

Antioksidativni efekat ekstrakta semenki crnog i belog grožđa u homogenatu tkiva jetre

*Ispitivana su antioksidativna svojstva etanolnih ekstrakata semenki crnog i belog grožđa. U ekstraktima je određivan ukupan sadržaj polifenola i flavonoida kao značajnih antioksidanasa. Takođe, ispitivano je inhibitorno dejstvo ovih ekstrakata na širenje procesa lipidne peroksidacije indukovano *tert*-butil hidroperoksidom u homogenatu tkiva jetre pacova. Koncentracije polifenola i flavonoida u ekstraktima kao i stepen lipidne peroksidacije određeni su spektrofotometrijski. Pokazano je da između ekstrakata semenki crnog i belog grožđa nema značajne razlike u koncentraciji polifenola, a da je koncentracija flavonoida značajno veća kod belog. Oba nerazblažena ekstrakta su statistički značajno inhibirala lipidnu peroksidaciju. Na osnovu IC₅₀ vrednosti pokazano je da su razblaženi ekstrakti semenki crnog grožđa efikasniji u inhibiciji lipidne peroksidacije u odnosu na ekstrakte semenki belog grožđa. Može se zaključiti da oba etanolna ekstrakta imaju značajna i međusobno lična antioksidantna svojstva koja mogu biti u osnovi njihovih povoljnih uticaja na sprečavanje nastanka nekih bolesti.*

Uvod

Slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli, koji u spoljašnjoj orbitali sadrže jedan ili više nesparenih elektrona. Veoma su reaktivni i osobina im je da izazivaju niz lančanih reakcija u kojima nastaju novi slobodni radikali, koji nastavljaju reakciju i pri tom mogu oštetiti biomakromolekule u ćeliji. Među najznačajnije slobodne radikale spadaju kiseonični

radikali, superoksid anjon (O₂⁻), vodonik peroksid (H₂O₂), hidroksi radikal (OH[•]). Oni najčešće nastaju u respiratornom lancu prilikom transmisije elektrona, koji ponekad nekontrolisano prelaze direktno na kiseonik. To su univalentne oksidacije u respiratornom lancu (Đorđević *et al.* 2000). U uslovima nekontrolisanog stvaranja slobodnih radikala, njihova količina može prevazići antioksidantni kapacitet ćelija i vanćelijskih tečnosti i tada nastaje tzv. oksidativni stres. Pojačano stvaranje slobodnih radikala mogu favorizovati i spoljašnji činioci kao što su npr. jonizujuće zračenje ili metabolizam nekih toksičnih jedinjenja i nekih lekova, a oksidativni stres može pratiti ili biti uzrok niza patoloških stanja u organizmu.

Slobodni radikali reaguju sa nezasićenim masnim kiselinama lipida, aminokiselinama u proteinima ili ostacima baza i šećera nukleotida u nukleinskim kiselinama. Oksidacija ovih biološki važnih makromolekula čini deo patofiziološke osnove nastanka i razvoja brojnih patoloških stanja (Đorđević *et al.* 2000).

Lipidna peroksidacija je najizraženiji negativni efekat delovanja slobodnih radikala. Hidroksilni radikal može oduzeti vodonikov atom sa metilenske grupe nezasićenih masnih kiselina. Dolazi do formiranja alkil radikala i preraspodele elektrona u ugljovodoničnom nizu. U reakciji sa kiseonikom nastaje peroksidni radikal, koji ima dovoljan redoks potencijal da oduzme vodonik iz susedne nezasićene masne kiseline i formira novi slobodni alkil radikal, koji nastavlja lančanu reakciju. Degradiranjem nestabilnih produkata nastaju sekundarni produkti i novi slobodni radikali. Sekundarni produkti lipidne peroksidacije su malondialdehid (MDA), etan i pentan (Gutteridge i Halliwell 2000).

Ana Petronijević (1995), Beograd, Prvoboraca 30G/7, učenica 1. razreda Treće beogradske gimnazije

MENTOR: Goran Tomić, diplomirani biohemičar

U zaštiti od slobodnih radikala učestvuju enzimski i neenzimski antioksidansi. Enzimski antioksidansi su superoksid dismutaza, katalaza i glutatjon peroksidaza, a neenzimski antioksidansi su vitamini C, A, E i glutatjon (Smith *et al.* 2005). Zabeležen je opšti porast istraživanja antioksidanasa radi njihove upotrebe u medicini i industriji hrane. Ishranom koja obuhvata voće, povrće, žitarice i semenke, obezbeđuje se značajan unos antioksidanasa, koje biljke proizvode u velikim količinama (Bora i Sharma 2011).

