



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

Vera Krimer Malešević, dipl.inž.

Fenolni potencijal uljanih pogača

-Doktorska disertacija-

Mentor:

Dr Ljiljana Popović, docent

Novi Sad, 2016.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Vera Krimer Malešević, dipl. inž.
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Ljiljana Popović, docent
Naslov rada: NR	Fenolni potencijal uljanih pogača
Jezik publikacije: JP	Srpski, latinica
Jezik izvoda: JI	Srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija
Fizički opis rada: FO	6 poglavlja, 135 stranica, 25 slike, 26 tabela, , 285 referenci
Naučna oblast: NO	Hemijsko-tehnološke nauke
Naučna disciplina: ND	Biohemija, Biohemija hrane
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Fenolne kiseline, uljane pogače, nusproizvodi, valorizacija
UDK	
Čuva se: ČU	U biblioteci Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bul. cara Lazara 1, 21000 Novi Sad

Važna napomena: VN	nema
Izvod: IZ	<p>U okviru disertacije ispitana je mogućnost eksploatacije nusproizvoda (nastalih tokom procesa hladnog presovanja ulja) kao izvora prirodnih fenolnih kiselina. Odabir je obuhvatio uzorke uljane tikve, crnog kima, lana i nara. Radi oslobađanja vezanih fenolnih kiselina i u cilju procene njihovog ukupnog sadržaja i distribucije (u čvrstim uzorcima), primenjena je alkalna hidroliza sa dodatkom L-askorbinske kiseline i EDTA. Dobijeni rezultati pokazuju da se sve analizirane pogače mogu se koristiti za dobijanje vrednih fenolnih kiselina, pri čemu raspodela fenolnih kiselina zavisi od vrste uljane pogače. Koncentracija slobodnih fenolnih kiselina se pokazala značajnom za pogaču uljane tikve, estarski vezanih za pogače nara i lana, a nerastvornih-vezanih za pogače crnog kima i nara. Od svih analiziranih uzoraka kora nara je sadržala najviše estarski vezanih fenolnih kiselina zahvaljujući veoma visokom sadržaju galne kiseline. Nakon određivanja fenolnih kiselina u nusproizvodima, analiza glavnih komponenti (PCA) je omogućila razdvajanje biljnih uzoraka u grupe prema poreklu i smanjila broj fenolnih kiselina neophodnih za njihovu karakterizaciju, što može imati potencijalnu primenu u skriningu fenolnih kiselina i određivanju kvaliteta/autentičnosti uljarica i njihovih nusproizvoda.</p>
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	23.11.2012.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>dr Vesna Tumbas Šaponjac, docent, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, predsednik</p> <p>dr Ljiljana Popović, docent, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, mentor</p> <p>dr Nebojša Ilić, viši naučni savetnik, Naučni institut za prehrambene tehnologije - FINS, Novi Sad, član</p>

University of Novi Sad

Faculty of Technology

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monographic publication
Type of record: TR	Textual material, printed
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Vera Krimer Malešević
Mentor: MN	Ljiljana Popović, PhD, assistant professor
Title: TI	Polyphenol potential of oil cakes
Language of text: LT	Serbian, latin
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2016
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Serbia, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Physical description: PD	6 chapters, 135 pages, 25 figures, 26 tables, 285 references
Scientific field SF	Applied and Engineering Chemistry
Scientific discipline SD	Biochemistry, Food biochemistry

Subject, Key words SKW	Phenolic acids, oil cake, by-products, valorization
UC	
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology, Novi Sad
Note: N	
Abstract: AB	<p>Within the thesis, the possibility of by-products (formed during the process of cold oil pressing) exploitation as a source of natural phenolic acids was examined. Selection of the samples included pumpkin, black cumin, flax and pomegranate. For the purpose of bonded phenolic acids release and for the total phenolic acids content and distribution (in the solid samples) assessment, the alkaline hydrolysis with the addition of L-ascorbic acid and EDTA was employed. The results show that all analyzed cakes can be used to obtain valuable phenolic acids, while the distribution of phenolic acids depends on the type of oil cakes. The concentration of free phenolic acids proved to be significant for a pumpkin oil cake, ester for pomegranate and flax oil cakes, and insoluble-bound for black cumin and pomegranate oil cakes. Of all analyzed samples, pomegranate hull contains the highest content of ester-linked phenolic acids, due to a very high content of gallic acid. After phenolic acids determination in the by-products, principal components analysis (PCA) allowed the separation of plant samples in groups according to origin and reduced the number of phenolic acids necessary for their characterization, which may have potential application in the screening of phenolic acids and determining the quality/authenticity oilseeds and their by-products.</p>
Accepted on Scientific Board on: AS	23.11.2012.
Defended: DE	

Thesis Defend Board: DB	<p>Vesna Tumbas Šaponjac, PhD, assistant professor, University of Novi Sad, Faculty of Technology, president</p> <p>Ljiljana Popović, PhD, assistant professor, University of Novi Sad, Faculty of Technology, mentor</p> <p>Nebojša Ilić, PhD, Senior Research Associate, Institute of Food Technology - FINS, Novi Sad, member</p>
----------------------------	--

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru dr Ljiljani Popović na brojnim savetima, stručnoj i organizacionoj pomoći i strpljenju tokom izrade ove disertacije.

Iskreno se zahvaljujem dr Vesni Tumbas Šaponjac i dr Nebojši Iliću na kritičkom čitanju disertacije i dragocenim savetima i sugestijama.

Ovom prilikom želim da izrazim duboku zahvalnost Prof. dr Draginji Peričin koja mi je od početka pa do samog kraja mnogo pomogla svojim ogromnim znanjem i iskustvom, kritičkim, ali dobronamernim sugestijama, usmeravanjem i ohrabrenjem.

Posebno se zahvaljujem svojim bivšim kolegama iz Zavoda za javno zdravlje Subotica na pruženoj pomoći u toku eksperimentalnog rada.

Koristim ovu priliku da se najsrdačnije zahvalim instituciji u kojoj sam zaposlena – Ministarstvu poljoprivrede i zaštite životne sredine, Direkciji za nacionalne referentne laboratorije, na materijalnoj podršci.

Svojim roditeljima se zahvaljujem na ljubavi i bezrezervnoj podršci svake vrste. Veru da u životu mogu sve da postignem i želju da postanem najbolja verzija sebe ste mi vi ugradili.

Svojoj sestri Sanji zahvaljujem na podršci u najtežim trenucima.

Suprugu Savi zahvaljujem na strpljenju, a sinu Stefanu na ljubavi, motivaciji i sreći koju mi pruža.

Sadržaj:

1. UVOD	1
1.1. Cilj disertacije	2
2. OPŠTI DEO	3
2.1. Polifenolna jedinjenja	3
2.1.1. Biosintetsko poreklo i klasifikacija polifenola	4
2.2. Fenolne kiseline	7
2.2.1. Klasifikacija fenolnih kiselina	7
2.2.2. Antioksidantno dejstvo i ostali efekti fenolnih kiselina	9
2.2.3. Značaj i primena fenolnih kiselina	15
2.2.4. Raspodela fenolnih kiselina	17
2.2.5. Ekstrakcija i hidroliza	19
2.2.5.1. Uticaj dodatka antioksidanta i metal helatora tokom hidrolize ...	22
2.2.6. Hromatografsko razdvajanje i detekcija	23
2.3. Sirovine za dobijanje ulja kao izvori polifenola	27
2.3.1. Uljana tikva (<i>Cucurbita pepo</i> L.)	27
2.3.2. Nar (<i>Punica granatum</i> L.)	30
2.3.3. Crni kim (<i>Nigella sativa</i> L.)	32
2.3.4. Lan (<i>Linum usitatissimum</i> L.)	34
2.3.5. Hladno presovana ulja	35
2.4. Valorizacija agro-industrijskih ostataka	39
2.4.1. Primena agro-industrijskih ostataka i njihovih ekstrakata u funkcionalnoj hrani, nutraceuticima, prirodnoj kozmetici	41
2.4.2. Prednosti i nedostaci upotrebe ekstrakata biljnog porekla	43
2.5. Značaj uljanih pogača i drugih nusproizvoda hladno presovanih ulja	46
3. MATERIJAL I METODE	53
3.1. Materijali	53
3.1.1. Hemikalije korišćene pri određivanjima tečnom hromatografijom visokih performansi i drugim metodama	53
3.2. Metode ispitivanja	54
3.2.1. Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja, hidroliza i prečišćavanje	54
3.2.2. Analiza fenolnih kiselina iz ekstrakata tečnom hromatografijom	56

visokih performansi na obrnutim fazama	56
3.2.3. Izračunavanje i izražavanje rezultata	58
3.2.4. Statistička obrada podataka	59
3.2.5. Određivanje parametara kvaliteta	60
3.2.6. Određivanje sadržaja metala	61
4. REZULTATI I DISKUSIJA	62
4.1. Validacija metode određivanja fenolnih kiselina	62
4.2. Sadržaj fenolnih kiselina	70
4.2.1. Sadržaj i raspodela fenolnih kiselina u uljanoj tikvi (<i>Cucurbita pepo</i> L.)	70
4.2.2. Sadržaj i raspodela fenolnih kiselina u naru (<i>Punica granatum</i> L.)	77
4.2.3. Sadržaj i raspodela fenolnih kiselina u crnom kimu (<i>Nigella sativa</i> L.)	83
4.2.4. Sadržaj i raspodela fenolnih kiselina u lanu (<i>Linum usitatissimum</i> L.)	87
4.2.5. Komparativna analiza sadržaja i raspodele fenolnih kiselina u uzorcima uljane tikve, crnog kima, nara i lana	90
4.2.6. Sadržaj fenolnih kiselina u hladno ceđenim uljima uljane tikve, nara, crnog kima i lana	93
4.3. Skrining fenolnih kiselina i potvrda autentičnosti primenom PCA analize	94
4.4. Parametri kvaliteta	102
4.5. Sadržaj metala	106
5. ZAKLJUČAK	110
6. LITERATURA	111

Spisak publikacija proisteklih neposredno iz rada na doktorskoj disertaciji:

1. Peričin, D., **Krimer, V.**, Trivić, S. and Radulović, L., (2009). The distribution of phenolic acids in pumpkin's hull-less seed, skin, oil cake meal, dehulled kernel and hull. *Food Chemistry*, 113 (2), 450-456.
2. **Krimer Malešević, V.**, Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S. and Peričin-Starčević, I., (2014). Characterisation of black cumin, pomegranate and flaxseed meals as sources of phenolic acids. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(1) 210-216.
3. **Krimer Malešević, V.**, Poša, M., Vaštag, Ž., Popović, Lj., Peričin-Starčević, I., (2016) Phenolic acids in Black cumin, flax, pomegranate and pumpkin seeds and their by-products *Acta Periodica Technologica*, Vol. 47 – рад прихваћен за штампу
4. **Krimer-Malešević, V.**, Mađarev-Popović, S., Vaštag, Ž., Radulović, Lj. & Peričin, D. (2011). Phenolic acids in Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds. In V. R. Preedy, R.R. Watson, V. B. Patel, *Nuts & Seeds in Health and Disease prevention* (1st ed.) (pp 925-932). London, Burlington, San Diego: Academic Press, Elsevier.

1. UVOD

Posljednjih godina javlja se povećan interes za proučavanjem prirodnih komponenata iz sirovih i prečišćenih ekstrakata biljnog materijala, prvenstveno zbog podizanja svesti sve većeg broja potrošača da su prirodni sastojci hrane bolji i sigurniji od sintetičkih. Zanimanje za prirodne ekstrakte i antioksidante dodatno uvećava činjenica da mnogi od njih pokazuju antikancerogene, antiaterogene, antitumorske, antimikrobne, imuno-stimulatorne i druge poželjne osobine. Istraživanja se sve češće fokusiraju na biljne ekstrakte koji sadrže polifenole kao što su flavonoidi, katehini i fenolne kiseline.

Tržište prirodne, organske, minimalno prerađene, funkcionalne ili drugačije nazvane terapijske hrane beleži uzlazni trend. Hladno ceđena ulja od raznih vrsta uljarica, semena ili plodova biljaka predstavljaju jedan segment proizvodnje takve hrane i suplemenata. Pored tradicionalnih, pojavila su se i nova, atraktivna, biološki aktivna hladno ceđena ulja, u našoj sredini do sada malo poznata i korišćena. U sirovine za proizvodnju hladno ceđenih ulja spadaju pojedine vrste tradicionalnih uljarica (suncokret, soja, repica, uljana tikva, lan, sezam i dr.), kao i biljke čije seme ili plod može poslužiti za proizvodnju specijalnih ulja (crni kim, nar, noćurak, crna ribizla, mak, orah, badem i dr.). Interesovanje za polifenolna jedinjenja iz ostataka u industriji hladno presovanih ulja (pogače, ljuške, opne i kore), kao i semena biljnih vrsta od kojih potiču je u stalnom porastu, s obzirom da ova jedinjenja u određenoj koncentraciji povoljno deluju na ljudsko zdravlje i imaju industrijsku primenu. U pogačama zaostalim nakon ceđenja ulja ostaje velik broj korisnih supstanci nerastvornih ili slabo rastvornih u uljima, kao što su proteini i fenolne kiseline. Ipak, fenolni potencijal uljanih pogača, ali i drugih nusproizvoda industrije hladno ceđenih ulja još uvek nije dovoljno istražen. Uljane pogače se za sada uglavnom upotrebljavaju u ishrani životinja. Kore, ljuške ili opne takođe predstavljaju nusproizvode, često bogate vlaknima, ali ponekad i teško svarljive. S obzirom da su to spoljni slojevi semena ili ploda, oni sadrže mnogo veće koncentracije fenolnih jedinjenja nego unutrašnji. Jedan od ciljeva valorizacije nusproizvoda prehrambene industrije je povrat finih hemikalija, u koje spadaju i fenolne kiseline.

U skladu sa ekonomskim i ekološkim trendovima, javlja se potreba za smanjenjem količine nusproizvoda prehrambene i drugih industrija.

Zbog ograničenosti bioloških resursa, porasta svetske populacije, produženja životnog veka, zadovoljenja sve viših zahteva potrošača i sprečavanja zagađenja životne sredine koje nosi ispuštanje ostataka prehrambene industrije, procesi valorizacije obnovljivih biomaterijala postaju sve važniji.

Uljana tikva (*Cucurbita pepo* L.), crni kim (*Nigella sativa* L.), lan (*Linum usitatissimum* L.) i nar (*Punica granatum* L.) su u svetu poznati po svojim terapijskim delovanjima. Alergije, pad imuniteta i drugi zdravstveni problemi ne zaobilaze ni našu sredinu. Iz tog razloga se hladno presovana ulja dobijena iz navedenih biljnih vrsta sve više konzumiraju a samim tim se povećava i količina nusproizvoda nastalih pri njihovoj proizvodnji. Stoga je predmet istraživanja ove doktorske disertacije izučavanje fenolnog sadržaja ostataka, naročito pogača, nakon hladnog presovanja ulja. Osim toga, od devedesetih godina prošlog veka, usled prestrukturiranja privrede i jačanja malih privatnih preduzeća, u našoj zemlji se pojavljuje sve više mini uljara koje traže svoje mesto na tržištu. Nove ideje za primenu ne samo sirovina, već i materijala ostalog nakon hladnog presovanja ulja mogu dovesti do razvoja novih proizvoda i doneti dodatni profit.

1.1. CILJ DISERTACIJE

Cilj istraživanja je valorizacija nusproizvoda (pogače, kore, ljuske ili opne) koji nastaju tokom procesa hladnog presovanja ulja, kao i ispitivanje potencijala semena uljane tikve, crnog kima, lana, nara iz kojih i potiču ovi nusproizvodi, radi procene mogućnosti njihove eksploatacije kao izvora prirodnih fenolnih kiselina. Radi oslobađanja vezanih fenolnih kiselina i u cilju procene njihovog ukupnog sadržaja i distribucije u čvrstim uzorcima, primenjena je alkalna hidroliza. Da bi se sprečila degradacija fenolnih kiselina tokom alkalne hidrolize dodata je L-askorbinska kiselina kao snažan antioksidant i EDTA - etilen diamin tetra sirćetna kiselina (metal helator) i metoda je validisana. Radi kompletne valorizacije ispitan je sadržaj metala i određeni parametri kvaliteta. Istraživanja su vođena u cilju dobijanja ekstrakata bogatih fenolnim jedinjenjima koji mogu služiti za proizvodnju bioaktivnih sastojaka hrane, kozmetike i zdravstvenih suplemenata. Paralelno je ispitan sadržaj slobodnih fenolnih jedinjenja iz odgovarajućih ulja, s obzirom na njihovu upotrebu u narodnoj medicini i kozmetici.

2. OPŠTI DEO

2.1. POLIFENOLNA JEDINJENJA

Pod pojmom polifenoli postoji više od 8000 jedinjenja sa različitim strukturama (**Robbins, 2003**). Voće, povrće, gljive i neke bakterije u okviru sekundarnog metabolizma proizvode razna polifenolna jedinjenja. Neka od njih su veoma značajna za fiziološko funkcionisanje navedenih organizama, dok druga služe u odbrani od stresnih situacija i radi privlačenja/odbijanja drugih organizama. Ranih 60-tih godina prošlog veka fenolna jedinjenja su smatrana za metabolički otpad smešten u biljnim vakuolama. Međutim, do danas je utvrđeno da ova jedinjenja mogu služiti kao pigmenti, antioksidanti, prekursori aroma itd., a u ishrani pokazuju zdravstveno povoljna delovanja kao što su: snižavanje šećera u krvi, regulisanje telesne težine, antikancerogeno, antizapaljensko, antitrombotsko i podmlađujuće dejstvo (**Leopoldini i sar., 2011**). Istraživanja vezana za flavonoide i druge polifenole, njihove antioksidantne osobine i preventivno delovanje na razna oboljenja istinski počinje nakon 1995. (**Scalbert i sar., 2005**). Ipak, kao glavna aktivnost polifenola navodi se antioksidantno dejstvo. Osnovna razlika između bioaktivnih polifenola (koji se ponašaju kao nutraceutici) i ostalih polifenolnih jedinjenja bez primetne bioaktivnosti je njihovo metaboličko poreklo. Prvi nastaju iz dva biosintetska puta: šikimski put i/ili poliacetatni put (**Bernal, i sar., 2011**).

Blagotvorno dejstvo voća, povrća i žitarica celog zrna se pripisuje bioaktivnim jedinjenjima poznatim pod opštim nazivom – fitohemikalije. Među njima su polifenolna jedinjenja obimno izučavana zahvaljujući raznim po zdravlje povoljnim osobinama.

Naziv "fenoli ili polifenoli" obuhvata širok spektar biljnih supstanci koje imaju kao zajedničku karakteristiku aromatični prsten sa jednim ili više hidroksilnih supstituenata, uključujući tu i funkcionalne derivate (estre, metil estre, glikozide, itd.). Termin "polifenoli" nije potpuno precizan, jer neka jedinjenja nisu polihidroksilni derivati. Takođe i termin "fenoli" je ograničeno upotrebljiv jer mnoga jedinjenja nemaju fenolne grupe, pa čak ni aromatični prsten, ali se zbog metaboličkog porekla svrstavaju u ovu grupu jedinjenja (cimetna, elenična, šikimska i hinska kiselina - **Robards i sar., 1999**). Polifenoli su sekundarni biomolekuli, tj. ne učestvuju u primarnim biohemijskim aktivnostima. Ipak, ova jedinjenja su od izuzetne važnosti za biljke, ljude i životinje (**Bravo, 1998; King i Yang., 1999**). Tako, polifenolna jedinjenja učestvuju u

raznim biohemijskim procesima koji su značajni za fotosintezu, zaštitu biljaka od gljiva, virusa i mehaničkih oštećenja, regulaciju metabolizma itd. Zbog svoje fiziološke aktivnosti fenolna jedinjenja nalaze sve veću primenu u farmaceutskoj industriji kao sirovine za proizvodnju lekova. U prehrambenoj i farmaceutskoj industriji polifenolna jedinjenja su našla primenu kao antioksidanti (Fang i Bhandari, 2010; Ratz-Lyko i sar., 2015), te se upotrebljavaju za stabilizaciju raznih proizvoda (Munin i Edwards-Lévy, 2011; Madhan i sar., 2005; Shah i sar., 2014).

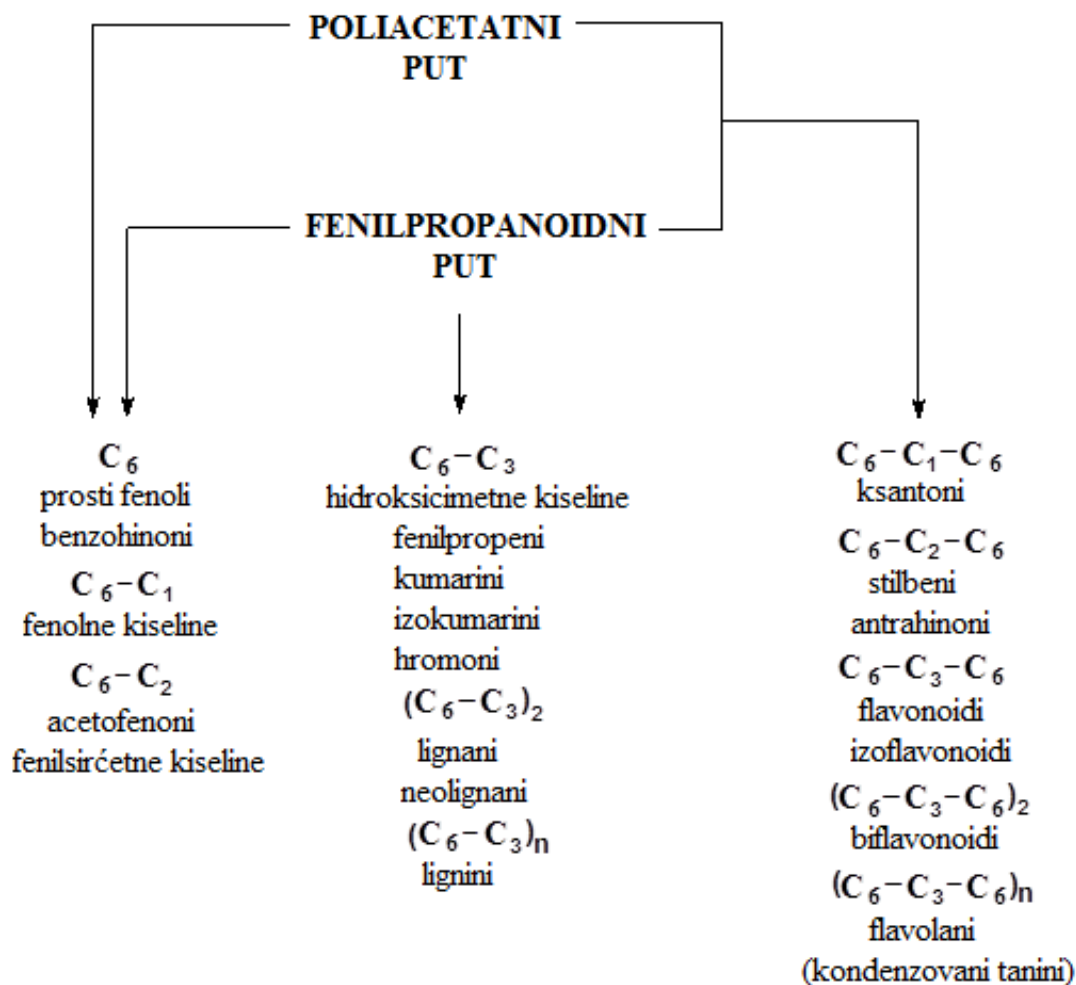
Prirodni polifenoli se uglavnom sreću u konjugovanom obliku sa jednim ili više ostataka šećera vezanim za hidroksilne grupe (što ih čini rastvorljivim u vodi), premda se sreću i direktne veze šećera za aromatični prsten. Šećeri koji se vezuju su monosaharidi, disaharidi ili čak i oligosaharidi. Glukoza je najčešći šećerni ostatak, zatim galaktoza, ramnoza, ksiloza, arabinoza, glukuronska i galakturonska kiselina. Česta je i veza sa drugim jedinjenjima kao što su organske kiseline, amini, lipidi, kao i veza sa drugim fenolima.

Polifenolna jedinjenja nisu ravnomerno rasprostranjena u biljnim tkivima. Mesto njihovog nalaženja nije znak da se biosinteza odigrala u istom delu biljke, jer se oni posle mogu transportovati i u najudaljenije delove biljke. Od ukupne količine hranom unetih fenolnih jedinjenja u organizam, jedna trećina su fenolne kiseline, a dve trećine su flavonoidi (Robbins, 2003). Polifenoli su najrasprostranjeniji antioksidanti u hrani. Njihov dnevni unos je znatno viši nego unos svih ostalih fitohemikalija koje su poznati dijetalni antioksidanti (Scalbert i sar., 2005).

2.1.1. BIOSINTETSKO POREKLO I KLASIFIKACIJA POLIFENOLA

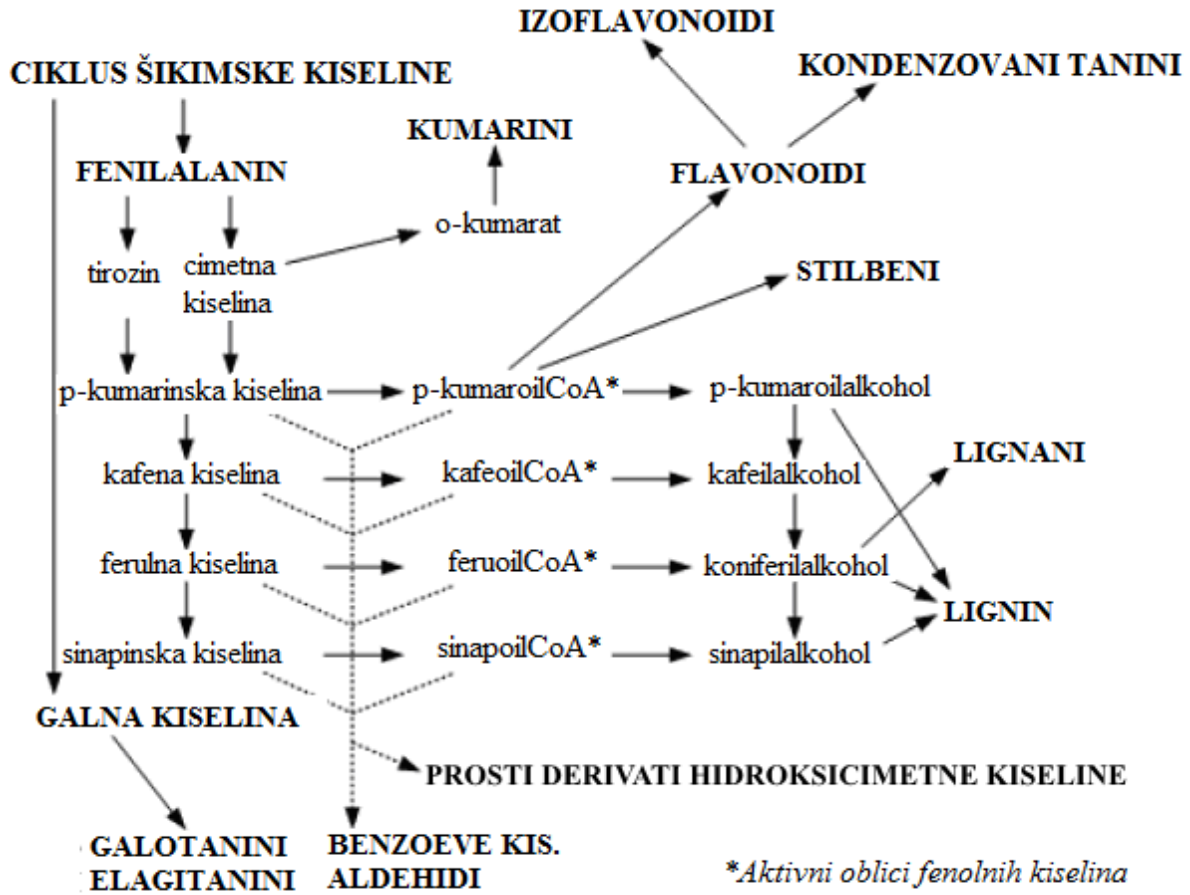
Kao što je već spomenuto, u prirodi postoje dva opšta biosintetska puta biljnih polifenola: poliacetatni put i fenilpropanoidni put sa šikimskom kiselinom kao intermedijerom (slika 1), dok neki polifenoli nastaju kombinacijom ova dva puta (Harborne, 1989).

Fenilpropanoidni put je važniji kod viših biljaka, dok je kod nižih biljaka, gljiva i bakterija dominantan acetatno-malonatni put. Fenilpropanoidni put daje *para* hidroksi jedinjenja, a acetatno-malonatni *meta* položaj hidroksilne grupe. Bliska veza biosinteze polifenola sa normalnim metabolizmom biljaka se ogleda u činjenici da ciklus šikimske kiseline predstavlja alternativni put sinteze aromatičnih aminokiselina, L-fenilalanina i L-tirozina (Häkkinen, 2000).



Slika 1. Šematski prikaz klasa biljnih fenola nastalih različitim biosintetskim putevima

Daljim transformacijama L-fenilalanina i L-tirozina dobijaju se različite klase polifenolnih jedinjenja što je prikazano na slici 2. Derivati i benzoevih i cimetnih kiselina imaju zajedničko biosintetsko poreklo od aromatične aminokiseline L-fenilalanina, koja predstavlja i finalni proizvod ciklusa šikimske kiseline. Dalje pretvaranje L-fenilalanina u razne hidroksicimetne kiseline obuhvata sekvencu od tri koraka koja se naziva „opšti fenilpropanoidni metabolizam“ s obzirom da se pomenuta sekvencu univerzalno pojavljuje u sintezi aromatičnih sekundarnih metabolita (Robbins, 2003).



Slika 2. Šema biosinteze polifenolnih jedinjenja

2.2. FENOLNE KISELINE

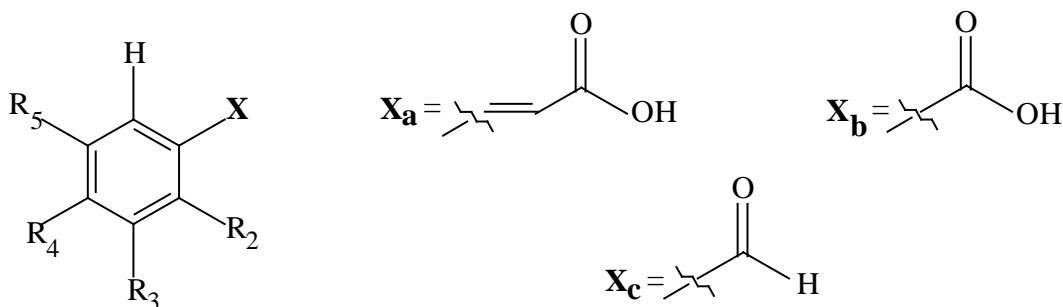
Fenolne kiseline su prosti polifenoli, fitohemikalije malih molekulskih masa, široko rasprostranjene u biljnom carstvu. Sastoje se od fenolnog jezgra i bočnog niza koji sadrži jedan (derivati benzoeve kiseline) ili tri (derivati cimetine kiseline) ugljenikova atoma. Postojeće i novije analitičke metode za određivanje fenolnih kiselina potiču od interesovanja za njihovu biološku ulogu kao sekundarnih metabolita, njihovog uticaja na kvalitet hrane i organoleptičke osobine, ali i zaštitne uloge koju ispoljavaju nakon unosa voća i povrća hranom ili putem dijetetskih suplemenata.

2.2.1. KLASIFIKACIJA FENOLNIH KISELINA

Pojam „fenolne kiseline“ podrazumeva polifenolna jedinjenja sa karboksilnom grupom. Međutim, kada se misli na biljne metabolite, pojam se odnosi na posebnu grupu organskih kiselina. Fenolne kiseline obuhvataju hidroksi i druge funkcionalne derivate benzoeve - hidroksibenzoeve i cimetine kiseline - hidroksicimetine kiseline (tabela 1).

Derivati se razlikuju u obrascima hidroksilacije i metoksilacije aromatičnih prstenova. Iako je osnovni skelet isti, broj i pozicija –OH grupa na aromatičnom prstenu stvara raznolikost ([Stalikas, 2007](#)). U mnogim slučajevima, aldehidni analozi se takođe svrstavaju u ovu grupu. U biljkama se češće sreću derivati hidroksicimetnih kiselina ([El Gharras, 2009](#); [Mattila i Hellström, 2007](#)). Hidroksicimetine kiseline se retko sreću kao slobodne u neobrađenom biljnom materijalu, ali mogu biti analizirane nakon dekonjugacije i biti prijavljene kao slobodne ([Clifford, 2000](#)).

Najrasprostranjenije hidroksicimetine kiseline su: *p*-kumarinska, kafena, ferulna i sinapinska kiselina ([Razzaghi-Asl i sar., 2013](#)). Najpoznatiji konjugat hidroksicimetnih kiselina je hlorogenska kiselina - estar kafene i hininske kiseline. Galna kiselina je trihidroksilni derivat koji učestvuje u stvaranju hidrolizujućih tanina. Dimerni kondenzacioni produkt galne kiseline (heksahidroksidifenska kiselina) i dilakton, elaginska kiselina (nastao kondenzacijom galne kiseline) su česti metaboliti biljaka. Elaginska kiselina ulazi u sastav elagitanina gde je prisutna kao estar analoga difenske kiseline sa glukozom.

Tabela 1. Strukture fenolnih kiselina (preuzeto od [Robbins, 2003](#))

R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	X	Uobičajen naziv
H	H	H	H	a	cimetna kiselina
-OH	H	H	H	a	<i>o</i> -kumarinska kiselina
H	H	-OH	H	a	<i>p</i> -kumarinska kiselina
H	-OH	H	H	a	<i>m</i> -kumarinska kiselina
H	-OCH ₃	-OH	H	a	ferulna kiselina
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	a	sinapinska kiselina
H	-OH	-OH	H	a	kafena kiselina
H	H	H	H	b	benzoeva kiselina
-OH	H	H	H	b	salicilna kiselina
H	H	-OH	H	b	<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina
H	-OCH ₃	-OH	H	b	vanilinska kiselina
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	b	siringinska kiselina
H	-OH	-OH	H	b	protokatehinska kiselina
-OH	H	H	-OH	b	gentisinska kiselina
-OH	-OH	-OH	-OH	b	galna kiselina
H	-OCH ₃	-OCH ₃	H	b	veratrinska kiselina
H	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	c	siringaldehid
H	-OCH ₃	-OH	H	c	vanilin

X_a – hidroksicimetne kiseline; X_b – hidroksibenzoeve kiseline; X_c – aldehidni analozi

2.2.2. ANTIOKSIDANTNO DEJSTVO I OSTALI EFEKTI FENOLNIH KISELINA

Antioksidanti su supstance prisutne u mnogo nižim koncentracijama od supstrata koji lako podležu oksidaciji, kao što su lipidi, proteini, dezoksiribonukleinska kiselina (DNK) ili ugljeni hidrati. Oni značajno inhibiraju ili potpuno sprečavaju oksidaciju supstrata (**Halliwell i Gutteridge, 1989**).

U oblasti bezbednosti hrane antioksidanti se definišu kao supstance koje produžavaju rok trajanja namirnica štiteći ih od kvarenja prouzrokovanog procesima oksidacije, kao što su užeglost masti, promena boje i gubitak nutritivne vrednosti (**Watson, 2002**). Američka uprava za hranu i lekove (FDA) definiše antioksidante kao prehrambene aditive, konzervanse, koji sprečavaju kvarenje hrane, odnosno užeglost masti i diskoloracije izazvane oksidacijom. Kvalitet hrane (izuzimajući bakterijsko i enzimsko kvarenje) opada stajanjem zahvaljujući oksidativnim procesima indukovanim i propagiranim atmosferskim kiseonikom. Na izgled, teksturu, ukus i miris hrane utiču oksidativni procesi. Lipidna oksidacija ima i pozitivne i negativne efekte. Pri niskim koncentracijama, proizvodi lipidne oksidacije doprinose poželjnoj aromi pržene hrane, kivanog mesa, prženih orašastih plodova itd. S druge strane, lipidna oksidacija izaziva užeglost i negativno utiče na ljudsko zdravlje (**Dilas i sar., 2002**).

U prooksidante se ubrajaju različite hemijske vrste koje u biološkim i hemijskim sistemima uzrokuju ili ubrzavaju reakcije oksidacije. Reaktivne prooksidativne vrste (tabela 2., **Halliwell i Whiteman, 2004**) se dele na reaktivne slobodne radikale i neradikalske vrste (oksidaciona sredstva koja lako prelaze u slobodne radikale). Slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli, koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi koji su uprkos tome sposobni za nezavisno postojanje (**Dilas i sar., 2002**). Nespareni elektroni su uzrok njihove visoke i neselektivne reaktivnosti i nestabilnosti. Slobodni radikali mogu biti neutralni, pozitivno (radikal katjon) ili negativno (radikal anjon) naelektrisani. Oni spadaju u najreaktivnije hemijske vrste i lako stupaju u reakciju, međusobno ili sa drugim molekulima (**Halliwell i Gutteridge, 1989**). Reaktivni slobodni radikali mogu nastati brojnim reakcijama koje se uglavnom svode na četiri osnovna tipa: termolizu, fotolizu, oksido-redukcione procese i iradijaciju visoke energije.

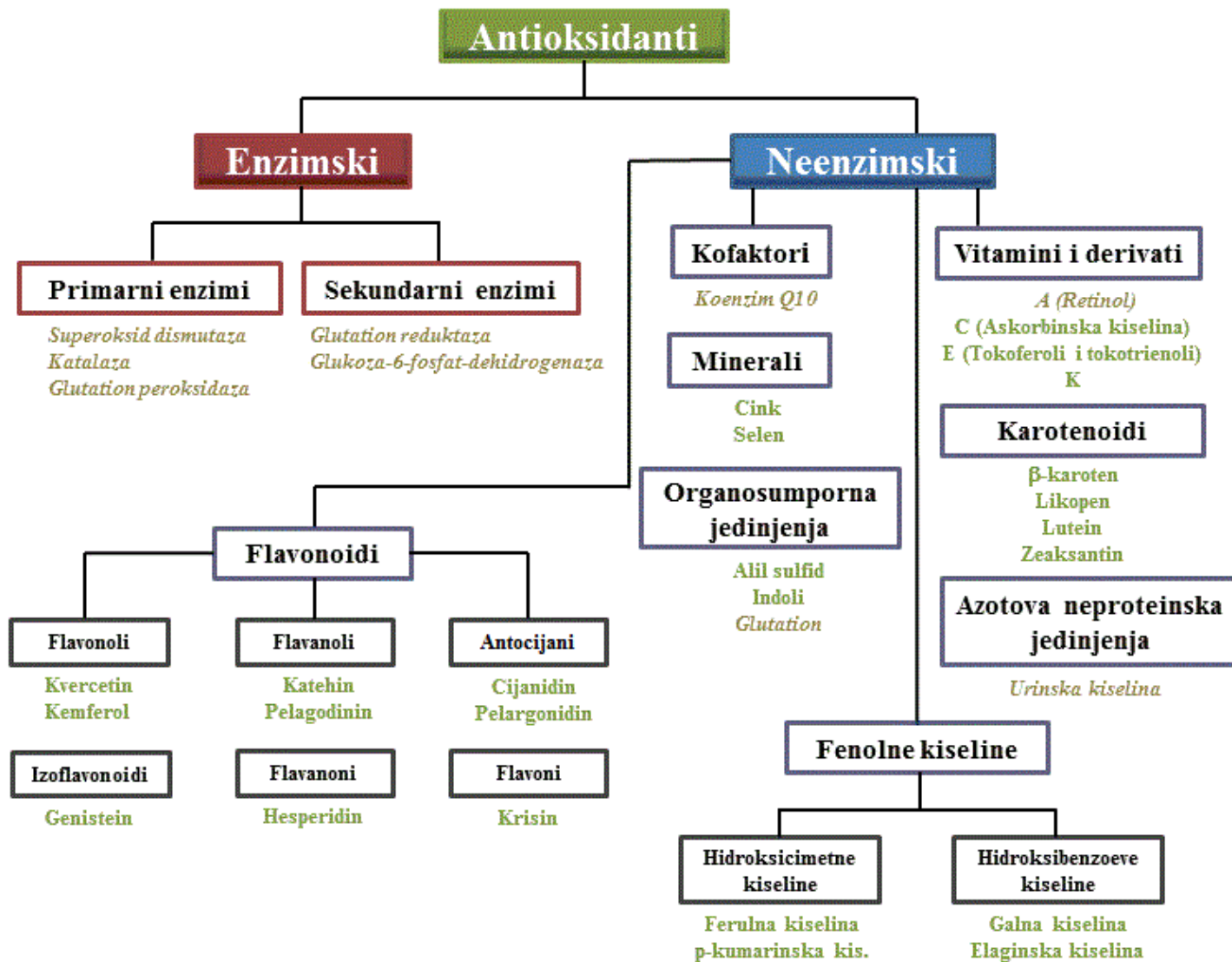
Tabela 2. Najvažnije reaktivne vrste

REAKTIVNE KISEONIČNE VRSTE (ROS)*	
Slobodni radikali	Neradikalske vrste
Superoksid anjon, $O_2^{\bullet-}$	Vodonik peroksid, H_2O_2
Hidroksil, $\bullet OH$	Hipobromna kiselina, $HOBr$
Hidroperoksid, HO_2^{\bullet}	Hipohloritna kiselina, $HOCl$
Peroksid, RO_2^{\bullet}	Ozon, O_3
Alkoksil, RO^{\bullet}	Singlet kiseonik, 1O_2
Karbonatni, $CO_3^{\bullet-}$	Organski peroksidi, $ROOH$
Ugljendioksidni, $CO_2^{\bullet-}$	Peroksinitrit, $ONOO^-$
	Peroksinitritna kiselina, $ONOOH$
REAKTIVNE AZOTOVE VRSTE (RNS)**	
Slobodni radikali	Neradikalske vrste
Azot oksid, NO^{\bullet}	Azotasta kiselina, HNO_2
Azot dioksid, NO_2^{\bullet}	Nitrozil katjon, NO^+
	Nitroksil anjon, NO^-
	Dinitrogen tetroksid, N_2O_4
	Dinitrogen trioksid, N_2O_3
	Peroksinitrit, $ONOO^-$
	Nitronijum katjon, NO_2^+
	Nitril hlorid, NO_2Cl
	Alkil peroksinitriti, $ROONO^-$
REAKTIVNE HLORNE VRSTE (RCS)***	
Slobodni radikali	Neradikalske vrste
Atomski hlor, Cl^{\bullet}	Nitril hlorid, NO_2Cl
	Hipohlorna kiselina, $HOCl$
	Hloramini

*ROS je zajednički naziv koji obuhvata i kiseonične radikale i neradikalske vrste koje su oksidacioni agensi i/ili lako prelaze u slobodne radikale; **RNS obuhvata i slobodne radikale i neradikalske vrste koje sadrže azot. Peroksinitrit se može smatrati i ROS-om i RNS-om; ***neke vrste, npr. $HOCl$ su i ROS i RCS.

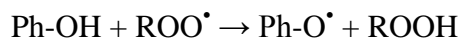
Postoji nekoliko podela antioksidanata:

- prirodni (slika 3) i sintetski
- endogeni (proizvedeni u telu) i egzogeni (uneti hranom)
- enzimski i neenzimski
- antioksidanti rastvorljivi u vodi ili mastima.

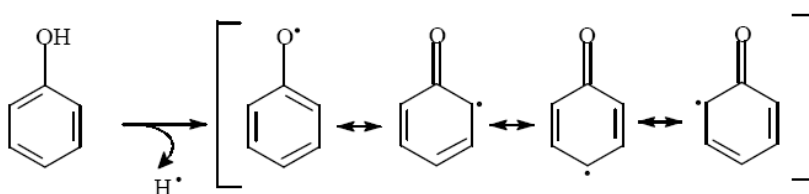


Slika 3. Prirodni antioksidanti podeljeni u klase (preuzeto od [Carocho i Ferreira, 2013](#))

Smatra se da je antioksidativna aktivnost polifenola prvenstveno rezultat njihove sposobnosti da budu donori vodonika, nakon čega nastaju manje reaktivni fenoksil radikali ([Robbins, 2003](#)):



Relativno velika stabilnost fenoksil radikala se objašnjava delokalizacijom elektrona, uz postojanje više rezonantnih formi (slika 4).



Slika 4. Rezonantna stabilizacija fenoksil radikala

Osim pomenutog mehanizma, biljni fenoli mogu i heliranjem jona metala sprečiti njihovo katalitičko dejstvo u produkciji reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS). Kafena i hlorogenska kiselina (estar kafene sa hinskim kiselinom) pokazuju veću helatnu aktivnost od hidroksibenzoevih kiselina ([Razzaghi-Asl i sar., 2013](#)).

