



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ
ФАКУЛТЕТ
ДЕПАРТМАН ЗА ХЕМИЈУ, БИОХЕМИЈУ
И ЗАШТИТУ ЖИВОТНЕ СРЕДИНЕ



Фитохемијска карактеризација и биолошке активности екстраката и инкапсулата воћа родова *Prunus* L. и *Cornus* L.

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор:
Проф. др Борис Поповић
Доц. др Емилија Свирчев

Кандидат:
Бојана Благојевић

Нови Сад, 2021. година

Мојој породици

To my family

Експериментални део ове дисертације је урађен на Пољопривредном факултету Универзитета у Новом Саду, у оквиру лабораторија за хемију и биохемију. Део анализа је урађен на Институту за онкологију Војводине у Сремској Каменици, као и на институтима *Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa (ITQB NOVA)* и *Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (iBET)* у Лисабону, и на департманима *Dipartimento di Fisica e Chimica, Università degli Studi di Palermo* у Палерму, *Department of Fruit, Vegetable and Plant Nutraceutical Technology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Wrocław University of Environmental and Life Sciences* у Вроцлаву и на *Fakultetu agrobiotehničkih znanosti* у Осијеку. Хвала свима који су на било који начин омогућили да се ова истраживања спроведу.

Посебну захвалност дугујем ментору проф. др Борису Поповићу који је био идејни творац свих спроведених истраживања у овом раду. Искрено се захваљујем на свему што ме је научио, што ме је прихватио као члана свог тима, дао ми прилику и подршку да учим и радим оно што волим, на огромној енергији и ентузијазму који увек шири на своје сараднике и упорности и истрајности у остваривању циљева.

Менторки доц. др Емилији Свирчев се од срца захваљујем на свој помоћи и подршци коју ми је пружала још од основних студија, током израде дипломског рада и поготово сада током писања дисертације.

Захваљујем проф. др Неди Мимици-Дукић на свему што ме је научила током студија и на интересовању за резултате овог рада.

Проф. др Јасни Чанадановић-Брунет се захваљујем на интересовању које је показала за резултате овог рада, као и на пруженој помоћи и дивној сарадњи коју смо имали са њом и њеним сарадницима.

Научном саветнику др Драгани Четојевић-Симин се захваљујем на спроведеним тестовима антипролиферативне активности инкапсулата, на интересовању које је показала за резултате овог рада, као и на пруженој помоћи током израде истог.

Посебно се захваљујем проф. др Дубравки Штајнер која је у нашој лабораторији увела тестове антиоксидантног капацитета и отворила нам врата истраживања у овој области. Хвала Вам на указаном поверењу и на пруженој прилици да прве истраживачке кораке и рад са студентима направим у Вашим лабораторијама.

Неизмерну захвалност за одабир и прикупљање узорака дугујем професорима и научним сарадницима са Департмана за воћарство, виноградарство, хортикултуру и пејзажну архитектуру, проф. др Сандри Бијелић, проф. др Ненаду Магазину, др Горану Бараћу и др Маји Миловић.

Special thanks go to Dr inž. Alicja Kucharska D.Sc. for determination of phenolic profile in Prunus species, Dr. Ana Teresa Serra for help with the assays of antiproliferative activities of fruit extracts.

I am very thankful to Prof. Dr. Giuseppe Lazzara and Dr. Filippo Parisi for revealing the secrets of halloysite and grateful for every moment spent in their laboratories.

Др Дејану Агићу се неизмерно захваљујем на анализата молекулског докинга и испитивању инхибиторне активности узорака према DPP III ензиму.

Проф др. Милошу Бокорову се захваљујем за снимање инкапсулата скенирајућим електронским микроскопом.

Проф. др Дејану Орчићу и проф. др Наташи Симин велико хвала на пренесеном знању током студија и на мом усмерењу и подрици на самом почетку докторских студија.

Срдачно се захваљујем проф. др Гордани Ђетковић, др Ана Марији Мандић и проф. др Саши Орловићу, који су ме ангажовали као истраживача на пројектима којима су руководили и тиме омогућили финансирање великог дела експерименталних истраживања у оквиру ове дисертације.

Хвала др Весни Тумбас-Шапоњац и др Александри Мишан, које су ми својим саветима и сугестијама знатно олакшале увођење HPLC-PDA методе за одређивање фенолних једињења.

Неизмерну захвалност дугујем доц. др Руџици Ждеро Павловић, Јелени Савић, Ани Кузмановић и Габријели Кишан које су ме срдачно прихватиле од самог доласка на Пољопривредни факултет и са којима сам од почетка делила и време и лабораторије. Хвала вам на дивним моментима које смо заједно провеле, као и на помоћи приликом сакупљања и анализирања узорака.

Свим наставницима и сарадницима на предметима Хемија и Биохемија хвала на свакодневним дружењима и сарадњи. Осталим колегама са Пољопривредног факултета у Новом Саду, посебно са Департмана за ратарство и повртарство хвала за сву подршку и помоћ коју су ми несебично пружили од мог првог дана на Факултету и током саме израде дисертације.

Највећу захвалност дугујем својој породици. Мама и тата, хвала вам на неизмерној љубави, стрпљењу и разумевању.

Хвала свима који су ме овим путем водили или носили.

Ваша Бојана

У Новом Саду, 26. 2. 2021.

САДРЖАЈ

| | |
|--|----|
| 1. Увод | 3 |
| 2. Општи део | 7 |
| 2.1. Воће родова <i>Prunus L.</i> и <i>Cornus L.</i> | 9 |
| 2.2. Биолошки активна једињења родова <i>Prunus L.</i> и <i>Cornus L.</i> – феноли и иридоиди | 17 |
| 2.3. Функционална храна и нутрацеутици | 45 |
| 2.4. Инкапсулација | 48 |
| 2.4.1. Инкапсулација у халојзит | 50 |
| 2.4.2. Инкапсулација у малтодекстрин | 53 |
| 2.4.3. Инкапсулација у циклодекстрин | 54 |
| 3. Експериментални део | 57 |
| 3.1. Биљни материјал | 60 |
| 3.2. Квалитативна UPLC-Q-TOF-MS/MS и квантитативна HPLC-PDA анализа воћа рода <i>Prunus L.</i> | 63 |
| 3.3. HPLC-PDA анализа генотипова трњине и дрена и инкапсулата воћа | 65 |
| 3.4. Одређивање антиоксидантног капацитета екстраката | 66 |
| 3.4.1. Способност редукције Фолин–Чокалте реагенса (FC тест) | 67 |
| 3.4.2. Способност редукције гвожђе(III)-јона (FRAP тест) | 68 |
| 3.4.3. Способност неутрализације DPPH радикала (DPPH тест) | 69 |
| 3.5. Одређивање антипролиферативне активности екстраката воћа | 70 |
| 3.6. Одређивање способности инхибиције ензима α -амилазе | 72 |
| 3.7. Одређивање способности инхибиције ензима α -глукозидазе | 74 |
| 3.8. Одређивање способности инхибиције ензима хумане дипептидил-пептидазе III (DPP III) | 75 |
| 3.9. Статистичка анализа података | 76 |
| 3.10. Молекулски докинг | 77 |
| 3.11. Припрема инкапсулата воћних екстраката | 78 |
| 3.11.1. Истовремена екстракција и инкапсулација у β -циклодекстрин | 78 |
| 3.11.2. Инкапсулација у халојзит, малтодекстрин и халојзит-малтодекстрински композит | 79 |
| 3.12. Физичкохемијска карактеризација инкапсулата | 81 |
| 3.12.1. Снимање површинске морфологије инкапсулата скенирајућом електронском микроскопијом (SEM) | 81 |
| 3.12.2. Термогравиметријска карактеризација инкапсулата | 81 |
| 3.12.3. Колоидна стабилност инкапсулата у халојзиту | 81 |
| 3.12.4. Спектрофотометријско одређивање ефикасности инкапсулације | 82 |
| 3.13. Одређивање антипролиферативне активности инкапсулата | 83 |
| 3.14. Контролисано отпуштње активних супстанци из инкапсулата (<i>controlled release</i>) | 85 |

| | |
|---|-----|
| 4. Резултати и дискусија | 87 |
| 4.1. Фитохемијска карактеризација и биолошке активности воћа рода <i>Prunus</i> L. | 91 |
| 4.1.1. Фитохемијска карактеризација воћа рода <i>Prunus</i> L. | 91 |
| 4.1.2. Биоактивни потенцијал воћа рода <i>Prunus</i> L. | 105 |
| 4.1.3. РСА анализа фитохемијског састава и биолошких активности воћа рода <i>Prunus</i> L. | 111 |
| 4.2. Фитохемијска карактеризација и биолошке активности генотипова трњине (<i>Prunus spinosa</i> L.) | 111 |
| 4.2.1. Фенолни профил генотипова трњине (<i>Prunus spinosa</i> L.) | 114 |
| 4.2.2. Биоактивни потенцијал генотипова трњине (<i>Prunus spinosa</i> L.) | 119 |
| 4.2.3. РСА анализа фитохемијског састава и биолошких активности генотипова трњине (<i>Prunus spinosa</i> L.) | 123 |
| 4.3. Фитохемијска карактеризација и биолошке активности генотиова дрена (<i>Cornus mas</i> L.)..... | 125 |
| 4.3.1. Фенолни и иридоидни профил генотипова дрена | 125 |
| 4.3.2. Биоактивни потенцијал генотипова дрена (<i>Cornus mas</i> L.) | 131 |
| 4.3.3. РСА анализа фитохемијског састава и биолошких активности генотипова дрена (<i>Cornus mas</i> L.) | 134 |
| 4.4. Молекулски докинг | 136 |
| 4.5. Инкапсулати екстракта воћа родова <i>Prunus</i> L. и <i>Cornus</i> L. | 146 |
| 4.5.1. Истовремена екстракција и инкапсулација у β -циклодекстрин | 149 |
| 4.5.2. Физичкохемијске карактеристике инкапсулата | 156 |
| 4.5.3. Спектрофотометријско одређивање ефикасности инкапсулације | 169 |
| 4.5.4. Испитивање антипролиферативне активности инкапсулата | 170 |
| 4.5.5. Контролисано отпуштање једињења из инкапсулата | 175 |
| 5. Закључак | 185 |
| 6. Summary | 191 |
| 7. Литература | 197 |
| 8. Прилог | 225 |
| Биографија | 288 |



1. Увод

Глад и болести представљају највеће проблеме данашњег друштва. Научници из различитих области свакодневно трагају за решењима којима би допринели смањењу ових проблема. Производња већих количина хране је један од основних задатака, али се све већи значај придаје и функционалности хране. Задатак је не само да се произведе већа количина хране, него да она буде богата или обogaћена молекулима који ће помоћи у очувању доброг здравственог стања и лечењу одређених здравствених поремећаја.

Човек од давнина користи биљке, како за исхрану, тако и у терапеутске сврхе. Фитохемикалије, односно секундарни биљни метаболити који немају нутритивну вредност, се интензивно проучавају због свог утицаја на здравље људи (Craig, 1997; Dillard & German, 2000). Традиционални биљни препарати и изоловани секундарни метаболити биљака веома често служе као полазна тачка или водила за развој нових лекова. Половина лекова одобрених између 1981. и 2014. године су изведени из природних производа (Newman & Cragg, 2016).

Фенолна једињења су најзаступљенији антиоксиданти у људској исхрани. То су секундарни метаболити, присутни највише у биљкама. Веома су разнолики у погледу структура, а самим тим и у погледу биолошке доступности и активности. Осим антиоксидантног, фенолна једињења испољавају антиканцерогено, антидијабетско, антиинфламаторно, антиалергијско, антимикробно, кардипротективно, вазодилататорно и друга дејства (Esfanjani et al., 2018; Eker et al., 2020).

Плодови воћа су богат извор фенолих једињења (Scalbert et al., 2005). Врсте родова *Prunus* L. и *Cornus* L. се према помолошкој класификацији убрајају у коштичаве воћне врсте, односно имају плод типа коштунице. Међу припадницима овог воћа се срећу врсте по чијем се узгајању Република Србија сврстава у сам врх светске листе произвођача воћних врста. Ту се убрајају шљива, бресква, кајсија, трешња, вишња, дрен и друге врсте (Кесеровић и сар., 2016; Љубојевић и сар., 2018; FAOSTAT, 2017).

Биолошка активност великог броја врста родова *Prunus* и *Cornus* са подручја Србије је недовољно испитана. Литературни подаци и прелиминарне анализе указују на значај плодова ових биљака као потенцијалних извора биолошки активних фенолних једињења. Нарочито су потцењене самоникле врсте и дивљи сродници комерцијално веома заступљених врста, попут дрена и трњине. Они су се вековима уназад користили у исхрани и за очување доброг здравља, а у нашем народу постоји и изрека „здрав као дрен“.

Једна од метода за добијање функционалних производа је инкапсулација сокова или екстракта воћа и добијање прашкастих суплемената. Тежња примене ове технологије је продужење стабилности биолошки активних једињења као и контролисање њиховог отпуштања и доставе циљним ћелијама.

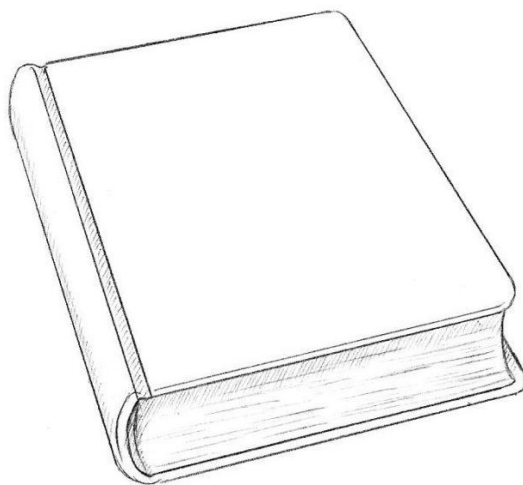
Циљ ове дисертације је да се испита и упореди фитохемијски састав плодова одабраног воћа родова *Prunus* и *Cornus* и да се испита њихов биолошки потенцијал; да се установе сличности и разлике међу појединим врстама; да се утврди допринос одређених једињења биолошким активностима; да се испита да ли екстракти могу да се

инкапсулирају у различите носаче како би се добили инкапсулати који би могли да се користе у прехранбене или фармацеутске сврхе.

Полазећи од чињенице да је фитохемијски састав биљака узрок њиховог биоактивног потенцијала изведена је основна хипотеза да постоји корелација између фитохемијског профила плодова воћа родова *Prunus* и *Cornus* и одређених биолошких активности, као и то да се инкапсулацијом екстраката воћа у одређене носаче може постићи контролисано отпуштање ових биоактивних једињења.

С тим у вези, у оквиру истраживања су постављени следећи радни задаци:

- ❖ прикупљање плодова воћа родова *Prunus* и *Cornus* у периоду њихове пуне зрелости и припремање екстраката за анализу;
- ❖ одређивање фенолног и иридоидног профила UPLC-Q-TOF-MS/MS и HPLC-PDA анализама;
- ❖ одређивање укупног антиоксидантног капацитета;
- ❖ одређивање антипролиферативне активности;
- ❖ одређивање способности инхибиције ензима α -амилазе, α -глукозидазе и дипептидил-пептидазе III;
- ❖ употреба анализе главних компоненти (PCA, *енгл.* principal component analysis) ради утврђивања повезаности фитохемијског састава и биолошких активности и класификације воћних врста на основу ових параметара;
- ❖ анализа молекулског докинга одређених једињења са α -амилазом, α -глукозидазом и дипептидил-пептидазом III ради утврђивања најбољих инхибитора ових ензима;
- ❖ инкапсулација воћних екстраката у халојзит, малтодекстрин и β -циклодекстрин;
- ❖ физичкохемијска карактеризација инкапсулата;
- ❖ одређивање антипролиферативне активности инкапсулата;
- ❖ испитивање контролисаног отпуштања једињења из инкапсулата (*controlled release*).



2. Општи део

2.1. Воће родова *Prunus* L. и *Cornus* L.

Род *Prunus* L. припада породици ружа (Rosaceae) и обухвата приближно 200 дрвенастих и жбунастих коштичавих воћних врста. Ту се убрајају шљиве, вишње, трешње, кајсије, брескве, бадеми и друге веома заступљене и привредно веома важне воћне врсте. Биљке овог рода расту углавном самоникло или као гајено воће (Potter, 2011).

Заједничка карактеристика врста рода *Prunus* је плод типа коштунице. Код овог типа плода, семенка је заштићена унутар тврдог омотача (ендокарпа), што све заједно представља коштицу. Око коштице су јестиви меснати део плода и љуска (мезокарп и егзокарп) (Кесеровић и сар., 2016).

Биљке рода *Prunus* су познате од давнина. Врсте попут шљиве, брескве и трешње се гаје још од доба пре нове ере, а до данас је оплемењивањем створено више од по 2000 њихових сорти. Већина врста рода *Prunus* је распрострањена на северној земљиној хемисфери, у условима умереноконтиненталне климе. Биљке рода *Prunus* се највише узгајају због својих плодова, а има и оних које се гаје као декоративне врсте.

У свету су веома распрострањене јапанска или кинеска шљива (*P. salicina* Lindl.) и декоративне врсте јапанска трешња (*P. serrulata* Lindl.) и јапанска кајсија (*P. mume* Siebold & Zucc.), које се највише гаје на просторима Јапана и Кине (Кесеровић и сар., 2016). Цветање јапанске трешње је једна од светских атракција. Низ фестивала у градовима широм Јапана и у Вашингтону се организује у част овог догађаја.

У Србији се гаје различите сорте шљиве (*P. domestica* L.), трешње (*P. avium* L.), вишње (*P. cerasus* L.), кајсије (*P. armeniaca* L.), брескве (*P. persica* L.), бадема (*P. amygdalus* Batsch). Као декоративне врсте се највише гаје сремза (*P. padus* L.), касна сремза (*P. serotina* Ehrh.), ловор вишња (*P. laurocerasus* L.) и црвенолисни ринглов (*P. pissardi* Carrière). Велики број врста расте самоникло, најчешће поред путева, у парковима или у шумским екосистемима: ринглов или цанарика (*P. cerasifera* Ehrh.), степска вишња (*P. fruticosa* Pall.), степски бадем (*P. tenella* Batsch.), трњина (*P. spinosa* L.) и магрива (*P. mahaleb* L.) (Мратинић и Којић, 1998; Љубојевић и сар., 2018).

Шљива је воћна врста која се највише гаји у Србији, а може да се каже да представља и један од симбола Србије. Према подацима Организације за храну и пољопривреду Уједињених нација (FAO, *енгл.* Food and Agriculture Organisation of the United Nations), по производњи шљиве у периоду 2000–2018. године, Србија је на трећем месту у свету, после Кине и Румуније. Такође, Србија је у самом врху светске листе произвођача и другог воћа рода *Prunus*, као што су вишња, трешња и кајсија (FAOSTAT, 2017).

Са воћарског аспекта врсте рода *Prunus* су веома важне у оплемењивању. Бројне врсте имају велики значај у расадничкој производњи као генеративне подлоге за калемљење коштичавог воћа. Поред декоративног карактера, цветови биљака рода *Prunus* су важни за пчеларство. Већина врста цвета веома рано, почетком пролећа, дајући претежно беле, медоносне цветове, који су понекад у том периоду једина пчелиња паша. Плодови овог воћа су богати шећерима, органским киселинама, танинима, целулозом и пектином. Веома су заступљени у људској исхрани, било у свежем или у прерађеном облику. Најчешће се

од њих прави слатко, џем, мармелада, компоти, сирупи, ликери, ракије. У народној медицини се користе сви делови биљака, како плодови, тако и листови, цветови, петелјке и коре стабала (Стојиловић, 2001).

Домаћа или европска шљива (*P. domestica* L.) је настала у области источне Европе и Кавказа. Потиче још из доба пре нове ере о чему сведоче коштице пронађене на археолошким ископинама из неолита, или у феничанским и пунским амфорама из античког доба. Данас је широко распрострањена на европском, азијском и северно-америчком континенту (Мишић, 2002; Spangenberg et al., 2006; Ucchesu et al., 2017).

Сматра се да је шљива настала спонтаном хибридизацијом ринглова (*P. cerasifera*) и трњине (*P. spinosa*), али неки извори наводе да је директни потомак ринглова (Zohary, 1992). Генерално, шљива, ринглов, трњина и трношљива су генетички веома сродне врсте и њихови спонтани хибриди се често срећу у природи.

Домаћа шљива расте као дрво, висине и до 12 m. Цвета и листа у априлу, а плодови сазревају од средине јуна до средине октобра, у зависности од сорте. Боја покожице плодова је најчешће љубичаста, модроплава, црвена или жута, док је месо плода најчешће златножута. Плодови су углавном крупни, са веома крупном коштицом (слика 2.1).

Плодови шљиве се највише користе у исхрани и у производњи ракије. Ракија „Шљивовица“ је бренд по којем је Србија позната у целом свету. Од плодова се највише кувају пекмези и мармеладе, или се суше како би могли да се једу током целе године.

Оплемењивање шљиве се врши веома дуго, а у свету је до данас познато преко 2500 сорти шљиве. Процес селекције шљиве је веома интензивно развијен и у Србији. Међу најпознатијим и највише гајеним сортама шљиве у Србији се срећу чачанска родна, чачанска лепотица, пожегача и многе друге (Мишић, 2002).



Слика 2.1. Плодови шљиве (чачанска родна, лево) и белошљиве (десно)
(<https://www.institut-cacak.org>)

У појединим пределима Србије, могу се срести аутохтоне сорте шљиве, па је тако **тургуња (туруњача, тургуља)** заштитни знак Средњег Баната. Плодови су округли, са плитким шавом. Покожица је танка, плаво-љубичаста, прекривена пепељком. Месо плода је веома сочно, златно-жута до потпуно црвено, са средње крупном коштицом. (Вагац et al., 2020). Једна од старих, домаћих сорти шљиве је и белошљива. **Белошљива** се на подручју Војводине назива и фрушкогорска бела шљива. Плод белошљиве (слика 2.1) је

округластог или овалног облика, покожица му је зелено-жута, са карактеристичним белим пепљком, по чему је сорта и добила име. Иако немају трње на границима, што је једна од одлика трношљива, поједина истраживања су показала ближу генетичку сродност тургуње и белошљиве са трношљивом (*P. insititia* L.) него са домаћом шљивом.

Ринглов, цанарика (*P. cerasifera* Ehrh.) је једна од првих воћних врста које је човек припитомио. Расте и као дивља, самоникла, најчешће поред путева. Највише се гаји на Балканском полуострву, у источној Европи, средњој и северној Азији.

Расте углавном као стабло, висине до 15 m, а може да расте и у облику жбуна. Цвета доста рано, у марту, а сазрева у периоду од средине јуна до августа. Плодови су округли, средње крупни, са сочним мезокарпом и сјајном покожицом жуте, црвене, љубичасте или тамноплаве боје. Плодови не сазревају истовремено, тако да берба може да траје и до месец дана. Користе се свежи у исхрани, или се прерађују у сокове, ракију, џемове, мармеладе, каше за бебе и друго (Мратинић и Којић, 1998).

P. cerasifera је веома варијабилна врста. У Србији се најчешће срећу форме са црвено-љубичастим (црвени ринглов) плодовима или жутим (бели ринглов, слика 2.2). Црвенолисни ринглов (слика 2.3), који се управо због црвених листова, као декоративна врста врло често среће у парковима, издвојио се као засебна врста *P. pissardi* Carrière (Љубојевић и сар., 2018).



Слика 2.2. Жбунови и плодови црвеног (лево) и белог (десно) ринглова (Благојевић, Б., 2016)



Слика 2.3. Црвенолисни ринглов (Благојевић, Б., 2016)

Ринглов важи за веома отпорну и скромну воћку, јер јој није потребна посебна нега. Веома добро подноси различите климатске услове и отпорна је на болести и штеточине, па се готово никада не штити пестицидима. У воћарству ринглов има велику примену као

подлога за шљиву, кајсију и брескву (Мишић, 2002; Стојиловић, 2001; Мратинић и Којић, 1998).

Трњина или црни трн (*P. spinosa* L.) се убраја међу најраспрострањеније и најполиморфније врсте шљива. Распрострањена је широм Европе, у Малој Азији, Ирану, Тунису. Често се среће на чернозему у Војводини и по ободу храстових шума. Расте као жбун, висине око 2 m. Цвета пре листања, почетком пролећа, а формирану бели мирисни цветови представљају добру пчелињу пашу и веома су декоративни (Мишић, 2002).

Плодови трњине су округли и ситни, тамноплаве боје, са сивкастим пепељком по површини. Сазревају у септембру, а могу дуго да остану на гранама, чак до пролећа. и да презиме на гранама. Свежи плодови се за исхрану беру тек после првих мразева. Због високог садржаја пектина и танина имају слаткасто-накисео и опор укус, па се чешће прерађују у компоте и пекмезе, него што се једу у свежем стању. Веома су богати витамином С. Због велике хранљиве вредности и сличног изгледа, у селима централне Србије трњину називају српска аронија (Љубојевић и сар., 2018).



Слика 2.4. Жбун и плодови трњине (Благојевић, Б., 2016)

У народној медицини се користе плод, лист, цвет, кора и корен трњине. Плодови и кора имају адстригентно деловање, односно—сужавају крвне судове, што је корисно код отворених рана и крварења, стежу цревне и мокраћне путеве (Стојиловић, 2001).

Трешња (*P. avium* L.) се од давнина користи у људској исхрани. Остаци коштица трешње из периода каменог доба, односно између 5000 и 4000 г. п.н.е. нађени на просторима данашње Швајцарске, Француске, Италији, Немачкој и Енглеској и записи грчких и римских ботаничара из III века п.н.е. сведоче о њеној дугој историји. Трешња се у средњем веку гајила широм Европе, а данас је распрострањена у готово свим крајевима света, у подручјима са умереноконтиненталном климом (Мишић, 2002). Турска је водећи произвођач трешње у свету (FAOSTAT, 2017).

Трешња расте као дрво, а може да достигне веома велику висину и ширину стабла. Првобитни назив за трешњу је био птичија трешња, јер птице радо једу њене плодове, а на тај начин је и расејавају, па отуда потиче латински назив *avium*. Плод трешње, приказан на слици 2.5, је веома заступљен у људској исхрани, пре свега у свежем облику или прерађен у слатка и мармеладе, а користи се и у лековите сврхе. У свету је до данас створено око 2000 сорти трешње, које су произведене пре свега да би испуниле одређене тржишне захтеве, попут чврстине плода, док се неке сорте гаје искључиво за производњу ликера и

ракије, а има и оних које су због цветова произведене у декоративне сврхе (Љубојевић и сар., 2018).

Дивља трешња или трешња врапчара је родоначелник великог броја сорти трешње. Прати листопадне шуме у умереним климатским зонама, јер не подноси добро мразеве. У Србији расте у шумама на Фрушкој Гори, Тари, Златибору, Златару, Копаонику и другим планинама. Цвет дивље трешње је добра пчелиња паша, а њено дрво је веома цењено у столарству, за израду намештаја и других предмета. У воћарству дивља трешња има највећу примену у расадничкој производњи као подлога за калемљење сорти трешње и вишње (Мратинић и Којић, 1998).



Слика 2.5. Плодови трешње (лево), вишње (централно) и степске вишње (десно) (Благојевић, Б. и Бараћ, Г., 2016)

У народној медицини се користе плод трешње, петелјке, лист, језгро, коштице и смола из стабала. Дивља трешња испољава својства код болести бубрега, мокраћних канала, туберкулозе, импотенције, исцрпљености, нарасположења, подочњака (Стојиловић, 2001). Веома је корисна као извор органског јода, који је неопходан за правилан рад тироидне жлезде. Чај од петелјки дивље трешње је добар диуретик и регулатор крвног притиска (Мратинић и Којић, 1998).

Вишња (*P. cerasus* L.) је настала укрштањем трешње и степске вишње (*P. fruticosa* Pall.). Први писани опис вишње је дао грчки филозоф Теофраст (око 300 г. п.н.е.), који ју је назвао *kerasos*, по граду Гиресуну (на грчком *Kerasous* или *Cerasus*) на обали Црног мора, у данашњој Турској. Наводи се да вишња, као и трешња и степска вишња, потиче из предела централне Европе и регије око Црног мора (Janick, 2005).

У Србији се после шљиве и јабуке, највише гаји вишња. Велике површине под вишњом смештају Србију на четврто место у Европи, а по производњи се налази на шестом месту у свету. Највише се гаји облачинска вишња (слика 2.5), која је пореклом из околине Ниша и Прокупља, а у Војводини је веома заступљена и фекетићка вишња (Кесеровић и сар. 2016; Vargać et al., 2020).

Степска вишња (*P. fruticosa* Pall.) је стара врста. Потиче са блиског истока. Расте као дивља врста, у средњој и јужној Европи, на северном Кавказу, у Малој Азији, западном

Сибиру и јужном Уралу, у степској зони европског дела Русије. У Србији се среће као шибље или жива ограда у напуштеним виноградима и на камењарима. Расте у облику ниског, слабо бујног, лоптастог жбуна. Цвета у периоду април-мај, а плодови сазревају у јулу. Плодови (слика 2.5) су нешто ситнији од плодова обичне вишње, тамноружичасте до тамноцрвене боје (Мратинић и Којић, 1998).

Магрива или рашељка (*P. mahaleb* L.) је претежно распрострањена у средњој и јужној Европи, у средњој Азији, Закавказју, Криму. Расте као жбун, висине 4–12 m, круна јој је лоптаста и густа (слика 2.6). Плодови су округли, ситни, тамноцрвени до црни, са тамноцрвеним месом и соком. Сочни су, али горког укуса, због чега се мало конзумирају за јело. Сазревају током јула и августа. Богати су органским киселинама (јабучна, лимунска, винска, салицилна), па су погодни за прављење мешаних мармелада и сирупа (Мратинић и Којић, 1998). Богат су извор антоцијана, па служе за бојење вина и сокова. Цветови су богати нектаром и поленом, те представљају богату пчелињу пашу. Дрво магриве је цењено у столарству и токарству, а због богатства цветова, магрива се користи и у пејзажној архитектури као декоративна биљка. Магрива се у природи размножава само семеном, па се коштице магриве користе за производњу генеративних подлога за трешњу и вишњу (Мратинић и Којић, 1998).



Слика 2.6. Жбун и плодови магриве (Благојевић, Б., 2016)

Бресква (*P. persica* (L.) Batsch) потиче из Кине, где се гаји више од 4000 година. У Европу је доспела преко Ирана, односно области некадашње Персије, због чега јој је и дат латински назив *persica*. Проширила се и у Америку где се данас интензивно ради на њеном оплемењивању и стварању нових сорти. Највећи произвођач брескве у свету је Кина, а у Европи су то Италија, Грчка, Шпанија и Француска (Janick, 2005; Мишић, 2002; FAOSTAT, 2018).

Бресква расте као дрво висине око 4 m. Цвета пре листања, веома рано, у марту, априлу, па пролећни мразеви могу неретко да је оставе без плода. Чашични листићи су интензивније обојени од круничних, а њихова боја са унутрашње стране је у корелацији са бојом плода. Плодови брескве су углавном крупни, лоптасти и сочни, са великом коштицом. Веома много се прерађују у сокове и компоте (Љубојевић и сар., 2018).

Стварање нових сорти брескве се ради највише са циљем побољшања квалитета плода и повећања отпорности према узроковачима болести. У свету данас постоји више од 4000

сорти брескве (Мишић, 2002), а дивљи преци су потпуно искорењени. У Србији се све до 1938. године гајила искључиво виноградарска бресква, која због прилагођавања различитим агроколошким условима има велику генетичку варијабилност. Вишедеценијски процеси селекције брескве у Србији резултовали су бројним сортама и могућношћу убирања плодова брескве током читавог лета (Љубојевић и сар., 2018).

У народној терапији се користе лист, цвет, плод, пупољци, кора и прерађевине. Бресква ослобађа црева од трулежи, умирује нерве код деце, подстиче излучивање жучи, користи се против великог кашља (цвет брескве), за лакше мокрење, побољшање рада желуца и црева, јетре, плућа. Сок од брескве је изузетан лосион за кожу, јер истовремено храни лице и скупља поре. Од изгњечених плодова могу да се праве маске за лице (Стојиловић, 2001).



Слика 2.7. Плодови брескве и кајсије (Миловић, М., 2016)

Кајсија (*P. armeniaca* L.) води порекло из северозападне Кине, а тамо се могу наћи шуме ове воћке на падинама планина. Постојбином кајсије се сматрају и средња и Мала Азија, одакле се она проширила на европски континент. Латински назив *armeniaca* добила је по Јерменији, али слично као и код брескве, Јерменија је само представљала пут којим је за време Александра Великог кајсија стигла из Азије у Грчку одакле се ширила по осталом делу Европе (Janick, 2005).

У Србији се кајсија много гаји заступљена и доста се ради на њеном селекционисању и оплемењивању, јер су велика колебања приноса кајсије по годинама, због због великих температурних колебања и климатских прилика. Поред брескве, кајсија је једна од најосетљивијих воћних врста на ниске температуре и на зимске и пролећне мразеве током њеног цветања. Највећи произвођач кајсије у свету је Турска, а по површинама под кајсијом Србија се налази на осмом месту у Европи (Мишић, 2002; Кесеровић и сар., 2016; FAOSTAT, 2018).

Кајсија сазрева доста рано, њени плодови се убирају од јуна до августа, у исхрани се доста користе у свежем, али и у сушеном облику, прерађују се у пекмезе, мармеладе, компоте, слатка, сокове и ракију. Семенке кајсије могу да послуже као замена за бадем и лешник. Плод кајсије је богат шећерима (глукозом и сахарозом), органским киселинама, влакнима (целулозом, пектинима, протеинима), каротеноидима (Милатовић, 2013).

Дрен (*Cornus mas* L.) је врста рода *Cornus* L. који припада породици Cornaceae Link. Породица Cornaceae обухвата 2 рода (*Alangium* Lam. и *Cornus*) са око 85 врста, које углавном расту у умереним и суптропским крајевима обе хемисфере. У Србији расту само врсте рода *Cornus* и то: *C. mas* L. (дрен, дренак, дрењина), *C. sanguinea* L. (свиб, свибовина, пасји дрен), *C. australis* C. A. Mey (јужни свиб), *C. alba* L. (бели дрен) (Јовановић, 1973; Christenhusz, 2016).

Дрен расте као жбун или дрво висине 5–7 m (слика 2.8). Једна је од воћних врста које најраније цветају. Већ у фебруару могу се видети жути цветови дрена. Међутим, плодови дрена сазревају тек крајем лета и почетком јесени, убирају се претежно у септембру. Најчешће су сорте дрена са црвеним плодовима, али постоје и оне које дају жуте плодове (Kucharska et al., 2015).



Слика 2.8. Дрво и плодови дрена (Бијелић, С., 2017)

Дрвенасти делови дрена имају изузетно велику густину због чега су јако чврсти, па су се користили за израду алата и оружје, попут копља, лукова и стрела. Ова особина дала је и назив врсти. На латинском *cornu* значи рог, а *mas* је настало од речи *maschile*, која на латинском значи мушки, јак. Стабло дрена је веома дуговечно, може да живи и више од 200 година (Dinda et al., 2016).

Дрен је веома распрострањен у централној и јужној Европи и у југозападној Азији. Познат је још из времена пре нове ере, из доба старе Грчке и Рима. Самоникло расте најчешће у листопадним храстовим шумама, али се узгаја у засадима широм Европе и Мале Азије. Гаји се и као украсна биљка (Мратинић и Којић, 1998).

Плодови дрена се једу у сировом стању, али и прерађени, у виду џемов, слатка, компота, сокова, ликера и другог (Brindza et al., 2007; Sokół-Łętowska et al., 2014). У народној медицини се користе сви делови дрена, плод, лист, кора, најчешће за лечење болести органа за варење, грознице, упала и инфекција (Dinda et al., 2016). Због лековитости свих делова ове биљке, код Срба постоји народна изрека „здрав као дрен“.

2.2. Биолошки активна једињења родова *Prunus* L. и *Cornus* L. – феноли и иридоиди

Сва једињења која биљке синтетизују могу да се поделе на **примарне и секундарне биомолекуле**. У примарне биомолекуле се убрајају једињења која су потребна за раст, развиће и репродукцију. То су угљени хидрати, липиди, протеини и нуклеинске киселине. Групу секундарних биљних метаболита чине једињења која нису директно укључена у примарне биохемијске процесе, али су важна за биљке јер им помажу да се прилагоде различитим условима средине, да привуку опрашиваче, да се одбране од патогена и од бројних других стресогених фактора. У секундарне биомолекуле се убрајају фенолна једињења, терпени, алкалоиди, цијаногени гликозиди, глукозинолати, биљни хормони и други биомолекули. За ова једињења је устаљен и термин природни производи (Dewick, 2009; Поповић, 2005). Примарни биомолекули биљака су слични примарним биомолекулима у анималном свету, док су секундарни биомолекули специфични за биљне ћелије, а неретко су секундарни биомолекули карактеристични за одређене биљне врсте, представљајући на тај начин и специфичне генетичке, односно хемотаксономске маркере (Singh, 2016; Braunberger et al., 2015).

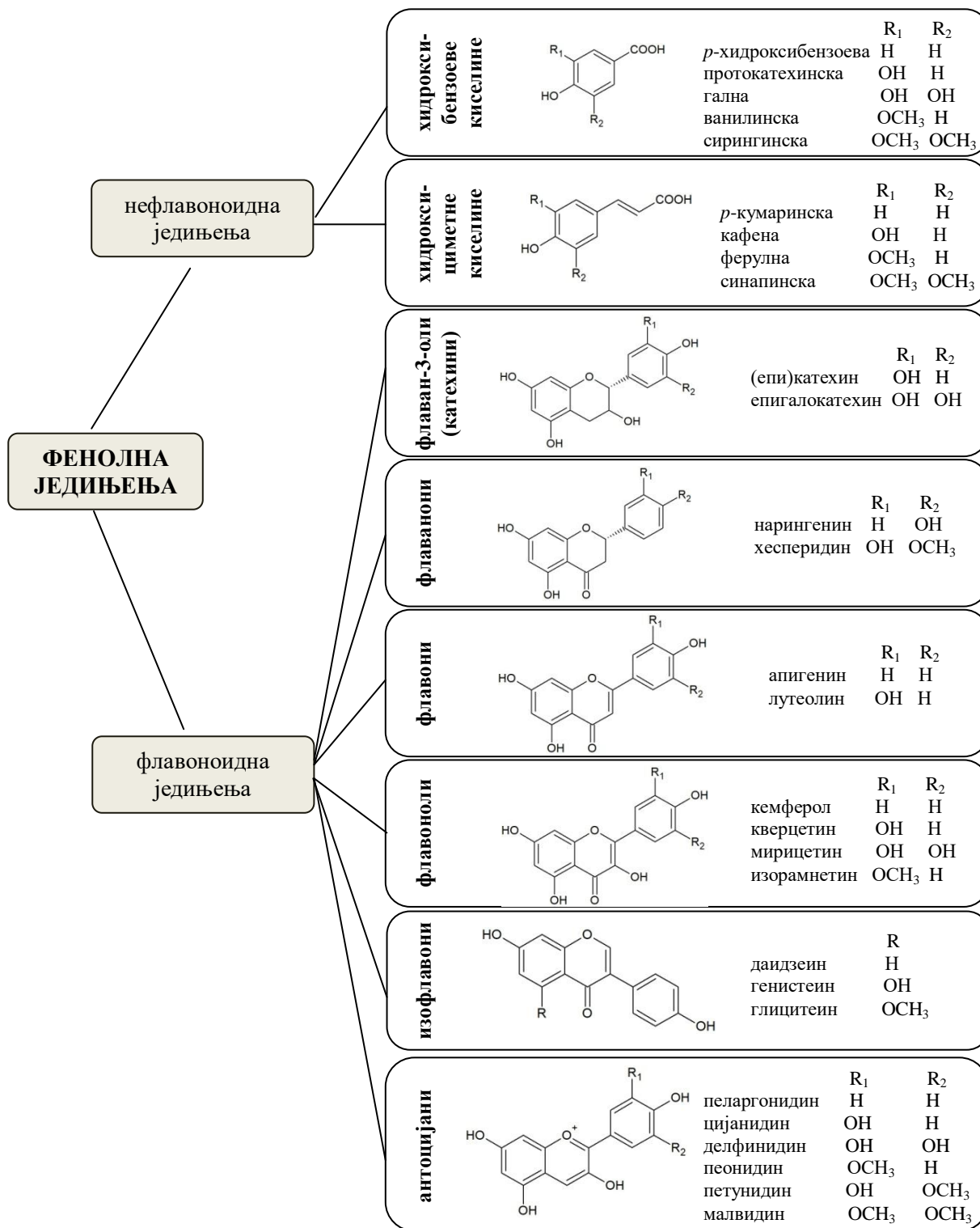
Плодови воћа родова *Prunus* и *Cornus*, као и други плодови воћа, обилују нутријентима и извор су витамина и минерала. Такође, они су богат извор секундарних биљних метаболита, пре свега фенолних једињења. Најдоминантније фенолне структуре у воћу родова *Prunus* и *Cornus* су хидроксициметне киселине, флавоноли и антоцијани, а за плодове дрена је специфично присуство иридоидних молекула (Natić et al., 2019; Jang et al., 2018; Kucharska et al., 2015).

Фенолна једињења

Фенолна једињења су молекули који у својој структури имају најмање један ароматични прстен (C_6) за који је везана једна или више хидроксилних ($-OH$) група, укључујући и функционалне деривате, као што су естри, метил-етри, гликозиди и други (Harborne, 1989; Поповић, 2005; Tiwari et al. 2013). Полифенолима се, у ужем смислу, називају молекули који у својој структури садрже већи број фенолних прстенова и више $-OH$ група, као на пример кондензовани и хидролизујући танини или флавоноиди (Haslam & Cai., 1994). Међутим, овај термин се често употребљава и за једноставне фенолне структуре, тако да употреба ових назива није стриктно ограничена (Manach et al., 2004; Belščak-Cvitanović et al., 2018). Хемијске структуре неких од најзаступљенијих фенолних једињења у природи су приказане на слици 2.9.

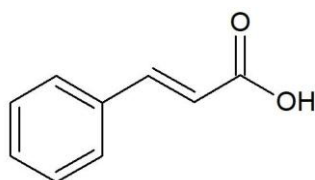
Према броју фенолних прстенова и структурних елемената који их повезују може да се дефинише неколико класа фенолних једињења. У овом контексту је усвојена подела на две основне групе, флавоноидна и нефлавоноидна једињења. Као што је приказано на слици 2.9, флавоноидна једињења имају $C_6-C_3-C_6$ структуре: флаван-3-оли, флаванони, флавони, флавоноли, антоцијанидини, изофлавоноли, проантоцијанидини. У нефлавоноидна једињења се на основу броја угљеникових атома класификују на следеће групе једињења:

прости феноли, бензоеве киселине, хидроксициметне киселине, ацетофенони, фенилсирћетне киселине, хидролизујући танини, кумарини, бензофенони, ксантони, стилбени, халкони и лигнани (Andrés-Lacueva et al., 2010).



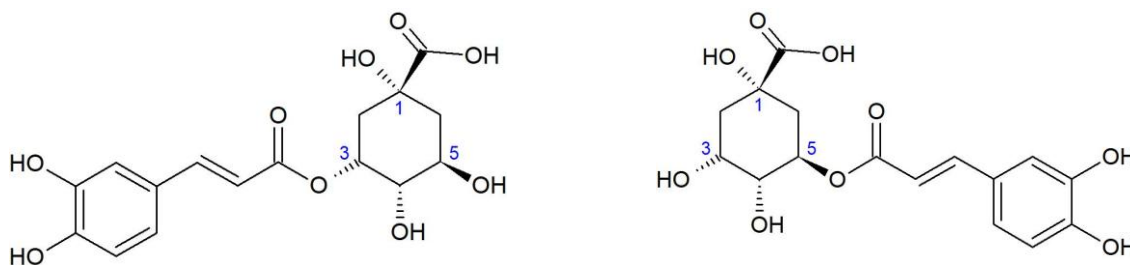
Слика 2.9. Хемијске структуре неких од најзаступљенијих фенолних једињења у природи

Хидроксициметне киселине представљају групу фенолних киселина које имају фенолпропаноидни (C₆-C₃) скелет, односно у својој структури имају *trans*-циметну киселину (слика 2.10) за коју је везана барем једна хидроксилна група. Хидроксилне групе могу да буду метиловане или врло често естерификоване, дајући на тај начин велики број деривата. Хидроксициметне киселине се ретко срећу у слободној форми, углавном су присутни њихови деривати. У природи су најчешће налазе деривати кафене, *p*-кумаринске, ферулне и синапинске киселине. Естарска веза се најчешће гради са хинском киселином. 5-*O*-Кафеоилхинска киселина се тривијално назива хлорогенска киселина, међутим, назив **хлорогенске киселине** је општеприхваћен назив који обједињује и остале кафеоилхинске, кумароилхинске, ферулоилхинске и синапоилхинске структуре (Clifford, 2000a; Liang & Kitts, 2016; Dewick, 2009).



Слика 2.10. Структура *trans*-циметне киселине

Организација IUPAC (Интернационална заједница за чисту и примењену хемију, *eng.* International Union of Pure and Applied Chemistry) је 1976. године изменила редослед нумерације атома хинске киселине, што се веома одразило на номенклатуру и довело до извесних забуна око хлорогенске и неохлорогенске киселине. Данас, према IUPAC правилима, хлорогенска киселина је 5-*O*-кафеоилхинска, а неохлорогенска киселина је 3-*O*-кафеоилхинска (слика 2.11). Раније, називи су били обрнути. Неки аутори, али чак и поједини произвођачи хемикалија су задржали ранију номенклатуру, па треба бити додатно обазрив када су ова једињења у питању (Abrankó & Clifford, 2017; Kremr et al., 2016). У оквиру ове дисертације су поштована IUPAC правила.



3-*O*-кафеоилхинска (неохлорогенска) киселина

5-*O*-кафеоилхинска (хлорогенска) киселина

Слика 2.11. Структуре неохлорогенске и хлорогенске киселине, уз нумерацију хинске киселине према IUPAC правилу

Најзаступљенија хидроксициметна киселина у природи је кафена киселина, а различите кафеоилхинске и дикафеоилхинске структуре су најзаступљенији деривати у виду којих је присутна. Хлорогенска (5-*O*-кафеоилхинска) киселина је углавном доминантан изомер у природи, међутим у коштичавом воћу и купусњачама доминира неохлорогенска (3-*O*-кафеоилхинска) киселина (Clifford, 2000a).

С обзиром да је доминантно присутна у кафи и чају, хлорогенска киселина је једна од најзаступљенијих фенолних киселина у исхрани људи (Naveed et al., 2018), а самим тим и веома много проучавана, како у погледу биолошких активности, тако и са аспекта апсорпције и метаболизма након уноса у организам.

Оно што је до сада утврђено за хлорогенске киселине јесте да се великим делом апсорбују у желуцу и у танком цреву, и то у свом неизмењеном (естерификованом, нехидролизованом) облику. Раније се мислило да је апсорпција на нивоу ових органа могућа само након хидролизе (Nardini, 2002). Међутим, и на експерименталним пацовима (Lafay et al., 2006) и код људи (Duarte & Farah, 2011) је утврђено да се хлорогенска киселина апсорбује у великој мери у интактној форми, било након уноса храном или кафом, било након директног ињектовања у желудац пацова. Поред апсорпције у неизмењеном облику, на нивоу танког црева се апсорбују и примарни метаболити добијени дејством цревних естераза и редуктаза. То су пре свега кафена, ферулна, дихидрокафена и дихидроферулна киселина. Неапсорбоване хлорогенске киселине и примарни метаболити се даље у дебелом цреву разграђују до секундарних метаболита који се потом апсорбују (слика 2.12 и 2.13).

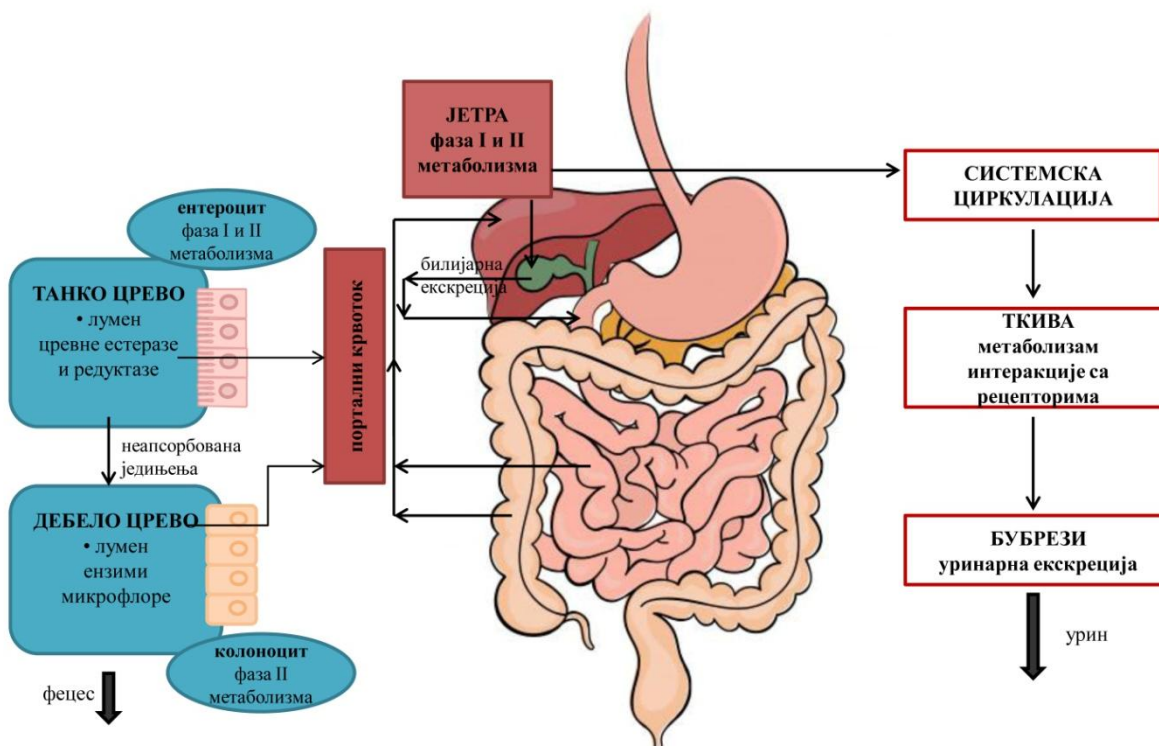
На основу измерених концентрација хлорогенских киселина и њихових метаболита у урину током 24 h након конзумирања кафе је утврђено да проценат апсорбованих хлорогенских киселина, заједно са метаболитима насталим у дигестивном тракту, износи $68 \pm 20\%$ од укупно унетих киселина (Duarte & Farah, 2011).

Водећи транспорт фенолних киселина кроз цревни епител је **парацелуларна дифузија**, односно пролазак кроз простор између ћелија, што је предложено и као водећи начин транспорта хлорогенских киселина (Konishi & Kobayashi 2004). Хлорогенске и хидроксициметне киселине кроз епително ткиво у гастроинтестиналном тракту могу да пролазе **пасивном дифузијом**, а сматра се да је у процес транспорта укључен и **МСТ транспортер** – транспортер монокарбоксилних киселина (МСТ, *енгл.* monocarboxylic acid transporter). На транспорт једињења значајан утицај имају хемијске структуре једињења, али и унете концентрације (Liang & Kitts, 2016).

Метаболити настали разградњом хлорогенских киселина се такође транспортују кроз цревни епител преко МСТ. Моноанјонска карбоксилна група и неполарни ланац или ароматични хидрофобни део молекула су неопходни критеријуми за супстрате за МСТ, што фенолне киселине чини потпуно адекватним (Rahman et al., 1999). Естарска веза код деривата хлорогенских киселина може да омета интеракције са транспортером, па је тако трансепителни флуks хлорогенске киселине знатно мањи у поређењу са ферулном киселином (највећи флуks) или кафеном киселином (мање од ферулне). Међутим,

транспорт хлорогенске киселина је у рангу са галном киселином и катехином, који вероватно због поларности не одговарају довољно МСТ транспортеру.

Ефикасност апсорпције хлорогенских киселина зависи много и од начина уноса, структуре намирница којима су унете у организам, али и од других компонената присутних у матриксу. Тако на пример, уколико је додато млеко у кафу, значајно се смањује апсорпција хлорогенских киселина (Duarte & Farah, 2011).

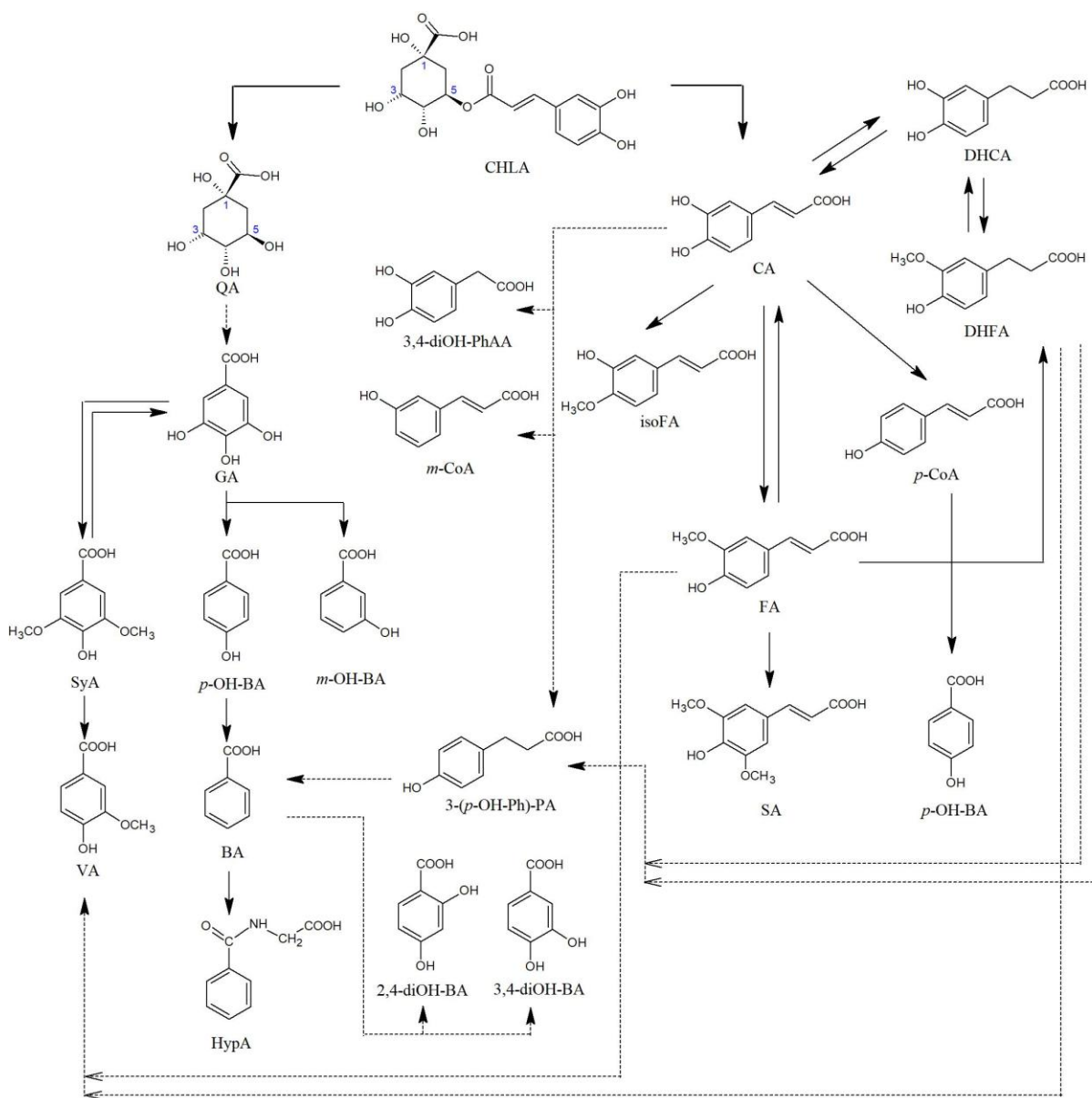


Слика 2.12. Апсорпција фенолних киселина дуж дигестивног тракта (модификовано према Liang & Kitts, 2016; Cardona et al., 2013)

На слици 2.12 су приказани путеви апсорпције, метаболизма и екскреције хлорогенских киселина дуж гастроинтестиналног тракта, а на слици 2.13 су приказани метаболити који могу да настану разградњом хлорогенске киселине.

Главни путеви метаболизма и елиминације хлорогенских киселина, као и осталих фенолних једињења, се одвијају у јетри и уринарном систему. Метаболити који настају у организму након апсорпције су исти они који настају разградњом једињења дуж гастроинтестиналног тракта, једино се разликује проценат заступљености метаболита. Реакције којима се метаболишу фенолна једињења су типичне реакције фазе I и фазе II метаболизма ксенобиотика. Ово укључује реакције хидролизе, оксидације, редукције (фаза I) и метиловања, глукуронидације, сулфатације, коњугацију са глицином (фаза II) (Farrel et al., 2011).

Око 96–97% метаболита фенолних једињења који се излучују урином представља пет једињења: хипурина киселина, 3,4-дихидроксибензилсирћетна киселина, дихидрокафена,



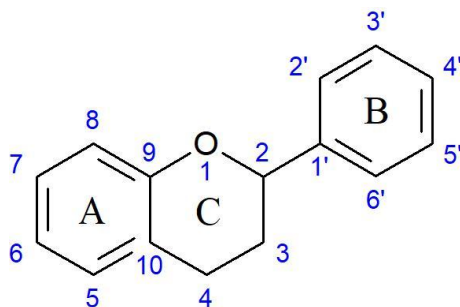
Слика 2.13. Поједностављен приказ метаболичких путева разградње хлорогенске киселине. (Farah & Duarte, 2015)

Ознаке: CHLA – хлорогенска киселина; CA – кафена киселина; QA – хинска киселина; GA – гална киселина; SyA – сирингинска киселина; BA – бензоева киселина; *p*-OH-BA – *p*-хидроксибензоева киселина, *m*-OH-BA – *m*-хидроксибензоева киселина; 2,4-diOH-BA – 2,4-дихидроксибензоева киселина; 3,4-diOH-BA – 3,4-дихидроксибензоева киселина; VA – ванилинска киселина; HupA – хипурина киселина; DHCA – дихидрокафена киселина; DHFA – дихидроферулна киселина; FA – ферулна киселина; isoFA – изоферулна киселина; SA – синапинска киселина; *p*-CoA – *p*-кумаринска киселина; *m*-CoA – *m*-кумаринска киселина; 3,4-diOH-PhAA – 3,4-дихидроксифенилсирћетна киселина; 3-(*p*-OH-Ph)PA – 3-(*p*-хидроксифенил)-пропионска киселина. Испрекиданам линијама приказани су путеви којима се одвија више од једне реакције до крајњег производа.

ванилинска и гална киселина. Доминантни метаболит је хипурина киселина, која чини чак 80–88% од ових пет набројаних једињења. Метаболити који се јављају у мањим концентрацијама су изоферулна киселина, *p*-хидроксibenзова, 2,4-дихидроксibenзова, *m*-кумаринска, *p*-кумаринска, синапинска и сирингинска киселина (слика 2.13). Овакви проценти су добијени и код људи који су пили кафу и код оних који су пили воду (контролна група), тако да се ова једињења сматрају општим метаболитима за сва фенолна једињења (Duarte & Farah, 2011).

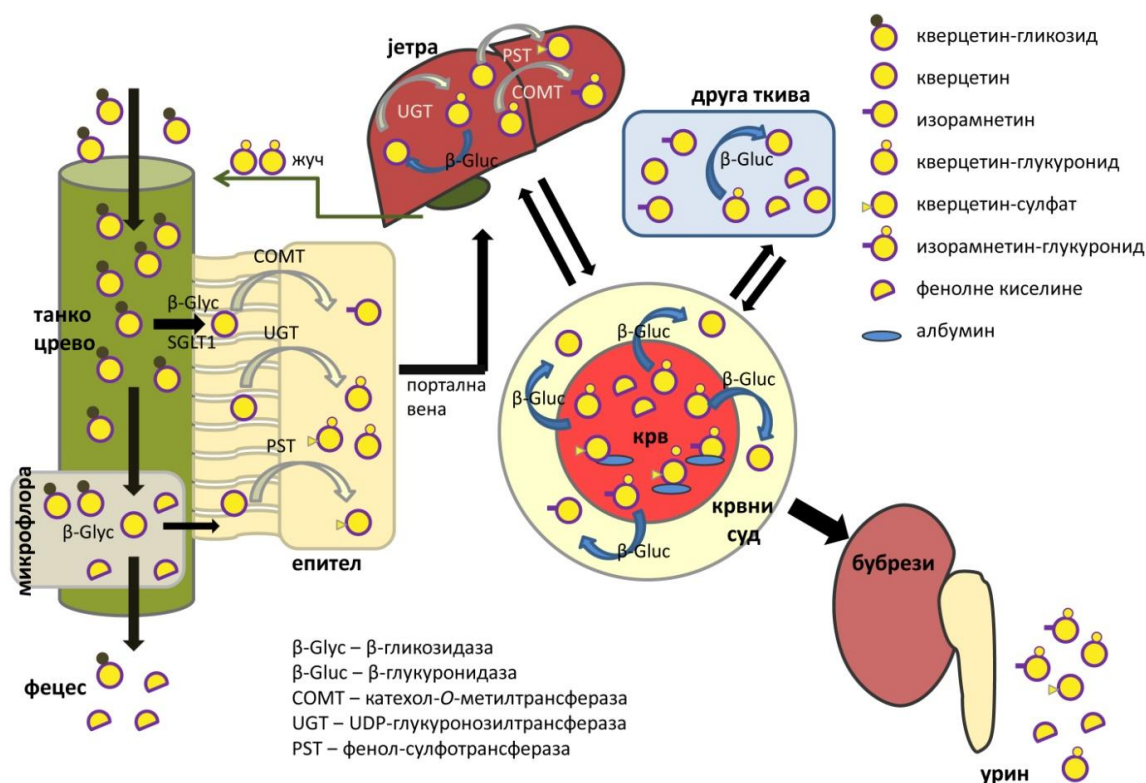
Међутим, хипурина киселина настаје и разградњом фенолних аминокиселина (фенилаланина, тирозина, триптофана), тако да њено присуство у урину потиче и од разградње протеина и аминокиселина. За разлику од хипурина киселине и осталих метаболита, 3,4-дихидроксифенилсирћетна киселина се детектује у урину само након уноса фенолних једињења (детектована код људи који су конзумирали кафу – и без и са млеком, али није код оних који су пили само воду; Duarte & Farah, 2011), представљајући маркер метаболизма фенолних једињења, поготово за флавоноидне структуре (Rechner, et al., 2004; Choudhury et al., 1999).

Флавоноидна једињења или флавоноиди (лат. flavus – жут) су група биолошки веома активних фенолних једињења присутних у воћу, поврћу, језграстим плодовима, зачинским биљкама, или производима попут вина и чоколаде. Ова група броји преко хиљаду једињења која се на основу хемијске структуре флаванског скелета ($C_6-C_3-C_6$) могу разврстати на неколико подгрупа: флаванони, флавони, дихидрофлавоноли, флавоноли, флаван-3-оли, леукоантоцијанидини, антоцијанидини и изофлавоноли. Разлике потичу од различитог оксидационог стања хетероцикличног С прстена (пиран) који повезује два фенолна (А и В) прстена (слике 2.14 и 2.9). Велики допринос разноврсности структура дају гликозидне везе коју могу да се граде на различитим положајима А, В или С прстена, као и могућности димеризације и полимеризације скелета (Manach et al., 2005; Dewick, 2009; Dey & Harborne, 1997). Структурне варијације диктирају и разлике у апсорпцији и метаболизму једињења и њиховим биолошким активностима. У врстама родова *Prunus* и *Cornus* се претежно налазе флавонолни гликозиди (Jang et al., 2018; Pawlowska et al., 2010).



Слика 2.14. Флавански скелет – основа структуре флавоноидних једињења

Након оралне ингестије, флавоноиди су подвргнути хемијским модификацијама дуж гастроинтестиналног тракта од стране ензима домаћина или микрофлоре и метаболисани након апсорпције у интестиналном зиду, јетри или периферним ткивима. Што се тиче апсорпције флавоноидних структура, пресудни фактор представља гликозилованост, односно присуство везаних шећерних остатака. Код испитаника са илеостомијом је установљено да се у желуцу и танком цреву апсорбује $52 \pm 15\%$ кверцетин-4'-*O*-глукозида, $17 \pm 15\%$ кверцетин-3-*O*-рутинозида и $24 \pm 9\%$ агликона кверцетина (Hollman et al., 1995). У истој овој студији је измерено да се путем урина излучи свега 0,5% апсорбованих количина, тако да се велики део ових једињења задржава у људском организму и метаболише највероватније у јетри. У каснијем истраживању које је за тему имало исту ову проблематику (Walle et al., 2000), установљено је да се гликозиди кверцетина у танком цреву хидролизују β -глукозидазама и да се веома велики проценат насталог кверцетина затим ефикасно апсорбује (64,5–80%). Апсорпција, метаболизам и екскреција кверцетина су шематски приказани на слици 2.15.