Semenke grožđa su otpadni produkti u proizvodnji vina i voćnih sokova. One sadrže lipide, proteine, ugljene hidrate i 5–8% polifenola u zavisnosti od vrste. Ekstrakt semenki grožđa (ESG) sadrži velike koncentracije vitamina E, flavonoida, linolne kiseline, i polifenola od kojih su posebno značajni oligomerni proantocijanidini koji deluju kao antioksidansi (Kim *et al.* 2006). Brojni podaci ukazuju na povoljne uticaje fenolnih jedinjenja na zdravlje, uključujući sprečavanje razvoja degenerativnih, kardiovaskularnih oboljenja i nekih tipova karcinoma (Xia *et al.* 2010). Čuven je „Francuski paradoks“: Francuzi uzimaju hranu bogatu zasićenim masnim kiselinama i holesterolom, ali imaju mnogo manju učestalost srčanih bolesti, što se povezuje sa konzumiranjem crnog vina (Renaud i De Lorgeril 1992; Simini 2000). Neka istraživanja su pokazala da crno vino sadrži više antioksidanasa nego belo (Bagchi 2000).

Najveći broj dosadašnjih ispitivanja odnosio se na semenke crnog grožđa, dok o efektima ekstrakta semenki belog grožđa nema dovoljno podataka. U ovom istraživanju ispitivan je ukupni sadržaj polifenola i flavonoida u ekstraktu semenki crnog (ESG-C) i belog (ESG-B) grožđa, kao i njihov efekat na proces lipidne peroksidacije u homogenatu tkiva jetre pacova.

Materijal i metode

Istrživanje je vršeno kroz više faza. U početnoj fazi, pripremljeni su ESG-C i ESG-B, zatim su u njima određene koncentracije polifenola i flavonoida. Ispitivan je efekat ESG na proces lipidne peroksidacije, izazvane terc-butil hidroperoksidom, u homogenatu tkiva jetre pacova. Na posletku, pripremljena su različita razblaženja ekstrakata i ispitivan je njihov uticaj na smanjenje stimulisanih lipidnih peroksida. Sastavljene su krive inhibicije koje predstavljaju povezanost između koncentracija polifenola u ekstraktima i koncentracija lipidnih peroksida. Na osnovu

kriva, izračunate su vrednosti IC₅₀, odnosno vrednosti koncentracije ESG koje inhibiraju 50% lipidne peroksidacije.

Priprema ESG-C i ESG-B. Nabavljeno je komercijalno dostupno grožđe, crno sorte Kardinal i belo sorte Afusali. Semenke crnog i belog grožđa isprane su u vodi i sušene na suncu. Homogenizovane su u avanu sa tučkom i izložene temperaturi od 100°C u toku od 10 minuta. Odmereno je po 0.1 g od obe vrste ovako pripremljenih semenki i dodato po 10 mL 70% etanola. Sadržaj je ostavljen preko noći uz mešanje na magnetnoj mešalici. Nakon mešanja vršeno je centrifugiranje na 2000 rpm u trajanju od 10 minuta. Supernatanti su filtrirani kroz filter papir Whatman 1. Dobijeni ekstrakti su korišćeni za određivanje antioksidativne aktivnosti (Kim *et al.* 2006). Do upotrebe su čuvani zaštićeni od svetlosti.

Određivanje ukupnog sadržaja polifenola. Ukupni sadržaj polifenola određen je metodom po Singleton *et al.* (1999) modifikovanom od strane Dewanto *et al.* (2002). ESG obe vrste razblažen je 20 puta u 70% etanolu. U zapremini od 0.125 mL pomešan je sa 0.5 mL destilovane vode i 125 µL Folin–Ciocalteu reagensa. Posle 6 minuta dodato je 1.25 mL 7% Na₂CO₃. Do ukupne zapremine od 3 mL dodata je destilovana voda. Posle 90 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, u odsustvu svetlosti, apsorbancu supernatanta merena je spektrofotometrijski (CECIL 2021 2000 series, Cambridge, UK) na talasnoj dužini od 760 nm. Standardna kriva pravljen je pomoću serije razblaženja galne kiseline rastvorene u 70% etanolu u koncentracijama 5–100 µg/mL.

Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida. Ukupni sadržaj flavonoida u ESG određen je metodom prema Jia *et al.* (1999). ESG obe vrste razblažen je 20 puta i uzeta je zapremina od 0.25 mL i pomešano je sa 1.25 mL destilovane vode i 0.075 mL 5% NaNO₂. Posle 6 minuta, dodato je 0.15 mL 10% AlCl₃·6H₂O. Nakon 5 minuta dodato je 0.5 mL NaOH koncentracije 1 mol/L. Zatim je dodata voda do ukupne zapremine 2.5 mL i čitana je apsorbancu na 510 nm. Izračunavanje ukupnog saržaja flavonoida vršeno je pomoću standardne krive koja je pravljen upotrebom serije razblaženja kvercetina rastvorenog u 70% etanolu u koncentracijama od 0.5 do 10 µg/mL.

Priprema homogenata tkiva jetre. Reagensi: KCl 0.16 mol/L, fosfatni pufer (PBS) 0.1 mol/L pH=7.4, terc-butil hidroperoksid 33 mmol/L, trihlorsirćetna (TCA) 2.44 mol/L, tiobarbiturna kiselina

(TBA) 55 mmol/L rastvoren u 0.1 mol/L natrijum hidroksidu, (sveže pripremljen rastvor) butilirani hidroksi-toluen (BHT) 10 mmol/L rastvoren u metanolu.

Na analitičkoj vagi odmereno je 2-2.5 g tkiva jetre pacova, soja Wistar, i homogenizovano je u avanu sa 20 mL rastvora KCl, tako da je dobijen 10% homogenat. Razblažen je dva puta i centrifugiran u toku 10 minuta na 2000 rpm. Dobijeni supernatanti su korišćeni kao homogenate za dalju biohemijsku analizu (Simić *et al.* 2008).

Određivanje koncentracije lipidnih peroksida (LPO). Sekundarni proizvod lipidne peroksidacije, malondialdehid (MDA), na povišenoj temperaturi, u kiseloj sredini reaguje sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) pri čemu gradi konjugat crvene boje (u odnosu 1MDA : 2TBA). Ova reakcija široko je primenjena za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije LPO, upravo zbog produkta crvene boje, koji ima pik apsorpcije na 532 nm (Rehncrona *et al.* 1980).

Određivana je nativna količina LPO, tj. reaktanta sa TBA u homogenatu tkiva jetre, pošto je propagacija procesa lipidne peroksidacije sprečena dodavanjem antioksidansa – butiliranog hidroksi-toluena (BHT). Pored toga, određivan je intenzitet indukovane lipidne peroksidacije koja je pokrenuta u uslovima *in vitro* dodavanjem terc-butil hidroperoksida (prooksidans) (Gonzalez Flecha *et al.* 1991) sa ili bez dodavanja BHT, ESG-C i ESG-B. Korišćeni su nerazblaženi ESG.

Određivanje koncentracije LPO u homogenatu tkivu jetra oduhvatalo je određivanje: nativnih LPO, stimulisanih LPO i stimulisanih LPO u prisustvu ESG-C, ESG-B i BHT. U svaku epruvetu dodat je po 1 mL homogenata i 1 mL PBS. U epruvetu za određivanje nativnih LPO dodato je 0.2 mL BHT. U epruvetu za određivanje stimulisanih LPO dodato je 0.2 mL terc-butil hidroperoksida (TBHP), a u epruvete za određivanje stepena redukcije stimulisanih LPO pored TBHP dodato je 0.2 mL ESG-C, ESG-B, odnosno BHT. Slepa proba je sadržavala 1 mL KCl, 1 mL PBS, 0.2 mL TBHP. U uzorke je dodavana po potrebi destilovana voda do ukupne zapremine od 2.4 mL. Svi uzorci i slepa proba inkubirani su na 37°C, u toku 30 minuta. Nakon ovog perioda dodato je po 1 mL TBA i 1 mL TCA, nakon čega je vršena inkubacija na 100°C u toku 10 minuta. Zatim je vršeno centrifugiranje na 3000 rpm u toku 10 minuta.

