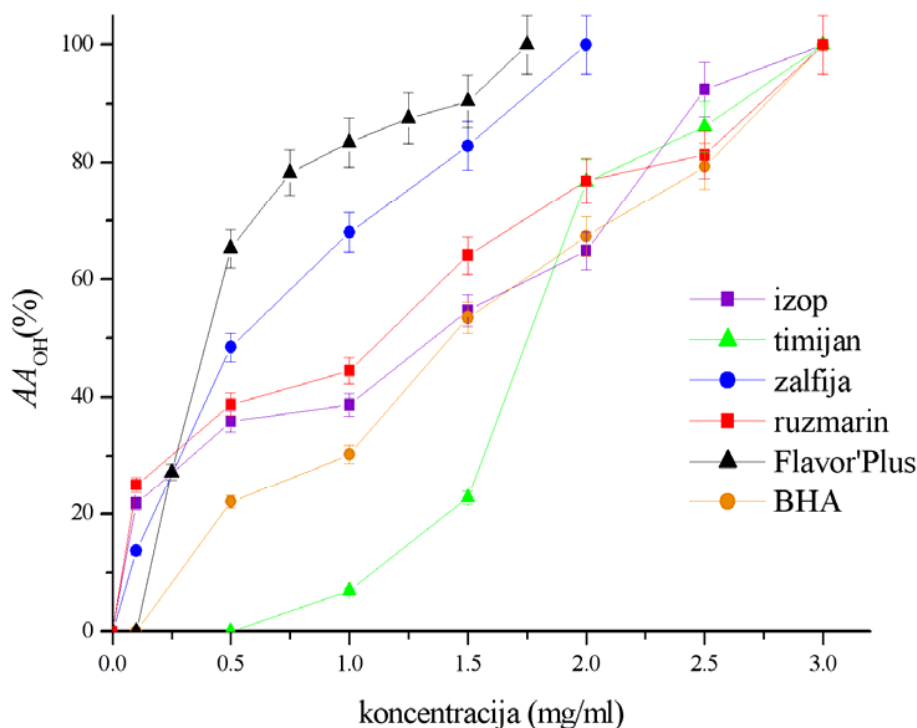
I3- izop na 100°C, 35 MPa

T3- timijan na 100°C, 35 MPa

4.4. ESR spektralna analiza uticaja antioksidativnih frakcija na $\cdot\text{OH}$

Aktivnost antioksidativnih frakcija ruzmarina, žalfije, timijana i izopa je ispitivana preko sposobnosti ovih frakcija da hvataju hidroksilne radikale. Ova sposobnost je veoma važna zbog činjenice da su hidroksilni radikali glavne aktivne kiseonične vrste koje prouzrokuju lipidnu oksidaciju (Milić i sar, 1998). U cilju ispitivanja uticaja ispitivanih ekstrakata na reaktivne hidroksilne radikale, korišćena je Fentonova reakcija ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$) kao izvor hidroksilnih radikala. Pomoću "spin-trap" jedinjenja kao što je DMPO, moguće je prevesti reaktivne hidroksilne radikale u stabilne nitroksid radikale, odnosno DMPO-OH "spin adukte". Relativni intezitet stvaranja slobodnih radikala moguće je pratiti preko ESR signala koji je direktno povezan sa koncentracijom DMPO-OH. Uticaj različitih koncentracija ispitivanih ekstrakata (antioksidativnih frakcija) i komercijalnih antioksidanasa na formiranje i transformaciju hidroksil radikala nastalih u Fentonovoj reakciji je prikazan na slici 4.6. EC_{50} vrednosti ispitivanih ekstrakata, BHA i Flavor' PlusTM su prikazani u tabeli 4.13. Kao što se može videti sa slike 4.6 i u tabeli 4.13 redosled od najjače do najslabije antioksidativne aktivnosti bio je: Flavor' PlusTM, ekstrakt žalfije, ekstrakt ruzmarina, ekstrakt izopa, BHA i ekstrakt timijana. Koncentracije Flavor' PlusTM, ekstrakta žalfije, ekstrakta izopa, ekstrakta timijana, ekstrakta ruzmarina i BHA koje su potrebne za potpunu eliminaciju hidroksil radikala bile su: 1,75 mg/ml, 2,0 mg/ml, 3,0 mg/ml, 3,0 mg/ml, 3,0 mg/ml i 3,0 mg/ml, respektivno. Na primer, AA_{OH} antioksidativne frakcije žalfije pri koncentraciji od 2,0 mg/ml bila je 100%, što je bilo uporedivo sa Flavor' PlusTM, dok je AA_{OH} antioksidativnih frakcija izopa, timijana, ruzmarina i BHA bila samo 64,84%, 76,74%, 76,85% i 67,33% respektivno. Antioksidativna frakcija timijana pri koncentracijama od 1,0 mg/ml nije pokazivala AA_{OH} . AA_{OH} izopa, timijana, ruzmarina i BHA pri koncentraciji od 2,5 mg/ml bila je 92,37%, 86,05%, 81,25% i 79,3% respektivno.

Rezultati dobijeni ispitivanjem AA_{OH} natkritičnih ekstrakata ruzmarina i žalfije izolovanih na pritisku od 30 MPa i temperaturama od 40°C i 100°C (Ivanović i sar., 2009) pomoću ESR spektroskopije prikazani su na slici 4.7. Na osnovu vrednosti $\text{EC}_{50 \text{ OH}}$ može se zaključiti da ekstrakti ruzmarina i žalfije izolovani na 30 MPa pokazuju slabiju antioksidativnu aktivnost od ekstrakata ruzmarina i žalfije izolovanih na 35 MPa (tabela 4.14). Razlike u $\text{EC}_{50 \text{ OH}}$ vrednostima za ekstrakte ruzmarina i žalfije koji su izolovani na 30 MPa i 35 MPa su veće nego u slučaju $\text{EC}_{50 \text{ DPPH}}$ vrednosti, posebno u slučaju ruzmarinskog ekstrakta.

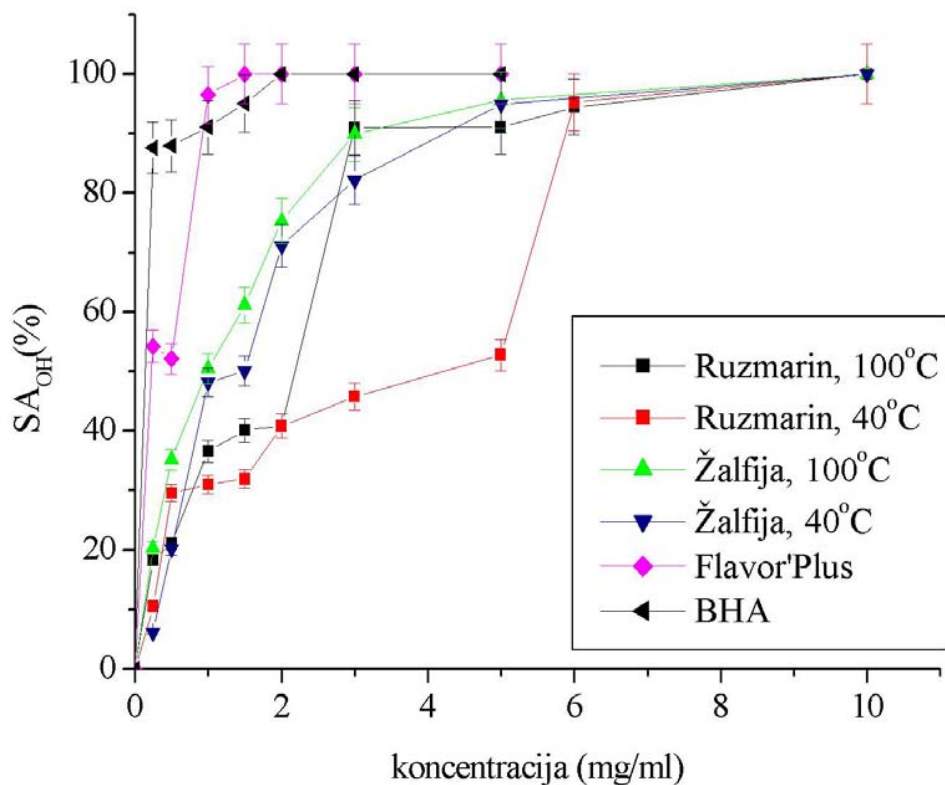


Slika 4.6 Antioksidativna aktivnost različitih koncentracija antioksidativnih frakcija ruzmarina, žalfije, timijana i izopa izolovanih na 35 MPa i 100°C, BHA i Flavor'Plus™ na DMPO-OH adukt

Tabela 4.13 $EC_{50\ OH}$ vrednost ekstrakata izolovanih na 35 MPa i 100 °C, BHA i Flavor'Plus™

Antioksidans	$EC_{50\ OH}$ (mg/ml)
Ruzmarin	1,03
Žalfija	0,59
Timijan	1,75
Izop	1,3
BHA	1,51
Flavor' Plus™	0,35

Polifenoli sa *o*-dihidroksil grupama mogu ispoljavati svoje zaštitne efekte kroz helaciju metalnih jona tokom Fentonove reakcije (Rice-Evans i sar., 1996). Prema toj činjenici može se zaključiti da je visok sadržaj karnosolne kiseline i karnosola u ekstraktima žalfije i ruzmarina i visok sadržaj karnosola u ekstraktu izopa odgovoran za bolju antioksidativnu aktivnost ovih ekstrakata prema hidroksil radikalima u poređenju sa ekstraktom timijana i sintetskog antioksidansa BHA.



Slika 4.7 Antioksidativna aktivnost različitih koncentracija antioksidativnih ruzmarina i žalfije izolovanih na 30 MPa i 100°C, BHA i Flavor'Plus™ na DMPO-OH adukt (Ivanović, 2009)

Tabela 4.14 $EC_{50\ OH}$ vrednost ekstrakata, BHA i Flavor'Plus™

Antioksidans	Pritisak, MPa	Temperatura, °C	$EC_{50\ OH}$ (mg/ml)
Ruzmarin	30	100	1,75
	30	40	2,91
Žalfija	35	100	1,03
	30	100	0,96
Timijan	30	40	1,27
	35	100	0,59
Izop	35	100	1,75
BHA	/	/	1,51
Flavor'Plus™	/	/	0,35

Tabela 4.15 Antioksidativna aktivnost, AA_{OH} (%) različitih koncentracija NKE ruzmarina, žalfije, timijana i izopa, BHA i Flavor'Plus™

Uzorak	Koncentracija, mg/ml														
	0,05	0,1	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5	1	1,5	2	2,5	3,0	5,0	6,0	10
R1				18,31			21,13	36,62	40,14	40,85		90,91	91,02	94,45	100
R2				10,56			29,58	30,99	31,96	40,85		45,77	52,82	95,25	100
R3	0	25					38,79	44,44	64,06	76,85	81,25	100			
S1				20,35			35,18	50,45	61,2	75,28		89,87	95,58		100
S2				6,19			20,15	48,16	50,12	71,15		82,15	94,91		100
S3	0	13,75					48,46	67,97	82,81	100	100	100			
I3	0	21,76					35,88	38,68	54,69	64,84	92,37	100			
T3							0	6,98	22,79	76,74	86,05	100			
Flavor'Plus™				54,23			52,11	96,48	100	100	100	100	100	100	100
BHA				87,61			87,96	91,02	95,07	100	100	100	100	100	100

R1, S1 - ruzmarin i žalfija na 100°C, 30 MPa

R2, S2 - ruzmarin i žalfija na 40°C, 30 MPa

R3- ruzmarin na 100°C, 35 MPa

S3- žalfija na 100°C, 35 MPa

I3- izop na 100°C, 35 MPa

T3- timijan na 100°C, 35 MPa

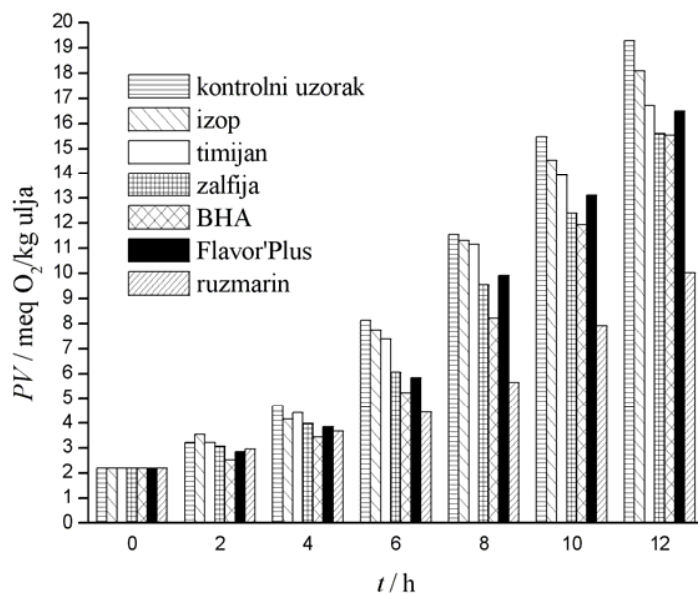
4.5. Peroksidni broj

Rezultati određivanja peroksidnog broja u funkciji od vremena prikazani su na slici 4.8 i u tabeli 4.16 Najveća koncentracija nastalih peroksida nađena je u kontrolnom uzorku. Najmanja koncentracija nastalih peroksida nakon 2 h čuvanja na temperaturi od 98°C nađena je u uzorku kome je bio dodat sintetski antioksidans (BHA) i u uzorku sa dodatim komercijalnim ruzmarinskim antioksidansom (Flavor' Plus™). Antioksidativna frakcija iz ruzmarina pokazala je najveću antioksidativnu aktivnost nakon 4, 6, 8, 10 i 12 h čuvanja na temperaturi od 98°C. Nađeno je da ekstrakt ruzmarina pokazuje značajno veću antioksidativnu aktivnost od BHA u suncokretovom ulju.