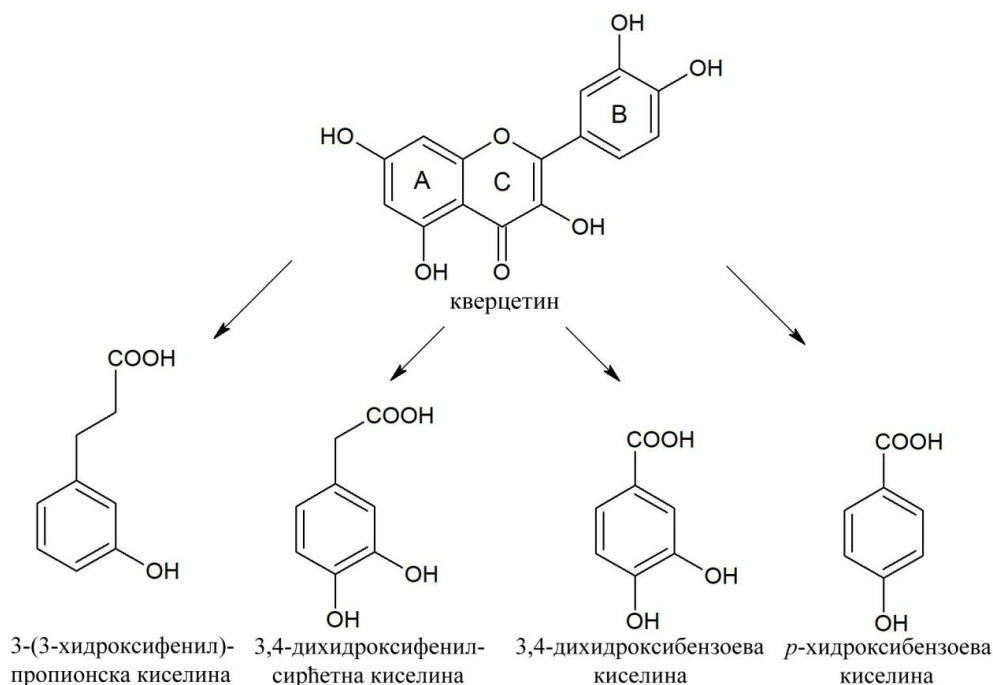


Слика 2.15. Шематски приказ апсорпције и метаболизма флавоноидних једињења (на примеру кверцетина (Perez-Vizcaino et al., 2012))

Када се апсорбује, кверцетин подлеже даљим интензивним метаболичким реакцијама. Ове реакције се одвијају дејством ензима катехол-*O*-метилтрансферазе (COMT), уридилдифосфат-глукуронозилтрансферазе (UGT) и фенол-сулфотрансферазе (PST). То су

реакције грађења метил-, глукуронидо- и сулфо-коњугата, у виду којих се кверцетин транспортује порталном венном до јетре или циркулише кроз крвоток до осталих органа. Кверцетин и његови деривати се кроз крвоток преносе и везани за албумин. У васкуларном систему се одвијају реверзни процеси и хидролиза ових коњугата, ослобађајући кверцетин који се акумулира у ткивима где испољава свој ефекат. Ови реверзни процеси декоњугације и коњугације кверцетина (и осталих флавоноида) сведоче да и агликонске структуре и коњуговане форме испољавају биолошке ефекте (Perez-Vizcaino et al., 2012).

У организму се такође одиграва и разградња флавоноидних структура до фенолних киселина (Santangelo et al., 2019). На слици 2.16 је приказана разградња кверцетина дејством цревне микрофлоре до фенолних деривата пропионске и сирћетне киселине и до деривата бензоеве киселине. О апсорпцији и даљим метаболичким трансформацијама фенолних киселина је већ било речи (слика 2.13).

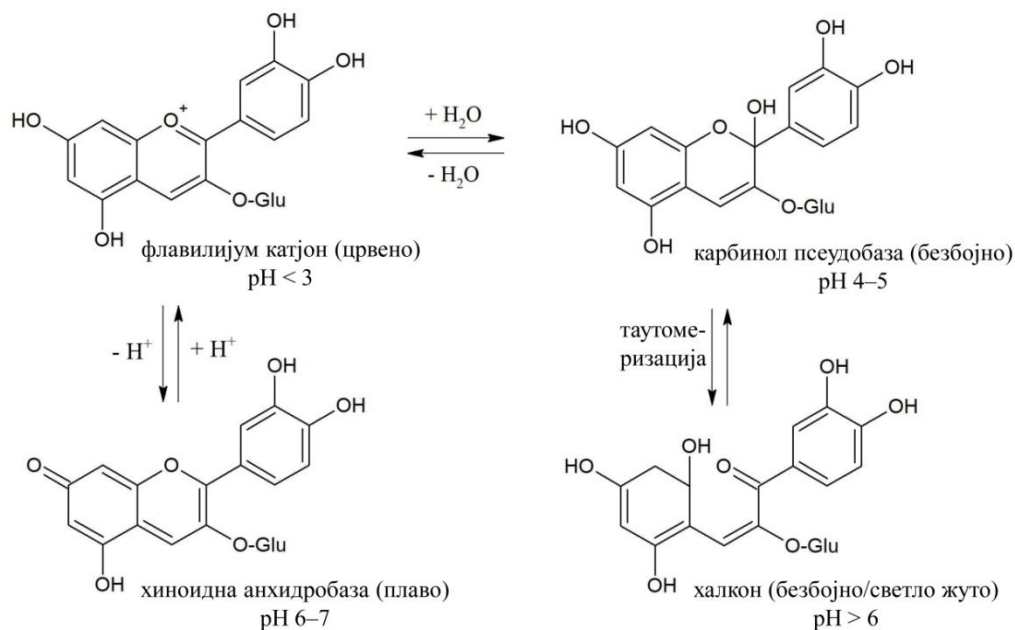


Слика 2.16. Метаболити разградње кверцетина дејством цревне микрофлоре (Santangelo et al., 2019)

Антоцијани (грч. anthos – цвет и cyanos – плаво) су најважнији биљни пигменти који су растворљиви у води. Агликони имају флавоноидну структуру се и зову антоцијанидини, а везивањем шећерних јединица добијају се антоцијани. У природи је пронађено више од 600 молекула антоцијана и преко 30 антоцијанидина (He & Giusti, 2010; Andersen & Jordheim, 2006), међутим 6 агликона су најраспрострањенији у природи: пеларгонидин, цијанидин, делфинидин, пеонидин, петунидин и малвидин (слика 2.9). За агликон могу да се вежу једна или више шећерних јединица, за –ОН групе на различитим положајима. Најчешће шећерне јединице су глукоза, галактоза, рамноза, ксилоза и арабиноза, међутим срећу се и деривати код којих су шећерне јединице ациловане алифатичним киселинама (малонском, ћилибарном, јабучном и сирћетном) или хидроксициметним киселинама (*p*-кумаринском, ферулном и синапинском) (Clifford, 2000b).

У биљним ткивима антоцијани су носиоци црвене, љубичасте и плаве боје и нијанси које настају њиховим комбинацијама, па су они доминанта једињења у црвено-љубичастом воћу и поврћу, попут бобичастог воћа, грожђа, нара, плавог патлиџана, црвеног купуса и другог (Wang & Stoner, 2008). Структура антоцијанидинског скелета, присуство или одсуство гликозидних и ацилованих форми, места везивања, врста и број шећерних јединица, представљају „антоцијански шаблон“, односно специфични су за одређену биљну врсту. Стога молекули антоцијана имају велики потенцијал као хемотаксономски маркери (Eker et al., 2020).

Карактеристично својство молекула антоцијана јесте промена структуре у зависности од рН средине у којој се налазе. Промена структуре резултује и променом боје. Реверзибилне промене структуре антоцијана у зависности од киселости средине су приказане на слици 2.17, на примеру цијанидин-3-*O*-глукозида, антоцијана који се најчешћи среће у природи. У киселој средини, када је рН мање од 3, антоцијани су у облику флавилијум јона и дају црвену боју. Уколико средина постане мање кисела (рН 6–7), флавилијум катјон прелази у хиноидну анхидробазу плаве боје. С друге стране, нуклеофилном адицијом воде на флавилијум катјон настаје безбојна карбинол псеудобаза. Даље, таутомеризацијом ове псеудобазе настаје халкон, који је претежно безбојан или светло жут (Olivas-Aguirre et al., 2016; McGhie & Walton, 2007).



Слика 2.17. Промена структуре антоцијанидинског скелета у зависности од pH (модификовано према McGhie and Walton 2007)

Када је у питању апсорпција антоцијана у организму, за разлику од осталих флавоноидних структура, они могу да се апсорбују у гликозидном облику. Овај транспорт интактних једињења се одвија у желуцу и то највероватније преко појединих транспортера глукозе и транспортера монокарбоксилних киселина (МСТ; Oliveira et al., 2015) и преко билитранслоказе (Passamonti et al., 2002; Ziberna et al., 2012), а структура једињења диктира афинитет везивања за транспортере. Веома кисела средина у желуцу (pH~2) погодује одржавању стабилне структуре антоцијана у форми флавилијум катјона. У цревима, слабо базна и неутрална pH средина мењају структуру агликона из флавилијум катјона у хиноидну, полукеталну (карбинол-псеудобаза) или халконску структуру (слика 2.17), што се сигурно одражава и на апсорпцију (Olivas-Aguirre et al., 2016). Међутим, тачне промене је немогуће потпуно прецизно утврдити, јер још увек нису развијене методе за детекцију ових структура (McGhie & Walton, 2007).

У танком цреву антоцијани могу такође да буду апсорбовани у гликозидном облику (Talavéra et al., 2004), али као и остали флавоноидни гликозиди, могу да буду хидролизоване и апсорбоване у виду агликона. (Zou et al., 2014). У дебелом цреву се дејством ензима микрофлоре одвија хидролиза неапсорбованих антоцијана и даља разградња насталих агликона до фенолних киселина и флороглуциналдехида цепањем C прстена (McGhie & Walton, 2007). Због много краће дужине дебелог црева у поређењу са танким, апсорпција у овом делу гастроинтестиналног тракта је генерално знатно мања.

Убризавањем различитих антоцијана и екстраката богатих антоцијанима директно у желудац и танко црево експерименталних пацова утврђено је да апсорпција антоцијана у желуцу износи око 25% за моногликозиде, док се знатно слабије апсорбују дигликозиди,

конкретно цијанидин-3-рутинозид (8,4%). Такође, деривати делфинидина се апсорбују нешто боље од гликозида других антоцијанидина, као и деривати са арабинозом као шећерном групом, у поређењу са глукозом или галактозом (Talavéra et al., 2003; Felgines et al, 2007). Апсорпција на нивоу танког црева износи просечно 24% (Talavéra et al., 2004; Felgines et al, 2007).

Веома брзо након уноса у организам (0,5–1 h) антоцијани су детектовани у крви и у урину испитаника (Czank et al., 2013). Иако је велик проценат апсорпције интактних једињења, она су у циркулационом систему и у урину присутна у ниским концентрацијама. У нешто вишим концентрацијама су присутни деградациони метаболитички производи и њихови коњугати настали у фази II метаболизма, односно протокатехинска киселина и флороглуциналдехид, глукурониди и сулфати протокатехинске киселине, ванилинске и изованилинске киселине, ферулна киселина и хипуриинска киселина. Полуживот ових једињења у организму је доста дуг и износи у просеку више од 20 h, али за ферулну киселину може да буде дужи и од 50 h.

In vitro симулација кодигестије антоцијана са другим намирницама је показала да свакодневне намирнице попут хлеба, меса и млека, могу да смање биолошку доступност антоцијана и осталих фенолних једињења. Изоловани протеини из соје и меса и казеин из млека знатно смањују биолошку доступност антоцијана, док је моносахариди и полисахариди значајно повећавају, како на нивоу желуца, тако и на нивоу танког црева (Sengul et al., 2014). Процент апсорпције антоцијана је једнак било да се они уносе у виду чистих изолованих једињења, било у виду воћних екстраката (Talavéra et al., 2003).

Бројна испитивања фенолних једињења су потврдила њихове позитивне биолошке активности. Једна од највише испитиваних и доказаних активности јесте антиоксидантна активност.

Антиоксиданти су једињења која имају способност да одложе, спрече или да отклоне оксидативна оштећења циљних молекула (Halliwell & Gutteridge, 2015). Оксидативни процеси су неизбежни код аеробних организама. Они су неопходни за одвијање неких од најважнијих животних процеса и за нормално функционисање организма. Са друге стране, уколико се наруши равнотежа у организму, превелика количина реактивних врста може да изазове велика оштећења. Овај феномен је познат као „**кисеонични парадокс**“, а до негативних последица долази када се наруши хомеостаза у организму, што изазива **оксидативни стрес** (Davies, 2000).

Реактивне врсте су веома реактивни слободни радикали, јони или молекули који настају у организму услед различитих ендогених или егзогених фактора. Најчешће су то реактивне врсте кисеоника (*енгл.* reactive oxygen species, ROS), као што су супероксид анјон радикал ($O_2^{\cdot-}$), водоник-пероксид (H_2O_2), пероксил радикали (ROO^{\cdot}), хидроксил-радикал (HO^{\cdot}), синглетни кисеоник (1O_2) и реактивне врсте азота (*енгл.* reactive nitrogen species, RNS), као што су слободни радикали азота (нпр. азот-моноксид, NO). ROS и други слободни радикали настају као споредни производи нормалног ћелијског метаболизма, посебно у митохондријама приликом реакција транспорта електрона током ћелијског дисања. Стварање ROS од стране неутрофила и макрофага је неопходан механизам за одбрану од инфекција. Реактивне честице активирају поједине сигналне процесе и учествују у пролиферацији ћелија. Настају и током изложености UV, X и гама зрачењу, продукти су у реакцијама катализованим јонима метала, присутни су као полутанти у животној средини (Finkel & Holbrook, 2000; Gülcin, 2012). Реактивне врсте могу да изазову оксидативна оштећења липида, протеина, нуклеинских киселина и полинезасићених масних киселина. Они доводе до развоја многих хроничних оболења, као што су старење ћелија, канцерогена оболења, срчани поремећаји, неуродегенеративне болести попут Алцхајмерове и Паркинсонове болести, затим атеросклерозе, дијабетеса, хроничних запаљења и других патофизиолошки поремећаји (Valko et al., 2006; Halliwell & Gutteridge, 2015). Реактивне врсте су такође узрочници оксидативног оштећења хране, па је потрага за антиоксидантима значајна не само са фармаколошког аспекта, него и за прехранбену индустрију (Gülcin, 2012).

Антиоксиданти испољавају своју активност путем неколико механизма (Tiwari, 2004):

1. спречавају настајање активних врста,
2. „хватају“ (неутралишу) слободне радикале,
3. комплексирају јоне метала,
4. поправљају и/или уклањају оштећења,
5. индукују биосинтезу других антиоксиданата или антиоксидантних ензима.

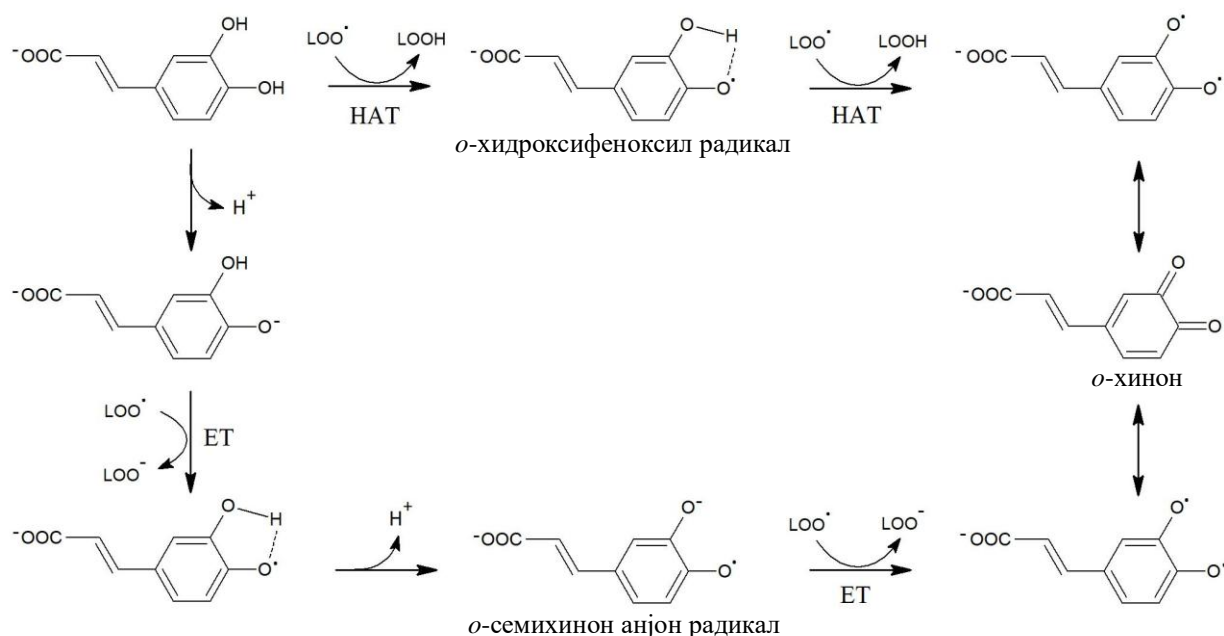
Људски организам поседује неколико антиоксидантних система који се могу поделити на:

- ензимске антиоксиданте: супероксид-дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион-пероксидаза (GSH-Px) и друге пероксидазе и
- неензимске антиоксиданте: витамин Е, витамин С, албумин, билирубин, тиоли (глутатион, тиоредоксин, липоинска киселина), каротеноиди (Поповић и Штајнер, 2008; Valko et al., 2006).

У условима стреса, када оксидативни процеси надвладају ендogene системе антиоксидантне заштите, ћелије постају немоћне да се одбране. Због тога је унос екзогенних антиоксиданата путем исхране или дијететских суплемената важан превасходно за очување здравља људи, али и као превенција и помоћ при лечењу.

Установљена су два главна механизма неутралисања слободних радикала од стране фенолних једињења (слика 2.18). Први се заснива на способности фенолне функционалне групе да слободном радикалу (опште формуле R^{\bullet} или LOO^{\bullet} ако је у питању липидни пероксил радикал) донира атом водоника. Овај механизам је назван „НАТ” – механизам трансфера атома водоника, *енгл.* hydrogen atom transfer. У овој реакцији сам фенолни антиоксидант ($ArOH$) постаје слободни радикал (ArO^{\bullet}) који је резонантно стабилизован. Други механизам укључује трансфер електрона, те је назван „ЕТ“ (*енгл.* electron transfer) или „SET“ (*енгл.* single electron transfer). Овом механизму претходи депротоновање фенолног антиоксиданта, тако да ЕТ механизам зависи од рН средине и способности јонизације самог антиоксиданта. Након трансфера електрона настаје феноксид радикал ањон, а након трансфера још једног електрона настаје резонантно стабилизован феноксил радикал. Готово увек се у узорцима одвијају и НАТ и ЕТ механизам (Cheng et al., 2007; ; Gülçin, 2012).

У истраживању Cheng et al. (2007) је утврђен антиоксидантни капацитет кафе, ферулне, *p*-кумаринске, синапинске и хлорогенске киселине у погледу инхибиције оксидације липопротеина мале густине инициране јонима бабра(II). Иако све хидроксициметне киселине показују антиоксидантну способност, кафена и хлорогенска киселина су испољиле бољи капацитет од осталих. Разлог томе лежи у вициналном (*orto*) положају хидроксилних група који доприноси бољој резонантној стабилизацији насталог феноксил радикала, али и могућности комплексирања јона метала. Оваква активност истиче се и код флавоноидних молекула са дихидроксициметним групама на В прстену агликона (Hou et al., 2004; Dai et al., 2006). Када молекул има *orto*-дихидроксициметне групе, гради се интермедијер *orto*-хидроксициметил радикал који је стабилизован интрамолекулском водоничном везом. Додатно, *orto*-хидроксициметил радикал и/или *orto*-семихинон радикал ањон се брже оксидују до крајњег производа *orto*-хинона, а предложени механизам реакције је на примеру кафе киселине приказан на слици 2.18 (Cheng et al., 2007).



Слика 2.18. Механизам неутрализације слободних радикала (Cheng et al., 2007)
 (Ознаке: LOO• – липидни перокси радикал, LOOH – липидни хидропероксид, HAT – трансфер водоника, ET – трансфер електрона)

Антиоксиданти штите ДНК од оксидативних оштећења и мутаација које могу да изазову карциноме, те се сматрају веома важним хемопревентивним агенсима против различитих канцера. Осим антиоксидантне активности и неутралисања слободних радикала, фенолна једињења могу да испољавају **антиканцерогену активност** преко модулације метаболизма карциногена, регулације експресије онкогена и тумор-супресор гена током ћелијске пролиферације и диференцијације, заустављањем ћелијског циклуса и иницирањем апоптозе, инхибицијом путева преноса сигнала, модулацијом активности ензима укључених у процесе детоксикације, антиинфламаторном активношћу преко стимулације имуног система, супресијом ангиогенезе и многим другим дејствима (Abdal Dayem et al., 2016; Huang et al., 2009; De Flora et al., 2001).

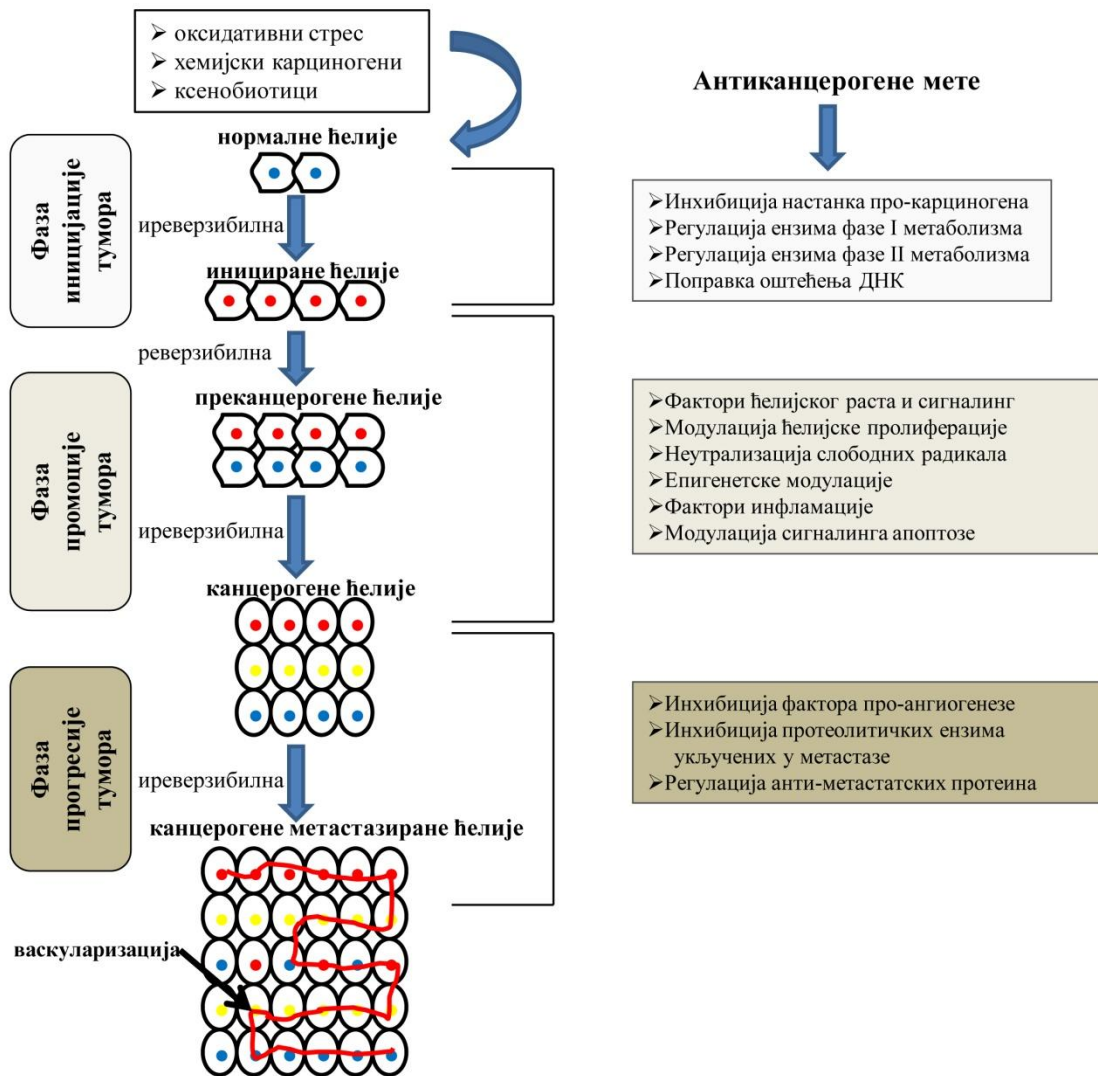
Канцерогенеза је сложен процес који се одвија у више фаза укључујући иницијацију, промоцију и прогресију. На слици 2.19 су шематски приказане ове фазе и начини на који у свакој од фаза полифенолна једињења могу да делују као антиканцерогени агенси.

Иницијација подразумева улазак и дистрибуцију карциногенних агенаса у ћелију, односно у једро, и интеракцију са ДНК која за последицу има развој мутација и изазивање токсичних ефеката. Овај процес је иреверзибилан, али може да се заустави реакцијама фазе I и II метаболичке разградње ксенобиотика, у којима се карциногени трансформишу у мање токсичне и растворљиве агенсе (De Flora et al., 2001). У фази иницијације полифеноли могу да испољавају протективно дејство путем више механизма, попут спречавања уласка генотоксичних молекула или њиховог ендеогеног формирања (Scalbert et al., 2005), регулацијом ензима фазе I и фазе II, нпр. цитохром P450 (Baer-Dubowska et al.,

1998), глутатион S-трансферазе, NAD(P)H: хинон-оксидоредуктазе (Shih, et al., 2007) или инхибицијом формирања ДНК адуката (Lu et al., 2008).

Фаза промоције, која може да траје годинама и десетинама година, се односи на пролиферацију почетних туморских ћелија. Сматра се реверзибилном фазом туморигенезе и током ње расте број пре-туморских ћелија. У овој фази фенолна једињења могу да делују инхибирајући различите фазе ћелијског циклуса и ћелијске пролиферације, као и индукујући апоптозу (Golonko et al., 2019; Fresco et al., 2010; Fantini et al., 2015).

Фаза прогресије тумора је фаза у којој се ћелије постепено трансформишу у малигно стање. Метастазе и инвазија туморских ћелија се одвијају у овој фази, путем ангиогенезе, која је појачана услед секреције специфичних фактора раста и експресије њихових рецептора. Механизми инхибиције ове фазе од стране фенолних једињења и других природних производа укључују регулацију секреторних фактора раста, попут фактора раста пореклом из тромбоцита и васкуларног ендотелијалног фактора раста (*енгл.* platelet-derived growth factor, PDGF и vascular endothelial growth factor, VEGF), као и инхибицију металопроотеиназа (*енгл.* metalloproteinase, MMP) и других протеина који учествују у формирању цитоскелета (De Flora et al., 2001; Ramos, 2008).



Слика 2.19. Схематски приказ карциногенезе и биолошких мета фенолних једињења као антиканцерогених агенаса (прилагођено према Abdel Dayem et al., 2016; De Flora et al., 2001)

У табели 2.1 су за поједина фенолна једињења приказане неке од биолошких активности и механизма путем којих их остварују.

Табела 2.1. Биолошке активности појединих фенолних једињења

| Једињење | Модел | Активност и механизам дејства | Референца |
|--|---|---|---|
| Хлорогенска и хидроксициметне киселине | <i>In vitro</i> индукована оксидација јонима бакра (Cu^{2+}) или азо-иницијатором (AAPH) | Превенција кардиоваскуларних обољења путем спречавања оксидације LDL | Cheng et al. (2007) |
| Флавоноли (кверцетин, кемферол и њихови гликозиди) | | | Hou et al. (2004) |
| Хлорогенска и кафена киселина | Мишеви код којих је гојазност индукована применом режима исхране са великим садржајем масти (high-fat diet-induced-obese mice) | Смањење гојазности и побољшање липидног метаболизма; Смањење телесне тежине, висцеларног масног ткива, лептина и инсулина у крви | Cho et al. (2010) |
| Ферулна киселина | Пацови код којих је стрептозотоцином индукован дијабетес | Антидијабетска активност путем неколико механизма Смањење повећане концентрације глукозе и липда у крви; Повећана активност ензима антиоксидантне заштите (SOD, CAT, GPx); Побољшање хистолошког налаза панкреасних ћелија | Balashubashini et al. (2004) Roy et al. (2013) |
| Епигалокатехингалат, епикатехин, гална киселина, елагинска киселина, кверцетин, мирицетин, нарингенин и њихови деградациони продукти | <i>In vitro</i> тестови – активност теломеразе, <i>енгл.</i> telomeric repeat amplification protocol (TRAP) и дужина теломеразе, <i>енгл.</i> terminal restriction fragment (TRF) | Антиканцерогена активност инхибицијом теломеразе | Naasani et al. (2003) |

| | | | |
|--|---|--|---|
| Кверцетин | Изолвани протеин микротубула (тубулин) | Антипролиферативна активност индукована спречавањем формирања цитоскелета директним везивањем за тубулине и спречавањем њихове полимеризације у микротубуле | Gupta & Panda (2002) |
| Кверцетин | Ћелије рака дојке (MDA-MB-453 ћелије) | Антипролиферативна активност путем заустављања ћелијског циклуса и изазивања апоптозе делујући на експресију протеина који регулишу апоптозу (p53, Bcl-2, Вах, цитохром С, каспаза-3 и PARP) | Choi et al. (2008) |
| Кверцетин | Ћелије рака дојке (MCF7 ћелије) | Антипролиферативна активност путем заустављања ћелијског циклуса у S фази и изазивања апоптозе нарушавајући мембрански потенцијал митохондрија и активацијом каспазе-6, -8 и -9 и редукцијом активности циклин-зависне киназе-2 (CDK2) и циклина А и В | Chou et al. (2010) |
| Кверцетин | Ћелије рака дојке (HCC1937 ћелије) код којих је генетски избрисан тумор суоресор ген (PTEN) | Инхибиција ћелијске пролиферације путем инхибиције протеин тирозин киназе В (Akt/PKB) која је укључена у фосфатидилинозитол (PtdIns) 3-киназом (PI3K)-посредован пут ћелијског преживљавања; кверцетин се показао једнако ефикасан као и комерцијални селективни инхибитор фосфатидилинозитол-3-киназе LY 294002 | Gulati et al. (2006) |
| Кверцетин, кемферол, кафена, хлорогенска, елагинска, гална и други флавоноидни молекули и фенолне киселине | Ћелије рака дебелог црева HT-29, ћелије рака дојке (MCF7), ћелије рака грлића материце (HeLa), здраве ћелије феталних фибробласта плућа (MRC-5) | Антипролиферативна активност према туморским ћелијама | Četojević-Simin, (2015) |
| Цијанидин-3-О-глукозид и његов метаболит протокатехинска киселина | Wistar пацови | Повећање <i>ex vivo</i> резистентности на оксидацију серума | Tsuda, Horio, and Osawa (1998); Tsuda, Horio, and Osawa (1999) |

| | | | |
|--|--|---|----------------------------|
| Цијанидин-3- <i>O</i> -глукозид | <i>db/db</i> мишеви (експериментални модел мишеви за тип 2 дијабетеса; имају мутацију гена за рецептор лептина; лептин је хормон који сигнализира ситост, а његов недостатак доводи до патолошке гојазности и низа придружених метаболичких и неуроендокриних поремећаја) | Смањење негативних ефеката изазваних хипергликемијом Регулација синтезе тј. повећање синтезе редукованог глутатиона (GSH) и смањење интраћелијских концентрација ROS; Инхибиција продукције ROS и апоптозе НерG2 ћелија (ћелије рака јетре) до којих долази због високе количине глукозе; Смањење оксидативних оштећења, инфламације и превенција развоја хепатичне стеатозе код дијабетичних мишева | Zhu et al. (2012) |
| Цијанидин-3- <i>O</i> -глукозид | КК- A^y мишеви (модел дијабетичних мишева) | Смањење концентрације глукозе у плазми; Смањење инсулинске резистенције | Sasaki et al. (2007) |
| Цијанидин-3- <i>O</i> -глукозид, цијанидин-3- <i>O</i> -галактозид, делфинидин-3- <i>O</i> -глукозид, пеларгонидин-3- <i>O</i> - галактозид, цијанидин, делфинидин, пеларгонидин, малвидин, петунидин | β -ћелије панкреаса (INS-1 832/13) | Повећање секреције инсулина | Jayaprakasam et al. (2005) |

Већином су у истраживањима биолошких активности фенолна једињења испитивана у својој нативној структури, а како је после указано на њихову метаболичку разградњу након уноса у организам, доведени су у питање њихови биолошки ефекти. Додатну „неповерљивост“ о биолошким активностима ових једињења потхрањивала је слаба апсорпција фенолних једињења у дигестивном тракту, односно **смањена биолошка доступност и расположивост** (Williamson, 2002).

Биолошка доступност (*енгл.* bioaccessibility) представља количину нутријента која се у организму ослободи из хране или уопштено неког матрикса, путем којег је унесен, односно ону количину нутријента која је организму доступна за апсорпцију.

Биолошка расположивост (*енгл.* bioavailability) представља ону количину неког нутријента која у организму бива апсорбована у гастроинтестиналном тракту, односно која доспева у системску циркулацију и касније бива излучена након метаболизма и дистрибуције у ткивима (Gonçalves et al., 2019).

Као што је раније описано, новија истраживања су показала да фенолна једињења могу да се апсорбују у интактном облику. Иако се она брзо и у великој мери метаболишу у организму, доказано је и да је велики број метаболита биолошки активан. У појединим експериментима је показано и да метаболити разградње фенолних једињења могу да буду активнији од својих прекурсора, посебно ако је задржана фенолна структура, па једињење доприноси одбрани од оксидативног стреса (Lambert et al., 2007). Такође је показано да су у инхибицији агрегације крвних плочица метаболити разградње флавоноида, 3,4-дихидрокси-фенилсирћетна киселина и 4-хидроксифенилсирћетна киселина, много активнији од својих прекурсора рутина и кверцетина (Kim et al., 1998).

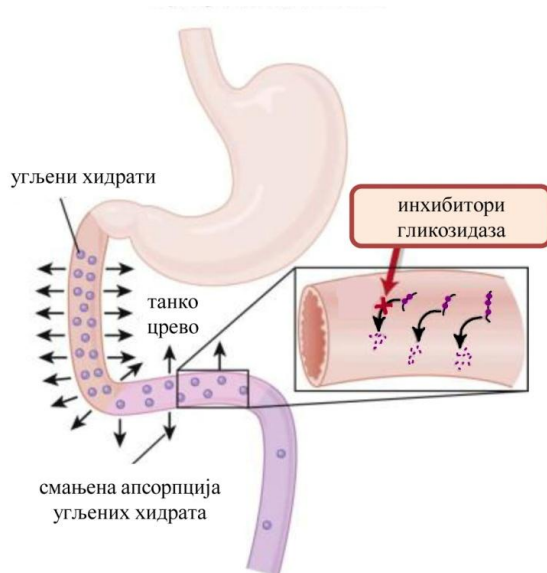
Такође неки од ефеката по здравље уопште не захтевају апсорпцију једињења. Висока локална концентрација фенолних једињења у лумену црева има директни утицај на цревну мукозу и заштиту од оксидативног стреса, као и на карциногене процесе који настају у овом делу организма (Giovannelli et al., 2000; Lodovici et al., 2000).

Проласком кроз дигестивни систем, фенолна једињења могу да инхибирају одређене ензиме и на тај начин модулирају неке метаболичке процесе. Овакав приступ се користи као стратегија у лечењу типа 2 дијабетеса, преко инхибиције ензима панкреасне α -амилазе и интестиналне α -глукозидазе (Rocha et al., 2019). Ови ензими су укључени у метаболичку разградњу угљених хидрата, а њиховом инхибицијом се смањује количина слободне глукозе доступне за апсорпцију, што даље резултује смањеном концентрацијом глукозе у крви (Lebovitz, 1998). Ово је приказано на слици 2.20.

Постоји неколико типова ензима амилазе, а осим код људи, овај ензим се налази и у биљкама, микроорганизмима и животињама. Код људи је присутна α -амилаза (EC 3.2.1.1), и то у две форме, пљувачна (саливарна) и панкреасна α -амилаза. Пљувачна α -амилаза у устима започиње разградњу скроба, коју даље наставља панкреасна α -амилаза у

дванаестопалачном цреву. α -Амилаза раскида α -1,4 везе између глукоза у амилози и амилопектину (два типа структура које чине скроб) и у гликогену. Код амилопектина и гликогена постоје и α -1,6 везе које ће у даљем процесу дигестије разградити други ензими (Андрић et al., 2006; Lowe, 2004).

α -Глукозидаза (ЕС 3.2.1.20) раскида α -1,4 везе код дисахарида малтозе ослобађајући молекуле глукозе. Такође отцепљује глукозу са нередукујућих крајева олиго и полисахарида. Налази се на четкастој мембрани танког црева, тако да се ослобођена глукоза лако даље транспортује кроз мембрану у крвоток (Томасик & Хортон, 2012).



Слика 2.20. Принцип инхибиције ензима који хидролизују угљене хидрате у танком цреву као стратегија у лечењу типа 2 дијабетеса

Поред улоге у дигестији угљених хидрата, α -глукозидаза има важну улогу у гликозилацији протеина. Гликозилација представља посттранслациону модификацију протеина, где се угљенохидратне јединице везују за протеин дајући гликопротеин. α -Глукозидаза учествује у модификацији структуре гликопротеина, тако што уклања терминалне глукозне јединице, након чега следи коначно увијање гликопротеина. Овакве модификације су кључне за испољавање функција одређених протеина.

Код појединих група вируса, који се одликују додатним омотачем, управо је гликозилација одговорна за њихову инфективност. Као унутарћелијски облигатни паразити (живе искључиво на рачун домаћина), вируси искоришћавају ћелијске механизме домаћина како би гликозиловали своје протеине. Неки вируси, попут вируса ХИВ-а (вирус хумане имунодефицијенције, *енгл.* human immunodeficiency virus), вируса инфлуенце, коронавируса, Зика, денга или ебола вируса, поред капсида имају додатни протеински омотач који подлеже интензивној гликозилацији. Гликопротеини се налазе и у структурама вируса који немају додатни омотач, попут вируса херпеса и флазивируса. Гликозилација је кључан фактор за инфективност ових вируса, јер настали гликани

омогућавају интеракције са ћелијама домаћина и напад на имуни систем (Watanabe et al., 2019). У пољу медицинске хемије се инхибиција α -глукозидазе веома студиозно проучава као стратегија за развој антивирусних агенаса (Panahi et al., 2013).

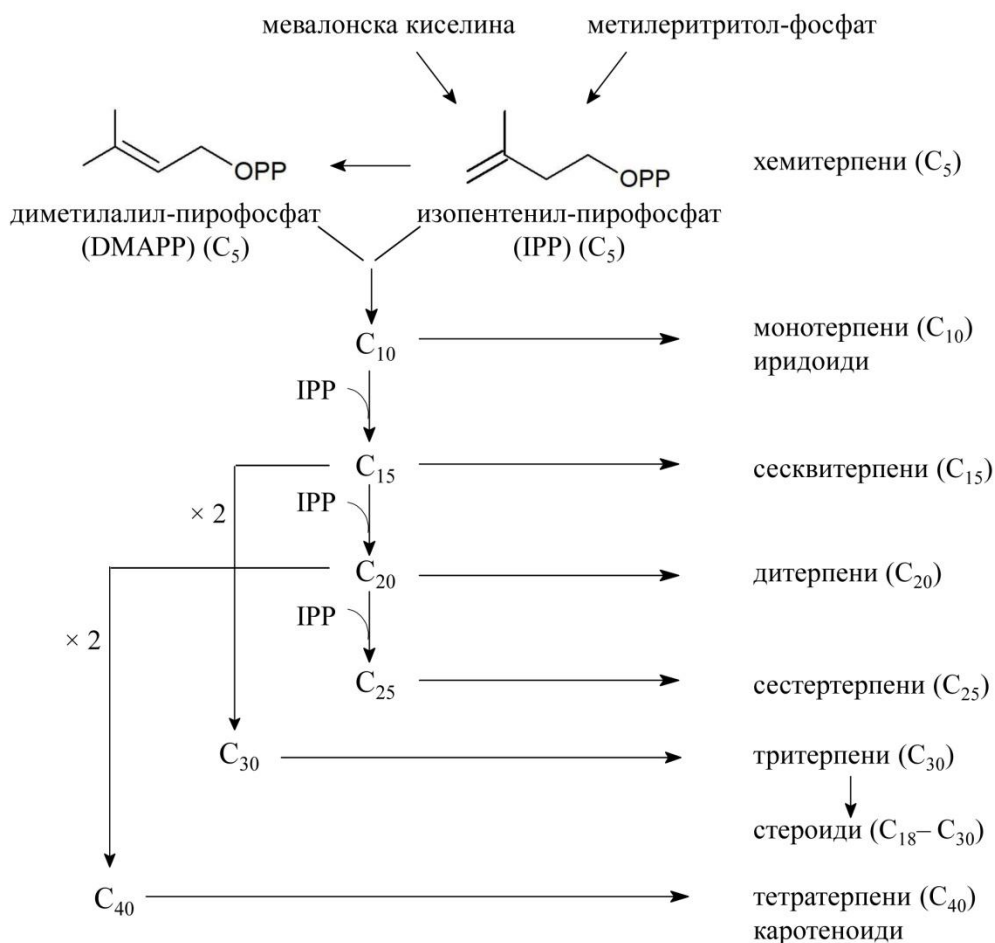
Биолошке активности фенолних једињења, иако доказане бројним експериментима, стално су довођене у питање и оповргаване јер су већином извођена *in vitro* истраживања или *in vivo* испитивања на експерименталним животињама, па је остајао нејасан стварни ефекат ових једињења у људском организму.

Истраживања која су пратила утицај фенолних једињења унетих путем исхране на адолесценте из десет европских градова су потврдила позитиван утицај различитих фенолних једињења на антиинфламаторне процесе, делујући на медијаторе инфламације (Wisnuwardani et al., 2020). Такође је потврђена веза уноса флавоноидних једињења и смањења атеросклеротичних кардиоваскуларних поремећаја и смањења броја смртних случајева изазваних раком, кардиоваскуларним или неким другим поремећајима. Најбољи ефекти су постизани приликом уноса од просечно 500–1000 mg флавоноидних једињења дневно (Dalgaard et al., 2019; Bondonno et al., 2019).

Познат је и „**француски парадокс**“. Ова фраза је настала 1980-их, када је у појединим регијама у Француској забележено да је упркос висококалоричној исхрани богатој мастима, веома мала смртност од коронарних болести узрокованих зачепљењем крвних судова. Сматрало се да је ово повезано са редовним пијењем црвеног вина које је богато флавоноидима (око 200 mg по чаши) и фенолним једињењем резвератролом (0,1–15 mg/L) и њиховог антиоксидантног деловања којим се спречава оксидација LDL молекула, која се сматра главним узрочником атеросклерозе (Renaud & de Lorgeril, 1992; Zhou et al., 2005). Иако је касније оповргнуто становиште да је то због вина, већ да је због медитеранског начина исхране која подразумева високе количине воћа и поврћа, опет не изостаје повезаност са фенолним једињењима која су присутна у овим намирницама (Simini, 2000).

Иридоидна једињења

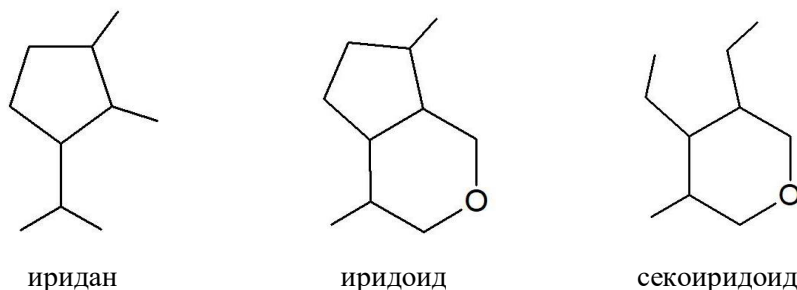
Иридоиди спадају у класу монотерпенских једињења. Терпени су секундарни биомолекули различитих структура које су изведене из C_5 изопренске јединице. Типичне структуре ових биомолекула садрже угљенични низ који се добија повезивањем изопренских јединица. Монотерпене чине две кондензоване изопренске јединице (C_{10}), а шема биосинтетског пута терпенских једињења је приказана на слици 2.21.



Слика 2.21. Шема биосинтетског пута терпенских једињења (Dewick, 2009)

Основна C_5 изопренска јединица, изопентенил-пирофосфат (IPP) настаје из мевалонске киселине или метилеритритол-фосфата. Изомеризацијом изопентенил-пирофосфата настаје друга изопренска јединица – диметилаллил-пирофосфат (DMAPP). Кондензацијом ових изопренских јединица настају сложеније терпенске структуре, које имају скелет са $(C_5)_n$ атома. Терпенска једињења се класификују као хеми-терпени (C_5), монотерпени (C_{10}), сесквитерпени (C_{15}), дистерпени (C_{20}), сестертерпени (C_{25}), три-терпени (C_{30}), тетра-терпени (C_{40}) (Dewick, 2009).

У основи структуре иридоида је монотерпен иридан (слика 2.22). Циклопентански прстен иридана је често спојен са шесточланим прстеном који садржи кисеоник, градећи основу структуре иридоида. Велики број иридоида се налази у форми гликозида, као што су то логанска киселина и њен метил-естар, логанин (слика 2.23). Цепанем монотерпенског скелета у логанину настаје секологанин, представник секоиридоидних структура. Даљим метаболичким трансформацијама настају терпеноидни индолни алкалоиди (Dewick, 2009).

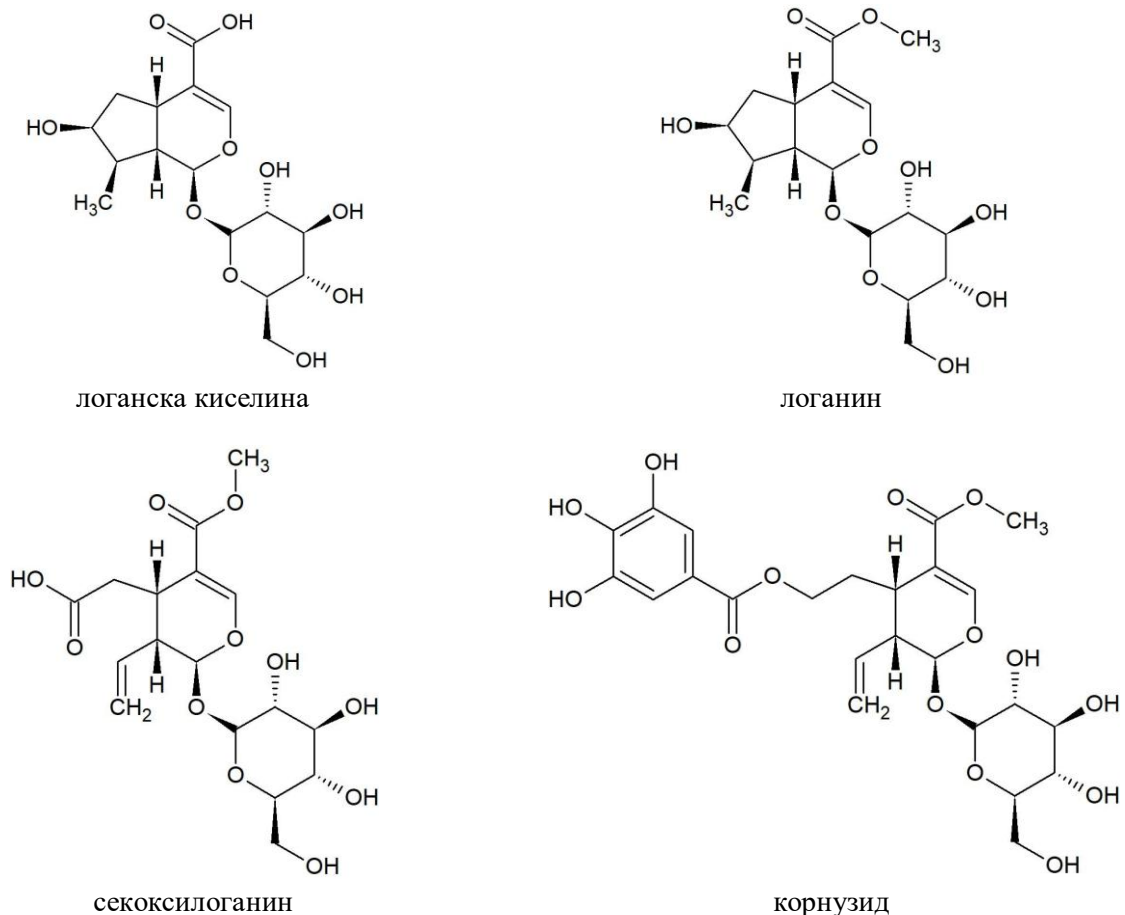


Слика 2.22. Иридански скелет и основе иридоидних и секоиридоидних једињења

Иридоидне и секоиридоидне структуре се најчешће јављају у виду гликозида, али могу да награде и естарске везе са фенолним једињењима. Најчешће се везују са фенолним киселинама, простим или хидроксициметним киселинама (El-Nagger & Beal, 1980; Dinda et al., 2007). Логанска киселина и логанин су иридоидни глукозиди, док је нпр. корнузид секоиридоидни глукозид који је естерификован са галном киселином (слика 2.23).

Иридоидна једињења се срећу код терестријалне и морске флоре и фауне (Dinda et al., 2007). Назив иридоиди је генерисан из назива једињења иридомирмецин, иридолактон и иридоидал, који су изоловани из појединих врста мравља из рода *Iridomyrmex*, код којих се излучују као одбрамбене супстанце (El-Nagger & Beal, 1980).

Логанска киселина и логанин су први пут изоловани и најчешће се налазе у семенкама стрихноса (*Strychnos nux-vomica* L.), који припада породици Loganiaceae, по чему су ова једињења и добила имена (Patil & Laddha, 2017). Иридоиди се ретко налазе у плодовима воћа. Осим у врстама рода *Cornus* (Kucharska et al., 2015; Yamabe et al., 2010) присутни су у плодовима рибизле (Kucharska et al., 2017), бруснице (Turner et al., 2007) и боровнице (Juađjur & Winterhalter, 2012), као и у тропском воћу нони (Nerurkar et al., 2015). Највише су проучавани иридоидни гликозиди пронађени у плодовима јапанског дрена (*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.). То је и највише проучавана врста рода *Cornus* (Huang et al., 2018).



Слика 2.23. Хемијске структуре неких од најзаступљенијих иридоидних структура у биљкама рода *Cornus*

Иридоиди су присутни у великом броју биљака које се користе у народној медицини као горки тоници, седативи, антипиретици, средства за зарастање рана, средства за лечење кашља, кожных обољења и снижавање крвног притиска (Dinda et al., 2007). Оваква употреба је била подстрек за проучавање биолошких активности иридоида. Разне студије су показале широк спектар биолошких дејстава ових фитохемикалија: кардиоваскуларно, антихепатотоксично, холеретично, хипогликемијско, хиполипидемијско, антиинфламаторно, антиспазмодично, антитуморско, антивирално, имуномодулаторно и друга дејства (Ghisalberti, 1998). Нека од биолошких дејстава иридоида, поготово структура које се срећу у роду *Cornus*, су сумирана у табели 2.2.

Табела 2.2. Биолошке активности иридоидних једињења или екстракта воћа богатих њима

| Једињење | Модел систем | Активност и механизам дејства | Референца |
|---|---|--|------------------------|
| Логанска киселина | <i>In vitro</i> тестови | Антиоксидантна активност – „хватање“ DPPH, O ₂ ⁻ , OH [•] радикала; | Abirami et al. (2019) |
| | Мононуклеарне ћелије периферне крви (енгл. human peripheral blood mononuclear cells, PBMC) | Смањење токсичности тешких метала у ћелијама | |
| Логанин (40 mg/kg, p.o.) | Мишеви којима су когнитивне способности нарушене убризгавањем скополамина | Побољшање когнитивних способности, односно способности учења и памћења нарушених скополамином Инхибиција ацетилхолинестеразе у хипокампусу и фронталном кортексу | Kwon et al. (2009) |
| Логанин (20 or 100 mg/kg b.w.; p.o., 8 недеља) изолован из јапанског дрена (<i>Cornus officinalis</i> Sieb. et Zucc) | Мишеви са изазваним типом 2 дијабетеса (type 2 diabetic db/db mice) | Смањење хипергликемије и дислипидемије изазваних дијабетесом Супресија експресије mRNA која учествује у синтези липида; смањење абнормалне експресије PPAR α ¹ и везивних протеина регулисаних стеролом у једру ћелија јетре | Yamabe et al. (2010) |
| Лиофилизирано воће дрена (<i>Cornus mas</i> L.; 100 mg/kg b.w.; p.o.), богато иридоидима и антоцијанима | Хиперхолестеролемични зечеви (60 узастопних дана храњени холестеролом који је чинио 1% исхране) | Протективни ефекат на хипертриглицеридемију и атеросклерозу Смањење триглицерида у серуму за 44% је смањило настанак атероматичних промена у торакалној аорти. Повећање експресије PPAR α протеина у јетри. Протективни ефекат на оксидативни стрес у јетри индукован исхраном | Sozański et al. (2014) |

¹ PPAR – рецептор за активирани пролифератор пероксизома (енг. peroxisome proliferator-activated receptor)

| | | | |
|--|---|--|------------------------|
| Логанска киселина (20 mg/kg b.w.) и смеша антоцијана (10mg/kg b.w.) изолованих из дрена (<i>Cornus mas</i> L.) | Хиперхолестеролемични зечеви (60 узастопних дана храњени холестеролом који је чинио 1% исхране) | <p>Позитивни утицај на дислипидемију узроковану холестеролом додатим у исхрану</p> <p>Антиинфламаторна активност Антоцијани смањују укупни и LDL холестерол и триглицериде и повећавају HDL холестерол. Логанска киселина испољава сличне ефекте, али мањег интензитета.</p> <p>Антоцијани и у мањој мери логанска киселина, значајно смањују дебљину интима и однос интима и медије торакалне (грудне) артерије, што спречава атеросклерозу. (Интима и медија су унутрашњи и средишњи слој артеријског зида.)</p> <p>И иридоиди и антоцијани смањују концентрацију оксидованог LDL холестерола у плазми;</p> <p>Повећавају експресију PPARγ и α протеина у јетри.</p> <p>Логанска киселина смањује активност фактора инфламације (TNF-a and IL-6)</p> | Sozański et al. (2016) |
| Логанска киселина (20 mg/kg b.w.) и смеша антоцијана (10 mg/kg b.w.) изолованих из дрена (<i>Cornus mas</i> L.) | Хиперхолестеролемични зечеви (60 узастопних дана храњени холестеролом који је чинио 1% исхране) | <p>Модулација атеросклерозе и редокс-стања</p> <p>Смањење атеросклеротичног плака у аорти. Смањење липидне пероксидације (мерено као смањење MDA¹) и оксидативног стреса (мерено као повећање концентрације GSH²).</p> | Sozański et al. (2018) |

¹ MDA – малонилдиалдехид – један од продуката липидне пероксидације

² GSH – редуковани глутатион

2.3. Функционална храна и нутрацеутици

Још пре више од две хиљаде године, Хипократ (460–377. године п.н.е.), отац модерне медицине, је рекао: „Храна треба да буде лек и лек треба да буде храна.“ То је принцип којим се руководи и данашњи свет. Поред проблема глади са којим се сусреће данашње друштво и поред великих напора који се улажу да се повећа количина произведене хране, све се већа пажња придаје и њеном квалитету, односно функционалности (Bagchi, 2014).

Концепт функционалне хране се првобитно појавио у Јапану почетком 1980-их. Овај концепт је касније добио назив FOSHU – Храна за специфичну здравствену употребу (*енгл.* Foods for Specified Health Use). Јапан је, до данас, једина држава у којој је концепт функционалне хране законски регулисан од стране јапанског министарства здравља (Das & Sen, 2014).

У Европи је 1999. године успостављен консензус познат као Научни концепт функционалне хране У Европи (*енгл.* Scientific Concepts of Functional Foods in Europe – FUFUSE). Овим консензусом је дата радна дефиниција функционалне хране, а посебан акценат је стављен на научну процену резултата о позитивним ефектима одређених нутријената и компонената хране на поједине функције у организму (Мишан et al., 2013).

Амерички Центар за функционалну храну (*енгл.* The Functional Food Center, FFC) даје следећу дефиницију функционалне хране: „природна или обрађена храна која садржи биолошки активна једињења, која у тачно дефинисаним, ефективним, нетоксичним количинама испољавају клинички доказан и документован здравствени бенефит, у погледу превенције, контроле или лечења хроничне болести или њених симптома“ (<https://www.functionalfoodscenter.net/>).

Функционална храна може да буде:

- природно нутритивно вредна храна,
- прехранбени производи фортификовани¹ функционалним састојцима,
- храна којој је додата компонента са позитивним ефектом на здравље, или је уклоњена компонента која има негативан утицај (нпр. алерген),
- храна код које је једно или више једињења измењено,
- храна у којој је биорасположивост једне или више компонената модификована и
- све комбинације наведених могућности (Мишан et al., 2013).

Функционална храна је, најједноставније говорећи, она храна која осим основне нутритивне улоге има позитиван утицај на очување и побољшање здравља и смањење ризика од хроничних обољења. Функционална храна увек мора да буде у облику хране, а

¹ Према *Codex Alimentarius* (међународно прихваћени стандарди, смернице и водичи у вези са храном), фортификација или обогаћивање хране подразумевају додаток једног или више есенцијалних нутријената храни (било да јесу или нису нормално присутни у њој)

позитиван ефекат на здравље мора да испољи конзумирањем уобичајене количине хране (Мишан et al., 2013).

У Сједињеним Америчким Државама функционални производи нису дефинисани законским одредбама. Америчка Администрација за храну и лекове (*енгл.* The U.S. Food and Drug Administration, FDA) регулише додатке исхрани посебним регулативама, које су одвојене од регулатива за конвенционалну храну и регулатива за лекове (www.fda.gov).

Зконске регулативе Републике Србије као посебне категорије препознају само дијететске производе и додатке исхрани (дијететске суплементе) као подгрупу у оквиру дијететских производа. У Правилнику о здравственој исправности дијететских производа (Сл. гласник РС, бр. 45/2010, 27/2011, 50/2012, 21/2015, 75/2015, 7/2017, 103/2018) су дате следеће дефиниције:

- „**дијететски производи** су намирнице које се због посебног састава или посебног начина производње јасно разликују од намирница уобичајеног састава и које су погодне за посебно наведену нутритивну намену за коју се стављају у промет“;
- „**додаци исхрани (дијететски суплементи)** су намирнице које допуњују нормалну исхрану и представљају концентроване изворе витамина, минерала или других супстанци са хранљивим или физиолошким ефектом, појединачно или у комбинацији, а у промету су у дозираним облицима дизајниране да се узимају у одмереним појединачним количинама (капсуле, таблете, кесице прашка, ампуле течности, бочице за дозирање у капима и друго)“.

У истом Правилнику је дефинисано и следеће: „Дијететски производи спадају у категорију хране и никако се не могу сматрати леком. (Чл 22а)“

Доктор Stephen DeFelice, оснивач Фондације за иновације у медицини, (*енгл.* the Foundation for Innovation in Medicine), је 1989. године сковао термин „нутрацеутик“. **Нутрацеутик** је превод енглеске речи добијене комбинацијом речи *nutrition* – исхрана и *pharmaceutical* – фармацеутски, а термин се односи на супстанцу која се сматра као храна или део хране, а која обезбеђује медицинску или здравствену добробит, обухватајући превенцију и лечење болести. То су додаци исхрани који се састоје из биолошки активних једињења изолованих из хране или који ће настати у метаболичким процесима након уноса у организам, биљних продуката или њихових конституената, чија је намена да испоље физиолошки или медицински ефекат након ингестије. Ту се убрајају и витамини и минерали који се у организам уносе у формама другачијим од конвенционалне хране или пића (Das & Sen, 2014; Almada, 2014).

С обзиром да не постоји јасна дефиниција и граница међу појмовима функционална храна, нутрацеутик, дијететски суплемент и слично, веома често се ови појмови користе као синоними. Међутим, функционална храна је прехранбени производ, док су нутрацеутици концентрати једињења добијени из прехранбених производа, који се често продају као таблете, капсуле, тинктуре и слично. У поређењу са дијететским суплементом,

нутрацеутик треба, не само да допуњује исхрану, него такође и да спречава и/или лечи одређене болести/поремећаје (Dudeja & Gupta, 2016).

Неки од појмова који се често срећу у области функционалне хране и њихова објашњења су сумирани у табели 2.3.

Табела 2.3. Различити термини који се срећу у области функционалне хране

Биоактивно једињење

Једињење које је присутно или изоловано из биљке, гљиве, животиње или морских плодова и које испољава жељену здравствену добробит.

Дијететски суплемент

Додаци исхрани који садрже активне састојке и могу да се додају у храну или да се конзумирају одвојено, у виду пилула, прашкова, или течности; не могу да буду замена за храну или оброк

Медицинска храна

Према FDA се дефинише као храна односно исхрана која је намењена особама са одређеним здравственим стањима/поремећајима, узима се под надзором лекара

Нутрацеутик

Било која супстанца која је изолована из хране или дела хране, а која обезбеђује медицинску или здравствену добробит, укључујући превенцију и лечење болести; користи се у форми пилула, капсула, напитака или течности

GRAS, generally recognized as safe

Препознато као безбедно – према FDA се ова одредница односи на супстанце додате у храну, а које квалификовани стручњаци сматрају као здравствено безбедне (може да се односи и на раствараче који се примењују приликом изоловања активних компоненти)

API, active pharmaceutical ingredients

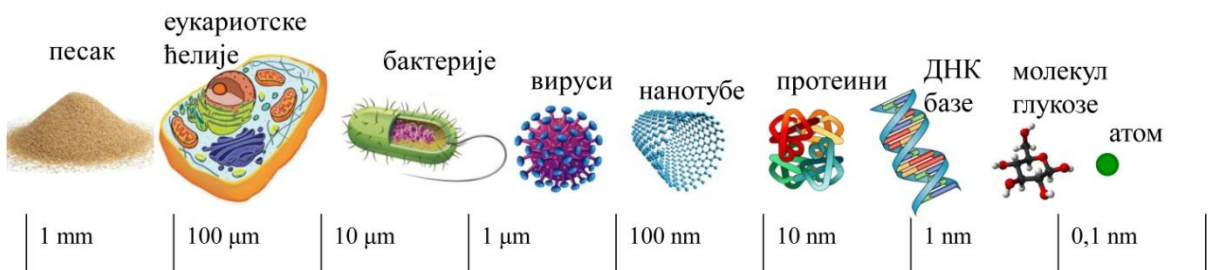
Активни фармацеутски састојак – састојак у фармацеутском леку (препарату) који је биолошки активан, односно који узрокује жељени ефекат

2.4. Инкапсулација

Инкапсулација представља технику којом се активне компоненте везују на одговарајући носач, при чему настају честице микро- или нано-димензија. Инкапсулација представља ефективан начин за контролисану доставу и отпуштање различитих супстанци. Инкапсулацијом се једињења штите од физичких и хемијских фактора који могу да доведу до њихове разградње, а омогућава се и да након уноса у организам, једињења остану заштићена дуж гастроинтестиналног тракта и да, услед споријег отпуштања из инкапсулата, дужи временски период испољавају своје дејство (Lakkis, 2016).

Многа биолошки активна једињења, укључујући и фенолна једињења, су нестабилна након изолације из својих природних извора. Често је неопходно да се заштите од утицаја средине, али и од нежељених интеракција са другим компонентама. Неретко имају горак и опор укус или непријатан мирис, који је потребно замаскирати, како би били прихватљивији за конзумирање. Додатно, да би активна једињења испољила своје одређене функције у организму човека, морају бити присутна у одређеним концентрацијама. Веома често се дешава да иако се у организам унесе велика количина биоактивне супстанце, она због недовољне апсорпције у организму или услед разградње дуж гастроинтестиналног тракта, не достигне потребну ефективну концентрацију (Shishir et al., 2018).

Један од начина да се ови проблеми превазиђу јесте инкапсулација једињења, било да је реч о микро- или нано-инкапсулацијама, у зависности у којем рангу величина су крајње произведене честице. У процесу инкапсулације, микрочестицама се сматрају оне чија је величина од 1 μm до 1 mm , наночестицама оне у опсегу од 1 nm до неколико стотина nm , док субмикронске честице имају димензије од неколико стотина нанометара до 1 μm (Мишан et al., 2013, Shishir et al., 2018). На слици 2.24 је приказана димензиона скала са различитим честицама, у опсегу од нанометарских до милиметарских димензија.



Слика 2.24. Димензиона скала различитих честица

Обе инкапсулационе технологије су веома ефикасне и побољшавају функционалност производа. У последње време је све веће интересовање за нано-инкапсулацију и развој нано-система за доставу биоактивних једињења због њихове веће инкапсулационе ефикасности, већег капацитета пуњења честица, веће специфичне површине честица, веће

биорасположивости, стабилности честица, бољег уноса од стране ћелија. Међутим, велики проблем представља висока цена и комплексност процеса нано-инкапсулације (Shishir et al., 2018).

Инкапсулат представља честицу која садржи језгро, односно активну супстанцу (*енгл. core*) која је обавијена или урођена у носач (инкапсулациони материјал, омотач; *енгл. coat, shell* или *wall material*). Структуре ових честица могу да буду веома различите, па се у зависности од начина локализације инкапсулиране супстанце у инкапсулациони материјал разликују честице типа резервоара, честице типа матрикса и честице типа матрикса обавијене мембраном (слика 2.25). Честице типа резервоара представљају микро/нанокапсуле код којих је активни садржај обавијен полимерним материјалом који га у потпуности затвара. Честице типа матрикса се називају и микро/наносфере, а код њих је активни садржај хомогено распоређен у носачу. Обавијене честице типа матрикса представљају комбиноване честице, односно сферне честице које су додатно обавијене мембраном (Мишан et al., 2013; McClements, 2012).



Слика 2.25. Шематски приказ типова структура инкапсулата (прилагођено према Мишан et al., 2013; Shishir et al., 2018)

Постоје многобројни методи за добијање инкапсулата, у зависности пре свега од супстанца која треба да се инкапсулира и примене самог инкапсулата, затим одабира носача, као и саме технике за производњу инкапсулата.

Инкапсулирају се различите материје, укуси, ароме, етарска уља, витамини, минерали, антимикробне супстанце, антиоксиданти, пробиотици, боје, заслађивачи, ензими, масне киселине и друго (Lakkis, 2016). Као носачи, веома често се користе биополимери, пре свих угљени хидрати и протеини, због приступачне цене, али и због биолошке прихватљивости односно нетоксичности ових једињења. Највише се користе скроб, различити декстрини, целулоза, пектини, хитозан, алгинат, гуме, протеини сурутке, соје, житарица, казеини, желатини и њихове модификације. Употребљавају се различите липидне структуре, као и други полимери (Shishir et al., 2018), али се срећу и носачи, на бази неорганских материјала, као нпр. халојзит, друге глине, нанотубе угљеника (Lvov et al., 2014; Chowdhury, 2019). Технике које се данас највише примењују за производњу инкапсулата јесу сушење распршивањем (*енгл. spray drying*), сушење смрзавањем (лиофилизација, *енгл. freeze drying, lyophilisation*), коацервација (*енгл. coacervation*), емулзификација (*енгл. emulsification*), екструзија (*енгл. extrusion*), слој по слој слагање (*енгл. layer by layer deposition - LbL*) и друге (Shishir et al., 2018).

2.4.1. Инкапсулација у халојзит

Халојзит је природна, неорганска, алуминосиликатна глина, која је позната више од 100 година, али је њена примена интензивирана тек почетком 21. века. Све до 2005. године халојзит је употребљаван у производњи керамике, а од тада експоненцијално расте број истраживања ове наноглине ради примене, пре свега, у медицинске сврхе (Churchman et al., 2016). Халојзит је нашао примену као носач за контролисану доставу лекова и природних секундарних биомолекула, протеина, ДНК, антимикробних и антикорозивних агенаса, за изоловање ћелија, зацељивање рана, као носач код регенеративних метода лечења, као адсорбент за загађиваче животне средине, у аналитичкој хемији и катализи и многим другим областима (Lvov & Abdullayev, 2013; Satish et al., 2019; Yuan et al., 2015; Sadjadi, 2020). Овако шаролику могућност примене халојзиту даје његова специфична структура.

