

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Neda O. Đorđević

**HEMIJSKI PROFIL I ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST
CRVENIH VINA KLONOVA
AUTOHTONE I INTERNACIONALNIH
SORTI VINOVE LOZE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Neda O. Đorđević

**CHEMICAL PROFILE AND ANTIOXIDATIVE ACTIVITY
OF RED WINES OBTAINED FROM
AUTOCHTHONOUS AND INTERNATIONAL
GRAPE CLONE VARIETIES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

Mentori:

prof. dr Vele Tešević
Redovni profesor
Univerzitet u Beogradu
Hemijski fakultet

dr Boris Pejin
Naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu
Institut za multidisciplinarna istraživanja

Članovi komisije:

prof. dr Vele Tešević
Redovni profesor
Univerzitet u Beogradu
Hemijski fakultet

dr Boris Pejin
Naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu
Institut za multidisciplinarna istraživanja

prof. dr Snežana Pajović
Naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu
Institut za nuklearne nauke "Vinča"
Redovni profesor
Univerzitet u Nišu
Medicinski fakultet

prof. dr Vesna Maraš
Redovni profesor, dekan
Univerzitet Donja Gorica, Podgorica
Fakultet za prehrambenu tehnologiju,
bezbjednost hrane i ekologiju

dr Ljubodrag Vujisić
Docent
Univerzitet u Beogradu
Hemijski fakultet

dr Miroslav Novaković
Naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju

Datum odbrane doktorske disertacije: _____

Ova doktorska disertacija urađena je u laboratorijama Odeljenja za instrumentalnu analizu Hemijskog fakulteta i Centra za hemiju IHTM Univerziteta u Beogradu, kao i u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju (lab 090) Instituta za nuklearne nauke „Vinča”.

Želela bih da izrazim veliku zahvalnost svom mentoru, prof. dr Veletu Teševiću, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu na odabiru aktuelne teme, neprocenjivim savetima i pomoći prilikom izrade i pisanja teze. Mom drugom mentoru, dr Borisu Pejinu, naučnom savetniku Instituta za multidisciplinarna istraživanja, Univerziteta u Beogradu takođe se zahvaljujem na podršci i pomoći prilikom izrade naučnih radova i pisanja same teze. Prof. dr Snežani Pajović se zahvaljujem na ukazanom poverenju, dragocenim savetima, pomoći i podršci prilikom izrade teze. Dr Miroslavu Novakoviću i dr Ljubodragu Vujisiću se takođe zahvaljujem na korisnim sugestijama prilikom eksperimentalnog rada i pisanja. Zahvalnost dugujem i dr Ivanu Vučkoviću i dr Dejanu Gođevcu na korisnim savetima pri interpretaciji dobijenih spektara. Takođe se zahvaljujem svim kolegama Centra za hemiju IHTM na kolegijalnoj saradnji.

Ovom prilikom takođe se zahvaljujem prof. dr Vesni Maraš na obezbeđenim uzorcima kao i na stručnom mišljenju prilikom pisanja doktorske teze. Takođe bih želela da se zahvalim prof. dr Jeleni Mutić, dr Leli Korićanac, dr Ireni Novaković, dr Stanislavi Gorjanović, dr Daliboru Stankoviću i dr Aleksandru Saviću na saradnji i korisnim savetima pri izradi ove doktorske disertacije. Zahvalnost dugujem i dr Latu Pezo na pomoći u statističkoj analizi rezultata i korisnim savetima. Koleginicama i kolegama dr Marijani Živković, dr Jeleni Radivojević, dr Branislavu Nastasijeviću, dr Goranu Vukotiću i dr Nemanji Stanisavljeviću se zahvaljujem na tehničkoj podršci, korisnim savetima, idejama i pozitivnoj energiji.

Veliko hvala svim saradnicima iz laboratorije 090 Instituta „Vinča” koji su na bilo koji način pomogli izradu ove teze. Posebno se zahvaljujem svojoj najbližoj saradnici, koleginici i prijatelju dr Neveni Todorović na neizmernoj ljudskoj i profesionalnoj pomoći i podršci.

Na kraju neizmerno zahvalnost dugujem svojoj porodici, suprugu Perici, sinu Ognjenu i ćerci Maji, na podršci, razumevanju i ljubavi.

Neda Đorđević

Hemijski profil i antioksidativna aktivnost crvenih vina klonova autohtone i internacionalnih sorti vinove loze

SAŽETAK

Ova doktorska disertacija fokusirana je na hemijsku i biološku karakterizaciju odabranih uzoraka crvenih vina. Akcenat je stavljen na hemijsku karakterizaciju klonskih sorti vina vranac i merlo, kao i na procenu antioksidativne aktivnosti vina sorte merlo u ćelijama kvasca. Pored uobičajenih spektrofotometrijskih metoda, primenjene su elektrohemijske metode (ciklična voltometrija i klasična polarografija), kao i EPR spektroskopija. Tečnom hromatografijom sa ultraljubičastim detektorom sa nizom dioda (PDA) i masenim detektorom sa tri analizatora – trostruki kvadrupol (QQQ) određen je fenolni profil analiziranih uzoraka vina. Njihov elementalni profil je okarakterisan pomoću induktivno spregnute plazme kuplovane sa optičkom emisionom spektroskopijom (ICP-OES) ili masenom spektrometrijom (ICP-MS). Antiradikalske aktivnosti ispitane su i na fiziološki relevantnim slobodnim radikalima (hidroksil i superoksid anjon). Osim toga, utvrđena je i ukupna antioksidativnost, kao i druge biološke aktivnosti (citotoksična i antibakterijska aktivnost) odgovarajućih uzoraka vina. Eksperiment na bazi vinskog kvasca je obuhvatio određivanje koncentracije proteina, ukupnih grupa –SH, kao i enzimskih aktivnosti (glutation peroksidaza, glutacion reduktaza i katalaza). Eksperimentalno dobijeni podaci za klonska sortna vina merlo ukazuju na poseban doprinos glutacion peroksidaze preživljavanju ćelija kvasca u uslovima oksidativnog stresa. Konačno, primenom veštačke neuronske mreže (ANN) razvijena je brza i precizna metoda za predviđanje uticaja malih promena u vinskom fenolnom profilu na aktivnosti istaknutih enzima antioksidativne zaštite. Svi protokoli u okviru ove disertacije mogu se primeniti kako na crvena, tako i na bela i roze vina.

Ključne reči: crvena vina, sorte vranac i merlo, klonska selekcija grožđa, hemijska karakterizacija crvenih vina, biološka aktivnost crvenih vina, savremena statistika

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Hemija prirodnih proizvoda, Biohemija hrane

Chemical profile and antioxidative activity of red wines obtained from autochthonous and international grape clone varieties

ABSTRACT

This doctoral dissertation focuses on the chemical and biological characterisation of selected red wine samples. Emphasis is placed on the chemical characterisation of clonal wines of Vranac and Merlot varieties, as well as on the evaluation of the antioxidant activity of Merlot wines in yeast cells. In addition to the usual spectrophotometric methods, electrochemical methods (cyclic voltammetry and classical polarography) as well as EPR spectroscopy were also applied. Phenolic profile of the analysed wine samples was determined using liquid chromatography with a multi-diode (PDA) ultraviolet detector and a triple quadrupole (QQQ) mass detector. The elemental profile is characterised by inductively coupled plasma coupled with optical emission spectroscopy (ICP-OES) or mass spectrometry (ICP-MS). Antiradical activities were also screened for physiologically relevant free radicals (hydroxyl and superoxide anion). In addition, total antioxidant activity as well as other biological activities (cytotoxic and antibacterial activity) of the respective wine samples were determined. The wine yeast experiment involved determining the concentration of proteins, total groups –SH, as well as enzymatic activities (glutathione peroxidase, glutathione reductase and catalase). The experimentally obtained data for clonal Merlot wine varieties indicate a particular contribution of glutathione peroxidase to the survival of yeast cells under oxidative stress conditions. Finally, using an artificial neural network (ANN), a rapid and accurate method was developed to predict the effect of small changes in the wine phenolic profile on the activities of prominent antioxidant enzymes. All protocols within this dissertation can be applied on white and rose wines as well.

Key words: red wines, Vranac and Merlot varieties, clonal grape selection, chemical characterisation of red wines, biological activity of red wines, modern statistics

Scientific Field: Chemistry

Scientific Subfield: Natural products chemistry, Food biochemistry

Spisak skraćenica

ABTS	(engl. <i>2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)</i>) 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
ANN	(engl. <i>Artificial Neural Network</i>)
A375	ćelijska linija melanoma
ANOVA	(engl. <i>Analysis of variance</i>) analiza varijanse
ACI	antioksidativni kompozitni indeks
BCA	(engl. <i>Bicinchoninic acid</i>) bicinhoninična kiselina
BDML ₀₁	(engl. <i>Benchmark Dose Lower confidence limit</i>) donja granična benchmark referentna doza
CA	(engl. <i>caffeic acid</i>) kafena kiselina
C	(engl. <i>catechin</i>) katehin
cP	<i>cis</i> -piceid
cR	<i>cis</i> -resveratrol
CS	kaberne sovinjon
CE	(engl. <i>caffeic acid</i>) kafeinska kiselina
Cat	(engl. <i>catalase</i>) katalaza
DPPH	(engl. <i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>) 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DTNB	5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeva kiselina)
EA	(engl. <i>ellagic acid</i>) elaginska kiselina
EC	(engl. <i>epicatechin</i>) epikatehin
EPR	(engl. <i>Electron Paramagnetic Resonance</i>) elektronska paramagnetna rezonancija
ESI	(engl. <i>electrospray ionization</i>) elektronsprej jonizacija
EDTA	(engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>) etilen diamin tetra acetat
FC	(engl. <i>Folin-Ciocalteu</i>) Folinov reagens
FRAP	(engl. <i>Ferric Reducing Anti-oxidant Power</i>) Fe ³⁺ redukujuća aktivnost
GPx	(engl. <i>glutathione peroxidase</i>) glutation peroksidaza
GR	glutation reduktaza
GA	(engl. <i>gallic acid</i>) galna kiselina
GSH	redukovani oblik glutationa
GSSG	oksidovani oblik glutationa
GAE	(engl. <i>gallic acid equivalents</i>) ekvivalenti galne kiseline
HBA	(engl. <i>4-hydroxy benzoic acid</i>) 4-hidroksibenzoeva kiselina
HPMC	(engl. <i>HydroxoPeroxoMercury(II) complex</i>) hidroksiperoksoživa (II) kompleks
HeLa	ćelijska linija kancera cerviksa
HCT116	ćelijska linija kancera creva
ICP-OES	(engl. <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>) optički emisioni spektrometar sa indukovano spregnutom plazmom
ICP-MS	(engl. <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>) maseni spektrometar sa indukovano spregnutom plazmom
K	kempferol
TPC	(engl. <i>total phenolic content</i>) sadržaj ukupnih fenola
KŽE	kapljična živina elektroda
LC-MS/MS	(engl. <i>liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>) tečna hromatografija sa tandemnom masenom spektrometrijom
My	(engl. <i>myricetin</i>) miricetin
Me	merlo
MIC	(engl. <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
MRM	(engl. <i>Multiple Reaction Monitoring</i>) mod za praćenje višestruke fragmentacije
MBE	(engl. <i>Mean Bias Error</i>) srednja greška pristrasnosti
MPE	(engl. <i>Mean Percentage Error</i>) prosečna procentualna greška

NF-k β	(engl. <i>nuclear factor kβ</i>) jedarni faktor k β
NADH	redukovani oblik nikotinamid adenin dinukleotida
NBT	(engl. <i>nitroblue tetrazolium</i>)
NADPH	(engl. <i>reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>) redukovani oblik nikotinamid adenin dinukleotid fosfata
OIV	(engl. <i>The International Organisation of Vine and Wine</i>)
PA	(engl. <i>protocatechuic acid</i>) protokatehuinska kiselina
PDA	(engl. <i>photodiode array</i>) fotodiodni
PMS	(engl. <i>phenazine methosulphate</i>) fenazin metosulfat
PANC-1	ćelijska linija kancera pankreasa
PCA	(engl. <i>Principal Component Analysis</i>) analiza glavnih komponenti
pKA	(engl. <i>p-coumaric acid</i>) p-kumarinska kiselina
p53	(engl. <i>cellular tumor antigen</i>) helijski tumorski antigen p53
PTWI	(engl. <i>Provisional Tolerable Weekly intake</i>) privremeni preporučeni nedeljni unos
Qe	(engl. <i>quercetin</i>) kvercetin
ROS	(eng. <i>Reactive Oxygen Species</i>) reaktivne kiseonične vrste
RTE	(engl. <i>rutin equivalent</i>) ekvivalent rutina
RMSE	(engl. <i>Root Mean Square Error</i>) kored srednje greške kvadrata
RSC	(engl. <i>Radical Scavenging Capacity</i>) kapacitet u neutralisanju slobodnih radikala
SA	(engl. <i>syringic acid</i>) siringinska kiselina
Sa	siringaldehid
SOD	superoksid dizmutaza
STAT3	(engl. <i>signal transducer and activator of transcription 3</i>) signalni prenosilac i aktivator transkripcije 3
SDS	(engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>) natrijum dodecil sulfat
SR	(engl. <i>survival rate</i>) stepen preživljavanja
SRB	(engl. <i>sulforhodamine B</i>) sulforodamin B
tR	<i>trans</i> resveratrol
tP	<i>trans</i> piceid
T-SH	(engl. <i>total -SH groups</i>) ukupne -SH grupe
TPTZ	(engl. 2,4,6-tripiryridyl-s-triazine) 2,4,6-tripiridil-s-triazin
TCA	(engl. <i>trichloroacetic acid</i>) trihlorsirćetna kiselina
TDI	(engl. <i>Tolerable Daily Intake</i>) preporučeni dnevni unos
TWI	(engl. <i>Tolerable Weekly Intake</i>) preporučeni nedeljni unos
VA	(engl. <i>vanillic acid</i>) vanilinska kiselina
Va	vanilin
VCR	(ital. <i>Vivai Cooperativi Rauscedo</i>)
Vr	vranac
ZKE	zasićena kalomelova elektroda

SADRŽAJ

I UVOD	1
II OPŠTI DEO	2
2.1. Crveno vino	2
2.2. Sorte vinove loze i klonovi sorti.....	3
2.3. Fenolna jedinjenja u crvenom vinu	6
2.3.1 Flavonoidi	8
2.3.1.1. <i>Flavonoli</i>	9
2.3.1.2. <i>Flavanoli</i>	11
2.3.1.3. <i>Antocijani</i>	13
2.3.2. Neflavonoidna jedinjenja.....	14
2.3.2.1. <i>Fenolne kiseline i njihovi derivati</i>	14
2.3.2.2. <i>Stilbeni</i>	16
2.3.3. Tanini	18
2.4. Mikro– i makroelementi u crvenom vinu.....	18
2.5. Oksidativni stres	20
2.5.1. Sistem antioksidativne odbrane u ćelijama kvasca.....	20
2.6. Druge biološke aktivnosti polifenola	21
2.6.1. Antikancerogena aktivnost	21
2.6.2. Antibakterijska aktivnost	22
III EKSPERIMENTALNI DEO	24
3.1. Ispitivani uzorci vina	24
3.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola	27
3.3. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida.....	27
3.4. Određivanje sadržaja monomernih antocijana	28
3.5. Određivanje sadržaja tanina	29
3.6. Određivanje fenolnog profila	29
3.7. Određivanje elementalnog profila	30
3.8. Određivanje antioksidativne aktivnosti	31
3.8.1. Anti–DPPH radikalska aktivnost.....	32
3.8.1.1. <i>UV–Vis spektrofotometrija</i>	32
3.8.1.2. <i>EPR spektroskopija</i>	33
3.8.2. Anti–ABTS radikalska aktivnost	33
3.8.3. Anti–hidroksil radikalska aktivnost.....	34

3.8.4. Anti–superoksid anjon radikalska aktivnost	35
3.8.5. Metoda FRAP	36
3.8.6. Ciklična voltametrij a	37
3.8.7. Klasična polarografija.....	37
3.8.8. Određivanje antioksidativne aktivnosti u ćelijama kvasca	38
3.8.8.1. Priprema homogenata ćelija kvasca	39
3.8.8.2. Određivanje koncentracije proteina	39
3.8.8.3. Određivanje sadržaja ukupnih –SH grupa.....	40
3.8.8.4. Određivanje aktivnosti glutathion peroksidaze.....	40
3.8.8.5. Određivanje aktivnosti glutathion reduktaze	41
3.8.8.6. Određivanje aktivnosti katalaze.....	41
3.9. Određivanje citotoksične aktivnosti	42
3.9.1. Odnos GSH/GSSG.....	42
3.10. Određivanje antibakterijske aktivnosti	43
3.11. Statistička obrada podataka	44
3.11.1. Analiza glavnih komponenti (PCA)	44
3.11.2. Veštačka neuronska mreža (ANN)	44
3.11.3. Analiza osetljivosti	44
3.11.4. Tačnost modela.....	44
IV REZULTATI I DISKUSIJA	46
4.1. Komercijalno dostupna vina.....	46
4.1.1. Sadržaji odabranih ukupnih jedinjenja i anti–DPPH radikalska aktivnost.....	46
4.1.2. Fenolni profil	51
4.1.3. Elementalni profil	54
4.2. Klonska sortna vina vranac	60
4.2.1. Sadržaj odabranih ukupnih jedinjenja i anti–DPPH radikalska aktivnost	60
4.2.2. Fenolni profil	64
4.2.3. Elementalni profil	72
4.2.4. Ciklična voltametrij a	86
4.2.5. EPR.....	88
4.3. Klonska sortna vina merlo.....	90
4.3.1. Sadržaj odabranih ukupnih jedinjenja i anti–DPPH radikalska aktivnost.....	90
4.3.2. Fenolni profil	94
4.3.3. Antioksidativna aktivnost	96
4.3.3.1. Antiradikalske aktivnosti i metoda FRAP	96

4.3.3.2. Klasična polarografija	96
4.4. Antioksidativna aktivnost odabranih uzoraka vina u ćelijama kvasca.....	98
4.4.1. Analiza PCA fenolnog profila	98
4.4.2. Odabrani parametri antioksidativne aktivnosti	99
4.4.3. Analiza ANN	102
4.4.4. Analiza osetljivosti enzimskih aktivnosti	103
4.5. Citotoksična aktivnost odabranih uzoraka vina.....	105
4.5.1. Odnos GSH/GSSG.....	106
4.6. Antibakterijska aktivnost odabranih uzoraka vina	107
V ZAKLJUČAK.....	109
VI LITERATURA.....	111
VII BIOGRAFIJA.....	124

I UVOD

Ova doktorska disertacija urađena je na Odeljenju za instrumentalnu analizu (CIA) Hemijskog fakulteta i Centra za hemiju Instituta za hemiju, metalurgiju i tehnologiju (IHTM) Univerziteta u Beogradu, Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju (Lab. 090) Instituta za nuklearne nauke "Vinča", Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta, kao i na Odseku za nauku o živim sistema Instituta za multidisciplinarna istraživanja (IMSI) Univerziteta u Beogradu. Predmet njenog istraživanja jeste hemijska i biološka karakterizacija odabranih uzoraka crvenih vina. Pored komercijalno dostupnih (sorte vranac, merlo i kaberne sovinjon), ispitivana su i vina dobijena od specifičnih introdukovanih (merlo) i autohtonih (vranac) klonova vinove loze, selekcionisanih na području Ćemovskog polja (Republika Crna Gora).

U poglavlju **OPŠTI DEO** date su opšte informacije o crvenim vinima, kao i o sortama i klonovima sorti vinove loze, čija su vina bila predmet ove disertacije. Potom su ukratko opisana najzastupljenija flavonoidna i neflavonoidna jedinjenja, kao i makro- i mikroelementi tipični za data vina. Sem toga, uveden je i pojam oksidativnog stresa, kao i sistem antioksidativne odbrane u ćelijama vinskog kvasca. Pri kraju ovog poglavlja sažeto su istaknute i druge biološke aktivnosti (konkretno, citotoksična i antibakterijska) crvenih vina.

U poglavlju **EKSPERIMENTALNI DEO** predstavljene su informacije o korišćenim instrumentima, kao i sami eksperimentalni protokoli.

U poglavlju **REZULTATI I DISKUSIJA** detaljno su prikazani i prodiskutovani eksperimentalno dobijeni podaci, statistički adekvatno obrađeni.

II OPŠTI DEO

2.1. Crveno vino

Crveno vino je alkoholno piće koje se dobija fermentacijom šire (groždanog soka). Od belog vina razlikuje ga sama procedura dobijanja; proces dobijanja crvenog vina uključuje maceraciju, dok kod proizvodnje belog vina toga nema [1]. Vino je prirodni proizvod kompleksnog sastava na koji utiče veliki broj faktora. Pored kvaliteta sorte i stepena zrelosti grožđa, na finalni kvalitet vina u velikoj meri utiču i klimatski i drugi agroekološki uslovi sredine, kao i sam postupak vinifikacije, uslovi skladištenja i zrenja vina [2,3]. Blagotvorno dejstvo vina kao alkoholnog pića sa pozitivnim delovanjem na zdravlje ljudi, pripisuje se njegovim mikronutrijentima. Proteklih decenija uloženi su naponi da se izoluju i identifikuju ta bioaktivna jedinjenja, kao i da se pretpostavi mehanizam njihovog delovanja [4]. Među mikronutrijentima vina, fenolna jedinjenja, mikro- i makroelementi zauzimaju veoma važno mesto.

Vitis vinifera L. je evropska vrsta vinove loze koja raste u umerenoj klimatskoj zoni. Klimatski uslovi u Ćemovskom polju (Crna Gora, odakle su uzorci obrađeni u ovoj tezi), gde preovladava izmenjena mediteranska klima, upravo pogoduju razvoju sorti vinove loze koje pripadaju vrsti *Vitis vinifera* L. Suva i topla klima ove regije pozitivno deluje, između ostalog, i na elementalni sadržaj i koncentraciju fenolnih jedinjenja u grožđu tokom ciklusa njegovog rasta. Crnogorski vinogradarski reon, smešten je na najjužnijem delu Jadranske obale. Samim tim u Ćemovskom polju se oseća izraziti uticaj jadranske klime [5]. Nadmorska visina platoa na kom leži vinograd je između 45 i 70 metara. Plato je oivičen krečnjačkim brdima, tako da čini krašku kotlinu sa izrazito toplim i suvim letom i blagom zimom [5]. Veliki broj sunčanih sati i mala količina padavina čine još jednu pogodnost ovog vinogradskog regiona. Zahvaljujući takvim uslovima mogu se uspešno gajiti sorte vinove loze svih epoha sazrevanja i namene korišćenja. Na Ćemovskom polju nalazi se vinograd na površini od 2310 ha, koji je u vlasništvu kompanije „13. jul Plantaže” a.d. Podgorica (**Slika 1**). U okviru vinograda dominiraju vinske sorte od čijeg grožđa se proizvode bela i crvena vina najboljeg kvaliteta.



Slika 1. Vinogradi kompanije „13. jul Plantaže” a.d. Podgorica

Vranac je najznačajnija sorta vinove loze za proizvodnju crvenog vina u Crnoj Gori. Čak dve trećine vinograda u Ćemovskom polju zauzima upravo ova sorta. Vino sorte vranac postalo je najbolji proizvod kompanije „13. jul Plantaže” a.d. Podgorica, kao i nacionalni brend [6]. Grupa eksperata milanskog dnevnog magazina „Il mondo”, svrstalo je 1991. godine ovo vino među 100 najboljih crvenih vina u Evropi [6].

2.2. Sorte vinove loze i klonovi sorti



Vranac je drevna crnogorska sorta vinove loze [7]. Čokot sorte vranac je bujan, cvet hermafroditan, bobica je srednje velika do velika, duguljasta, pokožica tanka, plave boje sa obilnim pepeljkom. Grozd mu je cilindričan, srednje zbijen, mase 160 do 250 grama (**Slika 2**) [8]. Prinosna je sorta. Berba grožđa ove sorte obično se obavlja u poslednjoj nedelji avgusta ili prvoj nedelji septembra.

Slika 2. Grozd vinove loze
sorte vranac

Vino proizvedeno od grožđa sorte vranac sadrži 11 do 14% alkohola i od 5-6 g/L kiselina [8]. To je vino specifičnog sortnog mirisa i ukusa. Prepoznatljivo je i po intenzivnoj tamnoj boji. Zbog svog kvaliteta idealno je za kupažu sa vinima drugih sorti. Vino sorte vranac (crnogorski vranac) je intenzivno rubin boje, sa nijansama ljubičaste i predstavlja moćno vino juga. Po mirisu i ukusu podseća na zrele višnje, tamno šumsko voće i suve šljive sa slatkim začinskim tonovima.

Pored vranca na Ćemovskom polju uspešno se gaje i postižu odličan kvalitet grožđa i vina i introdukovane sorte kaberne sovinjon i merlo. Ove dve sorte su čuvane i prepoznatljive svuda u svetu i predstavljaju deo svetske vinske baštine [9]. Njihova proizvodnja počinje pre više od hiljadu godina. O popularnosti ovih sorti svedoči i činjenica da u vinogradima Bordo, poznatog vinarijskog grada na jugozapadu Francuske, odakle i potiču, merlo sorta zauzima 62%, a kaberne sovinjon 25% ukupne površine plantaža vinove loze [9]. Grozdovi merlo sorte su rastresiti sa velikim bobicama tamno plave boje. U odnosu na sortu kaberne sovinjon, nešto je svetlije, sa tanjom pokožicom i manjim sadržajem tanina. Grožđe ove sorte sazreva i do dve nedelje ranije od sorte kaberne sovinjon, pa se data sorta može gajiti i u nešto hladnijim predelima. Još jedna razlika u odnosu na sortu kaberne sovinjon je ta što grožđe sorte merlo ima veći sadržaj šećera. Vino dobijeno od merlo sorte je meko, baršunasto, sa aromom šljive. Ono je prirodno slatko, intenzivnije obojeno i brže sazreva u odnosu na sortu kaberne sovinjon. Vino sorte kaberne sovinjon, međutim, snažnijeg je karaktera, sa većom koncentracijom tanina, koji vinu daju opor ukus, pa samim tim ima veći potencijal u starenju.



Vrhunsko suvo vino Crnogorski kaberne dobija se od sorte kaberne sovinjon (**Slika 3**), uz mali procenat vranca kao prateće sorte, poreklom sa Ćemovskog polja. Ovo vino poseduje raskošnu snagu kaberne i autentičnost vranca, kao i samog teroara. Tamno crvene je boje, sa aromama koje podsećaju na ljubičice, kupine i borovnice, sa diskretnim tonovima bibera. Bogatog je i harmoničnog ukusa.

Slika 3. Grozd vinove loze
sorte kaberne sovinjon



Crnogorski merlo je puno vino dobijeno od francuske sorte merlo (**Slika 4**), koja je u podgoričkom vinogorju, na Ćemovskom polju, sačuvala svoje najbolje karakteristike. Ovo vino je rubin crvene boje, sa začinskim i voćnim nota šljive i crne ribizle i sa mirisom ruže u tragovima.

Slika 4. Grozd vinove loze
sorte merlo

Za povećanje proizvodnje grožđa i poboljšanje agrobioloških i privredno-tehnoloških osobina jedne sorte vinove loze, u svetu se koristi metoda individualne selekcije, odnosno klonske selekcije. Danas se savremeni vinogradi podižu sa klonskim materijalom sorte.

Klonska selekcija odnosi se na seriju procedura dizajniranih radi izolacije i dobijanja sorti vinove loze sa željenim osobinama. Svrha klonske selekcije vinove loze ogleda se u dobijanju zdravih klonova vinove loze, sa sortnom autentičnošću i poboljšanim karakteristikama [10]. Selekcionisanje i propagiranje superiornih vrsta vinove loze u širokoj je primeni decenijama širom sveta. Izvođene su različite studije u cilju identifikacije retkih sorti, unutar sortnih genetskih različitosti kao i vinovih loza otpornih na viruse i oboljenja, kao i na niske temperature [11–13]. Poboljšanje je ograničeno na genetske varijacije koje već postoje ili će biti generisane u okviru sorte populacije. Te varijacije primarno se odnose na mutacije koje se akumuliraju i vegetativno umnožavaju. Najočiglednije mutacije su one koje utiču na pigmentisanost grožđa ili morfologiju vinove loze. Ipak, većina mutacija ima suptilnije efekte, npr. na nivou enzima. To može uticati na osobine od aromatičnog karaktera do klimatske osetljivosti vrste [1]. Većina mutacija proizilazi iz slučajnih promena u nukleotidnoj sekvenci gena. Svaki mutirani čokot iste sorte vinove loze može se smatrati različitim klonom te predstavlja čokot sa drugačijim fenotipom.

Klonska selekcija trebalo bi da obezbedi najveći mogući broj klonova sa različitim osobinama, pri čemu je vrlo poželjno da se klonovi međusobno genetski razlikuju u cilju sprečavanja redukovanja prirodne genetske različitosti jedne vrste, kao i u cilju dobijanja dovoljne baze za obrazovanje poliklonskih vinograda [14]. Ova tema još je važnija za autohtone sorte koje se gaje na ograničenim teritorijama obzirom da je teško naći klonove iz drugih regiona. Individualna klonska selekcija veoma je važna metoda koja se koristi u cilju poboljšanja agrobioloških i privredno-tehnoloških osobina jedne sorte vinove loze.

Vranac je autohtona sorta Crne Gore, veoma važna za vinogradarstvo i vinarijsku industriju, kao i za ekonomiju Crne Gore uopšte. To je bio povod da kompanija „13. jul Plantaže” a.d. Podgorica radi istraživanja tj. klonsku selekciju na danas najpoznatijoj i najviše gajenoj sorti vinove loze u Crnoj Gori. Cilj istraživanja bio je da se izdvoje čokoti koji se ističu visokim prinosom, kvalitetom grožđa i vina, dobrim habitusom koji su vizuelno zdravi i nezaraženi virusima.

U toku desetogodišnjeg rada na klonskoj selekciji autohtone sorte vranac (2004 - 2014) odrađena je genetička identifikacija, sanitarna kontrola na prisustvo virusa, umnožavanje čokota koji su prošli sanitarnu kontrolu i njihova sadnja. Odrađen je njihov ampelografski opis i praćena su njihova agrobiološka i privredno-tehnološka svojstva u poredjenju sa populacijom sorte. Na osnovu dobijenih rezultata selekcionisano je, i 2014. godine priznato, 7 klonova sorte vranac (vranac klon

1, vranac klon 2, vranac klon 3, vranac klon 4, vranac klon 5, vranac klon 6 i vranac klon 7). Klonovi vranca su 2017. godine priznati i zaštićeni kao patenti (objavljeno u Crnogorskom glasniku intelektualne svojine broj 24/2017). Dati klonovi su kvalitetom grožđa i vina, uključujući i senzorne i enološke karakteristike, nadmašili kvalitet grožđa i vina populacije sorte vranac [15]. U ovoj studiji ispitivan je kvalitet vina tri selekcionisana klona sorte vranac (vranac klon 1, vranac klon 2 i vranac klon 3).



Klon 1 vranac (CI) (**Slika 5**) odlikuje se većim koeficijentom rodosti okaca, većom prosečnom masom grozda, većim sadržajem šećera, ukupnih polifenola u širi, većim sadržajem ukupnog ekstrakta u vinu i većom organoleptičkom ocenom vina u odnosu na populaciju sorte.

Slika 5. Grozd vinove loze sorte vranac (klon 1)



Klon 2 vranac (CII) (**Slika 6**) se karakteriše značajno većim koeficijentom rodosti okaca, većom masom grozda i većim prinosom po čokotu u odnosu na populaciju sorte vranac. On takođe sadrži i više ukupnih polifenola i ukupnih antocijana u širi i vinu, a poseduje i veću organoleptičku ocenu vina od vina populacije sorte vranac.

Slika 6. Grozd vinove loze sorte vranac (klon 2)



Klon 3 vranac (CIII) (**Slika 7**) ima visok koeficijent rodosti okaca, veću masu grozda i visok prinos. Ovaj klon vranca ima najveći sadržaj vinske kiseline od svih ispitivanih klonova i populacije sorte, veći sadržaj polifenola u širi, veći sadržaj ukupnih kiselina i polifenola u vinu, kao i veću organoleptičku ocenu vina u odnosu na populaciju sorte.

Slika 7. Grozd vinove loze sorte vranac (klon 3)

Klonovi sorte merlo (VCR 1 i VCR 101) selekcionisani su od **Vivai Cooperativi Rauscedo** (VCR) Italija, najvećeg i najcenjenijeg rasadnika vinove loze u Italiji (provincija Udin, region Friuli, severno od Venecije), a introdukovani od strane kompanije „13. jul Plantaže” a.d. Podgorica. Klonska selekcija primarno je urađena na osnovu sanitarnog testa na najopasnije i široko

rasprostranjene virusne organizme koji napadaju vinograde, a takođe i na genetskom nivou, uz identifikaciju biotipova koji zadovoljavaju kvantitativne i kvalitativne potrebe moderne vinogradarske prakse [16]. Nakon introdukcije klonova sorte merlo i sadnje na Čemovskom polju ispitan je kvalitet grožđa i vina koje klonovi sorte merlo (VCR 1 i VCR 101) mogu dati u agroekološkim uslovima Čemovskog polja.



Slika 8. Grozd klona VCR1
vinove loze sorte merlo [17]

Klon VCR1 sorte merlo karakteriše grozd manje veličine od proseka, piramidalnog oblika, polukompaktan, raširen, manje težine od prosečne (**Slika 8**). Bobice su okrugle, tamno plave boje, srednje veličine sa srednje debelom pokožicom i prosečnom čvrstinom. Vino dobijeno od klona VCR1 je intenzivno crvene boje, voćne arome bez travnatog ukusa. Dobre je strukture, sa umerenim prisustvom tanina [17].



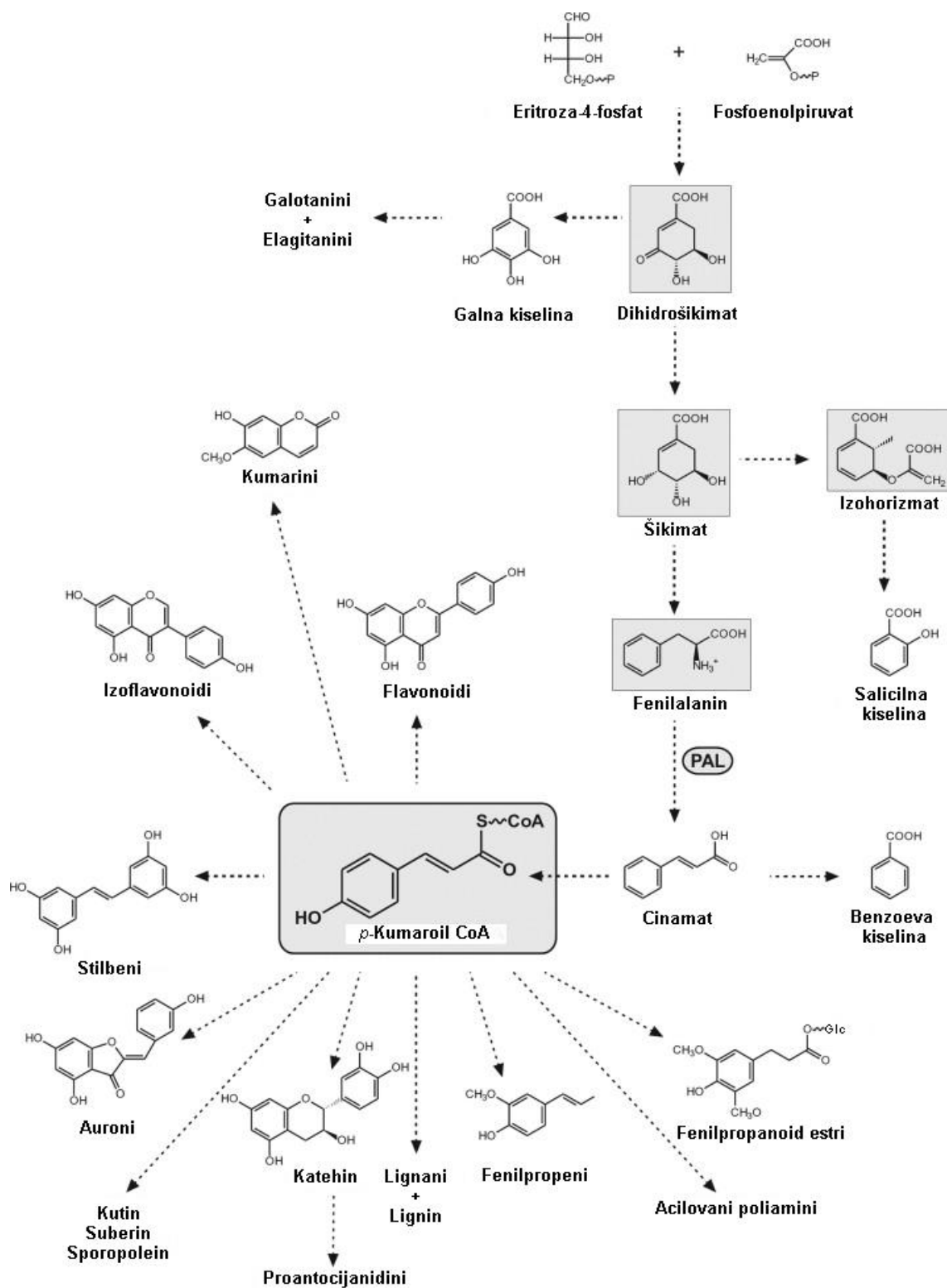
Slika 9. Grozd klona VCR101
vinove loze sorte merlo [17]

Klon VCR101 sorte merlo karakteriše grozd male veličine, otvoren, manje težine od prosečne (**Slika 9**). Bobice su sitnije, okrugle, tamno plave boje sa srednje debelom pokožicom. Vino dobijeno od klona VCR101 sorte merlo duboko je rubin crvene boje, delikatne arome ljubičica, punog voćnog ukusa sa blagom oštrinom. To je intenzivno vino, sa umerenim sadržajem tanina, predviđeno za dugo starenje [17].

Od klonova sorte vinove loze vranac, procesom mikroviniifikacije u kompaniji „13. jul Plantaže” a.d. Podgorica, dobijeni su uzorci crvenih vina od kojih su ispitivana vina tri klona sorte vranac (klon 1 vranac, klon 2 vranac i klon 3 vranac) u trogodišnjem periodu. U ovoj studiji ispitan je i kvalitet vina dobijenih od italijanskih klonova sorte merlo VCR1 i VCR101 vinove loze tokom dvogodišnjeg perioda.

2.3. Fenolna jedinjenja u crvenom vinu

Fenolna jedinjenja čine heterogenu grupu sekundarnih metabolita biljaka i predstavljaju jednu od najvažnijih klasa bioaktivnih jedinjenja uopšte. Ova jedinjenja vode poreklo od jedne od glavnih klasa sekundarnih metabolita u biljkama - amino kiselina, a nastaju u pentozo-fosfatnom i fenilpropanoidnom putu, kao i u ciklusu šikiminske kiseline (**Slika 10**).



Slika 10. Ciklus šikiminske kiseline (biosintetski put felilpropanoida) [18]

Do danas u vinu je identifikovano više od 500 jedinjenja među kojima su najznačajniji voda, alkohol (etanol) i fenolna jedinjenja. Fenolna jedinjenja se stvaraju u semenu i pokožici grožđa, odakle se ekstrahuju tokom procesa fermentacije prelazeći u vino. Približno 50% ukupnih fenolnih jedinjenja u crnom grožđu nalazi se u njegovoj pokožici, a 46-69% u semenu. Konačno, oko 6% fenolnih jedinjenja zastupljeno je u pulpi i soku grožđa [19]. Značajan sadržaj ovih jedinjenja

(fenolnih kiselina, flavonola i flavanola) može se naći u stabljici grožđa. Takođe, u vinu se mogu naći i fenolna jedinjenja koja potiču od kvasca koji se koristi u postupku vinifikacije, kao i fenolna jedinjenja poreklom od hrastovog drveta (usled procesa starenja u hrastovim buradima). Finalni sastav i sadržaj ovih jedinjenja u vinu zavisi od njihovog sadržaja u grožđu, parametara vezanih za način ekstrakcije, način vinifikacije, kao i od samih hemijskih reakcija koje se dešavaju tokom starenja vina.

Hemijsku strukturu fenolnih jedinjenja karakteriše benzenov prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa. Fenolna jedinjenja prisutna u grožđu i vinu mogu se svrstati u dve primarne grupe: flavonoide i neflavonoide, pri čemu je flavonoidna grupacija u crvenom vinu zastupljenija čineći oko 85% ukupnih fenola [19]. Grupa flavonoidnih jedinjenja obuhvata flavonole (kvercetin, miricetin i kempferol), flavan-3-ole (katehin i epikatehin), polimere flavan-3-ola (procijanidine), kao i antocijanine, pigmente odgovorne za boju crvenih vina. Nasuprot tome, grupa neflavonoidnih jedinjenja uključuje derivate hidroksibenzoeve i hidroksicimetne kiseline.

Fenolna jedinjenja se u prirodi mogu naći u slobodnom obliku, kao i u obliku kompleksa sa različitim šećerima, organskim kiselinama, aminima, lipidima, ugljenim hidratima i drugim fenolnim jedinjenjima. Njihova biološka aktivnost pripisuje se aglikonskom delu molekula. Ova jedinjenja imaju veoma značajnu ulogu u enologiji. Pored toga što su primarno odgovorna za razlike između belih i crvenih vina, posebno po boji i ukusu, fenolna jedinjenja u vinu imaju funkciju prirodnih stabilizatora koji potpomažu dugotrajni proces starenja vina. Njihov benefitni efekat na ljudsko zdravlje od davnina je poznat [20]. Među alkoholnim pićima crveno vino pokazuje najjači efekat protiv pojave oboljenja povezanih sa oksidativnim stresom [21]. Za antioksidativnu sposobnost polifenolnih jedinjenja zaslužne su njihove redoks sposobnosti koje im omogućavaju da deluju kao redukcionim agensima, donori vodonika i „hvatači” singletnog kiseonika [22]. Konzumacija crvenog vina, zajedno sa maslinovim uljem, predstavlja ključno objašnjenje „Francuskog paradoksa” – smanjene pojave kardiovaskularnih oboljenja uprkos povećanom unosu hrane bogate zasićenim masnim kiselinama [23]. Ova jedinjenja su veoma važna u oblasti nutrigenomike [24]. Zahvaljujući svojim antioksidativnim, baktericidnim i vitaminskim svojstvima fenolna jedinjenja su, direktno ili indirektno, u vezi sa prevencijom kardiovaskularnih i neurodegenerativnih oboljenja, kao i dijabetesa i kancera [25,26].

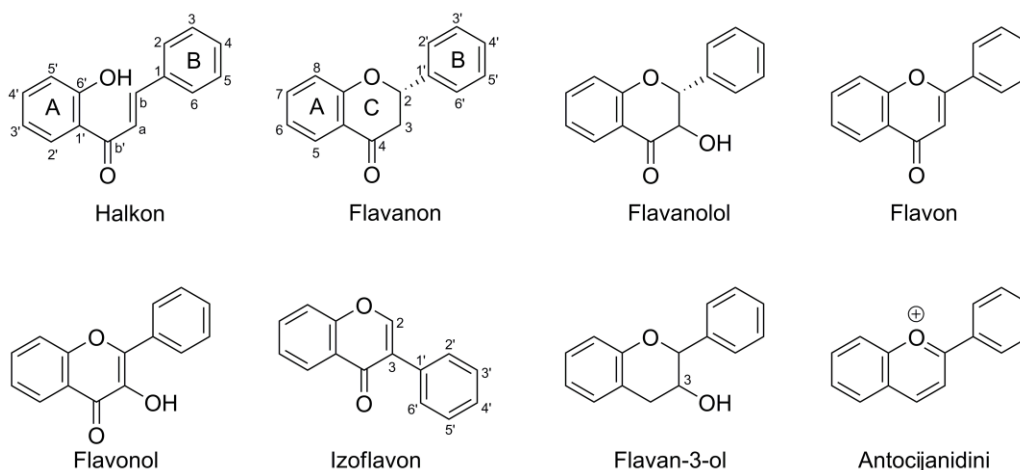
2.3.1 Flavonoidi

Flavonoidi su sekundarni metaboliti biljaka, a kao takvi imaju različite funkcije u biljkama (antioksidativnu, fungicidnu, insekticidnu, UV-protektivnu, signalnu, privlačenje insekata zarad oprašivanja, itd.) [27]. Svi flavonoidi vina su polifenolna jedinjenja koja u svojoj strukturi sadrže više aromatičnih prstenova sa hidroksilnim grupama. Osnovni skelet flavonoida predstavlja difenilpropanski C₆-C₃-C₆. To znači da se u okviru strukture flavonoida zapažaju dva benzenova prstena (prsten A i prsten B) međusobno povezana trougleničnim lancem koji gradi piranov prsten (heterociklični prsten sa kiseonikom) (prsten C) zajedno sa benzenovim, prstenom A (**Slika 11**). U najvećem broju struktura prsten B za prsten C vezan je preko pozicije 2; položaj date veze, međutim, može biti C-3 (izoflavonoidi) ili C-4 (neoflavonoidi). Flavonoidi mogu biti hidroksilovani, alkilovani ili glikozilovani. Ova jedinjenja takođe se mogu naći u slobodnoj formi kao i u okviru konjugata sa drugim flavonoidima, šećerima, neflavonoidima ili, pak, u kombinaciji ovih jedinjenja. Osim toga, mogu se međusobno umrežavati i graditi polimere (tanine). Sve to doprinosi činjenici da se flavonoidi mogu svrstati u jednu od najvećih i najraznovrsnijih grupa prirodnih jedinjenja.

Flavonoidi se mogu klasifikovati na osnovu:

- položaja preko kog se prsten B povezuje sa prstenom C
- stepena nezasićenosti i oksidacije prstena C

Izoflavoni su podgrupa flavonoida u čijoj strukturi je prsten B povezan sa prstenom C preko položaja 3, dok je u podgrupi **neoflavonoida** položaj vezivanja B i C prstena C-4. Članovi klase flavonoida u okviru koje se veza između prstenova B i C gradi preko položaja C-2 međusobno se razlikuju po strukturnim osobinama prstena C. Tako postoje **flavoni**, **flavonoli**, **flavanoni**, **flavanonoli**, **flavanoli** ili **katehini** i **antocijani** (Slika 11). Flavonoidi koji u svojoj strukturi sadrže otvoreni prsten C nazivaju se **halkoni**. Članovi različitih klasa karakterišu se supstitucijom na prstenu B. Česte su supstitucije na pozicijama 3, 4 i/ili 5 hidroksi ili metoksi grupom. Takođe, česta je i konjugacija šećerom.



Slika 11. Klasifikacija flavonoida po hemijskoj strukturi [28]

Glavne klase flavonoida koje se mogu naći u grožđu i vinima su **flavonoli**, **antocijani**, **flavan-3-oli** (**katehini**) i **flavan-3-ol-polimeri** (**proantocijanidini**).

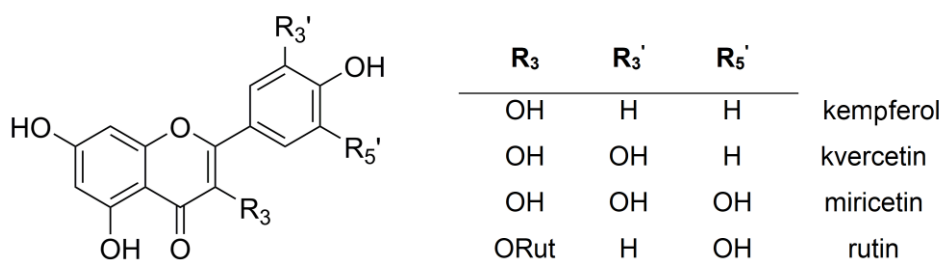
2.3.1.1. Flavonoli

Flavonoli su jedna od najzastupljenijih klasa flavonoida nađenih u pokožici crnog i belog grožđa. To su najčešće žuti pigmenti koji direktno doprinose boji belog vina, dok su u crvenom vinu zamaskirani crvenim pigmentima, antocijanima. Za samo vino flavonoli su veoma značajni zbog toga što učestvuju u procesu kopigmentacije zajedno sa antocijanima, stabilizujući flavilijum formu antocijana i pomažući time njihovu ekstrakciju tokom vinifikacije. Posledica toga je povećanje intenziteta purpurne boje vina. Ova jedinjenja su veoma važna i sa nutritivne tačke gledišta.

U grožđu flavonoli su prisutni u glikozidnom obliku, dok se u crvenom vinu uglavnom nalaze u formi aglikona, budući da se glikozidi hidrolizuju tokom fermentacije grožđa [29]. Dobro je poznato da biosintetski put stvaranja flavonola u biljnim ćelijama u dobroj meri zavisi od izlaganja svetlosti, te da se u biljkama intenzivno izloženim sunčevoj svetlosti sadržaj flavonola višestruko uvećava [30]. U slobodnoj formi, flavonoli su manje stabilni molekuli i lako se mogu razgraditi ako se izlože toploti, enzimima i oksidantima. Samim tim, može se očekivati da razni tretmani grožđa i sam proces proizvodnje vina može uticati na finalni sadržaj flavonola. Faktori koji, takođe, mogu značajno uticati na sadržaj flavonola u crvenim vinima vezani su za proces starenja i čuvanja vina. Čini se da među njima kiseonik ima centralnu ulogu, obzirom da

suplementacija kiseonikom tokom čuvanja vina smanjuje nivo kvercetina više od 50% u šestomesečnom periodu [31]. I temperatura na kojoj se čuva vino važan je faktor u očuvanju flavonola, te je tako pokazano da je nivo kvercetina značajno manji u uzorcima vina čuvanim na 22 °C, nasuprot onim čuvanim na 12 °C. Flavonoli su identifikovani kao fenolna jedinjenja koja spadaju u najjače antioksidante iz vina, posebno belog, dok u crvenom vinu dominiraju flavan-3-oli (katehini) i antocijani [32].

Flavonoli u okviru prstena C svoje flavonoidne strukture sadrže dvostruku vezu između atoma C-2 i C-3, kao i keto (položaj C-4) i hidroksilnu grupu (položaj C-3) [17] (**Slika 11**). Data struktura prstena C je od posebne važnosti za njihov antioksidativni potencijal. Članovi ove klase jedinjenja razlikuju se po dodatnim hidroksilnim ili metil grupama na prstenu B. U odnosu na supstituciju u okviru prstena B strukture flavonola, kao najzastupljeniji u crnom grožđu i crvenom vinu, izdvajaju se kempferol (4'- hidroksi flavonol), kvercetin (3',4'- dihidroksi flavonol) i miricetin (3',4',5'- trihidroksi flavonol) [29] (**Slika 12**). Kvercetin i njegovi konjugovani derivati su najčešći flavonoli i u crnom i u belom grožđu. U crnom grožđu mogu predstavljati i do 87% od ukupnog sadržaja flavonola [33]. Za razliku od kempferola i kvercetina prisutnih i u belim vinima, miricetin je specifičan samo za crvena vina. Glukoza je najčešće zastupljena šećerna komponenta povezana preko položaja C-3 u prstenu C sva tri pomenuta flavonola, premda se i glukuronska kiselina, takođe, može naći u okviru datih struktura. Kvercetin se, takođe, u grožđu može naći u formi 3-ramnozilglukozida, flavonola koji se zove rutin.



Slika 12. Struktura flavonola

Postoje brojni podaci koji ukazuju na različite biološke uloge flavonola [34–36]. Specifičan način inhibicije oksidativnih procesa, međutim, nije sasvim jasan, ali se pretpostavlja da podrazumeva:

- neutralisanje lipidnog, alkoksil i peroksil radikala doniranjem vodonika (1)
- heliranje jona metala
- regeneraciju α -tokoferola kroz reakciju α -tokoferol radikala



Aktivnost flavonola kao antioksidanasa veoma zavisi od njihove strukture. Najznačajniji strukturni elementi odgovorni za ovakvu aktivnost su:

- *orto*-dihidroksi (kateholna) struktura prstena B, koja predstavlja i mesto neutralisanja radikala
- dvostruka veza C-2–C-3 konjugovana sa 4–keto funkcijom (deo odgovoran za delokalizaciju elektrona na prstenu B)
- Prisustvo hidroksilnih grupa u položajima C-3 i C-5 koje obezbeđuje maksimalan potencijal u neutralisanju radikala

O značaju hidroksilne grupe u C-3 položaju svedoče rezultati istraživanja antioksidativnog potencijala aglikona flavonola i njihovih glikozida i metil derivata. Naime, uočeno je da blokiranje

C-3 hidroksilne grupe (glikozilovanjem ili metilovanjem) dovodi do potpunog gubitka antioksidativne aktivnosti [37]. Takođe je utvrđeno da glikozilovanje i metilovanje drugih hidroksilnih grupa u okviru strukture flavonola nema takav efekat. Samim tim zaključeno je da prisustvo hidroksilne grupe u položaju C-3 zajedno sa C-2–C-3 dvostrukom vezom konjugovanom sa 4–keto funkcijom u prstenu C uslovljava maksimalnu efikasnost u neutralisanju slobodnih radikala [38]. Ukoliko u strukturi flavonola postoji kateholna grupa, ali ne i C-2–C-3 dvostruka veza, eliminiše se mogućnost delokalizacije elektrona ariloksil radikala sa prstena B na prsten A što dovodi do smanjenja ukupne antioksidativne aktivnosti flavonola date strukture [38]. Pored toga, za ukupan antioksidativan potencijal flavonola veoma je važno da se hidroksilna grupa u položaju C-3 nalazi do keto krpe u položaju C-4 (Slika 5). Ukoliko u strukturi nedostaje jedna od ove dve grupe, očigledan je gubitak antioksidativnog potencijala datog jedinjenja [38]. Takođe je utvrđeno da je 4–keto grupa funkcionalna u smislu antioksidativnosti samo u prisustvu C-2–C-3 dvostruke veze. Kateholna struktura kvercetina daje mu veći ukupni antioksidativni potencijal u poređenju sa morinom koji ima dve hidroksilne grupe u *meta* položaju u prstenu B. Takođe, kempferol, koji u prstenu B sadrži samo hidroksilnu grupu u položaju 4', pokazuje znatno manji antioksidativni kapacitet, što opet potvrđuje da dvostruka veza između C-2 i C-3 u prstenu C gubi na značaju za ukupni antioksidativni potencijal flavonola bez prisustva *orto*-dihidroksilne strukture u prstenu B [38]. Prethodne studije pokazale su da postojanje i treće hidroksilne grupe u prstenu B (kao kod miricetina) ne povećava antioksidativni potencijal flavonola [39].

U heliranju jona metala, takođe, veoma je značajno prisustvo *orto*-dihidroksilne strukture, kao i 3- ili 5–hidroksilne grupe flavonola. Sposobnost flavonoida da sekvstriraju jone metala, takođe doprinosi njihovoj antioksidativnosti, usled sprečavanja nastanka slobodnih radikala u reakciji Fentonovog tipa, gde dolazi do redukcije vodonik peroksida do hidroksilnog radikala [40]. Flavonoli imaju dva mesta vezivanja jona prelaznih metala: kateholnu strukturu u okviru prstena B i između karbonilnog kiseonika u položaju C-4 i hidroksilne grupe u položajima C-3 ili C-5 prstena C. Escandar i Sala (1991) upravo su potvrdili da se koordinativno vezivanje gvožđa za kvercetin događa kako u okviru kateholne strukture B prstena, tako i između hidroksilne grupe na C-3 i karbonilne grupe na C-4 prstena C [41]. Studija Sestili i saradnika (2002) potvrdila je da je heliranje gvožđa od strane kvercetina ključno za prevenciju oštećenja jedarne DNK [42]. Ferrali i saradnici (1997) takođe su pokazali da kvercetin štiti eritrocite miševa od lipidne peroksidacije aktivirane gvožđem, upravo njegovim heliranjem [43]. Iz svega navedenog može se zaključiti da su kvercetin i miricetin najznačajniji flavonoli vina s obzirom na njihovu antioksidativnu aktivnost.

2.3.1.2. Flavanoli

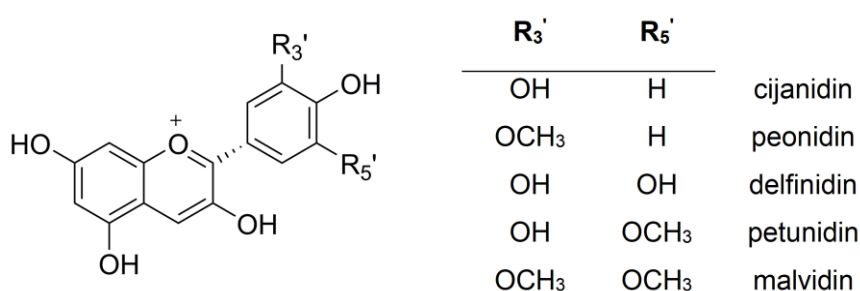
Flavan-3-oli (katehini) se mogu naći u semenu, kožici i stabljici grožđa u monomernoj, oligomernoj ili polimernoj formi. U svojoj hemijskoj strukturi, ova jedinjenja sadrže dva benzenova prstena povezana zasićenim kiseničnim heterociklom (fenil-2-hromansko jezgro) (Slika 13). Takođe se mogu uočiti dva asimetrična ugljenikova atoma (C-2 i C-3), koja su izvorna mesta stvaranja četiri izomera. Najstabilnije forme ovih izomera su (+)-katehin i (-)-epikatehin koji su ujedno i najzastupljeniji katehini u vinu. Oligomerne i polimerne forme, tzv. proantocijanidini (kondenzovani tanini), odgovorne su za jedak (opor) karakter vina usled njihove sposobnosti da grade kompleksa sa proteinima pljuvačke. Za razliku od flavonola i antocijana, molekuli flavanola nemaju glikozilovane forme. Sa druge strane oni mogu biti vezani za polisaharide u grožđu i mogu biti ekstrahovani u obliku kompleksa u toku vinifikacije.

je pokazala i da je ostatak strukture flavonoida od malog značaja za samu aktivnost, osim u slučaju kvercetina u čijoj strukturi kombinacija kateholne grupe sa dvostrukom vezom između C₂ i C₃ i hidroksilnom grupom na C₃ u prstenu C uslovljava izrazitu aktivnost u neutralisanju slobodnih radikala [57]. Samim tim, kvercetin pokazuje duplo veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na katehin upravo usled moguće delokalizacije elektrona između prstenova A i B i stabilizacije ariloksil radikala nakon doniranja vodonika [38]. Takođe pokazano je da kvercetin ima i veći kapacitet u heliranju jona prelaznih metala od katehina [58]. Sa druge strane, katehin i epikatehin pokazuju sličan antioksidativni potencijal u odnosu na slobodne radikale u vodenom rastvoru [38].