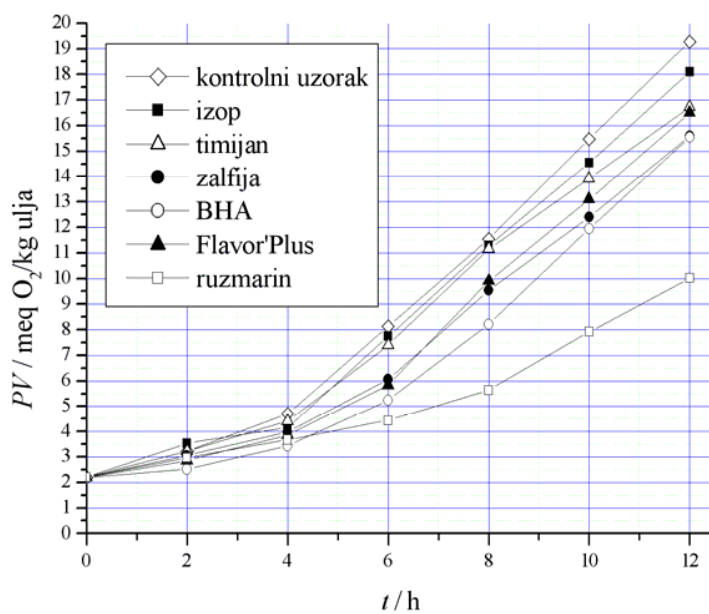
Tabela 4.16 *Dejstvo antioksidativnih frakcija (200 mg/kg ulja) na oksidativnu stabilnost suncokretovog ulja na 98°C*

Uzorak	PV / meq O ₂ /kg ulja						
	0	2	4	6	8	10	12 h
Kontrolni	2,2	3,22	4,7	8,14	11,54	15,48	19,28
Izop		3,54	4,16	7,74	11,3	14,54	18,1
Timijan		3,22	4,42	7,4	11,16	13,92	16,72
Žalfija		3,06	3,98	6,06	9,54	12,4	15,6
BHA		2,52	3,44	5,24	8,22	11,94	15,54
Flavor'Plus™		2,86	3,86	5,84	9,9	13,1	16,5
Ruzmarin		2,96	3,68	4,44	5,64	7,92	10,02

Značajne razlike između peroksidnog broja kontrolnog i ostalih uzoraka bila je uočljiva nakon 6 h čuvanja na 98°C. Peroksidni broj kontrolnog uzorka nakon 6 h, 8 h, 10 i 12 h čuvanja na 98°C bio je dva puta veći u odnosu na uzorak kome je bila dodata antioksidativna frakcija ruzmarina. Kako se može videti sa slike 4.8, peroksidni broj suncokretovog ulja kome je dodata antioksidativna frakcija žalfije nakon 6 h imao je vrednost od 6,06 meq O₂/kg ulja, dok je peroksidni broj kontrolnog uzorka iznosio 8,14 meq O₂/kg ulja. Antioksidativna frakcija iz žalfije pokazala je mnogo jaču aktivnost u poređenju sa antioksidativnim frakcijama iz timijana i izopa. Aktivnost frakcije iz žalfije bila je uporediva sa BHA, i nakon 12 h čuvanja na 98°C izjednačila se sa aktivnošću BHA. Frakcija iz timijana pokazala je sličnu aktivnost kao Flavor' Plus™ nakon 12 h čuvanja na 98°C. Frakcija iz izopa pokazala je najmanju aktivnost, sličnu kontrolnom uzorku. Kao što je prikazano na slici 4.9 uzorci sa frakcijama iz izopa, timijana, žalfije i ruzmarina dostigli su vrednost peroksidnog broja od 10 meq O₂/kg ulja nakon 7,2, 7,3, 8,3 i 12 h, respektivno. Kontrolni uzorak dostigao je vrednost peroksidnog broja od 10 meq O₂/kg ulja nakon 7 h. Uzorci sa BHA i Flavor' Plus™ dostigli su vrednost peroksidnog broja od 10 meq O₂/kg ulja nakon 9 i 8 h, respektivno.



Slika 4.8 Dejstvo antioksidativnih frakcija iz ruzmarina, žalfije, timijana i izopa izolovanih na 35 MPa i 100°C na PV suncokretovog ulja u poređenju sa komercionalnim i sintetskim antioksidansom



Slika 4.9 Vreme potrebno da PV uzorka dostigne maksimalnu dozvoljenu vrednost od 10 meq O₂/kg ulja

Na osnovu vrednosti peroksidnog broja antioksidativna aktivnost ispitivanih biljnih ekstrakata posle 12 h čuvanja na 98°C bila je sledeća: ekstrakt ruzmarina > BHA > ekstrakt žalfije > Flavor' Plus™ > ekstrakt timijana > ekstrakt izopa. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da zahvaljujući prisustvu karnosolne kiseline koja je lipofilni antioksidans u frakcijama žalfije i ruzmarina, aktivnost ovih frakcija je uporediva sa BHA i Flavor' Plus™. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima objavljenim u radovima Braida i sar. (2008), Trojakova i sar. (2001) i Ying i sar. (2010), koji ukazuju na veliku povezanost između sadržaja karnosolne kiseline i oksidativne stabilnosti ulja sa visokim sadržajem linoleinske kiseline. Karnosolna kiselina je jako stabilna u natkritičnom ugljenik(IV)-oksidu i pomoću NK-CO₂ ekstrakcije se izdvaja bez degradacije i kontaminacije. Ona je stabilna na povišenim temperaturama, i zato Lamiaceae ekstrakti koji je sadrže predstavljaju prirodnu alternativu sintetskim antioksidansima za veliki broj prehrambenih proizvoda. Zbog toga sastav, pa prema tome i antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakata zavisi od različitih faktora kao što su kvalitet biljne sirovine, njeno geografsko poreklo, klimatski uslovi, vreme žetve, način skladištenja, komercijalna formulacija (prašak ili tečnost), tip ekstrakcije i operativni parametri ekstrakcije (Cuvelier i sar., 1996).

5. ZAKLJUČAK

Glavni cilj ove disertacije bio je proučavanje antioksidativnih osobina frakcija iz ruzmarina, žalfije, timijana i izopa dobijenih postupkom NKE, kao i hemijska analiza izolovanih frakcija. Antioksidativna aktivnost ovih Lamiaceae ekstrakata, dobijenih konvencionalnim načinima ekstrakcije kao i njihov hemijski sastav već su ranije bili proučavani u mnogim studijama. Međutim, ne postoji mnogo radova u kojima su objavljeni podaci o antioksidativnoj aktivnosti natkritičnih ekstrakata primenom elektron spin rezonantne (ESR) spektrometrije i merenjem peroksidnog broja u suncokretovom ulju. Tako u do sada objavljenoj fitohemijskoj literaturi ne postoje podaci o hemijskom sastavu antioksidativnih frakcija timijana i izopa dobijenih pomoću NKE. Takođe ne postoje objavljeni rezultati o uticaju antioksidativnih frakcija iz žalfije i izopa na oksidativnu stabilnost suncokretovog ulja. Pored toga, u literaturi nema podataka o antioksidativnoj aktivnosti i hemijskom sastavu ispitivanih antioksidativnih frakcija dobijenih pomoću NKE na izabranim uslovima ekstrakcije iz ovog rada (35 MPa, 100°C).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

- 1) Primenom frakcione ekstrakcije sa natkritičnim ugljenik(IV)-oksidom mogu se izolovati antioksidativne frakcije bez degradacije i kontaminacije bioaktivnih supstanci, i bez prisustva komponenti koje mogu dodeliti ukus, miris ili boju tretiranom prehrambenom proizvodu. Prinosi antioksidativnih frakcija ruzmarina, žalfije, timijana i izopa bili su 2,61 mas%, 1,75 mas%, 1,40 mas% i 0,925 mas%, respektivno.
- 2) ESR spektralnom analizom uticaja antioksidativnih frakcija, sintetskog i komercijalnog antioksidansa na DPPH radikale utvrđen je redosled od najjače do najslabije antioksidativne aktivnosti: BHA, ekstrakt timijana, Flavor' Plus™, ekstrakti ruzmarina i žalfije i ekstrakt izopa. Ekstrakt timijana je pokazao najjaču antioksidativnu aktivnost među ispitivanim ekstraktima, sličnu kao komercijalni antioksidans Flavor' Plus™. Ekstrakt izopa pokazao je mnogo slabiju antioksidativnu aktivnost u poređenju sa ostalim ekstraktima. Antioksidativna aktivnost ostalih ekstrakata bila je uporediva sa aktivnošću sintetskog antioksidansa BHA.
- 3) ESR spektralnom analizom uticaja antioksidativnih frakcija, sintetskog i komercijalnog antioksidansa na hidroksil radikale utvrđen je redosled od najjače do najslabije antioksidativne aktivnosti: Flavor' Plus™, ekstrakt žalfije, ekstrakt ruzmarina, ekstrakt izopa, BHA i ekstrakt timijana. Pri ovoj metodi svi ispitivani natkritični ekstrakti bili su uporedivi sa aktivnošću komercijalnog antioksidansa Flavor' Plus™ i sintetskog antioksidansa BHA.
- 4) Najveći sadržaj karnosola imala je antioksidativna frakcija izopa, a najveći sadržaj karnosolne kiseline frakcija žalfije. Sadržaj karnosola u frakciji izopa iznosio je 7,3341 g/100 g ekstrakta, u frakciji žalfije 6,9729 g/100 g ekstrakta, a u frakciji ruzmarina 3,9368 g/100 g ekstrakta. Sadržaj karnosolne kiseline u frakciji žalfije iznosio je 13,7639 g/100 g ekstrakta, a u frakciji ruzmarina 4,7596 g/100 g ekstrakta.