U slučaju kada imaju iste hidroksilne i metoksi grupe, hidroksicimetne kiseline su efikasniji antioksidanti od hidroksibenzoevih kiselina ([Cai i sar., 2006](#); [Rice-Evans i sar., 1996](#)). $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ grupa, koja je vezana za fenil prsten hidroksicimetnih kiselina ima veću sposobnost doniranja vodonika i stabilizacije radikala rezonancijom zbog prisustva dvostruke veze, u odnosu na $-\text{COOH}$ grupu u hidroksibenzoevim kiselinama. Elektrofilna karboksilna grupa u benzoevim kiselinama ima negativan uticaj na njihovu sposobnost doniranja vodonika. Stoga su kafena, sinapinska, ferulna i *p*-kumarinska kiselina aktivnije od protokatehulinske, sirindžinske, vanilinske i *p*-hidroksibenzoeve kiseline, naročito u lipidnim sistemima. Uopšteno posmatrano, antioksidativna sposobnost fenolnih kiselina zavisi od broja i položaja hidroksil ($-\text{OH}$) i metoksi ($-\text{OCH}_3$) supstituenata na molekulu.

Monohidroksibenzojeve kiseline u *orto*- i *para*- položaju ne pokazuju antioksidantnu aktivnost u smislu doniranja vodonikovog atoma u vodenoj fazi, ali *m*-hidroksibenzojeva kiselina pokazuje antioksidantnu aktivnost od 0.84 ± 0.05 mM. Monohidroksibenzoati su ipak, efektivni hvatači radikala, zahvaljujući njihovoj tendenciji ka hidroksilaciji i visokoj reaktivnosti hidroksil radikala (**Rice-Evans i sar., 1996**).

Galna kiselina (3,4,5-trihidroksi-benzojeva kiselina) sa najviše hidroksilnih grupa, ima najveću antioksidantnu aktivnost. Benzojeve i cimetine kiseline bez –OH grupa ne pokazuju antioksidantnu aktivnost. Sposobnost hvatanja radikala hidroksibenzojevih kiselina opada po sledećem redosledu: galna kiselina > dihidroksibenzoati > monohidroksibenzoati (*o*-, *m*-, *p*- hidroksi; izuzev siringinske kiselinu sa *p*-hidroksil i metoksi grupama). Monohidroksibenzojeve kiseline pokazuju slabu antiradikalnu aktivnost, mada je metoksi grupe povećavaju (**Rice-Evans i sar., 1996**). Siringinska kiselina (4-OH, 3,5-OCH₃) pokazuje veću aktivnost od monohidroksibenzoata bez metoksi grupa. To ukazuje da metoksi grupe u hidroksibenzojevim kiselinama mogu povećati sposobnost doniranja vodonika i antiradikalnu sposobnost (**Karamac i sar., 2005**), s obzirom da dodatno stabilizuju fenoksil radikal (**Natella i sar., 1999**).

Kod hidroksicimetnih kiselina, dihidroksicinamati (kafena i hlorogenska kiselina) su aktivniji hvatači slobodnih radikala od nekih monohidroksicinamata (*m*-, *o*-kumarinska kiselina) ali i manje efikasni od ostalih monohidroksicinamata (*p*-kumarinske, ferulne i izoferulne kiseline). To se dešava zahvaljujući uticaju pozicije hidroksilnih i metoksilnih grupa. Prisustvo druge hidroksilne grupe u *orto*- položaju (kafena kiselina) povećava antioksidantnu aktivnost zahvaljujući dodatnoj stabilizaciji putem formiranja *o*-hinona. Zamena 3- ili 4-hidroksilne grupe kafene kiseline sa metoksi grupama, kao u slučaju ferulne kiseline i izoferulne kiseline, povećava antioksidantnu aktivnost. Metoksi grupe, dakle, mogu značajno pojačati antiradikalnu sposobnost hidroksicimetnih kiselina. Hidroksilne grupe u *p*-položaju (4-OH) na hidroksicimetnim kiselinama (*p*-kumarinska kiselina) značajno povećavaju antiradikalni kapacitet u poređenju sa ekvivalentnim *o*- i *m*- položajima (*o*- ili *m*-kumarinska kiselina). *Para*-supstituisana hidroksilna grupa omogućava delokalizaciju preko celog molekula i time i stabilizaciju fenoksil radikala. Zbog efekta *p*-(-4-) hidroksilne grupe, ferulna kiselina je aktivnija od izomera, izoferulne kiseline (**Lee i sar., 2003**).

Razzaghi-Asl i sar. (2013) su u svom revijalnom radu izneli opširno razmatranje o uticaju esterifikacije na antioksidantnu aktivnost hidroksicimetnih kiselina. Estarski derivati kafene kiseline poseduju snažniju biološku aktivnost u poređenju sa kafenom i ferulnom kiselinom, pa čak i u odnosu na sintetsko jedinjenje Trolox u 2,2'-azobis(2-amidin-propan)dihidrohlorid (AAPH) indukovanoj lipidnoj peroksidaciji Tween-emulgovane linoleinske kiseline. Sugerisano je da su oksidacioni produkti etil kafeata (*o*-hinon) stabilniji nego oksidacioni produkti neesterifikovanih hidroksicimetnih kiselina (fenoksi radikal). Stabilniji intermedijeri estara mogu objasniti njihovu višu antioksidantnu aktivnost u mnogim test sistemima. Estarska veza povećava rastvorljivost hidroksicimetnih kiselina u uljima. Esterifikacija kratkim lancima (metil-, etil-, propil- i butil-) blago snižava antioksidantnu aktivnost sinapinske kiseline u DPPH i FRAP probama, ali ima pozitivan uticaj na koeficijent raspodele. To može povećati upotrebljivost ovog jedinjenja u lipofilnim sistemima. Slični rezultati su dobijeni i za ferulnu kiselinu, gde je saopšteno da je DPPH antiradikalni efekat od metil- do dodecil-estara manji u odnosu na samu ferulnu kiselinu, ali je njihova aktivnost u lipofilnim sistemima znatno povećana. Sugerisano je i da se estarski derivati hidroksicimetnih kiselina mogu koristiti kao efikasni hvatači radikala u uljima, zahvaljujući njihovoj povećanoj lipofilnosti. To je naročito značajno ako se uzme u obzir da je jedno od glavnih ograničenja prilikom prehrambenih i kozmetičkih formulacija sa hidroksicimetnim kiselinama njihov hidrofilni karakter, koji čini njihovu integraciju u uljane ili masne matrikse zahtevnim.

Fenolne kiseline privlače znatnu naučnu pažnju kao sastojci ishrane sa antioksidantnim dejstvom i kao prirodni konzervansi. Antioksidanti sprečavaju užeglost hrane, nutritivne gubitke, nastanak nepoželjnih organoleptičkih osobina i gubitak boje. Pored produženja roka trajanja prehrambenih proizvoda, odlažu nastanak mnogih bolesti izazvanih stresom.

Interes za prirodnim polifenolnim antioksidantima je pojačan usled saznanja da mnoga od tih jedinjenja pokazuju antimutageno, antimikrobno, hemopreventivno, antitumorsko, antihepatotoksično, protivupalno, apoptotično, neurozaštitno i mnoga druga dejstva (**Khadem i Marles, 2010; Robbins 2003**). Dijetalni antioksidanti imaju važnu ulogu i kao nutraceutici zahvaljujući zaštitnoj ulozi organizma od slobodnih

radikala koji mogu biti proizvod normalnog metabolizma ili poticati iz spoljnih izvora. S obzirom da na fenolne kiseline otpada 30% od polifenola unetih putem ishrane, one imaju važnu ulogu u održanju ljudskog zdravlja.

Postoje razni dokazani apsorpcioni putevi vezanih polifenola u gastrointestinalnom traktu, u kojima učestvuju mikroorganizmi, enzimi, pa čak i transporteri glukoze. U ljudskom organizmu u debelom crevu dolazi do enzimskog oslobađanja (pod dejstvom esteraza i ksilanaza koje otpušta postojeća mikroflora) 95% od ukupno prisutnih feruloil grupa iz pšeničnih vlakana. Samo mala količina ferulne kiseline (2,6%) se oslobađa u želucu i tankom crevu. Nerastvorne-vezane fitohemikalije netaknute varenjem u želucu i tankom crevu dospevaju do debelog creva, s obzirom da je vlaknasti materijal ćelijskog zida težak za varenje. Prilikom digestije ćelijskih zidova sa inkorporiranim fenolnim jedinjenjima se oslobađaju fitohemikalije koje ispoljavaju zdravstveno povoljno delovanje ([Adom i Liu, 2002](#)). Iz tog su razloga nerastvorne-vezane fitohemikalije zdravstveno efikasnije u debelom crevu i preventivno deluju na karcinom debelog creva i ostale digestivne kancere. Hidroliza intestinalnim esterazama je najverovatnije glavni put oslobađanja i *in vivo* apsorpcije hidroksicimetnih kiselina. U tankom crevu aktivnost ovih enzima uglavnom potiče od mukoznih epitelnih ćelija, a u debelom crevu većina esteraza je mikrobiološkog porekla. Konzumiranje slobodnih ili vezanih fenolnih jedinjenja zavisi od željenog zdravstvenog efekta. Kao što je već rečeno, dijetalni unos vezanih oblika ima hemopreventivnu ulogu kod kancera debelog creva. Unos slobodnih i rastvorljivih konjugovanih oblika omogućava lakšu apsorpciju u želucu i tankom crevu i pokazuje zdravstveno povoljno delovanje na ceo organizam – sprečavanje oksidacije LDL holesterola i lipozoma. Stoga je neophodno oslobađanje vezanih polifenola pre unosa ishranom, ukoliko se očekuju i druge koristi osim prevencije kancera debelog creva ([Acosta-Estrada i sar. 2014](#)).

2.2.3. ZNAČAJ I PRIMENA FENOLNIH KISELINA

Osim u smešama, fenolne kiseline imaju primenu i kao zasebne supstance. Hidroksicimetne kiseline i njihovi derivati pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti uključujući antitumorsku, antimikrobnu i neuroprotektivnu ([Razzaghi-Asl i sar., 2013](#)).

Ferulna kiselina je u Japanu odobrena kao prehrambeni aditiv. U USA i većini evropskih zemalja brojni prirodni ekstrakti sa visokim sadržajem ferulne kiseline se dodaju hrani kao FDA-odobrene antioksidantne smeše (**Ou i Kwok, 2004**).

U domenu dermatologije i nege kože već postoje komercijalni preparati za zaštitu od prevremenog starenja i kancera kože, zasnovani na naučnim istraživanjima (**Lin i sar., 2005**; <http://www.skinceuticals.com/c-e-ferulic-635494263008.html>, 2016). Ferulna kiselina predstavlja prekursor vanilinske kiseline i vanilina (**Benoit i sar., 2008**). **Kumar i Pruthi, 2014** su u svom revijalnom radu detaljno prikazali 8 različitih industrijskih i bioloških primena ferulne kiseline, među kojima je i održanje boje zelenog graška, zelenog čaja, sprečavanje oksidacije i tamnjenja banana, sprečavanje bakterijske kontaminacije i dr. Slično važi i za ostale fenolne kiseline čija mogućnost primene raste iz godine u godinu. Tako su npr. **Hsu i Yen (2008)** dokazali da *p*-kumarinska i galna kiselina deluju protiv gojaznosti i predložili njihovu novu primenu u vidu zdravstvenih suplemenata. *p*-Kumarinska kiselina smanjuje rizik od raka želuca smanjenjem stvaranja kancerogenih nitrozamina i učestvuje u odbrani od biljnih patogena (**Sytar i sar., 2012**). *p*-Hidroksibenzoeva kiselina i njeni derivati nalaze primenu kao dijetalni antioksidanti, prirodne arome i konzervansi (**Sachan i sar., 2006**); *p*-hidroksibenzoeva kiselina je pokazala inhibitorno dejstvo (IC₅₀) na većinu gram pozitivnih i neke gram negativne bakterije pri koncentracijama 100 - 170 i 160 µg/ml, redom (**Cho i sar., 1998**). Siringinska i vanilinska kiselina poseduju antimikrobna, antikancerogena, hepatoprotektivna i preventivna svojstva protiv oksidacije DNA (**Itoh i sar., 2009**). Protokatehinska kiselina pokazuje antifungalna, antibakterijska, hepatoprotektivna, anti-inflamatorna, neuroprotektivna dejstva (**Hur i sar., 2003**; **Khadem i Marles, 2010**). Poznato je da kafena kiselina selektivno blokira biosintezu leukotriena koji učestvuju u autoimunim bolestima kao što su astma i alergijske reakcije (**Robbins, 2003**). Pored toga što ima snažno antioksidantno dejstvo, kafena kiselina se ponaša kao metal helator s obzirom na dve susedne hidroksilne grupe (**Naz i sar., 2004**). U Rancimat testu dodatak kafene kiseline svinjskoj masti znatno je produžio vreme lipidne oksidacije (**Sytar i sar., 2012**).

Benfeito i sar., (2013) pregledno navode modifikacije hidroksicimetnih i hidroksibenzoevih kiselina koje su dovele do poboljšanja njihovih fizičko-hemijskih

osobina u smislu lipofilnosti i sposobnosti stvaranja moćnih i efikasnih antioksidanata koji se mogu koristiti za formulaciju nove generacije lekova. Naime, esterifikacija hidrofilnih polifenolnih antioksidanata je opisana kao efikasan pristup za poboljšanje njihove rastvorljivosti u nepolarnim sredinama. Pri tome, kafena kiselina i njeni derivati pokazali su se aktivnijim od ferulne kiseline i njenih derivata, a alkil estri kafene kiseline imali su višu antioksidantnu aktivnost i lipofilnost u odnosu na samu kafenu kiselinu. U odnosu na prekursore, amidni derivati pokazali su povećanu lipofilnost i sličnu antioksidantnu aktivnost. Kombinacijom prirodnih peptida (karnozin i glutation) sa kafenom kiselinom dobijen je derivat sličan kafenoj kiselini ali sa većom sposobnoću inhibicije lipidne peroksidacije. Ovi konjugati imali su hidrofobne i hidrofilne grupe koje su im omogućile da budu efikasni i u vodenim i u hidrofobnim sredinama. Hibrid takrin-ferulne kiseline predložen je kao lek kandidat za Alchajmerovu bolest (**Benfeito i sar., 2013**). Tu se ne završava formulacija nove generacije antioksidanata sa poboljšanom lipofilnošću baziranih na fenolnim kiselinama. Novi hibridni antioksidant dobijen kombinacijom galne i ferulne kiseline po antioksidantnom kapacitetu je prevazišao smešu galne i ferulne kiseline. Esterifikacija karboksilne grupe dovela je do poboljšanja lipofilnosti. Dobijeno jedinjenje može da ima ulogu antioksidanta u biomembranama i drugim lipidnim sistemima i predloženo je kao potencijalni lek za lečenje neurodegenerativnih, inflamatornih procesa i kancera (**Teixeira i sar., 2013**).

2.2.4. RASPODELA FENOLNIH KISELINA

Polifenoli se u prirodi sreću u slobodnom i vezanom obliku. Pomoću estarskih, etarskih ili acetalnih veza fenolne kiseline se vezuju sa strukturnim komponentama biljaka (celuloza, hemiceluloza, proteini, lignin) i čine sastavni deo ćelijskog zida (**Stalikas, 2007**), pri čemu unakrsno povezivanje ligninskih komponenti preko fenolnih kiselina ima veliki uticaj na rast ćelijskog zida, njegove mehaničke osobine i biorazgradljivost. Polifenoli u ćelijskom zidu imaju važnu ulogu ponašajući se kao fizička i hemijska barijera i štiteći biljku od invazije patogena; a zatim delujući i kao astringent čime odbijaju insekte i životinje. Oni takođe deluju antibakterijski, antifungalno i antioksidantno, čime dodatno štite biljku (**Acosta-Estrada i sar., 2014**;

Zhou i sar., 2004). Polifenolna jedinjenja se akumuliraju uglavnom u ćelijskim zidovima (**Guern i sar., 1987; Monties, 1989**) najvećim delom na površini ploda (epidermalni i subepidermalni slojevi), s obzirom da biosinteza ovih jedinjenja zavisi od svetlosti (**Wollenweber, 1994**). Akumulacija polifenolnih jedinjenja varira i u zavisnosti od fiziološkog stanja biljke, kao rezultat ravnoteže između biosinteze i daljeg metabolizma (**Macheix i sar., 1990**). Istraživanja potvrđuju da je koncentracija polifenolnih jedinjenja manja u zrelom plodu, osim kod crvenih plodova kod kojih se flavonoidi i antocijani akumuliraju tokom sazrevanja (**Britton, 1983; Macheix i sar., 1990**). Polifenolna jedinjenja su od velike važnosti za biljke jer grade integralni deo strukture ćelijskog zida, uglavnom kao polimeri (lignini). Ove strukture služe kao mehanička barijera u odbrani od mikroorganizama. Lignini su, posle celuloze, najzastupljenije organske strukture na Zemlji (**Wallace i Fry, 1994; Strack, 1997**).

Fenolne kiseline mogu biti vezane za veće polifenole (flavonoide) ili za manje organske molekule (glukozu, hininsku, maleičnu, vinsku kiselinu), ali i za druga jedinjenja (npr. terpene). Derivati cimernih i benzoevih kiselina se sreću u svim vrstama biljne hrane (u voću, povrću, zrnelju) i prisutne su u svim delovima biljke (semenu, lišću, korenu, stabljici, plodu). Osim toga, fenolne kiseline nisu ravnomerno raspoređene u biljnom tkivu, a njihov sadržaj zavisi od faze sazrevanja biljke, uslova gajenja (temperature, vlage i sl.), sorte, a kasnije i od uslova skladištenja. U prirodi, fenolne kiseline se uglavnom pojavljuju u nerastvornom ili vezanom obliku (**Acosta-Estrada i sar., 2014; Nardini i Ghiselli, 2004, Stalikas, 2007**). Ovakva raznolikost hemijskih veza, derivata i raspodele je jedan od faktora složenosti analitike fenolnih kiselina (**Robbins 2003**). U mnogobrojnim *in vitro* antioksidantnim testovima vezana nerastvorna fenolna jedinjenja su pokazala znatno viši antioksidantni kapacitet u poređenju sa slobodnim i rastvorljivim konjugovanim polifenolima (**Acosta-Estrada i sar., 2014**).

2.2.5. EKSTRAKCIJA I HIDROLIZA

Na uspešnost ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz biljnog materijala utiče njihova hemijska priroda, ekstrakciona metoda, veličina čestica uzorka, vreme, temperatura i uslovi skladištenja, kao i prisustvo interferirajućih supstanci. Hemijska priroda biljnih polifenola varira od jednostavnih do visokopolimerizovanih supstanci. Oni takođe mogu postojati u vidu kompleksa sa ugljenim hidratima, proteinima i drugim biljnim komponentama, a uz to su polifenoli i njihovi kompleksi velikih molekulskih masa često nerastvorni (Naczki i Shahidi, 2004). Ekstrakcione tehnike moraju uzeti u obzir lokaciju fenolnih kiselina u biljkama. Rastvorljive fenolne kiseline prisutne u biljnom matriksu se nalaze uskladištene u vakuolama. Nerastvorni derivati su pak vezani za ugljene hidrate ili proteine ćelijskog zida. Često je neophodna saponifikacija pre ekstrakcije da bi se pocepale estarske veze sa ćelijskim zidom (Robbins 2003, Stalikas, 2007).

Uopšteno, čvrsti uzorci se pre ekstrakcije melju i homogenizuju, čemu može da prethodi sušenje ili liofilizacija. Tečni uzorci se prvo filtriraju i zatim direktno injektuju u separacioni sistem ili podležu tehnikama opisanim u tekstu ispod (Dai i Mumper, 2010; Tsao, 2010; Khoddami i sar., 2013).

Fenolni ekstrakti biljnih materijala su uvek smeša različitih klasa polifenola rastvorljivih u upotrebljenom rastvaraču. Često su potrebni dodatni koraci za uklanjanje neželjenih supstanci kao što su: voskovi, masnoće, terpeni i hlorofil ali i za razdvajanje prostih od složenih polifenola. U tu svrhu se često koriste tehnike ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE) i frakcionisanja baziranog na kiselosti. Npr. flavonoidi se mogu izdvojiti sa etil-acetatom podešavanjem na pH = 7, a fenolne kiseline na pH = 2. Eluiranjem sa rastvaračima pri višim pH vrednostima polifenoli većih molekulskih masa i šećeri se odvajaju od polifenola manjih molekulskih masa. Rastvorljivost polifenolnih jedinjenja zavisi od tipa (polarnosti) rastvarača, stepena polimerizacije polifenola, njihove interakcije sa ostalim sastojcima hrane kao i formiranja nerastvornih kompleksa. Zbog toga, ne postoji uniformna ili potpuno zadovoljavajuća procedura pogodna za ekstrakciju svih, ili tačno određene klase polifenola. Najčešće se koriste metanol, etanol, aceton, voda, etilacetat i u manjoj meri propanol, dimetilformamid i njihove smeše. Izrazito polarne fenolne kiseline nije moguće ekstrahovati čistim organskim rastvaračima pa se

preporučuje korišćenje smeša alkohol-voda ili aceton-voda (**Acosta-Estrada i sar. 2014**). Ekstrakcija se može izvoditi u mraku, u prisustvu antioksidanta (npr. 1% BHT tj. butilovanog hidroksitoluena). Vreme ekstrakcije se kreće od 1 minut do 24 časa. Vremena duža od tog povećavaju oksidaciju polifenola, osim ako se redukujući agensi ne dodaju rastvaraču. Na povrat (eng. *recovery*) polifenola takođe utiče odnos uzorak-rastvarač, ali i veličina čestica uzorka.

U pojedinim slučajevima, upotrebljavaju su mehanička sredstva da bi se pospešila molekularna interakcija: vorteks mućkanje praćeno centrifugiranjem, ultrazvučna ekstrakcija, mehaničko mešanje, a poslednjih godina i mikrotalasno zračenje. Ekstrakcija se gotovo u svim slučajevima ponavlja 2 do 3 puta a ekstrakti se spajaju. Mnoga istraživanja se fokusiraju na identifikaciju estarskih derivata iz hrane biljnog porekla. To je zahtevan zadatak, s obzirom da postoje brojni varijeteti ovih jedinjenja, koji mogu imati međusobno veoma slične spektre. Alkoholni ostatak za koji je fenolna kiselina vezana često ne sadrži hromoforu. U takvom slučaju zadržavanje na koloni zavisi od polarnosti jedinjenja, ali su UV spektri gotovo identični. Da bi se analiza pojednostavila primenjuje se hidroliza estara u karboksilne kiseline čime se dobija specifičnija slika profila fenolnih kiselina u hrani. Postoje dva najčešće korišćena načina za oslobađanje vezanih fenolnih kiselina: *kisela hidroliza* i *saponifikacija*, iako tom prilikom može doći do njihove degradacije. *Enzimsko oslobađanje* (**Andreasen i sar., 1999**) je alternativna, ali manje zastupljena tehnika (**Stalikas, 2007**). Premda se reakciona vremena i temperature pri kiseljoj hidrolizi znatno razlikuju, uopšteni metod obuhvata tretman biljnog ekstrakta ili uzorka hrane neorganskom kiselinom (najčešće hlorovodoničnom) na temperaturama refluksa ili višim u vodenom ili alkoholnom rastvaraču (najviše se upotrebljava metanol). Koncentracija se kreće od 1 do 2 N vodenog rastvora hlorovodonične kiseline, a reakciona vremena od 30 min do 1 h. Autori **Gao i Mazza (1994)** su u svojim istraživanjima pokušali da nađu uslove pod kojima se, pri kiseljoj hidrolizi, obezbeđuje maksimalno očuvanje fenolnih kiselina. Smeša 2 N HCl i metanola (1:1 v/v) na 100 °C tokom 1 h je dala najviši povrat fenolnih kiselina (30-65%). Rastvarači kao što su etanol, *terc*-butil alkohol i 2-propanol su dali niže vrednosti, a vodeni rastvor HCl je uništio hidroksicimetne kiseline. Gubitak pri kiseljoj hidrolizi varira

između fenolnih kiselina krećući se od 15 do 95% za *o*-kumarinsku i sinapinsku kiselinu, redom (**Krygier i sar., 1982**).

Saponifikacija podrazumeva tretman uzorka rastvorom NaOH u opsegu koncentracija od 1 do 4 M. Većinom se reakcije odigravaju na sobnoj temperaturi i traju od 15 min do 24 h. U cilju očuvanja analita reakcije se mogu izvoditi u mraku i pod inertnom atmosferom kao npr. u atmosferi argona ili azota. U ređim slučajevima se saponifikacija izvodi uz stalno mućkanje.

Enzimske reakcije mogu osloboditi fenolne kiseline (uglavnom ferulnu, i *p*-kumarinsku kiselinu). Enzimi koji oslobađaju ove kiseline (pektinaze, celulaze, amilaze) deluju cepanjem ugljenohidratnih veza, a mehanizam njihovog dejstva je cepanje acetalnih ili hemiacetalnih veza između ugljenohidratnog ostatka i hidroksilne grupe aromatičnog prstena, a ne cepanje estarskih veza. Drugim rečima, derivati fenolnih kiselina se oslobađaju ovim putem iz ćelijskih zidova, a ne iz estarske veze.

Neke od veza između hidroksilnih grupa aromatičnog prstena i šećera ili drugih polifenola su etarske veze. Ove veze se takođe najčešće sreću u strukturnim komponentama biljaka.

Procedure pripreme uzoraka za analizu fenolnih kiselina znatno variraju – od “filter and shoot“ pripreme koja se primenjuje kod napitaka, do komplikovanijih priprema koje obuhvataju hidrolizu glikozida i ekstrakciju/prečišćavanje pre analize. S obzirom na veliki asortiman polifenolnih jedinjenja u smislu raznolikosti, polarnosti, kiselosti, broja hidroksilnih grupa i aromatičnih prstenova, nivoa koncentracija i složenosti matriksa, ne postoji koherentnost u izboru procedure pretretmana.

Takođe, ne postoji definitivna, konačna metoda hidrolize. Iako dodatni koraci koji uključuju hidrolizu otvaraju nova pitanja vezana za pripremu uzorka, stabilnost i povrat analita, cepanje estarske veze u znatnoj meri pojednostavljuje analizu smanjenjem broja derivata. Potrebno je mnogo istraživanja da bi se povećala selektivnost i osetljivost metode, uz istovremeno izbegavanje interferenci i smanjenja povrata analita prilikom procedure kvantitativnog oslobađanja fenolnih kiselina iz biljnog matriksa i pripreme uzorka za hromatografsku analizu (**Stalikas, 2007**).

2.2.5.1. Uticaj dodatka antioksidanta i metal helatora tokom hidrolize

Kao što je već navedeno, poznato je da su fenolne kiseline retko prisutne u biljkama u slobodnom obliku. Češće se sreću kao estri, glikozidi i vezani kompleksi. Iz tog razloga se, radi određivanja njihovog ukupnog sadržaja, primenjuju hidrolitičke procedure. Međutim, uočen je gubitak fenolnih kiselina tokom alkalne hidrolize sa 4N NaOH, pri inkubacionom vremenu od 4h, u atmosferi N₂, koji za neke fenolne kiseline (*o*-kumarinsku, *p*-kumarinsku, izoferunu, ferulnu) nije prelazio 10% od inicijalnih koncentracija, dok je za kafenu i sinapinsku kiselinu iznosio 67% i 36,5% redom. Tokom izloženosti kiseljoj hidrolizi, gubitak derivata hidroksicimetnih kiselina se pokazao kao još dramatičniji (Krygier i sar., 1982).

Spontana oksidacija kafene kiseline, naročito pri alkalnim pH vrednostima je još mnogo ranije saopštena u literaturi (Cilliers i Singleton, 1989; Cilliers i Singleton, 1991). Sprečavanje oksidacije kafene kiseline (Cilliers i Singleton, 1990), kao i regeneracija kafene kiseline od fenoksil radikala pod uticajem askorbinske kiseline (Laranjinha, 2001; Laranjinha i Cadenas, 1999) su takođe navedeni u literaturi, dok je pokazano da kupri joni Cu²⁺ katalizuju oksidaciju kafene kiseline pri neutralnom pH (Nardini i sar., 1995).

U sprečavanju degradacije fenolnih kiselina tokom alkalne hidrolize ispitan je uticaj dodatka L-askorbinske kiseline kao snažnog antioksidanta i EDTA (etilen diamin tetra sirćetna kiselina) kao metal helatora (Nardini i Ghiselli, 2004; Nardini i sar., 2002). Prisustvo 10 mM EDTA tokom alkalne hidrolize je rezultiralo većim povratom (eng. *recovery*) kafene kiseline (55.4 ± 6.0% od početne vrednosti). Međutim, EDTA samostalno nije uspela da spreči gubitak kafene kiseline čak ni u većim koncentracijama (100 mM). Prisustvo 1% L-askorbinske kiseline bilo samostalno, bilo zajedno sa EDTA, potpuno je sprečilo degradaciju kafene kiseline. Čak ni nakon 2-časovne inkubacije u prisustvu 1% askorbinske kiseline i 10 mM EDTA, nije ustanovljen njen značajniji gubitak. Ispitano je dejstvo kombinacije 10 mM EDTA – 1% askorbata na povrat nekoliko fenolnih kiselina podvrgnutih alkalnoj hidrolizi. Među njima su dihidrokafena kiselina i homogentisinska kiselina (uz već pomenutu kafenu kiselinu) gotovo sasvim nestale tokom alkalne hidrolize. Gubitak tih jedinjenja potpuno je sprečen dodavanjem

kombinacije EDTA + askorbat. Dihidroferulna kiselina i sinapska kiselina su pokazale delimičan gubitak nakon alkalne hidrolize, koji je u potpunosti izbegnut dodavanjem EDTA i askorbinske kiseline (Nardini i Ghiselli, 2004; Nardini i sar., 2002). U tim uslovima (10 mM EDTA, 1% askorbinske kiseline), alkalna hidroliza hlorogenske kiseline je rezultirala potpunim povratom oslobođene kafene kiseline (97.0 - 2.8% od očekivane vrednosti u poređenju sa 22.0 - 11.5% u odsustvu EDTA - askorbata).

2.2.6. HROMATOGRAFSKO RAZDVAJANJE I DETEKCIJA

Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC tj. LC) je trenutno analitička metoda izbora za razdvajanje polifenola. Osim HPLC-a, koriste se i druge separacione tehnike, kao što su: gasna hromatografija (GC), tankoslojna hromatografija (TLC), kapilarna elektroforeza (CE) i spektrometrijske tehnike (Bernal, i sar., 2011; Robards, 2003). Klasična kolorimetrijska (spektrofotometrijska) metoda za analizu ukupnog sadržaja polifenola je Folin-Ciocalteu kojom se meri ukupna koncentracija fenolnih hidroksilnih grupa u biljnom ekstraktu. Polifenoli iz ekstrakta reaguju sa specifičnim redoks reagensom (Folin-Ciocalteu reagens) i stvaraju plavi kompleks koji se može kvantifikovati UV/VIS spektrofotometrijom. Reakcija stvara plavu hromoforu, a maksimum absorpcije hromofore zavisi od alkalnosti rastvora i koncentracije fenolnih jedinjenja. Glavni nedostatak spektrofotometrijskih metoda je u tome što daju samo procenu ukupnog sadržaja polifenola, bez razdvajanja i kvantifikacije pojedinačnih jedinjenja (Blainski et al., 2013). Osim toga spektrofotometrijske metode precenjuju sadržaj polifenolnih jedinjenja (Escarpa i González, 2001).

Rana hromatografska razdvajanja su koristila papirnu (PC) ili tankoslojnu (TLC) hromatografiju. Papirna hromatografija kao stacionarnu fazu koristi Whatman filter papir, a tankoslojna silika gel, celulozu i poliamid. TLC je brza, jeftina metoda koja omogućuje istovremeno ispitivanje nekoliko uzoraka. Još uvek se koristi za određivanje fenolnih kiselina u biljnom materijalu u analizi prirodnih proizvoda. Njen glavni nedostatak je ograničena kvantifikacija.

Kao što je već rečeno, HPLC je najčešće upotrebljavana tehnika za razdvajanje i kvantifikaciju polifenola. Polifenoli nižih molekulskih masa se mogu analizirati HPLC-

om na reverzno-faznim ili normalno-faznim kolonama. Pri tome se dominantno koriste obrnuto-fazne (eng. *reversed-phase*) C18 kolone promera 2.1 – 5 mm, veličine čestica 3 – 5 μm i binarni sistem rastvarača sa zakišljenom vodom (rastvarač A) i polarnim organskim rastvaračem, takođe najčešće zakišljenim (rastvarač B). Kiseline koje se koriste su: sirćetna, perhlorna ili mravlja. Trifluorsirćetna kiselina u oba rastvarača poboljšava rezoluciju i eliminiše tegljenje pikova katehina. Iako postoji velika raznolikost u procentualnom sastavu sistema rastvarača, izbor organskih rastvarača je uglavnom stalan: metanol i acetonitril, ređe propanol, butanol, tetrahidrofuran i etil-acetat. Vremena analize variraju od 30 do 150 min pri čemu istovremeno određivanje flavonoida – polifenola većih molekulskih masa sa fenolnim kiselinama produžava vreme analize. Protoci se kreću 0,15 – 1,8 ml/min, najčešće 1 ml/min. Injekcione zapremine se ređe pominju (10 – 20 μl), kao i temperature kolone (20 - 45 °C). Ipak, bitno je pomenuti da duga vremena analize zahtevaju konstantnu temperaturu radi reproduktivnosti retencionih vremena..

U separaciji i određivanju polifenola HPLC na obrnutim fazama koristi različite sisteme detekcije kao što su UV-VIS, PDA detektor, masena ili tandem masena spektrometrija. Hidroksibenzojeve kiseline imaju imaju λ_{max} u opsegu 200 – 290 nm. Jedini izuzetak je gentisinska kiselina sa apsorbcijom koja se kreće do 355 nm. Kompleksnija polifenolna jedinjenja (flavonoidi) pokazuju drugu apsorpcionu traku sa maksimumom u opsegu 300-550 nm koju izaziva B prsten. Hidroksicimetne kiseline zahvaljujući dodatnoj konjugaciji pokazuju još jedan opseg apsorbcije 270 – 360 nm. S obzirom da apsorpcioni spektri raznih fenolnih kiselina mogu biti veoma slični, njihova identifikacija se vrši poređenjem UV-VIS spektara sa spektrima kupovnih standarda, ali i retencionih vremena (**Abad-García i sar., 2007; Bernal, i sar., 2011; Robbins, 2003; Escarpa i González, 2000**).

U kompleksnim matriksima prekoncentracija i prečišćavanje polifenola je neophodan korak pre instrumentalne analize HPLC-om, da bi se postigli zadovoljavajući detekcioni limiti i osetljivost. Cilj prekoncentracije je pojednostavljenje hromatograma, da bi se pouzdano mogli identifikovati i kvantifikovati pikovi. Prečišćavanje je kritičan korak metode, a uklanjanje potencijalno ometajućih supstanci zavisi od analiziranog biljnog matriksa. Čak iako se primeni efikasno prečišćavanje, biljni ekstrakt i dalje može

da sadrži nekoliko interferirajućih komponenti. Na primer, pri određivanju derivata hidroksicimetnih kiselina u vodeno-alkoholnom rastvoru bobičastog voća mogu biti prisutni strukturno slični antocijani. Visoka koncentracija antocijana ometa razoluciju HPLC-DAD analize s obzirom da antocijani imaju visoku apsorbanciju na uobičajenoj talasnoj dužini koja se koristi za detekciju hidroksicimetnih kiselina, t.j. na 320 nm.

Tokom poslednje dekade intenzivan razvoj tečne hromatografije doveo je do „kvantnog skoka“ u performansama komercijalnih LC instrumenata. Najznačajniji razvoj predstavlja pojava tečne hromatografije ultra visokog pritiska (UHPLC), tečne hromatografije na visokim temperaturama (HTLC), multidimenzionalne LC (MDLC), kao i razvoj novih stacionarnih faza za HPLC kolone (monolitičkih, zatim potpuno poroznih (eng. *core-shell*) i faza zasnovanih na cirkonijumu (Zr)) kao i kolona sa dobrom termalnom stabilnošću (do 80 °C). Ove tehnologije su primenjene i na određivanje polifenola (**Kalili i de Villiers, 2011**).

Masena spektrometrija je analitička tehnika koja se između ostalog koristi i za razjašnjavanje hemijske strukture molekula kao što su peptidi, polifenoli itd. Masena spektrometrija ima veoma značajnu ulogu u istraživanju i njena analitička moć je važna za izučavanje strukture polifenolnih jedinjenja. **Steinmann i Ganzera (2011)** u svom revijalnom radu daju pregled aplikacija spregnutih tehnika (eng. *hyphenated*) - visokoefikasne tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom (LC-MS) u analizi biljaka koje se koriste u medicinske svrhe, sa navedenim analitima, matriksima, LC uslovima (odabrana kolona, rastvarači), masenim izvorima i navodom da li je metoda validisana. Među analitima su navedene i fenolne kiseline i flavonoidi. **Kalili i de Villiers (2011)** u svom revijalnom radu navode studije gde su poređene UHPLC i HPLC analize polifenolnih jedinjenja, kao i kombinacije UHPLC ili HPLC tehnika sa tandem masenom spektrometrijom (MS/MS) u istovremenom određivanju velikog broja fenolnih kiselina i flavonoida.

Gasna hromatografija je još jedna tehnika koja se koristi za razdvajanje i identifikaciju raznih fenolnih kiselina. Gasnohromatografske metode zahtevaju derivatizaciju do isparljivih jedinjenja metilacijom, trifluoroacetilacijom i detekciju masenom spektrometrijom u SIM (selective ion monitoring) modu (GC/MS-SIM). GC u kombinaciji sa masenom spektrometrijom ima odličan separacioni kapacitet i visoku

osetljivost i selektivnost. Međutim, priprema uzoraka za GC je veoma problematična, uključujući tu uklanjanje lipida iz ekstrakta, oslobađanje fenolnih jedinjenja iz estarskih i glikozidnih veza, kao i derivatizaciju slabo isparljivih polifenola koja često zna biti nekompletna i sa dosta nusprodukata koji komplikuju analizu hromatograma.

2.3. SIROVINE ZA DOBIJANJE ULJA KAO IZVORI POLIFENOLA

Semena sa visokim sadržajem ulja su jedan od najbogatijih izvora mikrokonstituenata, kao što su masne kiseline, karotenoidi, tokoferoli, polifenoli, fitosteroli i drugih jedinjenja sa biološkom aktivnošću. Poslednjih godina primećen je pojačan interes za dobijanje ulja iz nekonvencionalnih semena (**Górnaš i sar., 2013**). Sirovine za dobijanje ulja u koje spadaju tradicionalne uljarice kao i biljke čije seme ili plod može poslužiti za proizvodnju specijalnih, lekovitih ulja, pored manje polarnih antioksidanata rastvornih u uljanoj fazi, sadrže i polarnije, antioksidante rastvorne u vodenoj fazi. Liposolubilni antioksidanti se ekstrahuju zajedno sa uljem tokom presovanja, dok polarniji ostaju u pogačama. Uljana pogača ili pogača (eng. *oil cake, oil press-cake, seed cake, meal*) je često neselektivno korišćen izraz s obzirom da se upotrebljava za opisivanje ostatka nakon presovanja ulja, bez obzira da li on potiče od semena uljarica ili od uljanih semena koja služe za proizvodnju lekovitih odnosno biološki aktivnih ulja. Takođe, pomenuta semena koja se koriste u proizvodnji ulja na engleskom jeziku često dele isti naziv (*oilseed*) iako je bitno napraviti razliku. Adekvatniji naziv je semena bogata uljem (eng. *oil-bearing seeds*).

S obzirom na „koncentrisanje“ polarnih antioksidanata u pogačama, njihov sadržaj je veći nego u odgovarajućim semenima. Tako i većina polifenolnih jedinjenja ostaje u uljanoj pogači (**Zago i sar., 2015**). Semena bogata uljem su često zaštićena opnom ili ljuskom koja se uglavnom uklanja pre proizvodnje ulja, s obzirom da ne doprinose sadržaju ulja. Ljuske, opne, kore i drugi nusproizvodi sadrže relativno visoku koncentraciju polifenola, uglavnom veću od semena biljnih vrsta od kojih potiču, te se i oni mogu koristiti kao izvori antioksidanata. Nusproizvodi industrije hladno presovanih ulja - uljane pogače koje potiču od tradicionalnih uljarica, kao i drugi ostaci nakon presovanja biološki aktivnih ulja su i dalje nedovoljno istraženi i iskorišćeni.

2.3.1. ULJANA TIKVA (*Cucurbita pepo* L.)

Uljana tikva (*Cucurbita pepo* L.) je plemeniti varijetet obične tikve (**Berenji i Sikora, 2011**) i spada u tradicionalne uljarice. Uzgajanje uljane tikve je široko

rasprostranjeno na prostorima Austrije, Slovenije, Mađarske, Hrvatske i Vojvodine. Za razliku od stočne, uljana tikva se gaji radi proizvodnje ulja, a meso ploda je sporedni proizvod. I obična stočna tikva se može ubrajati među uljane tikve, s obzirom da se i seme stočne tikve može iskoristiti za dobijanje ulja. Semena uljane tikve su eliptična ili zaobljena i malo spljoštena. Mogu imati žuto-bele ljuske, dok su semena nekih bundeva bez ljuske (tikva golica) i imaju samo vrlo tanku tamno-zelenu opnu. Izdvojena mutacija se javila u XIX veku i dovela do nastanka tamno zelenih semena sa zakržljalom spoljnom ljuskom. Ova mutacija je olakšala proizvodnju ulja koje je postalo regionalni specijalitet u južno-istočnom delu Evrope (**Fruhworth i Hermetter, 2008**). Danas dva poznata varijeteta *C. pepo* L. semena su prikazana na Slici 5 (a, b).



a) sa ljuskom



b) seme golice

Slika 5. Semena uljane tikve

Prisustvo mnoštva biološki aktivnih jedinjenja u visokim koncentracijama kao što su α - i β -karoten, β -kriptoksantin, lutein i zeaksantin, polisaharidi, fitosteroli, nezasićene masne kiseline, proteini i peptidi čini *Cucurbita* vrstu izuzetno interesantnom za industriju fitohemikalija (**Durante i sar., 2014**).

Semena uljane tikve su opisana u pozitivnoj monografiji nemačke E komisije kao lek. Golica je, u odnosu na semena sa ljuskom, bogatija Δ^7 -sterolima. Seme tikve, kao i ekstrakti dobijeni iz njega, sadrže kompleksnu smešu supstanci i njihovo dejstvo se najverovatnije ne može pripisati samo jednom sastojku. Δ^7 -Steroli su značajni u tretmanu benignog uvećanja prostate (BHP), patološkog stanja koje najčešće pogađa muškarce

starije od 50 godina (**Gutierrez, 2016; Strobl, 2004**). Osim toga, semena tikve sadrže citrulin kom se pripisuju anti-edematozni efekat, karotenoide, selen, cink, linolnu, oleinsku, palmitinsku, stearinsku kiselinu i magnezijumove soli. Bogata su vitaminima rastvorljivim u ulju, naročito γ -tokoferolom (**Murkovic i sar., 1996**) i karotenoidima. Seme se u narodnoj medicini upotrebljava za lečenje iritabilne bešike, oboljenja slezine i pluća, gastritisa, glavobolje, malokrvnosti, čira na želucu itd. (**Gutierrez, 2016**).

Seme tikve se odlikuje većom hranljivošću u odnosu na mezokarp. Sadrži visok procenat ulja (22 - 46%) koji zavisi od sorte, visok procenat proteina (25 - 45%), a sadržaj vlage i pepela je oko 5% (**Gohari Ardabili i sar., 2011; Idouraine i sar., 1996; Lazos, 1986; Younis i sar., 2000**). Istraživanja *in vitro* su dokazala da glavni rezervni protein, kukurbitin, iz uljane tikve pokazuje antiparazitsku aktivnost, što potvrđuje preporuku narodne medicine za upotrebu semena uljane tikve kao antihelmintika pri pojavi dečijih glista i pantljičare. Seme uljane tikve sadrži svih 9 esencijalnih aminokiselina (**Kim i sar., 2012**). Takođe je dobar izvor magnezijuma, mangana, fosfora i fitosterola (**Rabrenović, 2011**).

Nusproizvodi nastali prilikom hladnog presovanja tikvinog ulja su još uvek nedovoljno iskorišćeni. Nakon ljuštenja semena varijeteta s ljuskom, samo jezgra bivaju iskorišćena, dok se ljuske odbacuju. **Nyam i sar. (2013)** su saopštili da je sadržaj sirovih vlakana u semenu i ljusci 31,48% i 14,83%, redom. Uljana pogača tikve se uglavnom koristi u stočnoj ishrani, iako se polako povećava broj njenih primena u prehrambenoj industriji. Zbog visokog sadržaja proteina \approx 61% i određenih funkcionalnih osobina, brašno dobijeno mlevenjem uljane pogače može potencijalno predstavljati hranu (**Bavec i sar., 2007**). **Sokoto i sar. (2013)** su saopštili da uljana pogača tikve sadrži 2,76 % vlage i 5,35% pepela.