2.3.1.3. Antocijani

Antocijani (od grčkih reči *anthos* = cvet i *kianos* = plavo) su glikozilovani, hidrosolubilni pigmenti, koji daju voću i cveću obojenost u opsegu nijansi od crvene do ljubičaste ili plave boje. Njihova hidrosolubilnost potiče od glikozidno vezanog šećernog ostatka, hidroksilnih grupa i katjonskog oblika kiseonika u prstenu C, dok je za njihovu boju zaslužan aglikonski deo (antocijanidin). Trenutno je poznato preko 700 antocijana koji se međusobno razlikuju po stepenu hidroksilacije, metilacije, glikozilacije i acilacije, a samim tim i po svojoj obojenosti. Antocijani su u grožđu locirani uglavnom u kožici i znatno manje u mesu grožđa. Takođe se u većoj meri mogu naći u lišću, uglavnom pri kraju sezone rasta.

Struktura antocijana (flavilijum katjona) obuhvata dva benzenova prstena (A i C) povezana nezasićenim katjonski oksidovanim heterociklom (B), dobijenim od 2-fenil-benzopirilijum jezgra (Slika 11). Zahvaljujući svojoj dugačkoj hromofori, koja nosi pozitivno naelektrisanje, antocijani su intenzivno obojeni u kiseloj sredini [59]. U grožđu i vinu identifikovano je pet molekula antocijana koji se međusobno razlikuju u odnosu na supstituciju bočnog jezgra (B-prstena), u kom mogu sadržati dva ili tri supstituenta (OH i OCH₃) (Slika 14) [20]. Ovi molekuli su znatno stabilniji u formi glikozida (antocijani) u odnosu na aglikonsku formu (antocijanidini), i kao takvi češće se nalaze u prirodi. Glikozilacija povećava stabilnost antocijana usled formiranja intramolekulskih vodoničnih veza. U vrsti *Vitis vinifera* i vinima od nje identifikovani su samo monoglukozidi antocijana, kao i monoglukozidi antocijana acilovani *p*-kumarinskom, kafeinskom i sirćetnom kiselinom.



Slika 14. Struktura antocijana

U okviru pet antocijana prisutnih u grožđu, malvidin je po količini dominantan molekul u svim sortama grožđa i varira u opsegu od 50-90% zastupljenosti. Smatra se da je malvidin monoglukozid (malvin) zaslužan za formiranje bazične boje crvenog grožđa, a samim tim i crvenog vina.

Pri povišenoj temperaturi dolazi do postepene razgradnje antocijana. Ovo treba imati u vidu prilikom starenja vina u buradima, bocama u cilju zaštite njegove boje. Takođe se čini da su kiseonik i svetlost katalizatori razgradnje antocijana u zakiseljenom alkoholnom rastvoru.

Kao i ostale grupe flavonoida i antocijani pokazuju antioksidativna svojstva. Smatra se da redukciona sposobnost *orto*-dihidroksilne strukture prstena B u najvećoj meri doprinosi njihovom antioksidativnom potencijalu. Obzirom na prisustvo konjugovanih dvostrukih veza u strukturi antocijana, pozitivno naelektrisanje flavilijum nukleusa je delokalizovano na ceo prsten i samim tim je stabilizovano rezonancijom. Heinonen i saradnici (1998) su utvrdili da je antioksidativna aktivnost bobičastog voća direktno proporcionalna koncentraciji antocijana u njima [60]. Obzirom da je pH ljudskog tela generalno neutralna, izuzev želuca, posebno je značajna antioksidativna aktivnost koju antocijani ispoljavaju pri neutralnom pH sredine. I antocijani, kao i antocijanidini pokazuju veću antioksidativnu aktivnost od vitamina C i E [61]. Antikancerogeno dejstvo ovih jedinjenja direktno je uslovljeno njihovom sposobnošću da efikasno neutrališu slobodne radikale tako što doniraju vodonikove atome sa fenolnih grupa, čime završavaju lančanu reakciju odgovornu za oksidativna oštećenja [38]. Takođe postoje indikacije o ulozi antocijana u prevenciji i tretmanu dijabetesa, kao i bolesti srca [62,63].

Ukupan antioksidativni potencijal cijanidina je približan antioksidativnom potencijalu kvercetina. Pokazano je da gubitak jedne od hidroksilnih grupa u prstenu B, smanjuje antioksidativni potencijal na nivo kempferola [38]. Metoksi grupa u položaju C-4', kao u peonidinu, doprinosi malo većem antioksidativnom potencijalu u odnosu na postojanje samo jedne OH grupe u prstenu B. Glikozilacija antocijana na položaju C-3 u prstenu C, smanjuje antioksidativni potencijal na nivo rutina. Sa druge strane, trihidroksilacija prstena B (delfinidin) ne utiče na ukupan antioksidativni potencijal.

2.3.2. Neflavonoidna jedinjenja

Među glavnim neflavonoidnim jedinjenjima u vinu nalaze se derivati hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline, stilbeni, kao i tzv. hidrolizabilni tanini. Osim toga što su u grožđu prirodno prisutni, neki od ovih derivata ekstrahuju se u vino iz drveta u toku procesa maturacije ili se dodaju u toku procesa vinifikacije. Iako su bezbojna, neflavonoidna jedinjenja stabilizuju boju crvenih vina kroz intra- i intermolekulske interakcije [64]. Takođe doprinose i ukusu i biološkoj aktivnosti samih vina. Neflavonoidna jedinjenja strukturno su jednostavnija od flavonoida i čuvaju se u vakuolama ćelija grožđa, odakle se lako ekstrahuju mrvljenjem bobica.

2.3.2.1. Fenolne kiseline i njihovi derivati

U grupu fenolnih kiselina spadaju jedinjenja koja sadrže najmanje jednu karboksilnu i jednu fenolnu hidroksilnu grupu. Nastaju u ciklusu šikiminske kiseline (**Slika 10**). Mogu se svrstati u dve podgrupe:

- derivate hidroksibenzojeve kiseline
- derivate cimetne kiseline

Hidroksibenzojeve kiseline karakteriše skelet C₆-C₁ (**Slika 15**). Različitosti u strukturi ovih derivata nastaju hidroksilovanjem ili metilovanjem aromatičnog jezgra. U biljkama su najzastupljenije galna, *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska i protokatehuinska kiselina, dok je u grožđu i vinu identifikovano sedam benzojevih kiselina (galna, gentizinska, *p*-hidroksibenzojeva, protokatehuinska, siringinska, salicilna i vanilinska kiselina), koje se razlikuju u supstituentima na benzenovom prstenu (**Slika 15**) [20]. Elaginska kiselina prirodno nije prisutna u grožđu, ali dospeva u vino iz drvenih buradi ili dodatkom tanina u čiji sastav ulaze i koji se u vino dodaju kao aditivi

[20]. Salicilna i gentizinska kiselina su u grožđu i vinu prisutne u tragovima. U grožđu se uglavnom nalaze u formi glikozida, iz kojih se oslobađaju kiselom hidrolizom, kao i u obliku estara (u taninima) iz kojih se oslobađaju baznom hidrolizom, tako da se u vinu uglavnom nalaze u svojim slobodnim formama [65]. Galna kiselina je jedan od derivata hidroksibenzoeve kiseline sa najvećom koncentracijom u vinu. Ne samo da se nalazi u samom grožđu, već se i stvara hidrolizom hidrolizabilnih i kondenzovanih tanina, npr. estara galne kiseline i flavan-3-ola [64]. Galna i elaginska kiselina ulaze u sastav galotanina i elagitaninina, dok *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska i siringinska kiselina ulaze u sastav lignina. Sadržaj derivata hidroksibenzoeve kiseline u vinima zavisi kako od sorte tako i od uslova u kojima je grožđe raslo.



1) benzoeve kiseline	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	2) cimetne kiseline
4-hidroksibenzoeva	H	H	OH	H	<i>p</i> -kumarinska
protokatehuinska	H	OH	OH	H	kafena
vanilinska	H	OCH ₃	OH	H	ferulinska
galna	H	OH	OH	OH	
siringinska	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	sinapinska
salicilna	OH	H	H	H	
gentizinska	OH	H	H	OH	

Slika 15. Strukture fenolnih kiselina i njihovih derivata

Hidroksicimetne kiseline poseduju C₆-C₃ skelet i formalno spadaju u grupu fenilpropanoida. Nastaju eliminacijom azota iz bočnog lanca amino kiseline L-fenilalanina (**Slika 10**). Različita jedinjenja prisutna u vinu, uglavnom predstavljaju derivate hidroksicimetnih kiselina, kafeinske, *p*-kumarinske, ferulinske i sinapinske kiseline (**Slika 15**) [64]. Kao i u slučaju derivata hidroksibenzoeve kiseline, derivati cimetne kiseline nastaju naknadnim reakcijama hidroksilacije i metilacije na benzenovom prstenu. Ovi derivati se mogu naći u *cis* i *trans* konfiguraciji, pri čemu je *trans* konfiguracija stabilnija pa samim tim i češće prisutna. Hidroksicimetne kiseline u vinu su u manjoj meri zastupljene u slobodnoj formi, dok su uglavnom esterifikovane, posebno tartarnom kiselinom. Takođe mogu biti i u obliku prostih glukozida. Tartarni estri su vrlo oksidizabilna jedinjenja groždanog soka i mogu biti odgovorna za tamnjenje šire. Cimetne kiseline takođe mogu reagovati sa antocijanima gradeći acilovane antocijanine. Kafeinska kiselina, u slobodnom i esterifikovanom obliku, je najzastupljenija fenolna kiselina i čini 75–100% ukupnog sadržaja derivata cimetne kiseline u voću [66].

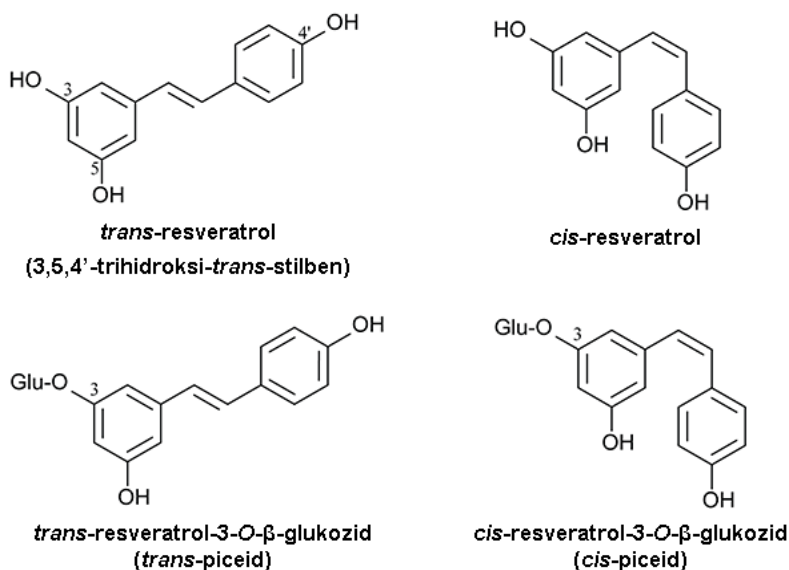
Hidroksicimetne kiseline učestvuju u brojnim reakcijama koje se događaju u toku procesa proizvodnje i starenja vina. Veoma su važna jedinjenja u oksidativnim procesima vina pri kojima nastaju kondenzacioni proizvodi polifenola iz vina, kao što su antocijani i flavan-3-oli [64]. Boja crvenih vina je takođe veoma zavisna od prisustva hidroksicimetnih kiselina, obzirom da one učestvuju u procesu kopigmentacije sa antocijanima pri čemu se purpurna boja vina intenzivira [67].

Iako postoji nekoliko mehanizama antioksidativnog dejstva fenolnih kiselina, smatra se da je glavni način njihovog delovanja neutralisanje slobodnih radikala uz doniranje vodonikovog atoma [68]. Antioksidativni kapacitet fenolnih kiselina i njihovih estara zavisi od broja i položaja hidroksilnih grupa u odnosu na karboksilnu funkcionalnu grupu [38,69]. Monohidroksibenzojeve kiseline sa hidroksilnom grupom u položajima *orto* ili *para* položajima u odnosu na karboksilnu grupu ne pokazuju antioksidativnu aktivnost, dok one sa hidroksilnom grupom u *meta* položaju je pokazuju [38]. Antioksidativna aktivnost raste sa brojem hidroksilnih grupa, tako da je poznato da su polifenoli efikasniji antioksidanti od monofenolnih jedinjenja [69]. Galna kiselina, 3,4,5-trihidroksi benzojeva kiselina, sa tri hidroksilne grupe efikasniji je antioksidant od odgovarajućih difenolnih kiselina (protokatehuinske i gentizinske). Esterifikacija karboksilne grupe galne kiseline smanjuje antioksidativni potencijal ovog jedinjenja. Sa druge strane, smatra se da su derivati hidroksicimetne kiseline bolji antioksidanti od derivata hidroksibenzojeve kiseline zbog prisustva karboksilne funkcije konjugovane dvostrukom vezom kod koje se rezonancijom stabilizuje nastali aroksil radikal [70]. Antioksidativna aktivnost monofenolnih derivata cimetne kiseline raste uvođenjem jedne ili dve metoksi grupe u *orto* položaj u odnosu na hidroksilnu grupu. Tako je poznato da antioksidativni potencijal raste u nizu *p*-kumarinska, ferulinska, sinapinska kiselina [71]. I pored toga, veći značaj za antioksidativni potencijal fenolnih kiselina ima broj hidroksilnih grupa u njihovoj strukturi.

Pored protektivnog, antioksidativnog dejstva, takođe su poznate i druge biološke aktivnosti fenolnih kiselina [68,72,73].

2.3.2.2. Stilbeni

Stilbeni predstavljaju grupu fenolnih jedinjenja, zastupljenu u mnogim familijama biljaka. Grožđe i vino su izvori nekih od njih [74]. Stilbeni u svojoj strukturi sadrže C₆-C₃-C₆ skelet (**Slika 16**), a sintetišu se u vinovoj lozi kao hemijska (fitoaleksinska) odbrana na mikrobne infekcije i UV zračenje, i bivaju prebačeni u toku procesa vinifikacije u širu i vino [64]. S obzirom na njihov antioksidativni, antikancerogeni i antimutageni potencijal, stilbeni se smatraju izrazito važnim polifenolima [75].



Slika 16. Struktura stilbena

Stilbeni nastaju kao derivati cimetne kiseline i tri acetatne jedinice malonil koenzima A (**Slika 10**). Jedan od najbitnijih i najviše proučavanih stilbena je *trans*-resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) (**Slika 16**). Ovo jedinjenje nalazi se u kožici grožđa i u vino dospeva u toku same fermentacije. Za razliku od *trans* izomera, *cis*-resveratrol je u tragovima prisutan u samom grožđu, a smatra se da nastaje iz *trans* oblika u procesu vinifikacije [76]. Resveratrol deluje kao fitoaleksin, a proizvodi se od strane ćelija kožice grožđa kao odgovor na *Botrytis cinerea* i druge gljivične infekcije vinove loze [64]. U prirodi resveratrol, osim u pomenuta dva oblika, postoji i u formi glikozida. Oblici 3-O- β -D-glukozida resveratrola nazivaju se piceidi. Piceid je i najzastupljenija forma resveratrola u prirodi [77]. Stilbeni mogu postojati u oligomernim i polimernim formama, tzv. viniferinima. Oni nastaju oksidativnom polimerizacijom monomera, resveratrola. U vrsti *V. vinifera* identifikovano je više oligomera resveratrola.

Sadržaj stilbena u vinu varira i zavisi od nekoliko faktora, uključujući klimatske uslove, sortu grožđa, postojanje gljivične infekcije, prisustvo UV svetlosti, prisustvo jona metala, a zavisi i od samih enoloških metoda korišćenih u procesu proizvodnje vina [78,79]. Sadržaj stilbena takođe je uslovljen enzimskim aktivnostima u kvascu, posebno aktivnošću izomeraze i glukozidaze [64].

Biološke aktivnosti resveratrola, posebno njegovog *trans*-izomera intenzivno su proučavane. Između ostalih, antioksidativna aktivnost resveratrola od velikog je značaja za održavanje redoks statusa u organizmu, usled potencijala u neutralisanju slobodnih radikala. Pored toga, resveratrol je i dobar promotor aktivnosti različitih antioksidativnih enzima [80]. Zini i saradnici (1999) su predložili tri različita antioksidativna mehanizma resveratrola: 1) kompeticija sa koenzimom Q, 2) neutralisanje superoksidnog radikala stvorenog u mitohondrijama i 3) inhibicija lipidne peroksidacije [81]. Brojne studije govore o sposobnosti resveratrola da neutrališe i superoksidne i hidroksilne radikale. Ovo čini na taj način što donira vodonikov atom sa hidroksilne grupe u položaju C-4', pri čemu nastaje resveratrol fenoksil radikal koji je stabilizovan konjugacijom [82]. Pored toga, studija Gülçin i saradnika (2010) pokazala je da resveratrol ima sposobnost da helira jone gvožđa i bakra [82]. Mesta heliranja jona prelaznih metala u okviru strukture resveratrola su hidroksilne grupe u položajima C-3 i C-5 (**Slika 16**). U studiji Losa (2003) pokazano je da stilbeni održavaju nivo glutaciona u monojedarnim ćelijama periferne krvi, štiteći ih od oksidativnih oštećenja usled dejstva 2-deoksi-D-riboze [83]. Osim toga, ova studija je pokazala da resveratrol smanjuje oksidaciju tiolnih grupa proteina u ćelijama humanih krvnih pločica. Slično tome, resveratrol indukuje povećanje nivoa glutaciona u humanim limfocitima aktiviranim vodonik peroksidom. U sledećoj studiji, pokazano je da resveratrol povećava sintezu nekoliko antioksidativnih enzima, uključujući glutation peroksidazu, glutation-S-transferazu i glutation reduktazu [84]. Istraživanje Su-a i saradnika (2013) pokazalo je da piceid ima snažnije anti-hidroksil radikalske sposobnosti u odnosu na resveratrol *in vitro* [85]. Međutim, *in vivo* studija ukazuje na suprotno. Smatra se da piceid pri istoj koncentraciji pokazuje nižu biološku aktivnost od resveratrola najverovatnije usled esterifikovane hidroksilne grupe u položaju C-3, kao i njegovog težeg usvajanja u ćelijama [80,85].

Dalja istraživanja pokazala su da resveratrol u ćelijama kancera deluje prooksidativno, što se vidi povećanim stvaranjem superoksidnih i hidroksilnih radikala u ćelijama [86]. Bakarni joni iz hromatina mogu biti izdvojeni metal helirajućim agensima tako da dolazi do internukleozomalne DNK fragmentacije, pa samim tim i do apoptoze ćelija. Citotoksični mehanizam resveratrola verovatno obuhvata mobilizaciju endogenih jona bakra vezanih za hromatin. Najpre dolazi do oksidacije resveratrola u prisustvu Cu^{2+} do resveratrol fenoksil radikala koji formira dimer. Bakarni joni se pri tome redukuju do Cu^{1+} ; konačno dolazi do fragmentacije DNK.

2.3.3. Tanini

Tanini su polifenolni makromolekuli koji nastaju polimerizacijom elementarnih fenolnih molekula [20]. To su jedinjenja sposobna da stvaraju stabilne agregate sa proteinima i drugim biljnim polimerima, kao što su polisaharidi, prvenstveno hidrofobnim interakcijama i građenjem vodoničnih veza. Molekulska masa tanina može biti u opsegu od 600 do 3500 Da. Hidrolizabilni tanini obuhvataju galotanine i elagitanine i u svojoj strukturi sadrže galnu ili elaginsku kiselinu koje oslobađaju nakon kisele hidrolize. U okviru svoje strukture ovi tanini sadrže i molekule glukoze. Hidrolizabilni tanini nisu prirodno prisutni u grožđu. Sa druge strane oni su glavni komercijalni tanini koji se dodaju kao aditivi u vino, a u vino mogu dospeti i iz hrastovih buradi korišćenih u procesu starenja vina. Kondenzovani tanini koji se nalaze u grožđu i vinu kompleksni su polimeri flavan-3-ola (katehina). Osnovne strukturne jedinice ovih tanina čine (+)-katehin i (-)-epikatehin [87]. Zagrevanjem ovih polimera u kiseloj sredini, oslobađa se nestabilni karbokatjonski intermedijer koji se prevodi u braon obojeni kondenzacioni proizvod, uglavnom crveni cijanidin [20]. Ovo objašnjava činjenicu zbog koje se ova jedinjenja nazivaju i procijanidini. U prirodi postoje dimerni, trimerni i oligomerni procijanidini. Oligomerni procijanidini su polimeri sastavljeni od 3 do čak 83 jedinica flavanola povezanih preko veza C-4-C-8 ili C-4-C-6 [88]. Kondenzovani tanini prisutni u svim delovima grožđa takođe su rastvorni i prisutni i u vinu. Pored hidrolizabilnih i kondenzovanih tanina, u biljkama se takođe mogu naći i kompleksni ili mešoviti tanini. Ova jedinjenja se sastoje od kovalentnih kompleksa između elagitanina i flavanola. Obzirom da se sastoje od više međusobno povezanih fenolnih kiselina ili katehina, očekivano je da je antioksidativni potencijal ovih jedinjenja veći u odnosu na njihove pojedinačne gradivne elemente.

2.4. Mikro– i makroelementi u crvenom vinu

Mikro– i makroelementi nalaze se među komponentama vina koje doprinose njegovom organoleptičkom kvalitetu i nutritivnoj vrednosti. Njihova koncentracija u vinu može prilično varirati. Poznato je da konzumiranje vina u umerenim količinama (1–2 čaše na dan) snabdeva organizam elementima esencijalnim za njegovo funkcionisanje [89]. Međutim, iznad optimalnog nivoa pojedini elementi mogu biti štetni po zdravlje, a takođe mogu i negativno uticati na organoleptičke osobine vina [90,91]. Internacionalna organizacija koja se bavi vinovom lozom i vinom (engl. *The International Organisation of Vine and Wine* - OIV) propisuje maksimalne dozvoljene vrednosti za sadržaj metala u vinima [92]. Takođe, u većini zemalja postoje regulative na nacionalnom nivou vezane za dozvoljene vrednosti pojedinih elemenata u vinu.

Elementalni sastav vina zavisi od velikog broja faktora među kojima su: sorta grožđa, rastvorljivost neorganskih jedinjenja iz zemljišta, klimatski uslovi, tehnika vinifikacije, transport i skladištenje vina [2]. Naime, korišćenje organskih i mineralnih đubriva, neorganskih pesticida, zagađenost spoljašnje sredine, upotreba aditiva, između ostalog, može značajno uticati na elementalni sadržaj vina [3,93].

Neorganski katjoni imaju veliku ulogu u procesu proizvodnje vina. Praćenje njihove koncentracije u vinu je neophodno usled rizika od stvaranja zamućenja, zbog povećane koncentracije soli (bitartarata sa K, tartarata sa Ca, soli trovalentnog Fe ili jednovalentnog Cu), kao i usled biološkog uticaja na zdravlje konzumenata. K je najzastupljeniji katjon u vinu. U crvenim vinima ovaj katjon je zastupljeniji nego u belim usled sposobnosti fenolnih jedinjenja da inhibiraju taloženje kalijum-bitartarata [94]. K je ključan za funkcionisanje nervnog i kardiovaskularnog sistema. Sam transport K i Na je vrlo važan za provođenje nervnih impulsa, dok je visok koncentracijski odnos K/Na (koji je prisutan u niskim koncentracijama u vinu) vrlo važan u prevenciji srčanih oboljenja snižavajući krvni pritisak [89,95]. K je takođe uključen i u metabolizam ugljenih hidrata i proteina. Joni Ca u vinu mogu graditi više, prilično nerastvornih soli.

Najnerastvornija od njih je Ca-oksalat. U crvenim vinima koncentracija Ca je nešto niža u odnosu na bela vina. Ovaj element je veoma značajan u procesima mineralizacije kostiju i zuba, kao i u signalnoj transdukciji [96]. K i Ca joni imaju i funkciju neutralisanja organskih kiselina u grožđu građenjem soli, čime nastalom vinu daju puferski kapacitet [94]. Mg je još jedan od zastupljenijih katjona u vinu i njegova koncentracija u toku fermentacije i starenja vina ostaje nepromenjena usled toga što su magnezijumove soli rastvorne [94]. Ovaj element je neophodan za funkcionisanje mnogih enzima, a takođe je važan u prevenciji hipertenzije (samim tim i kardiovaskularnih oboljenja) i dijabetesa [97,98].

Proces vinifikacije može značajno uticati na sadržaj pojedinih metala u vinu, posebno na sadržaj Al, Fe, Cd, Co, Cr, Cu, Mn i Pb. Joni teških metala, kao što su Fe, Cu, Cd, Hg, Ni, Pb i As mogu indukovati stvaranje reaktivnih radikala i dovesti do lipidne peroksidacije i oštećenja biomolekula [99]. Mehanizam štetnog dejstva nastalih slobodnih radikala odvija se putem reakcije Haber-Weiss/Fenton tipa (2). Ovim mehanizmom superoksidni joni i vodonik peroksid mogu reagovati sa prelaznim metalima, kao što su Fe i Cu dovodeći do stvaranja hidroksilnih radikala. Pored reakcija Haber-Weiss i Fenton tipa, pojedini metalni joni direktno reaguju sa ćelijskim molekulima pri čemu se stvaraju slobodni radikali, kao što su npr. tiolni radikali, ili indukuju ćelijske signalne puteve. Nastali radikali takođe mogu reagovati sa drugim tiolnim molekulima dovodeći do stvaranja superoksidnih radikala. Ovaj radikal se prevodi do vodonik peroksida, koji izaziva stvaranje dodatnih kiseoničnih radikala. Pojedini metali, kao što je As, indukuju indirektno stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *Reactive Oxygen Species* – ROS) aktiviranjem sistema za stvaranje radikala u ćelijama [100]. Vrste ROS stvorene tokom reakcija katalizovanih prelaznim metalima mogu modifikovati baze koje ulaze u sastav DNK. Kao rezultat oksidativnih oštećenja metalnim jonima, kao što su Fe²⁺, Cu²⁺ i Ni²⁺, mogu se desiti bazne supstitucije, i to: G → C, G → T i C → T. Reid i saradnici (1994) su pokazali da se izmena G → C predominantno dešava u prisustvu Fe²⁺, dok se supstitucija C → T događa u prisustvu Cu²⁺ i Ni²⁺ [101].



Fe i Cu su katjoni, zastupljeni u niskim koncentracijama u vinu, ali su veoma važni usled mogućnosti da izazivaju zamućenost vina [94]. Dobro je poznato da pri niskim koncentracijama, Fe može funkcionisati kao enzimski aktivator, stabilizator i funkcionalna komponenta proteina [102]. Međutim, povećanje koncentracije slobodnog unutarćelijskog Fe povezano je sa oksidativnim stresom. Samim tim, Fe je target mnogih antioksidativnih terapija obzirom da predstavlja primarni uzrok stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta *in vivo* i, doprinoseći stanju oksidativnog stresa, dovodi do oštećenja DNK i do ćelijske smrti [40]. Cu i Zn su esencijalni elementi, sastavni delovi Cu/Zn-zavisnih proteina sa redoks kapacitetom, kao što je enzim Cu/Zn superoksid dismutaza koja je uključena u ključne procese antioksidativne zaštite u ljudskom organizmu. Ova dva elementa su takođe važna za stimulaciju imunog sistema, dok je Zn poznat i kao antimikrobni agens [103]. Za Cu je specifično da može delovati i kao anti-, ali i kao prooksidant. Kao prooksidant, zajedno sa Fe, ulazi u Fentonovu reakciju stvaranja hidroksilnih radikala. Al prisutan u višku dovodi do stvaranja slobodnih radikala odgovornih za neurotoksičnost [104]. Nehru i saradnici (2005) su utvrdili da se Al³⁺ vezuje za transferin čime se smanjuje stepen vezivanja Fe²⁺ jona. Intraćelijsko povećanje koncentracija Fe²⁺ jona dovodi do peroksidacije lipidnih membrane [104].

Niske koncentracije Mn takođe mogu biti prisutne u vinu, i zavise od prisustva Mn u zemljištu vinograda i vinifikacione tehnike. Najviše Mn se nalazi u semenu grožđa, tri puta više nego u kožici grožđa i čak trideset puta više nego u mesu grožđa [94]. Ovaj element je esencijalan i uključen je u sintezu i aktivaciju brojnih enzima, među kojima su i oksidoreduktaze. Mn je neophodna komponenta za funkcionisanje mangan superoksid dizmutaze (MnSOD), enzima glavnog odgovornog za neutralisanje ROS u mitohondrijalnom oksidativnom stresu [105,106]. U

višku, Mn može izazvati neurodegenerativna oboljenja. Pored Mn veoma je važno pratiti i sadržaj elemenata kao što su Cd, Pb i As u vinu, obzirom na njihovu toksičnost. Cd u ćelijama može indukovati i oštećenja i reparativne procese u zavisnosti od ćelijskog redoks statusa. Obzirom da nije redoks aktivan metal, Cd ne može direktno stvarati ROS, ali može indukovati oksidativni stres. Cd ima veliki afinitet prema tiolima pa je glutation primarni target slobodnih Cd jona [107]. Trošenje redukovanog glutationa indukovano kadmijumom dovodi do narušavanja redoks balansa [107]. Pb je takođe potencijalni izazivač oksidativnog stresa i može izazvati oksidativna oštećenja u mozgu, srcu, bubrezima i reproduktivnim organima [108]. Ovaj element povećava lipidnu peroksidaciju [109]. Utvrđeno je značajno smanjenje u aktivnosti enzima tkivne SOD i glutation peroksidaze u mozgu nakon izlaganja Pb [110]. As je takođe vrlo toksičan i kancerogeni element, koji produkuje različite ROS, uključujući superoksidne radikale, singlet kiseonika, peroksil radikale, azotoksidne radikale, vodonik peroksid i dimetilarsenik peroksil radikale [111]. Jedinjenja As(III) mogu inhibirati antioksidativne enzime, posebno GSH-zavisne, kroz vezivanje za njihove sulfhidrilne grupe [112]. Se je jedan od esencijalnih mikronutrijenata koji predstavlja deo selenoproteina sa protektivnim, antioksidativnim, sposobnostima. Pored toga Se je neophodan za normalno funkcionisanje mozga [113], kao i u procesu sinteze i metabolizma tiroidnih hormona [114]. Usled ovih osobina ovaj element ima potencijal u prevenciji neurodegenerativnih oboljenja [113], a takođe je poznat i potencijal Se u tretmanu autoimunog oboljenja [114]. Samim tim, ovo je veoma značajan mikronutrijent crvenih vina.

Svi neorganski katjoni u širi i vinu prirodno su prisutni u netoksičnim koncentracijama [94]. Međutim, određeni metali, kao što su Pb, Zn, Hg i Sn mogu biti zastupljeni u većim koncentracijama usled socijalnog i ekonomskog okruženja i/ili metoda primenjenih u vinogradarstvu. Korišćenje đubriva i pesticida može biti razlog povećanog nivoa katjona (Cu, Zn, Mn, itd.). Kiselost šire i vina pogoduje rastvaranju pojedinih metala (Cu, Ni, Zn i Cr) iz legura od kojih je napravljena oprema za proizvodnju vina (bronzane pumpe, slavine, priključci, creva, itd.) [94]. Sa druge strane pojedine tehnike za stabilizaciju vina i sprečavanje stvaranja zamućenosti mogu dovesti do značajnog smanjenja koncentracije, esencijalnih elemenata, K i Ca u finalnom proizvodu. Sve navedeno ističe značaj konstantnog praćenja elementalnog sadržaja u svim koracima proizvodnje vina.

2.5. Oksidativni stres

U živim organizmima dolazi do stvaranja ROS, uključujući slobodne radikale, singletni kiseonik kao i perokside. Ove vrste su važne za imuni sistem, ćelijsku signalizaciju, preživljavanje i proliferaciju, za sam metabolizam i mnoge druge normalne funkcije organizma [115]. Međutim, ako se ROS proizvode u prekomernim količinama, one mogu dovesti do oštećenja ćelija što, sa druge strane, može dovesti do degenerativnih oboljenja, inflamacije, kardiovaskularnih oboljenja, kancera i starenja [116]. Svi aerobni organizmi su, po prirodi svog funkcionisanja, kontinuirano izloženi reaktivnim oksidujućim vrstama i mogu ući u stanje oksidativnog stresa kada sistem antioksidativne zaštite u ćeliji nema dovoljan kapacitet da ukloni nastale ROS [117]. Kako bi se izborili sa slobodnim radikalima živi organizmi proizvode endogene antioksidante. Međutim, ukoliko je produkcija slobodnih radikala veća od uobičajene, količina endogenih oksidanata može biti nedovoljna za njihovo potpuno neutralisanje. Samim tim, unošenje dodatnih, egzogenih antioksidanata, koji se mogu naći u dijetetskim proizvodima, kao što je crveno vino, može pomoći organizmu u borbi protiv ovih vrsta [118].

2.5.1. Sistem antioksidativne odbrane u ćelijama kvasca

Vrsta *Saccharomyces cerevisiae* je jednoćelijski eukariotski organizam koji pripada kvascima, tj. carstvu gljiva (engl. *Fungi*). Ovo je jedan od najviše proučavanih eukariotskih model

sistema u molekularnoj i ćelijskoj biologiji [119]. Kao model korišćen je za proučavanje procesa starenja, regulacije genske ekspresije, signalne transdukcije, ćelijskog ciklusa, metabolizma, apoptoze, neurodegenerativnih bolesti i mnogih drugih bioloških procesa [120–124]. Naime, poznato je da gotovo 30% gena uključenih u humanim oboljenjima ima svoje ortologe u proteomu kvasaca [125]. Kao i većina životinja i bakterija, gljive, uključujući i kvasac, su hemoorganotrofi, što znači da neophodnu energiju za obavljanje ćelijskih procesa dobijaju degradacijom organskih nutrijenata.

Usled kompleksnosti bioloških sistema, hemijski testovi za određivanje antioksidativne aktivnosti se sve više zamenjuju testovima na živim ćelijama. Njihova prednost je u tome što uzimaju u obzir biodostupnost jedinjenja kao i uticaj metabolizma što može biti značajno za iskorišćavanje polifenolnih jedinjenja i njihovu antioksidativnu sposobnost. Samim tim, eukariotski organizam, *S. cerevisiae*, predstavlja dobar model sistem koji je u prethodnim studijama korišćen za brzo određivanje antioksidativne aktivnosti vina i hrane [126–129].

Ćelije kvasca su, u cilju odbrane od oksidativnog stresa, opremljene enzimima antioksidativne odbrane, između ostalih glutation peroksidazom, glutation reduktazom i katalazom. Glutation (GSH) zavisna odbrana predstavlja prvu liniju odbrane protiv oksidativnog stresa. Pored GSH, koji predstavlja najzastupljeniji tiol u ćeliji, kao i glavnu determinantu intraćelijskog redoks statusa, ovaj sistem obuhvata i enzime GPx i GR [130].

GPx katalizuje redukciju vodonik peroksida kao i brojnih organskih peroksida do vode i odgovarajućeg stabilnog alkohola koristeći GSH kao izvor elektrona (3).



Posledica toga je oksidacija GSH u glutation disulfid (GSSG), koji se redukuje nazad do GSH dejstvom GR. Samim tim, GR je enzim zaslužan za kompenzaciju GSH koji troši GPx, a usled toga i za održavanje visokog GSH/GSSG odnosa unutar ćelije (4) [131].



Cat, kao i GPx, štiti ćelije od toksičnog efekta vodonik peroksida i čest je enzim koji se može naći u gotovo svim živim organizmima izloženim kiseoniku. Uloga ovog enzima je katalizovanje razgradnje vodonik peroksida do molekula H₂O i O₂ (5).



2.6. Druge biološke aktivnosti polifenola

2.6.1. Antikancerogena aktivnost

Dosadašnja istraživanja su pokazala da fenolna jedinjenja biljnog porekla pokazuju izrazite antikancerogene aktivnosti [132]. Antikancerogeni efekti fenolnih jedinjenja prvenstveno se odnose na njihovu sposobnost da:

- Izazivaju zaustavljanje ćelijskog ciklusa
- Inhibiraju onkogene signalne kaskade kontrolišući time proliferaciju ćelija, angiogenezu i apoptozu
- Menjaju nivo ROS u ćeliji
- Promovišu ekspresiju tumor supresornih proteina, kao što je p53
- Povećavaju sposobnost diferencijacije i transformacije u normalne ćelije

Od posebne važnosti jeste zapažanje da brojni polifenoli izazivaju apoptotsku smrt u različitim linijama kancerskih ćelija, ali ne i u normalnim ćelijama [133]. Prethodnih godina došlo se do saznanja da prirodno prisutna fenolna jedinjenja imaju pozitivna dejstva na zaustavljanje migracije ćelija interferencijom pri epitel/mezenhimalnom prelasku, ćelijskoj invaziji i ekstravazaciji [134]. Samim tim fenolna jedinjenja potpomažu lokalizaciju kancerskih ćelija i čine ih osetljivijim na tretman lekovima.

Vrste ROS proizvedene u kancerogenim ćelijama uključene su u aktivaciju nekoliko transkripcionih faktora, kao što su NF- κ B, STAT3, aktivatorni protein-1 itd, koji su esencijalni za kontrolu ćelijske proliferacije, tumorskog preživljavanja, angiogeneze itd. [135]. Iako ćelije kancera imaju veći nivo vrsta ROS u odnosu na normalne ćelije, povećan nivo datih vrsta, tokom dužeg vremenskog perioda, može i u njima izazvati oksidativna oštećenja [136]. Shodno tome, povećana produkcija vrsta ROS u kancerogenim ćelijama, načelno, predstavlja dobru strategiju u inhibiranju rasta tumora.

Sve veći broj podataka ukazuje na to da polifenoli mogu da se ponašaju i kao prooksidanti i tako iniciraju prekidanje ćelijske DNK, usled dejstva reaktivnih kiseoničnih vrsta, a samim tim i ćelijsku smrt [137,138]. Ranijim studijama pokazano je da je takav prooksidativni mehanizam dejstva polifenola rezultat redoks–aktivne mikrookoline u kancerskim ćelijama usled povećanog nivoa bakra [139]. Cu je važan redoks–aktivan metalni jon, prisutan u hromatinu, blisko vezan za nukleinske baze, i može biti mobilisan metal helirajućim agensima. Nekoliko studija ukazalo je na to da je nivo bakra u serumu, tkivima i ćelijama ljudi obolelih od kancera povišen [140,141]. Veruje se da je prooksidativna aktivnost polifenola uslovljena njihovom sposobnošću da vezuju i redukuju Fe³⁺ ili Cu²⁺ jone čineći ih dostupnim za reagovanje sa vodonik peroksidom ili nekim drugim izvorom slobodnih radikala [40]. Pretpostavlja se takođe da povišen nivo bakra u kancerskim ćelijama stimulatивно deluje na ekspresiju angiogenskih stimulatora [142]. Osim promotorske uloge u procesu angiogeneze, Cu ima esencijalnu ulogu i u intraćelijskoj signalizaciji i metastaziranju tumora, utičući na regulaciju epitelijalno–mezenhimalnih prelaza [143]. Samim tim, u kancerskim ćelijama omogućen je povećan prenos elektrona između bakarnih jona i polifenola pri čemu dolazi do redukcije Cu²⁺ do Cu¹⁺ jona i stvaranja vrsta ROS odgovornih za prekidanje DNK lanca i ćelijsku smrt [144]. Obzirom na to da je izmenjeni redoks status vrlo često primećen u mnogim kancerskim ćelijama, postoji hipoteza da polifenoli selektivno deluju na tumorske ćelije upravo usled drugačijeg redoks statusa u njima u odnosu na normalne ćelije [139]. Pored bakar zavisnog stvaranja vrsta ROS, polifenoli uneti hranom svoje značajne antikancerogene osobine ispoljavaju i izazivanjem prevremenog starenja tumorskih ćelija kroz modulaciju epigenetskih izmena, kao što su DNK metilacija, izmena nivoa acetilacije histona i genska ekspresija mikro RNK [145–147].

2.6.2. Antibakterijska aktivnost

Premda na svetskom tržištu ima efikasnih antibiotika, savremena medicina suočava se sa sve učestalijom pojavom bakterijske rezistencije. Pored toga, dodatne probleme stvaraju i mogući sporedni efekti koje tretman antibioticima može izazvati kod ljudi koji su na njih alergični. Samim tim, postoji sve veća tendencija za pronalaženje efikasnijih antimikrobnih prirodnih proizvoda koji bi mogli poboljšati otpornost ljudi prema patogenim bakterijama uz minimalne sporedne efekte. Antimikrobni efekat različitih biljnih ekstrakata u odnosu na patogene mikroorganizme predmet je mnogih naučnih studija [148,149]. Polifenolna jedinjenja se i u slučaju antimikrobnog delovanja izdvajaju kao komponente prirodnih proizvoda od posebne važnosti za njihovu fiziološku funkciju. Naime, prethodne naučne studije pokazale su da specifična polifenolna jedinjenja, kao što su resveratrol, kvercetin i brojne fenolne kiseline inhibiraju rast različitih patogenih mikroorganizama [150,151]. Brojne naučne studije proučavaju kako strukturne specifičnosti fenolnih jedinjenja kao antibakterijskih agenasa, tako i razumevanje mehanizma antibakterijskog delovanja datih jedinjenja. Tako se došlo do zaključka da hidroksilne grupe na posebnim položajima u aromatičnim

prstenovima flavonoida utiču značajno povećavaju njihovu antibakterijsku aktivnost [152]. Takođe je utvrđeno da metilacija aktivnih hidroksilnih grupa generalno smanjuje antibakterijsku aktivnost, kao i da hidrofobni supstituenti, kao što su prenil grupe, alkilamino nastavci, alkilni nastavci i kiseonični ili azotni heterocikli uglavnom povećavaju antibakterijsku aktivnost flavonoida [152]. Što se mehanizma antibakterijskog delovanja tiče, pretpostavlja se da se ono zasniva na: inhibiranju sinteze nukleinskih kiselina, inhibiranju funkcionisanja ćelijske membrane, inhibiranju energetskog metabolizma, inhibiranju samog vezivanja bakterija i stvaranja biofilma, inhibiranju porina na ćelijskoj membrani bakterija, menjanju membranske propustljivosti kao i na samom smanjivanju patogenosti bakterija [152,153]. Mnogo manje radova odnosi se na antimikrobnu aktivnost vina [154–157].

III EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Ispitivani uzorci vina

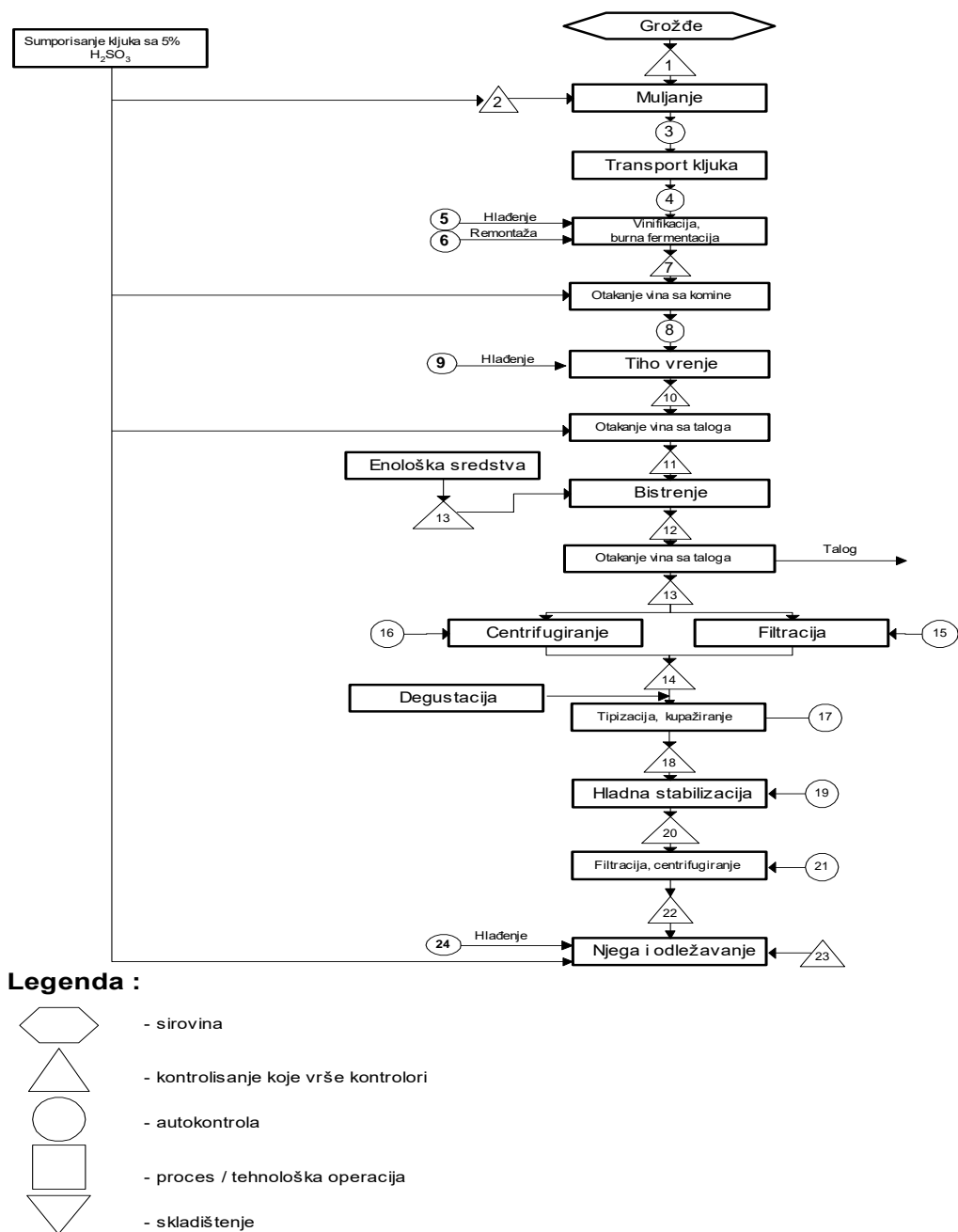
Sva analizirana vina, sorti kaberne sovinjon (engl. *Cabernet Sauvignon* – CS), merlo (Me) i vranac (Vr), dobijena su od vinarije „13. jul Plantaže” a.d., Podgorica, Crna Gora. Vina su proizvedena od grožđa navedenih sorti i njihovih klonova sa područja Ćemovskog polja. Ono se nalazi 30 km od Jadranskog mora, pripada podregiji Podgorice i deo je crnogorskog basena Skadarskog jezera. Geografska lokacija vinogradskog regiona je između 41°50' i 42°45' severne geografske širine i 16° i 17° istočne geografske dužine. Vinogradi Ćemovskog polja podignuti su na plitkim, skeletnim zemljištima, osunčanim preko 2500 h sunca godišnje. Ovi vinogradi daju grožđe vrhunskog kvaliteta sa skladnim odnosom šećera i kiselina. Razmak sadnje u vinogradu je 2,6 × 1 m (3846 čokota po hektaru) i 2,6 × 0,7 (5495 čokota po hektaru). Oblik stabala je dvokraka horizontalna kordunica, visine 70 cm. U vinogradu je primenjena mešovita rezidba.

Ukupno 24 uzorka analiziranih vina proizvedeno je od grožđa dobijenog iz tri berbe (2010, 2011 i 2012. godine). Uzorci analiziranih vina obuhvatali su kako flaširana vina, komercijalno dostupna za širu upotrebu, tako i vina dobijena od klonova sorte merlo i vranac proizvedenih u mikroviniifikaciji (**Tabela 1**). Klonovi sorte merlo introdukovani su iz VCR Reuscedo-Italija, dok su klonovi sorte vranac selekcionisani u kompaniji „13. jul Plantaže” a.d. Podgorica. Proizvodnja komercijalnih vina obavljena je na standardizovan način korišćenjem moderne tehnologije i uz regulisanje temperature prilikom proizvodnje vina. Faze u proizvodnji ispitivanih komercijalnih vina su: berba i transport grožđa, muljanje grožđa, sulfitacija, presovanje odnosno ceđenje, dodavanje kvasaca i upotreba enoloških sredstava, bistrenje šire, alkoholna fermentacija uz kontrolisanje i regulaciju temperature, pretakanje, odležavanje vina, bistrenje i stabilizacija vina, filtriranje i punjenje vina u staklenu ambalažu.

Tabela 1. Spisak analiziranih uzoraka.

Redni br.	Vino	Godište	Tip	Oznaka
1	kaberne sovinjon	2010	komercijalno vino	CS 10
2	kaberne sovinjon	2011	komercijalno vino	CS 11
3	kaberne sovinjon	2012	komercijalno vino	CS 12
4	merlo	2010	komercijalno vino	Me 10
5	merlo	2011	komercijalno vino	Me 11
6	merlo	2012	komercijalno vino	Me 12
7	merlo	2010	klon VCR1	VCR1 10
8	merlo	2010	klon VCR101	VCR101 10
9	merlo	2011	klon VCR1	VCR1 11
10	merlo	2011	klon VCR101	VCR101 11
11	vrnac	2010	komercijalno vino	Vr 10
12	vrnac	2011	komercijalno vino	Vr 11
13	vrnac	2012	komercijalno vino	Vr 12
14	vrnac	2010	klon I	CI 10
15	vrnac	2011	klon I	CI 11
16	vrnac	2012	klon I	CI 12
17	vrnac	2010	klon II	CII 10
18	vrnac	2011	klon II	CII 10
19	vrnac	2012	klon II	CII 10
20	vrnac	2010	klon III	CIII 10
21	vrnac	2011	klon III	CIII 10
22	vrnac	2012	klon III	CIII 10

Primena svih enoloških postupaka i enoloških sredstava, kao i upotreba opreme i sudova u proizvodnji obezbeđuju visok kvalitet vina (**Slika 17**).



Slika 17. Dijagram proizvodnje crvenog vina

Sva vina klonova ispitivanih sorti proizvedena su u mikrovinifikaciji po protokolu za crvena vina. Nakon ručne berbe grožđa vinifikacija je rađena u Ganimed tankovima (vinifikatorima) uz dodatak kalijum meta-bisulfit (Agroterm KFT, Mađarska) 8 g na 100 kg grožđa [158]. Korišćene su standardne enološke tehnike. Svi enzimi, vinski kvasac, mlečno kiseline bakterije, kao i nutrijenti kvasca poručeni su od Lallemend, Australija. Tokom vinifikacije korišćeni su: komercijalni kvasac Enoferm BDX (30 g/100 L), nutrijent za kvasac Go-ferm protect (30 g/hl), enzim za maceraciju Lalvin EX-V (2 g/100 kg), kao i nutrijent kvasca za fermentaciju Fermaid E (25 g/100 L). Komercijalna mlečnokiselinska bakterija Lalvin VP41 korišćena je za inokulaciju u toku malolaktične fermentacije. Nakon završene malolaktične fermentacije, rađena je hladna

stabilizacija na $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3-4 nedelje), pretakanje, odležavanje i flaširanje vina. Po dobijanju od kompanije „13. jul Plantaže” a.d., Podgorica, uzorci vina čuvani su na $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ i analizirani odmah nakon otvaranja.

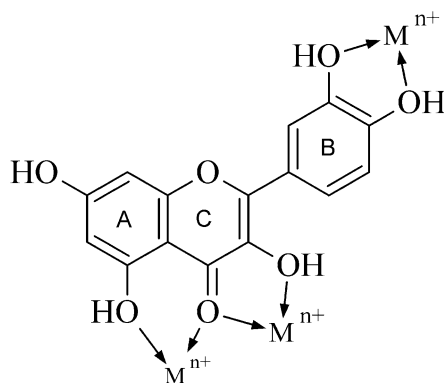
3.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim uzorcima vina određivan je pomoću kolorimetrijske Folin–Ciocalteu (FC) procedure koju je Singleton, 1998. godine [159] prilagodio analizi vina. Ova metoda se zasniva na prenosu elektrona u baznoj sredini sa fenolnih jedinjenja na kompleksnu smešu fosfovolframove ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) i fosfomolibdenove kiseline ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$). Proizvodi redukcije su oksidi volframa (W_8O_{23}) i molibdena (Mo_8O_{23}) koji su plave boje i apsorbuju svetlost u vidljivom regionu u opsegu 715–750 nm. Iako tačna priroda FC-reakcije nije poznata, smatra se da postupna, reverzibilna jedno ili dvo-elektronska redukcija dovodi do stvaranja plavo obojenih vrsta kao što je $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$ [160]. Intenzitet apsorpcije svetlosti na datoj talasnoj dužini proporcionalan je koncentraciji ukupnih fenola u ispitivanim rastvorima. Međunarodna organizacija za vinovu lozu i vino (Office International de la Vigne et du Vin (OIV)), koja sertifikuje specifične metode u analizi vina, prihvatila je FC metodu kao standardnu proceduru u analizi vina [161].

Analizirana vina su razblažena dejonizovanom vodom tako da se postigne razblaženje u kom bi merena apsorbanija nakon reakcije sa FC reagensom bila između 0,2 i 0,7. U $200\text{ }\mu\text{L}$ razblaženog rastvora vina dodato je $1000\text{ }\mu\text{L}$ FC reagensa prethodno razblaženog destilovanom vodom u proporciji 1:10. Nakon 6 min stajanja u mraku, u reakcionu smešu je dodato $800\text{ }\mu\text{L}$ 7,5% rastvora natrijum karbonata, promućkano vorteksom i ostavljeno da reaguje naredna 2 h u mraku. Nakon reakcije merena je apsorbanija reakcione smeše na 740 nm spektrofotometrom (GBC Cintra 40). Ista procedura korišćena je za četiri različite koncentracije standardnog rastvora galne kiseline (10, 20, 50 i $100\text{ }\mu\text{g/mL}$). Sva merenja su rađena u triplikatu. Sadržaj ukupnih fenola u vinima izračunat je iz standardne krive galne kiseline, a izražen je u ekvivalentima galne kiseline (mg GAE/L).

3.3. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorcima vina određivan je spektrofotometrijskom metodom, korišćenjem aluminijum(III)-hlorida kao reagensa [162]. Ova kolorimetrijska metoda zasniva se na stvaranju stabilnih kompleksa aluminijum(III)-hlorida sa C-4 keto grupom i C-3 ili C-5 hidroksilnom grupom flavona i flavonola (**Slika 18**). Osim toga, aluminijum(III)-hlorid stvara komplekse sa *orto* dihidroksilnim (kateolskim) grupama u A ili B prstenu flavonoida [163]. Apsorbanija svetlosti od strane formiranih kompleksa prati se na $410\text{--}440\text{ nm}$.

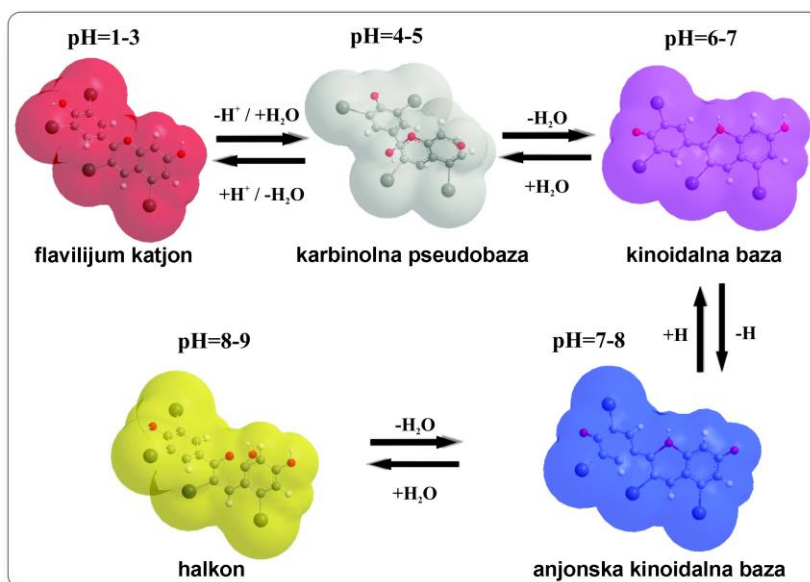


Slika 18. Moguća mesta građenja kompleksa metala i kvercetina [164]

Za potrebe ovog testa uzorci analiziranih vina su razblaženi dejonizovanom vodom na isti način kao prilikom izvođenja FC testa. Nakon toga, napravljena je reakciona smeša od 1,0 mL uzorka, 50 μ L 10% rastvora AlCl_3 reagensa, 50 μ L 1 M rastvora CH_3COOK i 1400 μ L dejonizovane vode. Nakon 30 min trajanja reakcije, merena je apsorbcija reakcione smeše na 410 nm. Ista procedura primenjena je u analizi pet različitih koncentracija standardnog rastvora rutina (10, 20, 25, 50 i 100 mg/L). Sadržaj ukupnih flavonoida u vinima izražen je u ekvivalentima rutina (mg RTE/L) izračunatim iz standardne krive ovog jedinjenja. Sva merenja urađena su u triplikatu. Absorbancija je merena spektrofotometrom, model GBC Cintra 40.

