

UNIVERZITET U BEOGRADU  
HEMIJSKI FAKULTET

Snežana Brašanac

**ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE MOĆI I  
KAPACITETA USVAJANJA METALA DIVLJE  
BOROVNICE (*VACCINIUM MYRTILLUS* L.,  
ERICACEAE) NA PODRUČJU CRNE GORE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF CHEMISTRY

Snežana Brašanac

**DETERMINATION ANTIOXIDANT ACTIVITY  
AND METAL ACCUMULATION CAPACITY  
OF WILD BILBERRY (*VACCINIUM  
MYRTILLUS* L., ERICACEAE) FROM  
MONTENEGRO**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022.

Članovi komisije:

---

Dr Jelena Mutić, mentor  
vanredni profesor, Hemijski fakultet,  
Univerzitet u Beogradu

---

Dr Vanja Tadić, mentor  
naučni savjetnik, Institut za proučavanje ljekovitog bilja „Dr Josif Pančić “

---

Dr Dragan Manojlović, član komisije  
redovni profesor, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

Dr Dalibor Stanković, član komisije  
docent, Hemijski fakultet Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

---

*Veliku zahvalnost dugujem svojim mentorima prof. dr Jeleni Mutić i naučnom savjetniku dr Vanji Tadić na ukazanom povjerenju, bezrezervnoj ličnoj i profesionalnoj podršci i velikoj pomoći tokom svih faza izrade teze. Korisni savjeti i velika podrška omogućili su da rad na tezi bude znatno lakši i doprinijeli su da naš odnos preraste u iskreno prijateljstvo.*

*Veliku zahvalnost dugujem doc. dr Daliboru Stankoviću, dr Vesni Vukojević i dr Slađani Đurđić na pomoći tokom izrade eksperimentalnog dijela rada.*

*Mojim dragim profesoricama sa Metalurško-tehnološkog fakulteta u Podgorici prof. dr Nadi Blagojević i prof. dr Vesni Vukašinović-Pešić veliko hvala na prijateljskoj podršci, nesebičnoj pomoći i uvijek korisnim stručnim savjetima.*

*Ovaj rad posvećujem svojoj porodici...*

*Dušanu Velikom, Maminom dječaku,  
Teoni Čarobnici, Maminoj djevojčici,  
Svojim roditeljima Radenku i Duški,  
Sestrama Danijeli i Stojani,  
Bratiću Danilu, Sestriću Vukaču,  
I mom Marku*



*Mom dedi  
Novaku-Nolu Brašancu,  
jer je uvijek vjerovao..*



## **Određivanje antioksidativne moći i kapaciteta usvajanja metala divlje borovnice (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) na području Crne Gore**

Predmet našeg istraživanja bila je borovnica (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae), biljka koje u Crnoj Gori ima u obilju, i tradicionalno se koristi u ishrani ljudi ali i za pripremu ekstrakata i tinktura u tretmanu dijabetesa.

S obzirom da borovnica sadrži različite koncentracije makroelemenata i mikroelemenata, koji su važni kao esencijalni elementi u tragovima, ili su potencijalno toksični, zavisno od koncentracije, posebna pažnja je usmjerena na sadržaj 16 elemenata, uključujući makroelemenata (Al, Ca, Fe, K i Mg) i mikroelemente (As, Ba, Cd, Co, Cu, Cr, Mn, Ni, Pb, Sr i Zn) u korijenu, stablu, listu i plodu divlje borovnice i zemljišnim supstratima kako bi se procijenila biodostupnost i migracija elemenata iz zemljišnih supstrata u korijen i određene nadzemne dijelove biljke.

Što se tiče toksičnih metala As nije detektovan u borovnici. Borovnica je pokazala i vrlo mali stepen akumulacije Pb u svim dijelovima biljke što je od izuzetne važnosti, s obzirom da je BCR sekvencijalna ekstrakcija potvrdila izuzetnu mobilnost a samim tim i biodostupnost Pb na ispitivanom zemljišnom supstratu. U slučaju Cd nešto veći biokoncentracioni faktor se javlja kod korijena biljke, mada je njegova vrijednost bila ispod jedinice. Ipak, vrijednost translacionog faktora ukazuje, što je takođe vrlo važno, da se ovaj toksični mikroelement u značajnijoj mjeri transportuje do stabla nego plodova i listova borovnice. Dobijeni translokacioni podaci vezani za ispitivane toksične metale, pored biokoncentracionih vrijednosti pokazali su da se plod i listovi borovnice mogu bezbjedno primjenjivati kako u ishrani stanovništva tako i u tradicionalnoj medicini.

Visoka bioakumulaciona vrijednost u plodu borovnice zabilježena je samo za K. Ono što je interesantno je da ovaj makroelement jedini i pokazuje značajan stepen translokacije prema plodu borovnice. Sa druge strane, Ca, Mg, K, Fe, Al, Sr, Ba, Mn, Cu i Zn se u vrlo značajnoj mjeri transportuju od korijena do listova, dok su Ca, Mg, K, Sr, Ba, Mn i Zn takođe pokazali veliku sposobnost akumuliranja u listu borovnice.

Dnevni doprinos Cr, Mn i Cu iz jedne porcije ispitivanih borovnica je vrlo značajan, s obzirom na preporučene vrijednosti dnevne potrebe esencijalnih elemenata, prema direktivi Evropske unije. S druge strane, konzumiranjem 100 g ispitivane borovnice unijeti toksični metali čini samo mali procenat od maksimalno prihvatljivog na dnevnom nivou, što nam ukazuje da borovnica ne predstavlja toksikološki rizik po zdravlje konzumatora.

Osnovni cilj ove teze bilo je i ispitivanje korelacije između hemijskog sastava i antioksidativne moći ekstrakata divlje borovnice (lista i ploda) dobijenih različitim ekstrakcionim postupcima: Soxhlet ekstrakcijom, postupkom maceracije i ekstrakcijom vrelom vodom. Iako su hemijski profil i antioksidativni kapacitet borovnice prilično ispitani, ovo je prvo istraživanja o njihovoj korelaciji u različitim ekstraktima lista i ploda borovnice.

Uzimajući u obzir da se biljni vodeni infuzi najčešće koriste za pripremu tradicionalnih fitopreparata, ali uzimajući u obzir i činjenicu da industrijska proizvodnja obično koristi etanol kao rastvarač, koristili smo različite metode ekstrakcije i rastvarače različitih polarnosti za nalaženje pogodnih uslova za dobijanje ekstrakata bogatih polifenolima.

Ovo istraživanje je potvrdilo da su ispitivani ekstrakti lista i ploda borovnice izuzetno bogati fenolnim jedinjenjima i da posjeduju visoku antioksidativnu aktivnost mjerenu dvjema spektrofotometrijskim metodama čiji rezultati su potvrđeni takođe i cikličnom voltametrijom. Naši ekstrakti pokazali su visok stepen korelacije između sadržaja fenola, tanina, flavonoida, antocijana, procijanidina, makroelemenata i mikroelemenata i njihove antioksidativne aktivnosti.

U ovom istraživanju, potvrđen je i veliki uticaj primjenjenog postupka ekstrakcije na sadržaj fenolnih jedinjenja u ispitivanim ekstraktima. HPLC analizom u ispitivanim ekstraktima lista i ploda borovnice identifikovano je osamnaest fenolnih jedinjenja, u različitim količinama, koji su u literaturi prepoznati kao nosioci antidijabetskog potencijala. Najzastupljenija fenolna kiselina u ekstraktima bila je hlorogenska kiselina, praćena protokatehinskom kiselinom, dok su u značajnim količinama u ispitivanim ekstraktima zastupljeni i resveratrol, izokvercetin, kvercetin, hiperozid. Prema

literaturnim podacima, fenolna jedinjenja mogu podjednako stimulisati preuzimanje glukoze iz krvi kao metformin i tiazolidindion, koji su osnovni sastojci hipoglikemijskih lekova za oralnu upotrebu. Dodatno, oni mogu inhibirati aktivnosti enzima  $\alpha$ -amilazei  $\alpha$ -glukozidaze, zbog čega se usporava resorpcija glukoze iz intestinalnog trakta i sprječava nastanak postprandijalne hiperglikemije. Na ćelijama masnog tkiva, ova jedinjenja ispoljavaju djelovanje slično insulinu, tj. povećavaju preuzimanje glukoze iz krvi u adipocite. Na taj način preparati borovnice mogu pokazati sličnost u mehanizmu antihiperglikemijskog efekta kao i derivati bigvanida i tiazolidindiona. Ovi rezultati doprinose objašnjenju tradicionalne upotrebe borovnice kao biljke koja ima antidiabetско dejstvo.

**Ključne riječi:** *Vaccinium myrtillus*, makroelementi i mikroelementi, zemljišni supstrat, sekvencijalna ekstrakcija, nutritivna vrijednost, zdravstveni rizik, antioksidativna aktivnost, fenolna jedinjenja, ciklična voltometrija, analiza glavnih komponenata

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Analitička hemija

UDK broj:

## **Determination antioxidant activity and metal accumulation capacity of wild bilberry (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) from Montenegro**

The subject of our research was investigation of different extracts of bilberry, (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae), a plant widespread in Montenegro, traditionally used in the treatment of diabetes, but also recognised as valuable nutraceutical.

As bilberry is a source of macroelements and microelements in different concentrations, one of the aims of this investigation was to determine the concentrations of 16 elements including macro (Al, Ca, Fe, K and Mg) and microelements (As, Ba, Cd, Co, Cu, Cr, Mn, Ni, Pb, Sr and Zn) in roots, stems, leaves and fruits of wild bilberry and corresponding soil sample in order to investigate element mobility and availability in soil and the manner of translocation of elements taken up from the soil to the roots and the above-ground parts of the plant. Depending on the concentration, the above-mentioned elements might be present in traces, representing the essential metals necessary for regular metabolic process, but being present in greater quantities they can be potentially toxic.

Regarding toxic metals, As was not detected in bilberry. Pb had also low bio-concentration factor in all the parts of bilberry, which is extremely important, because the obtained results of applied BCR sequential extraction procedure revealed that Pb could be considered as the most easily mobilized metal in investigated soil samples. In the case of Cd, a slightly higher bioconcentration factor occurs at the roots of the plant, although its value was below one. However, the value of the translocation factor indicates, which is also very important, that this toxic microelement is translocated to the stems mostly but not to leaves or fruits. The obtained translocation data related to the researched toxic metals, in addition to bio-concentration values, shows that the fruits and leaves of bilberry may safely be used in both human nutrition and traditional medicine.

The high bioconcentration value in the fruits was only found for K. Interestingly, this is the only element that has showed a significant level of translocation to the fruits. On the other hand, Ca, Mg, K, Fe, Al, Sr, Ba, Mn, Cu and Zn were mostly translocated from roots to leaves, while Ca, Mg, K, Sr, Ba, Mn and Zn also exhibited a high capability to be accumulated in leaves.

The daily contribution of Cr, Mn and Cu from one portion of the examined bilberry was very significant, considering the recommended daily allowance values of these essential elements, in accordance to the Directive of European Union. On the other hand, by consuming 100 g of tested bilberry, the intake of toxic elements was only a small percentage of the maximum tolerable daily intake, which indicates that bilberry possessed no toxicological risk to the consumer's health.

Taking into account the abovementioned, the additional aim of this study was to investigate the correlation between chemical profile and antioxidant activity of wild bilberry extracts (leaves and fruits), obtained by different extraction procedures, namely Soxhlet extraction, maceration and infusion. Although bilberry have been described elsewhere in terms of their chemical profile and/or their antioxidant capacities, this the first research focusing on their correlation in different types of bilberry leaves and fruits extracts.

Although the water herbal infusions are most often used for preparation of traditional phytopreparations, the industrial scale production usually employs ethanol as a solvent, different extraction methods and solvents with different polarity were used to establish the suitable conditions for obtaining the extracts rich in polyphenolic composition.

Our results revealed that all investigated bilberry leaves and fruits extracts were rich in phenolic compounds and demonstrated good antioxidant activity measured by using two spectrophotometric methods, the results verified with the cyclic voltammetry tests, as well. Our extracts showed a high degree of correlation between phenols, tannins, flavonoids, anthocyanins, procyanidins, macro and microelements content and their antioxidant activity.

This research also enabled to determine the effect of applied extraction procedure on the phenolic content in examined extracts. Using a HPLC method, we confirmed the presence of eighteen individual phenolic compounds in different amounts in the leaves and fruits extracts, known from the up to date literature data to possess antidiabetic potential. The most abundant phenolic acid was



chlorogenic acid, followed by protocatechuic acid, while resveratrol, isoquercetin, quercetin and hyperoside were present in significant quantities in investigated extracts. According to the literature data, phenolic compounds might stimulate glucose uptake by comparable performance to metformin and thiazolidinedione, main common oral hypoglycemic drugs. In addition, they might inhibit  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase activities, which decreases the rate of glucose resorption from the intestinal tract and prevents development of postprandial hyperglycemia. The effect of these compounds on the fat cells is similar to the insulin effect, meaning they increase adipocytes glucose uptake. In this manner, bilberry preparations may show similarities in the mechanism of anti-hyperglycemic effect to the derivate of biguanide and thiazolidinedione. The presence of identified phenolic compounds might contribute the evaluation of the traditionally established use of bilberry as a plant with antidiabetic effects.

**Keywords:** *Vaccinium myrtillus*, macroelements and microelements, soil substrate, sequential extraction, nutrition value, health risk, antioxidant activity, phenolic compounds, cyclic voltammetry, principal component analysis

Scientific field: Chemistry  
Scientific subfield: Analytical Chemistry  
UDC number:

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OPŠTI DIO .....	3
2.1. Sastav zemljišta .....	3
2.2. Makroelementi i mikroelementi u zemljištu i njihovo određivanje .....	4
2.3. Uticaj makroelemenata i mikroelemenata na biljke .....	7
2.4. Anatomske i fiziološke promjene biljaka i mehanizmi tolerantnosti .....	7
2.5. Diabetes mellitus .....	8
2.6. Slobodni radikali i oksidativni stres .....	9
2.7. Uloga oksidativnog stresa u razvoju komplikacija u dijabetesu .....	10
2.8. Antioksidansi .....	11
2.9. Borovnica ( <i>Vaccinium myrtillus</i> L., Ericaceae) .....	12
2.10. Sekundarni metabolizam i biosinteza fenolnih jedinjenja .....	13
2.11. Fenolna jedinjenja .....	15
2.11.1. Fenolne kiseline .....	15
2.11.2. Flavonoidi .....	18
2.12. Ekstrakcija fenolnih jedinjenja .....	22
2.13. Analitičke metode za ispitivanje hemijskog sastava ekstrakata borovnice .....	22
2.13.1. Metode mjerenja antioksidativne aktivnosti .....	22
2.13.1.1. Spektrofotometrijske metode .....	22
2.13.1.2. Elektrohemijske metode .....	24
2.13.2. Hromatografske metode .....	25
2.13.2.1. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) .....	25
2.13.3. Određivanje sadržaja metala .....	26
2.13.3.1. Indukovano spregnuta plazma–optička emisiona spektroskopija .....	26
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	28
3.1. Uzorkovanje borovnice i zemljišta .....	28
3.2. Reagensi i rastvori .....	28
3.3. Priprema uzoraka zemljišta za određivanje sadržaja makroelemenata i mikroelemenata .....	29
3.4. Priprema uzoraka borovnice za određivanje sadržaja makroelemenata i mikroelemenata .....	30
3.5. Određivanje biokoncentracionog i translokacionog faktora .....	30
3.6. Određivanje nutritivne vrijednosti borovnice .....	31
3.7. Metode ekstrakcije .....	31
3.7.1. Priprema vodenih ekstrakata borovnice za određivanje sadržaja makroelemenata i mikroelemenata .....	31
3.7.2. Priprema etanolnih ekstrakata borovnice za određivanje sadržaja makroelemenata i mikroelemenata .....	32
3.7.2.1. Određivanje ekstrakcionog koeficijenta .....	32
3.7.3. Maceracija .....	32
3.7.4. Soxhlet ekstrakcija .....	32
3.7.5. Ekstrakcija vrelom vodom (dobijanje infuza) .....	33

3.8. Priprema ekstrakata dobijenih Soxhlet ekstrakcijom, maceracijom i ekstrakcijom vrelom vodom za određivanje makroelemenata i mikroelemenata .....	33
3.9. Hemijska analiza ekstrakata dobijenih Soxhlet ekstrakcijom, maceracijom i ekstrakcijom vrelom vodom .....	33
3.9.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola.....	33
3.9.2. Određivanje sadržaja flavonoida .....	34
3.9.3. Određivanje sadržaja tanina .....	34
3.9.4. Određivanje sadržaja procijanidina .....	34
3.9.5. Određivanje sadržaja antocijana .....	35
3.9.6. HPLC metoda .....	35
3.9.7. Određivanje antioksidativnih svojstava ekstrakata dobijenih Soxhlet ekstrakcijom, maceracijom i ekstrakcijom vrelom vodom.....	35
3.9.7.1. Određivanje sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala-DPPH test .....	35
3.9.7.2. Određivanje sposobnosti redukcije feri jona-FRAP test .....	36
3.9.7.3. Ciklična voltametrija .....	36
3.10. Instrumentacija .....	36
3.11. Statistička analiza .....	37
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA .....</b>	<b>38</b>
4.1. Rezultati određivanja makroelemenata i mikroelemenata u zemljišnom supstratu .....	38
4.2. Biokoncentracioni i translokacioni faktori .....	44
4.3. Sadržaj makroelemenata i mikroelemenata u borovnici.....	46
4.4. Sadržaj makroelemenata i mikroelemenata u vodenim i etanolnim ekstraktima borovnice .	51
4.5. Prinos ekstrakcije, sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, tanina, procijanidina i antocijana u ekstraktima borovnice dobijenim Soxhlet ekstrakcijom, maceracijom i ekstrakcijom vrelom vodom.....	55
4.6. Identifikacija fenolnih jedinjenja HPLC metodom u ekstraktima borovnice dobijenim Soxhlet ekstrakcijom, maceracijom i ekstrakcijom vrelom vodom .....	58
4.7. Sadržaj makroelemenata i mikroelemenata u ekstraktima ekstraktima borovnice dobijenim Soxhlet ekstrakcijom, maceracijom i ekstrakcijom vodom na povišenoj temperaturi.....	68
4.8. Antioksidativna aktivnost ispitivanih ekstrakata borovnice .....	72
4.9. Korelacija sadržaja polifenola, makroelemenata i mikroelemenata i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim ekstraktima lista i ploda borovnice .....	75
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>80</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>81</b>

## 1. UVOD

Slobodni radikali, predmet interesovanja u mnogim naučno-istraživačkim studijama, predstavljaju medijatore brojnih oboljenja komplikovane etiologije (dijabetesa, HIV infekcija, autoimunih, neurodegenerativnih, koronarnih, malignih, plućnih, inflamatornih i mnogih drugih bolesti), predstavljajući dio kompleksnog patofiziološkog mehanizma oštećenja [1–3]. Organizam se protiv slobodnih radikala, osim sopstvenim odbrambenim mehanizmom, brani i prirodnim antioksidansima koji se u organizam mogu unijeti hranom. Prirodni antioksidansi imaju sposobnost da neutrališu slobodne radikale koji se smatraju odgovornim i za razvoj degenerativnih bolesti.

Kako su kroz istoriju biljke upotrebljavane kao lijekovi, u cilju identifikacije nosilaca biološke aktivnosti biljaka kao i njihove kvantifikacije, brojna istraživanja su usmjerena na primjenu raznovrsnih tehnika izolacije, kvalitativne i kvantitativne analize. Blagotvorno dejstvo ljekovitih biljaka na zdravlje pripisano je visokom sadržaju raznovrsnih sekundarnih metabolita, od kojih su najzastupljenija fenolna jedinjenja [4–7]. Fenolna jedinjenja imaju izraženu antioksidativnu i antiradikalnu aktivnost, i zbog toga im se pripisuju mnoga terapijska djelovanja: antibakterijsko, antiinflamatorno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno, te stoga, veliki broj i savremenih lijekova potiče od prirodnih proizvoda, ili je nastao polusintezom jedinjenja izolovanih iz biljaka. Istraživanja su naročito fokusirana na biljke koje se tradicionalno koriste u narodnoj medicini podneblja u kojem rastu.

Uporedo sa konstituentima koji su nosioci ljekovitih svojstava, biljke sadrže i određene količine metala. Čovjekov organizam zahtjeva unošenje mikroelemenata i makroelemenata u određenim količinama koje su neophodne za razvoj i dobro zdravlje [8,9]. Međutim, biljke tokom gajenja i obrade mogu biti lako zagađene toksičnim metalima. S obzirom na mogućnost akumulacije metala u biljkama, veoma je važno ustanoviti sadržaj metala u biljnom materijalu koji se koristi u medicinske, prehrambene i kozmetičke svrhe.

Detaljnim pregledom literature, utvrđeno je da ima malo podataka o sistematskom fitohemijskom ispitivanju samoniklih biljaka sa područja Crne Gore. Predmet našeg istraživanja bila je borovnica, *Vaccinium myrtillus L.*, Ericaceae, plod i list, biljka koje u Crnoj Gori ima u obilju, i tradicionalno se koristi u ishrani ljudi ali i za pripremu čajeva i tinktura u tretmanu dijabetesa [10–12]. Cilj je bio definisanje uslova koji se mogu iskoristiti za dobijanje novih preparata sa optimalnim sadržajem fenolnih i mineralnih konstituenata, prepoznatih kao sastojci preparata koji se mogu primijeniti kao dopunska terapija za olakšavanje problema koje prate dijabetes, namijenjenih *per os* i topikalnoj bezbjednoj primjeni.

Odabrana indikaciona oblast - dijabetes - pogađa veliki dio populacije, bilo da je riječ o stanovništvu razvijenog, ili ostalog dijela svijeta [2]. Procjenjuje se da je kod oko 25% svjetskog stanovništva konstatovano ovo oboljenje. *Diabetes mellitus* je uslovljen poremećajem metabolizma ugljenih hidrata, što se odražava na nizak nivo insulina u krvi, odnosno na pojavu neosjetljivosti određenih organa na insulin, što predstavlja patološko stanje.

Iako postoji stalan progres u liječenju ovog oboljenja, i dalje postoji potreba za formulacijom novih, efikasnijih lijekova, koji neće imati neželjene prateće efekte. Zato je ljekovito bilje izazov i na ovom polju.

Ovo istraživanje obuhvatilo je pripremu različitih etanolnih i vodenih ekstrakata lista i ploda borovnice i njihovu detaljnu hemijsku karakterizaciju. U cilju uspostavljanja koralacije antioksidativne aktivnosti ekstrakata i hemijskog sastava, određen je sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, tanina, procijanidina, antocijana. Kvantifikacija najzastupljenijih fenolnih jedinjenja omogućila je identifikaciju dijela biljke i tehnološkog procesa ekstrakcije kojim se dobijaju ekstrakti sa optimalnim sadržajem komponenti koje se literaturno navode kao nosioci antidijabetske aktivnosti. Posebna pažnja je usmjerena na sadržaj makroelemenata i mikroelemenata u biljci (korijenu, stablu, listu i plodu) i zemljišnim supstratima, kako bi se procijenila bioakumulaciona sposobnost borovnice

i mehanizam usvajanja određenih elemenata. Pored toga, ispitana je biodostupnost i migracija elemenata iz zemljišnih supstrata u određene nadzemne dijelove biljke. Nakon određivanja sadržaja elemenata u borovnici, koja je vrlo zastupljena u ishrani lokalnog stanovništva, izveden je zaključak o njenoj nutritivnoj vrijednosti i doprinosu dnevnom unosu esencijalnih elemenata. S druge strane, izveden je zaključak o unosu toksičnih elemenata i na osnovu toga procijenjen rizik po zdravlje konzumenata.

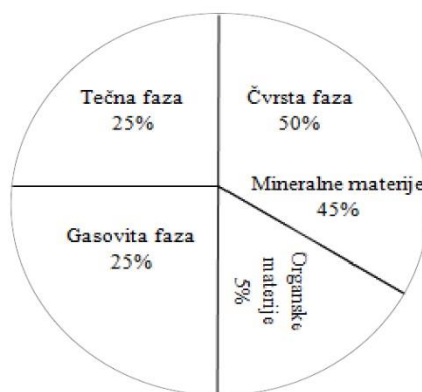
Kao osnovni cilj ove teze navedena je korelacija između hemijskog sastava i antioksidativne moći divlje borovnice (lista i ploda) i njenih ekstrakata dobijenih različitim ekstrakcionim postupcima. Iako su hemijski profil i antioksidativni kapacitet borovnice prilično ispitani, nema istraživanja o njihovoj korelaciji u različitim ekstraktima borovnice. Pri izboru pogodnog rastvarača za ekstrakciju uzeto je u obzir nekoliko faktora. Naime, nekovalentne interakcije, brzina kretanja molekula i ubrzanje protoka rastvarača na višoj temperaturi, može povećati sadržaj ekstrahovanih fenolnih jedinjenja [13]. S druge strane, visoka temperatura ključanja upotrebljenog rastvarača i smanjenje gustine fluida na višoj temperaturi može smanjiti efikasnost ekstrakcije fenolnih jedinjenja. Uzimajući u obzir da se biljni vodeni infuzi najčešće koriste za pripremu tradicionalnih fitopreparata, ali u skladu sa činjenicom da industrijska proizvodnja obično koristi etanol kao rastvarač, koristili smo različite metode ekstrakcije i rastvarače različitih polarnosti za nalaženje pogodnih uslova za dobijanje ekstrakata bogatih polifenolima. Pored toga, sadržaj makroelemenata i mikroelemenata je određen u borovnici i u zemljišnim supstratima radi procijene kapaciteta usvajanja tih elemenata, iz zemlje preko korijena do jestivog ploda. Na kraju, mjerenjem sadržaja makroelemenata i mikroelemenata u vodenim i etanolnim ekstraktima lista i ploda, izveo se zaključak o unosu esencijalnih elemenata kao i o unosu toksičnih elemenata i riziku po zdravlje konzumenata u cilju definisanja uslova za dobijanje novih preparata sa optimalnim sadržajem fenolnih i mineralnih konstituenata.

## 2. OPŠTI DIO

### 2.1. Sastav zemljišta

Iako predstavlja samo tanak sloj Zemljine kore (debljine 2 do 3 m), zemljište ima mnogobrojne funkcije [14,15]. Osnovna i najbitnija funkcija je proizvodnja hrane za životinje, biljke i čovjeka. Zahvaljujući sposobnosti samoprečišćavanja, zemljište može da apsorbira, razlaže i transformira zagađujuće materije, onemogućavajući ih da zagađuju podzemne vode i na taj način uđu u lanac ishrane. Takođe, zemljište pruža čvrst oslonac neophodan za gradnju, stanište je mnogih biljaka i životinja, izvor sirovina za gradnju kao i izvor obnovljivih izvora energije. Iako se prirodne funkcije zemljišta koriste i od velike su važnosti za opstanak i razvoj čovječanstva, bitno je ne narušiti prirodnu ravnotežu sistema. Zemljište je teško obnovljiv prirodni resurs, i formira se tokom dugih vremenskih intervala kroz interakciju osnovnog matičnog materijala sa organskom materijom. Na proces formiranja zemljišta značajno utiču klimatski, reljefski, biološki faktori, i danas jako bitan činilac promjene sastava zemljišta-čovjek [14–17].

Neprekidni proces nastanka zemljišta ogleda se u raspadanju stijena i minerala obrazovanjem novih, sintezi i transformaciji organskih jedinjenja, i premještanjem produkata raspadanja po profilu zemljišta [18,19]. Važnu ulogu u ovim procesima ima tečna faza zemljišta, posredstvom koje i u kojoj se svi ovi procesi odigravaju (slika 1). U zemljištu je i izvjesna količina zemljišnog vazduha, čiji je procenat obrnuto srazmjeran sadržaju vlage. Njegov sastav je drugačiji od atmosferskog [19]. Sadrži više ugljen-dioksida i vodene pare, a manje kiseonika, i taj odnos nije stalan, već se mijenja pod uticajem mikroorganizama, korijena biljaka i drugih organizama. Kiseonik se gubi u procesima disanja, truljenja i vrenja, i izdvaja se ugljen-dioksid koji djelimično apsorbiraju korjenovi biljaka i autotrofni mikroorganizmi, koristeći ga za sintezu sopstvenih organskih materija. Takođe, sastav vazduha se mijenja i pod uticajem atmosferskog i ta razmjena gasova između zemljišta i atmosfere naziva se disanje zemljišta (vazduh bogatiji kiseonikom istiskuje zemljišni).



Slika 1. Zemljište kao višefazni sistem (u zapreminskim %)

Treća, osnovna faza trofaznog sistema zemljišta je čvrsta faza (50%). Iako se faze zemljišta posebno navode, one su međusobno direktno, ali i uz učešće živih organizama (tzv. četvrtu živu fazu) povezane [14]. Dominantnu ulogu u formiranju neorganskog dijela čvrste faze imaju sedimentne stijene, koje su procentualno manje zastupljene u odnosu na magmatske i metamorfne, ali su površinski dominantno eksponiranije [14,20]. Neorganski dio zapravo čine primarni i sekundarni minerali [14,15,21]. Primarni se u izvjesnoj količini mogu naći u zemljištu, a po svom porijeklu vezani su za magmatske i metamorfne stijene. S obzirom da su nastali u uslovima drugačijim od onih

koji vladaju u zemljištu, nestabilniji su i raspadanjem daju kvalitativno nove minerale koji se hemijskim procesima (rastvaranje, hidroliza, hidratacija) i djelovanjem specijalnih grupa mikroorganizama (silikatne bakterije) ralažu, ali sporo, na oblike elemenata koje biljke mogu iskoristiti [14]. Stoga su elementi neophodni za razvoj biljaka praktično nedostupni iz ovog izvora, te njegovo prisustvo određuje samo potencijalno bogatstvo zemljišta. Mnogo su važniji sekundarni minerali koji nastaju razlaganjem primarnih minerala i čine manji dio čvrste faze. Najzastupljeniji su minerali gline (nastali razlaganjem silikata primarnih stijena). Upravo su oni značajan izvor negativnog površinskog naelektrisanja u zemljištu koje je sposobno zadržati pozitivne jone elektrostatičkom sorpcijom, te prema tome daju glavni doprinos kapacitetu izmjene katjona u mineralnim zemljištima. Ova funkcija dobija značaj zadržavanjem biljkama neophodnih, esencijalnih i nutritivnih elemenata, nastalih u procesima raspadanja [14]. U sekundarne minerale zemljišta spadaju i dalji produkti raspadanja minerala gline: hidratirani oksidi silicijuma, aluminijuma i gvožđa. Takođe, tu su i hidratirani oksidi mangana, teško rastvorne soli karbonata (Ca, Mg), sulfata (Ca) i drugi.

Generalno, sekundarni minerali se ponašaju kao aktivna faza zemljišta jer predstavljaju glavne sorbente vode i biljnih hraniva, ali i zagađujućih supstanci [14].

Drugi sastojak čvrste faze zemljišta su organske materije, koje su nastale od izumrlih djelova biljaka, zemljišne faune i plazme mikroorganizama. To su organske supstance velikih molekula i molekulskih masa, i organske supstance manjih molekula (ugljeni hidrati, proteini, fenoli, aminokiseline i ostali); kao i od njih nastale, procesima polimerizacije, polikondenzacije i nepotpune oksidacije huminske supstance, koje učestvuju u izgradnji humusa zemljišta (humus je plodno tlo na površini zemljine kore debljine samo oko nekoliko decimetara, sastavljeno od mješavine organskih i mineralnih materija sa prisustvom bakterija). Zbog svoje visoke specifične površine, huminske supstance, slično neorganskim, pokazuju dobre sorpcione osobine, kompleksiraju se sa jonima metala, vezujući tako i jone toksičnih metala [14,21]. Sveukupna organska materija zemljišta je značajan izvor negativnog naelektrisanja, doprinoseći tako njegovom kapacitetu katjonske izmjene [14,22].

## 2.2. Makroelementi i mikroelementi u zemljištu i njihovo određivanje

Metali u zemljištu vode porijeklo iz više izvora. U prvom redu je to geohemijski izvor, to jest matični supstrat na kome je zemljište formirano. Ništa manje važan je i sadržaj metala antropogenog porijekla, kao proizvod industrije, energetike, saobraćaja, đubriva, pesticida i ostalog [23,24].

Ispitivanje hemijskog sastava zemljišta može biti u vidu određivanja ukupne koncentracije određenog elementa ili određivanje njegove koncentracije u zemljišnim frakcijama. Kada se radi o ukupnoj koncentraciji, to je ukupna količina elementa trenutno prisutnog u zemljištu, nezavisno od fizičko-hemijske forme i izvora iz koga potiče. Često ukupna koncentracija nije u korelaciji sa apsorpcijom od strane biljaka, koja zavisi od biodostupnosti elementa, mobilnosti i njihovih izvora po zemljišnim frakcijama [25]. Ova pristupačnost za biljke je potencijalno promjenljiva, i zavisi od vrste elementa i uslova okolne sredine koji mogu dovesti do njegovog izdvajanja iz manje mobilnih formi: pH vrijednosti, redoks-potencijala, oksigenacije zemljišta, sadržaja organskih materija, oksida gvožđa, aluminijuma i mangana, gline i sulfida. Stoga je od značaja proučavanje elemenata u pojedinim frakcijama zemljišta.

Povećan ukupan sadržaj metala geohemijskog porijekla ne mora značiti i povećano usvajanje od strane biljaka [25]. Suprotno, na zemljištima koja se odlikuju normalnim ukupnim sadržajem metala, biljke mogu pokazati simptome toksičnosti. To je iz razloga što uslovi u zemljištu, kao što su kisela reakcija, nizak redoks potencijal, ili antropogeno porijeklo metala, dovode do njegovog lakšeg rastvaranja i veće dostupnosti biljkama. Stoga se, da bi dobili podatke o ukupnom i (potencijalno) pristupačnom sadržaju metala u zemljištu i njihovom mogućem porijeklu, koristi metoda frakcione ekstrakcije. To je metoda kojom se sukcesivnom primjenom različitih agenasa rastuće ekstrakcione

moći selektivno rastvaraju određene specifično vezane frakcije elemenata iz istog uzorka zemljišta [25–33]. Postoji niz sekvencijalnih ekstrakcija, ali su najpoznatije Tesijerova (Tessier) procedura [34] i BCR šema (Bureau Communautaire de Reference) [25,30,35,36]. Tesijerova procedura predviđa dijeljenje elemenata na pet definisanih frakcija: izmjenljiva; vezana za karbonate; vezana za okside gvožđa i mangana; vezana za organsku supstancu i sulfide; rezidualna. Kao i kod ostalih sekvencijalnih ekstrakcionih šema, opada dostupnost elemenata tokom ekstrakcije, pa je prva faza najlabilnija i biljci dostupna, a peta faza predstavlja elemente najmanje mobilnosti koji se pri prirodnim uslovima ne mogu mobilisati u normalnom vremenskom periodu [37].

Poznato je da se metali u zemljištu geohemijskog porijekla nalaze najvećim dijelom vezani u silikatima, sulfidima, oksidima, i kao takvi su slabo mobilni i teško pristupačni biljkama [24]. Suprotno ovome, metali antropogenog porijekla najčešće su u površinskom sloju, u rastvorljivim oblicima i stoga pristupačniji biljkama.

Izmjenljiva (adsorptivna i jonoizmenjivačka vezana) faza je najmobilnija u ispitivanom uzorku, te prema tome prvi korak u izvođenja sekvencijalne ekstrakcije. Metali ove frakcija su za čvrstu površinu vezani slabim elektrostatičkim interakcijama u obliku organskih i neorganskih kompleksa, ili u vidu hidratiranih jona rastvorenih u vodi, te stoga najlakše dospijevaju u životnu sredinu. Za ekstrakciju ove faze koriste se uglavnom neutralni rastvori soli ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{KNO}_3$ ), s obzirom da ne utiču na promjenu pH, te prema tome ni na ekstrakciju slabije mobilnih faza [38–42]. Ovi rastvori su dovoljno visokih koncentracija, odnosno jonskih sila, da bi izazvali što potpuniju jonsku izmjenu ( $1 \text{ mol/dm}^3$ ). Amonijumove soli jakih kiselina, ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  ili  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) mogu da snize pH i da potpomognu hidrolizu glina, a soli slabih kiselina ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) povećavaju pH i tako dovode do taloženja metalnih hidroksida ili kompleksiranje elemenata acetatnim anjonom. Stoga se ( $1 \text{ mol/dm}^3$ , pH 7) preporučuje kao ekstrakciono sredstvo od strane evropskih eksperata za ispitivanje jonoizmenjivih elemenata pod pokroviteljstvom biroa za referentni materijal (BCR) [43,44].

Karbonatna frakcija sadrži metale vezane za karbonate čija se rastvorljivost, a time i oslobađanje adsorbovanih jona metala, mijenja i pri maloj maloj promjeni pH vrijednosti zemljišta (povećava se sa smanjenjem pH vrijednosti). Kao ekstrakciono sredstvo koristi se natrijum-acetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) zakiseljen sirćetnom kiselinom ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) do pH vrijednosti 5 [34,38,45–47]. Sirćetna kiselina rastvara i metale rezidualne frakcije (silikatni material), a dovodi i do djelimičnog rastvaranja hidratiranih oksida gvožđa i mangana (redukujuća frakcija). Da bi se ove poteškoće koje sirćetna kiselina izaziva izbjegle, uglavnom se ekstrakcija metala karbonatne frakcije izostavlja i ekstrahuje zajedno sa lako redukujućom fazom [34].

Reducibilna faza podrazumijeva metale udružene sa oksidima gvožđa i mangana, a koji su pod uticajem promjene pH vrijednosti, redoks potencijala i oksigenacije sredine. Dijeli se u tri kategorije [38,48,49]: lako reducibilna (oksidi Mn), umjereno reducibilna (amorfni oksidi Fe) i teško reducibilna frakcija (kristalni oksidi Fe). Međutim, u literaturi se najčešće pravi podjela na metale vezane za umjerene i lako reducibilne okside Fe i Mn [38,45,47,50,51].

Sekvencijalna ekstrakcija ima za cilj da odvoji okside mangana od oksida gvožđa, ali i okside različitog stepena kristalizacije primjenom različitih ekstrakcionih sredstava. Oksidi mangana koji su hidratirani se mnogo lakše redukuju od oksida gvožđa, a kao najčešće korišćeno sredstvo za obje vrste oksida je kiseli rastvor hidroksilamin-hidrohlorida ( $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ ). Pri tome, mali procenat gvožđa se rastvara i redukuje, i to je najreaktivniji, najmanje kristalizovan oksid gvožđa. Povećanje ovog procenta, može se postići povećanjem koncentracije redukcionog sredstva ili sniženjem njegove pH vrijednosti (s tim da pH vrijednost niža od 1.5 [34,38] može uzrokovati rastvaranje i silikata). Rastvaranje kristalnog  $\text{MnO}_2$  je dosta sporije, i zavisi od vremena djelovanja redukcionog sredstva. Tokom ove ekstrakcije, koristi se rastvor čija pH vrijednost ne prelazi 5 u cilju smanjenja efekta ovog reagensa na silikate koje djelimično rastvara [34,38]. Veću selektivnost u odnosu na hidroksilamin-hidrohlorid posjeduje oksalatni reagens ( $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 + \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ), odnosno smješa oksalne kiseline i amonijum-oksalata (pH = 3), pa se koristi za djelimično kristalizovane i amorfne oksida gvožđa, ali ne i jako kristalizovane okside. Oksalat ne napada silikate u velikoj mjeri, ali može djelimično razložiti organsku supstancu, pa se preporučuje njena prethodna ekstrakcija natrijum-hipohloritom.



Organsko sulfidna faza (oksidabilna) je vezana za organsku materiju ili sulfidne minerale u anoksičnim uslovima. Povećanje sadržaja kiseonika dovodi do njihove mobilizacije. U sekvencijalnoj ekstrakciji za oslobađanje ovih metala najefikasnije sredstvo je azotna kiselina ( $\text{HNO}_3$ ), koja se može koristiti sama ili u kombinaciji sa drugim kiselinama. U većini naučno-istraživačkih radova, kao bolje sredstvo pokazao se vodonik-peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), na povišenoj temperaturi i sniženoj pH vrijednosti (oko 2), jer rastvara samo sulfidne rude. Problem sa ovim ekstrakcionim sredstvom je to što je potrebno da se ponovo desorbuju joni koji su adsorbovani na preostalim supstratima, a to se najčešće radi pomoću amonijum-acetata [34,38,52,53].

Rezidualna faza predstavlja metale inkorporirane u silikatnim i oksidnim mineralima, to jest najimobilnije metale. U prirodnim uslovima se ne mogu izolovati iz geološkog materijala, pa su sa aspekta životne sredine nezanimljivi za istraživanja. Za razaranje ovih geoloških materijala, koriste se mineralne kiseline ili smješe istih ( $\text{HF}/\text{HClO}_4$ ;  $\text{HNO}_3/\text{HF}$ ;  $\text{HCl}/\text{HNO}_3/\text{HF}$ ;  $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$ ;  $\text{HCl}/\text{HNO}_3$ ) [14].

Tesijerova procedura ekstrakcije se i danas koristi ali je potisnuta od strane BCR ekstrakcije, zbog promjenljive efikasnosti, nedovoljnog razdvajanja frakcija ali i njihovog preklapanja.

BCR sekvencijalna ekstrakcija je najšire primjenjivana procedura i ona je jednostavnija od Tesijerove, vremenski manje zahtjevnja, omogućava međulaboratorijsko upoređivanje, jer postoji sertifikovani referentni materijal, i uvijek je moguće ustanoviti preciznost i tačnost procedure. U originalnoj BCR proceduri postoje tri frakcije: 1) izmjenljiva, u vodi rastvorna i kiselo rastvorna faza - frakcija vezana za karbonate, 2) reducibilna - frakcija vezana za Fe i Mn okside i hidrokside i 3) oksidabilna - frakcija vezana za organsku materiju i sulfide [25,35]. Originalna BCR metoda je modifikovana u drugom koraku [25,30,54] zbog nekonzistentnosti ekstrakcije elemenata, smanjenjem pH vrijednosti i povećanjem koncentracije redukujućeg agensa, kao i dodatkom četvrte faze koja je zadužena za digestiju čvrstog ostatka carskom vodom (ili drugom kiselinskom smješom), što omogućava poređenje sume četiri BCR koraka sa nezavisnom analizom drugog dijela nakon njegove digestije sa carskom vodom (pseudo totalna koncentracija). Prikaz modifikovane BCR sekvencijalne ekstrakcione procedure sa 4 faze dat je u tabeli 1.

Tabela 1. Modifikovana BCR sekvencijalna ekstrakciona procedura sa 4 faze

Ekstrakcioni korak	Ekstrakciono sredstvo	Frakcija
1	Sirćetna kiselina	Izmjenljiva, u vodi rastvorna i kiselo rastvorna faza-frakcija vezana za karbonate
2	Hidroksilamin-hidrohlorid	Reducibilna-frakcija vezana za Fe i Mn okside i hidrokside
3	Vodonik-peroksid zatim 1M amonijum-acetat	Oksidabilna-frakcija vezana za organsku materiju i sulfide
4	Carska voda	Rezidualna

### 2.3. Uticaj makroelemenata i mikroelemenata na biljke

Usvajanje elemenata kod biljaka se prvenstveno vrši preko korijena iz zemljišnog rastvora, a manjim dijelom i preko nadzemnih organa iz atmosfere. Korijenske izlučevine su bogata sredina za razvoj mikroorganizama u sloju zemljišta oko korijenskog sistema. Mikroorganizmi fiksiraju azot iz zemljišnog vazduha, razlažu organske komplekse jedinjenja, razlažu minerale i mineralizuju organske materije kao priprema za njihovo usvajanje od strane biljke. Nisu svi elementi biljkama neophodni. Iz tog razloga elemente dijelimo na esencijalne (neophodne), korisne i ostale [55]. Esencijalne elemente odlikuje specifično dejstvo i da bi se biljke normalno razvijale i rasle, one moraju održavati koncentracije ovih elemenata u okviru optimalnih vrijednosti (stanje homeostaze). Bez njih biljka ne može da završi svoj potpuni životni ciklus, pojavljuju se simptomi deficijencije. Sedamnaest elemenata su esencijalni: C, O, H, N, P, K, Ca, Mg, S, Cl, Fe, B, Mn, Zn, Mo, Ni i Cu. Izvjestan broj elemenata, koji nisu esencijalni, imaju povoljno dejstvo na rast biljaka i oni se označavaju kao korisni elementi. Tu spadaju Na i Si. U nespecifičnim funkcijama oni mogu biti zamjenjeni. Ostali elementi mogu da se nađu u biljkama ali bez vidljivog značaja. Usvajanje i nakupljanje elemenata u biljkama zavisi od brojnih endogenih i egzogenih činilaca: vrste biljke i njenog genotipa, vrste jona, a najviše od njihove koncentracije u spoljašnjoj sredini. Sa povećanjem koncentracije najintezivnije se nakupljaju Zn, B, Mo, Co, Cd, a u manjoj mjeri Mn, Fe i Al, i najmanje Cu, Pb i Cr. U elemente koji se intezivno translociraju iz korijena u nadzemne organe biljaka spadaju Mn, Zn, Cd, B, Mo i Se, srednje Ni, Co i Cu, a sporo Cr, Pb i Hg [19].

Na osnovu zastupljenosti u biljkama, elementi se grupišu na makroelemente i mikroelemente. C, O, H, N, P, K, Ca, Mg, S, Na, Si i Cl predstavljaju makroelemente, i njihov saržaj u suvoj materiji biljaka se kreće od 2 do 60 mg/g. Fe, Zn, Cu, Mn i ostali su mikroelementi, i u suvoj materiji biljaka ih ima manje od 1 mg/g [55]. Ovakva podjela elemenata ne govori i o njihovom značaju za metabolizam biljaka, jer su i jedni i drugi neophodni za životni ciklus. Uloge elemenata u biljkama su višestruke: neki su kofaktori enzima uključeni u važne procese, kao što su fotosinteza (Cu, Mn), transkripcija dezoksiribonukleinske kiseline, DNK (Zn), hidroliza uree u CO<sub>2</sub> i NH<sub>3</sub> (Ni), kao i nodulacija (stvaranje čvorova) kod leguminoza i fiksacija azota (Co, Zn); drugi igraju važnu ulogu u cvjetanju i produkciji sjemena, kao i rastu biljaka (Cu, Zn) [56].

### 2.4. Anatomske i fiziološke promjene biljaka i mehanizmi tolerantnosti

Kada koncentracije elemenata pređu optimalne vrijednosti, elementi mogu ispoljiti svoje toksične efekte (fitotoksičnost). Ovi toksični efekti se mogu zapaziti u vidu promjene permeabiliteta ćelijskih membrana; u vidu reakcije sa sulfhidrilnom grupom (SH) enzima koji se na ovaj način inhibišu; takođe mogu da konkurišu za mjesto vezivanja neophodnim metabolitima; pokazuju afinitet ka aktivnim fosfatnim grupama ADP i ATP; dovode do dezintegracije membrane, gubitka jona, peroksidacije lipida, degradacije DNK/RNK i konačno smrti ćelije [19].

Većina metala se najviše nakuplja u korijenu, pa su morfološke i anatomske promjene u uslovima viška uočljive u vidu njegovog zaostatka u rastu, slabijeg grananja i manjeg broja korijenskih dlačica. Takođe dolazi do smanjenja permeabilnosti zidova korijenskih ćelija za vodu, i sve to vodi u generalno smanjenje resorpcije vode. Stoga je i transport u nadzemne organe smanjen, ali dodatno i smanjenjem površine provodnih sudova. Smanjen transport vode povećava difuzni otpor stoma lista (smanjenjem broja i veličine stoma otvora), odnosno smanjuje se transpiracija biljke, što se može zapaziti na listovima u vidu smanjenja broja listova, promjene njihove anatomske građe i pojave hlorotičkih i nekrotičkih pjega. Mogu uticati na metabolizam fitohormona, takođe smanjiti intezitet fotosinteze smanjujući sintezu fotosintetičkih pigmenta ili inhibirajući transport elektrona

kroz elektronski transportni lanac. Utiču na strukturu i funkciju ribozoma i time smanjuju sintezu proteina kao i aktivnost brojnih enzima [19].

Ipak biljke mogu opstati na staništima koja se odlikuju velikim količinama metala, zahvaljujući ćelijskim mehanizmima adaptacije koji omogućavaju toleranciju biljke prema metalnom stresu. Tolerancija može biti izražena prema jednom ili prema više metala (multipna tolerantnost). Ona ima genetsku osnovu, ali se modifikuje adaptacijom. U zavisnosti od mjesta gdje djeluju, mehanizmi tolerantnosti se mogu svrstati u spoljašnje i unutrašnje. Spoljašnji onemogućavaju ulazanje metala u biljku. Naime, biljka preko korijena izlučuje u spoljašnju sredinu helate i organske kiseline, koji mogu da promijene pH i redoks potencijal zone tla uz korijen biljke (rizosfere), i na taj način stvaraju barijeru za usvajanje metala. Takođe, veće količine metala se imobilizuju vezujući se za ćelijski zid (ova mjera se ostvaruje zahvaljujući polisaharidima pektina koji su sposobni da vežu dvovalentne i trovalentne metalne jone), i tako ne ostvaruju kontakt sa protoplastom. Unutrašnji mehanizmi tolerantnosti dolaze do izražaja kada metal uđe u unutrašnjost biljke, i to su: vezivanje metala za neorganska jedinjenja, nakupljanje metala u vakuoli, obrazovanje kompleksa metal-peptid (fitohelatini), stvaranje kompleksa metal-protein (metalotioneini). Kada biljka usvoji višak metala, oni se u citoplazmi vezuju za organska jedinjenja male molekulske težine polipeptide i proteine, koji u svom sastavu imaju aminokiseline sa sumporom (cistein i metionin). Na taj način aminokiselinska SH- grupa polipeptida stvara stabilni organo-metalni kompleks fitohelatin. Ovaj kompleks se može zadržati u citoplazmi ili prenijeti u vakuole, u čijoj kiselj sredini se kompleks razgrađuje i tada slobodan polipeptid odlazi u citoplazmu da nastavi svoju funkciju. U slučaju da su ovi metali u izvjesnom periodu neophodni za metabolizam biljaka, lako ih je izdvojiti [19,55,57–59].

## 2.5. Diabetes mellitus

*Diabetes mellitus*, dijabetes, predstavlja jedno od vodećih hroničnih oboljenja u svijetu. Smatra se da skoro 250 miliona ljudi ima dijabetes, a očekuje se da će tokom narednih 20 godina ovaj broj biti povećan na 380 miliona [60]. Radi se o hroničnom poremećaju metabolizma, kao posledica smanjene sekrecije insulina ili poremećaja njegovog dejstva (ili oba ova poremećaja istovremeno) što se karakteriše hiperglikemijom, odnosno povišenim nivoom glukoze u krvi, koja dovodi do oštećenja gotovo svih sistema organa. Smanjena sekrecija ili poremećaj dejstva insulina onemogućava skladištenje glukoze u masnom potkožnom tkivu i u manjoj mjeri u jetri, što kod oboljelih dovodi do stalnog povišenog nivoa glukoze u krvi. Osim ovih tkiva, koja su označena kao skladišta glukoze, i ćelije drugih tkiva zbog problema sa insulinom ne mogu koristiti glukozu kao izvor energije, te iako šećera u krvi ima i više nego što treba, ćelije ostaju "gladne". U normalnim uslovima, u periodu od dva do četiri sata nakon obroka, nivo glukoze u krvi je skladišten i normalizovan, a tkiva će postepeno koristiti tu skladištenu energiju.

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) je 1998. godine dala važeću klasifikaciju dijabetesa na 4 osnovne kategorije [60]:

1. Dijabetes tip 1, koji se najčešće javlja kod mladih osoba, ispod 30 godina. 5 do 10% od ukupnog broja dijabetičara ima ovaj tip dijabetesa. U osnovi je autoimuni proces, u kojem su beta ćelije ( $\beta$ -ćelije) pankreasa uništene, što dovodi do smanjenja i odsustva insulina, i posledično hiperglikemije.
2. Dijabetes tip 2 predstavlja najčešći oblik šećerne bolesti, i prema procjenama 85% do 90% dijabetičara ima ovaj tip dijabetesa. Pacijenti su obično stariji od 40 godina i najveći broj njih je gojazan. Kod ovih osoba stvara se premalo insulina ili organizam stvara rezistenciju na insulin. Naziva se insulin-nezavisnim i nastaje kao posledica različitih abnormalnosti na nivou perifernih tkiva.
3. Ostali specifični tipovi sekundarnog dijabetesa uključuju dijabetes nastao sekundarno - oštećenjem pankreasa usljed bolesti (cistična fibroza, hronični pankreatitis, pankreasni karcinom, hemohromatoza, itd.), u nekim endokrinim bolestima koje sekundarno iscrpljuju pankreas (akromegalija, Kušingov sindrom, feohromocitom i glukagonom), pri primjeni nekih lijekova i otrova (npr. kortikosteroidna terapija, rodenticid, Vacor).

4. Gestacijski dijabetes predstavlja hiperglikemiju otkrivenu prvi put u toku trudnoće, koja u većini slučajeva iščezava poslije porođaja. Javlja se u 2-3% svih trudnoća kao posledica hormonskih promjena, koje dovode do poremećaja u izlučivanju insulina ili blokiranja njegovog dejstva hormonima posteljice.

