

NEENZIMSKI ANTIOKSIDATIVNI STATUS PARADAJZA SORTE „VOLOVSKO SRCE“ SA PODRUČJA LIJEVČE POLJA

Zoran Kukrić¹, Ivan Samelak², Tanja Marić², Goran Vučić¹, Nataša Lakić¹,
Ladislav Vasilišin¹

Izvod: Rezultati određivanja neenzimskih antioksidativnih kapaciteta paradajza sorte „Volovsko srce“ prikazani su u ovom radu. Sadržaj ukupnih fenola se kreće u rasponu od 88.81 do 138.44 $\mu\text{gGAE/g}_{\text{FW}}$, ukupni flavonoidi od 59.25 do 66.95 $\mu\text{gQc/g}_{\text{FW}}$, te flavonoli od 94.49 do 243.47 $\mu\text{gQc/g}_{\text{FW}}$ respektivno. Sadržaj likopena u uzorcima se kretao od 136.32 do 600,3 $\mu\text{g}/100\text{g}_{\text{FW}}$, dok je određen i sadržaj vitamina C koji iznosi 12.6 do 15.87 $\text{mg}/100\text{g}_{\text{FW}}$ za 3 različita uzorka. Rezultati antioksidativne aktivnosti etanolnih ekstrakata paradajza sorte „volovsko srce“ određeni su primjenom DPPH i ABTS metoda u odnosu na Trolox ekvivalent i iznose: DPPH u rasponu od 1.81 do 2.54 $\mu\text{mol Trolox/g}_{\text{FW}}$, za ABTS od 0.19 do 2.23 $\mu\text{mol Trolox/g}_{\text{FW}}$. Rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima, ali je, najvjerovatnije, do određenih razlika došlo zbog različitog načina uzgoja ispitivanih uzoraka.

Ključne riječi: antioksidativni kapacitet, fenoli, likopen, DPPH, ABTS

Uvod

Slobodni radikali se u ljudskom tijelu stvaraju tokom normalnog metabolizma i predstavljaju jedan od osnovnih uzročnika čitavog niza neurodegenerativnih poremećaja kao što su diabetes, kancer, srčana oboljenja i starenje. Već je ranije ustanovljeno da ravnoteža između oksidanata i antioksidanata odlučuje o zdravlju i vitalnosti pojedinaca. (Pinela 2012, Shazad 2014, Maruyana 2015)

Antioksidanti mogu biti prirodni ili umjetni. Za razliku od sintetskih antioksidanta, prirodni antioksidanti su sigurni i imaju mnogo manje nuspojave. To je razlog velikog broja istraživanja vezanih za iznalaženje novih prirodnih, obično biljnih, jedinjenja sa antioksidativnom aktivnošću. Paradajz (*Lycopersicon Esculentum*) i njegove preradevine su bogate antioksidativnim jedinjenjima kao što su karotenoidi, likopen, vitamin C i fenolna jedinjenja (Pinela, 2012 i literatura navedena u ovom radu)

Materijal i metode

U istraživanju su korišteni uzorci paradajza (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) - sorta Volovsko srce. Uzorci su nabavljeni sa tri različita lokaliteta uzgoja na području opština Gradiška i Laktaši. Lokaliteti uzgoja paradajza su bili: Aleksandrovac (uzorak 1), Žeravica (uzorak 2) i Bok Jankovac (uzorak 3). Plodovi paradajza su homogizovani ručnim blenderom. Uzorci (15g) su ekstrahovani sa 25 mL 80% (v/v) etanola dva puta u trajanju od po 10 minuta. Nakon dopunjavanja etanolom do 50 mL dobijeni su rastvori

¹Tehnološki fakultet Banja Luka, Stepe Stepanovića 75, Banja Luka, Republika Srpska (z.kukric@gmail.com);

²Prirodno-matematički fakultet Banja Luka, Mladena Stojanovića 2, Banja Luka, Republika Srpska.