Apsorbanca supernatanta merena je na 532 nm spektrofotometrijski. Na osnovu nje izračunata je koncentracija LPO u uzorcima, po sledećoj formuli:

$$C_{LPO} = \frac{A_{uzorka}}{\varepsilon} \cdot \frac{tV}{pV} \cdot R \cdot 10$$

gde je A_{uzorka} – apsorbanca uzorka, ε – apsorpcioni koeficijent za MDA-TBA konjugat na 532 nm, iznosi 0.156 mL/nmol × cm; R – razblaženje homogenata; 10 – faktor za preračunavanje na gram tkiva (10% homogenat); tV – ukupna zapremina sadržaja u epruveti; pV – zapremina uzorka.

Svako merenje vršeno je u pentaplikatu.

Analiziran je nerazblaženi ekstrakt, kao i nekoliko serijskih razblaženja početnog ekstrakta radi dobijanja krive inhibicije.

Statistička obrada podataka. Upoređivanje koncentracije polifenola, flavonoida i lipidnih peroksida u pojedinim grupama je vršeno za dva nezavisna uzorka. Kada je verovatnoća nulte hipoteze bila manja od 0.05 razlika je smatrana statistički značajnom.

Rezultati i diskusija

Koncentracije polifenola i flavonoida u semenkama prikazani su u tabeli 1. Rezultati nisu pokazali da između ESG-C i ESG-B postoji bitna razlika u ukupnom sadržaju kako polifenola, tako i flavonoida.

Tabela 1. Koncentracija polifenola i flavonoida u semenkama crnog i belog grožđa kao ekvivalenti galne kiseline odnosno kvercetina.

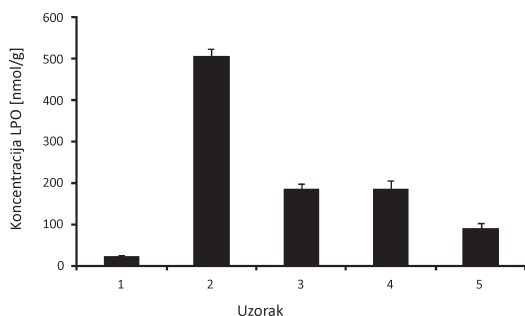
Koncentracija [mg/g]	Ekstrakt semenki	
	belog grožđa	crnog grožđa
Polifenoli	8.50±0.01	8.2±0.3
Flavonoidi	1.68±0.05	1.53±0.04

Druga ispitivanja sadržaja polifenola u ESG dala su različite rezultate u zavisnosti od vrste grožđa i načina pripreme ekstrakta. Revilla *et al.* (2000) su dobili da se u metanolnom ekstraktu, u zavisnosti od vrste grožđa, sadržaj polifenola u ESG-B kreće u rasponu od 1.84 do 4.07 g/kg. Kim i saradnici (2006) ispitivali su uticaj zagrevanja semenki grožđa na oslobađanje polifenola u toku pripreme ESG. Ovi autori su pokazali da se ekstrakt sa najvećim sadržajem fenola dobija pri uslovima primenjenim i u ovom radu. Dobijena ukupna koncentracija polifenola u ekstraktu semenki grožđa iznosila je 0.555 mM od-

nosno 943 µg/mL, što odgovara sadržaju polifenola koji je dobijen u našem istraživanju.

Antioksidantna svojstva nerazblaženih ESG-C i ESG-B odnosno njihov uticaj na inhibiciju lipidne peroksidacije u jetri pacova pokazan je na slici 1.

Uočava se da je u prisustvu ekstrakta semenki crnog i belog grožđa došlo do smanjenja koncentracije lipidnih peroksida u odnosu na koncentraciju stimuliranih lipidnih peroksida. Međutim, međusobna razlika između ekstrakata semenki crnog ili belog grožđa nije izražena.



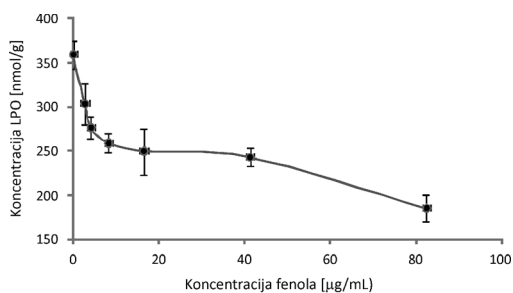
Slika 1. Koncentracija LPO (nmol/g tkiva): 1 – nativnih LPO; 2 – stimuliranih LPO; 3 – redukovanih LPO sa ESG – C; 4 – redukovanih LPO sa ESG – B; 5 – redukovanih LPO sa BHT.