Najčešće posledice neliječenog dijabetesa su slijepilo, slabljenje funkcije bubrega koje vodi u hemodijalizu, neuropatije koje komplikuju status donjih ekstremiteta i završavaju se nerijetko i amputacijama, kardiovaskularne smetnje koje se komplikuju moždanim udarom. Najopasnija komplikacija dijabetesa koja se najčešće dešava osobama sa dijabetesom 1 ali i dijabetesom tipa 2, čiji pankreas proizvodi izuzetno malo insulina, je ketoacidoza. Zbog izuzetno povećanih vrijednosti glukoze u krvi, a nemogućnosti njenog ulaska u ćelije, ćelije počinju da sagorijevaju masne kiseline što rezultuje proizvodnjom velike količine ketona i zakiseljavanjem krvi (metabolička acidoza). Što je pH krvi manja simptomi su teži, počev od povraćanja, ubrzanog rada srca, zaštitnog mehanizma hiperventilacije koji teži da smanji ugljen-dioksid i time kisele bikarbonatne jone u krvi (pokušaj da se poveća ukupna pH krvi) a potom otežanog disanja, i na kraju dezorijentacije i kome, smrti [61].

Osnovni cilj terapije dijabetesa je postizanje približno normalnih vrijednosti glikemije, što utiče na regulisanje metabolizma glukoze, lipida i proteina. Na taj način se spriječavaju akutne i odlažu hronične komplikacije ovog oboljenja, što produžava život oboljelih, ali i poboljšava njegov kvalitet. Terapija dijabetesa obuhvata nemedikamentni i medikamentni tretman [60–62].

Nemedikamentna terapija je izuzetno bitan segment u liječenju, i podrazumijeva terapiju ishranom odnosno ograničavanje ukupnog unosa energije, i rasporeda tog unosa u vidu rasporeda obroka. Kontinuirana fizička aktivnost je neizostavna, kao vid trošenja energije vezane u višku glukoze iz krvi.

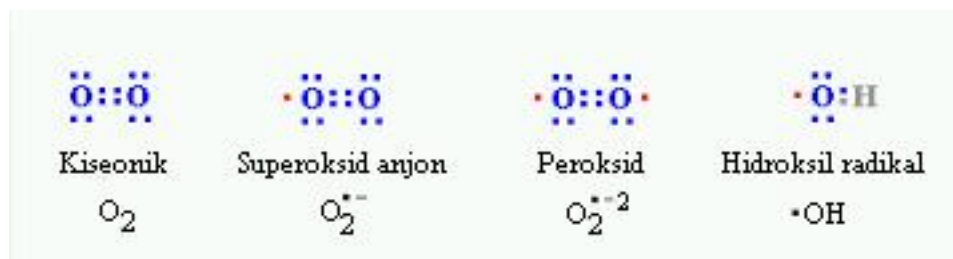
Medikamentna terapija se sastoji od peroralnih hipoglikemika (lijekovi koji dovode do snižavanja glukoze u krvi) i humanog insulina, koji se sintetiše u laboratoriji sa ciljem da imitira ljudski, sintetisan u pankreasu (prije razvoja humanog korišćen je životinjski, najčešće svinjski insulin).

Postoje i prirodni glikoregulatori, od davnina je poznata borovnica, koja se preporučuje za ishranu dijabetičara [10–12].

## 2.6. Slobodni radikali i oksidativni stres

Različiti faktori, kao što su hiperglikemija, hiperlipidemija i insulinska rezistencija, autoimune reakcije, inflamacije dovode do propadanja sekretornih  $\beta$ -ćelija pankreasa koje luče insulin, što vodi u dijabetes [62,63]. Dokazano je da je oksidativni stres zajednički mehanizam djelovanja svih ovih nabrojanih faktora [62,64,65]. Prema tome, kiseonik, bez koga je nemoguć opstanak života, može imati i negativne efekte zbog visokog redoks potencijala. Ovo oksidaciono sredstvo narušava ravnotežu između proizvodnje i uklanjanja slobodnih radikala, dovodeći do oksidativnog stresa ćelija. Slobodni radikali su molekuli ili dijelovi molekula koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u orbitalama, što ih čini nestabilnim i izuzetno reaktivnim [62,66]. U normalnim fiziološkim uslovima su prisutni u niskim koncentracijama, i mogu imati značajne uloge. Uključeni su u brojne signalne procese u ćeliji, učestvuju u regulaciji ekspresije gena i ćelijskog rasta, učestvuju u odbrani od raznih infektivnih agenasa kao i u pokretanju mitogenog odgovora [62,65]. Kao prva linija odbrane od infektivnih agenasa, tokom procesa fagocitoze u aktiviranim polimorfonuklearnim leukocitima i makrofagima dešava se “oksidaciona eksplozija” usled i do 20 puta povećane potrošnje  $O_2$  i prekomjerne produkcije kiseoničnih radikala, što lizira bakterijske ćelija u roku od 30 do 60 minuta [67,68].

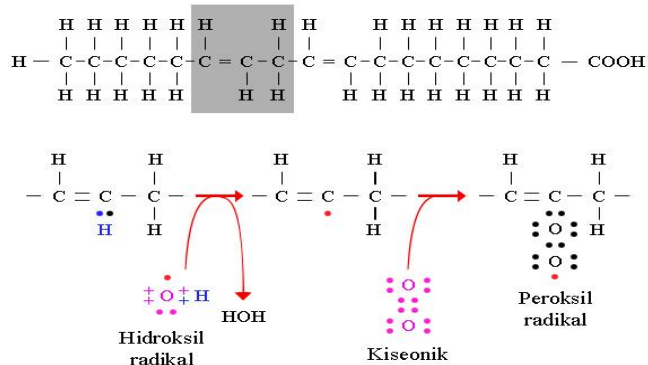
U slobodne radikale ubrajaju se reaktivne vrste kiseonika (ROS) i reaktivne vrste azota (RNS). Najvažnije reaktivne vrste kiseonika predstavljene su na slici 2. Pored navedenih ROS, takođe, uključuju singlet kiseonik ( $^1O_2$ ), hidroperoksil radikal ( $HOO^\bullet$ ), peroksil radikal ( $ROO^\bullet$ ), dok se u RNS ubrajaju azot oksid ( $NO^\bullet$ ) i peroksinitrit anjon ( $ONOO^-$ ) [62].



Slika 2. Reaktivne vrste kiseonika (ROS)

Najznačajniji izvor stvaranja kiseoničnih slobodnih radikala je proces ćelijskog disanja u mitohondrijama (oksidativna fosforilacija), a koji je ključni za dobijanje energije iz glukoze. U mitohondrije dopijeva 90% ukupno unijetog kiseonika, gdje se, tokom ćelijskog disanja, odvija četvoroelektronska redukcija  $O_2$  do  $H_2O$ , a oslobođena energija se koristi za sintezu adenzin trifosfata (ATP). Međutim, usled slabih veza između elektrona i odgovarajućih enzima koji učestvuju u njihovom prenosu, može doći do gubljenja elektrona i mali dio (2-3%) ukupnog kiseonika se na taj način neće potpuno redukovati do  $H_2O$ , već će se transformisati u reaktivne kiseonične oblike [67,69]. Zbog toga se mitohondrijalni respiratorni lanac smatra najznačajnijim izvorom superoksid anjona ( $O_2^{\bullet-}$ ).

Proces oksidativnog oštećenja polinezasićenih masnih kiselina, to jest lipidna peroksidacija (slika 3), je glavni mehanizam koji na molekularnom nivou uzrokuje oštećenje ćelijskih struktura i uzročno ćelijskog umiranja. Proces lipidne peroksidacije teče kroz faze oduzimanja atoma vodonika sa metilenske ( $=CH_2$ ) grupe polinezasićene masne kiseline od strane slobodnog radikala ( $HO^{\bullet}$  ili  $HOO^{\bullet}$ ) čime se stvara alkil radikal masne kiseline, potom kroz stabilizaciju nastalog radikala preuređenjem dvostrukih veza i formiranjem konjugovanog diena [62]. Dalje aerobni uslovi omogućavaju reakciju kiseonika sa konjugovanim dienom što ga prevodi u peroksil radikal. U narednim reakcijama oduzimanja vodonikovog atoma sa peroksil radikala nastaje hidroperoksil radikal, pri čemu se započeta reakcija može uvećavati višestruko to jest imati lančani tok.



Slika 3. Oksidativno oštećenje lipida – lipidna peroksidacija

S obzirom da su proteini, izuzimajući vodu, najzastupljeniji molekuli bioloških sistema, oni su glavna meta oksidativnog oštećenja. U reakciji slobodnih radikala sa njima nastaju mnogobrojni proteinski radikali koju mijenjaju strukturu ali i funkciju dijela ćelije kojeg izgrađuju [62].

Slobodni radikali u reakciji sa DNK molekulom mogu izmjeniti heterociklični prsten nukleotidne baze ili šećernu komponentu nukleotida, pri čemu posledično nastaje mutacija gena, koja ukoliko se ne popravi sistemom za popravku DNK izaziva problem u funkcionisanju ćelije [62].

## 2.7. Uloga oksidativnog stresa u razvoju komplikacija u dijabetesu

U situacijama povećane produkcije slobodnih radikala dolazi do oštećenja bioloških makromolekula (DNK, lipida i proteina). Naime, slobodni radikali oksidišu makromolekule predajući

im svoje nesparene elektrone i time mijenjaju njihovu funkciju a samim tim dovode do oštećenja ćelije. Povećana koncentracija glukoze dovodi do povećanog stvaranja slobodnih radikala, dominantno kiseonikovih reaktivnih jedinjenja. Glukoza (kao enediol) se oksiduje do enediol radikala, koji se dalje konvertuje u reaktivne ketoaldehide i  $O_2^{\cdot-}$ . Takođe, u uslovima hiperglikemije povećana je proizvodnja  $O_2^{\cdot-}$  i u ostalim kaskadama razlaganja glukoze, a naročito u mitohondrijalnom transportnom lanca elektrona [62,70,71]. Nastali  $O_2^{\cdot-}$  dovodi do peroksidacije lipoproteina male gustine, što dodatno proizvodi još slobodnih radikala [62,72]. Slobodni radikali dovode do oštećenja enzima glikolize te dolazi do nakupljanja intermedijera ciklusa razlaganja glukoze (glukoza  $\rightarrow$  glukozo-6-fosfat  $\rightarrow$  fruktozo-6-fosfat  $\rightarrow$  fruktozo-1,6-difosfat  $\rightarrow$  gliceraldehid-3-fosfat i dihidroksiaceton fosfat), a da se "sagorijevanje glukoze" ne može odviti u potpunosti. Kao alternativa aktiviraju se drugi biosintetski putevi (kao što su put poliola, proces neenzimatske glikozilacije proteina, put heksozamina i diacil glicerol (DAG)-protein kinaza C (PKC) signalni put), koji su i sami dodatni izvor slobodnih radikala u dijabetesu.

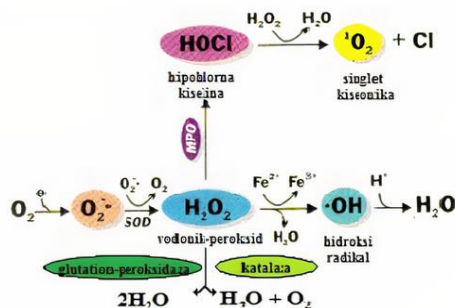
Komplikacije dijabetesa su zapravo posledica oksidacionog stresa tkiva, a najteže su na retini oka, endotelu bubrega, membrani živaca, endotelu krvnih sudova. Zbog svega navedenog su u dijabetesu hiperglikemija i oksidativni stres usko povezani.

## 2.8. Antioksidansi

Slobodne radikale neutrališu antioksidansi na taj način štiteći tkiva od oštećenja, odnosno organizam od različitih bolesti. U fiziološkim uslovima u organizmu postoji ravnoteža između prooksidanasa i antioksidanasa [73,74]. U najvećem broju slučajeva ćelija uspijeva da održi homeostazu. Izlaganje egzogenim izvorima oksidanasa (kao što su ultraljubičasto i jonizujuće zračenje, neki metali, redoks aktivna jedinjenja, anoksija i hiperoksija) koji povećavaju proizvodnju slobodnih radikala, otežava održavanje ravnoteže između procesa proizvodnje slobodnih radikala i njihovog uklanjanja. Ukoliko iz nekog razloga dođe do otkazivanja prirodnih mehanizama odbrane, prijeti mogućnost narušavanja oksidativnog statusa ćelije, što predstavlja uvod u oksidativni stres i rizik za nastajanje različitih poremećaja i bolesti. Zbog toga aerobni organizmi moraju konstantno da održavaju redoks balans [62,75,76].

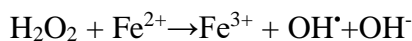
Prema mjestu nastanka antioksidansi dijele se na endogene i egzogene. Endogeni antioksidansi nastaju u ljudskom organizmu. Egzogene antioksidanse unosimo preko hrane ili lijekova. Mehanizam djelovanja antioksidansne zaštite aerobnih organizama se ostvaruje preko primarne i sekundarne antioksidativne zaštite [77].

Primarnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti imaju enzimi koji direktno reaguju sa prooksidativnim jedinjenjima, ili regenerišu molekule antioksidanata (slika 4). Pod dejstvom superoksid dismutase (SOD)  $O_2^{\cdot-}$  se konvertuje u  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$  je susprtat za dva enzima, katalazu i glutation-peroksidazu. Katalaza prevodi  $H_2O_2$  do  $H_2O$  i  $O_2$ , a glutation peroksidaza do  $2H_2O$ . Takođe,  $H_2O_2$  predstavlja izvor  $HO^{\cdot}$  koji predstavlja jedan od najjačih poznatih oksidujućih agenasa u prirodi [62,78]. Glavni mehanizam kojim  $HO^{\cdot}$  nastaje u biološkim sistemima je Fentonova reakcija katalizovana gvožđem [62,79,80] pri čemu  $HO^{\cdot}$  odmah reaguje sa bilo kojim biološkim molekulom (RH) u neposrednoj blizini iz koga oduzima vodonikov atom, jer je za razliku od relativno stabilnog superoksid radikala kratko živeći (sa poluživotom od  $10^{-9}$  s) [62,81].  $H_2O_2$ , pod dejstvom mijeloperoksidaze (MPO) i u prisustvu  $Cl^-$  jona, može da se konvertuje u hipohlornu kiselinu (HOCl). Reakcijom HClO i  $H_2O_2$  nastaje pored  $H_2O$  i hloridnog jona, i singlet kiseonika ( $^1O_2$ ) [82].



Slika 4. Nastajanje reaktivnih kiseoničnih vrsta od superoksidanjon-radikala. SOD - superoksid dismutaza, MPO – mijeloperoksidaza [82]

Osim enzima, primarnu antioksidativnu zaštitu čine i neenzimski biomolekuli: redukovani glutation (GSH), koji spriječava oksidaciju tiolnih grupa svih peptidnih i proteinskih hormona i enzima, prelazeći u oksidovani oblik (GSSG); proteini apoceruloplazmin, apotransferin i apoferitin, koji usmjeravaju slobodno gvožđe sprečavajući njegovo uključivanje u Fentonovu reakciju, čiji su produkti hidroksilni radikali [83,84]:



Sekundarna antioksidativna zaštita je bazirana, kao i primarna, na enzimskim i neenzimskim antioksidansima, s tim što su to ovdje niskomolekularna jedinjenja. Sekundarnu enzimsku zaštitu čine enzimi koji ispravljaju već nastala oštećenja nukleinskih kiselina, proteina i membranskih lipida: proteolitički enzimi, fosfolipaza A2 (fosfolipid-nezavisna i fosfolipid zavisna), glikozilaze, endo- i egzo- nukleaze, DNK ligaze, DNK polimeraze, itd. Neenzimski sekundarni antioksidansi, hidrofilnog ili lipofilnog karaktera, su veoma različita jedinjenja, pa im je i mehanizam djelovanja različit. Mogu djelovati tako što uklanjaju već stvorene slobodne radikale kao ‘hvatači’, zatim kao donori elektrona, ili razgrađujući lipid-perokside nastale u fazi propagacije, ili vezujući metalne jone ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  i  $Mg^{2+}$ ), a neki inhibiraju i enzimске sisteme koji produkuju reaktivne vrste kiseonika [83,85]. To su tokoferoli (vitamin E), askorbinska kiselina (vitamin C), karotenoidi, ubihinon (koenzim Q), fenoli i njihove kiseline, flavonoidi, derivati hidroksicinamata.

Beta ćelije pankreasa su naročito podložne djelovanju oksidativnog stresa, jer posjeduju nizak nivo endogene antioksidativne zaštite [62,86]. Mada još uvijek nije u potpunosti razjašnjeno zbog čega imaju tako slab sistem antioksidativne zaštite, dokazana je smanjena aktivnost katalaze, glutation peroksidaze 1 i bakar-cink superoksid dismutaze u odnosu na jetru [62,87,88]. Jedna od teorija objašnjava gubitak antioksidativnog sistema beta ćelija sa evolucijom mozga i placente sisara, kada se stresom smanjuje sekrecija insulina da bi se obezbjedila dovoljna količina glukoze za mozak i fetus [62,89].

## 2.9. Borovnica (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae)

Biljni ekstrakti i fitokonstituenti su efikasani antioksidansi jer uklanjaju slobodne radikale i inhibiraju lipidnu peroksidaciju [90–92]. Vjeruje se da hemijski sastojci biljnog porijekla imaju bolju kompatibilnost sa ljudskim tijelom u odnosu na one sintetičkog porijekla, jer su dio fizioloških funkcija biljaka. Uz to, lijekovi biljnog porijekla su bezbjedni, manje toksični, klinički efikasni, i postoji bolja tolerancija pacijenta na njih, a relativno su jeftiniji. Nasuprot njima, sintetička antioksidativna jedinjenja su pokazala toksična i/ili mutagena dejstva. Pored svog primarnog efekta, sintetičke droge ispoljavaju i sekundarni efekat koji može biti opasniji od bolesti koju bi trebalo da liječi [93–96]. Zato je u poslednje vrijeme sve veća potražnja za lijekovima biljnog porijekla koji bi bili zamjena za potencijalno toksične sintetičke antioksidanse.



*Vaccinium myrtillus* L., borovnica (porodica Ericaceae) je nizak višegodišnji listopadni žbun visine od 10 do 80 cm (prosječno oko 50 cm). Može se naći u zoni listopadnih, bukovih i četinarskih šuma, na kiselim zemljištima čija je pH vrijednost od 4 do 4.8. Biljka lista krajem aprila, početkom maja. Eliptični listovi, naizmjenično raspoređeni na stablu, opadaju krajem septembra, početkom oktobra. Period cvjetanja je od maja do juna. Plod borovnice najčešće je okrugao-spljoštenog oblika, tamnoplave ili ljubičaste boje (koja je uslovljena prirodnim pigmentima antocijanima), sa brojnim smeđim sjemenkama (slika 5). Vrijeme zrelosti i branja je od jula do septembra, i zavisi od nadmorske visine (sazrijevanje na višim visinama je kasnije).

Plod borovnice se vjekovima koristi kao hrana u različitim oblicima, zbog visoke nutritivne vrijednosti. Hemijski sastav i mala kalorijska vrijednost čine je idealnom namirnicom za sve one koji drže do svog zdravlja i zdrave ishrane. Plodovi i listovi borovnice sadrže brojna hemijska jedinjenja za koja je dokazano da posjeduju farmakološko djelovanje. Plod borovnice sadrži oko 10% tanina, antocijana, organskih kiselina i pektina. Listovi sadrže tanine, flavonoide i malu količinu arbutina [11]. *In vitro* studije su pokazale da antocijani i drugi polifenoli u borovnici mogu biti vrlo značajni u liječenju srčanih oboljenja, pozitivno utiču na krvnu sliku i na krvni pritisak, sprječavaju nastanak krvnih ugrušaka (koji izazivaju srčani i moždani udar, plućnu tromboemboliju, vensku trombozu), smanjuju nivo masnoća u krvi. Takođe celulozna vlakna stimulišu organe za varanje, a antioksidansi i vitamin A se preporučuju za liječenje mrežnjače oka, i mogu spriječiti nastanak Alchajmerove bolesti. Sekundarni metaboliti borovnice na sluzokožu urinarnih puteva djeluju i kao antiseptici i sprječavaju urinarnu infekciju. Redovno konzumiranje borovnice utiče na sniženje nivoa šećera u krvi [11,97–99].



Slika 5. Borovnica (*Vaccinium myrtillus*)

## 2.10. Sekundarni metabolizam i biosinteza fenolnih jedinjenja

Biljke iz zemljišta crpe neophodne elemente za rast i razvoj. Pored toga one procesom fotosinteze, koji se najvećim dijelom odvija u listovima biljaka, od neorganskog materijala ( $\text{CO}_2$ ) sintetišu za njih primarnu organsku materiju (šećere). U sintetisanim molekulima šećera je svjetlosna energija transformisana i skladištena u vidu energije hemijskih veza, i može se dalje koristiti kako u biljkama u kojima je sintetisana, tako i ostalim organizmima na Zemlji. U prirodi vlada zakon svrsishodnosti i “bezotpadne tehnologije”, kada potrošene materije jednog organizma bivaju supstrat za aktivnost drugog, što se naziva kruženjem materija u prirodi. Upravo je to princip dešavanja u fotosintezi: za proizvodnju hranljivih organskih materija i kiseonika, biljke koriste otpad svih živih bića- $\text{CO}_2$ . Takođe konstantna proizvodnja kiseonika u ovom procesu, čine biljke ključnim za opstanak života na našoj planeti.

Šećere nastale fotosintezom, osim za energiju, biljke koriste za sintezu drugih organskih jedinjenja (najčešće skrob i celulozu). Transformacija nastale glukoze do polisaharida, ili formiranje aminokiselina (kasnije peptida) i masnih kiselina (kasnije lipida), predstavlja primarni metabolizam biljnih ćelija. On obezbjeđuje energiju za rast, razvoj, funkcionisanje i reprodukciju. Procesi primarnog metabolizma se u svim biljkama odvijaju istim mehanizmom. Za razliku od primarnog, sekundarni metabolizam biljaka se odvija samo u specifično diferenciranim ćelijama. On nije neophodan za funkcionisanje tih ćelija, ali produkti ovog metabolizma, sekundarni metaboliti, koriste organizmu u cjelini kao proces adaptacije za opstanak vrste [100]. Oni štite od biljojeda i patogena, ili mogu biti važni u odnosima biljne vrste sa drugim biljnim vrstama. Najzastupljeniji sekundarni



metaboliti u biljkama su polifenolna jedinjenja, kod kojih je aromatični prsten supstituisan sa barem jednom hidroksilnom grupom (slobodnom ili etarski, estarski ili glikozidno modifikovanom). Ima ih preko 8000, od prostih molekula kao što su fenolne kiseline, pa sve do visoko polimerizovanih jedinjenja kao što su tanini [101]. Najčešće se klasifikuju prema broju ugljenikovih atoma vezanih za osnovni skelet fenola (tabela 2) [111].

Tabela 2. Klasifikacija fenolnih jedinjenja

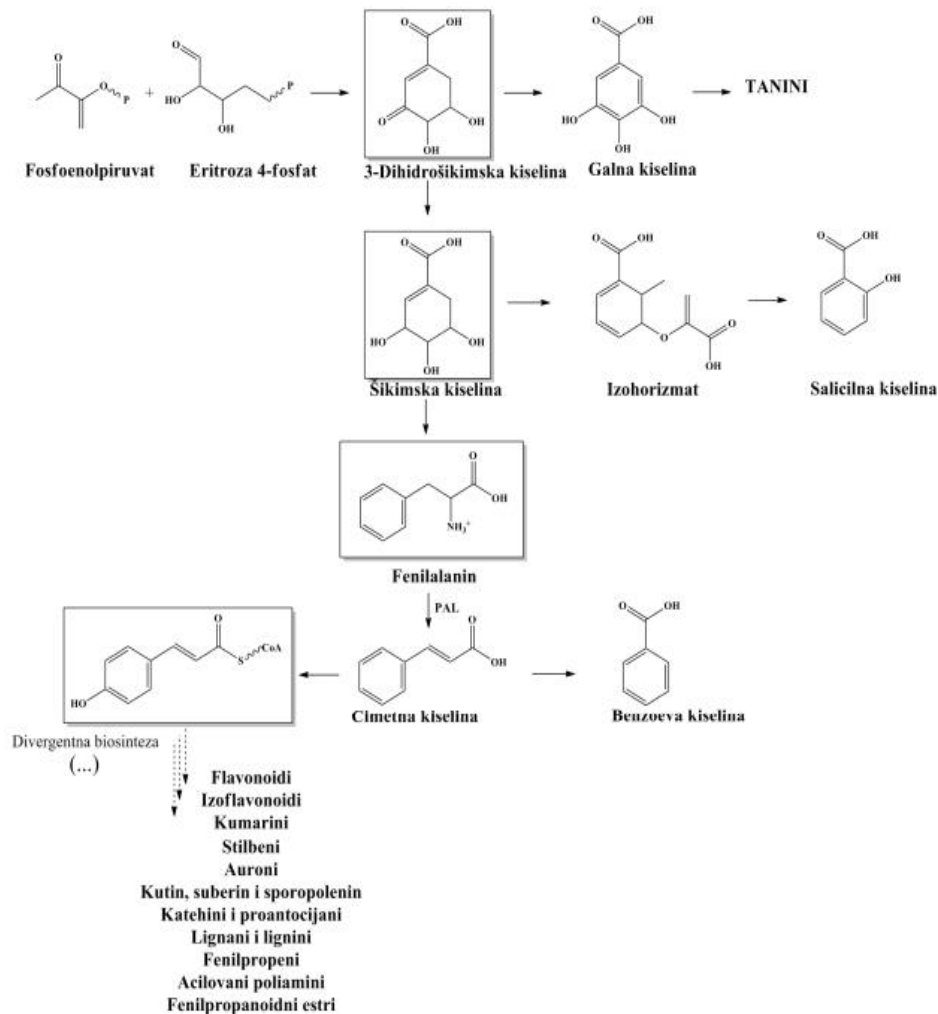
Ugljovodonični skelet	Klasa
C <sub>6</sub>	Prosti fenoli
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Hidroksibenzojeve kiseline
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Fenilsirćetne kiseline Cimetne kiseline
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Fenilpropani Kumarini Hromoni
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftohinoni
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Ksantoni Stilbeni
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Antrahinoni
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoidi
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Biflavonoidi
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignani
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Lignini
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Kondezovani tanini

S obzirom da njihova redovna konzumacija umanjuje rizik od pojave brojnih oboljenja [101-105], a nalaze se u prehrambenim proizvodima biljnog porijekla u značajnim količinama, prirodna fenolna jedinjenja su poslednjih decenija centar interesovanja mnogih istraživačkih grupa. Najčešći predmet istraživanja su fenolne kiseline, flavonoidi i tanini.

Prirodna aromatična jedinjenja nastaju tokom dva biosintetička puta: ciklusa šikimske kiseline i acetatno-malonatnog ciklusa, pri čemu se formira osnovna strukturna jedinica flavonoida C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Metabolički put šikiminske kiseline (slika 6) je osnova biosinteze fenolnih jedinjenja u biljkama, pri čemu nastaju aromatične aminokiseline (najčešće fenilalanin, ređe tirozin i triptofan). Supstrat za sintezu aromatičnih aminokiselina, šikimska kiselina, nastaje u nizu reakcija kondenzacijom fosfoenolpiruvata (glikoliza) i D-eritroza-4-fosfata (pentoza-fosfatni put). Ovim biosintetičkim putem aromatičnih aminokiselina, nazvanim ciklus šikimske kiseline, nastaju jedinjenja C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> tipa (fenilpropanoidi), odnosno B i C prsten flavonoida [106,107]. Fenilalanin-amonijum liaza (PAL) katalizuje reakciju otpuštanja amonijaka iz fenilalanina, pri čemu nastaje cimetna kiselina. Uvođenjem hidroksilne grupe u para položaj cimetne kiseline nastaje kumarinska kiselina. Dalja hidroksilacija kumarinske kiseline u položaju 3 vodi formiranju kafene, dok hidroksilacija u položaju 3 i 5 uz istovremeno metilovanje ovih položaja dovodi do formiranja ferulne i sinapinske kiseline [106]. Ova jedinjenja sadrže fenil grupu i bočni lanac od tri C atoma, jednim imenom se nazivaju fenilpropanoidi (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), i služe kao prekursori u sintezi lignina i mnogih drugih jedinjenja.

Takođe, metabolizmom ugljenih hidrata i masnih kiselina nastaje sirćetna kiselina, koja se aktivira (acetil-CoA) i potom prevodi u malonil-CoA. Ovaj biosintetički put je acetatno-malonatni ciklus i omogućava nastanak prstena A flavonoida [106,108]. Flavonoidi, uključujući flavone, izoflavone i antocijanidine, nastaju kondenzacijom fenilpropanoida. Uz učešće tri molekula malonil-koenzima A, a zatim kondenzacijom novonastale jedinice sa *p*-kumarinskom kiselinom formira se

halkon, koji postepeno ciklizuje i dolazi do stvaranja naringenina (flavon). Ova tačka u biosintezi predstavlja “tačku grananja”, i od nje polazi sinteza raznih strukturnih klasa flavonoida [106,109].

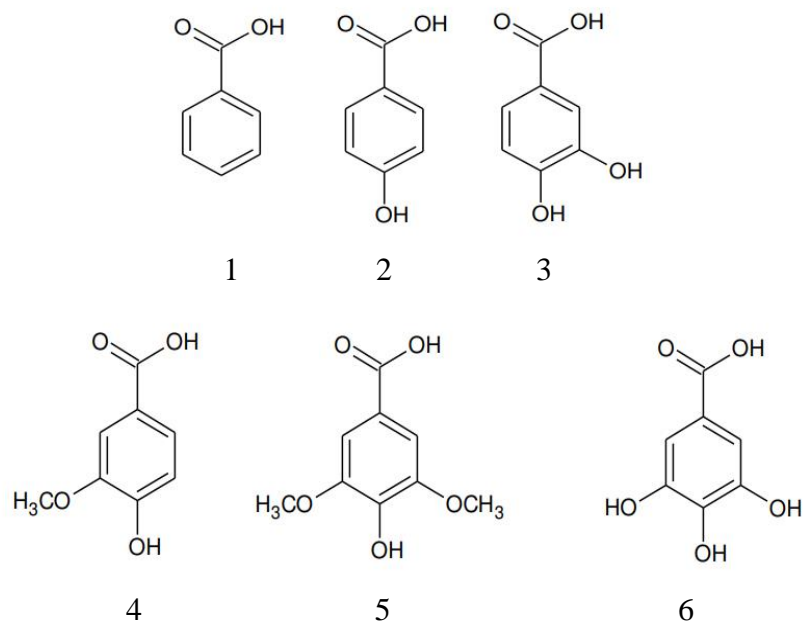


Slika 6. Fenilpropanoidni biosintetski put ili put šikimske kiseline [110]

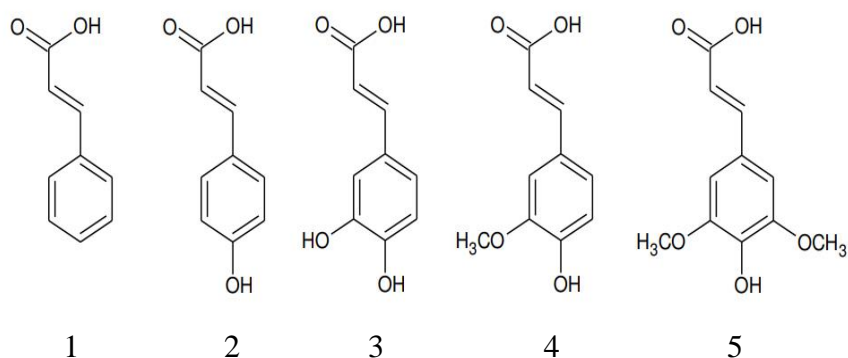
## 2.11. Fenolna jedinjenja

### 2.11.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su velika grupa fenolnih jedinjenja koju čine hidroksi-derivati benzoeve i cimetne kiseline. Derivati benzoeve kiseline, hidroksibenzoeve kiseline, koje se često zovu fenolne kiseline, imaju C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> strukturu (slika 7), dok derivati cimetne kiseline, hidroksicimetne ili fenilpropenske kiseline, imaju C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> strukturu (slika 8) [111-113]



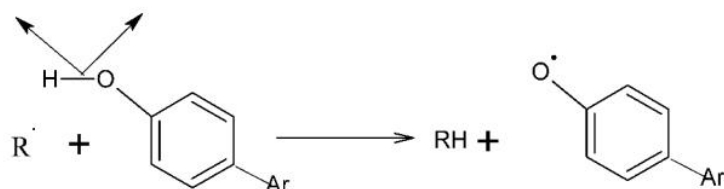
Slika 7. Strukture derivata benzoeve kiseline: (1) benzoeva kiselina, (2) *p*-hidroksibenzoeva kiselina, (3) protokatehinska kiselina, (4) vanilinska kiselina, (5) siringinska kiselina, (6) galna kiselina



Slika 8. Strukture derivata cimetne kiseline: (1) cimetna kiselina, (2) *p*-kumarinska kiselina, (3) kafena kiselina, (4) ferulna kiselina, (5) sinapinska kiselina.

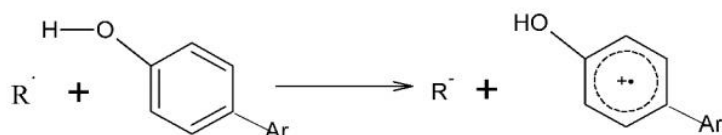
Postoje dva mehanizma kojima antioksidansi (ArOH) i fenolne kiseline inaktiviraju slobodne radikale [114-116]:

1. transferom atoma vodonika (HAT- hydrogen atom transfer) (slika 9) i



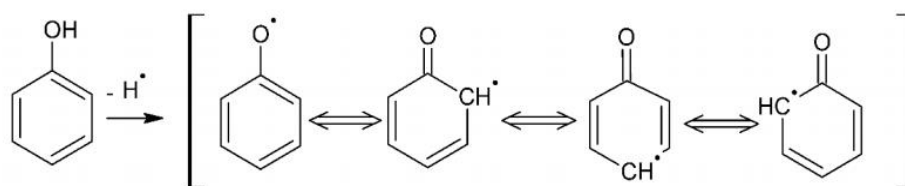
Slika 9. Šematski prikaz nastanka fenoksil radikala HAT mehanizmom [114]

2. transferom jednog elektrona (ET-electron transfer) (slika 10).



Slika 10. Šematski prikaz nastanka fenoksil radikala ET mehanizmom [114]

Prema prvom mehanizmu ( $\text{ArOH} + \text{R}^\bullet \rightarrow \text{ArO}^\bullet + \text{RH}$ ) kao proizvodi nastaju bezopasni RH i oksidovani fenoksil radikal. Prilikom procjene antioksidativne aktivnosti jedinjenja najbitnija njihova odlika je energija disocijacije O-H veze. Manja energija ove veze znači da se lakše otpušta vodonik i da je nastali fenoksil radikal stabilniji, odnosno da je veća antioksidativna aktivnost jedinjenja [114,115]. Stabilnost nastalog fenoksil radikala posledica je delokalizacije nesporenog elektrona preko tri ugljenikova atoma aromatičnog prstena, i djelimično atoma kiseonika, uz postojanje više rezonantnih formi (slika 11) [114,115]. Dodatnu stabilnost fenoksil radikal daje i prisustvo druge hidroksilne grupe u orto i para položaju prstena [114,117], a takođe i treće hidroksilne grupe (više od tri hidroksilne grupe ne dovode do povećanja antioksidativne aktivnosti) [114,118]. Kafena kiselina koja ima drugu hidroksilnu grupu u orto položaju je efikasniji antioksidans od ferulne kiseline [114,119,120]. Zbog prisustva treće hidroksilne grupe na prstenu galna kiselina je jedan od najjačih fenolnih antioksidanasa, zbog čega se često koristi kao standard za određivanje antioksidativnih svojstava jedinjenja [114,118].



Slika 11. Stabilizacija fenoksil radikala [114]

Antioksidativni kapacitet derivata cimetine kiseline veći je u odnosu na derivate *p*-hidroksibenzoeve kiseline. To se može objasniti uticajem konjugovane dvostruke veze u bočnom lancu na povećanje stabilnosti fenoksil radikala, odnosno povećanje antioksidativnih osobina. Uz to, derivati *p*-hidroksibenzoeve kiseline, zbog prisustva elektronakceptorske karboksilne grupe na prstenu, teže otpuštaju vodonikov atom iz hidroksilnih grupa [114,121]. Protivnici ove teorije upućuju na vezu između konformacije molekula fenolnih kiselina i njihove antiradikalske aktivnosti, negirajući značaj etilenskog bočnog lanca na prstenu [114,120,122].

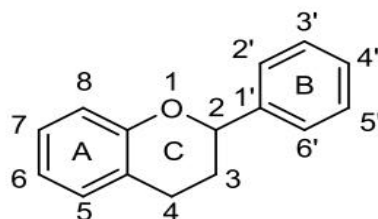
Na stabilnost utiču i supstituenti kao i njihov položaj na prstenu preko rezonantnog i induktivnog efekta. Npr. ferulna kiselina, koja ima metoksi grupu u orto položaju, ima veći antioksidativni potencijal od *p*-kumarinske kiseline, a vanilinska od *p*-hidroksibenzoeve kiseline. Takođe, uvođenje dodatne metoksi grupe u orto položaju dovodi do povećanja antioksidativne aktivnosti, pa je sinapinska kiselina jače antioksidativno sredstvo od ferulne, a siringinska od vanilinske [114,118].

Prema drugom mehanizmu inaktivacije slobodnih radikala ( $\text{ArOH} + \text{R}^\bullet \rightarrow \text{ArO}^{+\bullet} + \text{R}^-$ ), fenolne kiseline se ponašaju kao donori elektrona pri čemu nastaje pozitivno naelektrisan fenoksil radikal. Antioksidativna aktivnost jedinjenja se ovdje određuje njegovim jonizacionim potencijalom, a stabilnost nastalog radikala, kao i u prethodnom mehanizmu, zavisi od njegove strukture [114,115].

Postoji i treći antioksidativni mehanizam vezan za fenolna jedinjenja polifenole, koji heliraju prelazne metale, onemogućavajući ih da učestvuju u reakcijama u kojim nastaju slobodni radikali, poput Fentonove reakcije [114,115].

## 2.11.2. Flavonoidi

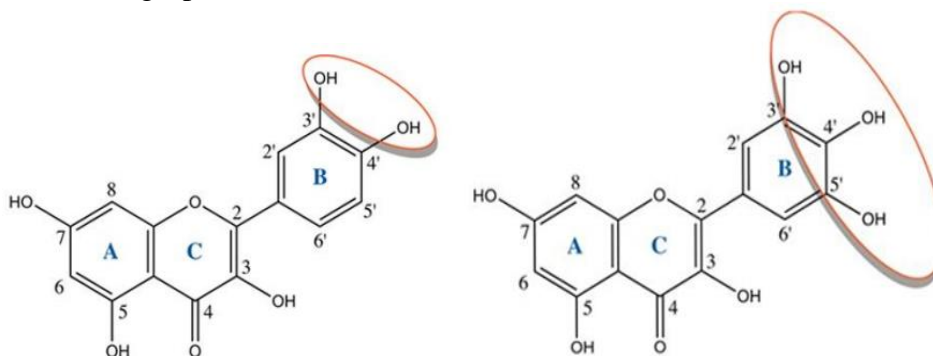
Flavonoidi su najveća grupa fenolnih jedinjenja u biljkama, sa preko 10 000 strukturnih varijacija [123,124,125]. Zajednička karakteristika flavonoida je osnovna flavanska struktura sastavljena od 15 C-atoma ( $C_6-C_3-C_6$ ), koji su raspoređeni u tri prstena (A, B i C), odnosno dva benzenska prstena A i B, povezana s piranskim prstenom C [126,127]. Flavonoidi kod kojih je prsten B vezan u položaju 3 prstena C nazivaju se izoflavoni. Oni čiji prsten B je vezan u položaju 4 su neoflavonoidi, dok se flavonoidi čiji je prsten B vezan u položaju 2 dalje dijele u nekoliko klasa u zavisnosti od strukturnih karakteristika prstena C (flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanonoli, flavanoli, anticijanidini i halkoni) [126,128] (slika 12).

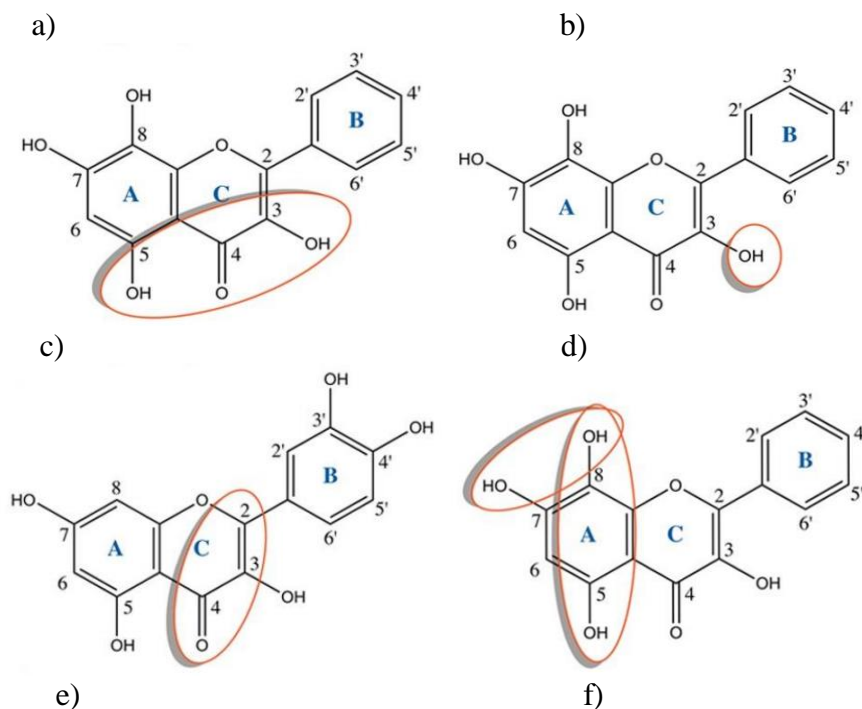


Slika 12. Skelet flavonoida

Brojne raznovrsne strukture flavonoida su rezultat modifikacija njihovih osnovnih struktura, kao što su: dodatne hidroksilacije, O-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezivanje neorganskog sulfata i najvažnije, glikolizacije hidroksilnih grupa (nastajanje O-glikozida) ili flavonoidnog jezgra (nastajanje C-glikozida) [129]. U prirodi se najčešće srijeću jedinjenja sa hidroksilnim grupama u C-3' i C-4' položaju i nešto manje sa jednom hidroksilnom grupom u položaju C-4'. Šećerna komponenta flavonoida je najčešće vezana u položaju C-3 i ređe u položaju C-7. Kao šećerna komponenta najčešće se javlja glukoza, a ređe galaktoza, ramnoza i ksiloza [130,131].

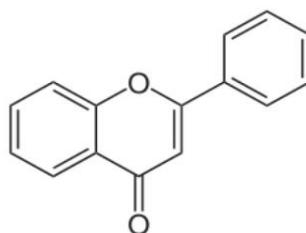
Kao i kod ostalih fenolnih jedinjenja, visoka antioksidativna aktivnost flavonoida zavisi od njihove strukture i prisustva supstituenata. Hidroksilne grupe B prstena su zadužene za doniranje molekula vodonika. *o*-Dihidroksi (katehol) struktura B prstena pruža veću stabilnost strukturi radikala (slika 13a), a najveću pirogalol grupa (hidroksilne grupe na 3', 4'- i 5'- pozicijama B prstena) (slika 13b). Takođe je značajno prisustvo 3-OH grupe C prstena i 5-OH grupe A prstena koje su u blizini 4-okso grupe na C prstenu (slika 13c). Prisustvo slobodne 3-OH grupe je važno zbog mogućih daljih modifikacija (npr. 3-O-glikozilacija) koje se odražavaju na smanjenje antioksidativnog kapaciteta (slika 13d). Kao strukturni činilac za dobru antioksidativnu aktivnost pokazala se i dvostruka veza između C-2 i C-3 piranskog prstena C koja je konjugovana sa 4-okso grupom i koja omogućava veću delokalizaciju elektrona prstena B (slika 13e). U A prstenu dodatna hidroksilacija na poziciji 8 povećava stabilnost što važi za 5,8- i 7,8-hidroksilacije (slika 13f), dok 5,7 hidroksilacija ima mali uticaj. Takođe 7-hidroksil grupa kao pojedinačna ima manji značaj, u odnosu na već navedenu pojedinačnu 5-hidroksil grupu [132,133].





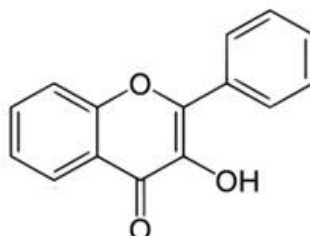
Slika 13. Osnovne strukturne karakteristike koje karakterišu antioksidativnu aktivnost flavonoida. Oblasti zaokružene crvenom bojom ukazuju na grupe koje su odgovorne za antioksidativnu funkciju. Slova A, B i C označavaju prstene u molekulu flavonoida [132,133].

Flavoni (luteolin, apigenin...) sadrže keto grupu i imaju nezasićenu dvostruku vezu u središnjem prstenu (slika 14).



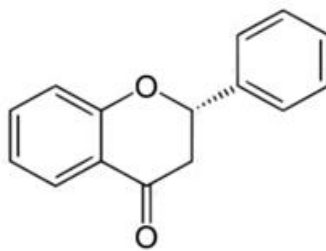
Slika 14. Flavoni

Flavonoli (kamferol, kvercetin i miricetin), osim navedenog, sadrže i OH grupu na položaju 3 C prstena (slika 15).



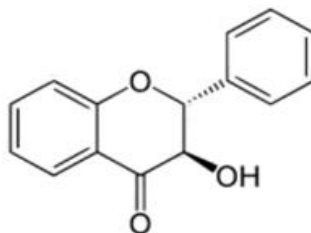
Slika 15. Flavonoli

Skelet flavanona (hesperetin i naringenin) karakteriše prisustvo keto grupe, ali i prisustvo zasićene veze između drugog i trećeg atoma u centralnom prstenu (slika 16).



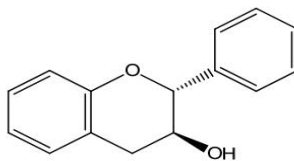
Slika 16. Flavanoni

Flavanonoli (taksifolin) su dihidroflavonoli (često se javljaju u taninima i drvetu) (slika 15).



Slika 17. Flavanonoli

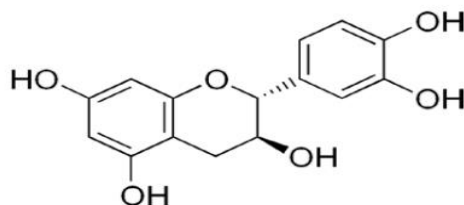
Flavanoli (Flavan-3-oli) su gradivne jedinice tanina. Definisani su prisustvom hidroksilne grupe na C-3 prstenu, a ne postoji dvostruka veza između C-2 i C-3, niti karbonilna grupa na C-4 u prstenu, zbog čega ova jedinjenja imaju dva hiralna centra (na C-2 i C-3) [134,135]. Katehin je izomer sa trans konfiguracijom, dok epikatehin ima cis konfiguraciju (slika 18).



Slika 18. Flavanoli

Osim monomernih, postoje oligomerni i polimerni oblici koji se nazivaju proantocijanidini [134,136].

Tanini su složena polifenolna jedinjenja. Dije se na dvije grupe: lako hidrolizabilne tanine (estri galne i elaginske kiseline) i kondenzovane tanine (proantocijanidini) [13,134]. Obje grupe imaju sposobnost taloženja proteina. Nastanak kondenzovanih tanina se zasniva na kondenzaciji monomernih flavan-3-ola katehina (slika 19) (trans derivata flavan-3-ola) i/ili leukoantocijanidina (derivate flavan - 3,4 – diola - monomernog proantocijanidina).

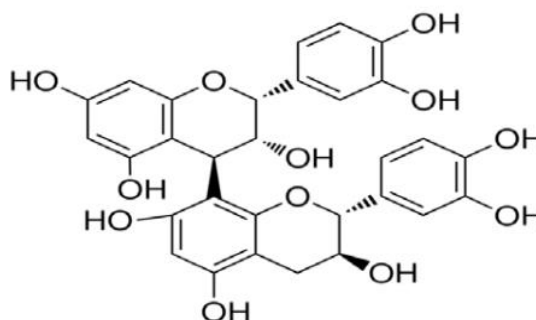


Slika 19. Struktura (+)-katehina

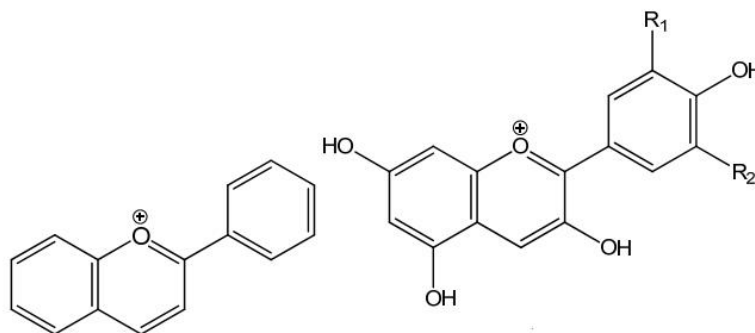
Veza se ostvaruje između C-4 atoma heterocikličnog prstena jedne i C-8 ili C-6 atoma susjedne monomernne jedinice. U zavisnosti od ove veze dijele se u dvije grupe: proantocijanidi B-tipa (slika 20) (sastoje se od dvije jedinice flavan-3-ola na C-4 i C-8 (B<sub>1</sub>-B<sub>4</sub>) ili C-4 i C-6 (B<sub>5</sub>-B<sub>8</sub>)) i proantocijanidi A-tipa (koji posjeduju i epoksidnu vezu između C-5 ili C-7 i C-2 [137-139]).

Dalje se polimerizuju u kiseloj sredini uz enzim oksidazu. Kondenzovani tanini se ne mogu hidrolizovati u blagim kiselim uslovima, ali mogu pod ekstremnim (zagrijevanje u jačoj kiselini).

Hidrolizirajući tanini se sastoje iz glukoze ili polihidroksilnog alkohola (poliola), koji su parcijalno ili potpuno esterifikovani galnom kiselinom gradeći galotanine, ili sa heksa hidroksidifenilnom kiselinom gradeći elagitanine. Galni tanini su nestabilni, razlažu se pod uticajem enzima tanaze, kiselina ili baza, ili jednostavnim kuvanjem u vodi. Elagi tanini su nešto stabilniji i razlažu se u kiseloj sredini.

Slika 20. Struktura procijanidina B<sub>2</sub>

Antocijani se uvijek javljaju u obliku glikozida antocijanidina, koji je flavonoid zaslužan za plavu, ljubičastu, roza i crvenu boju ploda biljke (slika 21). Antocijanidini imaju hidroksilnu grupu na mjestu 3 C prstena, i većina su penta- ili heksa-supstituisani hidroksilnom ili metoksi grupom, u položajima 5 i 7 A prstena, i 3', 4' i 5' B prstena. U odnosu na hidroksilne grupe B prstena postoje tri vrste antocijana: pelargonidin, cijanidin i delfinidin, a metilovanjem ovih grupa nastaju još tri: peonidin, petunidin i malvidin. Metilovanje je u položaju 3' i 5', a slobodna 4' hidroksila grupa je značajna za promjenu boje ovih jedinjenja jer apsorbuje svjetlost manjih talasnih dužina, dok metoksi grupe ekscitovane svjetlošću pomjeraju apsorpciju ka većim talanim dužinama [129].

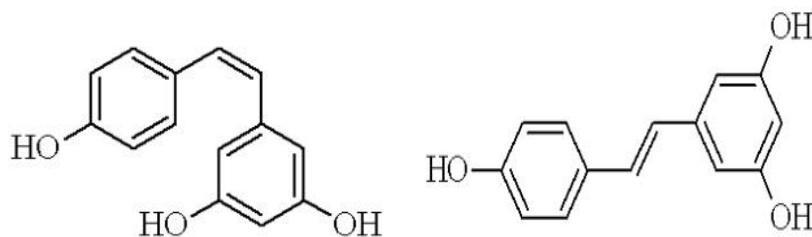


Aglikoni	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Cijanidin	OH	H
Peonidin	OCH <sub>3</sub>	H
Delfinidin	OH	OH
Malvidin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Pelargonidin	H	H
Petunidin	OCH <sub>3</sub>	OH

Slika 21. Osnovna struktura antocijana

Stilbeni imaju C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> strukturu (dva aromatična jezgra premoštena etanskim ili etenskim mostom [137,140]. Predstavnici su cis- i trans-resveratrol, cis- i trans-piceid, astingin, astringin i viniferin (slika 22).





Slika 22. *cis*-resveratrol (A) i *trans*-resveratrol (B) (3,5,4'-trihidroksistilben)

## 2.12. Ekstrakcija fenolnih jedinjenja

Pripremanje biljnih preparata dovodi do hemijskih promjena većine aktivnih ljekovitih supstanci. To se naročito dešava u fazi ekstrakcije, usled primjene rastvarača ili tehnološkog procesa. Stoga je neophodno izvršiti što bolji izbor ekstragensa za kvantitativniju i selektivniju ekstrakciju agensa uz minimalno prisustvo primjesa, što čini ekstrakciju najvažnijom fazom izolacije bioaktivnih jedinjenja [141].

Nije jednostavno odrediti najpogodniji rastvarač. Konvencionalne ekstrakcione tehnike (maceracija, hidrodestilacija i Soxhlet ekstrakcija) se zasnivaju na selektivnosti različitih rastvarača prema željenoj komponenti. Kao rastvarači se koriste voda, etanol, hloroform, etil acetat, metanol i drugi. Prednost se daje etanolu usled njegove netoksičnosti, i samim tim mogućoj daljoj primjeni dobijenih ekstrakata u farmaciji i prehrambenoj industriji. Prilikom izbora rastvarača treba uzeti u obzir njegovu polarnost, viskoznost i površinski napon. Smješa etanola i vode, relativno polarni rastvarač, iz polaznog materijala ekstrahuje polarne komponente fenole, flavonoide, tanine, šećere, glikozide, soli, neke vitamine i druga jedinjenja [141,142]. Smanjenje viskoznosti rastvarača povećava koeficijent difuzije, i smanjenje površinskog napona takođe ubrzava ekstrakciju. Uslovi ekstrakcije su od izuzetne važnosti, pa povećanje temperature ekstrakcije, smanjujući viskoznost rastvarača povećava sadržaj ekstrakta. Takođe bitna komponenta je i vrijeme trajanja ekstrakcije, čijim povećanjem se povećava i prinos, s tim što prekomjerno produžena ekstrakcija može dovesti do degradacije traženih komponenata [143].