Uljana tikva ima visoku hranjivu i nisku kalorijsku vrednost. Iako je njen sastav često proučavan, broj studija o razdvajanju i identifikaciji fenolnih i drugih polarnih jedinjenja u raznim delovima (seme, meso, ulje) je ograničen (**Iswaldi i sar., 2013**). Prisustvo malih količina fenolnih kiselina (**Dragovic-Uzelac i sar., 2005, Tuberoso i sar., 2007**) je nađeno u ljusci (vanilinska, *p*-kumarinska i sinapinska kiselina), u pireu (hlorogenska, siringinska i kafena kiselina) i u ulju (*p*-kumarinska i trans-cimetna kiselina). **Iswaldi i sar. (2013)** su ispitali sadržaj fenolnih kiselina i njihovih derivata,

flavonoida i organskih kiselina u celom plodu tikve (*Cucurbita pepo L.*), u dva varijeteta. Od fenolnih kiselina detektovane su *p*-kumarinska, ferulna, kaftarinska kiselina (estar kafene i vinske kiseline), hlorogenska (estar kafene i hininske kiseline), kafena, sinapinska, protokatehinska, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, *p*-hidroksibenzaldehid, benzoeva, vanilinska kiselina i još neki derivati. Od flavonoida, identifikovani su: luteolin, kvercetin, izoramnetin, robinin, kempferol, uglavnom u glikozidnom obliku.

2.3.2. NAR (*Punica granatum L.*)

Nar je egzotično tropsko voće sa Bliskog istoka ([Ayala-Zavala i sar., 2011](#)), poslednje decenije intenzivno izučavano. Autori [Lansky i Newman \(2007\)](#) su u revijalnom radu dali opširan pregled hemijskog sastava nara (sok, list, cvet, seme, kora drveta, kora korena). Plod nara se sastoji iz perikarpa (kore i opne) i jestivog semena (Slika 6). Seme se sastoji iz spoljnog mesnatog crvenog dela (pulpe) i smeđeg sitnog čvrstog jezgra u unutrašnjosti. Oko 50% ukupne mase ploda čini perikarp, u kom se kriju mnoga bioaktivna jedinjenja kao što su flavonoidi, elagitanini, proantocijanidini. Jestivo seme čini preostalih 50% mase ploda, dok se sadržaj ulja kreće 12 - 27% od ukupne mase semena ([Lansky i Newman, 2007](#); [El-Nemr i sar., 1990](#); [Viuda-Martos i sar., 2010](#)).



Slika 6. Delovi ploda nara

U Tabeli 3. su prikazana glavna jedinjenja prisutna u raznim delovima biljke nara i soka dobijenog iz semena ([Sreekumar i sar. 2014](#); [Shaban i sar., 2013](#); [Viuda-Martos i sar., 2010](#)).

Tabela 3. Sastojci različitih delova drveta i ploda nara

Deo biljke <i>Punica granatum L.</i> ili proizvod	Jedinjenja
Sok	Antocijani, glukoza, alifatične organske kiseline, askorbinska, elaginska, galna, kafena, hininska kiselina, elagitanini, katehin, kvercetin, rutin, flavonoli, šećeri, aminokiseline, minerali
Ulje	Konjugovana linoleinska, linolna, oleinska, stearinska, punicinska, eleostearinska, katalpinska, galna, hlorogenska, kafena kiselina
Perikarp	Luteolin, kvercetin, kempferol, galaginska, elaginska kiselina, glikozidi elaginske kiseline, punikalagin, punikalin, pedunkulagin, galna, kafena kiselina, peletierinski alkaloidi
Lišće	Elaginska kiselina, masne kiseline, ugljeni hidrati, redukujući šećeri, steroli, saponini, flavanoidi, tanini, piperidinski alkaloidi, flavoni, glikozidi, elagitanini
Cvet	Polifenoli, punikalagin, punikalin, elaginska, galna kiselina, triterpenoidi, masne kiseline
Seme	3,3'- di- <i>O</i> -metilelaginska, 3,3',4' -tri- <i>O</i> -metilelaginska kiselina, punicinska, oleinska, palmitinska, stearinska, linolna kiselina, steroli, tokoferoli, gonadalni steroidi
Korenje i kora drveta	Elagitanini, alkaloidi (piperidinski, pirolidinski, peletierinski), galna, hlorogenska, kafena kiselina

U plodu nara nalazi se 124 različitih fitohemikalija. U različitim delovima ploda identifikovano je ukupno 48 polifenola. Kora nara sadrži uglavnom hidrolizabilne tanine (među kojima dominiraju monomerni polifenoli) čija je koncentracija znatno veća nego u ostalim delovima ploda (Akhtar i sar., 2015).

Ayala-Zavala i sar. (2011) su u svom revijalnom radu analizirali agro-industrijski potencijal nusproizvoda prerade egzotičnog voća kao izvora prehrambenih aditiva i pri tom saopštili da sadržaj polifenola u kori nara iznosi 24,99%, a sadržaj askorbinske kiseline 0,12%; dok ovi sadržaji za pulpu iznose 2,44% i 10,2% redom. Crveni mesnati deo semena sadrži antocijane koji su zaslužni za njegovu jarko crvenu boju, kao i druge polifenole. Zdravstveno povoljna dejstva se pripisuju širokom opsegu prisutnih fitohemikalija, među kojima dominiraju polifenoli, prvenstveno hidrolizabilni elagitanini, antocijani kao i masne kiseline jedinstvenog profila (Johanningsmeier i

Harris, 2011). *In vitro* i *in vivo* studije su pokazale da nar ima antioksidantno, antidijabetično, hipolipidemijsko, antibakterijsko, antiinflamatorno, antiviralno, hemopreventivno i hemoterapeutsko (kancer prostate i dojki) dejstvo (**Costantini i sar., 2014; Kim i sar., 2002; Mehta i Lansky, 2004; Sreekumar i sar. 2014; Viuda-Martos i sar., 2010**). Esktrakti kore i ulja nara pokazali su protektivno dejstvo na promene na jetri indukovane dietilnitrozaminom i fenolbarbitalom (**Shaban i sar., 2013**) i ugljen tetrahloridom (**Ashoush i sar., 2013**). Plod nara takođe poboljšava kardiovaskularno i oralno zdravlje. Sok, kora i ulje pokazuju blagu estrogensku aktivnost (**Borouhaki i sar., 2016**). Seme nara sadrži ulje sa visokim procentom konjugovanih masnih kiselina koje imaju ulogu u normalizovanju metabolizma masti kod gojaznih i hiperlipidemičnih pacijenata (**Mirmiran i sar., 2010**) i smanjuju masno tkivo (**McFarlin i sar., 2009**). Najvažnija, sa sadržajem većim od 60% je punicinska kiselina, konjugovana linoleinska kiselina (CLnA). Na proteine, nerastvorna vlakna i pepeo otpada približno 13, 35 i 2%, redom (**El-Nemr i sar., 1990**).

2.3.3. CRNI KIM (*Nigella sativa* L.)

Islamskom proroku Muhamedu se pripisuju reči da crni kim leči sve osim smrti. U drevnom Egiptu ulje crnog kima je smatrano za lek za sve bolesti i sva zla. U grobnici faraona Tutankamona nađena je boca ulja crnog kima, koja je trebalo da mu obezbedi savršeno zdravlje u zagrobnom životu. Semena crnog kima se u mnogim zemljama koriste kao začini; u pripremi tradicionalnog slatkog jela koje se sastoji od paste crnog kima zaslađene medom ili sirupom; u aromatizovanju pekarskih proizvoda i sireva. Ulje crnog kima se smatra za jedno od novijih jestivih ulja koje, kao i seme, ima važnu ulogu u ljudskoj ishrani i održanju zdravlja (**Ali i sar., 2012**).

U islamskoj kulturi crni kim (Slika 7.) se smatra za jednu od biljaka sa najvećim isceliteljskim moćima. Njegovo dejstvo je antihipertenzivno, diuretično, karminativno, digestivno-stimulatorno, analgetično, antimikrobno, antizapaljensko, hepatoprotektivno, bronhodilatatorno, antioksidantno itd. (**Al-Jassir, 1992**). Većina terapijskih dejstava se pripisuje prisustvu timokinona koji je glavna bioaktivna komponenta esencijalnog ulja (**Ahmad i sar., 2013**). Popularnost ove biljke dodatno je pojačana narodnim uverenjem

da predstavlja lek za mnoge bolesti. Naučna istraživanja su opravdala ovo uverenje, s obzirom na složeni hemijski sastav semena. Seme crnog kima sadrži preko 100 različitih hemijskih sastojaka, uključujući i sve esencijalne masne kiseline (Ramadan, 2007).



Slika 7. Seme i ulje crnog kima

Sadržaj ulja u semenu je 28 - 35,5%, proteina 20 - 27%, vlage 5,4 - 7,0 % i pepela oko 3,70 - 6,72% (Cheikh-Rouhou i sar., 2007; Nergiz, C. i Ötleş, 1993; Khoddami i sar., 2011). Gharby i sar. (2015) navode da je sadržaj ulja u većini ispitivanih semena crnog kima veći od 30%, a može da se kreće i do 40%, međutim, fenološki uticaji (nedostatak vode, sadržaj soli u zemljištu, niske temperature) mogu smanjiti ovaj procenat na 13 – 23%.

Mariod i sar. (2009) su istražili antioksidantnu aktivnost i sadržaj polifenola metanolnog ekstrakta i njegovih etil-acetatnih, heksanskih i vodenih frakcija dobijenih iz pogača semena crnog kima. Dominantna fenolna jedinjenja identifikovana HPLC–DAD tehnikom u metanolnom ekstraktu bila su: *p*-hidroksibenzoeva, siringinska i *p*-kumarinska kiselina. Mimo toga, sadržaj polifenola u crnom kimu je vrlo retko istraživan,

uglavnom kao ukupan sadržaj polifenola (**Nogala-Kalucka i sar., 2010**), dok je identifikacija pojedinačnih komponenata izuzetno retka.

2.3.4. LAN (*Linum usitatissimum* L.)

Lan je poznat još od kamenog doba. Potiče iz Mesopotamije i ima dugu istoriju upotrebe. Danas se lan uzgaja zbog dve primene: radi proizvodnje prediva i radi proizvodnje ulja. Laneno seme (Slika 8) je široko poznato po svom zdravstveno povoljnom dejstvu zbog sadržaja vlakana, fitoestrogena, proteina i minerala (fosfor, magnezijum, kalcijum, sumpor, cink). Osim toga, laneno seme je jedinstveno po visokoj koncentraciji omega 3 masnih kiselina (**Madhusudhan, 2009**), prvenstveno α -linolenske kiseline, koje su deficitarne u zapadnjačkom načinu ishrane, a neophodne u zaštiti organizma od tromboze, određenih tipova kancera, kao i radi adekvatnog imunog i antiinflamatornog odgovora.



Slika 8. Seme lana

Zbog visokog sadržaja vlakana laneno seme umanjuje rizik od koronarnih bolesti, raka debelog creva i gojaznosti. Fitoestrogeni deluju zaštitno na zdravlje kostiju i sprečavaju nastanak hormonski zavisnih kancera kod žena. Laneno seme je takođe odličan izvor arginina, glutamina i histidina, tri aminokiseline za koje je poznato da imaju jak uticaj na imuni odgovor organizma (**Madhusudhan, 2009; Oomah, 2001**). **Hussain i**

sar. (2008) i **Coşkuner i Karababa (2007)** su saopštili da je sadržaj vlage, proteina, ulja, pepela i vlakana u semenu 4 - 8 %, 20 - 25%, 30 - 40%, 3 - 4 % i oko 8%, redom. Nutritivna vrednost i niska alergenost proteina semena lana i njihov aminokiselinski profil su slični sojinom zbog čega su predložene njegove brojne primene (**Kaushik i sar., 2016; Rabetafika i sar., 2011; Yang i sar., 2004**). Laneno seme je i bogat izvor različitih polifenola kao što su lignani, fenolne kiseline, flavonoidi, fenilpropanoidi i tanini (**Kasote, 2013, Oomah i sar., 1995**). Biljni lignani su biološki važna klasa polifenola, a njihov najbogatiji izvor je lan.

Sekoizolaricirezinol diglukozid (SDG) je lignanski makromolekul, estarski vezan hidroksimetil-glutarnom kiselinom (HMGA) ili drugim polifenolima kao što su glukozidi hidroksicimetnih kiselina: *p*-kumarinske i ferulne. Sadržaj SDG iznosi 6 – 29 g/kg u odmašćenom samlevenom semenu, a njegov sadržaj takođe zavisi od mesta gajenja i godine. SDG se uz pomoć bakterija debelog creva pretvara u lignane sisara: enterodiol i enterolakton (**Kasote, 2013; Struijs i sar., 2008**), koji uravnotežuju polne hormone, što se manifestuje ublažavanjem teškoća u menopauzi, očuvanjem zdravlja kostiju i smanjenjem gubitka kose. Osim SDG, manje količine ostalih tipova lignana: matairezinol, izolaricirezinol, laricirezinol i pinorezinol su takođe identifikovane u lanenom semenu. Takođe, u lignanskom makromolekulu lanenog semena potvrđeno je i prisustvo kafene kiseline i njenog glukozida (**Dabrowski i Sosulski, 1984; Kosińska i sar., 2011**). Prisutne slobodne fenolne kiseline nađene u semenu lana su: *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, *o*- i *p*-kumarinska i sinapinska (**Kasote, 2013**). **Terpinc i sar. (2012)** tabelarno navode fenolne kiseline, njihove derivate i flavonoide nađene u uljanim pogačama kameline (divljeg lana), lana, uljane repice i belog senfa. U uljanoj pogači lana od fenolnih kiselina su bile prisutne: protokatehinska, galna, vanilinska, gentisinska, *p*-hidroksibenzoeva, siringinska, *o*- i *p*-kumarinska, ferulna, sinapinska, kafena i hlorogenska kiselina.

2.3.5. HLADNO PRESOVANA ULJA

Postoje dve osnovne kategorije jestivih ulja, a to su: rafinisana i nerafinisana ulja. U jestiva nerafinisana ulja spadaju hladno presovana (čiji je drugi naziv hladno ceđena

ulja) i devičanska ulja. Usled odsustva rafinacije, jestiva nerafinisana ulja imaju specifična senzorska svojstva - miris i ukus na izvornu sirovinu (Dimić, 2005). Na našem tržištu npr. tikvino ulje se pojavljuje kao devičansko i hladno presovano ulje. Osnovna razlika u tehnološkom procesu proizvodnje je u pripremi semena. Kod devičanskog ulja dozvoljeno je zagrevanje (kondicioniranje) materijala pre presovanja, a kod hladno presovanog nije. Iako ne postoji zakonska regulativa za visinu temperature pri hladnom presovanju, smatra se da je 50° C gornja granica procesa (Haumann, 1997). Najveća prednost presovanja toplim pogonom je dobijanje veće količina ulja nego pri hladnoj tehnologiji, što znači da u uljanim pogačama dobijenim hladnim presovanjem ostaje više rezidualnog ulja.

Razlika između ulja semene tikve dobijena na jedan od dva pomenuta načina ogleđa se u senzorskom i hemijsko-nutritivnom kvalitetu, kao i u održivosti ulja (Vujasinović i sar., 2010; Dimić, 2000). Mnogi antioksidanti u uljanim semenima nisu rastvorljivi u uljima (zbog konjugacije sa molekulima šećera), ili je njihova ekstrakcija u ulje mala. Sadržaj polifenola je blisko vezan sa ekstrakcionim procesom ulja, s obzirom da on utiče na raspodelu polifenola između ulja i uljane pogače. Poznato je da se veći sadržaj polifenola oslobađa iz semena kada se ulje ekstrahuje na visokim temperaturama i pod visokim pritiskom (Terpinc i sar., 2012). Statistički znatno veći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja nađen je kod devičanskih ulja u odnosu na hladno ceđena ulja tikve (Vujasinović, 2011). Zbog toga, u uljanim pogačama preostalim nakon hladnog presovanja ulja zaostaje veći sadržaj polifenolnih jedinjenja u odnosu na devičanska i rafinisana. U odnosu na rafinisana ulja, devičansko i hladno presovano ulje imaju brojne prednosti: ne sadrže aditive, konzervanse, nisu prošla procese rafinisanja, tretmana hemijskim sredstvima (Vukša i sar., 2003). Osim toga, ovakvi načini proizvodnje su i ekološki prihvatljivi. Pužna presa je pogodna za presovanje, odnosno ceđenje ne samo ulja iz tikvinog semena, nego i za ceđenje najrazličitijih uljanih semena (Berenji, 2014).

Aktuelno je verovanje potrošača da su manje prerađene namirnice i zdravije, kao i da se postupkom rafinacije uklanjaju korisni sastojci ulja. Usled svega toga, poslednjih godina raste interesovanje potrošača za devičanska i hladno ceđena ulja, koja zadržavaju svoj prirodan sastav usled blagog proizvodnog procesa, kao i karakterističan ukus i miris na izvornu sirovinu od koje su nastali. Ona se prodaju kao visoko cenjena specijalna ulja,

čija cena varira u zavisnosti od vrste, a uslovljena je cenom sirovine. Njihovo tržište premda još uvek malo i neznatno u poređenju sa tržištem devičanskog maslinovog ulja ili rafiniranih jestivih ulja, je u stalnom porastu.

Tikvino ulje se, pored toga što je poznato kao salatno ulje, tradicionalno koristi u prevenciji i lečenju problema sa prostatom i mokraćnim putevima. Hladno ceđeno tikvino ulje pomaže i u regulisanju povišenog holesterola.

Za hladno ceđena ulja crnog kima, lana i nara se veruje da poseduju terapeutska dejstva protiv poremećaja rada imunog sistema – bolesti 21. veka, te se koriste kao dijetetski suplementi protiv navedenih stanja, ili kao sastojci u proizvodima za negu kože (**Tolkachev i Zhuchenko, 2000; Lansky i Newman, 2007; Ramadan, 2007, Ramadan i sar., 2012**). Iz navedenih razloga godišnja potražnja za navedenim uljima je takođe u porastu.

Laneno ulje je nerafinisano ulje dobijeno postupkom hladnog ceđenja neoljuštenih, sirovih semenki lana na savremenim pužnim presama. Ulju lanenog semena se pripisuje poboljšanje nutritivnog i zdravstvenog statusa zahvaljujući preventivnom delovanju na koronarne bolesti srca, neke tipove raka, neurološke i hormonske poremećaje. Laneno ulje je bogato lignanima i omega-3 masnim kiselinama (**Herchi i sar., 2011**). Omega 3 masne kiseline smatraju se posebno deficitarnim u ishrani savremenog čoveka (**Choo i sar., 2007**), a neophodne su za pravilno funkcionisanje mozga, mrežnjače, žuči, srca i krvnih sudova. Sadrži visok procenat esencijalnih masnih kiselina (**Kamal-Eldin, 2006**) i koristi se isključivo kao salatno ulje, za pravljenje umaka, kao dodatak jelima za negu kože i kose, ali i u lekovite svrhe. Kako je osetljivo na svetlost i povišenu temperaturu, preporučuje se njegovo čuvanje u frižideru nakon otvaranja.

Ulja crnog kima i nara spadaju u lekovita ulja. Koriste se kao suplementi, odnosno dodaci ishrani i ne preporučuje se prekoračenje njihove propisane dnevne doze. Fiksno ulje (eng. *fixed oil*) crnog kima, kao i ulje nara se takođe dobijaju postupkom hladnog ceđenja. Kao izuzetan imunomodulator (**Salem, 2005**), hladno ceđeno ulje crnog kima pomaže pri lečenju ne samo onih bolesti koje nastaju kao posledica oslabljenog imunološkog sistema, već i onih kod kojih je uzrok preterana imunološka reakcija.

Hladno ceđeno ulje nara je bogato raznim mineralima i vitaminima, posebno gama-tokoferolom, te ima regenerativno i podmlađujuće dejstvo. U dermalnim primenama stimuliše proliferaciju keratinocita (glavni tip ćelija u epidermu), što dovodi do blagog debljanja kože. Kako je starenje kože povezano sa smanjenjem debljine epidermisa, ulje podmlađuje kožu i sprečava njeno prerano starenje. Punicinska kiselina inhibira biosintezu pro-inflamatornih prostaglandina, što takođe pogoduje zreloj koži, s obzirom na njen viši inflamatorni potencijal (**Aslam i sar., 2006; Hora i sar., 2003; Lansky i Newman, 2007**).

2.4. VALORIZACIJA AGRO-INDUSTRIJSKIH OSTATAKA

U razvijenim zemljama 42% ostataka hrane potiče od domaćinstava, 39% iz prehrambene industrije, 14% iz sektora prehrambenih usluga, a preostalih 5% iz prodaje i distribucije, što ukazuje na povećano opterećenje životne sredine. Npr., procenjeno je da na svaku tonu otpada hrane dolazi emisija od otprilike 2 tone CO₂. Na Slici 9. je prikazana prioritizacija rukovanja agro-industrijskim ostacima:



Slika 9. Hijerarhija procesuiranja agro-industrijskih ostataka
(preuzeto od [Lin i sar., 2013](#))

Svetska godišnja proizvodnja hrane u 2015. godini je iznosila približno 1 bilion tona, pri čemu je došlo do stvaranja 309 miliona tona ostataka. U Evropskoj Uniji se promoviše prevencija stvaranja takvih ostataka eko-inovativnim konceptima koji streme društvu sa „nultim otpadom“ (eng. *“zero waste” society*) i ekonomiji u kojoj se ostaci nakon industrijske proizvodnje/nusproizvodi koriste kao sirovina za nove proizvode

(**Kammerer i sar., 2014**). To su zatvoreni sistemi industrijske simbioze, u kojoj se nusproizvodi iz jedne industrije koristi kao ulaz u drugim industrijama.

Ajila i sar. (2012) definišu 6 glavnih upotreba agro-industrijskih ostataka:

- kao sastojci hrane/hraniva
- kao izvor ugljenika za rast mikroorganizama pri proizvodnji vrednih hemikalija i enzima
- u proizvodnji đubriva
- u proizvodnji energije
- povrat proizvoda sa dodatnom vrednošću
- kao adsorbenti metala (zagađivača životne sredine).

Velika količina nusproizvoda koji potiču iz prehrambene industrije pored toga što predstavlja gubitak dragocenih materija, izaziva i probleme u ekonomskom i ekološkom smislu, kao i u pogledu rukovanja njime (**Mirabella i sar., 2014**). Hladno presovanje ulja ne daje visok ekstrakcioni prinos. Nusproizvodi koji zaostaju nakon takve proizvodnje čine 10-30% ulazne sirovine drugih industrijskih procesa. Na kraju, ne treba zanemariti ni izazov prehranjivanja rastuće svetske populacije u 21. veku.

Pored strategija kao što su kompostiranje ili anaerobna digestija, za upravljanje rastućom količinom ostataka ove vrste, u zavisnosti od hemijskog sastava i funkcionalnih osobina vrši se povrat značajnih jedinjenja. Na taj način se može odrediti njihova potencijalna upotreba, npr. za obogaćivanje raznih prehrambenih proizvoda (**Karaman i sar., 2015**).

Ostaci nakon proizvodnje biljnih ulja su bogati jedinjenjima kao što su polifenoli, fitosteroli, karotenoidi, tokoferoli, masne kiseline, proteini, koja mogu imati tehnološku (teksurisanje, bojenje), nutritivnu (vitamini, proteini) ili zdravstveno povoljnu (bioaktivna jedinjenja, antioksidanti) ulogu (**Puértolas i sar., 2016**). Takođe, oni mogu biti dobar izvor antimikrobnih agenasa što je sve od značaja za prehrambenu, kozmetičku i farmaceutsku industriju.

Valorizacija je relativno nov koncept upravljanja nusproizvodima prehrambene industrije. Jedan od ciljeva valorizacije je povrat fitohemikalija iz nusproizvoda industrije ulja (pogače, ljuske itd.), s obzirom da se oni samo delimično iskorištavaju kao stočna

hrana ili kompost, ali nemaju široku primenu u humanoj ishrani niti su dovoljno komercijalno eksploatisani.

2.4.1. Primena agro-industrijskih ostataka i njihovih ekstrakata u funkcionalnoj hrani, nutraceuticima, prirodnoj kozmetici

Izraz “nusproizvod” je u sve češćoj upotrebi s obzirom da se ostaci nakon proizvodnje u prehrambenoj industriji u skladu sa novim trendovima posmatraju kao supstrati za proizvodnju funkcionalnih jedinjenja i dobijanje novih proizvoda sa dodatom tržišnom vrednošću. Iskoristljivi nusproizvodi prehrambene industrije se prema poreklu mogu podeliti na dve glavne kategorije (biljnog ili životinjskog porekla) i sedam podkategorija ([Galanakis, 2012](#)). Jednu od tih sedam podkategorija čine uljarice i mahunarke. U ciljana jedinjenja dobijena iz izvora kao što su: seme sunkcokreta, seme soje, otpadno ulje soje, otpadna voda pri obradi sojinog zrna, komina masline, otpadna voda pri proizvodnji maslinovog ulja navedeni su: fitosteroli, albumin, polifenoli i pektin. U istom radu među navedenim patentiranim proizvodima sa komercijalnom primenom, kora i opna ploda nara su predstavljene kao izvor elagitanina i punikalagina sa primenom u vidu antioksidanata u hrani i kozmetici.

Porast oboljenja vezanih za izmenjen životni stil (dijabetes, gojaznost, bolesti krvnog sistema itd.) čini osnovu za razvoj novih proizvoda koji zadovoljavaju ciljne grupe potrošača. Demografsko starenje i pomeranje fokusa sa lečenja na prevenciju bolesti takođe su uticali na razvoj nutraceutika i funkcionalne hrane. Njihova proizvodnja može doprineti ekonomskom razvoju ruralnih zajednica, a njihova redovna upotreba dužem i zdravijem životnom veku.

Nutraceutici su prečišćeni ili izolovani iz hrane. „Nutraceutical” predstavlja kovanicu od reči *nutrition* i *pharmaceuticals* što znači ishrana i farmaceutski proizvodi. Naziv potiče iz koncepta da ekstrakt iz namirnica može biti upotrebljen kao lek. Nutraceutici su dijetetski suplementi koji imaju povoljno ili zaštitno fiziološko dejstvo dokazano u kliničkim studijama.

Funkcionalna hrana se dobija ugradnjom biološki aktivnih jedinjenja u prehrambene proizvode ([Reichert, 2002](#)). Funkcionalna hrana je izgledom slična ili ista

kao konvencionalna hrana i deo je uobičajenog režima ishrane. Pored nutritivnih dejstava ima i fiziološku korist i umanjuje rizik od hroničnih bolesti. Može biti dobijena modifikovanjem jednog ili više sastojka, ili njihovom eliminacijom. Primer funkcionalne hrane su konzumna jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama iz lana (**Oomah, 2001**). Tržište funkcionalne hrane i nutraceutika je jedno od najbrže rastućih tržišta, sa proizvodima koji predstavljaju dodatnu vrednost (eng. *added economic value*) ukoliko potiču od industrijskih nusproizvoda. Biljke se sve više koriste i u kozmetičkim proizvodima, naročito prirodnim. Primeri uključuju losione sa biljnim puterima, zatim kreme i šampone sa esencijalnim masnim kiselinama itd.

Na sajtu <http://www.europages.co.uk/>, pretraživanje putem ključnih reči rezultira listom od 78 kompanija koje se bave proizvodnjom ili snabdevanjem funkcionalne hrane, 37 kompanija koje se bave proizvodnjom ili snabdevanjem nutraceutika i 334 kompanije koje se bave proizvodnjom ili snabdevanjem prirodnom kozmetikom.

Npr. kompanija Parodi Nutra (<https://www.linkedin.com/company/parodi-nutra>) pored proizvodnje hladno ceđenih i rafinisanih ulja za potrebe kozmetičke industrije, prodaje i organsko odmašćeno „brašno“ dobijeno iz uljanih semena nakon proizvodnje ulja (između ostalog od tikve, lana i nara), za upotrebu u vidu nutraceutika ili u kozmetičkim preparatima. Slično, kompanija Oil Seed Extractions Ltd. prodaje mlevenu pogaču lana kao izvor rastvorljivih i nerastvorljivih vlakana, kvalitetnih proteina i biljnih lignana radi upotrebe u funkcionalnoj hrani (<http://www.osel.co.nz/products/functional-food-ingredients>).

Na sajtu <http://www.mnextract.it/products/polyphenol-extracts.html> mogu se kupiti polifenolni ekstrakti rogača, grožđa, ploda i lista masline, bosiljka, žalfije, ruzmarina, majorana, lovora, lišća mušmule, narandže, limuna i mandarine koje kompanija reklamira kao prirodne antioksidante sa upotrebom u prehrambenoj, kozmetičkoj, farmaceutskoj i nutraceutskoj industriji. Između ostalog, za svaki ekstrakt je naveden ukupan sadržaj polifenola određen Folin-Ciocalteu metodom, kao i sadržaj jedinjenja specifičnih za dati uzorak kao što su kafena i galna kiselina npr. u ekstraktu rogača, koji je određen HPLC metodom. Na sajtu <http://www.greenwellness.my/grace-ginseng-energy-essence-toner-mist/product-823445.html> kao jedan od sastojaka tonika za negu zrele kože lica

navodi se ekstrakt semena uljane tikve, sa navodima da stimuliše sintezu kolagena i izravnava fine bore.

Sa povećanjem dostupnosti informacija, kod potrošača se javlja sve manje interesovanja prema sintetskim antioksidantima zbog njihove toksičnosti. Nasuprot tome, ekstrakte bogate polifenolima, sa antioksidantnim delovanjem, potrošači doživljavaju kao prirodne i radije ih prihvataju kao sastojak hrane ili kozmetičkog proizvoda. U toku poslednje decenije javljaju se novi pokušaji implementacije fenolnih jedinjenja u komercijalne proizvode. Nedavno je objavljena upotreba mikorenkapsuliranih polifenola iz kore nara radi obogaćivanja sladoleda prirodnim antioksidantima (**Çam i sar., 2014**), kao i obogaćivanje hleba prahom dobijenim od kore nara (**Altunkaya i sar., 2013**). Ekstrakt nara ulazi u sastav dijetetskog suplementa Proxana koji služi očuvanju i oporavku funkcije prostate (<http://apotekaonline.rs/vidapharm>). Obezmašćeno seme crnog kima je *in-vitro* ispitano kao funkcionalna hrana sa insulinskim antidijabetskim dejstvom (**Kazeem i Davies, 2016**).

Pored primene praha, dobijenog mlevenjem nusproizvoda (uljane pogače, opne), u industriji funkcionalne hrane i nutraceutika, u upotrebi su i prirodni ekstrakti ili čiste supstance. Npr. materijal za pakovanje od polipropilenskog filma sa imobilisanim antioksidantima iz ruzmarina korišćen je za pakovanje goveđeg mesa (**Nerín i sar., 2006**). Autori **Makris i sar. (2014)** su dali tabelarni pregled sa preko 30 prirodnih ekstrakata koji ispoljavaju stabilizujuće dejstvo protiv oksidacije mesa i mesnih proizvoda. Iz literature su poznati primeri obogaćivanja i stabilizacije jestivih ulja ekstraktima pogača ili čistim fenolnim kiselinama (**Thiyam i sar., 2004; Szydowska-Czerniak i sar., 2010; Sun-Waterhouse i sar., 2011**). Autori **Taghvaei i Jafari (2015)** su tabelarno predstavili prirodne biljne ekstrakte (među kojima su i kafena i ferulna kiselina), koji su dodati raznim jestivim uljima kao antioksidanti.

2.4.2. Prednosti i nedostaci upotrebe ekstrakata biljnog porekla

Zamena sintetskih aditiva prirodnim predstavlja trend zahvaljujući promeni svesti potrošača o zdravstvenoj bezbednosti proizvoda. Industrijski proizvođači su izloženi pritisku da ponude efikasne i inovativne proizvode po prihvatljivoj ceni. Pri tom,

potrošači i ekološke grupe zahtevaju da proizvodi budu ekološki bezbedni, jednakih ili boljih karakteristika kao i proizvodi prethodne generacije. Sintetski antioksidanti i konzervansi su čiste, lako dostupne supstance, konstantne aktivnosti, bez negativnog dejstva na karakteristike proizvoda. Međutim, s obzirom na veštačko poreklo kod potrošača izazivaju odbojnost, a u visokim koncentracijama mogu biti toksične. Ekstrakti bogati prirodnim antioksidantima i konzervansi su prijemčiviji potrošačima, jer ih ne doživljavaju kao hemikalije. Ipak, obično ih je potrebno dodati u većoj koncentraciji da bi se obezbedilo željeno dejstvo, pri čemu mogu da imaju negativan uticaj na osobine stabilizovanih proizvoda (aromu, boju, viskoznost, pH vrednost).

Delovanje većine hvatača slobodnih radikala zasniva se na reverzibilnim oksido-redukcionim reakcijama, zbog čega oni mogu da ispolje i antioksidantnu i prooksidantnu ulogu u zavisnosti od koncentracije reaktanata i uslova reakcije. Zbog toga antioksidanti, s jedne strane mogu delovati preventivno hvatajući ROS, a s druge strane produkcijom ROS mogu štetno delovati na DNK. Snažni antioksidanti se mogu auto-oksidovati, generisati reaktivne supstance i ponašati se kao pro-oksidanti, što je primećeno u slučaju galne kiseline, njenih derivata i kafene kiseline (Moure i sar., 2001). Galna kiselina prisutna u velikoj koncentraciji, produkuje H₂O₂. Zbog toga njena upotreba kao dijetetskog suplementa u relativno visokoj koncentraciji može rezultovati toksičnim i kancerogenim efektom (Lee i Lee, 2006). Međutim, neki rezultati podržavaju hipotezu da antikancerogeni efekat biljnih polifenola uključuje mobilizaciju endogenog bakra i prooksidantno dejstvo koje iz toga proizilazi (Razzaghi-Asl i sar., 2013).

Osim toga, ekstrakti bogati prirodnim antioksidantima često predstavljaju kompleksnu smešu nekoliko sekundarnih metabolita od kojih ne moraju svi biti identifikovani. Jedan od dodatnih izazova vezanih za prirodne ekstrakte, predstavlja njihova varijabilnost u kvalitetu i sastavu, koja može biti uslovljena uticajima prirode (biljni varijetet, klimatski uslovi, stepen zrelosti) ili je posledica različitih metoda žetve, skladištenja i ekstrakcije. Zbog toga je potrebno ispitati sastav ekstrakata iz svake serije i ukoliko je potrebno, prilagoditi količinu koja se dodaje proizvodu (Schwag i Das, 2013). Da bi se umanjio negativan uticaj prirodnih ekstrakata, a ipak iskoristile sve njihove prednosti, Yanishlieva i Marinova (2001) su predložile kombinovanje prirodnih i veštačkih antioksidanata, radi sinergističkog dejstva.

Milionima godina, biljke su razvijale sofisticirane odbrambene mehanizme u kojima sekundarni metaboliti igraju važnu ulogu. Međutim, nakon ekstrakcije iz biljaka, ova jedinjenja mogu biti izloženi oksidativnom oštećenju, hemijskim transformacijama ili polimerizaciji kao posledica destruktivnih ekstrakcija. Sa starenjem biljnog ekstrakta, njegova stabilnost dodatno opada, što ga može činiti neodgovarajućim za dugotrajniju primenu. Snabdevanje tržišta ekstraktima prirodnog porekla je za razliku od konvencionalnih antioksidanasa i konzervanasa ograničeno. Dodatni problem predstavlja zakonodavstvo vezano za biljne ekstrakte, s obzirom da se oni ne mogu smatrati defakto bezbednim u hemijskom i mikrobiološkom smislu. Iako mnogi potrošači smatraju da su biljni ekstrakti bezbedni, neki od njih izazivaju alergijske reakcije kod ljudi koje dodatno mogu biti pojačane koncentracijom neophodnom za postizanje antimikrobnog dejstva (obično 1-10%), a za neke je jasno ustanovljeno da izazivaju hepatotoksičnost zbog čega su povučeni iz prodaje. Razlog za zabrinutost predstavlja i podatak da biljni ekstrakti mogu sadržati potencijalno opasne kontaminante, kao npr. teške metale (Seeff, 2009) ili aflatoksine (Sivaramakrishnan i Gangadharan, 2009). U okviru provere bezbednosti korišćenja nekog biljnog ekstrakta ili izolovanog jedinjenja kao dijetetskog suplementa, potrebno je proveriti njegovu genotoksičnost za koncentracije pri kojima ispoljava biološku aktivnost.

Dodatno, da bi ranije pomenuta filozofija društva sa „nultim otpadom“ bila ispoštovana, potrebno je primeniti pravila „zelene ekstrakcije“ (engl. “*Green extraction*“) koja se zasniva na dizajniranju ekstrakcionih procesa koji redukuju upotrebu energije, koriste agro (voda, etanol) ili alternativne rastvarače i obnovljive biljne izvore i koji omogućavaju dobijanje bezbednog i kvalitetnog biodegradabilnog ekstrakta/proizvoda bez kontaminata (Chemat i sar., 2012).

2.5. ZNAČAJ ULJANIH POGAČA I DRUGIH NUSPROIZVODA HLADNO PRESOVANIH ULJA

Poslednje dekade posvećena je naročita pažnja primeni uljanih pogača, kao sirovina u bioprocima i srodnim industrijama, zahvaljujući njihovoj visokoj nutritivnoj vrednosti, stalnoj dostupnosti i kompetitivnoj ceni. Uljane pogače koje nastaju od semena bogatih uljem i koje se koriste u ljudskoj ili životinjskoj ishrani se nazivaju jestivim uljanim pogačama, a one koje se zbog prisustva toksičnih jedinjenja i nečistoća ne mogu koristiti za ishranu, nejestivim (Sharma i sar., 2013; Mitra i Misra, 1967). Svetskim tržištem uljanih pogača dominira 8 jestivih uljanih pogača kao što su: pogača soje, uljane repice, pamuka, kikirikija, suncokreta, palmina, kokosova i lana. U Tabeli 4. prikazana je svetska godišnja proizvodnja najčešćih uljanih semena i pogača za 2012/2013 godinu (Koutinas i sar., 2014). Izgled uljanih pogača pojedinih biljnih vrsta prikazan je na Slici 10.

Tabela 4. Godišnja proizvodnja nekih uljanih semena i pogača
za 2012/2013. godinu

Biljna vrsta	Proizvodnja semena u hiljadama tona	Proizvodnja uljanih pogača u hiljadama tona
soja	267 606	181 075
uljana repica	61 130	35 806
pamuk	45 320	15 780
suncokret	36 360	14 933

Očekuje se da će se do 2021. godine godišnja proizvodnja uljanih pogača povećati za 23%, što iznosi 315×10^6 tona. Zbog nedavne naftne krize ispitan je potencijal proizvodnje biodizela iz semena soje, kikirikija, suncokreta, susama, šafranike, uljane repice, pamuka, lana, konoplje i maka (Eryilmaz i sar., 2016; Razon, 2009), kao i

semena lana i uljane tikve (Schinas i sar., 2009), usled čega se može očekivati još veća proizvodnja njihovih pogača.



Slika 10. Izgled uljanih pogača: A - uljane tikve; B - soje; C - uljane repice;
D - suncokreta; E - crnog kima – peleti

Sastav ostatka dobijenog nakon ekstrakcije ulja iz semena zavisi od biljne vrste, oblasti i uslova gajenja, kao i od procesa prerade. Npr., ljuštenje semena i potpuno

uklanjanje ulja ekstrakcijom mogu znatno uticati na sastav i konačnu primenu uljane pogače. Generalno, one su bogati izvori proteina, ugljenih hidrata, minerala i polifenola. Pogača uljane repice sadrži približno 5,3 – 6,9 mg ukupnih polifenola (**Koutinas i sar., 2014**). Uljane pogače se mogu koristiti za proizvodnju antioksidanata, enzima, vitamina, antibiotika, pečuraka, kao i za proizvodnju nutritivno bogatih suplemenata, dobijenih fermentacijom, koji mogu zameniti komercijalne preparate (**Koutinas i sar., 2014**). **Puértolas i sar. (2016)** u preglednom radu vezanom za primenu elektrotehnologija za povrat jedinjenja sa dodatnom vrednošću, iz određenih matriksa industrije biljnih ulja, navode pogaču i ljusku uljane repice i pogaču sezama kao izvore polifenola i proteina.

Iz uljane pogače suncokreta mogu se dobiti frakcije bogate antioksidantima, proteinski izolati i nutritivno bogati fermentacioni suplementi. Polifenoli iz uljane pogače suncokreta mogu se koristiti za poboljšanje stabilnosti suncokretovog ulja. Od polifenolnih jedinjenja u pogači suncokreta u najvišoj koncentraciji je prisutna hlorogenska kiselina, a u manjim i kafena, *p*-kumarinska, ferulna galna, protokatehinska i siringinska kiselina (**Kachrimanidou i sar., 2015**). Odmašćena pogača suncokreta se može upotrebiti kao organsko đubrivo i značajan izvor azota, sa smanjenim rizikom otpuštanja nitrata u odnosu na mineralna đubriva (**Mazzoncini i sar., 2015**).

Primenjene u ishrani živine, svinja i riba, uljane pogače smanjuju proizvodne troškove. Pogača od semena crnog kima se prodaje kao suplement u ishrani trkačkih konja (<http://www.amigo-konie.pl/en/pro-linen-black-cumin-oil-cake-2kg.html>). Međutim, upotreba uljanih pogača je ograničena zbog prisustva antinutritivenata (antinutritivnih faktora). Antinutritijenti su hemijska jedinjenja koja ograničavaju unos hrane i iskoristljivost nutrijenata menjanjem fizičke dostupnosti ili hemijskih karakteristika, ili ograničavaju brzinu enzimske konverzije unete hrane. Često hemijska jedinjenja proizvedena od strane biljaka u sklopu odbrambenog mehanizma inhibiraju delovanje digestivnih enzima insekata koji pokušavaju da ih pojedu, ali takođe mogu inhibirati digestivne enzime ljudi i stoke. Predtretmani kojima bi bila otklanjana toksična jedinjenja iz uljanih pogača povećavaju operativne troškove (**Sivaramkrishnan i Gangadharan, 2009**). Prisustvo antinutritivnih faktora je varijabla koja utiče na nutritivnu vrednost hrane i hraniva. Tako, nutritivni kvalitet predstavlja ravnotežu između nutrijenata i antinutrijenata. Iako prisutni često samo u tragovima ovi faktori imaju veliki

uticaj (Duffey i Stout, 1996). U antinutritivne spadaju i neka polifenolna jedinjenja, npr. tanini, ali i neki proteini. Procesne metode kao što su: potapanje, klijanje, kuvanje, ekstruzija, ljuštenje i sl. mogu da smanje njihov sadržaj. Uprkos činjenici da spada u 8 uljanih pogača koje dominiraju svetskim tržištem sa udelom proteina od 32%, uljana pogača lana ima ograničenu nutritivnu upotrebu kao stočna hrana, zbog: nedostatka lizina, prisustva antipiridoksin faktora (antivitamina B6), cijanogenog glikozida linamarina i slabe svarljivosti. Zbog toga se njena primena okreće ka npr. ekstrakciji flavonola herbacetin diglukozida (Sivaramakrishnan i Gangadharan, 2009), koji ispoljava biološku aktivnost u vidu poboljšanja bubrežne funkcionalnosti, lečenja otkazivanja bubrega, poboljšanja formiranja kostiju i antiviralnih aktivnosti protiv gripa (Fliniaux i sar., 2014).

Ipak, neki proteini iz uljanih pogača se smatraju idealnim suplementima u ljudskoj ishrani. Proteini iz semena tikve imaju dobre nutritivne osobine i mogu se koristiti u mesnim prerađevinama (Carames i sar., 2008). Tako se npr., bolonjskim kobasicama može dodati proteinski izolat semena tikve, radi poboljšanja nutritivnog kvaliteta i smanjenja troškova proizvodnje. Poslednjih godina objavljen je veliki broj naučnih radova koji se bave izučavanjem proteina u uljanoj pogači tikve i njihovom mogućom primenom. Npr. ispitana je i optimizovana enzimaska hidroliza proteinskog izolata i globulina (kukurbitina) iz uljane pogače golice (Popović i sar., 2013; Peričin i sar., 2009; Peričin i sar., 2008). Podvrgavanje enzimskoj hidrolizi ovih proteina u značajnoj meri izaziva promenu njihove strukture što na kraju menja i njihove funkcionalne osobine (rastvorljivost, disperzibilnost, emulziona aktivnost, stabilnost, penivost). Enzimatskim umrežavanjem (transglutaminazom) kukurbitina, poboljšana je njegova rastvorljivost i sposobnost želiranja (Popović i sar., 2013). Radi dobijanja bioaktivih sastojaka hrane - proteinskih hidrolizata sa antioksidantnom i ACE (angiotenzin I konvertujućeg enzima) inhibitorskom aktivnošću primenjena je enzimaska hidroliza proteinskog izolata uljane pogače tikve (Vaštag i sar., 2013; Vaštag i sar., 2011; Vaštag i sar., 2010). Ispitan je potencijal primene ove pogače u dobijanju biodegradabilnih filmova, kao alternative konvencionalnim materijalima za pakovanje i ambalažu (Popović i sar., 2011), koji su pokazali odlične karakteristike: poboljšanu rastegljivost i barijernu sposobnost prema O₂, N₂, CO₂ i vazduhu (Popović i sar., 2012).