koncentracija 30 mg/mL, koji su dalje korišćeni za određivanje ukupnih fenola, flavonola, flavonoida, neutralizaciju 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH) i radikal kationa 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazoline -6-sulfonska kiselina (ABTS⁺). Za određivanje ukupnih i monomernih antocijana uzorci (20g) su ekstrahovani sa 20 mL rastvora za ekstrakciju (85 mL 95%-tnog rastvora etanola i 15 mL 1.5 M rastvora HCL) na temperaturi 0°C u trajanju od 24 sata. Nakon toga, smjesa je filtrirana preko filter papira, a dobijeni filtrat je korišćen za dalju analizu. Za određivanje likopena uzorci (5g) su homogenizovani sa 80 mL heksana i centrifugirani tri puta u trajanju od po 10 minuta na 3000 obrtaja (uz uzastopno odvajanje supernatanta i dodavanje heksana). Dobijeni supernatanti su stavljeni na rotacionom vakuum uparivaču (Devarot) i upareni do suha. Suhi ekstrakti su rastvoreni sa 10 mL smješe heksan:acetan (6:4). Sadržaj suve materije (u %), pepela (u %), ukupne kiselosti (u %), i vitamina C (mg/100 g_{FW}) (FW – svježe mase) određivan je standardnim AOAC (2000) metodama. Ukupni fenoli su određeni modifikovanom metodom Folin-Ciocalteu (Wolfe, 2003). Za izradu baždarene krive korištena je galna kiselina. Rezultati su izraženi kao fenoli ekvivalentni galnoj kiselini (GAE), tj. µg GAE/g_{FW}. Određivanje ukupnih flavonola je vršeno metodom po Kumaran-u i Karunakaran-u (Kumaran, 2007), a određivanje ukupnih flavonoida metodom po Ordon-u (Ordonez, 2006). Za izradu baždarenih kriva je korišten quercetin hidrat. Rezultati su izraženi kao µg Quercetina (Qc)/g_{FW}. Efekat uzorka na DPPH radikal određen je metodom Liyana-Pathiranan i Shahidi (Liyana-Pathiranan, 2005) a za ABTS test korišćena je modifikovana metoda Re i saradnika (Re, 1999). Za izradu baždarenih kriva, i za DPPH i za ABTS test, je korišćen Trolox. Rezultati su predstavljeni TEAC vrijednošću (Trolox ekvivalent antioksidativne aktivnosti), tj. kao µmol Trolox-a/g_{FW}. Sadržaj likopena je određen koristeći metodu Barros i saradnici (Barros, 2010). Sadržaj ukupnih i monomernih antocijana u uzorcima je određen spektrofotometrijski, modifikovanom "singl" pH i pH diferencijalnom metodom koju su razvili Sun i saradnici (Sun, 1998). Eksperimenti su rađeni u 3 paralelna ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Korišćena je analiza varijanse (ANOVA) a najmanja značajna razlika (LSD) pri p<0.05 je izračunata korištenjem programa Origin Pro 8.0. Koeficijent korelacije je određen prema Pearson-u.

Rezultati i diskusija

Određen je sadržaj pepela koji se kretao od 0.33 do 0.44 % i bio je nešto niži u odnosu na literaturne podatke 0.56-0,7 (Shazad 2014) ; 0.5 (Grubačić 2003) ; 0.54-0.74 (Pinela2012). Količina suve materije je bila najniža u uzorku 3 - 4.84% a najviša u uzorku 1 i iznosila je 5.52%. Ove vrijednosti su bile u skladu sa literaturnim; - 5.5 (Grubačić 2003). Ukupna kiselost se kretala u rasponu od 0.25% do 0.5% i veoma je malo odstupala od literaturnih podataka – 0.4% (Grubačić, 2003). Sadržaj fenola u uzorcima se kretao od 88.81 do 138.44 µg (GAE)/g_{FW}. Ovi rezultati su nešto niži od literaturnih gdje je analiziran sadržaj ukupnih fenola, ali za neke druge sorte paradajza. U radu (Bachir 2014) se sadržaj ukupnih fenola kretao u rasponu 200 – 300 µg (GAE)/g_{FW} kod drugih autora (Gougalias 2012) taj se sadržaj kretao od 170-240 µg (GAE)/g_{FW}, a u radu (Vinković 2011) od 287-977 µg (GAE)/g_{FW}. Očito da sadržaj

ukupnih fenola znatno varira zavisno od sorte, načina uzgoja ali i od vrste rastvarača koji se koristio za ekstrakciju i načina ekstrakcije. Sadržaj flavonoida u uzorcima se kretao od 60.175 do 80.86 $\mu\text{g (Qc)/g}_{\text{FW}}$. Određen je sadržaj flavonola kretao se od 94.49 do 243.47 $\mu\text{g (Qc)/g}_{\text{FW}}$. Teško je porediti količine flavonola u uzorcima paradajza jer se u literaturi navode podaci o sadržaju flavonola u različitim jedinicama i obračunate količine prema različitim osnovama. Tako u radu (Pinela2012) nađen je sadržaj flavonola, zavisno od sorte, od 3.06 do 6.36 mg (Qc)/g ekstrakta, s tim da se ne navodi sadržaj ekstrakta u svježim uzorcima.