## 2.13. Analitičke metode za ispitivanje hemijskog sastava ekstrakata borovnice

### 2.13.1. Metode mjerenja aktioksidativne aktivnosti

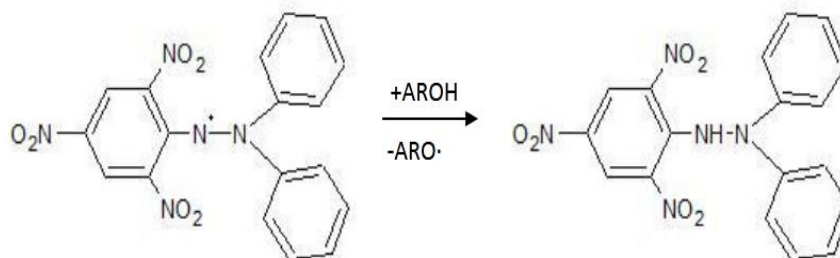
Metode mjerenja antioksidativne aktivnosti mogu se podijeliti u tri kategorije: spektrofotometrijske, elektrohemijske i hromatografske metode [144].

#### 2.13.1.1. Spektrofotometrijske metode

DPPH metoda (Scavenging of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical assay)

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH<sup>•</sup>) je stabilan radikal sa delokalizovanim nesparenim elektronom na azotu, pri čemu delokalizacija uzrokuje pojavu ljubičaste boje sa maksimumom apsorpcije od 515 do 517 nm. Redukciju DPPH radikala vrše antioksidansi ispitivanog uzorka (donori vodonika ili elektrona), pri čemu nastaje difenilpikrilhidrazilin DPPH-H, koji je žuto obojen [145-148] (slika 23). Promjena boje ovog ljubičastog rastvora u žutu, prilikom redukcije, analizira se

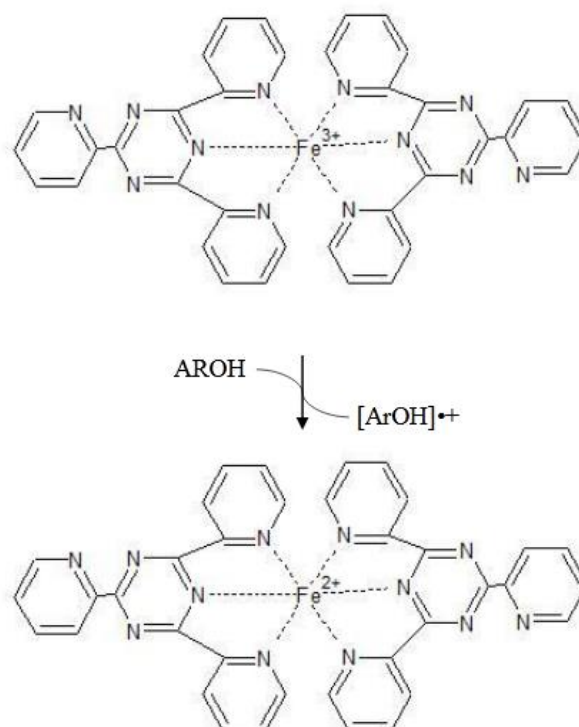
primjenom spektrofotometrije, čime se zapravo određuje sposobnost neutralizacije DPPH radikala ispitivanim uzorkom [145,149-151]. Rezultati se predstavljaju onom količinom antioksidansa koja smanjuje koncentraciju radikala za 50%, i to je njegova efikasna koncentracija ( $IC_{50}$ ). Veće vrijednosti  $IC_{50}$  antioksidansa ukazuju na to da je uzorak manjeg antioksidativnog kapaciteta.



Slika 23. Reakcija DPPH radikala s antioksidansom ArOH prikazana strukturnim formulama [144]

#### FRAP metoda (Ferric ion reducing antioxidant power assay)

FRAP metoda (slika 24) se zasniva na sposobnosti antioksidansa da doniranjem elektrona u kiselj sredini (pH 3,6) redukuje žuti kompleks gvožđe-2,4,6-tripiridil-S-triazin  $[Fe(III)-(TPTZ)_2]^{3+}$ , do intenzivno plavo obojenog kompleksa  $[Fe(II)-(TPTZ)_2]^{2+}$ , pri čemu se spektrofotometrijski mjeri intenzitet ove plavo nastale boje na 593 nm. Teorijski, svako jedinjenje sa redoks potencijalom nižim od redoks potencijala para Fe(III)/Fe(II) može redukovati Fe(III) do Fe(II) i usloviti visoke rezultate FRAP- vrijednosti, ali je ova reakcija zavisna od vremena [145, 152,153]. Obično je posmatrani vremenski interval 4 minuta, u okviru kojeg se na osnovu brzine redukcije procjenjuje antioksidativni kapacitet uzorka.



Slika 24. Reakcija koja se događa FRAP metodom prikazana strukturnim formulama [144]

### 2.13.1.2. Elektrohemijske metode

#### Ciklična voltametrija

Ova tehnika se sastoji iz reverzne, linearne promjene elektrodnog potencijala od početne do vrijednosti za krajnji potencijal, a onda do vrijednosti potencijala gašenja (što ne mora da bude potencijal koji je isti kao i početni). Za proces oksidacije obično se polazi od elektrodnog potencijala na kome nema oksidacije i u toku snimanja elektrodni potencijal se mijenja prema pozitivnijim vrednostima. Obrnuto, za proces redukcije polazi se od elektrodnog potencijala na kome nema redukcije, a elektrodni potencijal se mijenja prema negativnijim vrijednostima. Nakon postizanja konačne vrijednosti elektrodnog potencijala, koji se za primjer oksidacije obično postavlja na vrijednost manju od potencijala oksidacije rastvarača ili osnovnog elektrolita, elektrodni potencijal se vraća do potencijala gašenja [154,155].

U voltametrijskim eksperimentima se najčešće koriste tri elektrode: radna, pomoćna i referentna. Radna i pomoćna elektroda su razdvojene, a referentna je postavljena blizu radne elektrode i sadrži Haber-Ludtinov-u kapilaru da bi se smanjio gubitak otpora. U ćelijama sa dobrim miješanjem u većini slučajeva se može koristiti isti rastvor za više mjerenja. Za voltametrijska ispitivanja se koristi širok opseg rastvarača (nevodenih i vodenih) i pomoćnih elektrolita (obično koncentracije 0.1 M), uključujući i popularne tetraalkilamonijum-soli. S obzirom da je ispitivana supstanca najčešće koncentracije reda veličine  $10^{-4}$  M ili čak i manje, tragovi nečistoća mogu imati štetan uticaj na voltametrijska određivanja. Izbor rastvarača i pomoćnog elektrolita zavisi od toga šta se analizira, kao i od rastvorljivosti ispitivanog analita [154,155].

Do sada je ovom metodom analiziran veliki broj različitih prirodnih fenolnih jedinjenja [156-161]. Iako testovi ne dozvoljavaju određivanje individualnih antioksidanasa u kompleksnim smješama, ona daje važne informacije o količini glavnih grupa fenola, kao što su katehini, galati, antocijani, monofenoli.

Za određivanje i procjenu antioksidativnog kapaciteta cikličnom voltametrijom mogu se koristiti sledeći parametri:  $I_{a2}$  – vrijednost intenziteta anodne struje koja je proporcionalna koncentraciji komponenata u ispitivanom uzorku;  $E_{pa}$  – oksidacioni potencijal, čija vrijednost izražava redoks svojstva antioksidanasa i  $Q$  – površina ispod anodnog talasa koja se predlaže kao bolji parametar za procjenu antioksidativnog kapaciteta u odnosu na vrijednost  $I_{a2}$ .

Često se za procjenu antioksidativnog kapaciteta koristi i odnos oksidacionog potencijala i površine ispod anodnog talasa ( $E_{pa}/Q$ ). Međutim, kada je odsutan povratni katodni potencijal, kao u slučaju galne kiseline, osim naprijed navedenih parametara koristi se i  $E_{sred}$  – srednji potencijal čija vrijednost odgovara potencijalu između anode i katode, i polutalasnog potencijala-  $E_{p/2}$  [154,158].

Na slici 25 prikazana je aparatura korišćena za određivanje antioksidativnog kapaciteta uzoraka metodom ciklične voltametrije.



Slika 25. Aparatura korišćena za metodu ciklične voltametrije

### 2.13.2. Hromatografske metode

Hromatografija je skup laboratorijskih tehnika za razdvajanje antioksidanasa iz smješa, ali se može koristiti i za njihovu analizu. Osnovni princip rada je da različite komponente uzorka različito reaguju sa istom supstancom sa kojom se dovode u kontakt. Pokretna (mobilna) faza, gasovitog ili tečnog agregatnog stanja, sadrži rastvoreni uzorak koji se prevodi preko nepokretne (stacionarne) faze koja je fiksirana na hromatografskoj koloni ili ploči. U tom prostoru se odvija interakcija između ove dvije faze, pri čemu svaka komponenta mobilne faze pokazuje različitu reakciju u vidu određenog stepena rastvaranja, adsorpcije ili jednostavno hemijske reakcije. Nepokretna faza može ispunjavati cijelu kolonu ili samo njene zidove, pri čemu razlikujemo punjene i kapilarne kolone. Ispiranje uzorka sa stacionarne faze vrši se rastvaračem koji se naziva eluent, a proces eluiranja. Vrijeme potrebno da komponente uzorka prođu kroz kolonu pri određenim uslovima (temperatura, pritisak, eluent, brzina eluiranja, i vrsta nepokretne faze) naziva se retenciono vreme ( $t_R$ ) i zavisi od fizičkih i hemijskih osobina komponenata u datim uslovima. Komponente smješe se detektuju detektorom u vidu signala, čiji je intezitet srazmjeran koncentraciji komponente. Prikaz rezultata jedne hromatografske tehnike se naziva hromatogram. Njime se grafički prikazuje zavisnosti detektovanog signala od vremena prolaska uzorka kroz kolonu [162].

Hromatografski postupak se može koristiti za djelimično ili potpuno razdvajanje komponenti smješe (preparativna hromatografija), ali i za kvalitativnu i kvantitativnu analizu (analitička hromatografija).

U odnosu na fizičko stanje faza, razlikujemo gasnu i tečnu hromatografiju. U slučaju gasne hromatografije mobilna faza je u gasnom agregatnom stanju, a noseći gas je hemijski inertno jedinjenje (azot ili argon), dok stacionarna faza može biti čvrsta ili tečna (ako je čvrsta dolazi do adsorpcije na njoj: gasno-čvrsta adsorpciona hromatografija; ukoliko je tečna dolazi do rastvaranja u njoj: gasno-tečna podiona hromatografija). Gasnom hromatografijom se vrši i kvalitativna i kvantitativna analiza gasnih i tečnih uzoraka. Kada je u pitanju tečna hromatografija, čija je pokretna faza u tečnom agregatnom stanju, stacionarna faza je takođe čvrsta ili tečna. U slučaju čvrste stacionarne faze, reakcija je takođe adsorpciona: tečna adsorpciona hromatografija, a u slučaju tečne stacionarne faze (koja se nanosi na čvrst nosač) dolazi do rastvaranja u tečnosti: tečna podiona hromatografija [162,163].

Prema mehanizmu razdvajanja komponenti ispitivanog rastvora metode se dijele na: particione (apsorpcione); adsorpcione; jonoizmenjivačke; gel-hromatografije.

#### 2.13.2.1. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC)

Tečna hromatografija visokih performansi (tečna hromatografija pri visokim pritiscima), poznatija kao HPLC (High performance liquid chromatography ili high pressure liquid

chromatography) je oblik hromatografije kojim se na koloni efikasno razdvajaju komponente uzorka, čak i kod vrlo kompleksnih smješa. Zbog toga se primjenjuje u analitičkoj hemiji i biohemiji, u naučne i industrijske svrhe. Princip funkcionisanja je zasnovan na pumpanja analita u rastvarač (mobilna faza) kroz kolonu (u kojoj se nalazi stacionarna faza) u uslovima visokog pritiska, što obezbjeđuje kontinuirani protok mobilne faze i njegove dinamičke ravnoteže sa stacionarnom fazom (što je uslov dobre selektivne raspodjele komponenti). Upravo je izloženost analita visokom pritisku ono što razlikuje HPLC od ostalih metoda [162].

Rastvarači polarne mobilne faze su vodeno-organske smješe (metanol, acetonitril ili kombinacija ova dva rastvarača) koje treba da su mješljive i da ne dovode do taloženja. Različiti polaritet komponenti analita uzrokuje da se reakcija između dvije faze (prilikom prolaska analita kroz kolonu) odvija različitim brzinama: oni analiti koji imaju najveći broj interakcija sa rastvaračem mobilne faze, a najmanji sa stacionarnom fazom, brže će izaći iz kolone. Takođe, temperatura utiče na određivanja kod HPLC-a, posebno kada je reč o rastvorima male molekulske mase [162].

HPLC aparat se sastoji od: jednog ili više rezervoara za rastvarač (obično najmanje dva), pumpe visokog pritiska, kolona, injektora (sistema za ubrizgavanje) i detektora. Pumpa stvara pritisak od oko 106 Pa. Čestice stacionarne faze su malih dimenzija, 3-5 $\mu$ m u prečniku, i velike specifične površine koja im omogućava bolje razdvajanje komponenti. One gusto popunjavaju kolone, koje su pravljene od čelika da bi izdržale visok pritisak. Detektori mogu biti UV/VIS detektori, plameno-jonizacioni detektori (FID), maseni (MS), NMR i drugi.

Na slici 26 prikazan je tečni hromatograf visokih performansi korišćen za analizu ispitivanih uzoraka.



Slika 26. Tečni hromatograf visokih performansi (HPLC) korišćen za analizu ispitivanih uzoraka

### 2.13.3. Određivanje sadržaja metala

#### 2.13.3.1. Indukovano spregnuta plazma – optička emisiona spektroskopija (ICP-OES)

ICP-OES je kvantitativna i kvalitativna analitička metoda koja kao izvor pobuđivanja elemenata koristi indukovanu spregnutu plazmu. Plazma je jonizovan gas koji je makroskopski neutralan, a za čiju se proizvodnju koristi argon (rjeđe azot). Argon (Ar) je prirodni, plemeniti, hemijski inertan gas, koji ne reaguje sa jonima iz uzorka a ima visoku energiju jonizacije (15.8 eV), što je dovoljno za jonizaciju velikog broja elemenata periodnog sistema, koji imaju prvi jonizacioni potencijal između 4-12 eV. Ispitivani uzorci, koji su u tečnom stanju, uvode se u aparat uz pomoć sistema za raspršivanje rastvora da bi se preveli u aerosol. Aerosol se potom uvodi u plazmu gdje dolazi do njegove desolvatacije, atomizacije, disocijacije, jonizacije i ekscitacije (generišu se



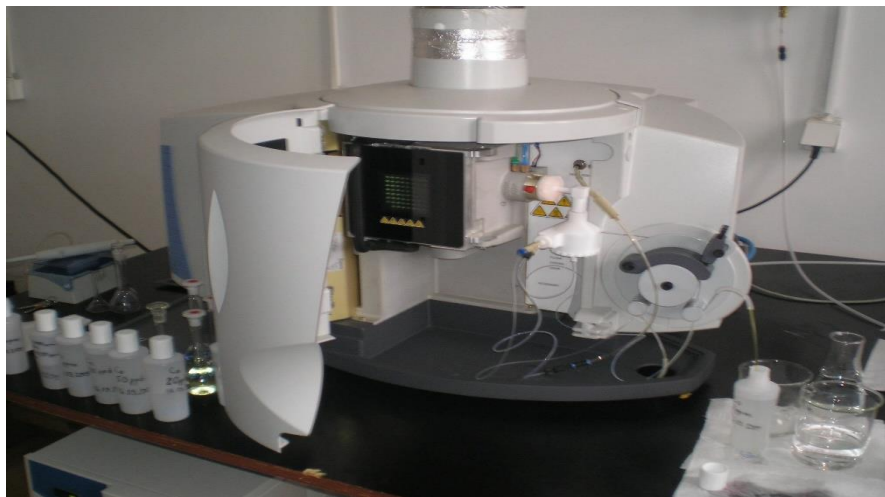
slobodni joni). Elektromagnetno zračenje potom stiže do detektora i selektuje se prema talasnim dužinama pomoću spektrometra. Energija zračenja selektovane talasne dužine koja stiže do detektora se pretvara u električni signal i njegov intenzitet se mjeri [164-166].

Formiranje plazme se odvija u plazmeniku (eng. torch) koji se sastoji od tri koncentrične kvarcne cijevi. Argon za formiranje plazme se uvodi kroz srednju cijev, sa protokom od 0.5 do 3 L/min, obezbjeđujući primarne elektrone i jone. Nošen strujom argona kao nosećeg gasa, sa protokom od 0,1 do 1.0 L/min., uzorak se uvodi kroz unutrašnju cijev. Spoljašnja cijev je najšira i kroz nju struji pomoćni gas (argon, azot ili vazduh) brzinom od 11 do 14 L/min., koji služi za hlađenje i stabilizovanje (centriranje) plazme. Oko spoljašnje cijevi se nalaze 3 – 4 navoja indukcionog bakarnog kalema, koji je povezan za radiofrekventni generator (frekvencije 5 – 50 MHz i izlazne snage 1 – 5 kW). Visokofrekventna struja, koja protiče kroz indukcionu kalem, stvara oscilatorno magnetno polje (H), koje indukuje elektrone u gasu. Elektroni se ubrzavaju vremenski promjenljivim električnim poljem, što dovodi do zagrijavanja i dodatne jonizacije. Dostizanjem dovoljne jonizacije i visoke temperature formira se plazmena baklja na izlazu iz gornjeg kraja kvarcne cijevi (dostiže i do 10 000 K). Ovako visoka temperatura omogućava isparavanje rastvarača, pri čemu nastaju čestice soli koje se razgrađuju-atomiziraju. Stepenn jonizacije nekog elementa u ICP-u zavisi od snage izvora, brzine protoka gasova (nosećeg i plazmenog) i potencijala jonizacije elemenata [164-166].

Svjetlost nastala u plazmi usmjerava se ka spektrometru pomoću niza konveksnih sočiva. U odnosu na način usmjeravanja svjetlosti razlikujemo dvije konfiguracije plazme: aksijalnu i radijalnu. Kod aksijalnog tipa spektrometar se nalazi u ravni plazme, a kod radijalnog tipa spektrometar je u normalnom položaju u odnosu na položaj plazme [164-166]. Za detekciju se koriste multikanalni detektori (CCD (charge-coupled device) i CID (charge-injection device)), koji se zasnivaju na CTD (charge-transfer device) tehnologiji. To su poluprovodnici sastavljeni od serije ćelija ili piksela koji akumuliraju naelektrisanje kada se izlože svjetlosti. Količina akumuliranog naelektrisanja je mjera količine svjetlosti kojoj je određen piksel bio izložen. Intezitet zraka odgovarajuće talasne dužine daje kvantitativne podatke o analiziranoj vrsti (talasna dužina emitovane svjetlosti je kvalitativni podatak, a intezitet talasne dužine kvantitativni). Glavne prednosti ovih detektora su: mogućnost odabira različitih analitičkih linija (talasnih dužina), korišćenje nekoliko linija istog elementa u cilju proširenja linearnog opsega i povećanja tačnosti, kao i identifikacije potencijalnih matriksa i spektralnih interferencija i mogućnost kvalitativne analize uzorka [164-166].

ICP-OES metoda se koristi za istovremeno određivanje preko 70 elemenata periodnog sistema. Granice detekcije za ove elemente su reda veličine ppb (engl. parts per billion).

Na slici 27 prikazan je Optički emisijski spektrometar indukovane kuplovane plazme korišćen za analizu ispitivanih uzoraka.



Slika 27. Optički emisijski spektrometar indukovane kuplovane plazme korišćen za analizu ispitivanih uzoraka

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Uzorkovanje borovnice i zemljišta

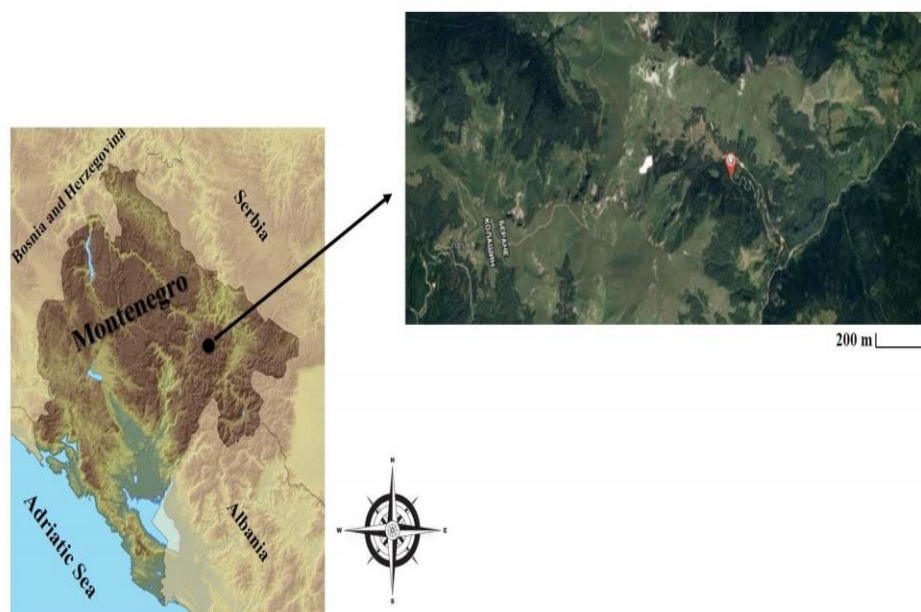
Borovnica (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) i njen zemljišni supstrat sakupljeni su na planini Bjelasica, Crna Gora. Ovo područje bogato zimzelenim četinarima (smrča), se nalazi na nadmorskoj visini od 1200 m i nije izloženo direktnom izvoru zagađenja (slika 28). Biljni materijal korišćen za analizu podijeljen je na uzorke korijena, stabla, lista i ploda.

Uzorci zemljišta su uzorkovani na dubini od 0 do 20 cm.

Biljni uzorci i zemljišni supstrat su zatim upakovani u polietilenske kese, dostavljeni u laboratoriju, gdje su osušeni na sobnoj temperaturi do konstantne mase, a zatim čuvani na mračnom i hladnom mjestu do analize. Borovnica je identifikovana na Katedri za botaniku Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i zavedena pod brojem VMF\_121215 i VML\_111215.

Monokomponentni čajevi namijenjeni tržištu, čaj od lista i ploda borovnice, obezbjeđeni su iz Instituta za proučavanje ljekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, Beograd, Srbija.

Biljni djelovi koji su korišćeni neposredno prije analize su samljeveni u laboratorijskom električnom mlinu do stepena usitnjenosti 355 [167].



Slika 28. Mapa Crne Gore sa mjestom uzorkovanja

#### 3.2. Reagensi i rastvori

Sve hemikalije korišćene u ovome istraživanju za određivanje makroelemenata i mikroelemenata bile su analitičke čistoće. Stakleno posuđe je držano potopljeno minimum 12 h u 10% HNO<sub>3</sub> (Merck, Nemačka), a zatim ispirano destilovanom, a onda i bidestilovanom vodom. Multielementarni osnovni rastvor (Merck, Darmstadt, Germany) koji je sadržao 1.0000 g/L svakog elementa korišćen je za pripremanje međustandardnih rastvora koncentracije 10 µg/mL, korišćenim u ICP-OES mjerenjima. Za svaki pojedinačni element koncentracije radnih standarda su bile u opsegu linearnosti utvrđenim za taj element. Dejonizovana voda, dobijena Milli-Q sistemom, provodljivosti 18 MΩ, i sadržajem ukupnog organskog ugljenika manjim od 10 µg/dm<sup>3</sup>, korišćena je za pripremu rastvora.

Za ispitivanje antioksidativne aktivnosti i u cilju procjene hemijskog profila ekstrakata, reagensi analitičke čistoće, kao što su acetatni pufer, hlorovodonična kiselina (HCl), 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ), gvožđe-(III)-hlorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), Folin–Ciocalteu reagens, 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (BHT), n-butanol (BuOH), aceton, etil acetat, natrijum bikarbonat, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), etanol (96%, v/v) i metanol, nabavljeni su od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Za analizu ekstrakata primjenom HPLC metode acetonitril, voda i metanol (HPLC čistoće) su nabavljeni od Merck (Darmstadt, Njemačka). Dinatrijum hidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) i natrijum hidrogen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) analitičke čistoće, korišćeni u elektrohemijskim mjerenjima takođe su nabavljeni od njemačkog proizvođača (Merck, Darmstadt, Germany). HPLC standardi: galna kiselina, pirogalol, protokatehinska kiselina, hlorogenska kiselina, procijanidin B<sub>2</sub>, vanilinska kiselina, kafenakiselina, epikatehin, *p*-kumarinska kiselina, ferulna kiselina, sinapinska kiselina, rutin, hiperozid, izokvercetin, kemferol-3-*O*-glukozid, resveratrol, kvercetin, kemferol (čistoća  $\geq 99\%$ ) nabavljeni su od francuskog proizvođača Extrasynthese (Genay, Francuska).

### 3.3. Priprema uzoraka zemljišta za određivanje sadržaja makroelemenata i mikroelemenata

Uzorci zemljišta su sušeni na sobnoj temperaturi oko tri nedelje. Nakon propuštanja kroz sito prečnika  $< 2.5\text{mm}$  uzorci su tretirani na dva načina: BCR sekvencijalnom ekstrakcijom i pseudo total metodom.

#### *BCR sekvencijalna ekstrakcija*

Uzorci zemljišta su podvrgnuti modifikovanoj BCR sekvencijalnoj ekstrakcionoj proceduri sa 4 faze.

**Prva faza** (F1, Izmjenjiva, u vodi rastvorna i kiselo rastvorna faza-frakcija vezana za karbonate): Uzorci zemljišta mase 1 g tretirani su sa 40 ml 0,11 M rastvora  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , a zatim su mućkani na rotacionoj mućkalici 16 h. Nakon mućkanja, ekstrakti su centrifugiranjem odvojeni od čvrstog djela, a zatim kvantitativno prenijeti u normalni sud od 100 ml. Čvrsti ostatak, koji je zadržan za sledeći korak, je ispran sa 10 ml destilovane vode i tečnost od ispiranja je pridodata glavnom rastvoru. Dobijeni ekstrakti su dopunjeni destilovanom vodom do crte i sačuvani za ICP-OES analizu.

**Druga faza** (F2, Reducibilna-frakcija vezana za Fe i Mn okside i hidrokside): Čvrstom ispranom ostatku je dodato 40 ml 0.5 M rastvora  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$  (pH 1,5). Nakon mućkanja od 16 sati, ekstrakti su odvojeni od taloga centrifugiranjem a zatim kvantitativno prenijeti u normalni sud od 100 ml. Talog koji je zadržan za sledeći korak je tretiran sa 10 ml destilovane vode, i tečnost od ispiranja je pridodata glavnom rastvoru. Dobijeni ekstrakti su dopunjeni destilovanom vodom do crte i sačuvani za ICP-OES analizu.

**Treća faza** (F3, Oksidabilna-frakcija vezana za organsku materiju i sulfide): Talog, zaostao nakon drugog koraka, tretiran je sa 10 ml 8.8 M rastvora  $\text{H}_2\text{O}_2$  (pH 2) i u trajanju od jednog sata ostavljen na vodenom kupatilu, na temperaturi od  $85^\circ\text{C}$ . Nakon hlađenja dodato je 40 ml 1 M rastvora  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  (pH=2) i 16 h mućkano na sobnoj temperaturi. Posle mućkanja ekstrakti su odvojeni od taloga centrifugiranjem, zatim su kvantitativno prenijeti u normalni sud od 100 ml, dopunjeni sa 0.5 M rastvorom azotne kiseline ( $\text{HNO}_3$ ) i sačuvani za ICP-OES. Talози su tretirani kao i u prethodna dva koraka.

**Četvrta faza (R, Rezidualna frakcija):** Talog je tretiran carskom vodom (15 ml 37% HCl i 5 ml 65%  $\text{HNO}_3$ ) i kuvan na vodenom kupatilu 5 sati na temperaturi od  $85^\circ\text{C}$ . Nakon hlađenja uzorak je filtriran u normalni sud od 100 ml i dopunjen do crte destilovanom vodom. Dobijeni rastvori su sačuvani za određivanje sadržaja elemenata.



*Pseudo total metoda*

Uzorak zemlje (0.5 g) je tretiran na isti način kao kod rezidualne frakcije u BCR sekvencijalnoj ekstrakcionoj proceduri. Nakon hlađenja izvršena je filtracija kroz filter papir i uzorak je razblažen do 100 ml destilovanom vodom, i sačuvan za ICP-OES analizu.

Recovery postignut pri BCR sekvencijalnoj ekstrakciji određen je poređenjem zbira sve četiri frakcije sa pseudototalnim koncentracijama, i kretao se u opsegu od 85 do 111%.

### 3.4. Priprema uzoraka borovnice za određivanje sadržaja makroelemenata i mikroelemenata

Nakon odmjeravanja oko 0.5 g osušenog, samljevenog korijena (WBR), stabla (WBS), lista (WBL) i ploda (WBF) samonikle borovnice, isti su prenijeti u teflonske kivete i u svaku je dodato po 7 ml 65% HNO<sub>3</sub> i 1 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Mikrotalasna digestija je izvođena na aparatu Ethos 1 (Advanced Microwave Digestion System, Milestone, Italy) prema sledećem programu: postepeno povećavanje temperature do 200°C tokom 10 min, održavanje te temperature u toku narednih 15 min i hlađenje u trajanju od 10 min. Uzorci su zatim kvantitativno prenijeti u normalne sudove od 50 ml, razblaženi destilovanom vodom i sačuvani za ICP-OES analizu.

Monokomponentni čajevi, čaj lista (CBL) i ploda (CBF) borovnice namijenjeni tržištu pripremljeni su na isti način.

Svaki uzorak je analiziran u duplikatu, a svaka analiza se sastojala od tri ponavljanja. Mjerenja makroelemenata i mikroelemenata u ispitivanim uzorcima izvršena su na optičkom emisionom spektrometru sa indukovano spregnutom plazmom, iCAP-6500 Duo (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

### 3.5. Određivanje biokoncentracionog i translokacionog faktora

U cilju razumjevanja akumulacionog potencijala borovnice izračunali smo biokoncentracioni (BCF) i translokacioni (TF) faktor za svaki element.

BCF predstavlja količnik koncentracije elementa u odgovarajućem dijelu biljke i sume koncentracije prve tri faze sekvencijalne ekstrakcije zemljišta (za koje se pretpostavlja da su dostupne biljci) [168-171].

$$BCF = \frac{C \text{ elementa u odgovarajućem dijelu biljke}}{C \text{ elementa u zemljištu}}$$

Izračunali smo BCF vrijednosti za korijen (BCF<sub>r</sub>), stablo (BCF<sub>s</sub>), list (BCF<sub>l</sub>) i plod (BCF<sub>f</sub>) borovnice. Ukoliko je vrednost BCF > 1, smatra se da dolazi do akumulacije elemenata iz zemljišta u odgovarajućem dijelu biljke [168,172].

Translokacioni faktor ukazuje na sposobnost biljke da transportuje metale iz korjena do izdanaka, i predstavlja količnik koncentracije elementa u odgovarajućem nadzemnom dijelu biljke i njegove koncentracije u korijenu [168,170,171].

$$TF = \frac{C \text{ elementa u odgovarajućem nadzemnom dijelu biljke}}{C \text{ elementa u korijenu}}$$

Izračunali smo TF vrijednosti za stablo (TF<sub>r</sub>), list (TF<sub>s</sub>) i plod (TF<sub>l</sub>) borovnice. Translokacija elemenata iz korjena do nadzemnih dijelova biljke se smatra efikasnom kada je TF > 1 [168,173-175].

### 3.6. Određivanje nutritivne vrijednosti borovnice

U cilju procjene nutritivne vrijednosti kao i doprinosa dnevnom unosu esencijalnih makroelemenata i mikroelemenata prilikom konzumacije ispitivane borovnice korišćena je porcija od 100 g svježih plodova po obroku. Ovakva porcija sadrži oko 16 g suvog ostatka, te su koncentracije makroelemenata i mikroelemenata preračunate u odnosu na njega.

Dnevni unos elemenata (DMI, %) smo računali na osnovu sledeće jednačine:

$$DMI = \frac{C \times 100}{RDA}$$

gdje RDA predstavlja preporučene dnevne potrebe elemenata prema direktivi Evropske unije (EEC) [176], dok C predstavlja sadržaj makroelementa ili mikroelementa (mg) u 100 g obroka.

Smatra se da je doprinos značajan ukoliko 100 g porcije sadrži najmanje 15% od preporučenih vrijednosti na dnevnom nivou.

S druge strane, da bi se izveo zaključak o unosu toksičnih elemenata i na osnovu toga procijenio rizik po zdravlje konzumenata dnevni unos (DI, %) As, Cd, Pb, Al i Ni smo računali na osnovu jednačine:

$$DI = \frac{C \times 100}{MDI}$$

gdje MDI predstavlja maksimalni dnevni unos koji se može tolerisati (EFSA – European Food Safety Authority) [177].

### 3.7. Metode ekstrakcije

#### 3.7.1. Priprema vodenih ekstrakata borovnice za određivanje sadržaja makroelemenata i mikroelemenata

Oko 0.5 g osušenog, samljevenog biljnog materijala (list i plod borovnice), odmjereno tačno na analitičkoj vagi, prelije se sa 50 ml dejonizovane vode. Ekstrakcija je izvođena na temperaturi od 50°C tokom 1 h. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi tokom 3 h, uzorci su filtrirani a zatim i razblaženi destilovanom vodom do 50 mL. Prije identifikacije i kvantifikacije makroelemenata i mikroelemenata ICP-OES metodom, vodeni ekstrakti su dodatno razblaženi u odnosu 1:10. Vodeni ekstrakti dobijeni na ovaj način označeni su sa WBLW (vodeni ekstrakt lista samonikle borovnice), WBFW (vodeni ekstrakt ploda samonikle borovnice), CBLW (vodeni ekstrakt lista komercijalne borovnice) i CBFW (vodeni ekstrakt ploda komercijalne borovnice).

### 3.7.2. Priprema etanolnih ekstrakata borovnice za određivanje sadržaja makroelemenata i mikroelemenata

Oko 10 g osušenog, samljevenog biljnog materijala (list i plod borovnice), odmjerenoj tačno na analitičkoj vagi, prelije se sa 50 ml 70% etanola. Ekstrakcija je izvođena na temperaturi od 40°C tokom 1 h. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi tokom 3 h, uzorci su filtrirani a zatim i razblaženi destilovanom vodom do 50 mL. Prije identifikacije i kvantifikacije makroelemenata i mikroelemenata ICP-OES metodom, etanolni ekstrakti su dodatno razblaženi u odnosu 1:50. Etanolni ekstrakti dobijeni na ovaj način označeni su sa WBLE (etanolni ekstrakt lista samonikle borovnice), WBFE (etanolni ekstrakt ploda samonikle borovnice), CBLE (etanolni ekstrakt lista komercijalne borovnice) i CBF E (etanolni ekstrakt ploda komercijalne borovnice).

#### 3.7.2.1. Određivanje ekstrakcionog koeficijenta

U vodenim i etanolnim ekstraktima lista i ploda samonikle i komercijalne borovnice (WBLW, WBFW, CBLW, CBFW, WBLE, WBFE, CBLE i CBF E), u zavisnosti od primjenjenog rastvarača, izračunali smo koeficijente ekstrakcije (EC) makroelemenata i mikroelemenata.

Ekstrakcioni koeficijenti su izračunati pomoću jednačine:

$$EC = 100 \frac{C_{\text{elementa}}(\text{ekstrakt})}{C_{\text{elementa}}(\text{odgovarajući dio biljka})}$$

### 3.7.3. Maceracija

Oko 50 g osušenog, samljevenog biljnog materijala (list i plod borovnice) prelije se sa 300 ml 70% etanola. Ekstrakcija je izvođena na sobnoj temperaturi tokom 72 h, uz povremeno miješanje. Dobijeni ekstrakt je profiltriran, dok je čvrsti ostatak reekstrahovan sa 20 ml istog ekstrakcionog sredstva, tokom 48 h. Ekstrakti su spojeni, profiltrirani i upareni do suva na rotacionom vakuum uparivaču, pri temperaturi ne većoj od 40°C. Balon sa uparenim ekstraktom ostavljen je tokom noći u sušnici na temperaturi od 30°C, nakon čega je određen prinos ekstrakcije u procentima. Ekstrakti dobijeni na ovaj način označeni su kao MLEM (upareni ekstrakt lista samonikle borovnice dobijen maceracijom) i MFEM (upareni ekstrakt ploda samonikle borovnice dobijen maceracijom). Ovako dobijeni ekstrakti su dalje tretirani u cilju određivanja sadržaja makroelemenata i mikroelemenata, analize hemijskog sastava kao i procjene antioksidativne aktivnosti.

### 3.7.4. Soxhlet ekstrakcija

Oko 10 g osušenog, samljevenog biljnog materijala (list i plod borovnice) se prelije sa 325 ml 70% etanola. Ekstrakcija je izvođena na temperaturi ključanja rastvarača u vremenskom trajanju od 72 h. Dobijeni ekstrakt je profiltriran i uparen na rotacionom vakuum uparivaču do suva, pri temperaturi ne većoj od 40°C. Balon sa uparenim ekstraktom ostavljen je tokom noći u sušnici na temperaturi od 30°C, nakon čega je određen prinos ekstrakcije u procentima. Ekstrakti dobijeni na ovaj način označeni su kao MLES (upareni ekstrakt lista samonikle borovnice dobijen Soxhlet ekstrakcijom) i MFES (upareni ekstrakt ploda samonikle borovnice dobijen Soxhlet ekstrakcijom).

Ovako dobijeni ekstrakti su dalje tretirani u cilju određivanja sadržaja makroelemenata i mikroelemenata, analize hemijskog sastava kao i procjene antioksidativne aktivnosti.

### 3.7.5. Ekstrakcija vrelom vodom (dobijanje infuza)

Oko 10 g osušenog, samljevenog biljnog materijala (list i plod borovnice) prelije se sa 150 ml destilovane vode, i na temperaturi ključanja ekstrahuje 2 min. Nakon toga posuda se ukloni sa grijača, poklopi i tokom 30 min hladi na sobnoj temperaturi. Dobijeni ekstrakt je profiltriran i uparen na rotacionom vakuum uparivaču do suva, pri temperaturi ne većoj od 40°C. Balon sa uparenim ekstraktom ostavljen je tokom noći u sušnici na temperaturi od 30 °C, nakon čega je određen prinos ekstrakcije u procentima. Ekstrakti dobijeni na ovaj način označeni su kao MLEI (upareni vodeni ekstrakt lista samonikle borovnice) i MFEI (upareni vodeni ekstrakt ploda samonikle borovnice). Ovako dobijeni ekstrakti su dalje tretirani u cilju određivanja sadržaja makroelemenata i mikroelemenata, analize hemijskog sastava kao i procjene antioksidativne aktivnosti.

## 3.8. Priprema ekstrakata dobijenih Soxhlet ekstrakcijom, maceracijom i ekstrakcijom vrelom vodom za određivanje makroelemenata i mikroelemenata

Oko 0.5 g ispitivanih biljnih ekstrakata (MLEI, MLEM, MLES, MFEI, MFEM i MFES), tretirano je na isti način kao i osušeni i samljevani uzorci samonikle i komercijalne borovnice (WBR, WBS, WBL, WBF, CBL, CBF).

Tačno odmjerene mase na analitičkoj vagi prenijete su u teflonske kivete i u svaku je dodato po 7 ml 65% HNO<sub>3</sub> i 1 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nakon razaranja mikrotalasnom digestijom uzorci su kvantitativno prenijeti u normalne sudove od 50 ml, razblaženi destilovanom vodom i sačuvani za ICP-OES analizu.

## 3.9. Hemijska analiza ekstrakata dobijenih Soxhlet ekstrakcijom, maceracijom i ekstrakcijom vrelom vodom

### 3.9.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Ukupan fenolni sadržaj (TP) određen je po Folin-Ciocalteu metodi. 100 µL metanolnih rastvora ispitivanih ekstrakata MLEI, MLEM, MLES, MFEI, MFEM i MFES (0.57 mg/mL, 0.49 mg/mL, 0.56 mg/mL, 0.51 mg/mL, 0.55 mg/mL, 0.62 mg/mL, respektivno) je pomiješano sa 0.75 mL Folin-Ciocalteu reagensom koji je prethodno razblažen deset puta. Nakon 5 minuta stajanja na temperaturi od 22°C, u navedenu smještu dodato je 0.75 mL rastvora natrijum bikarbonata koncentracije 60 g/L. Apsorbancije ovako pripremljenih rastvora su očitavane nakon 90 minuta perioda inkubacije na talasnoj dužini od 725 nm pomoću spektrofotometra Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System (Agilent Technologies, Nemačka). Serijski rastvori galne kiseline (0–100 mg/l) služili su za konstrukciju standardne krive. Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenata galne kiseline po gramu suve materije ekstrakata (mg GAE/g SM) i predstavljaju srednju vrijednost tri nezavisna mjerenja [178,179]. Kalibraciona kriva pokazala je linearnu regresiju sa  $r > 0.99$ .

### 3.9.2. Određivanje sadržaja flavonoida

Ukupan sadržaj flavonoida (TF) određen je metodom opisanom u Evropskoj farmakopeji Ph. Eur. 9.0 [167]. Uzorci su ekstrahovani uz povratni hladnjak smješom aceton/HCl.  $AlCl_3$  kompleks flavonoidnog dijela ekstrahuje se etil-acetatom, a zatim se vrši očitavanje apsorbancije na UV-VIS spektrofotometru HP 8453 na talasnoj dužini od 425 nm. Sadržaj flavonoida, izražen kao procenat hiperozida, prikazan je kao srednja vrijednost dobijena iz 3 nezavisna mjerenja, i izračunava se sledećom jednačinom:

$$\% \text{ flavonoida} = \frac{A \times 1.25}{m}$$

gdje A predstavlja apsorbanciju ispitivanog rastvora na 425 nm, dok m označava masu ispitivanog ekstrakta u gramima.

### 3.9.3. Određivanje sadržaja tanina

Sadržaj tanina (TT) određen je metodom koja je opisana u Evropskoj Farmakopeji Ph. Eur. 9.0 [167]. Ukratko, rastvori ispitivanih uzoraka su izloženi fosfomolibdovolframovom reagensu u alkalnom medijumu, a zatim su tretirani kožnim prahom. Apsorbancije su mjerene na UV-VIS spektrofotometru HP 8453, na talasnoj dužini od 760 nm. Sadržaj tanina, izražen kao procenat pirogalola, računa se iz razlike u apsorbanciji ukupnih polifenola ( $A_1$ ) i polifenola koji se ne adsorbuju na kožni prah ( $A_2$ ), uz pomoć formule:

$$\frac{62.5 (A_1 - A_2) \times m_2}{A_3 - m_1}$$

gdje  $m_1$  predstavlja masu ispitivanih ekstrakata u gramima, a  $m_2$  označava masu pirogalola u istim jedinicama.

### 3.9.4. Određivanje sadržaja procijanidina

Ukupan sadržaj procijanidina određen je metodom opisanom u Evropskoj farmakopeji Ph. Eur. 9.0 [167]. Metoda se zasniva na hidrolizi ispitivanih ekstrakata (MFEI, MFEM i MFES) smješom EtOH/HCl, nakon čega se tretiraju BuOH. Intezitet absorbancije rastvora je mjereno HP 8453 UV-VIS spektrofotometrom na talasnoj dužini od 545 nm. Procenat procijanidina, izražen preko cijanidin-hlorida, izračunava se sledećom jednačinom:

$$\frac{Ax 500}{75 \times m}$$

gdje A predstavlja absorbanciju uzorka na 545 nm, a m označava masu ispitivanog ekstrakta u gramima.

### 3.9.5. Određivanje sadržaja antocijana

Ukupan sadržaj antocijana određen je metodom opisanom u Evropskoj farmakopeji Ph. Eur. 9.0 [167]. Ukratko, metoda se zasniva na hidrolizi ispitivanih ekstrakata (MFEI, MFEM i MFES) smješom MeOH/HCl. Intezitet absorbancije rastvora je mjereno HP 8453 UV-VIS spektrofotometrom na talasnoj dužini od 528 nm. Procenat antocijana, izražen preko cijanidin-3-glukozid hlorida, izračunava se prema formuli:

$$\frac{Ax \ 5000}{718 \ x \ m}$$

gdje A predstavlja absorbanciju na 528 nm, dok m označava masu ispitivanih ekstrakata u gramima.

### 3.9.6. HPLC metoda

Koncentracije ispitivanih ekstrakata lista i ploda samonikle borovnice dobijenih Soxhlet ekstrakcijom, maceracijom i infuzijom, za HPLC analizu bile su 0.42 mg/mL, 0.50 mg/mL, 0.50 mg/mL, 0.44 mg/mL, 0.46 mg/mL, 0.44 mg/mL za MLEI, MLEM, MLES, MFEI, MFEM i MFES, respektivno. Nakon filtriranja kroz filtere od politetrafluoroetilen (PTFE) u staklene HPLC vialne uzorci su analizirani. Injektovani volumen uzoraka iznosio je 4  $\mu$ L. Standardni etanolni rastvori korišćeni u HPLC analizi pripremljeni su u sledećim koncentracijama: 0.01 mg/mL procijanidin B<sub>2</sub>, 0.15 mg/mL izokvercetin, 0.26 mg/mL hiperozid, 0.28 mg/mL kemferol-3-O-glukozid, 0.30 mg/mL vanilinska kiselina, neohlorogenska kiselina i kemferol, 0.34 mg/mL galna i protokatehinska kiselina, 0.36 mg/mL kvercetin, 0.38 mg/mL sinapinska kiselina i resveratrol, 0.40 mg/mL epikatehin i rutin, 0.46 mg/mL pirogalol, 0.52 mg/mL kafena kiselina, 0.56 mg/mL hlorogenska kiselina, 0.56 mg/mL ferulna kiselina, 0.74 mg/mL *p*-kumarinska kiselina. Zapremina standardnih rastvora je takođe bila 4  $\mu$ L. Identifikacija jedinjenja izvršena je na osnovu retencionih vremena i preklapanja spektra, a kvantifikacija eksternom kalibracijom sa standardima.

### 3.9.7. Određivanje antioksidativnih svojstava ekstrakata dobijenih Soxhlet ekstrakcijom, maceracijom i ekstrakcijom vreloom vodom

#### 3.9.7.1. Određivanje sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala-DPPH test

Po 300  $\mu$ l rastvora ispitivanih ekstrakata koncentracija 0.42 mg/mL, 0.50 mg/mL, 0.50 mg/mL, 0.44 mg/mL, 0.46 mg/mL, 0.44 mg/mL za MLEI, MLEM, MLES, MFEI, MFEM i MFES, respektivno, prenjeto je u odgovarajuće test-tube koje su sadržale po 2.7 ml 0.1 mM etanolnog rastvora DPPH. Apsorbancija navedene smješe je izmjerena na spektrofotometru nakon 30 min inkubacije na sobnoj temperaturi, na talasnoj dužini od 517 nm, uz etanol kao slepu probu. Procenat inhibicije DPPH radikala se računa prema sledećoj formuli:

$$\% = 100 - \left[ (A_S - A_B) \times \frac{100}{A_C} \right]$$

gdje A<sub>S</sub> predstavlja absorbanciju etanolnih rastvora ekstrakata prethodno tretiranih DPPH rastvorom; A<sub>B</sub> predstavlja absorbanciju etanolnih rastvora ekstrakata bez prethodnog tretiranja DPPH rastvorom; A<sub>C</sub> predstavlja absorbanciju etanolnog rastvora DPPH [178,180].

IC<sub>50</sub> vrijednosti su izračunate korišćenjem linearne regresione analize i predstavljaju koncentraciju uzorka koja dovodi do neutralizacije 50% DPPH radikala.

Sintetički antioksidans butilhidroksitoluen (BHT) korišćen je kao pozitivna kontrola.

### 3.9.7.2. Određivanje sposobnosti redukcije feri jona-FRAP test

Po 100 µl rastvora ispitivanih ekstrakata odgovarajućih koncentracija 0.42 mg/mL, 0.50 mg/mL, 0.50 mg/mL, 0.44 mg/mL, 0.46 mg/mL, 0.44 mg/mL za MLEI, MLEM, MLES, MFEI, MFEM i MFES, respektivno, je pomiješano sa 3.0 ml svježe pripremljenog FRAP reagensa (25 ml 300 mM acetatnog pufera, pH vrijednosti 3.6; 2.5 ml 10 mM rastvora TPTZ u 40 mM rastvoru HCl i 2,5 ml 20 mM rastvora FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O). Nakon inkubacije smješe od 30 min na 37°C, apsorbancija je izmjerena upotrebom spektrofotometra Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System (Agilent Technologies, Nemačka) na 593 nm, uz slijepu probu koja je smješa istih sastojaka sa 100 µl etanola umesto etanolnog rastvora analiziranog uzorka.

FRAP vrijednost je izračunata iz kalibracione krive standardnog rastvora FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O u FRAP reagensu u koncentracionom opsegu od 100 do 1000 mmol/l, koja je pokazala linearnu regresiju sa  $r > 0,99$ , a rezultati su izraženi kao milimolovi Fe<sup>2+</sup> jona po gramu suve materije ekstrakta (Fe<sup>2+</sup>/g SM ekstrakta) [178,181].

### 3.9.7.3. Ciklična voltametrija

Po 10 mL rastvora ispitivanih ekstrakata odgovarajućih koncentracija 0.42 mg/mL, 0.50 mg/mL, 0.50 mg/mL, 0.44 mg/mL, 0.46 mg/mL, 0.44 mg/mL za MLEI, MLEM, MLES, MFEI, MFEM i MFES, respektivno, snimano je cikličnom voltametrijom u cilju procjene antioksidativne aktivnosti

## 3.10. Instrumentacija

Za razaranje osušenih i samljevenih uzoraka borovnice (korijena, stabla, lista i ploda samonikle, odnosno lista i ploda komercijalne borovnice), kao i razaranje ekstrakata lista i ploda samonikle borovnice dobijenih Soxhlet ekstrakcijom, maceracijom i infuzijom, korišćen je aparat Ethos 1 (Advanced Microwave Digestion System, Milestone, Italy) koji posjeduje postolje sa 10 mjesta za teflonske kivete.

Mjerenja makroelemenata i mikroelemenata u svim uzorcima borovnice kao i u zemljišnim supstratima izvođena su na optičkom emisionom spektrometru sa indukovano spregnutom plazmom, iCAP-6500 Duo (Thermo Scientific, Velika Britanija). Sistem ima integrisanu jedinicu za generisanje hidrida. iTEVA operativni softver omogućava kontrolu svih funkcija instrumenta.

Radni parametri aparata prikazani su u tabeli 3.

Tabela 3. Instrumentalni i radni uslovi ICP-OES

Spectrometar	iCAP 6500 Duo Thermo Scientific
Raspršivač	koncentrični
Komora za raspršivanje	ciklonsko
Snaga generatora (W)	1150
Protok argona (L/min)	12
Pomoćni protok argona (L/min)	0.5
Brzina protoka raspršivača (L/min)	0.5
Brzina unošenja uzorka (ml/min)	1.0
Detektor	CID86

Identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja u ekstraktima lista i ploda samonikle borovnice dobijenih Soxhlet ekstrakcijom, maceracijom i infuziom, izvršena je na HPLC aparatu (Agilent Tehnologija 1200). Detekcija je vršena uz pomoć detektora sa nizom dioda (DAD) na talasnim dužinama od 260 i 325 nm. Separacija komponenti je postignuta korišćenjem LiChrospher 100 RP 18e (5  $\mu$ m), 250x4mm kolona sa protokom 1 mL/min, i mobilnim fazama A (500 mL H<sub>2</sub>O plus 9.8 mL 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), B (MeCN), u trajanju od 70 minuta. Gradijentna elucija je bila podešena prema sledećem protokolu: 89–75% A (0–35 min); 75–60% A (35–55 min); 60–35% A (55–60 min) i 35–0% A (60–70 min).

Ciklični voltamogrami za procjenu antioksidativne aktivnosti u ekstraktima lista i ploda samonikle borovnice, dobijenih Soxhlet ekstrakcijom, maceracijom i infuziom, su snimljeni na aparatu za cikličnu voltametriju CHI760B (CH Instruments, Austin, Texas, USA). Sva mjerenja su rađena u troelektrodnoj ćeliji, gdje je kao radna elektroda korišćena borom-dopovana dijamantska elektroda (BDD), u poliketonskom pakovanju unutrašnjeg prečnika 3 mm, otpornosti 0.075  $\Omega$  cm i borom dopovanog nivoa od 1000 ppm (po deklaraciji proizvođača Windsor Scientific Ltd., Slough, UK). Kao referentna elektroda korišćena je srebro/srebrohloridna elektroda CHI111 (CH Instruments) u koju je kao unutrašnji rastvor dodavan 3 M rastvor KCl. Kao pomoćna elektroda korišćena je platinska elektroda istog proizvođača, model CHI22. Prije svakog mjerenja elektrode su prethodno pripremane, odnosno površina je obnavljana uklanjanjem nečistoća uz protonizaciju površine elektrode. BDD elektroda je anodno tretirana (do +2 V) u 1 M sumpornoj kiselini, a zatim katodno (do -2 V). Oba procesa su trajala 180 s. Ciklični voltamogrami su snimani u opsegu potencijala od 0 mV i 1200 mV, brzinom skeniranja 100 mV.