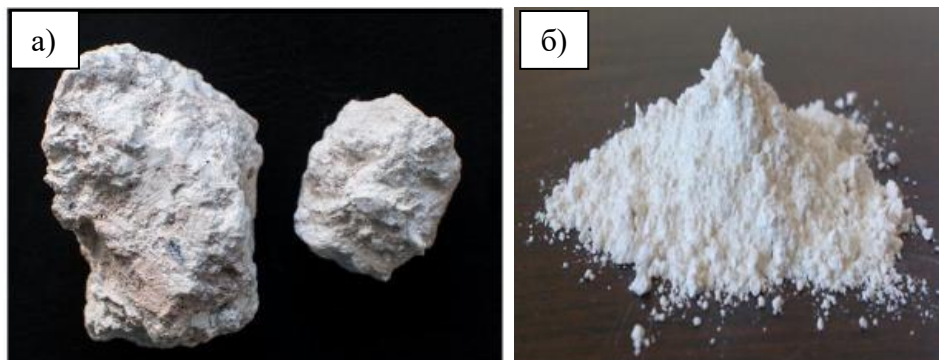
Халојзит има облик малих цеви, које се називају нанотубе и настају увијањем листова глине каолинит. Емпиријска формула халојзита је $Al_2SiO_5(OH)_4 \times nH_2O$, што по хемијском саставу представља структуру сличну каолиниту, са додатним молекулима воде који се налазе између увијених слојева (Lvov & Abdullayev, 2013). Спољашњи површински слој је формиран од SiO_2 (Si–O–Si) и има негативан потенцијал (–30 mV), док је на унутрашњој страни слој од Al_2O_3 (Al–OH) и унутрашња површина има позитиван потенцијал (+25 mV; слика 2.26). Ова разлика у наелектрисањима, као и различита природа интеракција које се успостављају приликом везивања једињења за унутрашњу и спољашњу површину, пружају бројне могућности везивања различитих типова једињења (Lvov et al., 2016).



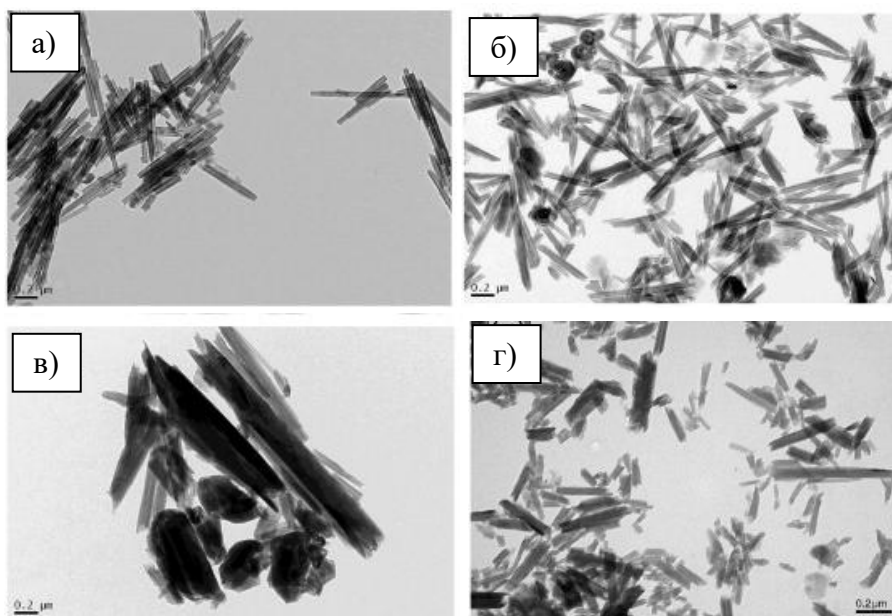
Слика 2.26. Структура нанотуба халојзита (de Oliveira & Beatrice, 2018)

Нанотубе халојзита са различитих налазишта се разликују у погледу својих димензија. Дужина туба варира у опсегу 50–5000 nm, спољашњи пречник туба се креће у распону 20–200 nm, а пречник унутрашње шупљине 10–70 nm (Pasbakhsh et al., 2013). Комерцијално доступне форме халојзита су најчешће дужине око 1 μ m и пречника око 50 nm. На слици 2.27 је приказан изглед халојзита у сировом и уситњеном облику, а на слици 2.28 су

приказане форме нанотубе халојзита из различитих рудника и копова у Аустралији, Новом Зеланду и у Америци, снимљене трансмисионом електронском микроскопијом (ТЕМ).



Слика 2.27. Халојзит у сировом стању (а) и прашкастој форми (б) (Liu et al., 2014; Lvov & Abdullayev, 2013)



Слика 2.28. TEM слике нанотуба халојзита са различитих налазишта: (а) јужна Аустралија; (б) западна Аустралија; (в) регија Нортланд, Нови Зеланд; (г) држава Југа, САД (Pasbakhsh et al., 2013)

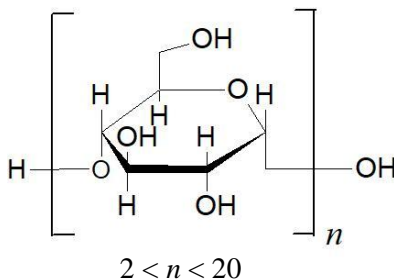
Просечно време отпуштања хидросолубилних агенаса из нанотуба халојзита је 5–10 сати, а модификацијама површине халојзита, оно се може драстично продужити. Активни агенси на овај начин бивају дуго задржани у носачу, постепено се отпуштају и дужи период испољавају своје дејство (Lvov et al., 2008). Оно што је најважније за медицинска испитивања, то је да су ове нанотубе *in vitro* и *in vivo* нетоксичне и потпуно биокompatibilне (Vergaro et al., 2010; Lai, et al., 2013). Захваљујући малим димензијама нанотубе халојзита лако улазе у ћелије, па су погодне за доставу жељених једињења (Vergaro et al., 2010; Yang et al., 2016).

Многа биоактивна једињења и лекови су успешно инкапсулирани са халојзитом: куркумин (Riela et al., 2014), резвератрол (Vergaro et al., 2014), диклофенак (Krejčová et al., 2013), паклитаксел (Yendluri et al., 2017), доксорубицин (Yang et al., 2016), инсулин (Massaro et al., 2018) и други. Наиме, различито наелектрисане спољашња и унутрашња површина омогућавају селективну адсорпцију наелектрисаних молекула и везивање помоћу електростатичких и ван дер Валсових (*нем.* van der Waals) привлачних сила, док тубуларан облик омогућава смештање активних молекула у саму унутрашњост, што халојзит чини веома погодним нано-носачем (Lisuzzo et al., 2019a). За потребе инкапсулације биоактивних, али и других агенаса, све више се испитују и примењују модификације нанотуба халојзита. Примењују се различити поступци ковалентне и нековалентне модификације, као и слој по слој техника (LbL). Негативно наелектрисана спољашња површина омогућава обмотавање наизменично позитивно и негативно наелектрисаним полиелектролитима. Веома ефикасним су се показали различити полимери, попут полиетиленамина, полилизина, као и биополимери, најчешће протеини и полисахариди. Нанотубе халојзита обложене овим полимерима обезбеђују већу контролу над отпуштањем инкапсулиране супстанце (тзв. *controlled release*), у смислу дужег времена отпуштања, али и тзв. *triggered release*, односно управљање моментом и местом отпуштања активних агенаса (Lvov & Abdullayev, 2013; Lvov et al., 2016).

2.4.2. Инкапсулација у малтодекстрин

За микроинкапсулацију, поготово у прехранбене сврхе, се као носачи највише користе угљенихидрати (скроб, малтодекстрини, гликозни сирупи, пектини, гума арабик), липиди (воскови, стеаринска киселина, моно- и диглицериди) и протеини (сурутке, пшенице, соје, казеини, желатини). Различити носачи поседују различите физичкохемијске особине, те и дају инкапсулате различитих структура и карактеристика (Desai & Park, 2005).

Малтодекстрин је олигосахарид који се добија хидролизом скроба. Постоје различите форме малтодекстрина које се, у зависности од степена хидролизе скроба, разликују према броју глукозних јединица везаних у једном олиго ланцу, односно према степену полимеризације. Ова особина се изражава преко количине редукујућих шећера у производу. Тај параметар се зове декстрозни (глукозни) еквивалент, тј. DE јединица (*енгл. dextrose equivalent*)¹. Узима се да чиста глукоза има DE 100, а скроб DE ~0, док малтодекстрини имају DE < 20 (Shishir et al., 2018). Структура малтодекстрина је приказана на слици 2.29.



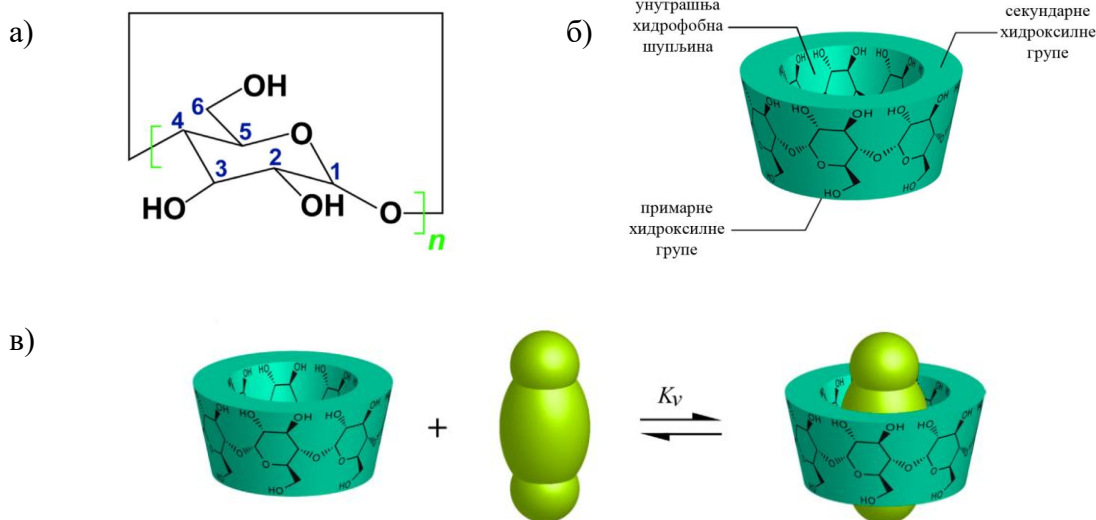
Слика 2.29. Структура малтодекстрина

Малтодекстрини се као инкапсулациони материјали широко примењују и у прехранбеној и у фармацеутској индустрији. Добра растворљивост малтодекстрина у води и мала вискозност ових раствора, значајно смањују лепљивост честица и отежавају настајање њихових англомерата. Мултифункционалност малтодекстрина се огледа и у доброј способности бубрења и обмотавања инкапсулационих агенаса, као и могућности инкапсулирања како хидрофилних, тако и липофилних молекула (Alvani & Tester, 2011; Shishir et al., 2018). Малтодекстрин се примењује за заштиту једињења од физичких и хемијских утицаја, попут термичке деградације или оксидације током сушења и складиштења. Употребљава се за инкапсулацију нутријената, боја, укуса, антиоксиданата, биоактивних једињења (Madene et al., 2006; Gandia-Herrero, et al., 2010; Sanchez et al., 2013). Као веома ефикасни инкапсулациони носачи су се показале различите комбинације малтодекстрина са протеинима, пектинима и гумама, јер поспешују емулзификационе способности инкапсулата, смањују пропустљивост кисеоника, веома добро штите једињења од разградње дуж гастроинтестиналног тракта (Tolun et al., 2016; Mahdavi et al., 2016; Premi & Sharma, 2017; Souza et al., 2017).

¹ DE вредност означава садржај редукујућих шећера, као проценат D-глукозе, рачунат на суву материју (Службени гласник, Правилник о квалитету скроба и производа од скроба за прехранбене сврхе)

2.4.3. Инкапсулација у циклодекстрин

Циклодекстрини су циклични олигосахариди који се добијају ензимском модификацијом скроба. Постоје три типа циклодекстрина, са 6, 7 и 8 глукоза повезаних $\alpha(1-4)$ гликозидним везама, односно α -, β - и γ -циклодекстрин (слика 2.30a). Најзаступљенији је β -циклодекстрин (Shishir et al., 2018). Циклодекстрин изгледа као шупља купа којој је одрезан врх. Са спољашње површине циклодекстрина су хидроксилне ($-OH$) групе, које доприносе доброј растворљивости у води. На ужем крају циклодекстрина налазе се примарне $-OH$ групе (везане за шести угљеник из глукозе), а на ширем крају су секундарне $-OH$ групе (везане за други и трећи угљеник из глукозе; слика 2.30б). Унутрашња површина β -циклодекстрина је хидрофобна. Ова шупљина је нано реда величине, односно у циклодекстрин се најчешће уграђује по један молекул (нпр. полифенол), градећи молекулски инклузиони комплекс (слика 2.30в). На овај начин може да се повећа растворљивост неполарних молекула (Kfoury et al., 2016).



Слика 2.30. Шематски приказ опште структуре циклодекстрина (а), 3D структуре β -циклодекстрина (б) и грађење инклузионог комплекса једињења са β -циклодекстрином (в) (преузето и модификовано према Kfoury et al., 2016)

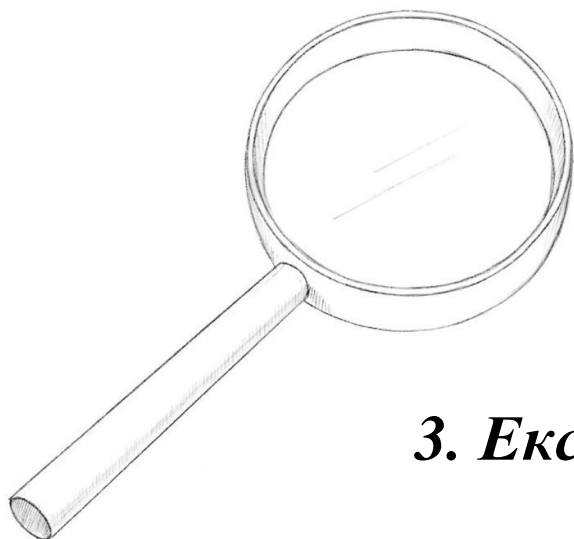
Грађење комплекса између β -циклодекстрина и „гостујућег молекула“, осим у односу 1:1, може да буде и у другим стехиометријским односима. Могуће је да се два молекула инкапсулирају у шупљину, затим да два циклодекстринска молекула инкапсулирају један молекул или да два циклодекстринска молекула инкапсулирају два једињења (Landy et al., 2007). Ова везивања су реверзibilна и успоставља се равнотежа (K_v – константа везивања; Hedges et al., 1995).

Грађење инклузионих комплекса је вођено енталпијско-ентропијским компензационим ефектом (Bender & Komiyama, 1978; Liu & Guo, 2002). Шупљина циклодекстрина је испуњена молекулима воде, који се ослобађају након везивања

једињења. Приликом стварања инклузионог комплекса се успостављају водоничне везе и ван дер Валсове силе између циклодекстрина и везаног једињења.

Циклодекстрини су први пут произведени и коришћени Јапану, где је првобитно и одобрена њихова употреба у прехранбене сврхе 1976. године. Врло брзо се употреба циклодекстрина проширила на земље Европе и остале делове света (Mosinger et al., 2001). Данас се α -, β - и γ -циклодекстрин у прехранбеној индустрији користе као адитиви под бројевима E457, E459 и E458 (JECFA, 2013; Commission Directive 2003/95/EC, 2003). Такође, α -, β - и γ -циклодекстрин се налазе на GRAS (*енгл.* generally recognized as safe) листи америчке Организације за храну и лекове (FDA). Дозвољена употреба у прехранбене сврхе, релативно ниска цена и биокompatibilност чине ове носаче веома погодним у индустријама у области хране, фармације, медицине, козметике, заштите животне средине и другим.

Циклодекстрини се у инкапсулацији примењују да побољшају растворљивост липофилних молекула, да заштите једињења од физичких и хемијских агенаса који би могли да им наруше структуру (кисеоник, UV зрачење, температура, pH), да заштите испарљиве компоненте, да очувају или замаскирају укусе и мирисе, за контролисано отпуштање молекула (Pinho et al., 2014). Показали се као веома ефикасни носачи за инкапсулацију терпенодних и фенолних структура (Răileanu et al. 2013; Rocks et al. 2012; Zhao et al., 2010; Stražičar et al., 2008; Shuang et al., 1997; Dias et al., 2012). Велика предност циклодекстрина над другим полимерним носачима се огледа у томе што се метаболишу тек под утицајем цревне микрофлоре (Harangi et al., 2012). Тачније, γ -циклодекстрин се једини разлаже у горњим деловима гастроинтестиналног тракта, под дејством α -амилазе, али на α - и β - циклодекстрин овај ензим не делује, тако да ови носачи значајно могу да поспеше биорасположивост и биоактивност инкапсулираних једињења (Kurkov & Loftsson, 2013).



3. Експериментални део

Експериментални део ове докторске дисертације је урађен на Пољопривредном Факултету Универзитета у Новом Саду, у Лабораторији за хемију и биохемију.

Детерминацију биљног материјала су извршили др Сандра Бијелић, ванредни професор на Департману за воћарство, виноградарство, хортикултуру и пејзажну архитектуру Пољопривредног Факултета Универзитета у Новом Саду и др Горан Бараћ, научни сарадник на истом Департману.

HPLC-MS/MS анализа екстраката воћа рода *Prunus* је урађена на *Department of Fruit, Vegetable and Plant Nutraceutical Technology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Wrocław University of Environmental and Life Sciences* (Вроцлав, Пољска), под руководством Dr inż. Alicja Kucharska D.Sc.

Испитивање антипролиферативне активности екстраката воћа родова *Prunus* и *Cornus* према ћелијама хуманог карцинома дебелог црева (HT-29) је урађено на институтима у граду Оеирас у Португалији, *Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa (ITQB NOVA)* и *Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (iBET)*, под руководством Dr. Ana Teresa Serra.

Анализе молекулског докинга су изведене под руководством др Дејана Агића, професора на Факултету агробиотехничких знаности у Осијеку у Хрватској (*Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek*).

Припрема инкапсулата са халојзитом, одређивање колоидне стабилности ових инкапсулата и термогравиметријска карактеризација свих инкапсулата су урађени на Департману за физичку хемију Универзитета у Палерму у Италији (*Dipartimento di Fisica e Chimica, Università degli Studi di Palermo*). Експерименталним анализама су руководили Prof. Dr. Giuseppe Lazzara и Dr. Filippo Parisi.

Снимање површинске морфологије инкапсулата скенирајућом електронском микроскопијом (SEM) је извршено на Департману за биологију и екологију, Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду, под руководством проф. др Милоша Бокорова.

Испитивање антипролиферативне активности инкапсулата је изведено у Лабораторији за ћелијске културе Института за онкологију Војводине, у Сремској Каменици, под руководством научног саветника др Драгане Четојевић-Симин.

3.1. Биљни материјал

Плодови воћа су сакупљани у периоду њихове пуне зрелости. Сви узорци су сакупљени на подручју Војводине. У табелама 3.1, 3.2 и 3.3 је приказан списак узорака, место и време сакупљања. Воће различитих врста рода *Prunus* је убрано током лета и јесени 2016. године. Плодови различитих генотипова трњине су сакупљени код Бешке и Банстола током новембра 2016. године. Иако трњина сазрева у летњем периоду, плодови се убирају након првих мразева, јер тек тада губе опорост и постају јестиви. Плодови дрена су сакупљени 2017. године, на Римским Шанчевима, из колекционог засада Департмана за воћарство, виноградарство, хортикултуру и пејзажну архитектуру Пољопривредног Факултета Универзитета у Новом Саду.

Табела 3.1. Подаци о узорцима испитиваних врста рода *Prunus*

| # | Српски (народни) назив | Латински назив | Сорта/селекција/генотип | Локалитет | Датум сакупљања плодова |
|-----|------------------------|--|---------------------------|----------------|-------------------------|
| 1. | шљива | <i>Prunus domestica</i> L. | сорта чачанска родна | Римски Шанчеви | август 2016. |
| 2. | влашкача | <i>Prunus domestica</i> L. ssp. <i>domestica</i> | - | Итебеј | август 2016. |
| 3. | тургуња | <i>Prunus domestica</i> L. ssp. <i>insititia</i> | - | Итебеј | август 2016. |
| 4. | белошљива | <i>Prunus domestica</i> L. ssp. <i>insititia</i> | - | Итебеј | август 2016. |
| 5. | црвенолисни ринглов | <i>Prunus pissardi</i> Carrière | - | Нови Сад | јул 2016. |
| 6. | црвени ринглов | <i>Prunus cerasifera</i> L. | - | Римски Шанчеви | јул 2016. |
| 7. | бели ринглов | <i>Prunus cerasifera</i> L. | - | Римски Шанчеви | јул 2016. |
| 8. | трњина | <i>Prunus spinosa</i> L. | - | Бешка | новембар 2016. |
| 9. | гајена трешња | <i>Prunus avium</i> L. | сорта <i>New star</i> | Римски Шанчеви | јун 2016. |
| 10. | дивља трешња | <i>Prunus avium</i> L. | - | Фрушка гора | јун 2016. |
| 11. | вишња | <i>Prunus cerasus</i> L. | сорта облачинска | Римски Шанчеви | јун 2016. |
| 12. | степска вишња | <i>Prunus fruticosa</i> Pall. | - | Римски Шанчеви | јун 2016. |
| 13. | магрива | <i>Prunus mahaleb</i> L. | - | Римски Шанчеви | јун 2016. |
| 14. | бресква | <i>Prunus persica</i> Batsch. | сорта <i>Maria Bianca</i> | Римски Шанчеви | јул 2016. |
| 15. | кајсија | <i>Prunus armeniaca</i> L. | сорта буда | Римски Шанчеви | јул 2016. |

Табела 3.2. Подаци о узорцима испитиваних генотипова трњине (*Prunus spinosa* L.)

| # | Сорта/селекција/ генотип | Локалитет | Датум сакупљања плодова |
|-----|--------------------------|-----------|-------------------------|
| 1. | генотип В1 | Бешка | новембар 2016. |
| 2. | генотип В2 | Бешка | новембар 2016. |
| 3. | генотип ВL1 | Банстол | новембар 2016. |
| 4. | генотип ВL2 | Банстол | новембар 2016. |
| 5. | генотип ВL3 | Банстол | новембар 2016. |
| 6. | генотип TR-МВ/1 | Банстол | новембар 2016. |
| 7. | генотип TR-МВ/2 | Банстол | новембар 2016. |
| 8. | генотип TR-МВ/3 | Банстол | новембар 2016. |
| 9. | генотип TR-МВ/4 | Банстол | новембар 2016. |
| 10. | генотип TR-МВ/5 | Банстол | новембар 2016. |
| 11. | генотип TR-МВ/6 | Банстол | новембар 2016. |
| 12. | генотип TR-МВ/7 | Банстол | новембар 2016. |
| 13. | генотип TR-МВ/8 | Банстол | новембар 2016. |
| 14. | генотип TR-МВ/9 | Банстол | новембар 2016. |
| 15. | генотип TR-МВ/10 | Банстол | новембар 2016. |

Табела 3.3. Подаци о узорцима испитиваних генотипова дрена (*Cornus mas* L.)

| # | Сорта/селекција/ генотип | Локалитет | Датум сакупљања плодова |
|----|---------------------------------|----------------|-------------------------|
| 1. | селекција <i>Apatinski rani</i> | Римски Шанчеви | септембар 2017. |
| 2. | селекција <i>Ваџка</i> | Римски Шанчеви | септембар 2017. |
| 3. | сорта <i>Elegantnyi</i> | Римски Шанчеви | септембар 2017. |
| 4. | селекција <i>KICI</i> | Римски Шанчеви | септембар 2017. |
| 5. | селекција <i>RI</i> | Римски Шанчеви | септембар 2017. |
| 6. | сорта <i>Semen</i> | Римски Шанчеви | септембар 2017. |
| 7. | сорта <i>Svetlyachok</i> | Римски Шанчеви | септембар 2017. |

Лиофилизација биљног материјала

Плодови воћа су одмах након сакупљања замрзнути на $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ у замрзивачу са дубоким замрзавањем (модел EvoSafe-SeriesTM, VF360-86, Snijders Labs, Tilburg, Netherlands). За лиофилизацију је коришћен лиофилизатор Alpha 1-2 LDplus произвођача Martin Christ (Osterode am Harz, Germany). Главни процес лиофилизације (*енгл.* main drying) се одвијао на $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ и притиску од 0,12 mbar to $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ током 43 h након чега је примењен поступак завршног сушења (*енгл.* final drying) на $-76\text{ }^{\circ}\text{C}$ и притиску од 0,001 mbar током 5 h. Уколико плодови нису били потпуно лиофилизирани, цео поступак је поновљен.

Након лиофилизације материјал је спрашен у млину за кафу (Gorenje, Slovenia) и добијен је материјал у прашкастој форми. У овом облику су вакуумирани у пластичним вакуум врећицама и чувани на $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до анализирања.

Припрема екстраката плодова воћа

Екстракти су припремљени поступком ултразвучне екстракције, употребом ултразвучног купатила (модел Elmasonic S 100 H, Elma Schmidbauer GmbH, Germany) са фреквенцијом звука 50/60 Hz и ефективном снагом од 500 W. Температура воде је била $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Као растварач је коришћен 50% етанол (смеша етанол:вода = 50:50, v/v). Лиофилизиран и спрашен узорак (1 g) је помешан са растварачем у односу 1:10 (w/v) и стављен на ултразвучно купатило 20 минута. Након екстракције смеша је центрифугирана 10 min на 10.000 rpm и одливен је супернатант. Поступак је поновљен још два пута. Сакупљени супернатанти су спојени и упарени на ротационом вакуум упаривачу на $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, да би се одстранио сав етанол из екстраката. Остатак је ресуспендован у води, до запремине од 5 ml и профилиран кроз стерилни филтер (0,22 μm MCE филтери, Membrane Solutions LLC, USA). Крајња концентрација екстраката је износила 200 mg лиофилизираног воћа (LF, *енгл.* lyophilized fruit) у једном mL воде (200 mg LF/mL). Ови екстракти су даље коришћени за све хемијске анализе и испитивања биолошких активности.

3.2. Квалитативна UPLC-Q-TOF-MS/MS и квантитативна HPLC-PDA анализа воћа рода *Prunus L.*

За одређивање фенолног профила екстракта воћа рода *Prunus* коришћене су техника течне хроматографије високих перформанси (енгл. high-performance liquid chromatography, HPLC) и ултра-високих перформанси (енгл. ultra-performance liquid chromatography, UPLC), са различитим системима за детекцију једињења. За квалитативну анализу је коришћен масеноспектрометријски детектор (енгл. mass spectrometric detector, MS), односно тандемско масеноспектрометријски систем детекције (енгл. tandem mass spectrometry, MS/MS), са квадруполом и масеним анализатором на бази времена прелета (енгл. quadrupole–time-of-flight, Q-TOF). Квантитативна анализа је урађена на HPLC систему са детектором са низом диода (енгл. photodiode array detector, PDA). Анализе су спроведене по методи описаној од стране Kucharska et al. (2017), уз мање измене. За ову анализу су због транспорта у Пољску, где је урађена анализа, екстракти додатно упарени до сува на ротационом вакуум упаривачу (RVC 2–18 CDplus, Martin Christ, Osterode am Harz, Germany), а суви екстракт је растворен у води непосредно пред анализирање.

Идентификација једињења помоћу UPLC-Q-TOF-MS/MS

Идентификација једињења је спроведена на Acquity UPLC систему, куплованим са Q-TOF MS инструментом (UPLC/Synapt Q-TOF MS, произвођача Waters Corp., Milford, MA, USA), са електроспреј јонским извором (енгл. electrospray ionization, ESI). Раздвајање једињења је извршено на Cadenza CD-C18 UP (75 mm × 2.0 mm i.d., 3 μm) колони (Imtakt, Kyoto, Japan). Компонента А мобилне фазе је била вода закишељена мрављом киселином (2%), а компонента В је био ацетонитрил. Градијент мобилне фазе је био следећи: иницијални услови – 1% В; 12 min – 25% В; 19 min – 100% В; 20 min – 1% В. Проток мобилне фазе је био 0,45 mL/min, а ињекциона запремина 5 μL. Колона је била термостатирана на 30 °C. UV-Vis апсорпциони спектри су снимани *on-line* током UPLC анализе, у опсегу таласних дужина 200–600 nm, кораком од 2 nm. Подаци су прикупљани на таласним дужинама од 280 nm, 320 nm, 360 nm и 520 nm.

Главни параметри рада Q-TOF MS уређаја били су следећи: напон на капилари 2,0 kV, напон на конусу 40 V, брзина протока гаса на конусу 11 L/h, енергија колизије 28–30 eV, температура извора 100 °C, температура десолватације 250 °C, колизиони гас, аргон; брзина протока гаса за десолватацију (N₂), 600 L/h; опсег маса, *m/z* 100–2000 Da; мод јонизације, негативан и позитиван. Подаци су обрађени у Mass-Lynx™ V 4.1 софтверу. Једињења су идентификована преко масених спектра, упоређујући протоноване (антоцијани, [M+H]⁺), депроноване (остала једињења, [M–H]) молекуле и главне фрагментне јоне са аутентичним стандардима и литературним подацима. Као стандарди су коришћени: *p*-кумаринска киселина, кафена киселина, ферулна киселина, 5-*O*-кафеоилхинска киселина (хлорогенска киселина), 3-*O*-кафеоилхинска киселина

(неохлорогенска киселина) и 4-*O*-кафеоилхинска киселина (криптохлорогенска киселина), кверцетин-3-*O*-глукозид, кемферол-3-*O*-глукозид, изорамнетин-3-*O*-глукозид, рутин и цијанидин-3-*O*-глукозид.

Квантификација фенолних једињења помоћу HPLC-PDA

Анализа је спроведена користећи Dionex систем (Germering, Germany) са PDA детектором модел Ultimate 3000, кватернерном пумпом LPG-3400A, аутосемплером EWPS-3000SI, пећницом TCC-3000SD, контролисан софтвером Chromeleon v. 7.2 software (Thermo Scientific Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Раздвајање је извршено на Cadenza Imtakt CD-C18 (75 × 4.6 mm, 5 μm) колони. Компонента А мобилне фазе је била вода закишељена мрављом киселином (4,5%), а компонента В је био ацетонитрил (100%). Градијент мобилне фазе је био следећи: 0–1 min, 5% В; 1–20 min, 5–25% В; 20–26 min, 25–100% В; 26–30 min, 100–5% В. Проток мобилне фазе је износио 1 mL/min, ињектовано је 20 μL узорка, а колона је била термостатирана на температури од 30 °C.

Фенолне, односно хидроксициметне (фенилпропанске) киселине и њихови деривати су детектовани на 320 nm, флавоноли на 360 nm и антоцијани на 520 nm. Калибрационе криве су експериментално припремљене са 5-*O*-кафеоилхинском киселином, кафеном киселином, ферулном киселином, *p*-кумаринском киселином, кемферол-3-*O*-глукозидом, кверцетин-3-*O*-глукозидом, изорамнетин-3-*O*-глукозидом, цијанидин-3-*O*-глукозидом. Фенолне киселине и одговарајући деривати су изражени преко еквивалената 5-*O*-кафеоилхинске, ферулне или *p*-кумаринске киселине, деривати кверцетина преко еквивалената кверцетин-3-*O*-глукозида, деривати изорамнетина преко еквивалената изорамнетин-3-*O*-глукозида, а антоцијани преко еквивалената цијанидин-3-*O*-глукозида. Резултати су изражени у mg еквивалената једињења на 100 g лиофилизираног воћа (mg/100 g LF).

3.3. HPLC-PDA анализа екстраката генотипова трњине и дрена и инкапсулата воћа

Анализа је изведена на течном хроматографу са детектором са низом диода (HPLC-PDA) модел Nexera X2, произвођача Shimadzu (Токуо, Јапан). Једињења су раздвојена на колони Luna C18(2), димензија 150 mm × 2 mm i.d., 3 μm, са C18 претколоном 4 mm × 2 mm i.d, 3 μm (обе од произвођача Phenomenex, Torrance, CA, USA). Колона и претколони су темперирани на 40 °C. За елуирање су коришћене две мобилне фазе. Мобилна фаза А – вода закишељена 1% мрављом киселином и мобилна фаза Б – метанол закишељен 1% мрављом киселином. Примењен је следећи градијент: 0–10 min, 5–20% В; 10–13 min, 20% В; 13–30 min, 20–25% В; 30–35 min, 25–30% В; 35–45 min, 30–70% В; 45–50 min, 70% В; 50–55 min, 70–100 % В; 55–65 min, 100 % В; 65–75 min, 100–5 % В; и 5 min *post run time*. UV-Vis апсорпциони спектри су снимани у опсегу таласних дужина 190–650 nm, са корекцијом на 620/20 nm. Хроматограми су читавани на 280 nm за фенолне киселине, 320 nm за хидроксициметне киселине (фенилпропанске киселине), 350 nm за флавоноиде (флавоноле), 520 nm за антоцијане, 254 nm за елагинску киселину и 245 nm за иридоиде. За идентификацију и квантификацију једињења су коришћени одговарајући стандарди и литературни подаци. Калибрационе криве су експериментално припремљене са галном киселином, елагинском киселином, 3-*O*-кафеоилхинском киселином (неохлорогенском киселином), 5-*O*-кафеоилхинском киселином (хлорогенском киселином), кафеном киселином, ферулном киселином, *p*-кумаринском киселином, кверцетин-3-*O*-галактозидом, кверцетин-3-*O*-глукозидом, кверцетин-3-*O*-рутинозидом, кверцетином, цијанидин-3-*O*-глукозидом, цијанидин-3-*O*-рутинозидом, пеонидин-3-*O*-глукозидом, пеларгонидин-3-*O*-глукозидом, логанском киселином, логанином, корнузидом. Једињења за која није био доступан одговарајући стандард су изражена преко еквивалената најсличнијих деривата. У екстрактима генотипова трњине су деривати хидроксициметних киселина изражени преко 3-*O*-кафеоилхинске, 5-*O*-кафеоилхинске или *p*-кумаринске киселине, пеонидин-3-*O*-рутинозид преко пеонидин-3-*O*-глукозида. У екстрактима генотипова дрена су иридоидни деривати сверозид и секоксилоганин изражени преко логанина, делфинидин-3-*O*-глукозид преко цијанидин-3-*O*-глукозида, деривати пеларгонидина преко пеларгонидин-3-*O*-глукозида, кемферол-3-*O*-галактозид преко кверцетин-3-*O*-галактозида, дериват галне киселине преко галне киселине, изомери кафтаринске киселине преко кафене киселине. Резултати су изражени у mg еквивалената једињења на 100 g лиофилизованог воћа (mg/100 g LF).

Овом методом су анализирани узорци различитих генотипова трњине и дрена, као и сви инкапсулати екстраката трњине, дрена и тропа вишње који су припремљени и испитивани у оквиру дисертације.

3.4. Одређивање антиоксидантног капацитета екстракта

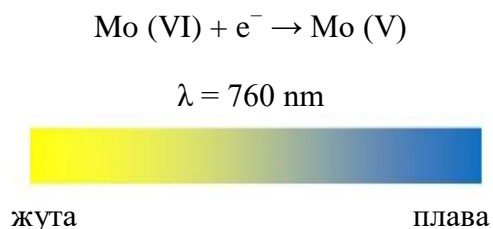
За одређивање антиоксидантног капацитета је најбоље да се примени више различитих тестова, јер ни један тест не може у потпуности да објасни антиоксидантну активност узорка. Сваки појединачни тест антиоксидантног капацитета има своје предности и ограничења. Осим што су засновани на различитим реакционим механизмима, постоје велике разлике међу тестовима у погледу средине у којој се изводе, попут рН, хидрофилности/липофилности средине и других фактора (Bibi Sadeer et al., 2020).

У оквиру ове дисертације, за одређивање антиоксидантног капацитета узорака примењена су три теста – FC, FRAP и DPPH тест. Сва три теста су колориметријска и заснована на промени боје реагенса, узрокованој трансфером електрона. Апсорбанције су мерене на одређеним таласним дужинама, на спектрофотометру Evolution 220 (Thermo Fischer Scientific, Shanghai, China).

3.4.1. Способност редукције Фолин–Чокалте реагенса (FC тест)

FC тест је назван по истоименом Фолин–Чокалте (Folin–Ciocâlteu) реагенсу, који чине смеша фосфомолибденске и фосфоволфрамове киселине. Тест је заснован на трансферу електрона са фенолних или других редукујућих једињења из узорка на реагенс. Реакција се одвија у базној средини, при рН око 10, која се постиже додатком натријум-карбоната. У базној средини се фенолна једињења депротонују градећи фенолатни анјон који је одговоран за редукцију реагенса. Приликом редукције FC реагенса његова првобитно жута боја се мења у плаву (слика 3.1). Интензитет боје се мери спектрофотометријски.

FC тест се примењује и као тест за одређивање садржаја укупних фенолних једињења. Пошто се овај тест претежно примењује на узорцима богатим фенолним једињењима, а она имају изражен антиоксидантни карактер, крајњи резултат ће бити у сагласности са садржајем укупних фенолних једињења. Међутим, донори електрона, поред фенолних, могу да буду и други молекули, попут редукујућих шећера или аскорбинске киселине. С обзиром да природни и прехранбени производи обилују овим једињењима, исправније је FC тест посматрати као мерило антиоксидантног капацитета.

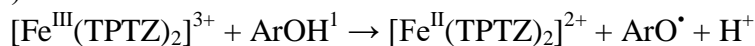


Слика 3.1. Механизам одвијања F–C теста

Поступак одређивања је изведен према Ainsworth & Gillespie (2007). Прво је 200 μl узорка инкубирано са 1 mL FC реагенса (0,1 M) током 10 min. Затим је додато 800 μL засићеног Na_2CO_3 (700 mM) да би средина била базна. Након 60 min инкубације на собној температури и у мраку, апсорбанција је очитана на $\lambda = 760 \text{ nm}$. За сваки узорак тест је изведен у три понављања. Калибрациона крива је припремљена са галном киселином, пратећи исти експериментални поступак. Резултати су изражени у милиграмима еквивалената галне киселине по граму лиофилизованог воћа (mg GAE/g LF).

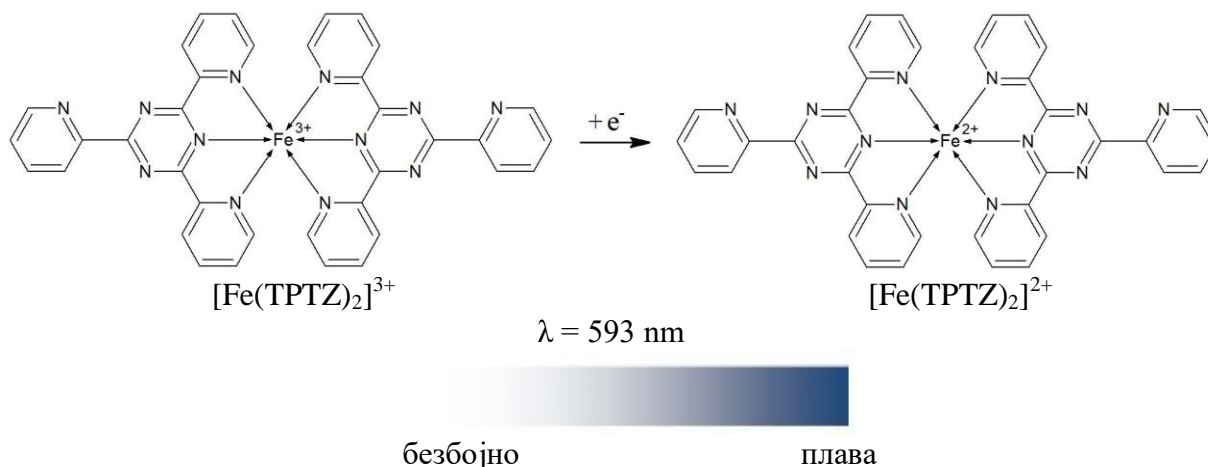
3.4.2. Способност редукције гвожђе(III)-јона (FRAP тест)

FRAP тест мери способност узорка да редукује гвожђе(III)-јоне до гвожђе(II)-јона (енгл. ferric reducing antioxidant power test). Гвожђе се комплексира са TPTZ (2,4,6-трис(2-пиридил)-S-триазин) реагентом у киселој средини (pH 3,6). Уколико гвожђе има оксидационо стање +3, раствор је безбојан. Уколико је оксидационо стање гвожђа +2, комплекс даје плаво обојени раствор, чија се апсорбанција мери на таласној дужини од $\lambda = 593 \text{ nm}$ (слика 3.2).



За овај тест је коришћен метод развијен од стране Benzie and Strain (1999). Припреме се 300 mM ацетатни пуфер (pH 3,6), 10 mM TPTZ реагенс и 20 mM FeCl₃. TPTZ реагенс се припрема растварањем у 40 mM HCl, а FeCl₃ се раствори у дестилованој води. FRAP реагенс се припрема мешањем ацетатног пуфера, TPTZ реагенса и раствора FeCl₃ у односу 10:1:1. Осим поменутог односа, реагенси треба да се додају наведеним редоследом, како се FeCl₃ не би редуковао TPTZ реагентом.

У епрувету је испипетирано 100 μL узорка и додато 3 mL FRAP реагенса. Смеша је вортексирана и након 5 min је очитана апсорбанција на спектрофотометру. За сваки узорак тест је изведен у три понављања. За израчунавање резултата припремљена је калибрациона крива са аскорбинском киселином и резултати су представљени као еквиваленти аскорбинске киселине по граму лиофилизованог воћа (mg AAЕ/g LF).

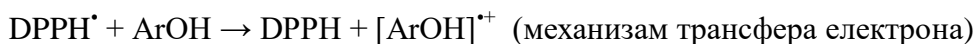
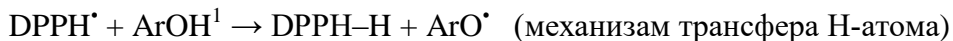


Слика 3.2. Механизам одвијања FRAP теста

¹ ArOH – антиоксидант

3.4.3. Способност неутрализације DPPH радикала (DPPH тест)

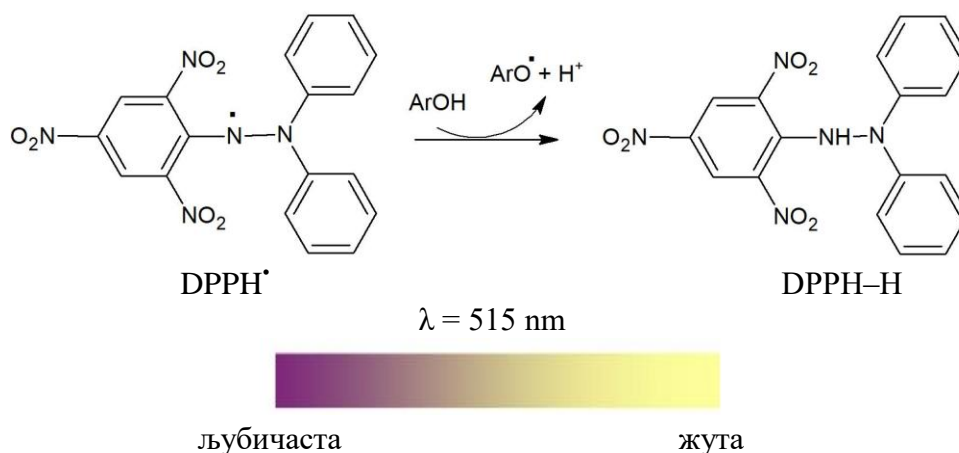
DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил) радикал је синтетски радикал који је веома стабилан због делокализације слободног електрона преко ароматичних прстенова. Има веома интензивну љубичасту боју. Приликом извођења теста радикал се неутралише или преко трансфера електрона или преко трансфера H-атома, а боја се мења у жуту (слика 3.3).



За одређивање способности неутрализације DPPH радикала је примењен метод Sánchez-Moreno et al. (1998). Основни раствор DPPH радикала (400 μM) је добијен растварањем у етанолу. Радни раствор DPPH радикала (90 μM) се добија разблаживањем етанолног раствора у метанолу. Припремљена су серијска разблажења екстракта. У епрувете је испипетирано по 200 μL екстракта и додато 2 mL 90 μM DPPH радног раствора. Након 30 min стајања у мраку на собној температури, садржај из епрувета је пребачен у кивете и прочитана је апсорбанција. За максималну апсорбанцију, односно контролу која представља 100 % концентрације DPPH радикала, припремљен је узорак у којем је уместо екстракта додато само растварач. Процент инхибиције (I, %) за узорке је израчунат у поређењу са том контролом.

$$\text{Инхибиција (\%)} = \frac{A_{\text{контроле}} - A_{\text{узорка}}}{A_{\text{контроле}}} \times 100 (\%)$$

Коначан резултат је изражен као IC₅₀ вредност (концентрација узорка која неутрализује 50% DPPH радикала).

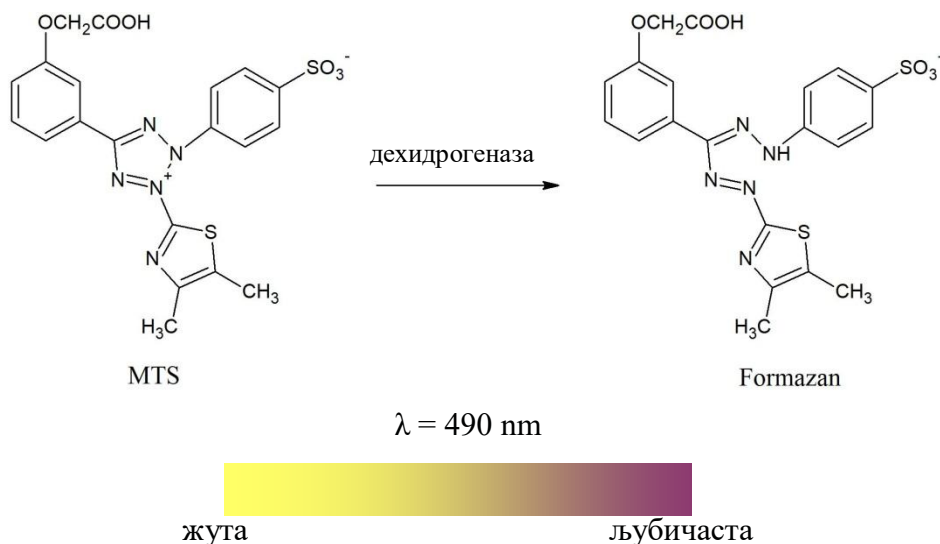


Слика 3.3. Механизам одвијања DPPH теста

¹ ArOH – антиоксидант

3.5. Одређивање антипролиферативне активности екстракта воћа

Антипролиферативна активност екстракта воћа је испитана на ћелијама хуманог карцинома дебелог црева (HT-29 ћелијска линија), а мерена је колориметријским MTS тестом. MTS је скраћеница од назива боје (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксилметоксифенил)-2-(4-сулфофенил)-2Н-тетразолијум) која се користи за детекцију вијабилних ћелија. MTS, тетразолијумова со жуте боје, се у присуству ензима дехидрогеназе (из преживелих ћелија) редукује до љубичасто обојеног формазана, а интензитет боје се мери спектрофотометријски, на $\lambda = 490 \text{ nm}$. Ова реакција је приказана на слици 3.4.



Слика 3.4. Механизам одвијања MTS теста

Испитивање утицаја екстракта на раст ћелија је изведено према поступку који су установили Serra et al. (2011a). HT-29 (ATCC, Virginia, USA) су гајене у медијуму RPMI 1640 уз додатак 10% феталног говеђег серума (FBS, *енгл.* heat-inactivated fetal bovine serum; Biowest, Riverside, USA) и 2 mM глутамин. Ћелије су узгајане у микроплејт плочама са 96 отвора, тако да им је густина била 1×10^4 ћелија по отвору. Након 24 h инкубације на 37°C у 5% CO_2 , медијум за гајење ћелија је замењен медијумом који је у себи садржао екстракте воћа у различитим опсезима концентрацијама (0–100 mg LF/mL). После 24-часовне инкубације, ћелије су испране фосфатним пуфером два пута и пролиферација ћелија је одређена MTS тестом. Апсорбаниција је мерена на 490 nm користећи микроплејт читач Spark[®] 10M Multimode Microplate Reader (Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland). Процент вијабилних ћелија је изражен у поређењу са контролом. Контрола је проба без додатка екстракта и она представља 100% вијабилних ћелија. На крају, резултати су изражени као IC_{50} вредности, односно, концентрација екстракта при којој је инхибиран раст ћелија за 50%.

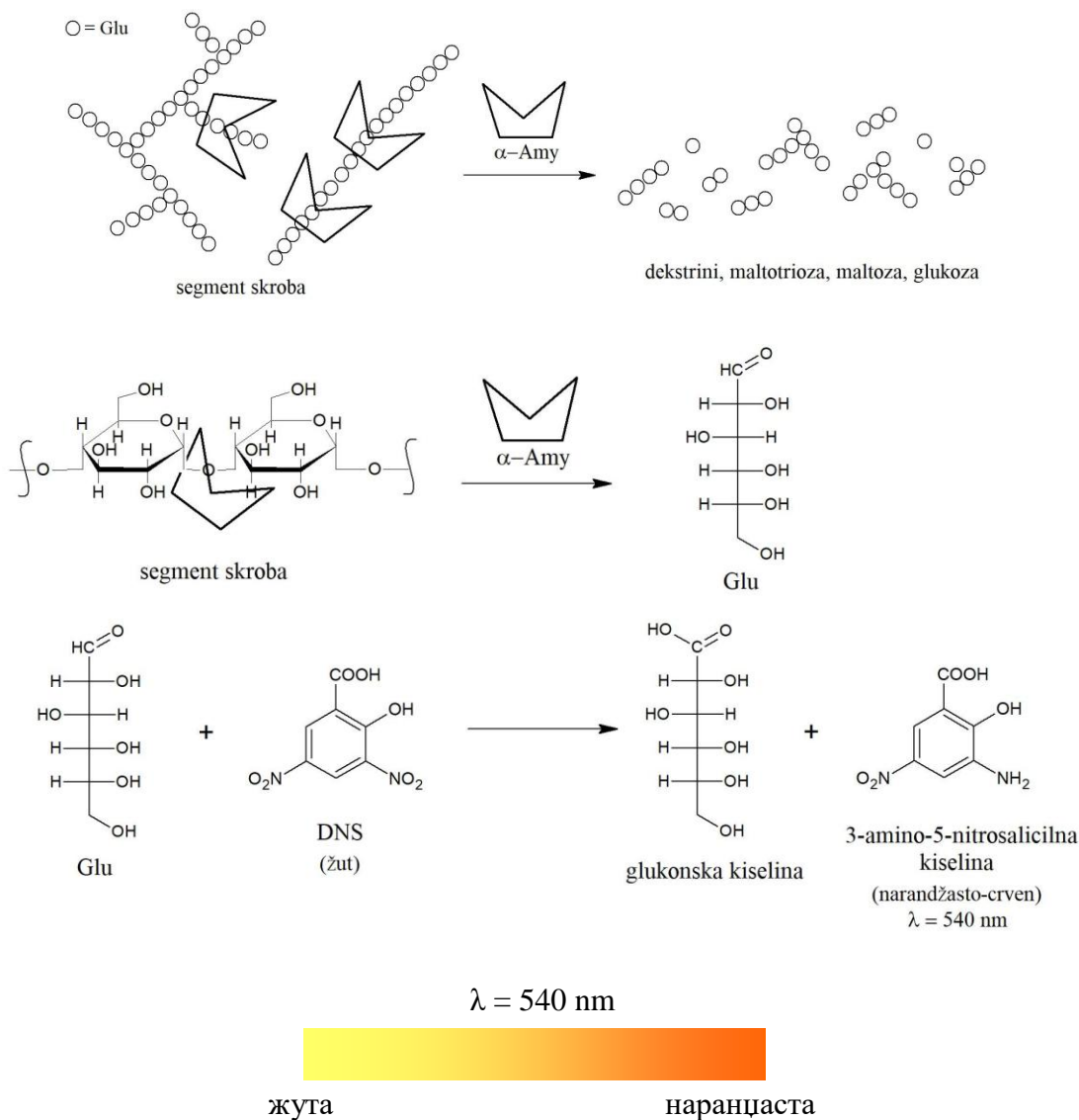
Како би се осигурало да воћни екстракти немају цитотоксични ефекат на здраве ћелије, него да евентуални антипролиферативни ефекат испољавају само ка туморским HT-29 ћелијама, испитана је цитотоксичност екстраката на конфлуентним и недиференцираним Caco-2 ћелијама. Ове ћелије се користе као ћелијски модел за хумани интестинални епителијум. Иако су изоловане из аденокарцинома дебелог црева, утврђено је да Caco-2 ћелије у конфлуентном стању поседују извесне сличности са ентероцитима и због тога се сматрају прихватљивим интестиналним моделом, који се употребљава за процену утицаја хемикалија и једињења из хране на интестиналне функције (Sambruy et al., 2005; Manda et al., 2015). Овај тест је изведен како би се установиле концентрације екстраката које су нетоксичне према Caco-2 ћелијама и оне су даље испитиване на HT-29 ћелијама.

Тест је изведен према протоколу који је установљен од стране Serra et al. (2011b). Caco-2 ћелије (Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen, Barunshweig, Germany) су гајене у RPMI 1640 медијуму уз додатак 10% топлотом инактивисаног феталног говеђег серума (FBS, *енгл.* heat-inactivated fetal bovine serum; Biowest, Riverside, USA) и 2mM глутамином (PenStrep; Gibco, Carlsbad, USA). Ћелије су одржаване као монослој у фласковима површине 75 cm², на 37 °C у атмосфери 5% CO₂, при високој влажности ваздуха.

Ћелије су засејане у микроплејт плочама са 96 отвора, тако да им је густина била 2×10^4 ћелија по отвору. Медијум је мењан сваких 48 h. Седмог дана, конфлуентне Caco-2 ћелије су инкубиране са различитим концентрацијама воћних екстраката, у опсегу 0–100 mg LF/mL, припремљеним разблаживањем у медијуму. Након 24 h инкубације вијабилност ћелија је мерена помоћу теста CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA), који садржи MTS реагенс. Апсорбаниција је мерена на 490 nm користећи микроплејт читач Spark[®] 10M Multimode Microplate Reader (Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland). Процент вијабилних ћелија је изражен у поређењу са контролом. Контролу је чинила проба без додатка екстракта, односно додат је само медијум, и она је представља 100% вијабилних ћелија.

3.6. Одређивање способности инхибиције ензима α -амилазе

Панкреасна α -амилаза насумично пресеца α -1,4 гликозидне везе у амилози и амилопектину из скроба дајући декстрине, малтозу и малтотриозу. Редукујући крај ових молекула редукује динитросалицилну киселину (DNS), која је жуте боје, до 3-амино-5-нитросалицилне киселине чији је раствор наранџасто-црвене боје. Инхибиторна способност екстраката мери се на основу праћења смањења настајања наранџасто-црвене боје. Реакција на којој је заснован експериментални поступак је приказана на слици 3.5.



Слика 3.5. Принцип теста за одређивање способности инхибиције α -амилазе

У овом тесту је коришћена амилаза изолована из свињског панкреаса (EC 3.2.1.1; Type VI-B, $\geq 10 \text{ U/mg solid}$). Примењена је процедура McDougall et al. (2005) уз мање измене. Направљен је раствор ензима $2,5 \text{ U/mL}$ у фосфатном пуферу $\text{pH} = 6,9$ ($20 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, са

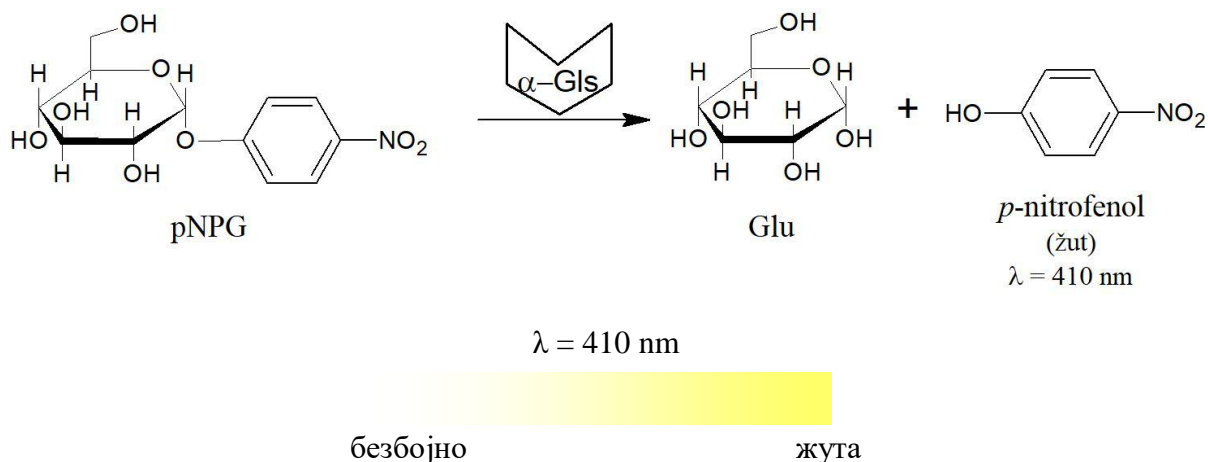
додатком 6 mM NaCl, јер су Cl⁻ јони неопходни за оптималну активност ензима). Запремина од 100 µL воћних екстракта различитих концентрација (1–20 mg/mL) преинкубирана је са 500 µL раствора ензима 10 min на 25 °C. Затим је додато 500 µL 1% раствора скроба (припремљен у фосфатном пуферу pH = 6,9) и смеша је даље инкубирана на 25 °C. Након 45 min додато је 500 µL 1% раствора динитросалицилне киселине (DNS). Овај раствор је припремљен тако што је прво 1 g DNS растворен у 60 mL воде, па затим помешан са раствором калијум-натријум-тартарата добијеног растварањем 12 g ове соли у 40 mL 1 M NaOH. Да би се зауставила реакција, епрувете су 5 min загреване у воденом кључалом купатилу. После хлађења до собне температуре, апсорбација је очитана на таласној дужини λ = 540 nm. Обавезна је корекција боје екстракта, која је добијена пратећи исти експериментални поступак, али са додатком воде уместо DNS. Процент инхибиције ензима је изражен у односу на контролу која је представљала 100 % ензимске активности, а добијена је тако што је екстракт замењен водом. Као позитивна контрола коришћена је акарбоза (комерцијални инхибитор α-амилазе) у опсегу концентрација 0–1 mg/mL.

Процент инхибиције ензима (α-Аму, %) рачунат је на основу једначине која следи, а коначан резултат је изражен као IC₅₀ вредност (концентрација почетног екстракта у mg LF/mL, која смањује активност ензима за 50%).

$$\alpha\text{-Amy (\%)} = \frac{A_{\text{контроле}} - (A_{\text{узорка}} - A_{\text{корекције узорка}})}{A_{\text{контроле}}} \times 100 (\%)$$

3.7. Одређивање способности инхибиције ензима α -глюкозидазе

Ензим α -глюкозидаза хидролизује *p*-нитрофенил- α -D-глюкопиранозид (pNPG) на глюкозу и *p*-нитрофенол, чији раствор има жуту боју која се мери на је 410 nm. Када је у реакционом медијуму присутан инхибитор ензима, ова реакција изостаје, а самим тим и производ чији се интензитет боје прати. Ово је шематски представљено на слици 3.6.



Слика 3.6. Принцип теста за одређивање способности инхибиције α -глюкозидазе

За анализу је примењен протокол развијен од стране McDougall et al. (2005), уз мање измене. Припремљен је раствор ензима активности 2 U/mL у дестилованој води. У епрувети је помешано 50 μ L овог раствора α -глюкозидазе и 50 μ L екстракта, а затим је додат 1 mL фосфатног пуфера (0,1 M; pH 6,8). Смеша је инкубирана 20 min у воденом купатилу на 37 $^{\circ}$ C, након чега је додат супстрат ензима, pNPG. Супстрат је припремљен у концентрацији од 5 mM у води и додат га је 50 μ L у реакциону смешу. Након 20 min реакција је заустављена додатком 1 mL раствора Na_2CO_3 концентрације 0,1 M и апсорбанција је очитана на 410 nm. Контрола, односно проба која се узима за максималну активност ензима (100 %) садржала је све реагенсе, изузев екстракта воћа. Корекције екстракта припремане су тако што је вода додата уместо pNPG. Процент инхибиције активности ензима (α -Gls) израчунат је према следећој формули:

$$\alpha\text{-Gls (\%)} = \frac{A_{\text{контроле}} - (A_{\text{узорка}} - A_{\text{корекције узорка}})}{A_{\text{контроле}}} \times 100 (\%)$$

Акарбоза је коришћена као позитивна контрола, односно као једињење за које се зна да инхибира активност ензима. Акарбоза је испитана у опсегу концентрација 0–20 mg/mL. Резултати су изражени као IC_{50} вредности (концентрација почетног екстракта у mg LF/mL која за 50% смањује активност ензима).

3.8. Одређивање способности инхибиције ензима хумане дипептидил-пептидазе III (DPP III)

Хетерологна експресија и пречишћавање ензима рекомбинантне хумане DPP III

Ген за DPP III је уграђен у вектор (плазмид) pLATE31 заједно са секвенцом која кодира хистидинску ознаку (His-tag) на С-крају и експримиран у сој BL21-CodonPlus (DE3)-RIL бактерије *E. coli* како би се даље умножио. Ензим је пречишћен Ni-NTA афинитетном хроматографијом (Špoljarić et al., 2011). Јони пуфера су замењени помоћу PD-10 колоне и ензим је чуван у 50 mM Tris пуферу са додатком 100 mM NaCl, вредности рН 8,2, на 4 °C.

Тест активности DPP III ензима

Рекомбинантна хумана DPP III (3,4 nM) преинкубирана је са екстрактима воћа различитих радних концентрација (0–300 µg LF/mL) прво 1 min на 25 °C, а затим 3 min на 37 °C у 50 mM Tris-HCl пуферу, рН 7,4. Ензимска реакција започета је додатком супстрата Arg₂-2NA (40 µM). Након 15 min инкубације на 37 °C реакција је заустављена и апсорбанција је измерена користећи метод описан од стране Abramić et al. (1988). Процент инхибиције активности ензима је одређен поређењем са нормалном активношћу без додатка екстракта, према формули:

$$\text{Инхибиција (\%)} = \frac{\text{нормална активност} - \text{инхибирана активност}}{\text{нормална активност}} \times 100 (\%)$$

Крајњи резултати су изражени као IC₅₀ вредности (радна концентрација екстракта која за 50% смањује активност ензима).

3.9. Статистичка анализа података

За статистичку обраду података је коришћен софтвер Statistica 13.3 software (TIBCO Software Inc, Palo Alto, CA, USA). Све експерименталне анализе су изведене у 3 независна понављања за сваки узорак ($n = 3$). Статистичке разлике међу узорцима у оквиру појединачних тестова су испитане помоћу анализе варијансе (One-way ANOVA) и post hoc Duncan-овог теста ($P < 0,01$). На подацима о фитохемијском саставу и биолошким активностима испитиваних екстраката воћа су примењене корелациона анализа и PCA (анализа главних компонената, *енгл.* principal component analysis). Кластер (*енгл.* cluster) анализа је урађена на основу садржаја фенолних једињења воћа рода *Prunus*.

Код тестова код којих се резултат изражава преко IC_{50} вредности (DPPH тест, испитивање способности инхибиције ензима), што је IC_{50} вредност мања, то је боља активност узорка. Ради једноставније интерпретације статистичких анализа, ове вредности су у програму унесене као реципрочне вредности ($1/IC_{50}$), а за корелациону и PCA анализу су све вредности претходно стандардизоване у програму.

3.10. Молекулски докинг

Кристална структура свињске панкреасне α -амилазе, PDB ID: 1HX0 и хумане дипептидил пептидазе III (hDPP III), PDB ID: 3FVY узете су из базе података протеина (енгл. Protein Data Bank, PDB; <https://www.rcsb.org/>). Кристална структура α -глюкозидазе квасца (*Saccharomyces cerevisiae*) још увек није тачно одређена. Због тога је протеинска секвенца α -глюкозидазе квасца (MAL32_YEAST, UniProt ID: P53341) преузета са UniProt (<https://www.uniprot.org/>), а BLAST сервер (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) је коришћен како би се постигао одговарајући темплат структуре ензима. Кристална структура квашчеве изомалтазе (PDB ID: 3A47, резолуције 1,59 Å) са високим преклапањем секвенце (72,06%) са α -глюкозидазом је одабрана као темплат за хомолого моделовање. За генерисање 3D модела ензима коришћен је MODELLER 9.23 софтвер (Webb & Sali, 2016). Поузданост добијеног 3D модела α -глюкозидазе процењен је на основу Рамачандрановог дијаграма добијеног преко PROCHECK сервера (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>). На Рамачандрановом дијаграму модела α -глюкозидазе уочава се да је 91,5% аминокиселина било у најповољнијим регионима (енгл. the most favoured regions), 7,5% аминокиселина је било у додатно дозвољеним (енгл. additional allowed), 0,8% у веома дозвољеним (енгл. generously allowed) и 0,2% у недозвољеним (енгл. disallowed) регионима. Подаци са Рамачандрановог дијаграма показују да је већина аминокиселина у оквиру ϕ и ψ дистрибуције, што указује да је добијени модел α -глюкозидазе био поуздан за докинг анализу (Прилог 14).

Све 3D хемијске структуре биоактивних једињења из екстраката испитиваног воћа су преузете са интернет странице PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). MGL Tools 1.5.6 (Morris et al., 2009) је коришћен за припрему структура за молекулски докинг.