Pogača uljane tikve je korišćena i kao supstrat za mikrobiološku proizvodnju karboksil-metil-celulaze (CMC) – **Pericin i sar. (2008)**. Iako su proteini obimno izučavani, fenolni potencijal uljanih pogača je ostao slabo istražen.

Uljane pogače počinju da dobijaju drugačiju primenu od dosadašnje i u našoj zemlji. U pekarskoj industriji se koriste za fortifikaciju (**Behera i sar., 2013**). Npr. brašno od semena tikve golice koje se dobija u procesu proizvodnje hladno ceđenog ulja je proglašeno za najbolju tehnološku inovaciju u Srbiji za 2012. godinu. Namenjeno je pekarskoj industriji kao dodatak pekarskim proizvodima. Zahvaljujući istraživanjima i naprednom tehnološkom rešenju, iz navedene pogače se dobija brašno visoke nutritivne vrednosti, bogato organskim i mineralnim materijama, koje ima aromatičan, nov ukus i zelenkastu boju (<http://bif.rs/2013/02/pan-union-oil-inovativno-brasno-sit-po-ceni-jedne-kifle/>). Uljana pogača golice je uspešno iskorišćena u pripremi namaza koji izgledom i teksturom podseća na kikiriki puter, ali sa superiornijim nutritivnim osobinama (**Radočaj i sar., 2011; Radočaj i sar., 2012**). **Caramez i sar. (2008)** su primenili alkalnu maceraciju da bi omekšali ljusku tikvinog semena, kako bi ga zajedno sa ljuskom pretvorili u grickalicu bogatu vlaknima i drugim funkcionalnim jedinjenjima. **Nyam i sar. (2013)** su sa dodatkom semena i ljuske tikve u iznosu od 5% pekarskim proizvodima postigli veći sadržaj ukupnih vlakana, ukupnih polifenola i veću antiradikalnu aktivnost, uz zadovoljavajuće rezultate senzorne procene. Pogača dobijena presovanjem semena konoplje, brašno smeđeg pirinča i dekafeinisani listići zelenog čaja su korišćeni za dobijanje funkcionalnih bezglutenskih krekeri poboljšanih karakteristika (**Radočaj i sar., 2014**). Takođe, uljane pogače predstavljaju odličan izvor sirovog materijala sa potencijalnom primenom kao nutraceutika ili sastojaka funkcionalne hrane (**Terpinc i sar., 2012**). U kozmetičkim proizvodima, uljane pogače deluju hidrantno i održavaju epidermalnu barijeru (**Ratz- Lyko i sar., 2015**), što je značajno u prevenciji nastanka ekcema (**Taïeb, 1999**). Uljana pogača crnog kima ima već utvrđen status u farmaceutskim, medicinskim, kozmetičkim i nutritivnim primenama (**Ratz- Lyko i sar., 2014**). Zatim, mogu poslužiti i kao supstrati za razne biotehnološke procese: fermentativnu proizvodnju enzima, antibiotika, vitamina, antioksidanata, ali i kao đubrivo ili za uzgoj pečuraka (**Lomascolo i sar., 2012; Ramachandran i sar., 2007**), a takođe i kao biosorbenti u uklanjanju kiselih boja prilikom prečišćavanja otpadne vode (**Safa,**

2016). Kora nara, ljuske i opne raznih semena mogu da se upotrebe kao prekursori za proizvodnju aktivnog uglja koji služi za uklanjanje toksičnih boja, metalnih jona iz otpadnih voda raznih industrija, npr. tekstilne (Yahya i sar., 2015). Na osnovu pretrage literature (Ramachandran i sar., 2007; Koutinas i sar., 2014; Kachrimanidou i sar., 2015) i svega prethodno navedenog mogu se šematski prikazati moguće primene uljanih pogača (Slika 11).



Slika 11. Šematski prikaz primene uljanih pogača

Sve navedeno vodi ka razvoju novih biotehnoloških procesa koje u osnovi imaju uljane pogače i druge nusproizvode industrije ulja, kao i proširenju asortimana prirodnih ingredijenata u novim prehrambenim, kozmetičkim i farmaceutskim proizvodima. U prehrambenoj industriji postoji trend zamene sintetičkih antioksidanata prirodnim – kao što su polifenoli, zbog njihovog uticaja na zdravlje. Interesovanje za prirodne polifenolne antioksidante je dodatno pojačano činjenicom da mnoga od tih jedinjenja ispoljavaju antimutageno, antimikrobno, hemopreventivno, antitumorsko, antihepatotoksično, antizapaljensko, apoptično, neuroprotektivno, antiparazitno i mnoga druga dejstva

(**Khadem i Marles, 2010**). Iz tog razloga, inkorporiranje takvih jedinjenja u prehrambene i kozmetičke proizvode doprinosi ne samo njihovoj stabilizaciji, već i pozitivnom uticaju na zdravlje.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJALI

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen u laboratorijama Zavoda za javno zdravlje Subotica, u Centru za higijenu i humanu ekologiju. Kao biljni materijal korišćeno je seme uljane tikve golice (*Cucurbita pepo* cv. Olinka), kao i pogača, opna i ulje koji su dobijeni od lokalnog proizvođača „Pan Union“ iz Novog Sada. Seme sa ljuskom je nabavljeno u lokalnoj prodavnici zdrave hrane. Ručno je čišćeno lomljenjem ljuske džepnim nožićem i vađenjem jezgra. Ostali uzorci: seme i pogača crnog kima (*Nigella sativa* L.), lana (*Linum usitatissimum* L.), seme, pogača i kora nara (*Punica granatum* L.), kao i sva hladno presovana ulja od navedenih biljnih vrsta dobijeni su od lokalnog proizvođača „Suncokret“ iz Hajdukova. Čvrsti uzorci su čuvani na temperaturi od +4 °C i pre eksperimentalne upotrebe samleveni su u mlinu za kafu, pri čemu su dobijene čestice manje od 2 mm.

3.1.1. HEMIKALIJE KORIŠĆENE PRI ODREĐIVANJIMA TEČNOM HROMATOGRAFIJOM VISOKIH PERFORMANSI I DRUGIM METODAMA

U određivanju polifenolnih jedinjenja korišćeni su reagensi i hemikalije analitičke, GC ili HPLC čistoće. Protokatehinska, *p*-hidroksibenzoeva, kafena, siringinska, *p*-kumarinska i sinapinska kiselina su proizvodi kompanije Sigma (Deisenhofen, Nemačka); vanilinska i ferulna kiselina su proizvedene u Fluka (Milwaukee, WI, SAD); monohidrat galne kiseline, *p*-hidroksibenzaldehid i L-askorbinska kiselina su proizvedene u kompaniji Aldrich (Steinheim, Nemačka). EDTA je nabavljena od firme Superlab (Beograd, Srbija). Rastvarači acetonitril, dietil-etar, etil-acetat *n*-heksan, metanol, su proizvedeni u Merck-u, Darmstadt, Nemačka. Korišćena je ultračista voda tip I (ELGA). Natrijum hidroksid i hlorovodonična kiselina su proizvedeni u Zorka (Šabac, Srbija), a bezvodni natrijum sulfat i glacijalna sirćetna kiselina u kompaniji Lachema (Brno, Češka).

Svi reagensi korišćeni pri određivanju sadržaja metala su bili najmanje p.a. čistoće. Pojedinačni matični standardi koncentracije ($c = 1 \text{ mg/ml}$) Cu, Zn, Fe, Mn, Pb, Cd i As su kupljeni od proizvođača Carlo Erba (Italija). U radu su korišćene sledeće hemikalije: dejonizovana voda sa provodljivošću do najviše $1 \mu\text{Scm}^{-1}$, 65% azotna kiselina, 96% etanol, magnezijum-nitrat-heksahidrat, 37% hlorovodonična kiselina, kalijum-jodid, natrijum-hidroksid, natrijum-borhidrid, askorbinska kiselina.

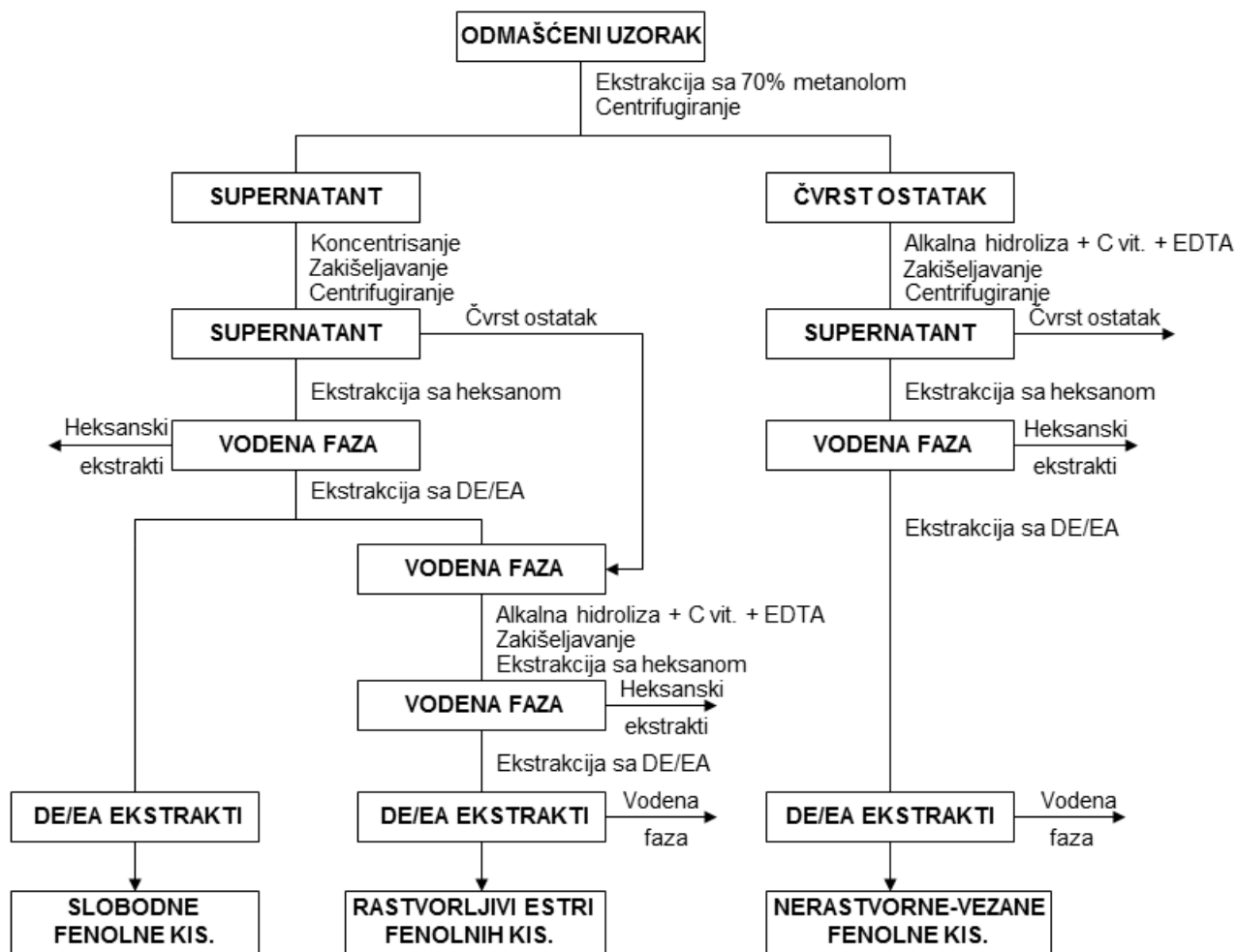
Pri određivanju parametara kvaliteta u radu su korišćene sledeće supstance, najmanje p.a. čistoće ili kvaliteta propisanog u standardnim SRPS ISO metodama: koncentrovana sumporna kiselina, Kjeltabs Cu 3.5 (alternativno 7 g kalijum-sulfat i 0,8 g bakar-sulfat, pentahidrat), borna kiselina, indikatori: bromkrezol zeleno i metil crveno, fenoftalein ili alkalno plavo, metanol, etanol, natrijum-hidroksid, kalijum-hidroksid, hlorovodonična kiselina, amonijum-sulfat, destilovana voda, azotna kiselina, glacijalna sirćetna kiselina, dietiletar, tehnički n-heksan ili petroletar, aluminijum-tercijalni butilat, kalijum-jodid, rastvorljivi skrob, natrijum-tiosulfat, cikloheksan, Vijsov reagens (jod monohlorid u sirćetnoj kiselini), izooktan, etil-laureat.

3.2. METODE ISPITIVANJA

3.2.1. EKSTRAKCIJA POLIFENOLNIH JEDINJENJA, HIDROLIZA I PREČIŠĆAVANJE

Procedura za izolaciju fenolnih kiselina iz čvrstih uzoraka je preuzeta od autora **Kryger i sar. (1982)** i kombinovana sa procedurom koju su opisali **Nardini i sar., (2002)**. Odmašćeno seme (1 g) se prenese u tubu za centrifugiranje i ekstrahuje na ultrazvučnom kupatilu 30 min sa 20 ml 70% metanola, na sobnoj temperaturi. Ekstrakt se centrifugira 10 min na 3000 o/min (stona centrifuga Centurion Scientific), supernatant se odvoji za dalju analizu, a sa čvrstim ostatkom postupak se ponovi još 2 x. Dobijeni supernatanti se spajaju, a čvrst ostatak čuva za dalju analizu (Slika 12).

(I + II) Kombinovani supernatanti se upare na 45°C radi koncentrovanja. Podesi se pH sa HCl, a zatim centrifugira.



Slika 12. Procedura za ekstrakciju slobodnih, esterifikovanih i nerastvornih vezanih fenolnih kiselina iz čvrstih uzoraka

Supernatant se 3x ekstrahuje sa hexanom u odnosu 1:1 svaki put po 15 min da bi se uklonile slobodne masne kiseline i drugi lipidni kontaminanti. Heksanski (gornji) sloj se odbacuje. Kod treće ekstrakcije, donji sloj (vodena faza) se hvata preko levka za filtraciju gde se slobodne fenolne kiseline iz vodene faze 4 x ekstrahuju sa smešom dietiletar/etilacetat (DE/EA) = 1:1.

Donja vodena faza (II) se hvata u erlenmajer, a gornja DE/EA (I) direktno iz levka preko bezvodnog Na₂SO₄ u balončić sa okruglim dnom u kome se uparava pod vakuumom na 30°C. Suvi ostatak se rastvori u 500 µL metanola i 500 µL startne mobilne faze (2% sirć.

kis. : metanol : acetonitril = 38:1:1) i nakon 3 minuta na ultrazvučnom kupatilu, bez filtriranja se prebacuje u amber HPLC vialu.

(II) Sa mokrog Na_2SO_4 se spiraju estri fenolnih kiselina sa 10 ml 70% metanola i eluat se spaja sa vodenom fazom koja je preostala nakon ekstrakcije se DE/EA = 1:1.

Toj fazi se dodaje i talog. Estri iz vodene faze se hidrolizuju preko noći sa 20 ml rastvora 4 M NaOH koji sadrži 1% w/v askorbinske kiseline i 10 mM EDTA pod azotom na sobnoj temperaturi. Hidrolizat se zakišeljiva do pH = 2 pre uklanjanja slobodnih masnih kiselina sa heksanom (kao pod (I)). Heksanski sloj (gornji) se odbacuje. Oslobođene fenolne kiseline se zatim ekstrahuju sa DE/EA kao što je već opisano.

(III) Rezidue (čvrst ostatak nakon centrifugiranja) iz metanolno-acetonskih ekstrakata se hidrolizuju sa 10 ml rastvora 4 M NaOH koji sadrži i 1% w/v askorbinske kiseline i 10 mM EDTA pod istim uslovima kao i estri. Nakon zakišeljavanja do pH = 2 i centrifugiranja, čisti supernatanti se ekstrahuju sa heksanom i zatim sa DE/EA kao što je prethodno već opisano.

Dalji postupak za (II) i (III) je isti kao i za fazu (I).

Procedura za izolaciju fenolnih kiselina iz uzoraka ulja je preuzeta od autora **Montedoro i sar., (1992)**: 100 g ulja se ekstrahuje 2 x sa po 20 ml smeše metanol/voda (80:20 v/v). Smeša se vorteksira (5000 g, 2 minuta), a zatim centrifugira (5000 g, 10 minuta). Metanolni ekstrakt se koncentriše u vakuumu na 35 °C do postizanja sirupaste konzistencije. Zatim mu se dodaje 10 ml acetonitrila i prečišćava se 2 x sa po 20 ml n-heksana. Suvi ostatak se rastvara u metanolu i prebacuje u amber HPLC vialu.

3.2.2. ANALIZA FENOLNIH KISELINA IZ EKSTRAKATA TEČNOM HROMATOGRAFIJOM VISOKIH PERFORMANSI NA OBRNUTIM FAZAMA

Uzorci pripremljeni na gore opisan način su poređani u autosampler Thermo Finnigan Surveyor HPLC-a sa Surveyor kvaternernom pumpom sa ugrađenim vakuum degaserom, injektorom za automatsko uzorkovanje, termoregulatorom kolone i Surveyor PDA detektorom. Parametri metode su podešeni u softveru ChromQuest v 4.0. Razdvajanja su vršena na C18 Hypurity Aquastar koloni (veličina čestica 5.0 μm , 250 x 4.6 mm i.d.) sa C18 Hypurity Aquastar predkolonom (veličina čestica 5.0 μm , 10 x 4.6

mm i.d.); proizvođača Thermo Electron Corporation. Metoda za tečno hromatografsku analizu na obrnutim fazama (RP-HPLC) je usvojena od autora **Bendini i sar., (2003)** sa malim izmenama: protok mobilne faze je 1.0 ml/min i injekcione zapremine standardnih rastvora i uzoraka su 20 µl. Temperatura kolone je održavana na 25 °C. Gradijentno spiranje jedinjenja sa kolone je omogućeno sledećom smešom rastvarača: mobilna faza A, voda–sirćetna kiselina (98:2, v/v), mobilna faza B, metanol–acetonitril (1:1, v/v). Program gradijentnog eluiranja je dat u Tabeli 5.

Tabela 5. Gradijentni HPLC program

Vreme (min)	Mobilna faza A (%)	Mobilna faza B (%)	Protok (ml/min)
0	95	5	1
25	70	30	1
35	60	40	1
40	52	48	1
50	30	70	1
55	0	100	1
70	95	5	1

Polifenoli (Tabela 6) su detektovani fotodiodnim detektorom na 280 nm sa spektralnom analizom podešenom na opseg talasnih dužina (skeniranje od 220 do 360 nm).

Tabela 6. Opis standardnih supstanci korišćenih u metodi

Standardna supstanca	Formula	Molarna masa (g/mol)
galna kiselina	C ₇ H ₆ O ₅	170,12
protokatehinska kiselina	C ₇ H ₆ O ₄	154,12
<i>p</i> -hidroksibenzoeva	C ₇ H ₆ O ₃	138,12
<i>p</i> -hidroksibenzaldehid	C ₇ H ₆ O ₂	122,12
vanilinska kiselina	C ₆ H ₈ O ₄	168,15
kafena kiselina	C ₉ H ₈ O ₄	180,16
siringinska kiselina	C ₉ H ₁₀ O ₅	198,17
<i>p</i> -kumarinska kiselina	C ₉ H ₈ O ₃	164,15
ferulna kiselina	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,18
sinapinska kiselina	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	224,21

Identifikacija fenolnih jedinjenja je izvršena upoređivanjem retencionih i spektralnih podataka sa standardnim supstancama (kriterijum prihvatljivosti je slaganje 90-100%). Kvantifikacija je izvedena metodom eksternog standarda u triplikatu. Iako HPLC analiza

traje 70 minuta, predstavljeno je samo prvih 30 minuta hromatograma, s obzirom da su svi pikovi od interesa snimljeni u ovom vremenskom okviru.

Za potrebe izrade ove disertacije, s obzirom na mali broj sličnih metoda, celokupna procedura ekstrakcije, prečišćavanja i analize je validisana.

Validacija HPLC metode je započeta izborom kolone i mobilne faze zasnovanim na istraživanju literature (**Bendini et al., 2003; Robbins, 2003**). Obuhvatila je utvrđivanje sledećih parametara: kvalitativnu identifikaciju određivanih komponenti, selektivnost, linearnost, tačnost, preciznost, granicu detekcije (GD), granicu kvantifikacije (GK), i robustnost. Ostali parametri kao što su parametri pogodnosti sistema: (rezolucija ($R_{a,b}$), broj teorijskih podova (N), visina ekvivalenta teorijskog poda (HETP) nisu određivani ovom prilikom, s obzirom na činjenicu da primarni cilj ove disertacije nije bio optimizacija parametara validacije već utvrđivanje profila fenolnih kiselina i njihovog sadržaja u odabranim uzorcima. Ceo postupak validacije sa dobijenim rezultatima je detaljno prikazan u poglavlju Rezultati i diskusija.

3.2.3. IZRAČUNAVANJE I IZRAŽAVANJE REZULTATA

Sadržaj svake pojedinačno određivane komponente (F_{kis}) se izražava u mg/kg računato na suhu materiju odmašćenog uzorka ili ulja i izračunava po formuli:

$$F_{kis} = \frac{c_{o\check{c}} \times V \times 10^{-3}}{m \times 10^{-3} \times SM} = \frac{c_{o\check{c}} \times V}{m \times SM}$$

gde je: $c_{o\check{c}}$ – očitana koncentracija pojedinačne određivane fenolne kiseline sa hromatograma, (mg/l)

V – zapremina u kojoj je rastvoren suvi ostatak pre prenošenja u hromatografsku vialu, (l)

m – masa odmerenog uzorka, (kg)

SM – sadržaj suve materije, (w/w)

3.2.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Za uočavanje obrazaca u podacima i za njihovo izražavanje na takav način da se istaknu sličnosti i razlike, korišćena je analiza glavnih komponenti, PCA (Principal Component Analysis). PCA je jednostavna metoda za izvlačenje relevantnih informacija iz setova podataka. Primenjuje se za nalaženje korelacione strukture varijabli i samim tim za njihovu redukciju. Hemometrijske analize su izvedene korišćenjem softvera *Statistica 10, Statsoft*.

3.2.5. ODREĐIVANJE PARAMETARA KVALITETA

U određivanju parametara kvaliteta korišćene su standardne metode SRPS ISO i dokumentovane metode Zavoda za javno zdravlje (Tabela 7). Probe su izvedene u dva ponavljanja.

Tabela 7. Pregled metoda po kojima su određeni parametri kvaliteta

Parametar ispitivanja	Oznaka metode određivanja	Naziv metode određivanja
Vlaga i isparljive materije	SRPS EN ISO 665:2008	Seme uljarica - Određivanje sadržaja vlage i isparljivih materija
Pepeo	DM01-29	Dokumentovana metoda ispitivanja DM01-29: Određivanje sadržaja ukupnog pepela
Proteini	DM01-75	Dokumentovana metoda ispitivanja DM01-75: Određivanje sadržaja ukupnih proteina
Ulje	SRPS EN ISO 659:2007	Seme uljarica – Određivanje sadržaja ulja
Celuloza	DM 54	Dokumentovana metoda ispitivanja DM54: Određivanje sadržaja sirove celuloze
Saponifikacioni broj	SRPS EN ISO 3657:2008	Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla - Određivanje saponifikacionog broja
Jodni broj	SRPS EN ISO 3961:2008	Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla - Određivanje jodnog broja
Peroksidni broj	SRPS EN ISO 3960:2011	Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla - Određivanje peroksidnog broja - Jodometrijsko (vizuelno) određivanje završne tačke
Indeks refrakcije	SRPS EN ISO 6320:2012	Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla - Određivanje indeksa refrakcije
Određivanje sadržaja vlage i isparljivih materija	SRPS EN ISO 662:2009	Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla - Određivanje sadržaja vlage i isparljivih materija
Kiselinski broj i kiselost	SRPS EN ISO 660:2011	Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla - Određivanje kiselinskog broja i kiselosti

3.2.6. ODREĐIVANJE SADRŽAJA METALA

Sadržaj metala u uljanim pogačama, nusproizvodima i semenima bogatim uljem, je određen po dokumentovanoj metodi kuće broj 08 (DM08) Zavoda za javno zdravlje Subotica: „Dokumentovana metoda kuće broj 08 za određivanje ostataka metala i metaloida u namirnicama“. Probe su izvedene u dva ponavljanja.

Princip metode:

Uzorak u kome se određuju cink (Zn), olovo (Pb), kadmijum (Cd), nikal (Ni), kobalt (Co), gvožđe (Fe), mangan (Mn), bakar (Cu) i arsen (As) se prvo razara zbog eliminisanja organske materije i prevođenja metala i metaloida u neorganski jonski oblik. Nakon rastvaranja mineralnog ostatka sa kiselinom određuje se koncentracija cinka (Zn), olova (Pb), kadmijuma (Cd), nikla (Ni), kobalta (Co), gvožđa (Fe), mangana (Mn) i bakra (Cu) metodom plamene atomske apsorpcione spektrometrije (FAAS).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

Istraživanja u okviru ove disertacije grupisana su u pet celina:

1. validacija metode određivanja fenolnih kiselina,
 2. ispitivanje i komparacija sadržaja i distribucije fenolnih kiselina u pogačama, nusproizvodima, semenima i hladno ceđenim uljima iz uljane tikve, nara, crnog kima i lana,
 3. hemometrijska obrada dobijenih podataka,
 4. analiza parametara kvaliteta i
 5. sadržaj metala,
- sa osvrtom na potencijalnu primenu analiziranih uzoraka.

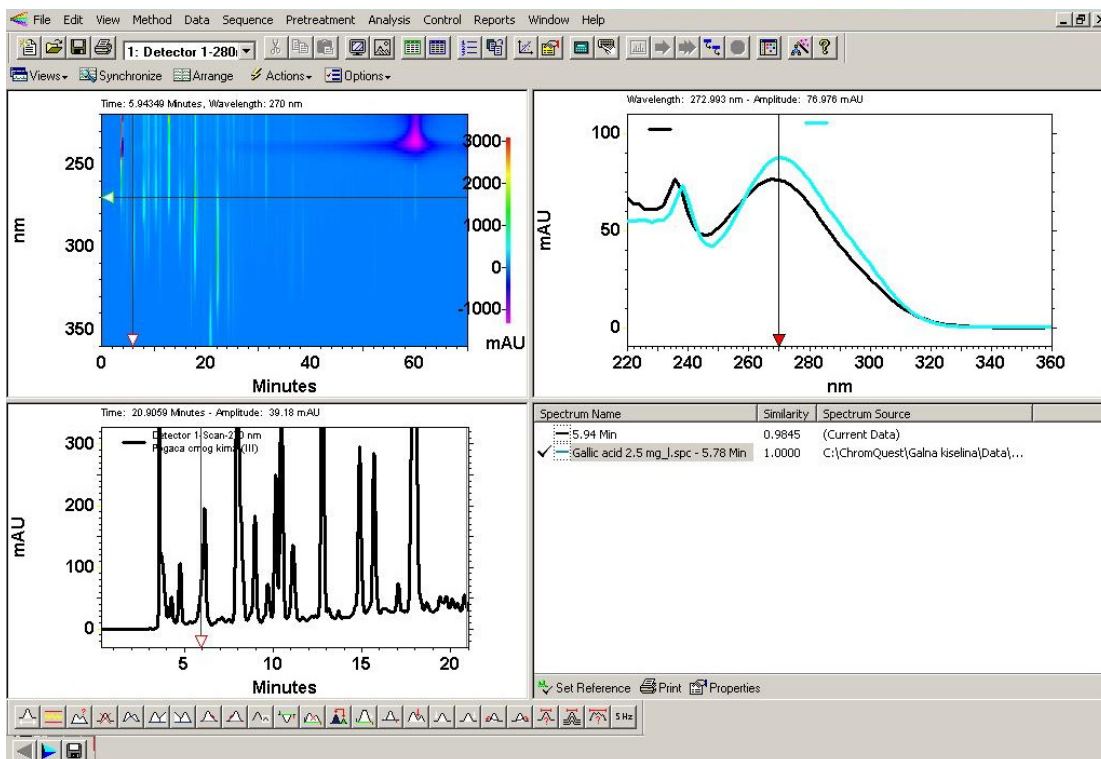
4.1. VALIDACIJA METODE ODREĐIVANJA FENOLNIH KISELINA

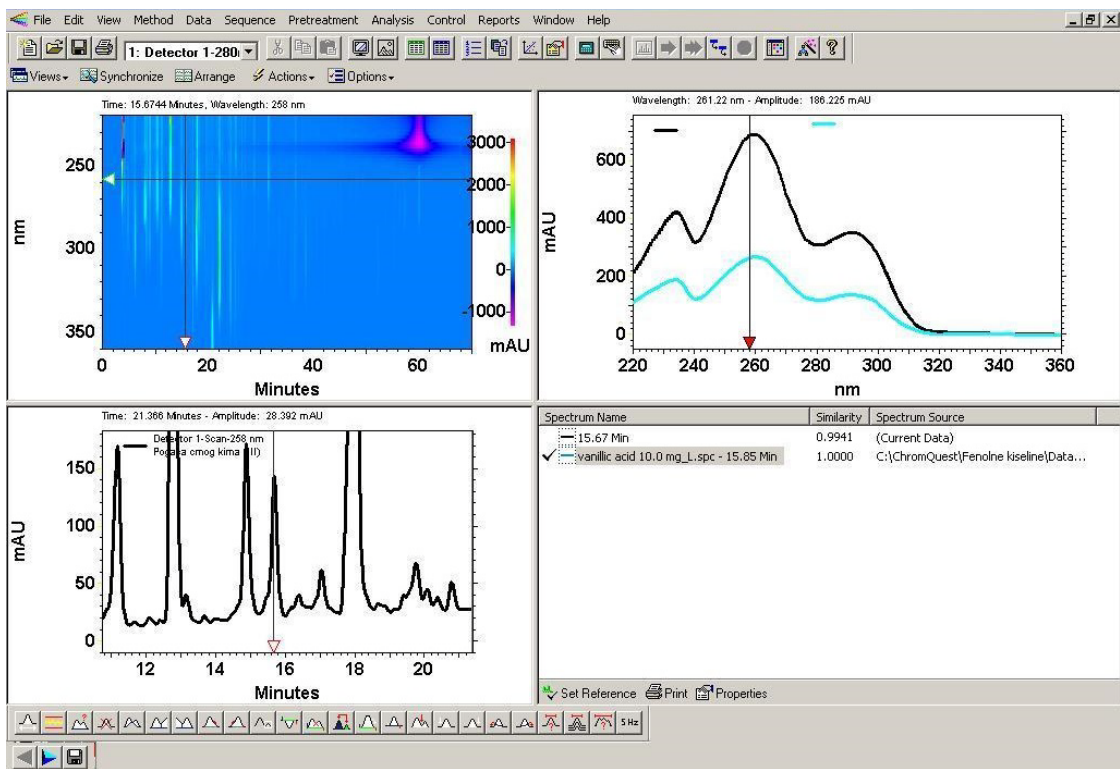
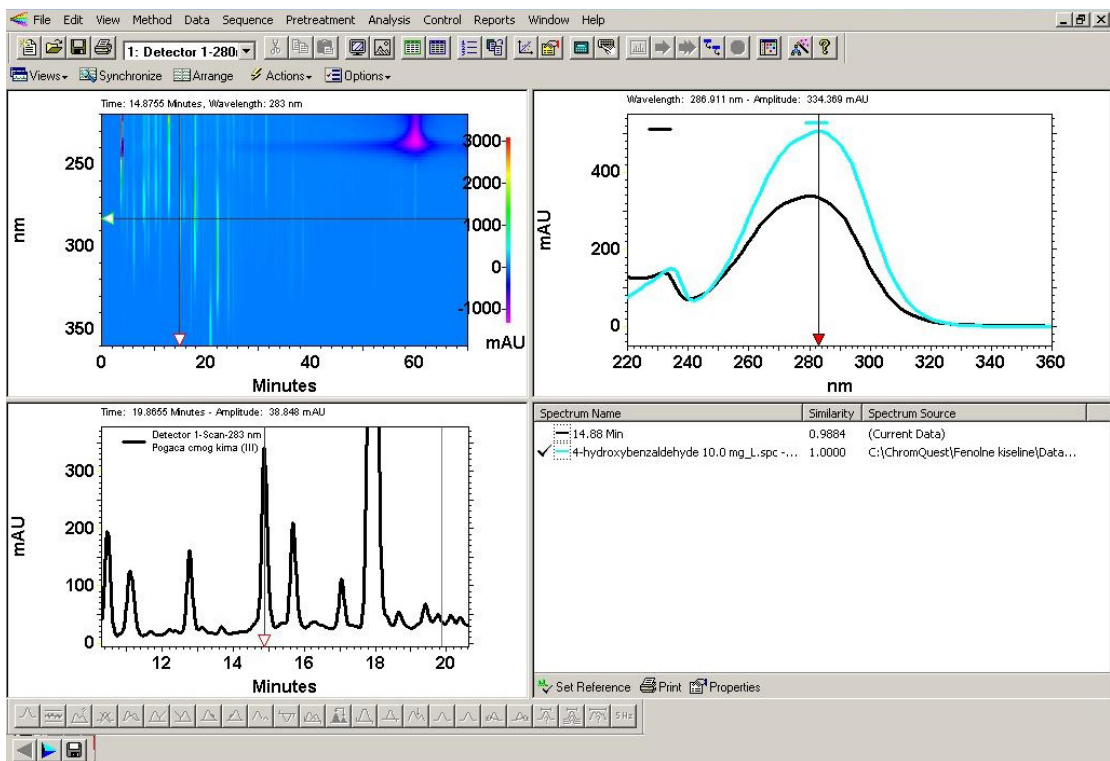
Devet fenolnih kiselina (galna, protokatehinska, *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, kafena, siringinska, *p*-kumarinska, ferulna i sinapinska) i jedan fenolni aldehid (*p*-hidroksibenzaldehid) kvalitativno su određeni na osnovu spektara snimljenih u opsegu 220-360 nm i retencionog vremena t_r (min). Na osnovu snimljenih spektara određeni su karakteristični maksimumi apsorpcije za svaku komponentu. Retenciona vremena i karakteristične talasne dužine apsorpcionih maksimuma pojedinačnih komponenti za kvalitativno određivanje prikazani su u Tabeli 8. S obzirom da se izgled spektra pojedinačnih jedinjenja menjao u zavisnosti od koncentracije standarda, za svako jedinjenje su snimljeni spektri na svim koncentracijama radnih standarda korišćenih u kalibracionom opsegu.

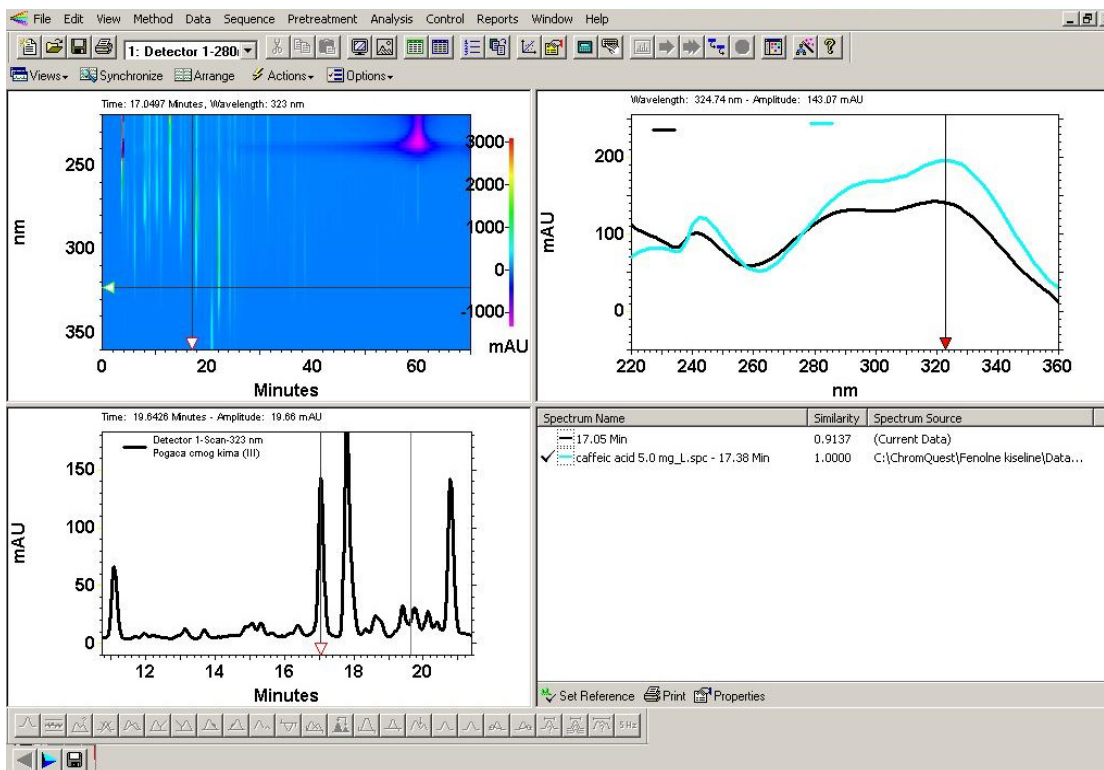
Tabela 8. Retenciona vremena t_r i talasne dužine na kojima se javljaju apsorpcioni maksimumi kao kriterijumi za identifikaciju određivanih jedinjenja

Naziv jedinjenja	t_r (min)	λ_{max} (nm)
galna kiselina	6.021	232, 270
protokatehinska kiselina	9.14	237, 259, 294
p-hidroksibenzoeva	13.17	234, 255
p-hidroksibenzaldehid	15.32	235, 283
vanilinska kiselina	16.01	234, 260, 292
kafena kiselina	17.16	243, 295, 323
siringinska kiselina	18.18	234, 274
p-kumarinska kiselina	21.81	237, 309
ferulna kiselina	23.89	242, 293, 320
sinapinska kiselina	25.04	243, 324

Primeri poređenja spektara i retencionih vremena standardnih supstanci i jedinjenja identifikovanih iz uzorka prikazani su na slici 14.







Slika 14 . Poređenje spektara standardnih supstanci galne kiseline, *p*-hidroksibenzaldehida, vanilinske i kafene kiseline sa spektrima jedinjenja iz pogače crnog kima na istom retencionom vremenu

Selektivnost ($\alpha_{a,b}$) je parametar koji definiše moć faze da napravi razliku između analita u istoj analizi. Numerička vrednost za selektivnost treba da je $\alpha_{a,b} \geq 1$, a poželjno je da leži u opsegu 1.05 - 2.00. Za analizirane fenolne kiseline selektivnost je određena kao srednja vrednost snimljenih hromatograma ($n=3$) uparenog DE/EA ekstrakta pogače uljane tikve, spajkovanog (zagađenog) sa mešanim standardnim rastvorom (koncentracije pojedinačnih jedinjenja 10 mg/l), rastvorenog u inicijalnoj mobilnoj fazi.

Linearnost je iskazana posredstvom koeficienta korelacije (r) regresione jednačine koji treba da je > 0.98 . Određena je snimanjem hromatograma mešanih standarda fenolnih kiselina u opsegu od 62,5 % od najniže do 133 % od najviše koncentracije radne kalibracione krive. Radna kalibraciona kriva za svaku pojedinačnu komponentu sastojala se iz jedanaest koncentracionih nivoa (0,4; 0,5; 1,0; 1,5; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 40,0; 50,0;

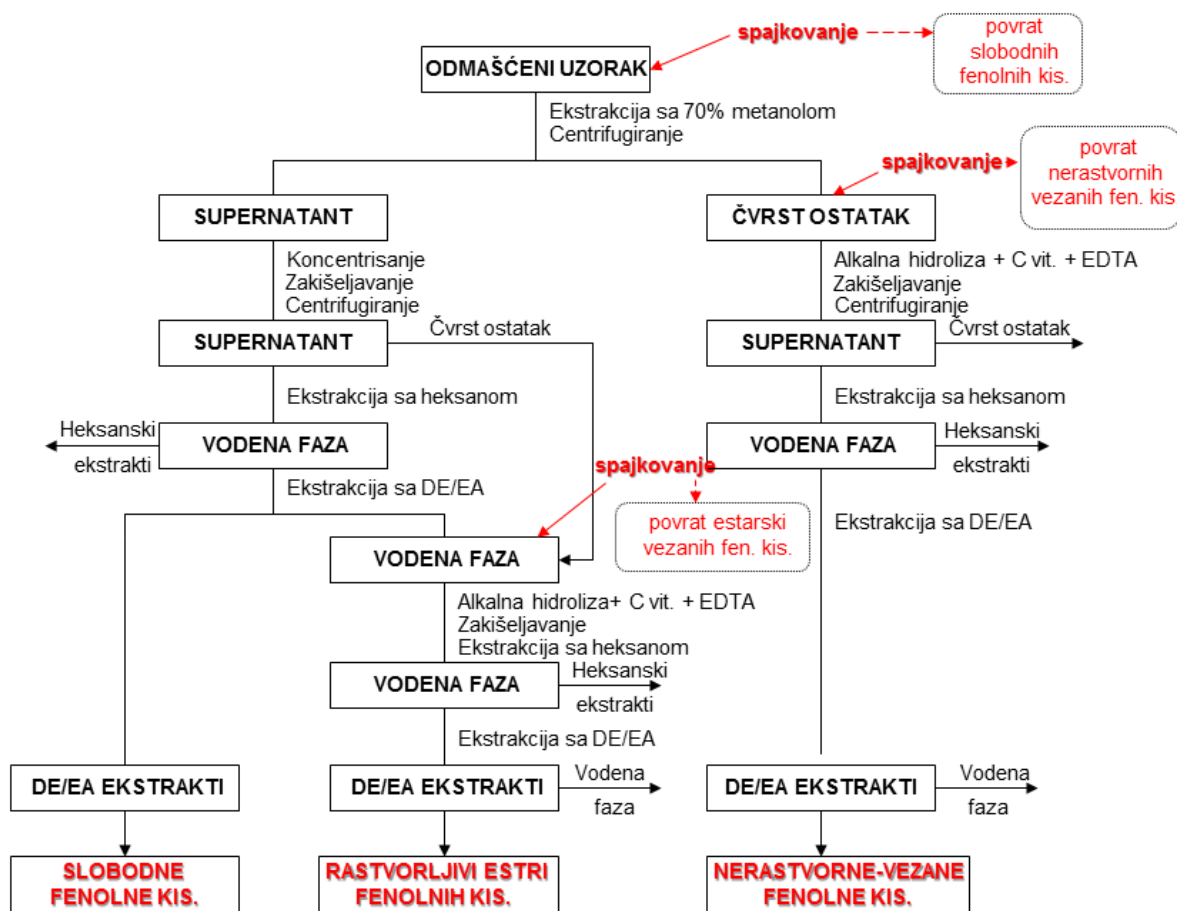
75,0 mg/l). Sve kalibracione krive su zadovoljile uslov u pogledu linearnosti ($r > 0.98$) čime je pokrivena mogućnost direktnog očitavanja širokog opsega koncentracija.

Analitički opseg je interval između donje i gornje koncentracione granice u kome se radi sa određenom preciznošću, tačnošću i linearnošću. On je određen granicom kvantifikacije kao donjom graničnom vrednošću i vrednošću od 133 % od najviše koncentracije radne kalibracione krive.

Tačnost ili povrat (eng. *recovery*) analitičke metode predstavlja stepen slaganja rezultata dobijenih definisanom metodom sa stvarnim vrednostima. Odsustvo referentnih materijala i nepostojanje zvaničnih metoda za analizu fenolnih jedinjenja čine zadatak određivanja tačnosti teškim. Kompletna ekstrakcija fenolnih jedinjenja iz ćelijskih zidova nije jednostavna, niti se do opisa takvih ekstrakcija može doći u literaturi (**Abad-García i sar., 2007**). Iz tog razloga mnogi autori primenjuju pojednostavljeni postupak procene tačnosti, čak i u jednostavnijim uzorcima (voćni sokovi), gde se primenjuju uzastopne ekstrakcije sve dok se fenolna jedinjenja više ne mogu detektovati HPLC analizom.

U ovoj disertaciji, tačnost je određena poređenjem rezultata analiza ($n=3$) spajkovane („zagađene“) odmašćene, predhodno intenzivno ekstrahovane (sa 70% metanolom) i zatim osušene pogače na početku svake „grane“ sa 1 ml mešanog radnog rastvora koncentracije 25 mg/l i iskazana je kao procenat prinosa analitičkog postupka (eng. *recovery*, %). Postupak „spajkovanja“ je prikazan na slici 13.