Tabela 1. Hemijski sastav i antioksidativna aktivnost paradajza
Table 1. Chemical composition and antioxidant activity of the tomato varieties

	Uzorak 1 Sample 1	Uzorak 2 Sample 2	Uzorak 3 Sample 3
Pepeo (%) Ash (%)	0.33±0.02 ^a	0.44±0.01 ^b	0.38±0.05 ^{ab}
Suva materija (%) Dry matter (%)	5.52±0.21 ^a	5.16±0.12 ^{ab}	4.84±0.06 ^b
Ukupna kiselost (%) Total acidity (%)	0.25±0.01 ^a	0.50±0.01 ^b	0.41±0.38 ^c
Fenoli ($\mu\text{gGAE/gFW}$) Phenols ($\mu\text{gGAE/gFW}$)	129.87±12.65 ^a	88.81±1.70 ^b	138.44±13.54 ^a
Flavonoidi ($\mu\text{gQc/gFW}$) Flavonoids ($\mu\text{gQc/gFW}$)	59.25±5.64 ^a	60.18±4.48 ^a	66.95±2.98 ^a
Flavonoli ($\mu\text{gQc/gFW}$) Flavonols ($\mu\text{gQc/gFW}$)	243.47±23.2 ^a	94.49±4.96 ^b	122.69±4.14 ^b
Ukupni antocijani (mg/L) Total anthocyanins (mg/L)	4.34±0.33 ^a	4.56±0.77 ^a	4.45±1.02 ^a
Monomerni antocijani (mg/L) Monomeric anthocyanins (mg/L)	2.34±0.01 ^a	2.12±0.69 ^a	0.33±0.01 ^b
Likopen ($\mu\text{g}/100\text{gFW}$) Lycopene ($\mu\text{g}/100\text{gFW}$)	600,3±19.2 ^a	136.32±6.02 ^b	185.4±4.15 ^c
Vitamin C (mg/100gFW) Vitamin C (mg/100gFW)	15.87±0.17 ^a	13.47±0.25 ^b	12.6±0.20 ^c
DPPH ($\mu\text{mol Trolox/gFW}$)	2.46±0.34 ^a	1.81±0.13 ^b	2.54±0.31 ^a
ABTS ($\mu\text{mol Trolox/gFW}$)	2.23±0.08 ^a	0.19±0.05 ^b	1.05±0.05 ^c

Srednje vrijednosti ± standardna devijacija tri nezavisna mjerenja; različita slova u superskriptu označavaju statistički značajnu razliku uz nivo pouzdanosti od 95%

Sadržaj ukupnih i monomernih antocijana se kretao u rasponu od 4.34 do 4.56 (mg/L), dok je sadržaj monomernih antocijana u rasponu od 0.334 do 2.34 (mg/L). Smatra se da je količina monomernih antocijana odgovorna za antioksidativno djelovanje. Kao i kod sadržaja flavonola i sadržaj antocijana je teško porediti sa literaturnim podacima jer se i u ovom slučaju rezultati izražavaju neujednačeno. Tako autori u radu (Pinela2012) navode sadržaj ,ali samo ukupnih antocijana i to u odnosu na sadržaj ekstrakta, od 0.23 do 3.45 mg malvidin-3-glukozida/g ekstrakta.

Količine likopena u uzorcima sa kretala od 0.136 do 0.6 mg/100g_{FW} ,i bile su nešto niže nego što je već ranije navedeno u literaturi za različite sorte ; 3.9-7.7 mg/100g_{FW} (Bachir 2014), 7.17 mg/100g_{FW} (Shazad 2014), 0.014-14.4 mg/100g_{FW} (Maruyana 2015). Sadržaj vitamina C u uzorcima je bio u rasponu od 12.6 do 15.87 mg/100g_{FW} i bio je u saglasnosti sa ranije određenim vrijednostima vitamina C ; 9.86-16.70 mg/100g_{FW} (Bachir 2014) i 10.86-18.56 mg/100g_{FW} (Pinela 2012), 23 mg/100g (Grubačić 2003). Uzorci paradajza pokazali su antioksidativnu aktivnost prema stabilnim DPPH I ABTS radikalima. Ta aktivnost je za DPPH radikal bila znatnije izražena; kretala se od 1.806 do 2.54 μmolTroloxa/g_{FW} dok su vrijednosti za stabilni ABTS radikal bile znatno manje : od 0.192 do 2.023 μmolTroloxa/g_{FW} .