Figure 1. Concentration of LPO (nmol/g of tissue): 1 – native LPO; 2 – stimulated LPO; 3 – LPO reduced with R-GSE; 4 – LPO reduced with W-GSE; 5 – LPO reduced with BHT.

Dobijeni rezultati su u skladu sa *in vivo* ispitivanjem kojim je pokazano da oralna primena ESG bogatog proantocijanidinima utiče na povećanu otpornost plazme na oksidativni stres kod pacova (Koga *et al.*, 1999), kao i sa ispitivanjem Fujishita *et al.* (2009) koji su pokazali da ESG štiti astrocite u kulturi od oksidativnog stresa.

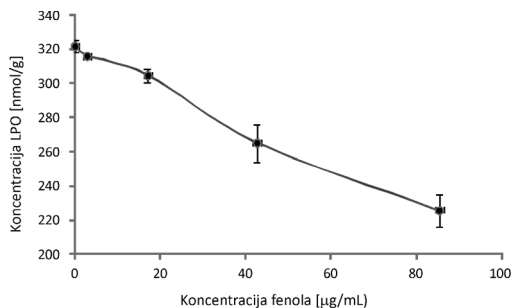
Krive inhibicije, odnosno zavisnost koncentracije LPO od koncentracije polifenola u ekstraktima semenki crnog i belog grožđa date su na slikama 2 i 3. Pri tome su koncentracije polifenola preračunate na osnovu dobijenih koncentracija ekstrakata.

Na osnovu kriva inhibicije izračunat je IC₅₀, odnosno koncentracija pri kojoj se postiže 50% inhibicije LPO (tabela 2).



Slika 2. Kriva inhibicije lipidne proksidacije različitim koncentracijama polifenola u ESG-C

Figure 2. Curve of lipid peroxidation inhibition caused by different polyphenol concentrations in R-GSE



Slika 3. Kriva inhibicije lipidne peroksidacije različitim koncentracijama polifenola u ESG-B

Figure 3. Curve of lipid peroxidation inhibition caused by different polyphenol concentrations in W-GSE

Tabela 2. IC₅₀ vrednosti za ESG-B i ESG-C

Ekstrakt semenki	IC ₅₀
belog grožđa	797
crnog grožđa	566

Dakle, ispitivanje pokazuje da postoji dozna zavisnost u inhibiciji LPO. Nerazblaženi ekstrakti inhibiraju lipidnu peroksidaciju za 63% (vrednost dobijena na osnovu vrednosti 2 i 3, odnosno 4, predstavljenih

na slici 1), što predstavlja maksimalnu inhibiciju lipidne peroksidacije. Zapaža se da je IC₅₀ za semenke crnog grožđa niži, odnosno da se 50% inhibicije postiže u prisustvu niže koncentracije polifenola u ekstraktu semenki crnog grožđa. Ovo može biti posledica prisustva drugih antioksidativnih komponenti u ESG-C koje u ovom radu nisu određivane. Ovi rezultati u skladu su sa literaturnim podacima da je crno grožđe efikasnije u zaštiti od štetnih dejstava slobodnih radikala (Bagchi *et al.* 2000).

Zaključak

Ovo istraživanje pokazuje da se koncentracije flavonoida, kao i polifenola, u ekstraktima semenki crnog i belog grožđa međusobno bitno ne razlikuju. Takođe, nerazblaženi ekstrakti semenki crnog i belog grožđa u podjednako meri inhibiraju lipidnu peroksidaciju u homogenatu tkiva jetre, indukovanu terc-butil hidroperoksidom. Međutim, IC₅₀ za ESG-C je značajno manji od IC₅₀ ESG-B, što ukazuje na veću efikasnost razblaženih ESG-C u inhibiciji procesa lipidne peroksidacije. Sa ciljem da se nastavi proučavanje antioksidativnog efekta ESG, trebalo bi sprovesti istraživanja koja bi ispitala uticaj ESG na zaštitu proteina i DNK od oksidativnog oštećenja, kao i uticaj na enzime antioksidativne zaštite. Značajan doprinos dalo bi ispitivanje zaštitne uloge ESG u uslovima *in vivo*.

Literatura

Bagchi D., Bagchi M., Stohs S. J., Das D. K., Ray S. D., Kuszynski C. A., Joshi S. S. Pruess H. G., 2000. Free Radicals and Grape Seed Proanthocyanidin Extract: Importance in Human Health and Disease Prevention. *Toxicology*, **148**: 187.