Mjerenje apsorbancije ekstrakata lista i ploda samonikle borovnice dobijenih Soxhlet ekstrakcijom, maceracijom i infuziom, u cilju procjene antioksidativne aktivnosti DPPH i FRAP metodom i analize hemijskog sastava, vršeno je na spektrofotometru Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System (Agilent Technologies, Nemačka),

### 3.11. Statistička analiza

Prilikom određivanja makroelemenata i mikroelemenata u ispitivanim uzorcima, parametri deskriptivne statistike (srednja vrijednost i devijacija) su dobijeni NCSS statističkim softverom ([www.ncss.com](http://www.ncss.com)).

Statistička analiza hemijskog profila i antioksidativne aktivnosti u ekstraktima je izvršena pomoću programa Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) i SPSS Statistics 22.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA), upotrebom ANOVA testa, Tukey-ev HSD testa i post hoc testa.



## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1. Rezultati određivanja makroelemenata i mikroelemenata u zemljišnom supstratu

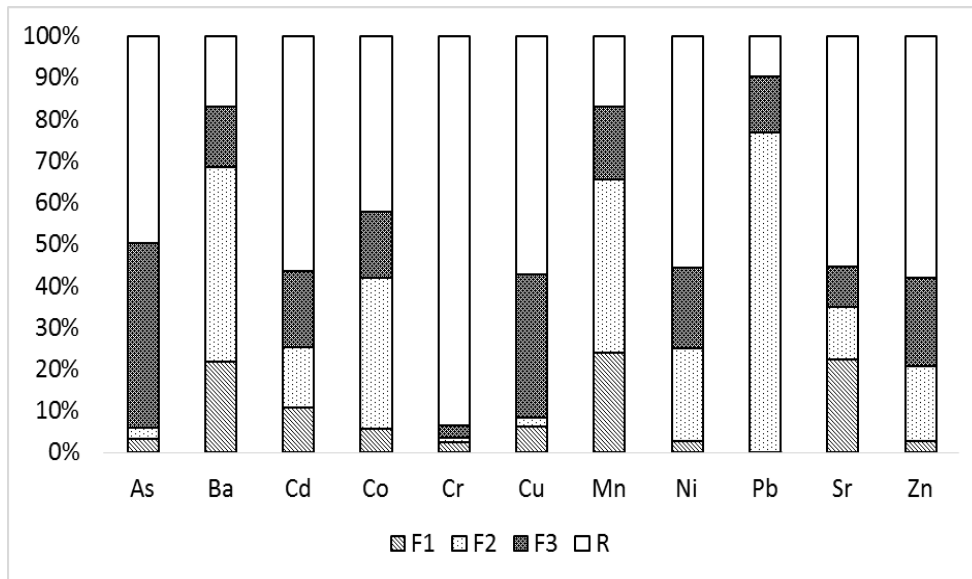
Zemljišni supstrati u ovom radu su pripremani prema modifikovanoj BCR sekvencijalnoj ekstrakcionoj proceduri, radi određivanja četiri frakcije: kiselu-rastvorno/izmenjive, reducibilne, oksidabilne i rezidualne. Metali ovih faza su različite mobilnosti, biodostupnosti i toksičnosti. Frakcija F1 je ekvivalentna sumi izmenjive frakcije rastvorne u vodi, i frakcije vezane za karbonate. To je najaktivnija, najmobilnija i najdostupnija faza metala. Ona ukazuje na količinu metala koja bi mogla biti otpuštena u okolinu pod odgovarajućim uslovima (povećana kiselost zemljišta), što u slučaju toksičnih metala može predstavljati opasnost po okolinu [25,182,183]. Reducibilna frakcija (F2) predstavlja metale koji su vezani za Fe i Mn okside i hidrokside, koji mogu biti mobilni pod redukcionim uslovima. Metali oksidabilne frakcije (F3) su vezani za organsku materiju i sulfide, a na njihovo otpuštanje utiču redoks potencijal i pH vrijednost zemljišta. Zbir ove tri frakcije (F1 + F2 + F3) daje uvid u mobilnost i biodostupnost metala u zemljištu, i što je veći, ide u prilog većoj dostupnosti biljkama [25]. Rezidualnu frakciju (R) čine metali vezani za kristalne minerale strukture i uglavnom nisu dostupni biljkama.

U tabeli 4 prikazane su koncentracije ekstrahovanih makroelemenata i mikroelemenata iz zemljišta primjenom BCR modifikovane sekvencijalne ekstrakcije, pojedinačno po fazama, pseudototalne koncentracije analiziranih metala u zemljištu i recovery vrijednosti.

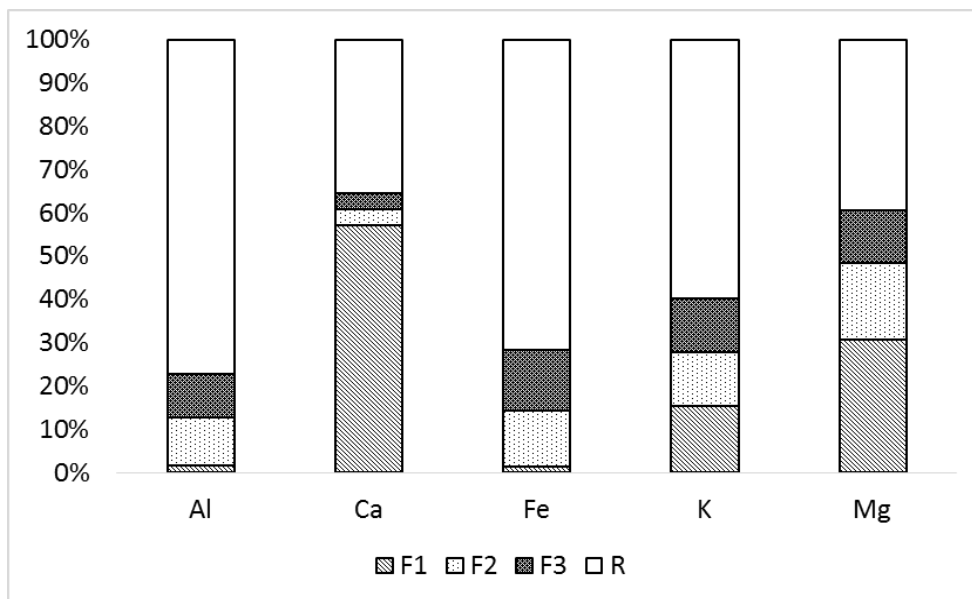
Tabela 4. Koncentracija ekstrahovanih makroelemenata i mikroelemenata iz zemljišta sa ispitivanog lokaliteta po fazama modifikovane BCR ekstrakcione procedure. Pseudototalna koncentracija analiziranih metala u zemljištu i recovery vrijednosti (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija)

Elementi	F1 ( $\mu\text{g/g}$ )	F2 ( $\mu\text{g/g}$ )	F3 ( $\mu\text{g/g}$ )	R ( $\mu\text{g/g}$ )	Pseudo-total ( $\mu\text{g/g}$ )	Recovery (%)
As	0.061 $\pm$ 0.006	0.053 $\pm$ 0.002	0.82 $\pm$ 0.10	0.9 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.2	107.56
Ba	14.30 $\pm$ 0.08	30.51 $\pm$ 0.10	9.54 $\pm$ 0.03	11.11 $\pm$ 0.04	73.5 $\pm$ 0.4	89.11
Cd	0.048 $\pm$ 0.009	0.065 $\pm$ 0.009	0.08 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.02	0.48 $\pm$ 0.04	92.16
Co	0.78 $\pm$ 0.10	4.92 $\pm$ 0.05	2.18 $\pm$ 0.03	5.73 $\pm$ 0.03	14.56 $\pm$ 0.08	93.41
Cr	6.0 $\pm$ 0.4	2.18 $\pm$ 0.04	6.96 $\pm$ 0.09	212.6 $\pm$ 2.3	265.8 $\pm$ 5.6	85.65
Cu	1.37 $\pm$ 0.05	0.46 $\pm$ 0.02	7.44 $\pm$ 0.07	12.41 $\pm$ 0.04	19.66 $\pm$ 0.09	110.31
Mn	135.9 $\pm$ 1.2	236.0 $\pm$ 2.4	97.7 $\pm$ 0.5	96.5 $\pm$ 2.1	657.8 $\pm$ 7.5	86.06
Ni	0.71 $\pm$ 0.02	5.50 $\pm$ 0.10	4.81 $\pm$ 0.04	13.74 $\pm$ 0.05	23.0 $\pm$ 0.2	107.76
Pb	0.20 $\pm$ 0.04	25.65 $\pm$ 0.08	4.45 $\pm$ 0.07	3.267 $\pm$ 0.06	34.9 $\pm$ 0.8	96.13
Sr	5.65 $\pm$ 0.10	3.24 $\pm$ 0.04	2.46 $\pm$ 0.03	13.8 $\pm$ 0.2	22.7 $\pm$ 0.5	110.58
Zn	1.17 $\pm$ 0.02	7.72 $\pm$ 0.03	9.04 $\pm$ 0.04	24.65 $\pm$ 0.02	44.8 $\pm$ 0.4	95.09
Al	468.7 $\pm$ 9	2750.1 $\pm$ 20	2435.4 $\pm$ 14	19155 $\pm$ 200	23313 $\pm$ 183	106.42
Ca	13774 $\pm$ 214	883 $\pm$ 16	841 $\pm$ 5	8537 $\pm$ 177	22433 $\pm$ 80	107.14
Fe	262 $\pm$ 9	2238 $\pm$ 18	2394 $\pm$ 18	12289 $\pm$ 240	17345 $\pm$ 210	99.06
K	1478 $\pm$ 27	1172 $\pm$ 14	1165 $\pm$ 19	5662 $\pm$ 126	10490 $\pm$ 143	90.36
Mg	1816 $\pm$ 19	1039 $\pm$ 9	714 $\pm$ 6	2323 $\pm$ 14	5940 $\pm$ 28	99.23

Na slikama 29 i 30 prikazana je procentualna raspodjela makroelemenata i mikroelemenata po fazama BCR ekstrakcije u uzorcima zemljišta sa ispitivanog lokaliteta.

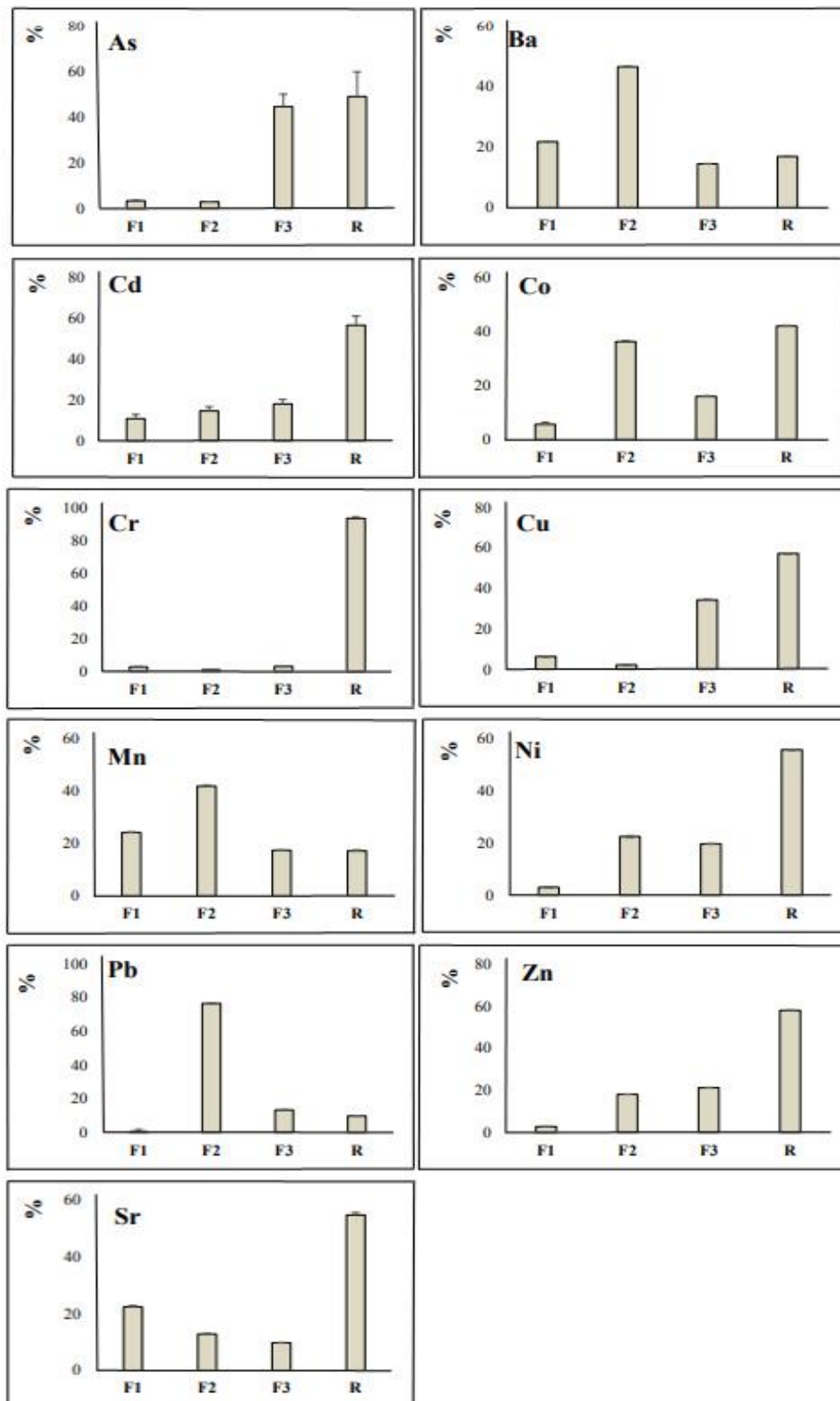


a)

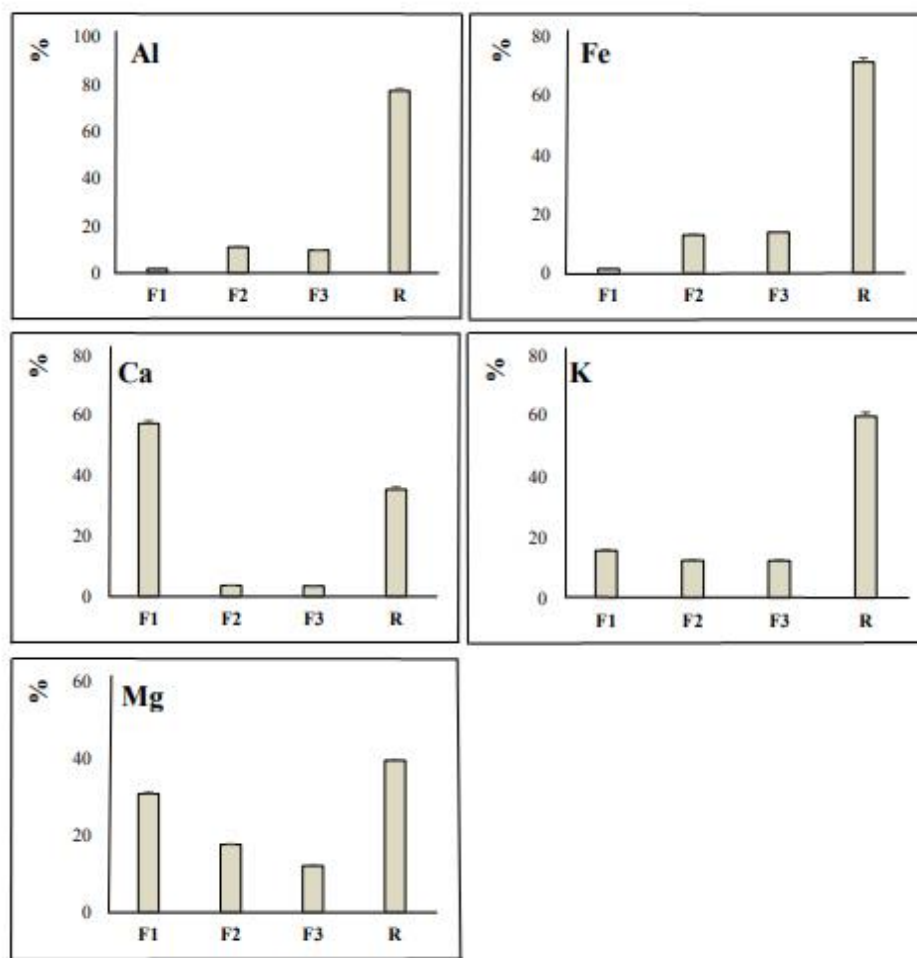


b)

Slika 29. Procentualna raspodjela a) makroelemenata i b) mikroelemenata po fazama BCR ekstrakcije u uzorcima zemljišta sa ispitivanog lokaliteta



a)



b)

Slika 30. Procentualna raspodjela pojedinačnih a) mikroelemenata i b) makroelemenata po fazama BCR ekstrakcije u uzorcima zemljišta sa ispitivanog lokaliteta

Pseudo totalna koncentracija Ca u ispitivanom zemljišnom supstratu je iznosila 22433  $\mu\text{g/g}$ . Najveći procenat ovog makroelementa je izdvojen u prvoj fazi (57.31%), što ukazuje da i pri najmanjim promjenama jonske jačine i pH vrijednosti može doći do njegove mobilizacije. Veliki uticaj na rastvorljivost i pokretljivost Ca ima ugljen dioksid, pomoću koga kalcijum karbonat prelazi u bikarbonat i tako postaje dostupan biljkama [184]. Biljne vrste različito reaguju na prisutnost Ca u zemljištu. One koje rastu na krečnjačkoj podlozi nazivaju se kalcikolne ili kalcifilne vrste i osjetljive su na smanjenje pH vrijednosti [184-187]. Kalcifobne, kalcifugne ili silicifilne biljke naseljavaju zemljišta siromašna kalcijumom i veoma su osjetljive na povećanu količinu  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{HCO}_3^-$  jona [184,186,188]. Takođe, za biljke je veoma važan odnos Ca i Mg u zemljištu. Optimalan odnos Ca/Mg iznosi 2:1 i njegovo remećenje može dovesti do nedostatka Mg i ometanja rasta biljke [184]. Istraživanja su pokazala da je 55% ukupnog Mg u izmjenljivoj frakciji zemljišta, dok se koncentracija Mg u zemljišnom rastvoru kreće od 0.7 mM do 7.0 mM, a može ići i do 100 mM. Kisela zemljišta često su siromašna Mg usled konkurencije sa  $\text{H}^+$  jonima. U zemljišnim rastvorima kiselih zemljišta koncentracija Mg iznosi oko 2.0 mM, a u neutralnim oko 5.0 mM [184,189]. Pseudototalna koncentracija Mg u našem zemljišnom supstratu je iznosila 5940  $\mu\text{g/g}$ . Najveći procenat i ovog makroelementa smo ekstrahovali u prvoj fazi (30.84%). Kad je u pitanju dalja raspodjela Ca i Mg po fazama BCR sekvencijalne ekstrakcije, vrlo značajan procenat smo zabilježili u rezidualnoj frakciji (35.51% i 39.42%, respektivno), praćenju oksidabilnom i na kraju reducibilnom frakcijom.

Preostali ispitivani makroelementi (Fe, Al i K) u najvećem procentu se ekstrahuju u rezidualnoj frakciji iz zemljišta, što znači da se uglavnom nalaze u obliku primarnih i sekundarnih silikatnih minerala, te su stoga vrlo slabo mobilni i nisu dostupni borovnici.

Pseudototalna koncentracija Fe i Al u ispitivanom zemljišnom supstratu je iznosila 17345  $\mu\text{g/g}$  i 23313  $\mu\text{g/g}$ , respektivno. U rezidualnoj frakciji izdvojen je čak 71.52% Fe i 77.21% Al.

Poznato je da je  $\text{Fe}^{2+}$  jon rastvorljiviji i dostupniji biljkama nego  $\text{Fe}^{3+}$ . Povećanjem pH vrijednosti zemljišta favorizuje se oksidacija  $\text{Fe}^{2+}$  do  $\text{Fe}^{3+}$  oblika, i dolazi do taloženja oksida i  $\text{Fe}^{3+}$  soli, što je od izuzetne važnosti jer ova jedinjenja mogu uticati i na imobilizaciji toksičnih metala, prevodeći ih u nepristupačne oblike biljkama [184,190,191]. S druge strane, joni gvožđa se ne usvajaju iz rastvora kao joni, nego u obliku kompleksa sa organskim jedinjenjima, u kojima je gvožđe vezano koordinativnim vezama [192]. Ta organska jedinjenja nazivaju se helatori ili helirajući agensi (nastaju u zemljištu) i siderofori (sintetišu ih zemljišne bakterije i gljive). Siderofori vezuju trovalentni jon gvožđa, čime ga čine sto puta dostupnijim biljkama, a samim tim i obezbjeđuju zadovoljenje njenih metaboličkih potreba kada je u pitanju ovaj makroelement.

U neutralnoj i alkalnoj sredini Al nije dostupan biljkama. U kiselim zemljištima, pri pH vrijednostima manjim od 5, aluminijumove soli se mogu rastvariti i postati biodostupne. Naime, Al joni sa fosfornom kiselinom grade teško rastvorljive fosfate i na taj način učestvuju u njegovoj imobilizaciji, što ima za posledicu da je na zemljištima sa visokim sadržajem mobilnog aluminijuma usvajanje fosfora od strane biljaka otežano, pa se u biljkama javlja njegov nedostatak [193].

Pseudototalna koncentracija K u našem zemljišnom supstratu je bila 10490  $\mu\text{g/g}$ . U rezidualnoj frakciji je ekstrahovano 59.74% ovog makroelementa. U zemljištima koja sadrže glinu veći dio unijetog kalijuma biva vezan odnosno fiksiran u razmaknutim međuslojnim prostorima minerala gline, koji se odlikuju negativnim nabojem. Fiksirani kalijum, zavisno od mineraloškog sastava, pH vrijednosti, vlažnosti, sadržaja drugih katjona i kiseonika u zemljištu i osobina biljaka, postepeno se oslobađa i prelazi u izmjenljiv, za biljke pristupačan oblik. Vlažnost zemljišta je naročito značajna, jer pod uticajem vlage dolazi do širenja minerala gline i hidratacije jona, što podstiče oslobađanje katjona. Takođe, pri pH vrijednosti od 3 do 3.5 oslobađanje jona kalijuma je dva puta veće nego pri reakciji zemljišta od 4.5 do 9.0. K se u zemljišnom rastvoru nalazi u malim količinama i čini svega oko 1% od ukupno izmjenljivog kalijuma. S obzirom da ta količina kalijuma ne zadovoljava potrebe biljaka, on se stalno obnavlja na račun izmjenljivog i neizmjenljivog K [194].

Što se tiče mikroelemenata, pseudototalna koncentracija Mn u našem zemljišnom supstratu je iznosila 657.8  $\mu\text{g/g}$ . U zemljištima širom svijeta njegova koncentracija varira od 270 mg/kg do 525 mg/kg, dok je maksimalno dozvoljena koncentracija ovog metala procjenjena u rasponu od 1500 mg/kg do 3000 mg/kg [23,25]. Cjelokupan sadržaj Mn u zemljištu je porijeklom iz matičnog supstrata [184]. Tokom vremena, Mn u jedinjenjima minerala podliježe oksidaciji pri čemu nastaju različiti oksidi Mn koji dalje, kao i oksidi Fe, imaju veliki uticaj na imobilizaciju toksičnih metala u zemljištu [195-198]. Literaturnim pregledom utvrđeno je da se Mn naročito koncentriše u slojevima zemljišta obogaćenim oksidima ili –hidroksidima Fe [195], te stoga veliki procenat ovog mikroelementa ekstrahovan iz zemljišta sa ispitivanog lokaliteta upravo u reducibilnoj fazi (41.69%,) nije iznenađujuć.

Najveći procenat Ba primjenom BCR sekvencijalne ekstrakcije iz zemljišta sa ispitivanog lokaliteta izdvojili smo u reducibilnoj fazi (46.61%), što nije iznenađujuće s obzirom da je poznato da se Ba pod atmosferskim uslovima lako adsorbuje, posebno od strane oksida i hidroksida, mada je relativno mobilan, naročito u kiselijem zemljištu [23,25]. Pseudototalna koncentracija Ba u našem zemljišnom supstratu bila je 73.5  $\mu\text{g/g}$ , dok u zemljištima širom svijeta, zavisno od tipa, koncentracija se kreće od 10 mg/kg do 1500 mg/kg, sa prosječnim opsegom od 362 mg/kg do 580 mg/kg [23,25].

Preko 80% ukupne koncentracije Mn i Ba čini zbir prve tri frakcije, zbog čega se ovi metali mogu smatrati izuzetno mobilnim i biodostupnim borovnici.

Pseudototalna koncentracija Cr (265.8  $\mu\text{g/g}$ ) u našim uzorcima bila je iznad maksimalno preporučene vrijednosti propisane nacionalnom regulativom (100 ppm) [199]. Međutim, s obzirom da se preko 90% ovog metala nalazi u nepokretnoj, rezidualnoj frakciji, najmanje je dostupan borovnici, te stoga ne predstavlja potencijalnu opasnost za životnu sredinu. Prosječna koncentracija

Cr u zemljištima širom svijeta je oko 60 ppm, mada se mogu naći i veće koncentracije, zavisno od stijena i materijala od kojih je zemljište nastalo [23,25]. Hrom u zemljištu postoji u više oksidacionih stanja, od kojih su nastabilniji  $\text{Cr}^{3+}$  i  $\text{Cr}^{6+}$ .  $\text{Cr}^{3+}$  je izrazito slabo pokretan i lako se adsorbuje za čestice. Njegova rastvorljivost se smanjuje kada je pH zemljišta iznad 4, a taloži se pri  $\text{pH} > 5$ , te se njegova jedinjenja smatraju veoma stabilnim u zemljištu. S druge strane,  $\text{Cr}^{6+}$  je veoma mobilan i u kiselim i u alkalnim zemljištima [25, 200]. Međutim, pri visokom redoks potencijalu i u prisustvu organske materije  $\text{Cr}^{6+}$  se redukuje u  $\text{Cr}^{3+}$ .

U ispitivanom zemljišnom supstratu sadržaj Ni, Cu, Zn i Co je bio ispod maksimalno dozvoljenih vrijednosti, koje su za ove metale propisane nacionalnom regulativom [199].

Pseudototalna koncentracija Cu koju smo zabilježili u zemljišnom supstratu iznosila je 19.66  $\mu\text{g/g}$  i bila je u skladu sa opsegom koncentracija zabilježenim u nekontaminiranim zemljištima širom svijeta (14-109 mg/kg) [23,25]. Što se tiče mobilnosti, 57.23% Cu se izdvaja u rezidualnoj fazi, praćenju oksidabilnom (34.32%), na osnovu čega možemo zaključiti da Cu nije mobilan odnosno biodostupan. Cu koji se nalazi u zemljištu vodi porijeklo iz primarnih minerala u kojima se javlja u jednovalentnom obliku [201]. Njihovim raspadanjem oksiduje se u  $\text{Cu}^{2+}$  i sa organskim kiselinama u zemljištu gradi stabilne komplekse što ga čini slabo dostupnim.

Sličnu procentualnu raspodjelu bilježimo i za Zn. U rezidualnoj frakciji je ekstrahovano 57.89% Zn, a u oksidabilnoj 21.23%. Pseudototalna koncentracija Zn je iznosila 44.8  $\mu\text{g/g}$  i približno je u opsegu uobičajenih prosječnih koncentracija (60-89 mg/kg) [23,25]. Minerali gline, oksidi, hidroksidi i pH vrijednost su najvažniji faktori koji kontrolišu rastvorljivost, pokretljivost, a samim tim i biodostupnost Zn iz zemljišta [184].

Pseudototalna koncentracija Ni u našem zemljišnom supstratu bila je 23.0  $\mu\text{g/g}$ , što u skladu sa opsegom koncentracija zabilježenim u literaturi (od 13 mg/kg do 37 mg/kg) [25]. Najveći procenat ovog mikroelementa je izdvojen u rezidualnoj frakciji (55.48%) koja je praćena reducibilnom (22.22%).

Takođe, najveći procenat i Co je detektovan u rezidualnoj frakciji (42.09%). Međutim s obzirom da nešto manje od 60% ukupne koncentracije Co čini zbir prve tri frakcije, ovaj makroelement se može smatrati potencijalno mobilnim i biodostupnim borovnici. Dostupnost i ovog elementa biljkama zavisi od pH vrednosti zemljišta. Biljke ga lako usvajaju u kiseloj sredini, međutim porastom pH vrijednosti iznad 6.5 dolazi do naglog pada u dostupnosti čak i za 50% [165]. Pseudototalna koncentracija Co u našem zemljišnom supstratu je bila 14.56  $\mu\text{g/g}$ . Prosječna koncentracija Co u zemljištima iznosi 10 mg/kg, ali zavisno od vrste zemljišta, vrijednosti mogu biti i znatno veće [23,25].

Pseudototalna koncentracija Sr u našem zemljišnom supstratu je iznosila 22.7  $\mu\text{g/g}$ . U nekontaminiranim zemljištima širom svijeta njegov sadržaj se kreće od 7 mg/kg do preko 200 mg/kg [23,25]. Sr se smatra umjereno mobilnim u zemljištu i njegov dominirajući katjon  $\text{Sr}^{2+}$  je najverovatnije prisutan u hidratiziranoj formi u mineralima gline i Fe oksida i hidroksida [25]. BCR ekstrakcijom našeg uzorka najveći procenat Sr smo zabilježili u rezidualnoj frakciji (54.83%), praćenju izmjenjivom, kiselo rastvornom (22.50%).

U ispitivanom zemljišnom supstratu sadržaj toksičnih elemenata (Pb, Cd i As) je takođe bio ispod maksimalno dozvoljenih vrijednosti propisanih nacionalnom regulativom [199].

Koncentracije Pb u nekontaminiranim zemljištima širom svijeta variraju od 3 mg/kg do 90 mg/kg, a prosječan sadržaj procijenjen je na 27 mg/kg [23,25]. Mi smo izmjerili pseudototalnu koncentraciju od 34.9  $\mu\text{g/g}$  što je u saglasnosti sa tim literaturnim podacima. BCR sekvencijalnom ekstrakcijom najveći procenat Pb smo zabilježili u reducibilnoj (76.41%), zatim oksidabilnoj (13.27%) i na kraju rezidualnoj (9.73%) frakciji. Ako se posmatraju samo prve 3 frakcije, njihov zbir iznosi preko 90%, tako da iako je pseudototalna koncentracija ovog metala u ispitivanom zemljištu bila ispod maksimalno dozvoljene propisane nacionalnom regulativom [199], ovakva raspodjela može predstavljati problem jer i najmanje snižavanje pH vrijednosti može učiniti olovo biodostupnim [25,202]. Naime, istraživanja su pokazala da njegova velika adsorpcija od strane organskih materija (2 do 3 puta jača od  $\text{Ca}^{2+}$  jona) ga čini vrlo slabo pokretljivim čak i najmanje mobilnim od svih

toksičnih metala, ali da povećanjem kiselosti zemljišnog rastvora povećava se njegova rastvorljivost i pokretljivost u zemljištu [203-205].

Pseudototalna koncentracija As koju smo zabilježili u ispitivanom zemljišnom supstratu (1.6  $\mu\text{g/g}$ ) u skladu je sa literaturnim podacima (1-40 mg/kg) [25,206]. Što se tiče mobilnosti, BCR ekstrakcijom najveći procenat As je izdvojen u rezidualnoj frakciji (46.91%), praćenju oksidabilnom (46.60%), na osnovu čega možemo zaključiti da As nije mobilan na ispitivanom lokalitetu. Hemija As u zemljištu je dosta slična hemiji fosfora [18]. Faktori koji utiču na ponašanje fosfata u zemljištu utiču i na ponašanje As. Tako, Fe, Al i Ca imaju veliku ulogu u fiksaciji As u zemljištu. Najstabilnija jedinjenja su  $\text{As}^{3+}$  i  $\text{As}^{5+}$ .  $\text{As}^{5+}$  prevladava u oksidacionim, a  $\text{As}^{3+}$  u redukcionim uslovima.  $\text{As}^{3+}$  je mnogo toksičniji, rastvorljiviji i mobilniji od  $\text{As}^{5+}$  [25].

Sličnu procentualnu raspodjelu smo zabilježili i za Cd, primjenom BCR sekvencijalne ekstrakcione procedure. U rezidualnoj frakciji izdvojeno je 56.49% Cd, dok je u oksidabilnoj ekstrahovani procenat bio 18.08%. Poznato je da zemljišta koja sadrže  $\text{CaCO}_3$  vezuju Cd i na taj način smanjuju njegovu pokretljivost i pristupačnost biljkama [207]. Pseudototalna koncentracija Cd u našem zemljišnom supstratu je iznosila 0.48  $\mu\text{g/g}$ , dok je u zemljištima širom svijeta detektovani opseg bio od 0.2 do 1.1 mg/kg [25].

## 4.2. Biokoncentracioni i translokacioni faktori

U cilju razumjevanja akumulacionog potencijala borovnice izračunali smo biokoncentracioni (BCF) i translokacioni (TF) faktor za svaki element.

Dobijene BCF i TF vrijednosti su predstavljene u tabeli 5.

Tabela 5. Biokoncentracioni (BCF) i translokacioni faktor (TF)

Elementi:	$\text{BCF}_r$	$\text{BCF}_s$	$\text{BCF}_l$	$\text{BCF}_f$	$\text{TF}_s$	$\text{TF}_l$	$\text{TF}_f$
As	* np	np	np	np	np	np	np
Ba	<b>1.08</b>	<b>2.76</b>	<b>2.34</b>	0.18	<b>2.56</b>	<b>2.17</b>	0.17
Cd	0.71	0.57	0.41	0.21	0.81	0.58	0.30
Co	0.01	np	np	np	np	nd	np
Cr	0.23	0.10	0.13	0.03	0.46	0.57	0.15
Cu	0.62	0.70	0.61	0.55	<b>1.13</b>	0.99	0.89
Mn	<b>3.62</b>	<b>6.45</b>	<b>12.54</b>	0.03	<b>1.78</b>	<b>3.46</b>	0.01
Ni	np	np	np	np	np	np	np
Pb	0.17	0.13	0.14	0.01	0.77	0.81	0.04
Sr	<b>1.60</b>	<b>4.80</b>	<b>5.31</b>	0.12	<b>3.01</b>	<b>3.32</b>	0.07
Zn	0.83	<b>2.80</b>	0.93	0.40	<b>3.39</b>	<b>1.13</b>	0.49
Al	0.07	0.06	0.12	0.02	0.86	<b>1.81</b>	0.33
Ca	0.20	0.85	<b>1.51</b>	0.04	<b>4.33</b>	<b>7.70</b>	0.21
Fe	0.07	0.04	0.13	0.01	0.57	<b>1.77</b>	0.09
K	<b>1.39</b>	<b>3.35</b>	<b>5.27</b>	<b>1.39</b>	<b>2.42</b>	<b>3.81</b>	<b>1.00</b>
Mg	0.14	0.40	0.92	0.12	<b>2.83</b>	<b>6.53</b>	0.83

\* np – nije primjenljivo

U slučaju makroelemenata vidimo da se K izuzetno koncentruje u svim dijelovima borovnice, sa najvećom vrijednošću u listovima (BCF od 1.39 do 5.27). K je aktivator brojnih enzima, ima značajnu ulogu u biosintezi proteina, nukleinskih kiselina, utiče na vodni režim biljke, stvaranje aromatičnih materija, osmoregulaciju, fotosintezu, disanje i druge fiziološke procese u biljci [184,194,208]. S obzirom da K ima višestruku ulogu u životnim procesima biljke, od izuzetnog značaja je njena optimalna obezbjeđenost ovim elementom, te i pored slabe mobilnosti koju je ovaj makroelement pokazao u ispitivanom zemljišnom supstratu primjenom BCR sekvencijalne ekstrakcione procedure, dobijena akumulacija K u borovnici nije iznenađujuća.

Ca i Mg se takođe najviše akumuliraju u listovima (BCF vrijednost 1.51 odnosno 0.92, respektivno) ispitivane borovnice. Naime, iako se Ca može naći u svakoj zelenoj biljci i to u velikim količinama, poznato je ne ulazi u sastav hlorofila i proteina. Zapravo je značajan kao element koji utiče na čvrstoću ćelijskih membrana a samim tim i cijele biljke [184,186,203,209]. Suprotno, čak 20% Mg u suvom biljnom materijalu potiče iz hlorofila te u velikoj mjeri utiče na proces fotosinteze i tako predstavlja ključni makroelement za rast i razvoj biljke [184,203,209]. Pored ove funkcije Mg utiče na mnoštvo drugih biohemijskih procesa u biljkama, uključujući prenos energije i sintezu proteina. Takođe, kao i Ca, Mg igra značajnu ulogu u neutralizaciji organskih kiselina sintetisanih u biljnoj ćeliji [203].

Ispitivana borovnica je pokazala vrlo slab stepen usvajanja i akumulacije Fe. BCF vrijednost se kretala u opsegu od 0.01 u plodu do 0.13 u listovima ove biljke. Ovaj nalaz bi mogao biti zabrinjavajući, s obzirom da je Fe od izuzetnog značaja u životnom ciklusu biljke. Fe učestvuje u formiranju hlorofila i neizbježan je sastojak nekih aminokiselina i proteina. Takođe ima značajnu ulogu u formiranju esencijalnih enzima (katalaze, reduktaze i peroksidaze), i njegovo prisustvo je osnova za proces disanja [184]. BCR sekvencijalna ekstrakciona procedura je pokazala da na ispitivanom lokalitetu rasta borovnice najveći procenat Fe je izdvojen u rezidualnoj frakciji (čak 71.52%), što je ukazalo na izuzetno slabu pokretljivost i dostupnost ovog elementa biljci. Slaba pristupačnost se najčešće može javiti u karbonatnim zemljištima, zbog velike tendencije Fe da u njima gradi oblike jedinjenja koje biljka ne može da usvoji [203].

Borovnica je takođe pokazala vrlo slab stepen usvajanja i akumulacije Al. BCF vrijednost se kretala od 0.02 u plodu do 0.12 u listovima ove biljke. Al u malim količinama stimulatивно može djelovati na rast biljaka, kao i smanjiti štetno dejstvo visoke koncentracije Cu, mada više se ispituju njegove toksične količine koje dovode do blokiranja jonskih kanala za ulazak K i Ca što uzrokuje narušavanje brojnih fizioloških procesa u biljkama [210].

Ukoliko posmatramo BCF vrijednosti dobijene za mikroelemente, primjećujemo da se Mn u izuzetnoj mjeri akumulira u korijenu, stablu i listovima borovnice (BCF od 3.62 do 12.54). Ovakva akumulacija Mn je svakako opravdana zbog njegove značajne uloge koju ima u ciklusu biljke. Mn je uključen u proces proizvodnje kiseonika i transporta elektrona tokom fotosinteze [165,184,201]. Takođe, učestvuje u asimilaciji azota, procesu formiranja organskih azotnih jedinjenja (aminokiseline) iz neorganskih prisutnih u životnoj sredini. S obzirom da predstavlja važnu komponentu enzima superoksid dismutaze, njegova najvažnija funkcija je učešće u različitim oksido-redukcionim procesima i izgradnja otpornosti prema abiotičkim i biotičkim stresovima.

Zn se takođe koncentruje u korijenu, stablu i listu borovnice (BCF od 0.83 do 2.80). Kao sastavni dio brojnih enzima Zn je uključen u proces sinteze RNK i nekih proteinskih struktura. Takođe učestvuje u izgradnji superoksid dismutaze, enzima važnog za zaštitu biljke od stresa [211]. Njegova najvažnija uloga je u regulaciji rasta biljke i izdužavanju stabljike s obzirom da je esencijalan u formiranju hormona auksina [165].

Cu se približno jednako koncentruje kroz sve dijelove borovnice, uključujući i plod (BCF od 0.55 do 0.70). Istraživanja su pokazala da iako biljke usvajaju male količine Cu, u poređenju sa ostalim esencijalnim elementima procenat usvajanja je najniži, ovaj mikroelement ulazi u sastav enzima od vitalnog značaja za metabolizam biljke [23,184,212]. Ima važnu ulogu u fotosintetskom i elektron transportnom lancu, u metabolizmu ćelijskog zida, proteina a kao integralna komponenta enzima superoksid dismutaze doprinosi i zaštiti biljke od oksidativnog stresa [23,184,212,213].

Ba i Sr se izuzetno koncentruju u korijenu, stablu i listu borovnice (BCF od 1.08 do 5.31). Sr i Ba nisu elementi neophodni za rast i razvoj biljke, ali sličnost sa Ca vjerovatno čini da se lako usvajaju i transportuju u biljkama [214,215]. Bez obzira na sličnost oni ne mogu da zamjene Ca u biohemijskim funkcijama.

Borovnica sa područja Bjelasice nije pokazala moć akumulacije Ni. S obzirom da je ponašanje elemenata u zemljištu uslovljeno pH vrijednošću, sadržajem oksida i hidroksida Fe i Mn, prisustvom organske materije, ovo nije iznenađujuće, jer je i BCR ekstrakcija pokazala da se najveći procenat Ni iz ispitivanog zemljišnog supstrata ekstrahovao u rezidualnoj frakciji (55.48%), frakciji koja je najmanje mobilna a onda i reducibilnoj frakciji (22.22%), frakciji vezanoj za okside i hidrokside Fe



i Mn. Biljkama je potrebna vrlo mala količina ovog elementa, jer kao gradivna komponenta enzima ureaze Ni ima važnu ulogu u životnom ciklusu biljke i njegov nedostatak može uzrokovati nakupljanje uree u listovima [184,201,216].

Borovnica je pokazala vrlo slabu moć akumulacije Cr (BCF od 0.03 u plodu do 0.23 u listovima), što je takođe bilo za očekivati s obzirom da se preko 90% ovog mikroelementa iz zemljišnog supstrata ekstrahovalo u rezidualnoj frakciji. Međutim, nije još uvijek ni utvrđena fiziološka uloga odnosno neophodnost ovog mikroelementa u biljkama [217].

Takođe, borovnica je pokazala vrlo mali stepen akumulacije Co u korijenu (BCF je bio 0.01), dok se u stablu, listovima i plodu Co nije akumulirao. S obzirom da nije utvrđena fiziološka uloga odnosno neophodnost ni ovog mikroelementa u biljkama ovakva akumulacija nije iznenađujuća [201], iako je BCR ekstrakcija pokazala da je Co u ispitivanom zemljišnom supstratu potencijalno mobilan i oko 60% čini zbir prve tri faze.

Što se tiče toksičnih metala As nije detektovan u borovnici. Takođe, borovnica je pokazala vrlo mali stepen akumulacije Pb (BCF od 0.07 do 0.17). Ovo je od izuzetne važnosti, s obzirom da je BCR sekvencijalna ekstrakcija potvrdila izuzetnu mobilnost a samim tim i biodostupnost Pb na ispitivanom zemljišnom supstratu (preko 90% čini zbir prve tri frakcije).

U slučaju Cd nešto veći biokoncentracioni faktor se javlja kod korijena biljke, mada je njegova vrednost bila ispod jedinice (0.71). U stablu, listovima i plodu akumulacija Cd je bila još slabija (BCF je iznosio do 0.57).

Naime, iako postoje misljenja da As, Pb i Cd u malim količinama mogu biti stimulatori rasta biljke, usvajanje ovih elemenata i veoma visok afinitet koji pokazuju prema tiolnim grupama (-SH) brojnih enzima i proteina zapravo inhibira rast i razvoj same biljke [19].

Na osnovu dobijenih vrednosti translokacionih faktora može se zaključiti da se K, Mg i Cu (TF vrijednost od 0.83 do 1.00) u značajnoj mjeri transportuju iz korijena do ploda. Takođe je bitno uočiti da ne dolazi do translokacije toksičnih mikroelemenata do ploda, već se u većoj mjeri translociraju prema stablu ili listu, pri čemu je TF vrijednost i u ovom slučaju manja od 1. Od esencijalnih elemenata do listova se iz korijena transportuju svi makroelementi, kao i Mn, Zn (TF vrijednost od 1.13 do 7.70). Naime, dobijeni translokacioni podaci, pored biokoncentracionih vrijednosti ukazuju da se plod i listovi borovnice mogu bezbjedno primjenjivati kako u ishrani lokalnog stanovništva tako i za tretiranje različitih oboljenja u tradicionalnoj medicini.

### 4.3. Sadržaj makroelemenata i mikroelemenata u borovnici

Ljekovito bilje i njihovi ekstrakti zaslužuju pažnju zbog značajnog uticaja na ljudsko zdravlje. Za većinu svjetske populacije ljekovito bilje predstavlja primarni izvor zdravstvene zaštite.

Iako je blagotvorno dejstvo ljekovitog bilja uglavnom povezano sa visokim sadržajem raznovrsnih sekundarnih metabolita, u njima se mogu naći i esencijalni makroelementi i mikroelementi koji su od velikog značaja, obzirom da su ljudskom tijelu u određenim koncentracijama neophodni za optimalno funkcionisanje. Međutim, utvrđeno je da produžen unos može da izazove zdravstvene probleme zbog mogućeg prisustva toksičnih elemenata. Zbog toga je od izuzetne važnosti određivanje sadržaja makroelemenata i mikroelemenata u biljnom materijalu kako zbog nutritivnih vrijednosti ali i da bi se spriječio eventualni štetni efekat usled unosa toksičnih elemenata.

U tabeli 6 prikazan je sadržaj makroelemenata i mikroelemenata u korijenu, stablu, listu i plodu samonikle borovnice, kao i sadržaj makroelemenata i mikroelemenata u listu i plodu komercijalne borovnice.

Tabela 6. Sadržaj makroelemenata i mikroelemenata u korijenu, stablu, listu i plodu samonikle borovnice, kao i sadržaj makroelemenata i mikroelemenata u listu i plodu komercijalne borovnice

Elementi ( $\mu\text{g/g}$ )	Samonikla borovnica				Komercijalna borovnica	
	Korijen (WBR)	Stablo (WBS)	List (WBL)	Plod (WBF)	List (CBL)	Plod (CBF)
As	* nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ba	58.5 $\pm$ 0.5	150.0 $\pm$ 0.7	127.2 $\pm$ 0.5	9.70 $\pm$ 0.04	119.5 $\pm$ 0.4	14.05 $\pm$ 0.05
Cd	0.136 $\pm$ 0.007	0.111 $\pm$ 0.004	0.079 $\pm$ 0.005	0.041 $\pm$ 0.004	0.073 $\pm$ 0.005	0.021 $\pm$ 0.005
Co	0.087 $\pm$ 0.002	nd	nd	nd	0.600 $\pm$ 0.001	0.534 $\pm$ 0.002
Cr	3.47 $\pm$ 0.06	1.58 $\pm$ 0.08	1.98 $\pm$ 0.04	0.52 $\pm$ 0.02	1.99 $\pm$ 0.06	0.833 $\pm$ 0.005
Cu	5.73 $\pm$ 0.04	6.50 $\pm$ 0.04	5.68 $\pm$ 0.04	5.11 $\pm$ 0.07	6.78 $\pm$ 0.05	4.378 $\pm$ 0.004
Mn	1701 $\pm$ 25	3031 $\pm$ 11	5887 $\pm$ 30	13.61 $\pm$ 0.02	5955 $\pm$ 23	14.07 $\pm$ 0.05
Ni	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Pb	5.09 $\pm$ 0.05	3.90 $\pm$ 0.04	4.11 $\pm$ 0.06	0.20 $\pm$ 0.02	4.29 $\pm$ 0.08	0.237 $\pm$ 0.006
Sr	18.12 $\pm$ 0.08	54.5 $\pm$ 0.4	60.2 $\pm$ 0.2	1.32 $\pm$ 0.02	52.3 $\pm$ 0.5	2.057 $\pm$ 0.009
Zn	14.84 $\pm$ 0.08	50.3 $\pm$ 0.2	16.76 $\pm$ 0.07	7.24 $\pm$ 0.04	29.19 $\pm$ 0.07	13.83 $\pm$ 0.06
Al	380 $\pm$ 2	328 $\pm$ 2	689 $\pm$ 2	126.8 $\pm$ 0.6	594.0 $\pm$ 0.8	130.6 $\pm$ 1.0
Ca	3028 $\pm$ 9	13116 $\pm$ 105	23330 $\pm$ 210	651 $\pm$ 8	17264 $\pm$ 180	1419 $\pm$ 15
Fe	349 $\pm$ 2	200.0 $\pm$ 0.5	620 $\pm$ 2	32.5 $\pm$ 0.5	580 $\pm$ 4	45.2 $\pm$ 0.2
K	5285 $\pm$ 10	12796 $\pm$ 57	20113 $\pm$ 210	5290 $\pm$ 50	16894 $\pm$ 80	5474 $\pm$ 42
Mg	504 $\pm$ 3	1424 $\pm$ 12	3286 $\pm$ 14	419 $\pm$ 7	2324 $\pm$ 20	653 $\pm$ 7

\* nd – nije detektovan

Dobijeni procentualni dnevni unos esencijalnih makroelemenata i mikroelemenata, kao i toksičnih elemenata iz jedne porcije ispitivanih borovnica predstavljen je u tabeli 7.

Sadržaj Co je u stablu, listu i plodu samonikle borovnice bio ispod granice detekcije instrumenta ( $<0.011 \mu\text{g/g}$ ), dok je u korijenu njegova vrijednost iznosila  $0.087 \mu\text{g/g}$ . U komercijalnim uzorcima bilježi se značajna koncentracija ovog mikroelementa (komercijalni list bilježi  $0.600 \mu\text{g/g}$ , dok je u komercijalnom plodu zabilježeno  $0.534 \mu\text{g/g}$ ).

Koncentracije preostalih ispitivanih elemenata u samoniklim i komercijalnim uzorcima ne razlikuje se bitno.

Takođe, poredeći list i plod borovnice zapažamo da niži sadržaj makroelemenata i mikroelemenata bilježe u plodu ove biljke.

Tokom usvajanja od strane biljaka, Co je slabo pokretljiv i zato se sporo premješta od korijena do nadzemnih djelova [218], što je vjerovatno i razlog zbog kojeg ga nismo detektovali u nadzemnim djelovima samonikle borovnice. Raimann i saradnici [219] su proučavajući listove borovnice iz nezagađenih područja Sjeverne Evrope zabilježili znatno nižu koncentraciju Co ( $0.044 \mu\text{g/g}$ ) od naše zabilježene u listovima komercijalne borovnice (CBL).

Co je esencijalan element i predstavlja dio vitamina B12. Ovaj vitamin učestvuje u proizvodnji crvenih krvnih zrnaca, kao i jedinjenja koja sprječavaju nastanak bakterijskih i virusnih infekcija [220]. Značajan je i u metabolizmu masti, ugljenih hidrata i proteina [25]. U nervnom sistemu sprječava demijelinaciju, to jest oštećenje ovojnice nervnih vlakana, čime omogućava normalan prenos nervnih impulsa kroz tijelo. Nije definisana preporučena količina za Co, već samo postoji preporuka za vitamin B12 koja na dnevnom nivou iznosi  $2.5 \mu\text{g}$  [25,176]. S tim u vezi, možemo zaključiti da porcija od 100 g borovnica (komercijalni plod) snabdijeva konzumente značajnom količinom ovog mikroelementa ( $8.54 \mu\text{g}$ ). Može se reći i da bi morao postojati izvjestan oprez pri konzumaciji ove borovnice, ako se pretpostavi da nije jedini dnevni izvor Co iz hrane. Njegov pretjerani unos u tijelu može izazvati kardiološke probleme [221], takođe dovesti do policitemije (povišena proizvodnja crvenih krvnih zrnaca) što je jedan od faktora nastanka krvnih ugrušaka i moždanog udara. Visok nivo Co može poremetiti funkcionisanje štitaste žlijezde kao i dovesti do hiperglikemije to jest povišenog nivo šećera u krvi.

S druge strane, konzumiranje porcije ploda samonikle borovnice sa područja Bjelasice ne predstavlja izvor Co.

Tabela 7. Procentualni dnevni unos a) esencijalnih makroelemenata i mikroelemenata i b) toksičnih elemenata, iz jedne porcije ispitivanih borovnica (prosječna koncentracija elemenata u 100 g samonikle borovnice, ACWF; Prosječna koncentracija elemenata u 100 g komercijalne borovnice, ACCF)

a)

Elementi	ACWF	RDA (mg/dan)	DMI (%)	ACCF	RDA (mg/dan)	DMI (%)
Co	*nd	2.5 µg	/	8.544	2.5 µg	341.76
Cr	0.008	0.04 mg	20	0.0128	0.04 mg	32
Cu	0.081	1 mg	8	0.064	1 mg	6.4
Mn	0.217	2 mg	10.4	0.224	2 mg	11.2
Zn	0.115	10 mg	1.12	0.208	10 mg	2.08
Ca	10.416	800 mg	1.302	22.704	800 mg	2.838
Fe	0.520	14 mg	3.714	0.7232	14 mg	5.165
K	84.640	2000 mg	4.232	87.584	2000 mg	4.378
Mg	6.704	375 mg	1.787	10.448	375 mg	2.786

\*nd-nije detektovan

b)

Elementi	ACWF	MDI (µg/dan)	DI (%)	ACCF	MDI (µg/dan)	DI (%)
As	nd	150 µg	/	nd	150 µg	/
Cd	0.656	25 µg	2.624	0.336	25 µg	1.344
Ni	nd	196 µg	/	nd	196 µg	/
Pb	3.200	250 µg	1.28	3.792	250 µg	1.5168
Al	2.016	10 mg	20.16	2.0896	10 mg	20.89

Najzastupljeniji makroelement u korijenu i plodu samonikle borovnice (WBR i WBF) je K (5285 µg/g i 5290 µg/g, respektivno) praćen Ca (3028 µg/g i 651 µg/g, respektivno), dok je u stablu i listu (WBS i WBL) najzastupljeniji Ca (13116 µg/g i 23330 µg/g, respektivno) praćen K (12796 µg/g i 20113 µg/g, respektivno). U svim ispitivanim uzorcima dalje slijedi Mg (od 419 µg/g u WBF do 3286 µg/g u WBL), zatim Al (od 126.8 µg/g u WBF do 689 µg/g u WBL) i Fe (od 32.5 µg/g u WBF do 620 µg/g u WBL).