Povrati nekih fenolnih kiselina (*p*-kumarinske, ferulne i sinapinske) su bili niži od povrata ostalih, međutim kada se sve tri „grane“ (slobodne, estarski vezane i nerastvorne-vezane fenolne kis.) uzmu u obzir i međusobno uporede, vidi se da nije došlo do velikih gubitaka tokom hidrolize, kada se odvijala uz dodatak askorbinske kiseline i EDTA, što pokazuje njihovu zaštitnu ulogu. **Krygier i Sosulski (1982)** su prijavili gubitak kafene i sinapinske kiseline (kao standardnih supstanci, a ne u spajkovanom uzorku) samo tokom hidrolize sa 4 N NaOH (a ne tokom celog postupka ekstrakcije) u iznosu od 67% i 36.5%, redom. Gubitak kafene i sinapinske kiseline u kompletnoj validiranoj proceduri opisanoj u ovoj disertaciji je iznosio 24,89% i 38,0%, redom.



Slika 13. Procedura zagađivanja tj. „spajkovanja“ uzorka

Većina ispitivanih fenolnih kiselina je pokazala veoma visok povrat (računat kao prosečna vrednost sve tri „grane“ procedure) i on se kretao od 75,11% u slučaju kafene kiseline do 105,16 %, u slučaju vanilinske kiseline. Za sve određivane fenolne kiseline selektivnost se kretala u opsegu 1,04–2,40; što pokazuje dobro razdvajanje ispitivanih jedinjenja (tabela 10).

Preciznost je parametar validacije koji predstavlja stepen rasipanja dobijenih rezultata i iskazuje se preko standardne devijacije (SD) ili relativne standardne devijacije (RSD). Može se pratiti u uslovima ponovljivosti (s_r) i u uslovima intermedijalnosti (s_i).

Preciznost u uslovima ponovljivosti (s_r) je određena snimanjem hromatograma mešanog radnog standarda (koncentracije pojedinačnih jedinjenja 10 mg/l) u bliskom

vremenu (u toku jednog dana) u tri ponavljanja, pri istoj kalibraciji, na istoj opremi i u istoj laboratoriji od strane jednog laboranta.

Preciznost u uslovima intermedijalnosti (s_i) je određena snimanjem hromatograma mešanog radnog standarda (koncentracije pojedinačnih jedinjenja 10 mg/l) u tri različita dana sa po tri ponavljanja, pri istoj kalibraciji, na istoj opremi i u istoj laboratoriji od strane jednog laboranta.

Granica detekcije (GD) je najmanja koncentracija analita u uzorku koja se može detektovati ali ne mora biti kvantifikovana.

Granica kvantifikacije (GK) je najmanja koncentracija praćene komponente u uzorku koja se može kvantitativno odrediti sa prihvatljivom preciznošću i tačnošću.

Granice detekcije i kvantifikacije određene su snimanjem hromatograma mešanog radnog standarda ($n=3$) najniže koncentracije (0,25 mg/l). Kretale su se u opsegu 0,03 - 0,10 mg/l, and 0,10 – 0,30 mg/l, redom.

Radi procene robustnosti, ispitan je efekat malih fluktuacija sastava mobilne faze, talasne dužine detektora i temperature kolone, kao i promene nagiba kalibracione krive tokom različitih dana. Promena koncentracije metanola ili acetonitrila sa 50 na 51%, promena talasne dužine detektora sa 278 na 282 nm i promena temperature kolone u opsegu 24 - 26 °C nije znatno uticala na rezultate ispitivanja. Koeficijent varijacije CV dobijen tokom 3 dana bio je niži od 5%. Ovi rezultati su pokazali da je metoda robustna.

Svi dobijeni parametri validacije prikazani su u tabelama 9 i 10.

Tabela 9. Validacioni parametri – granica detekcije, granica kvantifikacije, linearnost i preciznost

Fenolna kiselina	GD	GK	opseg	Linearnost koeficijent korelacije	Analitički opseg	Preciznost			
						S_r		S_i	
	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)			STD (mg/l)	CV (%)	STD (mg/l)	CV (%)
galna	0,03	0,10	0 - 100	0,9939	od 0,0983 do 100	0,07	0,71	0,06	0,65
protokatehinska	0,03	0,10	0 - 100	0,9997	od 0,0974 do 100	0,08	0,80	0,16	1,62
p-hidroksibenzoeva	0,03	0,10	0 - 100	0,9996	od 0,0979 do 100	0,05	0,54	0,08	0,77
p-hidroksibenzaldehid	0,05	0,16	0 - 100	0,9846	od 0,1573 do 102	0,06	0,50	0,08	0,66
vanilinska	0,04	0,12	0 - 100	0,9997	od 0,1191 do 101	0,07	0,74	0,05	0,58
kafena	0,10	0,30	0 - 100	0,9992	od 0,3029 do 106	0,09	0,85	0,04	0,39
siringinska	0,04	0,12	0 - 100	0,9990	od 0,1168 do 100	0,03	0,27	0,07	0,70
p-kumarinska	0,03	0,10	0 - 100	0,9955	od 0,0992 do 101	0,07	0,72	0,07	0,66
ferulna	0,05	0,15	0 - 100	0,9997	od 0,1487 do 100	0,08	0,86	0,16	1,60
sinapinska	0,04	0,13	0 - 100	0,9999	od 0,1309 do 101	0,10	1,00	0,17	1,70

Tabela 10. Validacioni parametri – tačnost i selektivnost

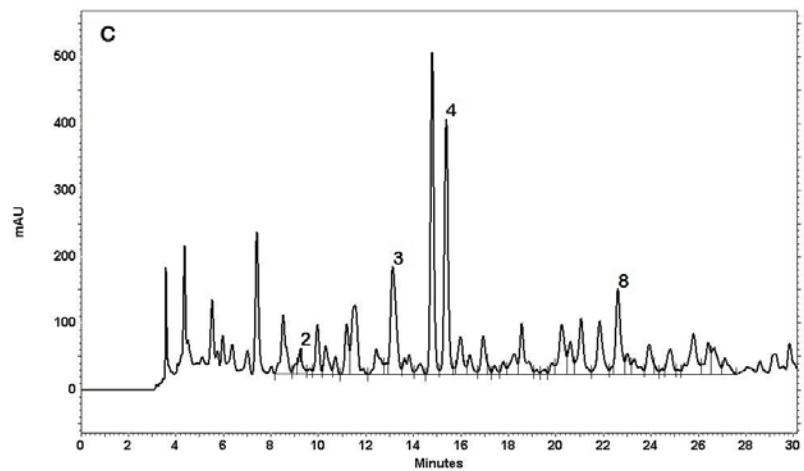
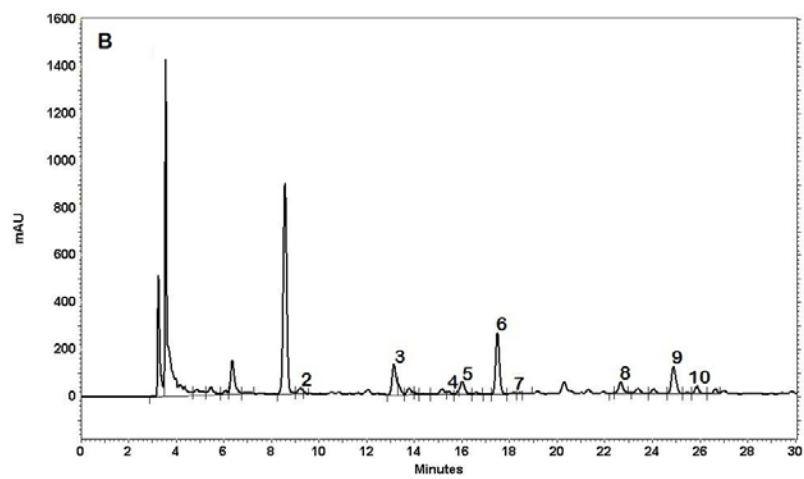
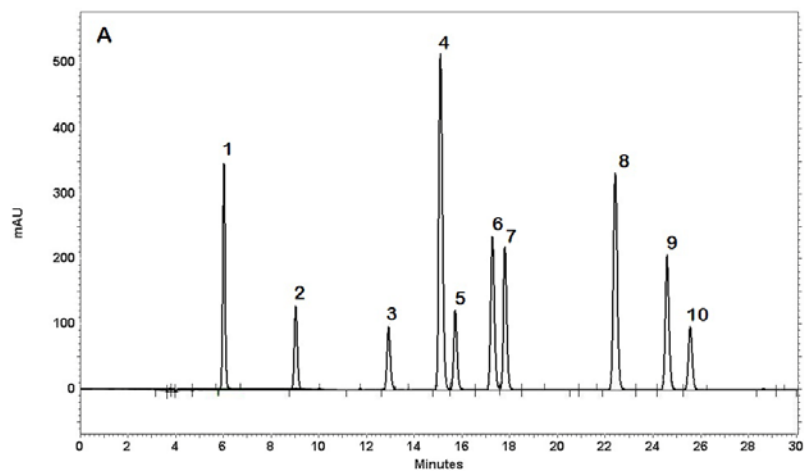
Fenolna kiselina	Tačnost (%)			Selektivnost		
	slobodne	esterifikovane	nerastvorne- vezane	komponenta a	komponenta b	α_{ab}
galna	97,03	98,11	95,12	galna	protokatehinska	2,40
protokatehinska	96,08	105,13	94,78	protokatehinska	p-hidroksibenzoeva	1,72
p-hidroksibenzoeva	96,94	108,81	77,24	p-hidroksibenzoeva	p-hidroksibenzaldehid	1,23
p-hidroksibenzaldehid	91,42	89,50	87,60	p-hidroksibenzaldehid	vanilinska	1,06
vanilinska	118,74	110,88	85,85	vanilinska	kafena	1,13
kafena	75,55	91,29	58,50	kafena	siringinska	1,04
siringinska	97,42	98,41	72,21	siringinska	p-kumarinska	1,32
p-kumarinska	42,49	45,02	47,68	p-kumarinska	ferulna	1,12
ferulna	53,93	53,15	54,75	ferulna	sinapinska	1,05
sinapinska	61,74	70,05	54,19			

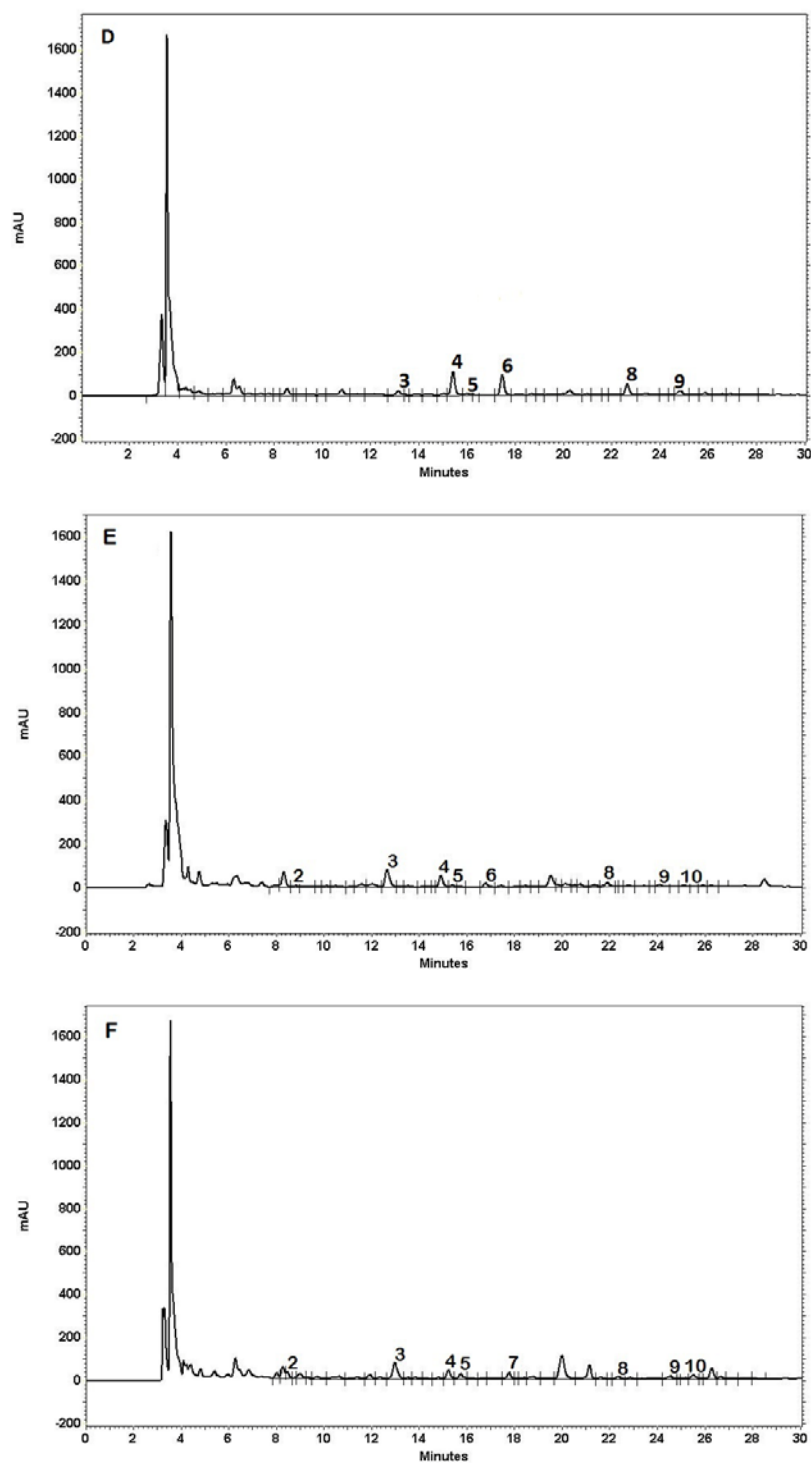
4.2. SADRŽAJ FENOLNIH KISELINA

4.2.1. Sadržaj i raspodela fenolnih kiselina u uljanoj tikvi (*Cucurbita pepo* L.)

Semena uljane tikve golice i jezgra varijeteta sa ljuskom su analizirana s obzirom da se u tim oblicima koriste u proizvodnji ulja, ili kao grickalice. Imajući u vidu da golica daje veći prinos ulja od varijeteta sa ljuskom, te da se u svrhu proizvodnje ulja češće i koristi, ispitivana je samo pogača ostala nakon hladnog ceđenja ulja iz semena uljane tikve golice. Opna (od golice) i ljuska (od varijeteta sa ljuskom) su od interesa pošto je poznato da spoljni slojevi semena po pravilu sadrže mnogo veće koncentracije fenolnih jedinjenja od unutrašnjih slojeva jer predstavljaju prvu liniju odbrane od spoljnog okruženja i patogena (Balasundram i sar., 2006; Zhou et al., 2004). Shahidi i sar. (2006) su pokazali da je sadržaj polifenola u ljusci belog i crnog susamovog semena viši nego u odnosu na celo seme. Attree i sar. (2015) su ustanovili da je u svih šest ispitivanih varijeteta kikirikija većina fitohemikalija i antioksidanasa bila raspoređena u omotaču semena, nešto manje u jezgru a najmanje u kotiledonu. Osim toga nakon ljuštenja semena, samo jezgra bivaju iskorišćena, dok se ljuske odbacuju. Hromatogrami dobijeni od frakcija golice su prikazani na Slici 15. Sadržaj i raspodela fenolnih kiselina u pogači, semenu i opni golice su prikazani u Tabelama 11, 12, i 13, a sadržaj i raspodela fenolnih kiselina ljuske i jezgra koji potiču od varijeteta sa ljuskom u Tabelama 14 i 15. Rezultati pokazuju da je ukupni sadržaj fenolnih kiselina (računat kao zbir tri frakcije) znatno viši u opni i ljusci (218,39 i 158,73 mg/kg suve materije) nego u semenu golice i jezgru varijeteta sa ljuskom (77,02 i 51,53 mg/kg s.m.).

Galna kiselina nije identifikovana ni u jednom uzorku uljane tikve, siringinska u uljanoj pogači, a kafena u ljuskama. *p*-Hidroksibenzoeva kiselina je bila dominantna u svim ispitivanim uzorcima, sa 34,72%, 52,04%, 51,44%; 67,38% i 51,80% u semenu golice, pogači, opni, jezgru varijeteta sa ljuskom i ljusci, redom, računato na ukupan sadržaj fenolnih kiselina. Pored *p*-hidroksibenzoeve kiseline, kao dominantnog jedinjenja, u opadajućem redosledu sadržaja su bile kvantifikovane: kafena, ferulna, vanilinska kiselina u semenu golice; *p*-hidroksibenzaldehid, *p*-kumarinska i vanilinska kiselina u pogači; *p*-hidroksibenzaldehid, kafena i *p*-kumarinska kiselina u opni. U varijetetu sa ljuskom jezgra su bila bogata sa sinapinskom, protokatehinskom kiselinom i *p*-hidroksibenzaldehidom; dok su u ljusci dominantna jedinjenja bila *p*-hidroksibenzaldehid, vanilinska i protokatehinska kiselina.





Slika 15. Hromatogrami standardne smeše fenolnih kiselina (f.k.) i uzoraka uljane tikve *Cucurbita pepo* L.; **A:** radna standardna smeša (10 mg/l) za kalibraciju: 1 – galna, 2 – protokatehinska, 3 – *p*-hidroksibenzoeva kiselina, 4 – *p*-hidroksibenzaldehid, 5 – vanilinska, 6 – kafena, 7 – siringinska, 8 – *p*-kumarinska, 9 – ferulna, 10 – sinapinska kiselina; **B:** seme golice – esterifikovane f.k.; **C:** pogača uljane tikve – slobodne f. k.; **D:** Opna golice – nerastvorne-vezane f.k.; **E:** Jezgro varijeteta sa ljuskom – nerastvorne-vezane f.k.; **F:** Ljuska – esterifikovane f.k.

Tabela 11. Distribucija fenolnih kiselina u uljanoj pogači golice

Fenolna kiselina	Sadržaj fenolnih kiselina (mg/kg s.m.)		
	Slobodne	Estarski vezane	Nerastvorne-vezane
galna	ND	ND	ND
protokatehinska	1,58 ± 0,15	3,10 ± 0,25	ND
<i>p</i> -hidroksibenzoeva	27,03 ± 2,65	16,22 ± 1,63	3,33 ± 0,27
<i>p</i> -hidroksibenzaldehid	9,54 ± 0,11	0,57 ± 0,04	3,51 ± 0,34
vanilinska	ND	4,20 ± 0,40	0,53 ± 0,05
kafena	ND	4,44 ± 0,42	ND
siringinska	ND	ND	ND
<i>p</i> -kumarinska	5,04 ± 0,22	2,36 ± 0,22	ND
ferulna	ND	3,88 ± 0,24	ND
sinapinska	ND	4,18 ± 0,42	ND
ZBIR	43,19 ± 3,16	38,95 ± 3,90	7,37 ± 0,29

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri ponavljanja ± SD, ND – nije detektovano, s.m. – suva materija, SD- standardna devijacija

Tabela 12. Distribucija fenolnih kiselina u semenu golice

Fenolna kiselina	Sadržaj fenolnih kiselina (mg/kg s.m.)		
	Slobodne	Estarski vezane	Nerastvorne-vezane
galna	ND	ND	ND
protokatehinska	ND	3,66 ± 0,35	0,72 ± 0,06
<i>p</i> -hidroksibenzoeva	3,64 ± 0,38	15,96 ± 1,20	7,14 ± 0,11
<i>p</i> -hidroksibenzaldehid	0,94 ± 0,09	0,35 ± 0,02	1,34 ± 0,12
vanilinska	ND	6,66 ± 0,57	1,37 ± 0,12
kafena	2,80 ± 0,25	12,20 ± 0,70	2,08 ± 0,20
siringinska	ND	0,36 ± 0,01	0,28 ± 0,05
<i>p</i> -kumarinska	1,79 ± 0,16	1,82 ± 0,13	0,69 ± 0,01
ferulna	1,01 ± 0,10	7,05 ± 0,16	1,78 ± 0,16
sinapinska	2,04 ± 0,18	0,51 ± 0,04	0,83 ± 0,08
ZBIR	12,22 ± 0,22	48,57 ± 2,08	16,23 ± 0,11

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm SD, ND – nije detektovano, s.m. – suva materija, SD- standardna devijacija

Tabela 13. Distribucija fenolnih kiselina u opni golice

Fenolna kiselina	Sadržaj fenolnih kiselina (mg/kg s.m.)		
	Slobodne	Estarski vezane	Nerastvorne-vezane
galna	ND	ND	ND
protokatehinska	ND	6,70 \pm 0,60	ND
<i>p</i> -hidroksibenzoeva	79,70 \pm 5,89	20,76 \pm 1,88	11,87 \pm 0,77
<i>p</i> -hidroksibenzaldehid	11,99 \pm 1,06	1,28 \pm 0,11	11,52 \pm 0,87
vanilinska	6,37 \pm 0,22	5,61 \pm 0,48	4,13 \pm 0,40
kafena	ND	2,32 \pm 0,03	21,57 \pm 0,42
siringinska	ND	ND	ND
<i>p</i> -kumarinska	8,23 \pm 0,07	1,70 \pm 0,10	8,02 \pm 0,39
ferulna	1,68 \pm 0,13	3,27 \pm 0,12	7,82 \pm 0,75
sinapinska	ND	3,85 \pm 0,38	ND
ZBIR	107,96 \pm 5,29	45,50 \pm 3,29	64,93 \pm 3,28

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm SD, ND – nije detektovano, s.m. – suva materija, SD- standardna devijacija

Tabela 14. Distribucija fenolnih kiselina u ljusci varijeteta sa ljuskom

Fenolna kiselina	Sadržaj fenolnih kiselina (mg/kg s.m.)		
	Slobodne	Estarski vezane	Nerastvorne-vezane
galna	ND	ND	ND
protokatehinska	6,64 \pm 0,60	0,59 \pm 0,03	1,34 \pm 0,09
<i>p</i> -hidroksibenzoeva	52,28 \pm 2,54	12,70 \pm 1,12	17,24 \pm 0,64
<i>p</i> -hidroksibenzaldehid	8,79 \pm 0,82	1,04 \pm 0,04	23,04 \pm 1,71
vanilinska	5,72 \pm 0,34	2,84 \pm 0,26	14,61 \pm 0,68
kafena	ND	ND	ND
siringinska	ND	2,19 \pm 0,13	2,13 \pm 0,12
<i>p</i> -kumarinska	2,93 \pm 0,20	0,49 \pm 0,04	ND
ferulna	ND	1,07 \pm 0,09	ND
sinapinska	ND	3,09 \pm 0,04	ND
ZBIR	76,36 \pm 5,75	24,01 \pm 2,33	58,36 \pm 3,21

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm SD, ND – nije detektovano, s.m. – suva materija, SD- standardna devijacija

Tabela 15. Distribucija fenolnih kiselina u jezgru varijeteta sa ljuskom

Fenolna kiselina	Sadržaj fenolnih kiselina (mg/kg s.m.)		
	Slobodne	Estarski vezane	Nerastvorne-vezane
galna	ND	ND	ND
protokatehinska	0,40 \pm 0,03	1,49 \pm 0,13	0,60 \pm 0,05
<i>p</i> -hidroksibenzoeva	18,33 \pm 1,73	5,81 \pm 0,42	10,58 \pm 1,02
<i>p</i> -hidroksibenzaldehid	1,15 \pm 0,10	ND	1,23 \pm 0,07
vanilinska	ND	0,72 \pm 0,06	0,84 \pm 0,06
kafena	ND	0,90 \pm 0,08	0,86 \pm 0,07
siringinska	ND	0,80 \pm 0,06	NK
<i>p</i> -kumarinska	1,00 \pm 0,09	ND	0,87 \pm 0,07
ferulna	ND	ND	0,94 \pm 0,08
sinapinska	1,98 \pm 0,14	1,62 \pm 0,12	1,38 \pm 0,12
ZBIR	22,87 \pm 1,80	11,34 \pm 1,01	17,32 \pm 1,52

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm SD, ND – nije detektovano, NK – nije kvantifikovano, s.m. – suva materija,

SD- standardna devijacija

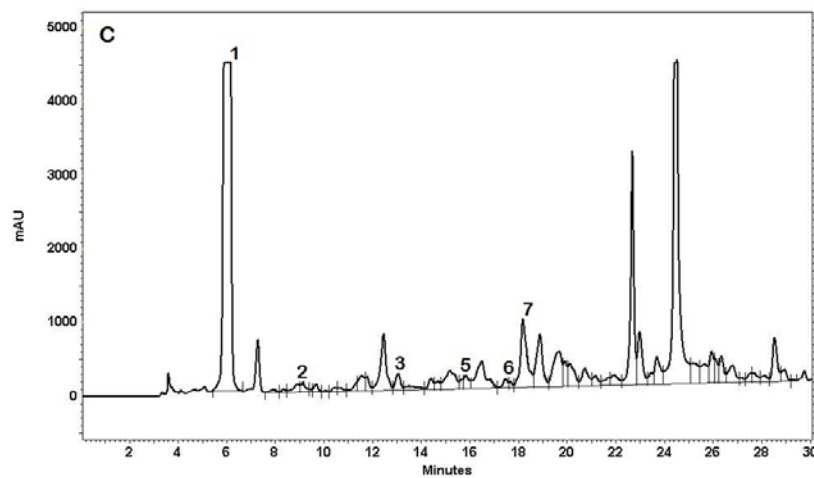
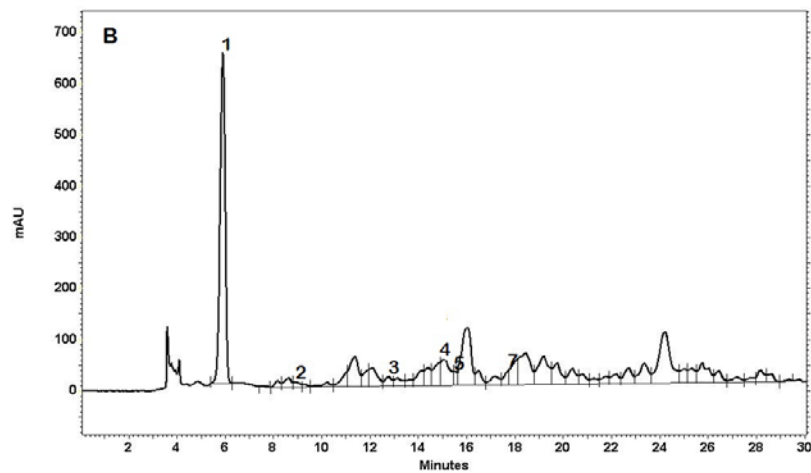
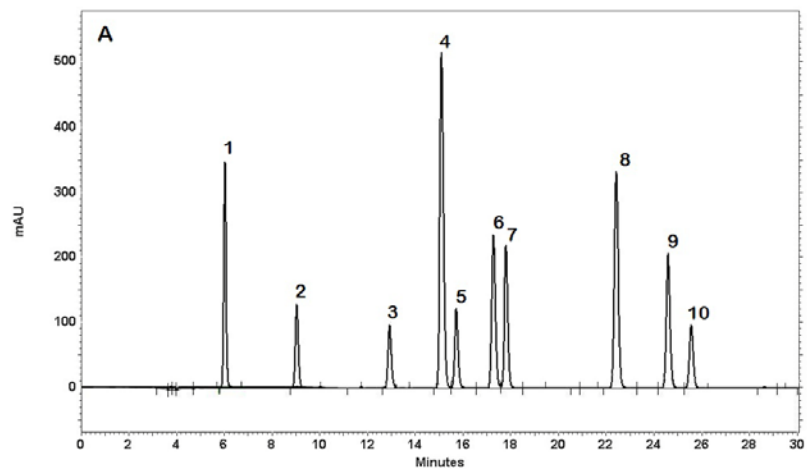
U svim uzorcima sadržaj vezanih fenolnih kiselina (estarski vezanih i nerastvornih-vezanih) fenolnih kiselina je bio viši od sadržaja slobodnih, što ukazuje da se većina fenolnih kiselina iz pomenutih uzoraka ne može ekstrahovati vodenim rastvorom metanola, već se oslobađa iz strukture ćelijskog zida alkalnom hidrolizom. U odmašćenom semenu golice npr., esterifikovani oblik je činio 63,06% a nerastvorni-vezani 21,07% (u zbiru 84,13%) od ukupnog sadržaja fenolnih kiselina. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim za druge tipove semena uljarica (**Dabrowski i Sosulski, 1984**). Do današnjeg dana je objavljen jako mali broj radova koji se bavi istraživanjem sadržaja fenolnih kiselina u vrsti *Cucurbita pepo* L. (**Dragovic-Uzelac i sar., 2005**), pri čemu su autori **Mattila i Hellström (2007)** uspeli da kvantifikuju samo dve fenolne kiseline sa spektrima sličnim hlorogenskoj i sinapinskoj kiselini; a još je manji broj onih koji se bave raspodelom polifenola u pomenutoj biljnoj vrsti. Ipak, **Iswaldi i sar. (2013)** su pomoću HPLC kuplovane sa masenim analizatorom s vremenom preleta (eng. time-of-flight, TOF) potvrdili prisustvo *p*-kumarinske, ferulne, kafene, hlorogenske, heksozida sinapinske, protokatehinske, vanilinske, glikozida vanilinske kiseline i *p*-hidroksidbenzaldehida prilikom profilisanja fenolnih i drugih polarnih jedinjenja u *Cucurbita pepo* L. Prisustvo glukozida i estara hidroksibenzoevih kiselina (protokatehinska, *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, siringinska) je poznato decenijama. U višim biljkama oni imaju razne fiziološke funkcije. Slobodne kiseline se obično oslobađaju enzimskom hidrolizom kao signalna ili odbrambena jedinjenja koja imaju funkciju zaštite od napada patogena, ili služe za inkorporiranje u ćelijski zid (**Dey i sar., 2005**). **Acosta-Estrada i sar. (2014)** navode podatak da u voću i povrću vezani polifenoli čine 24% od ukupnog sadržaja polifenola, a nasuprot tome, većina polifenola koja se nalazi u žitaricama je prisutna u nerastvornom-vezanom obliku. U žitaricama, najveći deo fenolnih kiselina je kovalentno vezan za polisaharide i lignin ćelijskog zida. Poznato je da su hidroksicimetne kiseline (kafena, *p*-kumarinska, ferulna, sinapinska) jedinjenja koja utiču na čvrstinu ćelijskog zida i odbranu od patogena. Njihov sadržaj se menja tokom sazrevanja (**Faulds i Williamson, 1999**). Hidroksicimetne kiseline (naročito ferulna i *p*-kumarinska) se estarski vezuju za lignin i arabinosilane u ćelijskom zidu (**Andreasen i sar., 1999**). Hidroksicimetne i hidroksibenzoeve kiseline stvaraju estarske veze sa ligninom preko svojih hidroksilnih grupa u aromatičnom prstenu i estarske veze sa strukturnim ugljenim hidratima i proteinima preko svojih karboksilnih grupa (**Acosta-Estrada i sar. 2014**). Autori **Zhou i sar. (2004)** su zaključili da su ćelijski zidovi omotača iz semena pirinča znatno lignifikovaniji od jezgra. Slično, dobijeni rezultati prikazuju da su hidroksicimetne kiseline u ljusci semena uljane tikve

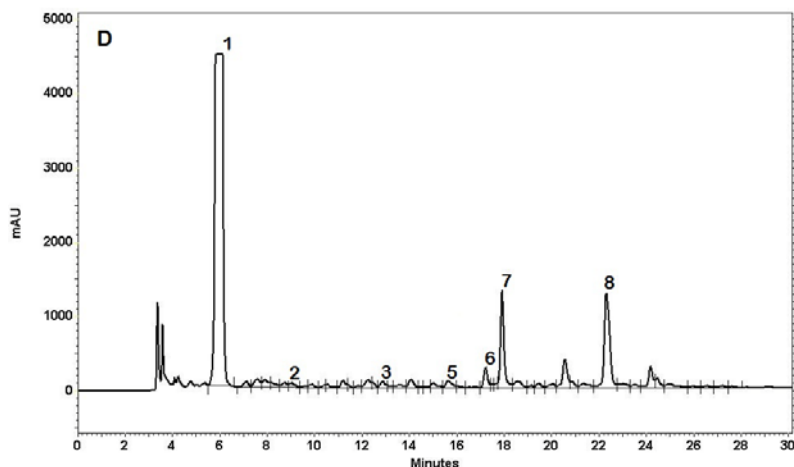
uglavnom prisutne u esterifikovanom obliku. Sadržaj vezanih fenolnih kiselina (esterifikovanih i nerastvornih) je za uzorke pogače, opne, jezgra varijeteta sa ljuskom i ljuske iznosio 51,75%, 50,57%, 55,62% i 51,89% redom. **Dabrowski et al. (1984)** su objavili da nakon ekstrakcije odmašćenih semena uljarica sa tetrahidrofuranom nisu detektovane slobodne fenolne kiseline u merljivim količinama. Međutim po proceduri opisanoj u ovoj disertaciji, ekstrakcija sa 70% metanolom potpomognuta ultrazvučnom ekstrakcijom imala je za rezultat kvantifikaciju nezanemarljivih količina fenolnih kiselina prisutnih u slobodnom obliku. Rezultati pokazuju da uljana pogača zaostala nakon hladnog ceđenja ulja (računato na sadržaj suve materije) sadrži više fenolnih kiselina u odnosu na seme iz kog potiče. Još je interesantnija činjenica da su fenolna jedinjenja u pogači lakše dostupna u smislu ekstrakcije nego u semenu, s obzirom da se u pogači fenolne kiseline nalaze u većem procentu u slobodnom obliku.

Kao što je ranije već rečeno, seme uljane tikve, kao i ekstrakti dobijeni iz njega, sadrže kompleksnu smešu supstanci i njihovo dejstvo se najverovatnije ne može pripisati samo jednom sastojku. Moguće je da fenolne kiseline iz uljane tikve potpomažu povoljan efekat Δ^7 -sterola na benigno uvećanje prostate.

4.2.2. Sadržaj i raspodela fenolnih kiselina u naru (*Punica granatum L.*)

Sadržaj i raspodela fenolnih kiselina ispitan je iz semena, pogače i kore nara. U pogači nara galna kiselina je bila najzastupljenija u sva tri oblika (slobodne, estarski vezane i nerastvorne vezane fenolne kiseline) sa 97,41%, 87,68% i 96,96%, redom. Takođe, s obzirom na ukupan sadržaj od 2466,94 mg/kg računat na suhu materiju, sadržaj galne kiseline je višestruko veći od svih određivanih fenolnih kiselina. Veoma visok sadržaj galne kiseline se može objasniti činjenicom da ona ulazi u sastav hidrolizabilnih tanina i da su visoke koncentracije ovih tanina u pojedinim delovima nara već ranije objavljene u literaturi (**Arapitsas, 2012; Lu i Yuan, 2008**).





Slika 16. Hromatogrami standardne smeše fenolnih kiselina (f.k.) i uzoraka nara *Punica granatum* L.; **A:** radna standardna smeša (10 mg/l) za kalibraciju: 1 – galna, 2 – protokatehinska, 3 – *p*-hidroksibenzoeva kiselina, 4 – *p*-hidroksibenzaldehid, 5 – vanilinska, 6 – kafena, 7 – siringinska, 8 – *p*-kumarinska, 9 – ferulna, 10 – sinapinska kiselina; **B:** razblaženi ekstrakt semena nara (R=10) – slobodne f.k.; **C:** pogača nara – estarski vezane f. k.; **D:** kora nara – nerastvorne-vezane f.k.

Koncentracije ukupnih polifenola, kondenzovanih i hidrolizabilnih tanina mogu varirati između različitih sorti, ali su ipak više nego u drugim biljkama (Saad i sar., 2012). Vanilinska kiselina je bila prisutna u sva tri oblika, druga po redu u smislu sadržaja, dok *p*-kumarinska, ferulna i sinapinska kiselina nisu detektovane ni u jednoj frakciji pogače nara (slika 16 i tabela 16). Nasuprot ovde dobijenim rezultatima, He i sar. (2011) navode prisustvo derivata ferulne kiseline u ostatku od semena nara. Takođe su našli derivat kafene kiseline, što je u skladu sa ovde pomenutim rezultatima, međutim nisu detektovali slobodne fenolne kiseline, koje su dokazane istraživanjima u okviru ove disertacije. U pogači je nađena znatna količina slobodne galne kiseline i manje količine protokatehinske, *p*-hidroksibenzoeve i vanilinske kiseline. Osim toga, siringinska kiselina je nađena u esterifikovanom obliku, dok je nerastvorna-vezana frakcija sadržala ista jedinjenja kao i slobodna i dodatno, *p*-hidroksibenzaldehid. Tehranifar i sar. (2011) su objavili da su metanolni ekstrakti ljuske nara i semena pokazali najsnažnije antifungalne i antioksidantne efekte, zaključujući da su oni najverovatnije prisutni zbog visokog sadržaja polifenola. Ova činjenica je indirektno potvrđena u disertaciji s obzirom da je galna kiselina poznata po antioksidantnom i antikandidnom dejstvu (Hong i sar., 2011; Soong i Barlow, 2006), pa neke od pomenutih aktivnosti verovatno potiču od njenog prisustva. U sveže pripremljenom soku nara dobijenom presovanjem semena, Poyrazoğlu i

sar. (2002) su identifikovali galnu, protokatehinsku, hlorogensku, kafenu, *o*- i *p*-kumarinsku, kao i ferulnu kiselinu. **Fischer i sar. (2011)** su međutim, određivali sadržaj polifenolnih jedinjenja (među njima i fenolnih kiselina) u sokovima, kori i mezokarpu nara. Iako su kvantifikovali galnu, protokatehinsku, vanilinsku, kafenu, ferulnu i kumarinsku kiselinu ili njihove derivate u soku nara, u kori nara su kvantifikovali samo galnu kiselinu (270,4 mg/kg s.m.) i to u koncentraciji nižoj nego u eksperimentima dobijenim u okviru ove disertacije (1155,96 mg/kg s.m.). Sadržaj galne kiseline je bio mnogostruko veći i u odnosu na rezultat koji su dobili **Kazemi i sar. (2016)** koji su ekstrakciju kore nara izveli sa 70% etanolom i pulsnom ultrazvučnom ekstrakcijom.

U nerastvorno-vezanom obliku određen je nešto viši sadržaj galne kiseline: 1259,12 mg/kg s.m., dok je estarski vezana galna kiselina bila prisutna u količini od gotovo 8 g/kg s.m. (tačnije, 7721,80 mg/kg s.m.). Dobijeni rezultati za izuzetno visok sadržaj galne kiseline u kori nara se poklapaju sa istraživanjem koje su obavili **Mirdehghan i Rahemi (2007)**, s obzirom na njihov zaključak da je sadržaj ukupnih polifenola bio uočljivo viši (gotovo osmostruko) u kori nara u odnosu na ostatak ploda nara (eng. *arils with seeds*). **Elfalleh i sar. (2011)** su kvantifikovali slobodnu galnu kiselinu u količini 1096,1 – 1295,7 mg/kg u kori nara što je u skladu sa rezultatima iz Tabele 17, kao i manje koncentracije kafene i *p*-kumarinske kiseline, dok u ovoj disertaciji kafena i *p*-kumarinska kiselina nisu nađene kao slobodne. Takođe, nasuprot literaturnim podacima, ferulna i sinapinska kiselina nisu identifikovane ni u jednom uzorku *Punica granatum* L. biljne vrste, dok je *p*-kumarinska nađena samo u nerastvorno-vezanom obliku u kori nara.

U semenu nara, galna kiselina je bila ravnomerno zastupljena između slobodnog (404,57 mg/kg s.m.) i estarski vezanog oblika (444,51 mg/kg s.m.) dok je u nešto manjoj koncentraciji (260,8 mg/kg s.m.) nađena u nerastvorno-vezanom obliku (Tabela 18). To znači da se većim delom veoma lako može ekstrahovati, sa vodenim rastvorom metanola (grana I i II). U semenu su kvantifikovane pored galne, *p*-hidroksibenzoeva kiselina sa ukupnim sadržajem 49,88 mg/kg s.m., vanilinska kiselina sa 45,85 mg/kg s.m. i u nešto nižim koncentracijama protokatehinska, siringinska, kafena kiselina i *p*-hidroksibenzaldehid.

p-Kumarinska, ferulna i sinapinska nisu identifikovane ni u jednoj frakciji semena nara.