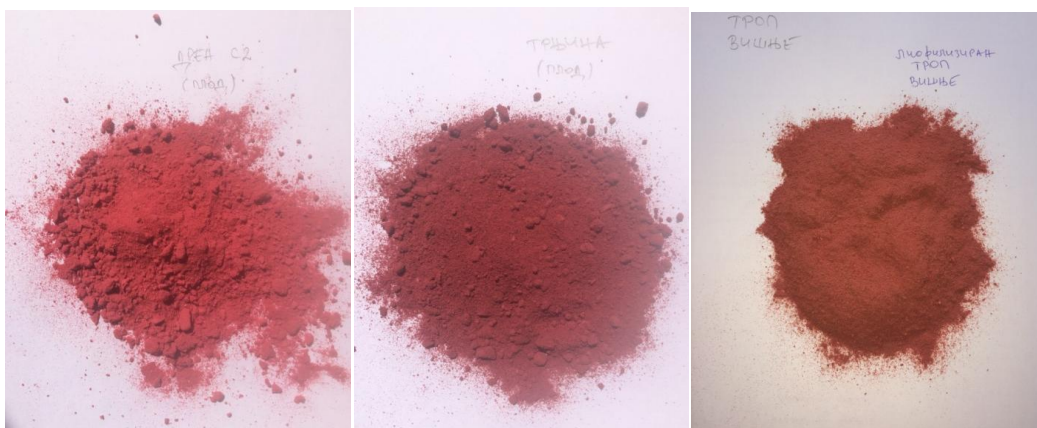
Структурама ензима додата су *Kollman united atom* наелектрисања и поларни водоникови атоми, док су молекулима лиганда додата *Gasteiger* наелектрисања и водоникови атоми. AutoDock Vina 1.1.2 (Trott & Olson, 2010) је коришћен за претрагу најбоље позиције лиганда унутар места везивања за ензимску структуру.

За проналажење најбоље позиције за везивање лиганда за ензим коришћена је *grid докинг* симулација. Везивно место лиганда на α -амилази је дефинисано преко *grid box* димензија $80 \times 80 \times 80$ и центром постављеним на $x = 38,240$, $y = 21,055$ и $z = 54,110$. *Grid box* за лиганде на α -глюкозидази је износила $51 \times 51 \times 51$ и центар је био постављен на $x = 34,170$, $y = -6,004$ и $z = 10,892$, док је за лиганде на DPP III *grid box* износила $60 \times 60 \times 60$ тачака и центар је био на $x = 4,780$, $y = -6,120$ и $z = 1,517$. Докинг симулација је изведена са размаком од 0,375 Å. Најбоље позиције су одабране помоћу софтвера AutoDock Vina, а интеракције између ензима и лиганда су визуализоване и анализиране помоћу софтвера VMD 1.9.3 (Humphrey et al., 1996) и LigPlot⁺ (Laskowski & Swindells, 2011).

3.11. Припрема инкапсулата воћних екстраката

За припрему инкапсулата су одабрани плодови дрена и трњине и троп вишње (остатак чврсте материје након цеђења сока). Троп вишње, а не цели плодови, је одабран због тога што се у прехранбеној индустрији вишња првенствено користи за производњу сока и различитих напитака. Након цеђења остају велике количине тропа, који представља нуспроизвод. Пошто се у тропу претежно задржавају љуска и меснати део плода, овај нуспроизвод је богат извор биолошки веома активних фитохемикалија, нарочито фенолних једињења (Cilek et al., 2012; Luca et al., 2013).

У експериментима су коришћени дрен сорте *Svetlyachock*, мешавина различитих генотипова трњине и облачинска вишња произвођача Фриком д.о.о. (Србија). Након одстрањивања коштица и ручног цеђења сока вишње кроз газу, плодови дрена и трњине и троп вишње су замрзнути на $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ у замрзивачу за дубоко замрзавање (модел EvoSafe-Series™, VF360-86, Snijders Labs, Tilburg, Netherlands), а потом лиофилизирани (Alpha 1-2 LDplus, Martin Christ, Osterode am Harz, Germany). Леофилизиран биљни материјал је приказан на слици 3.7.



Слика 3.7. Леофилизирани плодови дрена, трњине и троп вишње који су коришћени за припрему инкапсулата

3.11.1. Истовремена екстракција и инкапсулација у β -циклодекстрин

Поступак припреме инкапсулата у β -циклодекстрину је обухватио истовремену екстракцију и инкапсулацију биоактивних једињења из биљног материјала. Овакав вид припреме инкапсулата је одабран јер β -циклодекстрин, услед грађења инклузионих комплекса са одређеним једињењима, доприноси њиховој бољој екстракцији. Да би се екстракција β -циклодекстрином упоредила са конвенционалним начинима екстракције, леофилизирани плодови дрена, трњине и тропа вишње су екстраховани са четири различита система: чистом водом, 50% етанолом, β -циклодекстрином у води и β -циклодекстрином у 50% етанолу.

Поступак је спроведен према Mantegna et al. (2012). Коришћен је 1,5% (w/v) раствор β -циклодекстрина у води и 50% етанолу. По 1 g лиофилизованог воћа је преливен са 50 mL одговарајућег система, подвргнут ултразвучној екстракцији током 20 минута на 40 °C и 550 W. Суспензије су центрифугиране 10 минута на 3500 rpm. Супернатанти из воденог и 50% етанолног система су коришћени за даљу анализу, док су супернатанти са β -циклодекстрином лиофилизирани према процедури описаној у одељку 3.2, како би се добили инкапсулати у прашкастој форми. Пре лиофилизације, супернатант са β -циклодекстрином у 50% етанолу је делимично упарен на ротационом вакуум упаривачу како би се уклонио етанол. За екстракцију једињења из инкапсулата у β -циклодекстрину је коришћен систем етанол:вода:сирћетна киселина у односу 50:42:8. На лиофилизиран инкапсулат је додато 50 mL ове смеше, екстраховано на ултразвучном купатилу и центрифугирано према горе описаним параметрима. Екстракти су анализирани HPLC/PDA методом описаном у одељку 3.4., а лиофилизирани прашкасти инкапсулати у β -циклодекстрин–етанолу су окарактерисани и испитивани према даљим анализама описаним за остале инкапсулате.

3.11.2. Инкапсулација у халојзит, малтодекстрин и халојзит-малтодекстрински композит

Припрема екстракта воћа за инкапсулације

Екстракти воћа су припремљени са 50% етанолом (смеша етанол:вода = 50:50, v/v). Леофилизирано воће (20 g) и растварач су помешани у односу 1:20 (w/v), подвргнути екстракцији на ултразвучном купатилу током 20 min на 40 °C (Elmasonic S 100 H, Singen, Germany). Након тога је смеша мешана на магнетној мешалици на 600 rpm током 2 h. Садржај је затим центрифугиран 10 минута на 3500 rpm и супернатант је профилтриран (F2043 chm, Chmlab group, Barselona, Spain). Део супернатанта је упарен на вакуум упаривачу на 40 °C како би се одредила маса сувог екстракта ради даље припреме инкапсулата. Овај суви екстракт је такође коришћен за испитивање антипролиферативне активности екстракта.

Припрема инкапсулата у халојзиту

Инкапсулати су припремљени са халојзитом из налазишта Matauri Bay (Northland, New Zealand; добијеног од Imerys Tableware, New Zealand. Нанотубе халојзита из овог депозита су претежно следећих димензија: дужина до 2 μ m, унутрашњи пречник 15–70 nm, спољашњи пречник 50–200 nm, дебљина зида 20–200 nm. Честице су претежно дуге и танке или кратке и здепасте, тубуларне, са цилиндричним обликом пора (Pasbakhsh et al., 2013). Халојзит и екстракти воћа су помешани тако да је однос масе сувог екстракта и масе халојзита износио 1:5 (w/w, core to coat ratio). Инкапсулација једињења из екстракта воћа у нанотубе халојзита се одвијала цикличним успостављањем вакуума, што

се примењује као стратегија за ефикаснији улазак једињења у шупљине нанотуба (Lisuzzo et al., 2019b).

Припрема инкапсулата у малтодекстрину

За припрему инкапсулата је коришћен малтодекстрин DE 15-20, погодан за коришћење у прехранбене сврхе. Произведен је у Кини, а купљен од фирме Алимента д.о.о. из Ветерника (Србија). Направљен је 20% (w/w) раствор малтодекстрина у води, који је помешан са сваким екстрактом воћа тако да однос масе сувог екстракта и масе малтодекстрина буде 1:2 (w/w, core to coat ratio; Cilek et al., 2012). Смеше су потом упараване на ротационом вакуум упаривачу да би се одстранио етанол који потиче из екстракта воћа. Добијене водене суспензије су потом лиофилизиране како би се добили инкапсулати у чврстом и сувом облику.

Припрема инкапсулата у халојзит–малтодекстринском композиту

Ови инкапсулати су припремљени на исти начин као инкапсулати у халојзиту, с тим што је халојзит прво помешан са малтодекстрином. Однос инкапсулираног материјала и носача, односно однос суви екстракт:халојзит: малтодекстрин је износио 3:1:6.

3.12. Физичкохемијска карактеризација инкапсулата

3.12.1. Снимање површинске морфологије инкапсулата скенирајућом електронском микроскопијом (СЕМ)

За добијање информација о површинској морфологији инкапсулата и самих носача, они су снимљени техником скенирајуће електронске микроскопије (СЕМ, *енгл.* scanning electron microscopy). За снимање је коришћен електронски микроскоп JSM-6460 LV (JEOL, Токуо, Јапан), при радном напону од 20 kV.

3.12.2. Термогравиметријска карактеризација инкапсулата

Термогравиметријска (ТГ) карактеризација инкапсулата је изведена према методи описаној од стране Cavallaro et al. (2016). Мерење је извршено на инструменту Q5000 IR (TA Instruments, Milan, Italy), при протоку азота од 25 cm³/min. Мерено је не више од 10 mg узорака и загревани су до 750 °C. Брзина пораста температуре је износила 20 °C/min. Узорци су пре почетка мерења еквилибрирани на 100 °C у трајању од 1 h да би се уклонила адсорбована вода.

3.12.3. Колоидна стабилност инкапсулата са халојзитом

Стабилност инкапсулата са халојзитом је процењена на основу замућености колоидних раствора инкапсулата и поређењем са замућеношћу колоидног раствора самог носача током времена. Замућеност раствора је мерена као проценат трансмисије раствора, односно проценат пропуштеног зрачења кроз растворе, према Ламбер–Беровом (Lambert–Beer) закону:

$$T (\%) = \frac{I}{I_0} \times 100 (\%),$$

где је I_0 интензитет упадног зрачења, а I интензитет пропуштеног зрачења.

Инкапсулати дрена, трњине и тропа вишње са халојзитом (2500 µg/mL) и чист халојзит (1000 µg/mL) су дисперговани у води и мерен је проценат трансмисије ових раствора током времена, на 25 °C. Мерење је вршено на таласној дужини од 800 nm, јер је претходним снимањем спектра утврђено да нема апсорпције на тој таласној дужини. За мерење трансмисије је коришћен UV-Vis спектрофотометар (Specord S 600, Analytik Jena AG) и кивета оптичке дужине пута 1 cm.

3.12.4. Спектрофотометријско одређивање ефикасности инкапсулације

Ефикасност инкапсулације (ЕЕ, *енгл.* encapsulation efficiency) је одређена мерењем садржаја једињења у унутрашњости инкапсулата (*core*) у односу на укупну количину једињења у инкапсулату, према методи Saénz et al. (2009).

Укупни садржај биоактивних једињења (ТВС, енгл. total bioactive compounds)

За екстракцију укупних биоактивних једињења из инкапсулата као растварач је коришћена смеша етанол:сирћетна киселина:вода (50:8:42, v/v/v). Одмерено је 100 mg инкапсулата и преливено са 1 mL овог растварача. Садржај је вортексиран 1 min и додатно екстрахован ултразвуком 20 min. Након тога је садржај центрифугиран 5 min на 10.000 rpm, супернатант је профилиран кроз 0,22 µm порозан шприц-филтер (Membrane Solutions, LLC, USA) и даље анализиран према Фолин–Чокалте методи, описаној у одељку 3.4.1.

Садржај биоактивних једињења на површини инкапсулата (SBC, енгл. surface bioactive compounds)

Једињења везана на површини инкапсулата екстрахована су системом метанол:етанол (50:50, v/v). Одмерено је 100 mg инкапсулата, преливено са 1 mL растварача и вортексирано 1 min. Садржај је центрифугиран 5 min на 10.000 rpm, супернатант је профилиран кроз 0,22 µm шприц-филтер (Membrane Solutions, LLC, USA) и подвргнут даљој анализи, према Фолин–Чокалте методи, описаној у одељку 3.4.1.

ЕЕ је одређена према формули:

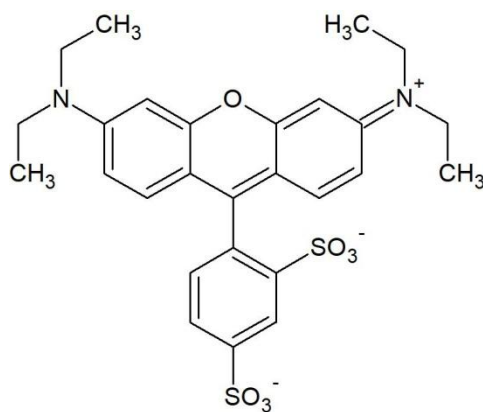
$$EE (\%) = \frac{TBC - SBC}{TBC} \times 100 (\%),$$

где разлика ТВС – SBC представља садржај биоактивних једињења у унутрашњости инкапсулата, такозвана *core* једињења (SBC, *енгл.* core bioactive compounds).

3.13. Одређивање антипролиферативне активности инкапсулата

Антипролиферативна активност инкапсулата и екстракта дрена, трњине и тропа вишње је испитана на хуманим ћелијама карцинома дебелог црева (HT-29; ECACC No. 91072201), карцинома дојке (MCF7; ECACC No. 86012803) и здравим ћелијама фибробласта плућа (MRC-5; ECACC No. 84101801).

За мерење вијабилности ћелија након третмана испитиваним узорцима, примењен је SRB тест (сулфородамин Б, *енгл.* sulforhodamine B). SRB је анјонска аминоксантенска боја (слика 3.8) која се електростатичким привлачним силама комплексира са базним остацима аминокиселина из протеина из ћелија, градећи коњуigate који флуоресцирају јарко црвено. (Skehan et al., 1990). Тест је модификован према Џетојевић-Simin et al. (2008).



Слика 3.8. Хемијска структура SRB боје

Гајење ћелијских линија

Ћелијске линије су узгајане у Дулбековој модификацији Игловог медијума (DMEM, *енгл.* Dulbecco's modified Eagle's medium) са 45 mg/mL глукозе, уз додатак 10% топлотом инактиваног феталног говеђег серума (FCS, *енгл.* heat-inactivated fetal calf serum), 100 IU/mL пеницилина и 100 µg/mL стрептомицина. Све испитиване ћелијске линије су узгајане залепљене за подлогу. Узгајане су у флашковима површине 25 cm², на 37 °C у атмосфери 5% CO₂, при високој влажности ваздуха. Пресађиване су два пута недељно. Једноћелијска суспензија је добијена третманом трипсином (1 mg/mL, активности 60 U/mg) са 0,4 mg/mL EDTA.

Узорци коришћени за антипролиферативне тестове

Узорци су растворени и разблажени у DMSO. Коначне концентрације узорака кретале су се у распону 0,0625–5 mg/mL, док је крајња концентрација DMSO била мање од 0,05% (v/v), чиме је избегнута могућност његовог утицаја на раст ћелија.

SRB тест

Ћелије су пресађене у микротитер плоче са 96 отвора. Густина ћелија је износила $4-8 \times 10^3$ ћелија по отвору, у запремини од 199 μL и преинкубиране су са комплетним медијумом уз додатак 5% FCS, на 37 °C током 24 h. Направљена је серија разблажења узорака и додати су у запремини од 1 μL по отвору. У контролну пробу је додат само растварач. Микротитер плоче су инкубиране на 37 °C још додатних 48 h (Ћетојевић-Simin et al., 2015). Раст ћелија је одређен колориметријским SRB тестом, према методи Skehan et al. (1990) модификованој према Ћетојевић-Simin et al. (2008). Ћелије су фиксирани 50% TCA (1 h, +4 °C), испране затим дестилованом водом и бојене 0,4% SRB реагенсом. Након 30 min стајања на собној температури, вишак боје је испран 1% сирћетном киселином. Боја која се везала за ћелијске протеине екстрахована је 10 mM Tris базом и апсорбанција је очитана на 540 nm (специфична таласна дужина за SRB) и 620 nm (референтна таласна дужина за уклањање апсорбанције позадине). Раст ћелија израчунат је у процентима, у поређењу са контролом, према формули:

$$\text{Раст ћелија (\%)} = \frac{A_{\text{узорка}}}{A_{\text{контроле}}} \times 100 (\%)$$

Третмани су испитани у четири понављања, а резултати су изражени као средња вредност \pm стандардна девијација (SD). Код узорака код којих је било могуће израчуната је IC₅₀ вредност, као концентрација екстракта или инкапсулата која инхибира раст 50 % ћелија.

3.14. Контролисано отпуштање активних супстанци из инкапсулата (*controlled release*)

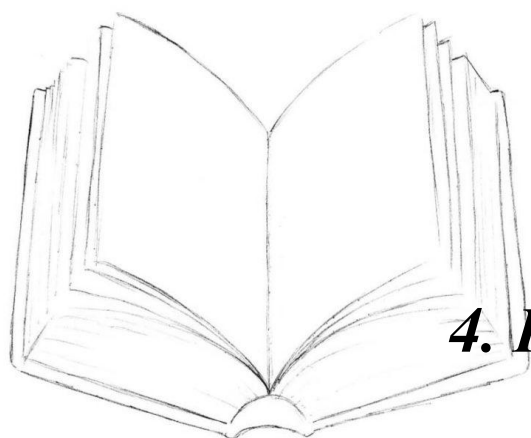
Отпуштање фенолних једињења (и иридоида код инкапсулата са екстрактом дрена) из инкапсулата је праћено тако што је одређена маса инкапсулата (0,5 g инкапсулата са халојзитом и 0,3 g инкапсулата са малтодекстрином и β-циклодекстрином) стављена у мембране за дијализу које су пропустљиве за молекуле масе 6-8 kD. Мембране су прво натопљене са 1 mL дестиловане воде како би се отвориле. Након стављања узорка, штипаљкама су затворене са оба краја и потопљене у 24 mL дестиловане воде. Цео систем је стављен на мешање брзином од 70 rpm и 37 °C. Сваког сата је узимано по 200 μL раствора за HPLC анализу и додавано 200 μL воде да би укупна запремина остала непромењена.

Количина ослобођених фенолних и иридоидних једињења је одређена HPLC-PDA методом, описаном у одељку 3.3. Количина ослобођених једињења је израчуната према формули:

$$Cn' = Cn + \frac{V}{V_0} \times \sum_{i=0}^{n-1} Ci,$$

где Cn' представља кориговану концентрацију, Cn је измерена концентрација узета у n сату, V је запремина узорка која је узета за анализу, V_0 је укупна запремина, а Ci концентрација измерена у претходном сату, односно времену i ($i < n$) (Lisuzzo et al., 2019a).

Коначан резултат за количину отпуштеног једињења је изражен у процентима, у односу на његову укупну количину у узорку. Укупна количина једињења у узорку (која је представља 100 %) измерена је након екстракције системом растварача и начином који је објашњен у одељку 3.12.4. за екстракцију укупних биоактивних једињења, *Укупни садржај биоактивних једињења* (ТВС, енгл. Total Bioactive Compounds).



4. Резултати и дискусија

У оквиру ове докторске дисертације је урађена фитохемијска карактеризација одабраних плодова воћа родова *Prunus* и *Cornus* и испитан је њихов биоактивни потенцијал. Фитохемијска карактеризација је обухватила одређивање фенолног профила свих узорака воћа и иридоидног профила плодова дрена, као и квантификацију ових једињења помоћу UPLC-Q-TOF-MS/MS и HPLC-PDA метода. У погледу биоактивног потенцијала воћа су испитани антиоксидантни капацитет, антипролиферативни ефекат, способност инхибиције ензима α -амилазе, α -глукозидазе и хумане дипептидил пептидазе III (DPP III). Добијени подаци о фитохемијском саставу и биолошким активностима су међусобно упоређени и обрађени статистичком PCA методом са циљем да се установи која једињења највише доприносе појединим активностима. Фенолна и иридоидна једињења идентификована у испитаним узорцима су тестирана методом молекулског докинга како би се одредио афинитет везивања појединачних једињења за α -амилазу, α -глукозидазу и DPP III ензим, односно њихова способност инхибиције ових ензима.

Антиоксидантни капацитет екстраката воћа

Антиоксидантни капацитет екстраката воћа је процењен на основу три теста: FC теста (Фолин-Чокалте редукциони капацитет), FRAP теста (способност редукције гвожђе(III)-јона) и DPPH теста (способност неутралисања DPPH радикала). Сва три примењена теста су базирана на трансферу електрона, а код DPPH теста се одвија и трансфер водоника (Hang et al., 2005). Иако су механизми одвијања ових тестова врло слични, реакциони услови се разликују према рН средине у којој се одигравају, па се спрам тога разликује и реактивност испитиваних узорака. FC тест се одвија у базној, FRAP тест у киселој, а DPPH тест у неутралној средини.

Антипролиферативна активност

Антипролиферативна активност воћа је испитана на HT-29 ћелијама, које се користе као модел за *in vitro* истраживања колоректалног карцинома. Карцином дебелог црева је један од водећих узрочника смртности широм света (Siegel et al., 2014). С обзиром да је дигестивни систем најизложенији директном утицају продуката унесених путем хране, све више се истражује примена природних производа у хемотерапеутске сврхе због њихове релативне нетоксичности (Lefranc et al., 2017; Curti et al., 2017).

Способност инхибиције ензима α -амилазе и α -глукозидазе

Код дигестије угљених хидрата важну улогу имају амилазе и глукозидазе. То су ензими који у дигестивном тракту разграђују сложене угљене хидрате до глукозе, која даље бива транспортована у крвоток. Обе ове групе ензима цепају искључиво α -1,4 гликозидне везе у угљенохидратним молекулима. Ензими α -амилаза и α -глукозидаза су препознати као терапеутске мете за модулацију постпрандијалне хипергликемије, која је најранији метаболички поремећај који се јавља код типа 2 дијабетеса. Инхибицијом ових

ензима одлаже се дигестија угљених хидрата и њихова апсорпција, што знатно снижава постпрандијалну хипергликемију (Lebovitz, 1998; Wang et al, 2015).

Прекомерна инхибиција ензима који хидролизују угљене хидрате, односно већег броја ових ензима, доводи до нагомилавања неразграђених полимера, што може да узрокује надимање и друге пробавне тегобе (Panahi et al., 2013). Из овог разлога се све више тежи проналаску инхибитора који имају већи афинитет за један од хидролизујућих ензима. Превасходно се трага за инхибиторима специфичним за α -глукозидазу, јер поред улоге у дигестији угљених хидрата, α -глукозидаза има важну улогу у модификацији гликопротеина, тј. њиховом превођењу у активну форму. С обзиром да се гликопротеини налазе у овојници вируса са додатним омотачем (*енгл.* envelope viruses) и да су један од кључних фактора за њихову инфективност, инхибиција α -глукозидазе представља један од начина борбе са овим типом вируса, међу којима су HIV вирус, вирус хепатитиса и други (Dwek et al., 2002; Panahi et al., 2013; Chang et al., 2013).

Способност инхибиције ензима хумане дипептидил пептидазе III (DPP III)

DPP III је цинк-зависни ензим који одваја дипептиде са N-краја различитих биолошки активних пептида. Тачна физиолошка улога DPP III није још увек тачно одређена, али се зна да је овај ензим укључен у процесе модулације осећаја бола и да има улогу код малигних обољења, као што је рак материце. Без обзира на непотпуну истраженост улоге DPP III, веома активно се трага за инхибиторима овог ензима (Agić et al., 2017).

Истраживачи Pang et al. (2016) су указали на потенцијалну улогу овог ензима у регулацији крвног притиска, док су Deniau et al. (2020) установили да повећање DPP III у крвној плазми може да буде потенцијални фактор депресије миокарда повезан са смртношћу код пацијената са тешком срчаном инсуфицијенцијом. Они су такође показали да инхибиција циркулишуће DPP III побољшава хемодинамику на моделу мишева са срчаном инсуфицијенцијом, сугеришући да DPP III може да буде нови биолошки маркер или биолошка мета за овај поремећај.

4.1. Фитохемијска карактеризација и биолошке активности воћа рода *Prunus*

4.1.1. Фитохемијска карактеризација воћа рода *Prunus*

У екстрактима воћа рода *Prunus* квалитативни садржај фенолних једињења је одређен UPLC-MS/MS техником, а квантификација једињења помоћу HPLC-PDA методе. Једињења су идентификована на основу њихових ретенционих времена, редоследа елуирања, спектралних карактеристика појединачних пикова (UV-Vis и MS), поређењем спектралних података са стандардним једињењима и литературним подацима.

У табели у Прилогу 1. су дати подаци о идентификованим једињењима: ретенциона времена у UPLC анализи (t_R), јони прекурсор ($[M-H]^-$ или $[M+H]^+$), јони продукти и њихов интензитет (MS/MS intensity) и максималне таласне дужине из UV-Vis спектра (λ_{max}). У Прилогу 2. су приказани хроматограми UPLC анализе на 280 nm, 320 nm и 360 nm, на основу којих су одређене фенолне киселине и флавоноидна једињења, а у Прилогу 3. хроматограми HPLC-PDA квантитативне анализе антоцијана, снимљени на 520 nm.

У испитиваним узорцима је детектовано укупно 56 фенолних једињења (Прилог 1). Квантитативно су одређена 34 фенолна једињења, од којих су 13 једињења деривати фенолних киселина, 12 флавонолних гликозида и 1 агликон (кверцетин) и 8 антоцијана. Садржај једињења је изражен у mg једињења на 100 g лиофилизованог воћа (mg/100 g LF) и приказан је у табели 4.1. На сликама 4.1a, 4.1b и 4.1c су редом графички приказани садржаји фенолних киселина, флавонола и антоцијана, како би се визуелно лакше уочила доминантна једињења у испитиваним екстрактима.

Према укупном садржају фенолних једињења, који је израчунат као збир свих квантификованих једињења, значајно се истичу магрива са 974,79 mg/100 g LF, затим степска вишња са 730,81 mg/100 g LF, трњина са 603,33 mg/100 g LF, дивља трешња са 572,94 mg/100 g LF и вишња са 445,01 mg/100 g LF. Веома низак садржај фенолних једињења у поређењу са осталим воћем је одређен код кајсије, црвеног и црвенолисног ринглова (24,07; 10,75 и 8,76 mg/100 g LF). Садржај и класе фенолних једињења у испитаним узорцима значајно варирају, а сваку од испитиваних врста карактерише већа количина одређеног једињења.

Фенолне киселине

Од фенолних киселина су детектоване *trans*-циметне киселине и њихови деривати, и то деривати кафене, ферулне и кумаринске киселине. Према укупном садржају фенолних киселина су се највише истакле магрива, трњина и степска вишња са 374,65; 365,50 и 310,86 mg/100 g LF.

Деривати кафене киселине

Најзаступљеније фенолне киселине у испитиваним врстама рода *Prunus* су кафеоилхинске киселине и њихови деривати. Фрагментацијом кафеоилхинских киселина (CQA) у негативном моду из полазног једињења са m/z 353, ¹([CQA-H]⁻), су добијени јони m/z 179 ²([CA-H]⁻) и m/z 135 ([CA-CO₂-H]⁻), чији се интензитет разликује у зависности од положаја везивања кафене киселине за хинску киселину.

Изузев код магриве и степске вишње, 3-*O*-кафеоилхинска (неохлорогенска) киселина је присутна код свих осталих врста. Њен садржај је највећи код тургуње, влашкаче и белошљиве (156,92; 70,59 и 69,62 mg/100 g LF), затим код брескве и трњине (36,93 и 21,50 mg/100 g LF). Највећи садржај 5-*O*-кафеоилхинске (хлорогенске) киселине је одређен код брескве, белог ринглова и тургуње (22,42; 10,08 и 9,64 mg/100 g LF).

У узорцима су у великој мери присутни метил- или етил-естри кафеоилхинских киселина. Ови естри су природни конституенти биљака (Кауано et al., 2004), али могу и да настану приликом дуготрајних екстракција и изолација једињења, поготово када се користи метанол (Jaiswal & Kuhnert, 2011). Метил-*O*-кафеоилхинати у масеном спектру у негативном моду имају m/z 367, а приликом фрагментације се отцепљује метил-хинат и даљим губитком малих молекула (H₂O, CO₂, CO) се детектују јони са m/z 179 ([CA-H]⁻), m/z 161 ([CA-H₂O-H]⁻), m/z 135 ([CA-CO₂-H]⁻), m/z 133 ([CA-H₂O-CO-H]⁻), чија заступљеност зависи од полазног изомера (Jaiswal & Kuhnert, 2011).

По количинама садржаним у појединим врстама воћа, истичу се метил-естри неохлорогенске и хлорогенске киселине (метил-3-*O*-кафеоилхинат и метил-5-*O*-кафеоилхинат). Метил-3-*O*-кафеоилхинат је доминантно присутан код трњине (271,04 mg/100 g LF), а висок садржај овог једињења је одређен и код дивље трешње (142,00 mg/100 g LF), влашкаче (105,34 mg/100 g LF) и шљиве (86,87 mg/100 g LF). У високим количинама је овај дериват био присутан и код тургуње (58,25 mg/100 g LF), белошљиве (42,45 mg/100 g LF) и вишње (22,53 mg/100 g LF).

Најбогатија метил-5-*O*-кафеоилхинатом је била степска вишња (147,10 mg/100 g LF), затим се по садржају овог једињења истакла вишња (43,17 mg/100 g LF), а после ње дивља трешња (10,13 mg/100 g LF). Метил-5-*O*-кафеоилхинат је у мањим концентрацијама детектован и у екстрактима шљиве, влашкаче, тургуње, белошљиве, црвеног и белог ринглова, трешње и трњине.

У литературним подацима се истиче да у коштичавом воћу садржај 3-*O*-кафеоилхинске киселине доминира над садржајем 5-*O*-кафеоилхинске киселине (Clifford, 2000a; Gironés-Vilarplana et al., 2014). Резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације су у сагласности са наведеном латературом, уз неколико изузетака. Код облачинске вишње је доминантност једињења била обрнута, код степске вишње је једино одређен метил-5-*O*-кафеоилхинат, а у екстракту магриве уопште нису детектовани кафеоил-деривати.

¹ CQA – кафеоилхинска киселина

² CA – кафена киселина

Деривати ферулне киселине

Ферулна киселина је присутна једино код степске вишње, у облику гликозида, хексозида (65,93 и 15,30 mg/100 g LF). Идентификација је извршена на основу фрагмената карактеристичних масених јединица m/z 193 за $^1[\text{FA}-\text{H}]^-$, 149 за $[\text{FA}-\text{CO}_2-\text{H}]^-$ и фрагмента m/z 134 ($[\text{FA}-\text{CO}_2-\text{CH}_3-\text{H}]^+$), који настаје раскидањем CH_3-O везе и губитком метил-радикала, односно 15 m/z јединица. У досадашњој литератури не постоје забележени подаци о одређивању фенолних киселина, нити других класа фенолних једињења у плодовима степске вишње.

Деривати кумаринске киселине

Магрива је јединствена по присуству деривата *m*-кумаринске киселине. Ова воћна врста се истакла по веома високом садржају хексозида *m*-кумаринске киселине (374,65 mg/100 g LF). Поред хексозида су присутни и дихексозиди *m*-кумаринске киселине (Прилог 1). У масеним спектрима (MS) ових једињења су детектовани јони са m/z 325 и m/z 487, што одговара масама $^2[\text{CoA}-\text{хексоза}-\text{H}]^-$ и $[\text{CoA}-\text{хексоза}-\text{хексоза}-\text{H}]^-$, а фрагментацијом су добијени јон m/z 163 који одговара кумаринској киселини и јон m/z 119 који настаје након декарбоксилације киселине, у виду губитка CO_2 , $[\text{CoA}-\text{CO}_2-\text{H}]^-$. С обзиром да ови фрагментни јони могу да потичу од било које кумаринске киселине (*o*-, *m*- или *p*-), за идентификацију киселине је битан и UV спектар. Према UV спектралним карактеристикама детектованих једињења и поређењем са снимљеним UV спектрима стандарда *o*-, *m*- и *p*-кумаринске киселине (Прилог 4), уочава се да су у узорку магриве испитиваном у оквиру ове дисертације у питању деривати *m*-кумаринске киселине.

Велика недоумица је постојала око спектралне идентификације деривата *m*-кумаринске киселине. Наиме, у литератури нема много података о фенолним једињењима одређеним у магриви. Једино у истраживањима Ieri et al. (2012) и Blando et al. (2015) су тентативном анализом одређени деривати *o*-кумаринске киселине, са доминантним присуством *o*-кумаринска киселина-2-*O*-глукозида. Иако се у свом истраживању Ieri et al. (2012) ослањају преваходно на UV спектар, аутори наводе да гликозиловање *o*-хидроксилне групе доводи до померања λ_{max} , односно у овом случају тзв. *shoulder*-а ка нижим таласним дужинама, те да је реч о *o*-деривату. За овакву интерпретацију резултата, они се позивају на истраживање Määttä et al. (2003), где је забележено померање λ_{max} ка нижим таласним дужинама, али код 4-*O*-глукозида *p*-кумаринске и ферулне киселине. Међутим, код осталих гликозидних деривата ових киселина није било никаквих померања у UV спектру у поређењу са спектрима чистих киселина. За разјашњење ове недоумице и утврђивање тачне структуре доминантних деривата кумаринске киселине у плодовима магриве су неопходне додатне експерименталне анализе.

¹ FA – ферулна киселина

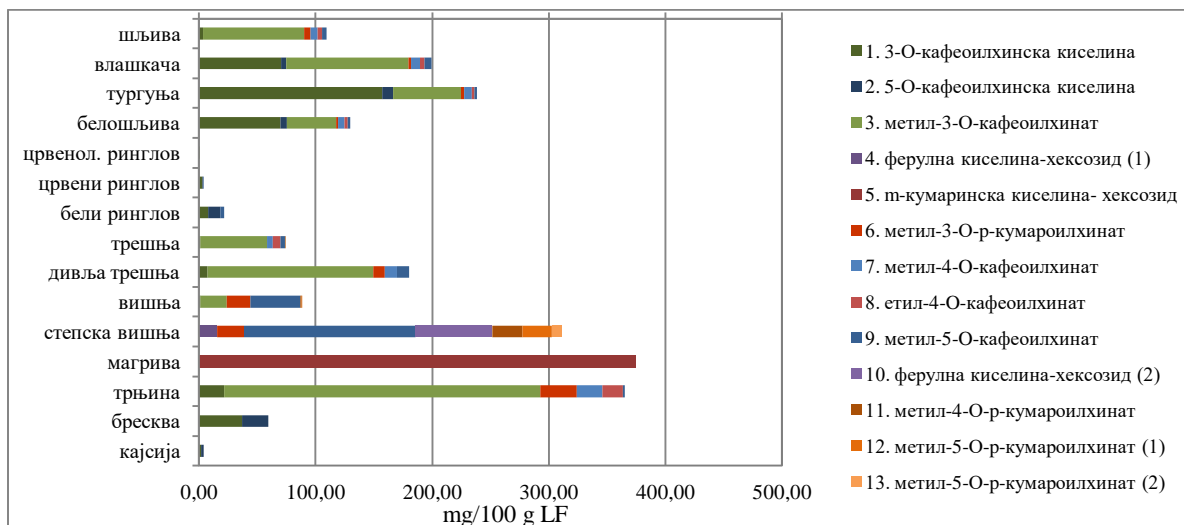
² CoA – кумаринска киселина

Табела 4.1. Садржај фенолних једињења у екстрактима воћа рода *Prunus* (изражен у mg једињења/100 g лиофилизованог воћа)

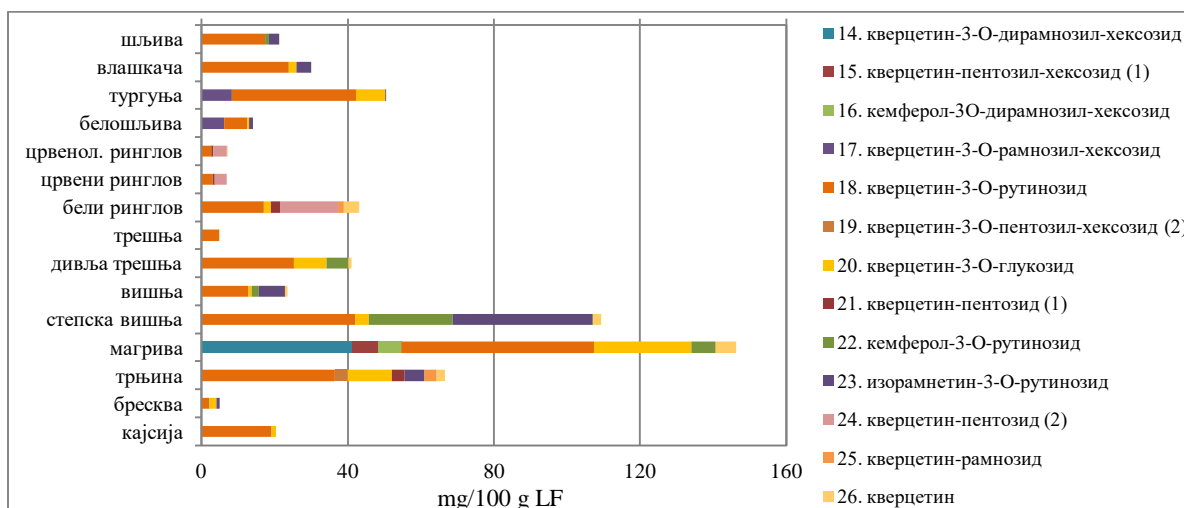
| Бр. | Једињење | шљива (<i>P. domestica</i>) | вљашкача (<i>P. domestica</i>) | тургуња (<i>P. insititia</i>) | белошљива (<i>P. insititia</i>) | црвенолисни ринглов (<i>P. pissardi</i>) | црвени ринглов (<i>P. cerasifera</i>) | бели ринглов (<i>P. cerasifera</i>) | гајена трешња (<i>P. avium</i>) | дивља трешња (<i>P. avium</i>) | облачнска вишња (<i>P. cerasus</i>) | степска вишња (<i>P. fruticosa</i>) | магрива (<i>P. mahaleb</i>) | трњина (<i>P. spinosa</i>) | бресква (<i>P. persica</i>) | кајсија (<i>P. armeniaca</i>) |
|-----|---|----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|--|--|--|--------------------------------------|-------------------------------------|---|--|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| 1. | 3- <i>O</i> -кафеоилхинска киселина | 3,39 ^{efg} | 70,59 ^b | 156,92 ^a | 69,62 ^b | 0,79 ^g | 2,87 ^{fg} | 7,88 ^e | 1,38 ^g | 7,27 ^{ef} | 1,12 ^g | - | - | 21,50 ^d | 36,93 ^c | 1,50 ^g |
| 2. | 5- <i>O</i> -кафеоилхинска киселина | - | 3,90 ^d | 9,64 ^b | 5,49 ^c | - | 0,74 ^f | 10,08 ^b | - | - | - | - | - | - | 22,42 ^a | 2,21 ^e |
| 3. | метил-3- <i>O</i> -кафеоилхинат (изомер 2) | 86,87 ^d | 105,34 ^c | 58,25 ^e | 42,45 ^f | - | - | - | 56,68 ^e | 142,00 ^b | 22,53 ^g | - | - | 271,04 ^a | - | - |
| 4. | ферулна киселина-хексозид | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 15,30 ^a | - | - | - | - |
| 5. | <i>m</i> -кумаринска киселина-хексозид (изомер 2) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 374,65 ^a | - | - | - |
| 6. | метил-3- <i>O-p</i> -кумароилхинат (изомер 2) | 5,25 ^e | 2,24 ^f | 2,41 ^f | 1,58 ^f | - | - | - | - | 10,05 ^d | 20,15 ^c | 23,46 ^b | - | 31,33 ^a | - | - |
| 7. | метил-4- <i>O</i> -кафеоилхинат | 6,07 ^d | 7,35 ^c | 6,91 ^c | 5,75 ^{de} | - | - | - | 5,36 ^e | 10,58 ^b | - | - | - | 22,06 ^a | - | - |
| 8. | етил-4- <i>O</i> -кафеоилхинат | 3,79 ^c | 3,95 ^c | 2,08 ^d | 2,52 ^d | - | - | - | 6,59 ^b | - | - | - | - | 17,48 ^a | - | - |
| 9. | метил-5- <i>O</i> -кафеоилхинат | 3,81 ^{de} | 6,18 ^d | 2,29 ^e | 2,18 ^e | - | 0,25 ^e | 3,54 ^{de} | 3,48 ^{de} | 10,13 ^c | 43,17 ^b | 147,10 ^a | - | 2,10 ^e | - | - |
| 10. | ферулна киселина-хексозид | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 65,93 ^a | - | - | - | - |
| 11. | метил-4- <i>O-p</i> -кумароилхинат (изомер 2) | - | - | - | - | - | - | - | 0,75 ^b | - | 0,90 ^b | 25,37 ^a | - | - | - | - |
| 12. | метил-5- <i>O-p</i> -кумароилхинат (изомер 1) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Tr | 25,37 ^a | - | - | - | - |
| 13. | метил-5- <i>O-p</i> -кумароилхинат (изомер 2) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 8,32 ^a | - | - | - | - |
| | Укупне фенолне киселине | 109,18^g | 199,56^d | 238,51^d | 129,59^f | 0,79^k | 3,86^{jk} | 21,50^j | 74,24^{gh} | 180,02^e | 87,88^h | 310,86^c | 374,65^a | 365,50^b | 59,35ⁱ | 3,71^{ik} |
| 14. | кверцетин-3- <i>O</i> -дирамнозил-хексозид | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 41,23 ^a | - | - | - |
| 15. | кверцетин-3- <i>O</i> -пентозил-хексозид (1) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 7,09 ^a | - | - | - |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 16. | кемферол-3- <i>O</i> -дирамнозил-хексозид | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 6,39 ^a | - | - | - |
| 17. | кверцетин-3- <i>O</i> -рамнозил-хексозид | - | - | 8,37 ^a | 6,22 ^b | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 18. | кверцетин-3- <i>O</i> -рутинозид | 17,46 ^f | 23,91 ^e | 33,93 ^d | 6,23 ^h | 2,73 ^{ij} | 3,05 ^{ij} | 16,96 ^f | 4,87 ^{hi} | 25,28 ^e | 12,83 ^g | 42,03 ^b | 52,69 ^a | 36,50 ^c | 2,10 ^{ij} | 19,17 ^f |
| 19. | кверцетин-3- <i>O</i> -пентозил-хексозид (2) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 3,41 ^a | - | - |
| 20. | кверцетин-3- <i>O</i> -глюкозид | - | 2,13 ^f | 8,01 ^d | 0,63 ^h | Тр | Тр | 1,94 ^{fg} | - | 8,86 ^c | 0,84 ^b | 3,73 ^e | 26,53 ^a | 12,12 ^b | 1,91 ^{fg} | 1,19 ^{gh} |
| 21. | кверцетин-пентозид (1) | - | - | - | - | 0,54 ^c | 0,46 ^c | 2,74 ^b | - | - | - | - | - | 3,58 ^a | - | - |
| 22. | кемферол-3- <i>O</i> -рутинозид | 0,92 ^e | - | Тр | - | - | - | - | - | 6,04 ^c | 1,99 ^d | 22,96 ^a | 6,77 ^b | - | - | - |
| 23. | изорамнетин-3- <i>O</i> -рутинозид | 2,83 ^d | 3,91 ^c | Тр | 0,98 ^e | - | Тр | - | - | - | 7,14 ^b | 38,27 ^a | - | 5,42 ^b | 0,88 ^e | - |
| 24. | кверцетин-пентозид (2) | - | - | - | - | 3,61 ^b | 3,38 ^c | 15,67 ^a | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 25. | кверцетин-рамнозид | - | - | - | - | Тр | - | 1,66 ^b | - | - | - | - | - | 3,30 ^a | - | - |
| 26. | кверцетин | - | - | - | - | - | - | 4,16 ^b | Тр | 0,83 ^c | 0,70 ^e | 2,31 ^c | 5,57 ^a | 2,21 ^d | - | - |
| | Укупни флавоноли | 21,21^g | 29,95^f | 50,30^d | 14,06^b | 6,88ⁱ | 6,89ⁱ | 43,13^c | 4,87ⁱ | 41,01^e | 23,50^g | 109,30^b | 146,27^a | 66,53^c | 4,90ⁱ | 20,36^g |
| 27. | цијанидин-3- <i>O</i> -софорозид | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 9,92 ^a | 4,68 ^b | - | - | - | - |
| 28. | цијанидин-3- <i>O</i> -(2'-глюкозил)рутинозид | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 207,15 ^a | 173,05 ^b | - | - | - | - |
| 29. | цијанидин-3- <i>O</i> -глюкозид | - | - | 2,23 ^d | - | - | - | - | 2,02 ^d | 67,67 ^c | 3,02 ^d | 3,62 ^d | 195,23 ^a | 58,35 ^b | Тр | - |
| 30. | цијанидин-3- <i>O</i> -(2'-ксилозил)рутинозид | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 5,47 ^b | 2,14 ^c | 86,16 ^a | - | - | - |
| 31. | цијанидин-3- <i>O</i> -рутинозид | - | 1,10 ^f | 3,67 ^f | - | 1,09 ^f | Тр | - | 41,68 ^e | 267,40 ^a | 98,14 ^d | 116,39 ^c | 172,48 ^b | 74,25 ^d | - | - |
| 32. | пеларгонидин-3- <i>O</i> -рутинозид | - | - | - | - | - | - | - | 0,68 ^b | 4,45 ^a | - | - | - | - | - | - |
| 33. | пеонидин-3- <i>O</i> -глюкозид | - | - | Тр | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 8,34 ^a | - | - |
| 34. | пеонидин-3- <i>O</i> -рутинозид | Тр | 2,65 ^{de} | 2,32 ^e | - | - | - | - | 2,76 ^d | 12,38 ^b | 9,95 ^c | 10,77 ^c | - | 30,36 ^a | - | - |
| | Укупни антоцијани | Тр | 3,76^g | 8,22^g | - | 1,09^g | Тр | - | 47,14^f | 351,90^b | 333,64^c | 310,65^d | 453,88^a | 171,29^e | Тр | - |
| | УКУПНО | 130,39^g | 233,27^f | 297,03^e | 143,65^g | 8,76ⁱ | 10,75ⁱ | 64,63^b | 126,24^g | 572,94^c | 445,01^d | 730,81^b | 974,79^a | 603,33^c | 64,24^h | 24,07ⁱ |

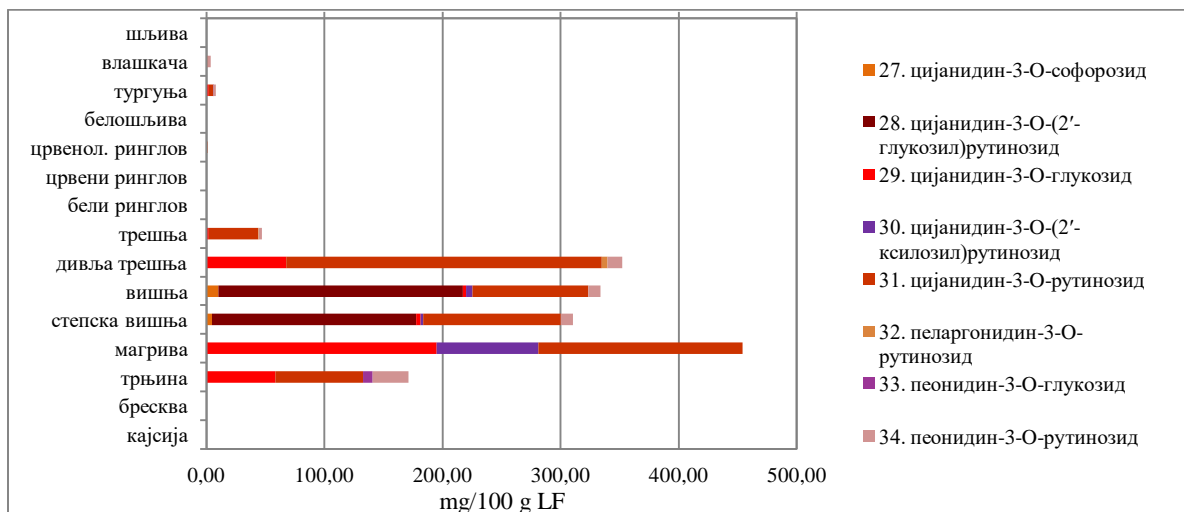
Резултати су изражени у mg једињења/100 g лиофилизованог воћа (mg/100 g LF). Стандардна девијација је износила мање од 1 %, па су, због боље прегледности резултата, у табели изостављене тачне вредности. Различитим словима су означене вредности које се статистички значајно разликују на основу *Duncan*-овог теста ($P < 0,01$).



Слика 4.1а. Графички приказ садржаја фенолних киселина у испитиваним врстама рода *Prunus*



Слика 4.1б. Графички приказ садржаја флавонолних једињења у испитиваним врстама рода *Prunus*



Слика 4.1в. Графички приказ садржаја антоцијана у испитиваним врстама рода *Prunus*

Од кумаринских киселина, у природи је највише заступљена *p*-кумаринска киселина и за њу је у литератури доступно највише података, што није случај са *o*- и *m*-дериватима. Осим за магриву, у досадашњим литературним подацима не постоје забележени подаци о присуству деривата нити *o*-, нити *m*-кумаринске киселине у другим врстама рода *Prunus*. У плодовима шест различитих врста бобичастог воћа, боровнице (*Vaccinium myrtillus*), црног дуда (*Morus nigra*), сибирске боровнице (*Lonicera caerulea* var. *camtschatica* SeVast), дивље мушмуле (*Amelanchier ovalis*), купине (*Rubus plicatus*) и црне рибизле (*Ribes nigrum*) је помоћу гасно-масене спектрометрије (GC-MS) идентификована *m*-кумаринска киселина као доминантна фенолна киселина. Поред ње, *p*-кумаринска киселина је била такође доминантно присутна у свим испитиваним бобичастим плодовима, једино је код боровнице и у занемарљиво малој количини код црног дуда одређена *o*-кумаринска киселина (Zadernowski et al., 2005).

Деривати *p*-кумаринске киселине који су идентификовани у анализираним екстрактима су метил-естри 3-*O*-, 4-*O*- и 5-*O*-*p*-кумароилхинске киселине. Метил-3-*O*-*p*-кумароилхинат је идентификован на основу масеног спектра и истраживања Jaiswal et al., (2013). У MS спектру је детектован пик са m/z 351, а у MS² спектру је детектован фрагмент са m/z 145 ($[p\text{-CoA-H}_2\text{O-H}]^-$), који настаје након губитка метил-хината ($\Delta m/z = 206$) и фрагмент са m/z 117 ($[p\text{-CoA-CO-H}]^-$) (Прилог 1). Идентични јонски фрагменти настају код метил-4-*O*-*p*-кумароилхинске киселине, док приликом фрагментације метил-5-*O*-*p*-кумароилхинске киселине настаје и фрагмент са m/z 163 ($[p\text{-CoA-H}]^-$) (Jaiswal & Kuhnert, 2011).

Метил-3-*O*-*p*-кумароилхинат је квантификован код шљиве, влашкаче, тургуње, белошљиве, степске и облачинске вишње, дивље трешње и трњине, а у екстрактима степске и облачинске вишње су детектовани и метил-4-*O*-*p*-кумароилхинат и метил-5-*O*-*p*-кумароилхинат. Ова једињења су детектовали и Alrgei et al. (2015) у свом истраживању различитих генотипова облачинске вишње из колекционог засада на огледном добру Радмиловац, који припада Пољопривредном факултету Универзитета у Београду.

Флавоноли

Од укупно 13 квантификованих флавонолних једињења, 9 једињења су били гликозиди кверцетина, а детектован је и агликон (табела 4.1). Агликон кверцетин се приликом негативне јонизације детектује на m/z 301¹ ($[Q-H]^-$), а овај фрагментни јон је детектован и у MS² спектрима свих гликозида кверцетина (Прилог 1).

Кверцетин-3-*O*-рутинозид (рутин) је заступљен код свих испитиваних врста рода *Prunus*. Идентификован је на основу преклапања ретенционог времена са стандардом и на основу масеног спектра у којем се детектује губитак $\Delta m/z$ 308, што одговара рутинози.

¹ Q – кверцетин

Највећи садржај је одређен код магриве и степске вишње (52,69 и 42,03 mg/100 g LF), а најмањи код брескве, свега 2,10 mg/100 g LF.

Кверцетин-3-*O*-глукозид се у масеном спектру идентификује на основу губитка $\Delta m/z$ 162, што одговара хексозама, а поређењем са стандардом је утврђено да је у питању глукозид. Заступљен је код већине анализираних врста, једино није детектован у узорку трешње и шљиве и само у траговима је нађен у екстракту црвенолисног и црвеног ринглова. Поред ових деривата кверцетина, одређени су и различити деривати са пентозама, хексозама и рамнозом као шећерном јединицом, међутим тачна идентификација свих ових једињења није била могућа на основу спроведене HPLC анализе.

Осим деривата кверцетина, рутинозиди кемферола и изорамнетина су одређени код неколико анализираних врста. Након фрагментације и губитка шећерних остатака се детектују агликони карактеристичних m/z , кемферол са m/z 285 ¹ ([Kf-H]⁻) и изорамнетин са m/z 315 ² ([Is-H]⁻). Најбогатија овим једињењима је била степска вишња са 22,96 mg/100 g LF кемферол-3-*O*-рутинозида и 38,27 mg/100 g LF изорамнетин-3-*O*-рутинозида.

Према укупном садржају флавонолних једињења, од осталих узорака се значајно истичу магрива са 146,27 mg/100 g LF, затим степска вишња са 109,30 mg/100 g LF и трњина са 66,53 mg/100 g LF.

Добијени подаци за флавонолни профил су у сагласности са онима који се могу пронаћи у литератури за различите врсте рода *Prunus*. Резултати других аутора такође указују да у плодовима шљиве, вишње, трешње, трњине, брескве, кајсије и осталих врста, попут јапанске шљиве и јапанске кајсије, претежно доминирају деривати кверцетина, кемферола и изорамнетина (Jang et al., 2018; Picariello et al., 2016).

У истраживању спроведеном на различитим италијанским сортама трешње (*Rainier*, *Napoleon/Bigarreau* и *Bing*) и вишње (*Montmorency* или „*amarene*“ и тамно-црвене *Morello*), Picariello et al. (2016) аутори истичу да се трешња и вишња могу разликовати на основу присуства кемферол-3-*O*-рутинозида, који су они детектовали само у сортама вишње. Резултати ове докторске дисертације потврђују присуство кемферол-3-*O*-рутинозида у плодовима вишње, и гајене (облачинске), и степске вишње, као и одсуство овог једињења код гајене трешње (сорта *New Star*). Међутим, кемферол-3-*O*-рутинозид је детектован код дивље трешње, па би требало да се истраже и друге сорте трешње како би се утврдило присуство или одсуство овог једињења. На тај начин би могло да се установи да ли би кемферол-3-*O*-рутинозид могао да има улогу хемотаксономског маркера за разликовање дивљих од гајених генотипова трешње.

¹ Kf – изорамнетин

² Is – изорамнетин

Антоцијани

Антоцијани су, као пигменти који дају црвено-љубичасту боју, најзаступљенији у овако обојеном воћу. Идентификовани и квантификовани су код влашкаче, тургуње, црвенолисног ринглова, трешње, трњине, степске и облачинске вишње, дивље трешње и магриве (табела 4.1). Код осталих воћних врста (шљиве, црвеног и белог ринглова, брескве, кајсије, белошљиве) су присутни у траговима или испод границе детекције. Антоцијани су сигурно присутни и у овом воћу и то превасходно у покожици, као што сведоче резултати других аутора (Jang et al., 2018; Стојановић, 2014), али пошто је плод за анализу узиман у целости, мали удео је чинила покожица, те је и количина антоцијана била недовољна за детекцију.

У испитиваним воћним врстама су претежно заступљени различити гликозиди цијанидина и пеонидина. Када је реч о дериватима цијанидина, присутни су моно, ди и три-гликозидни деривати, идентификовани на основу одговарајућих m/z молекулских јона и m/z агликона ¹([Су+Н]⁺) у вредности од 287. Деривати пеонидина су у MS² спектру дали фрагментне јона са m/z 301 након губитка од 162 и 308 m/z јединица, што одговара пеонидин-3-*O*-глукозиду и пеонидин-3-*O*-рутинозиду. Једино је у узорцима трешња, гајене и дивље, идентификован и квантификован пеларгонидин-3-*O*-рутинозид. Овај молекул је у позитивном ESI моду наградио молекулски јон ([М+Н]⁺) са m/z = 595, а након фрагментације је детектован пеларгонидин на m/z 287 ²([Pg+Н]⁺) (Прилог 1).

Међу најзаступљенијим и најдоминантнијим антоцијанима у анализираним узорцима је цијанидин-3-*O*-рутинозид. Највећи садржај цијанидин-3-*O*-рутинозида је одређен код дивље трешње у вредности од 267,40 mg/100 g LF и код магриве, где је износио 172,48 mg/100 g LF. Затим следе степска вишња, облачинска вишња и трњина са вредностима око 100 mg/100 g LF, гајена трешња са 41,68 mg/100 g LF, а код тургуње, влашкаче, црвенолисног и црвеног ринглова је детектован у веома ниском садржају или у траговима.

У плодовима трњине, гајене трешње, дивље трешње, степске вишње, облачинске вишње, тургуње и влашкаче је квантификован пеонидин-3-*O*-рутинозид, али је његов садржај био мањи у поређењу са цијанидин-3-*O*-рутинозидом. Најбогатија садржајем овог једињења је била трњина, са 30,36 mg/100 g LF. Затим су следиле дивља трешња, степска и облачинска вишња, са по 12,38, 10,77 и 9,95 mg/100 g LF, а потом гајена трешња, тургуња и влашкоча са свега 2 до 3 mg/100 g LF.

Код већине испитиваних врста је одређен и цијанидин-3-*O*-глукозид. Садржај овог једињења је био највећи код магриве (195,23 mg/100 g LF), а затим код дивље трешње и трњине (67,67 и 58,35 mg/100 g LF). Цијанидин-3-*O*-глукозида је одређен и код тургуње, гајене трешње, степске и облачинске вишње, али је код ових воћних врста његов садржај био веома низак и износио је између 2 и 4 mg/100 g LF.

У истраживању полифенолног профила различитих сорти трешње и вишње, Picariello et al. (2016) су међу молекулима антоцијана идентификовали цијанидин-3-*O*-(2'-

¹ Су – цијанидин

² Pg – пеларгонидин

ксилозил)рутинозид као потенцијални хемотаксономски маркер присутан само у сортама вишње. У оквиру ове докторске дисертације цијанидин-3-*O*-(2'-ксилозил)рутинозид је идентификован код облачинске и степске вишње (5,47 и 2,14 mg/100 g LF), али је његово присуство у значајно већем садржају забележено и код магриве (86,16 mg/100 g LF), што указује на сродност ових воћних врста. Доминантно присуство овог једињења, цијанидин-3-*O*-глукозида и цијанидин-3-*O*-рутинозида у магриви су забележили и Ieri et al. (2012) и Blando et al. (2015).

Једино су у плодовима облачинске и степске вишње квантификовани цијанидин-3-*O*-(2'-глукозил)рутинозид у вредностима од 207,15 и 173,05 mg/100 g LF и цијанидин-3-*O*-софорозид у много мањем садржају (9,92 и 4,68 mg/100 g LF).

Picariello et al. (2016) су установили да су плодови вишње веома богати цијанидин-3-*O*-(2'-глукозил)рутинозидом, док су у плодовима трешње ово једињење детектовали само у траговима. Такође су и резултати бројних истраживања облачинске и других сорти вишње, као и резултати ове дисертације сагласни да је цијанидин-3-*O*-(2'-глукозил)рутинозид најзаступљенији антоцијан у плодовима вишње (Alrgei et al., 2014; Митић, 2011; Kirakosyan et al., 2009; Blando et al., 2004;), тако да би присуство и заступљеност овог једињења могла да послужи у хемотаксономске сврхе.

На основу корелационе анализе (корелациона матрица је приказана у Прилогу 5), све статистички значајне корелације су позитивне. Изузетно високи степени корелације у износу од $r = 1,000$ су установљени за хексозиде ферулне киселине (једињења бр. 4 и бр. 10) и метил-естре 5-*O*-*p*-кумароилхинске киселине (једиња бр. 12 и бр. 13), што је последица њиховог присуства једино у екстракту степске вишње. Ова четири једињења су у статистички значајној корелацији ($r = 0,999$) и са метил-4-*O*-*p*-кумароилхинатом (једињење бр. 11), што се оправдава његовим највишим садржајем у степској вишњи и занемарљиво ниским садржајем у облачинској вишњи и гајеној трешњи.

Метил-3-*O*-кафеоилхинат (бр. 3) је у статистички значајној корелацији са метил-4-*O*-*p*-кумароилхинатом (бр. 7; $r = 0,984$) и етил-4-*O*-кафеоилхинатом (бр. 8; $r = 0,851$). Метил-5-*O*-кафеоилхинат (бр. 9) је у високој статистички значајној корелацији ($r \geq 0,959$) са хексозидом ферулне киселине (бр. 10), метил-4-*O*-*p*-кумароилхинатом (бр. 11) и изомерима метил-5-*O*-*p*-кумароилхинске киселине (бр. 12 и 13).

Хексозид *m*-кумаринске киселине (бр. 5), једињење које је било присутно само код магриве, је имао степен корелације $r = 1,000$ са флавоноидним једињењима која су такође квантификована једино у овом узорку – кверцетин-3-*O*-дирамнозил-хексозидом (бр. 14), кверцетин-3-*O*-пентозил-хексозидом (бр. 15) и кемферол-3-*O*-дирамнозил-хексозидом (бр. 16). У статистички значајној корелацији је био и са кверцетин-3-*O*-глукозидом (бр. 20, $r = 0,852$), кверцетином (бр. 26; $r = 0,712$), цијанидин-3-*O*-глукозидом (бр. 29; $r = 0,910$) и цијанидин-3-*O*-ксилозил-рутинозидом (бр. 30, $r = 0,998$), једињењима присутним и код других воћних врста, али са највишим садржајем у магриви.

Кверцетин-3-*O*-рутинозид (бр. 18), који је квантификован у свим испитиваним врстама, је у статистички значајној корелацији са кверцетин-3-*O*-глукозидом (бр. 20; $r = 0,803$) и кверцетином (бр. 26; $r = 0,803$).

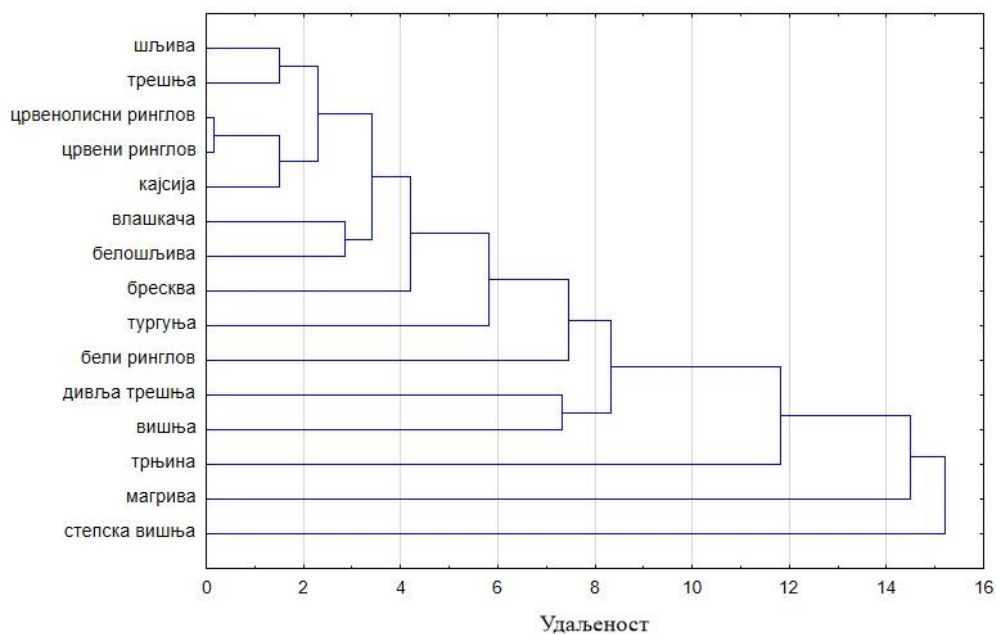
Кемферол-3-*O*-рутинозид (бр. 22) и изорамнетин-3-*O*-рутинозид (бр. 23), осим што су у међусобно високој корелацији ($r = 0,803$), у статистички веома значајним корелацијама ($r > 0,900$) су са хексозидима ферулне киселине (бр. 4 и бр. 10), метил-5-*O*-кафеоилхинатом (бр. 9), метил-4-*O*- и метил-5-*O*-*p*-кумароилхинатима (бр. 11, 12 и 13). Узрок овако високих степени корелације је у томе што су ова једињења или у највишем садржају, или једино присутна у степској вишњи.

Цијанидин-3-*O*-глукозид (бр. 29) и цијанидин-3-*O*-(2'-ксилозил)рутинозид (бр. 30), поред тога што су у међусобно високој корелацији ($r = 0,905$), у статистички значајним корелацијама ($r > 0,900$) су са кверцетин-3-*O*-дирамнозил-хексозидом (бр. 14), кверцетин-3-*O*-пентозил-хексозидом (бр. 15) и кемферол-3-*O*-дирамнозил-хексозидом (бр. 16), једињењима која су присутна једино у магриви. Такође су у значајној корелацији са кверцетин-3-*O*-глукозидом (бр. 20) и кверцетином (бр. 26), једињењима присутним и у другим анализираним врстама, али са највишим садржајем у магриви.

Пеонидин-3-*O*-глукозид (бр. 33) и пеонидин-3-*O*-рутинозид (бр. 34) су у статистички значајној корелацији међусобно ($r = 0,850$), као и са осталим једињењима чији је највећи садржај одређен у трњини, а то су метил-3-*O*-кафеоилхинат (бр. 3; $r = 0,800$), метил-3-*O*-*p*-кумароилхинат (бр. 6; $r = 0,675$ и $r = 0,909$), метил-4-*O*-кафеоилхинат (бр. 7; $r = 0,804$ и $r = 0,765$), етил-4-*O*-кафеоилхинат (бр. 8; $r = 0,898$ и $r = 0,723$) и једино у трњини присутном кверцетин-3-*O*-пентозил-хексозидом (бр. 19; $r = 1,000$ и $r = 0,850$).

На основу садржаја фенолних једињења одређених у плодовима воћа рода *Prunus*, који је приказан у табели 4.1, урађена је кластер (*енгл.* cluster) анализа. Овом методом се издвајају кластери (групе) са објектима који су међусобно слични, а истовремено различити у односу на објекте из других кластера.