Bora K. S., Sharma A. 2011. Evaluation of antioxidant and free-radical scavenging potential of *Artemisia absinthium*. *Pharm Biol.*, (u štampi).

Dewanto V., Wu, X., Adom K. K., Liu R. H. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 3010.

Đorđević V., Pavlović D., Kocić G. 2000. *Biohemija slobodnih radikala*. Niš: Medicinski fakultet

Fujishita K., Ozawa T., Shibata K., Tanabe S., Sato Y., Hisamoto M., Okuda T., Koizumi S.

2009. Grape seed extract acting on astrocytes reveals neuronal protection against oxidative stress via interleukin-6-mediated mechanisms. *Cell Mol Neurobiol.* **29**: 1121.

Gonzalez Flecha B., Llesuy S., Boveris A. 1991. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med*, **10**: 93.

Gutfinger, T. 1981. Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* **58**: 966.

Gutteridge J. M., Halliwell B. 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.* **899**: 136.

Jia Z., Tang M., Wu J. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **64**: 555.

Kim S. Y., Jeong S. M., Park W. P., Nam K. C., Ahn D. U., Lee S. C. 2006. Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grape seed extracts. *Food Chemistry.* **97**: 472.

Koga T., Moro K., Nakamori K., Yamakoshi J., Hosoyama H., Kataoka S., Ariga T. 1999. Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *J Agric Food Chem.* **47**: 1892.

Meyers K. J., Watkins C. B., Pritts M. P., Liu R. H. 2003. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *J Agric Food Chem.* **51**: 6887.

Rehncrona S., Smith D. S., Akesson B., Westerberg E., Siesjö B. K. 1980. Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe²⁺ - and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation in vitro. *J Neurochem.* **34**: 1630.

Renaud S., de Lorgeril M. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* **339**: 1523.

Revilla E., Ryan J. M. 2000. Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation. *J Chromatogr A.* **881**: 461.

Simini B. 2000. „Serge Renaud: from French paradox to Cretan miracle“. *The Lancet*, **55**: 48.

Simić T., Petronijević N., Ivanka M. i Isaković A. 2008. *Priručnik za praktične vežbe iz biohemije*. (urednik B. Đuričić) Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **299**: 152.

Smith C. M., Marks A. D., Lieberman M. A., Marks D. B. 2005. *Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins

Xia E. Q., Deng G. F., Guo Y. J., Li H. B. 2010. Biological activities of polyphenols from grapes. *Int. J. Mol. Sci.* **11**: 622.

Ana Petronijević

Antioxidant Effect of Red and White Grape Seed Extract in Rat Liver Homogenate

Free radicals are ions, atoms or molecules with unpaired electrons which cause them to be highly chemically reactive. An imbalance in production of free radicals causes oxidative stress, which is involved in many diseases. Antioxidants are effective in prevention of free radical production and their damaging influence on macromolecules in the cell. Beside enzymatic and non-enzymatic antioxidants in the cell, antioxidants ingested by food very important.

In this work antioxidative properties of red and white grape seed ethanolic extracts (R-GSE and W-GSE) were investigated. It is known that polyphenols, flavonoids, proanthocyanidins, vitamin E and others are antioxidants found in grape seeds. In R-GSE and W-GSE total content of important antioxidants polyphenols and flavonoids was measured. Also, inhibitory effects of R-GSE and W-GSE on the propagation of lipid peroxidation induced by tert-butyl hydroperoxide, in rat liver homogenate, were investigated. Concentrations of polyphenols and flavonoids, as well as the level of lipid peroxides were determined spectrophotometrically.

It was shown that there is no difference in the concentration of polyphenols or flavonoids between two extracts. Both concentrated extracts had significant inhibitory effect on the process of lipid peroxidation. It was proven that there is a correlation between the concentration of polyphenols and the concentration of lipid peroxides. By calculation of IC50 it was shown that R-GSE were more efficient in inhibition of lipid peroxidation and that a lower concentration of polyphenols in R-GSE reduces 50% of total concentration of lipid peroxides compared to W-GSE.

It can be concluded that ethanolic R-GSE and W-GSE have important and similar antioxidative properties that could be the basis for their favorable influences in prevention of some diseases. There is a need for further investigation of significance and mechanism of GSE protective effects. 