Tabela 16. Distribucija fenolnih kiselina u uljanoj pogači nara

Fenolna kiselina	Sadržaj fenolnih kiselina (mg/kg s.m.)		
	Slobodne	Estarski vezane	Nerastvorne-vezane
galna	1178,82 ± 4,23	581,02 ± 2,53	707,10 ± 2,85
protokatehinska	12,98 ± 0,32	13,05 ± 0,30	1,25 ± 0,11
<i>p</i> -hidroksibenzoeva	11,71 ± 0,29	22,43 ± 0,50	6,22 ± 0,19
<i>p</i> -hidroksibenzaldehid	ND	ND	2,06 ± 0,16
vanilinska	6,62 ± 0,19	33,21 ± 0,81	12,65 ± 0,30
kafena	ND	11,24 ± 0,31	ND
siringinska	ND	1,74 ± 0,12	ND
<i>p</i> -kumarinska	ND	ND	ND
ferulna	ND	ND	ND
sinapinska	ND	ND	ND
ZBIR	1210,13 ± 4,30	662,69 ± 2,64	729,28 ± 2,97

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri ponavljanja ± SD, ND – nije detektovano, s.m. – suva materija, SD- standardna devijacija

Tabela 17. Distribucija fenolnih kiselina u kori nara

Fenolna kiselina	Sadržaj fenolnih kiselina (mg/kg s.m.)		
	Slobodne	Estarski vezane	Nerastvorne-vezane
galna	1155,96 ± 3,85	7721,80 ± 4,20	1259,12 ± 3,70
protokatehinska	13,92 ± 0,60	ND	8,83 ± 0,25
<i>p</i> -hidroksibenzoeva	60,64 ± 1,05	17,98 ± 1,20	11,36 ± 0,15
<i>p</i> -hidroksibenzaldehid	ND	59,28 ± 1,32	ND
vanilinska	28,00 ± 0,85	15,58 ± 0,85	10,81 ± 0,32
kafena	ND	ND	12,45 ± 0,28
siringinska	131,06 ± 1,02	28,1 ± 2,05	3,00 ± 0,11
<i>p</i> -kumarinska	ND	ND	54,36 ± 0,30
ferulna	ND	ND	ND
sinapinska	ND	ND	ND
ZBIR	1389,58 ± 3,50	7842,74 ± 4,05	1359,93 ± 3,20

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri ponavljanja ± SD, ND – nije detektovano, s.m. – suva materija, SD- standardna devijacija

Tabela 18. Distribucija fenolnih kiselina u semenu nara

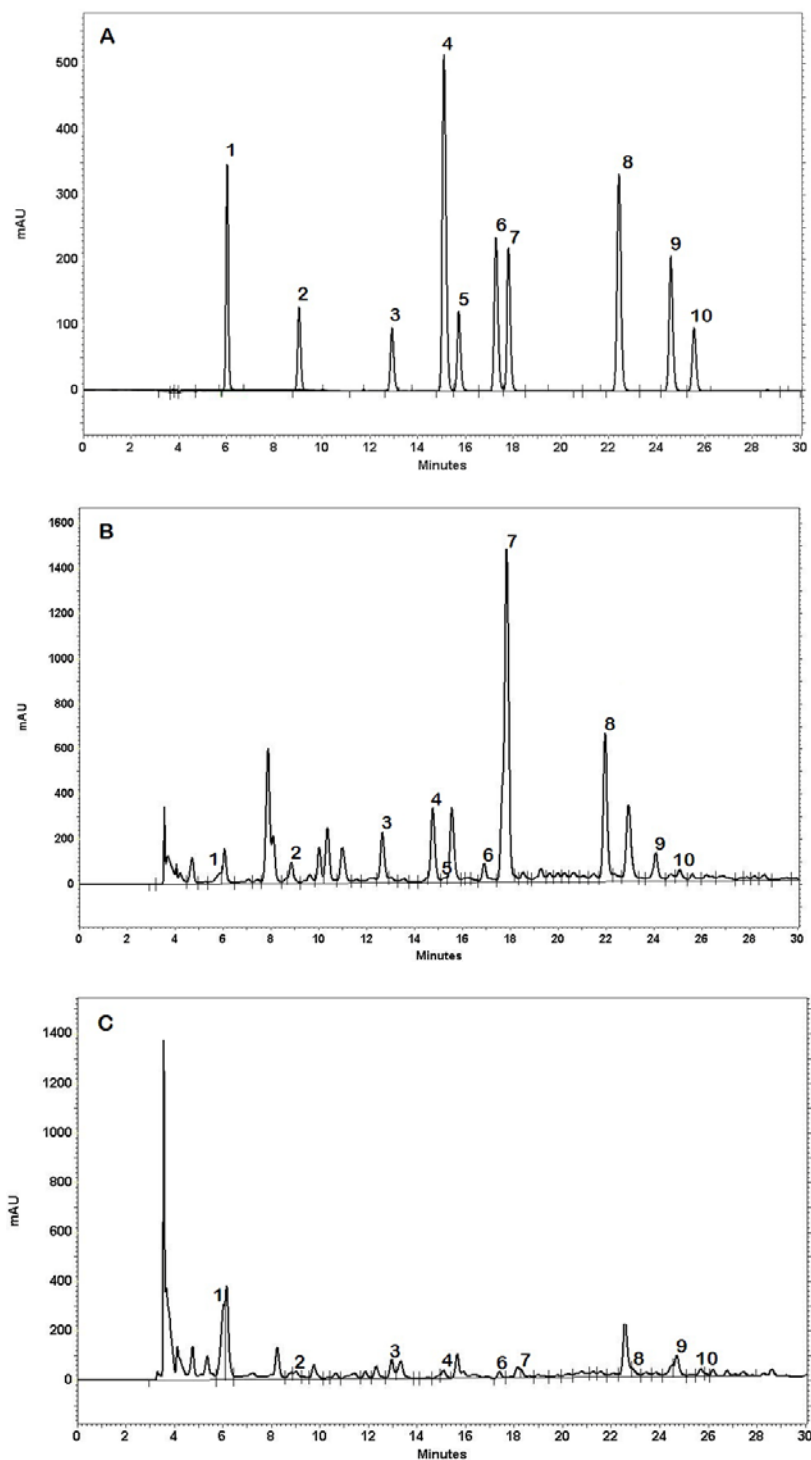
Fenolna kiselina	Sadržaj fenolnih kiselina (mg/kg s.m.)		
	Slobodne	Estarski vezane	Nerastvorne-vezane
galna	404,57 ± 2,08	444,51 ± 2,54	260,8 ± 1,95
protokatehinska	14,34 ± 1,05	6,38 ± 0,48	10,98 ± 0,30
<i>p</i> -hidroksibenzoeva	28,39 ± 1,53	15,89 ± 0,78	5,60 ± 0,22
<i>p</i> -hidroksibenzaldehid	15,20 ± 1,88	ND	ND
vanilinska	24,61 ± 1,73	8,66 ± 1,20	12,85 ± 1,06
kafena	ND	4,29 ± 0,40	ND
siringinska	ND	ND	ND
<i>p</i> -kumarinska	ND	ND	ND
ferulna	ND	ND	ND
sinapinska	ND	ND	ND
ZBIR	497,53 ± 2,50	479,73 ± 2,65	290,23 ± 1,90

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri ponavljanja ± SD, ND – nije detektovano, s.m. – suva materija, SD- standardna devijacija

4.2.3. Sadržaj i raspodela fenolnih kiselina u crnom kimu (*Nigella sativa* L.)

Iako su seme i pogača crnog kima izučavani u mnogim naučnim istraživanjima, sadržaj i raspodela fenolnih jedinjenja u ovim uzorcima su retko objavljivani. Za razliku od rezultata koje su saopštili **Ratz-Lyko i sar. (2014)**, koji su u vodeno-etanolnom ekstraktu pogače identifikovali samo hidroksibenzoenu i siringinsku kiselinu, u ovoj disertaciji su, u frakciji slobodnih fenolnih kiselina pored prethodno pomenute dve kvantifikovane još i protokatehinska, vanilinska kiselina, kao i *p*-hidroksibenzaldehid; zatim u frakciji estarski vezanih fenolnih kiselina sve izuzev vanilinske; a u nerastvorno-vezanoj frakciji sve ispitivane fenolne kiseline (Slika 17 i Tabela 19). **Mariod i sar. (2009)** su istražili antioksidantnu aktivnost i odredili sadržaj polifenola neprečišćenog metanolnog ekstrakta dobijenog iz pogače crnog kima, kao i njegovih frakcija korišćenjem etil-acetata, heksana i vode. Dominantne fenolne kiseline identifikovane HPLC-DAD sistemom u neprečišćenom metanolnom ekstraktu i iz njega dobijenoj vodenoj frakciji su bile: *p*-hidroksibenzoena, siringinska i *p*-kumarinska kiselina. Takođe su zaključili da ukoliko se frakcije bogate polifenolima koje potiču od pogače crnog kima dodaju kukuruznom ulju u kome nema prisutnih antioksidanata, dolazi do inhibicije oksidacije ulja. Pri tome neke frakcije su bile efikasnije u odlaganju formiranja primarnih i sekundarnih oksidacionih proizvoda kukuruznog ulja u poređenju sa sintetskim antioksidantom BHA. Međutim, u pomenutom eksperimentu je određivan sadržaj samo ekstraktibilnih fenolnih kiselina, dok je sadržaj nerastvornih-vezanih bio zanemaren.

U skladu sa prethodno pomenutim rezultatima, potvrđeno je da su dominantne fenolne kiseline u pogači *p*-hidroksibenzoena, siringinska i *p*-kumarinska kiselina, iako sa drugačijom raspodelom. U slobodnom obliku fenolna kiselina sa najvišom koncentracijom bila je *p*-hidroksibenzoena kiselina sa 97,65 mg/kg s.m. tj. 83,58%, ali i ukupno (čineći više od 1/3 svih fenolnih kiselina u pogači crnog kima, dok je samo mala količina siringinske kiseline npr. bila detektovana u slobodnom obliku. Nasuprot tome, dominantni oblik siringinske kiseline je nađen u frakciji nerastvornih-vezanih fenolnih kiselina 93,35 s.m., što je bio slučaj i sa *p*-kumarinskom kiselinom (26,33 mg/kg). Zapravo, *p*-hidroksibenzoena i siringinska kiselina su nađene u sva tri oblika, dok je *p*-kumarinska kiselina kvantifikovana samo u vezanim oblicima (estarski i nerastvornom).



Slika 17. Hromatogrami standardne smeše fenolnih kiselina (f.k.) i uzoraka crnog kima *Nigella sativa* L.; **A:** radna standardna smeša (10 mg/l) za kalibraciju: 1 – galna, 2 – protokatehinska, 3 – *p*-hidroksibenzoeva kiselina, 4 – *p*-hidroksibenzaldehid, 5 – vanilinska, 6 – kafena, 7 – siringinska, 8 – *p*-kumarinska, 9 – ferulna, 10 – sinapinska kiselina; **B:** seme crnog kima – nerastvorne-vezane f.k.; **C:** pogača crnog kima – estarski vezane f. k.

Tabela 19. Distribucija fenolnih kiselina u uljanoj pogači crnog kima

Fenolna kiselina	Sadržaj fenolnih kiselina (mg/kg s.m.)		
	Slobodne	Estarski vezane	Nerastvorne-vezane
galna	2,13 ± 0,18	12,27 ± 0,32	2,34 ± 0,21
protokatehinska	8,48 ± 0,22	4,40 ± 0,20	11,62 ± 0,35
<i>p</i> -hidroksibenzoeva	97,65 ± 2,29	9,73 ± 0,15	24,81 ± 0,52
<i>p</i> -hidroksibenzaldehid	1,32 ± 0,09	0,85 ± 0,09	8,08 ± 0,20
vanilinska	3,85 ± 0,10	ND	24,93 ± 1,00
kafena	ND	1,05 ± 0,10	5,07 ± 0,20
siringinska	3,40 ± 0,13	1,76 ± 0,09	93,35 ± 2,15
<i>p</i> -kumarinska	ND	1,09 ± 0,07	26,33 ± 1,10
ferulna	ND	5,53 ± 0,35	7,23 ± 0,11
sinapinska	ND	3,90 ± 0,65	6,05 ± 0,54
ZBIR	116,83 ± 2,05	40,58 ± 1,08	209,81 ± 2,53

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri ponavljanja ± SD, ND – nije detektovano, s.m. – suva materija, SD- standardna devijacija

Tabela 20. Distribucija fenolnih kiselina u semenu crnog kima

Fenolna kiselina	Sadržaj fenolnih kiselina (mg/kg s.m.)		
	Slobodne	Estarski vezane	Nerastvorne-vezane
galna	1,55 ± 0,20	3,07 ± 0,35	1,58 ± 0,25
protokatehinska	2,70 ± 0,40	2,17 ± 0,30	9,33 ± 0,11
<i>p</i> -hidroksibenzoeva	45,74 ± 1,05	8,82 ± 0,10	27,45 ± 1,27
<i>p</i> -hidroksibenzaldehid	1,78 ± 0,22	ND	7,92 ± 0,60
vanilinska	ND	ND	1,87 ± 0,10
kafena	ND	1,70 ± 0,25	4,94 ± 0,40
siringinska	1,45 ± 0,15	1,73 ± 0,18	96,13 ± 1,48
<i>p</i> -kumarinska	ND	9,06 ± 0,40	21,75 ± 1,70
ferulna	ND	7,56 ± 0,60	9,14 ± 0,80
sinapinska	ND	5,12 ± 0,20	7,71 ± 0,60
ZBIR	53,22 ± 0,95	39,22 ± 0,42	187,82 ± 1,20

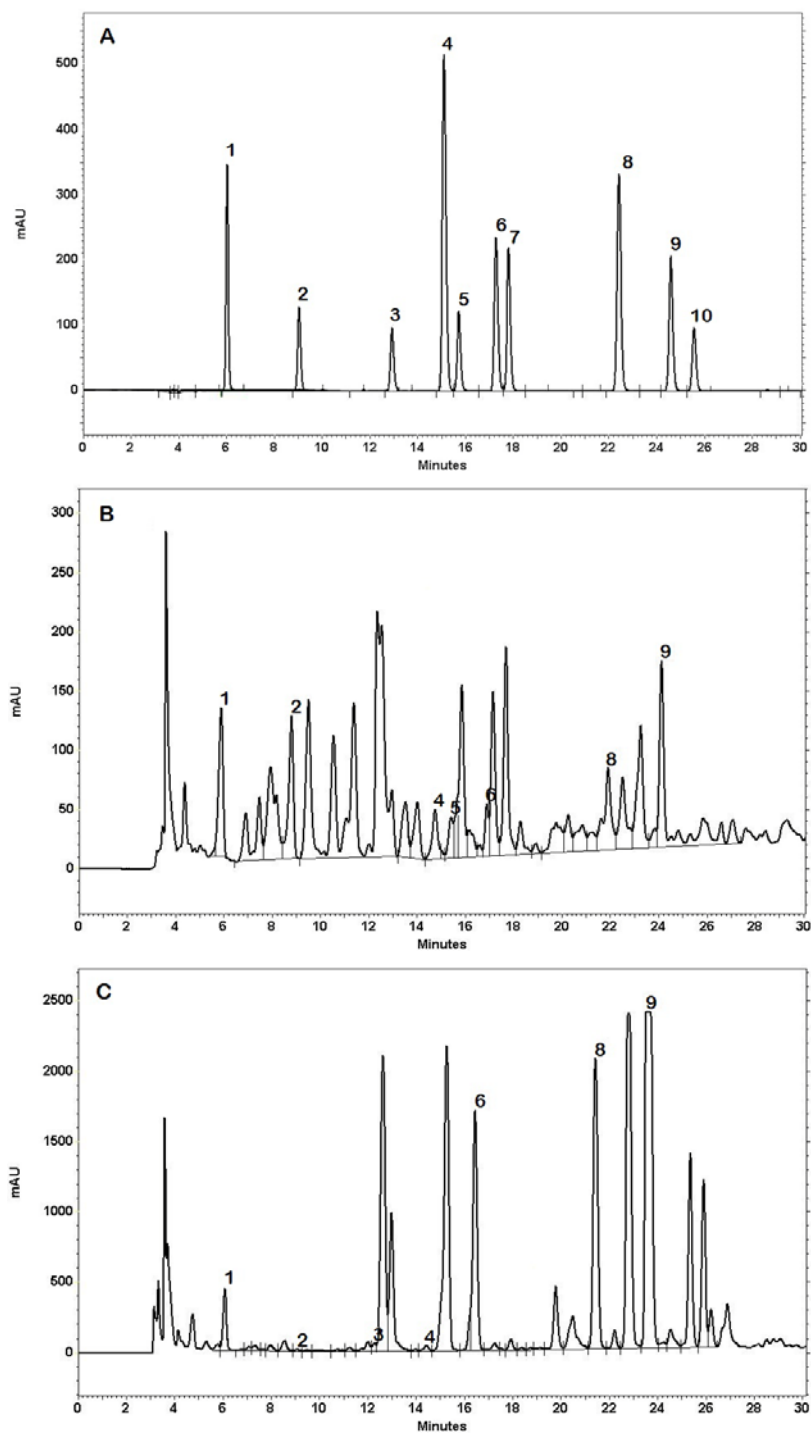
Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri ponavljanja ± SD, ND – nije detektovano, s.m. – suva materija, SD- standardna devijacija

Vanilinska kiselina je bila četvrta po zastupljenosti u pogači crnog kima, sa ukupnim sadržajem od 28,78 mg/kg s.m. (u slobodnom i nerastvorno-vezanom obliku). Nerastvorno-vezana frakcija je bila najbogatija u kvalitativnom i kvantitativnom obliku, jer je sadržala svih deset analiziranih fenolnih kiselina, sa ukupnim sadržajem od 209,82 mg/kg s.m., što je činilo više od pola ukupnog sadržaja fenolnih kiselina u pogači crnog kima. Sličnu raspodelu fenolnih kiselina pokazalo je i seme crnog kima (Tabela 20). Frakcija nerastvorno-vezanih fenolnih kiselina iz semena sadržala je sve analizirane fenolne kiseline; estarski vezana frakcija sve fenolne kiseline kao i frakcija iz pogače izuzev *p*-hidroksibenzaldehida; a slobodna frakcija sve fenolne kiseline kao i frakcija iz pogače izuzev vanilinske kiseline. **Toma i sar. (2015)** su samo u hidrolizovanim ekstraktima semena crnog kima našli *p*-kumarinsku i ferulnu kiselinu, što je u skladu sa dobijenim rezultatima. Njihov sadržaj hidrolizom oslobođene *p*-kumarinske kiseline iznosio je 4,01 mg/kg; a ferulne 25,53 mg/kg; dok je u ovom radu dobijeno 30,81 i 16,88 mg/kg, redom. Očekivano, pogača crnog kima sadržala je dvostruko veću količinu fenolnih kiselina u slobodnoj frakciji, u odnosu na seme.

4.2.4. Sadržaj i raspodela fenolnih kiselina u lanu (*Linum usitatissimum L.*)

Hidroksicimetne kiseline, glukozid ferulne kiseline i glukozid *p*-kumarinske kiseline ulaze u sastav lignanskog makromolekula u semenu lana. Sekoizolariciresinol diglukozid (SDG), čini osnovu lignanskog makromolekula. Hidroksicimetne kiseline su estarskom vezom vezane za šećerni ostatak SDG (Kasote, 2013; Struijs i sar., 2008). U lanenom semenu, esterifikovane fenolne kiseline čine 48 - 66% od ukupnog sadržaja polifenola (Oomah i sar., 1995). Ralph (2010) navodi da hidroksicinamati imaju naročito značajnu ulogu u lignifikaciji nekih biljaka i učestvuju u polimernom umrežavanju ćelijskog zida. Ferulatni polisaharidni estri mogu čak biti inicijalna mesta na kojima počinje lignifikacija ćelijskog zida. *p*-Kumarinska kiselina ulazi u sastav polimera drugim putem.

Istraživanja izvedena u okviru ove disertacije potvrđuju navedene podatke, s obzirom da su najveće količine ferulne i *p*-kumarinske kiseline u pogači i semenu lana nađene u estarski vezanoj frakciji (Tabele 21 i 22), iako su nađene i kao slobodne i nerastvorne-vezane (Slika 18). Eliasson i sar. (2003) su dokazali visoke koncentracije glukozida ferulne i *p*-kumarinske kiseline u pogači lana. Dobijeni rezultati su u skladu sa navedenima za ferulnu kiselinu, dok je za *p*-kumarinsku kiselinu dobijena niža vrednost. Uzrok ove razlike može se objasniti razlikom u ekstrakcijama oligomera iz matriksa lana sa različitim rastvaračima, gubicima tokom prečišćavanja ili tokom hidrolize, ali može poticati i od različitosti sorti i uslova gajenja. Osim toga, već je ranije rečeno da sadržaj SDG može znatno varirati (Kasote, 2013). U okviru validacije metode pokazano je da je povrat *p*-kumarinske i ferulne kiseline za sve tri grane prosečno iznosio 45% i 54% redom, što takođe objašnjava pomenutu razliku. Quezada i Cherian (2012) su saopštili da metanolni ekstrakti pogače lana sadrže 1728,1 µg/g polifenolnih jedinjenja, dok su Harris i Haggerty (1993) našli da metanolni ekstrakti pogače lana sadrže ferulnu i hlorogensku kiselinu koje su činile 84% od ukupnih fenolnih kiselina. Uzevši u obzir da je istraživanje u okviru ove disertacije bilo usmereno na izolaciju fenolnih kiselina (pri čemu sadržaj hlorogenske kiseline nije ispitivan), a ne i svih ostalih polifenolnih jedinjenja koja se mogu ekstrahovati smešom metanol:voda (7:3, v/v), dobijeni rezultati se mogu smatrati uporedivim sa navedenom studijom.



Slika 18. Hromatogrami standardne smeše fenolnih kiselina (f.k.) i uzoraka lana *Linum usitatissimum* L.; **A:** radna standardna smeša (10 mg/l) za kalibraciju: 1 – galna, 2 – protokatehinska, 3 – *p*-hidroksibenzojeva kiselina, 4 – *p*-hidroksibenzaldehid, 5 – vanilinska, 6 – kafena, 7 – siringinska, 8 – *p*-kumarinska, 9 – ferulna, 10 – sinapinska kiselina; **B:** seme lana – slobodne f.k.; **C:** pogača lana – estarski vezane f. k.

Tabela 21. Distribucija fenolnih kiselina u uljanoj pogači lana

Fenolna kiselina	Sadržaj fenolnih kiselina (mg/kg s.m.)		
	Slobodne	Estarski vezane	Nerastvorne-vezane
galna	5,03 ± 0,32	ND	3,78 ± 0,13
protokatehinska	0,10 ± 0,01	1,14 ± 0,12	1,48 ± 0,09
<i>p</i> -hidroksibenzoeva	ND	5,58 ± 0,25	1,71 ± 0,10
<i>p</i> -hidroksibenzaldehid	1,56 ± 0,08	0,97 ± 0,08	ND
vanilinska	0,79 ± 0,09	ND	ND
kafena	ND	84,64 ± 2,00	2,88 ± 0,22
siringinska	ND	ND	ND
<i>p</i> -kumarinska	2,31 ± 0,13	73,45 ± 1,95	4,43 ± 0,19
ferulna	4,59 ± 0,22	1025,44 ± 3,99	32,79 ± 0,80
sinapinska	ND	ND	ND
ZBIR	14,38 ± 0,34	1191,21 ± 4,05	47,07 ± 1,05

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri ponavljanja ± SD, ND – nije detektovano, s.m. – suva materija, SD- standardna devijacija

Tabela 22. Distribucija fenolnih kiselina u semenu lana

Fenolna kiselina	Sadržaj fenolnih kiselina (mg/kg s.m.)		
	Slobodne	Estarski vezane	Nerastvorne-vezane
galna	5,22 ± 0,25	ND	9,38 ± 0,35
protokatehinska	14,45 ± 1,30	7,15 ± 0,15	2,90 ± 0,20
<i>p</i> -hidroksibenzoeva	ND	4,79 ± 0,34	4,96 ± 0,18
<i>p</i> -hidroksibenzaldehid	1,29 ± 0,12	0,81 ± 0,09	0,68 ± 0,02
vanilinska	3,76 ± 0,22	ND	ND
kafena	1,81 ± 0,10	20,09 ± 0,57	20,66 ± 1,89
siringinska	ND	ND	ND
<i>p</i> -kumarinska	3,69 ± 0,20	30,07 ± 1,61	15,08 ± 0,90
ferulna	7,82 ± 0,95	74,89 ± 2,80	73,25 ± 3,02
sinapinska	ND	ND	ND
ZBIR	38,04 ± 0,98	137,78 ± 2,05	126,91 ± 2,90

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri ponavljanja ± SD, ND – nije detektovano, s.m. – suva materija, SD- standardna devijacija

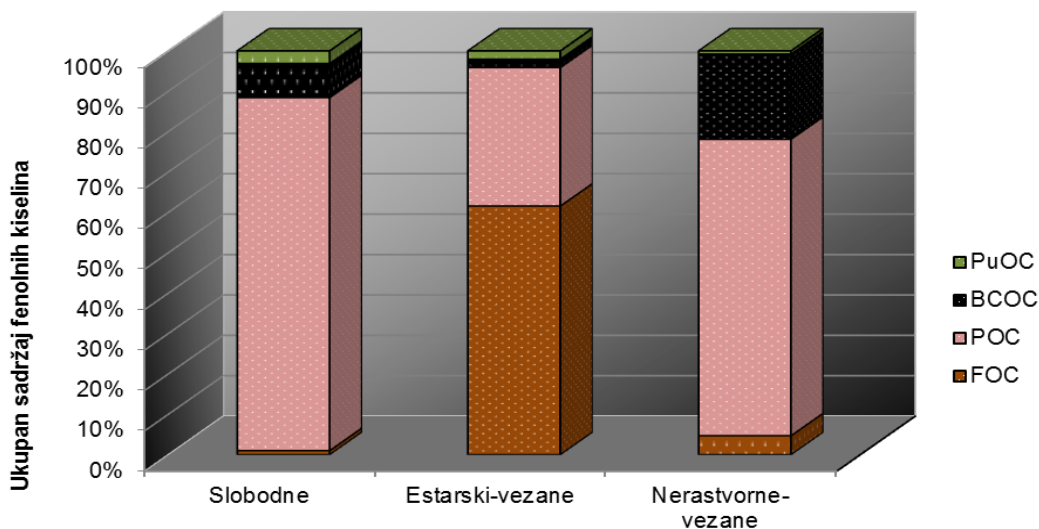
Takođe, dokazano je prisustvo kafene kiseline u molekulu lignana lanenog semena (lanenog semena (**Kosińska i sar., 2011**), međutim iako autori nisu kvantifikovali kafenu, *p*-kumarinsku i ferulnu kiselinu nakon alkalne hidrolize, našli su znatne količine ovih kiselina nakon kisele hidrolize. Taj rezultat je kontradiktoran s obzirom da **Acosta-Estrada i sar. (2014)** u svom revijalnom radu izvode zaključak da se polifenolna jedinjenja efikasnije oslobađaju alkalnom hidrolizom u odnosu na kiselu, znajući da kiselna hidroliza razara glikozidne veze i rastvara šećere, ali estarske veze ostavlja netaknutim. Međutim, alkalna hidroliza razara estarske veze kojima su fenolne kiseline vezane za ćelijski zid čime omogućava efikasno oslobađanje polifenola iz polisaharida.

Dobijeni rezultati pokazuju prisustvo kafene kiseline, iako je oslobođena nakon alkalne hidrolize, što ukazuje na zaštitni efekat C vitamina i EDTA na ovo polifenolno jedinjenje. Tragovi protokatehinske kiseline su nađeni u sve tri frakcije semena lana, dok suprotno važi za siringinsku i sinapinsku kiselinu. Galna kiselina je bila prisutna u pogači lana u slobodnom i nerastvornom-vezanom obliku, *p*-hiroksibenzoeva u estarski-vezanom i nerastvornom-vezanom, a vanilinska kiselina samo u slobodnom obliku.

4.2.5. Komparativna analiza sadržaja i raspodele fenolnih kiselina u uzorcima uljane tikve, crnog kima, nara i lana

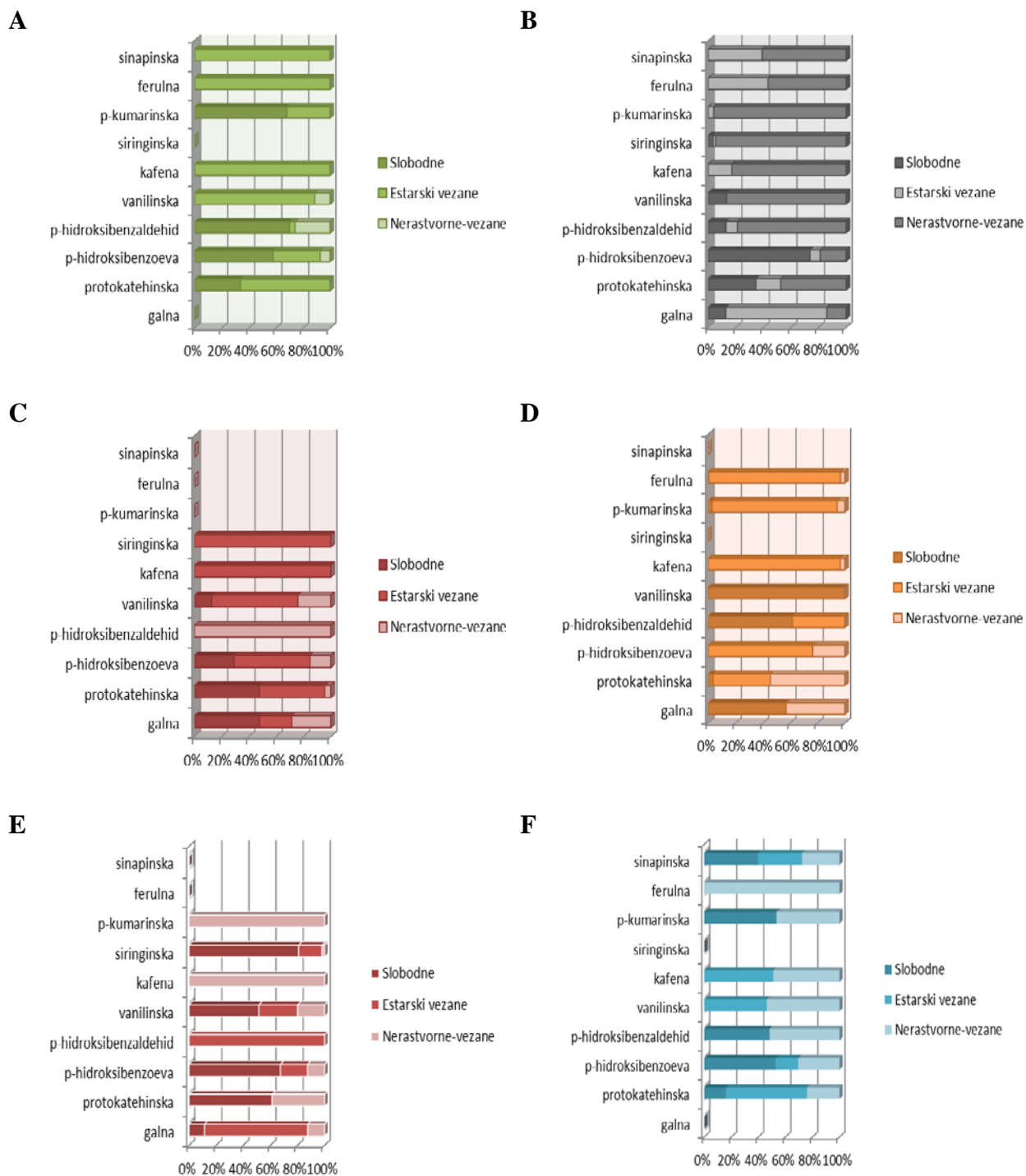
Sve analizirane pogače mogu se koristiti za dobijanje vrednih fenolnih kiselina. Međutim, raspodela fenolnih kiselina zavisi od vrste uljane pogače. Uzimajući u obzir analizirane uzorke, uočljivo je sledeće: od pogača, u kvantitativnom smislu je bila najbogatija pogača nara (sa 2602,1 mg/kg s.m. ukupnog sadržaja fenolnih kiselina), a u kvalitativnom pogača crnog kima (svih 10 polifenolnih jedinjenja je identifikovano). Koncentracija slobodnih fenolnih kiselina značajna je u pogači uljane tikve, estarski vezanih u pogačama nara i lana, a nerastvornih-vezanih u pogačama crnog kima i nara (Slika 19). Što se tiče semena, seme nara je sadržalo najviše fenolnih kiselina u frakciji slobodnih fenolnih kiselina, seme lana i uljane tikve – golice u estarski-vezanoj frakciji, a seme crnog kima u nerastvorno-vezanoj frakciji. Ljuska uljane tikve je najviši sadržaj fenolnih kiselina pokazala u slobodnoj frakciji, a najveći broj identifikovanih fenolnih kiselina u estarski vezanoj frakciji. Od svih analiziranih uzoraka kora nara je sadržala najviše estarski vezanih fenolnih kiselina (7842 mg/kg s.m.), zahvaljujući veoma visokom sadržaju galne kiseline. Slobodne i

estarski vezane (lako ekstrabilne) fenolne kiseline iz kore nara činile su približno 87% od njenog ukupnog sadržaja fenolnih kiselina koji je iznosio 10,52 g/kg s.m.



Slika 19. Distribucija slobodnih i vezanih fenolnih kiselina po pogačama u odnosu na ukupan sadržaj fenolnih kiselina: PuOC – pogača uljane tikve; BCOC - pogača crnog kima; POC – pogača nara; FOC – pogača lana

Analiziranjem raspodele fenolnih kiselina u svim uzorcima kao slobodnih, estarski vezanih i nerastvornih-vezanih, može se zaključiti da bi njihov sadržaj očito bio potcenjen ukoliko bi samo sadržaj slobodnih bio uzet u obzir. Kao što je već ranije rečeno, konzumiranje slobodnih ili vezanih fenolnih jedinjenja zavisi od željenog zdravstvenog efekta. Dijetalni unos vezanih oblika ima hemopreventivnu ulogu kod kancera debelog creva. Unos slobodnih i rastvorljivih konjugovanih oblika omogućava lakšu apsorpciju u želucu i tankom crevu i pokazuje zdravstveno povoljno delovanje na ceo organizam – sprečavanje oksidacije LDL holesterola i lipozoma. Imajući to u vidu, a na osnovu dobijenih rezultata istraživanja moguća je formulacija nove funkcionalne hrane sa dodatkom ispitivanih uljanih pogača, kore ploda i ljuske semena u zavisnosti od željenog zdravstvenog efekta. Dodatno, takođe je već pomenuto da se estarski derivati hidroksicimetnih kiselina mogu koristiti kao efikasni hvatači radikala u uljima, zahvaljujući njihovoj povećanoj lipofilnosti. Pregled dominantnih oblika fenolnih kiselina u pojedinim ispitivanim uzorcima dat je na Slici 20.



Slika 20. Fenolne kiseline po frakcijama u: A – uljanjoj pogači tikve, B – pogači crnog kima, C – pogači nara, D – uljanjoj pogači lana, E – kori nara, F - ljusci semena uljane tikve

Upotrebom ekstrakata bogatih estarski vezanim fenolnim kiselinama (uz izuzeće koraka hidrolize) moguće su nove prehrambene i kozmetičke formulacije sa hidroksicimetnim kiselinama gde bi bila olakšana njihova integracija u uljane ili masne matrikse.

4.2.6. Sadržaj fenolnih kiselina u hladno ceđenim uljima uljane tikve, nara, crnog kima i lana

Sadržaj fenolnih kiselina u hladno ceđenim uljima je određen zbog činjenice da se pomenuta ulja koriste u narodnoj medicini u tretiranju različitih zdravstvenih problema kao što su astma, alergije, dijabetes, benigna hiperplazija ili kao sastojak prirodne kozmetike za negu kože. Semena bogata uljem sadrže mnoga polifenolna jedinjenja, od kojih samo mali deo dospe u ulje nakon hladnog ceđenja ili ekstrakcije. Stoga, nije očekivano da koncentracije hidrofilnih polifenola dostignu one iz semena (Van Hoed, 2010). Koncentracije slobodnih fenolnih kiselina hladno presovanih ulja su prikazane u Tabeli 23.

Rezultati dobijeni za fenolne kiseline prisutne u ulju uljane tikve su u skladu sa navodima iz literature (Andjelkovic i sar., 2010; Siger i sar., 2008). Za razliku od rezultata koje navode Siger i sar. (2008) u okviru ovih ispitivanja su kvantifikovane *p*-hidroksibenzoeva i kafena kiselina. Takođe, gotovo sve fenolne kiseline koje navode Nyam i sar. (2009) su nađene i u domaćem uzorku ulja uljane tikve, izuzev *p*-kumarinske kiseline. Međutim njihovi rezultati su 10 puta viši od dobijenih u ovom radu, ali i od onih koje su dobili Andjelkovic i sar. (2010) i Siger i sar. (2008).

Tabela 23. Fenolne kiseline u uljima uljane tikve, crnog kima, nara i lana

Sadržaj slobodnih fenolnih kiselina (mg/kg ulja)				
Fenolna kiselina	Uljana tikva	Nar	Crni kim	Lan
galna	ND	3,50 ± 0,34	ND	ND
protokatehinska	0,03 ± 0,01	ND	0,05 ± 0,01	0,01 ± 0,01
<i>p</i> -hidroksibenzoeva	0,15 ± 0,01	ND	1,41 ± 0,20	0,05 ± 0,01
<i>p</i> -hidroksibenzaldehid	0,15 ± 0,01	ND	0,18 ± 0,01	0,03 ± 0,01
vanilinska	0,22 ± 0,12	ND	0,06 ±	ND
kafena	0,35 ± 0,03	0,15 ± 0,03	0,25 ±	ND
siringinska	0,14 ± 0,01	ND	ND	0,06 ± 0,02
<i>p</i> -kumarinska	ND	ND	ND	ND
ferulna	0,15 ± 0,02	ND	ND	ND
sinapinska	ND	ND	ND	ND
ZBIR	1,19 ± 0,12	3,65 ± 0,33	1,95 ± 0,22	0,15 ± 0,02

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri ponavljanja ± SD, ND – nije detektovano, SD- standardna devijacija

U ulju nara identifikovane su galna i kafena kiselina, iako u manjim koncentracijama od onih koje su saopštili **Shaban i sar. (2013)**. Ipak ako se zna da je dokazan sadržaj galne kiseline u soku nara znatno niži (**Campillo i sar., 2015**) onda se koncentracije koje su naveli **Shaban i sar. (2013)** ne čine logičnim s obzirom da je poznato da je rastvorljivost fenolnih kiselina bolja u vodenim nego u uljanim sredinama.

Kiralan i sar. (2014) su u ulju crnog kima dokazali prisustvo *p*-hidroksibenzojeve kiseline u koncentraciji od 1,50 ppm što odgovara određenoj koncentraciji u ovom radu (Tabela 23). Pored toga u uzorku ulja od semena crnog kima su nađene male koncentracije protokatehinske, vanilinske, kafene kiseline i *p*-hidroksibenzaldehida. U ulju od semena lana **Herchi i sar. (2011)** su našli vanilinsku i ferulnu kiselinu u malim količinama što se razlikuje od rezultata prikazanih u Tabeli 23, ali i *p*-hidroksibenzojevu kiselinu u koncentraciji od 0,022 ppm, dok je sadržaj te kiseline bio više nego dvostruko veći po rezultatima ove disertacije. Takođe, za razliku od njihovih rezultata nađene su male količine protokatehinske i siringinske, kao i *p*-hidroksibenzaldehida. Može se zaključiti da su dobijeni rezultati u skladu sa literaturnim navodima, uz određena očekivana odstupanja, s obzirom da je već ranije rečeno da sadržaj i profil fenolnih kiselina može varirati i u okviru iste biljne vrste.

4.3. SKRINING FENOLNIH KISELINA I POTVRDA AUTENTIČNOSTI PRIMENOM PCA ANALIZE

Za prepoznavanje i klasifikaciju biljnog materijala korišćena je analiza glavnih komponenti, PCA. Vektori kolone polazne matrice podataka odgovaraju koncentracijama fenolnih kiselina, dok su vektori vrste tj. objekti uzorci različitih biljnih sirovina (proizvoda). Da bi se odredila sličnost objekata (višedimenzionalni vektori u prostoru fenolnih varijabila) bez redukcije polaznog prostora vektora kolona primenjena je (bez redukcije dimenzije polazne matrice) hijerarhijska (dendrogramska) analazi. Za karakterizaciju međusobne udaljenosti vektora objekata primenjen je kvadrat *Euklidovog* rastojanja, dok se za povezivanje objekata i klastera koristi se *Wardova* funkcija (**Horvai, 2004**).

Zbog razlike u skalama varijabila za dobijanje glavnih komponenti korišćena je korelaciona matrica koja je dobijena iz matrice podataka tako što su od svake varijabile (vektor kolona) oduzete odgovarajuće srednje vrednosti (različito za svaku varijabilu) i podeljene sa standardnom

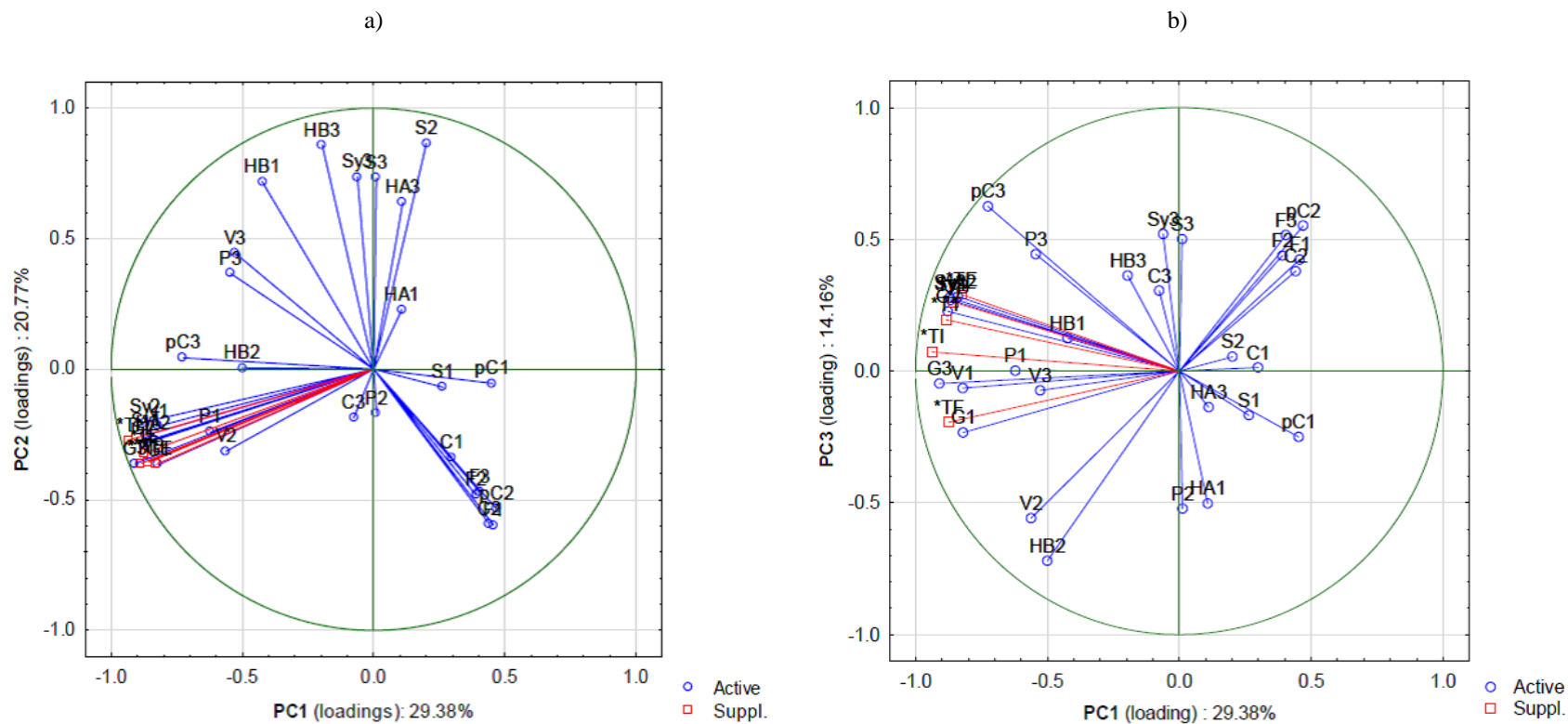
devijacijom (takođe različito za svaku varijabilu), tj. primenjena je autoskalirana matrica. Glavne komponente su određene NIPALS algoritmom. Signifikantne komponente su određeni *screen testom* (Otto, 2007). Analiza glavnih komponenti je primenjena za karakterizaciju fenolnih kiselina sa ciljem da se biljni materijal klasifikuje po sličnosti. Prema *Screen testu* prve četiri glavne komponente su značajne za modelovanje varijabli (Tabela 24). Kako glavne komponente sa malim sopstvenim vrednostima objašnjavaju grešku merenja, za opis varijacije ulaznog matriksa dovoljne su prve tri glavne komponente, jer objašnjavaju > 64% ukupne varijanse originalnih podataka. U ravni težina (*loadings*) vektora glavnih komponenti (standardizovanih na krug prečnika jedinice) dužine vektora pokazuju značaj pojedinih varijabila u PC modelu (maksimalna vrednost 1), a kosinus ugla između dva vektora varijabila određuje njihovu međusobnu korelaciju.

Tabela 24. Signifikantne sopstvene vrednosti matrice korelacione matrice

Glavna komponenta	Sopstvena vrednost	Ukupna varijansa %	Kumulativna sopstvena vrednost	Kumulativna varijansa %
1	8.815201	29.38400	8.81520	29.3840
2	6.231254	20.77085	15.04646	50.1549
3	4.247401	14.15800	19.29386	64.3129
4	2.762886	9.20962	22.05674	73.5225

Pri analizi podataka fenolnih varijabila zbirne varijabile: ukupne slobodne, ukupne esterifikovane, ukupne nerastvorne-vezane i ukupan sadržaj fenolnih kiselina (FT, ET, IT, BT, TT) koje su i same dobijene linearnom kombinacijom ostalih varijabila se ne uzimaju pri dobijanju PCA modela, već se tretiraju kao suplementarne varijabile i naknadno se projektuju u prostor glavnih komponentata. Slika 21.a pokazuje da su vektori varijabile sva tri oblika ferulne kiseline (F3, F2, F1), pC2, C1 i C2 međusobno paralelni u ravni PC1-PC2, to jest da su odgovarajuće varijabile međusobno jako korelisane. To znači da nose iste informacije i za karakterizaciju objekata dovoljno je koristiti bilo koju od njih. Varijabile sva tri oblika galne kiseline (G3, G2, G1), Sy2, HA2 i V1 su takođe međusobno jako korelisane, dok su njihovi vektori ortogonalni na vektore iz predhodne grupe varijabila (F3, F2, F1, pC2, C1 i C2). To znači da između ove dve grupe varijabila ne postoji korelacija, odnosno one objašnjavaju različite osobine (karakteristike) objekata. Zbirne tj. suplementarne varijabile (FT, ET, IT, BT, TT) takođe su korelisane sa varijabilima (G3, G2, G1, Sy2, HA2 i V1), što znači da su zbirne varijabile uglavnom determinisane sa varijabilima grupe (G3, G2, G1, Sy2, HA2 i V1). Bitno je pomenuti da prvu grupu varijabili (F3, F2, F1), pC2, C1 i C2 čine

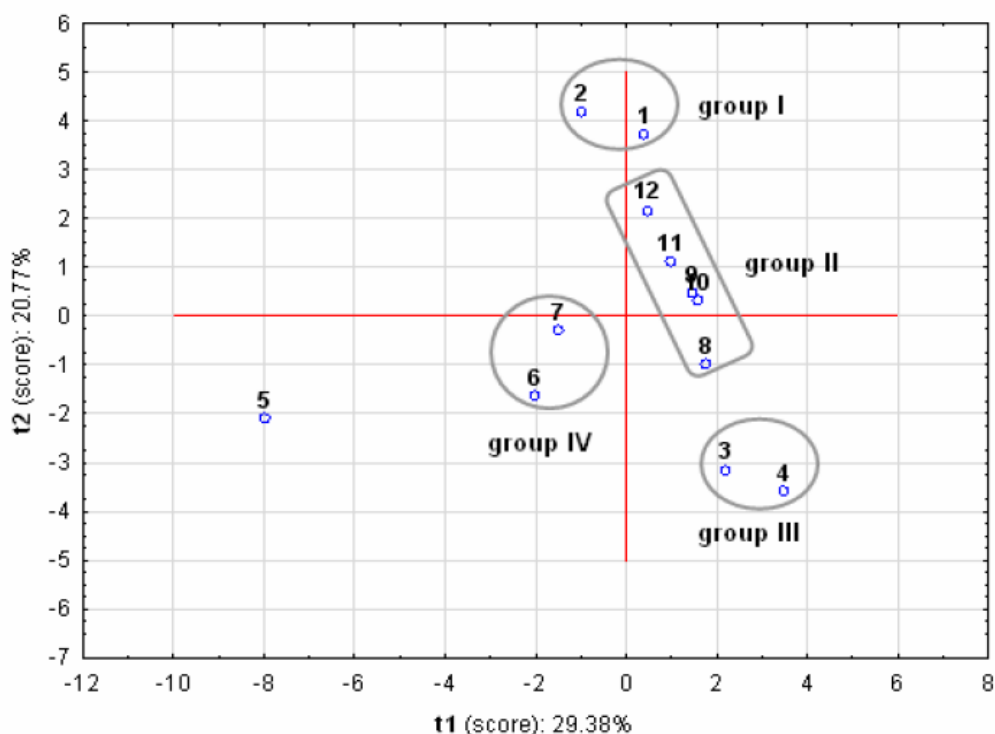
samo hidroksicimetne kiseline, a drugu (G3, G2, G1), Sy2, HA2, i V1 hidroksibenzojeve kiseline, te da se sličnost između varijabli može razumeti na bazi njihove hemijske strukture. U daljoj analizi nema potrebe za procenom svih fenolnih varijabli da bi se postigla ista karakterizacija analiziranog biljnog materijala; dovoljno je odrediti jednu varijablu po grupi. U ravni glavnih komponenti PC1 i PC3 (Slika 21.b) korelacija između fenolnih varijabli je veoma slična kao i u ravni glavnih komponenti PC1 i PC3. Međutim, u prethodno pomenutim grupama raste ugao između vektora odgovarajućih fenolnih varijabli zbog manje sopstvene vrednosti glavne komponente PC3. Stoga je verovatnoća da PC3 objašnjava grešku određivanja veća nego kod glavnih komponenti PC1 i PC2.