Antioksidativna aktivnost prema slobodnom DPPH radikal je bila znatno manja nego što je to nađeno za neke Brazilske vrste paradajza koje su se kretale od 0.76 do 10.31 mmolTrolox/g (Maruyana 2015) dok su s druge strane bile nešto veće od vrijednosti za neke Indijske sorte čije su se vrijednosti kretale od 0.17 do 0.24 μmol/g (Kaur 2013).

Vrijednosti za antioksidativnu aktivnost s obzirom na ABTS slobodni radikal su bile neznatno niže nego literaturne koje su nađene za čitav niz različitih varijeteta paradajza koji se kretao u rasponu od 2.53 do 6.26 μmolTrolox/g (Hanson 2004).

Tabela 2. Korelacioni koeficijenti (r) između antioksidativne aktivnosti i hemijskog sastava paradajza.

Table 2. Correlation coefficients (r) between antioxidant activity and chemical composition of the tomato varieties.

	Fenoli Phenols	Flavonoli Flavonols	Flavonoidi Flavonoids	Likopen Lycopene	Vit.C Vit.C	Mon.Ant. Mon.Ant	Uk.Ant. Tot.Ant
DPPH	0.99	0.56	0.49	0.49	0.16	-0.5	-0.8
ABTS	0.75	0.95	-0.15	0.93	0.73	0.137	-0.99

Iz tabele 2 u kojoj su prikazani koeficijenti korelacije može se vidjeti da je antioksidativna aktivnost na DPPH radikal povezana sa sadržajem fenola, flavonola, flavonoida i likopena. Sadržaj vitamina C je, iznenađujuće neznatno povezan sa antioksidativnom aktivnošću dok sadržaj ukupnih i monomernih antocijana ima negativnu korelaciju sa uklanjanjem DPPH radikala. Podaci koje smo dobili ukazuju da je za antioksidativnu aktivnost naših uzoraka s obzirom na stabilni ABTS radikal najzaslužniji sadržaj flavonola i likopena te fenola i vitamina C, dok na ovu antioksidativnu aktivnost ne utiče sadržaj flavonoida, ukupnih i monomernih antocijana. Očito je da doprinos za ove antioksidativne aktivnosti ne možemo pripisati

samo jednom biološki aktivnom jedinjenju, već je ova aktivnost najvjerojatnije, rezultat zajedničkog djelovanja prisutnih biološki aktivnih jedinjenja.

Zaključak

Identična sorta paradajza, gajena na tri lokaliteta, sa približno istim hemijskim sastavom zemljišta, pokazuje različit hemijski sastav, a samim tim i različitu antioksidativnu aktivnost prema DPPH i ABTS slobodnim radikalima. Rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima, ali je, najvjerojatnije, do određenih razlika došlo zbog različitog načina uzgoja ispitivanih uzoraka.