- 5) Rezultati dobijeni hemijskom analizom ekstrakta timijana i ESR spektralnom analizom uticaja ekstrakta timijana na DPPH radikale ukazuju da se *p*-cimen-2,3-diol i bifenilna jedinjenja javljaju kao glavna jedinjenja odgovorna za antioksidativnu aktivnost ekstrakta timijana. Ekstrakt timijana pokazao je sličnu antioksidativnu aktivnost kao komercijalni ruzmarinski ekstrakt Flavor' Plus™ i pokazao je mnogo jaču antioksidativnu aktivnost u poređenju sa ispitivanim ekstraktima ruzmarina i žalfije. Dalja istraživanja su potrebna u cilju dobijanja pouzdanijih rezultata hemijskog sastava antioksidativnih frakcija posebno u slučaju timijana i određivanja jedinjenja koja doprinose jakoj antioksidativnoj aktivnosti ekstrakta timijana.
- 6) Svi ispitivani ekstrakti pokazali su se kao inhibitori lipidne peroksidacije suncokretovog ulja. Na osnovu vrednosti peroksidnog broja antioksidativna aktivnost ispitivanih biljnih ekstrakata posle 12 h čuvanja na 98°C bila je sledeća: ekstrakt ruzmarina > BHA > ekstrakt žalfije > Flavor' Plus™ > ekstrakt timijana > ekstrakt izopa. Dobijeni rezultati određivanja peroksidnog broja u suncokretovom ulju nisu međusobno u saglasnosti sa rezultatima ESR spektralne analize uticaja antioksidativnih frakcija na DPPH radikale i na hidrosil radikale jer je ekstrakt timijana pokazao najveću aktivnost među ispitivanim ekstraktima na DPPH radikale, dok je ekstrakt žalfije pokazao najveću aktivnost među ispitivanim ekstraktima na hidrosil radikale.
- 7) Biljni ekstrakti se mogu koristiti u prehrambenoj industriji ne samo zato što štite proizvod od oksidacije već i zbog svojih brojnih bioloških i farmakoloških aktivnosti. Zato je potrebno standardizovati biljne ekstrakte koji bi se koristili kao alternativa sintetskim. To znači standardizovati njihov proces proizvodnje, sadržaj aktivnih komponenti, metode kojima bi se određivala njihova antioksidativna aktivnost u hrani i koncentracije u kojoj bi se dodavali prehrambenim proizvodima. Takođe, iako se pretpostavlja da su biljni ekstrakti bezbedni za upotrebu kao nutritivni suplementi, komponente funkcionalne hrane ili antioksidansi, njihova manja toksičnost u odnosu na sintetske se mora dokazati toksikološkim ispitivanjima.

LITERATURA

- Abdalla, A. E., Roozen, J. P. (1999). Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. *Food Chemistry*, 64, 323-329.
- Acworth, I. N. (2003). *The Handbook of Redox Biochemistry*. ESA, Inc., Chelmsford, USA.
- Ahn, J., Grun, I. U., Fernando L. N. (2002). Antioxidant properties of natural plant extract containing polyphenolic compounds in cooked ground beef. *Journal of Food Science*, 67, 1364-1369.
- Al-Hasso, S. (2000). Coenzyme Q₁₀: A review, *Hospital Pharmacy*, 36, 51-55.
- Almela, L., Sanchez-Munoz, B., Fernandez-Lopez, J. A., Rosa, M. J., Rabe, V. (2006). Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A*, 1120, 221-229.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183-198.
- AOCS (1990). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society Method Cd 8-53, Method Cd 8b-90 and Method Cd 20-91. (4th ed.). Champaign: American Oil Chemists' Society.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Aeschbach, R., Loligers, J. (1992). Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica*, 22, 257-268.
- Ashraf-Khorassani, M., Taylor, L. T. (2004). Sequential fractionation of grape seeds into oils, polyphenols, and procyanidins via a single system employing CO₂-based fluids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2440-2444.
- Basaga, H., Tekkaya, C., Acikel, F. (1997). Antioxidative and free radical scavenging properties of rosemary extract. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 30, 105-108.
- Becker, E. M., Nissen, L. R., Skibsted, L. H. (2004). Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, 219, 561-571.
- Beecher, G. R. (2003). Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence and intake. *The Journal of Nutrition*, 133, 3248S-3254S.
- Belhatab, R., Larous, L., Kalantzakis, G., Boskou, D., Exarchou, V. (2004). Antifungal properties of *Origanum glandulosum* Desf. extracts, *Journal of Food Agriculture and Environment*, 2, 69-73.
- Belitz, H. D., Grosch, W. (1999). Phenolic compounds, *Food Chemistry*. Berlin, Springer, 764-775.
- Bergman, M., Vershavsky, L., Gottlieb, H. E., Grossman, S. (2001). The antioxidant activity of aqueous spinach extract: Chemical identification of active fractions, *Phytochemistry*, 58, 143-152.
- Berner, D. L., Jacobson, G. A. (1973). Spice antioxidant principle and process for the extraction thereof. U.S. Patent, 3,732,111.
- Bicchi, C., Binello, A., Rubiolo, P. (2000). Determination of phenolic diterpene antioxidants in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) with different methods of extraction and analysis, *Phytochemical Analysis*, 11, 236-242.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a Review. *Annals of Botany*, 91, 179-194.

- Bracco, U., Loeliger, J., Viret, J. L. (1981). Production and use of natural antioxidants. *Journal of American Oil Chemists Society*, 58, 686-690.
- Braida, I., Mattea, M., Cardarelli, D. (2008). Extraction–adsorption–desorption process under supercritical condition as a method to concentrate antioxidants from natural sources. *The Journal of Supercritical Fluids*, 45, 195-199.
- Brunner, G. (1994). *Gas Extraction*. New York, Steinkopff.
- Budincevic, M., Vrbaski, Z., Turkulov, J., Dimic, E. (1995). Antioxidative effect of plant extracts on feed fats. *Fett Wissenschaft Technologie*, 97, 461-466.
- Burdge, G. C., Calder, P. C. (2005). α -Linoleic acid metabolism in adult humans: the effect of gender and age on conversion to longer chain polyunsaturated fatty acids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107, 426–439.
- Calliste, C. A., Trouillas, P., Allais, D. P., Simon, A., Duroux, J. L. (2001). Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3321-3327.
- Carvalho, R. N., Moura, L. S., Rosa, P. T. V., Meireles., M. A. A. (2005). Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. *The Journal of Supercritical Fluids* 35, 197–204.
- Cavero, S., Jaime, L., Martin-Alvarez, J. P., Javier Senorans, F., Reglero, G., Ibanez, E. (2005). In vitro antioxidant analysis of supercritical fluid extracts from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *European Food Research and Technology*, 221, 478-486.
- Chang, S. S., Ostric–Matijaseric, B., Hsieh, O. A. L., Huang, C. (1977). Natural antioxidants from rosemary and sage. *Journal of Food Science*, 42, 1102–1106.
- Che-Man, Y. B., Jaswir, I. (2000) Effect of rosemary and sage extracts on frying performance of refined, bleached and deodorized (RBD) palm olein during deep-fat frying. *Food Chemistry*, 69, 301-307.
- Chicco, A. G., D'Alessandro, M. E., Hein, G. J., Oliva, M. E., Lombardo, Y. B. (2009). Dietary chia seed (*Salvia hispanica* L.) rich in α -linolenic acid improves adiposity and normalises hypertriacylglycerolaemia and insulin resistance in dyslipaemic rats. *British Journal of Nutrition*, 101, 41-50.
- Chipault, J. R., Mizuno, G. R., Hawkins, J. M., Lundberg, W. O. (1952). Antioxidant properties of natural spices. *Food Research*, 17, 46-55.
- Chipault, J. R., Mizuno, G. R., Hawkins, J. M., Lundberg, W. O. (1956). The antioxidant properties of spices in foods. *Food Technology*, 10, 209-211.
- Chu, Y. H., Chang, C. L., Hsu, H. F. (2000). Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 561–566.
- Code of Federal Regulations Title 21. (1993). Washington, Food and Drugs Department of Health and Human Services USA.
- Cuvelier, M. E., Richard, H., Berset, C. (1992) Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 56, 324-327.
- Cuvelier, E. M., Richard, H., Berset C. (1996). Antioxidant activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of American Oil Chemists Society*, 73, 645-652.
- Cuvelier, M. E., Berset, C., Richard, H. (1994). Separation of major antioxidants in sage by high performance liquid chromatography. *Sciences des Aliments*, 14, 811-815.

- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., van Beek, T. A., Linssen, J. P. H. (1998). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 77, 140–146.
- Dapkevicius, A., van Beek, T. A., Lelyveld, G. P., van Veldhuizen, A., de Groot, A., Linssen, J. P. H., Venskutonis, R. (2002). Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* leaves. *Journal of Natural Products*, 65, 892–896.
- Dauksas, E., Venskutonis, P. R., Povilaityte, V., Sivik, B. (2001). Rapid screening of antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) extracts obtained by supercritical carbon dioxide at different extraction conditions. *Nahrung/Food*, 45, 338-341.
- de Saizieu, A., Fowler, A., Goralczyk, R., Kilpert, C., Schueler, G., Wehrli, C. (2008). Dietary or pharmaceutical compositions containing tricyclic diterpenes and derivatives thereof for the treatment of depression. PCT Patent WO/2008/061754.
- del Valle, J. M., Godoy, C., Asencio, M., Aguilera, J. M. (2004). Recovery of antioxidants from boldo (*Peumus boldus* M.) by conventional and supercritical CO₂ extraction. *Food Research International*, 37, 695-702.
- Duxbury, D. D. (1992). Extract of rosemary provides natural solution to dehydrated products. *Food Processing*, 53, 102-104.
- Darmati, Z., Jankov, M. R., Schwirtlich, E., Đulinac, B., Đordjevic, A. (1991). High antioxidant activity of extracts obtained from sage by supercritical CO₂ extraction. *Journal of American Oil Chemists Society*, 68, 731–734.
- Economou, K. D., Oreopoulo, V., Thomopoulos C. D. (1991). Antioxidant properties of some plant extracts of the Labiatae family. *Journal of American Oil Chemists Society*, 68, 109–113.
- El-Ghorab, A. H., El-Massry, K. F., Marx, F., Fadel, H. M. (2003). Antioxidant activity of Egyptian Eucalyptus camaldulensis var. brevirostris leaf extracts. *Nahrung*, 47, 41–45.
- Esquivel, M. M., Ribeiro, M. A., Bernardo-Gil, M. G. (1999). Supercritical extraction of savory oil: Study of antioxidant activity and extract characterization, *The Journal of Supercritical Fluids*, 14, 129-138.
- Exarchou, V., Godejohann, M., Van Beek, T. A., Gerathanassis, I. P., Vervoort, J. (2003). LC-UV-solid-phase extraction–NMR-MS combined with a cryogenic flow probe and its application to the identification of compounds present in Greek oregano, *Analytical Chemistry*, 75, 6288–6294.
- Fadel, H., Marx, F., El-Sawy, A., El-Ghorab, A. H. (1999). Effect of extraction techniques on the chemical composition and antioxidant activity of Eucalyptus camaldulensis var. brevirostris leaf oils. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 208, 212–216.
- Fecka, I., Turek, S. (2008). Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chemistry*, 108, 1039-1053.
- Fernandez-Lopez, J., Sevilla, L., Sayas-Barbera, E., Navarro, C., Marin, F., Perez-Alvarez, J. A. (2003). Evaluation of the antioxidant potential of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts in cooked pork meat. *Journal of Food Science*, 68, 660-664.
- Formanek, Z., Kerry, J. P., Higgins, F. M., Buckley, D. J., Morrissey, P. A., Farkas, J. (2001). Addition of synthetic and natural antioxidants to α -tocopheryl acetate supplemented beef patties: effects of antioxidants and packaging on lipid oxidation. *Meat Science*, 58, 337-341.

- Fowler, A., Kilpert, C., Schueler, G., Wehrli, C., Wyss, A. (2008). Dietary and pharmaceutical compositions comprising a sage extract containing a mixture of tricyclic diterpenes and their derivatives and their uses. PCT Patent WO/2008/061756.
- Frankel, E. N., Huang, S., Aeschbach, W. R., Prior, E. (1996). Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol and rosmarinic acid in bulk oil and oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 131-135.
- Frankel, E. N., Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, *Journal of Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1941.
- Georgantelis, D., Blekas, G., Katikou, P., Ambrosiadis, I., Fletouris, D. J. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on lipid oxidation and colour stability during frozen storage of beef burgers. *Meat Science*, 75, 256-264.
- Gordon, M. H. (2001). Measuring antioxidant activity, *Antioxidants in food: Practical Applications*, Ed. By: Pokorny, J., Yanishlieva N., Gordon, M., CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 71-83.
- Gordon, M. H., An, J. (1995). Antioxidant activity of flavonoids isolated from licorice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1784-1788.
- Gordon, M. H. (2001). The development of oxidative rancidity in foods, *Antioxidants in Food: Practical Applications*, Ed. By: Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 7-20.
- Guillen, M. D., Manzanos, M. J. (1998). Composition of the extract in dichloromethane of the aerial parts of a Spanish wild growing plant *Thymus vulgaris* L. *Flavour and Fragrance Journal*, 13, 259-262.
- Hadolin, M., Rižner, A. H., Bauman, D., Knez, Ž. (2004). Isolation and concentration of natural antioxidants with high-pressure extraction, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 245-248.
- Hakkinen, S. H., Karelampi, S. O., Heinonen, I. M., Mykkanen, M., Torronen, A. R. (1998). HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 543-551.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford, Oxford University Press, 22-85.
- Halliwell, B. (1995). Antioxidant characterization: Methodology and mechanism. *Biochememical Pharmacology*, 49, 1341-1348.
- Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the result mean ?. *British Journal of Pharmacology*, 142, 231-255.
- Haraguchi, H., Saito, T., Okamura, N., Yagi, A. (1995). Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*. *Planta Medica*, 61, 333-336.
- Haraguchi, H., Saito, T., Ishikawa, H., Date, H., Kataoka, S., Tamura, Y., Mizutani, K. (1996). Antiperoxidative components in *Thymus vulgaris*. *Planta Medica*, 62, 217-221.
- Ho, C. T., Chen, C. W., Wanasundara, U. N., Shahidi, F. (1997). Natural antioxidants from tea, *Natural Antioxidants. Chemistry, Health Effects, and Applications*, Shahidi, F. (ed.), Champaign, Illinois, AOCS Press, 213-223.
- Horwath, A. B., Grayer, R. J., Keith-Lucas, D. M., Simmonds, M. S. J. (2008). Chemical characterisation of wild population of *Thymus* from different climatic regions in southeast Spain. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36, 117-133.