Ulubelde (1990) је хроматографском методом проучавао фенолна једињења као генетичке маркере рода *Prunus* и на основу њих утврдио сродност појединих врста, као и једињења која су се пренела укрштањем врста. Кластер анализом у оквиру ове дисертације су се издвојиле врсте блиске по фенолном профилу, односно генетички сродне врсте, а резултати су представљени у облику дендрограма на слици 4.2. На основу дендрограма је урађена подела свих испитиваних врста рода *Prunus* на 7 различитих кластера, на основу Еуклидског растојања из дендрограма при удаљености од 6. Чланови сваког кластера су приказани у табели 4.2.



Слика 4.2. Дендрограм кластер анализе за врсте рода *Prunus* на основу садржаја фенолних једињења

Према фенолном профилу, степска вишња се одваја од осталих анализираних врста и сврстана је у Кластер 1. Осим степске вишње, појединачно се издвајају магрива, бели ринглов и трњина. Ове врсте су груписане у Кластере 2, 6 и 7. Белошљива и тургуња чине Кластер 4, вишња и дивља трешња Кластер 5, док су у Кластеру 3 сврстане све остале врсте: трешња, шљива, бресква, кајсија, црвенолисни и црвени ринглов и влашкача.

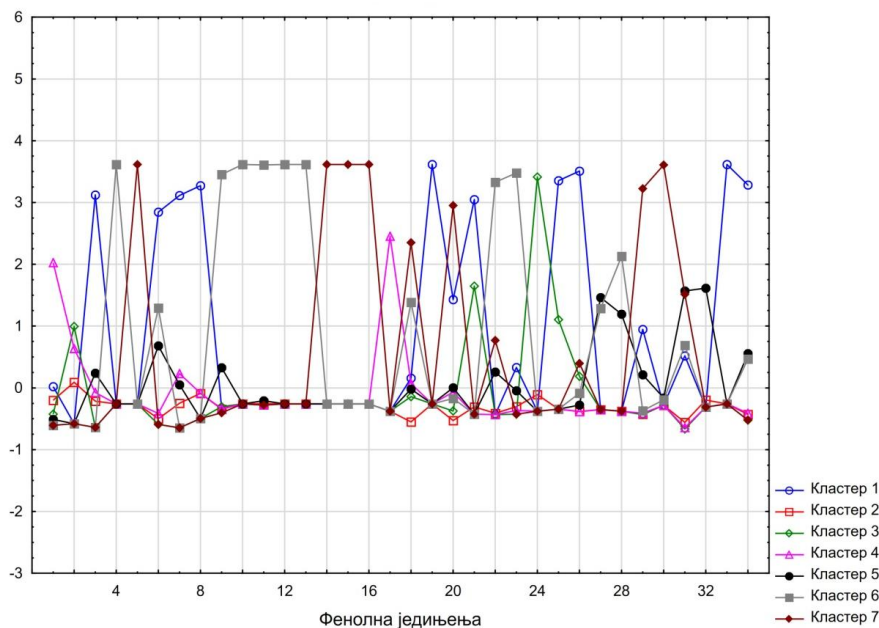
Трњина, магрива и степска вишња су се издвојиле по екстремно високим вредностима садржаја фенолних киселина, флавонола и антоцијана. Пошто код сваке од ове три врсте доминирају различити представници у оквиру поменутих група једињења, разврстане су у засебне кластере (табела 4.2; слика 4.3).

Табела 4.2. Чланови појединачних кластера

| # | Кластер 1 | Кластер 2 | Кластер 3 | Кластер 4 | Кластер 5 | Кластер 6 | Кластер 7 |
|---|---------------|-----------|---------------------|-----------|--------------|--------------|-----------|
| 1 | степска вишња | магрива | трешња | белошљива | вишња | бели ринглов | трњина |
| 2 | | | шљива | тургуња | дивља трешња | | |
| 3 | | | бресква | | | | |
| 4 | | | кајсија | | | | |
| 5 | | | црвенолисни ринглов | | | | |
| 6 | | | црвени ринглов | | | | |
| 7 | | | влашкача | | | | |

На слици 4.3 је приказан график средњих вредности за сваки кластер. Бројевима од 1 до 34 су обележена фенолна једињења из табеле 4.1.

Плод трњине се истакао по високом садржају метил-3-*O*-кафеоилхината (једињење бр. 3), који није присутан код магриве и степске вишње. У већим концентрацијама него код осталих врста, у екстракту трњине су одређени и метил-3-*O*-*p*-кумароилхинат (бр. 6), као и метил- и етил-4-*O*-кафеоилхинати (бр. 6, 7 и 8). Једино је код трњине присутан кверцетин-3-*O*-пентозил-хексозид (бр. 19), у ниској концентрацији, а исто тако је једино за трњину карактеристично присуство пеонидин-3-*O*-глукозида (бр. 33).



Слика 4.3. График средњих вредности за сваки кластер

Магрива је јединствена по присуству хексозида *m*-кумаринске киселине (бр. 5) и комплексних гликозидних деривата кверцетина и кемферола (дирамнозил-хексозиди кверцетина и кемферола и кверцетин-пентозил-хексозид; бр. 14, 15 и 16). Такође се од

осталих узорака издваја по највишем садржају цијанидин-3-*O*-глукозида и цијанидин-3-*O*-рутинозида (бр. 29 и 31).

Степска вишња се од осталих врста највише издваја по фенолним киселинама. Једино за њу је карактеристично присуство деривата ферулне киселине (бр. 4 и 10). Такође, једино у плоду степске вишње су квантификовани деривати 5-*O*-*p*-кумароилхинске киселине (бр. 12 и 13), док су деривати 3-*O*- и 4-*O*-*p*-кумароилхинске киселине (бр. 6, 11) у већем или мањем садржају дектовани и код других врста, указујући на њихову генетичку повезаност. Слична ситуација је и са кемферол-3-*O*-рутинозидом (бр. 22) и изорамнетин-3-*O*-рутинозидом (бр. 23), чији је садржај висок код степске вишње, али су детектовани у мањим концентрацијама и код других врста. Када је реч о антоцијанима, идентичан профил и заступљеност једињења су одређени код степске вишње и облачинске вишње, што потврђује њихову генетичку сродност.

Бели ринглов, који је једини члан Кластера 6, се у односу на остале подврсте ринглова истиче по знатно већем садржају деривата кверцетина, од којих је у овом екстракту најдоминантнији био пентозид кверцетина (бр. 24).

Према кластер анализи, евидентна је генетичка сродност вишње са дивљом трешњом, и оне су груписане у Кластер 5. Међутим, обе су удаљене од гајене трешње, која је по кластер анализи сличнија са шљивом, влашкачом, бресквом, кајсијом, црвеним и црвенолисним рингловом, који су груписани у одвојен кластер, Кластер 3. Вишња је настала укрштањем трешње и степске вишње (Мишић, 2002), али пошто ове врсте нису сврстане у заједнички кластер, може се претпоставити да су селекције и одабири сорти., односно генетичка укрштања, довели до измена и генетичког удаљавања на основу фенолног профила.

У оквиру Кластера 3, али и у поређењу са осталим врстама, на дендрограму се уочава да је удаљеност најмања између црвенолисног и црвеног ринглова, односно да су од свих анализираних врста они генетички најсроднији.

На основу удаљености у дендрограму се види блискост влашкаче и белошљиве, које су сврстане у Кластер 4. Ове врсте у народу важе за аутохтоне сорте шљиве, а на основу резултата кластер анализе се види да се разликују од саме шљиве.

4.1.2. Биоактивни потенцијал воћа рода *Prunus*

У табели 4.3. су приказани резултати тестова биолошких активности одређених за испитиване врсте рода *Prunus*.

Антиоксидантни капацитет

Сви испитивани екстракти воћа рода *Prunus* испољили су антиоксидантну активност. Вредности добијене у оквиру сваког појединачног теста су биле истог реда величина, али са значајним разликама међу појединачним екстрактима. На основу сва три примењена теста (FC, FRAP и DPPH) степска вишња и трњина су показале најбољи антиоксидантни капацитет, а за њима следе магрива и дивља трешња.

Резултати добијени FC тестом су се кретали у распону 28,78–2,25 mg GAE/g LF. Највише вредности су одређене за степску вишњу и магриву и износиле су 28,78 и 26,36 mg GAE/g LF. Затим су следиле дивља трешња, магрива и облачинска вишња са 17,45, 16,72 и 18,51 mg GAE/g LF. У екстрактима влашкаче, тургуње бело-шљиве, гајене трешње и шљиве су вредности износиле 10,81, 10,29, 8,43, 6,54 и 5,99 mg GAE/g LF, а у екстрактима брескве, кајсије, белог, црвенолисног и црвеног ринглова су вредности биле мање од 5 mg GAE/g LF.

Вредности одређене FRAP тестом су биле у распону 27,23–1,35 mg AAE/g LF. Највише вредности су одређене за степску вишњу, трњину, магриву, дивљу трешњу и облачинску вишњу (27,23, 20,89, 19,67, 17,69 и 14,99 mg AAE/g LF). За екстракте влашкаче, тургуње, гајене трешње, белошљиве, брескве и кајсије вредности су износиле од 6,32 до 3,06 mg AAE/g LF. Најслабији капацитет редукције гвожђе(III)-јона су испољили екстракти кајсије, шљиве и сва три испитивана ринглова, са вредностима мањим од 3 mg AAE/g LF.

Најбољи капацитет „хватања“ DPPH радикала су испољили екстракти степске вишње, трњине, дивље трешње и магриве, са IC₅₀ вредностима у опсегу 0,83–1,66 mg/mL. Одређене IC₅₀ вредности за облачинску вишњу, влашкачу, тургуњу, белошљиву, гајену трешњу, шљиву и брескву су износиле 2,31–6,53 mg/mL. За кајсију и бели ринглов IC₅₀ вредности су биле 12,28 и 15,75 mg/mL, а најслабији капацитет неутрализације радикала су имали црвенолисни и црвени ринглов, са одређеним IC₅₀ вредностима од 28,82 и 29,12 mg/mL.

На основу корелационе анализе чији су резултати приказани у Прилогу 5, резултати сва три теста антиоксидантног капацитета су међусобно показали високе степене корелације ($r \geq 0,962$). Сва три теста су такође била у статистички значајним корелацијама са садржајима метил-3-*O*-*p*-кумароилхинатом (бр. 6; $r \geq 0,777$), кемферол-3-*O*-рутинозидом (бр. 22; $r \geq 0,690$), изорамнетин-3-*O*-рутинозидом (бр. 23; $r \geq 0,654$), цијанидин-3-*O*-рутинозидом (бр. 31; $r \geq 0,654$), али и са укупним садржајима свих класа фенолних једињења (укупним фенолним киселинама ($r \geq 0,801$), укупним флавонолима ($r \geq 0,704$) и укупним антоцијанима ($r \geq 0,745$) и са укупним садржајем фенолних једињења ($r \geq 0,859$).

Антипролиферативна активност

Антипролиферативни ефекат на НТ-29 ћелије су испољиле све испитиване врста рода *Prunus*. Најбољу инхибиторну способност на раст НТ-29 ћелија и IC_{50} вредности од 6,68 и 6,84 mg/mL су показале степска вишња и трњина. Затим следе кајсија, црвени ринглов, облачинска вишња и влашкача са IC_{50} вредностима од 11,56 до 15,69 mg/mL, затим бели ринглов, тургуња, шљива и црвенолисни ринглов чије су IC_{50} вредности износиле од 19,80 до 24,03 mg/mL. Дивља трешња, белошљива и бресква су достигле IC_{50} од око 30 mg/mL, а најслабију антипролиферативну активност међу испитиваним врстама су показале облачинска вишња ($IC_{50} = 50,27$ mg/mL) и магрива ($IC_{50} = 52,70$ mg/mL).

Резултати корелационе анализе су показали да је антипролиферативна активност према НТ-29 ћелијама била у статистички значајној корелацији са садржајима метил-3-*O*-*p*-кумароилхината (бр. 6; $r = 0,776$), изорамнетин-3-*O*-рутинозида (бр. 23; $r = 0,682$) и пеонидин-3-*O*-рутинозида (бр. 34; $r \geq 0,662$), а од биолошких активности са инхибицијом α -амилазе и DPP III ензима ($r = 0,700$ и $r = 0,755$).

У студији аутора Serra et al. (2011a) у којој су према истој експерименталној процедури испитивали антипролиферативну активност различитих португалских сорти трешње према НТ-29 ћелијама, измерене IC_{50} вредности су се кретале од 4,3 до 13,8 mg/mL, што је у рангу са врстама које су у оквиру ове дисертације испољиле најбољу способност инхибиције раста НТ-29 ћелија. Иста истраживачка група је у другом истраживању хемотерапеутског потенцијала трешања (Serra et al., 2011b) поредила утицај воћних екстраката са доксорубицином, леком који се примењује у хемотерапији. Установили су да, иако је IC_{50} вредност за доксорубицин вишеструко нижа од IC_{50} вредности воћних екстраката, доксорубицин и екстракти трешње заустављају ћелијски циклус у потпуно различитим фазама. Доксорубицин је заустављао раст ћелија у G1 фази (фази ћелијског раста), док су екстракти трешње у овој фази повећавали пролиферацију ћелија, а антипролиферативно су деловали у S и G2/M фази (фази ћелијског размножавања). Резултати овог истраживања и резултати добијени у оквиру ове дисертације указују на потенцијал комбиновања постојећих лекова и екстраката воћа рода *Prunus* као хемотерапеутских агенаса, у циљу бољег антипролиферативног ефекта, али овакав приступ би требало додатно да се испита.

Табела 4.3. Биоактивни потенцијал екстракта воћа рода *Prunus*

| Активност | FC | FRAP | DPPH | HT-29 | α -Amy | α -Gls | DPP III |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Јединица | mg GAE/g LF | mg AAE/g LF | IC ₅₀ (mg/mL) | IC ₅₀ (mg/mL) | IC ₅₀ (mg/mL) | IC ₅₀ (mg/mL) | IC ₅₀ (μ g/mL) |
| шљива | 5,99 \pm 1,59 ^g | 2,63 \pm 0,31 ^{g,h} | 5,71 \pm 0,13 ⁱ | 23,27 \pm 1,05 ^f | 46,69 \pm 4,33 ^d | 5,72 \pm 0,25 ^{g,h} | н.д. |
| влашкача | 10,81 \pm 0,38 ^d | 6,32 \pm 0,66 ^e | 2,47 \pm 0,06 ^f | 15,69 \pm 0,55 ^d | 45,54 \pm 3,33 ^d | 1,48 \pm 0,07 ^e | 101,71 \pm 2,71 ^e |
| тургуња | 10,29 \pm 0,13 ^{de} | 5,38 \pm 0,29 ^{ef} | 3,55 \pm 0,02 ^g | 21,40 \pm 0,96 ^{ef} | 103,45 \pm 5,43 ^c | 1,39 \pm 0,06 ^e | 69,44 \pm 1,67 ^c |
| белошљива | 8,43 \pm 1,37 ^{ef} | 3,76 \pm 0,62 ^{fg} | 4,04 \pm 0,03 ^h | 30,88 \pm 1,36 ^g | 43,63 \pm 3,88 ^d | 4,11 \pm 5,98 ^{fg} | 78,49 \pm 2,24 ^d |
| црвенолисни ринглов | 2,96 \pm 1,52 ^{hi} | 1,35 \pm 0,38 ^h | 28,82 \pm 0,37 ⁿ | 24,03 \pm 1,08 ^f | 136,23 \pm 17,34 ^e | 28,44 \pm 1,22 ⁱ | 179,60 \pm 11,6 ^g |
| црвени ринглов | 2,25 \pm 0,07 ⁱ | 1,95 \pm 0,32 ^{gh} | 29,12 \pm 0,50 ⁿ | 11,65 \pm 0,50 ^b | 40,35 \pm 3,07 ^d | 10,15 \pm 0,46 ^{hi} | 129,90 \pm 2,61 ^f |
| бели ринглов | 3,78 \pm 0,27 ^{hi} | 2,37 \pm 0,47 ^{gh} | 15,75 \pm 0,21 ^m | 19,80 \pm 0,69 ^e | н.д. | 6,18 \pm 0,27 ^{gh} | 213,67 \pm 14,32 ^g |
| гајена трешња | 6,54 \pm 0,58 ^{fg} | 4,20 \pm 0,59 ^{fg} | 5,19 \pm 0,09 ⁱ | 50,27 \pm 2,26 ^h | 41,80 \pm 5,20 ^d | 3,06 \pm 0,11 ^f | н.д. |
| дивља трешња | 17,45 \pm 0,42 ^c | 17,69 \pm 0,92 ^c | 1,32 \pm 0,03 ^c | 29,25 \pm 1,26 ^g | 37,46 \pm 4,45 ^d | 1,40 \pm 0,05 ^e | н.д. |
| облачинска вишња | 15,81 \pm 1,50 ^c | 14,99 \pm 0,90 ^d | 2,31 \pm 0,04 ^e | 13,12 \pm 0,58 ^c | 18,44 \pm 1,86 ^c | 0,62 \pm 0,69 ^b | н.д. |
| степска вишња | 28,78 \pm 0,16 ^a | 27,23 \pm 1,58 ^a | 0,83 \pm 0,00 ^a | 6,68 \pm 0,29 ^a | 4,61 \pm 0,39 ^b | 0,41 \pm 0,02 ^a | 33,76 \pm 0,06 ^b |
| магрива | 16,72 \pm 0,98 ^c | 19,67 \pm 1,44 ^b | 1,66 \pm 0,03 ^d | 52,70 \pm 1,84 ^h | 43,95 \pm 7,10 ^d | 0,96 \pm 0,04 ^d | 196,23 \pm 4,31 ^g |
| трњина | 26,36 \pm 0,82 ^b | 20,89 \pm 0,67 ^b | 1,18 \pm 0,02 ^b | 6,84 \pm 0,30 ^a | 1,11 \pm 0,04 ^a | 0,78 \pm 0,03 ^c | 27,49 \pm 0,04 ^a |
| бресква | 4,84 \pm 0,45 ^{g,h} | 3,30 \pm 0,16 ^g | 6,53 \pm 0,16 ^k | 32,56 \pm 1,14 ^g | н.д. | 3,89 \pm 0,18 ^{fg} | 205,93 \pm 6,55 ^g |
| кајсија | 3,80 \pm 0,63 ^{hi} | 3,06 \pm 0,27 ^{gh} | 12,28 \pm 0,13 ^l | 11,56 \pm 0,51 ^b | н.д. | н.д. | н.д. |
| стандард | | | Тролокс 0,04 \pm 0,00 | | Акарбоза 0,11 \pm 0,01 | Акарбоза 3,73 \pm 0,08 | |

Резултати су изражени као средња вредност \pm стандардна девијација ($n = 3$). Вредности у истој колони обележене различитим суперскриптом се статистички значајно разликују на основу *Duncan*-овог теста ($P < 0,01$).

Скраћенице: GAE – еквиваленти галне киселине, AAE – еквиваленти аскорбинске киселине, FC – Folin-Ciocalteu редукциони тест, FRAP – капацитет редукције Fe³⁺ јона, DPPH – капацитет неутрализације DPPH радикала, HT-29 – антипролиферативна активност према ћелијама хуманог аденокарцинома дебелог црева, α -Amy – способност инхибиције α -амилазе, α -Gls – способност инхибиције α -глукозидазе, DPP III – способност инхибиције хумане дипептидил-пептидазе III, IC₅₀ – концентрација екстракта која за 50% смањи активност, н.д. – није одређено.

Способност инхибиције ензима α -амилазе и α -глукозидазе

Анализирани узорци воћа рода *Prunus*, са изузетком брескве, кајсије и белог ринглова, су испољили способност инхибиције ензима α -амилазе. У поређењу са референтним стандардом акарбозом, чија је IC_{50} износила 0,11 mg/mL, сви екстракти су испољили слабију инхибиторну активност. Као најбоље врсте су се истакле трњина и степска вишња, са значајно нижим IC_{50} вредностима у односу на остало воће. Трњина је имала IC_{50} вредност 1,11 mg/mL, а степска вишња 4,61 mg/mL. Дивља трешња, црвени ринглов, облачинска вишња, белошљива, магрива, влашкача и шљива су имале IC_{50} вредности око 40 mg/mL, тургуња 103,45 mg/mL, а најслабију инхибиторну активност је показао црвенолисни ринглов са IC_{50} од 136,23 mg/mL.

Сви испитивани плодови воћа рода *Prunus* су показали изузетну способност инхибиције ензима α -глукозидазе, која је код већине врста била боља од инхибиторне активности референтног стандарда – акарбозе. Једино узорак кајсије није испољио инхибиторну активност. Врсте које су имале најбољу способност инхибиције α -глукозидазе су степска вишња, облачинска вишња, трњина и магрива са IC_{50} вредностима од 0,41 до 0,96 mg/mL. За њима следе тургуња, дивља трешња и влашкача (IC_{50} 1,39–1,48 mg/mL), а затим трешња, бресква и белошљива, чије IC_{50} вредности су приближне оној која је одређена за акарбозу ($IC_{50} = 3,73$ mg/mL). Инхибиторна активност шљиве је била слична активности белог ринглова и њихове IC_{50} вредности су износиле 5,72 и 6,18 mg/mL. Најслабију способност инхибиције α -глукозидазе од свих испитиваних врста су имали црвени и црвенослини ринглов (10,15 и 28,44 mg/mL).

Познато је да екстракти богати фенолним једињењима имају добру способност инхибиције ензима α -амилазе и α -глукозидазе, те стога бивају промовисани као антидијабетски агенси (Rasouli et al., 2017; Kalita et al., 2018). Сок од вишње је у истраживању Casedas et al. (2016) испољио способност инхибиције α -глукозидазе и других ензима укључених у биолошке процесе (дипептидил-пептидазе IV (DPP IV), моноамин оксидазе (MAO), тирозиназе (TYR)). Екстракти богати антоцијанима из мађарских сорти вишње су испољили високу антиоксидантну активност и способност инхибиције саливарне α -амилазе (Homoki et al., 2016). Екстракти листова различитих сорти шљиве богати фенолним једињењима испитивани у истраживању Mosan et al. (2018) су се такође показали као добри инхибитори α -амилазе и α -глукозидазе. Они су показали бољу способност инхибиције α -глукозидазе него α -амилазе, међутим утврђено је да сорта има велики утицај на испитиване биолошке активности. У истраживању McDougall et al. (2005) је различиту способност инхибиције ензима α -амилазе и α -глукозидазе показало бобичасто воће богато полифенолима. У овом истраживању је утврђено да се воће богато антоцијанима, као што су боровница и купина, показало као добар инхибитор α -глукозидазе, док су бољу способност за инхибицију α -амилазе показали воћни екстракти богати елагитанинима. У испитивању воћа рода *Prunus* од стране аутора Nowicka et al., (2016), сок од вишње и каше од брескве, кајсије и шљиве, који су имали висок садржај

фенолних једињења и висок антиоксидантни капацитет, су испољили и добру способност инхибиције α -амилазе и α -глукозидазе. Аутори овог истраживања су дошли до закључка да антоцијани и флавоноли доприносе инхибицији α -глукозидазе, а да су флаван-3-оли одговорни за инхибицију α -амилазе.

Јака инхибиција ензима који хидролизују угљене хидрате у дигестивном тракту, иако важна да би се смањила концентрација глукозе која доспева у крвоток, може да има и негативне ефекте. Уколико је више хидролизујућих ензима инхибирано, долази до нагомилавања прекомерних количина неразграђених полисахарида у цревима. Ово најчешће доводи до надимања, грчева и дијареје, што су често негативни ефекти који се јављају у третману типа 2 дијабетеса (Coniff et al., 1995). Различита способност инхибиције α -амилазе и α -глукозидазе, односно већа селективност инхибитора према једном од ових ензима је у овом случају пожељан ефекат. Такође, осим у третману постпрандијалне хипергликемије, инхибиција α -глукозидазе се проучава и са аспекта антивиралне активности. Ензим α -глукозидаза има кључну улогу у посттранслационој модификацији гликопротеина који су одговорни за инфективност вируса са додатним омотачем у организму домаћина. Потрага за селективним инхибиторима α -глукозидазе је и из овог разлога тема бројних истраживања (Panahi et al., 2013).

Када се резултати добијени за испитивање способности инхибиције α -амилазе и α -глукозидазе упореде са овог аспекта, издвајају се „шљиве“ (шљива, влашкача, тургуња, белошљива), облачинска и степска вишња и магрива. Екстракти ових воћних врста су α -глукозидазу инхибирани у нивоу акарбозе или боље, док је инхибиција α -амилазе била знатно мање ефикасна у односу на акарбозу.

Корелационом анализом (Прилог 5) је утврђено да је способност инхибиције α -амилазе била у статистички значајној корелацији са садржајем метил-3-*O*-кафеоилхината (бр. 3; $r = 0,760$), метил-3-*O-p*-кумароилхината (бр. 6; $r = 0,795$), метил- и етил-4-*O*-кафеоилхината (бр. 7, $r = 0,758$ и бр. 8, $r = 0,859$), дигликозидом и пентозидом кверцетина (бр. 19, $r = 0,973$ и бр. 21, $r = 0,720$), кверцетин-рамнозидом (бр. 25; $r = 0,845$), пеонидин-3-*O*-глукозидом (бр. 33; $r = 0,973$) и пеонидин-3-*O*-рутинозидом (бр. 34; $r = 0,903$).

С обзиром да су се степска и облачинска вишња издвојиле као најактивније у погледу инхибиције α -глукозидазе, ова активност је у статистички значајној корелацији са једињењима доминантно или једино присутним у овим воћним врстама, а то су: хексозиди ферулне киселине (бр. 4, $r = 0,796$ и бр. 10, $r = 0,716$), метил-5-*O*-кафеоилхинат (бр. 9; $r = 0,817$), метил-4-*O-p*-кумароилхинат (бр. 11; $r = 0,729$), два изомера метил-5-*O-p*-кумароилхината (бр. 12 и 13; $r = 0,716$), кверцетин-3-*O*-рутинозид (бр. 18; $r = 0,642$), кемферол-3-*O*-рутинозид (бр. 22; $r = 0,777$), изорамнетин-3-*O*-рутинозид (бр. 23; $r = 0,812$), цијанидин-3-*O*-софорозид (бр. 27; $r = 0,665$) и цијанидин-3-*O*-(2'-глукозил)рутинозид (бр. 28; $r = 0,777$).

Између способности инхибиције α -амилазе и способности инхибиције α -глукозидазе није установљена статистички значајна корелација. Способност инхибиције α -амилазе је била у статистички значајној корелацији са FC тестом ($r = 0,655$), са антипролиферативном активношћу према HT-29 ћелијама ($r = 0,700$) и са способношћу инхибиције DPP III ензима ($r = 0,802$). Способност инхибиције α -глукозидазе је била у статистички високој корелацији са свим тестовима антиоксидантног капацитета (FC, FRAP и DPPH; $r \geq 0,890$).

Способност инхибиције DPP III ензима

Анализиране врсте рода *Prunus* су показале веома разнолику способност инхибиције DPP III ензима. Као најбољи инхибитори ензима су се истакли екстракти трњине и степске вишње, са IC_{50} вредностима од 27,49 и 33,76 $\mu\text{g/mL}$. Тургуња и белошљива су достигле IC_{50} при концентрацијама од 69,44 и 78,49 $\mu\text{g/mL}$, а влашкача и црвени ринглов при 101,71 и 129,90 $\mu\text{g/mL}$. Црвенолисни ринглов, магрива, бресква и бели ринглов су испољили нешто слабију инхибиторну активност са IC_{50} вредностима у опсегу 179,60–213,67 $\mu\text{g/mL}$. Шљива, гајена трешња, дивља трешња, облачинска вишња и кајсија нису показале инхибиторну активност према DPP III ензиму.

4.1.3. PCA анализа фитохемијског састава и биолошких активности воћа рода *Prunus*

Садржај фенолних једињења и подаци о биолошким активностима врста рода *Prunus* су анализирани PCA методом. Анализом је обухваћено 15 испитиваних врста рода *Prunus* и 45 варијабле. Варијабле су представљале фенолна једињења и биолошке активности, чије су вредности приказане у табелама 4.1 и 4.2. Резултати PCA анализе су приказани преко два графика – *Loadings plot* и *Scores plot* графика, који су приказани на слици 4.4а и 4.4б. Тачке на PCA графицима које су геометријски близу једна другој, указују на сличност параметара које те тачке представљају. Усмереност вектора који описују варијабле на *Loadings plot*-у указује на тренд пораста те варијабле, а дужина вектора је пропорционална квадратној вредности корелације између варијабле и фактора.

Прва два фактора¹, фактор 1 и фактор 2, су описала укупно 57,36% варијабилности међу узорцима и дали су карактеристичне вредности (енгл. eigenvalues) од 16,587 и 9,225 (Прилог 6). Карактеристичне вредности свих фактора, вредности вектора и доприноси појединачних варијабле и испитиваних врста фактору 1 и фактору 2 су дати у Прилогу 6.

Највећи допринос фактору 1 је дао антиоксиданти капацитет испитиваних екстраката, односно резултати FC, FRAP и DPPH тестова. За њима следи способност инхибиције α -глукозидазе (α -Gls) и допринос укупних фенолних једињења (TP), као и доприноси сваке појединачне класе фенолних једињења (TPA, TF, TA). Највећи допринос фактору 2 су дала једињења која су магриву издвојила од осталих испитиваних врста, хексозид *m*-кумаринске киселине (бр. 5), дирамнозил-хексозил деривати кверцетина и кемферола (бр. 14 и 16), кверцетин-3-*O*-пентозил-хексозид (бр. 15), цијанидин-3-*O*-глукозид (бр. 29) и цијанидин-3-*O*-(2'-глукозил)рутинозид (бр. 30). Од испитиваних биолошких активности највећи допринос фактору 2 је дала способност инхибиције раста HT-29 ћелија.

Према графику пројекција варијабле (*Loadings plot*) се на основу геометријске близине тачака види да антиоксидантном капацитету узорака (FC, FRAP и DPPH) највише доприносе укупна фенолна једињења, укупни антоцијани и укупни флавоноиди, а од појединачних једињења кемферол-3-*O*-рутинозид (бр. 22).

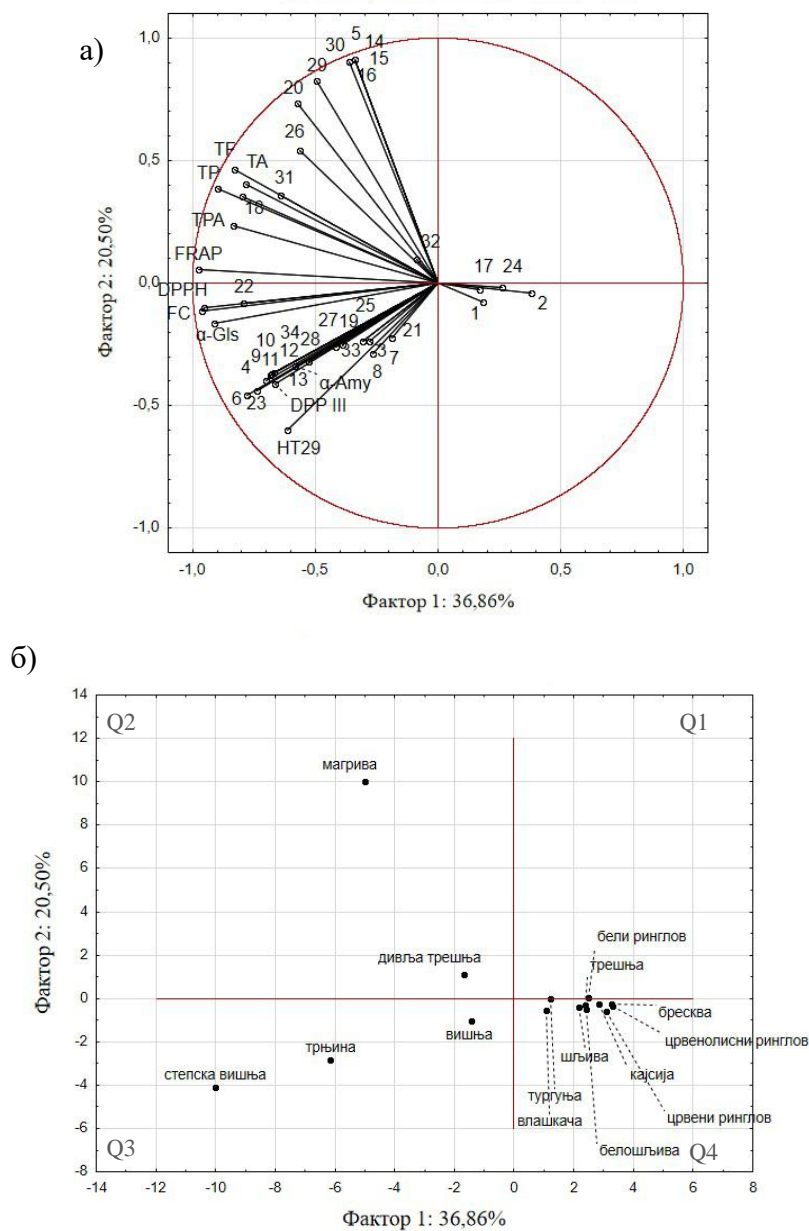
Идентична усмереност и веома слични интензитети вектора способности инхибиције ензима DPP III и α -амилазе и вектора деривата *p*-кумароилхинске киселине (бр. 6, 11, 12, 13), метил-5-*O*-кафеоилхината (бр. 9), хексозида ферулне киселине (бр. 4 и 10), цијанидин-3-*O*-(2'-глукозил)рутинозида (бр. 28) и пеонидин-3-*O*-рутинозида (бр. 34) указују на инхибиторни потенцијал ових фенолних једињења. Управо ова једињења и биолошке активности су највише идвојили степску вишњу, а делом и трњину од осталих врста, што је уочљиво на *Scores plot*-у на слици 4.4б.

На основу *Scores plot*-а је осим издвајања магриве, степске вишње и трњине, уочљиво издвајање облачинске вишње и дивље трешње. Све ове врсте су на графику различито позициониране преваходно услед доминације различитих једињења. Остале испитиване врсте су груписане на десној страни графика, не варирајући у односу на фактор 2.

¹ фактор = главна компонента

Раздвајање на основу фактора 1 указује на изузетну блискост влашкаче и тургуње, затим гајене трешње, шљиве, белошљиве и белог ринглова, као и кајсије, брескве, црвеног и црвенолисног ринглова. За одвајање и груписање ових врста су највише одговорни садржаји неохлорогенске и хлорогенске киселине (3-*O*- и 5-*O*-кафеоилхинске, бр. 1 и бр. 2), као и кверцетин-3-*O*-рамнозил-хексоид (бр. 17) и кверцетин-пентозид (бр. 24)

Груписање испитиваних врста рода *Prunus* приказано на *Scores plot*-у је веома слично са груписањем које је добијено на основу кластер анализе. С обзиром да је кластер анализа спроведена само на основу садржаја фенолних једињења, а да су у *PCA* анализу укључени и резултати тестова за биолошке активности, може да се закључи да фенолна једињења највише доприносе раздвајању међу врстама и да управо фенолна једињења доприносе различитим биолошким активностима испитиваних воћних врста. Ово указује да постоји основ за примену фенолних једињења као хемотаксономских маркера, али су за то неопходна додатна истраживања којима би био обухваћен већи број врста и генотипова сваке појединачне врсте.



Слика 4.4. Loadings plot (а) и Scores plot (б) PCA анализе садржаја фенолних једињења и биолошких активности врста рода *Prunus*.

Скраћенице: Бројеви 1-34 представљају фенолна једињења из табеле 4.1, TPA – укупне фенолне киселине, TF – укупни флавоноли, TA – укупни антоцијани, TP – укупна фенолна једињења; FC – Folin-Ciocalteu редукциони тест, FRAP – капацитет редукције Fe³⁺ јона, DPPH – капацитет неутрализације DPPH радикала, HT-29 – антипролиферативна активност према ћелијама хуманог аденокарцинома дебелог црева, α-Amy – способност инхибиције α-амилазе, α-Gls – способност инхибиције α-глюкозидазе, DPP III – способност инхибиције дипептидил-пептидазе III.

4.2. Фитохемијска карактеризација и биолошке активности генотипова трњине (*Prunus spinosa* L.)

Резултати фенолног профила и биолошких активности генотипова трњине добијени у оквиру ове докторске дисертације су објављени у публикацији Popović et al. (2020).

4.2.1. Фенолни профил генотипова трњине (*Prunus spinosa* L.)

На основу HPLC-PDA анализе је у екстрактима испитиваних генотипова трњине одређен садржај фенолних једињења. На основу UV-Vis спектра и поређењем са стандардним једињењима је идентификовано и квантификовано 10 једињења. У табели 4.4 је приказан садржај фенолних једињења која су одређена у свим испитиваним генотиповима трњине, а на слици 4.6 су приказане структуре најдоминантнијих деривата.

Фенолне киселине

У свим испитиваним узорцима је уочљива доминација пика чији спектар одговара дериватима кафеене киселине ($\lambda_{\max} = 325$ nm), а ретенционо време се поклапа са временом елуирања стандарда 3-*O*-кафеоилхинске (неохлорогенске) киселине. Међутим, када се посматра садржај фенолних једињења у узорку трњине који је анализиран са осталим врстама рода *Prunus* помоћу UPLC-Q-TOF-MS/MS технике (табела 4.1), може да се уочи да је доминантан дериват уствари метил-естар 3-*O*-кафеоилхинске киселине. Ова чињеница указује да су у примењеној HPLC-PDA методи услови били такви да су ова два деривата кафеене киселине (неохлорогенска киселина и њен метил-естар) елуирала заједно, па је тако назначено и у табели 4.6.

Код свих генотипова је идентификован још један дериват кафеене киселине, који је највероватније дериват 5-*O*- или 4-*O*-кафеоилхинске киселине. Ретенционо време (t_R) овог пика је било веома блиско са ретенционим временом стандарда 5-*O*-кафеоилхинске киселине ($t_R = 12,9$ min), али само на основу апсорпционог спектра није било могуће тачно да се утврди који је дериват у питању. У литератури, као и у UPLC-Q-TOF-MS/MS анализи воћа рода *Prunus* чији су резултати приказани у табели 4.1 и дискутовани у претходном одељку је забележено присуство деривата и 5-*O*- и 4-*O*-кафеоилхинске киселине (Gironés-Vilaplana et al., 2013; Guimarães et al., 2013; Meschini et al., 2017).

У узорцима је одређен дериват *p*-кумаринске киселине, на основу UV-Vis спектра и таласне дужине апсорпционог максимума ($\lambda_{\max} = 310$ nm), који су карактеристични за *p*-кумаринску киселину. На основу литературних података (Gironés-Vilaplana et al., 2013; Guimarães et al., 2013; Meschini et al., 2017) и HPLC-MS/MS анализе екстраката воћа рода *Prunus* (табела 4.1) се може претпоставити да је у питању 3-*O-p*-кумароилхинат или метил-естар овог једињења.

Флавоноли

Од флавонолних једињења су, на основу аутентичних стандарда, детектовани кверцетин и његови гликозидни деривати, глукозид и рутинозид. У свим испитиваним

генотиповима трњине је доминирао кверцетин-3-*O*-рутинозид. Садржај овог једињења се кретао од 2,96 mg/100 g LF код *TR-MB/3* до 32,85 mg/100 g LF код *B1*, мада је код већине генотипова износио око 13 mg/100 g LF. Садржај кверцетин-3-*O*-глукозида се кретао од 2,22 mg/100 g LF код генотипа *TR-MB/3* до 11,22 и 11,31 код генотипова *B1* и *B11*. Агликон, кверцетин, је у свим узорцима детектован у веома ниском садржају, од свега 0,01 mg/100 g LF (*B2*, *BL3*, *TR-MB/9*) до 0,48 mg/100 g LF (*TR-MB/5*).

Антоцијани

У свим испитиваним генотиповима трњине је забележено присуство 4 антоцијана. На основу аутентичних стандарда су одређени цијанидин-3-*O*-глукозид, цијанидин-3-*O*-рутинозид, пеонидин-3-*O*-глукозид, а тентативно је одређен пеонидин-3-*O*-рутинозид, на основу апсорпционог спектра и литературе. Ова четири деривата представљају доминантне антоцијане и у истраживањима других аутора који су анализирали плод трњине (Gironés-Vilaplana et al., 2013; Guimarães et al., 2013; Meschini et al., 2017).

Како је приказано у табели 4.4 и на хистограму на слици 4.5, поредећи деривате истог антоцијанидина се види да рутинозиди доминирају над глукозидима. Такође, деривати цијанидина доминирају над дериватима пеонидина. У свим узорцима је одређен највећи садржај цијанидин-3-*O*-рутинозида. Једино је у генотиповима *TR-MB/3*, *TR-MB/9* и *TR-MB/4* забележен низак садржај овог једињења (7,38, 15,83 и 30,00 mg/100 g LF), у генотипу *TR-MB/10* је износио 94,90 mg/100 g LF, док је у екстрактима свих других генотипова садржај прелазео 100 mg/100 g LF. Највећи садржај цијанидин-3-*O*-рутинозида је забележен у генотиповима *B1*, *B11* и *TR-MB/2*, у вредностима од око 180 mg/100 g LF.

Садржај цијанидин-3-*O*-глукозида је варирао међу узорцима. Најнижи садржај је одређен у истим генотиповима у којима је и садржај цијанидин-3-*O*-рутинозида био најмањи (*TR-MB/3*, *TR-MB/9* и *TR-MB/4*) и износио је 4,41, 13,93 и 21,64 mg/100 g LF. Највећи садржај цијанидин-3-*O*-глукозида је одређен у генотиповима *B1* (157,85 mg/100 g LF) и *B11* (183,63 mg/100 g LF).

Садржај пеонидин-3-*O*-рутинозида се кретао у опсегу од 4,62 mg/100 g LF у *TR-MB/9*, до 39,91 и 48,61 mg/100 g LF у генотиповима *BL3* и *B1*. Садржај пеонидин-3-*O*-глукозида је био највећи у генотиповима *B1* и *B11*, у којима је износио 17,58 и 11,38 mg/100 g LF. У свим осталим генотиповима је садржај пеонидин-3-*O*-глукозида био мањи од 10 mg/100 g LF.

Други аутори су забележили још и присуство пентозида и ацетилглукозида цијанидина или пеонидина у плодовима трњине (Guimarães et al., 2013; Meschini et al., 2017), међутим у узорцима испитиваним у оквиру ове дисертације ови деривати нису детектовани.

На основу Пирсонових корелационох коефицијената приказаних у Прилогу 8 се види да су садржаји цијанидин-3-*O*-глукозида и цијанидин-3-*O*-рутинозида у статистички значајним позитивним корелацијама међусобно ($r = 0,870$) и са садржајима деривата 3-*O*-кафеоилхинске и *p*-кумароилхинске киселине ($r \geq 0,653$). Висок степен корелације је и

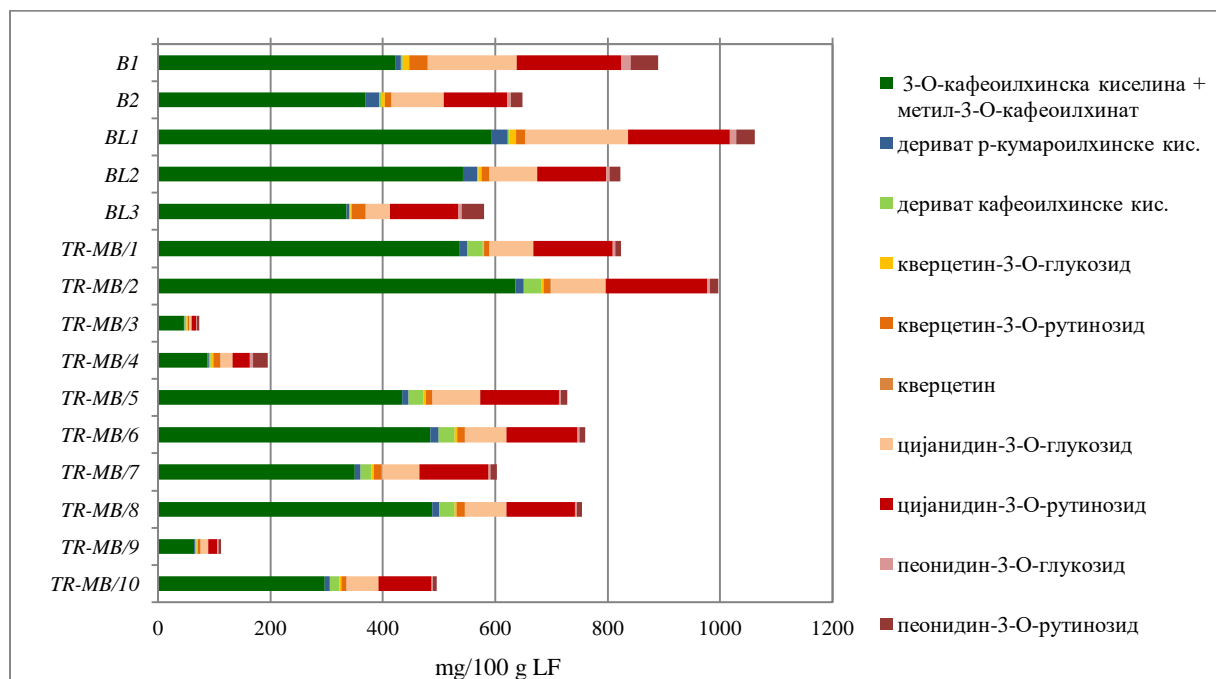
Табела 4.4. Садржај фенолних једињења (mg/100 g лиофилизованог воћа) у екстрактима генотипова трњине (*Prunus spinosa* L.)

| Једињење | 3CQA+ Me3CQA | CoQA der | CQA der | Q3glu | Q3rut | Q | Sy3glu | Sy3rut | Pn3glu | Pn3rut |
|----------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| t_R (min) | 9,1 | 11,5 | 13,1 | 37,9 | 38,4 | 43,7 | 16,6 | 19,1 | 22,7 | 26,2 |
| λ_{max} (nm) | 324 | 310 | 325 | 352 | 353 | 354 | 364 | 517 | 520 | 520 |
| 1. B1 | 422,04 ± 25,32 ^d | 9,99 ± 0,55 ^g | 4,09 ± 0,25 ^f | 11,22 ± 0,28 ^a | 32,85 ± 1,12 ^a | 0,20 ± 0,00 ^g | 157,85 ± 4,74 ^b | 185,62 ± 7,42 ^a | 17,58 ± 0,63 ^a | 48,61 ± 1,22 ^a |
| 2. B2 | 369,32 ± 20,31 ^c | 24,33 ± 1,46 ^b | 3,18 ± 0,10 ^{fg} | 6,63 ± 0,23 ^b | 11,20 ± 0,28 ^f | 0,01 ± 0,00 ⁱ | 94,19 ± 3,77 ^{cd} | 112,81 ± 4,06 ^d | 6,05 ± 0,15 ^c | 21,22 ± 0,47 ^e |
| 3. BL1 | 594,23 ± 35,65 ^a | 28,17 ± 0,85 ^a | 3,57 ± 0,09 ^{fg} | 11,31 ± 0,28 ^a | 15,82 ± 0,47 ^c | 0,03 ± 0,00 ⁱ | 183,63 ± 6,61 ^a | 180,93 ± 4,52 ^a | 11,38 ± 0,25 ^b | 32,31 ± 1,07 ^c |
| 4. BL2 | 543,16 ± 16,29 ^b | 24,31 ± 0,61 ^b | 2,67 ± 0,09 ^{fg} | 5,93 ± 0,18 ^c | 12,77 ± 0,51 ^{def} | 0,26 ± 0,01 ^{ef} | 85,33 ± 2,13 ^{de} | 123,79 ± 2,72 ^d | 4,81 ± 0,16 ^d | 19,61 ± 0,96 ^e |
| 5. BL3 | 335,62 ± 8,39 ^{ef} | 4,80 ± 0,16 ^h | 1,70 ± 0,04 ^g | 2,61 ± 0,10 ^{fg} | 24,29 ± 0,87 ^b | 0,01 ± 0,00 ⁱ | 43,89 ± 0,97 ⁱ | 121,51 ± 4,01 ^d | 6,25 ± 0,34 ^c | 39,91 ± 2,84 ^b |
| 6. TR-MB/1 | 537,21 ± 18,27 ^b | 13,82 ± 0,35 ^{cd} | 27,24 ± 0,82 ^{bc} | 2,10 ± 0,08 ^g | 9,20 ± 0,23 ^g | 0,28 ± 0,01 ^{ef} | 77,88 ± 2,57 ^{ef} | 141,62 ± 6,94 ^b | 3,71 ± 0,26 ^{ef} | 11,34 ± 0,28 ^g |
| 7. TR-MB/2 | 636,14 ± 15,90 ^a | 15,09 ± 0,45 ^c | 30,92 ± 1,24 ^a | 3,65 ± 0,09 ^c | 13,18 ± 0,29 ^{de} | 0,26 ± 0,01 ^f | 97,36 ± 4,77 ^c | 180,86 ± 12,85 ^a | 4,36 ± 0,22 ^{de} | 14,72 ± 0,44 ^f |
| 8. TR-MB/3 | 46,63 ± 1,40 ^g | 0,93 ± 0,04 ⁱ | 2,77 ± 0,10 ^{fg} | 2,22 ± 0,05 ^g | 2,96 ± 0,10 ^h | 0,14 ± 0,01 ^h | 4,41 ± 0,31 ^k | 7,38 ± 0,37 ^g | 1,51 ± 0,08 ⁱ | 5,16 ± 0,11 ^h |
| 9. TR-MB/4 | 87,94 ± 3,52 ^g | 2,52 ± 0,09 ⁱ | 3,15 ± 0,08 ^{fg} | 4,73 ± 0,16 ^d | 12,66 ± 0,62 ^{def} | 0,36 ± 0,03 ^c | 21,64 ± 1,08 ^j | 30,00 ± 1,50 ^f | 6,37 ± 0,14 ^c | 26,02 ± 0,65 ^d |
| 10. TR-MB/5 | 434,73 ± 15,65 ^d | 11,17 ± 0,28 ^{ef} | 26,10 ± 0,57 ^c | 4,34 ± 0,21 ^d | 11,52 ± 0,82 ^{ef} | 0,48 ± 0,02 ^a | 85,01 ± 4,25 ^{de} | 140,00 ± 3,08 ^{bc} | 3,80 ± 0,19 ^{ef} | 10,78 ± 0,36 ^g |
| 11. TR-MB/6 | 484,74 ± 12,12 ^c | 14,45 ± 0,32 ^c | 28,81 ± 0,95 ^b | 4,39 ± 0,11 ^d | 13,12 ± 0,66 ^{de} | 0,29 ± 0,02 ^{de} | 74,52 ± 1,64 ^{fg} | 126,63 ± 6,33 ^{cd} | 3,03 ± 0,10 ^{fg} | 10,34 ± 0,52 ^g |
| 12. TR-MB/7 | 350,18 ± 7,70 ^e | 9,90 ± 0,33 ^{fg} | 20,15 ± 0,99 ^d | 4,46 ± 0,22 ^d | 13,64 ± 0,34 ^d | 0,43 ± 0,01 ^b | 65,91 ± 3,95 ^{gh} | 123,65 ± 4,08 ^d | 3,18 ± 0,16 ^{fg} | 11,84 ± 0,59 ^g |
| 13. TR-MB/8 | 488,12 ± 16,11 ^c | 12,56 ± 0,62 ^{de} | 26,63 ± 1,89 ^c | 4,39 ± 0,13 ^d | 14,07 ± 0,31 ^d | 0,31 ± 0,02 ^d | 73,51 ± 2,43 ^{fg} | 122,23 ± 7,33 ^d | 3,42 ± 0,09 ^f | 9,42 ± 0,28 ^g |
| 14. TR-MB/9 | 64,74 ± 3,17 ^g | 1,62 ± 0,11 ⁱ | 2,94 ± 0,15 ^{fg} | 2,42 ± 0,05 ^{fg} | 4,31 ± 0,22 ^h | 0,01 ± 0,00 ⁱ | 13,93 ± 0,70 ^{jk} | 15,83 ± 0,79 ^{fg} | 2,04 ± 0,12 ^{hi} | 4,62 ± 0,33 ^h |
| 15. TR-MB/10 | 297,28 ± 21,12 ^f | 8,57 ± 0,26 ^g | 17,23 ± 0,43 ^e | 3,06 ± 0,09 ^{ef} | 9,34 ± 0,31 ^g | 0,16 ± 0,01 ^h | 56,25 ± 2,81 ^h | 94,90 ± 4,65 ^e | 2,58 ± 0,18 ^{gh} | 6,89 ± 0,21 ^h |

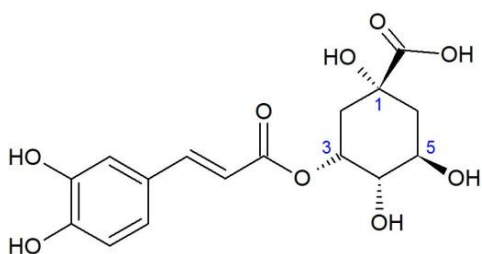
Резултати су изражени у mg једињења / 100 g лиофилизованог воћа (mg/100 g LF). Приказани су као средња вредност ± стандардна девијација ($n = 3$). Вредности у истој колони обележене различитим суперскриптом се статистички значајно разликују на основу *Duncan*-овог теста ($P < 0,01$).

Скраћенице: 3CQA – 3-*O*-кафеоилхинска киселина, Me3CQA – метил-3-*O*-кафеоилхинат, CoQA der – дериват *p*-кумароилхинске киселине, CQA der – дериват кафеоилхинске киселине, Q3glu – кверцетин-3-*O*-глукозид, Q3rut – кверцетин-3-*O*-рутинозид, Q – кверцетин, Sy3glu – цијанидин-3-*O*-глукозид, Sy3rut – цијанидин-3-*O*-рутинозид, Pn3glu – пеонидин-3-*O*-глукозид, Pn3rut – пеонидин-3-*O*-рутинозид.

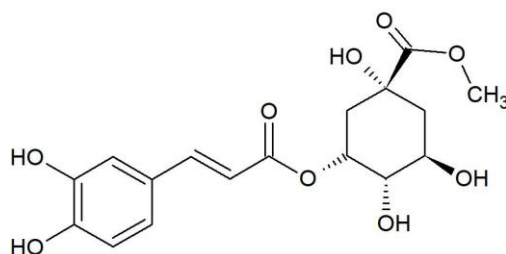
између садржаја цијанидин-3-*O*-глукозида и кверцетин-3-*O*-глукозида ($r = 0,868$). Пеонидин-3-*O*-глукозид и пеонидин-3-*O*-рутинозид су такође у статистички значајној корелацији ($r = 0,894$), као и са садржајима кверцетин-3-*O*-глукозида и кверцетин-3-*O*-рутинозида ($r \geq 0,685$).



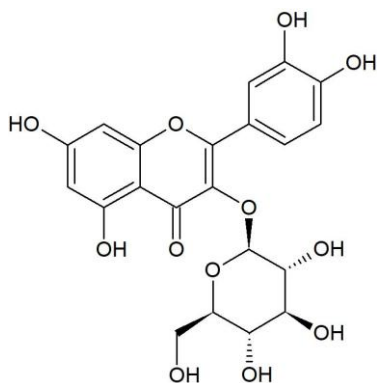
Слика 4.5. Графички приказ садржаја фенолних једињења у испитиваним генотиповима трњине



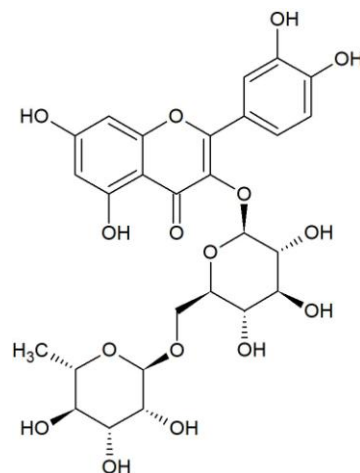
3-*O*-Кафеоилхинска (неохлорогенска) киселина



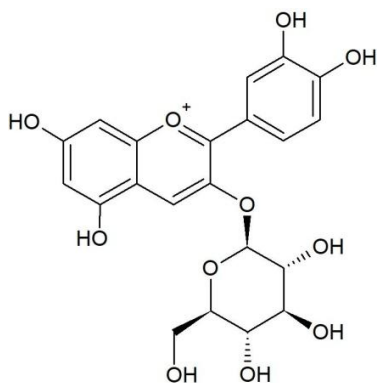
Метил-3-*O*-кафеоилхинат



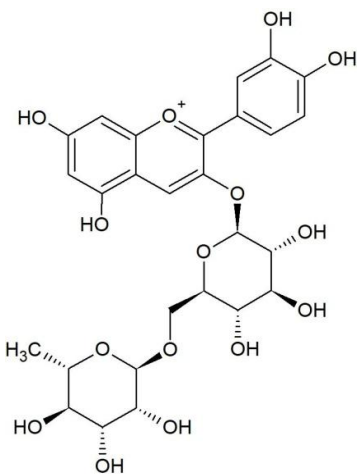
Кверцетин-3-*O*-глукозид



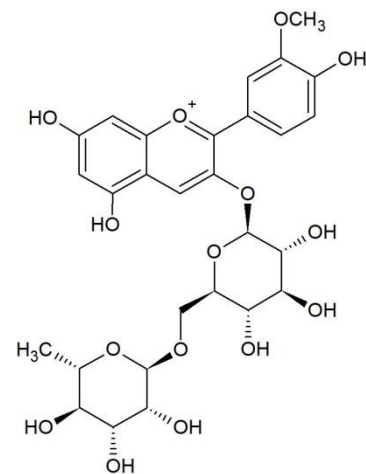
Кверцетин-3-*O*-рутинозид (рутин)



Цијанидин-3-*O*-глукозид



Цијанидин-3-*O*-рутинозид



Пеонидин-3-*O*-рутинозид

Слика 4.6. Доминантна фенолна једињења у плодовима трњине (*Prunus spinosa* L.)

4.2.2. Биоактивни потенцијал генотипова трњине (*Prunus spinosa* L.)

На основу резултата испитивања биолошких активности различитих врста рода *Prunus* који су представљени у табели 4.2 у оквиру претходног одељка, за већину одређених активности трњина се показала као најбоља врста или једна од најбољих. Међутим, када се упореде различити генотипови трњине, види се да долази до мањих или већих варијација у оквиру појединачних параметара.

Антиоксидантни капацитет

Сви генотипови трњине су испољили бољи антиоксидантни капацитет од већине воћа рода *Prunus*, посматрано на основу три теста којима је одређивана ова активност (FC, FRAP и DPPH). Резултати FC теста били су у опсегу вредности 11,10–30,43 mg GAE/100 g LF. Највеће вредности су забележене код генотипова *B1*, *B2* и *BL1*, а најмање код *TR-MB/3* и *TR-MB/9*. Резултати FRAP теста су били у опсегу вредности 7,06–25,27 mg AAE/100 g LF, а IC₅₀ вредности за капацитет неутралисања DPPH радикала су биле у опсегу 4,08–0,62 mg/mL. Као и према FC тесту, и на основу FRAP и DPPH теста су генотипови *BL1*, *B1* и *B2* испољили најјачи, а генотипови *TR-MB/3* и *TR-MB/9* најслабији антиоксидантни капацитет.

Резултати сва три примењена теста за одређивање антиоксидантног капацитета испитиваних генотипова трњине су били у статистички значајној корелацији ($r \geq 0,705$; Прилог 7). Такође су сва три теста била у статистички значајним корелацијама са садржајем деривата *p*-кумароилхинске киселине ($r \geq 0,722$), кверцетин-3-*O*-глукозида ($r \geq 0,723$) и цијанидин-3-*O*-глукозида ($r \geq 0,817$). Резултати FC теста су били у статистички значајној корелацији и са садржајем кверцетин-3-*O*-рутинозида и свих осталих одређених антоцијана, цијанидин-3-*O*-рутинозида, пеонидин-3-*O*-глукозида и пеонидин-3-*O*-рутинозида. Високи степени корелације су установљени и између FRAP теста и садржаја цијанидин-3-*O*-рутинозида ($r = 0,703$), као и између DPPH теста и садржаја глукозида и рутинозида пеонидина ($r = 0,737$ и $0,684$).

Резултати других аутора такође сведоче о високом антиоксидантном капацитету плода трњине. Ruiz-Rodríguez et al. (2014) су на основу истих тестова анализирали антиоксидантни капацитет трњине из области у околини Мадрида. Они су указали на варијације садржаја фенолних једињења и антиоксидантног капацитета у зависности од локалитета и од године у којој су узорци сакупљани. Такође су упоредили узорке трњине и глога и установили два до три пута већи садржај фенолних једињења у узорцима трњине него у узорцима глога. Иако је трњина била много богатија фенолним једињењима, разлике у антиоксидантном капацитету између трњине и глога нису биле толико велике, што указује на могућност да и друга, нефенолна једињења знатно доприносе антиоксидантној активности трњине. Аутори Veličković et al. (2014) су у свом истраживању такође доказали висок антиоксидантни капацитет у неутралисању DPPH радикала као и висок садржај фенолних једињења у узорцима трњине прикупљеним у југоисточној Србији.

Антипролиферативна активност

Најбољу антипролиферативну активност према HT-29 ћелијама су испољили генотипови *BL1*, *BL2*, *BL3*, *B1* и *B2*, са IC_{50} вредностима у опсегу 4,79–10,71 mg/mL, док су се за остале генотипове IC_{50} вредности кретале од 16,41 до 28,48 mg/mL. IC_{50} вредности свих испитиваних генотипова трњине су биле унутар опсега вредности одређених за екстракте воћа рода *Prunus* (табела 4.3).

Вредности коефицијената корелације приказаних у табели у Прилогу 8 указују да је антипролиферативна активност према HT-29 ћелијама у статистички значајној корелацији са FC и DPPH антиоксидантним тестовима ($r = 0,816$ и $r = 0,847$), као и са способношћу инхибиције α -амилазе ($r = 0,925$). Корелациона матрица указује и да антипролиферативној активности екстракта трњине највише доприноси дериват *p*-кумароилхинске киселине ($r = 0,725$). У испитивању Jaganathan et al. (2013) су доказали да *p*-кумаринска киселина има антипролиферативно дејство на ћелије карцинома дебелог црева (HT-29 и HCT-15). Такође су утврдили да је овај ефекат дозно-зависан и да је дејство *p*-кумаринске киселине различито у различитим фазама ћелијског циклуса. Антипролиферативни ефекат на HT-29 ћелије је потврђен и за друге хидроксициметне киселине (кафена, ферулна; Bouzaïene et al., 2015), али и за друге класе фенолних једињења, као нпр. за антоцијане екстраховане из воћа попут грожђа, боровнице и ароније; (Zhao et al., 2004).

Meshini et al (2017) су помешали екстракт трњине са нутрацеутским активирајућим комплексом (смешом аминокиселина, витамина и минералних соли) и добили су препарат који *in vitro* испољава антипролиферативни ефекат на ћелије карцинома дебелог црева (HCT116 и SW480), док не ремети раст здравих ћелија.

Табела 4.5. Биоактивни потенцијал екстракта генотипова трњине (*Prunus spinosa* L.)

| | Активност | FC | FRAP | DPPH | HT-29 | α -Amy | α -Gls | DPP III |
|----|-----------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| # | Јединица | mg GAE/g LF | mg AAE/g LF | IC ₅₀ (mg/mL) | IC ₅₀ (mg/mL) | IC ₅₀ (mg/mL) | IC ₅₀ (mg/mL) | IC ₅₀ (μ g/mL) |
| 1 | B1 | 24,97 \pm 0,99 ^b | 18,74 \pm 0,47 ^c | 0,77 \pm 0,01 ^b | 10,71 \pm 0,46 ^e | 1,03 \pm 0,07 ^b | 0,35 \pm 0,01 ^b | 28,66 \pm 0,08 ^a |
| 2 | B2 | 26,36 \pm 0,82 ^b | 20,89 \pm 0,67 ^b | 1,18 \pm 0,02 ^c | 6,84 \pm 0,30 ^c | 1,11 \pm 0,04 ^c | 0,78 \pm 0,03 ^e | 27,49 \pm 0,04 ^a |
| 3 | BL1 | 30,43 \pm 0,27 ^a | 25,27 \pm 0,98 ^a | 0,62 \pm 0,01 ^a | 4,79 \pm 0,22 ^a | 0,85 \pm 0,03 ^a | 0,34 \pm 0,01 ^b | 58,93 \pm 0,7 ^c |
| 4 | BL2 | 20,93 \pm 2,69 ^c | 11,51 \pm 1,20 ^f | 0,75 \pm 0,01 ^b | 5,88 \pm 0,21 ^b | 0,89 \pm 0,03 ^a | 0,29 \pm 0,01 ^a | 44,85 \pm 0,35 ^b |
| 5 | BL3 | 25,28 \pm 0,52 ^b | 13,42 \pm 0,44 ^{de} | 1,24 \pm 0,02 ^{cd} | 7,47 \pm 0,32 ^d | 1,92 \pm 0,15 ^d | 1,34 \pm 0,69 ^g | 29,93 \pm 0,05 ^a |
| 6 | TR-MB/1 | 18,95 \pm 1,52 ^{cde} | 11,42 \pm 0,96 ^f | 1,92 \pm 0,06 ^{gh} | 16,41 \pm 0,72 ^f | 24,58 \pm 5,32 ^{fg} | 1,23 \pm 0,05 ^g | 46,62 \pm 1,38 ^b |
| 7 | TR-MB/2 | 19,30 \pm 0,12 ^{cde} | 12,41 \pm 0,29 ^{ef} | 1,60 \pm 0,04 ^{ef} | 18,55 \pm 0,83 ^{fgh} | 10,33 \pm 0,76 ^{ef} | 1,21 \pm 0,04 ^{fg} | 44,28 \pm 0,3 ^b |
| 8 | TR-MB/3 | 11,10 \pm 0,57 ^h | 7,06 \pm 0,66 ^h | 4,08 \pm 0,30 ⁱ | 22,73 \pm 0,80 ^{hij} | 76,72 \pm 3,11 ^g | 1,32 \pm 0,06 ^g | 67,53 \pm 1,16 ^d |
| 9 | TR-MB/4 | 14,94 \pm 0,04 ^g | 9,04 \pm 1,06 ^g | 2,35 \pm 0,02 ^h | 21,81 \pm 0,94 ^{hij} | 11,91 \pm 0,58 ^{efg} | 0,57 \pm 0,02 ^d | 100,72 \pm 0,57 ^g |
| 10 | TR-MB/5 | 18,48 \pm 0,33 ^{de} | 13,81 \pm 0,75 ^{de} | 1,55 \pm 0,15 ^e | 20,57 \pm 0,91 ^{ghi} | 8,69 \pm 0,72 ^e | 0,96 \pm 0,04 ^f | 108,13 \pm 1,34 ^h |
| 11 | TR-MB/6 | 20,26 \pm 0,41 ^{cd} | 17,89 \pm 0,76 ^c | 1,39 \pm 0,04 ^{de} | 23,15 \pm 1,04 ^{ij} | 12,29 \pm 1,86 ^{efg} | 0,75 \pm 0,03 ^e | 85,15 \pm 1,43 ^f |
| 12 | TR-MB/7 | 17,75 \pm 0,33 ^e | 14,25 \pm 0,53 ^d | 2,10 \pm 0,02 ^{gh} | 24,52 \pm 0,86 ^{ij} | 15,00 \pm 1,84 ^{efg} | 0,36 \pm 0,02 ^b | 76,31 \pm 1,15 ^e |
| 13 | TR-MB/8 | 17,18 \pm 0,36 ^e | 13,74 \pm 0,19 ^{de} | 1,83 \pm 0,05 ^{fg} | 25,13 \pm 1,08 ^{ij} | 18,06 \pm 2,20 ^{efg} | 0,48 \pm 0,24 ^c | 117,26 \pm 1,55 ⁱ |
| 14 | TR-MB/9 | 11,84 \pm 0,52 ^h | 7,37 \pm 0,59 ^h | 2,09 \pm 0,03 ^{gh} | 28,48 \pm 1,25 ^j | 63,55 \pm 3,17 ^g | 0,77 \pm 0,03 ^e | н.д. |
| 15 | TR-MB/10 | 15,31 \pm 0,09 ^{fg} | 12,77 \pm 0,25 ^{def} | 3,46 \pm 0,04 ⁱ | 17,23 \pm 0,76 ^{fg} | 23,95 \pm 0,65 ^{fg} | 0,87 \pm 0,03 ^{ef} | 226,86 \pm 7,97 ^j |
| | стандард | - | - | Тролокс 0,04 \pm 0,00 | - | Акарбоза 0,11 \pm 0,01 | Акарбоза 3,73 \pm 0,08 | - |

Резултати су изражени као средња вредност \pm стандардна девијација ($n = 3$). Вредности у истој колони обележене различитим суперскриптом се статистички значајно разликују на основу *Duncan*-овог теста ($P < 0,01$).