Literatura

- A. Kumaran, R. Joel Karunakaran, "In vitro antioxidant activities of methanol extracts of *Phyllanthus* species from India", *Food Science and Technology*, vol. 40 (2), pp. 344–352, Mar. 2007.
- A.A.L. Ordoñez, J.D. Gomez, M.A. Vattuone, M.I. Isla, "Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swart extracts", *Food Chemistry*, vol. 97 (3), 452–458, 2006.
- Bachir Bey M., Louileche H., Mouhoubi Z., (2014). Antioxidant activity of eight Tomato (*Lycopersicon Esculentum* L.) varieties grown in Algeria. *Journal of Food Technology Research* 1(3), 133-145.
- Barros, L., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. 2010. Leaves, Flowers, Immature fruits and Leafy flowered stems of *Malva sylvestris*: A comparative study of the nutraceutical potential and composition. *Food Chem. Toxicol.* 48, 1466-1472.
- C.M. Liyana-Pathirana, F. Shahidi F, "Antioxidant Activity of Commercial Soft and Hard Wheat (*Triticum aestivum* L.) as Affected by Gastric pH Conditions", *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 53 (7), pp. 2433-2440, Mar. 2005.
- Gougoulis N., Papachatzis A., Kalorizou H., Vagelas I., Giurgiulescu L., Chouliaras N., (2012). Total Phenolics, Lycopene and Antioxidant activity of Hydroponically cultured Tomato Sandin F1. *Carpathian Journal of Food Science and Technology* 4(2), 46-51.
- Grubačić M., Vasiljšin L., 2003. Praktikum iz Tehnologije voća i povrća, Tehnološki fakultet, Banja Luka.
- Hanson Peter, Ray-yu-Yang, Jane Wu, Jen-tzu-Chen, Dolores Ledsman, Samson Tsu.: Variation for Antioxidant Activity and Antioxidants in Tomato, *J. Amer. Soc. Hor. Sci.*, 125(5) 704-711, 2004
- J.S. Sun, Y.H. Tsuang, I.J. Chen, W.C. Huang, Y.S. Hang, F.J. Lu, "An ultra-weak chemiluminescence study on oxidative stress in rabbits following acute thermal injury", *Burns*, vol. 24 (3), pp. 225–231, May 1998.
- K. Wolfe, X. Wu, R.H. Liu, "Antioxidant Activity of Apple Peels", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51 (3), pp. 609-614, Jan. 2003.
- Kaur, C.; Walia, S.; Nagal, S.; Walia, S.; Singh, J.; Singh, B. B.; Saha, S.; Singh, B.; Kalia, P.; Jaggi, S. Functional quality and antioxidant composition of selected

- tomato (*Solanum lycopersicon L*) cultivars grown in Northern India. *Food Science and Technology* 2013, 50, 139.
- Maruyama S.A., Claus T., Montanher O., Bonafe E. G., De o Santos O., De Souza N.E., Visentainer J.V., Teresinha M. Gomez S., Matsushita M., (2015). Evaluation of Lipophilic Antioxidant Capacity and Lycopene Content in Brazilian Tomatoes. *Revista Virtual de Quimica* 7, 1163-1173.
- Pinela J, Barros L, Carvalho AM, Ferreira ICFR. Nutritional composition and antioxidant activity of four tomato (*Lycopersicon esculentum L.*) farmer varieties in Northeastern Portugal homegardens. *Food Chem Toxicol.* 2012; 50: 829-834.
- R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 26 (9–10), pp. 1231–1237, May 1999.
- Shahzad T., Ijaz A., Shahnaz C., K Saeed M., N Khan M., (2014). DPPH free radical scavenging activity of tomato, cherry tomato and watermelon: Lycopene extraction, purification and quantification. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6, 223-228.
- Vinkovic Vreck ., Samobor V., Bojic M., Medic- Saric M., Vukobratovic M., Erhatic R., Horvat D., Matotan Z., (2011). The effect of grafting on the antioxidant properties of tomato (*Solanum lycopersicum L.*) *Spanish Journal of Agricultural Research* 9(3), 844-851.

NON-ENZYMATIC ANTIOXIDANT STATUS TOMATO VARIETY "VOLOVSKO SRCE" TAKEN FROM LIJEVČE POLJE FIELDS

Zoran Kukrić¹, Ivan Samelak², Tanja Marić², Goran Vučić¹, Nataša Lakić¹,
Ladislav Vasilišić¹

Abstract

The results of determination of non-enzymatic antioxidant capacity tomato variety "volovsko srce" are presented in this paper. Content of total phenols is between 88.81 to 138.44 $\mu\text{gGAE/g}_{\text{FW}}$, total flavonoids from 59.25 to 66.95 $\mu\text{gQc/g}_{\text{FW}}$, and flavonols from 94.49 to 243.47 $\mu\text{gQc/g}_{\text{FW}}$ respectively. The content of lycopene in the samples ranged from 136.32 to 600,3 $\mu\text{g}/100\text{g}_{\text{FW}}$, while we determined and the content of vitamin C, which is 12.6 to 15.87 $\text{mg}/100\text{g}_{\text{FW}}$ for 3 different sample probes. The results of antioxidant activity of ethanolic extract of tomato variety "volovsko srce" obtained using DPPH and ABTS methods as compared to Trolox equivalent antioxidant capacity are: DPPH ranged from 1.81 to 2.54 $\mu\text{mol Trolox/g}_{\text{FW}}$, for ABTS from 0.19 to 2.23 $\mu\text{mol Trolox/g}_{\text{FW}}$. The results are in agreement with literature data, but it is most likely to some differences due to different ways of breeding samples.

Key words: antioxidant capacity, Phenols, Lycopene, DPPH, ABTS