3.4. Određivanje sadržaja monomernih antocijana

Za određivanje koncentracije monomernih antocijana u ispitivanim uzorcima vina korišćena je brza i jednostavna procedura, pH diferencijalna metoda. Ova metoda se zasniva na strukturnoj promeni hromofore antocijana u zavisnosti od pH. Ta izmena može se izmeriti optičkom spektroskopijom [59]. Promenom pH, antocijani se reverzibilno strukturno menjaju, što se može primetiti upečatljivo različitim apsorpcionim spektrima. Na pH 1,0 antocijani su zastupljeni u formi obojenog oksonijum jona, dok je na pH 4,5 zastupljenija bezbojna poluketalna forma (**Slika 19**). Sama pH diferencijalna metoda zasniva se na datoj reakciji izmene.



Slika 19. Forme antocijana pri različitim pH sredine [165]

U cilju određivanja sadržaja monomernih antocijana analizirana vina su razblažena na dva načina: 0,025 M rastvorom KCl pH 1 i 0,4 M rastvorom acetatnog pufera pH 4,5, kako bi se dobila apsorbcija finalnih rastvora između 0,2 i 0,7. Nakon 15 min merene su apsorbcije dobijenih rastvora na 520 nm i 700 nm. Ukupni sadržaj antocijana izračunat je pomoću sledeće jednačine (6):

$$\text{Monomerni antocijani (mg/L cyd-3-glu)} = A \times \text{MW} \times \text{DF} \times l \times 1000 / \varepsilon \quad (6)$$

$$A = [(A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1,0}] - [(A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4,5}]$$

Gde je „A” apsorbcija; MW je molekulska masa za cijanidin-3-glukozid (449,2 g/mol); „DF” je faktor razblaženja; „l” je dužina pređenog puta zraka svetlosti izražena u cm; „ ε ” je molarni ekstinkcioni koeficijent za cijanidin-3-glukozid koji iznosi 26 900 $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Apsorbancija dobijenih rastvora vina merena je spektrofotometrom GBC Cintra 40. Dobijene vrednosti su izražene kao sadržaj cijanidin-3-glukozida [166].

3.5. Određivanje sadržaja tanina

Sadržaj tanina u uzorcima vina određivan je metodom koja se zasniva na precipitaciji tanina goveđim serum albuminom. U ovu svrhu korišćena je originalna metoda Harbertson-a i saradnika, 2002 [167] sa modifikacijama objavljenim u radu Fernandez i Agosin, 2007 [168].

Količina od 200 μL crvenog vina razblažena je 2 puta puferom koji se sastojao od 12% etanola i 5 g/L kalijum-bitartarata, pH 3,3. Zapremina od 500 μL razblaženog vina pomešano je sa 1 mL rastvora BSA (u 200 mM natrijum acetatnom puferu, pH 4,9). Nakon stajanja 15 min na sobnoj temperaturi uzorci su centrifugirani 10 min na 12000 g, pri čemu pada tanin-protein precipitat. Dobijeni supernatant je odbačen, dok je talog ispran sa po 500 μL acetatnog pufera. Nakon ponovnog centrifugiranja 5 min na 10000 g, dobijeni talog je rastvoren u 875 μL smeše 5% (v/v) trietanolamina i 5% SDS-a (w/v) u vodi. Nakon inkubiranja 10 min na sobnoj temperaturi, očitana je apsorbancija na 510 nm, što predstavlja pozadinsku apsorbanciju. Nakon toga u rastvore je dodato po 125 μL 10 mM gvožđe (III) hlorida u 10 mM hlorovodoničnoj kiselini. Nakon reagovanja 10 min na sobnoj temperaturi, merena je finalna apsorbancija na 510 nm. Sadržaj tanina je izražen u ekvivalentina katehina (mg CE/L) u odnosu na standardnu krivu napravljenu korišćenjem standarda (+)-katehina.

3.6. Određivanje fenolnog profila

U cilju detekcije i kvantifikacije polifenolnih jedinjenja u vinu korišćena je tečna hromatografija sa ultraljubičastim detektorom sa nizom fotodioda (PDA) i masenim detektorom sa tri analizatora – trostruki kvadrupol (engl. *triple quadrupole* – QQQ).

Nakon filtriranja po 10 μL svakog od ispitivanih uzoraka vina kroz Econofilter veličine pora 0,22 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD), uzorci vina direktno su ubrizgavani u tečni hromatograf (Waters Acquity UPLC H-Class; WAT-176015007; Milford, MA SAD) sa PDA detektorom (Waters 2998 PDA), povezan sa MS detektorom (Waters TQ (Tandem Quadrupole, WAT-176001263). Za dobijanje i procesuiranje podataka korišćen je MassLynx V4.1 softver.

ZORBAX Eclipse XDB C18 kolona (150 \times 4,6 mm; 5 μm) upotrebljena je za razdvajanje polifenolnih jedinjenja. Za analizu datih jedinjenja korišćeni su rastvori 0,2% (v/v) mravlje kiseline u dejonizovanoj vodi (rastvor A) i acetonitril (rastvor B).

Primenjen je sledeći elucioni program:

0-20 min (5–16% B), 20-28 min (16–40% B), 28-32 min (40–70% B), 32-36 min (70–98 % B), 36-45 min (98% B), 45-46 min (98–5% B), 46-55 min (5% B).

Temperatura kolone održavana je na 25 °C, dok je brzina protoka mobilne faze bila 0,7 mL/min. PDA detektor, opsega 190–600 nm, i maseni detektor korišćeni su za analiziranje i kvantifikaciju razdvojenih fenolnih jedinjenja.

Uslovi rada na masenom detektoru bili su sledeći:

Temperatura elektrosprej jonskog izvora: 150 °C, napon na kapilari: 3,5 kV, napon na konusu: 20–60 V, kolizijska energija: 10–56 eV.

IntelliStart odeljak iz MassLynx V4.1. softvera korišćen je za podešavanje uslova na masenom spektrometru (MS). Retencionna vremena, UV maksimumi i mod za praćenje višestruke fragmentacije (engl. *Multiple Reaction Monitoring* – MRM) u toku elektrosprej jonizacije u

negativnom (ESI-) i pozitivnom (ESI+) modu korišćeni su za identifikaciju i kvantifikaciju pojedinačnih fenolnih jedinjenja.

Kvantifikacija fenolnih jedinjenja urađena je korišćenjem rastvora komercijalno dostupnih standardnih jedinjenja. Kalibracione krive dobijene su ubrizgavanjem različitih koncentracija standardnih rastvora, pod istim uslovima koji su važili i za analizu fenolnih jedinjenja u uzorcima vina. Standardne krive, pak, definisane su površinom ispod pika za svaki izdvojeni jonski prelaz određenog fenolnog jedinjenja iz standardnog rastvora u ESI modu. Obzirom da standardna jedinjenja tP i cP nisu bila dostupna, ova jedinjenja kvantifikovana su korišćenjem standardnih krivih njihovih aglikona tR i cR.

3.7. Određivanje elementalnog profila

Za određivanje koncentracije makroelemenata (Ca, Na, K, Mg i Fe) korišćen je optički emisioni spektrometar sa indukovano spregnutom plazmom (engl. *inductively coupled plasma optical emission spectrometry* – ICP-OES (Thermo Scientific, UK), model iCAP-6500 Duo, koji poseduje CID86 čip detektor.

Ovaj instrument radi sekvencijalno sa dvostrukom konfiguracijom plamenika (radijalnom i aksijalnom). Ceo sistem kontrolisan je pomoću Iteva softvera. Instrumentalni uslovi, kao i selektovane talasne dužine date, su u **Tabeli 2**.

Tabela 2. Instrumentalni uslovi za određivanje koncentracije makroelemenata pomoću uređaja ICP-OES.

Spektrometar	iCAP 6500 Thermo scientific
Raspršivač	koncentrični
Komora za raspršivanje	ciklonska
Snaga generatora (W)	1150
Brzina protoka nosećeg gasa – argona (L/min)	12
Brzina protoka pomoćnog gasa – argona (L/min)	0,5
Brzina protoka raspršivača (L/min)	0,5
Brzina unošenja uzorka (mL/min)	1,0
Detektor	CID86
Odabrane talasne dužine (nm)	Fe (259,9); Na (589,5); Ca (373,6); Mg (279,5); K (766,4)

Određivanje koncentracije preostalih šesnaest mikroelemenata, kao i elemenata prisutnih u tragovima, urađeno je na masenom spektrometru sa indukovano spregnutom plazmom (engl. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* – ICP-MS), iCAP Q, Thermo Scientific X series 2.

Dato merenje urađeno je na osnovu prethodno opisane metode [169], dok je ceo sistem kontrolisan pomoću softvera Qtegra Instrument Control. Izotopi određivanih elemenata prikazani su u **Tabeli 3**.

Tabela 3. Mereni izotopi i uslovi rada na ICP-MS instrumentu prilikom merenja koncentracije mikroelemenata i elemenata prisutnih u tragovima.

Elementi	Mereni izotopi
Al	27
V	51
Cr	53
Mn	55
Co	59
Ni	60
Cu	65
Zn	66
As	75
Se	82
Ag	109
Cd	112
Sb	121
Ba	138
Tl	205
Pb	208
Snaga generatora (W)	1548
Brzine protoka gasa (L/min)	13,90; 1,09; 0,80
Vreme akvizicije (sek)	3 × 50
Broj očitavanja intenziteta pika	3
Integraciono vreme (nsek)	10
Mod detektora	Pulsni
Broj ponavljanja	3

Multielementni osnovni rastvor (Merck, Darmstadt, Nemačka) koji je sadržao po 1,000 g/L svakog od makroelemenata korišćen je za pripremanje standardnih serija rastvora za ICP-OES analizu uzoraka, dok je multielementni osnovni rastvor od po 10 mg/L od svakog od preostalih šesnaest mikroelemenata i elemenata prisutnih u tragovima korišćen za pripremu standardnih serija rastvora koji će se koristiti za ICP-MS merenja. ^{45}Sc , ^{115}In i ^{159}Tb korišćeni su kao interni standardi i oni su pripremljeni od smeše rastvora referentnih internih standarda (engl. *Internal Standard Mix solution*) (VHG standardi, Manchester, Velika Britanija).

Uzorci su prilikom analize razblaženi u odnosu 1:10 (v/v) dejonizovanom vodom, dobijenom Milli-Q sistemom, koja je sadržala 2% (v/v) azotnu kiselinu (Merck, Darmstadt, Nemačka). Standardni rastvori su pripremljeni u 1% (v/v) rastvoru etanola (Merck, Darmstadt, Nemačka) koji je takođe sadržao 2% (v/v) azotnu kiselinu.

3.8. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Antioksidativna aktivnost analiziranih uzoraka vina ispitivana je pomoću osam različitih metoda. *In vitro* anti-DPPH radikalska aktivnost merena je spektrofotometrijskom i EPR metodom. Takođe su spektrofotometrijski ispitane i anti-ABTS, anti-hidroksil i anti-superoksid radikalska aktivnosti. Uz to urađen je i FRAP test za analizirane uzorke vina. *In vitro*, antioksidativna aktivnost ispitivana je i korišćenjem ciklične voltometrije i klasične polarografije. Konačno, U ispitivanju antioksidativnog potencijala ispitivanih uzoraka vina u ovom radu se otišlo korak dalje,

Uzorci vina razblaženi su dejonizovanom vodom tako da merena apsorbanacija datog rastvora nakon reakcije sa DPPH radikalom bude u opsegu 0,2 – 0,7. Zapremina od 200 μL rastvora vina pomešana je sa 1800 μL metanolnog rastvora DPPH (koncentracije 0,04 mg/mL). Reakciona smeša je ostavljena da reaguje 30 min u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, merena je apsorbanacija reakcione smeše (zaostalog DPPH radikala) na 517 nm spektrofotometrom (GBC Cintra 40). Sposobnost vina da neutrališe DPPH radikal izračunata je sledećom jednačinom (7):

$$\text{DPPH (\%)} = [1 - A_x / A_0] \times 100 \quad (7)$$

gde je A_0 apsorbanacija kontrole (umesto vina u reakcionu smešu je dodata dejonizovana voda), dok je A_x apsorbanacija preostalog DPPH radikala nakon reakcije sa razblaženim rastvorom vina. Svaki uzorak vina analiziran je u četiri različita razblaženja a svako razblaženje analizirano je u triplikatu. Rezultati su izraženi kao vrednosti EC_{50}^{-1} (recipročno razblaženje uzorka vina koje neutrališe 50% DPPH*), koje su određene sa grafika zavisnosti procenta aktivnosti neutralisanja DPPH radikala u odnosu na razblaženje uzoraka vina izraženo u procentima.

3.8.1.2. EPR spektroskopija

Proces rezonantne apsorpcije mikrotalasnog zračenja u homogenom magnetnom polju, u sistemima koji poseduju najmanje jedan nespareni elektron detektuje se rezonantnom spektroskopskom metodom, elektronskom paramagnetnom rezonancijom (EPR). U cilju ispitivanja anti-DPPH radikalske aktivnosti, DPPH je najpre rastvoren u metanolu do 40 nM finalne koncentracije. Smeša DPPH i vina (1:1, v/v) inkubirana je 15 min i sadržaj preostalog DPPH radikala meren je EPR spektroskopijom [172]. EPR spektri dobijeni su korišćenjem Varian E104-A, X-band ESR spektrometra (Varian, Palo Alto, CA, SAD) pri radnim uslovima prikazanim u **Tabeli 4**.

Tabela 4. Radni uslovi na EPR spektrometru.

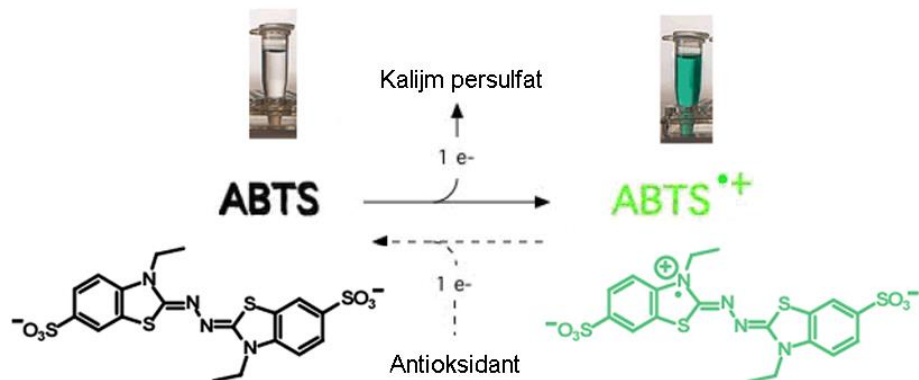
Magnetna indukcija polja	3390 G
Opseg snimanja	100 G
Modulacija frekvencije	100 kHz
Modulacija amplitude	2 G
Vremenska konstanta	32 ms
Mikrotalasna snaga	10 mW
Mikrotalasna frekvencija	$9,50 \pm 0,02$ GHz (podešeno za svaki uzorak)

Eksperiment je izvođen na sobnoj temperaturi (22 °C). Dobijanje i obrada spektara urađena je pomoću EW softvera (Scientific Software, Bloomington, IL, SAD), dok su ostale analize rađene pomoću MatWorks Matlab 2010a. Merenja su rađena u triplikatu. Dobijeni rezultati izraženi su kao procenat smanjenja signala.

3.8.2. Anti-ABTS radikalska aktivnost

ABTS test se zasniva na ispitivanju anti-ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)] radikalske aktivnosti. U okviru ovog testa prati se redukcija zeleno-plave boje stabilne radikalske katjonske hromofore 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6 sulfonata) (ABTS⁺),

koja nastaje procesom oksidacije u prisustvu kalijum persulfata, i ima apsorpcioni maksimum na 734 nm (**Slika 22**). U tu svrhu korišćena je modifikovana metoda Re-u i saradnicima 1999 [173].



Slika 22. Princip testa ABTS [174]

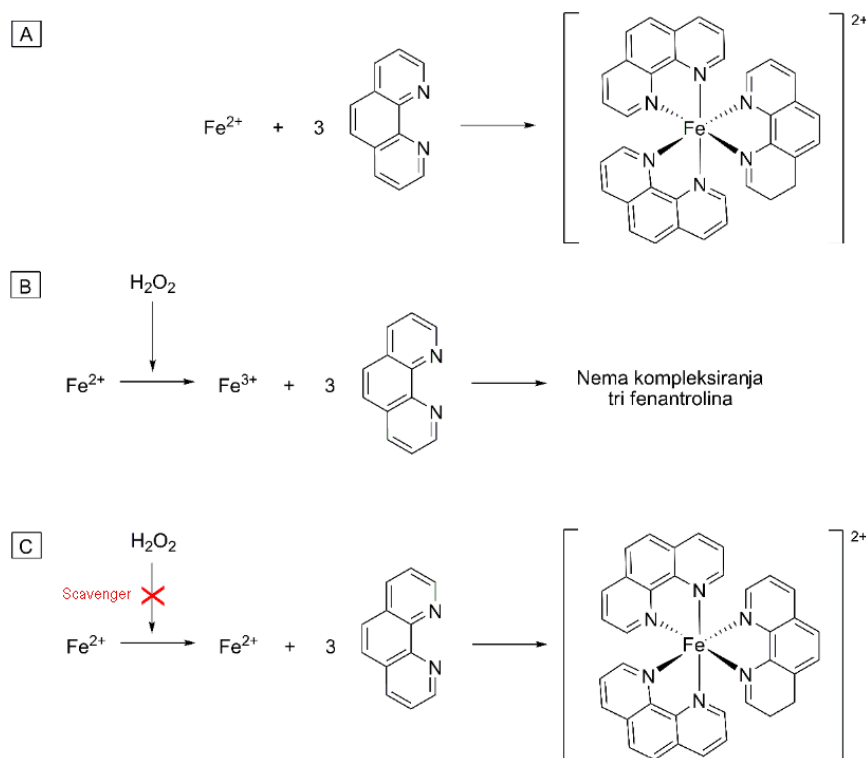
Radni rastvor napravljen je mešanjem 7 mM ABTS rastvora sa 2,4 mM rastvorom kalijum persulfata u odnosu 1:1 (v/v). Radni rastvor je ostavljen da stoji 14 h na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon toga 1,5 mL radnog rastvora razblaženo je sa 50 mL metanola kako bi se dobila apsorbanca oko 0,7 mereno na 734 nm. Ispitivani uzorci crvenog vina su za potrebe ovog eksperimenta razblaženi 25, 50, 75 i 100 puta. Zapremina od 1 mL radnog rastvora ABTS pomešan je sa 100 μ L uzorka vina različitog razblaženja. Nakon 6 min merena je apsorbanca date reakcione smeše na 734 nm. Procenat inhibicije, tj. sposobnost vina da neutrališe ABTS radikal izračunata je sledećom jednačinom (8):

$$\text{ABTS (\%)} = [1 - A_x / A_0] \times 100 \quad (8)$$

gde je A_0 apsorbanca kontrole (umesto vina u reakcionu smešu je dodata dejonizovana voda), dok je A_x apsorbanca preostalog ABTS radikala nakon reakcije sa razblaženim rastvorom vina. Svaki uzorak vina analiziran je u četiri različita razblaženja a svako razblaženje je analizirano u triplikatu. Rezultati su izraženi kao vrednosti EC_{50}^{-1} (recipročno razblaženje uzorka vina koje neutrališe 50% ABTS^{•+}), koje su određene sa grafika zavisnosti procenta aktivnosti neutralisanja ABTS radikala u odnosu na razblaženje uzoraka vina izraženo u μ L⁻¹.

3.8.3. Anti-hidroksil radikalska aktivnost

Test određivanja anti-hidroksil radikalske aktivnosti zasniva se na građenju trifenantrolinskog kompleksa koji nastaje između Fe^{2+} i fenantrolina u odsustvu vodonik peroksida (**Slika 23 (A)**). Naime, vodonik peroksid, koji je sastavni deo reakcione smeše doveo bi do oksidacije Fe^{2+} u Fe^{3+} čime bi bilo onemogućeno stvaranje datog kompleksa (**Slika 23 (B)**). Međutim, u prisustvu antioksidativnih vrsta iz crvenog vina, koje imaju sposobnost da neutrališu vodonik peroksid, dolazi do njegovog uklanjanja iz rastvora i do ponovnog građenja trifenantrolinskog kompleksa (**Slika 23 (C)**). Test je izvođen prema modifikovanoj metodi Li-a i saradnika 2008 [175].



Slika 23. Mehanizam anti–hidroksil radikalskog testa

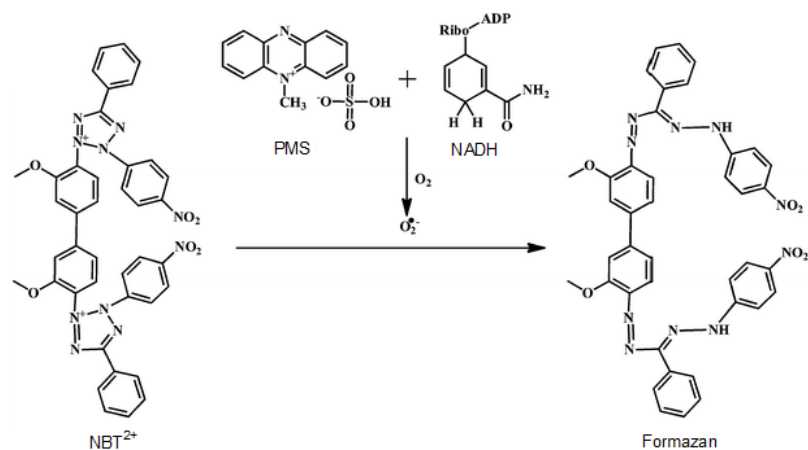
Za potrebe testa napravljena su po 4 razblaženja svakog od analiziranih vina (25, 50, 75 i 100 puta). Reakciona smeša je sadržala po 200 μL odgovarajućeg razblaženja vina, 3 mM rastvora 1,10-fenantrolina (rastvorenog u 20 mM fosfatnom puferu pH 7,4), 3 mM FeSO_4 i 0,02% H_2O_2 . Smeša je inkubirana 1 h na 37 $^\circ\text{C}$, nakon čega je merena apsorbancija na 536 nm. Apsorbancija je merena i u rastvorima blanka (koji je sadržao samo rastvore fenantrolina i FeSO_4), kao i u kontrolnom uzorku (koji je sadržao sve osim ispitivanog uzorka). Anti–hidroksil radikalska aktivnost, izražena kao procenat inhibicije, izračunata je sledećom jednačinom (9):

$$(\%) = \left[\frac{A_s - A_c}{A_0 - A_c} \right] \times 100 \quad (9)$$

gde je A_s apsorbancija uzorka (reakcione smeše), A_c apsorbancija kontrole, a A_0 apsorbancija blanka. Svaki uzorak vina je analiziran u četiri različita razblaženja a svako razblaženje analizirano je u triplikatu. Rezultati su izraženi kao vrednosti EC_{50}^{-1} (recipročno razblaženje uzorka vina koje neutrališe 50% hidroksil radikala), koje su određene sa grafika zavisnosti procenta aktivnosti neutralisanja hidroksil radikala u odnosu na razblaženje uzoraka vina izraženo u μL^{-1} .

3.8.4. Anti–superoksid anjon radikalska aktivnost

Za potrebe ovog eksperimenta superoksidni anjon je generisan u neenzimskom PMS (engl. *phenazine methosulphate*) – NADH (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide* - redukovana forma) sistemu oksidacijom NADH. Pri oksidaciji NADH dolazi do istovremene redukcije NBT (engl. *nitroblue tetrazolium*) u plavo obojeni formazan, čija je apsorbancija praćena na 560 nm (**Slika 24**) [176]. Sposobnost uzoraka vina da neutrališu formirani superoksid radikal računa se iz smanjenja apsorbcije nastalog formazana u odnosu na kontrolu u kojoj nema uzorka. U ovu svrhu korišćena je modifikovana metoda Liu-a i saradnika [177].



Slika 24. Mehanizam testa za ispitivanje anti–superoksid radikalske aktivnosti [176]

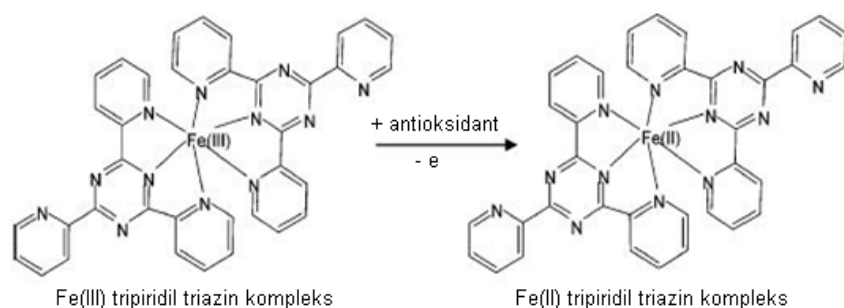
Reakciona smeša je napravljena mešanjem sledećih reagenasa: 600 μL 20 mM Tris-HCl pufera pH 8,3, 100 μL razblaženog uzorka vina (20, 30, 50 i 75 puta), 100 μL 0,5 mM rastvora NBT, 100 μL 0,78 mM rastvora NADH i 100 μL 0,1 mM rastvora PMS. Reakciona smeša je inkubirana 5 min na 37 $^{\circ}\text{C}$. Nakon toga merena je apsorbancija dobijenih rastvora na 560 nm u odnosu na odgovarajući blank (sve u reakcionoj smeši osim PMS). Procenat inhibicije, tj. sposobnost vina da neutrališe superoksid radikal izračunata je sledećom jednačinom (10):

$$\text{SO (\%)} = [1 - A_x / A_0] \times 100 \quad (10)$$

gde je A_0 apsorbancija kontrole (umesto vina u reakcionoj smeši je iskorišćen Tris-HCl pufer), dok je A_x apsorbancija nagrađenog formazana u reakcionoj smeši sa dodatim rastvorom vina odgovarajućeg razblaženja. Svaki uzorak vina je analiziran u četiri različita razblaženja a svako razblaženje je analizirano u triplikatu. Rezultati su izraženi kao vrednosti EC_{50}^{-1} (recipročno razblaženje uzorka vina koje neutrališe 50% $\text{O}_2^{\cdot -}$), koje su određene sa grafika zavisnosti procenta aktivnosti neutralisanja $\text{O}_2^{\cdot -}$ radikala u odnosu na razblaženje uzoraka vina izraženo u μL^{-1} .

3.8.5. Metoda FRAP

Test FRAP (engl. *Ferric Reducing Anti-oxidant Power*) zasniva se na sposobnosti analiziranih uzoraka vina da, u kiseljoj sredini, redukuju Fe(III) tripiridil triazin kompleks do Fe(II) kompleksa koji je intenzivno plavo obojen i čija se apsorbancija prati na 593 nm (**Slika 25**). Pri izvođenju datog testa praćena je originalna metoda Benzie and Strain, 1996 uz modifikacije [178].



Slika 25. Princip FRAP testa

Radni FRAP rastvor dobijen je mešanjem 75 mL 0,3 M acetatnog pufera pH 3,6; 7,5 mL 10 mM TPTZ (engl. *2,4,6-tripyridyl-s-triazine*) i 7,5 mL 20 mM FeCl₃. Radni rastvor je preinkubiran na 37 °C. Reakciona smeša je dobijena mešanjem 950 µL FRAP reagensa sa 50 µL ispitivanih uzoraka vina razblaženih 50 puta. Nakon toga sledilo je inkubiranje na 37 °C, 10 min i očitavanje apsorbancije na 593 nm. Od dobijene apsorbancije oduzeta je apsorbancija kontrole koja je umesto uzorka sadržala korišćeni pufer. Redukcione sposobnosti datih uzoraka vina izražene su u odnosu na ekvivalente askorbinske kiseline (mg askorbinske kiseline/mL vina).

3.8.6. Ciklična voltometrija

Kvantifikacija elektrohemijskih osobina antioksidanata prisutnih u različitim uzorcima vina kao i određivanje antioksidativnog kapaciteta uzoraka pomoću Q parametara, urađeno je metodom ciklične voltetrije. Ciklični voltamogrami snimljeni su na CHI760 B uređaju (CHInstruments, Austin, Teksas, SAD). Radna troelektrodna ćelija sadržala je staklenu (GC) elektrodu (Model CHI 104), pomoćnu platinsku elektrodu velike površine (Model CHI221), kao i Ag/AgCl referentnu elektrodu (Model CHI111). Ukupna zapremina radne ćelije iznosila je 5 mL. Pre svakog merenja površina staklene ugljenične elektrode je bila sveže polirana aluminijumskim prahom (1,0; 0,5 i 0,3 µm, Buehler, IL, SAD), a zatim je ispirana destilovanom vodom. Sva merenja su rađena na sobnoj temperaturi. Snimanje je rađeno u okviru napona od 0 mV i 1300 mV, brzinom snimanja od 100 mV/s. Potencijal na kojem je meren maksimum struje iznosio je ~600 mV, pa je na osnovu površine ispod voltametrijskog anodnog pika izračunat Q600 faktor. Antioksidativni kompozitni indeks (ACI) izračunat je kao procenat dobijenog Q600 faktora u poređenju sa najboljim Q600 faktorom (vrednosti 100) prema sledećoj jednačini (11):

$$ACI = Q600 (\text{uzorka}) / Q600 (\text{najbolji}) \times 100 \quad (11)$$

ACI vrednost 100 pripisana je najvećoj vrednosti Q600 faktora dobijenog u voltametrijskim merenjima.

3.8.7. Klasična polarografija

Polarografska (HPMC) metoda je, za potrebe ove doktorske disertacije, korišćena za određivanje antioksidativne aktivnosti ispitivanih uzoraka vina [179]. Ova metoda koristi kapljuću živinu elektrodu (KŽE) kao radnu elektrodu i zasniva se na polarizaciji date elektrode sporom promenom potencijala u sistemu sa pomoćnom i referentnom elektrodom. U baznim rastvorima vodonik peroksida dolazi do nastajanja hidroksiperoksoživa (II) kompleksa (engl. *HydroxoPeroxoMercury(II) complex* – HPMC) usled čega se u rastvoru javlja struja, koju meri radna elektroda. U prisustvu antioksidativnih vrsta dolazi do smanjenja anodne struje, a samo smanjenje proporcionalno je antioksidativnom kapacitetu rastvora. Ova metoda posebno je pogodna za merenje antioksidativnog kapaciteta obojenih uzoraka, kao što je crveno vino, obzirom da nije potrebna posebna priprema uzorka pre uvođenja u elektrohemijsku ćeliju.

Tokom rada, praćeno je smanjenje anodne struje u odnosu na postepeno dodavanje 7 dodataka od po 25 µL ispitivanih uzoraka vina, nakon čega je napravljena kriva zavisnosti procenta smanjenja anodne struje od zapremine dodatog uzorka. Nagib linearnog dela dobijene krive izražen u procentualnom smanjenju anodne struje u zavisnosti od dodate zapremine uzorka, korišćen je kao mera antioksidativnog kapaciteta rastvora. Polarografske i-E krive dobijene su pomoću PAR (Princeton Applied Research) 174A polarografskog uređaja sa X-Y pisačem (Houston Instruments, Omnigraph 2000) za automatsko beleženje dobijenih krivih. U datom elektrolitičkom sistemu, u istaknutim uslovima snimanja i-E krivih (**Tabela 5**) korišćene su sledeće elektrode:

1. Radna KŽE sa kapilarnim karakteristikama $m = 2,5 \text{ mg/s}$ (masa žive istekle iz kapilare po sekundi) pri visini rezervoara žive od 75 cm
2. Referentna zasićena kalomelova elektroda (ZKE)
3. Pomoćna elektroda (platinski lim)

Tabela 5. Uslovi snimanja i-E krivih.

Zapremina polarografske ćelije	30 mL
Vreme kapanja (τ) KŽE	1 s
Brzina promene polarizujućeg napona	10 mV/s
Početni potencijal prema ZKE	0,1 V
Strujna osetljivost	20 μA (pun otklon skale od 250 mm)
Vreme propuštanja struje azota	5 min

Tokom snimanja i-E krivih, inertna atmosfera je održavana strujom azota iznad rastvora. Homogenizacija i deaerizacija rastvora sledila je nakon dodatka svakog alikvota uzorka.

U 20 mL puferskog rastvora (Clark&Lubs (CL) pufer pH 9,8) 5 mM vodonik peroksida dodavani su uzorci vina (7 dodataka od po 25 μL). i-E krive su snimane nakon svakog dodatka ispitivanih vina, pri čemu je dolazilo do ravnomernog smanjenja osnovne struje peroksida. Procenat smanjenja osnovne struje po svakom dodatku uzorka izračunat je na osnovu sledeće jednačine (12):

$$\% \text{ smanjenja } [\text{H}_2\text{O}_2] = (1 - i_{lr}/i_{l0}) \times 100 \quad (12)$$

gde je: i_{lr} – visina granične vrednosti anodne struje po svakom dodatku, a i_{l0} – visina granične struje osnovnog anodnog pika peroksida.

Na osnovu dobijenih vrednosti nacrtan je grafik zavisnosti procenta smanjenja granične struje od zapremine dodatog uzorka. Antioksidativna aktivnost uzoraka izražena je kao nagib pravolinijskog dela te zavisnosti, i izražena je u %/mL uzoraka analiziranih vina. Ova zavisnost bila je linearna u celom intervalu zapremine, od 25 do 175 μL .

3.8.8. Određivanje antioksidativne aktivnosti u ćelijama kvasca

Test preživljavanja *S. cerevisiae* korišćen je za ispitivanje antioksidativne aktivnosti analiziranih vina u stanju oksidativnog stresa u ćelijama *S. cerevisiae* (Zymaflore RX60 Vin Rouge obtained from Laffort-BP 17, Francuska) izazvanog vodonik peroksidom. Ćelije kvasca koje su rasle na tečnoj Sabouraud dekstroznoj podlozi, u ekspanzionalnoj fazi rasta prebačene su u svežu podlogu. Apsorbancija (A_{600}) je podešena na 0,2. Optimalna koncentracija vina određena je serijom razblaženja (2, 4, 6, 8 mL/100 mL). Najniža koncentracija vina koja je podržavala rast ćelija *S. cerevisiae* u odnosu na ćelije izložene 0,75 mM rastvoru vodonik peroksida odabrana je za dalje analize.

Korišćene su tri kontrolne grupe:

- etanolna kontrola (Kont, ćelije tretirane 13% rastvorom etanola)
- vinska kontrola (Kom, C I, C II, ćelije tretirane samo odgovarajućim vinom)
- H_2O_2 kontrola (Kont + H_2O_2 ćelije tretirane vodonik peroksidom)

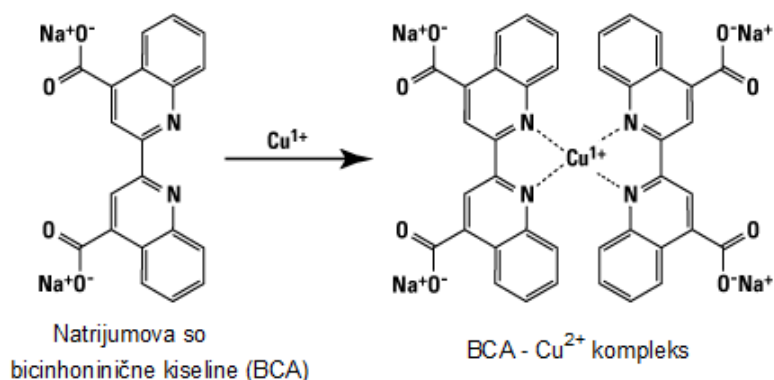
Svaka reakciona smeša sadržala je vino u finalnoj koncentraciji 4 mL vina na 100 mL rastvora i vodonik peroksid (0,75 mM) koji je dodavan 15 min nakon dodatka vina. Uzorci i kontrole inkubirani su 1 h na 28 °C uz mešanje na 160 rpm. Vijabilnost ćelija određivana je zasejavanjem na Sabouraud dekstroznom agaru nakon serijskog desetstrukog razblaživanja. Na svakoj Petri šolji nalazilo se oko 1000 kolonija *S. cerevisiae*. Petri šolje su inkubirane na 28 °C, 72 h i nakon toga pristupljeno je brojanju izraslih kolonija. Sposobnost preživljavanja (engl. *survival rate* – SR) od 100% odnosi se na broj kolonija *S. cerevisiae* izraslih na etanolnoj kontrolnoj Petri šolji.

3.8.8.1. Priprema homogenata ćelija kvasca

Za određivanje sadržaja ukupnih –SH grupa (engl. *total SH groups* – T–SH) i izvedbu enzimskih testova, ćelije kvasca su pripremljene prema proceduri Lingua i saradnika (2016) [129]. Ćelije kvasca su lizirane u puferu za lizu ćelija (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 7,2) korišćenjem 2 zapremine staklenih kuglica za lizu ćelija veličine 425–600 mikrona. Ćelije su naizmenično vorteksovane i hlađene na ledu po 1 min, u okviru 8 ciklusa. Ćelijski ostaci su uklonjeni centrifugiranjem brzinom od 14.000 g, na 4 °C tokom 15 min. Dobijeni supernatant korišćen je za dalje analize.

3.8.8.2. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u homogenatu ćelija *S. cerevisiae* određena je pomoću Pierce BCA kita za proteine (engl. *Protein Assay Kit*) (Thermo Scientific, UK). Dati test zasniva se na građenju ljubičasto obojenog kompleksa između bicinoninične kiseline i Cu^+ jona, nastalih redukcijom Cu^{2+} jona iz CuSO_4 od strane peptidnih veza proteina u rastvoru (**Slika 26**). Koncentracija proteina direktno je proporcionalna intenzitetu ljubičaste boje merenog u vidljivom delu spektra između 540 i 590 nm.

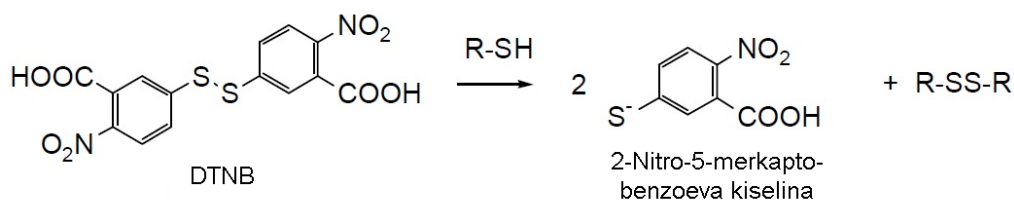


Slika 26. Građenje kompleksa između Cu^+ jona i bicinoninične kiseline

Pre početka eksperimenta pripremljen je BCA radni rastvor mešanjem BCA reagensa A, koji sadrži Na_2CO_3 , NaHCO_3 , bicinoniničnu kiselinu i Na-tartarat u 0,1 M rastvoru NaOH, i BCA reagensa B, koji sadrži 4% rastvor CuSO_4 , u odnosu 50/1 (v/v). U bunarić mikrotitar pločice je uneto 25 μL uzorka ili standardnog rastvora i 200 μL BCA radnog rastvora, nakon čega je sledilo mešanje na šejkeru za mikrotitar pločice 30 s. Mikrotitar pločica je zatim poklopljena i inkubirana 30 min na 37 °C. Nakon spontanog hlađenja pločice na 25 °C, merena je apsorbancija rastvora na 550 nm pomoću čitača mikrotitar pločica (WALLAC 1420 - Victor² Multilabel Counter, LKB, UK). Rastvor goveđeg seruma albumina (BSA) u opsegu koncentracija 0–2 mg/mL korišćen je za izračunavanje koncentracije proteina u ispitivanim uzorcima.

3.8.8.3. Određivanje sadržaja ukupnih –SH grupa

Sadržaj T–SH grupa meren je korišćenjem Elmanovog reagensa [5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeva kiselina) – DTNB] [180]. Ovo jedinjenje sadrži disulfidnu vezu koja se vrlo lako redukuje u prisustvu slobodnih –SH grupa u reakciji izmene, pri čemu se stvara smeša analitnog disulfida uz oslobađanje jednog molekula 5-tio-2-nitrobenzoeve kiseline (TNB) (**Slika 27**). TNB je odlična odlazeća grupa sa pK_a tiola od 4,5. Količina od 1 mol TNB se oslobađa na 1 mol –SH grupa koji se oksiduje od strane DTNB reagensa. Stvoreni TNB anjon je intenzivne žute boje i može se koristiti za kvantifikaciju –SH grupa.

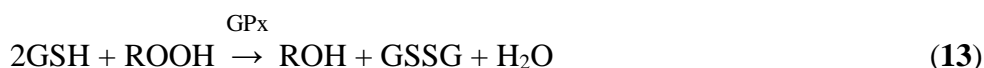


Slika 27. Reakcija između –SH grupa i Elmanovog reagensa (DTNB)

20 μL uzoraka/standarda pomešano je sa 75 μL dilucionog pufera (30 mM Tris HCl, 3 mM EDTA, pH 8,2), 25 μL 3 mM rastvora DTNB reagensa i 400 μL metanola. Nakon centrifugiranja pri brzini od 3,000 g u trajanju od 5 min na sobnoj temperaturi, supernatanti su prebačeni u mikrotitar pločicu sa ravnim dnom. Finalna apsorbanacija merena je na 412 nm pomoću čitača mikrotitar pločica (WALLAC 1420 - Victor² Multilabel Counter, LKB, UK). Standardna kriva dobijena na bazi različitih koncentracija standardnog rastvora GSH (u opsegu 0–1000 μM) omogućila je kvantifikaciju grupa T–SH.

3.8.8.4. Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze

Aktivnost enzima glutation peroksidaze (GPx) merena je pomoću Ransel enzimskog kita (Randox Laboratories, Crumlin, UK) po uputstvu proizvođača uz manje modifikacije. Sam kit se zasniva na činjenici da GPx katalizuje oksidaciju GSH od strane hidroperoksida (**13**). U prisustvu enzima GR i NADPH, oksidovani glutation (GSSG) se odmah prevodi u redukovanu formu uz istovremenu oksidaciju NADPH, kao koenzima, do NADP⁺ (**4**).



Aktivnost GPx se prati posredno određivanjem pada u apsorbanaciji na 340 nm (apsorpcioni maksimum NADPH).

Zapremina od 30 μL uzorka je pomešana sa 15 μL hidroperoksida i 174 μL destilovane vode. Odmah nakon dodatka 174 μL reagensa koji sadrži GSH, GR i NADPH merena je apsorbanacija na 340 nm na svakih 30 s u toku ukupno 180 s spektrofotometrom S-30 Boeco (Boeckel Co KG, Hamburg, Nemačka). Za slepu probu korišćena je ista reakciona smeša uz dodatak destilovane vode umesto uzorka. Aktivnost GPx izražena je kao jedinica aktivnosti (U) po gramu proteina korišćenjem sledeće jednačine (**14**):

$$\text{Aktivnost} = (\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{bl}}) \times V_{\text{uk}} / 6,22 \times V_{\text{uz}} \times C_p \quad (14)$$

gde je:

ΔA_{uz} – promena apsorbancije uzorka po minutu

ΔA_{sp} – promena apsorbancije slepe probe po minutu

V_{uk} – ukupna zapremina reakcione smeše u μL

V_{uz} – zapremina uzorka u μL

C_p – koncentracija proteina u mg/mL

6,22 – molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH ($6,22 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

3.8.8.5. *Određivanje aktivnosti glutation reduktaze*

Aktivnost enzima glutation reduktaze (GR) određena je korišćenjem BIOXYTECH enzimskog kita (OXIS International Foster City, SAD), prema uputstvima proizvođača uz manje modifikacije. Ovaj test bazira se na redukciji GSSG do GSH u prisustvu NADPH kao kofaktora (4). Pad apsorbancije na 340 nm, usled prevođenja NADPH u NADP^+ , proporcijalan je aktivnosti GR.

Zapremina od 20 μL uzorka razblažena je sa 70 μL rastvarača. Nakon toga u smešu je dodato 180 μL GSSG i 180 μL NADPH. Odmah nakon dodatka NADPH merena je apsorbancija na 340 nm, na svakih 30 s u toku naredna 4 min pomoću spektrofotometra S-30 Boeco (Boeckel Co KG, Hamburg, Nemačka). Za slepu probu umesto uzorka korišćen je kalijum-fosfatni pufer koji je sadržan u okviru samog kita. Aktivnost GR je izražena kao U po gramu proteina korišćenjem sledeće jednačine (15):

$$\text{Aktivnost} = (\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl}) \times V_{uk} / 6,22 \times V_{uz} \times C_p \quad (15)$$

gde je:

ΔA_{uz} – promena apsorbancije uzorka po minutu

ΔA_{sp} – promena apsorbancije slepe probe po minutu

V_{uk} – ukupna zapremina reakcione smeše u μL

V_{uz} – zapremina uzorka u μL

C_p – koncentracija proteina u mg po mL

6,22 – molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH ($6,22 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

3.8.8.6. *Određivanje aktivnosti katalaze*

Određivanje aktivnosti katalaze (Cat) bazirano je na praćenju razgradnje vodonik peroksida, pri čemu je pad u apsorbanciji na 240 nm (maksimum apsorpcije vodonik peroksida) proporcionalan aktivnosti Cat [181].

30% Rastvor vodonik peroksida rastvoren je u 0,05 M kalijum-fosfatnom puferu pH 7,0 kako bi apsorbancija finalnog rastvora vodonik peroksida bila između 0,525 i 0,550. U kivetu je nakon dodavanja 1,99 mL reakcionog rastvora vodonik peroksida dodato 10 μL uzorka i odmah nakon toga merena je apsorbancija na 240 nm svakih 30 s naredna 4 min spektrofotometrom S-30 Boeco (Boeckel Co KG, Hamburg, Nemačka). Aktivnost katalaze računata je prema sledećoj jednačini (16):

$$\text{Aktivnost} = (\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl}) \times V_{uk} / 43,6 \times V_{uz} \times C_p \quad (16)$$

gde je:

ΔA_{uz} – promena apsorbancije uzorka po minutu

ΔA_{sp} – promena apsorbancije slepe probe po minutu

V_{uk} – ukupna zapremina reakcione smeše u μL

V_{uz} – zapremina uzorka u μL
 C_p – koncentracija proteina u mg po mL
6,22 – molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH ($43,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Aktivnost katalaze izražena je kao jedinica aktivnosti po miligramu proteina.

3.9. Određivanje citotoksične aktivnosti

Za potrebe ovog eksperimenta korišćene su četiri kancerske ćelijske linije:

- A375 – melanomske ćelije;
- HeLa – kancerske ćelije grlića materice;
- PANC-1 – kancerske ćelije pankreasa;
- HCT116 – kancerske ćelije creva.

Ćelije rastle su u medijumu DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) u uslovima *in vitro* uz dodatak 10% fetalnog telećeg seruma (Sigma–Aldrich Chemie GmbH), kao i penicilin/streptomycin antibiotske smeše (Sigma–Aldrich Chemie GmbH) u vlažnim uslovima, pri 5% koncentraciji CO_2 na 37°C (Heraeus, Hanau, Germany).

Za potrebe eksperimenta ćelije su posejane u mikrotitar ploče sa 96 bunara (Sarstedt, Newton, NC, USA) pri gustini od 2×10^3 . U eksponencijalnoj fazi rasta ćelije su tretirane 5, 10 i 20% zapreminskom koncentracijom analiziranih vina sorte merlo, berba 2011 komercijalno dostupnim vinom, VCR1 i VCR101 vinom.

Citotoksičnost datih koncentracija ispitivanih vina određivana je pomoću SRB testa (engl. *sulforhodamine B assay*), baziranog na merenju koncentracije ukupnih proteina u ćelijama. Naime, ukupni proteini u ćelijama boje se u ružičasto usled elektrostatičke interakcije dve sulfonske grupe negativno naelektrisanog SRB–a i baznih ostataka aminokiselina koje ulaze u sastav proteina. Test je izveden prema metodi Skehan i saradnika, 72 h nakon tretmana vinima [182]. Sloj ćelija u mikrotitar pločicama fiksiran je dejstvom 10% trihlorosirćetne kiseline [engl. *trichloroacetic acid (TCA)*] (Centrohem, Stara Pazova, Serbia) 1 h na $+4^\circ\text{C}$. Nakon fiksiranja mikrotitar ploče su pet puta ispirane vodom i bojene pomoću 0,4% (w/v) rastvora SRB (Sigma–Aldrich Chemie GmbH) u 1% rastvoru sirćetne kiseline 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga, višak boje uklonjen je ispiranjem 1% rastvorom sirćetne kiseline (Centrohem), nakon čega je sledilo sušenje na vazduhu. Boja vezana za proteine rastvorena je sa po 200 μL 10 mM Tris baze (Sigma–Aldrich Chemie GmbH) pH 10,5 u toku 5 min. Apsoorbancija je merena na 550 nm i 690 nm (referentna talasna dužina) pomoću čitača mikrotitar ploča (Wallac, VICTOR² 1420 Multilabel counter, PerkinElmer, Turku, Finland). Vijabilnost ćelija nakon tretmana izražena je u procentima u odnosu na netretirane ćelije.

3.9.1. Odnos GSH/GSSG

Radi utvrđivanja prooksidativnog dejstva crvenog vina na kancerske ćelije, u eksponencijalnoj fazi rasta A375 ćelije su tretirane 5% zapreminskom koncentracijom analiziranih vina sorte merlo, berba 2011, komercijalno dostupnim vinom, VCR1 i VCR101 vinom. Nakon 24-časovne inkubacije melanomskih kancerskih ćelija, ćelije su isprane sa 3 mL hladnog 0,1 M fosfatnog pufera pH 7,4. Nakon toga, ćelije su tripsinizovane sa po 0,5 mL Try-EDTA, 5 min na sobnoj temperaturi i sakupljene u 2 mL hladnog medijuma. Nakon centrifugiranja 3 min na 2000g na sobnoj temperaturi, supernatant je odliven, a talog resuspendovan u 2 mL 0,1 M fosfatnog pufera pH 7,4. Ćelije su ponovo centrifugirane na 4000 g, 10 min i nakon toga resuspendovane u 500 μL

ekstrakcionog pufera (0,1 M kalijum-fosfatni pufer pH 7,5 koji sadrži 5 mM EDTA, 0,1% Triton X-100 i 0,6% sulfosalicilnu kiselinu). Čelije su lizirane na ledu 30 min uz vorteksiranje. Supernatant, dobijen centrifugiranjem na 4000 g, 20 min na 4 °C, sakupljen je u ohlađene tube.

Sadržaji redukovanog i totalnog glutationa određeni su prema metodi Salbitani i saradnika [183] uz modifikacije. Reakciona smeša sadržala je 600 µL, 40 µL 0,4% DTNB i 50 µL ćelijskog ekstrakta/GSH standarda. U uzorku blanka umesto ćelijskog ekstrakta dodato je još 50 µL ekstrakcionog pufera. Nakon inkubacije od 5 min na sobnoj temperaturi izmerena je apsorbancija na 412 nm. Iz očitane apsorbancije sa standardne krive GSH dobijena je koncentracija GSH u reakcionim smešama. Nakon toga u reakcionu smešu je dodato 50 µL 0,4% NADPH i 1 µL 0,5 U glutation reduktaze. Nakon inkubacije od 30 min na sobnoj temperaturi, merena je apsorbancija na 412 nm. Iz očitane apsorbancije sa standardne krive GSH izračunata je koncentracija ukupnog glutationa u reakcionim smešama. Koncentracija GSSG dobijena je oduzimanjem koncentracije GSH od koncentracije ukupnog glutationa.

Radi utvrđivanja prooksidativnog dejstva analiziranih vina, određeni GSH/GSSG odnos u analiziranim uzorcima poređeni su sa GSH/GSSG odnosom u kontroli (netretirane melanomske ćelije).

3.10. Određivanje antibakterijske aktivnosti

Antibakterijska aktivnost analiziranih vina sorte merlo (komercijalno dostupno vinu, vina VCR1 i VCR101, berbe 2010. i 2011.) ispitivana je u odnosu na četiri različita soja Gram-pozitivnih bakterija:

- ATCC 6538 *Staphylococcus aureus*
- ATCC 19404 *Clostridium sporogenes*
- ATCC 9341 *Kocuria rhizophila*
- ATCC 6633 *Bacillus subtilis*

kao i na četiri odabrana soja Gram-negativnih bakterija:

- ATCC 25922 *Escherichia coli*
- ATCC 13315 *Proteus hauseri*
- ATCC 9027 *Pseudomonas aeruginosa*
- ATCC 10031 *Klebsiella pneumoniae*

Od sveže presejanih bakterijskih kultura napravljene su suspenzije u sterilnom fiziološkom rastvoru. Suspenzije su podešene na 0,5 McFarlanda turbidimetrijski, što odgovara koncentraciji od 1×10^8 bakterija/mL. Određivanje vrednosti MIC (engl. *Minimum Inhibitory Concentration*) metodom dvostrukog razblaživanja u mikrotitar ploči urađeno je na sledeći način. Najpre je napravljen hranljivi Mueller Hinton bujon po uputstvu proizvođača (HiMedia, Mumbai, India). U svaki bunar mikrotitar-ploče dodato je po 100 µL bujona. U prvi bunar reda dodato je po 100 µL uzorka vina, a potom je sadržaj dvostruko razblažen do kraja reda, tako da nanete koncentracije vina budu u opsegu od 500 µL/mL do 0,25 µL/mL. Istim postupkom ostatak bunara u mikrotitar-ploči ispunjen je ostalim uzorcima vina, 13% etanolom (kao negativnom kontrolom) i antibiotikom amikacinom (kao pozitivnom kontrolom). U svaki od bunara dodato je po 10 µL odgovarajuće bakterijske kulture i sadržaj u njima termostatiran je 24 h na 37 °C. Nakon termostatiranja, određeni su bunari u kojima ne postoji vidljivi rast bakterijske kulture, praćen merenjem apsorbancije na 620 nm pomoću čitača mikrotitar ploča (Thermo Lab systems, Multiskan EX, Software for Multiscan ver 2,6, Vantos, Finland). Vrednost MIC odgovara koncentraciji vina u onom bunaru u kojem se po prvi put ne javlja rast bakterija.

3.11. Statistička obrada podataka

Statistička analiza dobijenih podataka urađena je korišćenjem softverskog paketa STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Sva merenja su urađena u tri ponavljanja i za sve rezultate merenja je prikazana srednja vrednost sa standardnom devijacijom merenja (SD). Analiza varijansi (ANOVA) i Tukey's HSD test su korišćeni za poređenje srednjih vrednosti merenja dobijenih za različite uzorke vina.

3.11.1. Analiza glavnih komponenti (PCA)

Analiza glavnih komponenta (engl. *Principal Component Analysis*– PCA) predstavlja statističku metodu upotrebljenu kao centralnu alatku u analizi dobijenih rezultata [184]. Radi se o multivarijantnoj metodi u okviru koje se podaci transformišu u ortogonalne komponente - linearne kombinacije originalnih promenljivih. Izvodi se Eigenvalue dekompozicijom podataka korelacionih matriksa [185]. Ova transformacija definisana je tako da prva komponenta ima najveću varijansu. Primenom PCA postiglo se, u stvari, maksimalno razdvajanje među grupama parametara, uz vidljivu međusobnu prostornu povezanost, što sve skupa omogućava diferencijaciju uzoraka [186].

3.11.2. Veštačka neuronska mreža (ANN)

Model ANN (engl. *Artificial Neural Network*) korišćen je kako bi se predvidele vrednosti parametara SP, T-SH, GPx, GR i Cat. Kako bi se sam model ANN poboljšao, ulazni i izlazni podaci su normalizovani. Model MLP (engl. *Multi-Layer Perceptron*), model koji se sastojao od tri sloja (ulazni, skriveni i izlazni), pokazao se kao dobar za aproksimaciju nelinearnih funkcija [187] što, zapravo, opravdava njegov odabir u ovoj studiji. Algoritam BFGS (engl. *Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno*) omogućio je modeliranje modela ANN.

3.11.3. Analiza osetljivosti

Analiza osetljivosti predstavlja sofisticiranu tehniku neophodnu u proučavanju posmatranih efekata ulaznih promenljivih, kao i za analizu nesigurnosti dobijenih modela i ponašanja same mreže. Neuronska mreža ispitivana je datom metodom kako bi se utvrdilo da li i pri kojim uslovima konkretno ista može proizvesti nedovoljno dobro prilagođen sistem [188].

3.11.4. Tačnost modela

Numerička varijacija razvijenih modela testirana je korišćenjem više parametara, konkretno, r^2 (koeficijenta određivanja), χ^2 (redukovani chi-square), MBE (engl. *Mean Bias Error*), RMSE (engl. *Root Mean Square Error*) i MPE (engl. *Mean Percentage Error*). Dati (standardni) parametri mogu se izračunati prema sledećoj jednačini (17):

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (x_{\text{exp},i} - x_{\text{pre},i})^2}{N - n} \quad RMSE = \left[\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N (x_{\text{pre},i} - x_{\text{exp},i})^2 \right]^{1/2}$$

$$MBE = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N (x_{\text{pre},i} - x_{\text{exp},i}) \quad MPE = \frac{100}{N} \cdot \sum_{i=1}^N \left(\frac{|x_{\text{pre},i} - x_{\text{exp},i}|}{x_{\text{exp},i}} \right) \quad (17)$$

gde $x_{\text{exp},i}$ predstavlja eksperimentalno dobijene vrednosti, a $x_{\text{pre},i}$ izračunate vrednosti pomoću odgovarajućeg modela; N je broj merenja, dok se n odnosi na broj konstanti.

IV REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Komercijalno dostupna vina

U ovom odeljku prikazani su rezultati dobijeni analizom hemijskog sastava uzoraka komercijalno dostupnih vina sorti vranac, merlo i kaberne sovinjon, proizvedenih od 2010. do 2012. godine.