- Houlihan, C. M., Ho, C., Chang, S. S. (1984). Elucidation of the chemical structure of a novel antioxidant, rosmaridiphenol, isolated from rosemary. *Journal of American Oil Chemists Society*, 61, 1036–1039.
- Hu, Q., Hu, Y., Xu, J. (2005). Free radical-scavenging activity of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) extracts by supercritical carbon dioxide extraction. *Food Chemistry*, 91, 85–90.
- Huang, D., Ou, B. Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Huang, M. T., Ho, C. T., Wang, Z. Y., Ferraro, T., Lou, Y. R., Stauber, K., Ma, W., Georgiadis, C., Laskin, J. D., Conney, A. H. (1994). Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. *Cancer Research*, 54, 701–708.
- Ibanez, E., Lopez-Sebastian, S., Fernandez, J., Tabera, J., Bueno, J. M., Ballester, L., Reglero, G. (2001). Influence of the CO₂ quality in the antioxidant activity of rosemary extracts dearomatized by supercritical fluid extraction. *Food Science and Technology International*, 7, 177-182.
- Ibanez, E., Kubatova, A., Senorans, F. J., Cavero, S., Reglero, G., Hawthorn, S. B. (2003). Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 375–382.
- Ibanez, E., Oca, A., de Murga, G., Lopez-Sebastian, S., Tabera, J., Reglero, G. (1999). Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed rosemary plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1400-1404.
- Ibanez, L., Kubatova, A., Senorans, F. J., Cavero, S., Reglero, G., Hawthorne, S. B. (2003). Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 375–382.
- Inatani, R., Nakatani, N., Fuwa, H., Seto, H. (1982). Structure of a new antioxidative phenolic diterpene isolated from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 1661-1666.
- Iriarte, J., Villanueva, M. R., Iturri, J. M. (1992). Comparative study of antioxidants in meat products: Effects of substitution with extract of rosemary. *Alimentacion, Equipos y Tecnologia*, 11, 87-92
- ISO 3960. (1977). Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla. Određivanje peroksidnog broja.
- Ito, N., Fukushima, S., Hagiwara, A., Shibata, M., Ogiso, T. (1983). Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 70, 343–352.
- Ivanović, J. (2009). Izolacija antioksidativne frakcije iz ruzmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) i žalfije (*Salvia officinalis* L.) natkritičnim ugljenik(IV)-oksidom-optimizacija procesa, Magistarska teza, Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu.
- Ivanović, J., Dilas, S., Babović, N., Žižović, I., Petrović, S., Antioxidant activity of the supercritical extracts of Lamiaceae herbs, 47th Meeting of the Serbian Chemical Society, Belgrade, March 21, 2009, Book of Abstracts p. 45, Proceedings pp. 91-94.
- Kavvadias, D., Monschein, V., Sand, P., Riederer, P., Schreier, P. (2003). Constituents of sage (*Salvia officinalis*) with in vitro affinity to human brain benzodiazepine receptor. *Planta medica*, 69, 113-117.
- Kilic, T., Dirmenci, T., Goren, A. C. (2007). Chemotaxonomic evaluation of species of Turkish *Salvia*: Fatty acid composition of seed oils. II. *Records of Natural Products*, 1, 17-23.
- Kimura, Y., Kanamori, T. (1983). Process for producing preservatives. U.S. Patent, 4,380,506.
- Kochhar, S. P., Rossell, J. B. (1990). Detection, estimation and evaluation of antioxidants in food systems, *Food Antioxidants*, Hudson, B. J. F., Ed., Elsevier Applied Science, England, 19.

- Leal, P. F., Chaves, F. C. M., Ming, L. C., Petenate, A. J., Meireles, M. A. A. (2006). Global yields, chemical compositions and antioxidant activities of clove basil (*Ocimum gratissimum* L.) extracts obtained by supercritical fluid extraction. *Journal of Food Process Engineering*, 29, 547–559.
- Lee, S. J., Umamo, K., Shibamoto, T., Lee, K. G. (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 91, 131–137.
- Lopez-Sebastian, S., Ramos, E., Ibanez, E., Bueno, J. M., Ballester, L., Tabera, J., Reglero, G. (1998). Dearomatization of antioxidant rosemary extracts by treatment with supercritical carbon dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 13–19.
- Louli, V., Ragoussis, N., Magoulas, K. (2004). Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. *Bioresource Technology*, 92, 201–208.
- Luengthanaphol, S., Mongkholkhajornsilp, D., Douglas, S., Douglas, P. L. (2004). Extraction of antioxidants from sweet Thai tamarind seed coat-preliminary experiments. *Journal of Food Engineering*, 63, 247–252.
- Madhavi, D. L., Deshpande S. S., Salunke, D. K. (edit.). (1996.) *Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives*. Food Science and Technology, New York, Basel, Hong Kong, Marcel Dekker, 68.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Jimenez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability, *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727–747.
- Mandić, M. L. (2007). Znanost o prehrani: hrana i prehrana u čuvanju zdravlja, Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek.
- Marongiu, B., Porcedda, S., Piras, A., Rosa, A., Deiana, M., Dessi, M. A. (2004). Antioxidant activity of supercritical extract of *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* and *Melissa officinalis* subsp. *inodora*. *Phytotherapy Research*, 18, 789–792.
- Martinez, J. L. (2008), *Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 287-291.
- Masterova, I., Misíková, I. E., Sirotkova, L., Vaverkova, S., Ubik, K. (1996). Royleanones in the roots of *Salvia officinalis* L. of domestic provenance and their antimicrobial activity. *Ceská a Slovenská farmacie*, 45, 242-245.
- Mchugh, M., Krukoniš, V. J. (1986). *Supercritical Fluid Extraction (Principles and Practice)*. Butterworth publishers, Stoneham.
- Medjakovic, S., Jungbauer, A. (2008). Red clover isoflavones biochanin A and formononetin are potent ligands of the human aryl hydrocarbon receptor, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 108, 171–177.
- Meireles, M. A. A. (2009). *Extracting bioactive compounds for Food Products: Theory and Applications*. CRC Press, Boca Raton, FL, 272-306.
- Mikova, K. (2001). The regulation of antioxidants in food, *Antioxidants in food: Practical Applications*, Ed. By: Pokorny, J., Yanishlieva N., Gordon, M., CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 267–283.
- Milic, B. Lj., Djilas, S. M., Canadanovic-Brunet, J. M. (1998). Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion break-down of lipid peroxidation system. *Food Chemistry*, 61, 443-447.
- Miquel, E. M., Nissen, L. R., Skibsted, L.H. (2004). Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, 219, 561-571.

- Miura, K., Inagaki, T., Nakatani, N. (1989). Structure and activity of new deodorant biphenyl compounds from thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37, 1816-1819.
- Miura, K., Kikuzaki, H., Nakatani, N. (2002). Antioxidative activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1845–1851.
- Miura, K., Nakatani, N. (1989). Antioxidative activity of flavonoids from thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 3043–3045.
- Moller, J. K. S., Madsen, H. L., Aaltonen, T., Skibsted, L. H. (1999). Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. *Food Chemistry*, 64, 215–219.
- Moller, P., Wallin, H., Knudsen, L. E. (1996). Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and lifestyle factors, *Chemico-Biological Interactions*, 102, 17-36.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J., Nunez, M. J., Parajo, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources, *Food Chemistry*, 72, 145–171.
- Moyler, D. A. (1994). Oleoresins, tinctures and extracts, *Food Flavours*, Ashurst, P. R., Ed., Blackie Academic and Professional, an imprint of Chapman and Hall, Glasgow.
- Mukhopadhyay, M. (2000). *Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide*. CRC Press, Boca Raton, FL, 5.
- Munne-Bosch, S., Alegre, L. (2001). Subcellular compartmentation of the diterpene carnosic acid and its derivatives in the leaves of rosemary, *Plant Physiology*, 125, 1094-1102.
- Nakatani, N. (1994). Antioxidative and antimicrobial constituents of herbs and spices. *Spices, Herbs and Edible Fungi*. Charalambous, G., Ed., Elsevier Science, Amsterdam, 251.
- Nakatani, N., Inatani, R. (1981). Structure of rosmanol, a new antioxidant from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*, 45, 2385-2386.
- Nakatani, N., Inatani, R. (1983). A new diterpene lactone, rosmadial, from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*, 47, 353-358.
- Nakatani, N., Inatani, R. (1984). Two antioxidative diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and a revised structure for rosmanol. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48, 2081-2085.
- Nakatani, N., Miura, K., Inagaki, T. (1989). Structure of new deodorant biphenyl compounds from thyme (*Thymus vulgaris* L.) and their activity against methyl mercaptan. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 1375-1381.
- Nakatsu, T., Yamasaki, A. (2000). Water-soluble anti-oxidation agents. US Patent, US6123945.
- Nguyen, U., Frankman, G., Evans, D. A. (1991). Process for extracting antioxidants from Labiateae herbs. U.S. Patent, 5,017,397.
- Ninomiya, K., Matsuda, H., Shimoda, H., Nishida, N., Kasajima, N., Yoshino, T., Morikawaa, T., Yoshikawaa, M. (2004). Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14, 1943–1946.
- Nissen, L. R., Mansson, L., Bertelsen, G., Tuong, H. B., Skibsted, L. H. (2000). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5548-5556.
- Okamura, N., Fujimoto, Y., Kuwabara, S., Yagi, A. (1994). High-performance liquid chromatographic determination of carnosic acid and carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. *Journal of Chromatography A*, 679, 381-386.
- Okazaki, K., Kawazoe, K., Takaishi, Y. (2002). Human platelet aggregation inhibitors from thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Phytotherapy Research*, 16, 398–399.

- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of Nutrition*, 133, 2812-2819.
- Pokorny, J., Reblova, Z., Janitz, W. (1998). Extracts from rosemary and sage as natural antioxidants for fats and oils. *Czech Journal of Food Science*, 16, 227-234.
- Pokorny, J. (2001). Introduction, *Antioxidants in food: Practical Applications*, Ed. By: Pokorny, J., Yanishlieva N., Gordon, M., CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 1-7.
- Pokorny, J., Schmidt, S. (2003). The impact of food processing in phytochemicals: The case of antioxidants, *Phytochemical functional foods*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Pokorny, J., Korczak, J. (2001). Preparation of natural antioxidants, *Antioxidants in food: Practical Applications*, Ed. By: Pokorny, J., Yanishlieva N., Gordon, M., CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 311-326.
- Pongracz, G., Kracher, F., Schuler, P. (1990.). 1978–1987, as reported in Natural antioxidants exploited commercially, by Schuler, P., in chap. 4, *Food Antioxidants*, Hudson, B. J. F., Elsevier Applied Science, 136.
- Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za jestiva biljna ulja i masti, margarin i druge masne namaze, majonez i srodne proizvode (Sl. list SCG, br. 23/2006).
- Pravilnik o kvalitetu i uslovima upotrebe aditiva u namirnicama i o drugim zahtevima za aditive i njihove mešavine (Sl. list SCG, br. 56/2003, 5/2004 – ispr. i 16/2005).
- Pravilnik o kvalitetu začina, ekstrakata začina i mešavina začina (Sl. list SFRJ, br. 4/85 i 84/87).
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Quitain, A. T., Katoh, S., Moriyoshi, T. (2004.). Isolation of antimicrobials and antioxidants from moso-bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) by supercritical CO₂ extraction and subsequent hydrothermal treatment of the residues, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 43, 1056-1060.
- Reglero, G., Tabera, J., Ibanez, E., Lopez-Sebastian, S., Ramos, E., Ballester, L. (1999). Proceso de extracción con fluidos supercríticos para la producción de antioxidantes naturales y antioxidantes obtenidos mediante dicho proceso. Spanish Patent, ES2128996.
- Ribeiro, M. A., Bernardo-Gil, M. G., Esquivel, M. M. (2001). *Melissa officinalis* L.: Study of antioxidant activity in supercritical residues, *The Journal of Supercritical Fluids*, 21, 51-60.
- Rice-Evans, C. A., Miller, J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical in Biology and Medicine*, 20, 933-956.
- Richheimer, S. L., Bernart, M. W., King, G. A., Kent, M. C., Beiley, D. T. (1996). Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. *Journal of American Oil Chemists Society*, 73, 507–514.
- Rizvi, S. S. H. (1994). *Supercritical fluid processing of food and biomaterials*. London: Blackie Academic & Professional.
- Rižnar, K., Čelan, Š., Knez, Ž., Mojca, S., Bauman, D., Glaser, R. (2006). Antioxidant and antimicrobial activity of rosemary extract in chicken frankfurters. *Journal of Food Science*, 71, 425-429.
- Rižnar, K., Čelan, Š., Škerget, M., Knez, Ž. (2008). Solubility of carnosic acid and carnosol from rosemary extract in supercritical CO₂. *Acta Chimica Slovenica*, 55, 516–520.

- Rižner, A. H., Hadolin, M., Knez, Ž., Bauman, D. (2000). Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil, *Food Chemistry*, 71, 229-233.
- Robards, K., Prenzler, P., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chemistry*, 66, 401-436.
- Rota, M. C., Herrera, A., Martinez, R. M., Sotomayor, J. A., Jordan, M. J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19, 681-687.
- Sanchez-Gonzales, I., Jimenez-Escrib, A., Saura-Galixto, F. (2005). In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures, *Food Chemistry*, 90, 133-139.
- Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8, 121-137.
- Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B., Fernandes-Ferreira, M. (2002). Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Science*, 162, 981-987.
- Schulz, J. M., Hermann, K. (1980) Occurrence of hydroxybenzoic acid and hydroxycinnamic acids in species (German). *Journal Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und –Forschung A*, 171, 193-199.
- Schwarz, K., Ernst, H., Ternes, W. (1996). Evaluation of antioxidative constituents from thyme. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 70, 217-223.
- Schwarz, K., Ternes, W. (1992). Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*, *Journal Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und –Forschung A*, 195, 99-103.
- Sebranek, J. G., Sewalt, V. J. H., Robbins, K. L., Houser, T. A. (2005). Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat Science*, 69, 289-296.
- Sen, C. K. (1995). Oxidants and antioxidants in exercise, *Journal of Applied Physiology*, 79, 675-686.
- Senorans, F. J., Ibanez, E., Cavero, S., Tabera, J., Reglero, G. (2000). Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of supercritical-fluid extracts of rosemary plants. *Journal of Chromatography A*, 870, 491-499.
- Setchell, K. D. R., Cassidy, A. (1999). Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *The Journal of Nutrition*, 129, 758S-767S.
- Simandi, B., Hajdu, V., Peredi, K., Czukor, B., Nobik-Kovacs, A., Kery, A. (2001). Antioxidant activity of pilot-plant alcoholic and supercritical carbon dioxide extracts of thyme. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103, 355-358.
- Simandi, B., Oszagyan, M., Lemberkovics, E., Kery, A., Kaszacs, J., Thyron, F., Matyas, T. (1998). Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of oregano oleoresin, *Food Research International*, 31, 723-728.
- Shi, J., King, J. W. (2006). *Functional Food Ingredients and Nutraceuticals: Processing Technologies*. Published by CRC Press, 11.
- Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z., Nagy, G. (2007). Antioxidant measurements, *Physiological Measurement*, 28, R41-R55.
- Stocker, R., Frei, B. (1991). Endogenous antioxidant defenses in human blood plasma, *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. H. Sies (Editor), Academic Press, Florida, 213-243.

- Sun, X. R., Luo, H. W., Sakai, T., Niwa, M. (1991). Paramiltioic acid, a novel rearranged norabietanoid from *Salvia paramiltiorrhiza*. *Tetrahedron Letters*, 32, 5797-5800.
- Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A.R., Simonič, M, Knez, Ž. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities, *Food Chemistry*, 89, 191-198.
- Tada, M., Okuno, K., Chiba, K., Ohnishi, E., Yoshii, T. (1994). Antiviral diterpenes from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 35, 539-541.
- Takeuchi, H., Lu, Z. G., Fujita, T. (2004). New monoterpene glucoside from the aerial parts of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Bioscience Biotechnology and chemistry*, 68, 1131-1134.
- Tateo, F., Fellin, M. (1988). *Rosmarinus officinalis* L. extract production, antioxidant and antimutagenic activity. *Perfumer Flavorist*, 13, 48-54.
- Thanos, J., Cotterchio, M., Boucher, B. A., Kreiger, N., Thompson, L. U. (2006). Adolescent dietary phytoestrogen intake and breast cancer risk (Canada). *Cancer Causes Control*, 17, 1253-1261.
- Thongtan, K., Toma, R., Reiboldt, W., Daoud, A. Z. (2005). Effect of rosemary extract on lipid oxidation and sensory evaluation of frozen, precooked beef patties. *Foodservice Research International*, 16, 93-104.
- Thorsen, M. A., Hildebrandt, K. S. (2003). Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts: Aspects of accurate quantification. *Journal of Chromatography A*, 995, 119-125.
- Tipsrisukond, N., Fernando, L. N., Clarke, A. D. (1998). Antioxidant effects of essential oil and oleoresin of black pepper from supercritical carbon dioxide extractions in ground pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4329-4333.
- Todd, P. H. (1989). Herb flavoring and/or antioxidant composition and process, U.S. Patent, 4,877,635.
- Topcu, G., Turkmen, Z., Schilling, J. K., Kingston, D. G. I., Pezzuto, J. M., Ulubelen, A. (2008). Cytotoxic activity of some anatolian *Salvia* extracts and isolated abietane diterpenoids, *Pharmaceutical Biology*, 46, 180-184.
- Trojakova, L., Reblova, Z., Nguyen, H., Pokorny, J. (2001). Antioxidant activity of rosemary and sage extracts in rapeseed oil. *Journal of Food Lipids*, 8, 1-13.
- Ulubelen, A., Oksuz, S., Kolak, U., Bozok-Johansson, C., Celik, C., Voelter, W. (2000). Antibacterial diterpenes from the roots of *Salvia viridis*. *Planta medica*, 66, 458-462.
- Vagi, E., Rapavi, E., Hadolin, M., Vasarhelyine, K. P., Balazs, A., Blazovics, A., Simandi, B. (2005). Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 17-21.
- Viani, R. (1977). Process for extracting antioxidants, U.S. Patent, 4,012,531.
- Wang, H. C., Chen, C. R., Chang, C. J. (2001). Carbon dioxide extraction of ginseng root hair oil and ginsenosides, *Food Chemistry*, 72, 505-509.
- Wang, S. Y., Lin, H. S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and development stage, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 140-146.
- Watson, D.H. (2002). *Food Chemical Safety, Vol. 2 : Additives*, Cambridge England, 283-299.
- Willcox, J. K., Ash, S. L., Catignani, G. L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 275-295.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., Prior, R. L. (2004a). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4026-4037.

- Wu, X., Gu, L., Holden, J., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., Beecher, G., Prior, R. L. (2004b). Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 407–422.
- Yang, C., Xu, Y. R., Yao, W. X. (2002). Extraction of pharmaceutical components from *Ginkgo biloba* leaves using supercritical carbon dioxide, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 846-849.
- Yanishlieva, N. V. (2001). Inhibiting oxidation, *Antioxidants in food: Practical Applications*, Ed. By: Pokorny, J., Yanishlieva N., Gordon, M., CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 23-56.
- Yanishlieva, N. V., Heinonen, I. M. (2001). Sources of natural antioxidants, *Antioxidants in food: Practical Applications*, Ed. By: Pokorny, J., Yanishlieva N., Gordon, M. CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 210–249.
- Yanishlieva, N. V., Marinova, E. M., Gordon, M. H., Raneva, V. G. (1999). Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*, 64, 59–66.
- Yanishlieva, N. V., Marinova, E., Pokorny, J. (2006). Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108, 776–793.
- Yepez, B., Espinosa, M., Lopez, S., Bolanos, G. (2002). Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction. *Fluid Phase Equilibria*, 194, 879–884.
- Yesil-Celiktas, O., Nartop, P., Gurel, A., Bedir, E., Vardar-Sukan, F. (2007). Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis* calli. *Journal of Plant Physiology*, 164, 1536-1542.
- Ying, Z., Lei, Y, Yuangang, Z., Xiaoqiang, C., Fuji, W., Fang, L. (2010). Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chemistry*, 118, 656-668.
- Zheng, W., Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5165-5170.

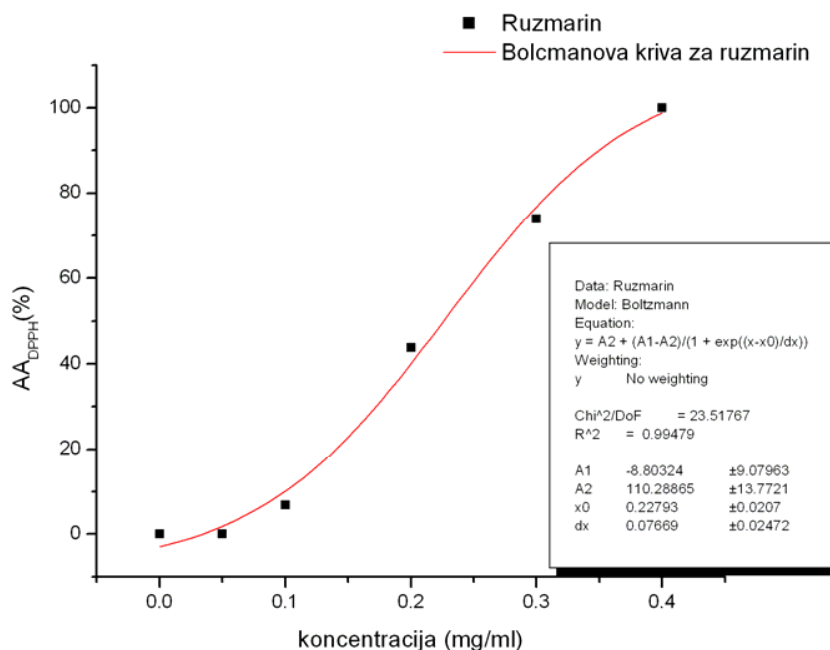
PRILOZI

Prilog 1

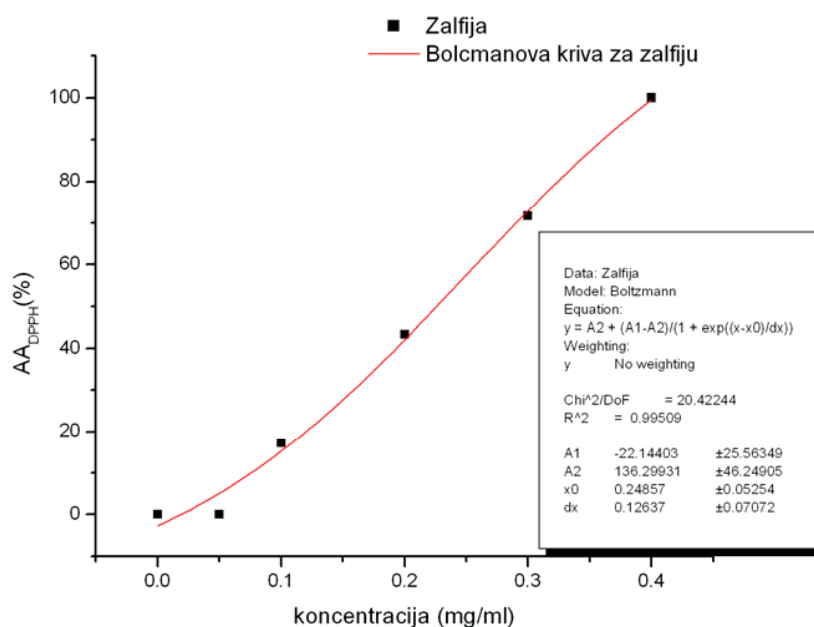
Tabela P1.1 Antioksidativna aktivnost, AA_{DPPH} (%) različitih koncentracija NKE ruzmarina, žalfije, timijana i izopa izolovanih na 35 MPa i 100°, BHA i Flavor'Plus™