Slika 21. PC ravni fenolnih kiselina, a) PC1-PC2 i b) PC1-PC3 ravan

Varijabile: *p*-hidroksibenzaldehid=HA; kafena=C; *p*-kumarinska=pC; ferulna=F; sinapinska=S; protokatehinska=P; *p*-hidroksibenzoeva=HB; vanilinska=V; siringinska=Sy; galna=G, ukupne slobodne=TF; ukupne estarski vezane=TE; ukupne nerastvorne-vezane=TI; ukupne vezane=TB; ukupne=TT (Free=1; Esterified=2; Insoluble=3)

U ravni vrednosti glavnih komponenti PC1-PC2 (Slika 22) ispitivani objekti formiraju četiri grupe (klastera) u zavisnosti od pripadnosti određenoj biljnoj vrsti (grupe su formirane upoređivanjem totalne rezidual varijanse grupe i pripojenih objekata), tako na primer grupu I formiraju uzorci od crnog kima, grupu II uzorci uljane tikve itd. Jedino se objekat 5 (kora nara) ne može pripojiti ni jednoj grupi, to jest ovaj objekat se najviše razlikuje od ostalih (eng. *outlier*), što potvrđuje i *Hotelling T²* test za model od tri glavne komponente. Klasifikacija analiziranih uzoraka u ravni PC1-PC3 je potvrđena na isti način kao i u ravni PC1-PC2 (nije prikazano).



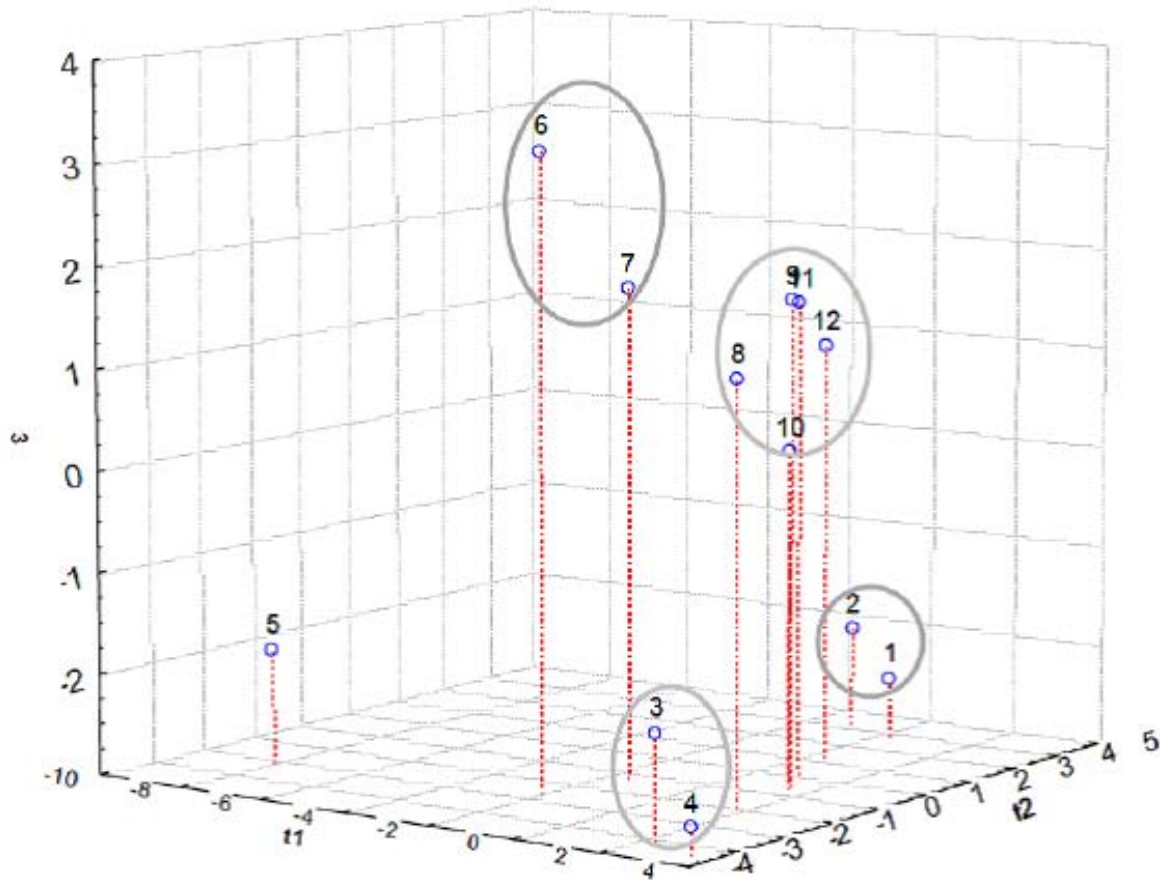
Slika 22. Doprinos glavnih komponenti (model: PC1+PC2)

Legenda: 1: seme crnog kima; 2: pogača od semena crnog kima; 3: seme lana; 4: pogača od semena lana; 5: kora nara; 6: pogača od semena nara; 7: seme nara; 8: seme golice; 9: pogača od semena golice; 10: jezgro od varijeteta semena uljane tikve sa ljuskom; 11: opna golice; 12: ljuske od varijeteta semena uljane tikve sa ljuskom

Uzimajući u obzir rezultate HPLC analize i grafika doprinosa (eng. *score plots*), uzorci crnog kima su u poređenju sa ostalim grupama imali visok sadržaj S2, S3, HB3, HB1, dok je sadržaj Sy3 bio najviši u ovim uzorcima, više od 93 mg/kg. Poredeći pogaču i seme, u pogači je bio

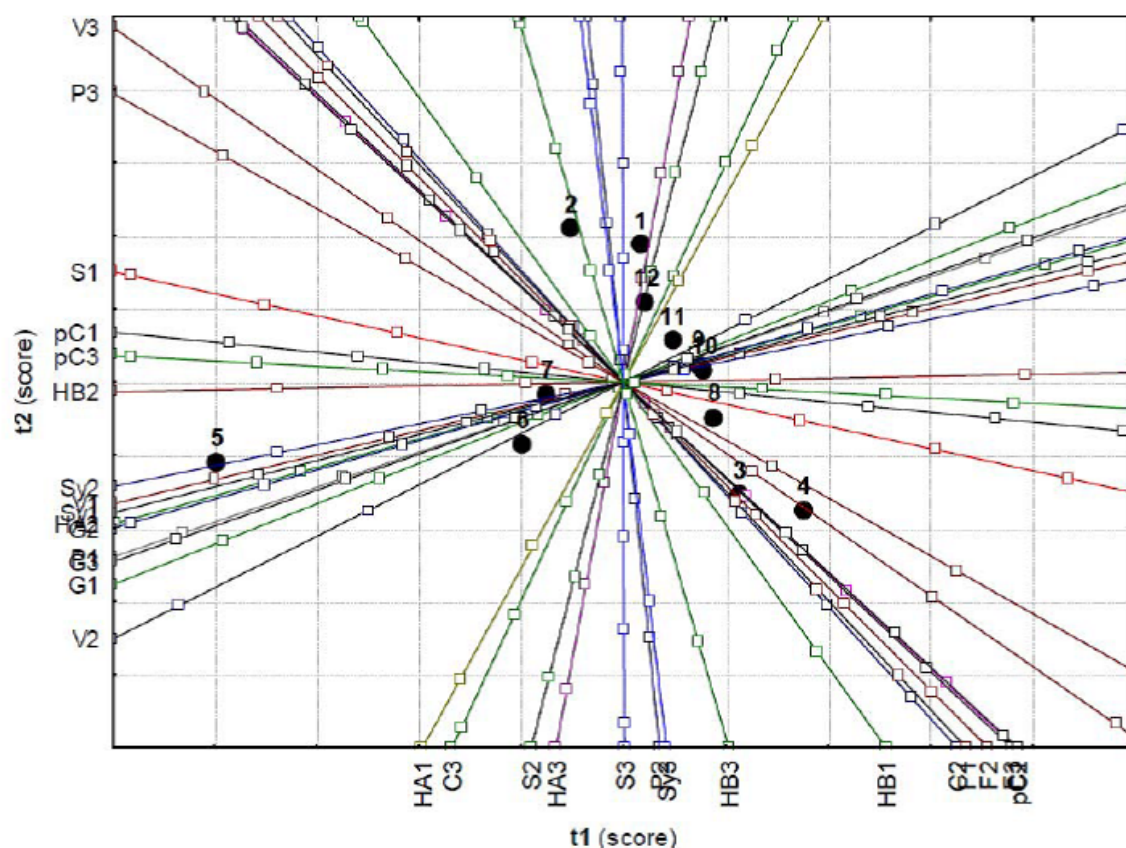
primećen visok sadržaj G3, G2, G1, Sy1, HA2, V1 i pC3, naročito G2, Sy1 i V1, koji je bio oko 3 puta viši nego u semenu. Samo je sadržaj Sy2 bio gotovo identičan. Druga grupa se sastojala od uzoraka uljane tikve i nju je karakterisalo odsustvo galne kiseline. Prema Slici 22, najbližiji su bili pogača od semena uljane tikve i jezgra (objekti 9 i 10). Opna i ljuska semena uljane tikve (objekti 11 i 12) imale su najviši sadržaj ukupnih fenolnih kiselina. Ovi uzorci su sadržali najviše HB1, imali sličan sadržaj HA2 i V1; dok je pC3 detektovan u opni, a Sy2 u ljusci. Uzorci semena lana sačinjavali su treću grupu. U ovoj grupi siringinska kiselina nije bila detektovana, dok je koncentracija G3, V1 i pC3 bila niža u pogači nego u semenu, što potvrđuje pozicioniranje objekata 3 i 4. Takođe, sinapinska kiselina nije detektovana. Četvrta grupa obuhvata pogaču i seme nara. U ovim uzorcima p-kumarinska i sinapinska kiselina nisu detektovane, ali je primećen veoma visok sadržaj G1, G2 i G3, koji je bio viši u semenu nego u pogači. Kora nara se nije uklapala niti u jednu grupu (*outlier*), s obzirom na izuzetno visoku koncentraciju galne kiseline (G1, G2 i G3). Kora nara je toliko bogata hidrolizabilnim taninima (Kushwaha i sar., 2013), da je ovaj nusproizvod predložen kao potencijalan, jeftin izvor elaginske kiseline (Lu i Yuan., 2008). S obzirom da je jedan od proizvoda hidrolize hidrolizabilnih tanina, galna kiselina, to je moguće objašnjenje njene neobično visoke koncentracije i statističke devijacije kore nara od ostalih uzoraka.

S obzirom da ispitivani objekti formiraju iste klasterne i u PC1-PC2-PC3 prostoru (Slika 23), kao i u ravni vrednosti, za prepoznavanje obrasca (eng. *pattern recognition*) dovoljne su prve dve glavne komponente. Diskriminaciona moć varijabla se može proceniti na osnovu biplot grafika. Sa Slike 24 se vidi da su obe glavne komponente PC1 i PC2 važne za dobijanje klastera, s obzirom da se objekti tj. *score* objekata rasipaju po obe ose glavne komponente. To znači da su za grupisanje objekata bitne one varijabile koje imaju velike težinske koeficijente u odgovarajućim glavnim komponentama i čije loading ose u većoj meri paralelne sa osama glavnih komponenti. Prema tome za diskriminaciju objekata (tj. grupisanje analiziranog biljnog materijala) su bitne varijabile G3, G2, G1, Sy2, Sy1, V1, pC3 i HA2 po PC1 osi i varijabile Sy3, HB3, HB1, S3 i S2 po PC2 osi. Varijabile ukupnih fenolnih količina (FT, ET, IT, BT, TT) koje su paralelne sa varijabilama (G3, G2, G1, Sy2, Sy1, V1 i HA2) ne klasifikuju objekte, pošto ne nose informacije o varijabilama koje imaju veliku korelaciju sa PC2.



Slika 23. Doprinos glavnih komponenti (model: PC1+PC2+PC3)

Legenda: 1: seme crnog kima; 2: pogača od semena crnog kima; 3: seme lana; 4: pogača od semena lana; 5: kora nara; 6: pogača od semena nara; 7: seme nara; 8: seme golice; 9: pogača od semena golice; 10: jezgro od varijeteta semena uljane tikve sa ljuskom; 11: opna golice; 12: ljuske od varijeteta semena uljane tikve sa ljuskom



Slika 24. Biplot za simultanu karakterizaciju opterećenja i skorova (scores and loadings)

Nakon određivanja deset fenolnih kiselina (u slobodnom, estarski vezanom i nerastvornom-vezanom obliku) u 12 biljnih uzoraka, analiza glavnih komponenti omogućila je razdvajanje biljnih uzoraka u grupe prema poreklu i smanjila broj fenolnih kiselina neophodnih za njihovu karakterizaciju, tako da je umesto 30 neophodno 13 fenolnih kiselina. To može imati potencijalnu primenu u skriningu fenolnih kiselina i određivanju kvaliteta/autentičnosti uljarica i njihovih nusproizvoda. Dobijeni rezultati takođe mogu služiti za procenu uljarica i njihovih nusproizvoda kao vrednih izvora fenolnih kiselina.

4.4. PARAMETRI KVALITETA

Parametri kvaliteta u uljanim pogačama i ostalim nusproizvodima industrije hladno ceđenih ulja su određeni radi procene njihovog kvaliteta u smislu potencijalnih sastojka funkcionalne hrane i prirodne kozmetike. Pomenuti ostaci su analizirani i kao izvori proteina i rezidualnog ulja. Fizičko-hemijski sastav je uticao i na odabir adekvatnih rastvarača i postupka ekstrakcije. Iako hladno ceđena ulja odabranih biljnih vrsta nisu u fokusu ove disertacije, njihov kvalitet je određen, s obzirom da ulja, čak i nakon postupka presovanja u znatnom procentu ostaju u uljanim pogačama, čime utiču na sveukupni kvalitet, stabilnost i fizičko-hemijski sastav uljanih pogača. Takođe, sadržaj ulja u uljanim pogačama utiče na njihov kvalitet tokom skladištenja, s obzirom na oksidativno kvarenje (**Chandrasekaran i Shine, 2012**). Pri tom, kao što je već rečeno, hladnim presovanjem se dobija manja količina ulja nego toplim pogonom, što znači da u uljanim pogačama dobijenim hladnim presovanjem ostaje više rezidualnog ulja (**Berenji, 2014**).

Dobijeni rezultati, prikazani u Tabeli 25 su u skladu sa ranijim ispitivanjima drugih autora (**Idouraine i sar. 1996; Younis i sar., 2000; Sultan i sar., 2009; Al-Jassir, 1992; Dadashi i sar., 2013; Hussain i sar., 2008**), sa očekivanim varijacijama zbog različitih varijeteta i podneblja gajenja biljaka. Sadržaj vlage u svim semenima je nešto veći od literaturnih podataka ($\approx 5\%$) što ukazuje na njihov kraći rok trajanja u odnosu na očekivani. Sadržaj proteina u pogačama je bio znatno veći nego u odgovarajućim semenima, a u slučaju uljane tikve, u pogači je dostigao čak 51,28%. Iz tabelarnih podataka se može zaključiti da su ljuska semena uljane tikve (34,56%) i pogača nara (26,04%) bogat izvor celuloze, kao i da znatan procenat ulja zaostaje u pogači crnog kima i uljane tikve – 22,87% i 18,66%, redom.

Prehrambeni proizvodi koji su izvor dijetetskih vlakana se mogu koristiti za prevenciju i lečenje konstipacije, kardiovaskularnih bolesti i hipertenzije (**Ayo i Kajo, 2016**). Vlaknima bogati proizvodi mogu poboljšati hranu i dati zdrav proizvod, sa niskim sadržajem masti i kalorijskom vrednošću. Takođe, mogu poslužiti kao funkcionalni sastojci radi poboljšanja viskoziteta, teksture, senzornih karakteristika, emulzione i oksidativne stabilnosti, kapaciteta zadržavanja vode (produženje svežine) i ulja, i roka trajanja. Kora nara je upotrebljena za obogaćenje pšeničnog hleba, pri čemu je primećeno povećanje kapaciteta zadržavanja vode (**Suliman i sar., 2016**). Vlaknima bogati nusproizvodi se mogu inkorporisati u prehrambene proizvode kao jeftini, nekalorični punioci, radi delimične zamene brašna, masti ili šećera. Ipak, u visokoj koncentraciji

mogu biti teški za varenje. Hidrolitički tretmani mogu promeniti odnos između rastvorljivih i nerastvornih vlakana (Elleuch i sar., 2011). Grickalica bogata vlaknima i drugim funkcionalnim jedinjenjima je dobijena nakon alkalne maceracije tikvinog semena sa ljuskom (Caramez i sar. 2008). Dijetetska vlakna se dodaju proizvodima kao što su testenine i peciva, pića, slatkiši, džemovi, mlečni proizvodi, meso i supe (Elleuch i sar., 2011). Prah semena nara je upotrebljen za dobijanje pilećih medaljona obogaćenih vlaknima (Kaur i sar., 2015).

Visoka koncentracija ulja je dobar izvor energije, a ukoliko se koristi u ishrani krava, ima pozitivan uticaj na sastav masnih kiselina mleka koje povoljno utiču na ljudsko zdravlje (Halmemies-Beauchet-Filleau i sar., 2011). Sa druge strane, visok i varijabilni sadržaj ulja ukazuje na potrebu za čestim serijskim analizama. Uljane pogače predstavljaju nedovoljno iskorišćene izvore hraniva u organskoj i maloj proizvodnji mleka (Rinne i sar., 2014).

Tabela 25. Parametri kvaliteta u uljanim pogačama, nusproizvodima i semenima iz kojih potiču

Uzorak		Vlaga i isp. materije (%)	Pepeo (%)	Proteini (%)	Ulje (%)	Celuloza (%)
	seme golice (jezgro + opna)	7.17	5.00	35.94	33.09	11.01
Uljana	pogača	6.73	8.50	51.28	18.66	6.00
tikva	seme bez ljuske	6.93	5.15	35.98	31.91	10.02
	ljuska	8.26	1.68	19.52	1.95	34.56
Crni kim	seme	6.92	4.16	21.99	40.09	9.92
	pogača	8.28	5.40	29.61	22.87	7.79
Lan	seme	6.36	3.11	22.83	32.73	8.39
	pogača	8.70	5.19	35.26	6.60	9.38
Nar	seme	5.93	1.48	11.72	18.89	31.23
	pogača	7.81	2.08	11.78	5.20	26.04
	kora	10.37	3.67	2.37	1.80	11.65

Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti dva ponavljanja

Određivanje parametara kvaliteta ulja, imalo je za cilj sagledavanje održivosti ulja, kao i njihovog uticaja na kvalitet uljanih pogača. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 26. Parametri

ispitivanja – vlaga i kiselinski broj tj. kiselost, pokazuju kvalitet uzorka; saponifikacioni, jodni broj i indeks refrakcije su metode za identifikaciju ulja, a peroksidni broj pokazuje oksidativno stanje i održivost ulja (Dimić, 2000). Vrednost saponifikacionog broja zavisi od relativnih molekularnih masa tj. od dužine lanca masnih kiselina, koje ulaze u sastav masti ili ulja. Ukoliko je relativna molekularna masa veća, saponifikacioni broj je manji i obrnuto. S obzirom da masti i ulja sadrže uglavnom gliceride masnih kiselina sa 16 i 18 C atoma, ne postoji značajna razlika u vrednostima saponifikacionog broja, što nije slučaj i sa jodnim brojem. Na vrednost saponifikacionog broja utiče takođe i sadržaj neosapunjivih materija. Saponifikacioni broj je karakteristična veličina za identifikaciju vrste ulja i on je bio u skladu sa literaturnim vrednostima (Dadashi i sar., 2013; Gohari Ardabili i sar., 2011; Khoddami i sar., 2011; Pravilnik, 23/2006 i 43/2013)

Tabela 26. Parametri kvaliteta u hladno presovanim uljima

Ulje od semena	Saponifikac. broj (mgKOH/g)	Jodni broj (I ₂ /100g)	Peroksidni broj (mmol/kg)	Indeks refr.	Vlaga i isparlj. mat. (%)	Kiselinski br.(mgKOH/g) i kiselost (%)
uljane tikve	189.17	114.59	5.10	1.466	0.03	2.22
						1.12
crnog kima	197.69	126.48	32.60	1.469	2.08	10.30
						5.18
lana	188.21	187.12	1.10	1.478	0.05	1.35
						0.68
nara	189.27	167.04	2.68	1.512	0.009	0.77
						0.39

Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti dva ponavljanja

Jodni broj ukazuje na stepen nezasićenosti ulja ili masti, tj. prisustvo nezasićenih (najčešće dvostrukih) veza masnih kiselina u molekulu triacilglicerola. Što je viši, to je veći broj nezasićenih veza i ukazuje na veću tendenciju ka užeglosti usled oksidacije (Ali i sar., 2012). On može poslužiti kao kriterijum pri oceni čistoće lipida ili masnih kiselina, tj. za dokazivanje vrste i porekla ulja. Laneno ulje je poznato po višoj vrednosti jodnog broja (Nagaraj, 2009) zbog visokog sadržaja α -linoleinske kiseline 18:3 (n=3) a od 4 analizirana ulja pokazalo je najvišu vrednost. Sledi ga ulje od

semena nara, koje s obzirom na visok sadržaj 18:3 (n=5) polinezasićene punicinske kiseline takođe pokazuje veliki jodni broj.

Peroksidni broj je najčešće primenjivana hemijska metoda za određivanje stepena oksidacije biljnih ulja. On označava nivo primarne oksidacije masnih kiselina, pokazuje količinu primarnih produkata oksidacije i jedan je od ključnih indikatora užeglosti ulja. Peroksidni broj pokazuje količinu hidroperoksida kao primarnih proizvoda autooksidacije. **Pravilnikom (23/2006 i 43/2013)** se definiše maksimalna vrednost peroksidnog broja, iznad koje je određeno ulje neprihvatljivo za ishranu ljudi. Iako je peroksidni broj ulja od semena crnog kima bio znatno viši nego u ostalim uljima, on se poklapa sa literaturnim podacima (**Kiralan i sar., 2014**), mada ukazuje i na užeglost ulja. Prema **Kirk-u i Sawyer-u (1991)** vrednost peroksidnog broja svežeg ulja je niža od 10 mmol/kg, dok užeglost kreće u opsegu vrednosti 20-40 mmol/kg. Po Pravilniku najviši peroksidni broj dozvoljen u jestivim uljima je 7,5. Na povećanje peroksidnog broja utiču uslovi čuvanja, temperatura i vreme (**Ramadan i Mörsel, 2004**), što može da ukazuje i na nepravilno čuvanje navedenog ulja. Sadržaj vlage je takođe jedan od najznačajnijih kriterijuma za određivanje kvaliteta jestivih ulja, s obzirom da je povećan sadržaj vlage indikator kvarljivosti ulja. Iz tabele 26 može se videti da ispitivano ulje crnog kima ima veći sadržaj vlage (2,08%) u odnosu na ostala ulja, što dodatno ukazuje na njegovu kvarljivost.

Indeks refrakcije je odnos brzine svetlosti određene talasne dužine u vakuumu prema brzini iste svetlosti u ispitivanoj supstanci. U praksi se umesto brzine svetlosti u vakuumu uzima brzina svetlosti u vazduhu. Indeks refrakcije date supstance zavisi od talasne dužine upadne svetlosti i temperature i karakteristična je veličina koja se nalazi u određenim granicama za datu vrstu ulja. Iz tog razloga i može poslužiti kao karakteristika za identifikaciju. Zavisi i od stepena nezasićenosti, odnosno jodnog broja, zatim od odnosa *cis/trans* konfiguracije masnih kiselina, kao i od stepena oksidacije ulja. Određeni indeksi refrakcije kretali su se u okviru očekivanih vrednosti (**Dadashi i sar., 2013; Üstun i sar., 1990; Pravilnik, 23/2006 i 43/2013**).

Kiselinski broj određuje količinu slobodnih masnih kiselina nastalih hidrolizom ulja (triacilglicerola) usled hemijske ili mikrobiološke aktivnosti. Određivanje sadržaja slobodnih masnih kiselina (SMK) je od naročitog značaja za industrijsku upotrebu, s obzirom da može da utiče na organoleptičke ili fizičko-hemijske osobine ulja. Kod rafiniranih ulja tokom procesa rafinacije uklanjaju se slobodne masne kiseline s obzirom da snižavaju tačku dimljenja u uljima za prženje i brzo se oksiduju dajući užeglu aromu. Što je procenat slobodnih masnih kiselina manji, to

je ulje kvalitetnije. Ponovo, kiselinski broj ulja od semena crnog kima ukazao je na pad njegovog kvaliteta, s obzirom da je po **Pravilniku (2006)** najviši kiselinski broj dozvoljen u jestivim uljima 4,0.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se uljane pogače, iako predstavljaju vredne izvore proteina, vlakana i rezidualnog ulja, s obzirom na njihovu potencijalnu primenu i podložnost užeglosti pojedinih ulja, moraju čuvati u adekvatnim uslovima i podvrgavati redovnim kontrolama kvaliteta.

4.5. SADRŽAJ METALA

Odabrani biljni materijal predstavlja različite vrste gajene u različitim regionima, što donosi raznovrsnost i u smislu očekivanih konstitutivnih mikronutrijenata i u smislu potencijalne kontaminacije toksičnim teškim metalima. Poznato je da teški metali reaguju sa biomolekulima, te je njihovo određivanje interesantno i u tom smislu. S obzirom da potrošači žele proizvode bez prisutnih kontaminenata, naročito u proizvodima vezanim za zdravlje, monitoring teških metala u biljkama je deo kontrole kvaliteta.

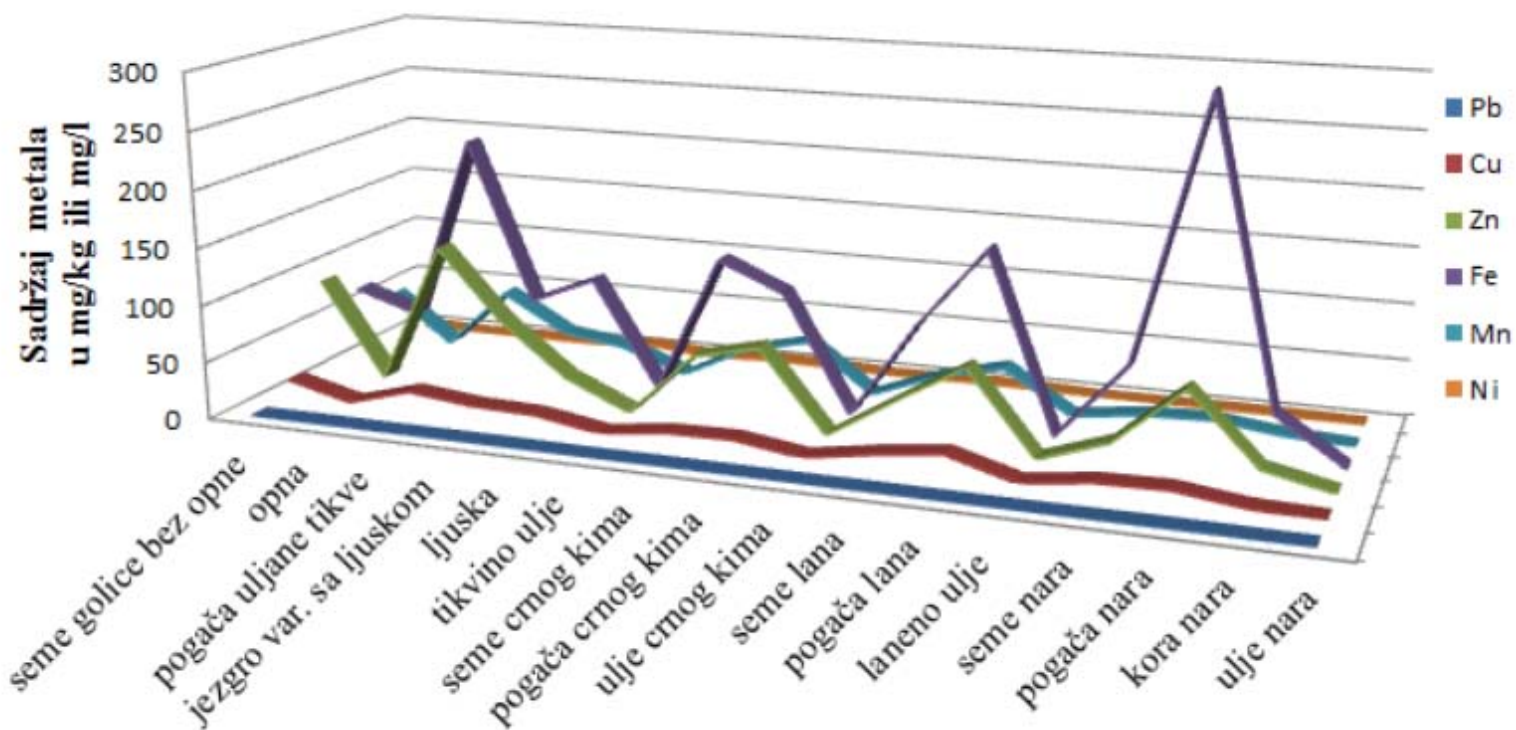
Pojedini teški metali mogu biti mikroelementi, tj. konstitutivni elementi sa specifičnim funkcijama u biljnom metabolizmu i ne moraju poticati od zagađenja. Oni su takođe esencijalni elementi u ljudskom ili životinjskom organizmu. Međutim, njihova koncentracija može znatno prevazići maksimalno dozvoljenu granicu u hrani. Česta je regionalna varijacija kontaminacije teškim metalima, u zavisnosti od stepena zagađenja (u većoj meri) i prirodnom sadržaju teških metala u zemljištu (u manjoj meri). Bakar, cink i gvožđe (Cu, Zn, Fe) su važni kofaktori koji ulaze u strukturu pojedinih enzima i neophodni su u brojnim biohemijskim putevima. Gvožđe se ponaša kao antioksidant i uključeno je u jačanje imunog sistema (**Bhat i Sridhar, 2008**). Gvožđe je od vitalnog značaja za gotovo sve žive organizme jer učestvuje u brojnim metaboličkim procesima uključujući transport kiseonika, DNK sintezu i transport elektrona. Međutim, višak gvožđa dovodi do oštećenja ćelija, kao rezultat stvaranja slobodnih radikala. Veći deo gvožđa u organizmu, (oko 60–70%) je prisutan u hemoglobinu, u eritrocitima. Cink je kofaktor više od 300 enzima i posle gvožđa najrasprostranjeniji metal u ljudskom organizmu. Za razliku od ostalih prelaznih metala kao što su bakar i gvožđe, cink ne podleže redoks reakcijama zahvaljujući popunjenoj d orbitali. On je biološki esencijalan element neophodan za rast, razvoj i diferencijaciju ćelije, homeostazu, rast

vezivnog tkiva, sintezu DNK i transkripciju RNK, deobu ćelije i ćelijsku aktivaciju. Takođe je neophodan za zarastanje rana, čulo ukusa i mirisa, funkcionisanje imunog sistema, stvaranje prostaglandina, mineralizaciju kostiju, funkciju štitaste žlezde, zgrušavanje krvi, kognitivne funkcije, rast fetusa i spermatogenezu. Reguliše pH telesnih tečnosti, pomaže formiranje kolagena, utiče na memorijske funkcije i mentalni razvoj, održava normalno funkcionisanje prostate i utiče na sekreciju testosterona (**Chasapis, 2012**). Bakar zajedno sa gvožđem učestvuje u stvaranju crvenih krvnih zrnaca i pomaže održanju zdravlja krvnih sudova, nerava, imunog sistema i kostiju. Bakar potpomaže i apsorpciju gvožđa. Nikal je kofaktor enzima koji učestvuje u biljnom metabolizmu azota (**Soetan i sar., 2010**). Mangan je aktivator i konstituent nekoliko enzima. Zdravstveni problemi izazvani nedostatkom mangana su dobro dokumentovani kod domaćih životinja, ali nisu kod ljudi. Međutim postoje brojni izveštaji o toksičnosti mangana na ljude. Slično važi i za nikel, gde je kao jedan od kliničkih simptoma preterane izloženosti niklu naveden kontaktni dermatitis (**WHO, 1996**). Sadržaj metala određen kao srednja vrednost dva ponavljanja atomskom apsorpcionom spektrometrijom i grafički je prikazan na Slici 25. Sadržaj toksičnog metala - olova je bio ispod granice kvantifikacije u svim ispitanim uzorcima, osim u pogači nara, gde se nalazio ispod donje maksimalno dozvoljene koncentracije (MDK). I sadržaj ostalih metala u svim ispitivanim uzorcima je bio ispod maksimalno dozvoljenih koncentracija propisanih **Pravilnikom (Službeni glasnik RS, br. 29/2014, 37/2014 - ispravka 39/2014)**.

Pregledom podataka uočljivo je da su pogače (u manjoj meri i semena) bogat izvor gvožđa i cinka, što je i očekivano, s obzirom na nizak sadržaj ovih metala u uljima. Nakon hladnog presovanja, metali se „koncentrišu“ u pogačama. Najbogatiji izvor gvožđa je pogača nara sa 299,74 mg/kg, a zatim pogača uljane tikve sa 214,90 mg/kg. Pogača i seme uljane tikve goliće sadrže najviše cinka (131,05 i 91,0 mg/kg, redom). Značajne izvore cinka predstavljaju i jezgro uljane tikve – varijetet sa ljuskom, pogača lana i pogača nara sa 69,57; 71,72 i 72,51 mg/kg, redom. Najviše koncentracije bakra sadržale su pogače uljane tikve i lana sa 17,18 i 16,94 mg/kg, redom. Podaci dobijeni za sadržaj Cu, Zn, Mn u pogači od semena lana su u skladu sa ranijim istraživanjima (**Ogunronbi i sar., 2011**). Sadržaj metala u semenu uljane tikve goliće je bio znatno manji nego u radu koji su objavili **Idouraine i sar. (1996)**, međutim ako se zna da se *Cucurbita pepo* L. od 9 ispitivanih useva u eksperimentu fitoremedijacije pokazala najefikasnijom u uklanjanju kadmijuma, mangana, bakra, nikla, olova i cinka iz zagađenog zemljišta (**Ciura i sar., 2005**), što pokazuje njenu veliku sposobnost apsorpcije teških metala, razlika u prijavljenim

koncentracijama možda nije iznenađujuća. Teški metali imaju tendenciju da se zadržavaju u uljanim pogačama, a kalijum-citrat, kalijum-tartarat i EDTA imaju sposobnost njihovog uklanjanja iz pogača (Yang i sar., 2016). To još jednom potvrđuje logičnost upotrebe EDTA prilikom procedure ekstrakcije fenolnih kiselina. U semenu crnog kima sadržaj cinka i gvožđa je bio u skladu sa ispitivanjima koje su izvršili Sultan i sar., 2009, sadržaj bakra veći, a sadržaj mangana niži nego u odnosu na pomenuta ispitivanja. U semenu nara, sadržaj bakra, cinka i mangana je bio u skladu sa rezultatima koje su obavili autori Dadashi i sar. (2013) dok je sadržaj gvožđa bio viši u odnosu na njihova određivanja. Ipak bitno je napomenuti da su Dadashi i sar. (2013) ispitivali 4 varijeteta semena nara iz Irana, a razlika u koncentraciji istog metala je u okviru ta 4 varijeteta bila npr. za gvožđe gotovo dvostruka (16 i 30 mg/kg), a za cink se kretala između 29 i 71 mg/kg. Pri tom, Tangahu i sar. (2011) navode 7 različitih faktora koji u biljkama utiču na mehanizam usvajanja teških metala, čime impliciraju mogućnost pojave različitih koncentracija metala u određenoj biljci.

Bez obzira na varijabilnost koncentracije metala u biljkama, literaturni podaci ukazuju na mogućnost poboljšanja mineralnog sastava hleba dodavanjem proizvoda (proteinski izolati, pogača, fermentisana pogača itd.) od bundevinog semena. Gornja granica suplementacije u organoleptičkom i kvalitativnom smislu za pogaču iznosi 17% (El-Soukkary, 2001). Pri dodavanju pogače lana nisu primećeni negativni uticaji na tehnologiju pravljenja hleba, za razliku od pogače uljane tikve (Tarek-Tilistyák i sar., 2014). Navedena je i mogućnost formulacije hleba sa 5,10 ili 15% pogače crnog kima radi obogaćivanja cinkom, gvožđem i bakrom (Osman i sar., 2014). Dodatak samlevene kore nara keksima povećao je njihov sadržaj gvožđa i cinka, kao i kalcijuma, kalijuma, dijetetskih vlakana i ukupnih polifenola (Ismail i sar., 2014).



Slika 25. Sadržaj metala u ispitivanim uzorcima

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Uljane pogače analizirane u ovom radu predstavljaju bogat izvor fenolnih kiselina, čija raspodela zavisi od vrste uljane pogače. U najvećoj koncentraciji slobodne fenolne kiseline se nalaze u pogači uljane tikve, estarski vezane u pogačama nara i lana, a nerastvorne-vezane u pogačama crnog kima i nara.
2. Od svih analiziranih uzoraka kora nara je sadržala najviše estarski vezanih fenolnih kiselina (7842 mg/kg s.m.), zahvaljujući veoma visokom sadržaju galne kiseline. Slobodne i estarski vezane (lako ekstrabilne) fenolne kiseline činile su približno 87% od ukupnog sadržaja fenolnih kiselina u kori nara koji je iznosio 10,52 g/kg s.m.
3. Moguća je formulacija nove funkcionalne hrane sa dodatkom ispitivanih uljanih pogača, kore ploda i ljuske semena u zavisnosti od željenog zdravstvenog efekta.
4. Upotrebom ekstrakata bogatih estarski vezanim fenolnim kiselinama (uz izuzeće koraka hidrolize) moguće su nove prehrabene i kozmetičke formulacije sa hidroksicimetnim kiselinama gde bi njihova integracija u uljane ili masne matrikse bila olakšana.
5. Nakon određivanja deset fenolnih kiselina (u slobodnom, estarski vezanom i nerastvornom-vezanom obliku) u 12 biljnih uzoraka, analiza glavnih komponenti (PCA) omogućila je razdvajanje biljnih uzoraka u grupe prema poreklu i smanjila broj fenolnih kiselina neophodnih za njihovu karakterizaciju, tako da je umesto 30 neophodno 13 fenolnih kiselina. To može imati potencijalnu primenu u skriningu fenolnih kiselina i određivanju kvaliteta/autentičnosti uljarica i njihovih nusproizvoda. Dobijeni rezultati takođe mogu služiti za procenu uljarica i njihovih nusproizvoda kao vrednih izvora fenolnih kiselina.

6. LITERATURA

1. Abad-García, B., Berrueta, L.A., López-Márquez, D.M., Crespo-Ferrer, I., Gallo, B., Vicente, F., Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. *Journal of Chromatography A*, 1154 (2007) 87-96.
2. Acosta-Estrada B. A., Gutiérrez-Uribe J. A., Serna-Saldívar S. O., Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152 (2014) 46-55.
3. Adom, K.K., Liu, R.H., Antioxidant activity of grains. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50 (2002) 6182-6187.
4. Ahmad A., Husain A., Mujeeb M., Khan S. A., Najmi A. K., Siddique N. A., Damanhour Z. A., Anwar F., A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3 (2013) 337-352.
5. Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Rao, U. P. Sustainable solutions for agro processing waste management: an overview. In *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development* (65-109). Springer Netherlands (2012).
6. Akhtar, S., Ismail, T., Fraternali, D., Sestili, P., Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food chemistry*, 174 (2015) 417-425.
7. Ali, M.A., Sayeed, M.A., Alam, M.S., Yeasmin, M.S., Khan, A.M., Muhamad, I.I., Characteristics of oils and nutrient contents of *Nigella sativa* Linn. and *Trigonella foenum-graecum* seeds. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 26 (2012.) 55-64.
8. Altunkaya A., Hedegaard R. V., Brimer L., Gökmen V., Skibsted L.H., Antioxidant capacity versus chemical safety of wheat bread enriched with pomegranate peel powder. *Food & Function*, 4 (2013) 722-727.
9. Al-Jassir M. S., Chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds growing in Saudi Arabia. *Food Chemistry* 45 (1992) 239-242.
10. Andreasen, M. F., Christensen, L. P., Meyer, A. S., Hansen, A., Release of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids in rye by commercial plant cell wall degrading enzyme preparations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79 (1999) 411–413.

11. Andjelkovic, M., Van Camp, J., Trawka, A., Verhé, R., Phenolic compounds and some quality parameters of pumpkin seed oil. *European journal of lipid science and technology*, 112 (2010) 208-217.
12. Arapitsas, P., Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food chemistry*, 135 (2012) 1708-1717.
13. Ashoush, I.S., El-Batawy, O.I., El-Shourbagy, G.A., Antioxidant activity and hepatoprotective effect of pomegranate peel and whey powders in rats. *Annals of Agricultural Sciences*, 58 (2013) 27-32.
14. Aslam MN, Lansky EP, Varani J: Pomegranate as a cosmeceutical source: Pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 103 (2006) 311-118.
15. Attree, R., Du, B., Xu, B., Distribution of phenolic compounds in seed coat and cotyledon, and their contribution to antioxidant capacities of red and black seed coat peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *Industrial Crops and Products*, 67 (2015) 448-456.
16. Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodríguez, J. A., Siddiqui, M. W., Dávila-Aviña J.E., González-Aguilar, G. A., Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44 (2011) 1866-1874.
17. Ayo, J.A., Kajo, N., Effect of soybean hulls supplementation on the quality of acha based biscuits. *American Journal of Food and Nutrition*, 6 (2016) 49-56.
18. Balasundram N., Sundram K., Samman S., Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99 (2006) 191-203.
19. Bavec, F., Grobelnik Mlakar, S., Rozman, C., Bavec, M. *Oil pumpkins: Niche for organic producers*. ASHS Press: Alexandria, VA, USA (2007).
20. Bendini, A., Bonoli, M., Cerretani, L., Biguzzi, B., Lercker, G., Toschi, T. G., Liquid–liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. *Journal of Chromatography A*, 985 (2003) 425–433.