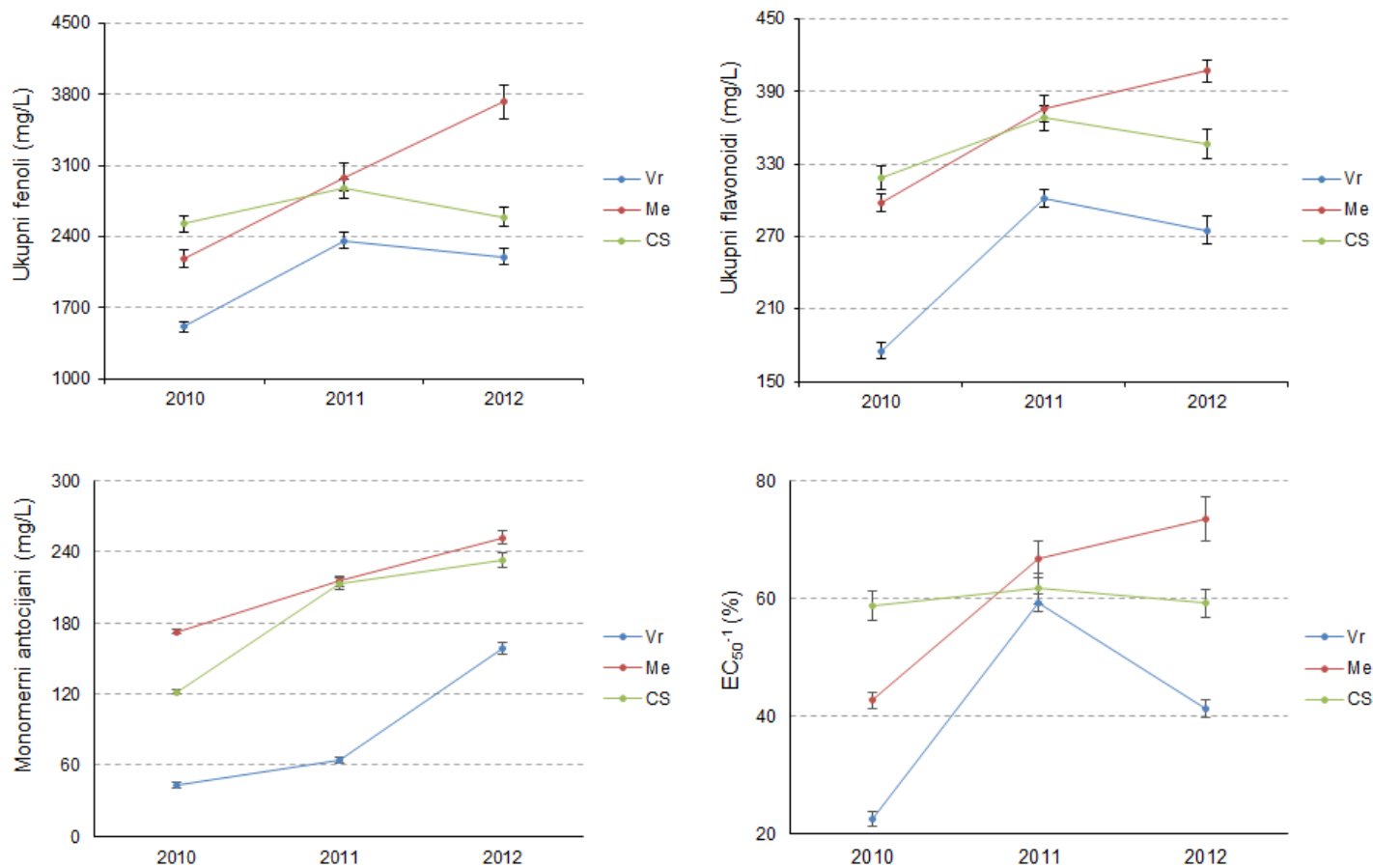
4.1.1. Sadržaji odabranih ukupnih jedinjenja i anti-DPPH radikalska aktivnost

Analizom rezultata spektrofotometrijske analize sadržaja ukupnih fenola, sadržaja ukupnih flavonoida, monomernih antocijana, kao i anti-DPPH radikalske aktivnosti u ispitivanim uzorcima komercijalno dostupnih crvenih vina sorti vranac, merlo i kaberne sovinjon, može se zaključiti da se dobijene vrednosti razlikuju u zavisnosti od sorte vinove loze kao i od godine proizvodnje, tj. klimatskih uslova specifičnih za datu godinu (**Tabela 6, Slika 28**). Rezultati dobijeni za sadržaj ukupnih fenola u sorti vranac pokazuju opseg vrednosti od $1513,0 \pm 54,6$ do $2362,1 \pm 77,6$ mg/L (**Tabela 6, Slika 28**). U okviru merlo i kaberne sovinjon uzoraka koncentracija ukupnih fenola je nešto veća u odnosu na vino sorte vranac i varira u opsegu od $2184,5 \pm 93,7$ do $3730,2 \pm 164,7$ mg/L, u okviru vina merlo sorte i od $2529,4 \pm 80,6$ do $2873,4 \pm 93,2$ mg/L u okviru vina sorte kaberne sovinjon. Slične vrednosti za koncentraciju ukupnih fenola dobijene su u ranijim studijama. Ivanova-Petropulos i saradnici (2015) su objavili opseg vrednosti od 1394 do 3097 mg/L dobijen u vinima sorte vranac poreklom iz Makedonije [189]. U crnogorskim vinima sorte vranac u okviru studije Bogičević i sar. 2015., za sadržaj ukupnih fenola nađene su vrednosti od 1532 do 1842 mg/L, dok su se u vinima kaberne sovinjon sorte vrednosti kretale od 1897 do 2749 mg/L [190]. Koncentracija ukupnih fenola u makedonskim vinima sorte vranac ispitivanih u studiji Ilieva i sar. 2017, u opsegu je vrednosti od 1993 do 2815 mg/L, dok je u okviru vina sorte kaberne sovinjon nađena koncentracija od 1738 do 2720 mg/L [191]. Analizom grčkih vina sorti kaberne sovinjon, Kallithraka i saradnici 2006. godine utvrdili su da je koncentracija ukupnih fenola približno 2481,0 mg/L [192], dok su Gris i saradnici (2013) izmerili sadržaj ukupnih fenola koji se kretao od 2680,4 do 2691,4 mg/L u južno brazilskom vinu iste sorte [193]. U argentinskom vinu sorte merlo Casassa i saradnici (2015) izmerili su približno 2073,0 mg/L ukupnih fenola [194], dok je njihova koncentracija u južno brazilskim vinima iste sorte bila u opsegu vrednosti 2692,1 – 2813,7 mg/L mereno od strane Gris i saradnika (2013) [191].

Tabela 6. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, monomernih antocijana i anti-DPPH radikalska aktivnost analiziranih uzoraka crvenih vina.

Uzorak	Ukupni fenoli (mg/L)	Ukupni flavonoidi (mg/L)	Monomerni antocijani (mg/L)	EC ₅₀ ⁻¹ (%)	
2010	Vr	1513,0 ± 54,6 ^{a,A}	175,2 ± 6,7 ^{a,A}	43,6 ± 2,7 ^{a,A}	22,6 ± 1,2 ^{a,A}
	Me	2184,5 ± 93,7 ^{a,B}	297,8 ± 7,1 ^{a,B}	172,8 ± 2,2 ^{a,C}	42,7 ± 1,4 ^{a,B}
	CS	2529,4 ± 80,6 ^{a,C}	319,0 ± 9,8 ^{a,C}	121,7 ± 1,6 ^{a,B}	58,8 ± 2,5 ^{a,C}
2011	Vr	2362,1 ± 77,6 ^{b,A}	301,5 ± 7,3 ^{c,A}	63,9 ± 2,5 ^{b,A}	59,2 ± 1,5 ^{c,A}
	Me	2988,6 ± 142,2 ^{b,C}	376,0 ± 11,2 ^{b,B}	215,2 ± 4,1 ^{b,B}	66,7 ± 3,1 ^{b,B}
	CS	2873,4 ± 93,2 ^{b,B}	368,3 ± 10,5 ^{b,B}	213,0 ± 4,7 ^{b,B}	61,7 ± 2,7 ^{a,B}
2012	Vr	2204,4 ± 82,3 ^{b,A}	275,4 ± 12,0 ^{b,A}	158,7 ± 4,5 ^{c,A}	41,3 ± 1,6 ^{b,A}
	Me	3730,2 ± 164,7 ^{c,C}	407,0 ± 8,9 ^{c,C}	252,4 ± 5,3 ^{c,C}	73,5 ± 3,7 ^{c,C}
	CS	2593,8 ± 95,0 ^{b,B}	347,3 ± 12,2 ^{b,B}	233,1 ± 5,7 ^{c,B}	59,2 ± 2,4 ^{a,B}

* Vr – vino sorte vranac; Me – vino sorte merlo; CS – vino sorte kaberne sovinjon. Vrednosti za sadržaj ukupnih fenola izražene su u ekvivalentima galne kiseline (mg GAE/L). Vrednosti za sadržaj ukupnih flavonoida izražene su u ekvivalentima rutina (mg RTE/L), dok su vrednosti za sadržaj monomernih antocijana izražene u ekvivalentima cijanidin-3-glukozida. Anti-DPPH radikalska aktivnost izražena je kao EC₅₀⁻¹, vrednost koja predstavlja recipročno razblaženje uzoraka vina sposobne za neutralisanje 50% DPPH*. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (u triplikatu). Različita slova u superskriptu, kod podataka koji se nalaze u istoj koloni, su pokazatelji da se dobijene srednje vrednosti merenja statistički značajno razlikuju, na nivou p < 0,05, prema HSD Tukey-evom testu; mala slova pokazuju statistički značajne različitosti između istih sorti vina različitog godišta, dok se velika slova odnose na statistički značajne različitosti u vrednostima dobijenim za različite sorte vina u okviru istog godišta.



Slika 28. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, monomernih antocijana i anti-DPPH radikalska aktivnost analiziranih uzoraka crvenih vina. Vr – vino sorte vranac; Me – vino sorte merlo; CS – vino sorte kaberne sovinjon

Vina 2010. godišta sorti vranac i merlo, najsiromašnija su u odnosu na koncentraciju ukupnih fenola, koja je značajno manja u odnosu na 2011. i 2012. godinu proizvodnje ($p < 0,001$) (**Tabela 6, Slika 28**). Sličan je slučaj i sa ukupnim flavonoidima i monomernim antocijanima ($p < 0,001$). Poređenjem između CS 2010. i 2011. godišta, može se takođe primetiti i značajno manja koncentracija ukupnih fenola u 2010. godištu ($p < 0,001$). Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorku CS 2010 takođe je znatno manji u odnosu na 2011. ($p < 0,01$), kao i u odnosu na 2012. ($p < 0,05$) godinu proizvodnje. U odnosu na monomerne antocijane uzorak CS 2010 takođe je znatno siromašniji u odnosu na istu sortu vina 2011 i 2012 ($p < 0,001$). Obzirom na veoma značajan uticaj spoljašnjih faktora, prvenstveno temperaturnih klimatskih razlika, broja sunčanih sati i osvetljenosti terena, na stepen fenolne zrelosti grožđa, a samim tim i na fenolni sastav vina primećene razlike u fenolnom sastavu uzoraka nisu slučajne. Naime, čini se da su nepovoljniji meteorološki uslovi (obilne padavine i značajno manji broj sunčanih sati) u 2010. godini usloveli dati hemijski sastav (**Tabela 7**).

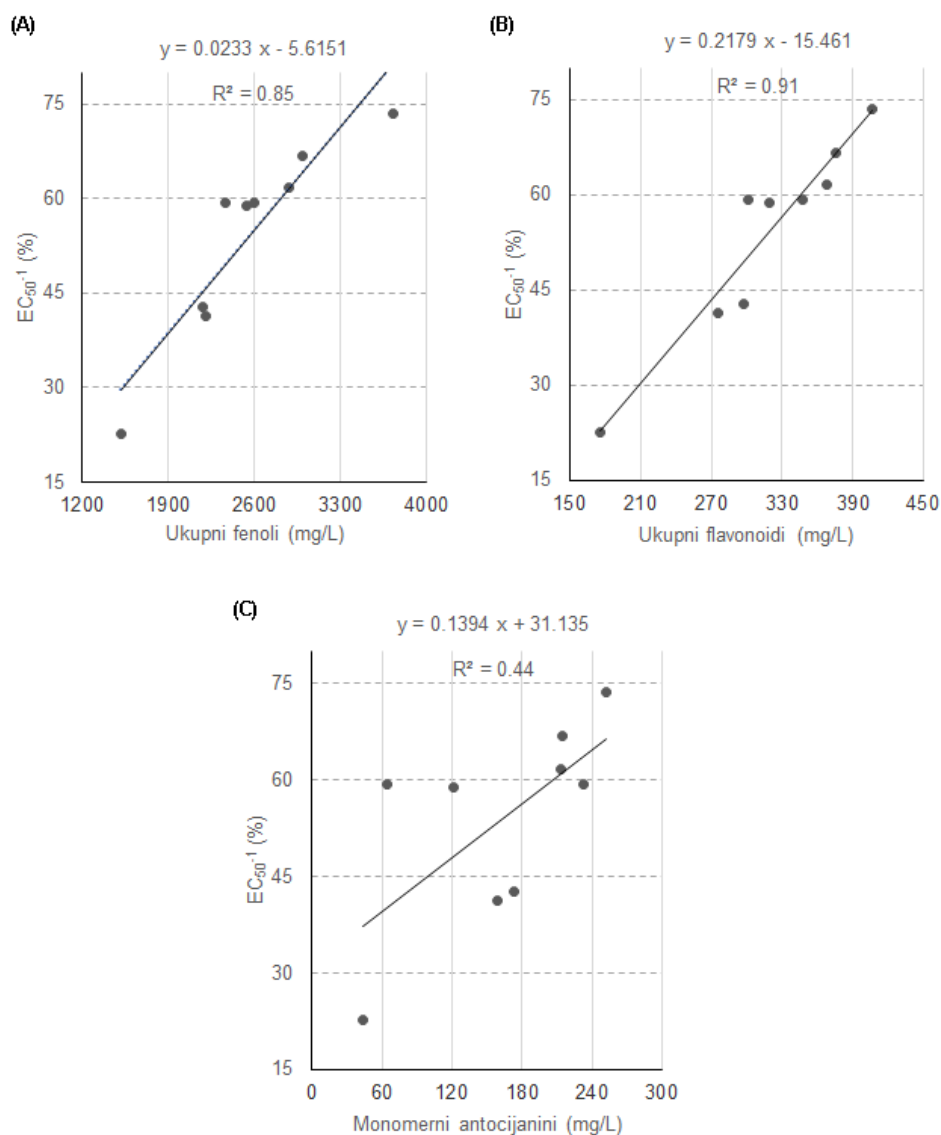
Tabela 7. Ukupna mesečna količina padavina na području opštine Podgorice, Republika Crna Gora, izražena u L/m³

	2010	2011	2012
Januar	273,8	79,5	60,3
Februar	345,9	113,8	200,9
Mart	153,3	100,5	0
April	167,7	44,1	351,2
Maj	115,0	89,5	132,0
Jun	50,8	25,8	33,7
Jul	20,4	31,4	11,3
Avgust	42,1	2,1	0,5
Septembar	101,9	43,3	86,6
Oktobar	297,6	75,6	296,3
Novembar	539,1	37,1	285,8
Decembar	249,3	254,2	305,0
Godišnja suma	2356,9	896,9	1763,6

Može se primetiti da vina sorte merlo 2010. i 2011. godine proizvodnje sadrže znatno manje ukupnih fenola ($p < 0,001$) i imaju znatno manju anti-DPPH radikalsku aktivnost ($p < 0,001$ i $p \leq 0,05$) od vina 2012. godine proizvodnje iste sorte (**Tabela 6**). Isto se odnosi na koncentraciju ukupnih flavonoida ($p < 0,001$ i $p < 0,05$) kao i monomernih antocijana ($p < 0,001$). Anti-DPPH radikalska aktivnost vina sorte vranac značajno je veća u 2011. godištu ($59,2 \pm 1,5\%$), u odnosu na 2010. sa izmerenom vrednošću od $22,6 \pm 1,2\%$ ($p < 0,001$), kao i u odnosu na 2012. godinu sa izmerenom vrednošću od $41,3 \pm 1,6\%$ ($p < 0,001$). Nema sumnje da sorte merlo i kaberne sovinjon sadrže znatno više ukupnih fenolnih jedinjenja ($p < 0,001$ i $p < 0,01$), ukupnih flavonoida ($p < 0,001$) i monomernih antocijana ($p < 0,001$) u odnosu na sortu vranac u sve tri godine proizvodnje. Isto se može primetiti i za anti-DPPH radikalsku aktivnost ($p < 0,05$ i $p < 0,001$). Iz dobijenih rezultata jasno se vidi da je uzorak Me 2012 uzorak sa najvećim sadržajima ukupnih fenola ($3730,2 \pm 164,7$ mg/L), ukupnih flavonoida ($407,0 \pm 8,9$ mg/L) i monomernih antocijana ($252,4 \pm 5,3$ mg/L). Takođe se ističe i kao uzorak sa najvećom anti-DPPH radikalskom aktivnošću ($73,5 \pm 3,7\%$) (**Tabela 6, Slika 28**). U poređenju sa njim uzorak CS 2012 ima značajno manje sve četiri ispitivane hemijske karakteristike. Sa druge strane, u okviru 2010. godišta vino sorte merlo ima značajno manje sadržaje ukupnih fenola ($p < 0,05$) i ukupnih flavonoida ($p < 0,05$) kao i manju anti-DPPH radikalsku aktivnost ($p < 0,001$) u poređenju sa vinom sorte kaberne sovinjon. U slučaju

monomernih antocijana u okviru vina 2010. godišta situacija je obrnuta; maksimalna vrednost je pronađena u uzorku Me 2010 ($172,8 \pm 2,2$ mg/L), znatno više nego u uzorku CS 2010 ($121,7 \pm 1,6$ mg/L) ($p < 0,001$).

Korelacioni odnosi između anti–DPPH radikalske aktivnosti i koncentracije ukupnih fenola, flavonoida i monomernih antocijana ukazuju na doprinos koji date klase jedinjenja imaju u odnosu na anti–DPPH radikalsku aktivnost. Samim tim, može se primetiti da je koncentracija ukupnih fenola u odličnoj pozitivnoj korelaciji sa anti–DPPH radikalskom aktivnošću ($R = 0,85$) (**Slika 29 (A)**). Ovako dobra korelacija je očekivana s obzirom na dobro poznatu sposobnost fenolnih jedinjenja da neutrališu slobodne radikale [25,195]. Slične korelacije su pronađene i publikovane u pređašnjim studijama [190,196]. Takođe, primećena je odlična korelacija između koncentracije ukupnih flavonoida i anti–DPPH radikalske aktivnosti ($R = 0,91$) (**Slika 29 (B)**), ukazujući time na veliki udeo samih flavonoidnih struktura u anti–DPPH radikalskoj odbrani (**Odeljak 2.3.1.**), što je u saglasnosti sa postojećim naučnim publikacijama [37,197,198]. Pozitivna korelacija je uočena i između koncentracije monomernih antocijana i anti–DPPH radikalske aktivnosti ($R = 0,44$) (**Slika 29 (C)**).



Slika 29. Korelacioni dijagrami između anti–DPPH radikalske aktivnosti i: A) sadržaja ukupnih fenola; B) sadržaja ukupnih flavonoida; C) sadržaja monomernih antocijana u ispitivanim uzorcima vina

4.1.2. Fenolni profil

U ispitivanim uzorcima vina detektovano je i kvantifikovano trinaest fenolnih jedinjenja (**Tabela 8, Slika 30**). Najzastupljenija fenolna jedinjenja u svim analiziranim uzorcima su (+)-katehin i galna kiselina, sa najvećim primećenim vrednostima u uzorku Me 2012 (izmereno $43,22 \pm 0,33$ mg/L za koncentraciju (+)-katehina i $28,65 \pm 0,42$ mg/L za koncentraciju galne kiseline). Najveći sadržaj galne kiseline i (+)-katehina u direktnoj je korelaciji sa najvećom izmerenom anti-DPPH radikalskom aktivnošću uzorka Me 2012. Date korelacije nađene su i u prethodnim studijama i ukazuju na direktan doprinos ovih fenolnih jedinjenja antioksidativnoj aktivnosti ispitivanih uzoraka [199,200]. Sadržaj (+)-katehina u uzorku Me 2012 dva do čak četiri puta je veći u poređenju sa ostalim uzorcima. Najmanja vrednost primećena je u uzorku Vr 2010 ($7,41 \pm 0,22$ mg/L) (**Tabela 8, Slika 30**). Takođe je očigledno da sorta vranac u poređenju sa ostale dve sorte vina, u sva tri godišta, ima značajno manji sadržaj (+)-katehina i (-)-epikatehina ($p < 0,001$). Koncentracija galne kiseline je gotovo tri puta veća u Me 2012 ($28,65 \pm 0,42$ mg/L) u poređenju sa uzorkom Me 2010 ($10,23 \pm 0,22$ mg/L) (**Tabela 8, Slika 30**). Meteorološki uslovi u 2010. godini mogu biti razlog takvog rezultata. Opseg vrednosti određenih za koncentraciju (+)-katehina i galne kiseline u analiziranim crvenim vinima u skladu je sa prethodno publikovanim vrednostima [156,191,201–203]. Koncentracija (-)-epikatehina, fenolnog jedinjenja prisutnog u svim analiziranim uzorcima vina, u koncentracijama od $2,96 \pm 0,04$ do $21,74 \pm 0,28$ mg/L, takođe je najveća u uzorku Me 2012 i bar duplo veća u odnosu na koncentraciju u ostalim uzorcima. Sa druge strane, najmanja koncentracija (-)-epikatehina nađena je u uzorku Vr 2012 (**Tabela 8, Slika 30**).

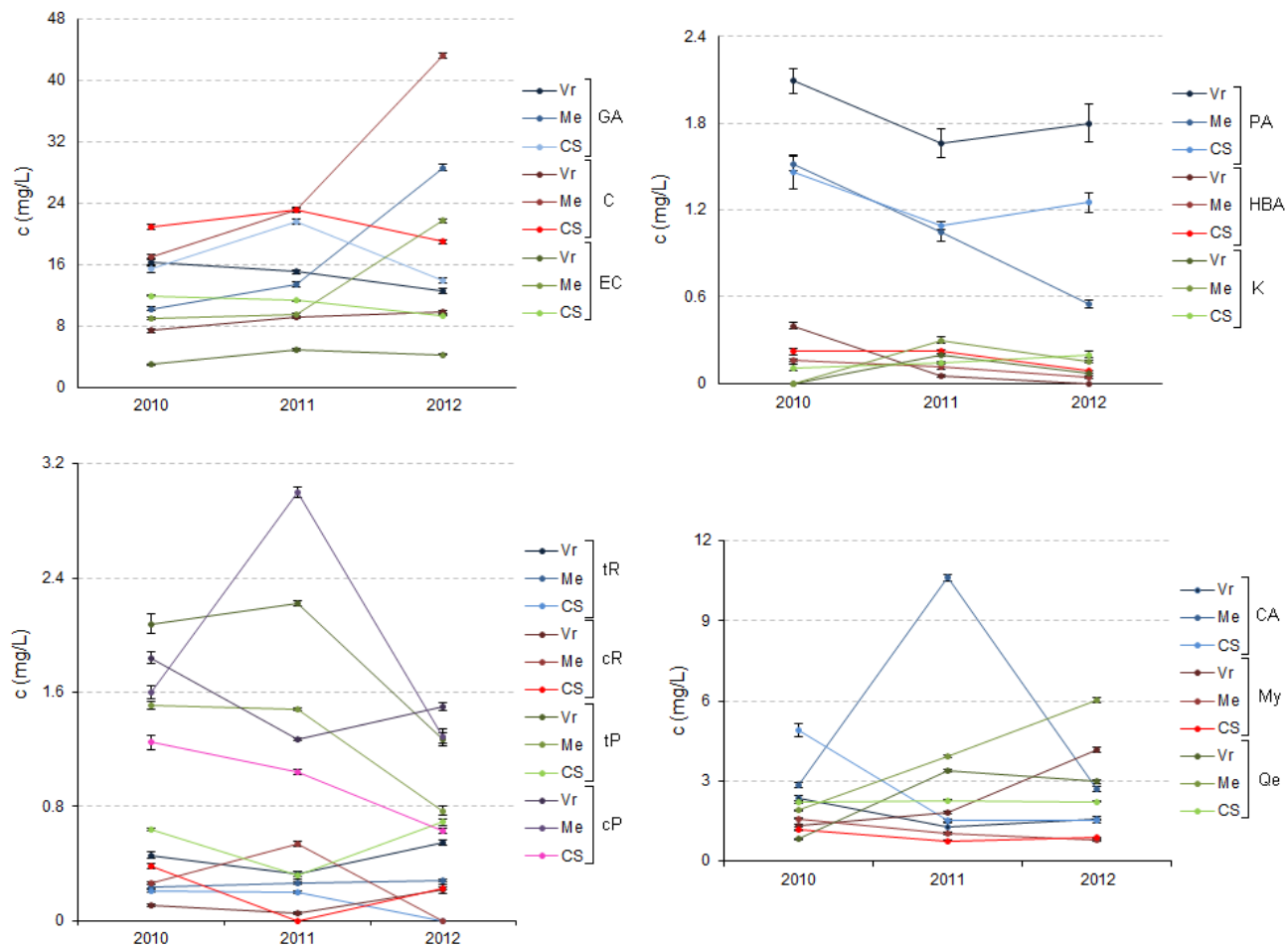
Opseg izmerenih vrednosti za sadržaj kvercetina u okviru analiziranih uzoraka kretao se od $0,82 \pm 0,03$ do $6,03 \pm 0,12$ mg/L. Uzorak Me 2012 i po pitanju datog flavonolnog jedinjenja najbogatiji je uzorak ($6,03 \pm 0,12$ mg/L) (**Tabela 8, Slika 30**). S obzirom da je poznato da hemijska struktura kvercetina obezbeđuje ovom jedinjenju veoma jak antioksidativni potencijal (**Odeljak 2.3.1.2**), i obzirom na to da su prethodne studije ukazale na pozitivnu korelaciju između koncentracije kvercetina i anti-DPPH radikalske aktivnosti [204–206], može se pretpostaviti da ovo jedinjenje direktno utiče na najveću anti-DPPH radikalsku aktivnost uzorka Me 2012. Sa druge strane uzorak Vr 2012 ima maksimalnu izmerenu koncentraciju miricetina ($4,15 \pm 0,10$ mg/L), još jednog pripadnika grupe flavonola (**Tabela 8, Slika 30**). Kafeinska kiselina, derivat hidroksicimetne kiseline, ubedljivo je najzastupljenija u uzorku Me 2011 ($10,63 \pm 0,12$ mg/L) (**Tabela 8, Slika 30**). Ova činjenica još jednom ističe merlo sortu kao vrlo bogatu najzastupljenijim fenolnim jedinjenjima.

Može se uočiti da je u analiziranim uzorcima vina glukozidna forma resveratrola zastupljenija u odnosu na sam resveratrol (**Tabela 8, Slika 30**). Ovakav rezultat je u skladu sa poznatim podatkom da u crvenom vinu piceid može biti i do deset puta zastupljeniji u odnosu na sam resveratrol [85,207]. *Trans*-piceid je najzastupljeniji u uzorku Vr 2011 ($2,22 \pm 0,02$ mg/L), dok je sadržaj *cis*-piceida najveći u uzorku Me 2011 ($3,00 \pm 0,04$ mg/L). Iz dobijenih rezultata takođe se može primetiti da vina iz 2011. i 2012. godine proizvodnje sve tri sorte (izuzev uzorka Me 2011) imaju manje ukupnog sadržaja oba izomera piceida (*cis* i *trans*) u odnosu na vina iz 2010. godine proizvodnje. Obzirom na fitoaleksinsku prirodu resveratrola ovakav rezultat je u skladu sa najvećom količinom padavina 2010. godine (**Tabela 7**).

Tabela 8. Koncentracija fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima vina određena metodom LC-MS/MS

Fenolno jedinjenje	2010			2011			2012		
	Vr	Me	CS	Vr	Me	CS	Vr	Me	CS
	(mg/L)								
galna kiselina	16,41 ± 0,41 ^{c,C}	10,23 ± 0,22 ^{a,A}	15,39 ± 0,36 ^{b,B}	15,10 ± 0,28 ^{b,B}	13,39 ± 0,34 ^{b,A}	21,59 ± 0,35 ^{c,C}	12,58 ± 0,32 ^{a,A}	28,65 ± 0,42 ^{c,C}	13,94 ± 0,26 ^{a,B}
protokatehuinska kiselina	2,09 ± 0,09 ^{b,C}	1,52 ± 0,05 ^{c,B}	1,46 ± 0,12 ^{b,A}	1,66 ± 0,10 ^{a,C}	1,05 ± 0,07 ^{b,A}	1,09 ± 0,03 ^{ac,B}	1,80 ± 0,13 ^{a,C}	0,55 ± 0,03 ^{a,A}	1,25 ± 0,07 ^{bc,B}
4-hidroksibenzojeva kiselina	0,40 ± 0,02 ^{b,A}	0,16 ± 0,01 ^{a,B,C}	0,22 ± 0,02 ^{a,A,C}	0,05 ± 0,01 ^{a,A}	0,12 ± 0,02 ^{a,A}	0,22 ± 0,01 ^{a,A}	ND	0,04 ± 0,01 ^{a,A}	0,09 ± 0,00 ^{a,A}
kafeinska kiselina	2,34 ± 0,10 ^{b,A}	2,85 ± 0,11 ^{a,B}	4,91 ± 0,25 ^{b,C}	1,25 ± 0,16 ^{a,A}	10,63 ± 0,12 ^{b,B}	1,51 ± 0,04 ^{a,A}	1,59 ± 0,07 ^{a,B}	2,70 ± 0,11 ^{a,C}	1,50 ± 0,06 ^{a,A}
(+)-katehin	7,41 ± 0,22 ^{a,A}	16,98 ± 0,36 ^{a,B}	20,88 ± 0,33 ^{b,C}	9,17 ± 0,22 ^{b,A}	23,10 ± 0,21 ^{b,B}	23,14 ± 0,28 ^{b,C}	9,85 ± 0,13 ^{b,A}	43,22 ± 0,33 ^{c,B}	19,00 ± 0,26 ^{a,C}
(-)-epikatehin	2,96 ± 0,04 ^{a,A}	9,04 ± 0,15 ^{a,B}	11,96 ± 0,10 ^{c,C}	4,97 ± 0,19 ^{c,A}	9,46 ± 0,23 ^{a,B}	11,33 ± 0,11 ^{b,C}	4,29 ± 0,10 ^{b,A}	21,74 ± 0,28 ^{b,C}	9,41 ± 0,15 ^{a,B}
<i>trans</i> -resveratrol	0,46 ± 0,02 ^{b,C}	0,24 ± 0,01 ^{a,B}	0,21 ± 0,01 ^{a,A}	0,33 ± 0,02 ^{a,C}	0,26 ± 0,01 ^{a,B}	0,20 ± 0,01 ^{a,A}	0,55 ± 0,02 ^{c,B}	0,28 ± 0,01 ^{b,A}	ND
<i>cis</i> -resveratrol	0,11 ± 0,01 ^{b,A}	0,26 ± 0,01 ^{a,B}	0,38 ± 0,02 ^{b,C}	0,05 ± 0,01 ^{a,A}	0,54 ± 0,02 ^{b,B}	ND	0,22 ± 0,03 ^{c,A}	ND	0,23 ± 0,01 ^{a,A}
<i>trans</i> -piceid	2,08 ± 0,07 ^{b,C}	1,51 ± 0,03 ^{a,B}	0,64 ± 0,01 ^{b,A}	2,22 ± 0,02 ^{c,C}	1,48 ± 0,01 ^{b,B}	0,32 ± 0,03 ^{a,A}	1,27 ± 0,05 ^{a,C}	0,77 ± 0,03 ^{a,B}	0,69 ± 0,02 ^{b,A}
<i>cis</i> -piceid	1,84 ± 0,04 ^{c,C}	1,60 ± 0,05 ^{a,B}	1,25 ± 0,05 ^{c,A}	1,27 ± 0,01 ^{a,B}	3,00 ± 0,04 ^{c,C}	1,04 ± 0,02 ^{b,A}	1,50 ± 0,03 ^{b,C}	1,29 ± 0,05 ^{a,B}	0,63 ± 0,02 ^{a,A}
miricetin	1,32 ± 0,05 ^{a,B}	1,59 ± 0,01 ^{c,C}	1,16 ± 0,01 ^{b,A}	1,81 ± 0,03 ^{b,C}	1,02 ± 0,05 ^{b,B}	0,75 ± 0,01 ^{a,A}	4,15 ± 0,10 ^{c,C}	0,76 ± 0,02 ^{a,A}	0,86 ± 0,01 ^{a,B}
kvercetin	0,82 ± 0,03 ^{a,A}	1,89 ± 0,01 ^{a,B}	2,19 ± 0,04 ^{a,C}	3,37 ± 0,05 ^{c,B}	3,92 ± 0,07 ^{b,C}	2,27 ± 0,02 ^{a,A}	2,98 ± 0,07 ^{b,B}	6,03 ± 0,12 ^{c,C}	2,22 ± 0,03 ^{a,A}
kempferol	ND	ND	0,11 ± 0,02 ^a	0,20 ± 0,01 ^{b,A}	0,30 ± 0,02 ^{b,B}	0,14 ± 0,01 ^{a,A}	0,07 ± 0,00 ^{a,A}	0,15 ± 0,01 ^{a,B}	0,20 ± 0,02 ^{b,C}

*ND – nije detektovano; Vr – vino sorte vranac; Me – vino sorte merlo; CS – vino sorte kaberne sovignon. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (u triplikatu). Različita slova u superskriptu, kod podataka koji se nalaze u istom redu, su pokazatelji da se dobijene srednje vrednosti merenja statistički značajno razlikuju, na nivou $p < 0,05$, prema HSD Tukey-evom testu; mala slova pokazuju statistički značajne različitosti u dobijenim vrednostima merenja između istih sorti vina različitog godišta, dok se velika slova odnose na statistički značajne različitosti u vrednostima dobijenim za različite sorte vina u okviru istog godišta.



Slika 30. Sadržaj fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima vina određen metodom LC-MS/MS. Vr – vino sorte vranac; Me – vino sorte merlo; CS – vino sorte kaberne sovinjon; GA – galna kiselina; PA – protokatehuinska kiselina; HBA – 4-hidroksibenzoeva kiselina; CA – kafeinska kiselina; C – (+)-katehin; EC – (-)-epikatehin; tR – *trans*-resveratrol; cR – *cis*-resveratrol; tP – *trans*-piceid; cP – *cis*-piceid; My – miricetin, Qe – kvercetin; K – kempferol.

4.1.3. Elementalni profil

U svim analiziranim uzorcima crvenog vina pronađen je visok odnos koncentracija K i Na što je veoma važno za normalno funkcionisanje kardiovaskularnog sistema kod ljudi (**Tabela 10, Slika 31**) (**Odeljak 2.4**). Najveći odnos ova dva elementa nađen je u uzorku CS 2010, usled očigledno najvećeg sadržaja K (803 ± 8 mg/L) (**Tabela 10, Slika 31**). Najveća koncentracija Ca nađena je u uzorku Vr 2010 ($63,1 \pm 0,7$ mg/L), dok je uzorak CS 2010 najbogatiji sadržajem Mg ($80,6 \pm 0,5$ mg/L). Obzirom da su ovo elementi esencijalni za pravilan rast i razvoj ljudi, konzumiranje 1–2 čaše analiziranih vina dnevno značajno doprinosi preporučenom dnevnom unosu pomenutih elemenata (**Tabela 9**) [208,209].

Tabela 9. Preporučeni dnevni unos elemenata

Elementi	RDA (mg/dan) ^a
K	2000
Ca	800
Mg	375
Fe	14
Zn	10
Cu	1
Mn	2
Se	55
Cr	40
Na	1500 ^b

^a Preporučeni dnevni unos od strane Komisije Evropske Unije

^b Preporučeni dnevni unos od strane EFSA 2005 (engl. *European Food Safety Authority*)

Vrlo je važno imati na umu da prisustvo pojedinih elemenata u koncentracijama većim nego što je dozvoljeno može dovesti do kvarenja vina. Ova studija je pokazala da je koncentracija Fe, najzastupljenijeg mikroelementa u analiziranim uzorcima, značajno ispod 6 mg/L, što se smatra minimalnom koncentracijom pri kojoj može doći do stvaranja zamućenja vina uzrokovanog gvožđem [94]. Isti je slučaj sa Cu, čija koncentracija ispod 1 mg/L onemogućava kvarenje vina usled povećane koncentracije Cu [210]. Obzirom na prooksidativnu ulogu Cu pri dozama iznad 1 mg/L (**Odeljak 2.4.**) [210,211], manja koncentracija od date, koja je nađena u svim analiziranim uzorcima, ukazuje na netoksičan nivo Cu u njima [13,64]. Iako je Zn element koji je vrlo važan za rast biljaka kao i za imuni sistem ljudi (**Odeljak 2.4.**), pri većim dozama može biti toksičan [212]. U svim analiziranim uzorcima nađena je koncentracija Zn u skladu sa vrednostima dozvoljenim od strane OIV (ispod 5 mg/L) [211], što isključuje i mogućnost neželjenog delovanja povećane koncentracije Zn na aromu i ukus vina. Uzorak Me 2012 je uzorak sa najvećim sadržajem Fe (2186 ± 4 µg/L), Zn ($1114,7 \pm 0,8$ µg/L), Mn ($752,0 \pm 0,4$ µg/L) i Al ($1172,3 \pm 2,5$ µg/L), dok je sadržaj Cu znatno veći u uzorcima Vr 2010 ($375,1 \pm 0,5$ µg/L) i Me 2012 ($267,3 \pm 1,7$ µg/L) u poređenju sa svim ostalim uzorcima (**Tabela 10, Slika 31**). Premda je poznato da su Fe, Cu i Zn elementi važni za funkcionisanje proteina uključenih u transfer elektrona (**Odeljak 2.4.**) jasno je da je unos ovih elemenata neophodan za održanje redoks balansa u organizmu [213]. Izmerene koncentracije Fe, Cu, Mn i Zn u analiziranim vinima u skladu su sa prethodno dobijenim vrednostima u hrvatskim i češkim crvenim vinima [214,215]. Konzumiranjem 1–2 čaše ovih vina na dan dati elementi se u organizam unose u okviru preporučenog dnevnog unosa (**Tabela 9**) [208]. Još jedan od esencijalnih elemenata crvenih vina, Se, kvantifikovan je u većini analiziranih uzoraka. Naučna komisija za hranu u evropskoj uniji postavila je populacioni preporučeni unos Se od 55 µg/dan (**Tabela 9**)

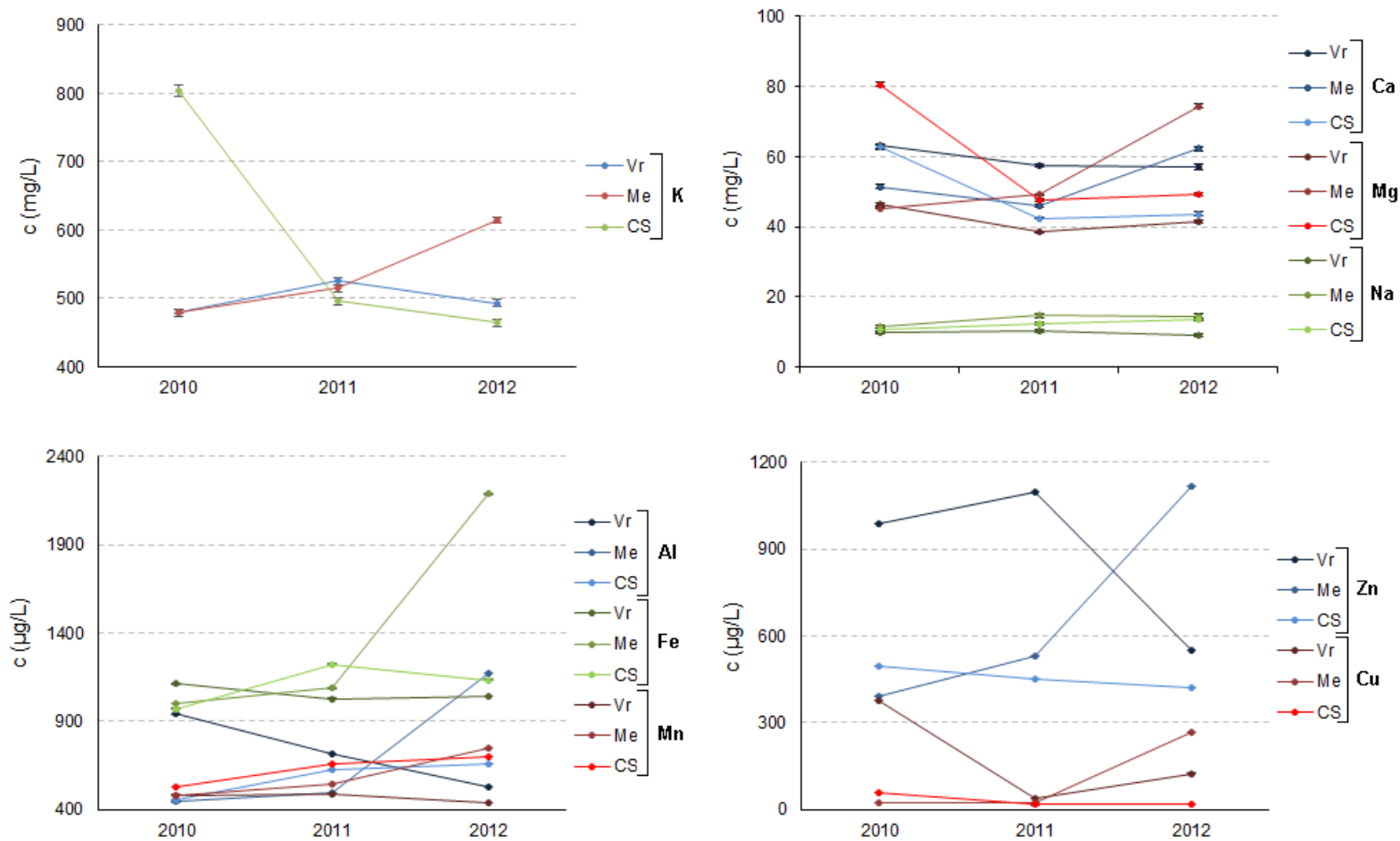
[206]. Uzorak vina najbogatiji selenom je Me 2011 ($5,16 \pm 0,30 \mu\text{g/L}$), dok se takođe može primetiti da je jedini uzorak sorte CS koji sadrži Se, CS 2011 (**Tabela 11, Slika 32**).

Vrednosti dobijene za koncentraciju teških metala As, Cd i Pb u ovoj studiji su ispod granica toksičnosti naznačenih od strane evropske direktive kao i od strane OIV [92] (0,20 mg/L za As, 0,01 mg/L za Cd i 0,15 mg/L za Pb). Ova činjenica je veoma važna u smislu njihovog bezbednog unosa, obzirom da u višku mogu poremetiti redoks ravnotežu u organizmu [216]. Koncentracije elemenata prisutnih u tragovima, Cr, Ni, Co i V u analiziranim uzorcima u okviru su ranije publikovanih vrednosti [214,215]. Na osnovu dobijenih rezultata merenja takođe se može zaključiti da je koncentracija potencijalno toksičnih elemenata (Pb, As, Cd, Ni, Sb) daleko ispod određenih granica, pri čemu je uzet u obzir unos datih elemenata (TDI, TWI, PTWI i BMDL₀₁) u okviru preporučene dnevne doze (1–2 čaše) vina (**Tabela 12**).

Tabela 10. Sadržaj makro- i mikroelemenata u analiziranim uzorcima vina, određen metodama ICP-OES i ICP-MS

Uzorak	MAKROELEMENTI (mg/L)				MIKROELEMENTI (µg/L)					
	Ca	K	Mg	Na	Al	Fe	Mn	Zn	Cu	
2010	Vr	63,1 ± 0,7 ^{b,B}	479 ± 5 ^{a,A}	46,4 ± 0,3 ^{c,A}	9,8 ± 0,3 ^{a,A}	939,8 ± 1,2 ^{c,C}	1113 ± 3 ^{c,C}	483,8 ± 0,4 ^{b,B}	988,3 ± 0,7 ^{b,C}	375,1 ± 0,5 ^{c,C}
	Me	51,5 ± 0,6 ^{b,A}	480 ± 3 ^{a,A}	45,3 ± 0,2 ^{a,A}	11,7 ± 0,4 ^{a,BC}	443,5 ± 0,8 ^{a,A}	1001 ± 2 ^{a,B}	477,3 ± 0,4 ^{a,A}	390,3 ± 0,4 ^{a,A}	24,4 ± 0,7 ^{a,A}
	CS	62,6 ± 0,7 ^{b,B}	803 ± 8 ^{c,B}	80,6 ± 0,5 ^{c,B}	10,6 ± 0,4 ^{a,AC}	452,1 ± 0,7 ^{a,B}	971 ± 2 ^{a,A}	529,1 ± 0,5 ^{a,C}	496,2 ± 0,4 ^{c,B}	57,7 ± 0,5 ^{b,B}
2011	Vr	57,5 ± 0,4 ^{a,C}	525 ± 6 ^{b,B}	38,5 ± 0,3 ^{a,A}	10,3 ± 0,4 ^{ac,A}	715,8 ± 0,8 ^{b,C}	1027 ± 3 ^{a,A}	491,2 ± 0,4 ^{c,A}	1095,6 ± 0,7 ^{c,C}	38,6 ± 0,4 ^{a,C}
	Me	45,8 ± 0,4 ^{a,B}	515 ± 5 ^{b,B}	49,2 ± 0,2 ^{b,C}	14,7 ± 0,5 ^{b,C}	495,5 ± 0,5 ^{b,A}	1088 ± 4 ^{b,B}	545,7 ± 0,5 ^{b,B}	531,4 ± 0,4 ^{b,B}	22,9 ± 0,4 ^{a,B}
	CS	42,4 ± 0,3 ^{a,A}	496 ± 5 ^{b,A}	47,7 ± 0,3 ^{a,B}	12,3 ± 0,3 ^{b,B}	629,4 ± 0,5 ^{b,B}	1223 ± 3 ^{c,C}	655,4 ± 0,5 ^{b,C}	449,8 ± 0,5 ^{b,A}	16,6 ± 0,7 ^{a,A}
2012	Vr	57,1 ± 0,7 ^{a,B}	493 ± 6 ^{a,B}	41,4 ± 0,5 ^{b,A}	9,1 ± 0,3 ^{ab,A}	530,6 ± 0,6 ^{a,A}	1041 ± 2 ^{b,A}	440,3 ± 0,3 ^{a,A}	551,7 ± 0,5 ^{a,B}	124,9 ± 1,5 ^{b,B}
	Me	62,2 ± 0,5 ^{c,C}	614 ± 5 ^{b,C}	74,4 ± 0,5 ^{c,C}	14,6 ± 0,5 ^{b,C}	1172,3 ± 2,5 ^{c,C}	2186 ± 4 ^{c,C}	752,0 ± 0,4 ^{c,C}	1114,7 ± 0,8 ^{c,C}	267,3 ± 1,7 ^{b,C}
	CS	43,7 ± 0,5 ^{a,A}	464 ± 5 ^{a,A}	49,3 ± 0,5 ^{b,B}	13,4 ± 0,4 ^{b,B}	658,4 ± 0,7 ^{c,B}	1134 ± 3 ^{b,B}	700,5 ± 0,5 ^{c,B}	419,3 ± 0,5 ^{a,A}	17,7 ± 0,5 ^{a,A}

* Vr – vino sorte vranac; Me – vino sorte merlo; CS – vino sorte kaberne sovinjon. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (u triplikatu). Različita slova u superskriptu, kod podataka koji se nalaze u istoj koloni, su pokazatelji da se dobijene srednje vrednosti merenja statistički značajno razlikuju, na nivou $p < 0,05$, prema HSD Tukey-evom testu; mala slova pokazuju statistički značajne različitosti u dobijenim vrednostima merenja između istih sorti vina različitog godišta, dok se velika slova odnose na statistički značajne različitosti u vrednostima dobijenim za različite sorte vina u okviru istog godišta.

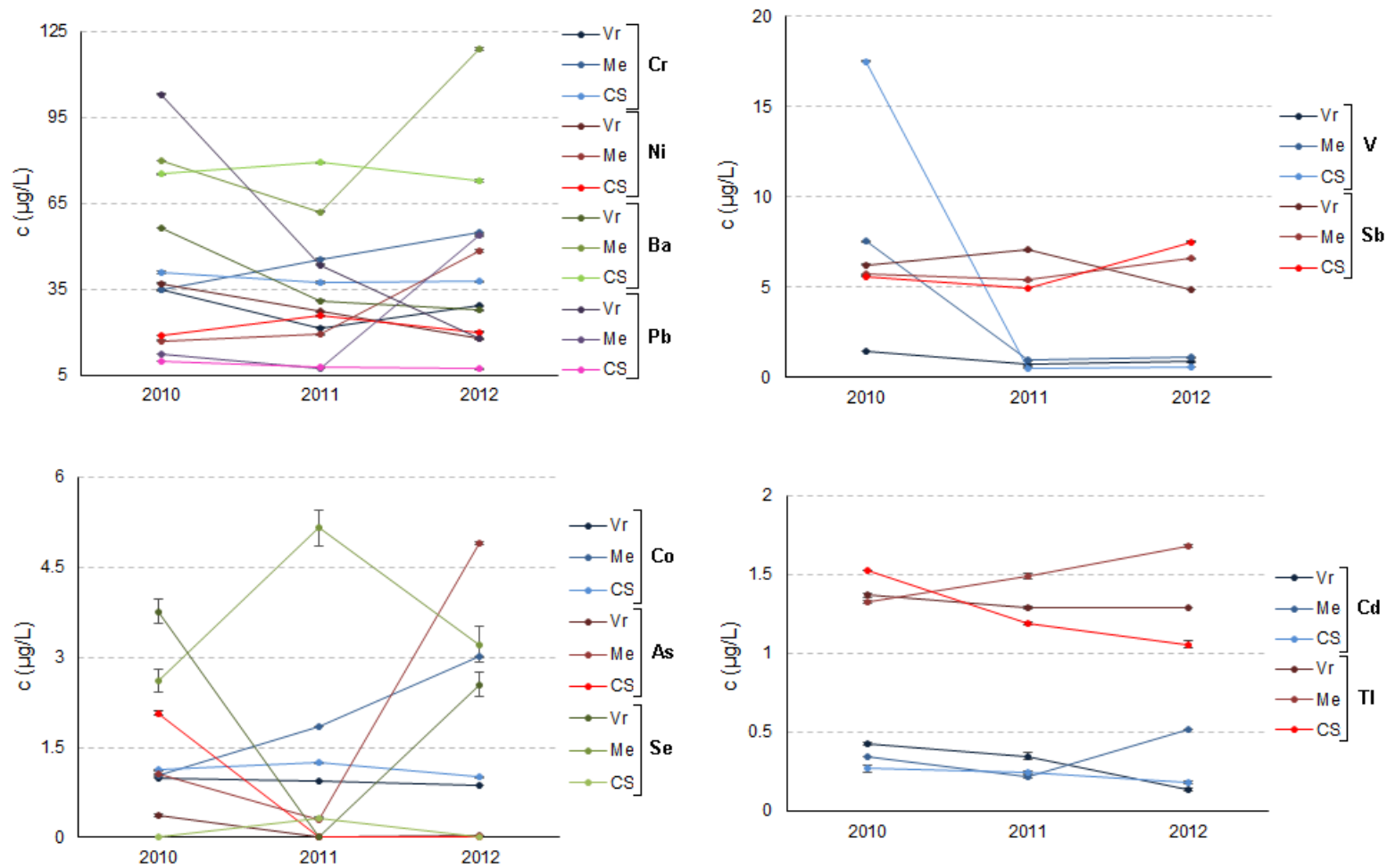


Slika 31. Sadržaj makro- i mikroelemenata u analiziranim uzorcima vina, određen metodama ICP-OES i ICP-MS. Vr – vino sorte vranac; Me – vino sorte merlo; CS – vino sorte kaberne sovinjon

Tabela 11. Sadržaj elemenata prisutnih u tragovima u analiziranim uzorcima vina, određen pomoću metode ICP-MS.

Uzorak	ELEMENTI U TRAGOVIMA											
	V	Cr	Ni	Co	As	Se	Cd	Sb	Ba	Tl	Pb	
2010	Vr	1,44 ± 0,02 ^{a,A}	34,6 ± 0,2 ^{c,A}	37,0 ± 0,3 ^{c,C}	0,99 ± 0,00 ^{c,A}	0,37 ± 0,02 ^{b,A}	3,77 ± 0,20 ^{a,A}	0,43 ± 0,01 ^{c,C}	6,23 ± 0,03 ^{b,C}	56,2 ± 0,1 ^{c,A}	1,37 ± 0,01 ^{b,B}	102,9 ± 0,2 ^{c,C}
	Me	7,53 ± 0,02 ^{c,B}	34,6 ± 0,2 ^{a,A}	16,9 ± 0,2 ^{a,A}	1,04 ± 0,01 ^{a,B}	1,06 ± 0,04 ^{b,B}	2,61 ± 0,20 ^{a,A}	0,35 ± 0,00 ^{b,B}	5,73 ± 0,03 ^{b,B}	79,8 ± 0,2 ^{b,C}	1,33 ± 0,01 ^{a,A}	12,2 ± 0,1 ^{b,B}
	CS	17,49 ± 0,05 ^{b,C}	40,8 ± 0,3 ^{b,B}	18,8 ± 0,2 ^{a,B}	1,12 ± 0,01 ^{b,C}	2,07 ± 0,04 ^C	ND	0,27 ± 0,02 ^{b,A}	5,59 ± 0,02 ^{b,A}	75,1 ± 0,1 ^{b,B}	1,53 ± 0,00 ^{c,C}	9,9 ± 0,1 ^{b,A}
2011	Vr	0,70 ± 0,02 ^{a,B}	21,5 ± 0,2 ^{a,A}	27,1 ± 0,3 ^{b,C}	0,93 ± 0,00 ^{b,A}	ND	ND	0,35 ± 0,02 ^{b,C}	7,06 ± 0,03 ^{c,C}	31,0 ± 0,3 ^{b,A}	1,29 ± 0,01 ^{a,B}	43,4 ± 0,2 ^{b,C}
	Me	0,94 ± 0,03 ^{a,C}	45,5 ± 0,2 ^{b,C}	19,2 ± 0,2 ^{b,A}	1,85 ± 0,01 ^{b,C}	0,30 ± 0,01 ^a	5,16 ± 0,30 ^{b,B}	0,22 ± 0,01 ^{a,A}	5,38 ± 0,02 ^{a,B}	61,9 ± 0,2 ^{a,B}	1,49 ± 0,02 ^{b,C}	7,2 ± 0,1 ^{a,A}
	CS	0,53 ± 0,02 ^{a,A}	37,5 ± 0,5 ^{a,B}	25,7 ± 0,3 ^{c,B}	1,24 ± 0,01 ^{c,B}	ND	0,33 ± 0,02 ^A	0,25 ± 0,01 ^{a,B}	4,93 ± 0,01 ^{a,A}	79,2 ± 0,2 ^{c,C}	1,19 ± 0,01 ^{b,A}	7,6 ± 0,1 ^{a,B}
2012	Vr	0,86 ± 0,03 ^{b,B}	29,1 ± 0,2 ^{b,A}	17,6 ± 0,2 ^{a,A}	0,86 ± 0,00 ^{a,A}	0,03 ± 0,01 ^{a,A}	2,55 ± 0,20 ^{a,A}	0,14 ± 0,01 ^{a,A}	4,86 ± 0,01 ^{a,A}	27,6 ± 0,1 ^{a,A}	1,29 ± 0,00 ^{a,B}	17,7 ± 0,3 ^{a,B}
	Me	1,10 ± 0,06 ^{b,C}	54,6 ± 0,3 ^{c,C}	48,1 ± 0,5 ^{c,C}	3,01 ± 0,02 ^{c,C}	4,90 ± 0,02 ^{c,B}	3,22 ± 0,30 ^{a,A}	0,52 ± 0,00 ^{c,C}	6,58 ± 0,03 ^{c,B}	118,8 ± 0,3 ^{c,C}	1,68 ± 0,01 ^{c,C}	53,7 ± 0,3 ^{c,C}
	CS	0,58 ± 0,02 ^{a,A}	37,6 ± 0,3 ^{a,B}	20,0 ± 0,2 ^{b,B}	1,01 ± 0,01 ^{a,B}	ND	ND	0,18 ± 0,01 ^{a,B}	7,49 ± 0,03 ^{c,C}	72,8 ± 0,3 ^{a,B}	1,06 ± 0,02 ^{a,A}	7,2 ± 0,2 ^{a,A}

*ND – nije detektovano; Vr – vino sorte vranac; Me – vino sorte merlo; CS – vino sorte kaberne sovinjon. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (u triplikatu). Različita slova u superskriptu, kod podataka koji se nalaze u istoj koloni, su pokazatelji da se dobijene srednje vrednosti merenja statistički značajno razlikuju, na nivou $p < 0,05$, prema HSD Tukey-evom testu; mala slova pokazuju statistički značajne različitosti u dobijenim vrednostima merenja između istih sorti vina različitog godišta, dok se velika slova odnose na statistički značajne različitosti u vrednostima dobijenim za različite sorte vina u okviru istog godišta.



Slika 32. Sadržaj elemenata prisutnih u tragovima u analiziranim uzorcima vina, određen pomoću metode ICP-MS. Vr – vino sorte vranac; Me – vino sorte merlo; CS – vino sorte kaberne sovinjon

Tabela 12. Dozvoljeni unos (TDI, TWI, PTWI i BMDL₀₁) potencijalno toksičnih elemenata.

Potencijalno toksični element			Referenca
Pb	PTWI	0,025	EFSA, 2010 [217]
	BMDL ₀₁	1,5	
As	PTWI	0,015	EFSA, 2009 [218]
	BMDL ₀₁	0,3	
	BMDL ₀₁	8	
Cd	TWI	2,5	EFSA, 2012 [219]
Ni	TDI	22	WHO, 2005 [220]
Sb	TDI	6	WHO, 2003 [221]

*PTWI (engl. *Provisional Tolerable Weekly Intake*) je izražen u mg po kg telesne mase nedeljno, BMDL₀₁ (engl. *Benchmark Dose Lower confidence limit*) je izražen u µg po kg telesne mase dnevno, TWI (engl. *Tolerable Weekly Intake*) je izražen u µg po kg telesne mase nedeljno, TDI (engl. *Tolerable Daily Intake*) je izražen u µg po kg telesne mase dnevno.