Koncentracija antioksidansa, mg/ml	BHA	Flavor'Plus™	Ruzmarin	Žalfija	Timijan	Izop
0	0	0	0	0	0	0
0,005	0					
0,01	32,29	0			27,08	
0,05	67	21,43	0	0	34,17	
0,1	85,71	51,29	6,85	17,17	62,05	
0,15	92,86					
0,2	100	85,71	43,84	43,37	83,33	
0,25		89,29				
0,3			73,97	71,69	100	
0,4			100	100		
0,5		100				
1						
2						
2.5						9.64
5						46,39
10						75,9
15						87,95
20						100

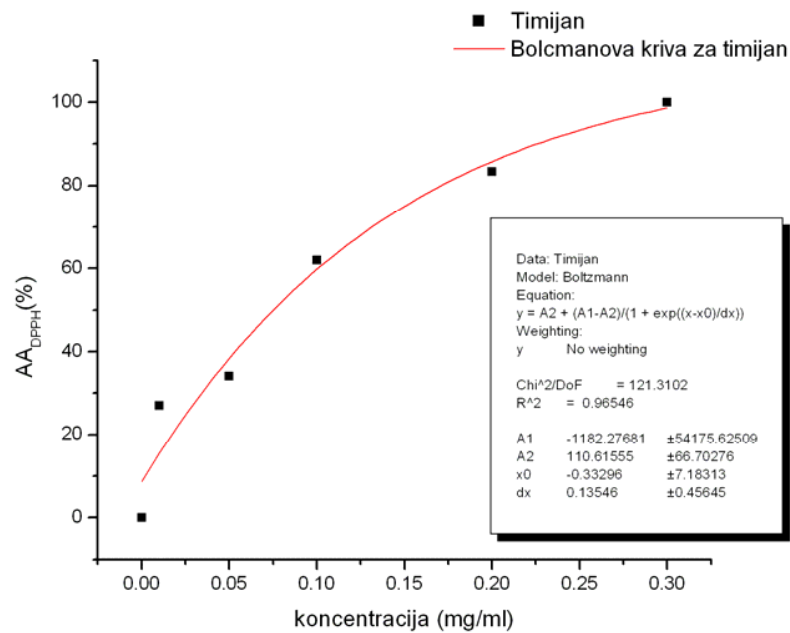
Određivanje EC₅₀ vrednosti za antioksidativne frakcije ruzmarina, žalfije, timijana i izopa, BHA i Flavor'Plus™ (DPPH radikali)



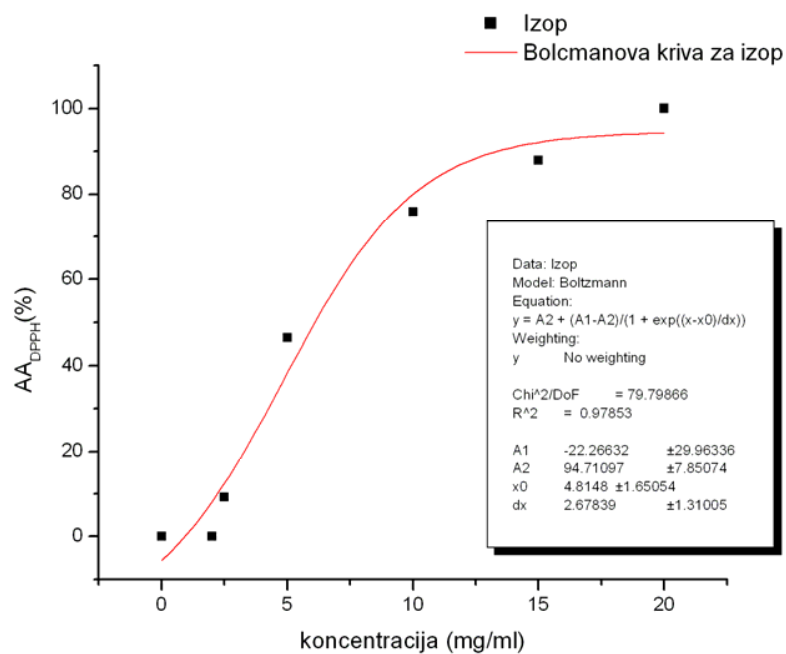
Slika P1.1 Grafički prikaz Boltzmanove krive za antioksidativnu frakciju ruzmarina



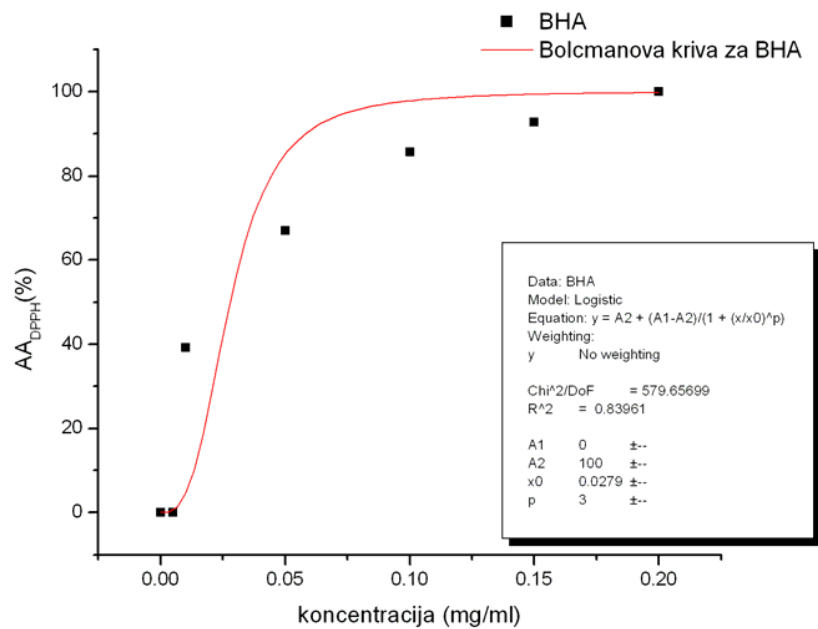
Slika P1.2 Grafički prikaz Boltzmanove krive za antioksidativnu frakciju žalfije



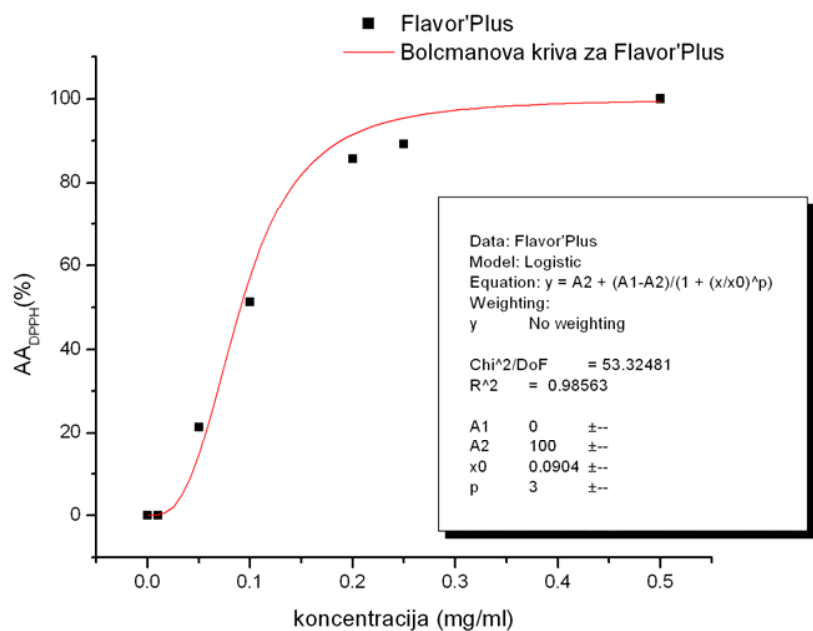
Slika P1.3 Grafički prikaz Bolzmanove krive za antioksidativnu frakciju timijana



Slika P1.4 Grafički prikaz Bolzmanove krive za za antioksidativnu frakciju izopa



Slika P1.5 Grafički prikaz Bolcmanove krive za BHA



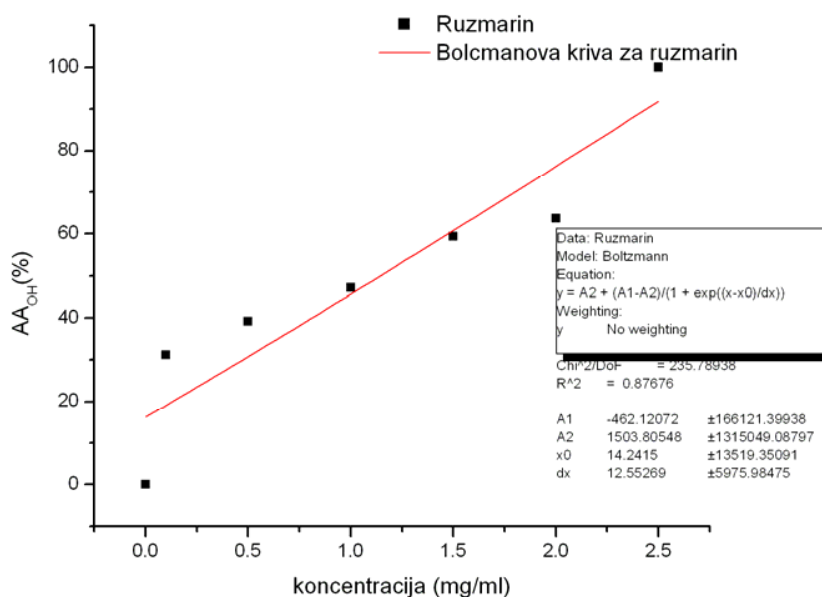
Slika P1.6 Grafički prikaz Bolzmanove krive za Flavor'Plus™

Prilog 2

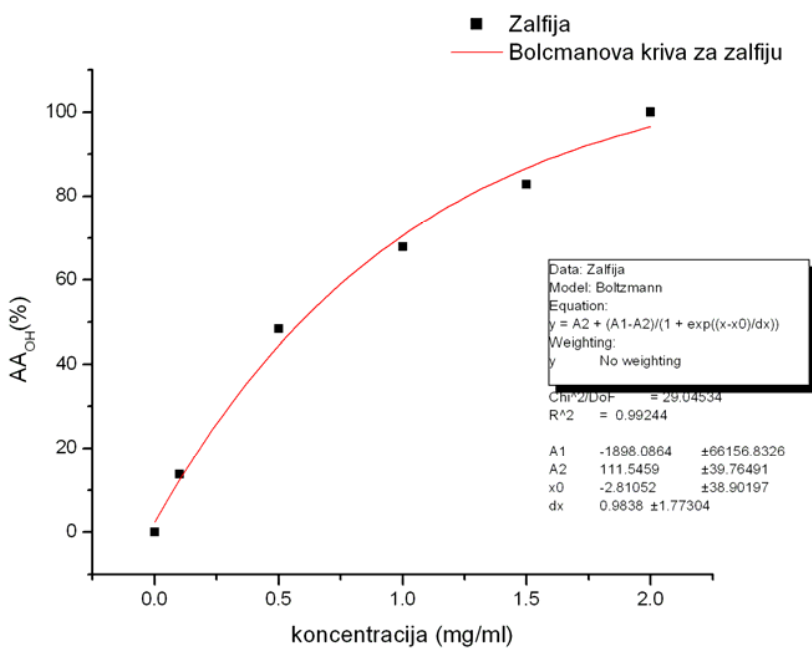
Tabela P2.1 Antioksidativna aktivnost, AA_{OH} (%) različitih koncentracija NKE ruzmarina, žalfije, timijana i izopa izolovanih na 35 MPa i 100°, BHA i Flavor'Plus™