Скраћенице: GAE – еквиваленти галне киселине, AAE – еквиваленти аскорбинске киселине, FC – Folin-Ciocalteu редукциони тест, FRAP – капацитет редукције Fe³⁺ јона, DPPH – капацитет неутрализације DPPH радикала, HT-29 – антипролиферативна активност према ћелијама хуманог аденокарцинома дебелог црева, α -Amy – способност инхибиције α -амилазе, α -Gls – способност инхибиције α -глюкозидазе, DPP III – способност инхибиције дипептидил-пептидазе III, IC₅₀ – концентрација екстракта која за 50% смањи активност, н.д. – није одређено.

Способност инхибиције ензима α -амилазе и α -глукозидазе

Сви генотипови трњине су испољили способност инхибиције ензима α -амилазе и α -глукозидазе. Међутим, уочене су велике разлике међу генотиповима у погледу ових активности, поготово у способности инхибиције α -амилазе. За све генотипове IC_{50} вредности су биле у опсегу од 0,85 mg/mL за *BL1* до 76,72 mg/mL за *TR-MB/3*. Првих пет у табели 4.5 наведених генотипова, *B1*, *B2*, *BL1*, *BL2* и *BL3*, су показали до 10, 20 и до 70 пута бољу способност инхибиције α -амилазе у односу на остале генотипове.

Способност свих анализираних генотипова трњине да инхибирају активност α -глукозидазе је била боља од референтног стандарда акарбозе. Одређене IC_{50} вредности генотипова трњине су биле у опсегу од 0,29 mg/mL за *BL2* до 1,34 mg/mL за *BL3*. Инхибиција α -глукозидазе је била у статистички значајној корелацији једино са садржајем кверцетин-3-*O*-глукозида ($r = 0,709$) и са резултатима DPPH теста ($r = 0,673$).

Способност инхибиције DPP III ензима

Екстракт само једног генотипа (*TR-MB/9*) није показао инхибиторну активност према ензиму DPP III. Способност осталих анализираних генотипова трњине да инхибирају DPP III, изражена преко IC_{50} вредности, је била у опсегу 27,49–226,86 mg/mL. Инхибиција ензима DPP III је била у статистички значајној корелацији једино са садржајем пеонидин-3-*O*-рутинозида ($r = 0,713$) и са резултатима FC теста ($r = 0,707$).

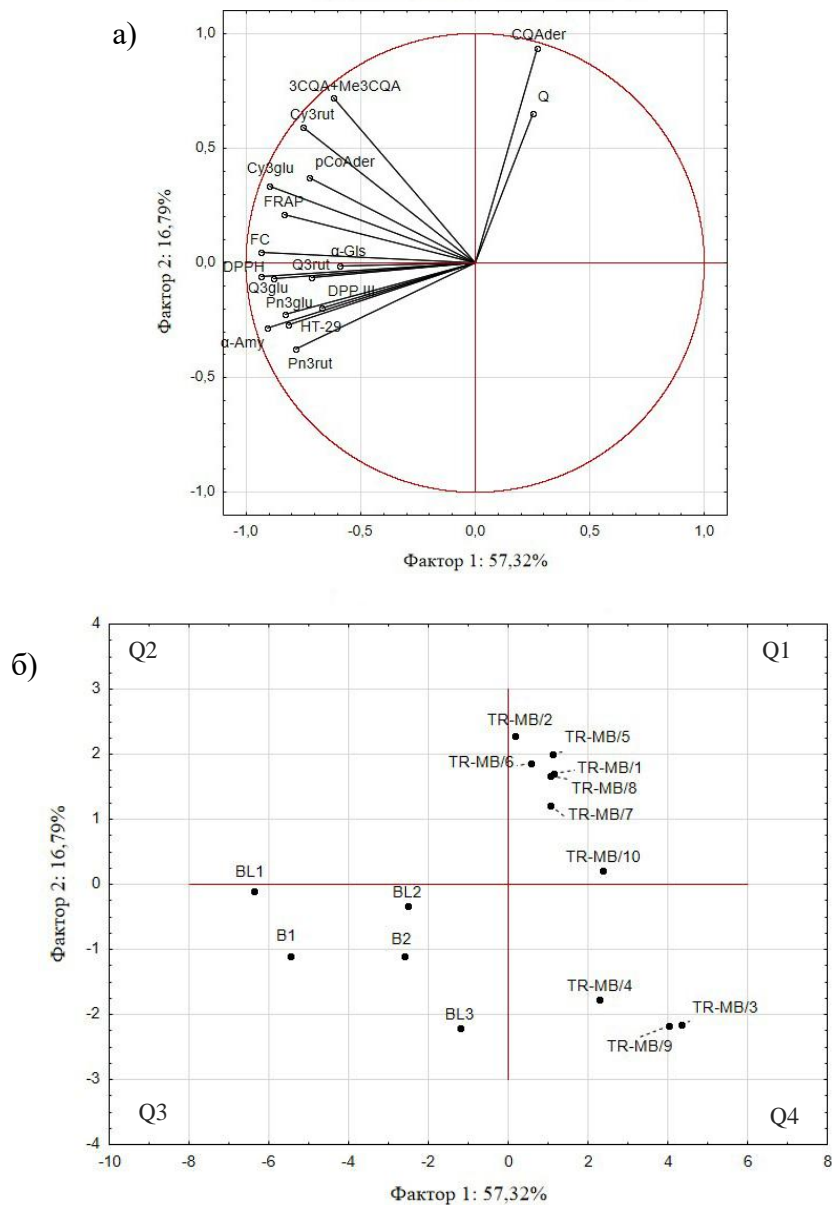
4.2.3. PCA анализа фитохемијског састава и биолошких активности генотипова трњине (*Prunus spinosa* L.)

За генотипове трњине, PCA анализом је обухваћено 17 варијабли (10 фенолних деривата и 7 биолошких активности) одређених за 15 генотипова. *Loadings plot* и *Scores plot* графици су приказани на слици 4.7, а карактеристичне вредности, факторске координате и доприноси варијабли и узорака факторима су приказани у Прилогу 9.

Фактором 1 је обухваћено 57,32% варијабилности, а фактором 2 је обухваћено 16,79%, што описује укупно 74,11% варијабилности међу узорцима. Карактеристичне вредности ових фактора су износиле редом 9,744 и 2,854. Карактеристичне вредности свих фактора, као и доприноси варијабли и генотипова фактору 1 и фактору 2 су дати у Прилогу 9.

На основу *Loadings plot*-а (слика 4.7а) и вредности из прилога се уочава да су највећи допринос фактору 1 дали тестови антиоксидантног капацитета (FC, DPPH и FRAP), способност инхибиције α -амилазе и садржаји цијанидин-3-*O*-глукозида и кверцетин-3-*O*-глукозида. Највећи допринос фактору 2 су дали деривати кафене киселине, кверцетин и цијанидин-3-*O*-рутинозид.

На *Scores plot*-у (слика 4.7б) су у III квадранту издвојени генотипови у којима је одређен највећи садржај фенолних једињења и који су показали најбоље резултате за тестове биолошких активности (*B1*, *B2*, *BL1*, *BL2* и *BL3*). Генотипови са умереним садржајем фенолних једињења и биолошким одговором су груписани у I квадранту (*TR-MB/1*, *TR-MB/2*, *TR-MB/5*, *TR-MB/6*, *TR-MB/7*, *TR-MB/8* и *TR-MB/10*), а они који су били најмање активни у IV (*TR-MB/3*, *TR-MB/4* и *TR-MB/9*).



Слика 4.7. Loadings plot (а) и Scores plot (б) PCA анализе садржаја фенолних једињења и биолошких активности генотипова трњине (*Prunus spinosa* L.)

Скраћенице: 3CQA – 3-*O*-кафеоилхинска киселина, Me3CQA – метил-3-*O*-кафеоилхинат, CoQA der – дериват *p*-кумароилхинске киселине, CQA der – дериват кафеоилхинске киселине, Q3glu – кверцетин-3-*O*-глукозид, Q3rut – кверцетин-3-*O*-рутинозид, Q – кверцетин, Cy3glu – цијанидин-3-*O*-глукозид, Cy3rut – цијанидин-3-*O*-рутинозид, Pn3glu – пеонидин-3-*O*-глукозид, Pn3rut – пеонидин-3-*O*-рутинозид; FC – Folin-Ciocalteu редукциони тест, FRAP – капацитет редукције Fe³⁺ јона, DPPH – капацитет неутрализације DPPH радикала, HT-29 – антипролиферативна активност према ћелијама хуманог аденокарцинома дебелог црева, α -Amy – способност инхибиције α -амилазе, α -Gls – способност инхибиције α -глукозидазе, DPP III – способност инхибиције дипептидил-пептидазе III.

4.3. Фитохемијска карактеризација и биолошке активности дрена (*Cornus mas* L.)

Резултати фитохемијске карактеризације и биолошких активности генотипова дрена и молекулског докинга једињења дрена са ензимима α -амилаза, α -глюкозидаза и DPP III, добијени у оквиру ове докторске дисертације су објављени у публикацији Vladojević et al. (2020).

4.3.1. Фенолни и иридоидни профил генотипова дрена (*Cornus mas* L.)

Садржаји фенолних и иридоидних једињења у екстрактима плодова дрена, одређени HPLC-PDA техником, су приказани у табелама 4.7а и 4.7б., а графички приказ помоћу хистограма је дат на слици 4.8 У Прилогу 10 су дати хроматограми очитани на 245, 280, 320, 350 и 520 nm и за анализирани екстракт сорте *Svetlyachok*, са обележеним пиковима идентификованих једињења. У оквиру ове дисертације је у испитиваним сортама и селекцијама дрена идентификовано и квантификовано 11 фенолних једињења и 5 иридоида.

Све испитиване узорке дрена карактерише висок садржај два иридоидна једињења – логанске киселине и корнузида, и два антоцијана – цијанидин-3-*O*-галактозида и пеларгонидин-3-*O*-галактозида. Ова једињења су у екстрактима свих генотипова била заступљена са уделом преко 90 % у односу на укупни садржај фенолних и иридоидних једињења одређених у екстрактима. У истраживању спроведеном на 28 пољских и украјинских генотипова дрена (Kucharska et al., 2015), је установљена доминантност идентичних једињења, без обзира на различите географске локалитете и факторе спољашње средине. Једино је код сорти са жутим плодовима дрена садржај антоцијана био веома низак или их готово уопште нема. Наведена четири једињења и проценат њихове заступљености би могли да имају примену као хемотаксономски маркери генотипова дрена са црвеним плодовима.

Иридоиди

Садржај логанске киселине се у испитиваним узорцима кретао у распону од 499,67 mg/100 g LF у селекцији *KIC1* до 1111,30 mg/100 g LF у сорти *Svetlyachok*. Садржај логанске киселине је био у статистички сигнификантној корелацији са садржајем сверозида ($r = 0,936$; Прилог 8) иако је логанска киселина присутна у скоро двадесет пута већој концентрацији. Садржај корнузида је износио од 59,41 mg/100 g LF у *KIC1* до 162,51 mg/100 g LF у сорти *Semen*. Логанин и секоксилоганин су преостала два детектована иридоидна једињења у испитаним генотиповима дрена.

Антоцијани

Међу фенолним једињењима, као што је већ напоменуто, највиши је садржај антоцијана, са нагласком на доминантност галактозида цијанидина и пеларгонидина. У селекцијама *Apatinski rani*, *KIC1* и *R1* је доминирао пеларгонидин-3-*O*-галактозид, док је код осталих узорака цијанидин-3-*O*-галактозид био најзаступљенији. Сорта *Svetlyachok* је

била најбогатија антоцијанима, са количинама од 968,20 mg/100 g LF цијанидин-3-*O*-галактозида и 211,06 mg/100 g LF пеларгонидин-3-*O*-галактозида. Поред ових антоцијана, у свим испитаним екстрактима дрена, у знатно мањим количинама су присутни делфинидин-3-*O*-галактозид и пеларгонидин-3-*O*-робинобиозид. Овакав профил антоцијана је код дрена уобичајен и детектован је и од стране других аутора (Jayaragasam et al., 2006; Kucharska et al., 2015; Kawa-Rygielska et al., 2019). У дрену је забележено још и присуство цијанидин-3-*O*-робинобиозида и глукозидних деривата антоцијанидина који су у овом раду детектовани (Antolak et al., 2017; Milenković-Andjelković et al., 2015; Pawlowska et al., 2010).

Флавоноли

Једини детектован флавонол у узорцима је био кемферол-3-*O*-галактозид. У анализама италијанских и пољских генотипова дрена (Pawlowska et al., 2010; Kucharska, 2012) су нађени и деривати кверцетина, међутим у генотиповима испитиваним у оквиру ове дисертације, они су били испод границе детекције.

Фенолне киселине

Trans изомер кафтаринске киселине је најдоминантнија хидроксициметна киселина код свих испитаних генотипова. *Cis*-Кафтаринска киселина је други по заступљености кафеоил-дериват у узорцима. Њихов садржај је био највећи у сорти *Svetlyachok* и износио је 1,22 и 0,23 mg/100 g LF за *trans* и *cis* изомер. У свим екстрактима је утврђено присуство четири деривата *p*-кумаринске киселине, али они нису могли појединачно прецизно да се идентификују, па је њихов садржај представљен збирно. На основу апсорпционих спектра ових једињења и литературних података, вероватно је да су присутни *p*-кумароилхинска киселина и гликозиди *p*-кумаринске киселине (Kucharska, 2012). Од фенолних киселина, у екстрактима дрена присутне су биле и гална и елагна киселина, у распону концентрација 0,10–2,86 mg/100 g LF и 0,43–5,40 mg/100 g LF.

Табела 4.6. Садржај фенолних и иридоидних једињења (mg/100 g лиофилизованог воћа) у екстрактима генотипова дрена (*Cornus mas* L.)

| Једињење | LA | Sw | Ln | Sec | Cn | Dp3gal | Sy3gal | Pg3gal | Pg3rob |
|--------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| t_R (min) | 13,5 | 19,2 | 22,1 | 27,5 | 42,0 | 13,9 | 15,7 | 18,4 | 21,7 |
| λ_{max} (nm) | 240 | 239 | 239 | 240 | 239, 272 | 525 | 518 | 505 | 503 |
| 1. <i>Apatinski rani</i> | 852,04 ± 19,68 ^c | 29,05 ± 0,59 ^d | 1,95 ± 0,05 ^e | 1,06 ± 0,03 ^e | 69,35 ± 1,60 ^{de} | 1,42 ± 0,03 ^{bc} | 21,89 ± 0,63 ^f | 106,11 ± 2,14 ^d | 3,76 ± 0,10 ^d |
| 2. <i>Vačka</i> | 1111,30 ± 22,46 ^a | 65,77 ± 1,52 ^a | 4,83 ± 0,10 ^d | 4,01 ± 0,08 ^b | 125,87 ± 3,27 ^b | 0,93 ± 0,02 ^{bc} | 105,20 ± 2,43 ^d | 52,08 ± 1,50 ^e | 3,21 ± 0,06 ^{de} |
| 3. <i>KIC1</i> | 499,67 ± 14,42 ^d | 14,49 ± 0,42 ^e | 0,47 ± 0,01 ^f | 1,01 ± 0,02 ^e | 59,41 ± 1,37 ^e | 0,88 ± 0,02 ^{bc} | 77,10 ± 1,56 ^{de} | 130,83 ± 3,02 ^e | 8,84 ± 0,18 ^b |
| 4. <i>RI</i> | 962,84 ± 22,24 ^b | 45,65 ± 1,32 ^b | 10,09 ± 0,29 ^a | 3,69 ± 0,11 ^{bc} | 71,42 ± 1,44 ^d | 0,19 ± 0,00 ^c | 36,63 ± 0,85 ^{ef} | 55,31 ± 1,44 ^e | 2,88 ± 0,08 ^e |
| 5. <i>Elegantnyi</i> | 553,45 ± 15,98 ^d | 25,60 ± 0,52 ^d | 6,27 ± 0,14 ^c | 1,84 ± 0,04 ^d | 113,37 ± 2,29 ^c | 2,19 ± 0,04 ^b | 153,46 ± 3,99 ^c | 121,66 ± 3,51 ^c | 7,46 ± 0,17 ^c |
| 6. <i>Semen</i> | 789,03 ± 20,50 ^c | 36,01 ± 0,83 ^c | 8,47 ± 0,24 ^b | 3,45 ± 0,10 ^{cd} | 162,51 ± 4,69 ^a | 1,99 ± 0,06 ^b | 257,48 ± 5,20 ^b | 144,33 ± 2,92 ^b | 6,93 ± 0,20 ^c |
| 7. <i>Svetlyachok</i> | 1054,78 ± 21,31 ^a | 62,21 ± 1,62 ^a | 4,91 ± 0,11 ^d | 4,63 ± 0,11 ^a | 121,02 ± 3,49 ^{bc} | 29,84 ± 0,86 ^a | 968,20 ± 27,95 ^a | 211,06 ± 4,87 ^a | 10,09 ± 0,23 ^a |

Резултати су изражени у mg једињења / 100 g лиофилизованог воћа (mg/100 g LF). Приказани су као средња вредност ± стандардна девијација ($n = 3$). Вредности у истој колони обележене различитим суперскриптом се статистички значајно разликују на основу *Duncan*-овог теста ($P < 0,01$).

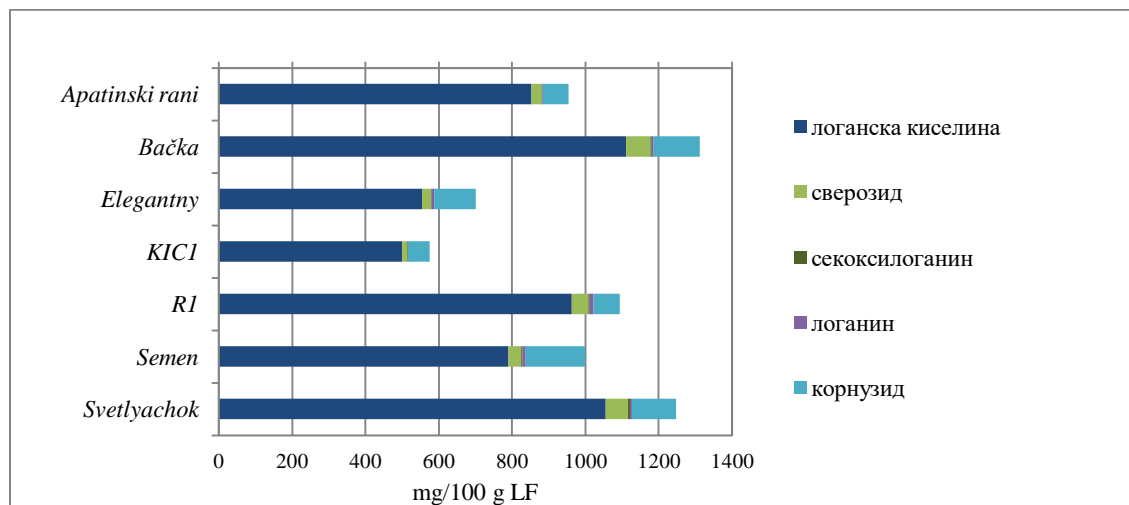
Скраћенице: LA – логанска киселина, Sw – сверозид, Sec – секоксилогенин, Ln – логанин, Cn – корнузид, Dp3gal – делфинидин-3-*O*-галактозид, Sy3glu – цијанидин-3-*O*-глукозид, Sy3gal – цијанидин-3-*O*-галактозид, Pg3glu – пеларгонидин-3-*O*-глукозид, Pg3gal – пеларгонидин-3-*O*-галактозид, Pg3rob – пеларгонидин-3-*O*-робинобиозид, Kf3gal – кемферол-3-*O*-галактозид, GA – гална киселина, GA der – дериват галне киселине, CA – кафена киселина, cCfA – *cis*-кафтаринска киселина, tCfA – *trans*-кафтаринска киселина, pCoAsum – сума деривата *p*-кумаринске киселине, EA – елагинска киселина

Табела 4.6. (наставак) Садржај фенолних и иридоидних једињења (mg/100 g лиофилизованог воћа) у екстрактима генотипова дрена (*Cornus mas* L.)

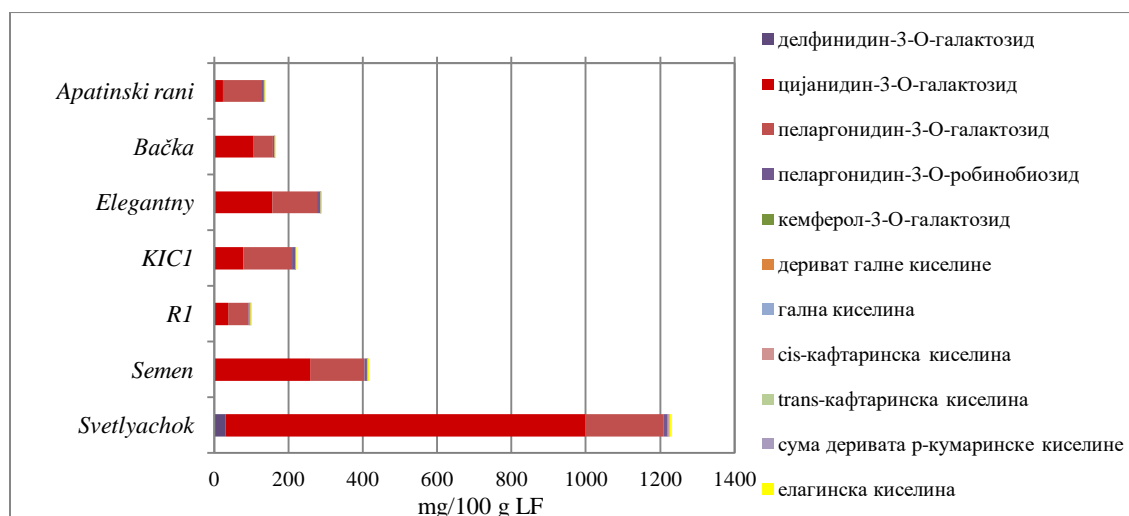
| Једињење | Kf3gal | GA der | GA | cCftA | tCftA | pCoAsum | EA |
|--------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| t_R (min) | 41,2 | 3,6 | 5 | 10,3 | 13,6 | 10,6–17,7 | 38,3 |
| λ_{max} (nm) | 342 | 275 | 270 | 327 | 327 | 308–310 | 254 |
| 1. <i>Apatinski rani</i> | 0,38 ± 0,01 ^a | 0,31 ± 0,01 ^{de} | 0,18 ± 0,00 ^d | 0,16 ± 0,00 ^c | 0,91 ± 0,03 ^b | 0,21 ± 0,00 ^g | 1,09 ± 0,03 ^e |
| 2. <i>Vačka</i> | 0,13 ± 0,00 ^d | 0,38 ± 0,01 ^{cde} | 0,36 ± 0,01 ^c | 0,12 ± 0,00 ^d | 0,37 ± 0,01 ^{de} | 0,26 ± 0,00 ^f | 2,80 ± 0,06 ^c |
| 3. <i>KIC1</i> | 0,32 ± 0,01 ^b | 0,26 ± 0,01 ^e | 0,10 ± 0,00 ^e | 0,12 ± 0,00 ^d | 0,40 ± 0,01 ^d | 0,36 ± 0,00 ^d | 0,43 ± 0,01 ^f |
| 4. <i>RI</i> | 0,13 ± 0,00 ^d | 1,70 ± 0,05 ^b | 0,62 ± 0,02 ^b | 0,19 ± 0,00 ^b | 0,66 ± 0,02 ^c | 0,27 ± 0,00 ^e | 2,06 ± 0,05 ^d |
| 5. <i>Elegantnyi</i> | 0,25 ± 0,01 ^c | 0,46 ± 0,01 ^c | 0,61 ± 0,01 ^b | 0,11 ± 0,00 ^d | 0,30 ± 0,01 ^e | 0,41 ± 0,01 ^c | 1,33 ± 0,03 ^e |
| 6. <i>Semen</i> | 0,25 ± 0,01 ^c | 0,43 ± 0,01 ^{cd} | 0,61 ± 0,02 ^b | 0,15 ± 0,00 ^c | 0,44 ± 0,01 ^d | 0,44 ± 0,00 ^b | 3,32 ± 0,07 ^b |
| 7. <i>Svetlyachok</i> | 0,26 ± 0,01 ^c | 2,86 ± 0,07 ^a | 0,77 ± 0,02 ^a | 0,23 ± 0,01 ^a | 1,22 ± 0,04 ^a | 0,67 ± 0,00 ^a | 5,40 ± 0,16 ^a |

Резултати су изражени у mg једињења / 100 g лиофилизованог воћа (LF). Приказани су као средња вредност ± стандардна девијација ($n = 3$). Вредности у истој колони обележене различитим суперскриптом се статистички значајно разликују на основу *Duncan*-овог теста ($P < 0,01$).

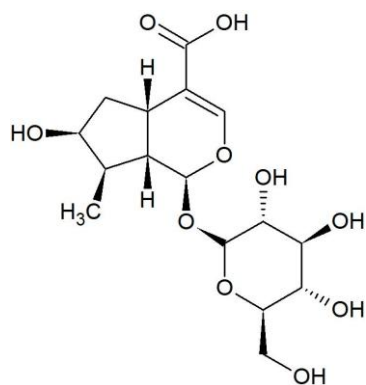
Скраћенице: LA – логанска киселина, Sw – сверозид, Sec – секоксилоганин, Ln – логанин, Cn – корнузид, Dp3gal – делфинидин-3-*O*-галактозид, Су3glu – цијанидин-3-*O*-глукозид, Су3gal – цијанидин-3-*O*-галактозид, Pg3glu – пеларгонидин-3-*O*-глукозид, Pg3gal – пеларгонидин-3-*O*-галактозид, Pg3rob – пеларгонидин-3-*O*-робинобиозид, Kf3gal – кемферол-3-*O*-галактозид, GA – гална киселина, GA der – дериват галне киселине, CA – кафена киселина, cCftA – *cis*-кафтаринска киселина, tCftA – *trans*-кафтаринска киселина, pCoAsum – сума деривата *p*-кумаринске киселине, EA – елагинска киселина



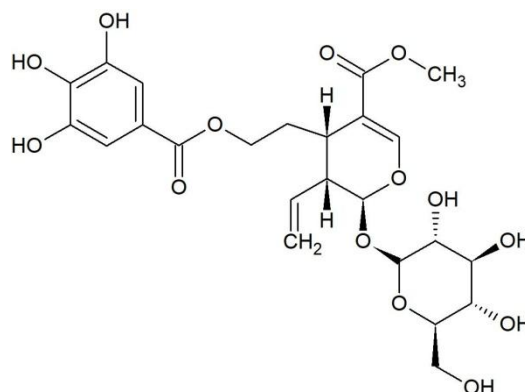
Слика 4.8а. Графички приказ садржаја иридоидних једињења у испитиваним генотиповима дрена



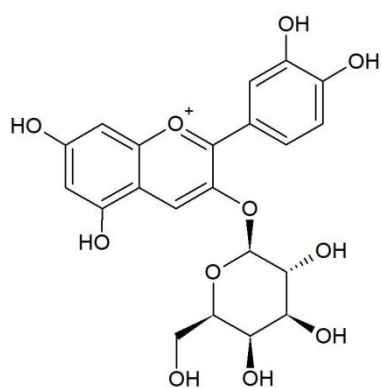
Слика 4.8б. Графички приказ садржаја фенолних једињења у испитиваним генотиповима дрена



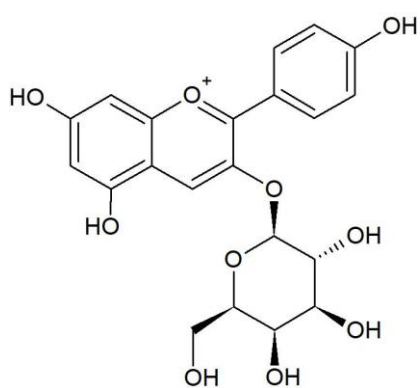
логанска киселина



корнузид



цијанидин-3-О-галактозид



пеларгонидин-3-О-галактозид

Слика 4.9. Доминантна иридоидна једињења и антоцијани у екстрактима плодова дрена (*Cornus mas* L.)

4.3.2. Биоактивни потенцијал генотипова дрена (*Cornus mas* L.)

Резултати биоактивног потенцијала испитиваних селекција и сорти дрена су приказани у табели 4.7.

Антиоксидантни капацитет генотипова дрена

Вредности за FC тест су износиле 10,15–21,68 mg GAE/100 g LF, а за FRAP тест 7,83–23,95 mg AAE/100 g LF. Установљен је висок степен корелације између FC и FRAP тестова ($r = 0,973$). За способност „хватања“ DPPH радикала IC₅₀ вредности су износиле 1,76–3,59 mg/mL. За сва три антиоксидантна теста најбољи резултат је имала сорта *Svetlyachok*, а најмање активна је била селекција *Apatinski rani*.

Добијени резултати за антиоксидантни капацитет су у сагласности са резултатима одређеним за пољске (Kucharska et al., 2007) и турске (Yilmaz et al., 2009) генотипове дрена, као и за грчку аутохтону сорту дрена (Pantelidis et al., 2007). У поређењу са другим бобичастим воћем, антиоксидантни капацитет дрена је у рангу са малином, већи је него капацитет црвене рибизле, али је мањи од купине (Pantelidis et al., 2007).

Са резултатима FC и FRAP теста највиши Пирсонов коефицијент корелације су имали цијанидин-3-*O*-галактозид и елагинска киселина ($r \geq 0,930$, Прилог 11). Резултати DPPH теста су били у високој корелацији са садржајима сверозида ($r = 0,930$) и секоксилоганина ($r = 0,993$), иако су ова једињења била присутна у веома ниским концентрацијама.

Антипролиферативна активност генотипова дрена према HT-29 ћелијама

Сви генотипови дрена су испољили значајну способност инхибиције пролиферације HT-29 ћелија. Забележене су мале варијације у IC₅₀ вредностима међу генотиповима. Најниже IC₅₀ вредности су постигле сорта *Svetlyachok* и селекција *Vačka* (9,14 и 9,93 mg/mL) док су за све остале узорке вредности биле око 13 mg/mL.

У раду Tiptiri-Kourpeti et al. (2019) је такође доказана дозно-зависна антипролиферативна активност плодова дрена на неколико туморских ћелија, укључујући и HT-29 ћелије. Када се резултати упореде са резултатима добијеним за екстракте другог воћа, антипролиферативна способност плодова дрена испитаних у оквиру ове дисертације је у рангу са резултатима добијеним за различите сорте вишње (Serra et al., 2011a) и за најбоље генотипове трњине описане у претходном поглављу.

На основу корелационе анализе, највећи допринос антипролиферативној активности плодова дрена су дали сверозид, елагинска киселина, галактозиди делфинидина и цијанидина и логанска киселина ($r \geq 0,719$), али ове вредности нису биле статистички значајне за $p < 0,01$ (Прилог 11).

Способност инхибиције α -амилазе и α -глукозидазе

Екстракти свих генотипова дрена су показали способност инхибиције ензима α -амилазе и α -глукозидазе. Инхибиторна способност је изражена преко IC₅₀ вредности.

Као најбољи инхибитори активности ензима α -амилазе су се показали екстракти селекције *Ваќка* и сорте *Svetlyachok*, са IC_{50} вредностима 3,56 и 4,31 mg/mL. Њих су следиле селекције *R1* и *Apatinski rani* са IC_{50} вредностима од 7,71 и 8,00 mg/mL, а затим сорте *Semen* и *Elegantnyi*, и селекција *KIC1* (IC_{50} 10,34–13,81 mg/mL). Акарбоза се ипак показала као бољи инхибитор α -амилазе ($IC_{50} = 0,11$ mg/mL).

Сви генотипови дрена су показали бољу инхибиторну способност α -глукозидазе од комерцијалног инхибитора акарбозе ($IC_{50} = 3,73$ mg/mL). За анализиране сорте и селекције IC_{50} вредности су биле међусобно блиске и у распону 0,19–0,37 mg/mL. Најнижа IC_{50} вредност од 0,19 mg/mL је одређена за *Svetlyachok* и *KIC1*. IC_{50} вредности од 0,28 и 0,29 mg/mL су постигли *R1*, односно *Apatinski rani*, 0,33 mg/mL сорта *Semen*, а 0,37 mg/mL *Ваќка* и *Elegantnyi* дрен.

Испитивањем различитих екстраката плодова дрена Świerczewska et al. (2019) су доказали инхибиторно дејство дрена на α -амилазу и панкреасну липазу. Инхибиторна способност дрена анализираних у овом истраживању (Świerczewska et al. (2019) према α -амилази је била слабија од акарбозе, као што је то био случај са генотиповима анализираним у оквиру ове дисертације. У истраживању (Shishehbor et al., 2006), поређењем инхибиторне активности плодова дрена, вишње и уве према α -амилази и α -глукозидази, дрен се истакао са нешто бољим инхибиторним потенцијалом, али су сви испитивани плодови показали инхибиторну способност и могућу примену у виду функционалне хране у антидијабетске сврхе.

Дрен се у традиционалној медицини од давнина користи као антидијабетски агенс (Hosseinpour-Jaghdani et al., 2017; Dinda et al., 2016). Експериментално је доказано да смањује гојазност и нетолеранцију на глукозу (Jayaprakasam et al., 2006). Поред *in vitro* доказаног инхибиторног потенцијала према дигестивним ензимима α -амилази и α -глукозидази, истражују се и други механизми његовог антидијабетског дејства (Dzydzan et al., 2019).

Способност инхибиције дипептидил пептидазе III (DPP III)

Резултати добијени у *in vitro* експерименту за одређивање способности инхибиције DPP III указују на велике разлике међу генотиповима дрена у погледу инхибиторне способности. Способност инхибиције је варијирала од потпуног недостатка активности забележене за селекцију *Apatinski rani* до најниже IC_{50} вредности од 33,86 μ g/mL добијене за сорту *Svetlyachok*.

Највиша позитивна корелација са инхибицијом DPP III је добијена за иридоид секоксилоганин ($r = 0,986$). Такође је висок коефицијент корелације ($r = 0,965$) између способности инхибиције ензима DPP III и неутрализације DPPH радикала, док је низак коефицијент корелације између инхибиције DPP III и α -амилазе и α -глукозидазе, што може да указује на различите механизме инхибиције ових ензима.

Табела 4.7. Биоактивни потенцијал екстраката генотипова дрена (*Cornus mas* L.)

| Активност | FC | FRAP | DPPH | HT-29 | α -Amy | α -Gls | DPP III |
|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Јединица | mg GAE/g LF | mg AAE/g LF | IC ₅₀ (mg/mL) | EC ₅₀ (mg/mL) | IC ₅₀ (mg/mL) | IC ₅₀ (mg/mL) | IC ₅₀ (μ g/mL) |
| <i>Apatinski rani</i> | 10,15 \pm 0,33 ^e | 7,83 \pm 0,34 ^f | 3,17 \pm 0,01 ^f | 12,69 \pm 0,26 ^c | 8,00 \pm 0,23 ^{c,d} | 0,29 \pm 0,01 ^b | н.д. |
| <i>Bačka</i> | 15,01 \pm 0,34 ^b | 14,37 \pm 0,16 ^{c,d} | 1,83 \pm 0,02 ^b | 9,93 \pm 0,23 ^b | 3,56 \pm 0,15 ^a | 0,37 \pm 0,01 ^c | 40,45 \pm 0,09 ^b |
| <i>KIC1</i> | 10,99 \pm 0,09 ^{d,e} | 9,11 \pm 0,13 ^f | 3,59 \pm 0,03 ^g | 13,97 \pm 0,32 ^c | 13,81 \pm 0,49 ^e | 0,19 \pm 0,00 ^a | 180,12 \pm 4,63 ^d |
| <i>R1</i> | 11,80 \pm 0,29 ^d | 11,71 \pm 0,96 ^e | 1,94 \pm 0,01 ^c | 13,68 \pm 0,28 ^c | 7,71 \pm 0,52 ^c | 0,28 \pm 0,01 ^b | 42,82 \pm 0,10 ^b |
| <i>Elegantnyi</i> | 11,25 \pm 0,05 ^d | 12,22 \pm 0,66 ^{d,e} | 2,79 \pm 0,04 ^e | 13,07 \pm 0,38 ^c | 11,65 \pm 1,21 ^e | 0,37 \pm 0,01 ^c | 101,62 \pm 0,89 ^c |
| <i>Semen</i> | 14,08 \pm 0,03 ^c | 15,63 \pm 0,67 ^{b,c} | 2,10 \pm 0,01 ^d | 13,48 \pm 0,31 ^c | 10,34 \pm 0,85 ^{d,e} | 0,33 \pm 0,01 ^c | 44,12 \pm 0,22 ^b |
| <i>Svetlyachok</i> | 21,68 \pm 0,11 ^a | 23,95 \pm 0,32 ^a | 1,76 \pm 0,01 ^a | 9,14 \pm 0,21 ^a | 4,31 \pm 0,12 ^b | 0,19 \pm 0,00 ^a | 33,86 \pm 0,17 ^a |
| стандард | | | Тролокс 0,04 \pm 0,00 | | Акарбоза 0,11 \pm 0,01 | Акарбоза 3,73 \pm 0,08 | |

Резултати су изражени као средња вредност \pm стандардна девијација ($n = 3$). Вредности у истој колони обележене различитим суперскриптом се статистички значајно разликују на основу *Duncan*-овог теста ($P < 0,01$).

Скраћенице: GAE – еквиваленти галне киселине, AAE – еквиваленти аскорбинске киселине, FC – Folin-Ciocalteu редукциони тест, FRAP – капацитет редукције Fe³⁺ јона, DPPH – капацитет неутрализације DPPH радикала, HT-29 – антипролиферативна активност према ћелијама хуманог аденокарцинома дебелог црева, α -Amy – способност инхибиције α -амилазе, α -Gls – способност инхибиције α -глукозидазе, DPP III – способност инхибиције дипептидил-пептидазе III, IC₅₀ – концентрација екстракта која за 50% смањи активност, н.д. – није одређено.

4.3.3. PCA анализа фитохемијског састава и биолошких активности генотипова дрена (*Cornus mas* L.)

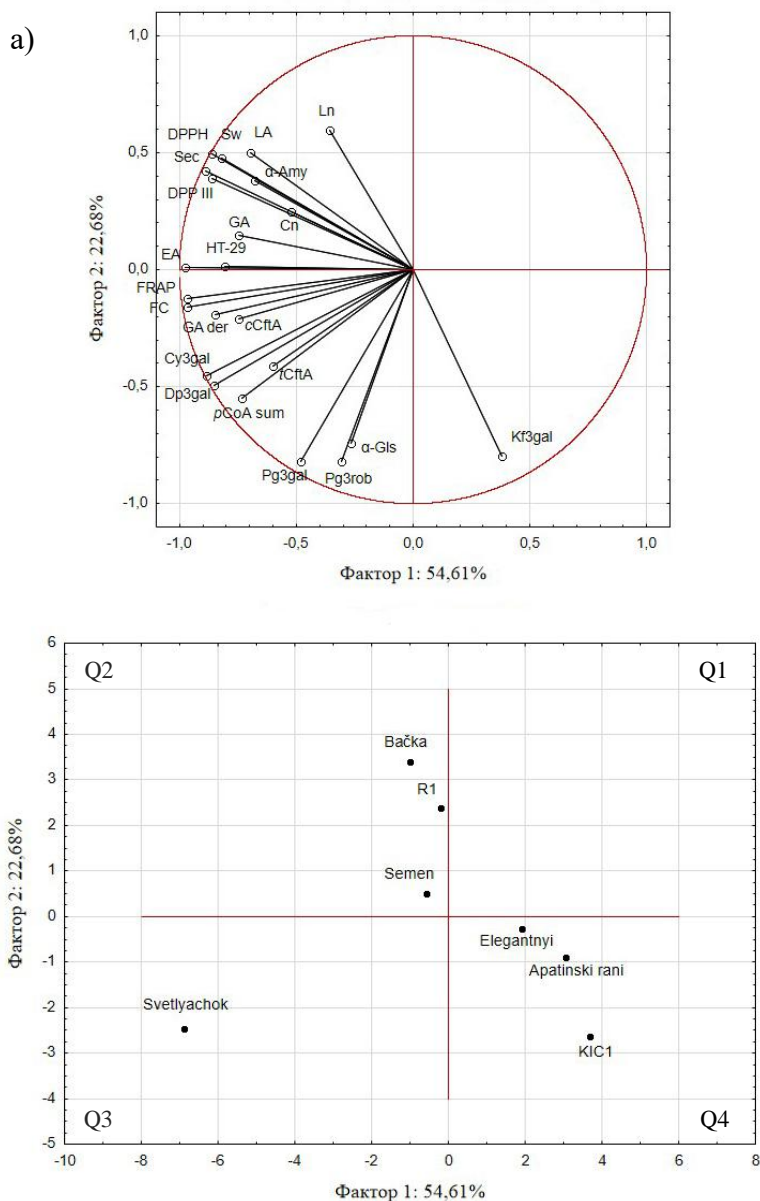
PCA анализа је изведена на основу средњих вредности добијених за 16 једињења и 7 биолошких активности одређених за 7 генотипова дрена (табеле 4.6 и 4.7). Дистрибуција свих параметара је приказана на *Loadings plot*-у (слика 4.10а) а дистрибуција генотипова дрена на *Scores plot*-у (слика 4.10б). Прва два фактора, фактор 1 и фактор 2, су описала укупно 77,29 % варијабилности међу узорцима и имали су карактеристичне вредности од 12,56 и 5,22. Карактеристичне вредности свих фактора, као и доприноси варијабилности и генотипова фактору 1 и фактору 2 су дати у Прилогу 12.

Елагинска киселина, цијанидин-3-*O*-галактозид и делфинидин-3-*O*-галактозид су дали највећи допринос антиоксидантној активности плодова дрена (FC и FRAP). Иридоидна једињења, нарочито секоксилоганин, сверозид и логанска киселина, су издвојени по капацитету неутрализације слободног DPPH радикала и способности инхибиције ензима DPP III и α -амилазе. Ова једињења и биолошке активности су уједно дали и највећи допринос Фактору 1.

Вектор елагинске киселине се поклапа са вектором антипролиферативне активности (HT-29). За ову киселину је доказана антитуморска активност у *in vitro* и у *in vivo* експерименталним студијама, поготово према аденокарциному дебелог црева (Ceci et al., 2018).

Гликозиди пеларгонидина, посебно пеларгонидин-3-*O*-робинобиозид, су се издвојили по способности инхибиције α -глукозидазе. Такође, деривати пеларгонидина, заједно са кемферол-3-галактозидом су дали највећи допринос фактору 2.

На *Scores plot*-у (слика 4.10б) се јасно види издвојеност сорте *Svetlyachok* од других сорти и селекција. Ову сорту је одликовао највећи садржај готово свих фенолних и иридоидних једињења, посебно антоцијана, као и најбоља активност у погледу испитаних биолошких активности. Такође, са графика и у Прилогу 12 се види да је ова сорта имала највећи допринос фактору 1, а заједно са селекцијама *KIC1*, *Ваџка* и *R1* је највише допринела фактору 2. Селекција *KIC1* се издвојила по највећем садржају деривата пеларгонидина и ниском садржају иридоида, док се дијагонално супротно налазе селекције *Ваџка* и *R1*, које одликује најмањи садржај гликозида пеларгонидина и висок садржај иридоида. Селекција *Semen* и сорта *Elegantnyi* су имале просечан садржај фенолних и иридоидних једињења, и испољиле су умерене биолошке активности, те су позициониране у централном делу графика.



Слика 4.10. Loadings plot (a) и Scores plot (б) PCA анализе садржаја фенолних и иридоидних једињења и биолошких активности генотипова дрена (*Cornus mas* L.)

Скраћенице: LA – логанска киселина, Sw – сверозид, Sec – секоксилоганин, Ln – логанин, Cn – корнузид, Dp3gal – делфинидин-3-*O*-галактозид, Cy3glu – цијанидин-3-*O*-глукозид, Cy3gal – цијанидин-3-*O*-галактозид, Pg3glu – пеларгонидин-3-*O*-глукозид, Pg3gal – пеларгонидин-3-*O*-галактозид, Pg3rob – пеларгонидин-3-*O*-робинобиозид, Kf3gal – кемферол-3-*O*-галактозид, GA – гална киселина, GA der – дериват галне киселине, *c*CftA – *cis*-кафтаринска киселина, *t*CftA – *trans*-кафтаринска киселина, *p*CoAsum – сума деривата *p*-кумаринске киселине, EA – елагинска киселина; FC – Folin-Ciocalteu редуccionи тест, FRAP – капацитет редуccionија Fe³⁺ јона, DPPH – капацитет неутрализације DPPH радикала, HT-29 – антипролиферативна активност према ћелијама хуманог аденокарцинома дебелог црева, α -Amy – способност инхибиције α -амилазе, α -Gls – способност инхибиције α -глукозидазе, DPP III – способност инхибиције дипептидил-пептидазе III.

4.4. Молекулски докинг

Молекулски докинг, односно симулација молекулског везивања, представља компјутерску технику којом се предвиђа преференцијална оријентација једног молекула ка другом у циљу грађења стабилног комплекса. Ова техника се најчешће примењује да би се испитала јачина интеракција или афинитет везивања малих молекула (лиганада) за биолошки активне макромолекуле, попут ензима и других протеина, угљених хидрата, липида или других молекула.

С обзиром на значајну улогу ензима у различитим физиолошким процесима, инхибиција ензима је честа терапеутска мета, односно бројни лекови представљају управо инхибиторе ензима. Молекулски докинг има значајно место у тзв. „рационалном дизајну лекова“ како би се компјутерским симулацијама издвојила једињења са бољим инхибиторним потенцијалом и тиме уштедели трошкови опсежног експерименталног испитивања. Предност ове методе је и лака могућност промене структуре лиганда, нпр. везивањем додатних функционалних група или моделовањем постојећих, како би се указало на боље везивне могућности и на тај начин усмерила синтеза фармаколошки активних супстанци.

Конформација једињења која је имала најнижу енергију везивања, односно била у најбољој позицији везивања за ензим је одређена на основу резултата докинга једињења и ензима. Положај и оријентација једињења унутар ензима и интеракције са аминокиселинским остацима су анализирани и приказани помоћу програмских система AutoDockVina, VMD 1.9.3 и LigPlot⁺.

У табелама 4.8 и 4.9 су представљени резултати молекулског докинга, односно израчунате енергије везивања појединачних једињења из воћа родова *Prunus* и *Cornus* за ензиме α -амилазу, α -глукозидазу и дипептидил-пептидазу III (DPP III). Што је већа апсолутна вредност енергије везивања, сматра се да је већи степен инхибиције ензима. На основу израчунатих енергија везивања се види да су, осим фенолних киселина и кверцетина, сва остала једињења показала бољу инхибицију α -глукозидазе него α -амилазе, као и да готово сва анализирана једињења боље инхибирају ова два ензима него DPP III. Највероватније објашњење за овакве резултате лежи у чињеници да је активно место α -глукозидазе дубоко у унутрашњости ензима, што допушта бољу акомодацију и интеракције једињења са ензимом (Proença et al., 2017).

Флавоноидна једињења, било да су у питању флавонолне структуре или антоцијани, су се показала као потентни инхибитори сва три испитивана ензима. Такође, флавоноидни дигликозиди су имали веће енергије везивања од одговарајућих моногликозида, што указује да волуминозност молекула има значајан утицај на инхибиторни потенцијал. Од овога одступа агликон кверцетин, који се много јаче везује за α -амилазу него за α -глукозидазу и DPP III, а његова енергија везивања за α -амилазу, у износу од $-9,3$ kcal/mol, је међу најнижим израчунатим енергијама везивања за овај ензим. До истог запажања да се агликон боље од гликозида везује за α -амилазу су дошли истраживачи

Komaki et al. (2003) испитујући лутеолин и његове гликозиде, лутеолин-7-*O*-глукозид и лутеолин-4'-*O*-глукозид.

Табела 4.8. Енергије везивања одабраних фенолних једињења из воћа рода *Prunus* за ензиме α -амилазу, α -глукозидазу и DPP III.

| # | Једињење | Енергија везивања (kcal/mol) | | |
|-----|--|------------------------------|-----------------------|-------------|
| | | α -амилаза | α -глукозидаза | DPP III |
| 1. | 3- <i>O</i> -кафеоилхинска (неохлорогенска) киселина | -8,4 | -8,2 | -7,9 |
| 2. | 5- <i>O</i> -кафеоилхинска (хлорогенска) киселина | -7,9 | -8,5 | -7,5 |
| 3. | метил-3- <i>O</i> -кафеоилхинат | -7,9 | -8,3 | -7,8 |
| 4. | метил-4- <i>O</i> -кафеоилхинат | -8,4 | -8,2 | -8,5 |
| 5. | етил-4- <i>O</i> -кафеоилхинат | -8,4 | -8,6 | -7,6 |
| 6. | метил-5- <i>O</i> -кафеоилхинат | -7,7 | -8,3 | -7,5 |
| 7. | метил-3- <i>O-p</i> -кумароилхинат | -8,0 | -8,1 | -7,2 |
| 8. | метил-4- <i>O-p</i> -кумароилхинат | -8,1 | -8,2 | -7,8 |
| 9. | метил-5- <i>O-p</i> -кумароилхинат | -7,8 | -7,9 | -7,2 |
| 10. | 3- <i>O-p</i> -кумароилхинска киселина * | -8,3 | -8,1 | -7,6 |
| 11. | 4- <i>O-p</i> -кумароилхинска киселина * | -8,3 | -8,2 | -8,6 |
| 12. | 5- <i>O-p</i> -кумароилхинска киселина * | -8,2 | -8,3 | -8,0 |
| 13. | кафена киселина * | -6,2 | -6,2 | -6,2 |
| 14. | <i>p</i> -кумаринска киселина * | -6,5 | -6,0 | -5,9 |
| 15. | <i>o</i> -кумаринска киселина * | -6,2 | -6,0 | -6,4 |
| 16. | <i>m</i> -кумаринска киселина * | -6,4 | -6,0 | -6,1 |
| 17. | ферулна киселина * | -6,6 | -6,2 | -5,9 |
| 18. | кверцетин-3- <i>O</i> -рутинозид | -9,0 | -10,6 | -9,4 |
| 19. | кверцетин-3- <i>O</i> -глукозид | -8,3 | -9,0 | -7,4 |
| 20. | кверцетин-3- <i>O</i> -рамнозид | -9,0 | -9,2 | -7,9 |
| 21. | кверцетин | -9,3 | -8,2 | -8,2 |
| 22. | кемферол-3- <i>O</i> -рутинозид | -8,9 | -10,3 | -9,3 |
| 23. | изорамнетин-3- <i>O</i> -рутинозид | -9,0 | -9,8 | -9,1 |
| 24. | цијанидин-3- <i>O</i> -глукозид | -8,6 | -8,9 | -7,4 |
| 25. | цијанидин-3- <i>O</i> -рутинозид | -9,4 | -9,5 | -8,9 |
| 26. | цијанидин-3- <i>O</i> -софорозид | -7,9 | -9,2 | -8,5 |
| 27. | цијанидин-3- <i>O</i> -(2'-глукозил)рутинозид | -9,0 | -9,7 | -8,0 |
| 28. | цијанидин-3- <i>O</i> -(2'-ксилозил)рутинозид | -9,1 | -10,7 | -9,1 |
| 29. | пеонидин-3- <i>O</i> -глукозид | -8,4 | -8,9 | -7,2 |
| 30. | пеонидин-3- <i>O</i> -рутинозид | -9,1 | -9,7 | -8,5 |
| 31. | пеларгонидин-3- <i>O</i> -рутинозид | -9,1 | -10,4 | -9,1 |

* Обележене хидроксициметне киселине нису као такве нађене у испитиваним екстрактима воћа, него су детектовани њихови коњугати. С обзиром да није било могуће да се утврде тачне структуре ових деривата, енергије везивања су израчунате за слободне киселине.

Табела 4.9. Енергије везивања одабраних иридоидних и фенолних једињења из воћа рода *Cornus* за ензиме α -амилазу, α -глукозидазу и DPP III.

| # | Једињење | Енергија везивања (kcal/mol) | | |
|-----|--|------------------------------|-----------------------|-------------|
| | | α -амилаза | α -глукозидаза | DPP III |
| 1. | логанска киселина | -7,7 | -8,3 | -7,3 |
| 2. | сверозид | -7,7 | -8,4 | -7,8 |
| 3. | логанин | -7,8 | -8,2 | -6,8 |
| 4. | корнузид | -7,8 | -8,9 | -8,4 |
| 5. | секоксилоганин | -7,5 | -7,5 | -6,4 |
| 6. | делфинидин-3- <i>O</i> -галактозид | -8,0 | -9,3 | -7,6 |
| 7. | цијанидин-3- <i>O</i> -галактозид | -7,9 | -9,0 | -7,8 |
| 8. | пеларгонидин-3- <i>O</i> -галактозид | -7,9 | -8,9 | -7,1 |
| 9. | пеларгонидин-3- <i>O</i> -робинобиозид | -9,3 | -10,4 | -9,0 |
| 10. | кемферол-3- <i>O</i> -галактозид | -8,1 | -8,7 | -7,9 |
| 11. | гална киселина | -6,0 | -5,9 | -6,2 |
| 12. | елагинска киселина | -8,3 | -9,7 | -7,5 |
| 13. | <i>cis</i> -кафтаринска киселина | -7,6 | -7,7 | -7,4 |
| 14. | <i>trans</i> -кафтаринска киселина | -7,2 | -7,3 | -7,2 |
| 15. | <i>p</i> -кумаринска киселина | -6,5 | -6,0 | -5,9 |

Дигликозидни деривати, посебно рутинозиди, било да су у питању деривати флавонола – кверцетина, кемферола, изорамнетина или деривати антоцијанидина – цијанидина, пеонидина, пеларгонидина, су се показали као једињења са највећим инхибиторним потенцијалом. Исто важи и за деривате са робинозом, односно пеларгонидин-3-*O*-робинобиозид. Такође су међу највећим одређеним биле енергије везивања тригликозидних деривата цијанидин-3-*O*-(2'-глукозил)рутинозида и цијанидин-3-*O*-(2'-ксилозил)рутинозида. Структуре ових једињења су приказане на слици 4.11.

На основу енергија везивања је такође уочљиво да се фенолне киселине, поготово неестерификоване хидроксициметне киселине (кафена, кумаринска, ферулна), у поређењу са флавоноидним једињењима слабије везују за сва три ензима.

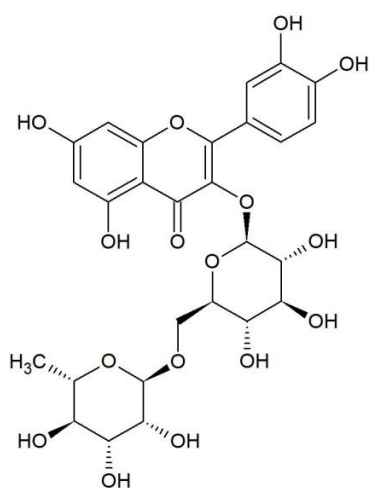
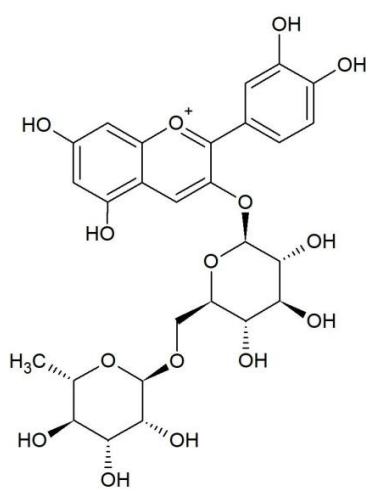
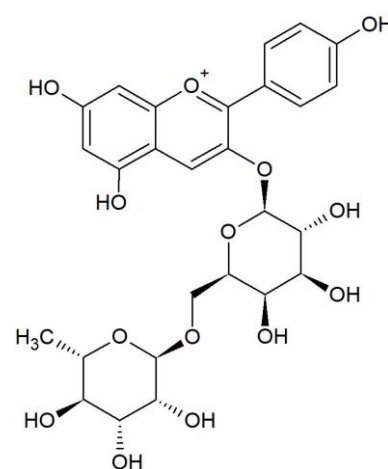
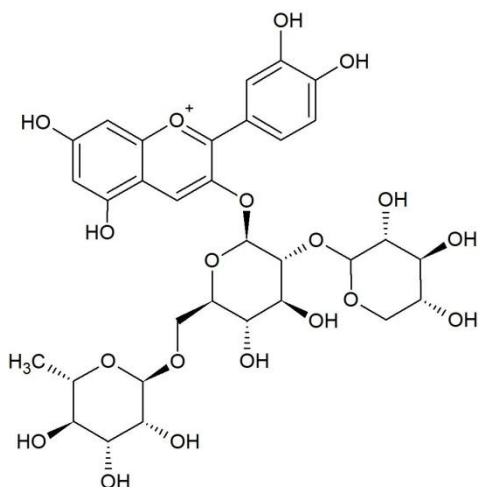
У свом истраживању Rasouli et al. (2017) истичу да се фенолна једињења пореклом из хране генерално сматрају као здравствено безбедна (тзв. GRAS супстанце, *енгл.* generally recognized as safe) и да имају велики потенцијал за инхибицију ензима због флексибилне структуре основног скелета, хидрофобних делова молекула и присуства донора и акцептора водоника. Такође су утврдили да су флаван-3-оли, флаволи, антоцијанидини и флавоноли много бољи инхибитори α -амилазе и α -глукозидазе него друга фенолна једињења. Ови аутори истичу да присуство C2=C3 двоструке везе у C-прстену (нарочито код флавона и флавонола са 4-оксо-групом), хидрогенизација C2=C3 двоструке везе, планарност C-прстена, метиловање 4'-ОН и 7-ОН, број и распоред ОН-група на В-прстену и гликозиловање представљају једне од главних фактора за инхибиторну способност

флавоноидних једињења према α -амилази и α -глукозидази, што је у сагласности и са резултатима добијеним у оквиру ове дисертације.

Иако у досадашњим истраживањима није испитиван инхибиторни потенцијал биљних екстраката према ензиму хумане DPP III, група аутора (Agić et al., 2017) је установила да флавоноиди имају инхибиторно дејство према овом ензиму и да је дистрибуција ОН-група важан фактор за инхибиторни потенцијал једињења.

Међу испитиваним једињењима из воћа рода *Prunus* (табела 4.8) као најбољи инхибитор α -амилазе се издвојио цијанидин-3-*O*-рутинозид (слика 4.11) са енергијом везивања од $-9,4$ kcal/mol. Везивање цијанидин-3-*O*-рутинозида за α -амилазу је приказано на слици 4.12. Кверцетин-3-*O*-рутинозид (слика 4.11) се издвојио као најпотентнији инхибитор α -глукозидазе и DPP III, са енергијама везивања од $-10,6$ и $-9,4$ kcal/mol, а његово везивање за ова два ензима је приказано на сликама 4.15 и 4.17. На основу енергије везивања као бољи инхибитор α -глукозидазе *in silico* се показао цијанидин-3-*O*-(2'-ксилозил)рутинозид, са енергијом од $-10,7$ kcal/mol. Међутим цијанидин-3-*O*-(2'-ксилозил)рутинозид је одређен само у екстрактима магриве, облачинске и степске вишње, док је кверцетин-3-*O*-рутинозид присутан у свим анализираним плодовима воћа рода *Prunus*. Везивање цијанидин-3-*O*-(2'-ксилозил)рутинозида за α -глукозидазу је приказано на слици 4.14.

Међу анализираним једињењима рода *Cornus*, односно дрена (*C. mas* L.), као најпотентнији инхибитори *in silico* сва три ензима су се издвојили антоцијани и елагинска киселина. Пеларгонидин-3-*O*-робинобиозид (структура приказана на слици 4.11) се истакао као изразито добар инхибитор, нарочито α -глукозидазе. За ово једињење су одређене енергије везивања у вредностима од $-10,4$ kcal/mol за α -глукозидазу, затим $-9,3$ kcal/mol за α -амилазу и $-9,0$ kcal/mol за DPP III (табела 4.9). На сликама 4.13, 4.16 и 4.18 су приказане најбоље позиције везивања пеларгонидин-3-*O*-робинобиозида за сва три ензима.

кверцетин-3-*O*-рутинозидцијанидин-3-*O*-рутинозидпеларгонидин-3-*O*-
рубинобиозидцијанидин-3-*O*-(2'-ксилозил)рутинозид

Слика 4.11. Структуре једињења за које су израчунате најниже енергије везивања за α -амилазу, α -глукозидазу и DPP III

Анализа позе са најнижом енергијом везивања цијанидин-3-*O*-рутинозида за α -амилазу показује да се једињење везује близу активног места ензима (слика 4.12a). Интеракције агликонске основе молекула се остварују преко водоничних веза са остацима Trp151, Lys200 и His201, док се рутинозил остатак гради водоничне везе са Trp59, Gln63 и високо конзервираним каталитичим остацима Asp197, Glu233 и Asp300. Такође, оријентација цијанидин-3-*O*-рутинозида укључује хидрофобне интеракције са аминокиселинским остацима Trp58, Trp62, Leu162, Val163, Leu165, Ile235, His305 и Gly306 (слика 4.12b). Xie et al. (2019) су саопштили да је већина наведених аминокиселина одговорна за инхибиторну активност антоцијана, попут малвидин-3-*O*-арабинозида, пеларгонидин-3-*O*-рутинозида и петунидин-3-*O*-арабинозида према хуманој α -амилази.

Најбољи положај и оријентација пеларгонидин-3-*O*-робинобиозида приликом његовог везивања за α -амилазу предвиђа везивање у близини активног места (слика 4.13а). Везује се водоничним везама са остацима His201, His299 и са два веома конзервирана каталитичка остатка Glu233 и Asp300. Пеларгонидин-3-*O*-робинобиозид такође успоставља хидрофобне интеракције са Lys200, Ile235, Leu162, Ala198, Val163 и Trp59 (слика 4.13б). Сличан начин везивања преко остатака His201, His299 и Asp300 су забележили и аутори Proença et al. (2019), приликом докинг анализе везивања флавоноида за активно место хумане α -амилазе. Према резултатима докинг анализе истраживача Lo Piraго et al. (2008), претпоставља се да је остатак Trp59 важан за инхибиторну способност флавоноида кверцетагетина и скутелареина према α -амилази.

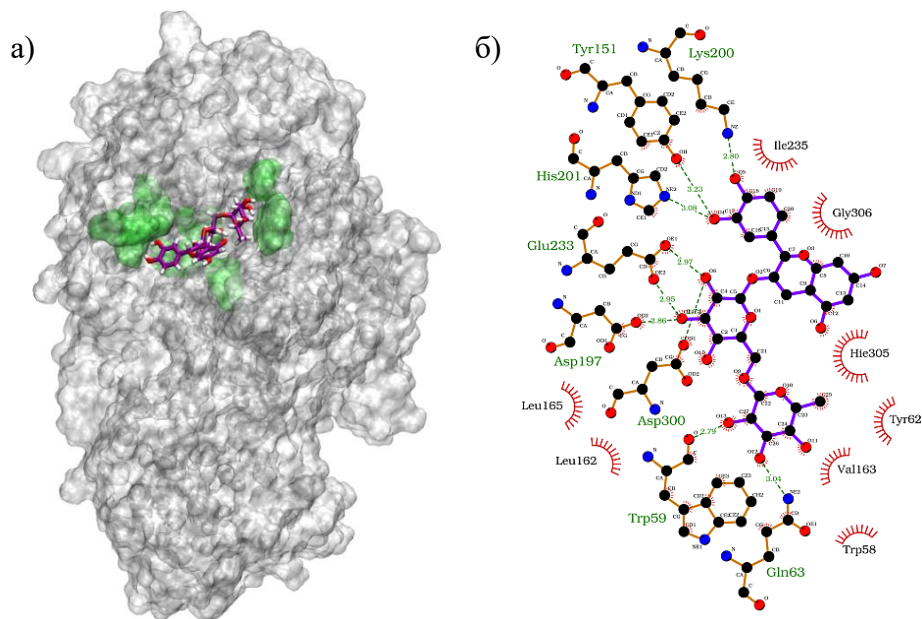
Анализа најбољих докинг поза цијанидин-3-*O*-(2'-ксилозил)рутинозида, кверцетин-3-*O*-рутинозида и пеларгонидин-3-*O*-робинобиозида за везивање за α -глукозидазу предвиђа да се ови молекули везују дубоко у унутрашњости везивног места ензима (слике 4.14а, 4.15а и 4.16а).

Агликонски део цијанидин-3-*O*-(2'-ксилозил)рутинозида гради водоничне везе са аминокиселинским остацима Thr215 и His245, док шећерни остатак успоставља водоничне везе са Phe157, His239, Asn241, Phe310, Asp408 и каталитичким остатком Asp349. Додатно се успостављају хидрофобне интеракције између једињења и аминокиселинских остатака Phe158, Phe177, Ala278, Arg312 и Arg439 (слика 4.14б).