4.2. Klonska sortna vina vranac

U ovom odeljku prikazani su rezultati dobijeni hemijskom analizom uzoraka vina sorte vranac, proizvedenih od 2010. do 2012. godine, kako komercijalno dostupnih, tako i vina dobijenih od autohtonih klonova (CI, CII i CIII) vinove loze date sorte.

4.2.1. Sadržaj odabranih ukupnih jedinjenja i anti-DPPH radikalska aktivnost

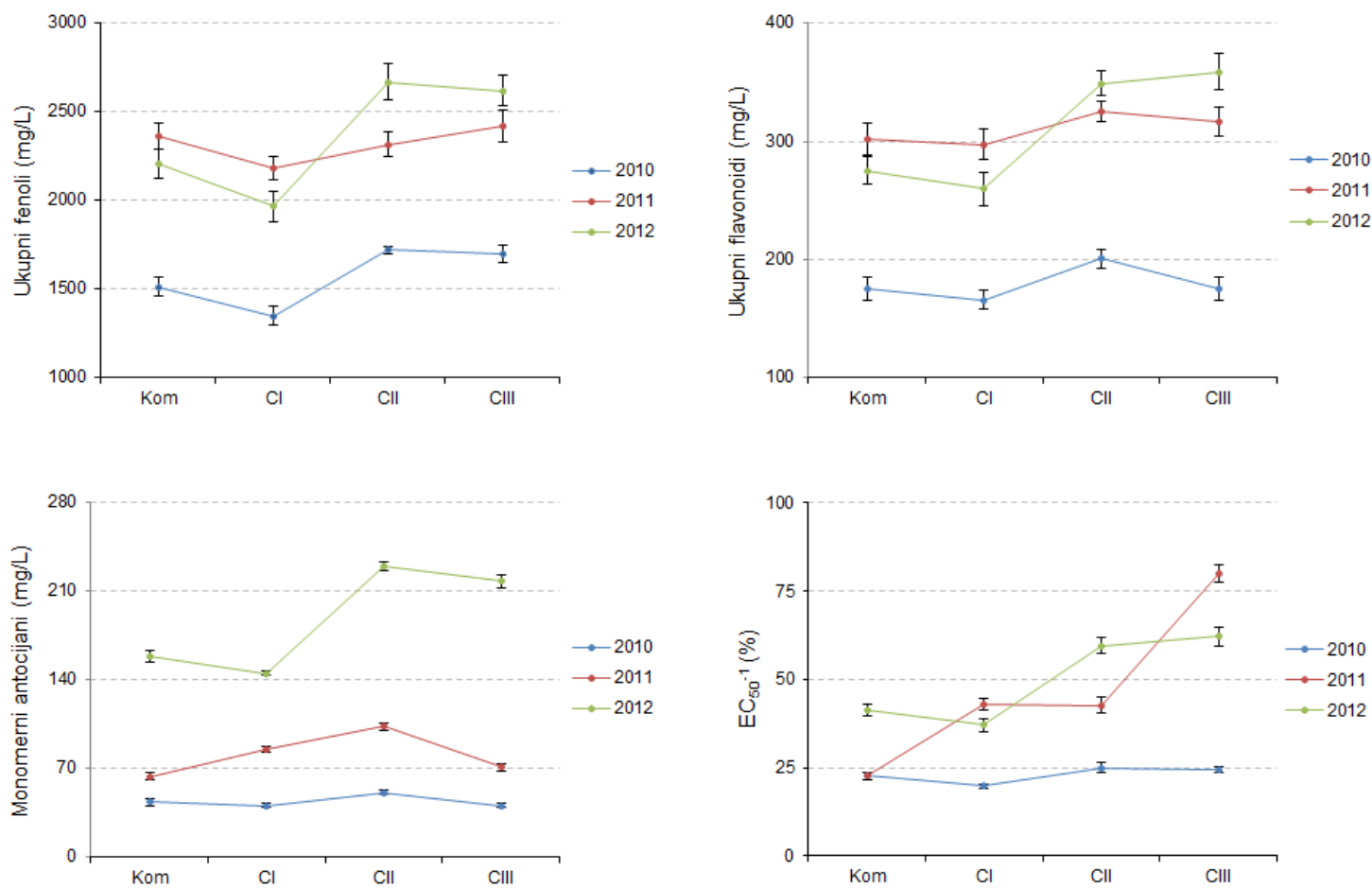
Iz dobijenih rezultata zaključeno je da su sva četiri analizirana uzorka vina iz 2010. godine siromašnija u sadržaju ukupnih fenola, flavonoida kao i monomernih antocijana u odnosu na vina istih vrsta iz 2011. i 2012. godine (**Tabela 13, Slika 33**). Isti je slučaj i sa anti-DPPH radikalskom aktivnošću, što se i očekivalo s obzirom da je u korelaciji sa koncentracijom ukupnih fenola, izuzev uzoraka Kom 2010 i Kom 2011 koji pokazuju jednaku anti-DPPH aktivnost ($22,6 \pm 1,2$ %). Naime, uzorak sa najmanjim sadržajem ukupnih fenola, koji prati i najniža anti-DPPH radikalska aktivnost je uzorak CI 2010 ($1349,0 \pm 56,3$ mg/L i $19,7 \pm 0,8$ %). Uzorak CII 2010 u okviru 2010. godine proizvodnje ima najveći sadržaj ukupnih flavonoida ($200,9 \pm 7,9$ mg/L) i monomernih antocijana ($51,0 \pm 1,5$ mg/L). Uzorci CII i CIII 2012 ističu se kao uzorci koji sadrže najviše ukupnih fenola ($2668,8 \pm 102,8$ i $2618,1 \pm 86,6$ mg/L), ukupnih flavonoida ($349,1 \pm 10,1$ i $359,0 \pm 15,5$ mg/L) i monomernih antocijana ($229,3 \pm 3,6$ i $217,7 \pm 5,5$ mg/L). Ti sadržaji su značajno veći u odnosu na sadržaj ovih klasa jedinjenja u komercijalno dostupnom vinu 2012 ($p < 0,01$ i $p < 0,001$). Sa druge strane, najveća anti-DPPH radikalska aktivnost se zapaža u uzorku CIII 2011 ($80,0 \pm 2,5$ %), što se može povezati sa visokim sadržajem ukupnih fenola u istom uzorku ($2421,2 \pm 91,3$ mg/L). Anti-DPPH radikalska aktivnost uzoraka CII i CIII 2012 takođe je visoka ($59,5 \pm 2,2$ i $62,1 \pm 2,6$ %), značajno veća u odnosu na izmerenu aktivnost komercijalno dostupnog vina iz 2012. ($p < 0,001$) (**Tabela 13, Slika 33**). Ukoliko uporedimo CI vino sa komercijalno dostupnim vinom u okviru 2012. godišta, CI vino ima značajno manje koncentracije ukupnih fenola i monomernih antocijana ($p < 0,05$), dok su koncentracije ukupnih flavonoida i anti-DPPH radikalska aktivnost u ova dva uzorka slični. Iz dobijenih rezultata očigledno je da je vino CI u okviru 2012. godine znatno slabije po svim ispitanim karakteristikama u odnosu na vina CII i CIII ($p < 0,001$) (**Tabela 13, Slika 33**).

Dobijeni rezultati za sadržaj ukupnih fenola nalaze se u okviru vrednosti dobijenih analizom vina sorte vranac, kao i drugih uzoraka crvenih vina. U studiji Bogičević i sar. 2015., u crnogorskim vinima sorte vranac nađen je sadržaj ukupnih fenola u opsegu od 1532 do 1842 mg/L [190], a u studiji Košmerl i sar., 2013., nađeno je 1693-2072 mg GAE/L [222]. Zatim, u doktorskoj disertaciji A.N. Radovanović, 2014., u analiziranim vinima sorte vranac izmerene su vrednosti 991,74-2246,25 mg GAE/L [223], dok su Radovanović i sar., 2012 pronašli 1492,65 mg GAE/L u vinu varanc sorte poreklom iz Srbije [224]. Pored toga, Di Majo i saradnici (2008) [225] su pronašli 2360-3730 mg GAE/L u sicilijanskim crvenim vinima, dok su Gorjanović i saradnici (2010) [196] izmerili 1700-2300 mg GAE/L u uzorcima srpskog, makedonskog i čileanskog vina. Anli i Vural (2009) [201] su u analizi turskih crvenih vina pronašli koncentraciju ukupnih fenola od 1070-2410 mg GAE/L. Slične vrednosti nađene su u grčkim (1217-3772 mg GAE/L) [226], kao i u španskim crvenim vinima (1262-2389 mg GAE/L) [227]. Rezultati dobijeni za sadržaj ukupnih fenola u ovoj studiji takođe su u saglasnosti sa prethodno dobijenim vrednostima u makedonskim vinima sorte vranac. Naime, izmerene vrednosti u četiri studije kretale su se u opsegu 1382-3097 mg GAE/L [189,227,228,229]. S druge strane u studiji Ivanova-Petropulos i sar. 2016, u makedonskim vinima sorte vranac nađene su nešto manje vrednosti 913-1084 mg GAE/L [230]. Nešto veća vrednost za sadržaj ukupnih fenola dobijena je u analizi vina sorte vranac iz jugozapadne Srbije (3505,5 mg GAE/L) [154]. Dobijeni rezultati za sadržaj ukupnih flavonoida i monomernih antocijana takođe su u skladu sa literaturnim podacima [154,224,227,231–234].

Tabela 13. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, monomernih antocijana i anti-DPPH radikalska aktivnost analiziranih uzoraka crvenih vina.

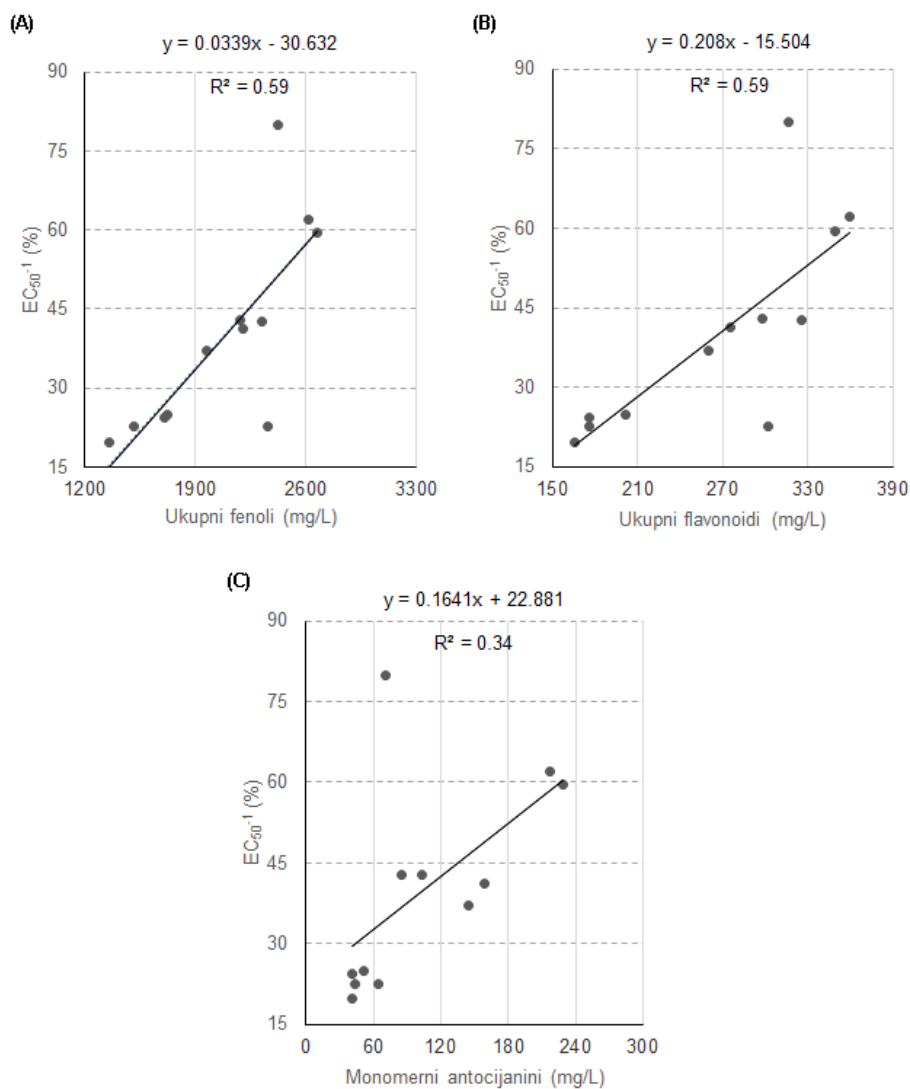
Uzorak		Ukupni fenoli (mg/L)	Ukupni flavonoidi (mg/L)	Monomerni antocijani (mg/L)	EC ₅₀ ⁻¹ (%)
V _R 2010	Kom	1513,0 ± 54,6 ^{a,A}	175,2 ± 9,7 ^{a,A}	43,6 ± 2,7 ^{a,A}	22,6 ± 1,2 ^{a,B}
	CI	1349,0 ± 56,3 ^{a,A}	165,6 ± 8,0 ^{a,A}	40,7 ± 1,8 ^{a,A}	19,7 ± 0,8 ^{a,A}
	CII	1720,4 ± 20,3 ^{a,C}	200,9 ± 7,9 ^{a,B}	51,0 ± 1,5 ^{a,B}	24,9 ± 1,4 ^{a,B}
	CIII	1700,8 ± 50,6 ^{a,C}	175,7 ± 9,8 ^{a,A}	40,6 ± 1,9 ^{a,A}	24,4 ± 0,9 ^{a,B}
V _R 2011	Kom	2362,1 ± 77,6 ^{b,AB}	301,5 ± 13,3 ^{b,A}	63,9 ± 2,5 ^{b,A}	22,6 ± 1,2 ^{a,A}
	CI	2182,2 ± 65,6 ^{c,A}	297,5 ± 13,3 ^{c,A}	85,2 ± 2,6 ^{b,B}	42,9 ± 1,8 ^{c,B}
	CII	2316,7 ± 71,2 ^{b,AB}	325,0 ± 8,8 ^{b,A}	103,1 ± 2,8 ^{b,C}	42,7 ± 2,1 ^{b,B}
	CIII	2421,2 ± 91,3 ^{b,B}	316,6 ± 12,5 ^{b,A}	70,9 ± 2,8 ^{b,A}	80,0 ± 2,5 ^{c,C}
V _R 2012	Kom	2204,4 ± 82,3 ^{b,B}	275,4 ± 12,0 ^{b,A}	158,7 ± 4,5 ^{c,B}	41,3 ± 1,6 ^{b,A}
	CI	1966,8 ± 87,9 ^{b,A}	259,5 ± 13,8 ^{b,A}	145,1 ± 1,8 ^{c,A}	37,0 ± 1,8 ^{b,A}
	CII	2668,8 ± 102,8 ^{c,C}	349,1 ± 10,1 ^{c,B}	229,3 ± 3,6 ^{c,C}	59,5 ± 2,2 ^{c,B}
	CIII	2618,1 ± 86,6 ^{c,C}	359,0 ± 15,5 ^{c,B}	217,7 ± 5,5 ^{c,C}	62,1 ± 2,6 ^{b,B}

* Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze; Vrednosti dobijene za sadržaj ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i monomernih antocijana izražene su u odnosu na ekvivalente galne kiseline, rutina i cijanidin-3-glukozida; Anti-DPPH radikalska aktivnost je izražena kao EC₅₀⁻¹, vrednost (recipročno razblaženje uzoraka vina sposobnih za neutralisanje 50% DPPH*); Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (u triplicatu); Različita slova u superskriptu, u istoj koloni, su pokazatelji da se dobijene srednje vrednosti merenja statistički značajno razlikuju, na nivou p<0,05, prema HSD Tukey-evom testu; mala slova pokazuju statistički značajne različitosti u dobijenim vrednostima merenja između istih vrsta merlo vina različitog godišta, dok se velika slova odnose na statistički značajne različitosti u vrednostima dobijenim za različite vrste merlo vina u okviru istog godišta.

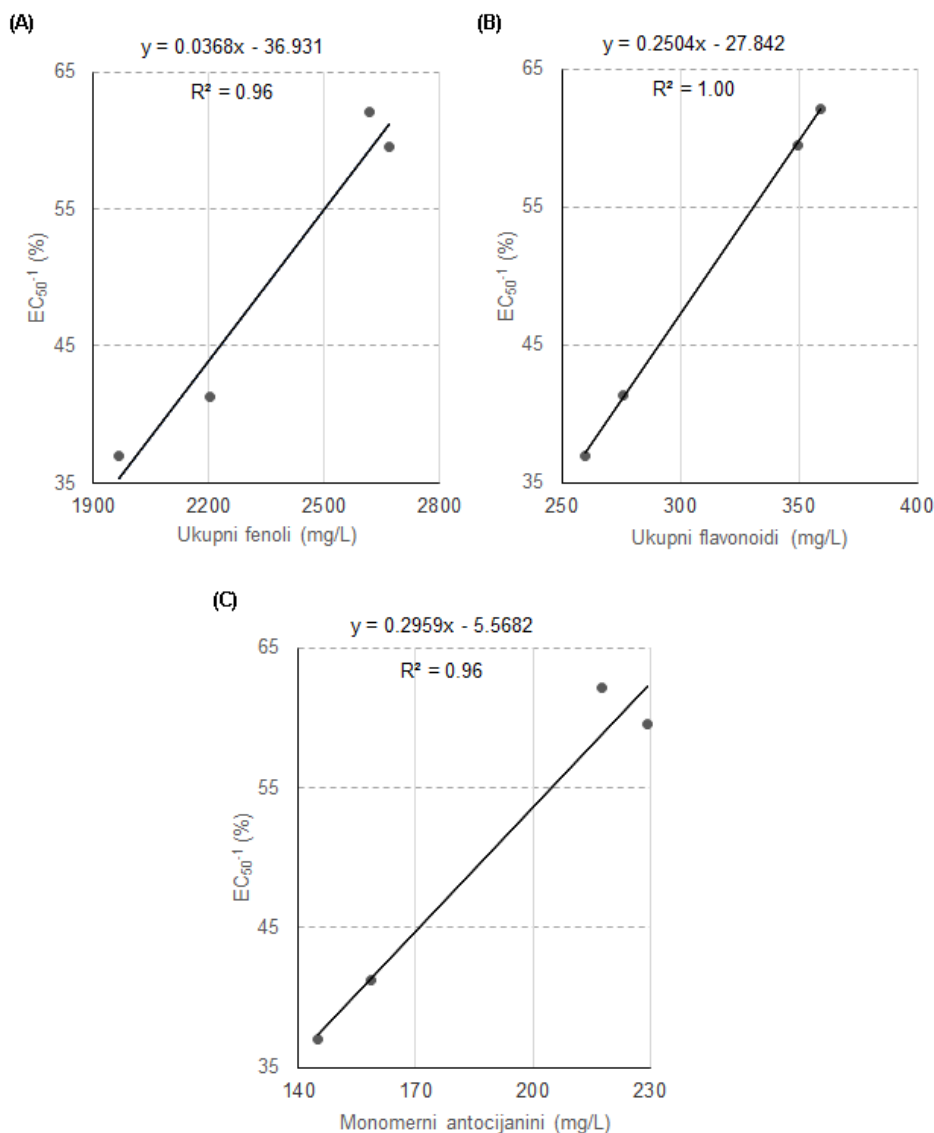


Slika 33. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, monomernih antocijana i anti-DPPH radikalska aktivnost analiziranih uzoraka crvenih vina sorte vranac. Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze

Za svih dvanaest analiziranih uzoraka nađena je pozitivna korelacija anti–DPPH radikalske aktivnosti sa sadržajem ukupnih fenola ($R^2 = 0,59$) (**Slika 34 (A)**), a ista korelacija dobijena je i između anti–DPPH radikalske aktivnosti i koncentracije ukupnih flavonoida (**Slika 34 (B)**). Korelacija anti–DPPH radikalske aktivnosti i sadržaja monomernih antocijana takođe je pozitivna i nešto slabija ($R^2 = 0,34$) (**Slika 34 (C)**). U okviru vina 2012. godišta korelacija između anti–DPPH radikalske aktivnosti i sadržaja ukupnih fenola je odlična ($R^2 = 0,96$) (**Slika 35 (A)**). Slične korelacije se mogu zapaziti u prethodnim studijama [154,196]. Odlične korelacije takođe su primećene i između anti–DPPH radikalske aktivnosti i sadržaja ukupnih flavonoida (**Slika 35 (B)**), kao i između anti–DPPH radikalske aktivnosti i sadržaja monomernih antocijana (**Slika 35 (C)**) u okviru vina 2012. godišta ($R^2 = 1,00$ i $R^2 = 0,96$).



Slika 34. Korelacioni dijagrami između anti–DPPH radikalske aktivnosti i: A) sadržaja ukupnih fenola; B) sadržaja ukupnih flavonoida; C) sadržaja monomernih antocijana u svim ispitivanim uzorcima vina (godišta 2010-2012)



Slika 35. Korelacioni dijagrami između anti–DPPH radicalske aktivnosti i: A) sadržaja ukupnih fenola; B) sadržaja ukupnih flavonoida; C) sadržaja monomernih antocijana u ispitivanim uzorcima vina godišta 2012

4.2.2. Fenolni profil

U analiziranim uzorcima crvenog vina sorte vranac određena je koncentracija dvadeset fenolnih jedinjenja (**Tabele 14-16, Slike 36-38**). I u ovoj grupi uzoraka najzastupljenija fenolna jedinjenja su galna kiselina i (+)-katehin. Može se primetiti da najviše galne kiseline ima u vinima iz 2010. godine u odnosu na 2011. i 2012, pri čemu su najbogatiji uzorci CII 2010 ($26,48 \pm 0,37$ mg/L) i CIII 2010 ($25,87 \pm 0,41$ mg/L) (**Tabela 14, Slika 36**). Slične koncentracije galne kiseline u vinima sorte vranac poreklom iz Crne Gore nađene su u studiji Pajović-Šćepanović i sar., 2018. godine [235], dok su nešto manje vrednosti dobijene u studiji makedonskih vina sorte vranac Ivanova-Petropulos i sar. 2015 [236]. U okviru ove grupe uzoraka određena je i koncentracija tri jedinjenja iz grupe benzoevih kiselina, vanilinske, siringinske i elaginske kiseline, kao i dva fenolna aldehida, vanilina i siringaldehida. Uzorak najbogatiji vanilinskom kiselinom je CII 2010 ($7,15 \pm 0,15$ mg/L), dok je siringinske kiseline najviše u uzorku Kom 2012 ($6,39 \pm 0,02$ mg/L). Ispitivanje sadržaja elaginske kiseline u vinu značajno je s obzirom na to da ovo jedinjenje nije prirodni konstituent grožđa (**Odeljak 2.3.2.1**). Najveće koncentracije ovog jedinjenja nađene su u uzorcima CII i CIII 2012 (**Tabela 16, Slika 38**). U okviru vina iz 2010. i 2012. godišta, može se primetiti da u

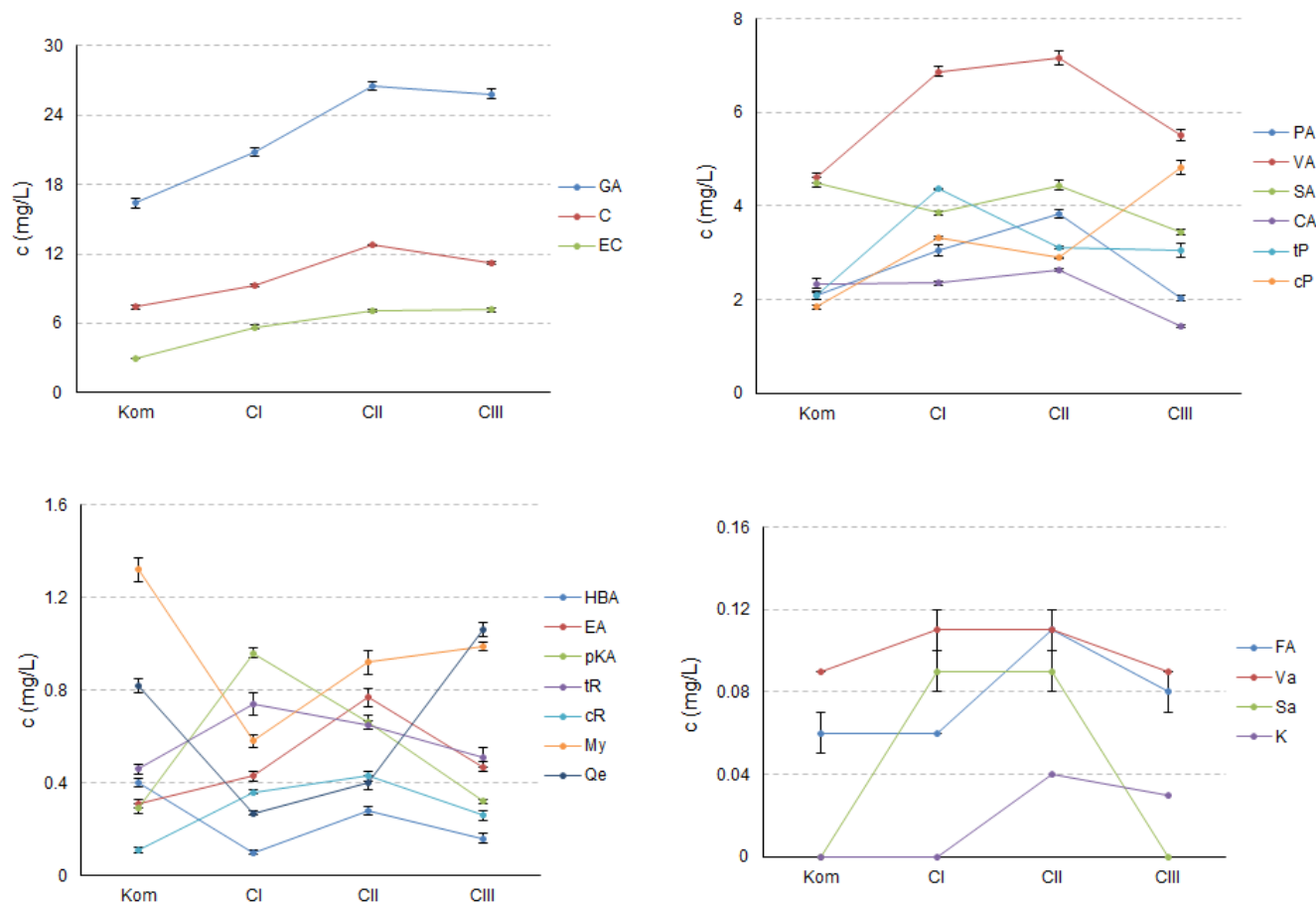
komercijalnom vinu ima znatno manje (+)-katehina u odnosu na vina dobijena od klonova CI, CII i CIII (**Tabele 14 i 16, Slike 36 i 38**). U odnosu na (+)-katehin, isti je slučaj i u okviru vina iz 2011. godine sa izuzetkom uzorka CIII u kom je sadržaj (+)-katehina sličan sadržaju u komercijalnom vinu (**Tabela 15, Slika 37**). Sa druge strane, najviše (+)-katehina nađeno je u uzorcima CII 2012 i CIII 2012, pri čemu je uzorak CII 2012 najbogatiji ($24,35 \pm 0,20$ mg/L) (**Tabela 16, Slika 38**). U svim uzorcima primećen je i značajan sadržaj (-)-epikatehina sa najvećim izmerenim i vrlo sličnim vrednostima u uzorcima CII 2012 i CIII 2012 ($7,79 \pm 0,12$ i $7,77 \pm 0,12$ mg/L). Najmanji sadržaj ovog jedinjenja izmeren je u uzorku Kom 2010 ($2,96 \pm 0,04$ mg/L). Izmereni sadržaji (+)-katehina i (-)-epikatehina u saglasnosti su sa vrednostima nađenim u drugim vinima sorte vranac poreklom iz Crne Gore [235]. Poređenjem vina 2012. godišta zapaža se da uzorci CII i CIII pored toga što imaju više ukupnih fenola i veću anti-DPPH radikalsku aktivnost od uzoraka Kom i CI, takođe imaju i značajno veći sadržaj galne kiseline i (+)-katehina (**Tabela 16, Slika 38**). Ovaj rezultat može ukazivati na značaj u doprinosu datih fenolnih jedinjenja anti-DPPH radikalskoj aktivnosti uzoraka.

Najzastupljenije jedinjenje iz grupe derivata hidroksicimetne kiseline je kafeinska kiselina. Ispitivana vina iz 2010. godine najbogatija ovim fenolnim jedinjenjem. Najveći sadržaj kafeinske kiseline nađen je u uzorku CII 2010 ($2,63 \pm 0,04$ mg/L). Njen sadržaj nađen u uzorcima vina vranac u saglasnosti je sa sadržajem nađenim u vinima iste sorte i istog geografskog porekla u studiji Pajović-Šćepanović i sar., 2018 [235]. Sa druge strane, uzorci iz 2010. godine znatno su siromašniji sadržajem miricetina i kvercetina u odnosu na uzorke iz druge dve godine (**Tabele 14-16, Slike 36-38**). Premda analizirani uzorci vina imaju i manju anti-DPPH radikalsku aktivnost u odnosu na uzorke iz 2011. i 2012. godine, može se pretpostaviti da najmanji sadržaj flavonola u vinima 2010. direktno utiče i na najnižu antiradikalsku aktivnost 2010. godišta (**Tabela 13, Slika 33**). Najviše miricetina nađeno je u uzorku Kom 2012 ($4,15 \pm 0,1$ mg/L), dok je najveća koncentracija kvercetina izmerena u uzorku CII 2011 ($3,61 \pm 0,08$ mg/L). Može se primetiti da je resveratrol zajedno sa svojim *cis/trans* glukozidom, piceidom zastupljen u svim ispitivanim uzorcima (**Tabele 14-16, Slike 36-38**). Izmereni sadržaji *cis/trans*-resveratrola u saglasnosti su sa sadržajem nađenim u studiji Pajović-Šćepanović i sar., 2018., dok je nađeni sadržaj *cis/trans*-piceida veći u odnosu na pomenutu studiju [235]. U studiji Kostadinović i sar. 2012, sadržaj *trans*-piceida u makedonskim vinima sorte vranac u okviru je vrednosti nađenih u ovoj tezi [237]. Očigledna je njihova najveća zastupljenost u uzorcima iz 2010. godine. Dato zapažanje podržava povezanost između veće koncentracije resveratrola u uzorcima (kao fitoaleksina) i povećane količine padavina u 2010. godini koja pogoduje razvoju gljivica (**Tabela 7**).

Tabela 14. Sadržaj fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima vina sorte vranac 2010. godišta određen metodom LC-MS/MS.

Fenolno jedinjenje	vranac 2010			
	Kom	CI	CII	CIII
galna kiselina	16,41 ± 0,41 ^A	20,81 ± 0,38 ^B	26,48 ± 0,37 ^C	25,87 ± 0,41 ^C
protokatehuinska kiselina	2,09 ± 0,09 ^A	3,06 ± 0,12 ^B	3,83 ± 0,10 ^C	2,03 ± 0,06 ^A
4-hidroksibenzojeva kiselina	0,40 ± 0,02 ^D	0,10 ± 0,01 ^A	0,28 ± 0,02 ^C	0,16 ± 0,02 ^B
vanilinska kiselina	4,60 ± 0,10 ^A	6,87 ± 0,11 ^C	7,15 ± 0,15 ^C	5,52 ± 0,12 ^B
siringinska kiselina	4,50 ± 0,11 ^C	3,85 ± 0,05 ^B	4,44 ± 0,11 ^C	3,44 ± 0,05 ^A
elaginska kiselina	0,31 ± 0,02 ^A	0,43 ± 0,02 ^B	0,77 ± 0,04 ^C	0,47 ± 0,02 ^B
kafeinska kiselina	2,34 ± 0,10 ^B	2,35 ± 0,04 ^B	2,63 ± 0,04 ^C	1,43 ± 0,03 ^A
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,29 ± 0,02 ^A	0,96 ± 0,02 ^C	0,66 ± 0,03 ^B	0,32 ± 0,01 ^A
ferulinska kiselina	0,06 ± 0,01 ^A	0,06 ± 0,00 ^A	0,11 ± 0,01 ^B	0,08 ± 0,01 ^A
vanilin	0,09 ± 0,00 ^A	0,11 ± 0,01 ^B	0,11 ± 0,01 ^B	0,09 ± 0,00 ^A
siringaldehid	ND	0,09 ± 0,01 ^A	0,09 ± 0,01 ^A	ND
(+)-katehin	7,41 ± 0,22 ^A	9,27 ± 0,14 ^B	12,74 ± 0,10 ^D	11,24 ± 0,15 ^C
(-)-epikatehin	2,96 ± 0,04 ^A	5,69 ± 0,15 ^B	7,09 ± 0,15 ^C	7,16 ± 0,15 ^C
<i>trans</i> -resveratrol	0,46 ± 0,02 ^A	0,74 ± 0,05 ^B	0,65 ± 0,02 ^B	0,51 ± 0,04 ^A
<i>cis</i> -resveratrol	0,11 ± 0,01 ^A	0,36 ± 0,01 ^C	0,43 ± 0,02 ^D	0,26 ± 0,02 ^B
<i>trans</i> -piceid	2,08 ± 0,07 ^A	4,36 ± 0,01 ^C	3,11 ± 0,02 ^B	3,04 ± 0,15 ^B
<i>cis</i> -piceid	1,84 ± 0,04 ^A	3,31 ± 0,03 ^C	2,89 ± 0,02 ^B	4,81 ± 0,15 ^D
miricetin	1,32 ± 0,05 ^C	0,58 ± 0,03 ^A	0,92 ± 0,05 ^B	0,99 ± 0,02 ^B
kvercetin	0,82 ± 0,03 ^C	0,27 ± 0,01 ^A	0,40 ± 0,03 ^B	1,06 ± 0,03 ^D
kempferol	ND	ND	0,04 ± 0,00 ^B	0,03 ± 0,00 ^A

*ND – nije detektovano; Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (u triplikatu). Različita slova u superskriptu, kod podataka koji se nalaze u istom redu, su pokazatelji da se dobijene srednje vrednosti merenja statistički značajno razlikuju, na nivou $p < 0,05$, prema HSD Tukey-evom testu.

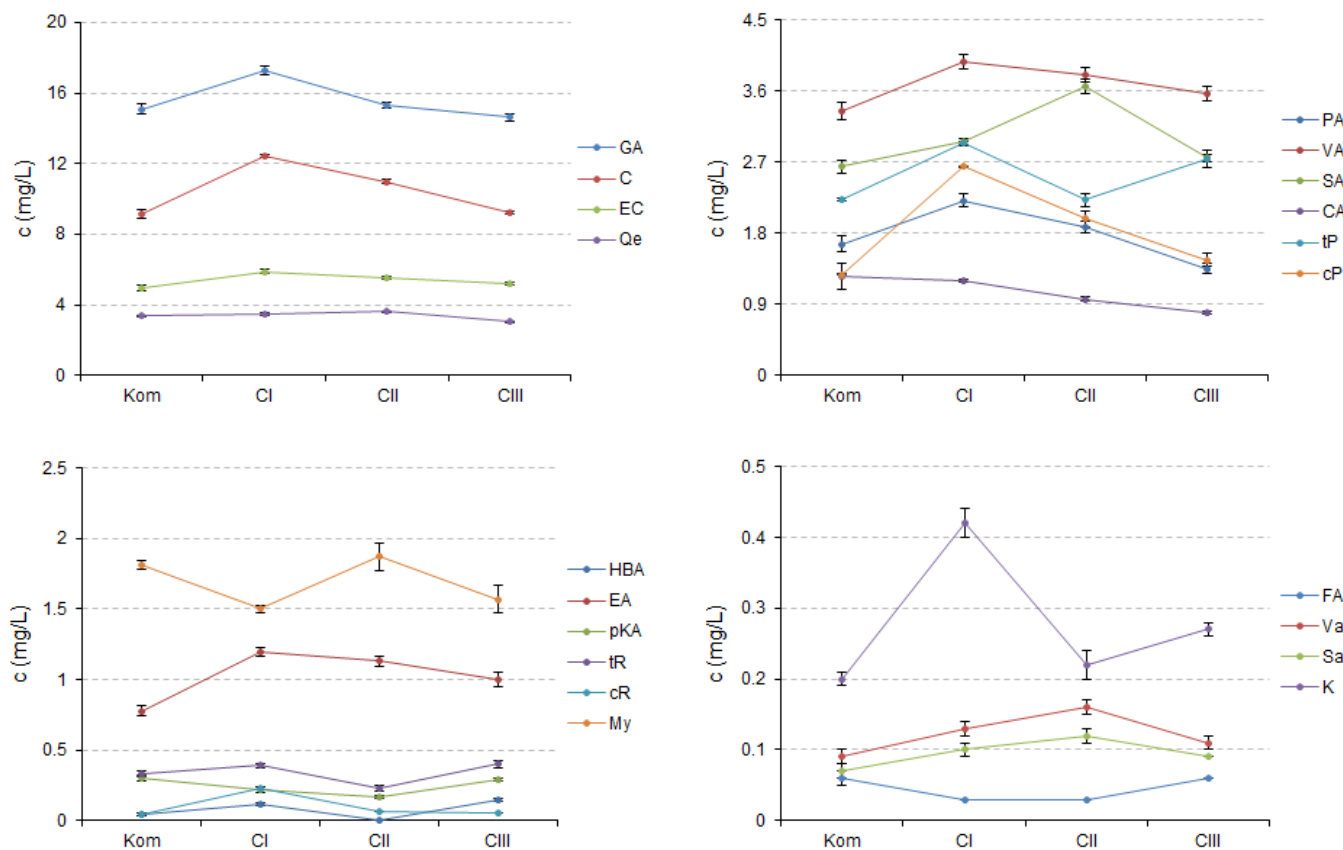


Slika 36. Sadržaj fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima vina sorte vranac 2010. godišta određen metodom LC-MS/MS. Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze; GA – galna kiselina; PA – protokatehuinska kiselina; VA – vanilinska kiselina; SA – siringinska kiselina; CA – kafeinska kiselina; HBA – 4-hidroksibenzoeva kiselina; EA – elaginska kiselina; pKA – *p*-kumarinska kiselina; C – (+)-katehin; EC – (-)-epikatehin; tR – *trans*-resveratrol; cR – *cis*-resveratrol; tP – *trans*-piceid; cP – *cis*-piceid; My – miricetin, Qe – kvercetin; FA – ferulinska kiselina; Va – vanilin; Sa – siringaldehid; K – kempferol

Tabela 15. Sadržaj fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima vina sorte vranac 2011. godišta određen metodom LC-MS/MS.

Fenolno jedinjenje	vranac 2011			
	(mg/L)			
	Kom	CI	CII	CIII
galna kiselina	15,1 ± 0,28 ^{AB}	17,28 ± 0,23 ^C	15,35 ± 0,16 ^B	14,65 ± 0,22 ^A
protokatehuinska kiselina	1,66 ± 0,10 ^B	2,21 ± 0,08 ^D	1,88 ± 0,07 ^C	1,35 ± 0,06 ^A
4-hidroksibenzoeva kiselina	0,05 ± 0,01 ^A	0,12 ± 0,01 ^B	ND	0,15 ± 0,01 ^C
vanilinska kiselina	3,35 ± 0,11 ^A	3,97 ± 0,09 ^B	3,81 ± 0,09 ^B	3,56 ± 0,09 ^A
siringinska kiselina	2,64 ± 0,08 ^A	2,95 ± 0,05 ^B	3,66 ± 0,09 ^C	2,75 ± 0,05 ^A
elaginska kiselina	0,78 ± 0,04 ^A	1,20 ± 0,03 ^C	1,13 ± 0,04 ^C	1,00 ± 0,05 ^B
kafeinska kiselina	1,25 ± 0,16 ^B	1,20 ± 0,02 ^B	0,96 ± 0,03 ^A	0,79 ± 0,02 ^A
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,30 ± 0,02 ^B	0,22 ± 0,02 ^C	0,17 ± 0,01 ^A	0,29 ± 0,01 ^B
ferulinska kiselina	0,06 ± 0,01 ^B	0,03 ± 0,00 ^A	0,03 ± 0,00 ^A	0,06 ± 0,00 ^B
vanilin	0,09 ± 0,01 ^A	0,13 ± 0,01 ^B	0,16 ± 0,01 ^C	0,11 ± 0,01 ^{AB}
siringaldehid	0,07 ± 0,01 ^A	0,10 ± 0,01 ^{BC}	0,12 ± 0,01 ^C	0,09 ± 0,00 ^{AB}
(+)-katehin	9,17 ± 0,22 ^A	12,44 ± 0,11 ^B	11,00 ± 0,13 ^B	9,23 ± 0,11 ^A
(-)-epikatehin	4,97 ± 0,19 ^A	5,89 ± 0,12 ^C	5,52 ± 0,09 ^B	5,19 ± 0,09 ^{AB}
<i>trans</i> -resveratrol	0,33 ± 0,02 ^B	0,39 ± 0,02 ^C	0,23 ± 0,02 ^A	0,40 ± 0,03 ^C
<i>cis</i> -resveratrol	0,05 ± 0,01 ^A	0,23 ± 0,01 ^C	0,07 ± 0,00 ^B	0,06 ± 0,00 ^{AB}
<i>trans</i> -piceid	2,22 ± 0,02 ^A	2,94 ± 0,01 ^C	2,22 ± 0,08 ^A	2,73 ± 0,11 ^B
<i>cis</i> -piceid	1,27 ± 0,01 ^A	2,64 ± 0,01 ^D	1,98 ± 0,10 ^C	1,46 ± 0,08 ^B
miricetin	1,81 ± 0,03 ^B	1,50 ± 0,03 ^A	1,87 ± 0,10 ^B	1,57 ± 0,10 ^A
kvercetin	3,37 ± 0,05 ^B	3,50 ± 0,07 ^{BC}	3,61 ± 0,08 ^C	3,05 ± 0,03 ^A
kempferol	0,20 ± 0,01 ^A	0,42 ± 0,02 ^C	0,22 ± 0,02 ^A	0,27 ± 0,01 ^B

*ND – nije detektovano; Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (u triplikatu). Različita slova u superskriptu, kod podataka koji se nalaze u istom redu, su pokazatelji da se dobijene srednje vrednosti merenja statistički značajno razlikuju, na nivou $p < 0,05$, prema HSD Tukey-evom testu.

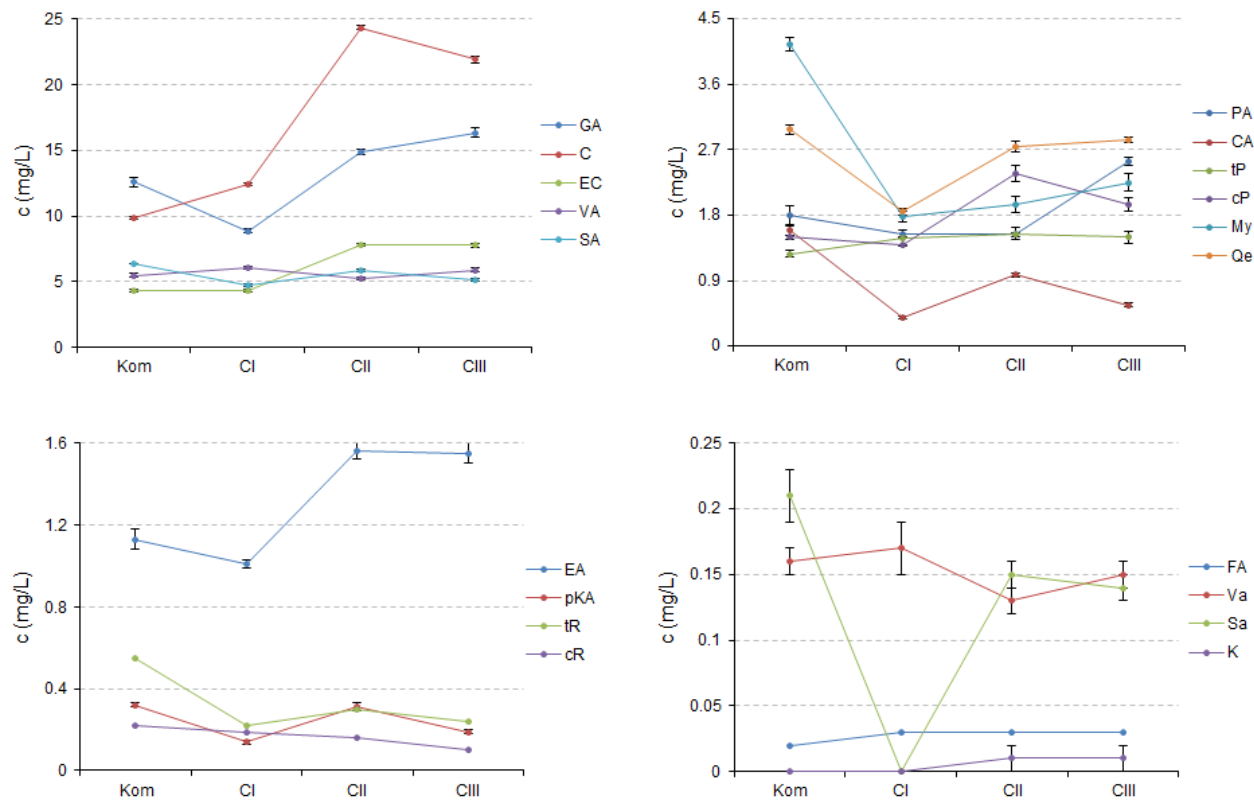


Slika 37. Sadržaj fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima vina sorte vranac 2011. godišta određen metodom LC-MS/MS. Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze; GA – galna kiselina; PA – protokatehuinska kiselina; VA – vanilinska kiselina; SA – siringinska kiselina; CA – kafeinska kiselina; HBA – 4-hidroksibenzoeva kiselina; EA – elaginska kiselina; pKA – *p*-kumarinska kiselina; C – (+)-katehin; EC – (-)-epikatehin; tR – *trans*-resveratrol; cR – *cis*-resveratrol; tP – *trans*-piceid; cP – *cis*-piceid; My – miricetin, Qe – kvercetin; FA – ferulinska kiselina; Va – vanilin; Sa – siringaldehid; K – kempferol

Tabela 16. Sadržaj fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima vina sorte vranac 2012. godišta određen metodom LC-MS/MS.

Fenolno jedinjenje	vranac 2012			
	Kom	CI	CII	CIII
galna kiselina	12,57 ± 0,32 ^B	8,88 ± 0,16 ^A	14,88 ± 0,25 ^C	16,36 ± 0,36 ^D
protokatehuinska kiselina	1,80 ± 0,13 ^B	1,54 ± 0,05 ^A	1,54 ± 0,03 ^A	2,54 ± 0,06 ^C
4-hidroksibenzoeva kiselina	ND	ND	ND	ND
vanilinska kiselina	5,50 ± 0,15 ^A	6,08 ± 0,10 ^B	5,27 ± 0,10 ^A	5,91 ± 0,15 ^B
siringinska kiselina	6,39 ± 0,02 ^D	4,72 ± 0,12 ^A	5,85 ± 0,12 ^C	5,15 ± 0,10 ^B
elaginska kiselina	1,13 ± 0,05 ^B	1,01 ± 0,02 ^A	1,56 ± 0,04 ^C	1,55 ± 0,05 ^C
kafeinska kiselina	1,59 ± 0,07 ^D	0,39 ± 0,02 ^A	0,98 ± 0,03 ^C	0,57 ± 0,03 ^B
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,32 ± 0,01 ^C	0,14 ± 0,01 ^A	0,31 ± 0,02 ^C	0,19 ± 0,01 ^B
ferulinska kiselina	0,02 ± 0,00 ^A	0,03 ± 0,00 ^B	0,03 ± 0,00 ^B	0,03 ± 0,00 ^B
vanilin	0,16 ± 0,01 ^{AB}	0,17 ± 0,02 ^B	0,13 ± 0,01 ^A	0,15 ± 0,01 ^{AB}
siringaldehid	0,21 ± 0,02 ^B	ND	0,15 ± 0,01 ^A	0,14 ± 0,01 ^A
(+)-katehin	9,85 ± 0,13 ^A	12,42 ± 0,11 ^B	24,35 ± 0,20 ^D	21,92 ± 0,26 ^C
(-)-epikatehin	4,29 ± 0,10 ^A	4,31 ± 0,10 ^A	7,79 ± 0,12 ^B	7,77 ± 0,12 ^B
<i>trans</i> -resveratrol	0,55 ± 0,02 ^C	0,22 ± 0,01 ^A	0,30 ± 0,02 ^B	0,24 ± 0,02 ^A
<i>cis</i> -resveratrol	0,22 ± 0,03 ^C	0,19 ± 0,01 ^{BC}	0,16 ± 0,01 ^B	0,10 ± 0,01 ^A
<i>trans</i> -piceid	1,27 ± 0,05 ^A	1,49 ± 0,01 ^B	1,55 ± 0,08 ^B	1,50 ± 0,08 ^B
<i>cis</i> -piceid	1,50 ± 0,03 ^B	1,39 ± 0,01 ^A	2,38 ± 0,11 ^D	1,95 ± 0,10 ^C
miricetin	4,15 ± 0,10 ^C	1,78 ± 0,07 ^A	1,95 ± 0,12 ^A	2,25 ± 0,12 ^B
kvercetin	2,98 ± 0,07 ^D	1,85 ± 0,05 ^A	2,75 ± 0,07 ^{BC}	2,84 ± 0,04 ^C
kempferol	0,07 ± 0,00 ^A	ND	0,16 ± 0,01 ^B	0,16 ± 0,01 ^B

*ND – nije detektovano; Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (u triplikatu). Različita slova u superskriptu, kod podataka koji se nalaze u istom redu, su pokazatelji da se dobijene srednje vrednosti merenja statistički značajno razlikuju, na nivou $p < 0,05$, prema HSD Tukey-evom testu.



Slika 38. Sadržaj fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima vina sorte vranac 2012. godišta određen metodom LC-MS/MS. Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze; GA – galna kiselina; PA – protokatehuinska kiselina; VA – vanilinska kiselina; SA – siringinska kiselina; CA – kafeinska kiselina; HBA – 4-hidroksibenzoeva kiselina; EA – elaginska kiselina; pKA – *p*-kumarinska kiselina; C – (+)-katehin; EC – (-)-epikatehin; tR – *trans*-resveratrol; cR – *cis*-resveratrol; tP – *trans*-piceid; cP – *cis*-piceid; My – miricetin, Qe – kvercetin; FA – ferulinska kiselina; Va – vanilin; Sa – siringaldehid; K – kempferol

4.2.3. Elementalni profil

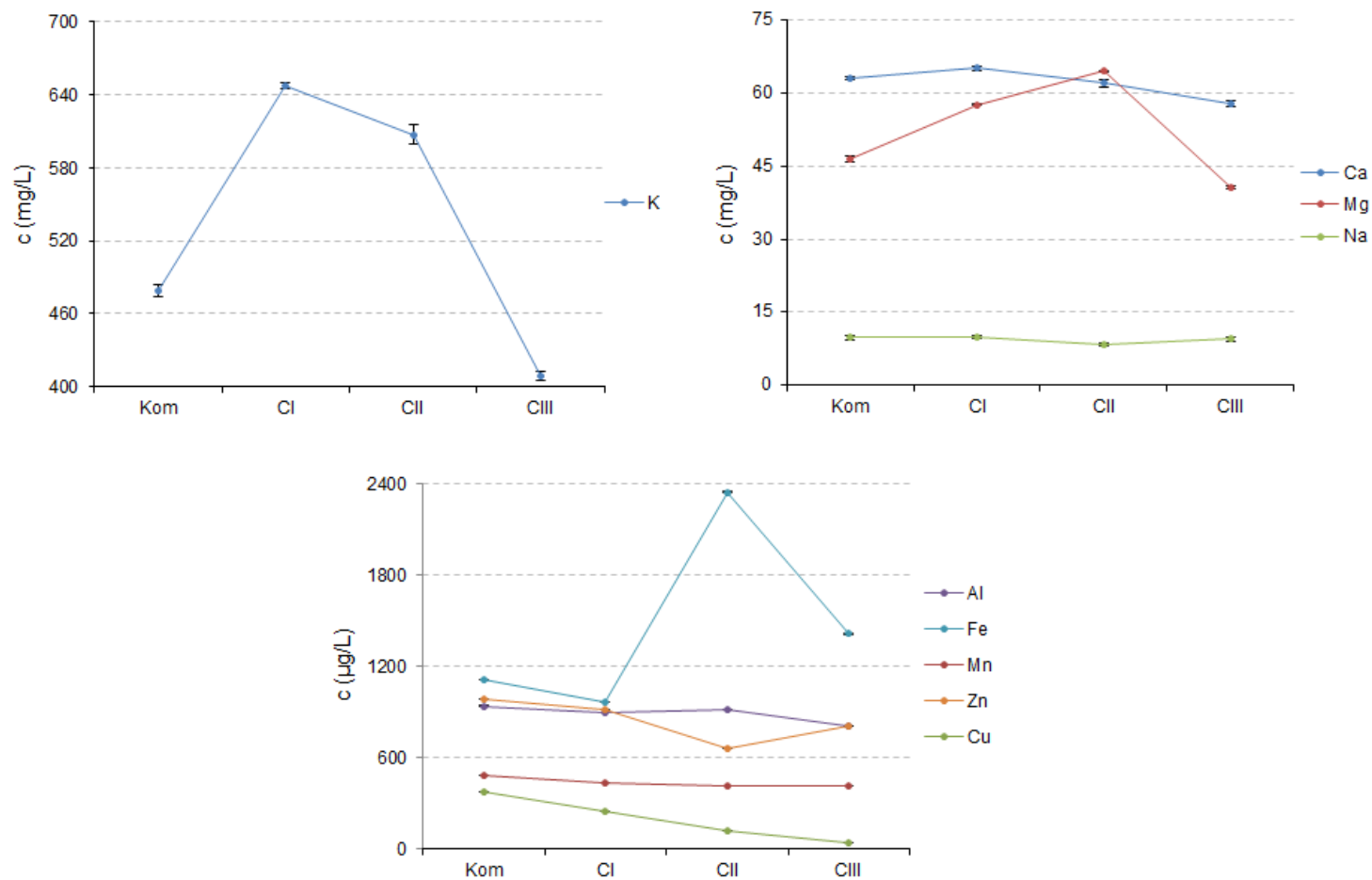
Kao i u do sada analiziranim grupama crvenih vina, najzastupljeniji element u svim analiziranim uzorcima vina sorte vranac jeste K. Iz dobijenih rezultata može se primetiti da je uzorak CI najbogatiji kalijumom u sve tri godine proizvodnje (**Tabele 17-19, Slike 39-41**), sa najvećom vrednošću u 2010. godini ($647,2 \pm 2,1$ mg/L). Pored visokog sadržaja K, u svim analiziranim uzorcima primećuje se i visok odnos K i Na (veći od 40:1), koji dostiže maksimum u uzorku CI 2010, što je jedna od karakteristika koja ima blagotvorno dejstvo na kardiovaskularne bolesnike i deo je objašnjenja „Francuskog paradoksa” (**Tabela 17, Slika 39**). Posle K, najzastupljeniji makroelementi u analiziranim vinima su Ca i Mg sa približno jednakim koncentracijama u svim ispitivanim uzorcima. I u slučaju ove grupe uzoraka značajno je naglasiti da konzumiranje 1–2 čaše vina dnevno može biti značajna nutritivna dopuna makroelemenata u okviru preporučenog dnevnog unosa (**Tabela 9**) [208,209].

Proces vinifikacije značajno može uticati na sadržaj određenih elemenata u vinu, posebno Al, Fe, Cd, Co, Cr, Cu, Mn i Pb. Među zastupljenim mikroelementima u vinima najviše ima Fe, Al i Zn. Najveća koncentracija Fe izmerena je u uzorku CII 2010 (2346 ± 2 µg/L). Al i Zn su najzastupljeniji u uzorku CIII 2011 sa koncentracijama od $1123,0 \pm 2,0$ i $1152,8 \pm 0,9$ µg/L. Može se primetiti da Zn ima znatno manje u uzorcima proizvedenim 2012. godine u odnosu na 2010. i 2011 (**Tabele 17-19, Slike 39-41**), dok sadržaj Cu prilično varira u istim uzorcima iz različitih godina proizvodnje. Primera radi, uzorak CI iz 2011. godine sadrži $35,1 \pm 0,8$ µg/L Cu, dok isti uzorak iz 2012. godine sadrži 15 puta više Cu ($543,5 \pm 0,5$ µg/L). Ovakav rezultat može biti posledica različitih spoljašnjih faktora, kao što su između ostalih, transportovanje i čuvanje uzoraka. U okviru 2012. godišta, uzorak CI izdvaja se kao uzorak sa najvećim koncentracijama Al, Fe, Mn, Zn i Cu (**Tabela 19, Slika 41**). Sa druge strane, u okviru 2011. godišta, može se primetiti da je isti slučaj sa uzorkom CIII (**Tabela 18, Slika 40**). Veoma je važna i činjenica da svi analizirani uzorci sadrže Fe, Cu i Zn ispod maksimalno dozvoljenih vrednosti (6, 1 i 5 mg/L) [94,211]. Iako nisu definisane dozvoljene koncentracije mangana u vinu, vrednosti dobijene u ovoj studiji u skladu su sa literaturnim podacima [214,215]. Konzumiranje ispitivanih vina u preporučenim dnevnim količinama značajno doprinosi preporučenom dnevnom unosu Fe, Mn, Zn i Cu (**Tabela 9**).

Tabela 17. Sadržaj makro- i mikroelemenata u analiziranim uzorcima vina sorte vranac, godište 2010. određen metodama ICP-OES i ICP-MS.