Koncentracije K, Ca, Mg, Al i Fe u listu komercijalne borovnice (CBL) iznosile su 16894 µg/g, 17264 µg/g, 2324 µg/g, 594.0 µg/g i 580 µg/g redom, dok su u plodu ove biljke (CBF) bile 5474 µg/g, 1419 µg/g, 653 µg/g, 130.6 µg/g, i 45.2 µg/g, respektivno.

Koncentracija Mg koju smo detektovali u listovima samonikle borovnice (WBL) bila je veća od koncentracije koju bilježe Reimann i saradnici (2280 µg/g), dok smo u listovima komercijalne borovnice (CBL) zabilježili slično [219]. Dalje, uzorci lista (WBL i CBL) bilježe koncentracije Ca, K i Al veće u odnosu na one koje su detektovali isti autori (7890 µg/g, 8730 µg/g, 101 µg/g respektivno). Gallaher sa saradnicima [222] ispitujući čaj od lista borovnice namijenjen tržištu Floride, bilježi niže koncentracije Ca, Mg i K (18.82 mg/kg, 12.64 mg/kg, 9.94 mg/kg, respektivno) od naših. Naši uzorci, WBL i CBL, sadržali su veću koncentraciju Fe u odnosu na literaturne nalaze (od 6.72 µg/g do 240.15 µg/g) [219,222-225].

Koncentracije K, Ca, Mg, Fe i Al u našim uzorcima ploda (WBF i CBF) bile su veće u odnosu na koncentracije koje su u uzorcima ploda sa nezagađenih područja Letonije [226] detektovane (482.4 µg/g, 160.4 µg/g, 53.12 µg/g, 1.69 µg/g, 3.06 µg/g, respektivno). Takođe, Demczuk i saradnici [227]

u plodu sa nezagađenih područja Poljske (od 14.4 µg/g do 29.7 µg/g) pronašli su nešto nižu koncentraciju Fe od naše.

S obzirom da preporučene dnevne potrebe K, Fe, Mg i Ca, prema direktivi Evropske unije, iznose 2000 mg, 14 mg, 375 mg, 800 mg [176], možemo primjetiti da je dnevni doprinos ovih esencijalnih makroelemenata iz jedne porcije ispitivanih borovnica prilično beznačajan i iznosi iz WBF 4.23%, 3.71%, 1.78% i 1.30%, redom, a iz CBF 4.37%, 5.16%, 2.78% i 2.83%, respektivno, od preporučenog dnevnog unosa.

Što se tiče Al, nedeljni unos koji se može tolerisati iznosi 1 mg/kg tjelesne mase što predstavlja 10 mg po danu prosječnog konzumenta [25]. Iz naših rezultata se može vidjeti da jedna porcija WBF sadrži 20.16% dok CBF sadrži 20.89% od maksimalne količine Al koja se može tolerisati na dnevnom nivou. Iako se ranije smatralo da Al nema doprinosa u metaboličkim funkcijama [164], dokazano je da predstavlja neophodan kofaktor u metabolizmu proteina. Međutim, povećan unos ovog elementa kod bubrežnih bolesnika može dovesti do razmekšanja kostiju (osteomalacije) i smatra se da je jedan od mogućih uzročnika Alchajmerove bolesti [25].

Raspodjela mikroelemenata (Mn>Zn>Cu>Cr) i toksičnih metala (Cd>Pb) u svim ispitivanim uzorcima prati isti trend.

Mn, Zn, Cu i Cr najnižu koncentraciju bilježe u plodu samonikle borovnice, WBF (13.61 µg/g, 7.24 µg/g, 5.11 µg/g i 0.52 µg/g, respektivno) dok najveću koncentraciju Mn bilježi u listu, WBL (5887 µg/g), Zn i Cu u stablu, WBS (50.3 µg/g i 6.50 µg/g, respektivno) a Cr u korijenu WBR, (3.47 µg/g) ove biljke.

Koncentracije Mn, Zn, Cu i Cr u listu komercijalne borovnice (CBL) iznosile su 5955 µg/g, 29.19 µg/g, 6.78 µg/g, 1.99 µg/g redom, dok su u plodu ove biljke (CBF) bile 14.07 µg/g, 13.83 µg/g, 4.378 µg/g, 0.833 µg/g, respektivno.

Koncentracija Mn u našim uzorcima lista (WBL i CBL) je veća u odnosu na literaturne navode u kojima se koncentracija Mn kreće u širokom opsegu, od 1.30 µg/g do 3952 µg/g [219,222-225], dok je sadržaj Cu, Zn i Cr u saglasnosti sa literaturnim opsegom zabilježenim za ove mikroelemente (od 0.017 µg/g do 7.8 µg/g za Cu, od 0.051 µg/g do 72.32 µg/g za Zn, i do 2.2 µg/g za Cr) [219,222-225].

Dobijene vrijednosti za Mn u našim uzorcima ploda (WBF i CBF) bile su niže od literaturnih navoda u kojima je koncentracija ovog mikroelementa bila od 18.82 µg/g do 130 µg/g [226,227]. Koncentracija Cu bila je u skladu sa nalazom koji su objavili Demczuk i saradnici [227]. Naime, ovi autori su proučavajući plod borovnice sa područja Poljske zabilježili koncentracije Cu od 3.68 µg/g do 5.11 µg/g. Što se tiče Zn, WBF sadrži količinu koja je takođe u opsegu koji su Demczuk i saradnici zabilježili (od 5.45 µg/g do 9.2 µg/g) dok smo u CBF pronašli nešto veći sadržaj ovog mikroelementa. S druge strane, znatno niže vrijednosti Zn, Cu i Cr bilježe se u uzorcima ploda sa područja Letonije (1.16 µg/g, 0.309 µg/g, 0.021 µg/g) [226] od onih koje smo mi detektovali u plodu biljke (WBF i CBF).

S obzirom da preporučene dnevne potrebe Cr iznose 0.04 mg [176], dnevni doprinos Cr iz jedne porcije ispitivanih borovnica je vrlo značajan (20% iz WBF i 32% iz CBF od preporučenog dnevnog unosa). Ovaj nalaz može biti od velike važnosti, naročito za dijabetičare, pošto je poznato da je jedna od najvažnijih uloga Cr u ljudskom organizmu podsticanje proizvodnje insulina i stoga se kao dodatak njihovoj ishrani često preporučuje upravo ovaj mikroelement [8,9].

Dalje, s obzirom da preporučeni dnevni unos Mn iznosi 2 mg [176], porcija ispitivanih borovnica obezbjeđuje zadovoljenje 10.4% (WBF) odnosno 11.2% (CBF) od dnevnih potreba. Poznato je da Mn ima višestruku ulogu u ljudskom organizmu. Kao sastojak enzimskog antioksidansa vrlo je značajan jer pomaže tijelu u uništavanju slobodnih radikala koji mogu dovesti do nepovratnih oštećenja a samim tim i nepovoljno uticati na zdravlje čovjeka [8,9].

Konzumiranje jedne porcije ispitivanih borovnica obezbjeđuje zadovoljenje 8% (WBF) odnosno 6.4% (CBF) dnevnih potreba Cu (1 mg). Kao gradivna komponenta velikog broja različitih enzima Cu je neophodan za optimalno funkcionisanje ljudskog organizma u cjelini [8,9].

Zadovoljenje potreba za Zn konzumiranjem jedne porcije ispitivanih borovnica je beznačajno (1.12% iz WBF i 2.08% iz CBF).

Što se tiče toksičnih metala, Pb i Cd, vidimo da najveću koncentraciju bilježe u korijenu samonikle borovnice (WBR 0.136  $\mu\text{g/g}$  i 5.09  $\mu\text{g/g}$ , respektivno) dok najmanju u plodu (WBF 0.20  $\mu\text{g/g}$ , 0.041  $\mu\text{g/g}$  respektivno).

Dobijene vrijednosti Cd u uzorcima lista samonikle (0.079  $\mu\text{g/g}$ ) i komercijalne borovnice (0.073  $\mu\text{g/g}$ ) u donjem su dijelu uobičajenog opsega zabilježenog u literaturi (od 0.009  $\mu\text{g/g}$  do 0.6  $\mu\text{g/g}$ ) [219,223,225]. Koncentracije Pb u uzorcima lista samonikle (4.11  $\mu\text{g/g}$ ) i komercijalne (4.29  $\mu\text{g/g}$ ) borovnice u skladu su sa opsegom koncentracija koji bilježi Ciupa sa saradnicima u uzorcima lista iz nezagađenih području Poljske [225]. Ovi autori su našli sezonske varijacije na sadržaj Pb (nadjeno je i do 40.13  $\mu\text{g/g}$ ). S druge strane nešto niži sadržaj Pb od našeg zabilježili su Kazananecki i saradnici [223] ispitujući list ove biljke iz nezagađenih područja u Poljskoj kao i Reimann sa saradnicima [219] ispitujući isti dio borovnice iz različitih nezagađenih područja Sjeverne Evrope (od 0.13  $\mu\text{g/g}$  do 2.6  $\mu\text{g/g}$ ).

Dobijena koncentracija Cd u plodu komercijalne borovnice (0.021  $\mu\text{g/g}$ ) u saglasnosti je sa opsegom koji je u uzorcima ploda sa područja Poljske zabilježio Demczuk (od 0.01  $\mu\text{g/g}$  do 0.03  $\mu\text{g/g}$ ) [227] dok je nešto veća u odnosu na koncentraciju koju je u plodu sa područja Letonije zabilježio Skesters sa saradnicima (0.013  $\mu\text{g/g}$ ) [226]. Plod naše samonikle borovnice (WBF) bilježi nešto veću vrijednost Cd (0.041  $\mu\text{g/g}$ ). Koncentracije Pb u ispitivanim uzorcima ploda (plod samonikle borovnice bilježi 0.20  $\mu\text{g/g}$  dok komercijalni 0.237  $\mu\text{g/g}$ ) su u skladu sa opsegom koji je zabilježio Demczuk (od 0.12  $\mu\text{g/g}$  do 2.65  $\mu\text{g/g}$ ) [227].

Koncentracije Cd i Pb zabilježene u ispitivanim dijelovima samonikle i komercijalne borovnice niže su od graničnih vrijednosti koje za ove metale u ljekovitom bilju preporučuje Svjetska zdravstvena organizacija, WHO (0.3  $\mu\text{g/g}$  i 10  $\mu\text{g/g}$ , respektivno) [228].

Kada je u pitanju Cd, prihvatljiv nedeljni unos iznosi 2.5  $\mu\text{g/kg}$  tjelesne mase, što preračunato, na dnevnom nivou, na masu prosječnog konzumatora (70 kg) iznosi 25  $\mu\text{g}$  [229]. S obzirom da unos Cd pri konzumaciji 100 g ispitivanih borovnica iznosi 2.62% (WBF) odnosno 1.34% (CBF) od prihvatljivog unosa na dnevnom nivou, dobijene vrijednosti su daleko ispod onih koje mogu biti zabrinjavajuće, i koje bi dugotrajnim unosom mogle da izazove zdravstvene probleme.

Dalje, s obzirom da prihvatljiv nedeljni unos Pb iznosi 25  $\mu\text{g/kg}$  tjelesne mase, odnosno 250  $\mu\text{g}$  tokom dana po kilogramu prosječnog konzumatora [230], konzumiranjem 100 g ispitivanih borovnica unijeto olovo čini samo 1.28% (WBF) i 1.51% (CBF) od maksimalno prihvatljivog unosa na dnevnom nivou, što nam ukazuje da ni u pogledu sadržaja ovog metala nema štetnih posledica po zdravlje konzumatora.

Prihvatljiv nedeljni unos As iznosi do 15  $\mu\text{g/kg}$  tjelesne mase, odnosno 150  $\mu\text{g/kg}$  prosječnog konzumatora tokom dana [231], dok dnevni unos Ni koji se može tolerisati iznosi 2.8  $\mu\text{g/kg}$  tjelesne mase [25,232], što je ekvivalentno 196  $\mu\text{g}$  za prosječnog konzumenta. As i Ni u svim našim ispitivanim uzorcima bili su ispod granice detekcije instrumenta (0.047  $\mu\text{g/g}$ , 0.012  $\mu\text{g/g}$ , respektivno). Stoga ovaj nalaz dodatno doprinosi bezbjednoj upotrebi ploda ove biljke, bez toksikološkog rizika.

Reimann i saradnici [219] u listu borovnice bilježe koncentraciju As oko 0.03  $\mu\text{g/g}$ . Isti autori su zabilježili koncentraciju Ni oko 1.0  $\mu\text{g/g}$ , dok su Kazananecki i saradnici [223] pronašli nešto veće koncentracije Ni (od 3.8  $\mu\text{g/g}$  do 9.6  $\mu\text{g/g}$ ).

Koncentracija Ni koju je u uzorcima plodu sa područja Letonije zabilježio Skesters sa saradnicima [228] bila je 0.0217  $\mu\text{g/g}$ , dok su vrijednosti koje su objavili Demczuk i saradnici [227] bile od 0.05  $\mu\text{g/g}$  do 1.25  $\mu\text{g/g}$ .

Najveća koncentracija Ba zabilježena je u stablu (150.0  $\mu\text{g/g}$ ) a Sr u listovima (60.2  $\mu\text{g/g}$ ) samonikle borovnice, dok oba metala najmanji sadržaj bilježe u plodu (9.70  $\mu\text{g/g}$  i 1.32  $\mu\text{g/g}$ , respektivno).

Sadržaj Ba i Sr u uzorcima lista komercijalne borovnice (CBL) je bio 119.5  $\mu\text{g/g}$  i 52.3  $\mu\text{g/g}$  redom, dok je u uzorcima ploda (CBF) iznosio 14.05  $\mu\text{g/g}$  i 2.057  $\mu\text{g/g}$ , respektivno.

Poznato je da pozitivnu biološku ulogu Ba ispoljava samo pri malim dozama, kada služi kao mišićni stimulator. Veće koncentracije dovode do srčane aritmije i grčenja mišića jer Ba može da

blokira kalijumske kanale ćelijske membrane [233]. Najvećim dijelom Ba se skladišti u kostima, i odrasla osoba ima oko 20 mg.

Reimann i saradnici [219] u listu borovnice bilježe koncentracije Ba i Sr (43.6  $\mu\text{g/g}$  i 6.2  $\mu\text{g/g}$ , respektivno) niže od koncentracija koje smo mi zabilježili u uzorcima lista (WBL i CBL).

Vrijednosti Ba i Sr u plodu sa područja Letonije (1.25  $\mu\text{g/g}$  i 0.0631  $\mu\text{g/g}$ , respektivno) [226] takođe su niže od naših vrijednosti zabilježenih u uzorcima ploda (WBF i CBF).

Ove razlike u sadržaju metala u listu i plodu borovnice različitog porijekla mogu se objasniti time što njihovo prisustvo u biljnim tkivima zavisi od dostupnosti u tlu, faze rasta i morfoloških karakteristika biljke [224]. Takođe, nakupljanje metala može imati i sezonske varijacije [225].

#### 4.4. Sadržaj makroelemenata i mikroelemenata u vodenim i etanolnim ekstraktima borovnice

Sadržaj makroelemenata i mikroelemenata je vrlo bitan kriterijum koji utiče da li će se od nekog biljnog materijala pripremati napitak ili neki drugi tradicionalni lijek. Kontrola sadržaja elemenata je stoga od izuzetne važnosti ne samo u biljnom materijalu već i u biljnim napicima i raznim ekstraktima.

Imajući na umu, da se u tradicionalnoj medicini, za liječenje širokog spektra oboljenja najčešće koristi list i plod borovnice, mi smo pratili sadržaj makroelemenata i mikroelemenata u vodenim i etanolnim ekstraktima navedenih djelova (tabela 8). Na osnovu dobijenih rezultata, u zavisnosti od primjenjenog rastvarača, izračunali smo koeficijente ekstrakcije elemenata (tabela 9).

Na osnovu dobijenog procenta ekstrakcije, makroelementi i mikroelementi su podijeljeni u tri grupe [234]:

- Elementi sa niskim koeficijentom ekstrakcije (< 20%)
- Elementi sa srednjim koeficijentom ekstrakcije (od 20% do 50%)
- Elementi sa visokim ekstrakcionim koeficijentom (> 60%)

Tabela 8. Sadržaj makroelemenata i mikroelemenata u vodenim i etanolnim ekstraktima [ $\mu\text{g/g}$ ]

	Vodeni ekstrakt samonikle borovnice		Vodeni ekstrakt komercijalne borovnice		Etanolni ekstrakt samonikle borovnice		Etanolni ekstrakt komercijalne borovnice	
	List (WBLW)	Plod (WBFW)	List (CBLW)	Plod (CBFW)	List (WBLE)	Plod (WBFE)	List (CBLE)	Plod (CBFE)
As	* nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ba	10.5±0.2	2.36±0.02	13.60±0.07	4.3±0.4	0.066±0.008	nd	nd	nd
Cd	0.074±0.002	0.039±0.002	0.061±0.006	0.020±0.001	0.065±0.004	0.026±0.002	0.05±0.03	0.013±0.001
Co	nd	nd	0.22±0.02	0.20±0.02	nd	nd	0.192±0.007	0.062±0.004
Cr	0.525±0.008	0.193±0.004	0.557±0.003	0.298±0.001	nd	nd	0.109±0.001	nd
Cu	1.62±0.02	1.568±0.002	2.03±0.03	1.5±0.2	0.60±0.03	0.17±0.05	1.25±0.05	0.40±0.05
Mn	683±6	2.73±0.03	697±3	2.76±0.05	88.2±0.2	2.573±0.010	45.9±0.3	1.49±0.03
Ni	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Pb	1.179±0.001	0.083±0.004	1.51±0.07	0.115±0.008	0.069±0.008	0.03±0.03	0.26±0.05	0.044±0.010
Sr	3.93±0.03	0.770±0.005	8.68±0.02	1.15±0.04	0.092±0.001	0.080±0.001	1.19±0.08	0.38±0.03
Zn	11.11±0.02	5.00±0.05	17.17±0.03	10.94±0.02	0.044±0.003	0.042±0.004	nd	nd
Al	61.3±0.6	39.8±0.3	70±1	48±1	57±2	37.8±1.0	40.1±0.2	40±2
Ca	1039±12	184±2	1075±28	391±11	21.4±0.2	4.3±0.2	24±1	17±2
Fe	3.68±0.06	19.5±0.2	2.5±0.2	26.0±0.3	nd	nd	nd	nd
K	1459±10	2743±15	1603±2	2901±9	763±6	1111±25	239±8	1101±9
Mg	673±3	237.1±0.5	598±4	400±2	321±5	21.5±0.6	154±2	18.1±0.7

\* nd – nije detektovan

Tabela 9. Koeficijenti ekstrakcije makroelemenata i mikroelemenata u vodenim i etanolnim ekstraktima borovnice [%]

	Vodeni ekstrakt samonikle borovnice		Vodeni ekstrakt komercijalne borovnice		Etanolni ekstrakt samonikle borovnice		Etanolni ekstrakt komercijalne borovnice	
	List (WBLW)	Plod (WBFW)	List (CBLW)	Plod (CBFW)	List (WBLE)	Plod (WBFE)	List (CBLE)	Plod (CBFE)
As	np*	np	np	np	np	np	np	np
Ba	8.26	24.33	11.38	30.37	0.05	np	np	np
Cd	93.67	95.12	83.56	95.24	81.91	62.94	74.44	60.05
Co	np	np	36.50	36.89	np	np	32.00	11.70
Cr	26.50	37.48	27.95	35.77	np	np	5.46	np
Cu	28.54	30.71	29.99	34.99	10.52	3.38	18.35	9.18
Mn	11.61	19.85	11.70	19.62	1.50	18.91	0.77	10.6
Ni	np	np	np	np	np	np	np	np
Pb	28.69	41.59	35.25	48.67	1.68	15.00	5.96	19.00
Sr	6.53	58.38	16.60	55.81	0.15	6.08	2.28	18.37
Zn	66.30	69.00	58.83	79.10	0.26	0.59	np	np
Al	8.91	31.39	11.83	37.03	8.34	29.80	6.76	30.73
Ca	4.45	28.23	6.23	27.54	0.09	0.67	0.14	1.20
Fe	0.59	59.99	0.43	57.60	np	np	np	np
K	7.25	51.86	9.49	53.00	3.79	21.00	1.41	20.11
Mg	20.47	56.55	25.73	61.33	9.77	5.12	6.61	2.77

\* np – nije primjenljivo

Najzastupljeniji makroelement u svim ispitivanim ekstraktima (WBLW, WBLE, WBFW, WBFE, CBLW, CBLE, CBFW i CMFE) bio je K.

U vodenim ekstraktima lista samonikle (WBLW) i komercijalne borovnice (CBLW) koncentracija K bila je 1459  $\mu\text{g/g}$  i 1603  $\mu\text{g/g}$ , redom, dok je u vodenim ekstraktima ploda (WBFW i CBFW) iznosila 2743  $\mu\text{g/g}$  i 2901  $\mu\text{g/g}$ , respektivno.

Sadržaj K u WBLE i CBLE je bio 763  $\mu\text{g/g}$  i 239  $\mu\text{g/g}$ , respektivno, dok je koncentracija ovog makroelementa u WBFE i CBFE bila 1111  $\mu\text{g/g}$  i 1101  $\mu\text{g/g}$ , respektivno.

Iako ovaj makroelement u vodenim ekstraktima lista samonikle i komercijalne borovnice (WBLW i CBLW) bilježi nizak stepen ekstrakcije (do 9.49%), procenat ekstrakcije K u vodenim ekstraktima divljeg i komercijalnog ploda (WBFW i CBFW) ima visoku vrijednost (do 53.00%). Gallaher i saradnici [222] proučavajući ekstrakciju metala u vodenim ekstraktima lista borovnice zabilježili su procenat ekstrakcije K od 69.66%.

K u etanolnom ekstraktu divljeg i komercijalnog lista (WBLE i CBLE) takođe bilježi nizak ekstrakcioni koeficijent (do 3.79%), dok u etanolnim ekstraktima ploda (WBFE i CBFE) bilježi umjeren (do 21.00%).

U vodenim ekstraktima lista (WBLW i CBLW), Ca je zastupljeniji od Mg. Koncentracija Ca u ovim ekstraktima je bila 1039  $\mu\text{g/g}$  i 1075  $\mu\text{g/g}$ , redom dok je koncentracija Mg iznosila 673  $\mu\text{g/g}$  i 598  $\mu\text{g/g}$ , respektivno. Koeficijent ekstrakcije Ca u ovim ekstraktima (WBLW i CBLW) je vrlo nizak (do 6.23%), dok je procenat ekstrakcije Mg umjeren (do 25.73%). Sličan procenat ekstrakcije Ca i Mg su zabilježili Gallaher i saradnici (6.34% i 19.04%, respektivno) [222].

U vodenim ekstraktima ploda (WBFW i CBFW) koncentracija Mg je praćena sadržajem Ca. Sadržaj Mg je iznosio 237.1  $\mu\text{g/g}$  i 400  $\mu\text{g/g}$ , redom, dok je sadržaj Ca bio 184  $\mu\text{g/g}$  i 391  $\mu\text{g/g}$ , respektivno. Koeficijent ekstrakcije Ca u ovim ekstraktima (WBFW i CBFW) je umjeren (do 28.23%), dok je Mg visok (do 61.33%).

U svim ispitivanim etanolnim ekstraktima (WBLE, CBLE, WBFE i CBFE) koeficijent ekstrakcije Ca i Mg je < 20%. Naime, sadržaj Ca u etanolnim ekstraktima lista samonikle i komercijalne borovnice (WBLE i CBLE) je bio 21.4  $\mu\text{g/g}$  i 24  $\mu\text{g/g}$ , redom dok je u etanolnim

ekstraktima ploda (WBFE i CBFE) iznosio 4.3 i 17  $\mu\text{g/g}$ , respektivno. Mg u etanolnim ekstraktima lista samonikle i komercijalne borovnice (WBLE i CBLE) iznosi 321  $\mu\text{g/g}$  i 154  $\mu\text{g/g}$ , redom, a u etanolnim ekstraktima ploda (WBFE i CBFE) 21.5  $\mu\text{g/g}$  i 18.1  $\mu\text{g/g}$ , respektivno.

Koncentracija Al u ispitivanim ekstraktima se kretala u opsegu od 37.8  $\mu\text{g/g}$  u WBFE do 70  $\mu\text{g/g}$  u CBLW. Koeficijent ekstrakcije ovog makroelementa u vodenim i etanolnim ekstraktima lista (WBLW, CBLW, WBLE, CBLE) je iznosio do 11.83%, dok je u vodenim i etanolnim ekstraktima ploda (WBFW, CBFW, WBFE, CBFE) bio do 37.03%.

Fe se značajno izdvaja u vodenim ekstraktima ploda samonikle i komercijalne borovnice (19.5  $\mu\text{g/g}$  u WBFW i 26.0  $\mu\text{g/g}$  u CBFW), pri čemu bilježi visok ekstrakcioni koeficijent (do 59.99%).

U vodenim ekstraktima lista samonikle i komercijalne borovnice Fe se detektuje u znatno manjoj količini (3.68  $\mu\text{g/g}$  u WBLW i 2.5  $\mu\text{g/g}$  u CBLW). Dobijeni ekstrakcioni koeficijent u vodenim ekstraktima lista samonikle i komercijalne biljke (do 0.59%) u skladu je sa nađenim literaturnim vrijednostima (0.41%) [222].

Sadržaj Fe u etanolnim ekstraktima lista i ploda samonikle i komercijalne borovnice (WBLE, CBLE, WBFE i CBFE) bio je ispod granice detekcije instrumenta ( $< 0.06 \mu\text{g/g}$ ).

Najzastupljeniji mikroelement u vodenim ekstraktima lista (WBLW i CBLW) bio je Mn praćen Zn, dok je u vodenim ekstraktima ploda (WBFW i CBFW) koncentracija Zn bila veća od koncentracije Mn.

Sadržaj Mn u WBLW i CBLW iznosio je 683  $\mu\text{g/g}$  i 697  $\mu\text{g/g}$ , redom, dok je u WBFW i CBFW bio 2.73  $\mu\text{g/g}$  i 2.76  $\mu\text{g/g}$ , respektivno. Međutim, svi navedeni vodeni ekstrakti (WBLW, CBLW, WBFW i CBFW) pokazali su nizak ekstrakcioni koeficijent Mn (do 19.85%). Gallaher i saradnici u vodenim ekstraktima lista borovnice bilježe veći procenat ekstrakcije Mn od našeg (39.30%) [222].

Sadržaj Zn u WBLW i CBLW iznosio je 11.11  $\mu\text{g/g}$  i 17.17  $\mu\text{g/g}$ , redom, dok je u WBFW i CBFW bio 5.00  $\mu\text{g/g}$  i 10.94  $\mu\text{g/g}$ , respektivno. Dobijeni ekstrakcioni koeficijent Zn u WBLW i CBLW je bio visok (do 66.30%), čak i veći od vrijednosti zabilježenih u literaturi (32.61%) [222]. Dodatno, visok procenat ekstrakcije Zn u WBFW i CBFW (79.10%) smo zabilježili.

Sadržaj Zn u WBLE i WBFE je bio veoma nizak (0.044  $\mu\text{g/g}$  i 0.042  $\mu\text{g/g}$ , respektivno), uz koeficijent ekstrakcije do 0.59%. Koncentracija ovog mikroelementa u CBLE i CMFE je čak nemjerljiva ( $< 0.020 \mu\text{g/g}$ ).

Kada su u pitanju mikroelementi u etanolnim ekstraktima (WBLE, CBLE, WBFE i CBFE) najzastupljeniji je takođe bio Mn. Sadržaj Mn u WBLE i CBLE iznosio je 88.2  $\mu\text{g/g}$  i 45.9  $\mu\text{g/g}$ , redom, dok je u WBFE i CBFE bio 2.573  $\mu\text{g/g}$  i 1.49  $\mu\text{g/g}$ , respektivno. Međutim, njegov ekstrakcioni koeficijent u svim ispitivanim etanolnim ekstraktima je bio nizak (do 18.91%).

Drugi po zastupljenosti mikroelement u etanolnim ekstraktima lista i ploda borovnice (WBLE, CBLE, WBFE i CBFE) bio je Cu sa koeficijentom ekstrakcije do 18.35%. Sadržaj Cu u WBLE i CBLE je bio 0.60  $\mu\text{g/g}$  i 1.25  $\mu\text{g/g}$ , redom, dok je koncentracija ovog metala u WBFE i CBFE bila 0.17  $\mu\text{g/g}$  i 0.40  $\mu\text{g/g}$ , respektivno.

U vodenim ekstraktima lista samonikle i komercijalne borovnice (WELW i CBLW) koncentracija Cu bila je 1.62  $\mu\text{g/g}$  i 2.03  $\mu\text{g/g}$ , redom, dok je u vodenim ekstraktima ploda (WBFW i CBFW) iznosila 1.568  $\mu\text{g/g}$  i 1.5  $\mu\text{g/g}$  respektivno. U svim ispitivanim vodenim ekstraktima (WELW, CBLW, WBFW i CBFW) procenat ekstrakcije Cu je iznosio od 28.54% do 34.99%. Sličan procenat ekstrakcije Cu u vodenim ekstraktima lista borovnice su zabilježili Gallaher i saradnici (36.8%) [222].

U vodenim ekstraktima lista samonikle i komercijalne borovnice (WBLW i CBLW) koncentracija Cr bila je 0.525  $\mu\text{g/g}$  i 0.557  $\mu\text{g/g}$ , redom, dok je u vodenim ekstraktima ploda (WBFW i CBFW) iznosila 0.193  $\mu\text{g/g}$  i 0.298  $\mu\text{g/g}$ , respektivno. U ovim ekstraktima (WELW, CBLW, WBFW i CBFW) zabilježen je umjeren procenat ekstrakcije Cr (do 37.48%).

U etanolnom ekstraktu lista komercijalne borovnice (CBLE) ekstrahovao se vrlo mali procenat Cr (5.46%), dok je u ostalim etanolnim ekstraktima (WBLE, WBFE i CBFE) njegova koncentracija bila ispod granice detekcije instrumenta ( $< 0.026 \mu\text{g/g}$ ).



U vodenim ekstraktima lista samonikle i komercijalne borovnice (WBLW i CBLW) koncentracija Ba bila je 10.5  $\mu\text{g/g}$  i 13.60  $\mu\text{g/g}$ , redom, dok je u vodenim ekstraktima ploda (WBFW i CBFW) iznosila 2.36  $\mu\text{g/g}$  i 4.3  $\mu\text{g/g}$ , respektivno. Procenat ekstrakcije Ba u vodenim ekstraktima lista (WBLW i CBLW) se kretao do 11.38% dok je u vodenim ekstraktima ploda (WBFW i CBFW) bio do 30.37%.

Sadržaj Ba u etanolnom ekstraktu lista samonikle borovnice (WBLE) je bio 0.066  $\mu\text{g/g}$ , uz procenat ekstrakcije od 0.05%, dok je u ostalim etanolnim ekstraktima (CBLE, WBFE i CBFE) ovaj mikroelement bio ispod granice detekcije instrumenta.

U vodenim ekstraktima lista samonikle i komercijalne borovnice (WBLW i CBLW) koncentracija Sr bila je 3.93  $\mu\text{g/g}$  i 8.68  $\mu\text{g/g}$ , redom, dok je u vodenim ekstraktima ploda (WBFW i CBFW) iznosila 0.770  $\mu\text{g/g}$  i 1.15  $\mu\text{g/g}$  respektivno. Procenat ekstrakcije Sr u vodenim ekstraktima lista (WBLW i CBLW) je iznosio do 16.60% dok je u vodenim ekstraktima ploda (WBFW i CBFW) bio do 58.38%.

Sadržaj Sr u WBLE i CBLE je bio 0.092  $\mu\text{g/g}$  i 1.19  $\mu\text{g/g}$ , respektivno, dok je koncentracija ovog mikroelementa u WBFE i CBFE bila 0.080  $\mu\text{g/g}$  i 0.38  $\mu\text{g/g}$ , respektivno. U etanolnim ekstraktima (WBLE, CBLE, WBFE i CBFE) procenat ekstrakcije Sr je bio manji od 18.37%.

U vodenom ekstraktu lista komercijalne borovnice (CBLW) koncentracija Co bila je 0.22  $\mu\text{g/g}$  dok je u vodenom ekstraktu ploda (CBFW) iznosila 0.20  $\mu\text{g/g}$ . Procenat ekstrakcije Co u ovim uzorcima iznosio je 36.50% i 36.89%, respektivno.

Sadržaj Co u CBLE je bio 0.192  $\mu\text{g/g}$ , dok je koncentracija ovog metala u CBFE bila 0.062  $\mu\text{g/g}$ . U etanolnim ekstraktima lista i ploda komercijalne borovnice (CBLE i CBFE) procenat ekstrakcije Co je bio 32.00% i 11.70%, respektivno.

U vodenim ekstraktima lista samonikle i komercijalne borovnice (WBLW i CBLW) koncentracija Pb bila je 1.179  $\mu\text{g/g}$  i 1.51  $\mu\text{g/g}$ , redom, dok je u vodenim ekstraktima ploda (WBFW i CBFW) iznosila 0.083  $\mu\text{g/g}$  i 0.115  $\mu\text{g/g}$ , respektivno. Procenat ekstrakcije Pb u ovim uzorcima (WELW, CBLW, WBFW i CBFW) kretao se od 28.69% do 48.67%, i u skladu je sa literaturnim nalazima [234]. Naime, Szymczycha-Madeja i saradnici prateći ekstrakciju metala u vodenim ekstraktima biljaka različitog porijekla zabilježili su procenat ekstrakcije Pb i do 58.6%.

Sadržaj Pb u WBLE i CBLE je bio 0.069  $\mu\text{g/g}$  i 0.26  $\mu\text{g/g}$ , redom, dok je koncentracija ovog toksičnog metala u WBFE i CBFE bila 0.03  $\mu\text{g/g}$  i 0.044  $\mu\text{g/g}$ , respektivno. U etanolnim ekstraktima (WBLE, CBLE, WBFE i CBFE) procenat ekstrakcije Pb je bio do 19%.

U vodenim ekstraktima lista samonikle i komercijalne borovnice (WBLW i CBLW) koncentracija Cd bila je 0.074  $\mu\text{g/g}$  i 0.061  $\mu\text{g/g}$ , redom, dok je u vodenim ekstraktima ploda (WBFW i CBFW) iznosila 0.039  $\mu\text{g/g}$  i 0.020  $\mu\text{g/g}$ , respektivno. Procenat ekstrakcije Cd u ovim uzorcima kretao se i do 95.24%, što je u skladu sa literaturnim nalazima [234].

Sadržaj Cd u WBLE i CBLE je bio 0.065  $\mu\text{g/g}$  i 0.05  $\mu\text{g/g}$ , redom, dok je koncentracija ovog toksičnog metala u WBFE i CBFE bila 0.026  $\mu\text{g/g}$  i 0.013  $\mu\text{g/g}$ , respektivno. U etanolnim ekstraktima (WBLE, CBLE, WBFE i CBFE) procenat ekstrakcije Cd je bio do 81.91%.

Visok procenat ekstrakcije Cd u ovom istraživanju, nije zabrinjavajući, s obzirom da je prethodno dobijen nizak stepen akumulacije ovog toksičnog elementa u listovima i plodu borovnice (BCF vrijednost do 0.41). Dalje, najveća translokacija Cd zabilježena je od korijena do stabla borovnice (TF vrijednost 0.81). Takođe, imajući u vidu da ispitivani djelovi borovnice sadrže koncentraciju Cd deset puta manju od one koju je propisala WHO [228] u ljekovitom bilju, može se zaključiti da se u pogledu sadržaja Cd ova biljka smatra bezbjednom.

Ono što zapažamo je da vodeni ekstrakti bilježe veću koncentraciju kao i veći procenat ekstrakcije elemenata u odnosu na etanolne ekstrakte istih dijelova borovnice.

Takođe primjećujemo da vodeni i etanolni ekstrakti lista bilježe veći sadržaj gotovo svih elemenata nego ekstrakti ploda. Izuzetak su K i Fe koji veći sadržaj bilježe u vodenim ekstraktima ploda nego lista. K veći sadržaj bilježi i u etanolnim ekstraktima ploda nego lista borovnice.

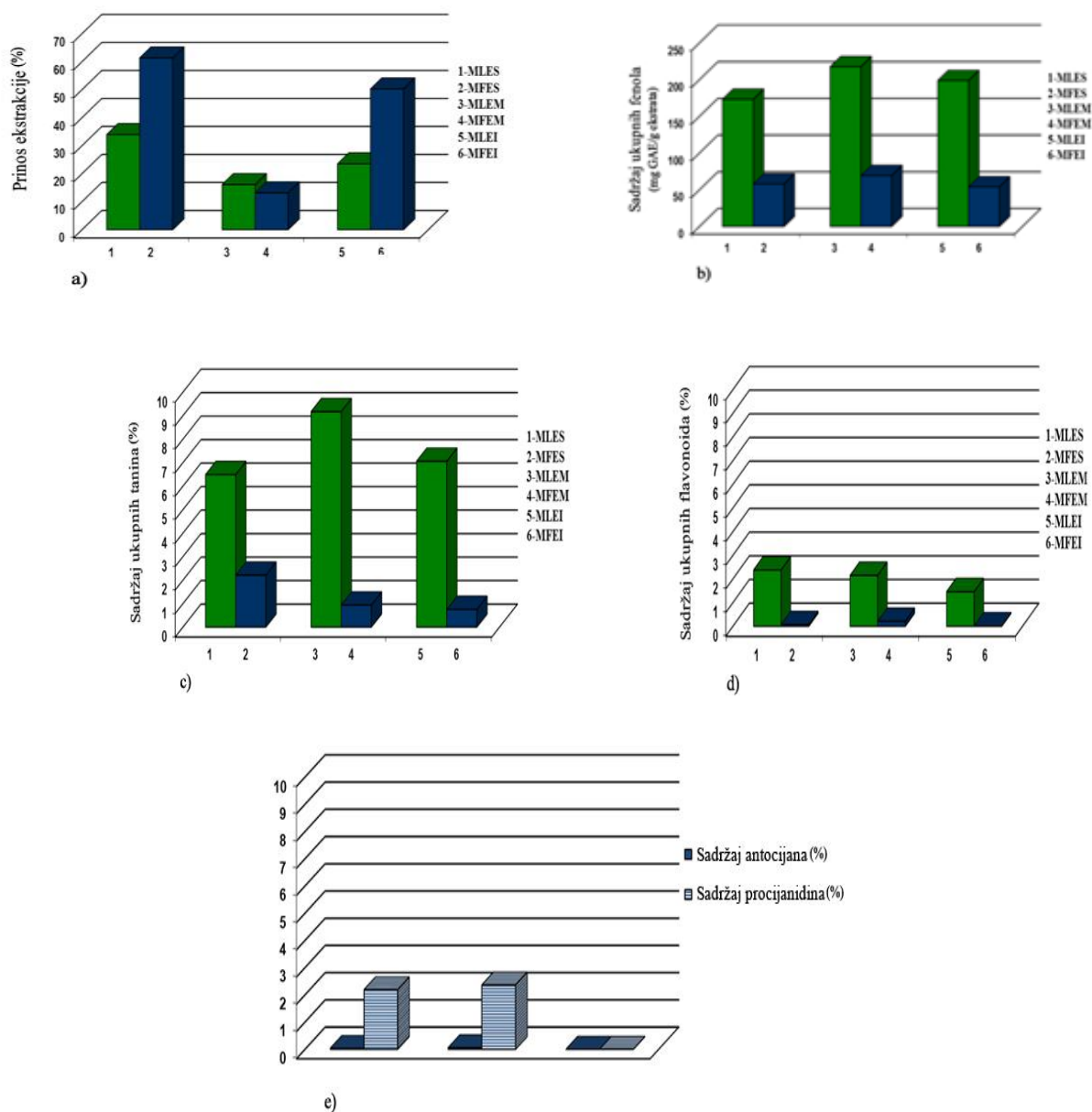
S druge strane voda bolje rastvara sve makroelemente i mikroelemente iz ploda nego iz lista borovnice. Ovo se može objasniti činjenicom da sekundarni metaboliti biljke pokazuju jače interakcije sa makroelementima i mikroelementima u lista u odnosu na plod [234].

#### **4.5. Prinos ekstrakcije, sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, tanina, procijanidina i antocijana u ekstraktima borovnice dobijenim Soxhlet ekstrakcijom, maceracijom i ekstrakcijom vrelom vodom**

Ekstrakcija je najvažnija faza u izolaciji bioaktivnih jedinjenja iz biljaka, jer primjenjeni rastvarač ili tehnološki proces može dovesti do hemijske promjene aktivnih sastojaka, a time uzrokovati i smanjenje ili gubitak ljekovitih svojstava. Nije jednostavno odrediti najpogodniji rastvarač. Prilikom izbora treba uzeti u obzir njegovu polarnost, s obzirom da polarnost rastvarača određuje njegovu selektivnost a tim i različitost komponenti koje se mogu ekstrahovati. Takođe poznato je da se sadržaj ekstrahovanih fenolnih jedinjenja može povećati na višim temperaturama. S druge strane, visoka temperatura ključanja upotrebljenog rastvarača može uticati negativno na termički nestabilne supstance a time i smanjiti efikasnost ekstrakcije. Stoga je neophodno izvršiti što bolji izbor ekstragensa uz optimalne uslove ekstrakcije koji će obezbijediti kvantitativniju i selektivniju ekstrakciju uz minimalno prisustvo primjesa [13,143].

U ovom istraživanju, za ekstrakciju fenolnih komponenti koristili smo rastvarače, koji pored toga što se mogu koristiti za ekstrakciju čitavog niza različitih supstanci, netoksični su u odnosu na ljudski organizam. Uzimajući u obzir da se biljni vodeni infuzi najčešće koriste za pripremu tradicionalnih fitopreparata [235], ali u skladu sa činjenicom da industrijska proizvodnja obično koristi etanol kao rastvarač, koristili smo različite metode ekstrakcije (Soxhlet ekstrakcija, maceracija, ekstrakcija vrelom vodom) i rastvarače različitih polarnosti (voda, 70% etanol) za nalaženje pogodnih uslova za dobijanje ekstrakata bogatih polifenolima.

S obzirom da je analiza makroelemenata i mikroelemenata pokazala da ne postoji značajna razlika između samonikle i komercijalne borovnice u sadržaju istih, u cilju određivanja hemijskog sastava i antioksidativne aktivnosti tretiran je samo list i plod samonikle borovnice. Postupci ekstrakcije primjenjeni u ovom istraživanju obezbjedili su ekstrakte označene kao MLES (upareni ekstrakt lista samonikle borovnice dobijen Soxhlet ekstrakcijom), MFES (upareni ekstrakt ploda samonikle borovnice dobijen Soxhlet ekstrakcijom), MLEM (upareni ekstrakt lista samonikle borovnice dobijen maceracijom), MFEM (upareni ekstrakt ploda samonikle borovnice dobijen maceracijom), MLEI (upareni vodeni ekstrakt lista samonikle borovnice) i MFEI (upareni vodeni ekstrakt ploda samonikle borovnice).



Slika 31. a) prinos ekstrakcije, b) sadržaj ukupnih fenola (TP), c) sadržaj ukupnih tanina (TT), d) sadržaj ukupnih flavonoida (TF), e) sadržaj procijanidina i antocijana u ispitivanim ekstraktima

Na osnovu dobijenih rezultata (slika 31a) može se zaključiti da je prinos ekstrakcije najveći kada se kao rastvarač koristi 70% etanol i Soxhlet ekstrakcija (MFES 61.35% i MLES 33.96%). Znatno slabiji prinos postignut je upotrebom istog rastvarača ekstrakcionim postupkom maceracije (MFEM 13.10% i MLEM 16.09%). Prinos ekstrakcije vodenim rastvaračem na temperaturi ključanja (MFEI 50.25% i MLEI 23.51%), je veći od prinosa koji se ostvaruje postupkom maceracije na sobnoj temperaturi, odnosno manji od Soxhlet ekstrakcije. Ovako dobijeni rezultati, tj. prednost Soxhlet ekstrakcije u odnosu na maceraciju, ukazuju da povećanjem temperature ekstrakcije se povećava i rastvorljivost ekstraktivnih materija, što dovodi i do povećanja prinosa. Takođe, bolji prinos Soxhlet ekstrakcijom u odnosu na ekstrakciju vodenim rastvaračem najvjerovatnije je posledica cirkulacionog toka rastvarača koji dovodi do potpunog iscrpljenja biljne sirovine [145]. Veći ekstrakcioni prinos vodenim rastvaračem u odnosu na maceraciju etanolnim rastvaračem može biti rezultat manje selektivnosti vode kao rastvarača, u kojoj se pored polifenolnih komponenti rastvaraju i druge komponente droge kao što su proteini i ugljeni hidrati [236].

Sadržaj ukupnih fenola (TP) u etanolnom ekstraktu lista borovnice bio je 173.19 mg GAE/g u MLES i 217.59 mg GAE/g u MLEM, dok je u vodenom ekstratu lista (MLEI) iznosio 198.84 mg GAE/g (slika 31b). Proučavajući borovnicu iz nezagađenog područja u Bosni i Hercegovini, Vučić i saradnici [237] zabilježili su nešto niži sadržaj ukupnih fenola u etanolnom i vodenom ekstraktu lista (107.79 mg GAE/g i 119.17 mg GAE/g, respektivno).

U ekstraktu lista procenat flavonoida (TF) iznosio je 1.46%, 2.15% i 2.38% u MLEI, MLEM i MLES, respektivno (slika 31d). Proučavajući listove borovnice iz nekoliko različitih nezagađenih područja u Poljskoj, Roslon i saradnici [238] su zabilježili nešto niži procenat flavonoida od našeg (do 0.6%). Da je etanol efikasnije ekstrakciono sredstvo od vode pri izolovanju flavonoida iz lista borovnice zabilježili su i Vučić i saradnici [237].

Zabilježeni procenat tanina (TT) u našem etanolnom ekstraktu lista je iznosio 6.49% u MLES i 9.17% u MLEM, dok je u vodenom ekstraktu (MLEI) bio 7.06% (slika 31c). Roslon i saradnici [238] su zabilježili sličan procenat tanina (u opsegu od 5.1% do 12.4%).

U našem istraživanju, najveći sadržaj ukupnih fenola i najveći procenat izolovanih tanina iz lista borovnice je dobijen postupkom maceracije, upotrebom 70% etanola na sobnoj temperaturi. Manji sadržaj ovih jedinjenja u ekstraktima dobijenim Soxhlet ekstrakcijom i infuzima ukazuje da je povećana temperatura najvjerovatnije uzrokovala degradaciju pojedinih termolabilnih jedinjenja. Duže izlaganje povišenoj temperaturi tokom Soxhlet ekstrakcije je dodatno imalo negativan uticaj na izolovanje ukupnih fenolnih jedinjenja i tanina, dok je isti postupak ekstrakcije doveo do iscrpljenja flavonoida iz lista borovnice u najvećem procentu.

U etanolnom ekstraktu ploda borovnice sadržaj ukupnih fenola iznosio je 57.94 mg GAE/g u MFES i 69.32 mg GAE/g u MFEM, dok je u vodenom ekstraktu ploda (MFEI) iznosio 53.95 mg GAE/g (slika 31b). Fenolni sadržaj koji su zabilježili Vučić i saradnici [237] u etanolnom i vodenom ekstraktu ploda (40.32 mg GAE/g i 31.44 mg GAE/g, respektivno) bio je takođe niži u odnosu na onaj koji smo mi pronašli.

Sadržaj flavonoida (TF) izražen kao procenat hiperozida u etanolnom ekstraktu ploda je iznosio 0.07% u MFES i 0.21% u MFEM, dok je u vodenom ekstraktu bio 0.02% (slika 31d). Da je etanol efikasnije ekstrakciono sredstvo od vode pri izolovanju flavonoida iz ploda borovnice zabilježili su i Vučić i saradnici [237].

Zabilježeni procenat tanina (TT) u našem etanolnom ekstraktu ploda je iznosio 2.21% u MFES i 0.94% u MFEM, dok je u vodenom ekstraktu (MFEI) bio 0.76% (slika 31c). Roslon i saradnici [238] u plodu borovnice bilježe procenat tanina u opsegu od 0.8 do 2.6%.

Najveći sadržaj procijanidina i antocijana u ekstraktu ploda borovnice zabilježen je u MFEM (2.36% i 0.06%, respektivno), zatim MFES (2.19% i 0.03%, respektivno) dok je najniži procenat zabilježen u MFEI (slika 31e). Nizak sadržaj antocijana u biljci vjerovatno je uzrokovan procesom sušenja ploda borovnice na sobnoj temperaturi neposredno prije primjenjenog ekstrakcionog postupka [238]. Sadržaj antocijana koji su zabilježili Roslon i saradnici [238] se kretao u opsegu od 0.61% do 1.64%. Isti autori su objavili da porast nadmorske visine može imati negativan odraz na ovu grupu jedinjenja.

U našem istraživanju, kao efikasnije ekstrakciono sredstvo pri izolovanju bioaktivnih jedinjenja iz ploda borovnice pokazao se 70% etanol u odnosu na vodu. Najveći procenat ekstrahovanih tanina je zabilježen u ekstraktima dobijenim na povišenoj temperaturi (Soxhlet ekstrakcija), dok je najveći sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, procijanidina i antocijana bio u ekstraktima dobijenim na sobnoj temperaturi.

Etanolni i vodeni ekstrakti lista sadrže značajno veću količinu ukupnih fenola i flavonoida, nego etanolni i vodeni ekstrakti ploda ove biljke, što je u skladu sa zapažanjem iz literature [237].

Naime, u ovom istraživanju značajne razlike između svih ispitivanih ekstrakata u ukupnom sadržaju fenola, flavonoida i tanina su uočene ( $p < 0.01$ ). Takođe, značajne razlike u sadržaju procijanidina i antocijana između ekstrakata ploda su zabilježene ( $p < 0.01$ ).

#### 4.6. Identifikacija fenolnih jedinjenja HPLC metodom u ekstraktima borovnice dobijenim Soxhlet ekstrakcijom, maceracijom i ekstrakcijom vreloom vodom

Epidemiološke studije su potvrdile povezanost ishrane bogate fenolnim jedinjenjima i smanjenog rizika za razvitak hroničnih bolesti [239,240]. Međutim, i pored mnogobrojnih pozitivnih, mi smo se bazirali samo na fenolna jedinjenja u ekstraktima borovnice sa potencijalnim antidijabetičkim efektom, s obzirom da se ova biljka tradicionalno koristi u prevenciji i liječenju dijabetesa.

U ovom istraživanju, HPLC analizom u ispitivanim ekstraktima lista i ploda borovnice identifikovano je osamnaest fenolnih jedinjenja (slike 32 i 33, tabela 10), što je od velike važnosti, s obzirom da su upravo ova jedinjenja u literaturi prepoznata kao nosioci antidijabetičkog potencijala [239,240]. Takođe, potvrđeno je prisustvo šest neidentifikovanih derivata kvercetina, hlorogenske kiseline i stilbenoide. Nešto drugačiji procenat identifikovanih pojedinačnih fenolnih jedinjenja u našem istraživanju od onog objavljenog u nekoliko ranijih studija [1,6,11,12,235,241], može se objasniti kao rezultat različitih abiotičkih i biotičkih faktora kojima je biljka primarno izložena, ali i kao rezultat samog postupka ekstrakcije.