Koncentracija antioksidansa, mg/ml	BHA	Flavor'Plus™	Ruzmarin	Žalfija	Timijan	Izop
0	0	0	0	0		0
0,05						
0,1	0	0	25	13,75		21,76
0,25		27,2				
0,5	22,09	65,28	38,79	48,46	0	35,88
0,75		78,24				
1	30,23	83,36	44,44	67,97	6,98	38,68
1,25		87,52				
1,5	53,49	90,4	64,06	82,81	22,79	54,69
1,75		100				
2	67,33		76,85	100	76,74	64,84
2.5	79,3		81,25		86,05	92,37
3	100		100		100	100

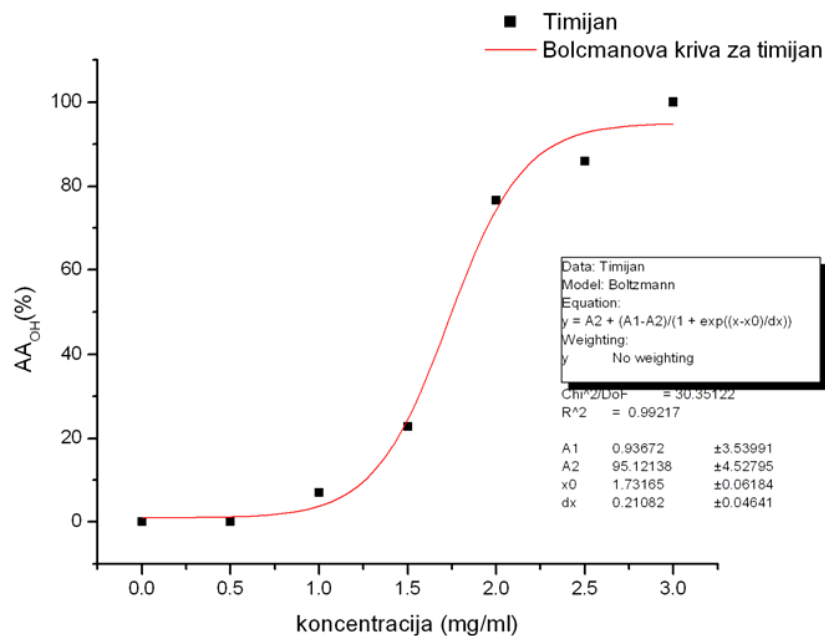
Određivanje EC₅₀ vrednosti za antioksidativne frakcije ruzmarina, žalfije, timijana i izopa, BHA i Flavor'Plus™ (OH radikali)



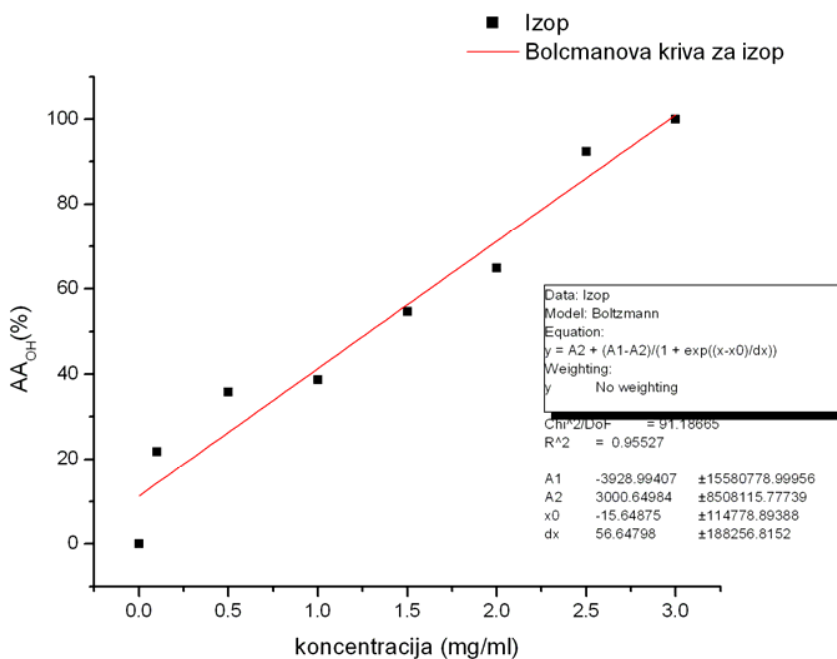
Slika P2.1 Grafički prikaz Bolcmanove krive za antioksidativnu frakciju ruzmarina



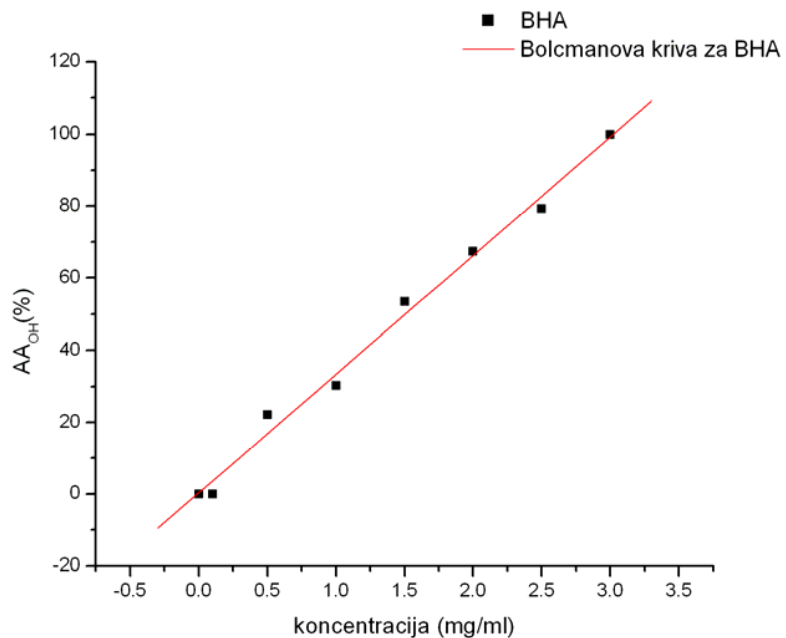
Slika P2.2 Grafički prikaz Bolzmanove krive za antioksidativnu frakciju žalfije



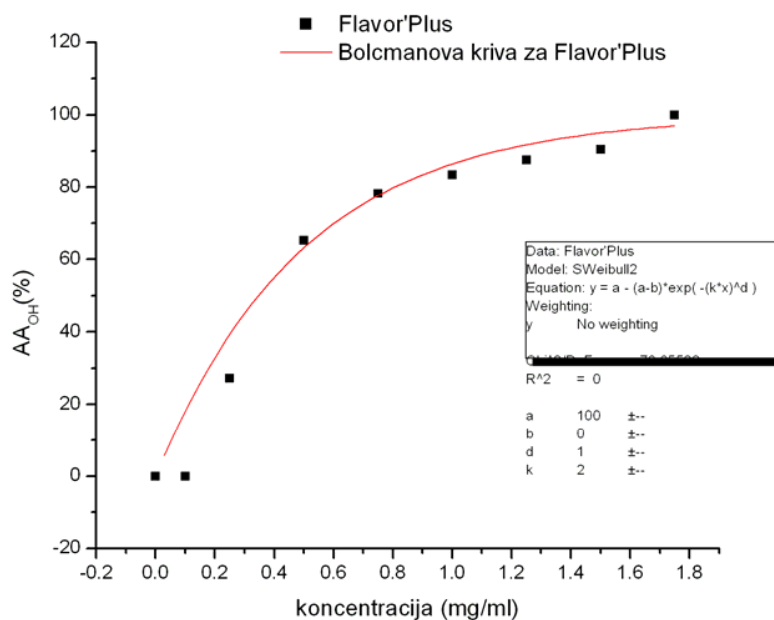
Slika P2.3 Grafički prikaz Bolzmanove krive za antioksidativnu frakciju timijana