Uzorak	MAKROELEMENTI (mg/L)					MIKROELEMENTI (µg/L)				
	Ca	K	Mg	Na	Al	Fe	Mn	Zn	Cu	
vranac 2010	Kom	63,1 ± 0,2 ^B	478,6 ± 4,9 ^B	46,4 ± 0,7 ^B	9,8 ± 0,4 ^B	939,8 ± 3,0 ^D	1113 ± 1 ^B	483,8 ± 0,5 ^D	988,0 ± 2,0 ^D	375,0 ± 3,0 ^D
	CI	65,1 ± 0,5 ^C	647,2 ± 2,1 ^D	57,6 ± 0,2 ^C	9,8 ± 0,3 ^B	899,2 ± 1,2 ^B	962 ± 1 ^A	438,3 ± 0,4 ^C	918,1 ± 0,6 ^C	247,0 ± 3,0 ^C
	CII	62,0 ± 0,7 ^B	607,2 ± 8,3 ^C	64,5 ± 0,2 ^D	8,3 ± 0,3 ^A	919,2 ± 0,7 ^C	2346 ± 2 ^D	418,2 ± 0,3 ^B	659,6 ± 0,2 ^A	118,5 ± 0,5 ^B
	CIII	57,8 ± 0,6 ^A	408,8 ± 4,2 ^A	40,6 ± 0,3 ^A	9,5 ± 0,4 ^B	807,6 ± 1,2 ^A	1418 ± 5 ^C	411,3 ± 0,2 ^A	812,8 ± 0,1 ^B	39,5 ± 0,7 ^A

* Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (u triplikatu). Različita slova u superskriptu, kod podataka koji se nalaze u istoj koloni, su pokazatelji da se dobijene srednje vrednosti merenja statistički značajno razlikuju, na nivou $p < 0,05$, prema HSD Tukey-evom testu.

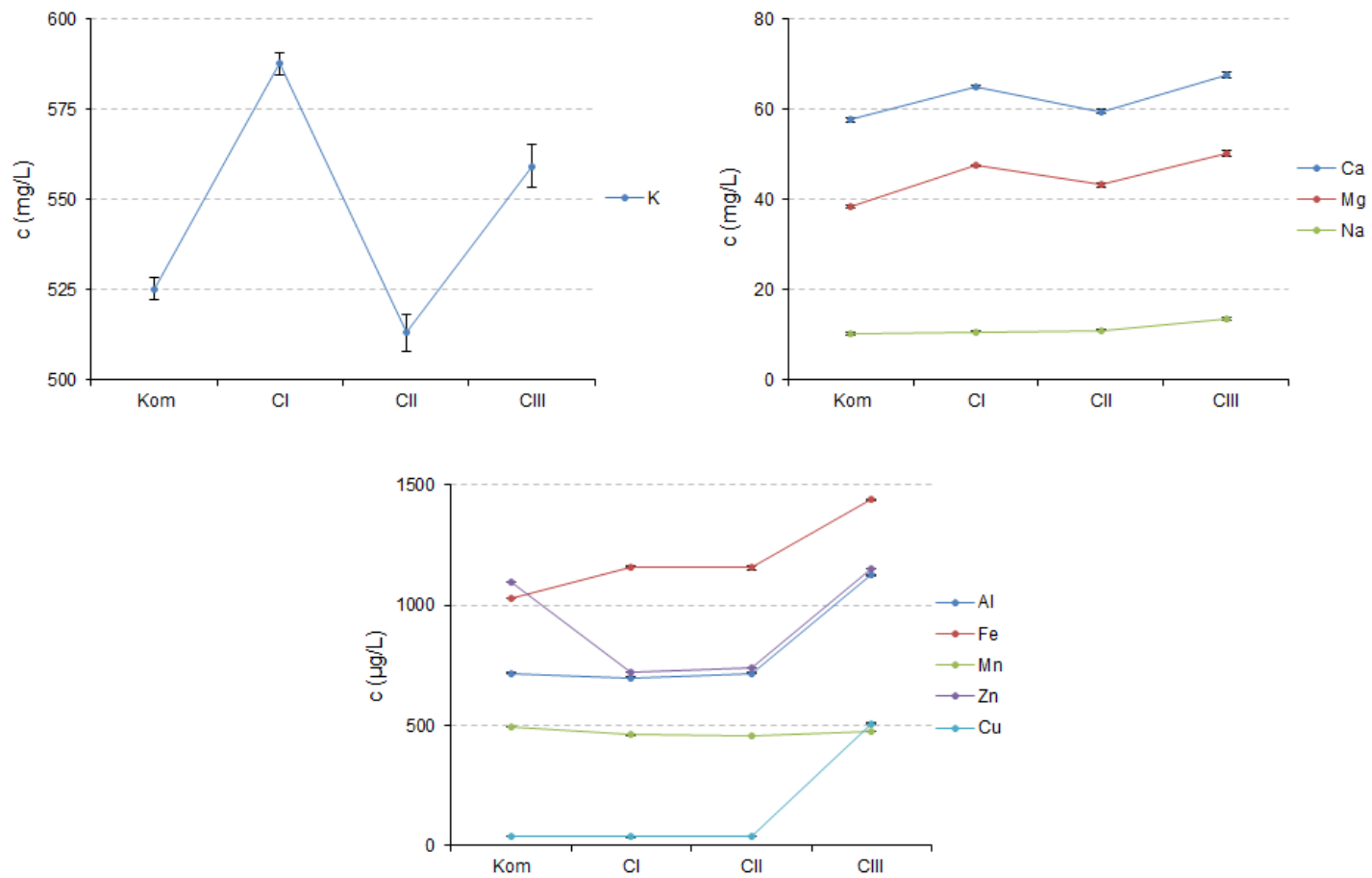


Slika 39. Sadržaj makro- i mikroelemenata u analiziranim uzorcima vina sorte vranac, godište 2010. određen metodama ICP-OES i ICP-MS. Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze

Tabela 18. Sadržaj makro- i mikroelemenata u analiziranim uzorcima vina sorte vranac, godište 2011. određen metodama ICP-OES i ICP-MS.

Uzorak	MAKROELEMENTI (mg/L)					MIKROELEMENTI (µg/L)				
	Ca	K	Mg	Na	Al	Fe	Mn	Zn	Cu	
vranac 2011	Kom	57,6 ± 0,5 ^A	525,2 ± 3,1 ^B	38,5 ± 0,3 ^A	10,3 ± 0,3 ^A	715,8 ± 2,6 ^B	1027 ± 2 ^A	491,2 ± 0,8 ^D	1095,6 ± 0,2 ^C	38,7 ± 0,5 ^A
	CI	65,0 ± 0,2 ^C	587,6 ± 3,1 ^D	47,5 ± 0,1 ^C	10,7 ± 0,2 ^{AB}	697,0 ± 2,0 ^A	1158 ± 3 ^B	460,0 ± 2,0 ^B	718,0 ± 0,1 ^A	35,1 ± 0,8 ^A
	CII	59,5 ± 0,4 ^B	513,1 ± 5,1 ^A	43,2 ± 0,5 ^B	11,0 ± 0,2 ^B	716,8 ± 0,6 ^B	1156 ± 9 ^B	456,2 ± 0,6 ^A	741,5 ± 0,0 ^B	39,0 ± 1,0 ^A
	CIII	67,6 ± 0,8 ^D	559,2 ± 6,0 ^C	50,3 ± 0,6 ^D	13,5 ± 0,2 ^C	1123,0 ± 2,0 ^C	1438 ± 3 ^C	475,5 ± 0,7 ^C	1152,8 ± 0,9 ^D	507,0 ± 3,0 ^B

* Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (u triplikatu). Različita slova u superskriptu, kod podataka koji se nalaze u istoj koloni, su pokazatelji da se dobijene srednje vrednosti merenja statistički značajno razlikuju, na nivou $p < 0,05$, prema HSD Tukey-evom testu.

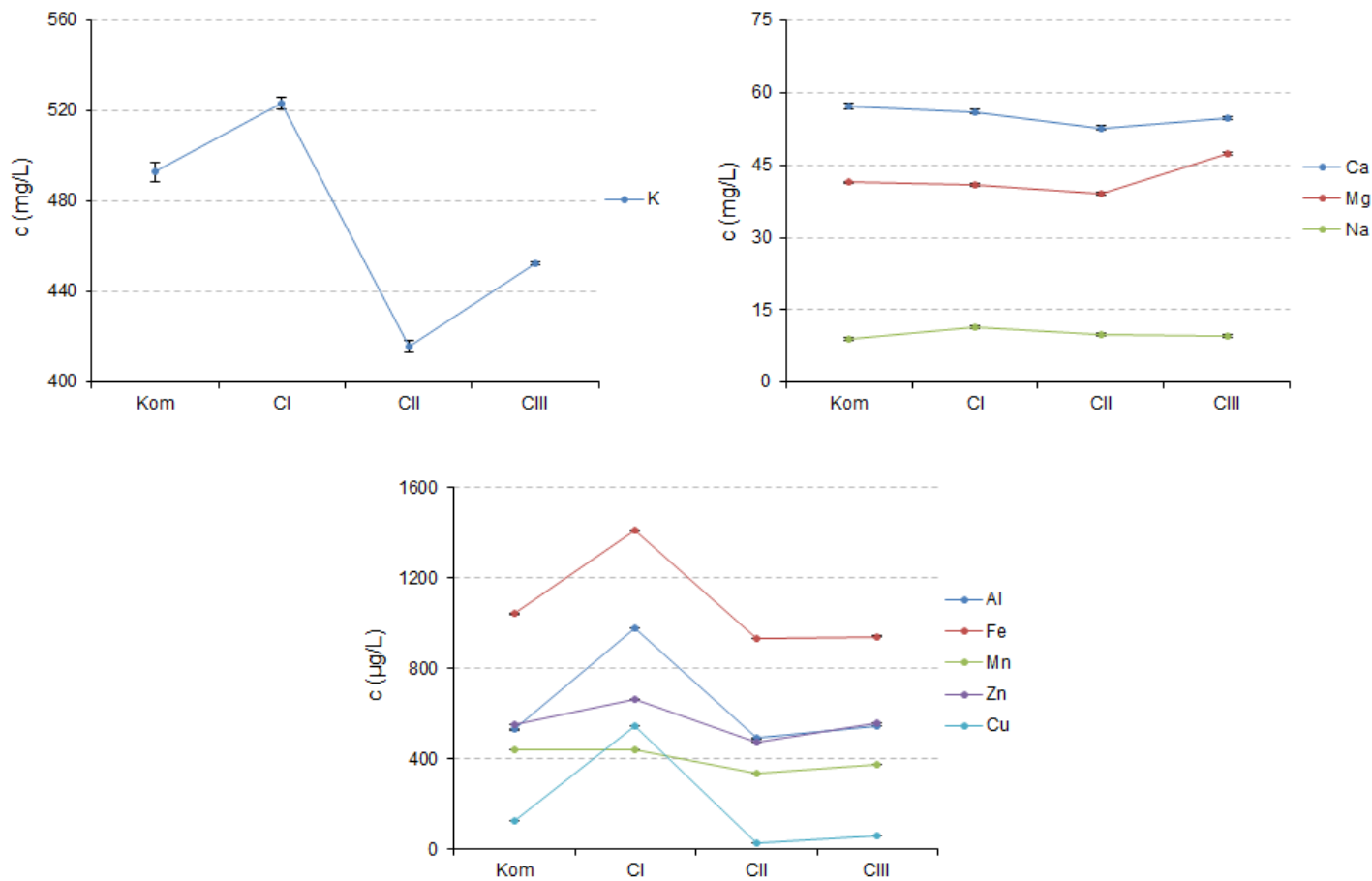


Slika 40. Sadržaj makro- i mikroelemenata u analiziranim uzorcima vina sorte vranac, godište 2011. određen metodama ICP-OES i ICP-MS. Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze

Tabela 19. Sadržaj makro- i mikroelemenata u analiziranim uzorcima vina sorte vranac, godište 2012. određen metodama ICP-OES i ICP-MS.

Uzorak	MAKROELEMENTI (mg/L)					MIKROELEMENTI (µg/L)				
	Ca	K	Mg	Na	Al	Fe	Mn	Zn	Cu	
vranac 2012	Kom	57,1 ± 0,6 ^C	493,0 ± 4,2 ^C	41,4 ± 0,2 ^B	9,1 ± 0,3 ^A	530,6 ± 2,5 ^B	1041 ± 3 ^C	440,3 ± 0,4 ^C	551,7 ± 0,4 ^B	124,9 ± 1,6 ^C
	CI	56,1 ± 0,4 ^C	523,1 ± 2,6 ^D	40,9 ± 0,2 ^B	11,4 ± 0,3 ^C	977,9 ± 1,2 ^D	1411 ± 3 ^D	441,5 ± 0,4 ^D	665,5 ± 0,6 ^D	543,5 ± 0,5 ^D
	CII	52,7 ± 0,4 ^A	415,9 ± 2,8 ^A	39,1 ± 0,3 ^A	9,9 ± 0,3 ^B	489,8 ± 0,7 ^A	933 ± 2 ^A	338,5 ± 0,4 ^A	473,4 ± 0,1 ^A	25,0 ± 0,7 ^A
	CIII	54,7 ± 0,3 ^B	452,4 ± 0,8 ^B	47,4 ± 0,2 ^C	9,7 ± 0,3 ^{AB}	546,5 ± 0,5 ^C	941 ± 2 ^B	377,9 ± 0,2 ^B	559,3 ± 0,2 ^C	61,2 ± 0,4 ^B

* Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (u triplikatu). Različita slova u superskriptu, kod podataka koji se nalaze u istoj koloni, su pokazatelji da se dobijene srednje vrednosti merenja statistički značajno razlikuju, na nivou $p < 0,05$, prema HSD Tukey-evom testu.



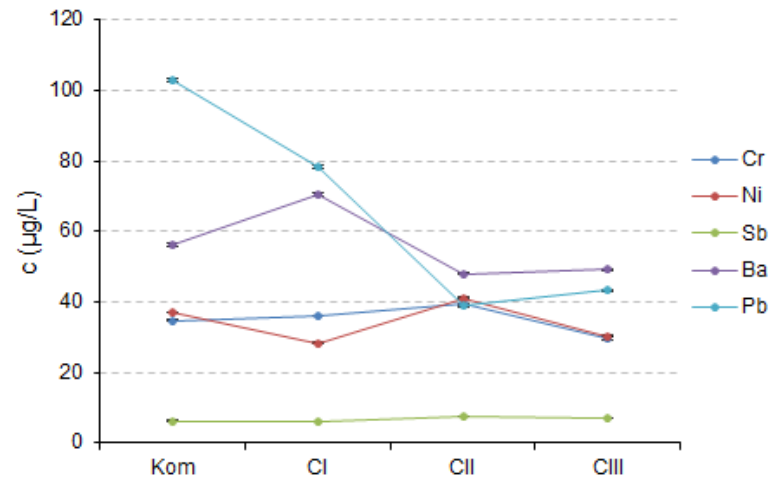
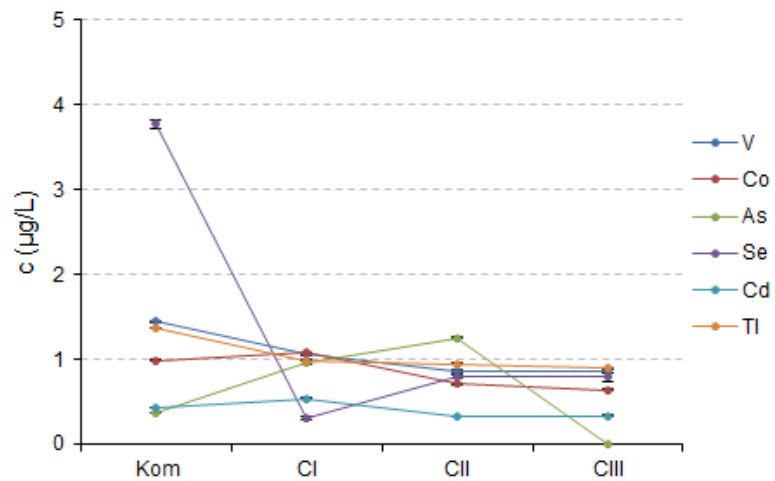
Slika 41. Sadržaj makro- i mikroelemenata u analiziranim uzorcima vina sorte vranac, godište 2012. određen metodama ICP-OES i ICP-MS. Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze

Među elementima prisutnim u tragovima Cr i Se su važni kao elementi neophodni za normalno funkcionisanje ljudskog organizma. Uzorak CIII 2012 se izdvaja od ostalih po najvećem sadržaju Cr ($42,3 \pm 0,2 \mu\text{g/L}$) (**Tabela 22, Slika 44**). Sa druge strane, Se je najzastupljeniji u uzorcima CI i CIII 2011 sa koncentracijama od $4,60 \pm 0,20$ i $4,58 \pm 0,10 \mu\text{g/L}$ (**Tabela 21, Slika 43**). Oba elementa se konzumiranjem ispitivanih vina unose u okviru preporučenih granica (**Tabela 9**). Može se zaključiti da svi analizirani uzorci vina sorte vranac sadrže teške metale As, Cd i Pb u znatno manjim koncentracijama od maksimalno dozvoljenih (**Tabele 20-22, Slike 42-44**) [92]. I preostali elementi u tragovima koncentracijski se nalaze u okviru do sada objavljivanih vrednosti [172,238]. Na kraju, važno je naglasiti da je sadržaj potencijalno toksičnih elemenata (Pb, As, Cd, Ni, Sb) u ispitivanim vinima sorte vranac daleko ispod određenih granica (TDI, TWI, PTWI i BMDL_{01}) (**Tabela 12**).

Tabela 20. Sadržaj elemenata prisutnih u tragovima u analiziranim uzorcima vina sorte vranac, godište 2010., određen metodom ICP-MS.

Uzorak	ELEMENTI U TRAGOVIMA											
	(µg/L)											
	V	Cr	Ni	Co	As	Se	Cd	Sb	Ba	Tl	Pb	
Kom	1,44 ± 0,01 ^C	34,6 ± 0,2 ^B	37,0 ± 0,2 ^C	0,99 ± 0,01 ^C	0,37 ± 0,00 ^A	3,77 ± 0,05 ^C	0,43 ± 0,00 ^B	6,23 ± 0,02 ^B	56,2 ± 0,4 ^C	1,37 ± 0,00 ^D	102,9 ± 0,4 ^D	
vranac 2010	CI	1,06 ± 0,01 ^B	36,0 ± 0,2 ^C	28,3 ± 0,2 ^A	1,09 ± 0,00 ^D	0,96 ± 0,02 ^B	0,30 ± 0,02 ^A	0,54 ± 0,01 ^C	6,02 ± 0,03 ^A	70,3 ± 0,4 ^D	0,99 ± 0,01 ^C	78,3 ± 0,4 ^C
	CII	0,85 ± 0,02 ^A	39,5 ± 0,1 ^D	41,0 ± 0,2 ^D	0,71 ± 0,01 ^B	1,25 ± 0,01 ^C	0,80 ± 0,02 ^B	0,33 ± 0,00 ^A	7,49 ± 0,06 ^D	48,0 ± 0,3 ^A	0,94 ± 0,01 ^B	38,7 ± 0,2 ^A
	CIII	0,86 ± 0,02 ^A	29,6 ± 0,4 ^A	30,3 ± 0,1 ^B	0,64 ± 0,01 ^A	ND	0,79 ± 0,05 ^B	0,33 ± 0,01 ^A	7,10 ± 0,05 ^C	49,1 ± 0,3 ^B	0,89 ± 0,00 ^A	43,2 ± 0,3 ^B

* ND – nije detektovano; Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (u triplikatu). Različita slova u superskriptu, kod podataka koji se nalaze u istoj koloni, su pokazatelji da se dobijene srednje vrednosti merenja statistički značajno razlikuju, na nivou $p < 0,05$, prema HSD Tukey-evom testu.

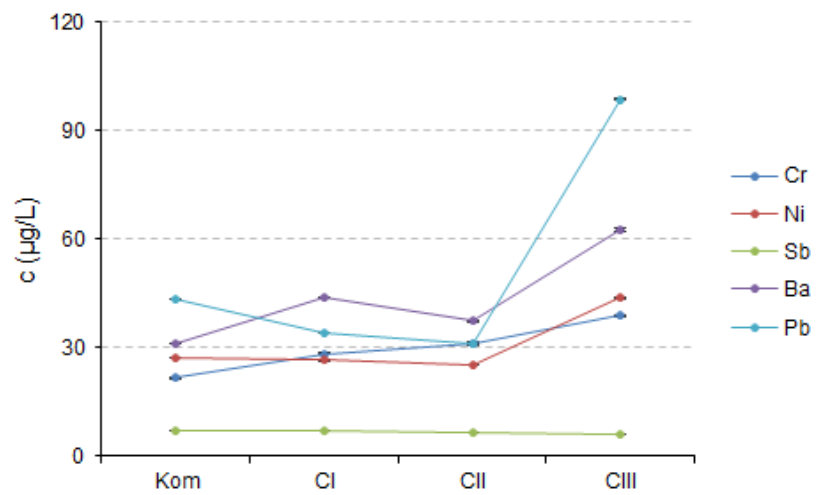
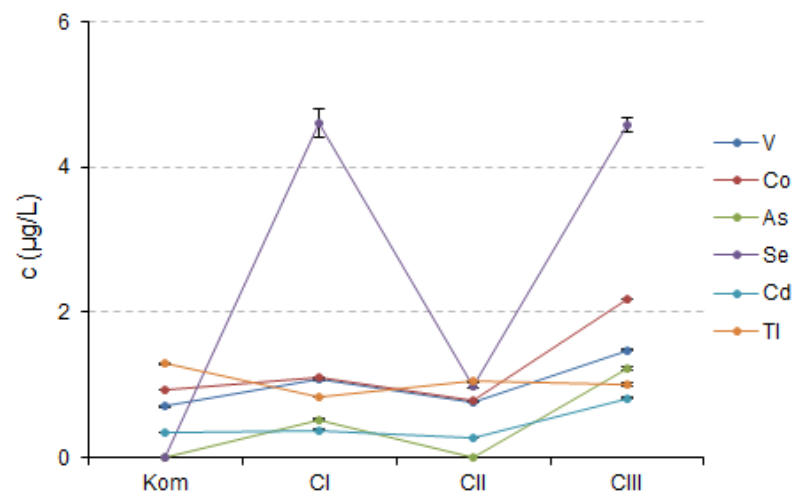


Slika 42. Sadržaj elemenata prisutnih u tragovima u analiziranim uzorcima vina sorte vranac, godište 2010., određen metodom ICP-MS. Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze

Tabela 21. Sadržaj elemenata prisutnih u tragovima u analiziranim uzorcima vina sorte vranac, godište 2011., određen metodom ICP-MS.

Uzorak	ELEMENTI U TRAGOVIMA											
	(µg/L)											
	V	Cr	Ni	Co	As	Se	Cd	Sb	Ba	Tl	Pb	
Kom	0,70 ± 0,01 ^A	21,5 ± 0,3 ^A	27,1 ± 0,1 ^C	0,93 ± 0,00 ^B	ND	ND	0,35 ± 0,00 ^B	7,06 ± 0,03 ^D	31,0 ± 0,1 ^A	1,29 ± 0,01 ^D	43,4 ± 0,2 ^C	
vranac 2011	CI	1,07 ± 0,01 ^C	28,3 ± 0,3 ^B	26,6 ± 0,2 ^B	1,10 ± 0,01 ^C	0,52 ± 0,01 ^A	4,60 ± 0,20 ^B	0,37 ± 0,01 ^C	6,81 ± 0,02 ^C	43,8 ± 0,1 ^C	0,84 ± 0,00 ^A	34,0 ± 0,0 ^B
	CII	0,77 ± 0,02 ^B	31,3 ± 0,2 ^C	25,0 ± 0,0 ^A	0,78 ± 0,01 ^A	ND	0,99 ± 0,04 ^A	0,26 ± 0,00 ^A	6,47 ± 0,01 ^B	37,3 ± 0,1 ^B	1,05 ± 0,01 ^C	30,9 ± 0,1 ^A
	CIII	1,48 ± 0,01 ^D	38,8 ± 0,3 ^D	43,7 ± 0,2 ^D	2,18 ± 0,01 ^D	1,22 ± 0,02 ^B	4,58 ± 0,10 ^B	0,82 ± 0,01 ^D	6,18 ± 0,03 ^A	62,5 ± 0,4 ^D	1,01 ± 0,02 ^B	98,5 ± 0,3 ^D

* ND – nije detektovano; Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (u triplikatu). Različita slova u superskriptu, kod podataka koji se nalaze u istoj koloni, su pokazatelji da se dobijene srednje vrednosti merenja statistički značajno razlikuju, na nivou $p < 0,05$, prema HSD Tukey-evom testu.

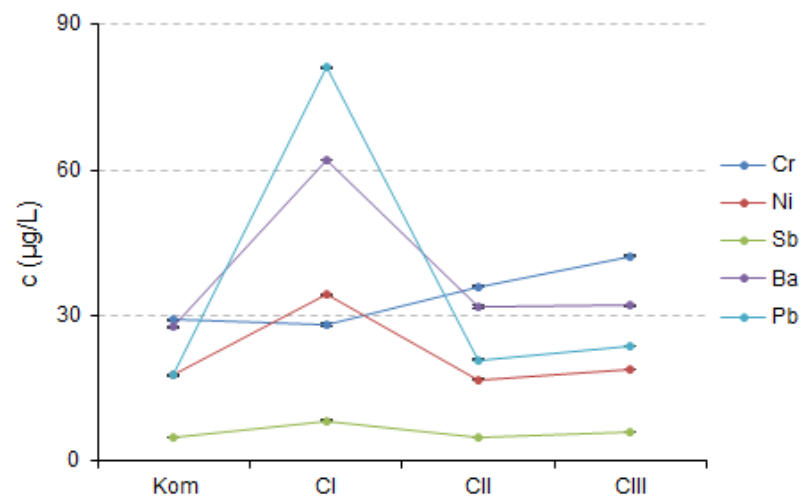
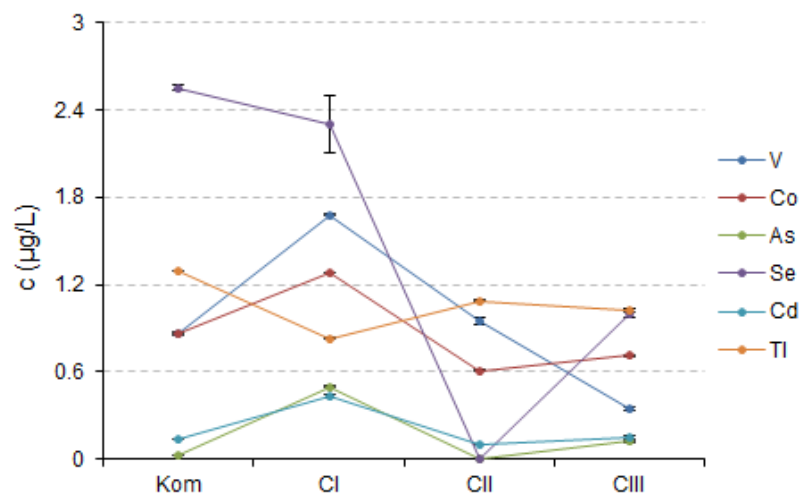


Slika 43. Sadržaj elemenata prisutnih u tragovima u analiziranim uzorcima vina sorte vranac, godište 2012., određen metodom ICP-MS. Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze

Tabela 22. Sadržaj elemenata prisutnih u tragovima u analiziranim uzorcima vina sorte vranac, godište 2012., određen metodom ICP-MS.

Uzorak	ELEMENTI U TRAGOVIMA											
	V	Cr	Ni	Co	As	Se	Cd	Sb	Ba	Tl	Pb	
Kom	0,86 ± 0,01 ^B	29,1 ± 0,2 ^B	17,6 ± 0,1 ^B	0,86 ± 0,00 ^C	0,03 ± 0,00 ^A	2,55 ± 0,02 ^B	0,14 ± 0,00 ^B	4,86 ± 0,03 ^A	27,6 ± 0,2 ^A	1,29 ± 0,00 ^D	17,7 ± 0,1 ^A	
vranac 2012	CI	1,68 ± 0,01 ^D	28,1 ± 0,2 ^A	34,2 ± 0,2 ^D	1,28 ± 0,00 ^D	0,50 ± 0,01 ^C	2,30 ± 0,20 ^B	0,43 ± 0,01 ^C	8,36 ± 0,03 ^C	62,0 ± 0,1 ^C	0,83 ± 0,01 ^A	81,1 ± 0,2 ^D
	CII	0,95 ± 0,02 ^C	36,0 ± 0,2 ^C	16,8 ± 0,1 ^A	0,61 ± 0,01 ^A	ND	ND	0,10 ± 0,00 ^A	4,88 ± 0,03 ^A	31,8 ± 0,2 ^B	1,09 ± 0,01 ^C	20,8 ± 0,2 ^B
	CIII	0,35 ± 0,01 ^A	42,3 ± 0,2 ^D	18,9 ± 0,1 ^C	0,71 ± 0,01 ^B	0,12 ± 0,01 ^B	1,00 ± 0,03 ^A	0,15 ± 0,01 ^B	6,12 ± 0,01 ^B	32,1 ± 0,2 ^B	1,02 ± 0,01 ^B	23,7 ± 0,1 ^C

* ND – nije detektovano; Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (u triplikatu). Različita slova u superskriptu, kod podataka koji se nalaze u istoj koloni, su pokazatelji da se dobijene srednje vrednosti merenja statistički značajno razlikuju, na nivou $p < 0,05$, prema HSD Tukey-evom testu.

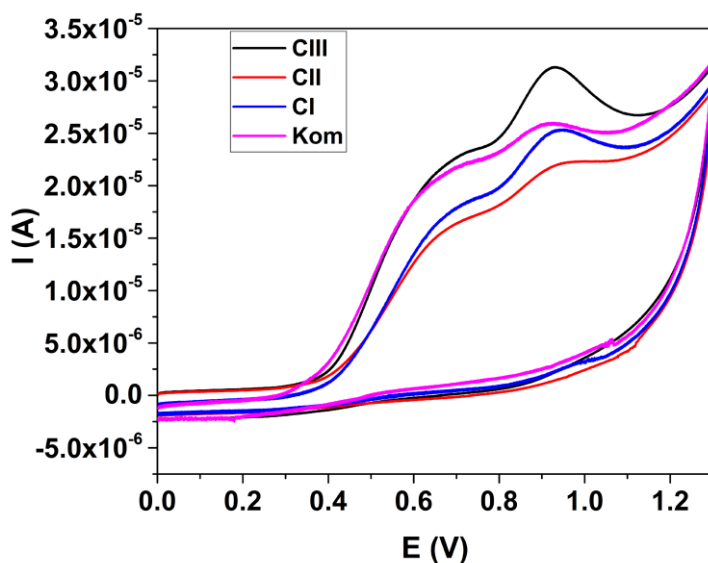


Slika 44. Sadržaj elemenata prisutnih u tragovima u analiziranim uzorcima vina sorte vranac, godište 2012., određen metodom ICP-MS. Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze

4.2.4. Ciklična voltametrija

Ciklična voltametrija je u ovoj studiji korišćena kao brza i pouzdana metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti ispitivanih uzoraka vina sorte vranac, kao alternativna metoda tradicionalnim spektrofotometrijskim tehnikama. Ova metoda je po prvi put iskorišćena u analizi pomenutih uzoraka. Ciklična voltametrija je u prethodnim studijama uspešno korišćena za određivanje fenolnog sadržaja u vinima i za korelaciju analitičkog odgovora sa antioksidativnim kapacitetom datih uzoraka [239–241]. Ovom tehnikom se ne mogu identifikovati pojedinačni antioksidanti iz uzorka već ona pokazuje ukupnu antioksidativnost [242]. Kako bi se obuhvatile sve grupe antioksidativnih jedinjenja snimani su voltamogrami pri potencijalu od 0 do 1,3 V. Površina ispod voltamograma u anodnom smeru proporcionalna je koncentraciji antioksidanata prisutnih u analiziranim uzorcima i predstavlja antioksidativni kapacitet uzorka. Za poređenje antioksidativnog kapaciteta analiziranih uzoraka vina korišćen je Q600 faktor, kao i antioksidativni kompozitni indeks (ACI) izražen u procentima (**Slike 45-47**).

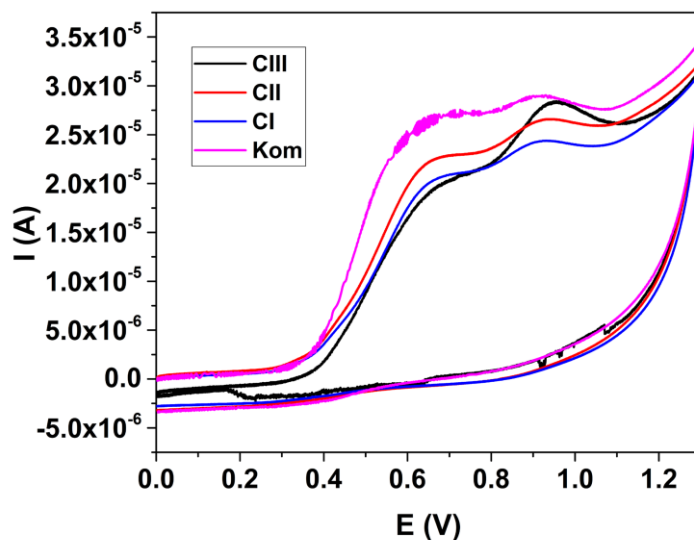
U okviru grupe vina iz 2010. godine proizvodnje na voltamogramu uzorka komercijalnog vina primećuju se dva anodna pika na oko + 0,67 i + 0,92 V, sa Q600 faktorom od 2,871 (**Slika 45**). Na voltamogramima vina dobijenih od klonova CI i CIII vidi se povećanje oksidacione struje drugog anodnog pika sa malim pomeranjem samog pika ka pozitivnijim vrednostima. U voltamogramu uzorka CI vidi se blago smanjenje Q600 faktora i ACI indeksa, dok se u slučaju uzorka CIII vidi drastično povećanje ova dva parametra, što ukazuje na veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na uzorke Kom 2010 i CI 2010 (**Slika 45**).



	Uzorak	Q ₆₀₀	ACI (%)
Vranac 2010	Kom	2,871	68,15
	CI	2,671	63,40
	CII	0,787	18,68
	CIII	4,213	100,00

Slika 45. Ciklični voltamogrami, faktor Q600 i antioksidativni kompozitni indeks (ACI) dobijeni za analizirane uzorke vina sorte vranac 2010. godišta. Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze

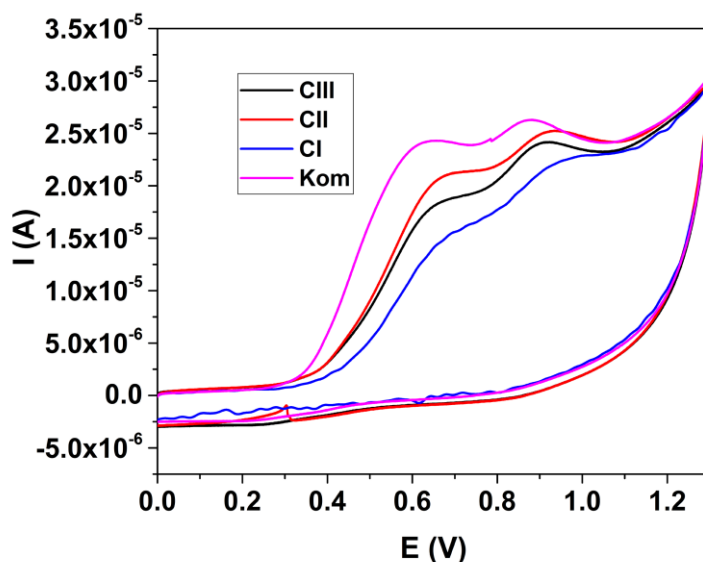
U okviru grupe uzoraka iz 2011. godine proizvodnje, na voltamogramu komercijalnog vina takođe se mogu primetiti dva anodna pika na oko + 0,67 i + 0,92 V, sa Q600 faktorom od 1,274 (Slika 46). I u ovom slučaju na voltamogramu uzorka CIII vidi se povećanje oksidacione struje drugog anodnog pika sa malim pomeranjem samog pika ka pozitivnijim vrednostima. Q600 faktor, kao i ACI indeks uzorka CIII pokazuju veće vrednosti u odnosu na komercijalno vino, što ukazuje na veću antioksidativnu aktivnost uzorka CIII. Uzorak CII ima Q600 faktor i ACI indeks sličan komercijalnom vinu, dok se kod uzorka CI primećuje smanjenje ovih vrednosti u odnosu na komercijalno vino (Slika 46).



	Uzorak	Q ₆₀₀	ACI (%)
Vranac 2011	Kom	1,274	92,59
	CI	1,158	84,17
	CII	1,288	93,60
	CIII	1,376	100,00

Slika 46. Ciklični voltamogrami, faktor Q600 i antioksidativni kompozitni indeks (ACI) dobijeni za analizirane uzorke vina sorte vranac 2011. godišta. Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze

U grupi uzoraka 2012. godine proizvodnje voltamogram komercijalnog vina sličan je kao u vinima 2010. i 2011. godišta, dok se u voltamogramima uzoraka CII i CIII vidi povećanje oksidacione struje drugog anodnog pika sa malim pomeranjem samog pika ka pozitivnijim vrednostima. Q600 i ACI indeksi oba uzorka veći su u odnosu na date vrednosti izmerene u uzorku Kom 2012, pri čemu se uzorak CII ističe najvećom antioksidativnom aktivnošću (Slika 47).



	Uzorak	Q ₆₀₀	ACI (%)
Vranac 2012	Kom	0,629	50,12
	CI	0,657	52,33
	CII	1,255	100,00
	CIII	0,964	76,80

Slika 47. Ciklični voltamogrami, faktor Q₆₀₀ i antioksidativni kompozitni indeks (ACI) dobijeni za analizirane uzorke vina sorte vranac 2012. godišće. Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze

Dobijeni rezultati pokazuju da je spektrofotometrijski određena anti-DPPH radikalska aktivnost uzoraka CIII 2011 i CII 2012 takođe visoka, dok je anti-DPPH radikalska aktivnost uzorka CIII 2010 nešto niža (**Tabela 13**). Sa druge strane, mereno metodom ciklične voltametrije, uzorak CIII 2010 ima najveći Q₆₀₀ faktor (4,213), a samim tim i najveću antioksidativnu aktivnost. Uzorak sa najmanjim Q₆₀₀ faktorom je uzorak Kom 2012 (0,629). S obzirom da se metodom ciklične voltametrije meri ukupna antioksidativna aktivnost merena na osnovu oksidacije svih jedinjenja unutar uzorka a ne samo antioksidativna aktivnost u odnosu na jedan radikal (npr. DPPH radikal), razlika između rezultata merenja antioksidativne aktivnosti dobijenih ovim dvema metodama je očekivana [243].

4.2.5. EPR

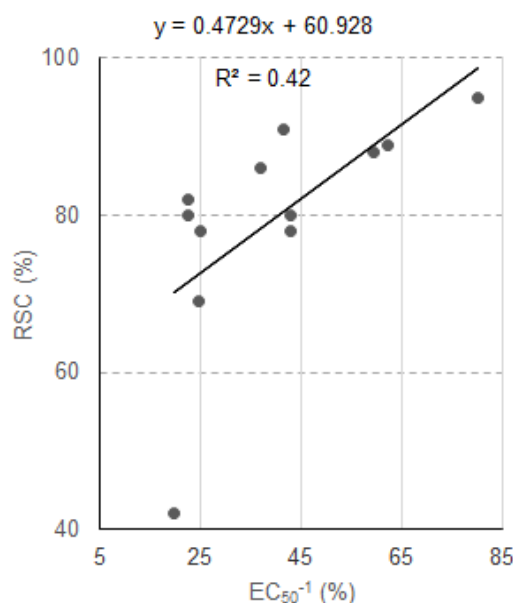
EPR metoda po prvi put je iskorišćena u analizi anti-DPPH radikalske aktivnosti ispitivanih uzoraka sorte vranac. Analizom rezultata dobijenih ovom metodom, može se zaključiti da svi analizirani uzorci crvenog vina sorte vranac pokazuju anti-DPPH radikalsku aktivnost (**Tabela 23**). Izmerena anti-DPPH radikalska aktivnost uzorka CI 2010 najmanja je i iznosi $42 \pm 2,1\%$, dok se uzorak CIII 2011 izdvaja sa najvećom izmerenom aktivnošću ($95 \pm 3,6\%$).

Tabela 23. Anti–DPPH radikalska aktivnost analiziranih uzoraka crvenog vina sorte vranac dobijeni metodom EPR.

		Uzorak	RSC (%)
vranac	2010	Kom	82 ± 3,2 ^{ab, C}
		CI	42 ± 2,1 ^{a, A}
		CII	78 ± 2,5 ^{a, C}
		CIII	69 ± 3,3 ^{a, B}
	2011	Kom	80 ± 4,5 ^{a, A}
		CI	80 ± 3,5 ^{b, A}
		CII	78 ± 2,2 ^{a, A}
		CIII	95 ± 3,6 ^{b, B}
	2012	Kom	91 ± 3,8 ^{b, A}
		CI	86 ± 3,6 ^{b, A}
		CII	88 ± 3,3 ^{b, A}
		CIII	89 ± 3,7 ^{b, A}

*Kom – komercijalno dostupno vino; CI/II/III – vino sorte vranac dobijeno od CI/CII/CIII klona vinove loze, RSC – (engl. *Radical Scavenging Capacity*) sposobnost neutralisanja slobodnih radikala izražena u procentima (u triplikatu). Različita slova u superskriptu, kod podataka koji se nalaze u istoj koloni, su pokazatelji da se dobijene srednje vrednosti merenja statistički značajno razlikuju, na nivou $p < 0,05$, prema HSD Tukey-evom testu; mala slova pokazuju statistički značajne različitosti u dobijenim vrednostima merenja između istih vrsta merlo vina različitog godišta, dok se velika slova odnose na statistički značajne različitosti u vrednostima dobijenim za različite vrste merlo vina u okviru istog godišta.

Poređenjem ovih rezultata sa rezultatima dobijenim spektrofotometrijskim merenjem anti–DPPH radikalske aktivnosti, primećuje se slaganje u odnosu na uzorke sa najvišom i najnižom aktivnošću (CIII 2011 i CI 2010) (**Tabela 23**). Pronađena je pozitivna korelacija između ukupnih vrednosti anti–DPPH radikalske aktivnosti ($R^2 = 0,42$), dobijenih za ispitivane uzorke vina sorte vranac, mereno spektrofotometrijski i EPR-om (**Slika 48**).



Slika 48. Korelacija između anti–DPPH radikalske aktivnosti određene dvema metodama (spektrofotometrijom i EPR-om)

4.3. Klonska sortna vina merlo

U ovom odeljku prikazani su rezultati dobijeni analizom hemijskog sadržaja uzoraka vina sorte merlo, iz dve godine proizvodnje (2010 i 2011), kako komercijalno dostupnih, tako i vina dobijenih od klonova (VCR1 i VCR101) vinove loze pomenute sorte.

4.3.1. Sadržaj odabranih ukupnih jedinjenja i anti–DPPH radikalska aktivnost

Poređenjem rezultata dobijenih za sadržaj ukupnih fenola može se primetiti da je u okviru 2010. godine proizvodnje uzorak VCR101 najbogatiji fenolima. Sadržaj ukupnih fenola u ovom uzorku značajno je veći u odnosu na uzorke Kom ($p < 0,001$) i VCR1 ($p < 0,01$) (**Tabela 24, Slika 49**). 2011. godine nema značajne razlike u sadržaju ukupnih fenola između uzoraka VCR1 i VCR101, dok je uzorak Kom 2011 znatno siromašniji ovim jedinjenjima u odnosu na uzorak VCR101 ($p < 0,05$). Može se primetiti da su klonska vina analizirana u ovoj studiji znatno bogatija u sadržaju ukupnih fenola u odnosu na klonska vina iste sorte (022,025 i 029), poreklom iz Srbije, koja su analizirana u studijama Vujović i sar., 2015 [244] i Vujović i sar., 2016 [234]. Isto se može primetiti i u odnosu na vina sorte merlo analizirana u studiji Majkić i sar., 2019 [245]. Koncentracija ukupnih fenola izmerena u uzorcima merlo vina u okviru ove studije takođe je veća u odnosu na koncentraciju nađenu u hrvatskim vinima iste sorte analiziranim u studiji Žurga i sar., 2019 [246]. U odnosu na sadržaj ukupnih flavonoida, u okviru uzoraka iz 2010. godine trend je isti kao u slučaju ukupnih fenola (**Tabela 24, Slika 49**). Naime, uzorak VCR101 je najbogatiji flavonoidima ($365,2 \pm 5,2$ mg/L). U uzorcima iz 2011. godine nema značajne razlike u sadržaju ukupnih flavonoida. Može se primetiti da u okviru vina 2010. godišta najviše monomernih antocijana ima u uzorku komercijalno dostupnog vina ($172,8 \pm 2,2$ mg/L), dok u 2011. godini dominira uzorak VCR101 ($230,3 \pm 6,6$ mg/L) (**Tabela 24, Slika 49**). Analizirani sadržaj tanina ukazuje na veću zastupljenost tanina u uzorcima VCR1 2011 u odnosu na VCR1 2010 ($p < 0,01$), kao i u VCR101 2011 u odnosu na VCR101 2010 ($p < 0,01$). Koncentracija tanina u ispitivanin uzorcima merlo vina u skladu je sa vrednostima pronađenim u crvenim vinima kako merlo vina tako i vina dobijenih od drugih sorti crnog grožđa [247,248]. Takođe, može se primetiti da klonska vina analizirana u ovoj studiji sadrže manje tanina u odnosu na klonska vina (022,025 i 029) merlo sorte, poreklom iz Srbije, analizirana u studiji Vujović i sar., 2016 [234]. Sa druge strane,

koncentracija tanina izmerena u ovoj studiji u okviru je vrednosti pronađenih u merlo vinima iz studije Majkić i sar., 2019. [245]. Poređenjem anti–DPPH radikalske aktivnosti može se zaključiti da u obe godine proizvodnje uzorci VCR1 i VCR101 imaju znatno veću aktivnost u odnosu na komercijalno dostupno vino (**Tabela 24, Slika 49**).

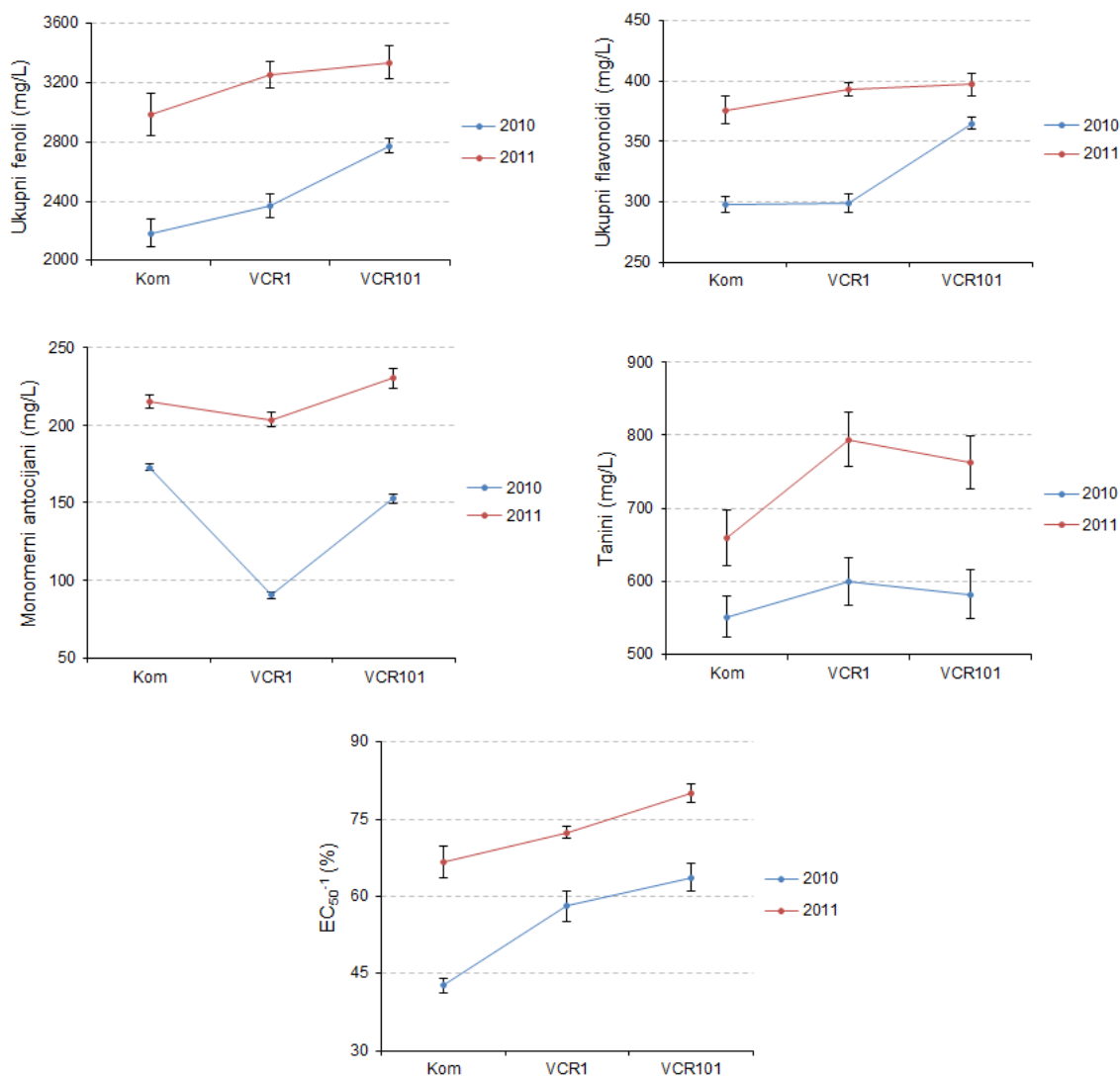
Iz dobijenih rezultata jasno se primećuje da su sva tri vina proizvedena 2010. godine znatno siromašnija u svih pet ispitivanih hemijskih karakteristika u odnosu na vina iz 2011. godine (**Tabela 24, Slika 49**). To još jednom stavlja akcenat na klimatske uslove (veći broj sunčanih sati i manje kiše) koji su bili povoljniji za sazrevanje, a samim tim i hemijske karakteristike grožđa u 2011. godini.

Tabela 24. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, monomernih antocijana, tanina i anti–DPPH radikalska aktivnost analiziranih uzoraka crvenih vina.

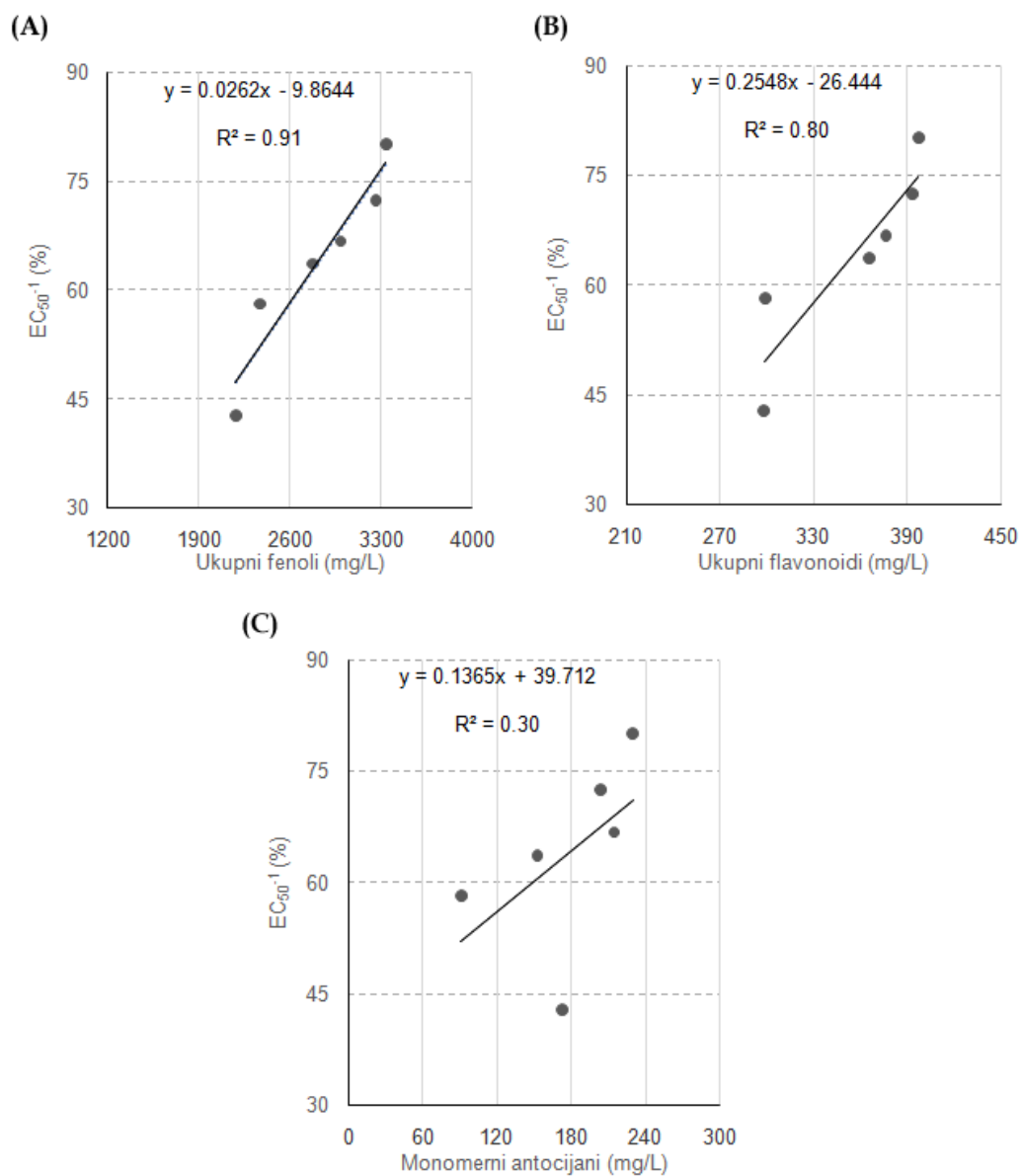
Uzorak	Ukupni fenoli (mg/L)	Ukupni flavonoidi (mg/L)	Monomerni antocijani (mg/L)	Tanini (mg/L)	EC ₅₀ ⁻¹ (%)	
2010	Kom	2184,5 ± 93,7 ^{a,A}	297,8 ± 7,1 ^{a,A}	172,8 ± 2,2 ^{a,C}	551,6 ± 28,7 ^{a,A}	42,7 ± 1,4 ^{a,A}
	VCR1	2370,2 ± 82,1 ^{a,A}	298,8 ± 8,0 ^{a,A}	90,2 ± 2,1 ^{a,A}	599,3 ± 32,3 ^{a,A}	58,1 ± 3,0 ^{a,B}
	VCR101	2775,0 ± 48,9 ^{a,B}	365,2 ± 5,2 ^{a,B}	152,5 ± 2,8 ^{a,B}	582,1 ± 33,6 ^{a,A}	63,6 ± 2,7 ^{a,B}
2011	Kom	2988,6 ± 142,2 ^{b,A}	376,0 ± 11,2 ^{b,A}	215,2 ± 4,1 ^{b,A}	659,3 ± 37,6 ^{a,A}	66,7 ± 3,1 ^{b,A}
	VCR1	3255,7 ± 90,8 ^{b,AB}	393,2 ± 5,8 ^{b,A}	203,6 ± 4,5 ^{b,A}	793,8 ± 37,5 ^{b,A}	72,4 ± 1,1 ^{b,B}
	VCR101	3337,9 ± 115,4 ^{b,B}	397,2 ± 9,2 ^{b,A}	230,3 ± 6,6 ^{b,B}	762,7 ± 36,1 ^{b,A}	80,1 ± 1,8 ^{b,C}

* Kom – komercijalno vino sorte merlo; VCR1/VCR101 – vino sorte merlo dobijeno od VCR1/VCR101 klona vinove loze. Vrednosti za sadržaj ukupnih fenola su izražene u ekvivalentima galne kiseline (mg GAE/L). Vrednosti za sadržaj ukupnih flavonoida su izražene u ekvivalentima rutina (mg RTE/L), dok su vrednosti za sadržaj monomernih antocijana izražene u ekvivalentima cijanidin-3-glukozida. Sadržaj tanina je izražen u ekvivalentima katehina (mg CE/L). Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (u triplikatu). Različita slova u superskriptu, kod podataka koji se nalaze u istoj koloni, su pokazatelji da se dobijene srednje vrednosti merenja statistički značajno razlikuju, na nivou $p < 0,05$, prema HSD Tukey-evom testu; mala slova pokazuju statistički značajne različitosti u dobijenim vrednostima merenja između istih vrsta merlo vina različitog godišta, dok se velika slova odnose na statistički značajne različitosti u vrednostima dobijenim za različite vrste merlo vina u okviru istog godišta.

Dobijeni korelacioni dijagrami ukazuju na odličnu pozitivnu korelaciju između dobijene anti–DPPH radikalske aktivnosti i sadržaja ukupnih fenola ($R^2 = 0,91$) (**Slika 50 (A)**). Vrlo dobra pozitivna korelacija takođe je primećena između anti–DPPH radikalske aktivnosti i sadržaja ukupnih flavonoida ($R^2 = 0,80$) (**Slika 50 (B)**). Sa druge strane, korelacija između anti–DPPH radikalske aktivnosti i sadržaja monomernih antocijana takođe je pozitivna, ali nešto slabija ($R^2 = 0,30$) (**Slika 50 (C)**).