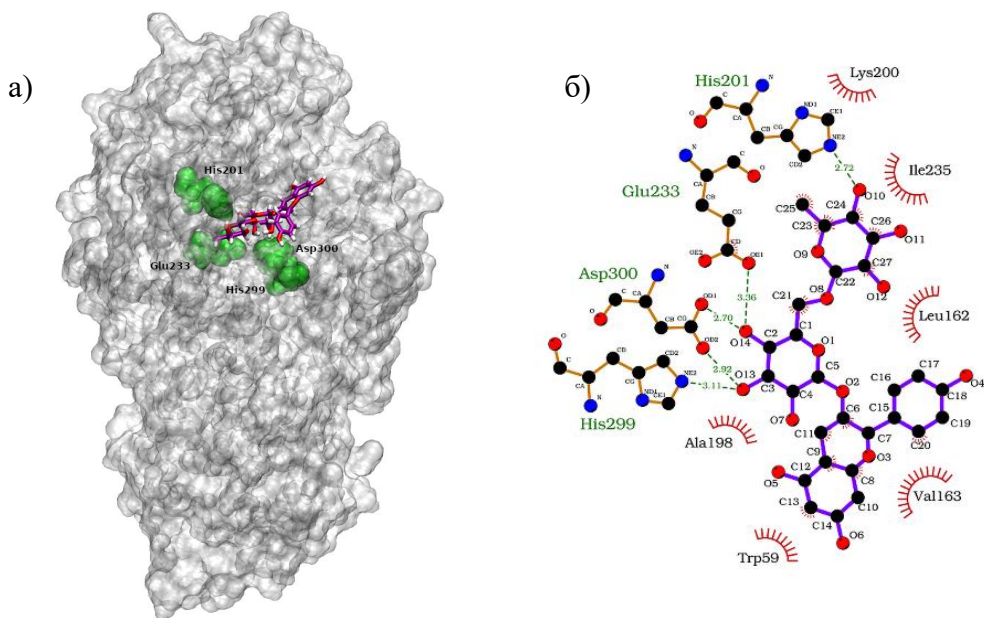
Најбоља докинг поза кверцетин-3-*O*-рутинозида предвиђа да агликонски део молекула гради водоничне везе са Lys155, Ser156 и Ser308, док рутинозил остатак гради водоничне везе са Phe157, Thr215, Asp408 и каталитичким остатком Glu276. Кверцетин-3-*O*-рутинозид такође успоставља хидрофобне интеракције са аминокиселинским остацима Phe158, His239, Pro240, Asn241, His245, Ala278, His279, Phe300, Glu304, Arg312, Tyr313, Asp349 и Arg439 (слика 4.15б).

Анализа најниже постигнуте енергије везивања пеларгонидин-3-*O*-робинобиозида за α -глукозидазу предвиђа да се његово везивање остварује преко водоничних веза са остацима Gln350, Asp408, Ser308, Thr215, Ser156, Lys155 и остатка важног у процесу катализе – Asp349. Такође се остварују хидрофобне интеракције између једињења и остатака Arg312, Phe300, Arg439, Tyr313, Phe177, His279, Glu304, Phe157 и His239 (слика 4.16б).

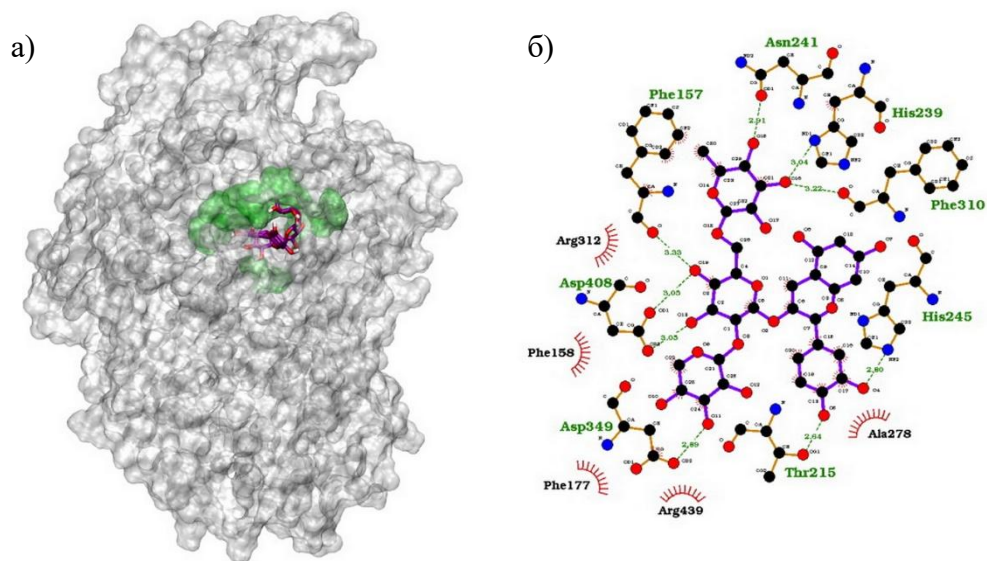
Proença et al. (2017) су уочили значај остатака Phe155, Phe177, Thr215, Arg312 и Asp408 за везивање флавоноидних структура и таксифолина за везивно место α -глукозидазе. Они су такође установили да се поједини флавоноиди, као и комерцијални инхибитор акарбоза, везују за активно место ензима блокирајући каталитичку аминокиселинску тријаду Asp349/Glu276/Asp216. Ning et al. (2019) су на основу енергија везивања показали да се флавоноидна једињења много боље од акарбозе везују за α -глукозидазу.



Слика 4.12. Везивање **цијанидин-3-О-рутинозида** за активно место панкреасне α -амилазе
 а) Најбоља докинг позиција лиганда на топографској површини ензима
 б) Интеракције између ензима и лиганда визуализоване помоћу LigPlot⁺ софтвера
 (аминокиселински остаци са којима се успостављају водоничне везе и хидрофобне интеракције су обележени зеленом бојом)

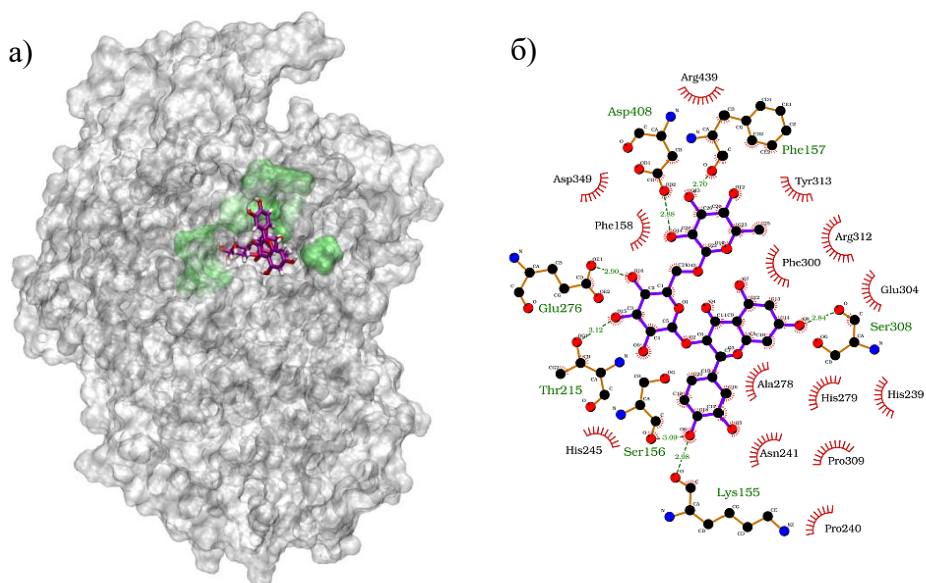


Слика 4.13. Везивање **пеларгонидин-3-О-рутинозида** за активно место панкреасне α -амилазе
 а) Најбоља докинг позиција лиганда на топографској површини ензима
 б) Интеракције између ензима и лиганда визуализоване помоћу LigPlot⁺ софтвера
 (аминокиселински остаци са којима се успостављају водоничне везе и хидрофобне интеракције су обележени зеленом бојом)



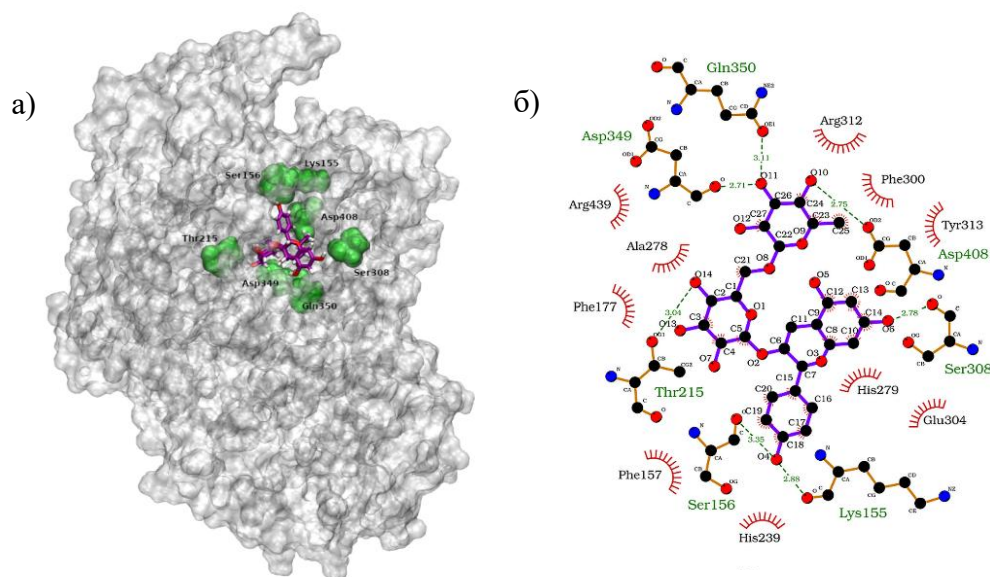
Слика 4.14. Везивање **цијанидин-3-*O*-(2'-ксилозил)рутинозида** за активно место моделоване **α -глукозидазе**

- а) Најбоља докинг позиција лиганда на топографској површини ензима
 б) Интеракције између ензима и лиганда визуализоване помоћу LigPlot⁺ софтвера (аминокиселински остаци са којима се успостављају водоничне везе и хидрофобне интеракције су обележени зеленом бојом)



Слика 4.15. Везивање **кверцетин-3-*O*-рутинозида** за активно место моделоване **α -глукозидазе**

- а) Најбоља докинг позиција лиганда на топографској површини ензима
 б) Интеракције између ензима и лиганда визуализоване помоћу LigPlot⁺ софтвера (аминокиселински остаци са којима се успостављају водоничне везе и хидрофобне интеракције су обележени зеленом бојом)

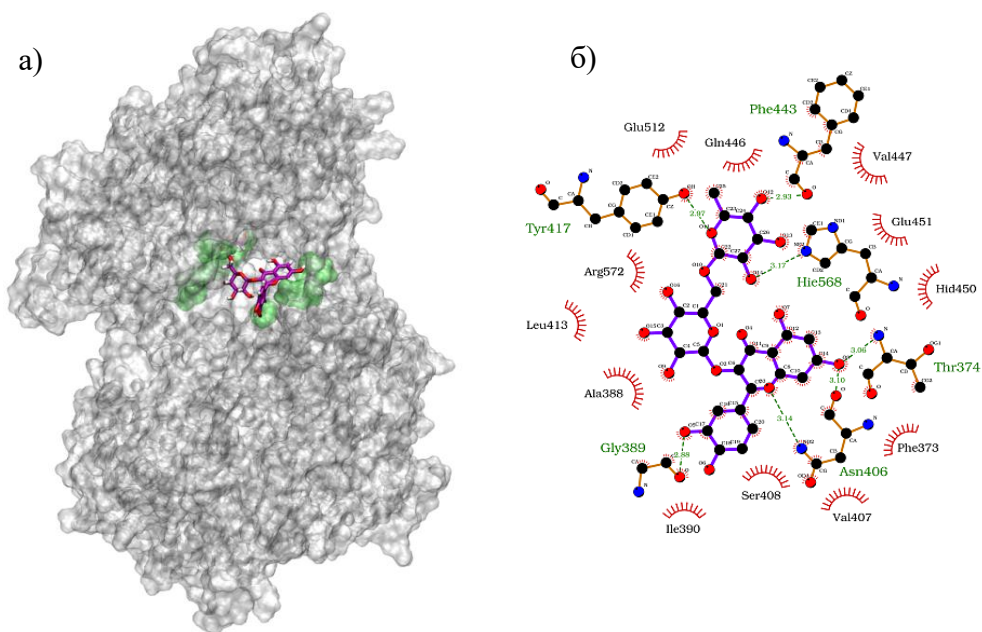


Слика 4.16. Везивање пеларгонидин-3-*O*-робинобиозида за активно место моделоване α -глукозидазе

- а) Најбоља докинг позиција лиганда на топографској површини ензима
 б) Интеракције између ензима и лиганда визуализоване помоћу LigPlot⁺ софтвера (аминокиселински остаци са којима се успостављају водоничне везе и хидрофобне интеракције су обележени зеленом бојом)

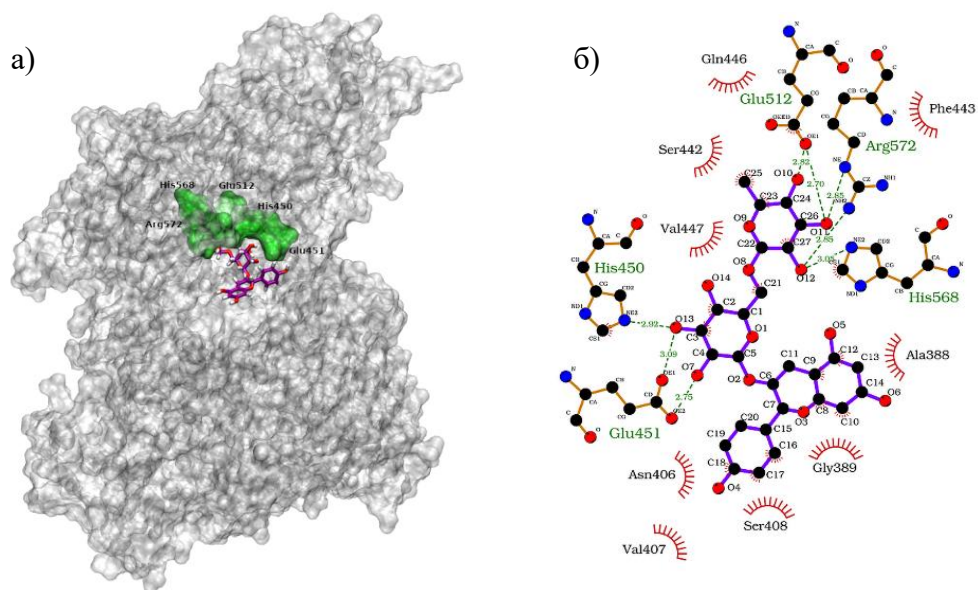
Најбоље рангирана докинг поза кверцетин-3-*O*-рутинозида приликом везивања за DPP III ензим предвиђа везивање молекула за цеп у близини активног места ензима (слика 4.17а). У овој позицији флавоноидни скелет формира водоничне везе са Tyr417, Phe443 и каталитичким остатком His568. Кверцетин-3-*O*-рутинозид се такође везује у помоћу хидрофобних интеракција које успоставља са Phe373, Ala388, Ile390, Val407, Ser408, Leu413, Gln446, Val447 и два каталитичка остатка, His450 и Glu451 (слика 4.17б).

Резултати најбоље позиције везивања пеларгонидин-3-*O*-робинобиозида за DPP III указују на везивање за активно место ензима (слика 4.18а). Интеракције са једињењем укључују водоничне везе са три каталитичка аминокиселинска остатка, His450, Glu451 и His568, и заједно са Glu512 и Arg572 највероватније доприносе везивању лиганда и стабилизацији активног места. Пеларгонидин-3-*O*-робинобиозид такође, као и кверцетин-3-*O*-рутинозид, успоставља хидрофобне интеракције са остацима Gln446, Phe443, Ser442, Val447, Ala388, Gly389, Asn406, Val407 и Ser408 (слика 4.18б). У истраживању Agić et al., (2017) је показано да је већина ових аминокиселинских остатака одговорна и за постављање лутеолина у најбољу оријентацију приликом везивања за активно место DPP III (Agić et al., 2017).



Слика 4.17. Везивање кверцетин-3-*O*-рутинозида за активно место хумане DPP III

- а) Најбоља докинг позиција лиганда на топографској површини ензима
 б) Интеракције између ензима и лиганда визуализоване помоћу LigPlot⁺ софтвера (аминокиселински остаци са којима се успостављају водоничне везе и хидрофобне интеракције су обележени зеленом бојом)



Слика 4.18. Везивање пеларгонидин-3-*O*-рубинобиозида за активно место хумане DPP III

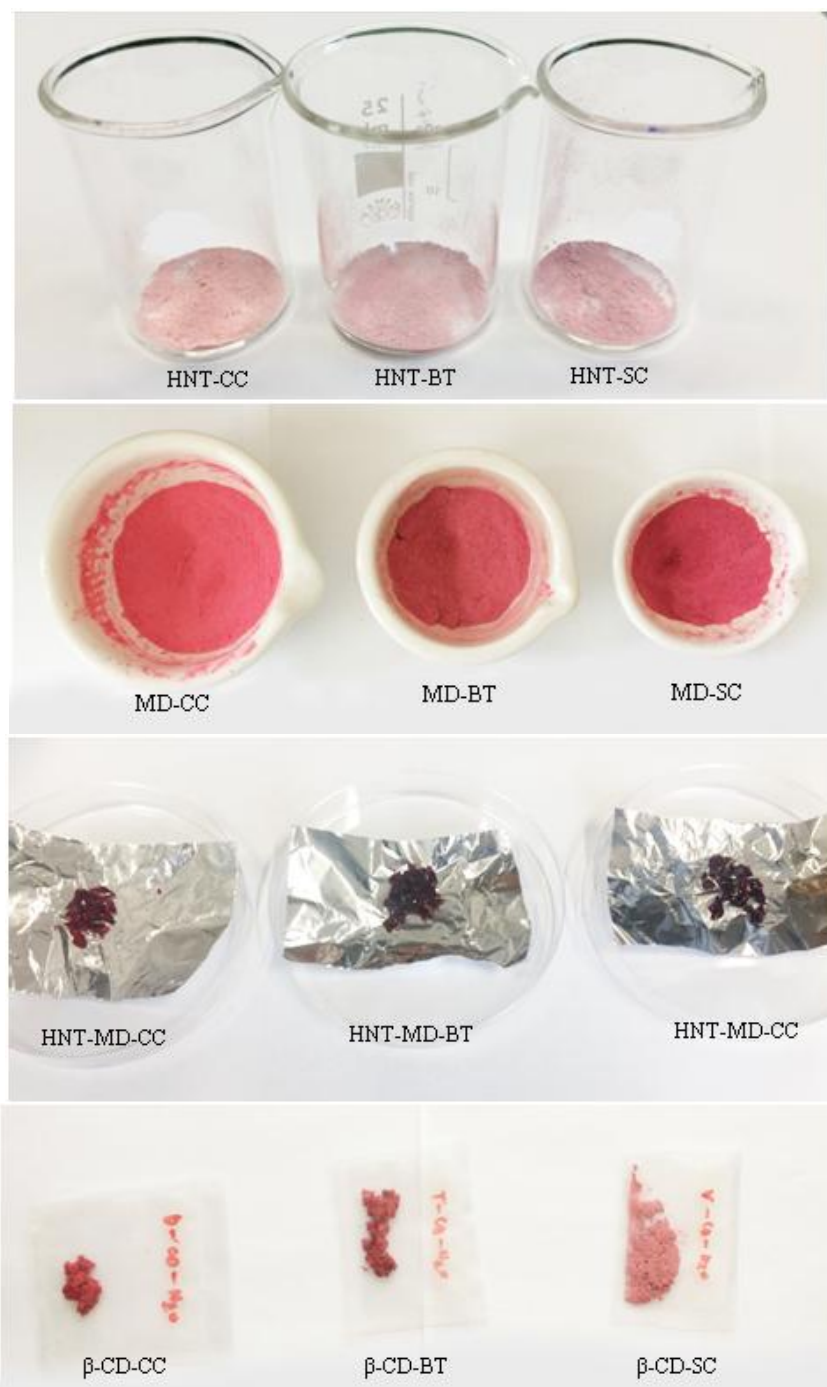
- а) Најбоља докинг позиција лиганда на топографској површини ензима
 б) Интеракције између ензима и лиганда визуализоване помоћу LigPlot⁺ софтвера (аминокиселински остаци са којима се успостављају водоничне везе и хидрофобне интеракције су обележени зеленом бојом)

4.5. Инкапсулати екстраката воћа родова *Prunus* и *Cornus*

У оквиру ове дисертације су инкапсулирана биоактивна једињења екстраката дрена, трњине и тропа вишње у халојзиту, малтодекстрину, халојзит-малтодекстринском композиту и β -циклодекстрину. Биоактивни потенцијал трњине и вишње које припадају роду *Prunus* (*P. spinosa* и *P. cerasus*) и дрена (*Cornus mas*), као и профили њихових биоактивних једињења су приказани у претходном делу *Резултата и дискусије*. На основу тих резултата се види да се по биоактивном потенцијалу, али и по садржају биоактивних једињења, ово воће истиче у односу на остале испитиване врсте. Троп вишње је одабран због тога што веома често настаје као прехранбени отпад (*енгл.* food waste) приликом прераде плодова ове воћне врсте. У прехранбеној индустрији се вишња првенствено користи за производњу сокова и различитих напитака. Након цеђења остају велике количине чврсте материје (тропа), који представља нуспроизвод. Пошто се у тропу претежно задржавају љуска и меснати део плода, овај нуспроизвод је богат извор биолошки активних фитохемикалија, нарочито фенолних једињења (Cilek et al., 2012; Luca et al., 2013).

Инкапсулати у халојзиту и халојзит-малтодекстринском композиту су припремљени специфичном техником цикличног успостављања вакуума, док су инкапсулати у малтодекстрину и β -циклодекстрину припремљени техником лиофилизације. *Core to coat ratio*, односно однос инкапсулираног екстракта и носача је био 1:5 за инкапсулате у халојзиту, 1:2 за инкапсулате у малтодекстрину и 3:1:6 је био однос екстракт:халојзит:малтодекстрин код инкапсулата у халојзит-малтодекстринском композиту. Ови односи су рачунати према маси сувог екстракта. Инкапсулати у β -циклодекстрину су добијени истовременом екстракцијом и инкапсулацијом, полазећи од лиофилизованог воћа. Литературни подаци указују да величина шупљине β -циклодекстрина одговара величини фенолног, односно флавоноидног једињења, те да се она комплексирају у односу 1:1 (Pinho et al., 2014). Поред инкапсулационе ефикасности β -циклодекстрина, у оквиру дисертације је испитан и ефекат додатка β -циклодекстрина конвенционалним растварачима (води и 50% етанолу) у сврху повећања ефикасности екстракције биоактивних једињења.

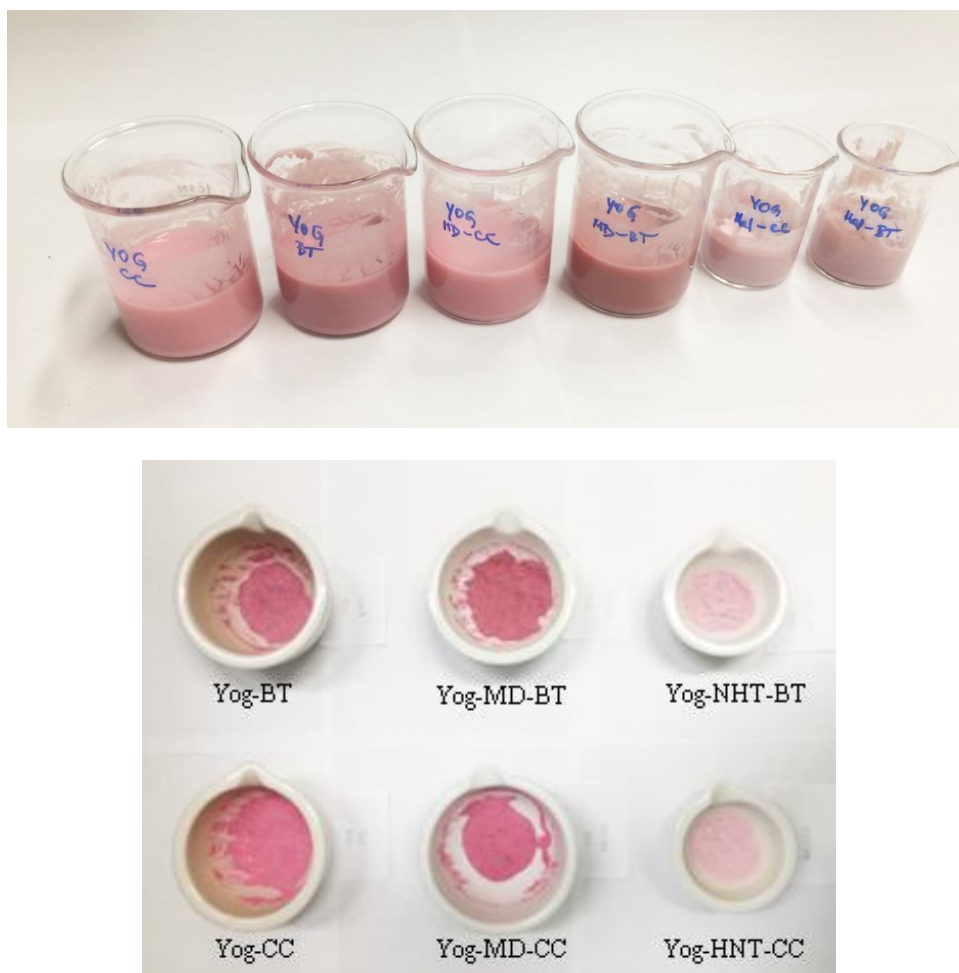
Сви припремљени инкапсулати су приказани на слици 4.19. Физичкохемијске карактеристике инкапсулата су испитане помоћу скенирајуће електронске микроскопије (SEM), термогравиметрије (ТГ), а за инкапсулате са халојзитом је одређена и колоидна стабилност. Ефикасност инкапсулације биоактивних једињења је мерена спектрофотометријски, поредећи садржај биоактивних једињења која се налазе у унутрашњости инкапсулата и једињења на спољашњој површини инкапсулата. Антипролиферативна активност инкапсулата, односно њихов утицај на раст туморских и нетуморских ћелијских линија је испитан ради процене могућности коришћења припремљених инкапсулата као система за доставу биоактивних једињења.



Слика 4.19. Инкапсулати екстракта дрена, трњине и тропа вишње
(Ознаке: CC – дрен, BT – трњина, SC – троп вишње, HNT – халојзит, MD – малтодекстрин, HNT-MD – халојзит-малтодекстрин; β-CD – β-циклодекстрин)

Инкапсулати екстракта дрена и трњине са халојзитом и малтодекстрином су накнадно додати у јогурт, са циљем добијања обогаћеног производа (слика 4.20). Након лиофилизације обогаћеног јогурта су добијене прашкасте форме које се због присутних протеина, масти и угљених хидрата из јогурта могу посматрати као нови инкапсулати (Norkaew et al., 2019; Ouyang et al., 2020). Из њих је такође праћено контролисано отпуштање биоактивних једињења.

Резултати инкапсулације биоактивних једињења дрена у халојзит добијени у оквиру ове докторске дисертације су објављени у публикацији Благојевић et al. (2020a).



Слика 4.20. Јогурт обогаћен инкапсулатима екстракта дрена и трњине (Слика горе – производ у течном облику, слика доле – након лиофилизације; Ознаке: CC – дрен, BT – трњина, HNT – халојзит, MD – малтодекстрин, Yog – јогурт)

4.5.1. Истовремена екстракција и инкапсулација у β -циклодекстрин

Конвенционалне методе екстракције биоактивних једињења из биљног материјала, попут Сокслетове екстракције (*нем.* Soxhlet) и мацерације, се интензивно примењују иако изискују много времена, енергије и употребу токсичних органских растварача (Ameer et al., 2017). Стога је циљ приступа „зелене хемије“ (*енгл.* green chemistry) да се постигне већа екстракциона ефикасност уз краће време екстракције, мањи утросак растварача и енергије, мање економске губитке и мање отпада. Чиста вода се сматра „најзеленијим“ растварачем, јер је нетоксична, некорозивна, незапаљива, еколошки прихватљива и широко распрострањена по приступачној цени. Једини недостатак употребе воде као растварача је ограничена растворљивост неполарних молекула. Екстракција водом може да се поспеши применом ултразвука или додатком мање поларних ко-растварача, нпр. етанола или глицерола (El Kantar et al., 2019). У литаратури се наводи да додаток β -циклодекстрина може да побољша растворљивост полифенола у води (Albahari et al., 2018). Такође је познато да величина унутрашње шупљине β -циклодекстрина одговара величини једног фенолног једињења, тако да се уз екстракцију истовремено одвија и инкапсулација једињења у β -циклодекстрин (Gornas et al., 2009, Li et al., 2010, Xu et al., 2007).

У оквиру ове дисертације је испитан ефекат додатка β -циклодекстрина чистој води и 50% етанолу као конвенционалним растварачима, у сврху повећања екстракције биоактивних једињења из плодова дрена, трњине и тропа вишње. Једињења су применом ултразвука екстрахована из лиофилизованог биљног материјала, а као екстракциони системи су коришћени дестилована вода, 50% етанол, 1,5% β -циклодекстрин у води и 1,5% β -циклодекстрин у 50% етанолу. У наставку су приказани резултати добијени за сваки биљни материјал. Садржај екстрахованих једињења је изражен у mg једињења на 100 g лиофилизованог воћа (LF). Као контрола је узета вода (100%), а ефикасност осталих система растварача је изражена процентуално у односу на воду.

Истовремена екстракција и инкапсулација биоактивних једињења дрена у β -циклодекстрин

У табели 4.10 су приказани садржаји фенолних и иридоидних једињења дрена екстрахованих испитиваним системима. Као најбоље екстракционо средство се показао 50% етанол, изузев за галну киселину, која је као веома поларна фенолна киселина најбоље екстрахована водом. Додатак β -циклодекстрина је значајно поспешио екстракцију већине фенолних и иридоидних једињења дрена. Резултати овог истраживања су објављени у раду Роровић et al. (2021).

Логанска киселина је веома добро екстрахована чистом водом. Додатак етанола и β -циклодекстрина води или 50% етанолу нису значајно утицали на ефикасност екстракције овог једињења. За разлику од логанске киселине, као поларног иридоидног једињења, корнузид, као мање поларан иридоидни молекул се око 50% боље екстрахује

Табела 4.10. Садржај иридоидних и фенолних једињења (mg/100 g лиофилизованог воћа) дрена екстрахованих различитим системима

| Бр. | Једињење | Изражено преко | t_R (min) | λ_{max} (nm) | H_2O | % (кон-трола) | EtOH/ H_2O | +/- (%) контроле | β -CD- H_2O | +/- (%) контроле | β -CD-EtOH/ H_2O | +/- (%) контроле |
|-----|----------|----------------|-------------|----------------------|---------------------------|---------------|---------------------------|------------------|--------------------------|------------------|---------------------------|------------------|
| 1. | LA | станд. | 13,40 | 245 | 636,81±22,96 ^a | 100 | 656,21±26,25 ^a | +3,05 | 677,35±6,57 ^a | +6,37 | 662,54±23,89 ^a | +4,04 |
| 2. | Сп | станд. | 41,88 | 245 | 46,32±0,45 ^b | 100 | 70,90±0,69 ^a | +53,05 | 71,07±2,84 ^a | +53,43 | 72,11±2,60 ^a | +55,66 |
| 3. | GA | станд. | 4,36 | 270 | 8,16±0,08 ^a | 100 | 6,47±0,26 ^b | -20,76 | 4,04±0,16 ^c | -50,52 | 3,37±0,12 ^d | -58,70 |
| 4. | cCftA | СА | 10,07 | 327 | 1,82±0,07 ^c | 100 | 2,15±0,02 ^b | +17,77 | 2,44±0,02 ^a | +33,83 | 2,47±0,09 ^a | +35,64 |
| 5. | CoA der | p-CoA | 10,33 | 311 | 1,36±0,05 ^b | 100 | 1,62±0,02 ^a | +19,56 | 1,15±0,04 ^c | -15,21 | 1,09±0,04 ^c | -19,99 |
| 6. | CoA der | p-CoA | 12,97 | 313 | 3,75±0,04 ^b | 100 | 4,74±0,17 ^a | +26,46 | 4,53±0,16 ^a | +20,84 | 4,54±0,04 ^a | +21,07 |
| 7. | tCftA | СА | 13,37 | 327 | 4,76±0,19 ^a | 100 | 4,91±0,18 ^a | +3,19 | 4,95±0,05 ^a | +4,06 | 4,83±0,17 ^a | +1,56 |
| 8. | CoA der | p-CoA | 16,04 | 309 | 0,97±0,01 ^b | 100 | 1,22±0,05 ^a | +25,01 | 1,12±0,04 ^a | +15,46 | 0,96±0,03 ^b | -1,89 |
| 9. | CoA der | p-CoA | 17,51 | 313 | 2,65±0,11 ^b | 100 | 2,95±0,03 ^a | +11,13 | 3,00±0,03 ^a | +13,24 | 2,75±0,03 ^b | +3,56 |
| 10. | EA | станд. | 37,97 | 254 | 7,29 ±0,26 ^c | 100 | 10,67±0,38 ^a | +46,42 | 7,19±0,07 ^c | -1,35 | 8,82±0,09 ^b | +20,98 |
| 11. | Kf3gal | Q3glu | 41,00 | 349 | 2,83±0,03 ^b | 100 | 4,43±0,04 ^a | +56,51 | 4,36±0,17 ^a | +54,20 | 4,39±0,04 ^a | +55,31 |
| 12. | Су3gal | Су3glu | 15,70 | 517 | 111,55±1,09 ^c | 100 | 268,09±9,67 ^a | +140,32 | 215,51±8,62 ^b | +93,19 | 229,29±9,17 ^b | +105,54 |
| 13. | Pg3gal | Pg3glu | 18,30 | 505 | 45,90±1,84 ^d | 100 | 112,71±1,10 ^a | +145,56 | 85,37±3,08 ^c | +86,00 | 93,56±0,91 ^b | +103,83 |

Резултати су изражени у mg једињења / 100 g лиофилизованог воћа (mg/100 g LF). Приказани су као средња вредност ± стандардна девијација ($n = 3$). Вредности у истој колони обележене различитим суперскриптом се статистички значајно разликују на основу *Duncan*-овог теста ($P < 0,01$).

Скраћенице: LA – логанска киселина, Сп – корнузид, Су3glu – цијанидин-3-*O*-глукозид, Су3gal – цијанидин-3-*O*-галактозид, Pg3glu – пеларгонидин-3-*O*-глукозид, Pg3gal – пеларгонидин-3-*O*-галактозид, Pg3rob – пеларгонидин-3-*O*-робинобиозид, Kf3gal – кемферол-3-*O*-галактозид, GA – гална киселина, GA der – дериват галне киселине, СА – кафена киселина, cCftA – *cis*-кафтаринска киселина, tCftA – *trans*-кафтаринска киселина, pCoAsum – сума деривата *p*-кумаринске киселине, EA – елагинска киселина

када се користи 50% етанол и β -циклодекстрин у чистој води или 50% етанолу. У досадашњим истраживањима је показано да примена модификованих циклодекстрина у електрофорези и хроматографији може да доприноси бољем раздвајању иридоидних једињења (Wu et al., 1998), али ефикасност екстракције или инкапсулације иридоидних једињења циклодекстринима није до сада испитивана.

Екстракција *cis*-кафтаринске киселине β -циклодекстрином у чистој води и 50% етанолу је око 35% била боља у односу на чисту воду, а статистички значајно повећање је постигнуто и у односу на 50% етанол. Негативан утицај β -циклодекстрина је испољен једино код галне киселине и код једног деривата *p*-кумаринске киселине. У истраживању Gornas et al. (2009) је утврђено да фенолне киселине имају различите афинитете везивања у унутрашњу шупљину β -циклодекстрина. Доказано је да кафена и хлорогенска (5-*O*-кафеоилхинска киселина) граде инклузиони комплекс са β -циклодекстрином, док то није случај са ферулном, *o*- и *p*-кумароилхинском киселином (Gornas et al., 2009).

Екстракција елагинске киселине β -циклодекстрином у води се није статистички значајно променила у односу на чисту воду. Повећање је било статистички значајно екстракцијом β -циклодекстрином у 50% етанолу (+7,19%), а сам 50% етанол је био још ефикаснији (+8,82%). Иако у нашем експерименту β -циклодекстрином у води није повећана екстракција елагинске киселине из дрена, аутори Vulani et al. (2016) су доказали да елагинска киселина гради инклузиони комплекс са β -циклодекстрином у односу 1:2. Они су утврдили да се на тај начин повећавају растволјивост и биолошка активност елагинске киселине у воденом раствору. Могуће је да је одступање резултата ове докторске дисертације од литературног навода последица ниског садржаја елагинске киселине у плодовима дрена, јер су истраживања Vulani et al. (2016) вршена са елагинском киселином у вишку.

Додатак β -циклодекстрина води значајно доприноси повећању екстракције флавоноидних једињења. За екстракцију флавонола кемферол-3-*O*-галактозида је постигнут исти резултат као за иридоид корнузид, односно око 50% више једињења се екстрахује 50% етанолом и β -циклодекстрином. Када је реч о антоцијанима, цијанидин-3-*O*-галактозиду и пеларгонидин-3-*O*-галактозиду, они се у поређењу са контролом око 90% боље екстрахују β -циклодекстрином у води и око 100% боље β -циклодекстрином у 50% етанолу. Ипак, 50% етанол се показао као најбољи од испитиваних система за екстракцију антоцијана дрена (око +140%).

Резултати других аутора такође показују да се флавоноидна једињења добро екстрахују и комплексирају у односу 1:1 са β -циклодекстрином, било да се користи чисто једињење или да се екстракција врши из биљног материјала (Tommasini et al., 2004; Kalogeropoulos et al., 2010). β -Циклодекстрином је ефикасно инкапсулиран цијанидин-3-*O*-глукозид из купине (Fernandes et al., 2018) као и галактозид, арабинозид и други гликозиди цијанидина из сока ароније (Howard et al., 2013). Ова истраживања су показала и да β -циклодекстрин штити антоцијане од термичке и рН деградације, као и током вишемесечног складиштења.

Истовремена екстракција и инкапсулација биоактивних једињења трњине у β -циклодекстрин

У табели 4.11 су дати садржаји фенолних једињења трњине екстрахованих различитим системима растварача. Генерално, чиста вода се показала као најмање ефикасно средство за екстракцију, док су сви остали ситеми били значајно ефикаснији.

Најдоминантније фенолно једињење трњине, метил-3-*O*-кафеоилхинат и 3-*O*-кафеоилхинска киселина су најбоље екстраховани β -циклодекстрином у 50% етанолу. Овај систем се показао двоструко бољим у поређењу са чистом водом (+107,65%). Затим је по ефикасности следио 50% етанол (+84,84%), а онда β -циклодекстрин у води (+66,20). И остали детектовани деривати хидроксициметних киселина у узорку трњине су се боље екстраховали додатком β -циклодекстрина, с тим што је већа ефикасност остварена за дериват *p*-кумароилхинске киселине него за дериват кафеене киселине.

β -Циклодекстрин се показао веома ефикасним за екстракцију флавонолних гликозида, кверцетин-3-*O*-глукозида и кверцетин-3-*O*-рутинозида. Оба деривата се за око 50% боље екстрахују β -циклодекстрином у води, а преко 100% боље када се екстракција врши 50% етанолом или β -циклодекстрином у 50% етанолу. Резултати других аутора су такође показали велики потенцијал β -циклодекстрина у екстракцији флавоноидних једињења из биљног материјала и да се граде инклузиони комплекси у односу 1:1. Kalogeropoulos et al. (2010) су из кантариона β -циклодекстрином екстраховали епикатехин, катехин и кверцетин и утврдили да β -циклодекстрин штити ова једињења од оксидације. Alvarez-Parrilla et al. (2005) и Çelik et al. (2015) су установили да се у поређењу са агликоном кверцетином, гликозиловани деривати (кверцетин-3-*O*-рамнозид и кверцетин-3-*O*-рутинозид) слабије комплексирају са β -циклодекстрином.

Мале количине антоцијана трњине су екстраховане чистом водом, тако да су додаток етанола или β -циклодекстрина више десетина пута поспешили екстракцију ових једињења. Могуће да је целокупан састав биљног материјала утицао дестимулативно на екстракцију антоцијана водом, која свакако, као веома поларна, није најподеснији растварач за екстракцију антоцијана (Müller, et al., 2005). Екстракција је, као и код дрена, била најефикаснија применом 50% етанола, којим је изекстраховано 581,42% више пеонидин-3-*O*-рутинозида, до 3560,27% више цијанидин-3-*O*-глукозида. β -Циклодекстрин се показао као веома добар ко-растварач води за екстракцију антоцијана трњине, побољшавајући екстракцију за 274,00% до 2088,47%. β -Циклодекстрин у 50% етанолу је поспешио екстракцију у поређењу са контролом, али се овај систем показао мање ефикасним од 50% етанола.

Табела 4.11. Садржај фенолних једињења (mg/100 g лиофилизованог воћа) трњине екстрахованих различитим системима

| Бр. | Једињење | Изражено преко | t_R (min) | λ_{max} (nm) | H ₂ O | % (кон-трола) | EtOH/H ₂ O | +/- (%) контроле | β -CD-H ₂ O | +/- (%) контроле | β -CD-EtOH/H ₂ O | +/- (%) контроле |
|-----|---------------|----------------|-------------|----------------------|--------------------------|---------------|--------------------------|------------------|------------------------------|------------------|-----------------------------------|------------------|
| 1. | 3CQA + Me3CQA | 3CQA | 9,1 | 324 | 248,30±0,50 ^d | 100 | 458,97±2,48 ^b | +84,84 | 412,68±12,38 ^c | +66,20 | 515,59±20,62 ^a | +107,65 |
| 2. | CoQA der | CoA | 11,6 | 310 | 10,45±0,14 ^d | 100 | 13,39±0,06 ^b | +28,13 | 11,95±0,36 ^c | +14,31 | 14,29±1,57 ^a | +36,73 |
| 3. | CQA der | CQA | 13,1 | 325 | 4,57±0,06 ^c | 100 | 4,76±0,04 ^b | +4,30 | 4,35±0,05 ^d | -4,81 | 4,95±0,04 ^a | +8,51 |
| 4. | Q3glu | станд. | 38,3 | 353 | 3,06±0,10 ^d | 100 | 6,27±0,16 ^b | +104,79 | 4,73±0,16 ^c | +54,51 | 6,63±0,09 ^a | +116,53 |
| 5. | Q3rut | станд. | 38,7 | 354 | 10,55±0,24 ^c | 100 | 15,54±0,51 ^b | +47,24 | 15,64±0,32 ^b | +48,20 | 17,55±0,58 ^a | +66,35 |
| 6. | Sy3glu | станд. | 17,3 | 517 | 2,42±0,08 ^d | 100 | 88,61±0,39 ^a | +3560,27 | 52,98±1,75 ^c | +2088,47 | 79,04±2,61 ^b | +3164,68 |
| 7. | Sy3rut | станд. | 20,0 | 520 | 8,40±0,14 ^d | 100 | 115,56±3,00 ^a | +1275,34 | 67,42±2,23 ^c | +702,45 | 94,48±0,42 ^b | +1024,49 |
| 8. | Pn3glu | станд. | 23,7 | 520 | 1,02±0,03 ^d | 100 | 15,07±0,20 ^a | +1382,58 | 6,93±0,04 ^c | +581,98 | 10,88±0,33 ^b | +969,90 |
| 9. | Pn3rut | Pn3glu | 27,4 | 520 | 6,55±0,26 ^d | 100 | 44,64±1,34 ^a | +581,42 | 24,50±0,34 ^c | +274,00 | 33,49±1,11 ^b | +411,16 |

Резултати су изражени у mg једињења / 100 g лиофилизованог воћа (mg/100 g LF). Приказани су као средња вредност ± стандардна девијација ($n = 3$). Вредности у истој колони обележене различитим суперскриптом се статистички значајно разликују на основу *Duncan*-овог теста ($P < 0,01$).

Скраћенице: 3CQA – 3-*O*-кафеоилхинска киселина, Me3CQA – метил-3-*O*-кафеоилхинат, CoQA der – дериват *p*-кумароилхинске киселине, CQA der – дериват кафеоилхинске киселине, Q3glu – кверцетин-3-*O*-глукозид, Q3rut – кверцетин-3-*O*-рутинозид, Sy3glu – цијанидин-3-*O*-глукозид, Sy3rut – цијанидин-3-*O*-рутинозид, Pn3glu – пеонидин-3-*O*-глукозид, Pn3rut – пеонидин-3-*O*-рутинозид.

Табела 4.12. Садржај фенолних једињења (mg/100 g лиофилизованог воћа) тропа вишње екстрахованих различитим системима

| Бр. | Једињење | Изражено преко | t_R (min) | λ_{max} (nm) | H_2O | % (кон-трола) | EtOH/ H_2O | +/- (%) контроле | β -CD- H_2O | +/- (%) контроле | β -CD-EtOH/ H_2O | +/- (%) контроле |
|-----|------------|----------------|-------------|----------------------|--------------------------|---------------|--------------------------|------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|------------------|
| 1. | 3CQA | станд. | 9,1 | 324 | 15,31±0,61 ^c | 100 | 19,59±0,27 ^a | +27,89 | 14,72±0,44 ^c | -3,85 | 17,97±0,10 ^b | +17,32 |
| 2. | CoQA der | CoA | 11,6 | 310 | 7,28±0,22 ^c | 100 | 8,73±0,29 ^{ab} | +19,79 | 8,03±0,11 ^b | +10,20 | 8,76±0,35 ^a | +20,31 |
| 3. | 5CQA | станд. | 13,1 | 325 | 5,08±0,15 ^d | 100 | 8,04±0,11 ^b | +58,19 | 7,40±0,04 ^c | +45,68 | 8,48±0,14 ^a | +66,86 |
| 4. | CA der | CA | 38,3 | 353 | 2,89±0,12 ^c | 100 | 6,78±0,20 ^a | +134,54 | 3,05±0,11 ^b | +5,41 | 3,26 ±0,08 ^b | +12,73 |
| 5. | Q3rut | станд. | 38,7 | 354 | 0,00±0,00 | - | 13,38±0,54 ^b | ∞ | 11,21±0,06 ^a | ∞ | 13,77±0,45 ^a | ∞ |
| 6. | Is3rut | Q3rut | 41,1 | 353 | 0,00±0,00 | - | 12,05±0,07 ^a | ∞ | 10,79±0,18 ^b | ∞ | 12,64±0,42 ^a | ∞ |
| 7. | Sy-gly | Sy3glu | 41,7 | 349 | 9,45±0,31 ^c | 100 | 14,63±0,08 ^a | +54,91 | 7,77±0,04 ^d | -17,69 | 10,84±0,18 ^b | +14,77 |
| 8. | Sy3glu-rut | Sy3rut | 17,3 | 517 | 117,87±0,64 ^c | 100 | 151,77±0,82 ^a | +28,75 | 115,44±3,46 ^c | -2,06 | 136,98±2,33 ^b | +16,21 |
| 9. | Sy3rut | станд. | 20,0 | 520 | 59,06±1,77 ^c | 100 | 100,27±1,70 ^a | +69,77 | 63,64±0,34 ^c | +7,75 | 76,40±2,52 ^b | +29,36 |
| 10. | Sy-gly | Sy3glu | 23,7 | 520 | 2,91±0,05 ^b | 100 | 2,89±0,02 ^b | -0,87 | 2,83±0,09 ^b | -2,75 | 3,22±0,05 ^a | +10,40 |
| 11. | Pn3rut | станд. | 27,4 | 520 | 2,83±0,09 ^b | 100 | 4,65±0,07 ^a | +64,46 | 2,06±0,03 ^c | -27,22 | 2,88±0,10 ^b | +1,97 |

Резултати су изражени у mg једињења / 100 g лиофилизованог воћа (mg/100 g LF). Приказани су као средња вредност ± стандардна девијација ($n = 3$). Вредности у истом реду обележене различитим суперскриптом се статистички значајно разликују на основу *Duncan*-овог теста ($P < 0,01$).

Скраћенице: 3CQA – 3-*O*-кафеоилхинска киселина, CoQA der – дериват *p*-кумароилхинске киселине, 5CQA – 5-*O*-кафеоилхинска киселина, CA der – дериват кафеене киселине, Q3rut – кверцетин-3-*O*-рутинозид, Is3rut – изорамнетин-3-*O*-рутинозид, Sy-gly – цијанидин-гликозид, Sy3glu – цијанидин-3-*O*-глукозид, Sy3glu-rut – цијанидин-3-*O*-(2'глукозил)рутинозид, Су3rut – цијанидин-3-*O*-рутинозид, Pn3glu – пеонидин-3-*O*-глукозид, Pn3rut – пеонидин-3-*O*-рутинозид.

Истовремена екстракција и инкапсулација биоактивних једињења тропа вишње у β -циклодекстрин

Резултати поређења ефикасности воде, 50% етанола, β -циклодекстрина у води и β -циклодекстрина у 50% етанолу као система за екстракцију фенолних једињења из тропа вишње су представљени у табели 4.12.

Слично резултатима за екстракцију биоактивних једињења дрена и трњине, и код тропа вишње се претежно 50% етанол показао као најбоље средство за екстракцију. За разлику од потенцијала β -циклодекстрина додатог води да значајно поспеши екстракцију једињења дрена и трњине, код тропа вишње се ово није показало толико ефикасним, указујући да осим структуре једињења, природа узорка из којег се врши екстракција има велику улогу.

β -Циклодекстрин се код тропа вишње показао ефикасним у екстракцији 5-*O*-кафеоилхинске киселине. Екстракција β -циклодекстрином у чистој води (+45,68%) је била готово на ниву оне постигнуте 50% етанолом (+58,19%), а још ефикаснијом се показала екстракција β -циклодекстрином у 50% етанолу (+66,86%). Такође статистички значајно ефикаснијим у односу на контролу, али са нешто нижим процентом, се показао β -циклодекстрин у екстракцији деривата *p*-кумароилхинске киселине.

Из резултата приказаних у табели 4.12 се види да β -циклодекстрин у води нема утицај на екстракцију 3-*O*-кафеоилхинске киселине из тропа вишње, него да додаток етанола узрокује бољу екстракцију. Исти резултат је добијен и за други детектовани дериват кафеине киселине (једињење број 4).

Највећи утицај је β -циклодекстрин имао на екстракцију флавонолних структура, кверцетин-3-*O*-рутинозида и изорамнетин-3-*O*-рутинозида. Приликом екстракције водом су ова једињења била испод граница детекције, док их је β -циклодекстрин екстраховао у садржају блиском оном који је достигнут са 50% етанолом.

Екстракција већине антоцијана из тропа вишње је под утицајем β -циклодекстрина била или на нивоу контроле или значајно редукована. Једино је β -циклодекстрином у 50% етанолу екстраховано процентуално више антоцијана него чистом водом.

У свом истраживању Ratnasooriya and Rupasinghe (2012) су β -циклодекстрином у води значајно поспешили екстракцију стилбена, флавонола и флаван-3-ола из тропа грожђа, а утврдили су и да је β -циклодекстрин бољи за екстракцију ових једињења од α - и γ -циклодекстрина. Истраживања су такође показала да додаток модификованих β -циклодекстрина значајно доприноси бољој екстракцији биоактивних полифенола из тропа маслине и коре наранџе (Albahari et al., 2018; Lakka et al., 2020).

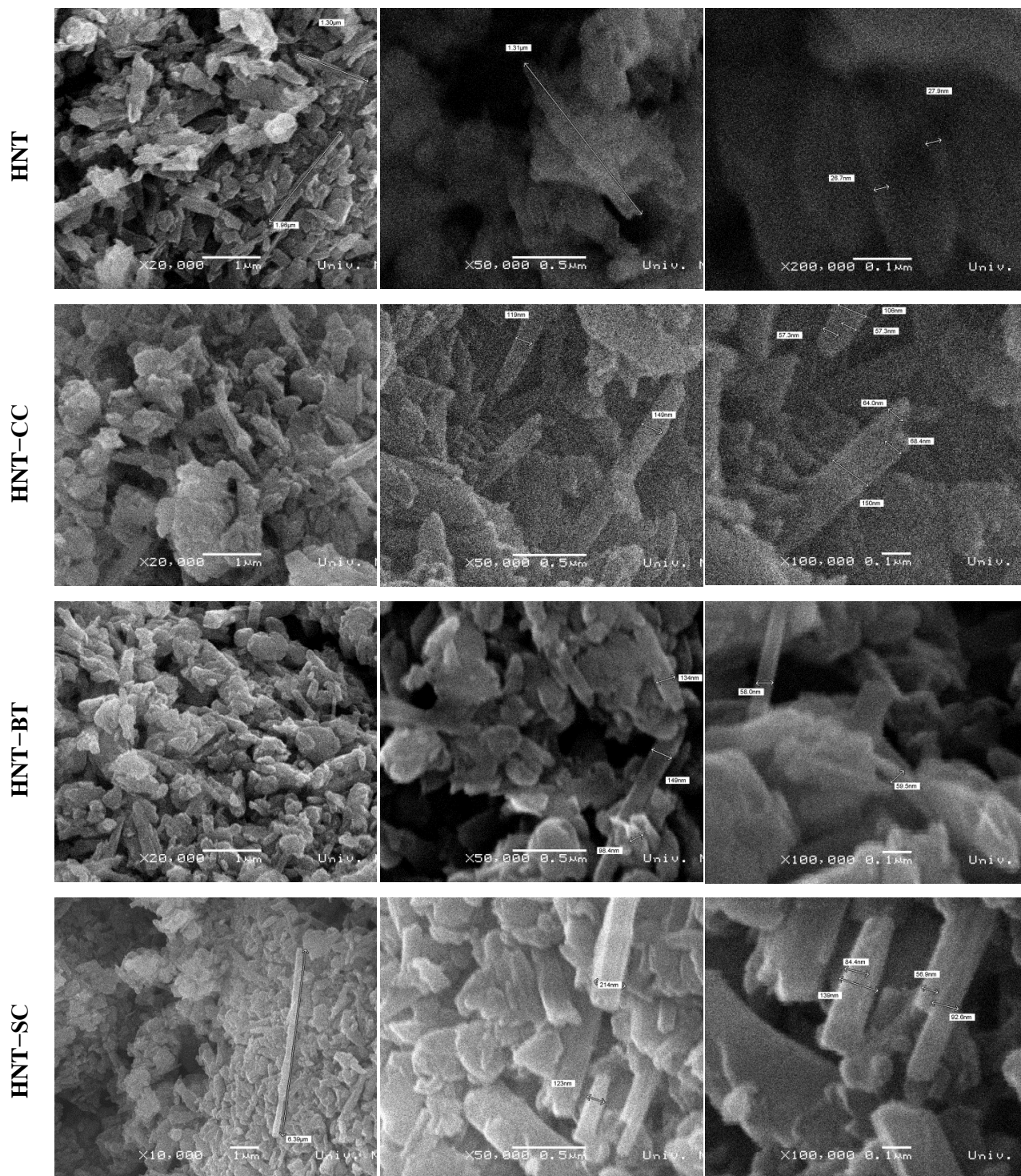
4.5.2. Физичкохемијске карактеристике инкапсулата

Снимање инкапсулата скенирајућом електронском микроскопијом (СЕМ)

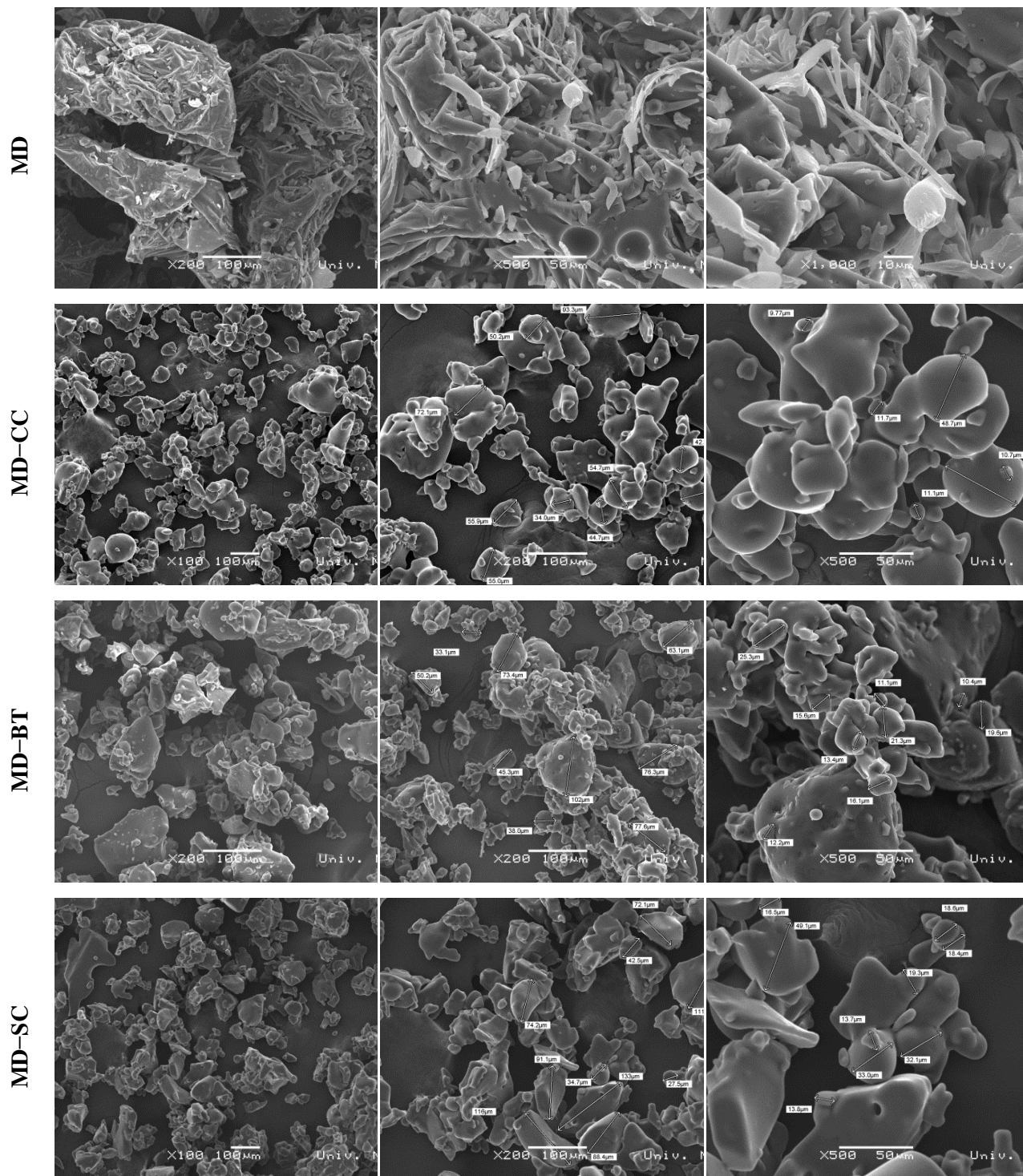
Површинска морфологија инкапсулата екстраката дрена, трњине и тропа вишње у халојзиту, малтодекстрину и β -циклодекстрину је снимљена скенирајућим електронским микроскопом. СЕМ снимци појединачних инкапсулата и самих носача који су снимљени при различитим увећањима су представљени на сликама 4.21, 4.22 и 4.24. Сви ови носачи и инкапсулати су добијени у прашкастој форми и могли су да буду снимљени СЕМ техником. Међутим, иако је носач који је добијен комбинацијом халојзита и малтодекстрина у односу 1:6 у прашкастој форми, након инкапсулације једињења из воћних екстраката, добијени инкапсулати су имали структуру као карамел бомбоне (слика 4.19), тако да честице нису могле да буду снимљене СЕМ техником. На слици 4.24 је СЕМ снимак носача халојзит-малтодекстрина и снимљена површина инкапсулата са дренам, где се види само спољашња глатка површина ових инкапсулата и површине које су засечене ножем када је инкапсулат пресечен да би се добиле што мање честице које се могу ставити под микроскоп.

На слици 4.21 су приказани СЕМ снимци нанотуба халојзита и инкапсулата дрена, трњине и тропа вишње у халојзиту. У уводном делу дисертације је објашњена структура халојзита. Халојзит је глина чији су слојеви увијени у облику ваљка са шупљином унутра, тако да има облик цеви. Нанотубе халојзита са различитих налазишта знатно варирају у димензијама, те је неопходно да се напомене да халојзит коришћен у овом раду потиче са површинског копа у регији Нортланд, на Новом Зеланду. У истраживању Pasbakhsh et al. (2013) су поређене нанотубе халојзита са различитих налазишта у Аустралији, САД и на Новом Зеланду. Утврђено је да су нанотубе халојзита из Нортланда издуженије и већег пречника од оних са других налазишта. Дужина туба је у распону 100–3000 nm, унутрашњи пречник им је 15–70 nm, а спољашњи пречник 50–70 nm.

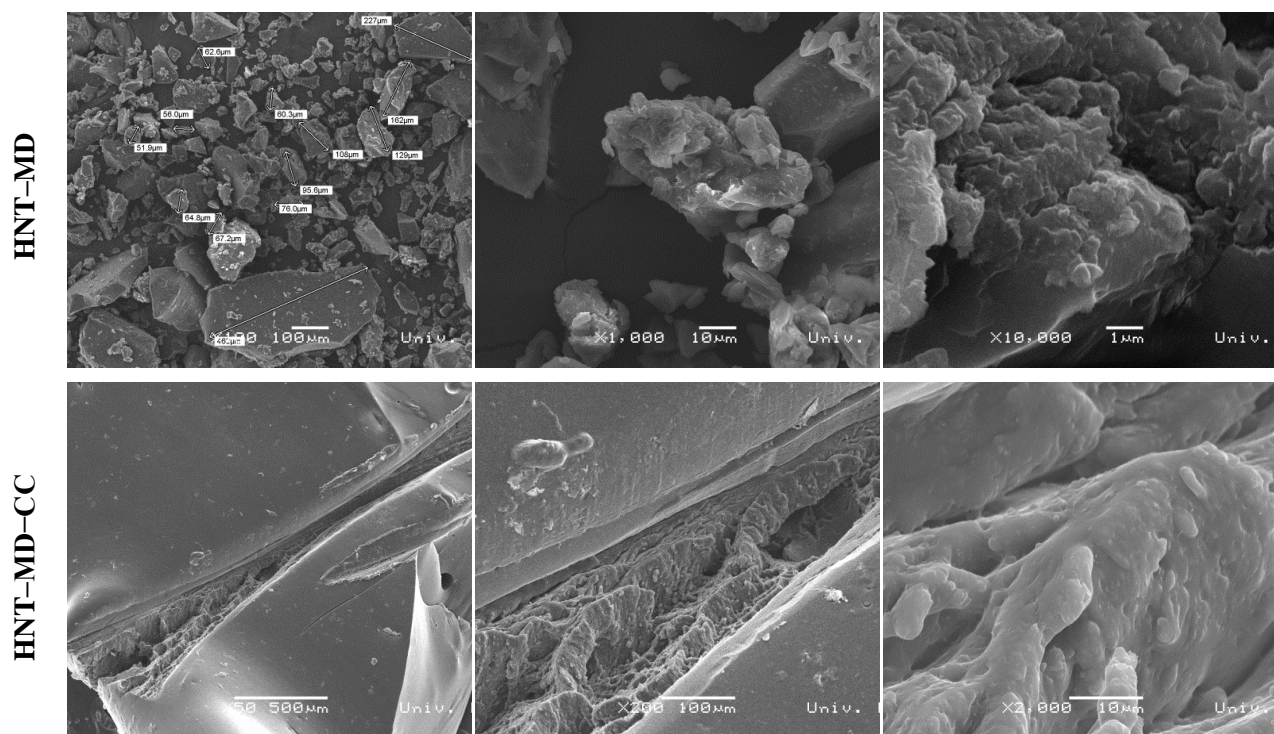
На СЕМ снимцима (слика 4.21) се јасно види издужена структура нанотуба, али такође и неуједначеност њихових димензија. Уочљиво је да се по две или више нанотуба надовезују једна на другу претежно у ширину, али понекад и у дужину. Изглед и димензије нанотуба халојзита коришћеног у овом истраживању су у складу са оним што је утврђено и од стране других аутора (Pasbakhsh et al., 2013, Cavallaro et al., 2018). Код инкапсулата воћних екстраката у халојзиту се види да су облик и димензије нанотуба остали непромењени, једино је израженије „слепљивање“ честица. Узрок томе су највероватније шећери који су били присутни у екстрактима воћа.