Slika P2.4 Grafički prikaz Bolzmanove krive za antioksidativnu frakciju izopa

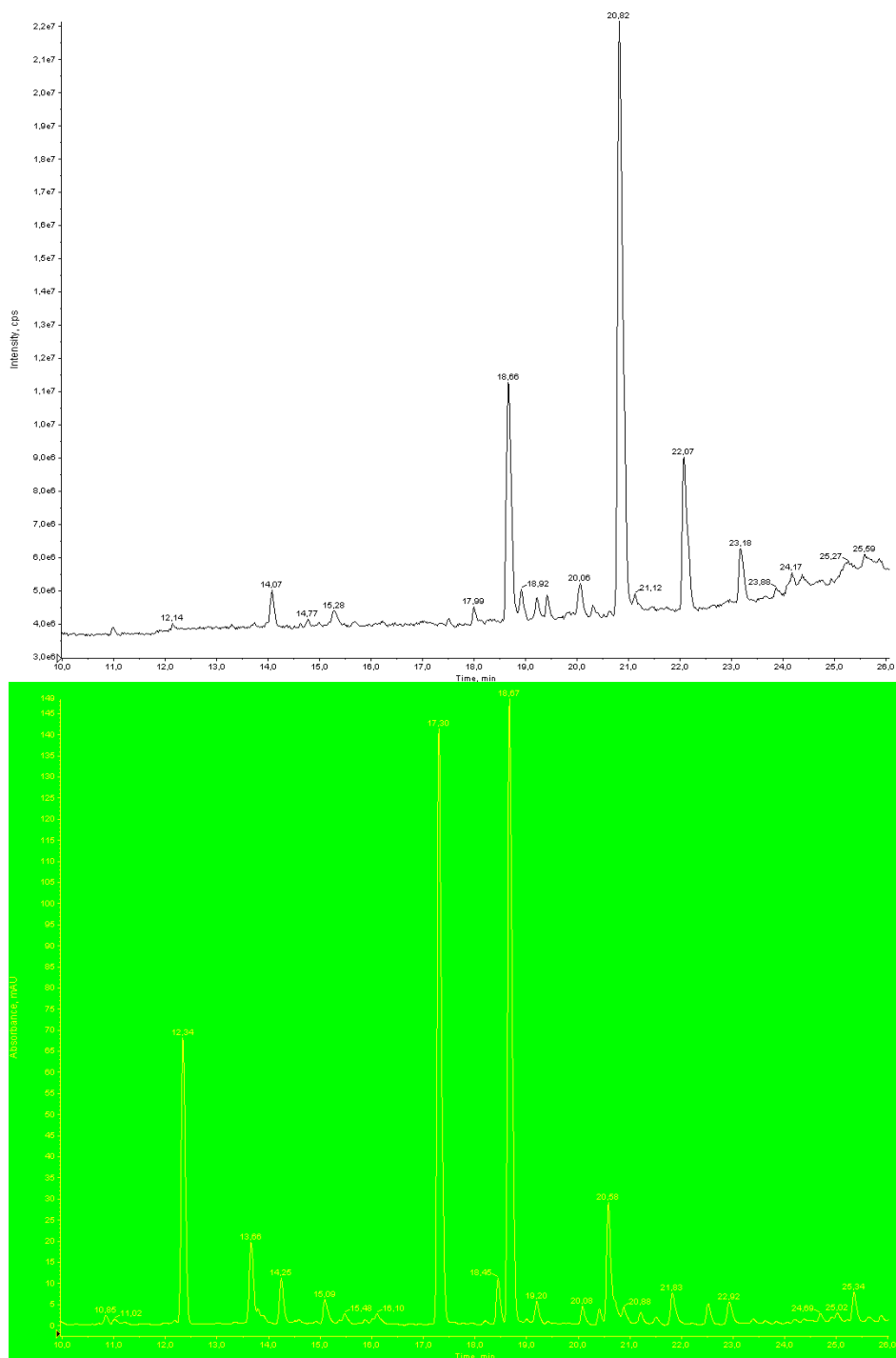


Slika P2.5 Grafički prikaz Bolzmanove krive za BHA

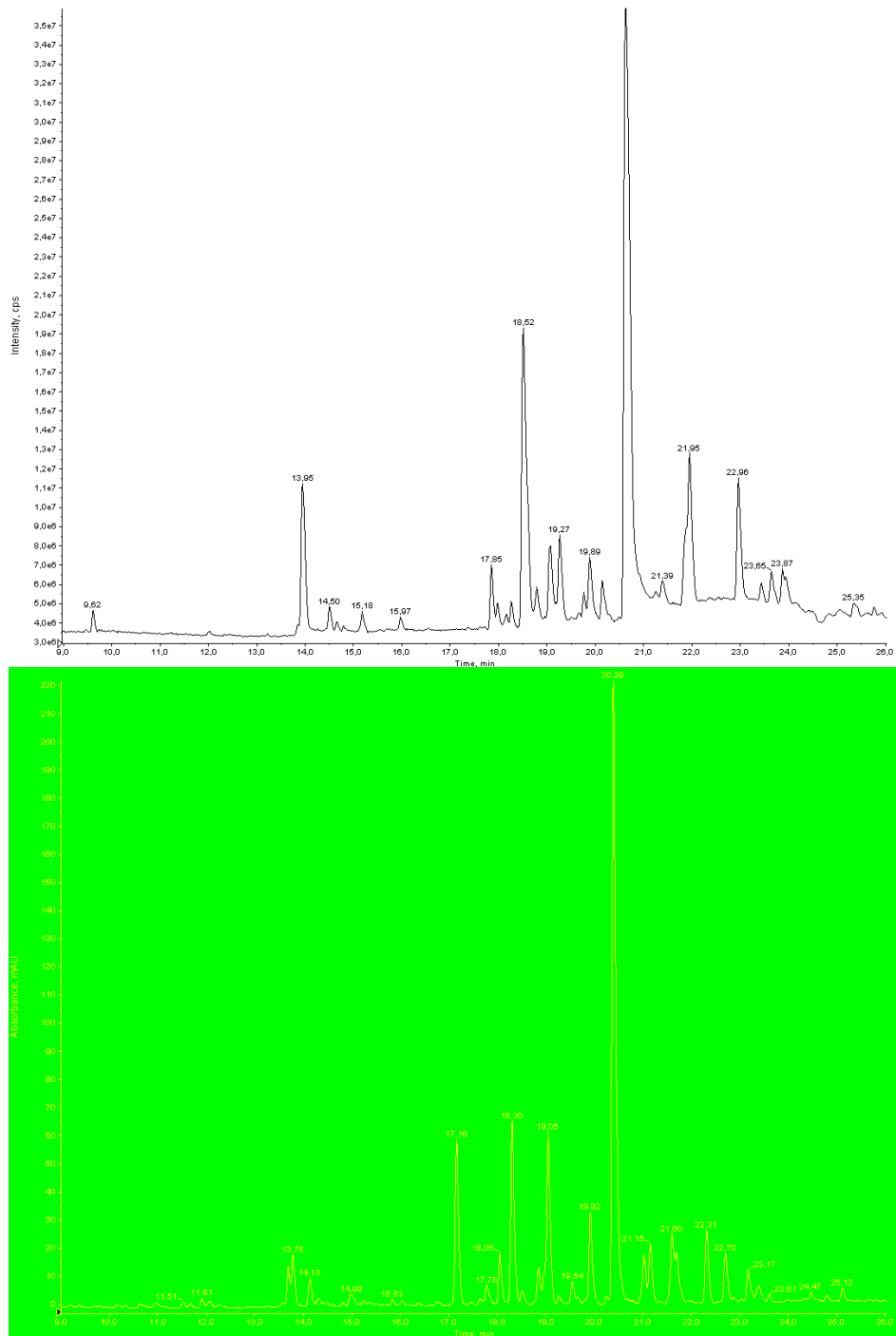


Slika P2.6 Grafički prikaz Bolzmanove krive za Flavor'Plus™

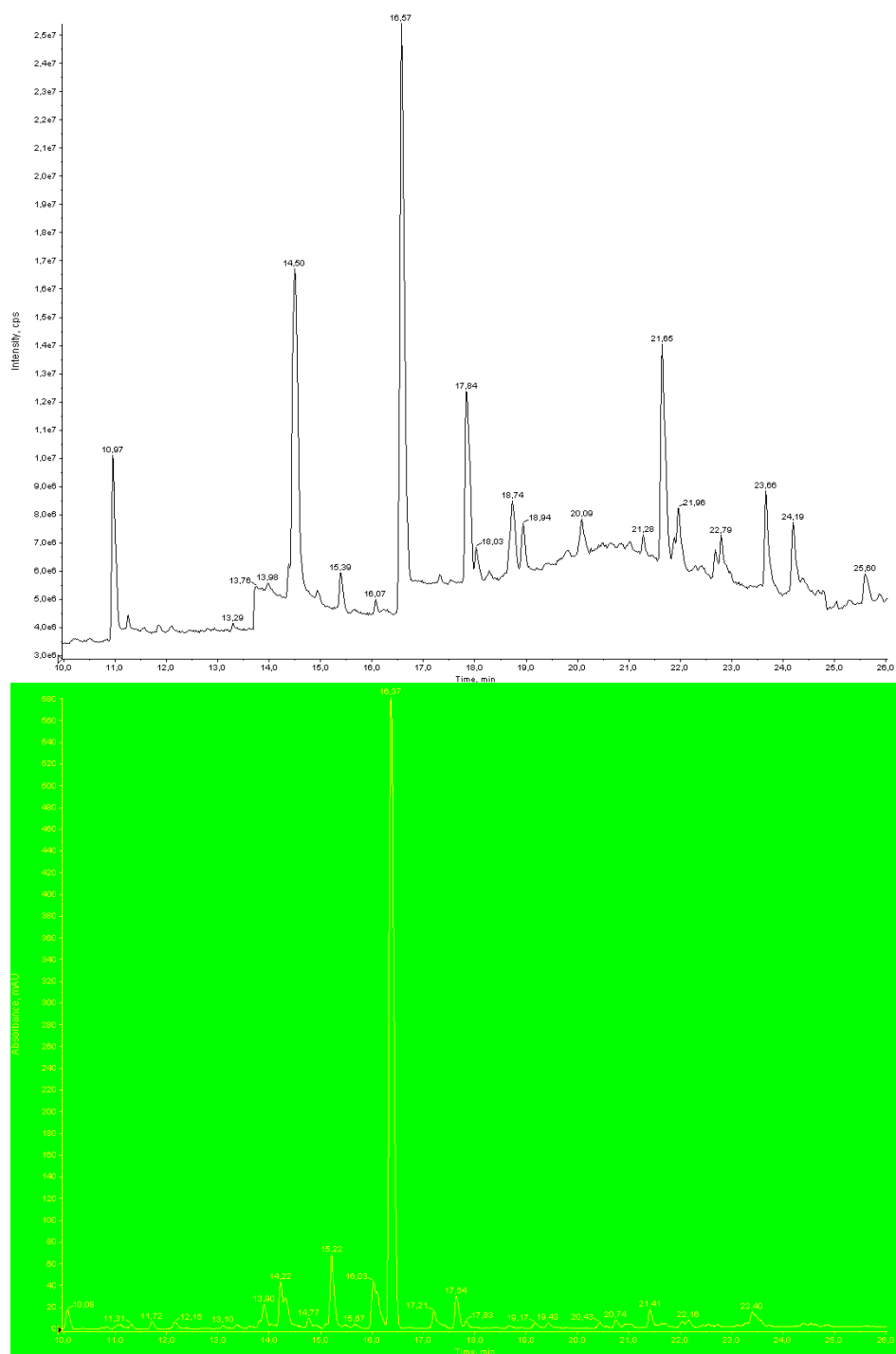
Prilog 3



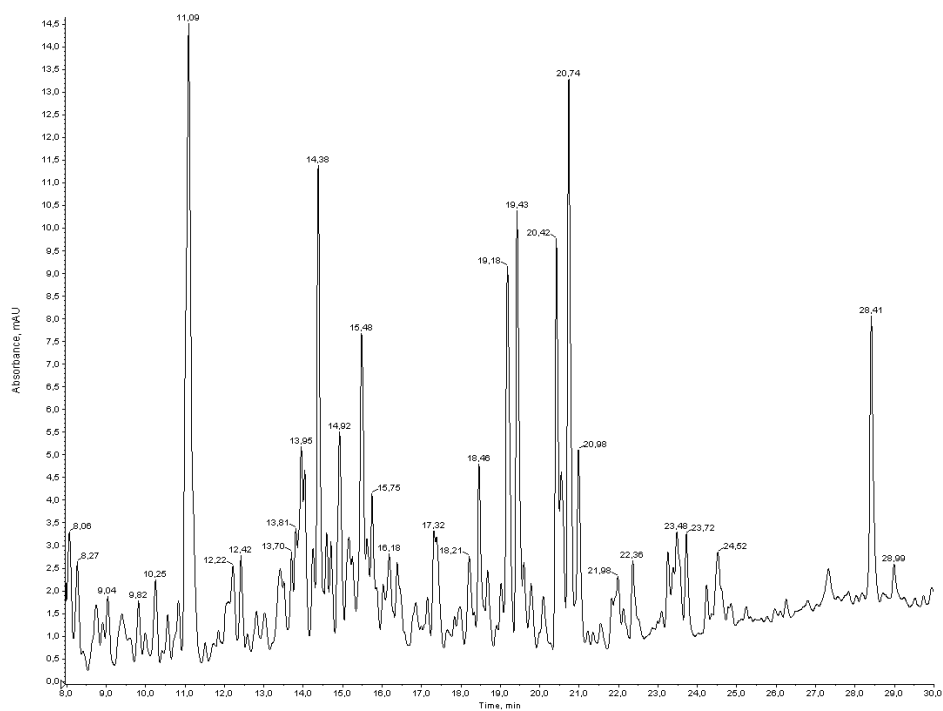
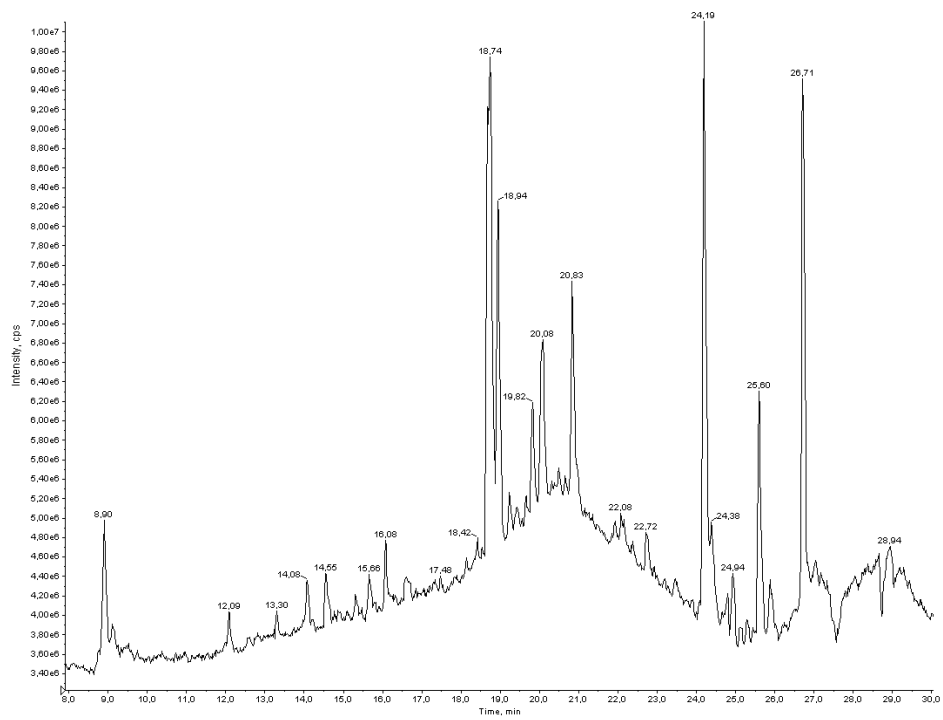
Slika P3.1 Hromatogrami antioksidativne frakcije ruzmarina, na vrhu, LC-ESI-MS, na dnu, LC-DAD na 240 nm



Slika P3.2 Hromatogrami antioksidativne frakcije žalfije, na vrhu, LC-ESI-MS, na dnu, LC-DAD na 240 nm



Slika P3.3 Hromatogrami antioksidativne frakcije timijana, na vrhu, LC-ESI-MS, na dnu, LC-DAD na 240 nm



Slika P3.4 Hromatogrami antioksidativne frakcije izopa, na vrhu, LC-ESI-MS, na dnu, LC-DAD na 240 nm

Прилог 2.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„ Антиоксидативне особине фракција добијених из одабраних биљака фамилије

Lamiaceae поступком наткритичне екстракције “

која је моје ауторско дело.

Сагласан/на сам да електронска верзија моје дисертације буде доступна у отвореном приступу.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци дат је на следећој страници.)

Потпис



У Београду, _____