Slika 49. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, monomernih antocijana, tanina i anti-DPPH radikalska aktivnost analiziranih uzoraka crvenih vina. Kom – komercijalno vino sorte merlo; VCR1/VCR101 – vino sorte merlo dobijeno od VCR1/VCR101 klona vinove loze

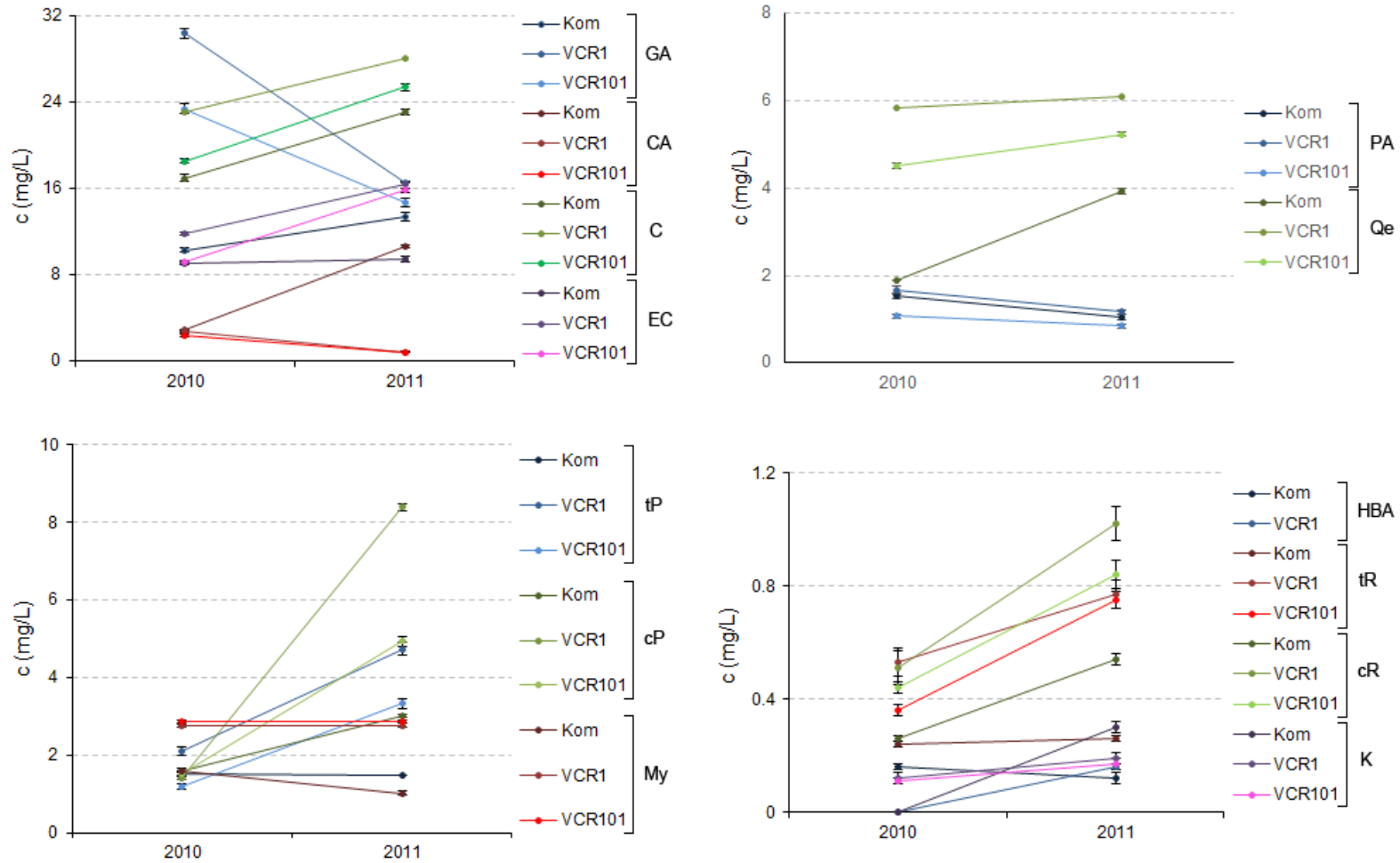


Slika 50. Korelacioni dijagrami između anti-DPPH radikalske aktivnosti i: A) sadržaja ukupnih fenola; B) sadržaja ukupnih flavonoida; C) sadržaja monomernih antocijana u ispitivanim uzorcima vina

4.3.2. Fenolni profil

U ispitivanim uzorcima crvenog vina sorte merlo određen je sadržaj trinaest fenolnih jedinjenja. Kao najzastupljenija fenolna jedinjenja u svim uzorcima ističu se galna kiselina i (+)-katehin (**Slika 51**). Najveća koncentracija galne kiseline izmerena je u uzorku VCR1 2010 ($30,46 \pm 0,42$ mg/L), dok je nešto niža koncentracija nađena u uzorku VCR101 2010 ($23,39 \pm 0,45$ mg/L) ($p < 0,001$). Sadržaj galne kiseline izmeren u uzorku VCR1 2010 gotovo je dva puta veći u odnosu na VCR1 2011. Poređenjem uzoraka VCR101 2010 i VCR101 2011 primećuje se slična situacija. Najniža srednja vrednost koncentracije galne kiseline izmerena je u komercijalno dostupnom vinu kako u 2010. tako i u 2011. godini proizvodnje ($10,23 \pm 0,22$ mg/L i $13,39 \pm 0,34$ mg/L). U studiji Pantelić i sar. 2016., nađen je sličan sadržaj galne kiseline u klonskim vinima (022, 025 i 029) merlo sorte poreklom iz Srbije ($20,03 - 26,68$ mg/L) [249,250], kao i u studiji Vujović i sar., 2016. ($20,71 - 25,49$ mg/L) [234]. S druge strane, koncentracija galne kiseline izmerena u okviru ove studije znatno je veća u odnosu na koncentraciju nađenu u merlo vinu poreklom iz Srbije u okviru studije Beara i sar., 2017 [251]. Isto se može primetiti i u slučaju katehina; najsiromašnije vino je komercijalno dostupno vino iz 2010. godine ($16,98 \pm 0,36$ mg/L), dok je najmanja koncentracija (+)-katehina u 2011. godini nađena takođe u komercijalno dostupnom vinu ($23,10 \pm 0,21$ mg/L). (+)-Katehin je najzastupljeniji i u uzorku VCR1 2011 ($28,12 \pm 0,29$ mg/L), a iz dobijenih rezultata (**Slika 51**) jasno se vidi veći sadržaj (+)-katehina u vinima 2011. godišta. Izmerene koncentracije galne kiseline nešto su niže od prethodno dobijenih eksperimentalnih vrednosti, dok su dobijene koncentracije (+)-katehina u opsegu literaturnih vrednosti [201,203]. Takođe se može primetiti da je sadržaj (+)-katehina u analiziranim klonskim vinima višestruko veći u odnosu na klonska vina (022, 025 i 029) merlo sorte poreklom iz Srbije ($1,56 - 4,31$ mg/L) [249,250]. Isto je slučaj i u odnosu na merlo vino poreklom iz Srbije, analizirano u studiji Beara i sar., 2017 [251]. Uzorci VCR1 2011 i VCR101 2011 su uzorci sa najvećim koncentracijama (-)-epikatehina ($16,36 \pm 0,28$ u VCR1 2011 i $15,83 \pm 0,17$ mg/L u VCR101 2011). Najmanji sadržaj ovog jedinjenja nađen je u komercijalno dostupnom vinu iz 2010. i 2011. godine ($9,04 \pm 0,15$ i $9,46 \pm 0,23$ mg/L), kao i u uzorku VCR101 2010 ($9,19 \pm 0,13$ mg/L). Sadržaj (-)-epikatehina nađen u ovoj studiji veći je u odnosu na sadržaj (-)-epikatehina u analiziranim klonskim vinima (022, 025 i 029) merlo sorte poreklom iz Srbije ($0,58 - 1,59$ mg/L) [249,250].

Ukupna koncentracija resveratrola i njegovih glukozida u okviru 2011. godišta manja je u komercijalno dostupnom vinu u odnosu na vina dobijena od VCR1 i VCR101 klonova vinove loze (**Slika 51**). Uzorak sa najvećim sadržajem ukupnog resveratrola u obe godine proizvodnje je VCR1. Takođe se može primetiti da je ukupnog resveratrola više u uzorcima iz 2011. godine, u odnosu na 2010. S obzirom na veću količinu padavina 2010. godine, ovakav rezultat nije očekivan te se može pretpostaviti da je uzrok određena specifičnost same merlo sorte vinove loze. Koncentracije *trans*-piceida i *trans*-resveratrola izmerene u ovoj studiji u skladu su sa vrednostima nađenim u makedonskim vinima iste sorte u okviru studije Kostadinović i sar. 2012 [237]. Manje koncentracije kvercetina i miricetina takođe su izmerene u komercijalno dostupnim vinima u odnosu na vina dobijena od oba klona vinove loze (VCR1 i VCR 101), u obe analizirane godine proizvodnje (**Slika 51**).



Slika 51. Sadržaj fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima vina određen metodom LC-MS/MS. Kom – komercijalno vino sorte merlo; VCR1/VCR101 – vino sorte merlo dobijeno od VCR1/VCR101 klona vinove loze

4.3.3. Antioksidativna aktivnost

4.3.3.1. Antiradikalske aktivnosti i metoda FRAP

Rezultati dobijeni prilikom ispitivanja antiradikalske aktivnosti analiziranih uzoraka merlo vina ukazuju da data vina pokazuju antiradikalsku aktivnost u odnosu na sve četiri ispitivane slobodnoradikalske vrste (DPPH, ABTS, hidroksil i superoksid radikale) (**Tabela 25**). Može se primetiti da analizirana vina imaju međusobno sličnu aktivnost u odnosu na ABTS kao i u odnosu na hidroksil radikal (**Tabela 25**). Sa druge strane, anti-superoksid radikalska aktivnost vina VCR1 značajno je niža u odnosu na uzorke Kom i VCR101 ($p < 0,001$). Poređenjem antiradikalske aktivnosti pojedinačnih vina u odnosu na četiri različite slobodnoradikalske vrste primećuje se da je aktivnost sva tri vina najmanja u odnosu na hidroksil radikal, dok je najveća aktivnost primećena u odnosu na DPPH radikal.

Tabela 25. Prikaz rezultata antioksidativnih testova za uzorke merlo vina 2011. godišta.

Uzorak	Anti-DPPH EC_{50}^{-1} (1/ μ L)	Anti-ABTS EC_{50}^{-1} (1/ μ L)	Anti-hidroksil EC_{50}^{-1} (1/ μ L)	Anti-superoksid EC_{50}^{-1} (1/ μ L)	FRAP (mg/mL)
Kom	$0,67 \pm 0,03^a$	$0,52 \pm 0,02^a$	$0,20 \pm 0,01^a$	$0,32 \pm 0,01^b$	$3,59 \pm 0,04^{ab}$
VCR1	$0,72 \pm 0,01^b$	$0,53 \pm 0,01^a$	$0,18 \pm 0,00^a$	$0,23 \pm 0,02^a$	$3,62 \pm 0,03^b$
VCR101	$0,80 \pm 0,02^c$	$0,52 \pm 0,02^a$	$0,18 \pm 0,01^a$	$0,33 \pm 0,01^b$	$3,52 \pm 0,04^a$

* Kom – komercijalno vino sorte merlo; VCR1/VCR101 – vino sorte merlo dobijeno od VCR1/VCR101 klonova vinove loze. Vrednosti dobijene u FRAP testu su izražene u ekvivalentima askorbinske kiseline (mg AA/mL). Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SD (u triplicatu). Različita slova u superskriptu su pokazatelji da se dobijene srednje vrednosti merenja statistički značajno razlikuju, na nivou $p < 0,05$, prema HSD Tukey-evom testu; mala slova pokazuju statistički značajne različitosti između vrednosti koje se nalaze u istoj koloni.

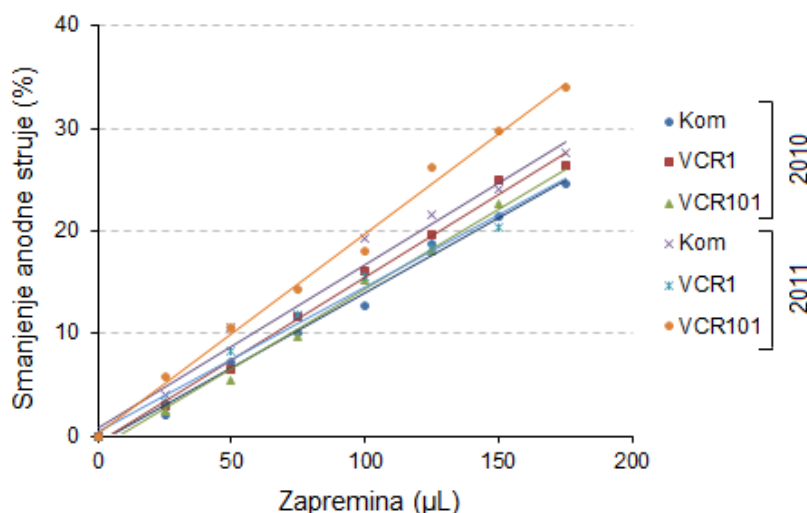
Naime, dok su anti-DPPH i anti-ABTS testovi odabrani kao najčešće korišćeni antiradikalski testovi u analizi biljnih proizvoda [252,253], ispitivanje anti-hidroksil i anti-superoksid radikalske aktivnosti od posebne je važnosti s obzirom na to da su dati radikali prirodno prisutni u živim organizmima. Za razliku od superoksid radikala, koji može biti detoksikovao dejstvom enzima superoksid dismutaze, hidroksil radikal se može eliminisati samo neenzimskim putem [254]. Samim tim, prirodne komponente, poput polifenolnih jedinjenja, koje imaju sposobnost u uklanjanju hidroksil radikala iz organizama dobijaju na još većem značaju i neophodno ih je koristiti u svakodnevnoj ishrani.

Rezultati FRAP testa ukazuju na redukujući potencijal analiziranih vina ekvivalentan od 3,52 do 3,62 mg askorbinske kiseline po mL vina (**Tabela 25**). To znači da jedna čaša vina (200 mL) ima redukujuću sposobnost kao 704 do 724 mg askorbinske kiseline. Dobijeni rezultati navode na zaključak da konzumiranje crvenog vina ima pozitivan uticaj na održanje redoks balansa u uslovima *in vitro*.

4.3.3.2. Klasična polarografija

Antioksidativna aktivnost odabranih uzoraka merlo vina (komercijalno dostupno merlo vino, kao i VCR1 i VCR101 klonovi merlo sorti 2010. i 2011. godine proizvodnje) praćena je metodom klasične polarografije. Ova metoda je po prvi put iskorišćena u analizi pomenutih uzoraka.

Antioksidativna aktivnost je praćena kroz smanjenje granične anodne struje nastale usled stvaranja HPMC kompleksa u baznim rastvorima vodonik peroksida. Posmatran je efekat razlićitih vina na smanjenje polarografske struje (**Slika 52**) kroz zavisnost procenta opadanja početne anodne struje u odnosu na zapreminu gradijentno dodanih alikvota ispitivanih vina. Nagib linearnog dela dobijenih krivih (pomnožen sa 1000) iskorišćen je za izražavanje antioksidativnog kapaciteta uzoraka u %/mL analiziranih vina.



Slika 52. Zavisnost smanjenja anodne struje HPMC kompleksa od dodate zapremine ispitivanih uzoraka. Kom – komercijalno dostupno vino, VCR1/VCR101– vino sorte merlo dobijeno od VCR1/VCR101 klona vinove loze

Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da je najveće smanjenje osnovnog pika anodne struje primećeno pri dodavanju uzorka merlo VCR101 vina iz 2011. godine, pa je samim tim i antioksidativni potencijal datog uzorka najveći ($194,8 \pm 6,6$ %/mL) (**Tabela 26**). Sa druge strane, najmanje smanjenje osnovne struje vodonik peroksida izmereno je pri dodatku merlo VCR1 2011 uzorka ($140,8 \pm 7,2$ %/mL), što ukazuje na njegovu najnižu antioksidativnu aktivnost, mereno metodom klasićne polarografije. Polarografski esej je u ranijim studijama Gorjanović i sar., 2010. i Sužnjević i sar., 2011. godine korišćen u analizi antioksidativne aktivnosti jakih alkoholnih pića, kao i belih i crvenih komercijalno dostupnih vina [255,179,196]. Međutim, u okviru ove studije pomenutom metodom po prvi put su analizirana specifićna klonska vina.

Tabela 26. Antioksidativni potencijal uzoraka vina određen metodom klasićne polarografije.

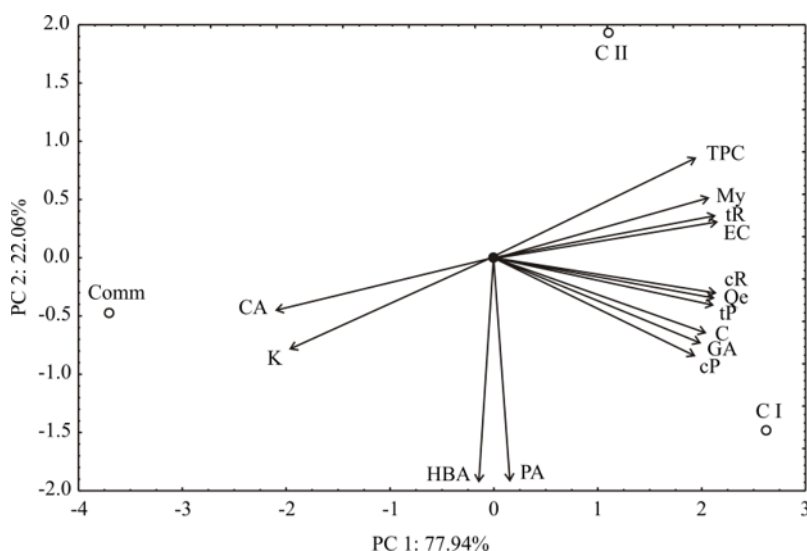
		Uzorak	HPMC (%/mL)
merlo	2010	Kom	$146,1 \pm 5,3$
		VCR1	$161,6 \pm 5,8$
		VCR101	$163,9 \pm 7,1$
	2011	Kom	$159,0 \pm 9,6$
		VCR1	$140,8 \pm 7,2$
		VCR101	$194,8 \pm 6,6$

4.4. Antioksidativna aktivnost odabranih uzoraka vina u ćelijama kvasca

Za dalja ispitivanja antioksidativne aktivnosti crvenih vina u ćelijama *S.cerevisiae* odabrani su uzorci merlo vina, kako komercijalno dostupno vino, tako i vina dobijena od dva različita klona vinove loze VCR1 i VCR101 iz 2011. godine proizvodnje. Data vina su odabrana u odnosu na najveći sadržaj ukupnih fenola, kao i grupno najveći *in vitro* određen antioksidativni potencijal.

4.4.1. Analiza PCA fenolnog profila

Analiza PCA dobijenih rezultata za sadržaj ukupnih fenola (**Tabela 24**) i fenolni profil (**Slika 51**) u uzorcima vina sorte merlo 2011. Godine proizvodnje pokazuje da prve dve komponente iznose 100% od ukupne varijanse (77,94 i 22,06%) u okviru četrnaest promenljivih (sadržaj ukupnih fenola i koncentracija trinaest fenolnih jedinjenja u ispitivanim vinima) (**Slika 53**). Iz mape PCA analize dobijenih rezultata može se videti da sadržaji ukupnih fenola (koji doprinosi 7,4% ukupnoj varijansi, bazirano na korelacijama), My (8,5%), tR (8,85%), EC (8,9%), cR (8,8%), Qe (8,9%), tP (8,8%), C (8,1%), GA (7,8%) i cP (7,4%) postižu pozitivan skor u odnosu na prvu faktorsku koordinatu, dok CA (8,7%) i K (7,7%) pokazuju negativan skor vrednosti u odnosu na prvu faktorsku koordinatu. Negativan doprinos računanja druge faktorske koordinate može se primetiti za PA (32,2% ukupne varijanse, bazirano na korelacijama) i HBA (32,2%), dok je pozitivan doprinos drugoj faktorskoj koordinati izračunat za sadržaj ukupnih fenola (7,3%).



Slika 53. Grafički prikaz PCA analize fenolnog sadržaja u vinu. Kom – komercijalno vino; C I – VCR1 vino; C II – VCR101 vino; TPC – sadržaj ukupnih fenola; GA – galna kiselina; PA – protokatehuinska kiselina; HBA – 4-hidroksibenzoeva kiselina; CA – kafeinska kiselina; C – (+)-katehin; EC – (-)-epikatehin; tR – *trans*-resveratrol; cR – *cis*-resveratrol; tP – *trans*-piceid; cP – *cis*-piceid; My – miricetin, Qe – kvercetin; K – kempferol

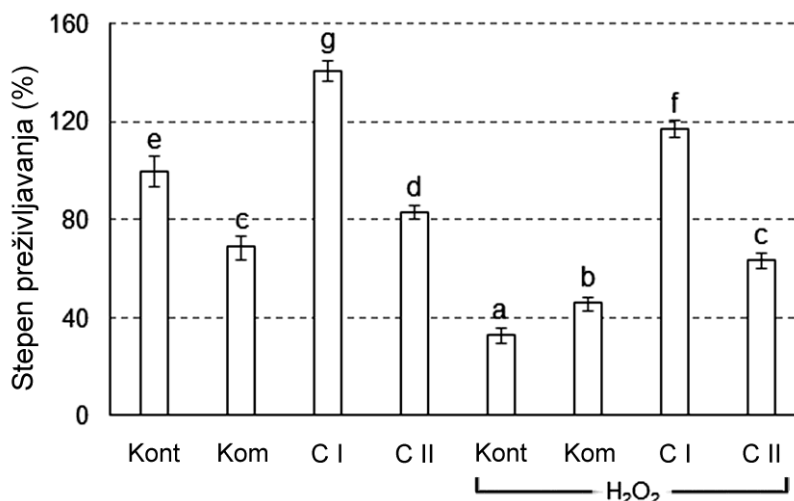
Komponente koje se pojavljuju na PCA grafiku (**Slika 53**), koje su geometrijski blizu jedna drugoj, ukazuju na sličnost parametara koji ih karakterišu. Orijentacija vektora opisuje promenljive u faktorskom prostoru ukazujući na rastući trend datih promenljivih, dok je ugao vektora proporcionalan kvadratu korelacionih vrednosti između fitujuće vrednosti za promenljivu i same promenljive. Uglovi između odgovarajućih promenljivih pokazuju stepen njihove međusobne korelacije (mali uglovi odgovaraju visokoj korelaciji). Upravo korelacionom analizom primećena je pozitivna, statistički značajna, korelacija između najzastupljenijih fenolnih jedinjenja, C i GA ($p < 0,05$). Koncentracija CA je u statistički značajnoj, negativnoj korelaciji u odnosu na koncentracije

EC, tR i My ($p < 0,05$). EC je u pozitivnoj korelaciji u odnosu na tR ($p < 0,05$), dok je cR pozitivno korelisan u odnosu na tP i Qe ($p < 0,05$).

PCA grafik pokazuje dobru diskriminaciju među uzorcima. Uzorci sa većim sadržajem ukupnih fenola, My, tR, EC, cR, Qe, tP, C, GA i cP su locirani na desnoj strani grafika (CI i CII), dok je uzorak komercijalnog vina (Kom), koji sadrži više CA i K lociran sa leve strane grafika. Prva glavna komponenta opisana je pomoću sadržaja ukupnih fenola, My, tR, EC, cR, Qe, tP, C, GA i cP, CA i K (diferencijacija među uzorcima je prvenstveno definisana ovim promenljivama), dok je druga glavna komponenta definisana sadržajem HBA i PA.

4.4.2. Odabrani parametri antioksidativne aktivnosti

Kako bi se ispitao protektivni efekat analiziranih vina merlo sorte 2011. godine proizvodnje u ovoj studiji praćen je stepen preživljavanja ćelija *S. cerevisiae*, sadržaj T-SH grupa, kao i aktivnost antioksidativnih enzima GPx, GR i Cat u ćelijama stresiranim vodonik peroksidom, a prethodno tretiranim ispitivanim uzorcima vina (**Slike 54 i 55**). Ova metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti po prvi put je iskorišćena u analizi pomenutih uzoraka vina.

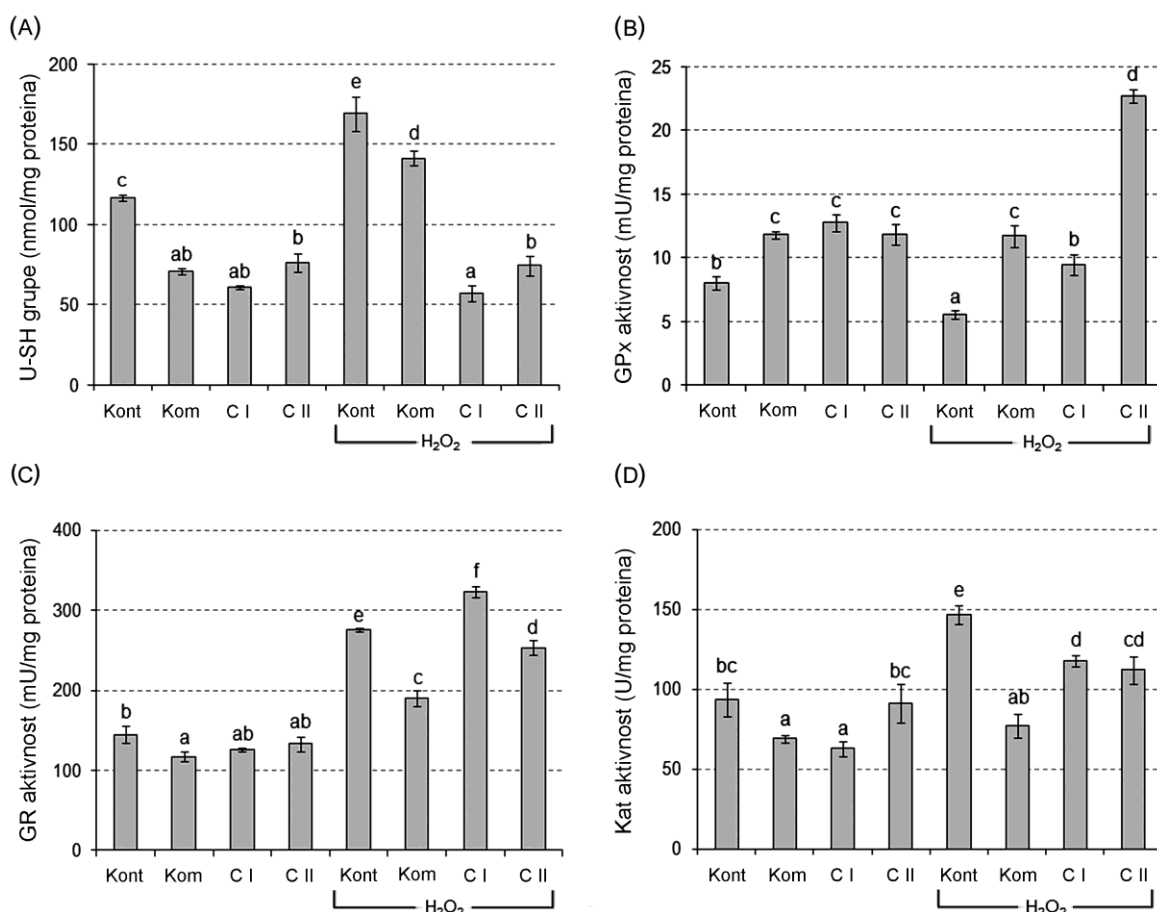


Slika 54. Stepenn preživljavanja ćelija *S. cerevisiae*. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SD. Različita slova iznad stubova u okviru dijagrama, su pokazatelji da se dobijene srednje vrednosti merenja statistički značajno razlikuju, na nivou $p < 0,05$, prema HSD Tukey-evom testu; Kont – negativna kontrola, ćelije tretirane 13% etanolom; Kont + H₂O₂ – pozitivna kontrola, ćelije tretirane vodonik peroksidom; Kom – komercijalno dostupno vino; C I – vino dobijeno od VCR1 klona vinove loze; C II – vino dobijeno od VCR101 klona vinove loze.

U ovom testu uočeno je da izlaganje ćelija kvasaca vodonik peroksidu smanjuje njihov stepen preživljavanja na 33% u poređenju sa kontrolnim ćelijama kvasaca koje su tretirane samo 13% etanolom (100% preživljavanje) (**Slika 54**). Pretretmanom ćelija kvasaca svim analiziranim vinima raste njihova brzina preživljavanja u uslovima stresa, pri čemu je najizraženiji zaštitni efekat primećen za vino dobijeno od VCR1 klona vinove loze. S obzirom na to da je uzorak VCR1 u okviru 2011. godišta najbogatiji galnom kiselinom, (+)-katehinom, ukupnim resveratrolom i kvercetinom (**Slika 51**), može se pretpostaviti da su upravo pomenuta jedinjenja zaslužna za najveći stepen preživljavanja ćelija kvasaca zahvaljujući izraženoj antiradikalnoj aktivnosti. *In vitro* analizama anti-hidroksil radikalske aktivnosti sva analizirana vina su pokazala sličnu aktivnost (**Tabela 25**). Nesaglasnost između rezultata dobijenih u *in vitro* i *in vivo* studijama, a koji se odnose na antioksidativnu aktivnost različitih bioaktivnih jedinjenja, primećena je i u ranijim studijama

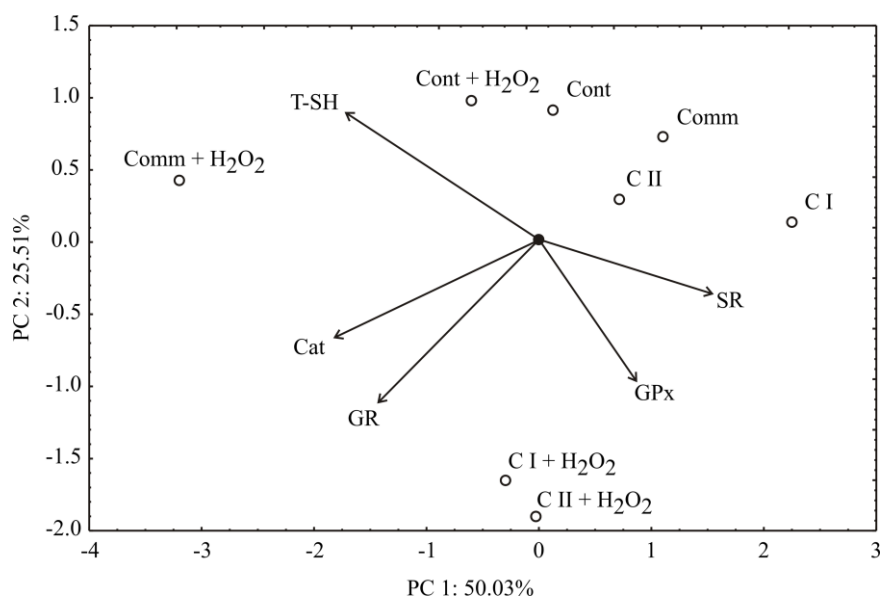
[256,257]. Data zapažanja nisu neočekivana s obzirom da još uvek postoje nerešena pitanja u smislu bioapsorpcije, biodostupnosti, metabolizma, molekulskih meta kao i bioaktivnosti fenolnih jedinjenja *in vivo* [257]. Ranije studije su takođe pokazale da dolazi do sinergijskih interakcija između različitih fenolnih jedinjenja i njihovih metaboličkih proizvoda što može objasniti različitost dobijenih rezultata antioksidativnog kapaciteta *in vitro* i *in vivo* [258].

Kada se obrati pažnja na aktivnost antioksidativnih enzima, vidi se značajno povećanje aktivnosti enzima Cat, kao i značajno smanjenje GPx aktivnosti u ćelijama kvasaca stresiranim vodonik peroksidom. Oba enzima katalizuju reakcije redukcije vodonik peroksida, mada u ovom slučaju, sudeći po dobijenim rezultatima, Cat preuzima dominantnu ulogu u odbrani od oksidativnog napada izazvanog izlaganjem vodonik peroksidu. Dalje je primećeno da svi analizirani uzorci vina pomeraju antioksidativnu odbranu sa katalazne strane, što je dominantno u ćelijama kvasca stresiranim vodonik peroksidom, na GPx–dominantnu odbranu. Naime, može se primetiti da pretretman ispitivanim uzorcima vina prevenira pad u aktivnosti GPx usled dejstva vodonik peroksida, pri čemu je efekat vina dobijenog od VCR101 klona vinove loze najveći (**Slika 55**). Aktivnost GPx u stresiranim ćelijama kvasca prethodno tretiranim datim vinom je više nego dva puta veća u odnosu na kontrolne ćelije. Ukoliko obratimo pažnju na GR, enzim koji redukuje GSSG do GSH, njegova aktivnost je značajno povećana u ćelijama kvasca stresiranim vodonik peroksidom, što je u saglasnosti sa povećanim sadržajem T-SH grupa koji je izmeren u ovim ćelijama. Ovo zapažanje bi moglo ukazati na to da je smanjenje aktivnosti GPx u ćelijama kvasca tretiranim vodonik peroksidom pre usledilo zbog post-translatornih modifikacija koje su uticale na funkciju GPx, nego zbog smanjenja sadržaja ko-supstrata GSH. Dobijeni rezultati ukazuju na to da povećanje u aktivnosti GPx može biti jedan od bioloških mehanizama koji dovodi do većeg stepena preživljavanja ćelija kvasaca u uslovima oksidativnog stresa koje su prethodno tretirane crvenim vinom. Ovakva zapažanja u saglasnosti su sa prethodno objavljenim literaturnim podacima [128,129].



Slika 55. Sadržaj ukupnih SH-grupa i enzimska aktivnost u ćelijama *S. cerevisiae*. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SD. Različita slova iznad stubova u okviru dijagrama, su pokazatelji da se dobijene srednje vrednosti merenja statistički značajno razlikuju, na nivou $p < 0,05$, prema HSD Tukey-evom testu; T-SH – ukupne sulfhidrilne grupe; GPx – glutation peroksidaza; GR – glutation reduktaza; Kat – katalaza; Kont – negativna kontrola, ćelije tretirane 13% etanolom; Kont + H₂O₂ – pozitivna kontrola, ćelije tretirane vodonik peroksidom; Kom – komercijalno dostupno vino; C I – vino dobijeno od VCR1 klona vinove loze; C II – vino dobijeno od VCR101 klona vinove loze.

Analiza PCA rezultata dobijenih u okviru ispitivanja antioksidativne aktivnosti (**Slika 56**) pokazuje da prva komponenta doprinosi 50,02% ukupne varijanse, dok druga komponenta objašnjava 25,51% u okviru pet promenljivih. Kada se pogleda mapa PCA na dobijenim podacima, stepen preživljavanja (koji doprinosi 20,7% ukupne varijanse, bazirano na korelacijama) pokazuje pozitivan skor u odnosu na prvu faktorsku koordinatu, dok GR (18,0%), Kat (29,4%) i T-SH (25,7%), pokazuju negativne vrednosti skora u odnosu na prvu faktorsku koordinatu. Negativan doprinos u proračunu za drugu faktorsku koordinatu uočen je za: GPx (26,0% ukupne varijanse, bazirano na proračunima), GR (35,9%) i Kat (13,1%), dok je pozitivan skor u kalkulaciji za drugu faktorsku koordinatu primećen za T-SH (21,2%).



Slika 56. PCA odnos promenljivih baziran na korelaciji komponenata vezanih za antioksidativnu aktivnost vina. Kom – komercijalno dostupno vino; Kom + H₂O₂ – komercijalno dostupno vino, ćelije tretirane vodonik peroksidom; Kont – negativna kontrola, ćelije tretirane 13% etanolom; Kont + H₂O₂ – pozitivna kontrola, ćelije tretirane vodonik peroksidom; C I – vino dobijeno od VCR1 klona vinove loze; C II – vino dobijeno od VCR101 klona vinove loze; SP – stepen preživljavanja; T-SH – ukupne sulfhidrilne grupe; GPx – glutation peroksidaza; GR – glutation reduktaza; Cat – katalaza.

PCA grafik (**Slika 56**) pokazuje prilično dobru diskriminaciju među uzorcima. Uzorci sa većim T-SH sadržajem i većom Cat i GR aktivnošću su locirani sa leve strane grafika (Kom + H₂O₂ i Kont + H₂O₂), dok su uzorci sa većom aktivnošću GR i GPx locirani pri dnu grafika (C I + H₂O₂ i C II + H₂O₂). Povećan SP je primećen kod uzoraka lociranih sa desne strane grafika (Kom, C I i C II). Takođe se može primetiti da najmanji ugao u odnosu na SP na PCA grafiku zaklapa GPx što ukazuje na to da, u ovom slučaju, aktivnost GPx pokazuje najveći pozitivni efekat na SP. Uzimajući sve dobijene rezultate u obzir može se zaključiti da, sudeći po SP, sva testirana vina pokazuju protektivni efekat u ćelijama kvasca tretiranim vodonik peroksidom, dok povećana aktivnost GPx može biti jedan od bioloških mehanizama koji najviše doprinosi dokazanom protektivnom efektu. Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa prethodno objavljenim literaturnim podacima [128,129].

4.4.3. Analiza ANN

Sve promenljive uzete u obzir u analizi PCA takođe su iskorišćene za ANN modeliranje koje je u ovoj studiji po prvi put iskorišćeno u predviđanju aktivnosti antioksidativnih enzima u odnosu na malu promenu koncentracije fenola u vinima. Određivanje odgovarajućeg broja skrivenih slojeva kao i broja skrivenih neurona u svakom od slojeva jedna je od najkritičnijih stavki u okviru dizajna ANN. Broj neurona u skrivenom sloju zavisi od kompleksnosti odnosa između ulaznih i izlaznih promenljivih. Optimalan broj skrivenih neurona odabran je minimalizujući različitosti između predviđenih ANN vrednosti i željenih izlaznih vrednosti, koristeći sumu kvadrata razlika (SOS) u toku analiza kao indikator performanse. U odnosu na dobijene rezultate primećeno je da je optimalan broj neurona u skrivenom sloju za SP, T-SH, GPx, GR i Cat izračunavanja 7. Algoritam za učenje mreže bio je BFGS 484, a korišćene su *Logistic* aktivacione funkcije za skriveni i izlazni sloj. ANN model je dao prilično dobra predviđanja eksperimentalnih rezultata (SP, T-SH, GPx, GR i Cat), za širok opseg promenljivih. Testiran je i kvalitet poklapanja modela, pri čemu r^2 vrednosti treba da budu što veće i što bliže 1, dok vrednosti χ^2 , MBE, RMSE i MPE treba da budu što niže

(**Tabela 27**). Urađena je takođe i rezidualna analiza razvijenog modela. Ukoliko je Skewness (mera odstupanja raspodele rezidua od normalne ose simetrije) jasno različit od nule, onda je raspodela asimetrična, dok je normalna raspodela perfektno simetrična. Kurtosis meri vrhunac distribucije. Ukoliko se Kurtosis jasno razlikuje od nule onda je distribucija različita od normalne; Kurtosis normalne distribucije je nula. Takođe je analizirana i srednja vrednost, SD i varijansa ostataka, a dobijeni rezultati su prikazani u **Tabeli 27**.

Tabela 27. Kvalitet poklapanja testova i analiza rezidua za optimalan ANN.

	χ^2	RMSE	MBE	MPE	r^2	Skew.	Kurt.	Mean	SD	Var.
SP	29,678	5,136	0,713	4,230	0,976	-0,565	2,797	0,713	5,183	26,867
T-SH	1115,430	31,488	-2,696	0,950	0,957	-0,607	0,630	-2,696	31,970	1022,080
GPx	0,027	0,156	0,005	1,013	0,923	0,688	-0,183	0,005	0,159	0,025
GR	2,935	1,615	-0,103	1,116	0,960	0,034	-1,049	-0,103	1,643	2,698
Cat	6,120	2,332	-0,004	2,426	0,967	0,642	0,635	-0,004	2,377	5,649

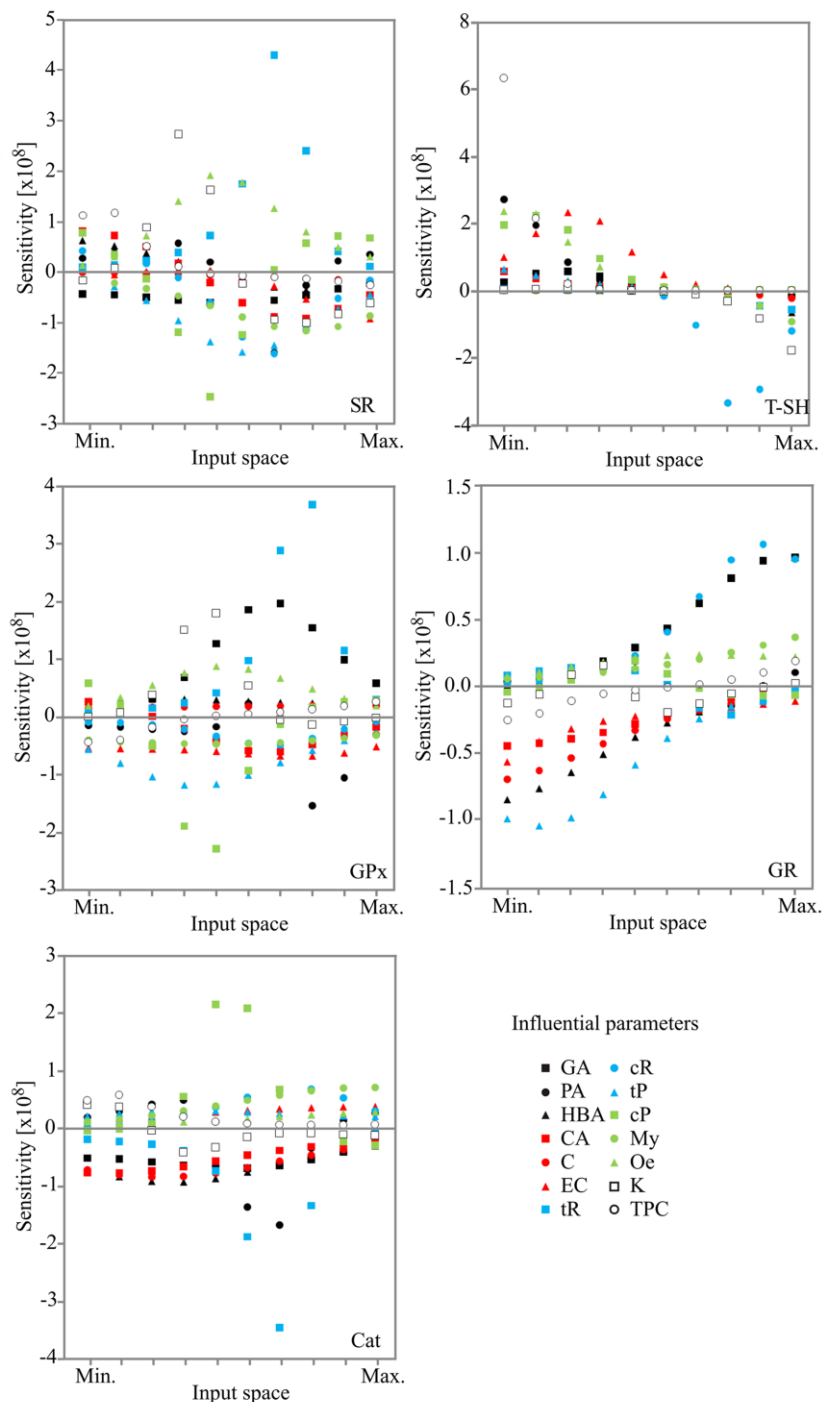
χ^2 – redukovani χ^2 test; RMSE – koren srednje vrednosti greške (engl. *root mean square error*); MBE – srednja vrednost greške odstupanja (engl. *mean bias error*); MPE – srednja procentna greška (engl. *mean percentage error*); r^2 – koeficijent determinacije (engl. *coefficient of determination*); Skew. – zakrivljenost raspodele (engl. *skewness*); Kurt. – kurtosis; SD – standardna devijacija; Var. – varijansa; SP – stepen preživljavanja; T-SH – ukupne sulfhidrilne grupe; GPx – glutation peroksidaza; GR – glutation reduktaza; Cat – katalaza

4.4.4. Analiza osetljivosti enzimskih aktivnosti

Uticaj ulaznih u odnosu na izlazne promenljive, npr. izračunavanjem promene izlaznih promenljivih u odnosu na beskrajno male promene ulaznih promenljivih prikazano je na **Slici 57**. Dobijene vrednosti odgovaraju nivou eksperimentalnih greški, a prikazuju uticaj sadržaja fenolnih jedinjenja na antioksidativnu aktivnost vina izraženu pomoću SP, sadržaja T-SH grupa i aktivnosti GPx, GR i Cat.

Analiza osetljivosti služi da pokaže uticaj ulaznih promenljivih, ali takođe pokazuje i značaj ulazne promenljive u određenoj tački ulaznog prostora [259]. Može se primetiti da na SP najveći pozitivni uticaj imaju male promene u sadržaju tR, Qe i K, dok najveći negativni uticaj imaju male promene u sadržaju cP, cR i tP u sredini ulaznog prostora (**Slika 57**). Na sadržaj T-SH najveći pozitivni efekat imaju male promene u sadržaju ukupnih fenola u oblasti minimuma ulaznog prostora, dok je najveći negativni uticaj primećen pri malim promenama u sadržaju cR u centralnom delu ulaznog prostora. Na aktivnost GPx najpozitivnije deluju male promene u koncentraciji tR blizu gornje granice ulaznog prostora. Može se primetiti da tR ima isti šablon delovanja na aktivnost GPx kao i na SP (**Slika 57**). Pozitivan efekat tR na aktivnost GPx prikazan je u ranijim naučnim radovima. Npr. Sadi i saradnici (2014) [260] su primetili da je aktivnost GPx povećana u jetri dijabetičnih pacova pri tretmanu resveratrolom, dok su Ourique i saradnici (2013) [261] primetili isti efekat resveratrola u testisima T3-indukovanih hipertiroidnih pacova. GA takođe pokazuje isti šablon pozitivnog uticaja na aktivnost GPx kao i na SP u središnjem delu ulaznog prostora, gde koncentracija cP negativno utiče na date parametre. Dobijeni rezultati podržavaju ranije zapažanje o tome da je aktivnost GPx glavna odgovorna za povećanje SP u ćelijama kvasca

stresiranim vodonik peroksidom i prethodno tretiranim analiziranim vinima. Ono što je takođe primećeno jeste da je aktivnost GR pod najvećim pozitivnim uticajem pri malim promenama u koncentraciji cP, dok najnegativniji uticaj na aktivnost GR pokazuju male promene u koncentraciji tR i PK u centralnom delu ulaznog prostora. Ovi nalazi su u skladu sa PCA kao i sa eksperimentalnim merenjima.



Slika 57. Analiza osetljivosti – uticaj ulaznih u odnosu na izlazne promenljive. TPC – koncentracija ukupnih fenola; GA – galna kiselina; PA – protokatehuinska kiselina; HBA – 4-hidroksibenzoeva kiselina; KA – kafeinska kiselina; C – (+)-katehin; EC – (-)-epikatehin; tR – *trans*-resveratrol; cR – *cis*-resveratrol; tP – *trans*-piceid; cP – *cis*-piceid; My – miricetin, Qe – kvercetin; K – kempferol

4.5. Citotoksična aktivnost odabranih uzoraka vina

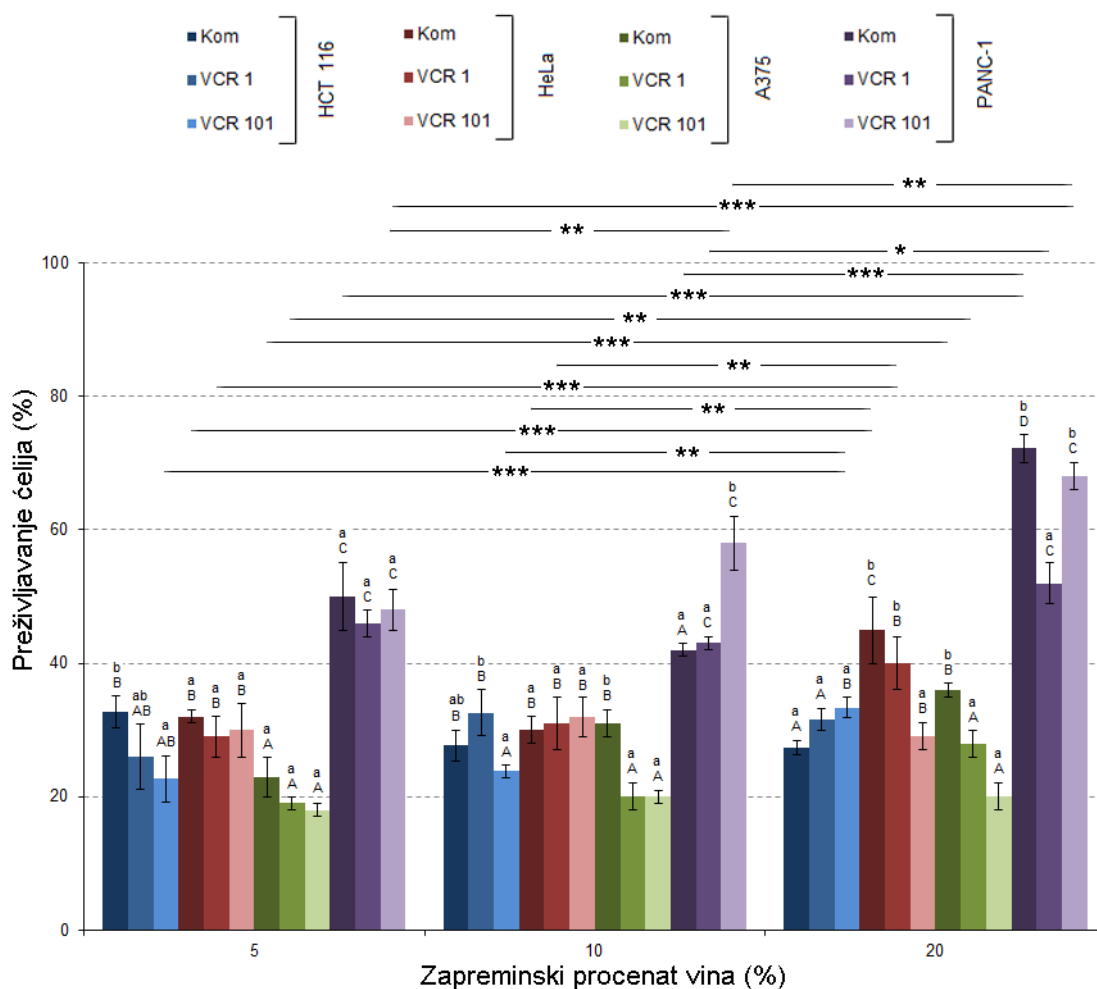
Citotoksična aktivnost analiziranih uzoraka merlo vina (komercijalno dostupno vino, kao i vina dobijena od VCR1 i VCR101 klonova vinove loze, iz 2011. godine proizvodnje) ispitana je u odnosu na četiri kancerske ćelijske linije (HCT116 – ćelijska linija kancera creva, HeLa – ćelijska linija kancera cerviksa, A375 – ćelijska linija melanoma i PANC-1 – ćelijska linija kancera pankreasa) po prvi put u okviru ove studije. Posmatran je efekat analiziranih vina u tri različita zapreminska procenta (5, 10 i 20%).

U okviru 5% zapreminske koncentracije vina prvo što se primećuje (**Slika 58**) jeste da sva tri analizirana vina imaju najslabiji citotoksični efekat na ćelijsku liniju PANC-1 ($p < 0,001$). Poređenjem citotoksičnog efekta na ćelijske linije A375 i HeLa, može se zaključiti da sva tri analizirana vina pokazuju veću aktivnost u odnosu na ćelijsku liniju A375, uzorci Kom i VCR1 sa $p < 0,01$, dok je kod uzorka VCR101 značajnost još veća ($p < 0,001$). Dalje, efekat svih vina na ćelijske linije HCT116 i HeLa je sličan, tj. nema statistički značajne razlike među njima. Takođe se zapaža da jedino uzorak komercijalnog vina ima veći citotoksični efekat na ćelijsku liniju A375 u poređenju sa ćelijskom linijom HCT116 ($p < 0,01$) (**Slika 58**). Međusobnim poređenjem citotoksičnog efekata analiziranih vina pri zapreminskoj koncentraciji od 5% u okviru jedne kancerske ćelijske linije, može se primetiti sličan efekat sva tri vina u odnosu na sve četiri ćelijske linije. Jedino se vidi veća citotoksična aktivnost vina VCR101 na ćelijsku liniju HCT116 u odnosu na komercijalno dostupno vino ($p \leq 0,001$) (**Slika 58**).

Pri 10% zapreminskoj koncentraciji vina takođe se zapaža najslabija citotoksična aktivnost svih vina u odnosu na ćelijsku liniju PANC-1. U okviru ove zapreminske koncentracije vina VCR1 i VCR101 pokazuju veću citotoksičnu aktivnost na A375 nego na ćelijsku liniju HeLa ($p < 0,001$). Komercijalno vino ima sličan efekat na ove dve ćelijske linije. Poređenjem citotoksičnosti vina u odnosu na linije HCT116 i HeLa primećeno je da su aktivnosti slične, osim u slučaju vina VCR101 koje jače deluje na ćelijsku liniju HCT116 ($p < 0,05$) (**Slika 58**). Sa druge strane takođe je nađeno da VCR1 vino jače deluje na A375 nego na ćelijsku liniju HCT116 ($p < 0,001$). VCR101 vino jače deluje na liniju HCT116 u odnosu na VCR1 vino ($p \leq 0,01$). Poređenjem sva tri analizirana vina primećeno je da komercijalno vino deluje najslabije na A375 ($p < 0,001$), dok VCR 101 deluje najslabije na ćelijsku liniju PANC-1 ($p < 0,001$) (**Slika 58**).

Pri 20% zapreminskoj koncentraciji vina još jednom se vidi najslabija citotoksična aktivnost na ćelijsku liniju PANC-1 ($p < 0,001$) (**Slika 58**). I pri ovoj zapreminskoj koncentraciji sva tri vina pokazuju veću aktivnost na ćelijsku liniju A375 nego na HeLa ćelije. Ovde se takođe primećuje jače dejstvo komercijalnog ($p < 0,001$) i vina VCR1 ($p < 0,05$) na ćelijsku liniju HCT116 u odnosu na HeLa ćelije. Može se primetiti da pri ovoj zapreminskoj koncentraciji VCR101 vino deluje jače na ćelije A375 u poređenju sa ćelijama HCT116, dok je u slučaju komercijalnog vina efekat suprotan. Međusobnim poređenjem citotoksične aktivnosti ispitivanih vina u okviru efekta na pojedinačne kancerske ćelijske linije pri 20% zapreminskoj koncentraciji vina vidi se da VCR101 vino najjače deluje na ćelije HeLa, dok komercijalno vino najslabije deluje na ćelijsku liniju A375 u odnosu na preostala vina (**Slika 58**). U okviru ćelijske linije PANC-1 VCR1 vino pokazuje najjače citotoksično dejstvo ($p < 0,001$).

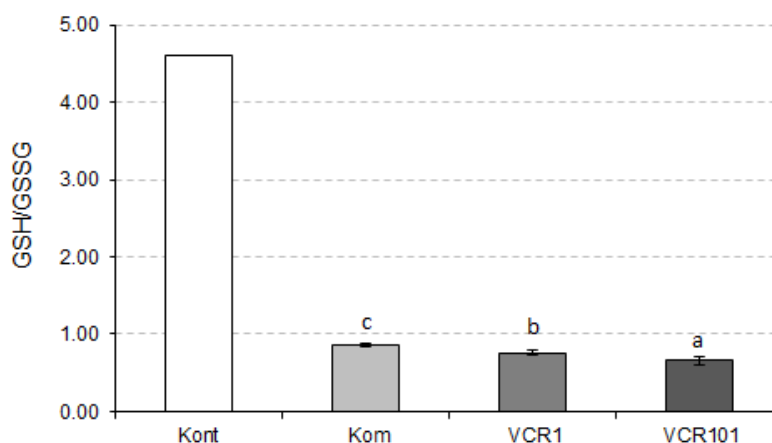
Može se primetiti da u većini slučajeva 5% zapreminska zastupljenost pokazuje veću citotoksičnu aktivnost u odnosu na 20% koncentraciju vina. Naime, to se odnosi na dejstvo komercijalnog vina na ćelije HeLa, A375 i PANC-1, dejstvo uzorka VCR1 na HeLa i A375, kao i dejstvo vina VCR101 na ćelijske linije HCT116 i PANC-1. U pojedinim slučajevima i 10% koncentracija vina ima veću citotoksičnost od 20% (uzorak Kom na ćelije HeLa i PANC-1, VCR1 vino na ćelije HeLa i PANC-1 i VCR101 vino na ćelijsku liniju HCT116 i PANC-1).



Slika 58. Zavisnost preživljavanja kancerskih ćelija u odnosu na zapreminski procenat vina u analiziranoj smeši. Kom – komercijalno dostupno vino; VCR1/VCR101 – vino sorte merlo dobijeno od VCR1/VCR101 klona vinove loze. HCT116 – ćelijska linija kancera creva, HeLa – ćelijska linija kancera cerviksa, A375 – ćelijska linija melanoma i PANC-1 – ćelijska linija kancera pankreasa. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SD (u triplikatu ili kvadriplikatu). Dati simboli su pokazatelji da se dobijene srednje vrednosti merenja statistički značajno razlikuju, na nivou: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$, prema HSD Tukey-evom testu. Različita slova pokazuju značajnu statističku različitost. Mala slova označavaju statističku značajnost dejstva različitih vina u okviru jedne kancerske ćelijske linije, dok velika slova pokazuju statističku značajnost citotoksičnog delovanja jednog vina na četiri različite kancerske ćelijske linije.

4.5.1. Odnos GSH/GSSG

Prooksidativno dejstvo analiziranih uzoraka crvenog vina sorte merlo, 2011. godine proizvodnje na melanomsku ćelijsku liniju (A375) prikazano je na **Slici 59**.



Slika 59. GSH/GSSG odnos u kontrolnim ćelijama A375 (Kont) i ćelijama A375 tretiranim crvenim vinima sorte merlo, 2011. godište i to: komercijalno dostupnim vinom (Kom) i vinom dobijenih od VCR1 i VCR101 klonova grožđa. Sve vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SD (u triplikatu ili kvadruplikatu). Različita slova pokazuju značajnu statističku različitost među rezultatima na nivou $p < 0,05$, prema HSD Tukey-evom testu.