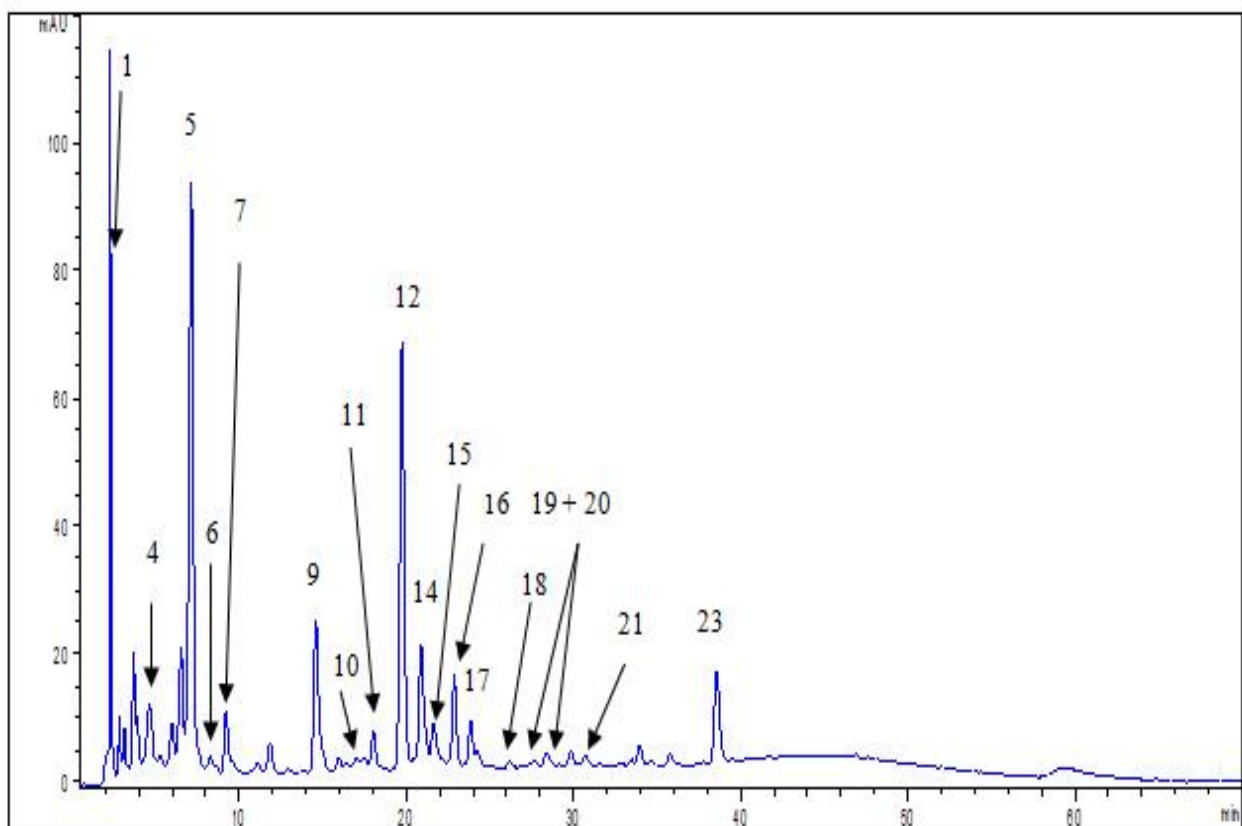
Tabela 10. Sadržaj fenolnih jedinjenja identifikovanih HPLC metodom u ispitivanim ekstraktima borovnice [mg/g]

Fenolna jedinjenja		MFEI	MFEM	MFES	MLEI	MLEM	MLES
Galna kiselina	1	0.73	1.03	0.78	0.58	0.80	0.54
Pirogalol	2	-	-	-	3.16	2.45	3.46
Neohlorogenska kiselina	3	0.01	0.41	-	1.86	0.34	3.72
Protokatehinska kiselina	4	1.10	1.42	1.23	1.74	1.40	1.73
Hlorogenska kiselina	5	1.82	2.48	1.95	59.70	45.51	55.28
Procijanidin B2	6	0.11	0.13	0.14	0.89	1.03	0.31
Kafena kiselina	7	0.16	0.31	0.32	1.25	1.95	1.90
Epikatehin	8	-	-	-	4.38	5.16	5.75
p-kumarinska	9	0.21	0.34	0.24	1.53	1.26	2.08
Sinapinska kiselina	10	0.03	0.06	0.03	0.39	0.18	0.63
Ferulna kiselina	11	0.05	0.07	0.01	0.11	0.26	0.28
Derivat stilbenoide 1	12	*	*	*	*	*	*
Rutin	13	-	-	-	5.31	4.73	4.94
Hiperozid	14	0.17	0.34	0.26	2.55	2.51	2.38
Izokvercetin	15	0.30	0.30	0.31	16.20	14.62	9.92
Derivat stilbenoide 2	16	*	*	*	*	*	*
Derivat stilbenoide 3	17	*	-	*	*	*	*
Kemferol-3-O-glukozid	18	0.05	0.15	0.06	1.60	1.56	1.38
Derivat kvercetina 1	19	*	-	*	*	*	*
Derivat kvercetina 2	20	*	-	*	-	-	-
Resveratrol	21	0.01	0.07	0.03	4.69	4.60	5.15
Derivat hlorogenske kiseline	22	-	-	-	-	*	-
Kvercetin	23	0.07	0.40	0.46	1.16	2.11	7.27
Kemferol	24	-	-	-	0.03	0.10	0.26

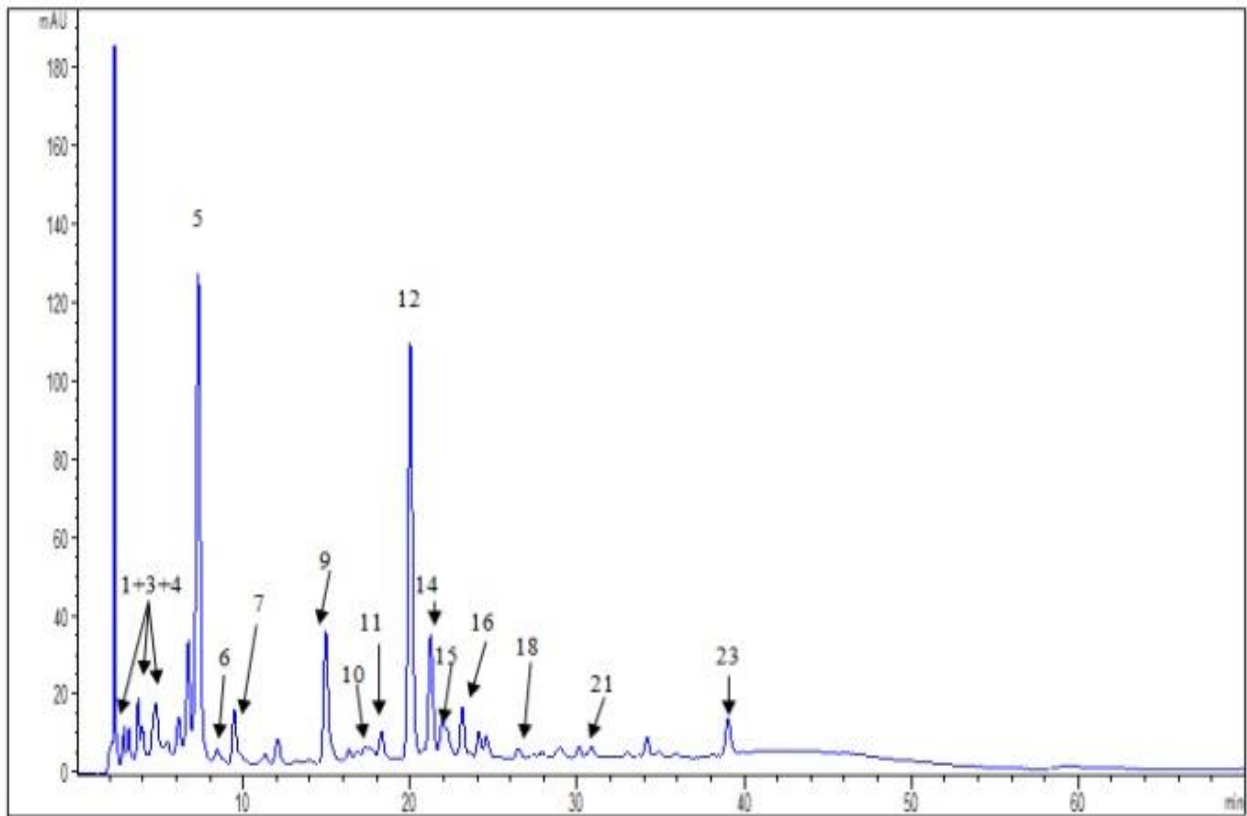
\* nepotvrđena identifikacija

Procenat identifikovanih fenolnih kiselina u našim ekstraktima je vrlo značajan. Najzastupljenija fenolna kiselina u ekstraktima lista bila je hlorogenska kiselina. Koncentracija ove kiseline u vodenom ekstraktu lista (MLEI) je bila veća (59.70 mg/g) u odnosu na etanolne ekstrakte (45.51 mg/g u MLEM i 55.28 mg/g u MLES). Bljajić i saradnici [1] ispitujući ekstrakte lista borovnice iz nezagađenih područja u Bosni i Hercegovini, takođe su detektovali veću koncentraciju hlorogenske kiseline u vodenom ekstraktu (20.82 mg/g) u odnosu na etanolni ekstrakt lista (11.21 mg/g).

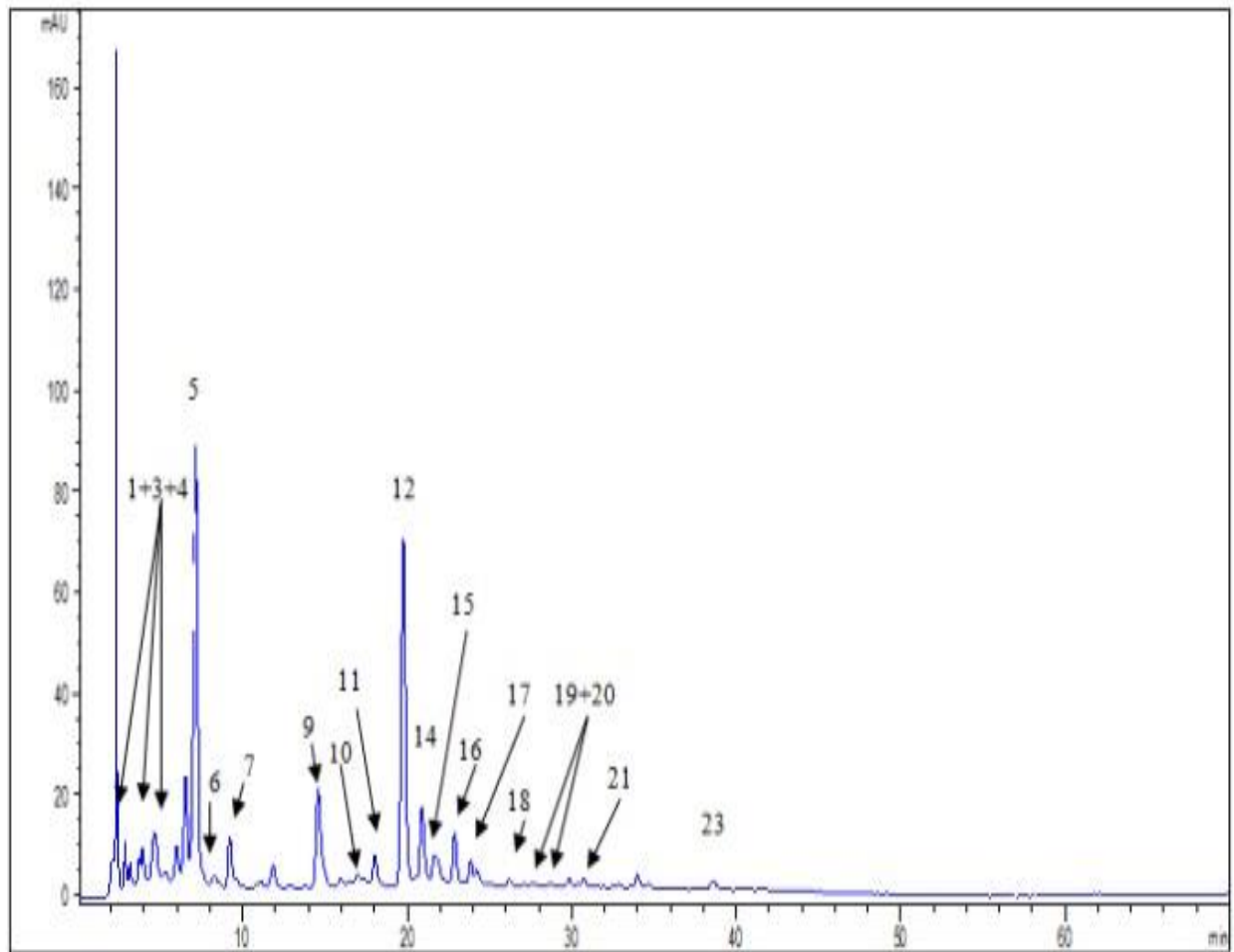
Hlorogenska kiselina bila je i najzastupljenija fenolna kiselina identifikovana u ekstraktima ploda (1.82 mg/g u MFEI, 1.95 u MFES i 2.48 mg/g u MFEM), međutim u značajno nižim koncentracijama u odnosu na ekstrakte lista borovnice. Moze i saradnici [12] ispitujući plod borovnice sa nezagađenih područja u Sloveniji zabilježili su koncentraciju hlorogenske kiseline znatno nižu od naše (0.23 mg/g).



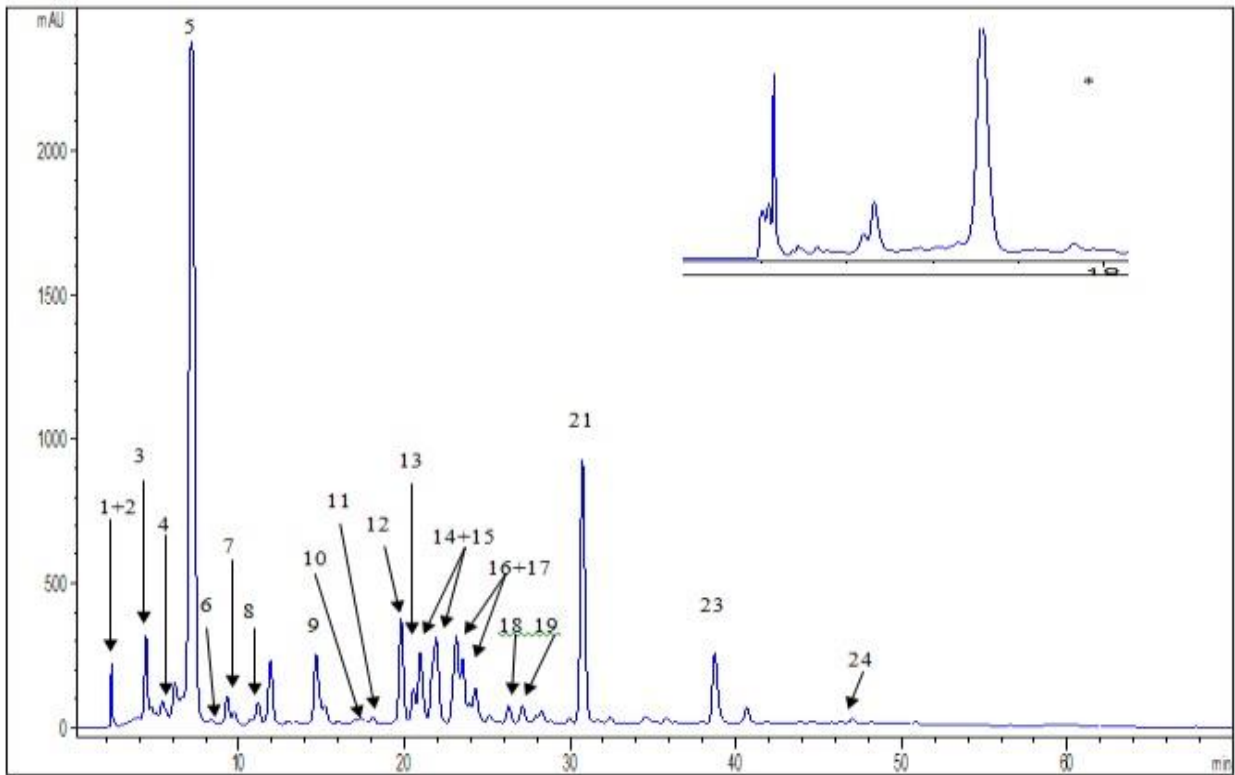
a)



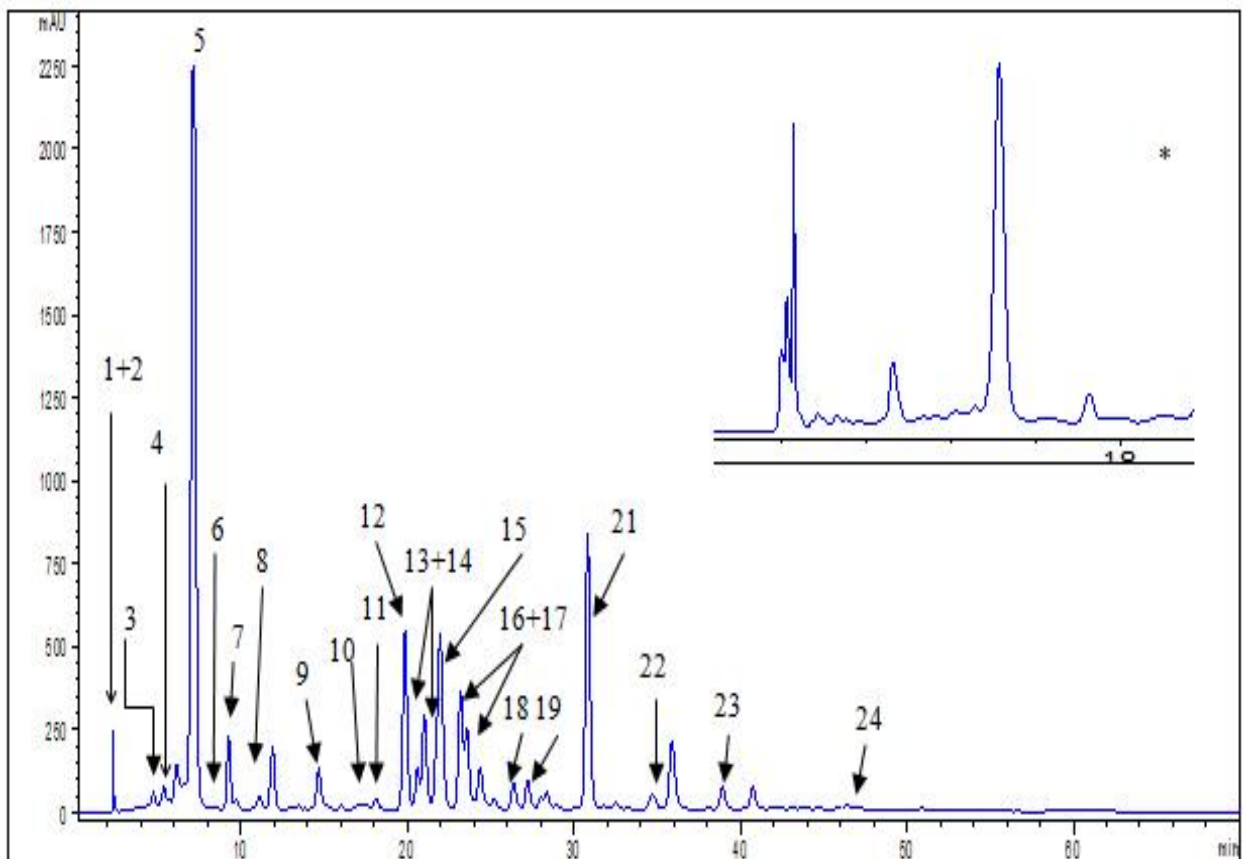
b)



c)

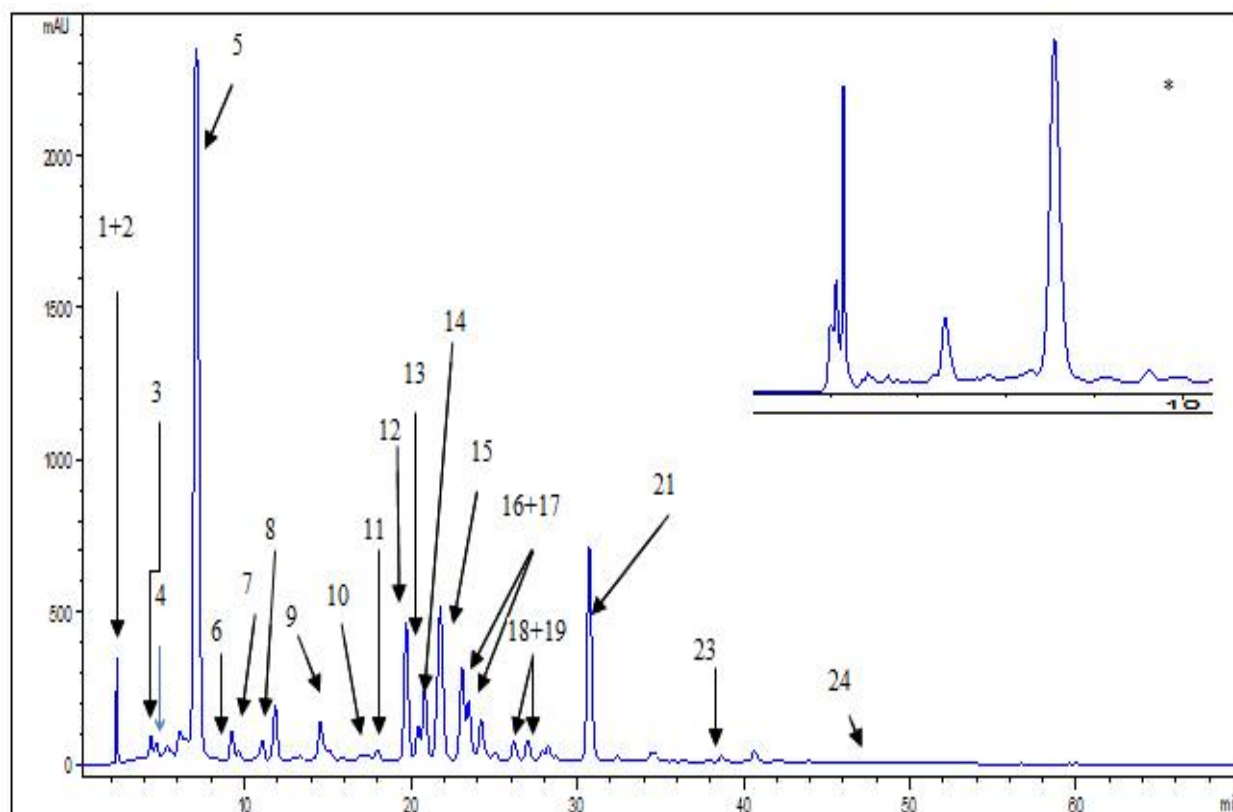


d)



e)





f)

Slika 32. HPLC hromatogrami fenolnih jedinjenja identifikovanih na 325 nm u ispitivanim ekstraktima a) MFES, b) MFEM, c) MFEI, d) MLES, e) MLEM, f) MLEI. (\*Identifikacija galne kiseline i pirogalola u uzorcima MLES, MLEM i MLEI je predstavljena na 260 nm)

U ekstraktima lista dobijenim vodom na povišenoj temperaturi i Soxhlet ekstrakcijom (MLEI i MLES) druga po zastupljenosti fenolna kiselina bila je neohlorogenska kiselina (1.86 mg/g i 3.72 mg/g, respektivno). U ekstraktu lista dobijenom postupkom maceracije (MLEM) koncentracija ove kiseline je značajno bila niža i iznosila je 0.34 mg/g. U ovom ekstraktu lista (MLEM) druga po zastupljenosti bila je kafena kiselina (1.95 mg/g). Koncentracija neohlorogenske kiseline u ekstraktima ploda je vrlo niska i iznosila je 0.01 mg/g u MFEI i 0.41 mg/g u MFEM, dok u MFES ovo jedinjenje nije ni identifikovano.

U ispitivanim ekstraktima ploda druga po zastupljenosti fenolna kiselina bila je protokatehinska kiselina, zabilježena i u svim ispitivanim ekstraktima lista u sličnim koncentracijama. U ekstraktima ploda (MFEI, MFES i MFEM) koncentracija ove kiseline je iznosila 1.10 mg/g, 1.23 mg/g i 1.42 mg/g, respektivno.

U ekstraktima lista (MLEM i MLEI) protokatehinska bila je treća po zastupljenosti kiselina (1.40 mg/g i 1.74 mg/g, respektivno), praćena *p*-kumarinskom (1.26 mg/g i 1.53 mg/g, respektivno), dok je u MLES ekstraktu treća po zastupljenosti bila *p*-kumarinska kiselina (2.08 mg/g) praćena kafenom (1.90 mg/g) i protokatehinskom kiselinom (1.73 mg/g). U vodenom ekstraktu lista (MLEI) koncentracija kafene kiseline je bila 1.25 mg/g. Bljajić i saradnici [1] u ekstraktima lista borovnice nisu identifikovali protokatehinsku kiselinu. Isti autori u vodenom ekstraktu lista borovnice bilježe niži sadržaj *p*-kumarinske kiseline (0.32 mg/g) u odnosu na etanolni ekstrakt (0.46 mg/g), dok u analiziranim uzorcima nisu detektovali ni kafenu kiselinu.

U ekstraktima ploda treća po zastupljenosti fenolna kiselina bila je galna kiselina. Njena koncentracija u ekstraktima ploda (MFEI, MFES i MFEM) iznosila je 0.73 mg/g, 0.78 mg/g i 1.03

mg/g, respektivno. Koncentracija galne kiseline u ekstraktima lista (MLEM, MLEI i MLES) iznosila je 0.80 mg/g, 0.58 mg/g i 0.54 mg/g, respektivno.

Koncentracija kafene kiseline u ekstraktima ploda je iznosila 0.16 mg/g u MFEI, 0.31 u MFEM i 0.32 mg/g u MFES, dok je koncentracija *p*-kumarinske kiseline bila 0.21 mg/g u MFEI, 0.24 mg/g u MFES i 0.34 mg/g u MFEM. Veću koncentraciju galne kiseline u odnosu na kafenu i *p*-kumarinsku kiselinu, zabilježio je i Moze sa saradnicima [12]. Naime, koncentracija galne kiseline koju su detektovali ovi autori u plodu borovnice iznosila je 0.062 mg/g, dok je koncentracija *p*-kumarinske i kafene kiseline bila 0.003 mg/g.

Koncentracija sinapinske kiseline u ekstraktima lista borovnice (MLEM, MLEI i MLES) iznosila je 0.18 mg/g, 0.39 mg/g, i 0.63 mg/g, respektivno, dok je koncentracija ferulne kiseline bila 0.11 mg/g u MLEI, 0.26 mg/g u MLEM i 0.28 mg/g u MLES.

U ekstraktima ploda borovnice dobijenim ekstrakcijom na povišenoj temperaturi (Soxhlet ekstrakti i infuzi, MFEI i MFES) koncentracija sinapinske kiseline je iznosila 0.03 mg/g, dok je u ekstraktu dobijenom postupkom maceracije (MFEM) bila 0.06 mg/g. Ferulna kiselina najveću koncentraciju bilježi u MFEM (0.07 mg/g), zatim MFEI (0.05 mg/g) i na kraju u MFES (0.01 mg/g). Koncentracija ferulne kiseline koju su zabilježili Moze i saradnici [12] u ekstraktu ploda borovnice iznosila je 0.004 mg/g.

Pronađene su značajne razlike u koncentraciji identifikovanih fenolnih kiselina ( $p < 0.01$ ) svih ispitivanih ekstrakata, osim za sinapinsku kiselinu u MFES i MFEI.

Poznato je da se glukoza iz krvi transportuje u ćelije organizma olakšanom difuzijom, posredstvom membranskih proteina [62]. U slučaju tkiva koja imaju visok zahtjev za energijom (mozak, mrežnjača oka, crvena krvna zrnca, bubreg, tanko crijevo i beta ćelije pankreasa) ovi transporteri glukoze ne zavise od prisustva insulina i označeni su kao GLUT 1 i GLUT 2. Takođe i funkcija glukoznog transportera GLUT 3 je nezavisna od prisustva insulina, međutim za razliku od ostalih odlikuje se izuzetno visokim afinitetom za glukozu, što tkivima na kojima je skoncentrisan (nervne ćelije i placenta) omogućava priliv glukoze i u jako hipoglikemičnim uslovima. Insulin zavistan je GLUT 4 transporter, koji se nalazi na ćelijskim membranama tkiva u koja odlazi procentualno najveći dio glukoze (masno tkivo, poprečno prugasti mišići i srčane mišićne ćelije). Unos glukoze posredstvom ovog nosača je direktno zavistan od prisustva insulina [242,243,244]. S obzirom da gojazne osobe imaju više GLUT 4 nosača na uvećanim masnim ćelijama, smatra se da nemogućnost pankreasa da odgovori ovako velikom zahtjevu, to jest njegovo iscrpljivanje, je jedan od razloga nastanka dijabetes mellitus tipa 2.

Porast glukoze u krvi stimuliše beta ćelije pankreasa da luče insulin. Kao što je već rečeno one na svojim površinama posjeduju GLUT 2 insulin nezavisne nosače, što je izuzetno važno za "procjenu" nivoa glukoze u krvi od strane pankreasa. Povišen nivo glukoze u krvi uzrokuje i povišen transport glukoze unutar ćelija pankreasa navedenim nosačima. U samim ćelijama ona se razlaže do energetskog ATP jedinjenja, čiji porast uslovljava oslobađanje insulina u cirkulaciju. Oslobođeni insulin ima za cilj da "ukloni" višak glukoze iz cirkulacije, skladišteći je u insulin zavisna tkiva. Suprotno, manja koncentracija glukoze u krvi ne stimuliše pankreas na lučenje insulina.

Naime, primjećeno je da fenolne kiseline stimulišu ćelije pankreasa na sekreciju insulina upravo stimulišući sintezu ATP-a. Takođe, na ćelijama masnog tkiva ova jedinjenja ispoljavaju dejstvo slično insulinu tj. stimulišu preuzimanje glukoze iz krvi u adipocite, povećavajući osjetljivost GLUT 4 nosača [239]. Ovaj nalaz je od izuzetne važnosti, naročito u uslovima smanjenog lučenje insulina koji karakteriše dijabetes, i može se zaključiti da fenolne kiseline terapijski djeluju na oba patološka mehanizma koja su izazvala ovo oboljenje. Na taj način i preparati borovnice pokazuju sličnost u mehanizmu antihiperглиkemijskog efekta kao i oralni antidijabetici derivati bigvanida i tiazolidindiona [245].

Što se tiče flavonoida, izokvercetin je bio najdominantniji flavonol u ispitivanim ekstraktima lista borovnice. Najveću koncentraciju izokvercetina smo zabilježili u infuzu lista (16.20 mg/g u MLEI), zatim maceratu (14.62 mg/g u MLEM) i na kraju etanolnom ekstraktu lista dobijenom Soxhlet ekstrakcijom (9.92 mg/g u MLES).

Drugi po zastupljenosti flavonol u infuzu lista (MLEI) i maceratu (MLEM) bio je rutin (5.31 mg/g i 4.73 mg/g, respektivno) praćen hiperozidom (2.55 mg/g i 2.51 mg/g, redom), dok u ekstraktu dobijenom Soxhlet ekstrakcijom (MLES) kvercetin (7.27 mg/g) praćen rutinom (4.94 mg/g). Koncentracija hiperozida u ekstraktu lista dobijenom Soxhlet ekstrakcijom (MLES) je iznosila 2.38 mg/g, dok je koncentracija kvercetina u infuzu (MLEI) i maceratu lista (MLEM) bila 1.16 mg/g i 2.11 mg/g, respektivno. Znatno veću koncentraciju hiperozida od naše u etanolnom i vodenom ekstraktu lista borovnice zabilježili su Bljajić i saradnici (44.43 mg/g i 32.16 mg/g, respektivno) [1]. Koncentracija kvercetina koju su detektovali Hokkannen i saradnici [246], u listu iz nezagađenog područja Sjeverne Finske, bila je niža od naše (0.03 mg/g), dok Bljajić i saradnici [1] ovo jedinjenje nisu ni detektovali u ispitivanim ekstraktima.

Koncentracije kemferol-3-*O*-glukozida zabilježene u ekstraktima lista (MLES, MLEM i MLEI) iznosile su 1.38 mg/g, 1.56 mg/g i 1.60 mg/g, respektivno, i bile su veće u odnosu na zabilježene koncentracije kemferola u istim uzorcima 0.26 mg/g, 0.10 mg/g i 0.03 mg/g, respektivno. Bljajić i saradnici [1] kao ni Hokkannen i saradnici [246] nisu identifikovali kemferol u ispitivanim ekstraktima lista.

Najzastupljeniji flavonol u infuzu ploda borovnice (MFEI) bio je izokvercetin (0.30 mg/g), praćen hiperozidom (0.17 mg/g) i kvercetinom (0.07 mg/g). U maceratu (MFEM) najdominantniji je bio kvercetin (0.40 mg/g) praćen hiperozidom (0.34 mg/g) i izokvercetinom (0.30 mg/g), dok u ekstraktu dobijenom Soxhlet ekstrakcijom (MFES) kvercetin (0.46 mg/g) je praćen izokvercetinom (0.31 mg/g) i na kraju hiperozidom (0.26 mg/g). Koncentracije kemferol-3-*O*-glukozida u ovim ekstraktima ploda (MFEI, MFEM i MFES) iznosile su 0.05 mg/g, 0.15 mg/g, 0.06 mg/g, respektivno. Znatno nižu koncentraciju kvercetina od naše, u ekstraktu ploda iz nezagađenog područja u Sloveniji, zabilježili su Moze i saradnici (0.008 mg/g) [12]. Dalje, iako su Moze i saradnici identifikovali rutin u ekstraktu ploda borovnice (0.002 mg/g), u našim ekstraktima ploda (MFEI, MFES, MFEM) ovaj flavonol nije identifikovan.

U ispitivanim ekstraktima ploda (MFEI, MFES i MFEM) sa područja Bjelasice kemferol takođe nismo identifikovali.

Značajne razlike u koncentraciji ovih flavonola su pronađene između svih ekstrakata lista borovnice ( $p < 0.01$ ). Koncentracije navedenih flavonola su se takođe značajno razlikovale između svih ekstrakata ploda ( $p < 0.01$ ), izuzev koncentracije izokvercetina u slučaju ekstrakata ploda MFEM i MFEI.

U gastrointestinalnom traktu čovjeka nalaze se enzimi čija je uloga završna digestija ugljenih hidrata.  $\alpha$ -Glukozidaza razgrađuje skrob i disaharide do glukoze, koja se zatim resorbuje u cirkulaciju, a enzim  $\alpha$ -amilaza učestvuje u razgradnji dugolančanih ugljenih hidrata. Inhibicijom hidrolize ugljenih hidrata smanjuje se količina glukoze koja bi se mogla resorbovati iz crijeva. Ovaj princip se može koristiti u terapiji za liječenje postprandijalne hiperglikemije. S obzirom da su flavonoli prepoznati kao mogući inhibitori  $\alpha$ -glukozidaze i  $\alpha$ -amilaze smatraju se korisnim oralnim lijekovima, posebno kod pacijenata sa dijabetesom tipa 2. Piper i saradnici su pokazali [247] da stepen inhibicije ovih enzima je u korelaciji sa brojem hidroksilnih grupa na B prstenu kostura ovih flavonoida.

Flavanol epikatehin je detektovan u ekstraktima lista borovnice. Njegova koncentracija je iznosila 5.75 mg/g u MLES, 5.16 mg/g u MLEM i 4.38 mg/g u MLEI. Koncentracija ovog jedinjenja koju su zabilježili Hokkannen i saradnici [246] iznosila je 1.75 mg/g. U ispitivanim ekstraktima lista (MLEI, MLEM i MLES) nismo zabilježili katehin, iako su neka ranija istraživanja potvrdila prisustvo ovog jedinjenja u listu borovnice [12,246].

U našim ekstraktima ploda (MFEI, MFEM i MFES) epikatehin nije detektovan. Takođe nismo detektovali ni katehin. Koncentracija epikatehina koju su detektovali Moze i saradnici [12] u plodu borovnice bila je 0.02 mg/g, dok je koncentracija katehina bila 0.002 mg/g.

Koncentracija pirogalola u ekstraktima lista borovnice je iznosila 2.45 mg/g u MLEM, 3.16 mg/g u MLEI i 3.46 mg/g u MLES. Ni ovo jedinjenje nije ekstrahovano u ispitivanim ekstraktima ploda (MFEI, MFES i MFEM) sa područja Bjelasice.

Značajna razlika između svih ekstrakata lista u sadržaju epikatehina i pirogalola je zabilježena ( $p < 0.01$ ).

Procijanidin B<sub>2</sub> je identifikovan u svim ispitivanim ekstraktima lista i ploda borovnice. Najveću koncentraciju ovog jedinjenja smo zabilježili u MLEM (1.03 mg/g), zatim MLEI (0.89 mg/g) i na kraju MLES (0.31 mg/g).

U ekstraktima ploda (MFEI, MFEM i MFES) koncentracija procijanidina B<sub>2</sub> je iznosila 0.11 mg/g, 0.13 mg/g i 0.14 mg/g, respektivno.

Postoji značajna razlika u koncentraciji procijanidina B<sub>2</sub> između svih ispitivanih ekstrakata ( $p < 0.01$ ).

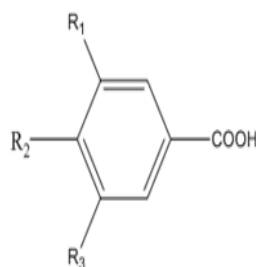
Dokazano je da epitekatina, pirogalol i procijanidin B<sub>2</sub> imaju sposobnost zaštite  $\beta$ -ćelija od hiperglikemije i oksidativnog oštećenja. Naime, oralna primjena ovih jedinjenja ima povoljne efekte jer može da smanji oksidativni stres kroz stimulaciju prirodnog antioksidativnog sistema što se pozitivno odražava i na vitalnost  $\beta$ -ćelija pankreasa [245].

Resveratrol je detektovan u svim ispitivanim ekstraktima borovnice. U ekstraktima lista (MLEM, MLEI i MLES) njegova koncentracija je iznosila 4.60 mg/g, 4.69 mg/g i 5.15 mg/g, respektivno. U ekstraktima ploda koncentracija resveratrola je bila 0.01 mg/g u MFEI, 0.03 mg/g u MFES i 0.07 mg/g u MFEM. Značajne razlike u sadržaju resveratrola između svih ekstrakata su zabilježene ( $p < 0.01$ ). Prema našem saznanju do sada nijedna studija nije potvrdila prisustvo resveratrola u listu borovnice, dok je u plodu ove biljke potvrđen znatno niži sadržaj ovog jedinjenja u odnosu na naš [12]. Može i saradnici su zabilježili koncentraciju resveratrola od 0.002 mg/g.

AMPK je AMP-aktivirana protein kinaza koja reguliše mnoge fiziološke procese u ljudskom organizmu. Od posebnog značaja je stimulisanje antioksidativne aktivnosti beta ćelija pankreasa čime se ublažava njihovo propadanje i usporava insulinsko iscrpljivanje. Kod dijabetičara aktivnost AMPK je smanjena, te je upravo ovaj enzim meta brojnih anti-dijabetskih lijekova (metformin i tiazolidindioni). Dokazano je da resveratrol, kao i pomenuti lijekovi, može ponovno da aktivira AMPK u različitim tkivima, čime se smanjuje stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta, a potom i poboljšava intraćelijski unos glukoze u mišićne ćelije stimulisanjem osjetljivosti GLUT 4 nosača. Vjeruje se da je efekat resveratrola na aktivaciju AMPK-a 50-200 puta veći od metformina [245].

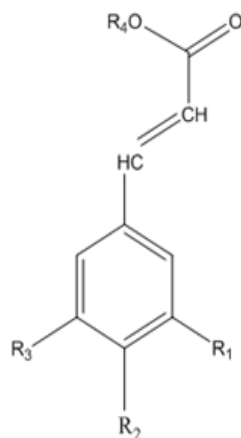
Uzimajući u obzir prisustvo velikog broja identifikovanih fenolnih jedinjenja u našim uzorcima, tradicionalna upotreba borovnice u prevenciji i liječenju dijabetesa može imati svoje opravdanje.

a)



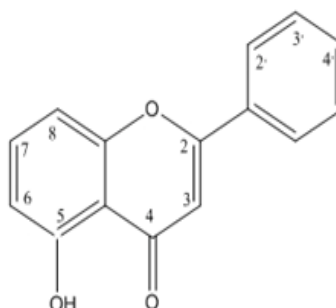
Hidroksi derivati benzojeve kiseline	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Galna kiselina	OH	OH	OH
Protokatehinska kiselina	H	OH	OH

b)



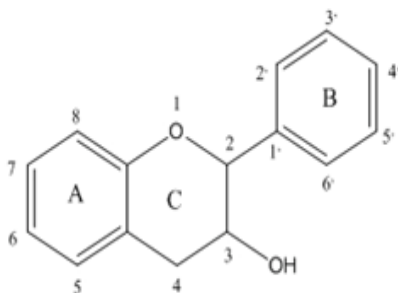
Hidroksi derivati cimetne kiseline	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Neohlorogenska kiselina	OH	OH	H	Hininska kiselina 
Hlorogenska kiselina	OH	OH	H	Hininska kiselina 
Kafena kiselina	OH	OH	H	H
<i>p</i> -kumarinska kiselina	H	OH	H	H
Sinapinska kiselina	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	H
Ferulna kiselina	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H

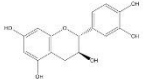
c)



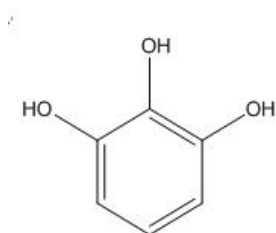
Flavonoli	C <sub>3</sub>	C <sub>3'</sub>	C <sub>4'</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>
Rutin	<i>O</i> -β-D-rutinozil	OH	OH	OH	H
Hiperozid	<i>O</i> -β-D-galaktozil	OH	OH	OH	H
Izokvercetin	<i>O</i> -β-D-glukozil	OH	OH	OH	H
Kemferol-3- <i>O</i> -glukozid	<i>O</i> -β-D-glukozil	H	OH	OH	H
Kvercetin	OH	OH	OH	OH	H
Kemferol	OH	H	OH	OH	H

d)

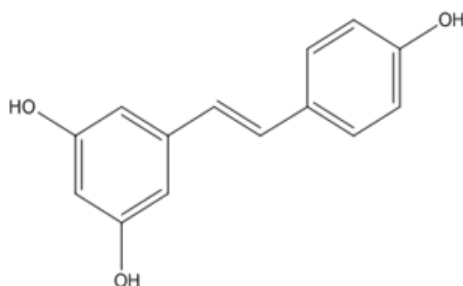


Flavanoli	C <sub>5</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>4'</sub>	C <sub>5'</sub>
		epikatehin			
procijanidin B <sub>2</sub>	OH		OH	OH	OH
epikatehin	OH	H	OH	OH	OH

e) Pirogalol



f) Resveratrol (Stilben)



Slika 33. Fenolna jedinjenja identifikovana u ispitivanim ekstraktima: a) Hidroksi derivati benzojeve kiseline; b) Hidroksi derivati cimetine kiseline; c) Flavonoli; d) Flavanoli; e) Pirogalol; f) Resveratrol (Stilben)

#### 4.7. Sadržaj makroelemenata i mikroelemenata u ekstraktima borovnice dobijenim Soxhlet ekstrakcijom, maceracijom i ekstrakcijom vodom na povišenoj temperaturi

Povezanost makroelemenata i mikroelemenata sa dijabetesom potvrđena je u mnogim istraživanjima [8,9]. Dokazano je da Cr, Mg, Zn, Mn, Fe, Cu, K i Ca imaju izuzetnu ulogu u regulisanju metaboličkih procesa, odnosno kao kofaktori stimuliraju aktivnost enzima koji učestvuju u metabolizmu ugljenih hidrata, masti, holesterola i proteina. Stoga, vrlo značajne koncentracije ovih elemenata koje smo detektovali u ispitivanim ekstraktima borovnice (tabela 11) mogu dodatno, pored sekundarnih metabolita, da doprinosu antidijabetskom potencijalu ove biljke.

U cilju procjene doprinosa dnevnom unosu esencijalnih makroelemenata i mikroelemenata kao i da bi se izveo zaključak o potencijalnom unosu toksičnih elemenata, i na osnovu toga procijenio rizik po zdravlje konzumenata, pretpostavili smo da je prosječna konzumacija ekstrakata lista/ploda borovnice dobijenih različitim ekstrakcionim postupcima u ovom istraživanju 1 g (tabela 12).

Najzastupljeniji esencijalni makroelement u svim ispitivanim ekstraktima borovnice bio je K. U ekstraktima lista, najveća koncentracija K je zabilježena u vodenom ekstraktu (17.22 mg/g u MLEI), zatim maceratu (9.24 mg/g u MLEM) i na kraju Soxhlet ekstraktu (8.19 mg/g u MLES). Koncentracija K koju su Bljajić i saradnici [1] zabilježili u ekstraktu lista bila je niža od naše (2267 mg/kg).

U ekstraktima ploda borovnice, najveću koncentraciju K smo takođe zabilježili u infuzu (10.66 mg/g u MFEI). Koncentracija K u Soxhlet ekstraktu (MFES) je bila 6.60 mg/g, dok je u ekstraktu dobijenom postupkom maceracije (MFEM) iznosila 6.01 mg/g.

K kao kofaktor većeg broja enzima ima vrlo značajnu ulogu u procesima metabolizma ugljenih hidrata [8], jer učestvuje u pretvaranju glukoze u glikogen, koji se u jetri odlaže za naknadno korišćenje. Naime, depoi glikogena u jetri predstavljaju rezerve glukoze koje se, u slučaju pada koncentracije glukoze u krvi, veoma brzo mogu mobilisati i taj pad kompenzovati. S druge strane glikogen deponovan u mišićima predstavlja izvor energije tokom intenzivnih fizičkih napora, pri čemu oslobođena glukoza nikada ne prelazi u krvotok.

Najveća koncentracija Mg u ekstraktima lista je zabilježena u infuzu (3.83 mg/g u MLEI). U etanolnim ekstraktima (MLEM i MLES) koncentracija je iznosila 2.66 mg/g i 1.546 mg/g, redom. U ekstraktima ploda najveća koncentracija Mg takođe je zabilježena u infuzu (1.024 mg/g u MFEI), dok je u etanolnim ekstraktima (MFEM i MFES) iznosila 0.397 mg/g i 0.442 mg/g, respektivno. Mg se takođe smatra protektivnom komponentom kod diabetesa tipa 2. Igra bitnu ulogu kao kofaktor u metabolizmu ugljenih hidrata, i utiče na oslobađanje i djelovanje insulina [9]. Zabilježeno je da dijabetičari tipa 2 imaju nizak nivo Mg u krvi. Uzrok ovome je oštećena funkcija bubrega koju uslovljava povišena vrijednost šećera, pri čemu se Mg izlučuje urinom.

Koncentracija Ca u infuzu lista borovnice (MLEI) je iznosila 5.94 mg/g, dok je u etanolnim ekstraktima bila niža (MLEM i MLES) i iznosila je 2.97 mg/g i 1.233 mg/g, respektivno. Koncentracija Ca koju su zabilježili Bljajić i saradnici [1] u ekstraktu lista iznosila je 2940 mg/kg.

U ekstraktima ploda najveća koncentracija Ca je zabilježena u infuzu (1.321 mg/g u MFEI), zatim ekstraktu dobijenom Soxhlet ekstrakcijom (0.425 mg/g u MFES) i na kraju ekstraktu dobijenom postupkom maceracije (0.383 mg/g u MFEM). Prisustvo Ca je vrlo značajno u svim insulin zavisnim tkivima, skeletnim mišićima i masnom tkivu [248-250]. Njegov nedostatak dovodi do smanjenja aktivnosti GLUT 4 nosača, odnosno uzrokuje smanjenu osjetljivosti ovih tkiva na insulin.

Najveću koncentraciju Fe u ekstraktima lista zabilježili smo u ekstraktu dobijenom postupkom maceracije (25.75 µg/g u MLEM), zatim infuzu (19.8 µg/g u MLEI) i na kraju ekstraktu dobijenom Soxhlet ekstrakcijom (17.37 µg/g u MLES). Nešto nižu koncentraciju Fe od naše u ekstraktu lista borovnice zabilježili su Bljajić i saradnici (14.85 mg/kg) [1].

U ekstraktima ploda najveću koncentraciju Fe smo zabilježili u infuzu ploda (37.6 µg/g u MFEI), zatim Soxhlet ekstraktu (11.9 µg/g u MFES) i na kraju ekstraktu dobijenom postupkom maceracije (5.90 µg/g u MFEM).

Fe ulazi u sastav mnogih važnih enzima i koenzima, kao i u sastav hemoglobina, mioglobulina i respiratornih enzima [9,141,251,252]. Njegov nedostatak vodi u anemiju, a zbog posledičnog smanjenja dopremanja kiseonika hemoglobinom do tkiva izaziva malaksalost, otežano disanje, lupanje srca, glavobolju i otežano gutanje. Takođe, Fe učestvuje u sintezi DNK, u metabolizmu nadbubrežnih hormona stresa koji pojačavaju odbrambene mehanizme organizma ali i kao prenosilac elektrona u mitohondrijama. Stoga su prilikom nedostatka Fe poremećene njegove sve prethodno navedene funkcije. Često se dešava da osobe koje boluju od dijabetesa imaju problem i sa anemijom. Kod dugotrajnog dijabetesa dolazi do slabljenja funkcije bubrega, a njegova nemogućnost da luči eritropoetin, hormon značajan za produkciju crvenih krvnih zrnaca, je najčešći razlog veze ova dva oboljenja. U tom slučaju rizik za dijabetetske komplikacije je uvećan, naročito za oštećenje vida i nervnih završetaka, pogoršanje bubrežne, srčane i arterijske bolesti [8,9].

Koncentracija Mg, Ca i K se značajno razlikovala između svih ispitivanih ekstrakata ( $p < 0.01$ ).

Koncentracija Al u vodenim ekstraktima lista i ploda borovnice je iznosila 186.2 µg/g u MLEI, odnosno 40.30 µg/g u MFEI. U etanolnim ekstraktima lista i ploda dobijenim maceracijom je iznosila 17.8 µg/g u MLEM, odnosno 8.92 µg/g u MFEM, dok je u ekstraktima lista i ploda borovnice dobijenim Soxhlet ekstrakcijom (MLES i MFES) iznosila 7.45 µg/g i 14.2 µg/g, redom.

S obzirom da dnevni unos Al koji se može tolerisati iznosi 10 mg po danu prosečnog konzumenta [25], naši rezultati su pokazali da 1 g ispitivanih ekstrakata lista (MLEI, MLEM i MLES) sadrži 1.86%, 0.18% i 0.07%, redom, od maksimalne količine. 1 g ekstrakata ploda (MFEI, MFEM i MFES) sadrži 0.40%, 0.09% i 0.14%, respektivno, od maksimalne količine Al na dnevnom nivou. Ovaj nalaz nam ukazuje da ispitivani ekstrakti, u pogledu sadržaja Al, nemaju štetnih posledica po zdravlje konzumatora.

Najzastupljeniji mikroelement u ekstraktima borovnice bio je Mn. U ekstraktima lista, najveća koncentracija Mn je zabilježena u etanolnom ekstraktu dobijenom postupkom maceracije (1210 µg/g u MLEM), zatim ekstraktu dobijenom Soxhlet ekstrakcijom (472 µg/g u MLES) i na kraju vodenom ekstraktu (251.4 µg/g u MLEI). Koncentracija Mn koju su zabilježili Bljajić i saradnici [1] u ekstraktu lista je iznosila 474 mg/kg.

U ekstraktima ploda borovnice, najveća koncentracija Mn je zabilježena u vodenom ekstraktu (150.3 µg/g u MFEI), zatim ekstraktu dobijenom postupkom maceracije (43.67 µg/g u MFEM) i na kraju Soxhlet ekstraktu (42.85 µg/g u MFES).

S obzirom da preporučeni dnevni unos Mn iznosi 2 mg [177], 1 g ekstrakti ploda borovnice (MFEI, MFEM i MFES) obezbeđuju zadovoljenje 7.52%, 2.18% i 2.14%, respektivno, od dnevnih potreba. S druge strane, 1 g ispitivanih ekstrakata lista borovnice (MLEM, MLES i MLEI) može da obezbedi zadovoljenje 60.50%, 23.60% i 12.57%, respektivno. Ovaj nalaz je od izuzetne važnosti s obzirom da je poznato da Mn ima višestruku ulogu u ljudskom organizmu. Superoksid dismutaza (SOD, MnSOD), koji u svojoj strukturi sadrži Mn predstavlja jedan od najznačajnijih enzima antioksidativne zaštite ćelije [67]. Ovaj enzim obezbeđuje zaštitu od slobodnih radikala i štete koju bi oni prouzrokovali u organizmu. Takođe, Mn predstavlja kofaktor enzima piruvat karboksilaze, koji učestvuje u procesu glukoneogeneze [9]. S obzirom da je glukoza nezamjenljiv izvor energije za mnoge ćelije, i jedini za skeletne mišiće u toku njihove aktivnosti, neophodno je održavati njen nivo u krvi u periodu između obroka kao i u uslovima gladovanja. To je omogućeno procesom glukoneogeneze, koji se odvija u jetri, i manjim dijelom bubrezima, a predstavlja sintezu glukoze iz aminokiselina, masnih kiselina, piruvata i drugih keto kiselina. Osobe oboljele od dijabetesa imaju nizak nivo Mn, što doprinosi slaboj regulaciji glukoze i smanjenoj funkciji ćelija pankreasa.

Posle Mn, sledeći po zastupljenosti mikroelement u vodenom ekstraktu lista borovnice i ekstraktu dobijenom postupkom maceracije (MLEI i MLEM) bio je Zn (31.48 µg/g i 20.49 µg/g, redom), praćen Cu (2.99 µg/g i 19.53 µg/g, respektivno), dok je u ekstraktu dobijenom Soxhlet ekstrakcijom (MLES) zabilježena veća koncentracija Cu (33.31 µg/g) u odnosu na Zn (29.55 µg/g).



Bljajić i saradnici [1] su proučavajući ekstrakt lista borovnice zabilježili koncentraciju Zn od 18.05 mg/kg, dok je koncentracija Cu bila 7.1 mg/kg.

U ispitivanim ekstraktima ploda borovnice, posle Mn najzastupljeniji mikroelement bio je Zn praćen Cu. Koncentracija Zn bila je najveća u vodenom ekstraktu ploda (17.35 µg/g u MFEI), zatim ekstraktu dobijenom Soxhlet ekstrakcijom (8.99 µg/g u MFES) i na kraju ekstraktu dobijenom postupkom maceracije (6.281 µg/g u MFEM). Koncentracija Cu u ispitivanim ekstraktima ploda borovnice (MFEM, MFES i MFEI) iznosila je 3.62 µg/g, 3.32 µg/g i 1.513 µg/g, respektivno.

Zn i Cu ulaze u sastav bakar-zink superoksid dismutaze (Cu/Zn SOD), enzima koji je značajan antioksidans u organizmu te je održavanje adekvatnog odnosa Cu i Zn veoma važno za normalno funkcionisanje organizma [253]. Cu takođe predstavlja sastavni dio citohrom-oksidge, enzima koji učestvuje u terminalnom dijelu prenošenja elektrona respiratornim elektron-transportnim lancem, što ga čini važnim u procesu stvaranja energije u ćeliji. Zn je neophodan za funkcionisanje zdravih beta ćelija pankreasa. Njegov transport u sekretorične granule insulina β-ćelija pankreasa se vrši nosačem ZnT8. Otkriveno je da su autoantitela protiv ZnT8 jedan od razloga nastanka dijabetesa tipa 1, a disfunkcije ovog nosača jedan od razloga nastanka dijabetes tipa 2. Kod dijabetičara, količina Zn u pankreasu je približno dva puta manja nego kod zdravih [254].