21. Benfeito, S., Oliveira, C., Soares, P., Fernandes, C., Silva, T., Teixeira, J., Borges, F., Antioxidant therapy: Still in search of the ‘magic bullet’. *Mitochondrion*, 13 (2013) 427-435.
22. Benoit, I., Danchin, E.G., Bleichrodt, R.J., de Vries, R.P., Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity. *Biotechnology letters*, 30 (2008) 387-396.
23. Bhat R., Sridhar K. R., Nutritional quality evaluation of electron beam-irradiated lotus (Nelumbo nucifera) seeds. *Food Chemistry*, 107 (2008) 174–184.
24. Behera, S., Indumathi, K., Mahadevamma, S., Sudha, M.L., Oil cakes—a by-product of agriculture industry as a fortificant in bakery products. *International journal of food sciences and nutrition*, 64 (2013) 806-814.
25. Berenji J., *Proizvodnja uljane tikve golice i tikvinog ulja*. Vojvođanska Fondacija za razvoj „Halo“ Subotica (2014).
26. Berenji J., Sikora V., Sistematika, morfologija, poreklo, genetika i oplemenjivanje uljane tikve u: Berenji J. (ed.): *Uljana tikva (Cucurbita pepo L.)*, Institut za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad (2011) 7-82.
27. Bernal, J., Mendiola, J.A., Ibáñez, E. and Cifuentes, A., Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 55 (2011), 758-774.
28. Blainski A., Lopes G. C., Palazzo de Mello J. C., Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*, 18 (2013) 6852-6865.
29. Boroushaki, M.T., Mollazadeh, H., Afshari, A.R., POMEGRANATE SEED OIL: A COMPREHENSIVE REVIEW ON ITS THERAPEUTIC EFFECTS. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7 (2016) 430.
30. Bravo L., Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56 (1998) 317-333.
31. Britton G., *The biochemistry of natural pigments*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, (1983).
32. Campillo, N., Viñas, P., Férez-Melgarejo, G., Ochotorena, M.L., Hernández-Córdoba, M., Determination of Phenolic Acids and Hydrolyzable Tannins in Pomegranate Fruit and

- Beverages by Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 8 (2015) 1315-1325.
33. Cai Y.-Z., Sun M., Xing J., Luo Q., Corke H., Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78 (2006) 2872-2888.
34. Çam M., İçyer N. C., Erdoğan F., Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT - Food Science and Technology* 55 (2014) 117-123.
35. Caraméz, S. M. B., Stefani, M., Medeiros, J. D., Vieira, M. A., Brueske, G. R., De Francisco, A., Amante, E. R., Softening of pumpkin seeds (*cucurbita moschata*) by alkaline maceration. *Journal of food process engineering*, 31 (2008) 431-442.
36. Carocho M., Ferreira I. C.F.R., A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 51 (2013) 15–25.
37. Chandrasekaran, M., Shine, K., Oil seeds. *Valorization of Food Processing By-Products. CRC Press Taylor and Francis Group (USA)*, (2012) 331-367.
38. Chasapis C. T., Loutsidou A. C., Spiliopoulou C. A., Stefanidou M. E., Zinc and human health: an update. *Archives of toxicology*, 86 (2012) 521–534.
39. Chemat F., Vian M. A., Cravotto G., Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (2012) 8615-8627.
40. Cheikh-Rouhou, S., Besbes, S., Hentati, B., Blecker, C., Deroanne, C. and Attia, H., *Nigella sativa* L.: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food chemistry*, 101 (2007) 673-681.
41. Cho, J.Y., Moon, J.H., Seong, K.Y., Park, K.H., Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and trans 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 62 (1998) 2273-2276.
42. Choo, W.S., Birch, J., Dufour, J.P., Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed flaxseed oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20 (2007) 202-211.
43. Cilliers, J. J. L., Singleton, V. L., Nonenzymic autoxidative phenolic browning reactions in a caffeic acid model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37 (1989) 890–896.

44. Cilliers, J. J. L., Singleton, V. L., Caffeic acid autoxidation and the effects of thiols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38 (1990) 1789–1796.
45. Cilliers, J. J. L., Singleton, V. L., Characterization of the products of nonenzymic autoxidative phenolic reactions in a caffeic acid model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39 (1991) 1298–1303.
46. Ciura, J., Poniedzialek, M., Sekara, A., Jedrszczyk, E., The possibility of using crops as metal phytoextractants. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14 (2005) 17-22.
47. Clifford, M.N., Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (2000) 1033-1043.
48. Coşkuner, Y., Karababa, E., Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Food Engineering*, 78 (2007) 1067-1073.
49. Costantini, S., Rusolo, F., De Vito, V., Moccia, S., Picariello, G., Capone, F., Guerriero, E., Castello, G., Volpe, M.G., Potential anti-inflammatory effects of the hydrophilic fraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil on breast cancer cell lines. *Molecules*, 19 (2014) 8644-8660.
50. Dabrowski, K. J., Sosulski, F. W., Composition of free and hydrolyzable phenolic acids in defatted flours of ten oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32 (1984) 128–130.
51. Dadashi, S., Mousazadeh, M., Emam-Djomeh, Z., Mousavi, S.M., Pomegranate (*Punica granatum* L.) seed: A comparative study on biochemical composition and oil physicochemical characteristics. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 1 (2013) 351-363.
52. Dai J., Mumper R. J., Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, *Molecules*, 15 (2010) 7313-7352.
53. Dey, G., Chakraborty, M., & Mitra, A., Profiling C6-C3 and C6-C1 phenolic metabolites in *Cocos nucifera*. *Journal of Plant Physiology*, 162 (2005) 375–381.
54. Dimić E. Hladno ceđena ulja. Monografija. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad (2005).
55. Dimić E., Kontrola kvaliteta hladno presovanih ulja. *Acta Periodica Technologica*, 31 (2000) 165-174.

56. Duffey S.S., Stout M.J., Antinutritive and Toxic Components of Plant Defense Against Insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 32 (1996) 3-37.
57. Durante, M., Lenucci, M.S., Mita, G., Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from pumpkin (cucurbita spp.): A review. *International journal of molecular sciences*, 15 (2014) 6725-6740.
58. Dragovic-Uzelac, V., Delonga, K., Levaj, B., Djakovic S., Pospisil, J. Phenolic Profiles of Raw Apricots, Pumpkins, and Their Purees in the Evaluation of Apricot Nectar and Jam Authenticity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005) 4836-4842.
59. Đilas S. M., Čanadanović-Brunet J. M., Četković G. S., Antioxidants in Food. *Chemical Industry*, 56 (2002) 105-112.
60. Elfalleh, W., Tlili, N., Nasri, N., Yahia, Y., Hannachi, H., Chaira, N., Ying, M., Ferchichi, A., Antioxidant capacities of phenolic compounds and tocopherols from Tunisian pomegranate (*Punica granatum*) fruits. *Journal of Food Science*, 76 (2011) C707-C713.
61. El Gharras, H., Polyphenols: food sources, properties and applications—a review. *International journal of food science & technology*, 44 (2009) 2512-2518.
62. Eliasson, C., Kamal-Eldin, A., Andersson, R., Åman, P., High-performance liquid chromatographic analysis of secoisolariciresinol diglucoside and hydroxycinnamic acid glucosides in flaxseed by alkaline extraction. *Journal of chromatography A*, 1012 (2003) 151-159.
63. Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., Attia, H., Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*, 124 (2011) 411-421.
64. El-Nemr, S. E., Ismail I. A., Ragab M., Chemical composition of juice and seeds of pomegranate fruit. *Food/Nahrung*, 34 (1990) 601-606.
65. El-Soukkary F.A.H., Evaluation of pumpkin seed products for bread fortification. *Plant Foods for Human Nutrition* 56 (2001) 365–384.
66. Eryilmaz, T., Yesilyurt, M.K., Cesur, C., Gokdogan, O., Biodiesel production potential from oil seeds in Turkey. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58 (2016) 842-851.
67. Escarpa, A., González, M.C., Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica Chimica Acta*, 427 (2001) 119-127.

68. Escarpa, A., Gonzalez, M.C., Optimization strategy and validation of one chromatographic method as approach to determine the phenolic compounds from different sources. *Journal of Chromatography A*, 897 (2000) 161-170.
69. Fang, Z., Bhandari, B., Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21 (2010) 510-523.
70. Faulds, C.B., Williamson, G., The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79 (1999) 393-395.
71. Fischer, U.A., Carle, R., Kammerer, D.R., Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSⁿ. *Food chemistry*, 127 (2011) 807-821.
72. Fliniaux, O., Corbin, C., Ramsay, A., Renouard, S., Beejmohun, V., Doussot, J., Falguières, A., Ferroud, C., Lamblin, F., Lainé, E., Roscher, A., Microwave-assisted extraction of herbacetin diglucoside from flax (*Linum usitatissimum* L.) seed cakes and its quantification using an RP-HPLC-UV system. *Molecules*, 19 (2014) 3025-3037.
73. Fruhwirth, G.O., Hermetter, A., Production technology and characteristics of Styrian pumpkin seed oil. *European journal of lipid science and technology*, 110 (2008) 637-644.
74. Galanakis C. M., Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 26 (2012) 68-87.
75. Gao, L., Mazza, G., Rapid method of complete chemical characterization of simple and acylated anthocyanins by highperformance liquid chromatography and capillary gas-liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (1994) 118-125.
76. Gharby, S., Harhar, H., Guillaume, D., Roudani, A., Boulbaroud, S., Ibrahimi, M., Ahmad, M., Sultana, S., Hadda, T.B., Chafchaoui-Moussaoui, I., Charrouf, Z., Chemical investigation of *Nigella sativa* L. seed oil produced in Morocco. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 14 (2015) 172-177.
77. Gohari Ardabili, A., Farhoosh, R., Haddad Khodaparast, M.H., Chemical composition and physicochemical properties of pumpkin seeds (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo* var. *Styriaka*) grown in Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13 (2011) 1053-1063.

78. Górnas, P., Siger A., Segliņa D., Physicochemical characteristics of the cold-pressed Japanese quince seed oil: New promising unconventional bio-oil from by-products for the pharmaceutical and cosmetic industry. *Industrial Crops and Products*, 48 (2013) 178-182.
79. Guern, J., Renaudin, J.P., Brown, S.C., *The compartmentation of secondary metabolites in plant cell cultures*. Cell culture and somatic cell genetics of plants, Academic Press, London, UK, (1987) 43-76.
80. Gutierrez, R.M.P., Review of Cucurbita pepo (Pumpkin) its Phytochemistry and Pharmacology. *Medicinal Chemistry*, 6 (2016) 012-021.
81. Häkkinen S., *Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products*. (Doctoral dissertation). Kuopio: Faculty of Medicine of the University of Kuopio (2000).
82. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford, Oxford University Press, (1989) 22-85.
83. Halliwell, B., Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142 (2004) 231-255.
84. Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Kokkonen, T., Lampi, A.M., Toivonen, V., Shingfield, K.J., Vanhatalo, A., Effect of plant oils and camelina expeller on milk fatty acid composition in lactating cows fed diets based on red clover silage. *Journal of dairy science*, 94 (2011) 4413-4430.
85. Harborne J. B., Plant Phenolics. In Dey P. M., Harborne J. B. (series ed.): *Methods in Plant Biochemistry*, Volume 1. Academic Press, Hartcourt Brace Jovanovich - Publishers, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, (1989) 3.
86. Harris, R.K., Haggerty, W.J., Assays for potentially anticarcinogenic phytochemicals in flaxseed. *Cereal foods world*, 38 (1993) 147-151.
87. Haumann, B.F., Mechanical extraction: capitalizing on solvent-free processing. *Inform*, 8 (1997) 165-174.
88. He, L., Xu, H., Liu, X., He, W., Yuan, F., Hou, Z., Gao, Y., Identification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant capacities by HPLC–ABTS+ assay. *Food Research International*, 44 (2011) 1161-1167.

89. Herchi, W., Sawalha, S., Arráez-Román, D., Boukhchina, S., Segura-Carretero, A., Kallel, H., Fernández-Gutierrez, A., Determination of phenolic and other polar compounds in flaxseed oil using liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *Food Chemistry*, 126 (2011) 332-338.
90. Hong, L.S., Ibrahim, D., Kassim, J., Sulaiman, S., Gallic acid: An anticandidal compound in hydrolysable tannin extracted from the barks of *Rhizophora apiculata* Blume. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1 (2011), 75.
91. Hora, J.J., Maydew, E.R., Lansky, E.P., Dwivedi, C., Chemopreventive effects of pomegranate seed oil on skin tumor development in CD1 mice. *Journal of medicinal food*, 6 (2003) 157-161.
92. Horvai Gy., editor. *Chemometrics*. Budapest: Nemzeti Tankönyvkiadó, Hungarian (2004).
93. Hussain, S., Anjum, F.M., Butt, M.S., Sheikh, M.A., Chemical composition and functional properties of flaxseed (*Linum usitatissimum*) flour. *Sarhad Journal of Agriculture*, 24 (2008) 649-653.
94. Hsu, C.-L., Yen, G.-C., Phenolic compounds: Evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52 (2008) 53 – 61.
95. Hur, J.M., Park, J.G., Yang, K.H., Park, J.C., Park, J.R., Chun, S.S., Choi, J.S., Choi, J.W., Effect of methanol extract of *Zanthoxylum piperitum* leaves and of its compound, protocatechuic acid, on hepatic drug metabolizing enzymes and lipid peroxidation in rats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 67 (2003) 945-950.
96. Idouraine, A., Kohlhepp, E.A., Weber, C.W., Warid, W.A., Martinez-Tellez, J.J., Nutrient constituents from eight lines of naked seed squash (*Cucurbita pepo* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (1996) 721-724.
97. Ismail, T., Akhtar, S., Riaz, M., Ismail, A., Effect of pomegranate peel supplementation on nutritional, organoleptic and stability properties of cookies. *International journal of food sciences and nutrition*, 65 (2014) 661-666.
98. Iswaldi I., Gómez-Caravaca A. M., Lozano-Sánchez J., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., Profiling of phenolic and other polar compounds in zucchini (*Cucurbita pepo* L.) by reverse-phase high-performance liquid chromatography coupled to

- quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Research International*, 50 (2013) 77–84.
99. Itoh, A., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Kobayashi, M., Tamesada, M., Yagi K., Hepatoprotective Effect of Syringic Acid and Vanillic Acid on Concanavalin A-Induced Liver Injury. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32 (2009) 1215-1219.
100. Johanningsmeier S. D., Harris G. K., Pomegranate as a Functional Food and Nutraceutical Source. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2 (2011) 181-201.
101. Kachrimanidou, V., Kopsahelis, N., Alexandri, M., Strati, A., Gardeli, C., Papanikolaou, S., Komaitis, M., Kookos, I.K., Koutinas, A.A., Integrated sunflower-based biorefinery for the production of antioxidants, protein isolate and poly (3-hydroxybutyrate). *Industrial Crops and Products*, 71 (2015) 106-113.
102. Kalili K. M., de Villiers A., Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds *Journal of Separation Science*, 34 (2011) 854–876.
103. Kamal-Eldin, A., Effect of fatty acids and tocopherols on the oxidative stability of vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108 (2006) 1051-1061.
104. Kammerer, D.R., Kammerer, J., Valet, R., Carle, R., Recovery of polyphenols from the by-products of plant food processing and application as valuable food ingredients. *Food Research International*, 65 (2014) 2-12.
105. Karamac, M., Kosińska, A., Pegg, R.B., Comparison of radical-scavenging activities for selected phenolic acids. *Polish journal of food and nutrition sciences*, 14 (2005) 165-170.
106. Karaman S., Karasu S., Tornuk F., Toker O. S., Geçgel Ü., Sagdic O., Ozcan N., Gül O., Recovery Potential of Cold Press Byproducts Obtained from the Edible Oil Industry: Physicochemical, Bioactive, and Antimicrobial Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (2015) 2305–2313.
107. Kasote, D.M., Flaxseed phenolics as natural antioxidants. *International Food Research Journal*, 20 (2013) 27-34.
108. Kaur, S., Kumar, S., Bhat, Z.F., Utilization of pomegranate seed powder and tomato powder in the development of fiber-enriched chicken nuggets. *Nutrition & Food Science*, 45 (2015) 793-807.

109. Kaushik, P., Dowling, K., McKnight, S., Barrow, C.J., Wang, B., Adhikari, B., Preparation, characterization and functional properties of flax seed protein isolate. *Food chemistry*, 197 (2016) 212-220.
110. Kazeem M. I., Davies T. C., Anti-diabetic functional foods as sources of insulin secreting, insulin sensitizing and insulin mimetic agents. *Journal of functional foods*, 20 (2016) 122–138.
111. Kazemi, M., Karim, R., Mirhosseini, H., Hamid, A.A., Optimization of pulsed ultrasound-assisted technique for extraction of phenolics from pomegranate peel of Malas variety: Punicalagin and hydroxybenzoic acids. *Food Chemistry*, 206 (2016) 156-166.
112. Khadem, S., Marles, R.J., Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy- and Polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies. *Molecules*, 15 (2010) 7985-8005.
113. Khoddami, A., Ghazali, H.M., Yassoralipour, A., Ramakrishnan, Y., Ganjloo, A., Physicochemical characteristics of nigella seed (*Nigella sativa* L.) oil as affected by different extraction methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88 (2011) 533-540.
114. Khoddami, A., Wilkes, M.A., Roberts, T.H., Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18 (2013) 2328-2375.
115. Kim, M.Y., Kim, E.J., Kim, Y.N., Choi, C., Lee, B.H., Comparison of the chemical compositions and nutritive values of various pumpkin (*Cucurbitaceae*) species and parts. *Nutrition research and practice*, 6 (2012) 21-27.
116. Kim, N.D., Mehta, R., Yu, W., Neeman, I., Livney, T., Amichay, A., Poirier, D., Nicholls, P., Kirby, A., Jiang, W., Mansel, R., Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 71 (2002) 203-217.
117. King, A., Young, G., Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99 (1999) 213-218.
118. Kiralan, M., Özkan, G., Bayrak, A., Ramadan, M.F., Physicochemical properties and stability of black cumin (*Nigella sativa*) seed oil as affected by different extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 57 (2014) 52-58.
119. Kirk, R.S., Sawyer, R. *Pearson's Composition and Analysis of Foods*. 9th ed. UK: Longman Scientific & Technical (1991).

120. Kosińska, A., Penkacik, K., Wiczowski, W., Amarowicz, R. Presence of Caffeic Acid in Flaxseed Lignan Macromolecule. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66 (2011) 270–274.
121. Koutinas, A.A., Vlysidis, A., Pleissner, D., Kopsahelis, N., Garcia, I.L., Kookos, I.K., Papanikolaou, S., Kwan, T.H., Lin, C.S.K., Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *Chemical Society Reviews*, 43 (2014) 2587-2627.
122. Krygier, K., Sosulski F., Hogge L. Free, esterified and insoluble-bound phenolic acids. 1. extraction and purification procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30 (1982) 330-334.
123. Kumar N., Pruthi V., Potential applications of ferulic acid from natural sources. Review. *Biotechnology Reports* 4 (2014) 86–93.
124. Kushwaha, S.C., Bera, M.B., Kumar, P., Nutritional Composition of Detanninated and Fresh Pomegranate Peel Powder. *Journal Of Environmental Science, Toxicology And Food Technology*, 7 (2013) 38-42.
125. Lansky E. P., Newman R. A., *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology* 109 (2007) 177–206.
126. Laranjinha, J., Redox cycles of caffeic acid with alpha-tocopherol and ascorbate. *Methods Enzymology*, 335 (2001) 282–295.
127. Laranjinha, J., Cadenas, E., Redox cycles of caffeic acid, alpha-tocopherol, and ascorbate: implications for protection of lowdensity lipoproteins against oxidation. *IUBMB Life*, 48 (1999) 57–65.
128. Lazos E. S. Nutritional, fatty acid, and oil characteristics of pumpkin and melon seeds. *Journal of Food Science*, 4 (1986) 83–87.
129. Lee, K. W., Lee, H. J. The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *BioFactors*, 26 (2006) 105–121.
130. Lee K.-G., Shibamoto T., Takeoka G. R., Lee S.-E., Kim J.-H., Park B.-S., Inhibitory Effects of Plant-Derived Flavonoids and Phenolic Acids on Malonaldehyde Formation from Ethyl Arachidonate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2003) 7203-7207.
131. Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M., The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125 (2011) 288-306.

132. Lin, F.-H., Lin, J.-Y., Gupta, R.D., Tournas, J.A., Burch, J.A., Selim, M.A., Monteiro-Riviere, N.A., Grichnik, J.M., Zielinski, J., Pinnell S.R., Ferulic Acid Stabilizes a Solution of Vitamins C and E and Doubles its Photoprotection of Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 125 (2005) 826–832.
133. Lin, C.S.K., Pfaltzgraff, L.A., Herrero-Davila, L., Mubofu, E.B., Abderrahim, S., Clark, J.H., Koutinas, A.A., Kopsahelis, N., Stamatelatos, K., Dickson, F., Thankappan, S., Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective. *Energy & Environmental Science*, 6 (2013) 426-464.
134. Lomascolo A., Uzan-Boukhris E., Sigoillot J.-C., Fine F., Rapeseed and sunflower meal: a review on biotechnology status and challenges, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95 (2012) 1105–1114.
135. Lu, J., Yuan, Q., A new method for ellagic acid production from pomegranate husk. *Journal of food process engineering*, 31 (2008) 443-454.
136. Macheix J. J., Fleuriet A., Billot J., *Fruit phenolics*. CRC Press, Boca Raton, FL, (1990).
137. Madhan, B., Subramanian, V., Rao, J.R., Nair, B.U. , Ramasami, T., Stabilization of collagen using plant polyphenol: Role of catechin. *International journal of biological macromolecules*, 37 (2005) 47-53.
138. Madhusudhan B., Potential Benefits of Flaxseed in Health and Disease - A Perspective. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 74 (2009) 67-72.
139. Makris D. P., Boskou D., Dubey N.K.: *Plant-Derived Antioxidants as Food Additives*. Plants as a source of Natural Antioxidants. CAB International 2014, 169-190.
140. Mariod, A.A., Ibrahim, R.M., Ismail, M., Ismail, N., Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chemistry*, 116 (2009) 306-312.
141. Martins S., Mussatto S.I., Martínez-Avila G., Montañez-Saenz J., Aguilar C.N., Teixeira J.A., Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, 29 (2011) 365–373.
142. Mattila, P., Hellström, J., Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20 (2007) 152-160.
143. Mathias O., *Chemometrics*. Wiley-VCH, Weinheim, (2007).

144. Mazzoncini, M., Antichi, D., Tavarini, S., Silvestri, N., Lazzeri, L., D'Avino, L., Effect of defatted oilseed meals applied as organic fertilizers on vegetable crop production and environmental impact. *Industrial Crops and Products*, 75 (2015) 54-64.
145. McFarlin, B.K., Strohacker, K.A., Kueht, M.L., Pomegranate seed oil consumption during a period of high-fat feeding reduces weight gain and reduces type 2 diabetes risk in CD-1 mice. *British Journal of Nutrition*, 102 (2009) 54.
146. Mehta, R., Lansky, E.P., Breast cancer chemopreventive properties of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in a mouse mammary organ culture. *European Journal of Cancer Prevention*, 13 (2004), 345-348.
147. Mirabella N., Castellani V., Sala S.. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a Review. *Journal of Cleaner Production*, 65 (2014) 28-41.
148. Mirdehghan, S.H., Rahemi, M., Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 111 (2007) 120-127.
149. Mirmiran, P., Fazeli, M.R., Asghari, G., Shafiee, A., Azizi, F., Effect of pomegranate seed oil on hyperlipidaemic subjects: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *British journal of nutrition*, 104 (2010) 402-406.
150. Mitra, C.R., Misra, P.S., Amino acids of processed seed meal proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 15 (1967) 697-700.
151. Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M., Miniati, E., Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40 (1992) 1571-1576.
152. Monties B., Lignins, *Methods in plant biochemistry*, Academic Press, London, UK, (1989) 113-157.
153. Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Domínguez, J.M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M.J., Parajó, J.C., Natural antioxidants from residual sources. *Food chemistry*, 72 (2001) 145-171.
154. Munin, A., Edwards-Lévy, F., Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics*, 3 (2011) 793-829.

155. Murkovic, M., Hillebrand, A., Winkler, J., Pfannhauser, W., Variability of vitamin E content in pumpkin seeds (*Cucurbita pepo* L). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 202 (1996) 275-278.
156. Naczki M., Shahidi F., Extraction and analysis of phenolics in food – Review. *Journal of Chromatography A*, 1054 (2004) 95–111.
157. Nagaraj, G., *Oilseeds: properties, products, processing and procedures*. New India Publishing (2009).
158. Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., Mencarelli, D., Comisso, A., & Scaccini, C. Detection of bound phenolic acids: Prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. *Food Chemistry*, 79 (2002) 119–124.
159. Nardini, M., D'Aquino, M., Tomassi, G., Gentili, V., Di Felice, M., Scaccini, C., Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radical Biology and Medicine*, 19 (1995) 541-552.
160. Nardini, M., Ghiselli, A. Determination of free and bound phenolic acids in beer. *Food Chemistry*, 84 (2004) 137–143.
161. Natella, F., Nardini, M., Di Felice, M., Scaccini, C., Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47 (1999) 1453-1459.
162. Naz, S., Sheikh, H., Siddiqi, R., Sayeed, S.A., Oxidative stability of olive, corn and soybean oil under different conditions. *Food Chemistry*, 88 (2004) 253–259.
163. Nerín, C., Tovar, L., Djenane, D., Camo, J., Salafranca, J., Beltrán, J.A., Roncalés, P., Stabilization of Beef Meat by a New Active Packaging Containing Natural Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (2006) 7840-7846.
164. Nergiz, C., Ötleş, S., Chemical composition of *Nigella sativa* L. seeds. *Food chemistry*, 48 (1993) 259-261.
165. Nogala-Kalucka, M., Rudzinska, M., Zadernowski, R., Siger, A., Krzyzostaniak, I., Phytochemical content and antioxidant properties of seeds of unconventional oil plants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87 (2010) 1481-1487.

166. Nyam, K. L., Lau, M., Tan, C. P., Fibre from pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds and rinds: physico-chemical properties, antioxidant capacity and application as bakery product ingredients. *Malaysian journal of nutrition*, 19 (2013) 99-109.
167. Nyam, K.L., Tan, C.P., Lai, O.M., Long, K., Man, Y.C., Physicochemical properties and bioactive compounds of selected seed oils. *LWT-Food Science and technology*, 42 (2009) 1396-1403.
168. Ogunronbi O., Jooste P. J., Abu J.O., Van Der Merwe B., Chemical composition, storage stability and effect of cold-pressed flaxseed oil cake inclusion on bread quality. *Journal of Food Processing and Preservation*, 35 (2011) 64–79.
169. Oomah B. D., Flaxseed as a functional food source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81 (2001) 889-894.
170. Oomah, B. D., Kenaschuk, E. O., Mazza, G. Phenolic acids in flaxseed. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43 (1995) 2016-2019.
171. Osman, M.A., Alamri, M.S., Mohamed, A.A., Hussain, S., Gassem, M.A., Rahman, I.A., Black cumin-fortified flat bread: formulation, processing, and quality. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 7 (2014) 233-238.
172. Otto M., Chemometrics, Willey-VCH, Weinheim, 2007.
173. Ou S., Kwok K.-C., Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84 (2004) 1261–1269.
174. Pericin, D., Madarev-Popovic, S., Radulovi-Popovic, L., Skrinjar, M., Evaluate of pumpkin oil cake as substrate for the cellulase production by *Penicillium roqueforti* in solid state fermentation. *Romanian Biotechnological Letters*, 13 (2008) 3815-20.
175. Peričin, D., Radulović-Popović, L. J., Vaštag, Ž., Mađarev-Popović, S., Trivić, S., Enzymatic hydrolysis of protein isolate from hull-less pumpkin oil cake: Application of response surface methodology. *Food Chemistry*, 115 (2009) 753-757.
176. Peričin, D., Radulović, L., Trivić, S., Dimić, E., Evaluation of solubility of pumpkin seed globulins by response surface method. *Journal of Food Engineering*, 84 (2008) 591-594.
177. Popović, L., Peričin, D., Vaštag, Ž., Popović, S., Krimer, V., Torbica, A., Antioxidative and functional properties of pumpkin oil cake globulin hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90 (2013) 1157-1165.

178. Popović, S., Peričin, D., Vaštag, Ž., Popović, L., Lazić, V. Evaluation of edible film-forming ability of pumpkin oil cake; effect of pH and temperature. *Food Hydrocolloids*, 25 (2011) 470-476.
179. Popović, S., Peričin, D., Vaštag, Ž., Lazić, V., Popović, L. Pumpkin oil cake protein isolate films as potential gas barrier coating. *Journal of Food Engineering*, 110 (2012) 374-379.
180. Poyrazoğlu, E., Gökmen, V., Artık, N., Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. *Journal of food composition and analysis*, 15 (2002) 567-575.
181. Puértolas, E., Koubaa, M., Barba, F.J., An overview of the impact of electrotechnologies for the recovery of oil and high-value compounds from vegetable oil industry: Energy and economic cost implications. *Food Research International*, 80 (2016) 19-26.
182. Quezada, N., Cherian, G., Lipid characterization and antioxidant status of the seeds and meals of *Camelina sativa* and flax. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114 (2012) 974-982.
183. Rabetafika, H.N., Van Remoortel, V., Danthine, S., Paquot, M., Blecker, C., Flaxseed proteins: food uses and health benefits. *International journal of food science & technology*, 46 (2011) 221-228.
184. Rabrenović B. B., Uticaj fizičko-hemijskih karakteristika semena uljane tikve (*Cucurbita pepo* L.) na kvalitet i nutritivna svojstva hladno presovanog ulja. *Doktorska disertacija*, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad (2011).
185. Radočaj, O., Dimić, E., Diosady, L.L., Vujasinović, V., Optimizing the texture attributes of a fat-based spread using instrumental measurements. *Journal of Texture Studies*, 42 (2011) 394-403.
186. Radočaj, O., Dimić, E., Tsao, R., Effects of Hemp (*Cannabis sativa* L.) Seed Oil Press-Cake and Decaffeinated Green Tea Leaves (*Camellia sinensis*) on Functional Characteristics of Gluten-Free Crackers. *Journal of food science*, 79 (2014) C318-C325.
187. Radočaj, O., Dimić, E., Vujasinović, V., Development of a Hull-Less Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) Seed Oil Press-Cake Spread. *Journal of food science*, 77 (2012) C1011-C1017.
188. Ralph, J., Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochemistry Reviews*, 9 (2010) 65-83.
189. Ramachandran S., Singh S. K., Larroche C., Soccol C. R., Pandey A., Oil cakes and their biotechnological applications – A review. *Bioresource Technology*, 98 (2007) 2000–2009.

190. Ramadan, M.F., Asker, M.M.S., Tadros, M., Antiradical and antimicrobial properties of cold-pressed black cumin and cumin oils. *European Food Research and Technology*, 234 (2012) 833-844.
191. Ramadan, M.F., Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (*Nigella sativa* L.): an overview. *International Journal of Food Science and Technology*, 42 (2007) 1208–1218.
192. Ramadan, M.F., Mörsel, J.T., Oxidative stability of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) crude seed oils upon stripping. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106 (2004) 35-43.
193. Ratz-Łyko, A., Arct, J., Pytkowska, K., Majewski, S., In vivo and ex vivo evaluation of cosmetic properties of seedcakes. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, 17 (2015) 109-115.
194. Ratz-Łyko, A., Herman, A., Arct, J., Pytkowska, K., Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of *Oenothera biennis*, *Borago officinalis*, and *Nigella sativa* seedcake extracts. *Food Science and Biotechnology*, 23 (2014) 1029-1036.
195. Razzaghi-Asl, N., Garrido, J., Khazraei, H., Borges, F., Firuzi, O., Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure-activity relationships. *Current medicinal chemistry*, 20 (2013) 4436-4450.
196. Razon, L.F., Alternative crops for biodiesel feedstock. *CAB Reviews: Perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources*, 4 (2009) 1-15.
197. Reichert, R.D., Oilseed medicinals: In natural drugs, dietary supplements and in new functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 13 (2002) 353-360.
198. Rice-Evans C., Miller N. J. Paganga G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20 (1996) 933-956.
199. Rinne, M., Dragomir, C., Kuoppala, K., Smith, J., Yáñez-Ruiz, D., Novel feeds for organic dairy chains. *Organic Agriculture*, 4 (2014) 275-284.
200. Robards, K., Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of chromatography A*, 1000 (2003) 657-691.
201. Robards, K., Prenzler, P., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W., Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66 (1999) 401-436.

202. Robbins R. J., Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2003) 2866-2887.
203. Saad, H., Charrier-El Bouhtoury, F., Pizzi, A., Rode, K., Charrier, B., Ayed, N., Characterization of pomegranate peels tannin extractives. *Industrial crops and products*, 40 (2012) 239-246.
204. Sachan, A., Ghosh, S., Sen, S.K., Mitra, A., Co-production of caffeic acid and p-hydroxybenzoic acid from p-coumaric acid by *Streptomyces caeruleus* MTCC 6638. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71 (2006) 720–727.
205. Salem, M.L., Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International immunopharmacology*, 5 (2005) 1749-1770.
206. Scalbert, A., Johnson, I.T., Saltmarsh, M., Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81 (2005) 215S-217S.
207. Safa Y., Utilization of mustard and linseed oil cakes: novel biosorbents for removal of acid dyes, *Desalination and Water Treatment*, 57 (2016) 5914-5925.
208. Schinas P., Karavalakis G., Davaris C., Anastopoulos G., Karonis D., Zannikos F., Stournas S., Lois E. Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seed oil as an alternative feedstock for the production of biodiesel in Greece. *Biomass and Bioenergy*, 33 (2009) 44–49.
209. Seeff L. B., Are herbals as safe as their advocates believe? *Journal of Hepatology*, 50 (2009) 13–16.
210. Sehwal S., Das M., Antioxidant Activity: An Overview Research & Reviews: *Journal of Food Science & Technology*, 2 (2013) 1-11.
211. Shaban, N.Z., El-Kersh, M.A., El-Rashidy, F.H., Habashy, N.H., Protective role of *Punica granatum* (pomegranate) peel and seed oil extracts on diethylnitrosamine and phenobarbital-induced hepatic injury in male rats. *Food chemistry*, 141 (2013) 1587-1596.
212. Shah, M.A., Bosco, S.J.D., Mir, S.A., Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat science*, 98 (2014) 21-33.
213. Shahidi, F., Liyana-Pathirana, C.M., Wall, D.S., Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fractions. *Food Chemistry*, 99 (2006), 478-483.
214. Sharma, S., Verma, M., Sharma, A., Utilization of non edible oil seed cakes as substrate for growth of *Paecilomyces lilacinus* and as biopesticide against termites. *Waste and Biomass Valorization*, 4 (2013) 325-330.

215. Siger, A., Nogala-Kalucka, M., Lampart-Szczapa, E., The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *Journal of Food Lipids*, 15 (2008) 137-149.
216. Soetan K.O., Olaiya C. O., Oyewole O. E., The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review. *African Journal of Food Science*, 4 (2010) 200-222.
217. Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Edible oil cakes. In *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*, Springer Netherlands, (2009) 253-271.
218. Sokoto, M. A., Hassan, L. G., Salleh, M. A., Dangoggo, S. M., Ahmad, H. G., Thermo-Chemical Properties of Lagenaria Vulgaris, Lagenaria Ladle and Cucurbita Pepo de-Oiled Cakes. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, 18 (2013) 12-17.
219. Soong, Y.Y., Barlow, P.J., Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. *Food Chemistry*, 97 (2006) 524–530.
220. Sreekumar, S., Sithul, H., Muraleedharan, P., Azeez, J.M., Sreeharshan, S., Pomegranate fruit as a rich source of biologically active compounds. *BioMed research international*, 2014.
221. Stalikas C. D., Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30 (2007) 3268-3295.
222. Steinmann D., Ganzera M., Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55 (2011) 744–757.
223. Strack D., Phenolic metabolism. *Plant Biochemistry*, Academic Press, New York, (1997) 387-437.
224. Strobl M. Δ^7 -Sterole und Δ^7 -Sterolglykoside aus Samen von *Cucurbita pepo* L.: Isolierung und Strukturaufklärung. Doctoral Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München (2004).
225. Struijs, K., Vincken, J.-P., Verhoef, R., Voragen, A.G.J., Gruppen, H., Hydroxycinnamic acids are ester-linked directly to glucosyl moieties within the lignan macromolecule from flaxseed hulls. *Phytochemistry*, 69 (2008) 1250–1260.

226. Sulieman, A.M.E., Babiker, W.A., Elhardallou, S.B., Elkhalifa, E.A., Veettil, V.N., Influence of Enrichment of Wheat Bread with Pomegranate (*Punica granatum* L) Peels by-Products. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, 6 (2016) 9-13.
227. Sultan, M.T., Butt, M.S., Anjum, F.M., Jamil, A., Akhtar, S. and Nasir, M., Nutritional profile of indigenous cultivar of black cumin seeds and antioxidant potential of its fixed and essential oil. *Pakistan Journal of Botany*, 41 (2009) 1321-1330.
228. Sun-Waterhouse D., Thakorlal J., Zhou J., Effects of added phenolics on the storage stability of avocado and coconut oils. *International Journal of Food Science and Technology*, 46 (2011) 1575–1585.
229. Sytar O., Brestic M., Rai M., Shao H. B., Plant phenolic compounds for food, pharmaceutical and cosmetics production. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6 (2012) 2526-2539.
230. Szydłowska-Czerniak A., Amarowicz R., Szlyk E., Antioxidant capacity of rapeseed meal and rapeseed oils enriched with meal extract, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 12 (2010) 750–760.
231. Taghvaei, M., Jafari, S.M., Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. *Journal of food science and technology*, 52 (2015) 1272-1282.
232. Taïeb, A., Hypothesis: from epidermal barrier dysfunction to atopic disorders. *Contact Dermatitis*, 41 (1999) 177-180.
233. Tangahu, B.V., Sheikh Abdullah, S.R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N. and Mukhlisin, M., A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering*, (2011) 1-31.
234. Tarek-Tilistyáka J., Agócsb J., Lukács M., Dobró-Tótha M., Juhász-Románd M., Dinyaa Z., Jekóa J., Máthéa E., NOVEL BREADS FORTIFIED THROUGH OILSEED AND NUT CAKES. *Acta Alimentaria*, 43 (2014) 444–451.
235. Terpinc, P., Čeh, B., Ulrih, N.P., Abramovič, H., Studies of the correlation between antioxidant properties and the total phenolic content of different oil cake extracts. *Industrial Crops and Products*, 39 (2012) 210-217.

236. Tehranifar, A., Selahvarzi, Y., Kharrazi, M. and Bakhsh, V.J., High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (*Punica granatum* L.) as the powerful antifungal and antioxidant substances. *Industrial Crops and Products*, 34 (2011), 1523-1527.
237. Teixeira, J., Silva, T., Benfeito, S., Gaspar, A., Garrido, E.M., Garrido, J., Borges, F., Exploring nature profits: Development of novel and potent lipophilic antioxidants based on galloyl–cinnamic hybrids. *European journal of medicinal chemistry*, 62 (2013) 289-296.
238. Thiyam, U., Kuhlmann, A., Stöckmann, H., Schwarz, K., Prospects of rapeseed oil by-products with respect to antioxidative potential. *Comptes Rendus Chimie*, 7 (2004) 611-616.
239. Tolkachev, O.N. , Zhuchenko, A.A. Jr., Biologically active substances of flax: medicinal and nutritional properties (a review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 34 (2000) 360–367.
240. Toma, C.C., Olah, N.K., Vlase, L., Mogoșan, C., Mocan, A., Comparative studies on polyphenolic composition, antioxidant and diuretic effects of *Nigella sativa* L.(black cumin) and *Nigella damascena* L. (lady-in-a-mist) seeds. *Molecules*, 20 (2015) 9560-9574.
241. Tsao R., Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2 (2010) 1231-1246.
242. Tuberoso, C. I. G., Kowalczyk, A., Sarritzu, E., Cabras, P., Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use, *Food Chemistry*, 103 (2007) 1494-1501.
243. Üstun, G., Kent, L., Cekin, N. and Civelekoglu, H., Investigation of the technological properties of *Nigella sativa* (black cumin) seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67 (1990) 958-960.
244. Van Hoed, V., Phenolic compounds in seed oils. *Lipid Technology*, 22 (2010) 247-249.
245. Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S., Peričin-Starčević, I., Krimer-Malešević, V., In vitro study on digestion of pumpkin oil cake protein hydrolysate: Evaluation of impact on bioactive properties. *International journal of food sciences and nutrition*, 64 (2013) 452-460.
246. Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S., Krimer, V., Peričin, D., Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. *Food Chemistry*, 124 (2011) 1316-1321.

247. Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S., Krimer, V., Peričin, D., Hydrolysis of pumpkin oil cake protein isolate and free radical scavenging activity of hydrolysates: Influence of temperature, enzyme/substrate ratio and time. *Food and Bioproducts Processing*, 88 (2010) 277-282.
248. Viuda-Martos M., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J.A. Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9 (2010) 635–654.
249. Vujasinović V., Uticaj termičke obrade na nutritivnu vrednost i oksidativnu stabilnost ulja semena uljane tikve golice *Cucurbita pepo* L. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu (2011).
250. Vujasinovic, V., Djilas, S., Dimic, E., Romanic, R., Takaci, A., Shelf life of cold-pressed pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seed oil obtained with a screw press. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87 (2010) 1497-1505.
251. Vukša, V., Dimić, E. and Dimić, V., Characteristics of cold pressed pumpkin seed oil. In *9th Symposium: Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier, Proceedings* (2003) 493-496.
252. Wallace, G., Fry, S.C., Phenolic components of the plant cell wall. *International review of cytology*, 151 (1994) 2007.
253. Watson, D.H., *Food Chemical Safety, Vol. 2 : Additives*, Cambridge England, (2002) 283-299.
254. Wollenweber E. Flavones and flavonols. *The Flavonoids: Advances in research since 1986*, Chapman & Hall, Cambridge, UK, (1994) 259–336.
255. World Health Organization (WHO). *Trace Elements in Human Nutrition and Health*. Geneva, Switzerland (1996).
256. Yahya, M.A., Al-Qodah, Z., Ngah, C.Z., Agricultural bio-waste materials as potential sustainable precursors used for activated carbon production: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 46 (2015) 218-235.
257. Yang, Y., Li, H., Peng, L., Chen, Z., Zeng, Q., Assessment of Pb and Cd in seed oils and meals and methodology of their extraction. *Food chemistry*, 197 (2016) 482-488.

258. Yang, H., Mao, Z., Tan, H., Determination and removal methods for cyanogenic glucoside in flaxseed. *ASAE Annual Meeting*. American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2004.
259. Yanishlieva, N.,V., Marinova, E.M., Stabilization of edible oils with natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103 (2001) 752–767.
260. Younis, Y.M.H., Ghirmay, S., Al-Shihry, S.S., African Cucurbita pepo L.: properties of seed and variability in fatty acid composition of seed oil. *Phytochemistry*, 54 (2000) 71-75.
261. Zago, E., Lecomte, J., Barouh, N., Aouf, C., Carré, P., Fine, F., Villeneuve, P., Influence of rapeseed meal treatments on its total phenolic content and composition in sinapine, sinapic acid and canolol. *Industrial Crops and Products*, 76 (2015) 1061-1070.
262. Zhou, Z., Robards, K., Helliwell, S., & Blanchard, C. The distribution of phenolic acids in rice. *Food Chemistry*, 87 (2004) 401–406.
263. <http://www.amigo-konie.pl/en/pro-linen-black-cumin-oil-cake-2kg.html>
264. <http://apotekaonline.rs/vidapharm>
265. <http://bif.rs/2013/02/pan-union-oil-inovativno-brasno-sit-po-ceni-jedne-kifle/>
266. <http://www.europages.co.uk/>
267. <http://www.greenwellness.my/grace-ginseng-energy-essence-toner-mist/product-823445.html>
268. <http://www.intelligentnutrients.com/catalogsearch/result/?q=ferulic+acid>
269. <https://www.linkedin.com/company/parodi-nutra>
270. <http://www.mnextract.it/products/polyphenol-extracts.html>
271. <http://www.osel.co.nz/products/functional-food-ingredients>
272. Dokumentovana metoda ispitivanja DM01-29: Određivanje sadržaja ukupnog pepela. Zavod za javno zdravlje Subotica.
273. Dokumentovana metoda ispitivanja DM01-75: Određivanje sadržaja ukupnih proteina. Zavod za javno zdravlje Subotica.
274. Dokumentovana metoda ispitivanja broj DM08: Određivanje ostataka metala i metaloida u namirnicama. Zavod za javno zdravlje Subotica.
275. Dokumentovana metoda ispitivanja DM54: Određivanje sadržaja sirove celuloze. Zavod za javno zdravlje Subotica.

276. Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja. *Službeni glasnik RS*, br. 29/2014, 37/2014 - *ispravka* 39/2014.
277. Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za jestiva biljna ulja i masti, margarin i druge masne namaze, majonez i srodne proizvode *Službeni list SCG*, br. 23/2006 i br. 43/2013.
278. Srpski standard SRPS EN ISO 659:2007– Seme uljarica – Određivanje sadržaja ulja. Institut za standardizaciju Srbije, Beograd.
279. Srpski standard SRPS EN ISO 665:2008 – Seme uljarica – Određivanje sadržaja vlage i isparljivih materija. Institut za standardizaciju Srbije, Beograd.
280. Srpski standard SRPS EN ISO 3657:2008 – Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla - Određivanje saponifikacionog broja. Institut za standardizaciju Srbije, Beograd.
281. Srpski standard SRPS EN ISO 3960:2011 – Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla - Određivanje perksidnog broja. Jodometrijsko (vizuelno) određivanje završne tačke. Institut za standardizaciju Srbije, Beograd.
282. Srpski standard SRPS EN ISO 3961:2008 – Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla - Određivanje jodnog broja. Institut za standardizaciju Srbije, Beograd.
283. Srpski standard SRPS EN ISO 6320:2012 – Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla - Određivanje indeksa refrakcije. Institut za standardizaciju Srbije, Beograd.
284. Srpski standard SRPS EN ISO 660:2011 – Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla - Određivanje kiselinskog broja i kiselosti. Institut za standardizaciju Srbije, Beograd.
285. Srpski standard SRPS EN ISO 662:2009 – Ulja i masti biljnog i životinjskog porekla - Određivanje sadržaja vlage i isparljivih materija. Institut za standardizaciju Srbije, Beograd.