Može se primetiti da je GSH/GSSG odnos u kancerskim ćelijama tretiranim sa sva tri uzorka merlo vina znatno manji od onog nađenog u kontrolnim (netretiranim) ćelijama A375 ($p < 0,001$) (**Slika 59**). Takođe se može primetiti da je u ćelijama tretiranim VCR101 vinom GSH/GSSG odnos najmanji ($0,66 \pm 0,05$) i da je značajno manji u odnosu na odnos nađen u ćelijama tretiranim komercijalnim vinom ($0,85 \pm 0,02$) ($p < 0,001$) i ćelijama tretiranim VCR1 vinom ($0,76 \pm 0,03$) ($p < 0,05$). Tretman komercijalnim vinom manje pomera ravnotežu prema GSSG i u odnosu na tretman VCR1 uzorkom ($p < 0,05$).

Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da je uzrok pomerene GSH/GSSG ravnoteže prema GSSG prooksidativno dejstvo crvenih vina u ćelijama A375. Ovaj rezultat je od izuzetnog značaja imajući u vidu hemio- i radio-rezistentnost melanomskih ćelija. Dati zaključak je u skladu sa dosadašnjim naučnim pretpostavkama i saznanjima da polifenolna jedinjenja biljnog porekla upravo prooksidativnim dejstvom ispoljavaju svoju antikancerogenu aktivnost [80,137,139,262].

4.6. Antibakterijska aktivnost odabranih uzoraka vina

Antibakterijska aktivnost analiziranih uzoraka vina merlo, po prvi put ispitana u okviru ove studije, izražena je kroz vrednost MIC ($\mu\text{L/mL}$), koja predstavlja minimalnu koncentraciju vina koja sprečava rast bakterija u eksperimentalnim uslovima (**Tabela 28**). U tu svrhu ispitana je antibakterijska aktivnost vina u odnosu na četiri soja Gram-pozitivnih i četiri soja Gram-negativnih bakterija u koncentracijskom opsegu vina od 0,25 do 500 $\mu\text{L/mL}$. Dobijeni rezultati su pokazali da sva vina u datom opsegu koncentracija dostižu odgovarajuće vrednosti MIC, čime je potvrđeno njihovo antibakterijsko dejstvo u odnosu na ispitivane bakterijske sojeve (**Tabela 28**). Može se primetiti da se vrednosti MIC svih analiziranih vina kreću od 125 do 500 $\mu\text{L/mL}$. Dobijeni rezultati pokazuju da je uzorak VCR1 2011 uzorak sa najjačom ukupnom antibakterijskom aktivnošću u odnosu na osam ispitivanih bakterijskih sojeva. S obzirom na to da je uzorak VCR1 2011, uzorak sa najvećim sadržajem ukupnog resveratrola, (+)-katehina i kvercetina (**Slika 51**), pokazana antibakterijska aktivnost može biti s tim u vezi. Prethodne naučne studije su pokazale da su fenolna jedinjenja sposobna da ireverzibilno menjaju ćelijsku membranu bakterija, pri čemu je antibakterijska aktivnost direktno zavisna od strukture samih jedinjenja [263,264]. Osim toga, Arima i saradnici (2002) su pokazali da postoji sinergija u antibakterijskom delovanju flavonoida [265]. Takođe se može primetiti da je antibakterijska aktivnost svih ispitivanih uzoraka vina

očekivano izrazito slabija od pozitivne kontrole, antibiotika amikacina (**Tabela 28**). Prethodno dobijeni literaturni podaci su u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj studiji [156].

Tabela 28. Antibakterijska aktivnost ispitivanih uzoraka vina, izražena kroz minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIC).

Bakterijski soj	Kom	VCR1	VCR101	Kom	VCR1	VCR101	Amikacin
	2010			2011			
	μL/mL						μg/mL
Gram (+)							
<i>S. aureus</i>	250	500	125	250	125	125	11
<i>C. sporogenes</i>	500	500	250	500	125	250	15
<i>K. rhizophila</i>	500	250	250	500	125	250	2
<i>B. subtilis</i>	500	500	125	500	125	125	42
Gram (-)							
<i>E. coli</i>	250	250	250	250	125	250	5
<i>P. hauseri</i>	500	500	250	500	250	250	7
<i>P. aeruginosa</i>	500	500	125	250	125	250	50
<i>K. pneumoniae</i>	500	500	250	500	250	500	8

V ZAKLJUČAK

1. Sva analizirana vina bogat su izvor fenolnih jedinjenja, kao i makro i mikro elemenata u okviru dozvoljenih ili uobičajenih granica.
2. Najzastupljenija fenolna jedinjenja u svim vinima su galna kiselina i (+)-katehin, dok je kalijum najzastupljeniji makroelement.
3. Vina 2010. godišta svih sorti sadrže najmanje fenolnih jedinjenja što je u skladu sa podatkom da je 2010. bila godina sa mnogo manje sunčanih dana u oblasti vinograda nego 2011. i 2012. U okviru uzoraka komercijalnih vina, merlo i kaberne sovinjon sorte ističu se kao hemijski kvalitetnije od sorte vranac.
4. Merlo 2012 je uzorak najbogatiji fenolnim jedinjenjima, sa izrazitom anti-DPPH radikalskom aktivnošću. Ovo vino je i najbogatije aluminijumom, gvožđem, manganom i cinkom.
5. Spektrofotometrijska i EPR metoda izdvajaju CI 2010 kao uzorak sa najnižom anti-DPPH radikalskom aktivnošću, što je u saglasnosti sa najmanjim sadržajem ukupnih fenola, među uzorcima sorte vranac. Najviša anti-DPPH radikalska aktivnost nađena je u uzorku CIII 2011.
6. Metoda ciklične voltametrije izdvojila je vina CIII (2010 i 2011) i vino CII 2012 kao antioksidativno najaktivnija u okviru svog godišta.
7. CII i CIII 2012 su uzorci najbogatiji ukupnim fenolima, flavonoidima i antocijanima, kao i uzorci sa veoma visokom anti-DPPH radikalskom aktivnošću.
8. Spektrofotometrijski određena anti-DPPH radikalska aktivnost klonskih vina merlo sorte viša je u odnosu na komercijalno, dok je klasičnom polarografijom najjača antioksidativna aktivnosti izmerena u uzorku VCR101 2011.
9. Merlo vina 2011. godišta pokazala su i anti-ABTS, anti-hidroksil i anti-superoksidnu aktivnost, kao i aktivnost u FRAP testu.
10. Klonska merlo vina sadrže više galne kiseline, (+)-katehina, miricetina i kvercetina u odnosu na komercijalna vina. VCR1 2011 uzorak se ističe kao najbogatiji ukupnim resveratrolom, (+)-katehinom i kvercetinom.
11. Sva analizirana merlo vina povećavaju stepen preživljavanja ćelija *S. cerevisiae* u uslovima oksidativnog stresa, pri čemu je protektivno dejstvo VCR1 2011 vina najjače. Protektivni efekat analiziranih uzoraka vina prvenstveno je zasluga aktivnosti GPx.
12. Pomoću ANN razvijena je brza i precizna metoda za predviđanje aktivnosti antioksidativnih enzima u odnosu na malu promenu koncentracije fenolnih jedinjenja u vinima sa visokom tačnošću predviđanja ($R^2 = 0,98$). Rezultati posebno ukazuju na to da sadržaj *trans*-resveratrola u vinima u okviru izmerenih gornjih granica pozitivno utiče na aktivnost GPx i ćelijsko preživljavanje.
13. Sva analizirana vina pokazuju citotoksičnu aktivnost u odnosu na četiri kancerske ćelijske linije. Naj snažnije dejstvo uočeno je u odnosu na melanomske ćelije i ćelijsku liniju kancera creva HCT116, dok je najslabije delovanje primećeno u odnosu na ćelijsku liniju kancera pankreasa. Smanjen odnos GSH/GSSG u melanomskim ćelijama tretiranim merlo vinima u odnosu na netretirane ćelije ukazuje na prooksidativno dejstvo datih vina u kancerskim ćelijama.
14. Analizirana vina merlo sorte pokazuju antibakterijsku aktivnost u odnosu na osam patogenih bakterijskih sojeva. VCR1 2011 uzorak se izdvaja kao uzorak sa najjačom ukupnom antibakterijskom aktivnošću, što je u skladu sa najvećom zastupljenošću fenolnih jedinjenja sa pokazanom antibakterijskom aktivnošću.

Doprinos date teze, pre svega, ogleda se u hemijskoj i biološkoj karakterizaciji (uključujući biohemijske aspekte) do sada neispitivanih uzoraka klonskih sortnih vina vranac i merlo. Ona predstavlja jednu od retkih studija baziranoj na kombinaciji klasičnih i savremenih eksperimentalnih metoda u karakterizaciji crvenih vina. S druge strane, plastično je demonstrirano kako se primenom napredne statistike detaljnije može sagledati skrivena biološka aktivnost. Svi

protokoli opisani u okviru ove doktorske disertacije sa uspehom se mogu primeniti i u karakterizaciji belih i roze vina.

Dalja istraživanja, koja su u planu, trebalo bi da budu fokusirana na simuliranu *in vitro* digestiju odabranih uzoraka crvenih vina zbog procene uticaja različitih faktora (pH, prisustvo enzima i/ili hrane, drugo), tokom digestije, na antioksidativnu aktivnost vina. Time bi se, u stvari, stekla potpunija slika o efektima crvenih vina u uslovima *in vivo*, po njihovom transportu kroz digestivni trakt. S druge strane, ispitivanje uticaja pojedinih fenolnih komponenti vina na ekspresiju gena u zdravlju i bolesti predstavlja dugoročni cilj kojem će se intenzivno težiti u vremenu pred nama.

VI LITERATURA

- [1] Jackson RS. Wine Science Principles and Applications. 3rd Edition. Amsterdam, etc: Academic Press (Elsevier). 2008.
- [2] Geana EI, Marinescu A, Iordache AM, Sandru C, Ionete RE, Bala C. Differentiation of Romanian wines on geographical origin and wine variety by elemental composition and phenolic components. *Food Anal Methods* 2014;7:2064–74.
- [3] Ivanova-Petropulos V, Jakabová S, Nedelkovski D, Pavlík V, Balážová Ž, Hegedűs O. Determination of Pb and Cd in Macedonian wines by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). *Food Anal Methods* 2015;8:1947–52.
- [4] Fragopoulou E, Choleva M, Antonopoulou S, Demopoulos CA. Wine and its metabolic effects. A comprehensive review of clinical trials. *Metabolism* 2018;83:102–19.
- [5] <http://www.plantaze.com/o-nama/vinogradi/> (pristupljeno: 17.12.2019.).
- [6] Maras V, Tomic M, Kodzulovic V, Sucur S, Raicevic J, Raicevic D, et al. Research of origin and work on clonal selection of Montenigrin grapevine varieties cv. vranac and cv. kratosija. *Agroznanje* 2012;13:103–12.
- [7] Maraš V, Popović T, Gazivoda A, Raičević J, Kodžulović V, Mugoša M, et al. Origin and characterization of Montenegrin grapevine varieties. *Vitis* 2015;54:135–7.
- [8] Maras V, Bogicevic M, Tomic M, Kodzulovic V, Sucur S, Cizmovic M, et al. Ampelometric, genetic and sanitary evaluation of CV. Vranac. *Bull UASVM Horticulture* 2011;68:155-162.
- [9] Lorrain B, Chira K, Teissedre P-L. Phenolic composition of Merlot and Cabernet-Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. *Food Chem* 2011;126:1991–9.
- [10] Vujović D, Maletić R, Popović-Đorđević J, Pejin B, Ristić R. Viticultural and chemical characteristics of Muscat Hamburg preselected clones grown for table grapes. *J Sci Food Agric* 2017;97:589–94.
- [11] Žulj Mihaljević M, Anhalt UCM, Rühl E, Tomić Mugoša M, Maraš V, Forneck A, et al. Cultivar identity, intravarietal variation, and health status of native grapevine varieties in Croatia and Montenegro. *Am J Enol Vitic* 2015;66:531–41.
- [12] Cretazzo E, Tomás M, Padilla C, Rosselló J, Medrano H, Padilla V, et al. Incidence of virus infection in old vineyards of local grapevine varieties from Majorca: implications for clonal selection strategies. *Spanish J Agric Res* 2010;8:409–18.
- [13] Mahmoudzadeh H. Clonal selection and superior cultivar selection of Iranian grape germplasm to cold hardiness. *ISHS Acta Horticulturae 1082: XI International Conference on Grapevine Breeding Genetics, 2015*, p. 255–8.
- [14] Mannini F. Clonal selection in grapevine: Interactions between genetic and sanitary strategies to improve propagation material. *Acta Horticulture* 2000;528:703–12.
- [15] Maraš V, Kodžulović V, Mugoša M, Raičević J, Gazivoda A, Šučur S, et al. Clonal selection of autochthonous grape variety Vranac in Montenegro. In: Badnjević A, Editor. Part of the IFMBE Proceedings (Vol. 62), CMBEBIH 2017, p. 787–90.
- [16] <http://vivairauscedo.com/en/cloni-originali-vcr> (pristupljeno: 17.12.2019.).
- [17] <http://www.novavine.com/grapevines/varieties-and-clones/vcr-vivai-cooperativi-rauscedo-selections/> (pristupljeno: 17.12.2019.).
- [18] Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol Plant* 2010;3:2–20.
- [19] Stockley C, Teissedre P-L, Boban M, Di Lorenzo C, Restani P. Bioavailability of wine-derived phenolic compounds in humans: A review. *Food Funct* 2012;3:995–1007.
- [20] Ribereau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D. Phenolic Compounds. *Handbook of Enology, Vol. 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments, 2nd Edition*, Wiley, 2006, p. 141–205.
- [21] Woraratphoka J, Intarapichet K, Indrapichate K. Phenolic compounds and antioxidative properties of selected wines from the northeast of Thailand. *Food Chem* 2007;104:1485–90.

- [22] Lima GPP, Vianello F, Corrêa Renata C, Campos RA da S, Borguini MG. Polyphenols in fruits and vegetables and its effect on human health. *Food Nutr Sci* 2014;5:1065–82.
- [23] Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet (London, England)* 1992;339:1523–6.
- [24] Pajović SB. Nutrigenomics. *Genetika* 2008;40:67–74.
- [25] Youdim KA, McDonald J, Kalt W, Joseph JA. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. *J Nutr Biochem* 2002;13:282–8.
- [26] Vujovic D, Pejin B, Djordjevic JP, Kosovic A, Velickovic M. An insight into selected properties of Merlot wines obtained from three new clone candidates. *Rev Chim* 2016;67:998–1000.
- [27] Treutter D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Env Chem Lett* 2006;4:147–57.
- [28] Lago JHG, Toledo-Arruda AC, Mernak M, Barrosa KH, Martins MA, Tibério IFLC, et al. Structure-activity association of flavonoids in lung diseases. *Molecules* 2014;19:3570–95.
- [29] Castilo-Munoz N, Gomez-Alonso S, Garcia-Romero E, Hermosin-Gutierrez I. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar Wines. *J Agric Food Chem* 2007;55:992–1002.
- [30] Spayd SE, Tarara JM, Mee DL, Ferguson JC. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* CV. Merlot berries. *Am J Enol Vitic* 2002;53:171–82.
- [31] Castellari M, Matricardi L, Arfelli G, Galassi S, Amati A. Level of single bioactive phenolics in red wine as a function of the oxygen supplied during storage. *Food Chem* 2000;69:61–7.
- [32] De Beer D, Joubert E, Marais J, Manley M. Unravelling the total antioxidant capacity of pinotage wines: Contribution of phenolic Compounds. *J Agric Food Chem* 2006;54:2897–905.
- [33] Mattivi F, Guzzon R, Vrhovsek U, Stefanini M, Velasco R. Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins. *J Agric Food Chem* 2006;54:7692–702.
- [34] Pasetto S, Pardi V, Murata RM. Anti-HIV-1 activity of flavonoid myricetin on HIV-1 infection in a dual-chamber *in vitro* model. *PLoS One* 2014;9:1–18.
- [35] Xu HX, Lee SF. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. *Phyther Res* 2001;15:39–43.
- [36] Holder S, Zemskova M, Zhang C, Tabrizizad M, Bremer R, Neidigh JW, et al. Characterization of a potent and selective small-molecule inhibitor of the PIM1 kinase. *Mol Cancer Ther* 2007;6:163–72.
- [37] Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem* 2001;49:2774–9.
- [38] Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:933–56.
- [39] Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 2005;579:200–13.
- [40] Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys* 2009;53:75–100.
- [41] Escandar GM. Complexing behavior of rutin and quercetin. *Can J Chem* 1991;69:1994–2001.
- [42] Sestili P, Diamantini G, Bedini A, Cerioni L, Tommasini I, Tarzia G, et al. Plant-derived phenolic compounds prevent the DNA single-strand breakage and cytotoxicity induced by tert-butylhydroperoxide via an iron-chelating mechanism. *Biochem J* 2002;364:121–8.
- [43] Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, et al. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett* 1997;416:123–9.
- [44] Zanwar AA, Badole SL, Shende PS, Hegde M V., Bodhankar SL. Antioxidant role of

catechin in health and disease. Polyphenols in Human Health and Disease, Vol. 1, Academic Press, 2013, p. 267–71.

- [45] Williamson G, Dionisi F, Renouf M. Flavanols from green tea and phenolic acids from coffee: Critical quantitative evaluation of the pharmacokinetic data in humans after consumption of single doses of beverages. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:864–73.
- [46] Minussi RC, Rossi M, Bologna L, Cordi L, Rotilio D, Pastore GM, et al. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chem* 2003;82:409–16.
- [47] Mitjans M, del Campo J, Abajo C, Martinez V, Selga A, Lozano C, et al. Immunomodulatory activity of a new family of antioxidants obtained from grape polyphenols. *J Agric Food Chem* 2004;52:7297–9.
- [48] Grzesik M, Naparło K, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I. Antioxidant properties of catechins: comparison with other antioxidants. *Food Chem* 2018;241:480–92.
- [49] Sugihara N, Arakawa T, Ohnishi M, Furuno K. Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with α -linolenic acid. *Free Radic Biol Med* 1999;27:1313–23.
- [50] Sugihara N, Ohnishi M, Imamura M, Furuno K. Differences in antioxidative efficiency of catechins in various metal-induced lipid peroxidations in cultured hepatocytes. *J Heal Sci* 2001;47:99–106.
- [51] Martínez V, Ugartondo V, Vinardell MP, Torres JL, Mitjans M. Grape epicatechin conjugates prevent erythrocyte membrane protein oxidation. *J Agric Food Chem* 2012;60:4090–5.
- [52] Cherrak SA, Mokhtari-Soulmane N, Berroukeche F, Bensenane B, Cherbonnel A, Merzouk H, et al. *In vitro* antioxidant versus metal ion chelating properties of flavonoids: A structure-activity investigation. *PLoS One* 2016;11:e0165575.
- [53] Butt MS, Imran A, Sharif MK, Shabir Ahmad R, Xiao H, Imran M, et al. Black tea polyphenols: A mechanistic treatise. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2014;54:1002–11.
- [54] Wang H, Wen Y, Du Y, Yan X, Guo H, Rycroft JA, et al. Effects of catechin enriched green tea on body composition. *Obesity* 2010;18:773–9.
- [55] Sutherland BA, Rahman RMA, Appleton I. Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *J Nutr Biochem* 2006;17:291–306.
- [56] Pereira RB, Sousa C, Costa A, Andrade PB, Valentão P. Glutathione and the antioxidant potential of binary mixtures with flavonoids: Synergisms and Antagonisms. *Molecules* 2013;18:8858–72.
- [57] Van Acker SABE, Van Den Berg DJ, Tromp MNJL, Griffioen DH, Van Bennekom WP, Van Der Vijgh WJF, et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:331–42.
- [58] Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* 1990;186:343–55.
- [59] He J, Giusti M. Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties. *Annu Rev Food Sci Technol* 2010;1:163–87.
- [60] Heinonen IM, Meyer AS, Frankel EN. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *J Agric Food Chem* 1998;46:4107–12.
- [61] Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Bagchi BJ, Balmoori J, et al. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. *Gen Pharmacol* 1998;30:771–6.
- [62] Tsuda T. Recent progress in anti-obesity and anti-diabetes effect of berries. *Antioxidants* 2016;5:pii:E13.
- [63] Mazza G. Anthocyanins and heart health. *Ann Ist Super Sanita* 2007;43:369–74.
- [64] Rentzsch M, Wilkens A, Winterhalter P. Non-flavonoid phenolic compounds. *Wine Chemistry and Biochemistry*, 2009, p. 509–27.

- [65] Pozo-Bayon AM, Hernandez TM, Martin-Alvarez PJ, Polo CM. Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties. *J Agric Food Chem* 2003;51:2089–95.
- [66] Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727–47.
- [67] Boulton R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *Am J Enol Vitic* 2001;52:67–87.
- [68] Robbins RJ. Phenolic Acids in Foods: An overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem* 2003;51:2866–87.
- [69] Pereira DM, Valentão P, Pereira JA, Andrade PB. Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules* 2009;14:2202–11.
- [70] Marinova EM, Yanishlieva N V. Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. *Food Chem* 2003;81:189–97.
- [71] Cuvelier M-E, Richard H, Berset C. Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: Structure-activity relationship. *Biosci Biotechnol Biochem* 1992;56:324–5.
- [72] Wang YJ, Thomas P, Zhong JH, Bi FF, Kosaraju S, Pollard A, et al. Consumption of grape seed extract prevents amyloid- β deposition and attenuates inflammation in brain of an Alzheimer's disease mouse. *Neurotox Res* 2009;15:3–14.
- [73] Liu Y, Pukala TL, Musgrave IF, Williams DM, Dehle FC, Carver JA. Gallic acid is the major component of grape seed extract that inhibits amyloid fibril formation. *Bioorg Med Chem Lett* 2013;23:6336–40.
- [74] Guebailia HA, Chira K, Richard T, Mabrouk T, Furiga A, Vitrac X, et al. Hopeaphenol: The first resveratrol tetramer in wines from North Africa. *J Agric Food Chem* 2006;54:9559–64.
- [75] Buiarelli F, Coccioli F, Jasionowska R, Merolle M, Terracciano A. Analysis of some stilbenes in Italian wines by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007;21:2955–64.
- [76] Cvejic JM, Djekic S V., Petrovic A V., Atanackovic MT, Jovic SM, Brceski ID, et al. Determination of *trans*- and *cis*-resveratrol in Serbian commercial wines. *J Chromatogr Sci* 2010;48:229–34.
- [77] Regev-Shoshani G, Shoseyov O, Bilkis I, Kerem Z. Glycosylation of resveratrol protects it from enzymic oxidation. *Biochem J* 2003;374:157–63.
- [78] Perrone G, Nicoletti I, Pascale M, De Rossi A, De Girolamo A, Visconti A. Positive correlation between high levels of ochratoxin A and resveratrol-related compounds in red wines. *J Agric Food Chem* 2007;55:6807–12.
- [79] Cantos E, Espin JC, Fernandez MJ, Oliva J, Tomas-Barberan FA. Postharvest UV-C-irradiated grapes as a potential source for producing stilbene-enriched red wines. *J Agric Food Chem* 2003;51:1208–14.
- [80] De la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans* 2007;35:1156–60.
- [81] Zini R, Morin C, Bertelli A, Tillement JP. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp Clin Res* 1999;25:87–97.
- [82] Gülçin I. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2010;11:210–8.
- [83] Losa GA. Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. *Eur J Clin Invest* 2003;33:818–23.
- [84] Yen GC, Duh PD, Lin CW. Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free Radic Res* 2003;35:509–14.
- [85] Su D, Cheng Y, Liu M, Liu D, Cui H, Zhang B, et al. Comparison of piceid and resveratrol in antioxidation and antiproliferation activities *in vitro*. *PLoS One* 2013;8:e54505.
- [86] Ahmad KA, Clement M-V, Pervaiz S. Pro-oxidant activity of low doses of resveratrol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1010:365–73.

- [87] Cheynier V, Dueñas-Paton M, Salas E, Maury C, Souquet J-M, Sarni-Manchado P, et al. Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am J Enol Vitic* 2006;57:298–305.
- [88] McRae JM, Kennedy JA. Wine and grape tannin interactions with salivary proteins and their impact on astringency: A review of current research. *Molecules* 2011;16:2348–64.
- [89] Đorđević N, Novaković M, Pejin B, Živković M, Savić A, Mutić J, et al. An insight into chemical composition and biological activity of Montenegrin Vranac red wine. *Sci Hortic (Amsterdam)* 2018;230:142–8.
- [90] Nicolini G, Larcher R, Pangrazzi P, Bontempo L. Changes in the contents of micro- and trace-elements in wine due to winemaking treatments. *Vitis* 2004;43:41–5.
- [91] Catarino S, Curvelo-Garcia AS, Sousa RB. Measurements of contaminant elements of wines by inductively coupled plasma-mass spectrometry: A comparison of two calibration approaches. *Talanta* 2006;70:1073–80.
- [92] OIV. International Code of Oenological Practices. Vol. 33. 2017.
- [93] Almeida CM, Vasconcelos MT. Multielement composition of wines and their precursors including provenance soil and their potentialities as fingerprints of wine origin. *Food Chem* 2003;51:4788–98.
- [94] Ribereau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D. Dry extract and minerals. *Handbook of Enology, Vol. 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*, Wiley, 2nd Edition, 2006, p. 91–109.
- [95] Perez V, Chang ET. Sodium-to-potassium ratio and blood pressure, hypertension, and related factors. *Adv Nutr* 2014;5:712–41.
- [96] Cole K, Kohn E. Calcium-mediated signal transduction: biology, biochemistry, and therapy. *Cancer Metastasis Rev* 1994;13:31–44.
- [97] Van Leer EM, Seidell JC, Kromhout D. Dietary calcium, potassium, magnesium and blood pressure in the Netherlands. *Int J Epidemiol* 1995;24:1117–23.
- [98] Lopez-Ridaura R, Willett WC, Rimm EB, Liu S, Stampfer MJ, Manson JE, et al. Magnesium intake and risk of type 2 diabetes in men and women. *Diabetes Care* 2004;27:134–40.
- [99] Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 1995;18:321–36.
- [100] Leonard SS, Harris GK, Shi X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1921–42.
- [101] Reid TM, Feig DI, Loeb LA. Mutagenesis by metal-induced oxygen radicals. *Environ Health Perspect* 1994;102:57–61.
- [102] Huang C, Li J, Zhang Q, Huang X. Role of bioavailable iron in coal dust-induced activation of activator protein-1 and nuclear factor of activated T cells: Difference between Pennsylvania and Utah coal dusts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;27:568–74.
- [103] McCarthy TJ, Zeelie JJ, Krause DJ. The antimicrobial action of zinc ion/antioxidant combinations. *J Clin Pharm Ther* 1992;17:51–4.
- [104] Nehru B, Anand P. Oxidative damage following chronic aluminium exposure in adult and pup rat brains. *J Trace Elem Med Biol* 2005;19:203–8.
- [105] Li L, Yang X. The essential element manganese, oxidative stress, and metabolic diseases: Links and interactions. *Oxid Med Cell Longev* 2018;2–3:1–11.
- [106] Azadmanesh J, Borgstahl G. A review of the catalytic mechanism of human manganese superoxide dismutase. *Antioxidants* 2018;7:pii:E25.
- [107] Cuypers A, Plusquin M, Remans T, Jozefczak M, Keunen E, Gielen H, et al. Modeling the process of formation of inclusion cone in large ingot. *Biometals* 2010;23:927–940.
- [108] Ahamed M, Siddiqui MKJ. Low level lead exposure and oxidative stress: Current opinions. *Clin Chim Acta* 2007;383:57–64.
- [109] Monteiro HP, Bechara EJH, Abdalla DSP. Free radicals involvement in neurological porphyrias and lead poisoning. *Mol Cell Biochem* 1991;103:73–83.
- [110] Tripathi RM, Raghunath R, Mahapatra S, Sadasivan S. Blood lead and its effect on Cd, Cu, Zn, Fe and hemoglobin levels of children. *Sci Total Environ* 2001;277:161–8.

- [111] Shi H, Shi X, Liu KJ. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 2004;255:67–78.
- [112] Waalkes MP, Liu J, Ward JM, Diwan BA. Mechanisms underlying arsenic carcinogenesis: hypersensitivity of mice exposed to inorganic arsenic during gestation. *Toxicology* 2004;198:31–8.
- [113] Pillai R, Uyehara-Lock JH, Bellinger FP. Selenium and selenoprotein function in brain disorders. *IUBMB Life* 2014;66:229–39.
- [114] Nourbakhsh M, Ahmadpour F, Chahardoli B, Malekpour-Dehkordi Z, Nourbakhsh M, Hosseini-Fard SR, et al. Selenium and its relationship with selenoprotein P and glutathione peroxidase in children and adolescents with Hashimoto's thyroiditis and hypothyroidism. *J Trace Elem Med Biol* 2016;34:10–4.
- [115] Ray PD, Huang B-W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 2012;24:981–90.
- [116] Allen R., Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 2000;28:463–99.
- [117] Persson T, Popescu BO, Cedazo-Minguez A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: Why did antioxidant therapy fail? *Oxid Med Cell Longev* 2014;2014:1–11.
- [118] Yoo YJ, Saliba AJ, Prenzler PD. Should red wine be considered a functional food? *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2010;9:530–51.
- [119] Karathia H, Vilaprinyo E, Sorribas A, Alves R. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: A comparative study. *PLoS One* 2011;6:1–10.
- [120] Murakami C, Kaerberlein M. Quantifying yeast chronological life span by outgrowth of aged cells. *J Vis Exp* 2009;27:pii:1156.
- [121] Flagfeldt DB, Siewers V, Huang L, Nielsen J. Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2009;26:545–51.
- [122] Parker MW, Botchan MR, Berger JM. Mechanisms and regulation of DNA replication initiation in eukaryotes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2017;52:107–44.
- [123] Owsianowski E, Walter D, Fahrenkrog B. Negative regulation of apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783:1303–10.
- [124] Miller-Fleming L, Giorgini F, Outeiro TF. Yeast as a model for studying human neurodegenerative disorders. *Biotechnol J* 2008;3:325–38.
- [125] Foury F. Human genetic diseases: A cross-talk between man and yeast. *Gene* 1997;195:1–10.
- [126] Ignea C, Dorobantu CM, Mintoff CP, Branza-Nichita N, Lodomery MR, Kefalas P, et al. Modulation of the antioxidant/pro-oxidant balance, cytotoxicity and antiviral actions of grape seed extracts. *Food Chem* 2013;141:3967–76.
- [127] Martorell P, Forment JV, De Llanos R, Montón F, Llopis S, González N, et al. Use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans* as model organisms to study the effect of cocoa polyphenols in the resistance to oxidative stress. *J Agric Food Chem* 2011;59:2077–85.
- [128] Baroni MV, Di Paola Naranjo RD, García-Ferreira C, Otaiza S, Wunderlin DA. How good antioxidant is the red wine? Comparison of some *in vitro* and *in vivo* methods to assess the antioxidant capacity of Argentinean red wines. *LWT - Food Sci Technol* 2012;47:1–7.
- [129] Lingua MS, Fabani MP, Wunderlin DA, Baroni MV. *In vivo* antioxidant activity of grape, pomace and wine from three red varieties grown in Argentina: Its relationship to phenolic profile. *J Funct Foods* 2016;20:332–45.
- [130] Sastre J, Pallardo FV, Viña J. Glutathione. In: Barceló, D., Kostianoy AG, Editor. *The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005, p. 91–108.
- [131] Jamieson DJ. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1998;14:1511–27.
- [132] Huang W-Y, Cai Y-Z, Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr Cancer* 2010;62:1–20.

- [133] Chang K-L, Cheng H-L, Huang L-W, Hsieh B-S, Hu Y-C, Chih T-T, et al. Combined effects of terazosin and genistein on a metastatic, hormone-independent human prostate cancer cell line. *Cancer Lett* 2009;276:14–20.
- [134] Zhang X, Lin D, Jiang R, Li H, Wan J, Li H. Ferulic acid exerts antitumor activity and inhibits metastasis in breast cancer cells by regulating epithelial to mesenchymal transition. *Oncol Rep* 2016;36:271–8.
- [135] Nikitaki Z, Hellweg CE, Georgakilas AG, Ravanat J-L. Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. *Front Chem* 2015;3:35 (eCollection 2015).
- [136] Jaganathan SK, Supriyanto E, Mandal M. Events associated with apoptotic effect of *p*-Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 2013;19:7726–34.
- [137] Ahmad A, Farhan Asad S, Singh S, Hadi S. DNA breakage by resveratrol and Cu(II): Reaction mechanism and bacteriophage inactivation. *Cancer Lett* 2000;154:29–37.
- [138] Khan HY, Zubair H, Ullah MF, Ahmad A, Hadi SM. Oral administration of copper to rats leads to increased lymphocyte cellular DNA degradation by dietary polyphenols: Implications for a cancer preventive mechanism. *BioMetals* 2011;24:1169–78.
- [139] Khan HY, Zubair H, Faisal M, Ullah MF, Farhan M, Sarkar FH, et al. Plant polyphenol induced cell death in human cancer cells involves mobilization of intracellular copper ions and reactive oxygen species generation: A mechanism for cancer chemopreventive action. *Mol Nutr Food Res* 2014;58:437–46.
- [140] Kaiafa GD, Saouli Z, Diamantidis MD, Kontoninas Z, Voulgaridou V, Raptaki M, et al. Copper levels in patients with hematological malignancies. *Eur J Intern Med* 2012;23:738–41.
- [141] Gupte A, Mumper RJ. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat Rev* 2009;35:32–46.
- [142] Brewer GJ. Anticopper therapy against cancer and diseases of inflammation and fibrosis. *Drug Discov Today* 2005;10:1103–9.
- [143] Turski ML, Thiele DJ. New roles for copper metabolism in cell proliferation, signaling, and disease. *J Biol Chem* 2009;284:717–721.
- [144] Yar Khan H, Zubair H, Fahad Ullah M, Ahmad A, Mumtaz Hadi S. A prooxidant mechanism for the anticancer and chemopreventive properties of plant polyphenols. *Curr Drug Targets* 2012;13:1738–49.
- [145] Vahid F, Zand H, Nosrat-Mirshekarlou E, Najafi R, Hekmatdoost A. The role dietary of bioactive compounds on the regulation of histone acetylases and deacetylases: A review. *Gene* 2015;562:8–15.
- [146] Supic G, Jagodic M, Magic Z. Epigenetics: A new link between nutrition and cancer. *Nutr Cancer* 2013;65:781–92.
- [147] Malavolta M, Costarelli L, Giacconi R, Piacenza F, Basso A, Pierpaoli E, et al. Modulators of cellular senescence: Mechanisms, promises, and challenges from *in vitro* studies with dietary bioactive compounds. *Nutr Res* 2014;34:1017–35.
- [148] Erasto P, Bojase-Moleta G, Majinda RR. Antimicrobial and antioxidant flavonoids from the root wood of *Bolusanthus speciosus*. *Phytochemistry* 2004;65:875–80.
- [149] Fukai T, Marumo A, Kaitou K, Kanda T, Terada S, Nomura T. Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia* 2002;73:536–9.
- [150] Wen A, Delaquis P, Stanich K, Toivonen P. Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiol* 2003;20:305–11.
- [151] Jaisinghani RN. Antibacterial properties of quercetin. *Microbiol Res (Pavia)* 2017;8:6877 (p. 13–14).
- [152] Yixi X, Weijie Y, Fen T, Xiaoqing C, Licheng R. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. *Curr Med Chem* 2015;22:132–49.
- [153] Friedman M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:116–34.

- [154] Radovanović A, Radovanović B, Jovančićević B. Free radical scavenging and antibacterial activities of southern Serbian red wines. *Food Chem* 2009;117:326–31.
- [155] Daglia M, Papeti A, Grisoli P, Aceti C, Dacarro C, Gazzani G. Antibacterial activity of red and white wine against oral Streptococci. *J Agric Food Chem* 2007;55:5038–42.
- [156] Radovanović AN, Jovančićević BS, Radovanović BC. Antimicrobial effectiveness of selected Vranac wines against six Gram-positive and six Gram-negative bacterial strains. *Trop J Pharm Res* 2014;13:819–24.
- [157] Papadopoulou C, Soulti K, Roussis IG. Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Technol Biotechnol* 2005;43:41–6.
- [158] Radović BR, Tešević VT, Kodžulović VK, Maraš VM. Resveratrol concentration in 'Vranac' wines. *Vitis* 2015;54:169–71.
- [159] Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 1998;299:152–78.
- [160] Huang D, Boxin OU, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 2005;53:1841–56.
- [161] (OIV) International Organisation of Vine and Wine. *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*. Volume 1. 2018.
- [162] Chang C-C, Yang M-H, Wen H-M, Chern J-C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* 2002;10:178–82.
- [163] Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 1970.
- [164] Kasprzak MM, Erxlebenb A, Ochockia J. Properties and applications of flavonoid metal complexes. *RSC Adv* 2015;5:45853–77.
- [165] Ananga A, Georgiev V, Ochieng J, Phills B, Tsoleva V. Production of anthocyanins in grape cell cultures: A potential source of raw material for pharmaceutical, food, and cosmetic industries. *The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive*, INTECH, 2013.
- [166] Cheng GW, Breen PJ. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *J Amer Soc Hort Sci* 1991;116:865–9.
- [167] Harbertson JF, Kennedy JA, Adams DO. Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir berries during ripening. *Am J Enol Vitic* 2002;53:54–9.
- [168] Fernández K, Agosin E. Quantitative analysis of red wine tannins using FTIR. *J Agric Food Chem* 2007;55:7294–300.
- [169] Taylor VF, Longerich HP, Greenough JD. Multielement analysis of Canadian wines by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and multivariate statistics. *J Agric Food Chem* 2003;51:856–60.
- [170] Blois M. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958;181:1199–200.
- [171] Godevac D, Vujšić L, Mojović M, Ignjatović A, Spasojević I, Vajs V. Evaluation of antioxidant capacity of *Allium ursinum* L. volatile oil and its effect on membrane fluidity. *Food Chem* 2008;107:1692–700.
- [172] Staško A, Liptáková M, Malík F, Mišík V. Applied magnetic resonance free radical scavenging activities of white and red wines: An EPR spin trapping study. *Apl Magn Reson* 2002;113:101–13.
- [173] Cano A, Hernández-Ruíz J, García-Cánovas, Francisco Acosta M, Arnao MB. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem Anal* 1998;9:196–202.
- [174] Boligon AA, Machado MM, Margareth LA. Technical evaluation of antioxidant activity. *Med Chem (Los Angeles)* 2014;4:517–22.
- [175] Li Y, Jiang B, Zhang T, Mu W, Liu J. Antioxidant and free radical-scavenging activities of

- chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chem* 2008;106:444–50.
- [176] Balasaheb Nimse S, Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv* 2015;5:27986-8006.
- [177] Liu F, Ooi VEC, Chang ST. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sci* 1997;60:763–71.
- [178] Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing (antioxidant) power as a measure of antioxidant capacity: The FRAP assay. *Anal Biochem* 1999;299:15–36.
- [179] Sužnjević DŽ, Pastor FT, Gorjanović SŽ. Polarographic study of hydrogen peroxide anodic current and its application to antioxidant activity determination. *Talanta* 2011;85:1398–403.
- [180] Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of Total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968;25:192–205.
- [181] Havir EA, McHale NA. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* 1987;84:450–5.
- [182] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:1107–12.
- [183] Salbitani G, Bottone C, Carfagna S. Determination of Reduced and Total Glutathione Content in extremophilic microalga *Galdieria phlegreale*. *Bio-Protocol* 2017;7:e2372.
- [184] Brlek T, Pezo L, Voća N, Krička T, Vukmirović Đ, Čolović R, et al. Chemometric approach for assessing the quality of olive cake pellets. *Fuel Process Technol* 2013;116:250–6.
- [185] Abdi H, Williams LJ. Principal component analysis. *Wiley Interdiscip Rev Comput Stat* 2010;2:433–59.
- [186] Pezo LL, Ćurčić BL, Filipović VS, Nićetin MR, Koprivica GB, Mišljenović NM, et al. Artificial neural network model of pork meat cubes osmotic dehydration. *Hem Ind* 2013;67:465–75.
- [187] Hu X, Weng Q. Estimating impervious surfaces from medium spatial resolution imagery using the self-organizing map and multi-layer perceptron neural networks. *Remote Sens Environ* 2009;113:2089–102.
- [188] Smith JT. Neural network verification. In: Taylor BJ, Editor. *Methods and Procedures for the Verification and Validation of Artificial Neural Networks*. 1st Edition. New York: Springer Science + Business Media. 2006. p. 109–69.
- [189] Ivanova-Petropulos V, Ricci A, Nedelkovski D, Dimovska V, Parpinello GP, Versari A. Targeted analysis of bioactive phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines. *Food Chem* 2015;171:412–20.
- [190] Bogicevic M, Maras V, Mugoša M, Kodžulović V, Raičević J, Šučur S, Failla O. The effects of early leaf removal and cluster thinning treatments on berry growth and grape composition in cultivars Vranac and Cabernet Sauvignon. *Chem Biol Technol Agric* 2015;2:13 (8 pages).
- [191] Ilijeva F, Kostadinović Veličkova S, Dimovska V, Mirhosseini H, Spasov H. Selection of 80 newly isolated autochthonous yeast strains from the Tikveš region of Macedonia and their impact on the quality of red wines produced from Vranec and Cabernet Sauvignon grape varieties. *Food Chem* 2017;216:309–15.
- [192] Kallithraka S, Tsoutsouras E, Tzourou E, Lanaridis P. Principal phenolic compounds in Greek red wines. *Food Chem* 2006;99:784–93.
- [193] Gris EF, Mattivi F, Ferreira EA, Vrhovsek U, Filho DW, Pedrosa RC, et al. Phenolic profile and effect of regular consumption of Brazilian red wines on in vivo antioxidant activity. *J Food Compos Anal* 2013;31:31–40.
- [194] Casassa LF, Bolcato E a., Sari SE. Chemical, chromatic, and sensory attributes of 6 red wines produced with prefermentative cold soak. *Food Chem* 2015;174:110–8.
- [195] Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing K V, Thomas CF, Beecher CW, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997;275:218–20.
- [196] Gorjanović SŽ, Novaković MM, Potkonjak NI, Sužnjević DŽ. Antioxidant activity of wines determined by a polarographic assay based on hydrogen peroxide scavenge. *J Agric Food*

Chem 2010;58:4626–31.

- [197] Li N, Liu J-H, Zhang J, Yu B-Y. Comparative Evaluation of cytotoxicity and antioxidative activity of 20 flavonoids. *J Agric Food Chem* 2008;56:3876–83.
- [198] Valente LMM, da Paixão D, do Nascimento AC, dos Santos PFP, Scheinvar LA, Moura MRL, et al. Antiradical activity, nutritional potential and flavonoids of the cladodes of *Opuntia monacantha* (Cactaceae). *Food Chem* 2010;123:1127–31.
- [199] Yen G-C, Duh P-D, Tsai H-L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chem* 2002;79:307–13.
- [200] Villaño D, Fernández-Pachón MS, Moyá ML, Troncoso AM, García-Parrilla MC. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 2007;71:230–5.
- [201] Anli RE, Vural N. Antioxidant phenolic substances of Turkish red wines from different wine regions. *Molecules* 2009;14:289–97.
- [202] Gambelli L, Santaroni GP. Polyphenols content in some Italian red wines of different geographical origins. *J Food Compos Anal* 2004;17:613–8.
- [203] La Torre GL, Saitta M, Vilasi F, Pellicanò T, Dugo G. Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection. *Food Chem* 2006;94:640–50.
- [204] Majewska M, Skrzycki M, Podsiad MAG, Czeczot H. Evaluation of antioxidant potential of flavonoids: An *in vitro* study. *Acta Pol Pharm* 2011;68:611–6.
- [205] Murakami Y, Kawata A, Ito S, Katayama T, Fujisawa S. Radical-scavenging and anti-inflammatory activity of quercetin and related compounds and their combinations against RAW264.7 cells stimulated with porphyromonas gingivalis fimbriae. Relationships between anti-inflammatory activity and quantum chemical par. *In Vivo (Brooklyn)* 2015;29:701–10.
- [206] Kim B-H, Choi JS, Yi EH, Lee J-K, Won C, Ye S-K, et al. Relative antioxidant activities of quercetin and its structurally related substances and their effects on NF- κ B/CRE/AP-1 signaling in murine macrophages Byung-Hak. *Mol Cells* 2013;35:410–20.
- [207] Moreno-Labanda JF, Mallavia R, Pérez-Fons L, Lizama V, Saura D, Micol V. Determination of piceid and resveratrol in Spanish wines deriving from Monastrell (*Vitis vinifera* L.) grape variety. *J Agric Food Chem* 2004;52:5396–403.
- [208] Regulation (EU) No 1169/2011 Annex XIII.
- [209] EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic products, nutrition and allergies [NDA] related to the Tolerable Upper Intake Level of Sodium. *EFSA J* 2005;209:1–26.
- [210] Ribereau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D. Dry extract and minerals Handbook of Enology, Vol. 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments, 2nd Edition, Wiley, 2006, p. 102–104.
- [211] International Oenological Codex - OIV. 2016.
- [212] Tapiero H, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology: Zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacother* 2003;57:399–411.
- [213] Sayre LM, Perry G, Smith MA. Redox metals and neurodegenerative disease. *Curr Opin Chem Biol* 1999;3:220–5.
- [214] Kment P, Mihaljevič M, Ettler V, Šebek O, Strnad L, Rohlová L. Differentiation of Czech wines using multielement composition – A comparison with vineyard soil. *Food Chem* 2005;91:157–65.
- [215] Vinković Vrček I, Bojić M, Žuntar I, Mendaš G, Medić-Šarić M. Phenol content, antioxidant activity and metal composition of Croatian wines deriving from organically and conventionally grown grapes. *Food Chem* 2011;124:354–61.
- [216] Jan AT, Azam M, Siddiqui K, Ali A, Choi I, Haq QMR. Heavy Metals and Human Health: Mechanistic insight into toxicity and counter defense system of antioxidants. *Int J Mol Sci* 2015;16:29592–630.
- [217] EFSA. Scientific Opinion on Lead in Food *EFSA J* 2010;8:1570.
- [218] EFSA. Scientific Opinion on Arsenic in Food *EFSA J* 2009;7:1351.

- [219] EFSA. Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA J* 2012;10:2551.
- [220] WHO. Nickel in Drinking-water. WHO/SDE/WSH/05.08/55.
- [221] WHO. Antimony in Drinking-water. WHO/SDE/WSH/03.04/74.
- [222] Košmerl T, Bertalanich L, Maras V, Kodzulović V, Šučur S, Abramović H. Impact of yield on total polyphenols, anthocyanins, reducing sugars and antioxidant potential in white and red wines produced from Montenegrin autochthonous grape varieties. *Food Sci Technol* 2013;1:7–15.
- [223] Radovanović AN. *Karakterizacija i korelacija bioaktivnih fenolnih jedinjenja crvenih vina Balkana i njihova antioksidaciona i antimikrobna svojstva*. Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2014.
- [224] Radovanovic B, Radovanovic A, Tomic V. Relations between the phenolic composition and free radical scavenging, and antibacterial activities of red wines from different cultivars of *Vitis vinifera* L. *Int J Food Prop* 2012;15:725–735.
- [225] Di Majo D, La Guardia M, Giammanco S, La Neve L, Giammanco M. The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chem* 2008;111:45–9.
- [226] Arnous A, Makris D, Kefalas P. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *J Agric Food Chem* 2001;49:5736–42.
- [227] Fernández-Pachón MS, Villaño D, García-Parrilla MC, Troncoso AM. Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Anal Chim Acta* 2004;513:113–8.
- [228] Nakov G, Damjanovski D, Pavlova V, Nedelkoska DN, Necinova Lj, Delchev N. The impact of the harvesting year on chemical and physical characteristics of the Vranec wine. *Banats J Biotechnol* 2013;IV:97–103.
- [229] Dimitrovska M, Tomovska E, Bocevska M. Characterisation of Vranec, Cabernet Sauvignon and Merlot wines based on their chromatic and anthocyanin profiles. *J Serb Chem Soc* 2013;78:1309–22.
- [230] Ivanova-Petropulos V, Durakova S, Ricci A, Parpinello GP, Versari A. Extraction and evaluation of natural occurring bioactive compounds and change in antioxidant activity during red winemaking. *J Food Sci Technol* 2016;53:2634–43.
- [231] Ivanova V, Stefova M, Chinnici F. Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods. *J Serb Chem Soc* 2010;75:45–59.
- [232] Blanco-Vega D, Gomez-Alonso S, Hermosin-Gutierrez I. Identification, content and distribution of anthocyanins and low molecular weight anthocyanin-derived pigments in Spanish commercial red wines. *Food Chem* 2014;158:449–58.
- [233] Hosu A, Cristea V, Cimpoiu C. Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: Prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. *Food Chem* 2014;150:113–8.
- [234] Vujovic D, Pejin B, Popovic Djordjevic J, Velickovic M, Tesevic V. Phenolic natural products of the wines obtained from three new Merlot clone candidates. *Nat Prod Res* 2016;30:987–90.
- [235] Pajović-Šćepanović R, Wendelin S, Eder R. Phenolic composition and varietal discrimination of Montenegrin red wines (*Vitis vinifera* var. Vranac, Kratošija, and Cabernet Sauvignon). *Eur Food Res Technol*. 2018;244:2243–54.
- [236] Ivanova-Petropulos V, Hermosín-Gutiérrez I, Boros B, Stefova M, Stafilov T, Vojnoski B, Dörnyei Á, Kilár F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines. *J Food Compos Anal* 2015;41:1–14.
- [237] Kostadinović S, Wilkens A, Stefova M, Ivanova V, Vojnoski B, Mirhosseini H, Winterhalter P. Stilbene levels and antioxidant activity of Vranec and Merlot wines from Macedonia: Effect of variety and enological practices. *Food Chem* 2012;135:3003–9.
- [238] Coetzee PP, Steffens FE, Eiselen RJ, Augustyn OP, Balcaen L, Vanhaecke F. Multi-element analysis of south african wines by ICP-MS and their classification according to geographical

- origin. *J Agric Food Chem* 2005;53:5060–6.
- [239] Kilmartin PA, Zou H, Waterhouse AL. A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *J Agric Food Chem* 2001;49:1957–65.
- [240] De Beer D, Harbertson JF, Kilmartin PA, Roginsky V, Barsukova T, Adams DO, et al. Phenolics: A comparison of diverse analytical methods. *Am J Enol Vitic* 2004;55:389–400.
- [241] Kilmartin PA, Honglei Z, Waterhouse AL. Correlation of wine phenolic composition versus cyclic voltammetry response. *Am J Enol Vitic* 2002;53:294–302.
- [242] Dobes J, Zitka O, Sochor J, Ruttkay-Nedecky B, Babula P, Beklova M, et al. Electrochemical tools for determination of phenolic compounds in plants. A review. *Int J Electrochem Sci* 2013;8:4520–42.
- [243] Alonso-Garrido G, Palma A, Arteaga JF, Rodríguez-Mellado JM, Ruiz-Montoya M, Pintado S. Comparison of the simple cyclic voltammetry (CV) and DPPH assays for the determination of antioxidant capacity of active principles. *Molecules* 2012;17:5126–38.
- [244] Vujović DS, Žunić DM, Popović BS, Pantelić MM, Popović-Đorđević JB. Agrobiological and wine quality traits of *Vitis vinifera* cv. Merlot clones selected in Serbia. *J Int Sci Vigne Vin* 2015;49:267–74.
- [245] Majkić TM, Torović LjD, Lesjak MM, Četojević-Simin DD, Beara IN. Activity profiling of Serbian and some other European Merlot wines in inflammation and oxidation processes. *Food Res Int* 2019;121:51–160.
- [246] Žurga P, Vahčić N, Pasković I, Banović M, Malenica Staver M. Croatian wines from native grape varieties have higher distinct phenolic (nutraceutic) profiles than wines from non-native varieties with the same geographic origin. *Chem Biodivers* 2019;16:e1900218.
- [247] Mercurio MD, Smith PA. Tannin quantification in red grapes and wine: Comparison of polysaccharide- and protein-based tannin precipitation techniques and their ability to model wine astringency. *J Agric Food Chem* 2008;56:5528–37.
- [248] Harbertson JF, Hodgins RE, Thurston LN, Schaffer LJ, Reid MS, Landon JL, et al. Variability of tannin concentration in red wines. *Am J Enol Vitic* 2008;59:210–4.
- [249] Pantelić M, Dabić Zagorac D, Natić M, Gašić U, Jović S, Vujović D, Popović Djordjević J. Impact of clonal variability on phenolics and radical scavenging activity of grapes and wines: A study on the recently developed Merlot and Cabernet Franc clones (*Vitis vinifera* L.). *PLOS ONE* 2016;11:e0163823.
- [250] Sredojević MM. *Hemijska karakterizacija grožđa i sortnih vina iz različitih vinogorja u Srbiji*. Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2018.
- [251] Beara IN, Torović LjD, Pintać DĐ, Majkić TM, Orčić DZ, Mimica-Dukić NM, Lesjak MM. Polyphenolic profile, antioxidant and neuroprotective potency of grape juices and wines from Fruška Gora region (Serbia). *Int J Food Prop* 2017;20:S2552–68.
- [252] Gülçin I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Arch Toxicol* 2012;86:345–91.
- [253] Petrović M, Sužnjević D, Pastor F, Veljović M, Pezo L, Antić M, et al. Antioxidant capacity determination of complex samples and individual phenolics – Multilateral Approach. *Comb Chem High Throughput Screen* 2016;19:58–65.
- [254] Matros A, Peshev D, Peukert M, Mock H-P, den Ende W Van. Sugars as hydroxyl radical scavengers: Proof-of-concept by studying the fate of sucralose in Arabidopsis. *Plant J* 2015;82:822–39.
- [255] Gorjanović S, Novaković MM, Vukosavljević PV, Pastor FT, Tešević VV, Sužnjević DŽ. Polarographic assay based on hydrogen peroxide scavenging in determination of antioxidant activity of atrong alcohol beverages. *J Agric Food Chem* 2010;58:8400–6.
- [256] Niki E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radic Biol Med* 2010;49:503–15.
- [257] Slatnar A, Jakopic J, Stampar F, Veberic R, Jamnik P. The Effect of bioactive compounds on *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity of different berry juices. *PLoS One* 2012;7:e47880.

- [258] Hugo PC, Gil-Chávez J, Sotelo-Mundo RR, Namiesnik J, Gorinstein S, González-Aguilar GA. Antioxidant interactions between major phenolic compounds found in "Ataulfo" mango pulp: Chlorogenic, gallic, protocatechuic and vanillic acids. *Molecules* 2012;17:12657–64.
- [259] Saltelli A, Annoni P. How to avoid a perfunctory sensitivity analysis. *Environ Model Softw* 2010;25:1508–17.
- [260] Sadi G, Bozan D, Yildiz HB. Redox regulation of antioxidant enzymes: Post-translational modulation of catalase and glutathione peroxidase activity by resveratrol in diabetic rat liver. *Mol Cell Biochem* 2014;393:111–22.
- [261] Ourique GM, Finamor IA, Saccol EMH, Riffel APK, Pês TS, Gutierrez K, et al. Resveratrol improves sperm motility, prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defences in the testes of hyperthyroid rats. *Reprod Toxicol* 2013;37:31–9.
- [262] Hadi SM, Asad SF, Singh S, Ahmad A. Putative mechanism for anticancer and apoptosis-inducing properties of plant-derived polyphenolic compounds. *IUBMB Life* 2000;50:167–71.
- [263] Borges A, Ferreira C, Saavedra MJ, Simões M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microb Drug Resist* 2013;19:256–65.
- [264] Ma DSL, Tan LTH, Chan KG, Yap WH, Pusparajah P, Chuah LH, et al. Resveratrol–potential antibacterial agent against foodborne pathogens. *Front Pharmacol* 2018;9:1–16.
- [265] Arima H, Ashida H, Danno G. Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002;66:1009–14.

VII BIOGRAFIJA

Neda (Olga) Đorđević rođena je 9. februara 1983. godine u Beogradu. Po završetku IX beogradske gimnazije „Mihailo Petrović Alas” (prirodno-matematički smer, 2002. godine), upisuje se na Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Biohemija. Diplomski rad pod naslovom „Primena trienzimske metode za određivanje folne kiseline” odbranila je 2007. godine sa ocenom 10 (prosečna ocena: 8,94). Školske 2010/2011. godine upisuje se na doktorske akademske studije na istom fakultetu.

U svojim dosadašnjim istraživanjima Neda Đorđević prvenstveno se fokusirala na hemijsku karakterizaciju crvenih vina i ispitivanje njihove biološke aktivnosti, s akcentom na polifenolna jedinjenja i antioksidativnu aktivnost. Rezultate svog dosadašnjeg naučno-istraživačkog rada Neda Đorđević objavila je u 15 bibliografskih jedinica. Autor je 5 radova publikovanih u časopisima međunarodnog značaja, od kojih su 3 rada iz kategorije M₂₁, 1 rad kategorije M₂₂ i 2 rada kategorije M₂₃, kao i 10 naučnih saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima (6 saopštenja kategorije M₃₃ i 4 saopštenja kategorije M₃₄) i 2 saopštenja kategorije M₆₄ na skupovima od nacionalnog značaja.

Član je Biohemijskog društva Srbije, Srpskog društva za molekularnu biologiju, Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju i Srpskog društva istraživača raka.

Изјава о ауторству

Потписана Неда Ђорђевић

број индекса ДБ10/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Хемијски профил и антиоксидативна активност црвених вина клонова аутохтоне и интернационалних сорти винове лозе”

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

Потпис докторанда

У Београду, 13. 03. 2020.

Неда Ђорђевић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Неда Ђорђевић
Број индекса ДБ 10/2010
Студијски програм Доктор биохемијских наука
Наслов рада **„Хемијски профил и антиоксидативна активност црвених вина
клонова аутохтоне и интернационалних сорти винове лозе”**
Ментор Проф. др Веле Тешевић, редовни професор Хемијског факултета,
Универзитета у Београду
Др Борис Пејин, научни саветник Института за мултидисциплинарна
истраживања, Универзитета у Београду
Потписана Неда Ђорђевић

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

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 13.03.2020.

Неда Ђорђевић

Изјава о коришћењу

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

„Хемијски профил и антиоксидативна активност црвених вина клонова аутохтоне и интернационалних сорти винове лозе“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 13.03.2020.

Нега Зрпјевић

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.