Najveća koncentracija Cr zabilježena je u vodenom ekstraktu lista (MLEI) i iznosila je 1.11 µg/g. U etanolnim ekstraktima lista borovnice (MLES i MLEM) koncentracija Cr je iznosila 0.463 µg/g i 0.123 µg/g, respektivno.

Najveća koncentracija Cr je takođe zabilježena u vodenom ekstraktu ploda borovnice (0.305 µg/g u MFEI), zatim maceratu (0.22 µg/g u MFEM) i na kraju u ekstraktu dobijenom Soxhlet ekstrakcijom (0.181 µg/g u MFES). Istraživanja su pokazala da Cr povoljno utiče na preuzimanje glukoze u periferna tkiva. U prisustvu Cr povećan je broj insulinskih receptora, kao i vezivanje insulina za njih. Stoga, u prisustvu dovoljne količine Cr, insulin u koncentracijama nižim od fizioloških može ostvariti zahtjevani ćelijski nivo aktivnosti. Takođe hrom povećava osjetljivost beta ćelija pankreasa, što u krajnjoj liniji ima kao posledicu poboljšanu sekreciju insulina [255].

Najveću koncentraciju Ba u ispitivanim ekstraktima lista borovnice smo zabilježili u vodenom ekstraktu (MLEI) i iznosila je 69.6 µg/g. Koncentracija Ba u etanolnim ekstraktima lista (MLEM i MLES) iznosila je 6.283 µg/g i 5.36 µg/g, respektivno. Koncentracija Ba koju su zabilježili Bljajić i saradnici [1] u ekstraktu lista iznosila je 51.1 mg/kg.

Koncentracija Ba u ispitivanim ekstraktima ploda borovnice (MFEI, MFES i MFEM) iznosila je 11.43 µg/g, 2.626 µg/g i 1.101 µg/g, respektivno.

Koncentracija Sr u ispitivanim ekstraktima lista iznosila je (MLEI, MLEM i MLES) 14.67 µg/g, 11.775 µg/g, 5.96 µg/g, redom, dok je u ekstraktima ploda (MFEI, MFEM, MFES) iznosila 3.675 µg/g, 0.738 µg/g, 0.582 µg/g, respektivno.

Najveću koncentraciju Ni zabilježili smo u ekstraktu lista borovnice dobijenom postupkom maceracije (4.398 µg/g u MLEI), zatim vodenom ekstraktu (2.85 µg/g u MLEI) i na kraju ekstraktu dobijenom Soxhlet ekstrakcijom (2.184 µg/g u MLES). 1 g ispitivanih ekstrakata lista (MLEM, MLEI i MLES) obezbjeđuje 2.24%, 1.45% i 1.11%, respektivno, od prihvatljivog unosa Ni na dnevnom nivou [25,232], te konzumiranje ovih ekstrakata ne predstavlja toksikološki rizik. Koncentracija Ni koju su zabilježili Bljajić i saradnici [1] u ekstraktu lista borovnice bila je niža od naše (0.2 mg/kg).

Koncentracija Ni u ispitivanim ekstraktima borovnice (MFEI, MFES i MFEM) iznosila je 1.469 µg/g, 0.96 µg/g, 0.94 µg/g, respektivno. Rezultati su pokazali da 1 g ispitivanih ekstrakata ploda (MFEI, MFEM i MFES) obezbjeđuje 0.75%, 0.48% i 0.49% od prihvatljivog unosa Ni [25,232], te nema opasnosti po zdravlje konzumenta kada je ovaj element u pitanju.

Co je jedino detektovan u ekstraktima lista i ploda borovnice dobijenim postupkom maceracije. U MLEM ekstraktu njegova koncentracija je iznosila 0.055 µg/g, dok je u MFES bila 0.072 µg/g. U ostalim ispitivanim ekstraktima koncentracija Co je bila ispod granice detekcije instrumenta (<0.002 µg/g).

Koncentracija navedenih elemenata se značajno razlikovala između svih ispitivanih ekstrakata ( $p < 0.01$ )

Što se tiče toksičnih metala, najveća koncentracija Pb je zabilježena u ekstraktu lista dobijenom Soxhlet ekstrakcijom (0.63  $\mu\text{g/g}$  u MLES), zatim ekstraktu dobijenom postupkom maceracije (0.60  $\mu\text{g/g}$  u MLEM) i na kraju vodenom ekstraktu (0.47  $\mu\text{g/g}$  u MLEI). Bljajić i saradnici [1] su u ekstraktu lista borovnice zabilježili koncentraciju Pb od 0.55 mg/kg.

U ekstraktima ploda koncentracija Pb je bila najveća u ekstraktu dobijenom postupkom maceracije (0.486  $\mu\text{g/g}$  u MFES), zatim Soxhlet ekstraktu (0.104  $\mu\text{g/g}$  u MFES) i na kraju vodenom ekstraktu (0.096  $\mu\text{g/g}$  u MFEI).

Koncentracija Cd u ekstraktima lista (MLEI, MLES i MLEM) iznosila je 0.112  $\mu\text{g/g}$ , 0.047  $\mu\text{g/g}$ , 0.016  $\mu\text{g/g}$ , redom, dok je u ekstraktima ploda (MFEI, MFEM i MFES) bila 0.030  $\mu\text{g/g}$ , 0.026  $\mu\text{g/g}$ , 0.024  $\mu\text{g/g}$ , respektivno.

Koncentracija As detektovana u etanolnim ekstraktima lista (MLES i MLEM) iznosila je 0.059  $\mu\text{g/g}$  i 0.297  $\mu\text{g/g}$ , respektivno, dok je u vodenom ekstraktu (MLEI) bila ispod granice detekcije instrumenta (< 0.005  $\mu\text{g/g}$ ). Bljajić i saradnici [1] su u ekstraktu lista pronašli koncentraciju As od 1.05 mg/kg.

U našim ekstraktima ploda As je detektovan jedino u vodenom ekstraktu (MFEI) pri čemu je zabilježena koncentracija iznosila 0.039  $\mu\text{g/g}$ .

Pb, As i Cd su zbog visokog afiniteta prema tiolnim grupama (SH) enzima konkurentni esencijalnim elementima pri čemu vezujući se za njih mogu da inhibiraju aktivnost datog enzima, a time dovedu i do poremećaja brojnih fizioloških procesa u organizmu. U nedostatku esencijalnih elemenata može doći do povećanog unosa ovih metala. Dokazano je da Pb, As i Cd smanjuju aktivnost enzima katalaze, koji je antioksidativni protektor beta ćelija pankreasa. Takođe, na ćelijama perifernog tkiva djeluju tako što smanjuju insulinsku osjetljivost, a u jetri remete proces glukoneogeneze [256,257].

Naši rezultati su pokazali da 1 g ispitivanih ekstrakata lista i ploda borovnice sadrže manje od 0.45% od prihvatljivog unosa Cd, As i Pb na dnevnom nivou [229-231]. Ovaj nalaz je od izuzetne važnosti jer su dobijene vrijednosti daleko ispod onih koje mogu biti zabrinjavajuće, i koje bi dugotrajnim unosom mogle da izazovu zdravstvene probleme.

Maksimalno dozvoljena koncentracija Cd i Pb u ljekovitom bilju prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji iznosi 0.3  $\mu\text{g/g}$  i 10  $\mu\text{g/g}$ , respektivno, dok za As ova vrijednost još uvijek nije utvrđena [228]. S obzirom da ispitivani ekstrakti sadrže koncentraciju ovih metala (tabela 12) ispod maksimalno, dozvoljene možemo zaključiti da ispitivani ekstrakti ne posjeduju toksikološki rizik.

Koncentracija Pb se značajno razlikovala između svih ispitivanih ekstrakata ( $p < 0.01$ ). S druge strane nismo pronašli značajnu razliku u sadržaju As između MFES i MFEM, i u sadržaju Cd između svih ispitivanih ekstrakata ploda borovnice.

Naši rezultati su pokazali da vodeni ekstrakti lista i ploda borovnice (MFEI i MLEI) sadrže veću količinu Mn, Zn, K, Mg, Ca, Cr, Al, Ba, Sr, i Cd u odnosu na etanolne ekstrakte istih dijelova biljke.

S druge strane, zabilježili smo veći sadržaj Cu i Pb u etanolnim ekstraktima lista i ploda borovnice u odnosu na vodene ekstrakte.

Vodeni ekstrakti ploda su sadržali značajnu količinu Ni, Fe i As, dok najveći sadržaj ovih elemenata u slučaju ekstrakata lista je zabilježen u MLEM (tabela 11).

Co je jedino detektovan u etanolnom ekstraktu lista i ploda dobijenom postupkom maceracije (MFEM i MLEM).

Tabela 11. Koncentracije makroelemenata i mikroelemenata u ispitivanim ekstraktima borovnice

	MFES	MFEM	MFEI	MLES	MLEM	MLEI
Al (µg/g)	14.2±0.7	8.92±0.04	40.30±0.06	7.45±0.06	17.8±0.2	186.2±0.2
As (µg/g)	-	-	0.039±0.002	0.059±0.002	0.297±0.004	-
Ba (µg/g)	2.626±0.008	1.101±0.006	11.43±0.02	5.36±0.03	6.283±0.009	69.6±0.8
Cd (µg/g)	0.0249±0.0002	0.026±0.002	0.030±0.002	0.047±0.002	0.016±0.001	0.112±0.007
Co (µg/g)	-	0.072±0.002	-	-	0.055±0.001	-
Cr (µg/g)	0.181±0.004	0.22±0.03	0.305±0.008	0.463±0.009	0.123±0.002	1.11±0.03
Cu (µg/g)	3.62±0.03	3.32±0.05	1.513±0.010	33.31±0.09	19.53±0.04	2.99±0.04
Mn (µg/g)	42.85±0.10	43.67±0.06	150.3±0.7	472±4	1210±2	251.4±11
Ni (µg/g)	0.96±0.02	0.94±0.02	1.469±0.008	2.184±0.005	4.398±0.006	2.85±0.02
Pb (µg/g)	0.104±0.002	0.486±0.007	0.096±0.004	0.63±0.02	0.60±0.05	0.47±0.02
Sr (µg/g)	0.582±0.003	0.738±0.007	3.675±0.008	5.96±0.02	11.775±0.00	14.67±0.08
Zn (µg/g)	8.99±0.02	6.281±0.007	17.35±0.05	29.55±0.09	20.49±0.04	31.48±0.04
Fe (µg/g)	11.9±0.2	5.90±0.05	37.6±0.2	17.37±0.04	25.75±0.09	19.8±0.2
K (mg/g)	6.60±0.08	6.01±0.10	10.66±0.10	8.19±0.02	9.24±0.02	17.22±0.02
Mg (mg/g)	0.442±0.009	0.397±0.007	1.024±0.003	1.546±0.009	2.66±0.02	3.83±0.02
Ca (mg/g)	0.425±0.001	0.383±0.005	1.321±0.010	1.233±0.004	2.97±0.03	5.94±0.02

\*Granica detekcije instrumenta za Co i As je bila 0.002 µg/g i 0.005 µg/g, respektivno

Tabela 12. Procentualni dnevni unos makroelemenata i mikroelemenata iz 1 g ispitivanih ekstrakata borovnice

	RDA* MDI**	MFES	MFEM	MFEI	MLES	MLEM	MLEI
Cr*	0.04 mg	0.45	0.55	0.76	1.16	0.31	2.78
K*	2000 mg	0.33	0.30	0.53	0.41	0.46	0.86
Mg*	375 mg	0.11	0.12	0.27	0.41	0.71	1.02
Ca*	800 mg	0.05	0.05	0.17	0.15	0.37	0.74
Cu*	1 mg	0.36	0.33	0.15	3.33	1.95	0.30
Mn*	2 mg	2.14	2.18	7.52	23.60	60.50	12.57
Zn*	10 mg	0.09	0.06	0.17	0.30	0.20	0.31
Fe*	14 mg	0.09	0.04	0.27	0.12	1.84	0.14
Co*	2.5 µg	-	2.88	-	-	2.20	-
Al**	10 mg	0.14	0.09	0.40	0.07	0.18	1.86
Ni**	196 µg	0.49	0.48	0.75	1.11	2.24	1.45
Pb**	250 µg	0.04	0.19	0.04	0.25	0.24	0.19
As**	150 µg	-	-	0.03	0.04	0.20	-
Cd**	25 µg	0.10	0.10	0.12	0.19	0.06	0.45

RDA\* -preporučene dnevne potrebe

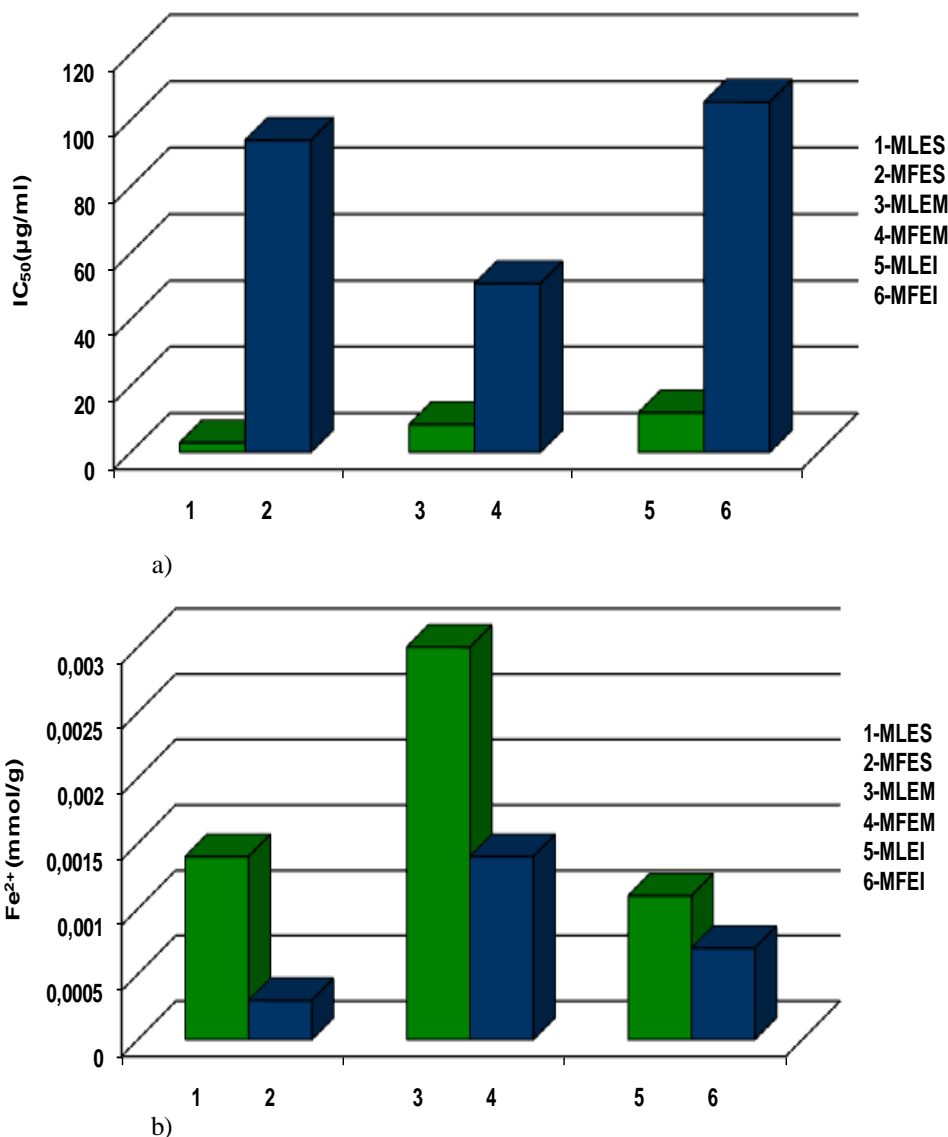
MDI\*\* maksimalni dnevni unos koji se može tolerisati

#### 4.8. Antioksidativna aktivnost ispitivanih ekstrakata borovnice

Aerobni organizmi, uključujući ljudska bića, imaju usklađenu proizvodnju reaktivnih vrsta kiseonika sa odbrambenim sistemom organizma. Disbalans ove ravnoteže vodi u oksidativni stres koji je osnova starenja organizma ali i brojnih bolesti. Istraživanja usmjerena na dejstvo biljnih antioksidanasa su u žiži interesovanja jer su se pokazali djelotvornim u prevenciji ali i kao izuzetno

potentni terapeutici mnogih oboljenja, uključujući i dijabetes [2,3]. Biljni antioksidansi su od velikog značaja za funkciju beta ćelija pankreasa s obzirom da one posjeduju izuzetno nizak nivo sopstvene antioksidativne zaštite. Istraživanjima je pokazano da antioksidativna aktivnost biljnih preparata korelira sa sadržajem fenolnih jedinjenja.

Antioksidativna aktivnost ispitivanih ekstrakata borovnice mjerena je DPPH i FRAP metodom u cilju dobijanja što potpunijeg odgovora, s obzirom da ove metode posjeduju različit mehanizam djelovanja (slika 34).



Slika 34. Antioksidativna aktivnost ekstrakata lista i ploda borovnice mjerena a) DPPH testom; b) FRAP testom

Princip DPPH metode je da antioksidanti, donirajući vodonik hidroksilne grupe polifenola, reaguju sa slobodnim DPPH radikalom (ljubičasto obojen rastvor) i prevode ga u žuti DPPH-H. Slobodni radikal na ovaj način postaje stabilan krajnji proizvod, a stepen promjene boje ukazuje na antioksidativni potencijal ekstrakata [145].

Etanolni ekstrakti lista i ploda borovnice pokazali su veću antioksidativnu aktivnost mjerenu DPPH testom, u odnosu na vodene ekstrakte (slika 34a).

Od ispitivanih ekstrakata lista borovnice (MLES, MLEM i MLEI) najveću antioksidativnu aktivnost mjerenu DPPH testom je pokazao ekstrakt dobijen Soxhlet ekstrakcijom (IC<sub>50</sub> vrijednost bila je 2.92 µg/mL), zatim ekstrakt dobijen postupkom maceracije (IC<sub>50</sub> vrijednost bila je 8.4 µg/mL), i na kraju vodeni ekstrakt (IC<sub>50</sub> vrijednost bila je 11.94 µg/mL).

Od ispitivanih ekstrakata ploda borovnice (MFEM, MFES i MFEI) najveću antioksidativnu aktivnost mjerenu DPPH testom je pokazao ekstrakt dobijen postupkom maceracije ( $IC_{50}$  vrijednost bila je 50.82  $\mu\text{g/mL}$ ), zatim ekstrakt dobijen Soxhlet ekstrakcijom ( $IC_{50}$  vrijednost bila je 93.99  $\mu\text{g/mL}$ ), i na kraju vodeni ekstrakt ( $IC_{50}$  vrijednost bila je 105.46  $\mu\text{g/mL}$ ),

Koncentracija ekstrakta lista potrebna za neutralizaciju 50% DPPH radikala slična je utrošenoj koncentraciji komercijalnog antioksidansa BHT (izmjerena  $IC_{50}$  vrijednost bila je 6  $\mu\text{g/ml}$ ), dok je koncentracija ekstrakata ploda ( $IC_{50}$  vrijednost) bila znatno viša u odnosu na komercijalni antioksidans. Stajčić i saradnici [6] ispitujući plod borovnice iz nezagađenog područja u Srbiji izmjerili su  $IC_{50}$  vrijednost veću od naše (0.3157 mg/ml).

FRAP metoda pripada grupi metoda koje mjere antioksidativnu aktivnost jedinjenja zasnovanu na transferu elektrona, pri čemu se promjenu boje određuje spektrofotometrijski.

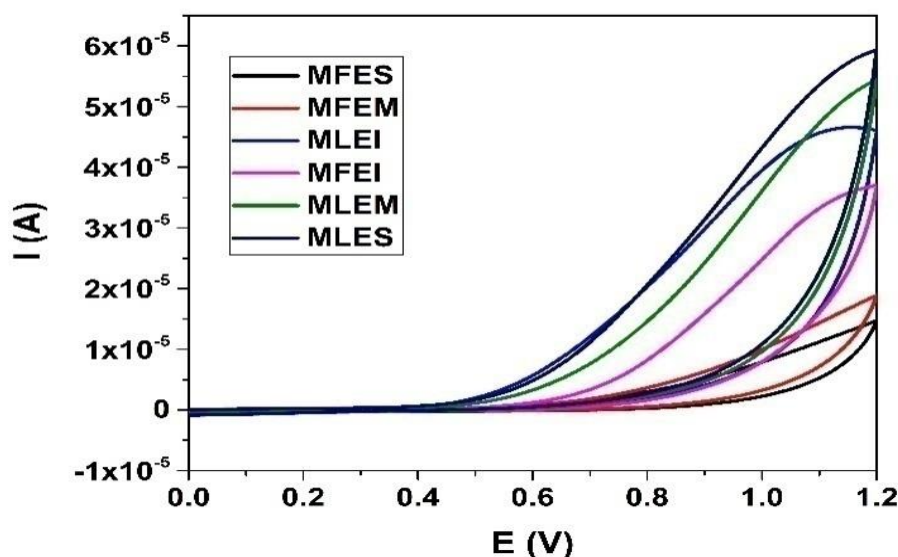
Rezultati FRAP testa su izraženi kao milimolovi  $\text{Fe}^{2+}$  jona po gramu ispitivanog ekstrakta ( $\text{Fe}^{2+}/\text{g SM}$ ) [236].

Od ispitivanih ekstrakata lista (MLEM, MLES i MLEI) najveću antioksidativnu aktivnost mjerenu FRAP testom je pokazao ekstrakt dobijen postupkom maceracije (0.0030 mmol/g), zatim Soxhlet ekstrakt (0.0014 mmol/g), i na kraju vodeni ekstrakt (0.0011 mmol/g) (slika 34b).

Od ispitivanih ekstrakata ploda borovnice (MFEM, MFES i MFEI) najveću antioksidativnu aktivnost mjerenu FRAP testom je pokazao ekstrakt dobijen postupkom maceracije (0.0014 mmol/g), zatim vodeni ekstrakt (0.0007 mmol/g) i na kraju ekstrakt dobijen Soxhlet ekstrakcijom (0.0003 mmol/g) (slika 34b). Antioksidativna aktivnost ploda borovnice mjerena FRAP testom, objavljena u literaturi je iznosila od < 20 do > 2000  $\mu\text{mol/g}$  [11].

Naše istraživanje je pokazalo značajnu razliku između svih ekstrakata ispitivanih DPPH metodom ( $p < 0.01$ ), dok je u slučaju FRAP ispitivanja značajna razlika primjećena između MLES-MLEM, MLEM-MLEI, MFES-MFEM.

Antioksidativna aktivnost ispitivanih ekstrakata procijenjena je i elektrohemijski, cikličnom voltametrijom. Dobijeni voltamogrami su prikazani na slici 35. Svi uzorci su imali oksidacioni pik u oblasti potencijala između 0 i 1.2 V, dok se odsustvo povratnog katodnog pika uočava. S obzirom da borovnica, odnosno ekstrakti ispitivanih dijelova ove biljke predstavljaju smjesu fenolnih jedinjenja, teško je identifikovati doprinos pojedinačnih komponenti antioksidativnoj moći, ali se može pretpostaviti da najzastupljenije komponente najviše i utiču [258].



Slika 35. Ciklični voltamogrami ispitivanih ekstrakata lista i ploda borovnice

Na osnovu slike 35 može se primjetiti da etanolni ekstrakti ploda MFEM i MFES pokazuju nižu, dok su ekstrakti lista MLEI, MLEM i MLES pokazali veću antioksidativnu aktivnost mjerenu cikličnom voltametrijom. Takođe, i antioksidativna aktivnost mjerena DPPH testom pokazuje isti

odnos (slika 32a). Ovo se može objasniti činjenicom da antioksidativna aktivnost zavisi od ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja, čije je prisustvo i dokazano spektrofotometrijskom analizom u većoj mjeri u ekstraktima lista u odnosu na ekstrakte ploda (slike 31a and 34a). Takođe, jasno definisan pik koji uočavamo na voltamogramima ekstrakata lista može biti rezultat prisustva značajne koncentracije fenolnih kiselina [259] u ovim uzorcima koja je dokazana HPLC metodom. HPLC analiza u MFEM i MFES ekstraktima nije potvrdila prisustvo dominantnog fenolnog jedinjenja (tabela 10).

Vodeni ekstrakt ploda je pokazao umjerenu antioksidativnu aktivnost dobijenu cikličnom voltametrijom, što nije u saglasnosti sa ostalim spektrofotometrijskim rezultatima dobijenim u ovom istraživanju. To se može objasniti činjenicom da veliki uticaj na rezultate ima i priroda uzorka kao i selektivnost upotrebljenih testova.

#### **4.9. Korelacija sadržaja polifenola, makroelemenata i mikroelemenata i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim ekstraktima lista i ploda borovnice**

U cilju procjene uticaja sadržaja i sastava polifenola kao i makroelemenata i mikroelemenata na antioksidativnu aktivnost ekstrakata lista i ploda borovnice, u ovom istraživanju korišćena je metoda Analize glavnih komponenti (PCA analiza-Principal component analysis). Dobijeni rezultati predstavljeni su na slici 36, i u tabelama 13, 14, 15, 16.

U ekstraktima ploda borovnice (tabela 13) potvrđen je visok stepen korelacije ( $R^2 = 0.7108$ ) između DPPH i FRAP vrijednosti, dok je u ekstraktima lista stepen korelacije bio slab ( $R^2 = 0.0006$ ). Veća korelacije u ekstraktima ploda može biti rezultat prisustva različitih jedinjenja koja različitim mehanizmima mogu potencirati antioksidativnu aktivnost. Stoga je od izuzetne važnosti, u procesu evaluacije antioksidativnog potencijala ispitivane supstance, potrebno izabrati kombinaciju više testova koji se zasnivaju na različitim principima i pokazuju antioksidativni potencijal ispitivane supstance putem različitih mehanizama djelovanja [260].

U ekstraktima lista borovnice utvrđen je visok stepen korelacije između sadržaja ukupnih flavonoida (TF) i antioksidativne vrijednosti mjerene DPPH metodom je ( $R^2 = 0.8466$ ). Takođe, sadržaj ukupnih tanina (TT) u ekstraktima lista je pokazao visok stepen korelaciju sa FRAP vrijednošću ( $R^2 = 0.882$ ). Iako su ovi rezultati pokazali da flavonoidi i tanini u velikoj mjeri doprinose antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata lista, umjerena korelaciju između sadržaja ukupnih fenola (TP) i FRAP i DPPH testa ( $R^2 = 0.5249$  i  $R^2 = 0.4529$ ) ukazuje da najvjerojatnije pored fenolnih jedinjenja, veliki doprinos daju i druge prisutne nefenolne aktivne komponente koje imaju antioksidativno dejstvo (tabela 13). Naime, naše istraživanje je potvrdilo da ukupna količina esencijalnih elemenata izuzetno doprinosi antioksidativnom potencijalu lista borovnice (tabela 14). Njihova korelacija sa DPPH testom je iznosila  $R^2 = 0.8563$ . Čak su i ukupni toksični elementi pokazali izuzetnu korelaciju sa FRAP testom ( $R^2 = 0.8933$ ). Naime, treba imati na umu da biljni ekstrakti predstavljaju kompleksne smeše prirodnih jedinjenja i da njihova antioksidativna aktivnost nije rezultat aktivnosti samo jedne komponente, već je posledica, pored različite aktivnosti pojedinačnih jedinjenja, i njihovih međusobnih antagonističkih i sinergističkih djelovanja [261]. Posmatrajući pojedinačno makroelemente i mikroelemente u ekstraktima lista (tabela 15), izuzev Pb, svi su pokazali jaku korelaciju sa antioksidativnom aktivnošću ( $R^2$  se kretao od 0.7016 do 0.9997).

S druge strane, da najveći stepen antioksidativne aktivnosti ekstrakata ploda (tabela 13) potiče upravo od prisutnih fenolnih jedinjenja pokazao je visok stepen korelacije sadržaja ukupnih fenola (TP) i DPPH i FRAP vrijednosti ( $R^2 = 0.9972$  i  $R^2 = 0.6617$ ). U ekstraktima ploda borovnice korelacija sadržaja ukupnih flavonoida (TF) sa DPPH i FRAP testom bila je visoka ( $R^2 = 0.996$  i  $R^2 = 0.6517$ , respektivno), dok je korelacija sadržaja ukupnih tanina (TT) sa FRAP i DPPH testom bila slaba ( $R^2 = 0.4898$  i  $R^2 = 0.0434$ , respektivno). Ovi rezultati ukazuju da veliki doprinos antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata ploda daju flavonoidi, dok je doprinos tanina vrlo mali. Visok stepen korelacije procijanidina i antocijana sa DPPH testom ( $R^2 = 0.8381$  i  $R^2 = 0.5059$ , respektivno) ukazuje da i ova fenolna jedinjenja dodatno doprinose antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata ploda.

Doprinos ukupnih esencijalnih elemenata antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata ploda je umjeren ( $R^2 = 0.5219$ ), dok je doprinos ukupnih toksičnih metala kao rezultat različitih sinergističkih i antagonističkih djelovanja visok ( $R^2 = 0.9221$ ) (tabela 14). Korelacija svih pojedinačnih makroelemenata i mikroelemenata u ekstraktima ploda je bila umjerena pa čak i slaba ( $R^2$  se kretao od 0.1599 do 0.672) (tabela 15).

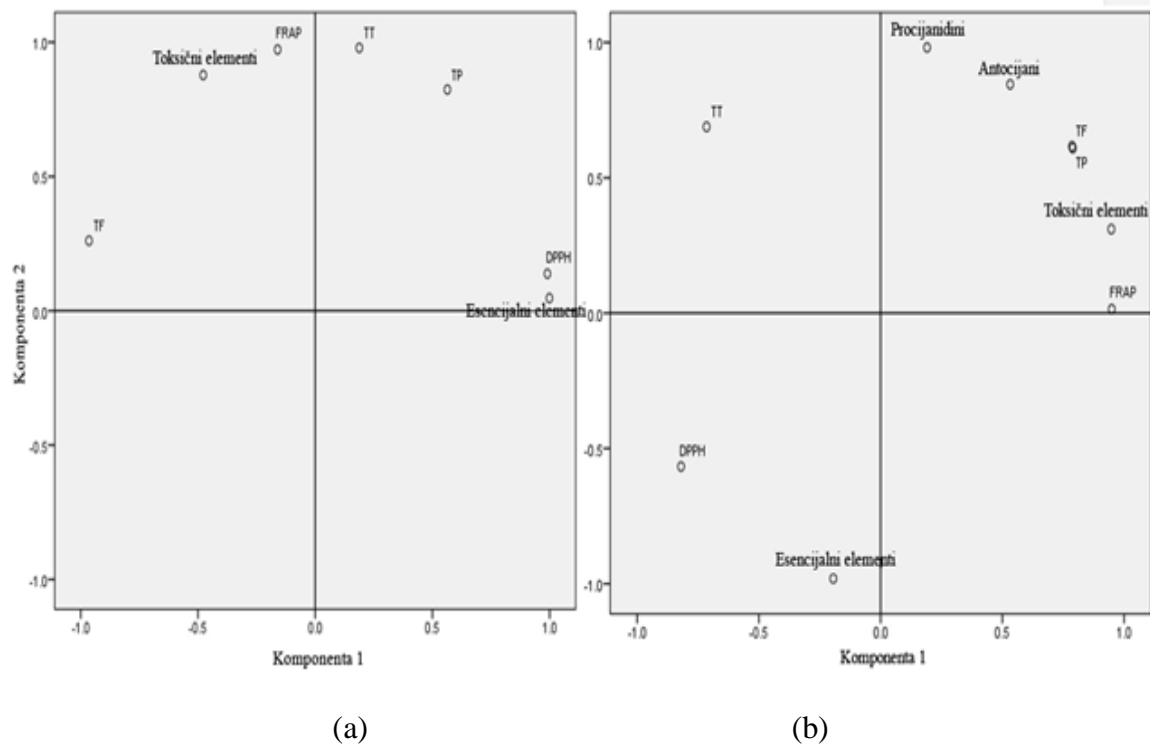
S obzirom da antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina raste sa porastom stepena hidroksilacije [262,263], nije iznenađujuće što su identifikovane fenolne kiseline u ekstraktima lista i ploda borovnice pokazale dobru korelaciju sa DPPH i FRAP vrijednošću ( $R^2$  se kretao od 0.5641 do 1) (tabela 16). Izuzetak je kafena kiselina koja je u ispitivanim ekstraktima ploda pokazala stepen korelacije  $R^2 < 0.5$ . Naime, i pored toga što kafena kiselina posjeduje drugu hidroksilnu grupu u orto-položaju, koja dodatno doprinosi antioksidativnom potencijalu, moguće sinergističke i antagonističke reakcije koje je ova kiselina u ekstraktima ploda borovnice ostvarila sa ostalim prisutnim fenolnim i nefenolnim jedinjenjima smanjuje njen doprinos ukupnom antioksidativnom potencijalu [264,265].

Dalje, identifikovani flavonoidi u ekstraktima lista i ploda borovnice pokazali su visok stepen korelacije sa DPPH i FRAP vrijednošću ( $R^2$  se kretao od 0.7347 do 0.9903) (tabela 16). Veliki doprinos ovih jedinjenja antioksidativnom potencijalu se mogao očekivati s obzirom da je poznato da je rezultat njihove strukture [262]. Ispitivanja zavisnosti hemijske strukture i antioksidativne aktivnosti pokazala su da su hidroksilna grupa u položaju 3 C prstena, 2,3 dvostruka veza u C prstenu i karbonilna grupa u položaju 4 C prstena, odgovorni za antioksidativnu aktivnost flavonoida. Hidroksilne grupe u položajima 5 i 7 A prstena, kao i 3' i 4' B prstena doprinose, takođe, povećanju antioksidativne aktivnosti. S obzirom da kvercetin (3',4'-dihidroksiflavonol) posjeduje sve navedene strukturne karakteristike antioksidativno djelotvornih flavonoida, spada u potentne antioksidante. U našem istraživanju kvercetin prisutan u ekstraktima lista je pokazao visoku korelaciju ( $R^2 = 0.9355$ ) sa antioksidativnom aktivnošću.

Resveratrol je pokazao visok stepen korelacije sa DPPH vrijednošću u svim ispitivanim ekstraktima (tabela 16) ( $R^2$  se kretao od 0.7266 do 0.998). Ovo trohidroksilno jedinjenje posjeduje veliku sposobnost "hvatanja" slobodnih radikala zahvaljujući i prisustvu dva aromatična prstena vezanim dvostrukom vezom. Prethodne eksperimentalne studije pokazuju da uklanjanje jedne hidroksilne grupe ili njena zamjena  $-OCH_3$  grupom može smanjiti antioksidativnu aktivnost [266].

Pirogalol usled visoke molekulske težine i visokog stepena hidroksilacije aromatičnog prstena doprinosi antioksidativnom potencijalu biljke [267], što je i potvrđeno u ovom istraživanju (tabela 16). Stepen korelacije pirogalola i FRAP vrijednosti iznosio je  $R^2 = 0.8095$ .

Veliki broj ranijih istraživanja je potvrdio da fenolna jedinjenja najviše doprinose antioksidativnoj aktivnosti biljke. Strukturni elementi koji su od značaja za funkciju ovih jedinjenja su hidroksilne grupe. Međutim, pri procjeni antioksidativne aktivnosti nekog ekstrakta mora se uzeti u obzir i prisustvo ostalih sekundarnih metabolita biljke, koji međusobno mogu djelovati sinergistički ili antagonistički [268]. Takođe, da bi se donio zaključak o antioksidativnim osobinama nekog uzorka samo jedan test procjene antioksidativne aktivnosti nije dovoljan, već treba ovu aktivnost testirati sa više testova. To je iz razloga što antioksidansi imaju različite odgovore kada se tretiraju različitim testovima. Razlike u antioksidativnoj aktivnosti polifenola mogu biti posledica različitog sadržaja i različite reaktivnosti prisutnih jedinjenja [106,269,270]. Uz to, efikasnost antioksidanata zavisi i od uslova u kojima se reakcija odvija. Različiti antiradikalni testovi pružaju različite mogućnosti antioksidantima da ispolje svoju aktivnost.



Slika 36. Analiza glavnih komponenti u ekstraktima a) lista; i b) ploda borovnice. Ukupni sadržaj fenola (TP), tanina (TT), flavonoida (TF), procijanidina, antocijana, sadržaj esencijalnih elemenata, sadržaj toksičnih metala, DPPH, FRAP

Tabela 13. Stepen korelacije TT, TF, procijanidina, antocijana i TP i antioksidativne aktivnosti; stepen korelacije DPPH i FRAP metode u ekstraktima lista i ploda borovnice

	Plod ( $R^2$ )		List ( $R^2$ )	
	DPPH	FRAP	DPPH	FRAP
TT	0.0434	0.4898	0.104	0.882
TF	0.996	0.6517	0.8446	0.1719
TP	0.9972	0.6617	0.4529	0.5249
procijanidini	0.5059	0.0491		
antocijani	0.8381	0.3085		
DPPH		0.710		0.0006

Tabela 14. Stepen korelacije esencijalnih i toksičnih elemenata i antioksidativne aktivnosti ekstraktima lista i ploda borovnice

	Plod ( $R^2$ )		List ( $R^2$ )	
	DPPH	FRAP	DPPH	FRAP
Esencijalni elementi	0.5219	0.0563	0.8563	0.1625
Toksični elementi	0.921	0.9221	0.1234	0.8933



Tabela 15. Stepen korelacije identifikovanih pojedinačnih elemenata i antioksidativne aktivnosti u ekstraktima lista i ploda borovnice

	List	List	Plod	Plod
	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Fe <sup>2+</sup> (mmol/g)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Fe <sup>2+</sup> (mmol/g)
Al (µg/g)	y=18.279x-71.24 R <sup>2</sup> =0.6853	y=-57033x+175.04 R <sup>2</sup> =0.337	y=0.4501x-16.41 R <sup>2</sup> =0.5958	y=-9319.4x+28.595 R <sup>2</sup> =0.0954
As (µg/g)	y=0.0023x+0.1361 R <sup>2</sup> =0.0042	y=153.8x-0.1633 R <sup>2</sup> =0.9983	y=0.0005x-0.0302 R <sup>2</sup> =0.4387	y=-6.2903x+0.018 R <sup>2</sup> =0.0242
Ba (µg/g)	y=6.5254x-23.513 R <sup>2</sup> =0.6485	y=22060x+67.525 R <sup>2</sup> =0.3744	y=0.1468x-7.1945 R <sup>2</sup> =0.5755	y=-2895.8x+7.369 R <sup>2</sup> =0.0836
Cd (µg/g)	y=0.0061x+0.011 R <sup>2</sup> =0.3205	y=-40.176x+0.132 R <sup>2</sup> =0.7016	y=5x10 <sup>-5</sup> x+0.0231 R <sup>2</sup> =0.2448	y=0.2419x+0.0268 R <sup>2</sup> =0.0025
Co (µg/g)	y=0.0009x+0.0117 R <sup>2</sup> =0.0152	y=30.751x-0.038 R <sup>2</sup> =0.9784	y=-0.0014x+0.142 R <sup>2</sup> =0.9604	y=69.677x-0.0317 R <sup>2</sup> =0.871
Cr (µg/g)	y=0.0603x+0.0982 R <sup>2</sup> =0.2983	y=-417.48x+1.3307 R <sup>2</sup> =0.7233	y=0.0009x+0.1619 R <sup>2</sup> =0.1599	y=-3.5004x+0.2412 R <sup>2</sup> =0.0126
Cu (µg/g)	y=-3.2888x+44.109 R <sup>2</sup> =0.9693	y=2951.1x+13.2 R <sup>2</sup> =0.0394	y=-0.0221x+4.6593 R <sup>2</sup> =0.3114	y=162.1x+2.5475 R <sup>2</sup> =0.0834
Mn (µg/g)	y=218.52x-295.57 R <sup>2</sup> =0.9224	y=-305016x+1957.9 R <sup>2</sup> =0.0908	y=1.4101x+38.695 R <sup>2</sup> =0.4322	y=-16537x+92.17 R <sup>2</sup> =0.0222
Ni (µg/g)	y=0.1022x+2.3519 R <sup>2</sup> =0.1671	y=1003.8x+1.3037 R <sup>2</sup> =0.8148	y=0.0071x+0.5266 R <sup>2</sup> =0.472	y=-101.45x+1.2042 R <sup>2</sup> =0.0355
Pb (µg/g)	y=-0.0167x+0.696 R <sup>2</sup> =0.795	y=39.457x+0.4943 R <sup>2</sup> =0.2246	y=-0.0076x+0.8633 R <sup>2</sup> =0.9671	y=370.97x-0.0681 R <sup>2</sup> =0.8587
Sr (µg/g)	y=0.9738x+3.2513 R <sup>2</sup> =0.9954	y=190.18x+10.453 R <sup>2</sup> =0.0019	y=0.038x-1.5043 R <sup>2</sup> =0.3946	y=-347.9x+1.9433 R <sup>2</sup> =0.0124
Zn (µg/g)	y=0.0538x+26.756 R <sup>2</sup> =0.0017	y=-5743.8x+37.704 R <sup>2</sup> =0.9997	y=0.1642x-2.8232 R <sup>2</sup> =0.672	y=-1746.7x+13.785 R <sup>2</sup> =0.3778
Na (µg/g)	y=-116.02x+1742.2 R <sup>2</sup> =0.7376	y=320096x+255.82 R <sup>2</sup> =0.2836	y=12.642x-690.74 R <sup>2</sup> =0.5106	y=-207069x+529.55 R <sup>2</sup> =0.0512
Fe (µg/g)	y=0.3775x+18.047 R <sup>2</sup> =0.1583	y=3831.3x+13.949 R <sup>2</sup> =0.8239	y=0.4589x-19.82 R <sup>2</sup> =0.6166	y=-4710.2x+26.317 R <sup>2</sup> =0.3226
K (mg/g)	y=0.9317x+4.3265 R <sup>2</sup> =0.7351	y=-2586.4x+16.292 R <sup>2</sup> =0.2862	y=0.0655x+2.2945 R <sup>2</sup> =0.5553	y=-1225.8x+8.7373 R <sup>2</sup> =0.0727
Mg (mg/g)	y=0.2489x+0.7486 R <sup>2</sup> =0.9812	y=-179.84x+3.0084 R <sup>2</sup> =0.0259	y=0.0083x-0.0883 R <sup>2</sup> =0.4387	y=-101.13x+0.6869 R <sup>2</sup> =0.0242
Ca (mg/g)	y=0.8083x-1.8862 R <sup>2</sup> =0.8258	y=-1737.4x+7.5662 R <sup>2</sup> =0.1927	y=0.0127x-0.3513 R <sup>2</sup> =0.4782	y=-185.16x+0.8578 R <sup>2</sup> =0.0379

Tabela 16. Stepen korelacije identifikovanih pojedinačnih fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti u ekstraktima lista i ploda borovnice

Fenolna	Plod		List	
	DPPH	FRAP	DPPH	FRAP
Galna kiselina	$y=-0.0005x+0.1294$ $R^2=0.9947$	$y=24.839x+0.0641$ $R^2=0.7743$	$y=0.0008x+0.0567$ $R^2=0.0696$	$y=13.131x+0.0389$ $R^2=0.9178$
Pirogalol	-	-	$y=-0.0047x+0.3386$ $R^2=0.1721$	$y=-45.575x+0.3856$ $R^2=0.8095$
Neohlorogenska kiselina	$y=-0.0008x+0.0808$ $R^2=0.9528$	$y=39.847x-0.0178$ $R^2=0.8833$	$y=-0.2414x+3.8452$ $R^2=0.4201$	$y=-109.41x+40.3745$ $R^2=0.6885$
Protokatehinska kiselina	$y=-0.0006x+0.1713$ $R^2=0.9652$	$y=21.234x+0.1081$ $R^2=0.5299$	$y=-0.0042x+1.6555$ $R^2=0.0095$	$y=-188.02x+1.968$ $R^2=0.9853$
Hlorogenska kiselina	$y=-0.0012x+0.3084$ $R^2=1$	$y=52.581x+0.1656$ $R^2=0.7087$	$y=0.0294x+5.1214$ $R^2=0.0339$	$y=-701.23x+6.6349$ $R^2=0.9742$
Procijanidin B <sub>2</sub>	$y=-0.0002x+0.1435$ $R^2=0.1449$	$y=-4.8387x+0.1305$ $R^2=0.0311$	$y=0.0701x+0.2002$ $R^2=0.6956$	$y=198.72x+0.379$ $R^2=0.2827$
Kafena kiselina	$y=-0.0002x+0.0404$ $R^2=0.3273$	$y=0.6452x+0.0255$ $R^2=0.0017$	$y=-0.0066x+0.2209$ $R^2=0.5748$	$y=25.99x+0.122$ $R^2=0.4488$
Epikatehin	-	-	$y=-0.0149x+0.6249$ $R^2=0.9578$	$y=15.511x+0.4809$ $R^2=0.0524$
<i>p</i> -kumarinska kiselina	$y=-0.0002x+0.0441$ $R^2=0.9982$	$y=9.1935x+0.0186$ $R^2=0.6718$	$y=-0.0068x+0.2147$ $R^2=0.5654$	$y=-25.958x+0.2093$ $R^2=0.4111$
Ferulna kiselina	$y=-5 \times 10^{-5} x+0.0078$ $R^2=0.2412$	$y=4.1935x+0.0006$ $R^2=0.7788$	$y=-0.0018x+0.0343$ $R^2=0.7363$	$y=4.8562x+0.0118$ $R^2=0.285$
Sinapinska kiselina	$y=-5 \times 10^{-5} x+0.0077$ $R^2=0.9824$	$y=2.0968x+0.0017$ $R^2=0.5841$	$y=-0.0033x+0.0646$ $R^2=0.4124$	$y=-16.933x+0.0704$ $R^2=0.5641$
Rutin	-	-	$y=0.0035x+0.4714$ $R^2=0.2866$	$y=-25.096x+0.5447$ $R^2=0.7347$
Hiperozid	$y=-0.0003x+0.0487$ $R^2=0.8778$	$y=9.1935x+0.0183$ $R^2=0.3622$	$y=0.0018x+0.2335$ $R^2=0.9512$	$y=1.6454x+0.2447$ $R^2=0.039$
Izokvercetin	$y=8 \times 10^{-6} x+0.0295$ $R^2=0.4391$	$y=-0.6016x+0.0307$ $R^2=0.9243$	$y=0.071x+0.8067$ $R^2=0.9754$	$y=42.636x+1.2792$ $R^2=0.0178$
Kemferol-3- <i>O</i> -glukozid	$y=-0.0002x+0.0255$ $R^2=0.9861$	$y=9.8387x+0.0001$ $R^2=0.811$	$y=0.0025x+0.1319$ $R^2=0.9487$	$y=2.3323x+0.1471$ $R^2=0.0413$
Resveratrol	$y=-0.0001x+0.0126$ $R^2=0.998$	$y=5x-0.0007$ $R^2=0.75$	$y=-0.0056x+0.5244$ $R^2=0.7266$	$y=-14.792x+0.5078$ $R^2=0.2524$
Kvercetin	$y=-0.0004x+0.0634$ $R^2=0.3009$	$y=0.4839x+0.0296$ $R^2=0.0002$	$y=-0.07x+0.8939$ $R^2=0.9355$	$y=-74.329x+0.4873$ $R^2=0.0533$
Kemferol	-	-	$y=-0.0026x+0.032$ $R^2=0.9903$	$y=-0.8626x+0.0136$ $R^2=0.0056$

## 5. ZAKLJUČAK

Ovo doktorskom tezom bilo je obuhvaćeno određivanje sadržaja 16 elemenata, uključujući makroelemente (Al, Ca, Fe, K i Mg) i mikroelemente (As, Ba, Cd, Co, Cu, Cr, Mn, Ni, Pb, Sr i Zn) u korijenu, stablu, listu i plodu divlje borovnice i zemljištu sa koga je ubrana.

Što se tiče toksičnih metala As nije detektovan u borovnici. Borovnica je pokazala i vrlo mali stepen akumulacije Pb (BCF od 0.07 do 0.17) i Cd (0.71). U slučaju Cd, vrijednost translacionog faktora ukazuje da se ovaj toksični mikroelement u značajnijoj mjeri transportuje do stabla nego plodova i listova borovnice.

Visoka BCF vrijednost u plodu borovnice zabilježena je samo za K (1.39), koji pokazuje značajan stepen translokacije prema plodu borovnice. Dalje, Ca, Mg, K, Fe, Al, Sr, Ba, Mn, Cu i Zn se u vrlo značajnoj mjeri transportuju od korijena do listova. Ca, Mg, K, Sr, Ba, Mn i Zn se takođe u značajnoj mjeri akumuliraju u listu borovnice.

Dnevni doprinos Cr, Mn i Cu iz jedne porcije ispitivanih borovnica je vrlo značajan (do 32%, 11.2% i 8%, respektivno). S druge strane, konzumiranjem 100 g ispitivane borovnice unijeti toksični metali čini samo do 2.62% od maksimalno prihvatljivog na dnevnom nivou, što nam ukazuje da u pogledu sadržaja toksičnih metala nema štetnih posledica po zdravlje konzumatora.

Dobijeni rezultati su pokazali da veliki uticaj na sadržaj mikroelemenata i makroelemenata u ispitivanim ekstraktima ima primjenjeni postupak ekstrakcije. Vodeni ekstrakti bilježe veću koncentraciju kao i veći procenat ekstrakcije elemenata u odnosu na etanolne ekstrakte istih dijelova borovnice. Takođe primjećeno je da vodeni i etanolni ekstrakti lista bilježe veći sadržaj gotovo svih elemenata nego ekstrakti ploda. Izuzetak su K i Fe koji veći sadržaj bilježe u vodenim ekstraktima ploda nego lista. K veći sadržaj bilježi i u etanolnim ekstraktima ploda nego lista borovnice. S druge strane voda bolje rastvara sve makroelemente i mikroelemente iz ploda nego iz lista borovnice.

Ovo istraživanje je potvrdilo da su ispitivani ekstrakti borovnice izuzetno bogati fenolnim jedinjenjima i da posjeduju visoku antioksidativnu aktivnost. Takođe, visoka antioksidativna aktivnost potvrđena je elektrohemijski, cikličnom voltametrijom. Naši ekstrakti pokazali su visok stepen korelacije između fenola, tanina, flavonoida, antocijana, procijanidina i metala i njihove antioksidativne aktivnost.

U ovom istraživanju, potvrđen je i veliki uticaj primjenjenog postupka ekstrakcije na sadržaj fenolnih jedinjenja u ispitivanim ekstraktima. Kao efikasnije ekstrakciono sredstvo pri izolovanju bioaktivnih jedinjenja pokazao se etanol u odnosu na vodu. HPLC analizom u ispitivanim ekstraktima lista i ploda borovnice identifikovano je osamnaest fenolnih jedinjenja. Najzastupljenija fenolna kiselina u ekstraktima bila je hlorogenska kiselina, praćena protokatehinskom kiselinom. Dalje, u vrlo značajnom procentu u ispitivanim ekstraktima zastupljeni su resveratrol, izokvercetin, kvercetin, hiperozid. Upravo ova jedinjenja u literaturi prepoznata su kao nosioci antidijabetskog potencijala. S druge strane, ispitivani vodeni ekstrakti su bili bogatiji esencijalnim metalima u poređenju sa etanolnim ekstraktima. 1 g ispitivanih ekstrakata lista borovnice može da obezbjedi zadovoljenje 60.50%, 23.60% i 12.57%, respektivno, dnevnih potreba.

## 6. LITERATURA

1. Bljajic, K., Petlevski, R., Vujic, L., Čačić, A., Šoštarić, N., Jablan, J., de Carvalho, I.S., Končić, M.Z. (2017). Chemical composition, antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase-inhibiting activities of the aqueous and hydroethanolic extracts of *Vaccinium myrtillus* leaves. *Molecules*, 22, 703.
2. Erejuwa, O.O. (2012). Oxidative stress in diabetes mellitus: Is there a role for hypoglycemic drugs and/or antioxidants. In: *Oxidative stress and diseases*. Lushchak, V., Ed. InTech Open, Rijeka, Croatia, 217–246.
3. Moussa, S.A. (2008). Oxidative stress in diabetes mellitus. *Romanian J. Biophys.*, 18, 225-236.
4. Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A., Boskou, D. (2002). Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage and summer savory. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5294–5299.
5. Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., Vivanco, J.M. (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chem.*, 83, 547-550.
6. Stajčić, S.M., Tepić, A.N., Djilas, S.M., Šumić, Z.M., Čanadanović-Brunet, J.M., Četković, G.S., Vulić, J.J., Tumbas, V.T. (2012). Chemical composition and antioxidant activity of berry fruits. *Acta Period. Technol.*, 43, 93-105.
7. Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., Kong, M., Li, L., Zhang, Q., Liu, Y., Chen, H., Qin, W., Wu, H., Chen, S. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, 21, 1374.
8. Arika, W.M., Ogola, P.E., Nyamai, D.W., Mawia, A.M., Wambua, F.K., Kiboi, N.G., Wambani, J.R., Njagi, S.M., Rachuonyo, H.O., Emmah, K.O., Lagat, R.C., Muruthi, C.W., Abdirahman, Y.A., Agyirifo, D.S., Ouko, R.O., Ngugi, M.P., Njagi, E.N.M. (2016). Mineral elements content of selected Kenyan antidiabetic medicinal plants. *Adv. Tech. Biol. Med.*, 4,160.
9. Khan, A.R., Awan, F.R. (2014). Metals in the pathogenesis of type 2 diabetes. *J. Diabetes Metab. Disor.*, 13,16.
10. Sidorova, Y., Shipelin, V., Mazo, V., Zorin, S., Petrov, N., Kochetkova, A. (2017). Hypoglycemic and hypolipidemic effect of *Vaccinium myrtillus* L. leaf and *Phaseolus vulgaris* L. seed coat extracts in diabetic rats. *Nutrition*, 41, 107-112.
11. Chu, W.-K., Cheung, S.C.M., Lau, R.A.W., Benzie, I.F.F. (2011). Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). In: *Herbal medicine biomolecular and clinical aspects*, 2nd ed. Benzie, I.F.F., Wachtel-Galor, S., Eds. CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton, Florida, 55–73.
12. Može, S., Polak, T., Gašperlin, L., Koron, D., Vanzo, A., Ulrich N.P., Abram, V. (2011). Phenolics in Slovenian bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 59, 6998-7004.
13. Dai, J., Mumper, R.J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313-7352.
14. Barać, N.M. (2017). Mobilnost i biodostupnost odabranih elemenata u poljoprivrednom zemljištu aluviona reke Ibar. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.
15. Đorđević, A., Radmanović, S. (2016). Pedologija. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
16. Jenny, H., Amundson, R. (1994). Factors of soil formation. A system of quantitative pedology. Dower Publications, Inc., New York.
17. Akinrinde, E.A. (2004). Soils: Nature, fertility conservation and management. Chude, V., Amakiri, M.A., Eds. AMS Publishing, Inc., Vienna, Austria.
18. Jakovljević, M., Pantović, M. (1991). Hemija zemljišta i voda. Naučna knjiga, Beograd, Srbija.
19. Kastori, R. (1995). Zaštita agroekosistema. Feljton, Novi Sad, Srbija.

20. Antić, M., Jović, N., Avdalović, V. (2007). Pedologija. Univerzitet u Beogradu, Šumarski fakultet, Beograd.
21. Ćirić, M. (1991). Pedologija. Svjetlost, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Sarajevo.
22. Tack, F.M.G. (2010). Trace elements: General soil chemistry, principles and processes. In: Trace elements in soil. Hooda, P.S., Ed. Wiley-Blackwell, Chichester, UK, 9-37.
23. Kabata-Pendias, A. (2011). Trace Elements in soils and plants, 4th ed. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida.
24. Bogdanović, D. (2007). Izvori zagađenja zemljišta hromom. Letopis naučnih radova Poljoprivrednog fakulteta, 31, 29–35.
25. Stefanović, V.M. (2016). Određivanje sadržaja makroelemenata i mikroelemenata u uzorcima pečurke *Macrolepiota procera* i zemljišnim supstratima iz Rasinskog okruga. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet, Beograd.
26. Zimmerman, A.J., Weindorf, D.C. (2010). Heavy metal analysis in soil by sequential extraction: A review of procedures. Int. J. Anal. Chem., 2010, 1-7.
27. Žemberyová, M., Barteková, J., Hagarová, I. (2006). The utilization of modified BCR three-step sequential extraction procedure for the fractionation of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in soil reference materials of different origins. Talanta, 70, 973-978.
28. Zakir, H.M., Shikazono, N. (2008). Metal fractionation in sediments: A comparative assessment of four sequential extraction schemes. JESSS, 2,1-12.
29. Sutherland, R.A. (2010). BCR®-701: A review of 10-years of sequential extraction analyses. Anal. Chim. Acta, 680, 10-20.
30. Mossop, K.F, Davidson, C.M. (2003). Comparison of original and modified BCR sequential extraction procedures for the fractionation of copper, iron, lead, manganese and zinc in soils and sediments. Anal. Chim. Acta, 478, 111-118.
31. Bacon, J.R., Davidson, C.M. (2008). Is there a future for sequential chemical extraction? Analyst, 133, 25-46.
32. Alvarez, J.M., Lopez-Valdivia, L.M., Novillo, J., Obrador, A., Rico, M. I. (2006). Comparison of EDTA and sequential extraction tests for phytoavailability prediction of manganese and zinc in agricultural alkaline soils. Geoderma, 132, 450-463.
33. Kubová, J., Matuš, P., Bujdoš, M., Hagarová, I., Medved', J. (2008). Utilization of optimized BCR three-step sequential and dilute HCl single extraction procedures for soil–plant metal transfer predictions in contaminated lands. Talanta, 75, 1110-1122.
34. Tessier, A., Campbell, P.G.C., Bisson, M. (1979). Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. Anal. Chem., 51,844-851.
35. Davidson, C.M., Duncan, A.L., Littlejohn, D., Ure, A.M., Garden, L.M. (1998). A critical evaluation of the three-stage BCR sequential extraction procedure to assess the potential mobility and toxicity of heavy metals in industrially-contaminated land. Anal. Chim. Acta, 363, 45-55.
36. Rauret, G., López-Sánchez, J.F., Sahuquillo, A., Barahona, E., Lachica, M., Ure, A.M., Davidson, C.M., Gomez, A., Lück, D., Bacon, J., Yli-Halla, M., Muntau, H., Quevauviller, P. (2000). Application of a modified BCR sequential extraction (three-step) procedure for the determination of extractable trace metal contents in a sewage sludge amended soil reference material (CRM 483), complemented by a three-year stability study of acetic acid and EDTA extractable metal content. J. Environ. Monit., 2, 228-233.
37. Sungur, A., Soylak, M., Ozcan, H. (2014). Investigation of heavy metal mobility and availability by the BCR sequential extraction procedure: Relationship between soil properties and heavy metals availability Chem. Speciat. Bioavailab., 26, 219-230.
38. Filgueiras, A.V., Lavilla, I., Bendicho, C. (2003). Chemical sequential extraction for metal partitioning in environmental solid samples. J. Environ. Monit., 4,823-857.
39. Arunachalam, J., Emons, H., Krasnodebska, B., Mohl, C. (1996). Sequential extraction studies on homogenized forest soil samples. Sci. Total Environ., 181, 147-159.
40. Stone, M., Droppo, I.G. (1996). Distribution of lead, copper and zinc in size-fractionated river bed sediment in two agricultural catchments of southern Ontario, Canada. Environ. Pollut., 93,

- 353-362.
41. Narwal, R.P. Singh, B.R. Salbu, B. (1999). Association of cadmium, zinc, copper, and nickel with components in naturally heavy metal-rich soils studied by parallel and sequential extractions. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 30, 1209-1230.
  42. Ahnstrom, Z.A.S., Parker, D.R. (2001). Cadmium reactivity in metal-contaminated soils using a coupled stable isotope dilution - Sequential extraction procedure. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 121-126.
  43. Ure, A.M., Davidson, C.M. (2002). Chemical speciation in soils and related materials by selective chemical extraction. In: *Chemical speciation in the environment*, 2nd ed. Ure, A.M., Davidson C.M., Eds. Blackwell Science Ltd, London, UK, 265-300.
  44. Relić, D.J. (2012). Novi pristup u ispitivanju mobilnosti metala i metaloida u sedimentima primenom sekvencijalne ekstrakcije. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet, Beograd.
  45. Gibson, M.J., Farmer, J.G. (1986). Multi-step sequential chemical extraction of heavy metals from urban soils. *Environ. Pollut. Ser. B*, 11, 117-135.
  46. Lee, F.Y., Kittrick, J.A. (1984). Elements associated with the cadmium phase in a harbor sediment as determined with the electron beam microprobe. *J. Environ. Qual.*, 13, 337-340.
  47. Diks, D.M., Allen, H.E. (1983). Correlation of copper distribution in a freshwater-sediment system to bioavailability. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 30, 37-43.
  48. Krishnamurti, G.S.R., Huang, P.M., Van Rees, K.C.J., Kozak L.M., Rostad. H.P.W. (1995). Speciation of particulate-bound cadmium of soils and its bioavailability. *Analyst*, 120, 659-665.
  49. Miller, W.P., Martens, D.C., Zelazny, L.W. (1986). Effect of sequence in extraction of trace metals from soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 50, 598-601.
  50. Shuman, L.M. (1983). Sodium hypochlorite methods for extracting microelements associated with soil organic matter. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 47, 656-660.
  51. Kersten, M., Forstner, U. (1986). Chemical fractionation of heavy metals in anoxic estuarine and coastal sediments. *Water Sci. Technol.*, 18, 121-130.
  52. Sutherland, R.A., Tack, F.M.G., Tolosa, C.A., Verloo, M.G. (2000). Operationally defined metal fractions in road deposited sediment, Honolulu, Hawaii. *J. Environ. Qual.* 29, 1431-1439.
  53. Campanella, L., D'Oracio, D., Petronio, B. M., Pietrantonio, E. (1995). Proposal for a metal speciation study in sediments. *Anal. Chim. Acta*, 309, 387-393.
  54. Sahuquillo, A., López-Sánchez, J.F., Rubio, R., Rauret, G., Thomas, R.P., Davidson, C.M., Ure, A.M. (1999). Use of a certified reference material for extractable trace metals to assess sources of uncertainty in the BCR three-stage sequential extraction procedure. *Anal. Chim. Acta*, 382, 317-327.
  55. Petrović, D. (2017). Ekofiziološke, biohemijske i anatomske odlike vrste *Trapa natans L.* na području Skadarskog jezera. Doktorski rad. Univerzitet Crne Gore, Prirodno-matematički fakultet, Podgorica.
  56. Malovac, A. (2017). Bioakumulacija teških metala u biljci hiperakumulatoru *Pistia stratiotes*. Master rad. Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Niš.
  57. Murphz, A., Taiz, L. (1995). Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten Arabidopsis ecotypes. Correlation with copper tolerance. *Plant Physiol.*, 109, 945-954.
  58. Grill, E., Winnacker, E.L., Zenk, M.H. (1985). Phytochelatins: The principle heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*, 230, 674-676.
  59. Arsenov, D. (2018). Fiziološki aspekti potencijala vrba (*Salix spp*) u asistiranoj fitoremedijaciji kadmijuma upotrebom limunske kiseline. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, Novi Sad.
  60. Mikač, G., Petrović, V., Stanetić, K., Stoisavljević-Šatara, S. (2010). Klinički vodič za primarnu zdravstvenu zaštitu: Bolesti žlijezda sa unutrašnjim lučenjem, ishrane i metabolizma. Diabetes mellitus; Hipertireoza i hipotireoza; Hiperlipoproteinemije. Ministarstvo zdravlja i socijalne zaštite Republike Srpske, Banja Luka.

61. Manojlović, D. (1998). Interna medicina. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.
62. Đorđević, M.M. (2019). Molekularni mehanizmi antioksidativnog dejstva ekstrakta kičice (*Centaureum erythraea* RAFN) u eksperimentalnom modelu dijabetesa pacova. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd.
63. Wajchenberg, B.L. (2007). beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment. *Endocr. Rev.*, 28, 187-218.
64. Robertson, R.P. (2004). Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J. Biol. Chem.*, 279, 42351- 42354.
65. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39, 44-84.
66. Halliwell, B., Gutteridge, J. (2015). Free radicals in biology and medicine, 5th ed. Oxford University Press, Oxford, UK.
67. Predin, T. (2014). Oksidativni stres kod pacijenata sa parodontopatijom. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Novi Sad.
68. Đukić, M.M. (2008). Oksidativni stres. Slobodni radikali, prooksidansi, antioksidansi. Mono i Manjana, Beograd, Srbija.
69. Bondy, S.C., Nadery, S. (1994). Contribution of hepatic cytochrome P-450 systems to the generation of reactive oxygen species. *Biochem. Pharmacol.*, 48, 155-159.
70. Du, X.L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I.G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J., Brownlee, M. (2000). Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 12222-12226.
71. Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.P., Giardino, I., Brownlee, M. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, 404, 787-790.
72. Tsai, E.C., Hirsch, I.B., Brunzell, J.D., Chait, A. (1994). Reduced plasma peroxy radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. *Diabetes*, 43, 1010-1014.
73. Klisić, A.N. (2015). Povezanost oksidativnog stresa i stepena inflamacije sa kardiovaskularnim faktorima rizika u populaciji gojaznih žena u postmenopauzi. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd.
74. Čepelak, I. (2009). Slobodni radikali i antioksidansi. U: Štrausova medicinska biokemija. Čepelak, I., Čvorišćec, D., urednice. Medicinska naklada, Zagreb, Hrvatska, 638-648.
75. Carney, J.M., Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Landum, R.W., Cheng, M.S., Wu, J.F., Floyd, R.A. (1991). Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-alpha-phenylnitron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 3633-3636.
76. Floyd, R.A. (1991). Oxidative damage to behavior during aging. *Science*, 254, 1597.
77. Stanković, J. (2019). Određivanje antioksidativnih karakteristika odabranih vrsta lubenica i dinja. Master rad. Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Niš.
78. Kohen, R., Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.*, 30, 620-650.
79. Haber, F., Weiss, J. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. A*, 147, 332-351.
80. Liochev, S.I. (1999). The mechanism of "Fenton-like" reactions and their importance for biological systems. A biologist's view. *Met. Ions. Biol. Syst.*, 36, 1-39.
81. Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E., Brenowitz, M. (2000). A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J. Mol. Biol.*, 304, 55-68.

82. Jovanović, V.B. (2013). Tiolna grupa Cys34 humanog serum-albumina: mogućnosti i značaj određivanja u kliničkoj praksi. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet, Beograd.
83. Krstić, J.N. (2017). Mineralni i polifenolni profil zelenog, crnog, biljnih i voćnih filter čajeva i njihov antioksidativni kapacitet. Doktorska disertacija. Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Niš.
84. Koraćević, D., Bjelaković, G., Đorđević, V.B., Nikolić, J., Pavlović, D.D., Kocić, G. (2003). Biohemija, 3. izdanje. Savremena administracija, Beograd, Srbija.
85. Božin, B., Mimica-Đukić, N., Samojlik, I., Anackov, G., Igić, R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chem.*, 4, 925-929.
86. Lenzen, S., Drinkgern, J., Tiedge, M. (1996). Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic. Biol. Med.*, 20, 463-466.
87. Grankvist, K., Marklund, S.L., Taljedal, I.B. (1981). CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem. J.*, 199, 393-398.
88. Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J., Lenzen, S. (1997). Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*, 46, 1733-1742.
89. Rashidi, A., Kirkwood, T.B.L., Shanley, D.P. (2009). Metabolic evolution suggests an explanation for the weakness of antioxidant defences in beta-cells. *Mech. Ageing Dev.*, 130, 216-221.
90. Matejić, J.S. (2013). Biološka aktivnost etarskih ulja i ekstrakata odabranih vrsta iz familije Apiaceae. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd.
91. Dash, D.K., Yeligar, V.C., Nayak, S.S., Ghosh, T., Rajalingam, D., Sengupta, P., Maiti, B.C., Maity, T.K. (2007). Evaluation of hepatoprotective and antioxidant activity of *Ichnocarpus frutescens* (Linn.) R.Br. on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Trop. J. Pharm. Res.*, 6, 755-765.
92. Yildirim, A., Oktay, M., Bulaloulu, V. (2001). The antioxidant activity of the leaves of *Cydonia vulgaris*. *Turk. J. Med. Sci.*, 31, 23-27.
93. Pešić, V.D. (2014). Antioksidativna aktivnost ekstrakata odabranih taksona roda *Seseli* L. Master rad. Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, Niš.
94. Sen, S., Chakraborty, R., De, B., Mazumder, J. (2009). Plants and phytochemicals for peptic ulcer: An overview. *Pharmacogn. Rev.*, 3, 270-279.
95. Ramchoun, M., Harnafi, H., Alem, C., Benly, M., Elrhaffari, L., Amrani, S. (2009). Study on antioxidant and hypolipidemic effects of polyphenol rich extract from *Thymus vulgaris* and *Lavendula multifida*. *Pharmacognosy Res.*, 1, 106-112.
96. Kamboj, V.P. (2000). Herbal medicine. *Curr. Sci.*, 78, 35-39.
97. Karlsen, A., Paur, I., Bøhn, S.K., Sakhi, A.K., Borge G.I., Serafini, M., Erlund I., Laake, P., Tonstad, S., Blomhoff, R. (2010). Bilberry juice modulates plasma concentration of NF- $\kappa$ B related inflammatory markers in subjects at increased risk of CVD. *Eur. J. Nutr.*, 49, 345-355.
98. Cignarella, A., Nastasi, M., Cavalli, E., Puglisi, L. (1996). Novel lipid lowering properties of *Vaccinium myrtillus* L. leaves, a traditional antidiabetic treatment, in several models of rat dyslipidaemia: A comparison with clofibrate. *Thromb. Res.*, 84, 311-322.
99. Erlund, I., Kol, R., Alfthan, G., Marniemi, J., Puukka, P., Mustonen, P., Mattila, P., Jula, A. (2008). Favourable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.*, 87, 323-331.
100. Bojović, D. (2012). Analiza hemijskog sastava i biološke aktivnosti šarplaninskog čaja, *Sideritis scardica* Griseb., Lamiaceae. Doktorska disertacija. Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka, Kragujevac.
101. Stanisavljević, N.S. (2015). Karakterizacija i *in vitro* biološke aktivnosti fenolnih jedinjenja graška (*Pisum sativum* L.). Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd.



102. Anderson, J.W., Smith, B.M., Washnock, C.S. (1999). Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. *Am. J. Clin. Nutr.*, 70, 464S-474S.
103. Miller, H.E., Rigelhof, F., Marquart, L., Prakash, A., Kanter, M. (2000). Whole-grain products and antioxidants. *Cereal Foods World*, 45, 59-63.
104. Mehta, R.G., Murillo, G., Naithani, R., Peng, X. (2010). Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come? *Pharm. Res.*, 27, 950-961.
105. Ramos, S. (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol. Nutr. Food Res.*, 52, 507-526.
106. Veličković, J.M. (2013). Hemijska analiza i antioksidativna aktivnost ekstrakata odabranih biljnih vrsta bogatih fenolnim jedinjenjima. Doktorska disertacija. Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Niš.
107. Delgado-Vargas, F., Paredes-López, O. (2003). Natural colorants for food and nutraceutical uses. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, 27-32, 93-99, 167-172.
108. Miletić S., Miletić G. (1996). Hemija biljnih pigmenata. Monografija. Univerzitet u Nišu, Filozofski fakultet, Niš, 27-32.
109. Grotewold, E. (2006). Science of flavonoids. Springer, Columbus, Ohio.
110. Jovanović, S.Č. (2016). Sekundarni metaboliti predstavnika roda *Sedum* L. (Crassulaceae) centralnog Balkanskog poluostrva i njihov hemotaksonomski značaj. Doktorska disertacija. Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Niš.
111. Šućur, J. (2015). Biopesticidna aktivnost ekstrakata odabranih biljnih vrsta familije Lamiaceae. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu, Novi Sad.
112. Orčić, D. (2010). Vrste tribusa Scandiceae (Apiaceae Lindley 1836, subfam. Apioideae) potencijalni izvor biološki i farmakološki aktivnih sekundarnih biomolekula. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu, Novi Sad.
113. Castellano, G. (2012). Classification of phenolic compounds by chemical structural indicators and its relation to antioxidant properties of *Posidonia Oceanica* (L.) delile. *MATCH Commun. Math. Comput. Chem.*, 67, 231-250.
114. Jakovetić Tanasković, S.M. (2016). Enzimaska proizvodnja estara fenolnih kiselina. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.
115. Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.*, 125, 288-306.
116. Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N., Toscano, M. (2004). Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *J. Phys. Chem. A*, 108, 4916-4922.

---

117. Cuvelier, M.-E., Richard, H., Berset, C. (1992). Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: Structure-activity relationship. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56, 324-325.
118. Pokorny, J., Trojakova, L., Takacsova, M. (2001). The use of natural antioxidants in food products of plant origin. In: *Antioxidants in food. Practical applications.* Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., Eds. Woodhead publishing, Cambridge, UK, 355-372.
119. Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K., Taniguchi, H. (2002). Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2161-2168.
120. Chen, J.H., Ho, C.-T. (1997). Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2374-2378.
121. Natella, F., Nardini, M., Di Felice, M., Scaccini, C. (1999). Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1453-1459.
122. Silva, F.A.M., Borges, F., Guimaraes, C., Lima, J.L.F.C., Matos, C., Reis, S. (2000). Phenolic acids and derivatives: Studies on the relationship among structure, radical scavenging activity, and physicochemical parameters. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2122-2126.
123. Stanišić, M.J. (2019). Alelopatiski potencijal sekundarnih metabolita transformisanih korenova jabuke - efekat floretina i florazina u kulturi *in vitro*. Doktorska disertacija. Univerzitet u

Beogradu, Biološki fakultet, Beograd.

124. Williams, C.A., Grayer, R.J. (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.*, 21, 539-573.
125. Ferrer, J.-L., Austin, M.B., Stewart, C.Jr., Noel, J.P. (2008). Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiol. Biochem.*, 46, 356-370.
126. Gligorić, E. (2018). Biološki potencijal i hemijska analiza vrsta roda *Salix* L. (Salicaceae) sa teritorije Republike Srbije. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Novi Sad.
127. Brewer, M.S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, compounds, mechanism of action, and potential applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 10, 221-47.
128. Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R. (2016). Flavonoids: An overview. *J. Nutr. Sci.*, 5, 1-15.
129. Tumbas, V.T. (2010). Antiradikalska i antiproliferativna aktivnost ekstrakata odabranih biljaka iz familija Rosaceae i Ericaceae. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
130. Janković, S. (2017). Kinetika ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz biljnog materijala. Master rad. Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Niš.
131. Herrmann, K. (1989). Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 28, 315-347.
132. Milivojević, A.D. (2019). Enzimaska sinteza estara flavonoida i kontrolisano otpuštanje iz kozmetičkih formulacija. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.
133. Plaza, M., Pozzo, T., Liu, J., Gulshan Ara, K.Z., Turner, C., Nordberg Karlsson E. (2014). Substituent effects on in vitro antioxidizing properties, stability, and solubility in flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 3321-3333.
134. Vinčić, M. (2017). Antioksidativna, antiproliferativna i antimikrobna aktivnost odabranih ekstrakata tropova bobičastog voća. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
135. Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231-1246.
136. Fraga, C.G., Litterio, M.C., Prince, P.D., Calabró, V., Piotrkowski, B., Galleano, M. (2010). Cocoa flavanols: effects on vascular nitric oxide and blood pressure. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 48, 63-67.
137. Radovanović, A.N. (2014). Karakterizacija i korelacija bioaktivnih fenolnih jedinjenja crvenih vina Balkana i njihova antioksidaciona i antimikrobna svojstva. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet, Beograd.
138. Gris, E.F., Mattivi, F., Ferreira, E.A., Vrhovsek, U., Pedrosa, R.C., Bordignon-Luiz, M.T. (2011). Proanthocyanidin profile and antioxidant capacity of Brazilian *Vitis vinifera* red wines. *Food Chem.*, 126, 213-220.
139. Vivas, N., Glories, Y. (1996). Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during aging. *Am. J. Enol. Vitic.*, 47, 103-107.
140. Camont, L., Cottart, C.-H., Rhaeym, Y., Nivet-Antoine, V., Djelidi, R., Collin, F., Beaudoux J.-L., Bonnefont-Rousselot, D. (2009). Simple spectrophotometric assessment of the trans/cis-resveratrol ratio in aqueous solutions. *Anal. Chim. Acta*, 634, 121-128.
141. Radojković, M. (2012). Ekstrakti duda (*Morus* spp., *Moraceae*), sastav, delovanje i primena. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
142. Vidović, S. (2011). Ekstrakcija, sastav, delovanje i mogude primene odabranih vrsta pečuraka. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
143. Sathishkumar, T., Baskar, R., Shanmugam, S., Rajasekaran, P., Sadasivam, S., Manikandan, V. (2008). Optimization of flavonoids extraction from the leaves of *Tabernaemontana heyneana* Wall. using L16 Orthogonal design. *J. Nat. Sci.*, 6, 10-21.
144. Pregiban, K. (2017). Metode mjerenja antioksidativne aktivnosti. Završni rad. Sveučilište J.J.

Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Osijek.

145. Stanojević, Lj.P., Zdravković, A.S., Stanković, M.Z., Cakić, M.D., Nikolić, V.D., Ilić, D.P. (2013). Antioksidativna aktivnost vodenno-etanolnih ekstrakata iz lista koprive (*Urtica dioica* L.). *Savremene tehnologije*, 2, 51-59.
146. Ahn, H.-J., Kim, J.-H., Jo, C., Kim, M.-J., Byun, M.-W. (2004). Comparison of irradiated phytic acid and other antioxidants for antioxidant activity. *Food Chem.*, 88, 173-178.
147. Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Technol. Int.*, 8, 121-137.
148. Patel, M.R. Patel, J.N. (2011). In vitro antioxidant activity of coumarin compounds by DPPH, Super oxide and nitric oxide free radical scavenging methods. *J. Adv. Pharm. Educ. Res.*, 1, 52-68
149. Stanojević, Lj., Stanković, M., Nikolić, V., Nikolić, Lj., Ristić, D., Čanadanovic-Brunet, J., Tumbas, V. (2009). Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of *Hieracium pilosella* L. extracts. *Sensors*, 9, 5702-5714.
150. Manisha, P., Kanchan, S., Jovita, K., Koshy, M. K., Saraf Shubhini, A. (2009). *Sida Veronicaefolia* as a source of natural antioxidant. *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.*, 1, 180-182.
151. Magalhaes, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal. Chim. Acta*, 613, 1-19
152. Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (frap) as a measure of "Antioxidant power": The frap assay. *Anal. Biochem.*, 239, 70-76.
153. Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3122-3128.
154. Ristivojević, P.M. (2014). Određivanje hemijskog sastava antioksidativnih i antimikrobnih svojstava propolisa topola tipa iz različitih regiona Srbije. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet, Beograd.
155. Stanković, D.M. (2012). Primena metil-3,5-bis[(di(2-pikolil)amino)metil]benzoata za modifikaciju elektrode od staklastog ugljenika. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet, Beograd.
156. Lugonja, N.M. (2014). Ispitivanje antioksidativnog potencijala hrane za bebe. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet, Beograd.
157. Bard, A.J., Faulkner, L.R. (2001). *Electrochemical Methods*, 2nd ed. John Wiley and Sons, Inc., New York, 137-155.
158. Kilmartin, P.A., Hsu, C.F. (2003). Characterisation of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry. *Food Chem.*, 82, 501-512.
159. Kilmartin, P.A., Zou, H., Waterhouse, A.L. (2001). A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1957-1965.
160. Kilmartin, P.A., Zou, H., Waterhouse, A.L. (2002). Correlation of wine phenolic composition versus cyclic voltammetry response. *Am. J. Enol. Vitic.*, 53, 294-203.
161. Zou, H., Kilmartin, P.A., Inglis, M., Frost, A. (2002). Extraction of phenolic compounds during vinification of Pinot Noir wine examined by HPLC and cyclic voltammetry. *Aust. J. Grape Wine R.*, 8, 163-174.
162. Milošević, A.Z. (2019). HPLC analiza ekstrakata ruzmarina. Validacija metode. Master rad. Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Niš.
163. Ristic, M. (2019). Hromatografija i separacione metode. Skripta. Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd.
164. Velimirović, D. (2013). Optimizacija, validacija i primena ICP-OES metoda određivanja sadržaja metala u realnim uzorcima. Doktorska disertacija. Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Niš.
165. Mladenović, M. (2015). ICP-OES određivanje sadržaja teških metala u četinama smreke. Master

- rad. Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Niš.
166. Mrmošanin, J.M. (2019). Analiza katehina, procijanidina, makro i mikroelemenata u crnoj, mlečnoj, i beloj čokoladi i kakaou u prahu i njihov antioksidativni potencijal. Doktorska disertacija. Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Niš.
167. Council of Europe. (2016). European Pharmacopeia, 9th ed. Council of Europe, Strasbourg, France.
168. Kalinović, J.V. (2019). Mogućnosti korišćenja šipurka, gloga i trnjine u biomonitoringu i fitoremedijaciji. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Tehnički fakultet u Boru, Bor.
169. Christou, A., Theologides, C.P., Costa, C., Kalavrouziotis, I.K., Varnavas, S.P. (2017). Assessment of toxic heavy metals concentrations in soils and wild and cultivated plant species in Limni abandoned copper mining site, Cyprus. *J. Geochem. Explor.*, 178, 16-22.
170. Mendoza, R.E., García, I.V., de Cabo, L., Weigandt, C.F., de Iorio, A.F. (2015). The interaction of heavy metals and nutrients present in soil and native plants with arbuscular mycorrhizae on the riverside in the Matanza-Riachuelo River Basin (Argentina). *Sci. Total Environ.*, 505, 555-564.
171. Nouri, J., Lorestani, B., Yousefi, N., Khorasani, N., Hasani, A.H., Seif, F., Cheraghi, M. (2011). Phytoremediation potential of native plants grown in the vicinity of Ahangan lead-zinc mine (Hamedan, Iran). *Environ. Earth Sci.*, 62, 639- 644.
172. Radojević A.A. (2017). Biomonitoring vazduha i fitoremedijacija zemljišta upotrebom hrasta, smreke i lešnika. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Tehnički fakultet u Boru, Bor.
173. Marbaniang, D., Chaturvedi, S.S. (2014). Assessment on Cr, Cd, As, Ni and Pb uptake and phyremediation potential of *Scirpus mucronatus*. *Int. J. Sci. Res. Manag.*, 2, 965-969.
174. Yildirim, D., Sasmaz, A. (2017). Phytoremediation of As, Ag, and Pb in contaminated soils using terrestrial plants grown on Gumuskoy mining area (Kutahya Turkey). *J. Geochem. Explor.*, 182, 228–234.
175. Shiyab, S. (2018). Phytoaccumulation of copper from irrigation water and its effect on the internal structure of lettuce. *Agriculture*, 8, 1-13.
176. European Economic Community-EEC. (2008). Commission Directive 2008/100/EC. Amending Council Directive 90/496/EEC on nutrition labelling for food stuffs as regards recommended daily allowances, energy conversion factors and definitions. *Off. J. Eur. Commun.*, L285, 9-12.
177. European Food Safety Authority-EFSA. (2012) Guidance on selected default values to be used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the absence of actual measured data. *EFSA J.*, 10, 2579.
178. Žugić, A.R. (2016). Ekstrakt talusa *Usnea barbata* (L.) Weber ex F. H. Wigg., Parmeliaceae u emulzionim nosačima stabilizovanim biorazgradivim emulgatorima: Preformulaciona i formulaciona istraživanja. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Beograd.
179. Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4113–4117.
180. Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199–1200.
181. Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1999). Ferric reducing antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.*, 299, 15–27.
182. Li, J., Lu, Y., Shim, H., Deng, X., Lian, J., Jia, Z., Li, J. (2010). Use of the BCR sequential extraction procedure for the study of metal availability to plants. *J. Environ. Monitor.*, 12, 466-471.
183. Bakircioglu, D., Kurtulus, Y.B., Ibar, H. (2011). Investigation of trace elements in agricultural soils by BCR sequential extraction method and its transfer to wheat plants. *Environ. Monit. Assess.*, 175, 303-314.
184. Grubin, J.B. (2016). Sezonske promene u sadržaju toksičnih metala u zemljištu i listovima zimzelenih vrsta *Prunus laurocerasus* L., *Buxus sempervirens* L. i *Mahonia aquifolium* (Purch) Nutt. na području grada Beograda. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Biološki

- fakultet, Beograd.
185. Horak, O., Kinzel, H. (1971). Typen des Mineralstoffwechsels bei den höheren Pflanzen. *Österreichische botanische Zeitschrift.*, 119, 475-495.
186. Pilbeam D.J., Morley P.S. (2007). Calcium. In: Handbook of plant nutrition. Barker, A.V., Pilbeam, D.J., Eds. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, 121-140.
187. Morrissey, J., Guerinot, M. L. (2009). Iron uptake and transport in plants: The good, the bad, and the ionome. *Chem. Rev.*, 109, 4553-4567.
188. Grime, J.P., Hodgson J.G. (1969). An investigation of the ecological significance of lime-chlorosis by means of large-scale comparative experiments. In: Ecological aspects of the mineral nutrition of plants. Rorison, I.H., Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 67-100.
189. Merhaut, D.J. (2007). Magnesium. In: Handbook of plant nutrition. Barker, A.V., Pilbeam, D.J., Eds. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, 146-172.
190. Jelić, M., Šekularac, G., Đekić, V., Dugalić, G., Paunović, A., Madić, M., Đalović, I. (2017). Sadržaj i mobilnost gvožđa u kiselim zemljištima centralne Srbije. *Zbornik radova XXII Savetovanja o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem*, Knjiga 1, 11-16.
191. Milivojević, J. (2003). Sadržaj i mobilnost mikroelemenata (Fe, Mn i Zn) u smonicama Srbije. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
192. Pavlović, J.M. (2017). Uloga silicijuma u prevazilaženju nedostatka gvožđa kod krastavca (*Cucumis sativus* L.). Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd.
193. Jerinić, S., Stojković-Jevtić, S., Janković, V. (2015). Promene agrohemijskih osobina pseudoglejnog zemljišta nakon izvedene kalcizacije. *Zbornik radova XX Savetovanja o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem*, 20, 45-50.
194. Kastori, R., Ilin, Ž., Maksimović, I., Putnik-Delić M. (2013). Kalijum u ishrani biljaka. Kalijum i povrće. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
195. Papludis, A.D., Alagić, S.Č., Milić, S.M. (2018). Mangan u sistemu zemljište-biljka: aspekti fitoremedijacije. *Zastita Materijala*, 59, 385–393.
196. Millaleo, R., Reyes-Díaz, M., Ivanov, A.G., Mora, M.L., Alberdi, M. (2010). Manganese as essential and toxic element for plants: Transport, accumulation and resistance mechanisms. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, 10, 476–494.
197. Bradl, H.B. (2004). Adsorption of heavy metal ions on soils and soils constituents. *J. Colloid. Interface Sci.*, 277, 1–18.
198. Peralta-Videa, J.R., Lopez, M.L., Narayan, M., Saupe, G., Gardea-Torresdey, J. (2009). The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 41, 1665–1677.
199. RS Pravilnik. (1994). Pravilnik o dozvoljenim količinama opasnih i štetnih materija u zemljištu i vodi za navodnjavanje i metodama njihovog ispitivanja. "Sl. glasniku RS", br. 23/94. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede u sporazumu sa Ministarstvom zaštite životne sredine Republike Srbije, Beograd.
200. Bogdanović, D. (2007). Izvori zagađenja zemljišta hromom. *Letopis naučnih radova Poljoprivrednog fakulteta*, 31, 29–35.
201. Grozdić, G. (2015). Određivanje sadržaja metala u biljnim vrstama *Seseli rigidum* i *Seseli pallasii*. Master rad. Univerzitetu Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Niš.
202. Jain, C.K. (2004). Metal fractionation study on bed sediments of River Yamuna, India. *Water Res.*, 38, 569–578.
203. Marić, M.J. (2014). Mogućnosti korišćenja nekih divljih i kultivisanih biljaka za remedijaciju zemljišta. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Tehnički fakultet u Boru, Bor.
204. Adriano, D.C. (2001). Trace elements in terrestrial environments. Biogeochemistry, bioavailability and risks of metals, 2nd ed. Springer-Verlag, New York
205. Adhikari, T., Singh, M.V. (2003). Sorption characteristics of lead and cadmium in some soils of India. *Geoderma*, 114, 81–92.
206. Mandal, B.K., Suzuki, K.T. (2002). Arsenic round the world: A review. *Talanta*, 58, 201-235.
207. Bogdanović, D. (2002). Izvori zagađenja zemljišta kadmijumom. *Letopis naučnih radova*

- Poljoprivrednog fakulteta, 26, 32-42.
208. Mengel, K. (2007). Potassium. In: Handbook of plant nutrition. Barker, A.V., Pilbeam, D.J., Eds. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, 91-116.
209. Sarić, M.R. (1983). Fiziologija biljaka, 4. izdanje. Naučna knjiga, Beograd.
210. Liu, K., Luan, S. (2001). Internal aluminum block of plant inward K<sup>+</sup> channels. *Plant Cell*, 13, 1453-1466.
211. Castillo-González, J., Ojeda-Barrios, D., Hernández-Rodríguez, A., González-Franco, A.C., Robles-Hernández, L., López-Ochoa, G.R. (2018). Zinc Metalloenzymes in Plants. *Interciencia*, 43, 242–248.
212. Kopsell, D.E., Kopsell, D.A. (2007). Copper. In: Handbook of plant nutrition. Barker, A.V., Pilbeam, D.J., Eds. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, 121-140.
213. Chizzola, R. (2012). Metallic mineral elements and heavy metals in medicinal plants. *Med. Aromat. Plant. Sci. Biotechnol.*, 6, 39-53.
214. Ozgen, S., Busse, J.S., Palta, J.P. (2011). Influence of root zone calcium on shoot tip necrosis and apical dominance of potato shoot: Simulation of this disorder by ethylene glycol tetra acetic acid and prevention by strontium. *HortScience*, 46, 1358-1362.
215. Jevtić, M. (2018). ICP-OES određivanje sadržaja teških metala u uzorcima lista biljne vrste *Bellis perennis* L. (Asteraceae). Master rad. Univerzitet u Nišu, Prirodno- matematički fakultet, Departman za hemiju, Niš.
216. Brown, P.H. (2007). Nickel. In: Handbook of plant nutrition. Barker, A.V., Pilbeam, D.J., Eds. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, 395-406.
217. Mickovski Stefanović, V.Ž. (2012). Uticaj genotipa i lokaliteta na dinamiku akumulacije teških metala u vegetativnim organima pšenice. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
218. Li, H.-F., Gray, C., Mico, C., Zhao, F.-J., McGrath, S.P. (2009). Phytotoxicity and bioavailability of cobalt to plants in a range of soils. *Chemosphere*, 75, 979–986.
219. Reimann, C., Koller, F., Frengstad, B., Kashulina, G., Niskavaara, H., Englmaier, P. (2001). Comparison of the element composition in several plant species and their substrate from a 1 500 000 km<sup>2</sup> area in Northern Europe. *Sci. Total Environ.*, 278, 87-112.
220. Jelkmann, W. (2012). The disparate roles of cobalt in erythropoiesis, and doping relevance. *Open Hematol. J.*, 3, 3-6.
221. Leyssens, L., Vinck, B., Van Der Straeten. C., Wuyts, F., Maes, L. (2017). Cobalt toxicity in humans. A review of the potential sources and systemic health effects. *Toxicology*, 387, 43-56.
222. Gallaher, R.N., Gallaher, K., Marshall, A.J., Marshall, A.C. (2006). Mineral analysis of ten types of commercially available teas. *J. Food Compos. Anal.*, 19, 53-57.
223. Kozanecka, T., Chojnicki, J., Kwasowski, W. (2002). Content of heavy metals in plant from pollution –free regions. *Pol. J. Environ. Stud.*, 11, 395-399.
224. Parzych, A. (2014). The heavy metal content of soil and shoots of *Vaccinium myrtillus* L. in the Słowiński national park. *Forest Res. Pap.*, 75, 217–224.
225. Kandziora-Ciupa, M., Ciepał, R., Nadgórska-Socha, A., Barczyk, G. (2013). A comparative study of heavy metal accumulation and antioxidant responses in *Vaccinium myrtillus* L. leaves in polluted and non-polluted areas. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 20, 4920–4932.
226. Skesters, A., Kleiner, D., Blazovics, A., May, Z., Kurucz, D., Silova, A., Szentmihályi, K. (2014). Mineral element content and antioxidant capacity of some Latvian berries. *Eur. Chem. Bull.*, 3, 98-101.
227. Demczuk, M., Garbiec, K. (2009). Heavy metals in edible fruits. A case study of bilberry *Vaccinium myrtillus* L. *Environ. Prot. Nat. Resour.*, 40, 307–312.
228. Patel, P., Patel, N.M., Patel, P.M. (2011). WHO guidelines on quality control of herbal medicines. *Int. J. Res. Ayurveda. Phar.*, 2, 1148-1154.
229. European Food Safety Authority-EFSA. (2012). Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA J.*, 10, 2551.

230. European Food Safety Authority-EFSA. (2010). Scientific opinion on lead in food. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). EFSA J., 8, 1570.
231. European Food Safety Authority-EFSA. (2014). Dietary exposure to inorganic arsenic in the European population. European Food Safety Authority. EFSA J., 12, 3597.
232. European Food Safety Authority-EFSA. (2015). Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of nickel in food and drinking water. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). EFSA J., 13, 4002.
233. Kravchenko, J., Darrah, T.H., Miller, R.K., Lyerly, H.K., Vengosh, A. (2014). A review of the health impacts of barium from natural and anthropogenic exposure. Environ. Geochem. Health, 36,797–814.
234. Szymczycha-Madeja, A., Welna, M., Pohl, P. (2012). Elemental analysis of teas and their infusions by spectrometric methods. Trends Analyt. Chem., 35, 165-181.
235. Bisset, N.G., Wichtl, M. (2001). Herbal drugs and phytopharmaceuticals. Handbook for practice on a scientific basis, 2nd ed. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, Germany.
236. Milutinović, M.D., Šiler-Marinković, S.S., Antonović, D.G., Mihajlovski, K.R., Pavlović, M.D., Dimitrijević-Branković, S.I. (2013). Antioksidativna svojstva sušenih ekstrakata iz otpadne espreso kafe. Hem. Ind., 67, 261-267
237. Vučić, D.M., Petković, M.R., Rodić-Grabovac, B.B., Stefanović, O.D., Vasić, S.M., Čomić, L.R. (2013). Antibacterial and antioxidant activities of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in vitro. Afr. J. Microbiol. Res., 7, 5130–5136.
238. Roslon, W., Osinska, E., Pioro-Jabrucka, E., Grabowska, A. (2011). Morphological and chemical variability of wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). Pol. J. Environ. Stud., 20, 237–243.
239. Vinayagam, R., Jayachandran, M., Xu, B. (2016). Antidiabetic effects of simple phenolic acids: A comprehensive review. Phytother. Res., 30, 184–199.
240. Vinayagam, R., Xu, B. (2015). Antidiabetic properties of dietary flavonoids: A cellular mechanism review. Nutr. Metab., 12, 60.
241. Upton R. (2001). Bilberry fruit *Vaccinium myrtillus* L. Standards of analysis, quality control and therapeutics. American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium, Santa Cruz, California.
242. Vrhovac, I., Breljak, D., Saboljić, I. (2014). Glucose transporters in the mammalian blood cells. Period. Biol., 116, 131–138.
243. Stojiljković, M.D. (2014). Efekat eksperimentalnog dijabetesa tipa 1 i supstitucione terapije na molekule regulisane insulinom u srcu pacova. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd.
244. Ebeling, P., Koistinen, H.A., Koivisto, V.A. (1998). Insulin-independent glucose transport regulates insulin sensitivity. FEBS Lett., 436, 301-303.
245. Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Azizi, F. (2013). Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: A review. J. Diabetes Metab. Disord., 12, 43.
246. Hokkanen, J., Mattila, S., Jaakola, L., Pirttilä, A.M., Tolonen, A. (2009). Identification of phenolic compounds from lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.), bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and hybrid bilberry (*Vaccinium x intermedium* Ruthe L.) leaves. J. Agric. Food Chem., 57, 9437–9447.
247. Piparo, E.L., Scheib, H., Frei, N., Williamson, G., Grigorov, M., Chou, C.J. (2008). Flavonoids for controlling starch digestion: Structural requirements for inhibiting human  $\alpha$ -amylase. J. Med. Chem., 51, 3555–3561.
248. Kavarić, S.J. (2018). Značaj određivanja vitamina D u pacijenata sa dijabetes melitusom tipa 2. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd.
249. Ojuka, E.O. (2004). Role of calcium and AMP kinase in the regulation of mitochondrial biogenesis and GLUT4 levels in muscle. Proc. Nutr. Soc., 63, 275-278.
250. Wright, D.C., Hucker, K.A., Holloszy, J.O., Han, D.H. (2004).  $Ca^{++}$  and AMPK both mediate stimulation of glucose transport by muscle contractions. Diabetes, 53: 330-335.



251. Tasić, N., Radak, Dj., Cvetković, Z., Petrović, B., Ilijevski, N., Djordjević-Debić, G. (2004). Uloga i značaj oligoelemenata u patogenezi arteroskleroze. *Vojnosanit. Pregl.*, 61, 667-673.
252. Ganz, T., Nemeth, E. (2006). Iron imports. IV. Hcpidin and regulation of body iron metabolism. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, 290, G199–G203.
253. Vidović, B.B. (2014). Uticaj suplementacije alfa-liponskom kiselinom na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod obolelih od shizofrenije. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Beograd.
254. Stanojević-Ristić, Z., Rašić, J., Stević, S., Valjarević, D., Stanić, M. (2017). Uticaj različitih doza cink glukonata na antioksidativnu aktivnost metformina i glibenklamida kod eksperimentalno izazvanog dijabetesa kunića. *Praxis Medica*, 46, 23-29.
255. Pantelić, M.M. (2018). Uticaj peroralne aplikacije hroma na endokrini i metabolički status krava holštajn rase. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd.
256. Jovanović, J. (2012). Praćenje efekata hronične intoksikacije teškim metalima (Cd, Pb, Cu) i protektivne uloge suplemenata S-donor liganada preko aktivnosti endonukleaza i sekundarnog produkta lipidne peroksidacije. Doktorska disertacija. Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Niš.
257. Jovanović, D.D. (2013). Povezanost koncentracije arsena u vodi za piće sa pojavom dijabetesa tip 2. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd.
258. Lugonja, N.M., Stankovic, D.M., Milicic, B., Spasic, S.D., Marinkovic, V., Vrvic, M.M. (2018). Electrochemical monitoring of the breast milk quality. *Food Chem.*, 240, 567–572.
259. Puangjan, A., Chaiyasith, S. (2016). An efficient ZrO<sub>2</sub>/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/reduced graphene oxide nanocomposite electrochemical sensor for simultaneous determination of gallic acid, caffeic acid and protocatechuic acid natural antioxidants. *Electrochim. Acta*, 211, 273–288.
260. Zugic, A., Djorđević, S., Arsic, I., Markovic, G., Zivkovic, J., Jovanovic, S., Tadic, V. (2014). Antioxidant activity and phenolic compounds in 10 selected herbs from Vrujci Spa, Serbia. *Ind. Crops Prod.*, 52, 519–527.
261. Rodrigues, E., Poerner, N., Rockenbach, I.I., Gonzaga, L.V., Mendes, C.R., Fett, R. (2011). Phenolic compounds and antioxidant activity of blueberry cultivars grown in Brazil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 31, 911–917.
262. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.*, 99, 191–203.
263. Wojdyło, A., Oszmianski, J., Czemerys, R. (2017). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.*, 105, 940–949.
264. Chew, K.K., Ng, S.Y., Thoo, Y.Y., Khoo, M.Z., Wan Aida, W.M., Ho, C.W. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts. *Int. Food Res. J.*, 18, 571–578.
265. Lianda, R.L.P., Sant´Ana, L.D.O., Echevarria, A., Castro, R.N. (2012). Antioxidant activity and phenolic composition of Brazilian honeys and their extracts. *J. Braz. Chem. Soc.*, 23, 618–627.
266. Gerszon, J., Rodacka, A., Puchala, M. (2015). Antioxidant properties of resveratrol and its protective effects in neurodegenerative diseases. *Adv. Cell Biol.*, 4, 97–117.
267. Kolečkar, V., Kubikova, K., Rehakova, Z., Kuca, K., Jun, D., Jahodar, L., Opletal, L. (2008). Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health. *Mini Rev. Med. Chem.*, 8, 436–447.
268. Nestorović Živković, J.M. (2013). Antioksidativno, antimikrobno i alelopatsko dejstvo tri endemične vrste roda *Nepeta* (*Lamiaceae*). Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd.
269. Tasić, M. (2017). Ispitivanje fenolnog sastava I antioksidativne aktivnosti ekstrakata biljne vrste *Forsythia Europaea*. Master rad. Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Niš.



270. Espinoza, M., Olea-Azar, C., Speisky, H., Rodríguez, J. (2009). Determination of reactions between free radicals and selected Chilean wines and transition metals by ESR and UV-vis technique. *Spectrochim. Acta A*, 71, 1638-1643.

## BIOGRAFIJA

Snežana Brašanac rođena je 28.10.1985.godine u Podgorici, Crna Gora. Osnovnu i srednju školu završila je u Podgorici, sa odličnim uspjehom. Osnovne studije na Metalurško-tehnološkom fakultetu u Podgorici upisala je 2004/05. godine i završila ih u predviđenom roku 2007. godine, i tako stekla zvanje Bachelor (BSc) inženjer hemijske tehnologije. Magistarske studije na Metalurško-tehnološkom fakultetu u Podgorici (ekološko usmjerenje) upisala je 2007. godine i završila ih sa prosječnom ocjenom 9.78. Magistarski rad pod nazivom "Ispitivanje mogućnosti korišćenja crvenog mulja kao adsorbensa za uklanjanje arsena iz vodenih rastvora" odbranila je u julu 2009. godine i tako stekla akademsko zvanje Magistar (MSc) hemijske tehnologije. Doktorske studije upisala je 2014/2015. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Radni odnos na Metalurško-tehnološkom fakultetu u Podgorici zasnovala je u decembru 2009. godine kao saradnik na određeno vrijeme. Od 2011. godine, kao saradnik u nastavi na Metalurško-tehnološkom fakultetu, izvodila je vježbe na studijskom programu Hemijska tehnologija iz sledećih predmeta: Analitička hemija I i Instrumentalne metode hemijske analize; na studijskom programu Zaštita životne sredine iz Instrumentalnih metoda i na Farmaceutskom fakultetu iz predmeta Instrumentalne metode. 2014. godine izabrana je u zvanje stručnog saradnika na Metalurško-tehnološkom fakultetu (studijski programi Hemijska tehnologija, Metalurgija i Zaštita životne sredine) i Medicinskom fakultetu (studijski program Farmacija), za sledeće predmete: Analitička hemija I, Analitička hemija II, Instrumentalne metode hemijske analize, Ispitivanje zagađivača u životnoj sredini, Karakterizacija materijala i Instrumentalne metode.

## BIBLIOGRAFIJA

Radovi objavljeni u vrhunskim časopisima međunarodnog značaja (M 21):

1. **Snezana Brasanac-Vukanovic**, Jelena Mutic, Dalibor M. Stankovic, Ivana Arsic, Nada Blagojevic, Vesna Vukasinovic-Pesic and Vanja M. Tadic, Wild Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) from Montenegro as a Source of Antioxidants for Use in the Production of Nutraceuticals, *Molecules* 2018, 23(8), 1864; (IF 2016 =2.861)  
<https://doi.org/10.3390/molecules23081864>

Radovi objavljeni u časopisima međunarodnog značaja (M 23):

1. **Snežana Brašanac Vukanović**, Vanja M. Tadić, Nada Blagojević, Vesna Vukašinović Pešić, Slađana Đurđić, Milica Stanković and Jelena Mutić.(2019) “Element accumulation capacity of *Vaccinium myrtillus* from Montenegro: Comparison of element contents in water and ethanol extracts of bilberry plant parts”, *Archives of Biological Sciences* 2019 On Line-First (00):56-56  
<https://doi.org/10.2298/ABS181004056B>

Radovi saopšteni na međunarodnim i nacionalnim skupovima štampani u izvodu:

1. **Snezana Brasanac Vukanovic**, Jelena Mutic, Ivana Arsic, Nada Blagojevic, Vesna Vukasinovic-Pesic, Vanja M. Tadic, IDENTIFICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN *Vaccinium myrtillus* L. XII international Conference of Chemists, Technologists and Ecologists of the Republic of Srpska, Teslic, Bosna i Hercegovina, (2018)

2. **Snezana Brasanac Vukanovic**, Jelena Mutic, Ivana Arsic, Nada Blagojevic, Vesna Vukasinovic-Pesic, Vanja M. Tadic TOTAL PHENOLIC, FLAVONOIDS AND TANNINS CONTENTS IN DIFFERENT EXTRACTS OF *Vaccinium myrtillus* L. XII international Conference of Chemists, Technologists and Ecologists of the Republic of Srpska, Teslic, Bosna i Hercegovina, (2018)

3. **Snezana Brasanac Vukanovic**, Vanja M. Tadic, Ivana Arsic, Nada Blagojevic, Vesna Vukasinovic-Pesic, Jelena Mutic, Metals content in different extracts of *Vaccinium myrtillus* L., 25th Congress of the society of chemists and technologists of Macedonia (with international participation), Ohrid, R. Macedonia,61 (2018)

4. **Snezana Brasanac Vukanovic**, Jelena Mutic, Dalibor M. Stankovic, Ivana Arsic, Nada Blagojevic, Vesna Vukasinovic-Pesic, Vanja M. Tadic, The antioxidant potential of different extracts of *Vaccinium myrtillus* L. 25th Congress of the society of chemists and technologists of Macedonia (with international participation), Ohrid, R. Macedonia,62 (2018)

5. **Snežana Vukanović**, Jelena Mutić, Vanja Tadić, Nada Blagojević, Vesna Vukašinović Pešić, Slađana Đurđić, Vesna Vukojević, Content of major and trace elements in *Vaccinium myrtillus* and their extracts, XXIVth Congress of the society of chemists and technologists of Macedonia (with international participation), Ohrid, R. Macedonia,73 (2016)

образац изјаве о ауторству

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Снежана Брашанац  
Број индекса 21/2014

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Одређивање антиоксидативне моћи и капацитета усвајања метала дивље боровнице (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) на подручју Црне Горе

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

**Потпис аутора**

У Београду, 11-11- 2022

Snežana Brašanac

образац изјаве о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Снежана Брашанац

Број индекса 21/2014

Студијски програм доктор хемијских наука

Наслов рада Одређивање антиоксидативне моћи и капацитета усвајања метала дивље боровнице (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) на подручју Црне Горе

Ментор др Јелена Мутић, др Вања Тадић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада. Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 11-III-2022

Snežana Brašanac

образац изјаве о коришћењу

### Изјава о коришћењу

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

Одређивање антиоксидативне моћи и капацитета усвајања метала дивље боровнице (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) на подручју Црне Горе

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

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

1. Ауторство (CC BY)
  2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
  3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
  4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
  5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
  6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)
- (Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 11-III-2022

Snežana Brašanac