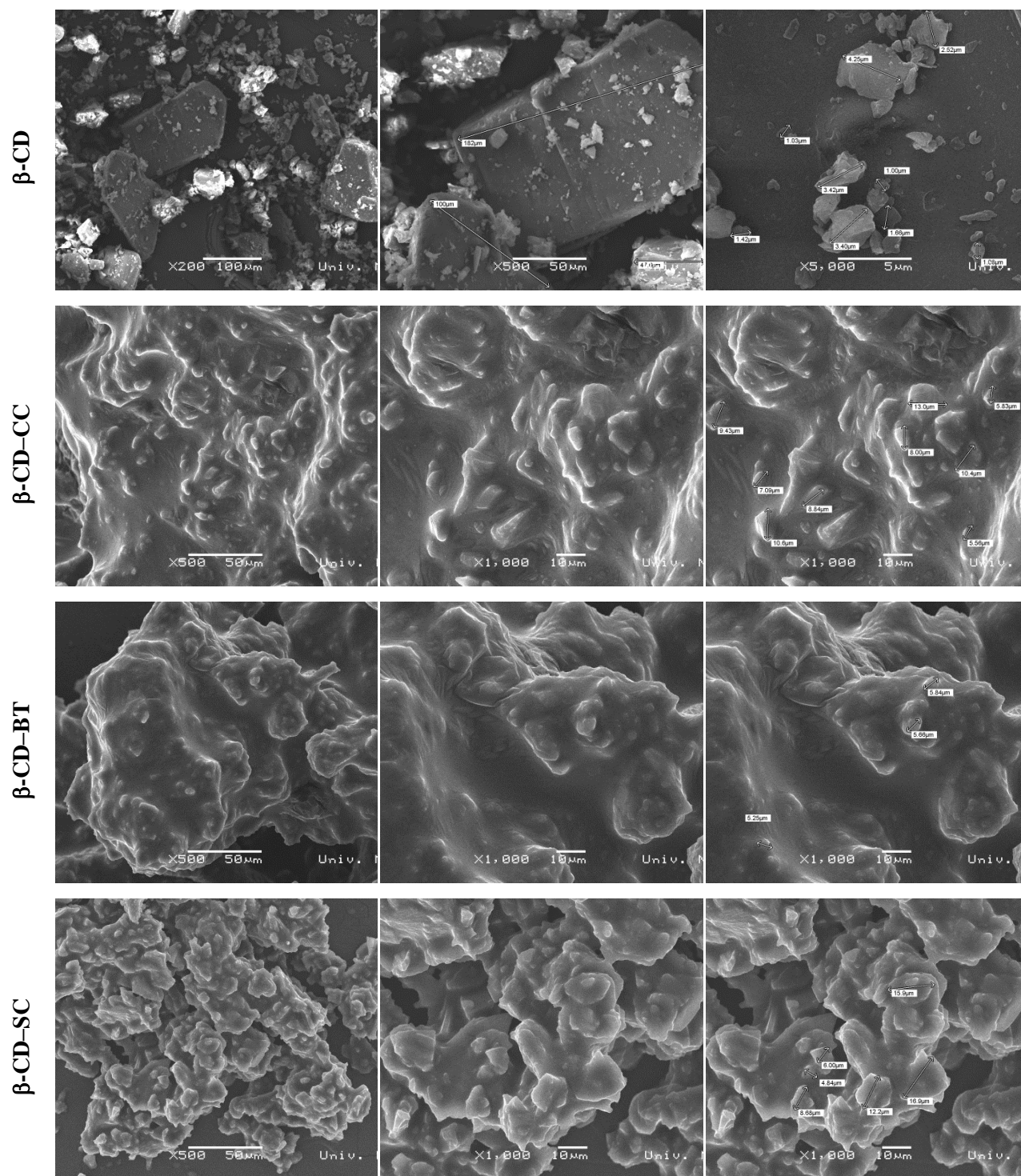
Слика 4.21. SEM снимци инкапсулата у халојзиту при увећањима од 20.000, 50.000 и 100.000 × (Ознаке: HNT–халојзит, CC – дрен, BT – трњина, SC – троп вишње)



Слика 4.22. СЕМ снимци инкапсулата у малтодекстрину при увећањима од 200, 500 и 1.000 × (Ознаке: MD – малтодекстрин, CC – дрен, BT – трњина, SC – троп вишње)



Слика 4.23. СЕМ снимци инкапсулата у халојзит-малтодекстринском композиту при увећањима од 50, 100, 200, 1.000, 2.000 и 10.000 ×
(Ознаке: HNT-MD – халојзит-малтодекстрин, CC – дрен)



Слика 4.24. SEM снимци инкапсулата у β -циклодекстрину при увећањима од 200, 500, 1.000 и 5.000 \times

(Ознаке: β -CD – β -циклодекстрин, CC – дрен, BT – трњина, SC – троп вишње)

На СЕМ снимцима инкапсулата у малтодекстрину (слика 4.22) се уочава њихов неправилан облик и нехомогеност. Уочљиве су и велике варијације у величини честица. На облик и величину честица највише утиче техника припреме инкапсулата. Из истраживања других аутора се види да се уједначеније честице инкапсулата, сферног облика, добијају применом технике сушења распршивањем (*енгл.* spray drying) (Mishra et al., 2014), док су честице неправилнијег облика уколико су добијене поступком лиофилизације (Cilek et al., 2012). Такође, декстрозни еквиваленти малтодекстрина имају утицај на крајњи изглед микрочестица (Laine et al., 2008; Tolun et al., 2016). У овој дисертацији је коришћен малтодекстрин са DE 15–20 и инкапсулати су припремљени поступком лиофилизације, а изглед честица је у сагласности са поменутом литературом. При увећању од 500 пута се јасно види глатка спољашња површина честица, што је одлика овог носача, без обзира на декстрозни еквивалент или технику припреме (Tolun et al., 2016). Инкапсулати сва три воћна екстракта су имали веома сличан изглед, односно није било разлика у погледу облика и димензија честица, било да су инкапсулирана једињења из екстракта дрена, трњине или тропа вишње.

Инкапсулати воћних екстраката у β -циклодекстрину се знатно разликују од чистог носача. За разлику од β -циклодекстрина који је у прашкастој форми и раздвојеност честица се види и на СЕМ снимцима, код свих инкапсулата се уочава аморфан облик и изразита слепљеност честица (слика 4.24). Слепљивање честица је, слично инкапсулатима у халојзиту, знатно мање изражено код инкапсулата тропа вишње. Врло сличне честице микрокапула су добијене у истраживању да Rosa et al. (2014), приликом инкапсулације фенолних једињења из боровнице. Такође, као и код инкапсулација у малтодекстрину, велику разлику у облику и димензијама честица прави техника припреме инкапсулата. За разлику од честица које се добијају лиофилизацијом, техником сушења распршивањем се добијају одвојене честице, сферног облика (Koester et al., 2003).

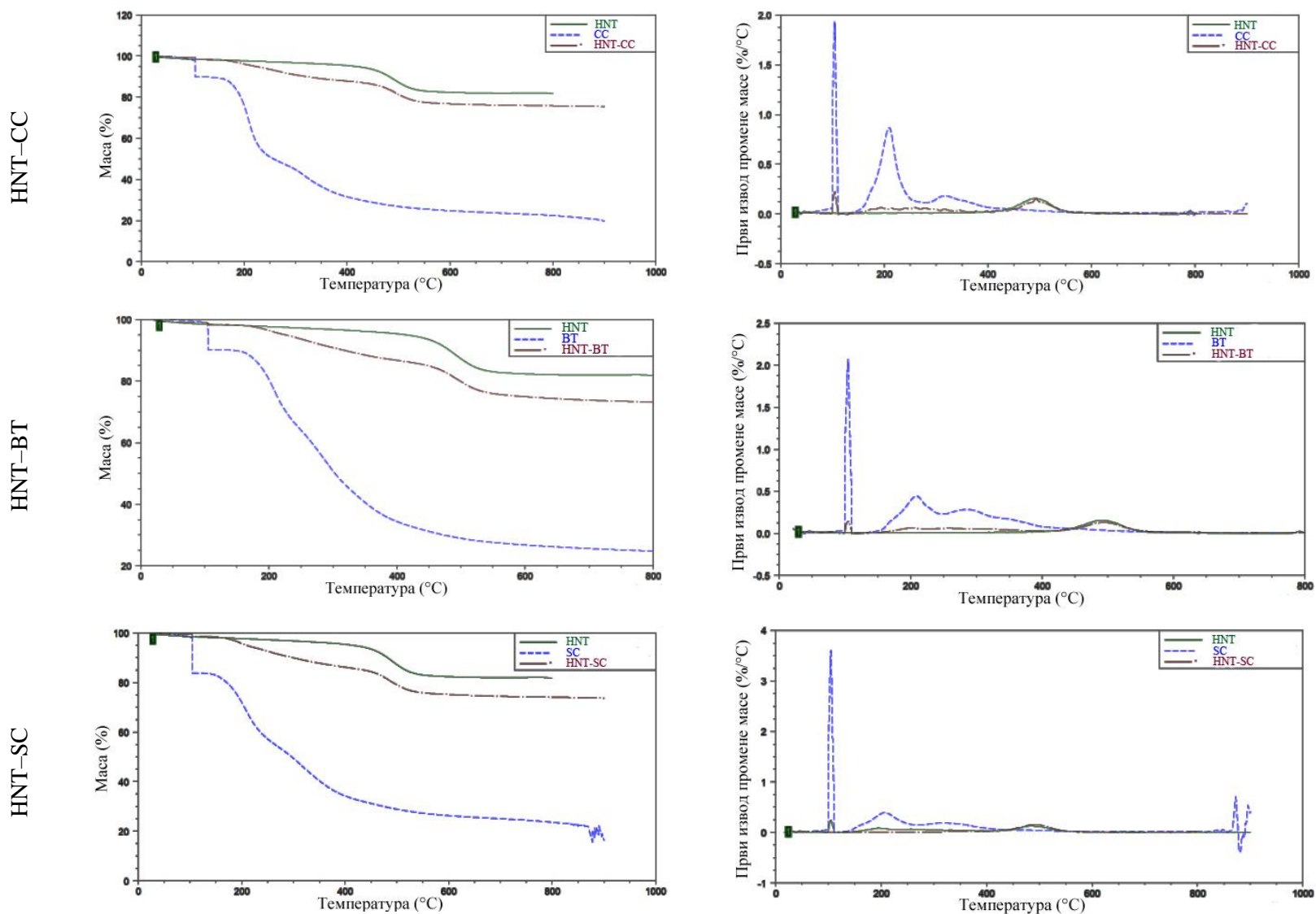
Термогравиметријска (ТГ) карактеризација инкапсулата

Термогравиметрија (ТГ) је метода којом се мери промена масе узорка са константним порастом температуре. Са повећањем температуре долази до разградње различитих компонената, што доводи до промене укупне масе узорака. Ова метода термијске анализе је примењена на све инкапсулате, екстракте и чисте носаче, а поређењем ТГ крива одговарајућег екстракта, носача и инкапсулата су добијене информације о начину разградње инкапсулираних екстраката и потврда да су екстрахована једињења инкапсулирана. На сликама 4.25, 4.26 и 4.27 су приказане ТГ криве промене масе узорка са температуром и криве првог извода губитка масе са температуром за сваки испитивани узорак.

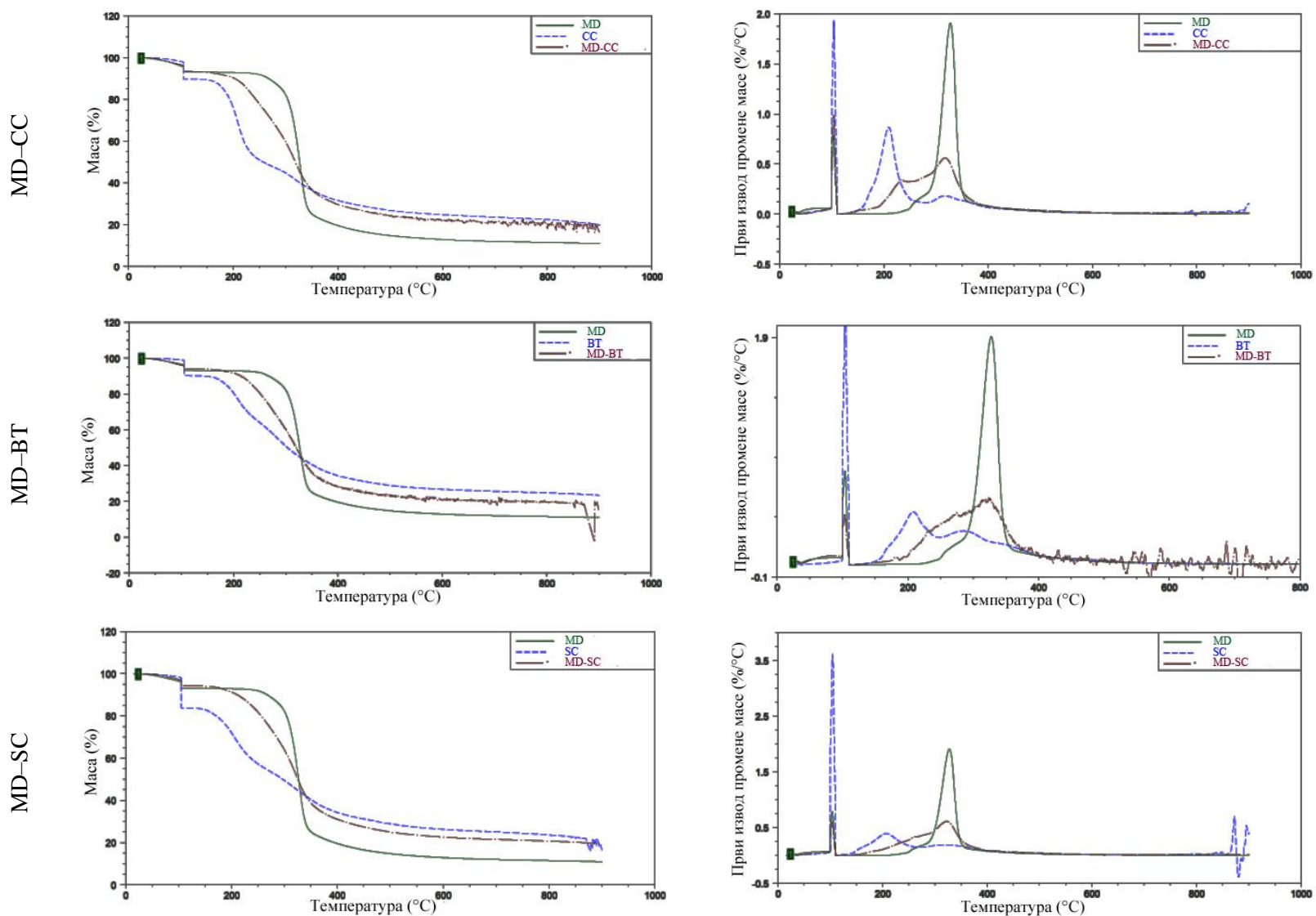
ТГ криве воћних екстраката потврђују сличност ових узорака и органску природу једињења, с обзиром да се деградација код свих екстраката одвијала између 150 и 350 °C, што је карактеристично за органске молекуле. Деградација једињења из екстракта дрена и тропа вишње се одиграла у два степена, на око 210 °C и 320 °C. Код оба узорка је већи губитак масе на 210 °C. Деградација једињења из екстракта трњине се одвијала у три корака. Први, највећи губитак масе је забележен такође на око 210 °C, а затим следе нешто мањи губици на око 280 °C и 350 °C.

За нанотубе халојзита је добијен изглед ТГ криве типичан за ову наноглину, са губитком масе од 16,3 % на приближно 500 °C, што представља губитак воде која се налази између увијених слојева халојзита. Инкапсулати са халојзитом су показали смањену резидуалну масу на високим температурама, услед губитка органских једињења из екстраката, која су се разградила на температурама између 150 и 350 °C. Количина органске материје у унутрашњости нанотуба халојзита је израчуната на основу термогравиметријских крива узимајући у прорачун резидуалну масу на 750 °C. Процењено је да је ефикасност пуњења халојзита једињењима из екстракта дрена 8,5%, трњине 9,4% и тропа вишње 8,6%. Ови резултати су у сагласности са максималним капацитетом нанотуба халојзита да инкапсулира молекуле (Cavallaro et al., 2018).

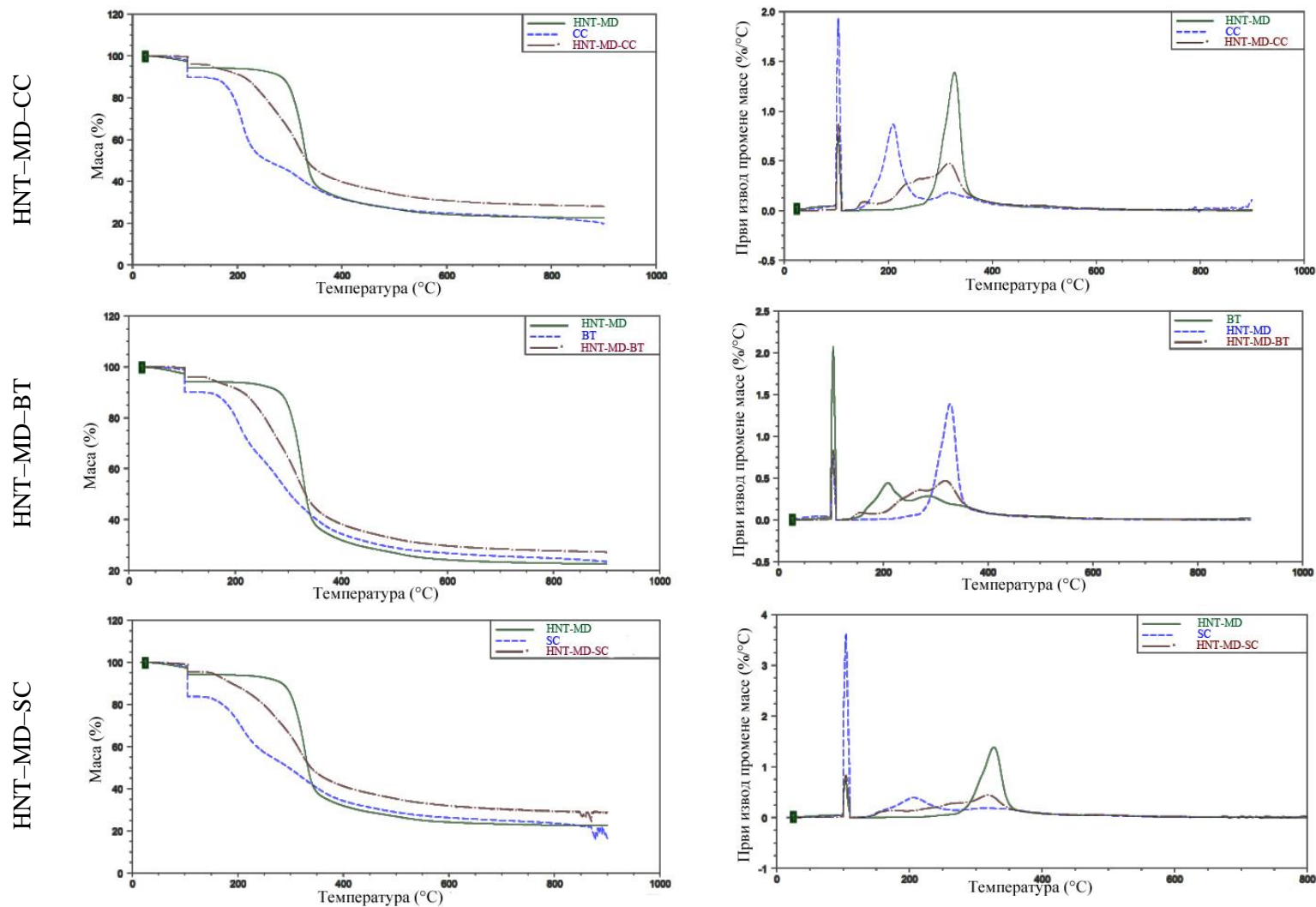
Криве разградње малтодекстрина и β -циклодекстрина су биле карактеристичне за ове угљенохидратне полимере, са губицима масе у интервалу између 300 и 350 °C. За инкапсулате свих воћних екстраката са овим носачима, као и са халојзит-малтодекстрин композитом, уочава се померање температуре разградње једињења ка вишим °C, што сведочи о томе да их носачи штите од термодеградације. Овакве резултате су потврдили аутори da Rosa et al. (2014) приликом инкапсулације фенолних једињења из екстракта боровнице.



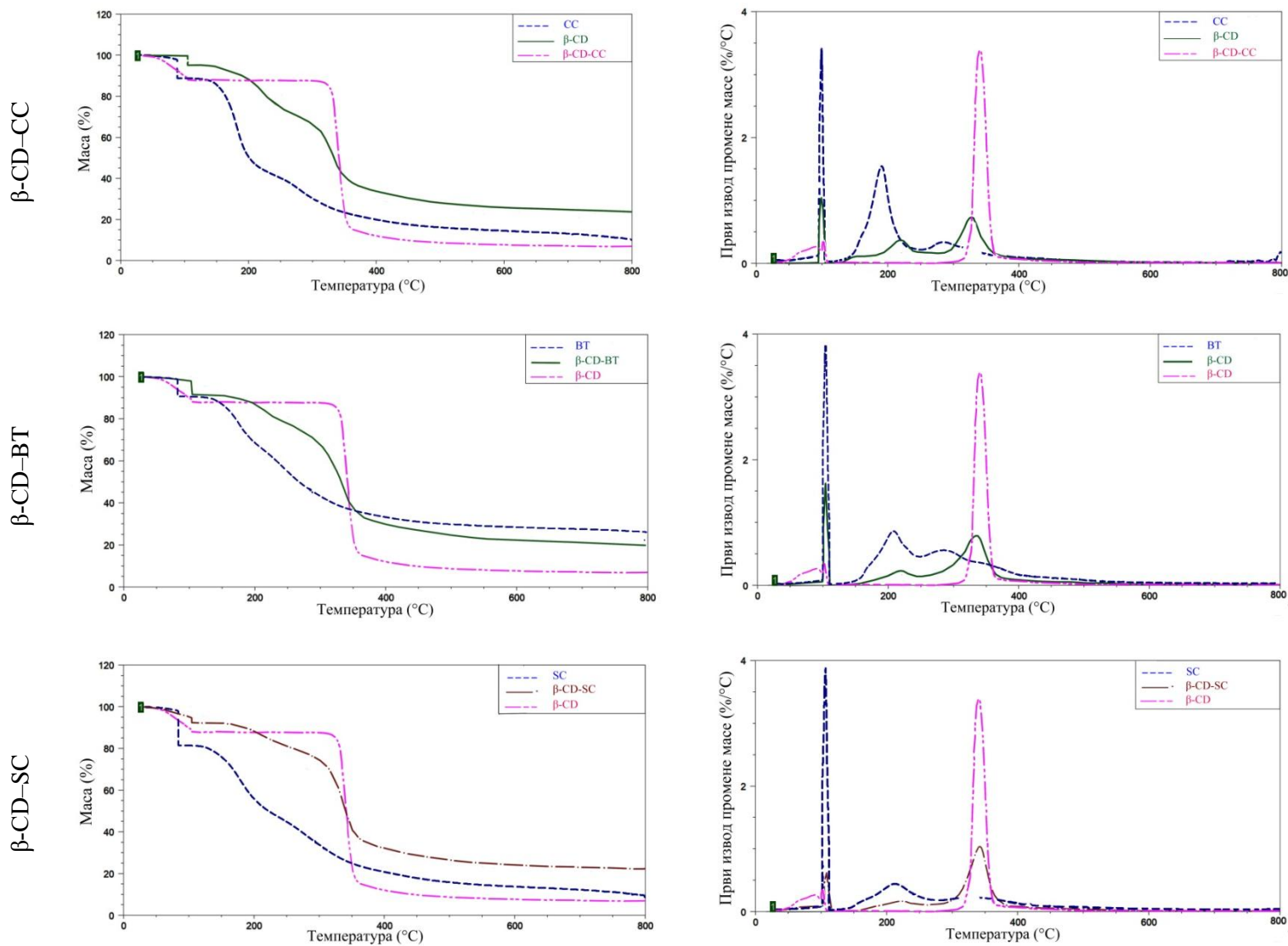
Слика 4.25. Термогравиметријске криве инкапсулата са халојзитом
(Ознаке: HNT– халојзит, CC – дрен, BT – трњина, SC – троп вишње)



Слика 4.26. Термогравиметријске криве инкапсулата са малтодекстрином
(Ознаке: MD – малтодекстрин, CC – дрен, BT – трњина, SC – троп вишње)



Слика 4.27. Термогравиметријске криве инкапсулата са халојзит-малтодекстрином (Ознаке: HNT– халојзит, MD – малтодекстрин, CC – дрен, BT – трњина, SC – троп вишње)

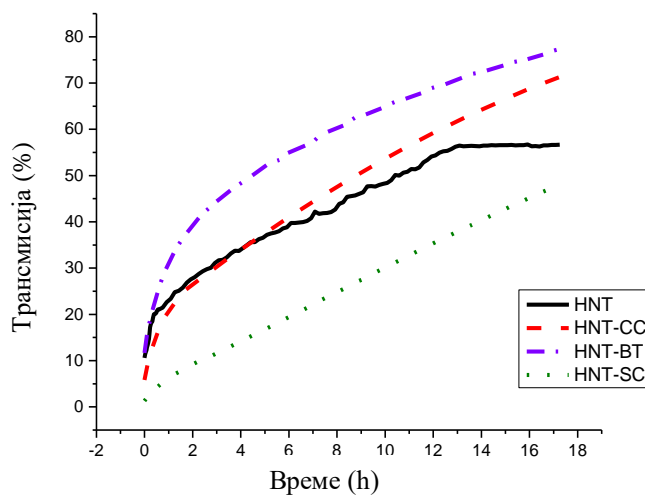


Слика 4.28. Термогравиметријске криве инкапсулата са β -циклодекстрином
(Ознаке: β -CD – β -циклодекстрин, CC – дрен, BT – трњина, SC – троп вишње)

Колоидна стабилност инкапсулата са халојзитом

Колоидна стабилност инкапсулата са халојзитом је одређена турбидиметријски, мерењем процента трансмисије раствора током времена. Процент трансмисије представља проценат пропуштеног зрачења кроз раствор. Код стабилних колоидних раствора таласни зраци се одбијају од диспергованих честица и количина пропуштеног зрачења је мала, односно проценат трансмисије је низак. Код нестабилних колоида, честице формирају агрегате и таложе се, што резултује великом трансмисијом раствора.

Трансмисија је мерена за инкапсулате екстракта дрена, трњине и тропа вишње са халојзитом. Чист халојзит и инкапсулати воћа су за одређивање колоидне стабилности дисперговани у води. На основу седамнаесточасовног праћења је утврђено да су сва три инкапсулата стабилна у раствору током више часова. На графику на слици 4.29 су приказани резултати мереног процента трансмисије у зависности од времена, а сам процес мерења је приказан на слици 4.30.



Слика 4.29. Трансмисија раствора диспергованих честица чистог халојзита и инкапсулата у халојзиту током времена
(Ознаке: HNT – халојзит, CC – дрена, BT – трњина, SC – троп вишње)

Чист халојзит је после нешто бржег иницијалног таложења имао уједначен ток таложења од првог до тринаестог сата. За ово време се трансмисија раствора линеарно повећавала од 20% до 55%. После тринаестог сата, трансмисија раствора халојзита је остала непромењена.

Колоидна стабилност инкапсулата дрена је врло слична колоидној стабилности чистог халојзита. Током првих 6 сати, до трансмисије од 40%, таложење инкапсулата са дренам се одвијало на исти начин као и таложење халојзита. Након тога, процес таложења инкапсулата дрена је био бржи од таложења чистог халојзита и континуирано се одвијао до краја праћења експеримента, где је трансмисија достигла 70%.

Колоидна стабилност инкапсулата трњине је била нешто мања у поређењу са осталим инкапсулатима и чистим халојзитом. Честице инкапсулата трњине су се током првих часова мерења таложиле много брже од осталих. За прва четири сата трансмисија раствора овог инкапсулата је порасла на 50%, али се даље таложење одвијало знатно спорије, до крајње измерене трансмисије од 77%. Овакав резултат указује да је присуство једињења из екстракта трњине узроковало привлачење честица инкапсулата, односно прављење већих агрегата честица које су се због тога брже таложиле.

Инкапсулат троп вишње је показао највећу стабилност, већу и од чистог халојзита. Током целокупног времена праћења таложења, овај инкапсулат је показао уједначен ток таложења и линеарно повећање процента трансмисије до 45%. Може да се претпостави да су на спољашњој површини овог инкапсулата молекули истоименог наелектрисања, што доводи до одбијања честица у раствору и споријег таложења.

Плодови дрена и трњине су богати органским једињењима, попут витамина С, органских киселина и шећера, нарочито пектина, који су могли да се вежу за спољашњу површину нанотуба халојзита и доведу до привлачних интеракција међу њима (Martinović & Cavoski, 2020; Yilmaz et al., 2009). Пошто троп представља остатак плодова након цеђења сока, треба имати на уму да су најхидрофилнија једињења плодова вишње, преваходно шећери, уклоњени са соком, тако да су друга једињења која су била везана на спољашњој површини инкапсулата довела до другачијег понашања овог инкапсулата у односу на инкапсулате дрена и трњине.



Слика 4.30. Таложење инкапсулата са халојзитом
(Ознаке: HNT – халојзит, CC – дрен, BT – трњина, SC – троп вишње)

4.5.3. Спектрофотометријско одређивање ефикасности инкапсулације

Ефикасност инкапсулације (ЕЕ, *енгл.* encapsulation efficiency) је одређена као однос биоактивних једињења везаних у унутрашњости инкапсулата (СВС, *енгл.* core bioactive compounds) и укупних инкапсулираних биоактивних једињења (ТВС, *енгл.* total bioactive compounds). Садржај биоактивних једињења везаних у унутрашњости инкапсулата је добијен одузимањем површински везаних једињења (SBC, *енгл.* surface bioactive compounds) од укупних једињења. Резултати су прикатани у табели 4.10.

Најбоља ефикасност инкапсулације је постигнута са носачима халојзит-малтодекстрином и самим малтодекстрином. За сва три екстракта воћа инкапсулирана са халојзит-малтодекстрином је постигнута ефикасност инкапсулације преко 99%, а са малтодекстрином преко 90%. Најмања ефикасност је постигнута са нанотубама халојзита, где је износила 35,87% за дрен, 52,30% за троп вишње и 61,85% за трњину.

Табела 4.10. Ефикасност инкапсулације

| Инкапсулат | ТВС mg/100 g ink. | SBC mg/100 g ink. | ЕЕ (%) |
|------------|----------------------|----------------------|--------------|
| HNT-CC | 143,76 ± 0,77 | 92,19 ± 0,38 | 35,87 ± 0,53 |
| MD-CC | 414,52 ± 2,69 | 34,72 ± 0,77 | 91,62 ± 0,24 |
| HNT-MD-CC | 317,71 ± 5,36 | 1,00 ± 0,38 | 99,69 ± 0,12 |
| β-CD-CC | 387,11 ± 15,86 | 132,97 ± 1,52 | 65,62 ± 1,31 |
| HNT-BT | 488,08 ± 3,62 | 186,19 ± 0,96 | 61,85 ± 0,29 |
| MD-BT | 864,58 ± 22,92 | 0,62 ± 0,38 | 99,93 ± 0,04 |
| HNT-MD-BT | 947,59 ± 21,73 | 4,07 ± 0,00 | 99,57 ± 0,01 |
| β-CD-BT | 728,23 ± 4,86 | 169,47 ± 5,57 | 76,73 ± 0,85 |
| HNT-SC | 504,43 ± 5,75 | 240,59 ± 3,10 | 52,30 ± 1,06 |
| MD-SC | 788,72 ± 17,76 | 33,44 ± 0,44 | 95,76 ± 0,08 |
| HNT-MD-SC | 863,81 ± 21,21 | 1,51 ± 0,22 | 99,83 ± 0,02 |
| β-CD-SC | 662,29 ± 1,11 | 221,90 ± 1,46 | 66,50 ± 0,21 |
| Yog-CC | 438,02 ± 9,32 | 168,94 ± 1,35 | 61,42 ± 0,54 |
| Yog-HNT-CC | 79,91 ± 3,62 | 63,07 ± 1,01 | 20,93 ± 4,75 |
| Yog-MD-CC | 306,47 ± 1,17 | 37,40 ± 4,35 | 87,79 ± 1,45 |
| Yog-BT | 570,58 ± 5,53 | 257,19 ± 2,46 | 54,92 ± 0,58 |
| Yog-HNT-BT | 175,44 ± 4,49 | 109,43 ± 3,34 | 37,62 ± 1,34 |
| Yog-MD-BT | 372,88 ± 4,79 | 44,81 ± 0,80 | 87,98 ± 0,26 |

Вредности у табели су дате као средња вредност ± стандардна девијација, у mg еквивалената галне киселине на 100 г инкапсулата.

(Ознаке: HNT – халојзит, MD – малтодекстрин, β-CD – β-циклодекстрин, CC – дрен, BT – трњина, SC – троп вишње)

4.5.4. Испитивање антипролиферативне активности инкапсулата

За већину канцерогених обољења хемотерапија је још увек први избор због своје високе ефикасности. Међутим, постоје бројна ограничења у примени хемотерапеутика, као што су слаба биолошка доступност, брза елиминација из организма, слаб унос од стране ћелија и друго. Све више се истражују различити системи за доставу хемотерапеутика или природних производа са терапеутским дејством којима би се решили ови проблеми. Инкапсулација и одабир одговарајућих носача се испитују и са овог аспекта (Gao et al., 2018).

У овој докторској дисертацији је испитана антипролиферативна активност инкапсулата екстракта дрена, трњине и тропа вишње у халојзиту, малтодекстрину, халојзит-малтодекстринском копозиту и β -циклодекстрину, као и самих екстракта воћа и самих носача. Антипролиферативна активност је испитана на две туморске и једној нетуморској ћелијској линији, односно на ћелијама хуманог аденокарцинома дојке (MCF7), ћелијама хуманог аденокарцинома дебелог црева (HT-29) и ћелијама феталних фибробласта плућа (MRC-5). Инкапсулати су тестирани у опсегу концентрација 156,25–2500 $\mu\text{g/mL}$, екстракти воћа у опсегу 312,5–5000 $\mu\text{g/mL}$, халојзит у опсегу 62,5–1000 $\mu\text{g/mL}$, а остали носачи у опсегу 156,25–2500 $\mu\text{g/mL}$. Антипролиферативна активност, изражена као проценат раста ћелија у зависности од концентрације узорка је приказана на слици 4.31.

Добијени резултати указују на то да ни један носач није цитотоксичан, осим халојзита и комбинације халојзит-малтодекстринског копозита који су једино ка MCF7 ћелијској линији испољили антипролиферативно дејство. IC_{50} вредности су износиле 137,09 $\mu\text{g/mL}$ за нанотубе халојзита и 833,45 $\mu\text{g/mL}$ за халојзит-малтодекстрин. Ови носачи су стимулисали раст ћелија HT-29 и MRC-5, посебно при нижим тестираним концентрацијама. У претходним истраживањима других аутора (Vergaro et al., 2010) је доказано да су нанотубе халојзита биокомпатибилне и да улазе у ћелије.

За разлику од халојзита и халојзит-малтодекстринског копозита, малтодекстрин и β -циклодекстрин су стимулисали раст MCF7 ћелија дуж целог испитиваног опсега концентрација. Раст HT-29 и MRC-5 ћелијских линија је био претежно на нивоу контроле, или око 15% инхибиран приликом третмана са овим угљенохидратним носачима. Истраживачи Leroy-Lechat et al. (1994) су установили да је β -циклодекстрин токсичнији од α - и γ -циклодекстрина и да при концентрацијама мањим од 10 mM изазива хемолизу и цитотоксичност према P388 ћелијама леукемије. Међутим, у испитивању Rahman et al., (2012) на ћелијама рака дебелог црева (SW-620) и рака плућа (A-549) β -циклодекстрин није испољио цитотоксичност при концентрацијама 1–10 μM , а тај опсег је знатно нижи од оног који је испитиван у оквиру ове дисертације (0,138–22 mM).

Екстракти воћа су испољили антипролиферативни ефекат у испитаном опсегу концентрација. Екстракт дрена је испољио дозно-зависну инхибицију раста на свим третираним ћелијама. Постигнуте IC_{50} вредности су износиле 1712,87 $\mu\text{g/mL}$ (MCF7),

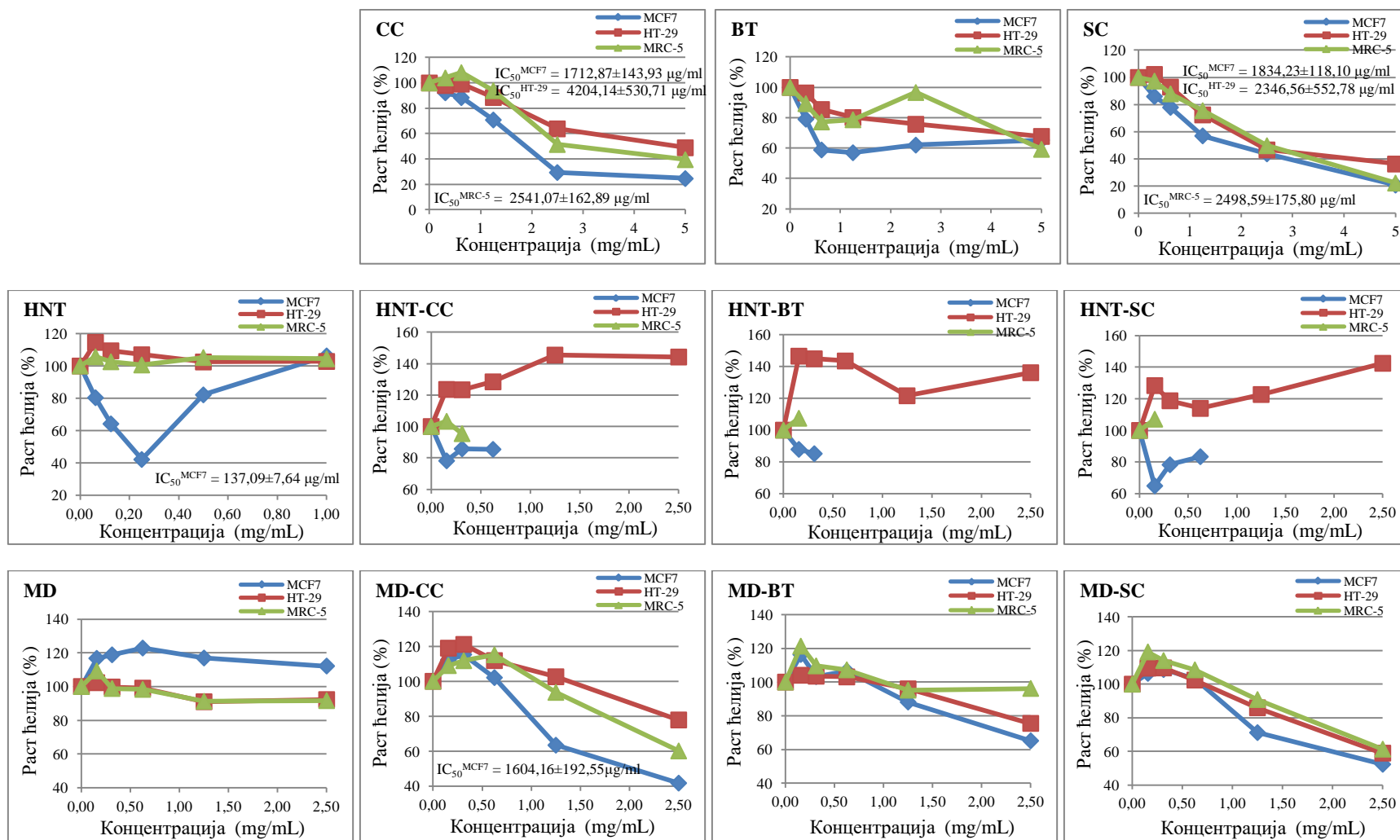
4204,14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (HT-29) и 2541,07 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (MRC-5). На истим ћелијским линијама за екстракт тропа вишње су одређене IC_{50} вредности од 1834,23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (MCF7), 2346,56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (HT-29) и 2498,59 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (MRC-5). За екстракт трњине нису достигнуте IC_{50} вредности у испитаном опсегу концентрација. Раст свих третираних типова ћелија је смањен на око 60% при третману највишом концентрацијом од 5 mg/mL . Резултати ове дисертације добијени за биолошке активности воћа родова *Prunus* и *Cornus*, описани у одељцима 4.1.2, 4.2.2 и 4.3.2 су такође показали антипролиферативну активност екстраката дрена, трњине и вишње према HT-29 ћелијама. Tiptiri-Kourpeti et al. (2019) су утврдили антипролиферативну активност сока дрена према ћелијским линијама HT-29, MCF7 и ћелијама хепатоцелуларног карцинома (Hep G2) и аденокарцинома колоне (Caco-2), као и карцинома колоне код мишева (CT26). За екстракт трњине је такође утврђена антитуморска и хепатотоксична активност на неколико ћелијских линија (Guimarães et al., 2014). У литератури нема података о испитивању антипролиферативне активности тропа вишње, али се наводи антипролиферативна активност фенолних једињења која су присутна у тропу (Yılmaz et al., 2019).

Сви инкапсулати екстраката воћа у **халојзиту** су показали стимулативан ефекат на раст HT-29 ћелија. У експериментима на MCF7 и MRC-5 ћелијама, при концентрацијама узорака $\geq 312,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ је дошло до интерференције узорака са SRB реагенсом, па тачан резултат и IC_{50} вредности нису могли да буду очитани. При нижим концентрацијама ($\leq 156,25 \mu\text{g}/\text{mL}$), раст MRC-5 ћелија је задржао ниво контроле, док је раст MCF7 ћелија био умањен за 20% приликом третмана инкапсулатима дрена и трњине, а за 40% приликом третмана инкапсулатом тропа вишње.

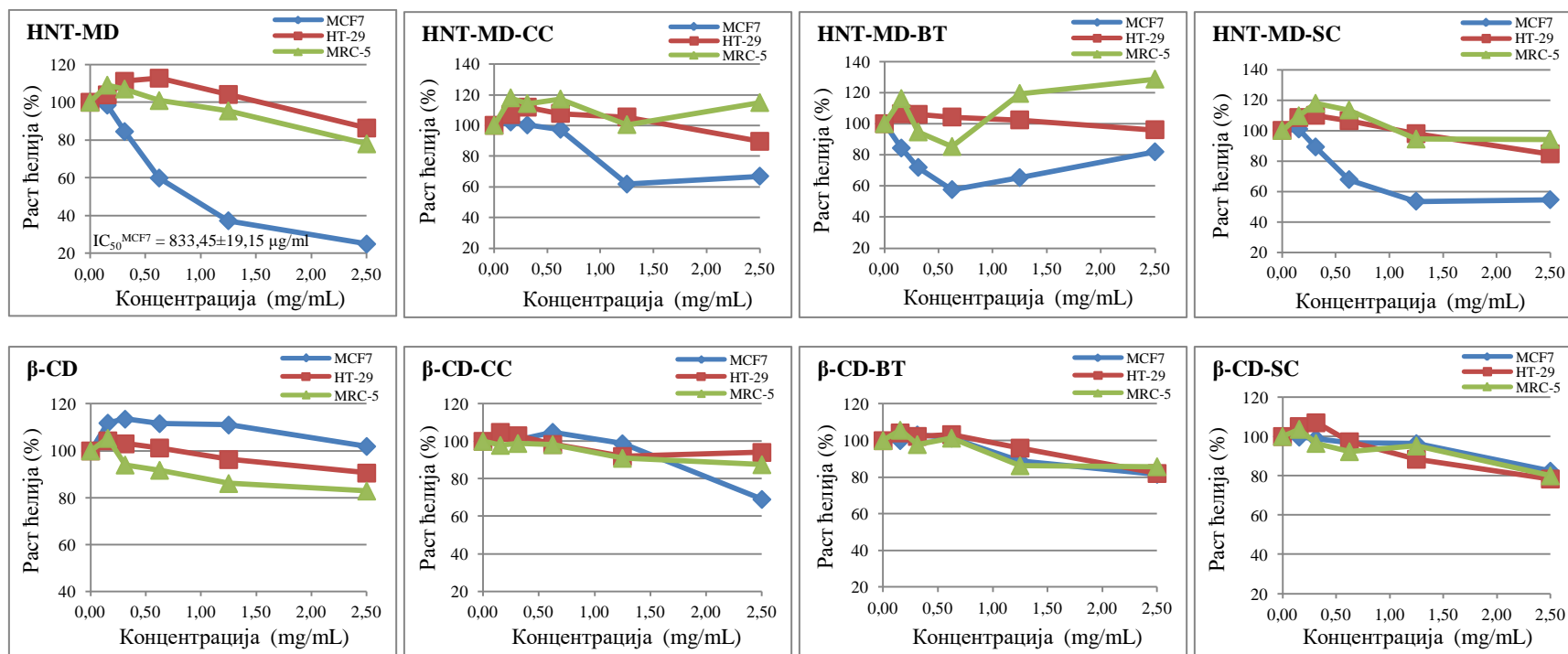
Нанотубе халојзита су се показале као одговарајући носач за антипролиферативну активност резвератрола, биоактивног фенолног једињења које је веома заступљено у грожђу. Антипролиферативна активност је испитана на MCF7 ћелијама и показало се да је инхибиција раста ћелија временски и дозно зависна (Vergaro et al., 2012).

Инкапсулати екстраката дрена и тропа вишње у **малтодекстрину** су показали дозно-зависну инхибицију раста свих ћелијских линија коришћених у експерименту. Једино је инкапсулат екстракта дрена постигао IC_{50} вредност од 1604,16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ према MCF7 ћелијама. При највишој тестираној концентрацији од 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ овај инкапсулат је смањео раст HT-29 ћелија на 80%, а MRC-5 ћелија на 60%. При истој концентрацији (2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) инкапсулат екстракта тропа вишње у малтодекстрину је инхибирао раст свих ћелијских линија за око 40% у односу на контролу. Оба ова инкапсулата у малтодекстрину су при ниским концентрацијама ($\leq 625 \mu\text{g}/\text{mL}$) испољили пролиферативни ефекат, односно раст ћелија је био већи од раста ћелија у контроли.

Инкапсулат трњине у малтодекстрину није показао никакву цитотоксичност према здравим MRC-5 ћелијама у испитаном опсегу концентрација. При најмањој концентрацији од 156,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ је поспешео раст MRC-5 ћелија за 20%, а при свим осталим концентрацијама је раст ових ћелија био приближно у нивоу контроле. Раст туморских ћелија је значајније био инхибиран тек при највећој тестираној концентрацији од



Слика 4.31. Утицаји екстракта воћа, носача и инкапсулата екстракта воћа на раст MCF7, HT-29 и MRC-5 ћелијских линија (Ознаке: CC – дрен, BT – трњина, SC – троп вишње, HNT – халојзит, MD – малтодекстрин, β -CD – β -циклодекстрин)



Слика 4.31. (наставка). Утицаји екстраката воћа, носача и инкапсулата екстраката воћа на раст MCF7, HT-29 и MRC-5 ћелијских линија (Ознаке: CC – дрен, BT – трњина, SC – троп вишње, HNT – халојзит, MD – малтодекстрин, β-CD – β-циклодекстрин)

2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Раст MCF7 ћелија је при овој концентрацији био смањен на 65,14%, а HT-29 ћелија на 75,46%.

Истраживачи Sousa et al. (2021) су на седам различитих хуманих туморских ћелијских линија, укључујући HT-29 и MCF7, испитали антипролиферативну активност чистог малтодекстрина (DE 10) и екстракта индијске јабуке инкапсулиране у овај носач. У распону концентрација од 0 до 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ које су тестиране (до десет пута ниже од концентрација тестираних у овој докторској дисертацији), вијабилност свих ћелија је била $\geq 70\%$. Корејски истраживачи (Yoo et al., 2018) су синтетизовали наночестице малтодекстрина коњугованог са цинамалдехидом, као носаче за хемотерапеутске антиканцерогене агенсе. Они су инкапсулирали антиканцерогени лек камптотетин и утврдили да инкапсулиран у овај носач показује већи антипролиферативни ефекат према ћелијама хуманог карцинома простате (DU145) и дебелог црева (SW620).

Инкапсулати екстракта дрена, трњине и тропа вишње припремљени са носачем **халојзит-малтодекстрином** на раст HT-29 ћелија готово да нису имали утицај различит од контроле. На MCF7 ћелијама испољен је инхибиторни утицај, али се ефекат разликовао у зависности од инкапсулираног воћног екстракта. Инкапсулат екстракта дрена је при нижим испитаним концентрацијама (156,25; 312,5 и 625 $\mu\text{g}/\text{mL}$) раст MCF7 ћелија одржао потпуно на нивоу контроле. При концентрацији од 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ раст је инхибиран на око 60% и тај ефекат је задржан и са дупло већом концентрацијом. Инкапсулати трњине и тропа вишње са халојзит-малтодекстрином су испољили антипролиферативни ефекат на MCF7 ћелије и при нижим концентрацијама, али није достигнута IC_{50} вредност већ је постигнут плато близу инхибиције од 50%. Сви инкапсулати са халојзит-малтодекстрином су деловали претежно стимулативно на раст MRC-5 ћелија.

Ниједан инкапсулат у **β -циклодекстрину** није испољио цитотоксичан ефекат. Максималан антипролиферативни ефекат инкапсулата на тестиране ћелије је био до 20%, са изузетком инкапсулата екстракта дрена у β -циклодекстрину, који је раст MCF7 ћелија инхибирао за 30% при третману највишом концентрацијом (2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

У истраживањима других аутора β -циклодекстрин се показао као одговарајући носач за побољшање антиканцерогеног дејства природних производа. Комплексирање карвакрола, активне компоненте из уља тимијана, поспешило је његову антипролиферативну активност према PC-3 ћелијама рака простате (Trindade et al., 2019), а комплексирање прополиса према различитим гастроинтестиналним туморским ћелијама (Catchpole et al., 2018).

4.5.5. Контролисано отпуштање једињења из инкапсулата

Системи за контролисано отпуштање се развијају како би се омогућило да се активна компонента дуже задржи у организму. Носачи би требало да спрече физиолошку деградацију и брзу елиминацију биоактивне компоненте из организма. Такође требало би да омогуће да се услед постепеног отпуштања биоактивне компоненте из инкапсулата дужи период испољава њено дејство, без потребе за додатним уношењем (Siegel & Rathbone, 2011).

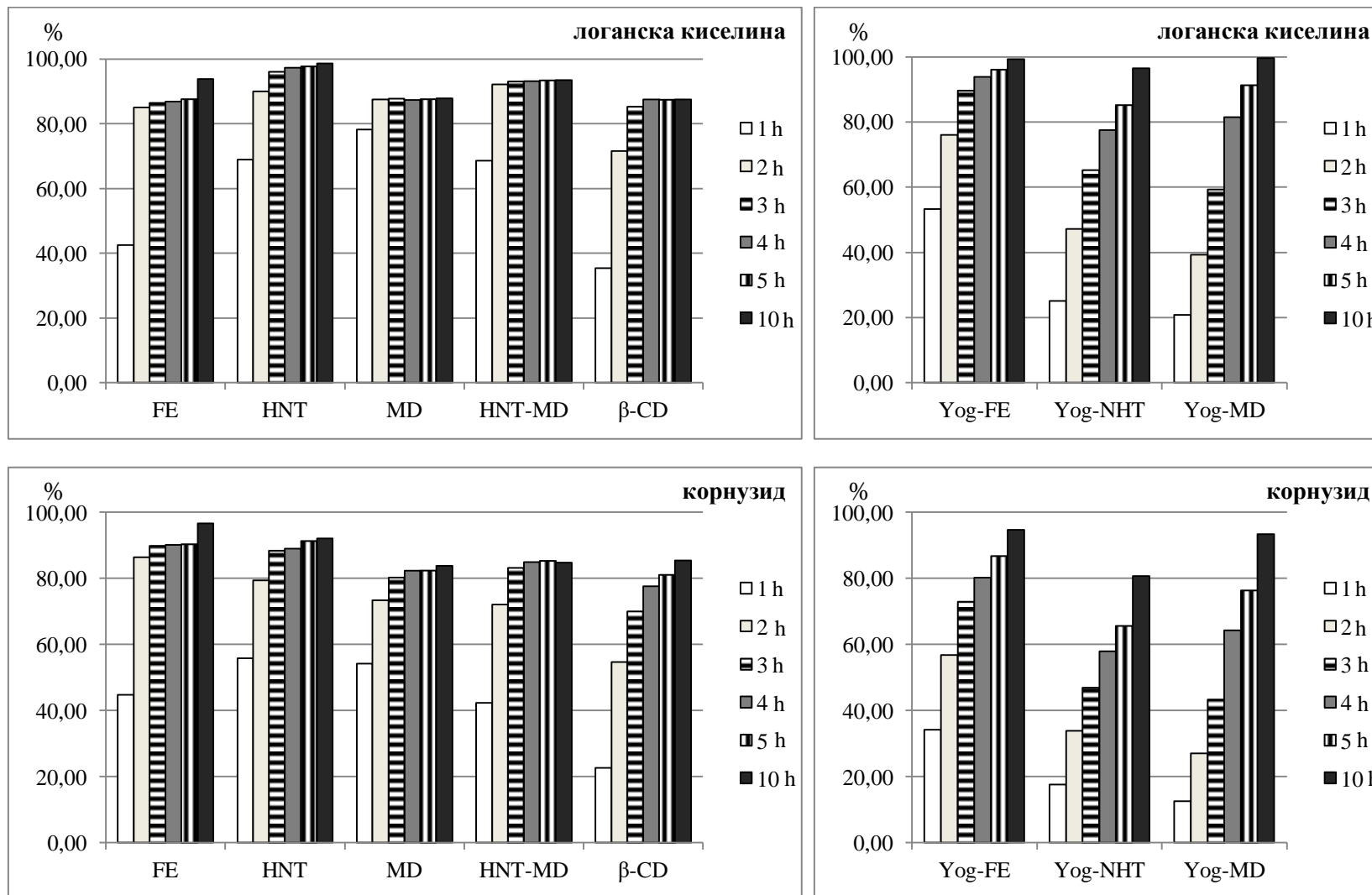
Због ниске концентрације појединих једињења у крајњем медијуму, нису могла сва једињења из инкапсулираних екстраката да буду праћена током ове анализе. Код инкапсулата екстракта дрена је праћено контролисано отпуштање доминантних иридоидних молекула – логанинске киселине и корнузида и доминантних антоцијана – цијанидин-3-*O*-галактозида и пеларгонидин-3-*O*-галактозида. Код инкапсулата екстракта трњине је праћено контролисано отпуштање цијанидин-3-*O*-глукозида, цијанидин-3-*O*-рутинозида, пеонидин-3-*O*-рутинозида и најдоминантнијег једињења у овом екстракту, неохлорогенске киселине, односно њеног деривата метил-3-*O*-кафеоилхината. Код инкапсулата екстракта тропа вишње су праћени доминантни антоцијани, цијанидин-3-*O*-(2'глукозил)рутинозид и цијанидин-3-*O*-рутинозид, флавоноли кверцетин-3-*O*-рутинозид и изорамнетин-3-*O*-рутинозид и деривати фенолних киселина – 3-*O*-кафеоилхинске, 5-*O*-кафеоилхинске и 3-*O*-*p*-кумароилхинске, односно њихови метил-естри.

Контролисано отпуштање једињења је мерено током 10 h и изражено је као проценат отпуштеног једињења из инкапсулата у односу на укупну количину тог једињења у инкапсулату. Максимална количина једињења у инкапсулату је одређена након екстракције за укупна биоактивна једињења, која је описана код спектрофотометријског одређивања ефикасности инкапсулације.

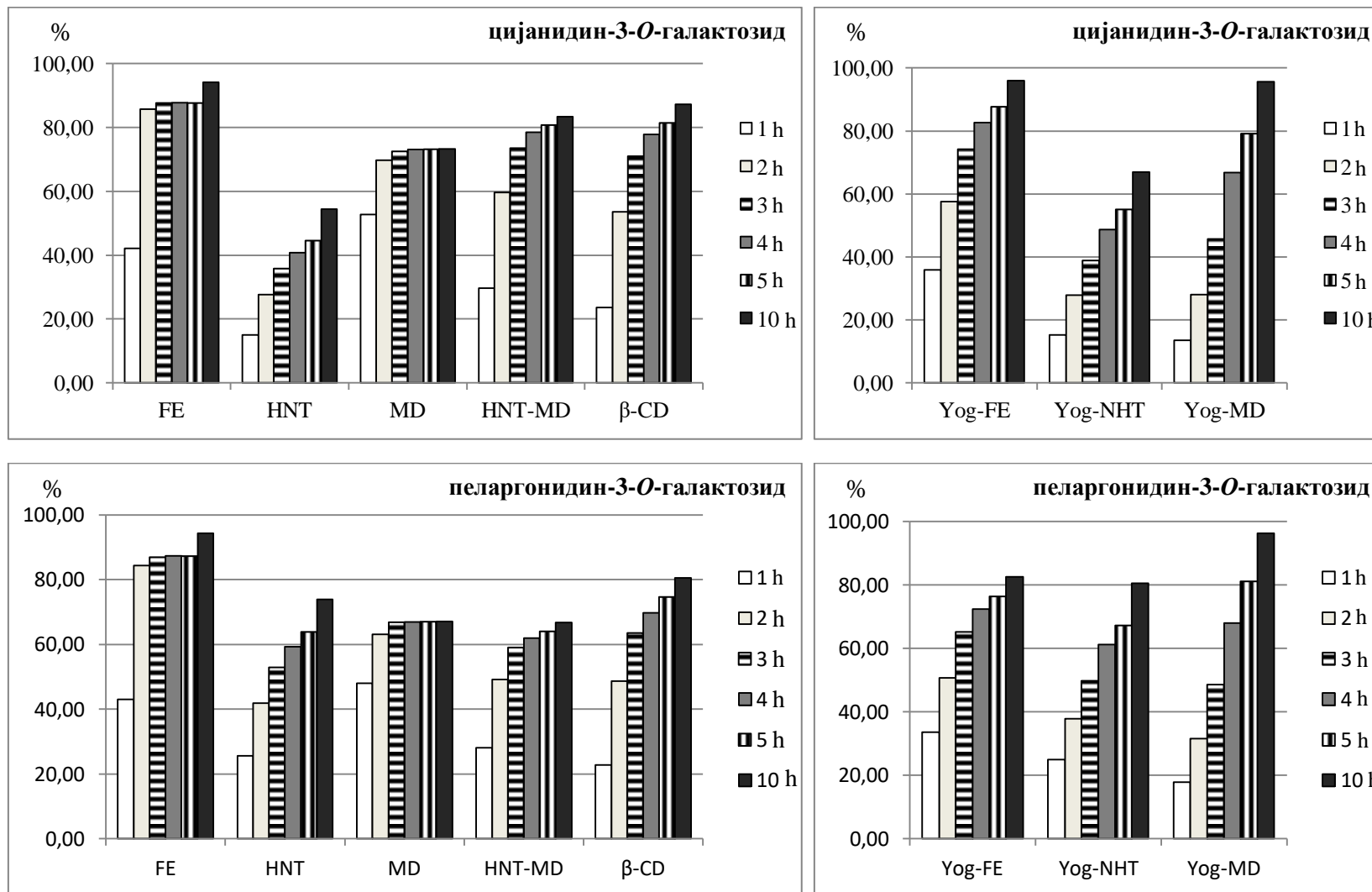
Процент отпуштених једињења из припремљених инкапсулата у халојзиту, малтодекстрину, халојзит-малтодекстрину и β -циклодекстрину је приказан на хистограмима на сликама 4.32 (инкапсулати екстракта дрена), 4.33 (инкапсулати екстракта трњине) и 4.34 (инкапсулати екстракта тропа вишње). Инкапсулати екстракта дрена и екстракта трњине у халојзиту и малтодекстрину су додати у јогурт у циљу добијања обогаћеног прехранбеног производа, односно функционалне хране. Након лиофилизације обогаћених јогурта је из добијених лиофилизата праћено контролисано отпуштање једињења. Контролисано отпуштање једињења је за сваки узорак праћено током 10 h.

Контролисано отпуштање биоактивних једињења дрена из одговарајућих инкапсулата

На основу резултата за логанску киселину и корнузид се види да инкапсулације у халојзиту, малтодекстрину и халојзит-малтодекстрину нису утицале на отпуштање ових иридоидних једињења. Логанска киселина и корнузид се из наведених носача, као и из екстракта у потпуности ослободе за 2 h. Инкапсулација у β -циклодекстрину је пролонгирала отпуштање ових једињења за још 1 h. Обогаћивање јогурта екстрактом и



Слика 4.32. Контролисано отпуштање биоактивних једињења дрена из инкапсулата и обогаћеног јогурта
 Ознаке: FE – екстракт воћа, HNT – халојзит, MD – малтодекстрин, HNT-MD – халојзит-малтодекстрин, β -CD – β -циклодекстрин, Yog – јогурт



Слика 4.32 (наставак). Контролисано отпуштање биоактивних једињења дрена из инкапсулата и обогаћеног јогурта
 Ознаке: FE – екстракт воћа, HNT – халојзит, MD – малтодекстрин, HNT-MD – халојзит-малтодекстрин, β -CD – β -циклодекстрин, Yog – јогурт

инкапсулатима дрена је резултирало знатно дужим и постепенијим ослобађањем логанске киселине и корнузида током првих 5 h.

На контролисано отпуштање антоцијана дрена највећи утицај има инкапсулација у халојзиту. Током првих 5 h се антоцијани постепеније отпуштају, али је приметно да се ни цијанидин-3-*O*-галактозид, ни пеларгонидин-3-*O*-галактозид не отпусте у потпуности из овог носача. С обзиром да су антоцијани позитивно наелектрисана једињења, а да је спољашња површина халојзита негативно наелектрисана, вероватно долази до електростатичког привлачења и да се антоцијани тако везују за нанотубе. Јаке електростатичке силе су вероватно и разлог због којег се антоцијани не ослободе у потпуности из овог носача.

Инкапсулација у малтодекстрину није имала никакав утицај, али су комбинација носача халојзита и малтодекстрина и β -циклодекстрин омогућили постепено отпуштање антоцијана током прва 3 h. Обогаћивањем јогурта је, као што је то случај и са иридоидима, постигнуто постепено и продужено отпуштање антоцијана из екстракта и инкапсулата дрена.

Контролисано отпуштање биоактивних једињења трњине из одговарајућих инкапсулата

За антоцијане из екстракта трњине, цијанидин-3-*O*-глукозид, цијанидин-3-*O*-рутинозид и пеонидин-3-*O*-рутинозид, су се као најбољи носачи показали халојзит и β -циклодекстрин. Из ових носача се антоцијани постепено отпуштају током 5 h (халојзит), односно током 4 h (β -циклодекстрин). Приметно је да се из инкапсулата у β -циклодекстрину отпусти готово сав садржај једињења (скоро 100%), док код инкапсулата у халојзиту део антоцијана остаје везан за носач, односно у медијум се ослободи око 80% од укупног садржаја једињења. Антоцијани трњине се, као и антоцијани дрена, вероватно везују за спољашњу негативно наелектрисану површину нанотуба халојзита и то резултује споријим отпуштањем из инкапсулата.

За разлику од антоцијана, халојзит није допринео споријем отпуштању метил-3-*O*-кафеоилхината. Овај дериват кафене киселине се једино током првог сата спорије ослободио из свих испитиваних инкапсулата, али је ослобођен садржај већ у другом сату достигао максимум. Једино је инкапсулација у β -циклодекстрину допринела да се метил-3-*O*-кафеоилхинат постепено отпусти током прва 3 h.

Обогаћивање јогурта и екстрактом и инкапсулатима екстракта трњине је допринело споријем и постепеном отпуштању свих фенолних једињења. Иако се из сувог екстракта већ у првом сату ослободило скоро 80% садржаја свих једињења, након додатка екстракта у јогурт се отпуштање одвијало спорије и из сата у сата је ослобађано око 20% појединачних једињења. Врло слични профили контролисаног отпуштања су забележени за јогурт обогаћен инкапсулатима у халојзиту и малтодекстрину.

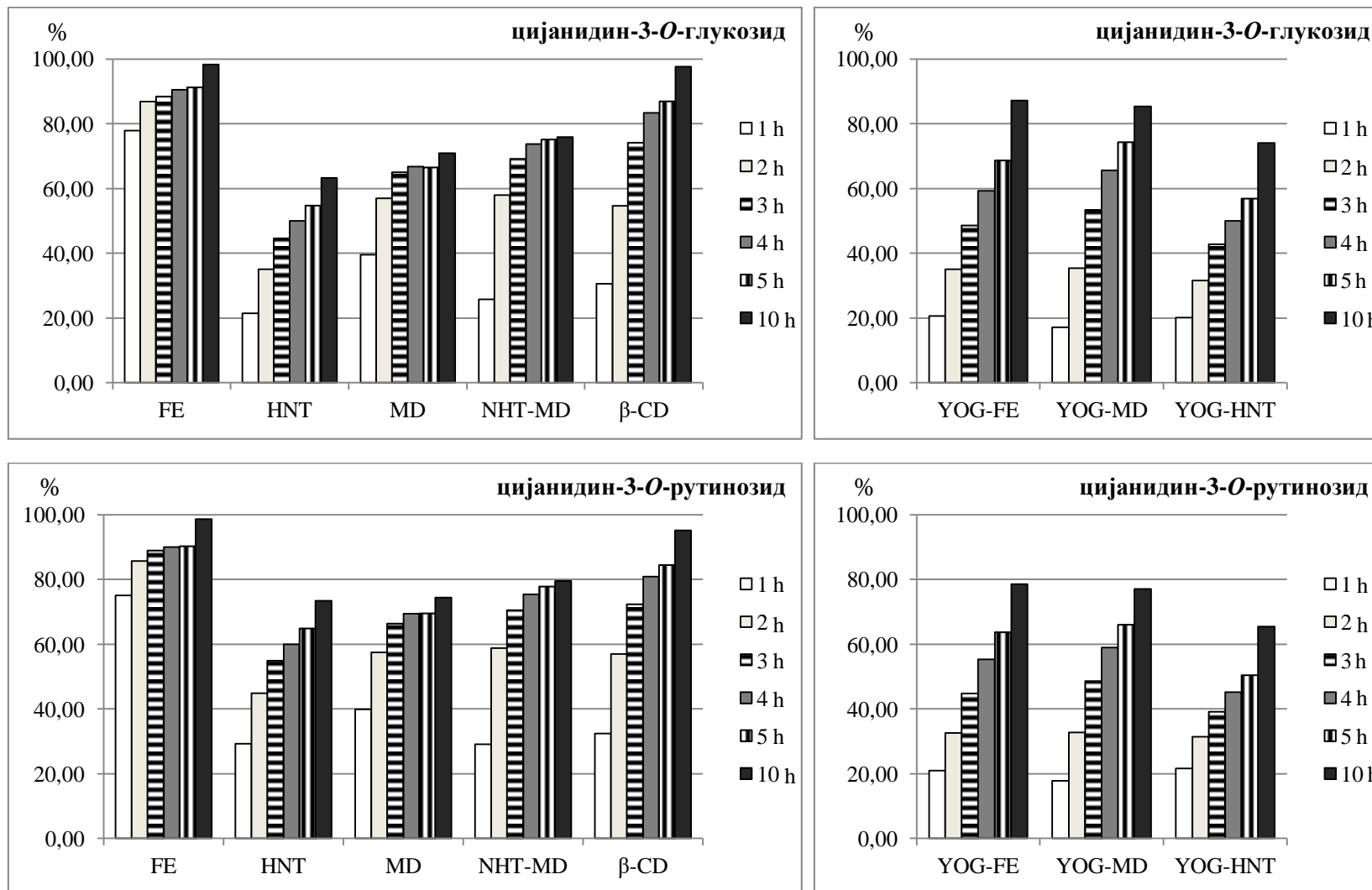
Истраживања су показала да су протеини из јогурта (протеини сурутке и казеини) погодни носачи за инкапсулацију антоцијана и других фенолних једињења из воћних екстракта (Norkaew et al., 2019; Ouyang et al., 2020). Друга истраживања су потврдила да протеини, у зависности од свог наелектрисања, могу да улазе у унутрашњу шупљину, или

да обавијају нанотубе халојзита (Lvov et al., 2014). Такође су испитиване и различите комбинације умрежавања малтодекстрина са протеином сурутке и казеином у сврху добијања емулзификационих агенаса (Akhtar & Dickinson, 2007; Shepherd et al., 2000), али и у инкапсулационе намене (Bae & Lee, 2008). Резултати поменутих аутора и нашег истраживања сугеришу на додатна истраживања у овој области како би се детаљније испитали и унапредили механизми везивања и отпуштања активних компоненти из носача.

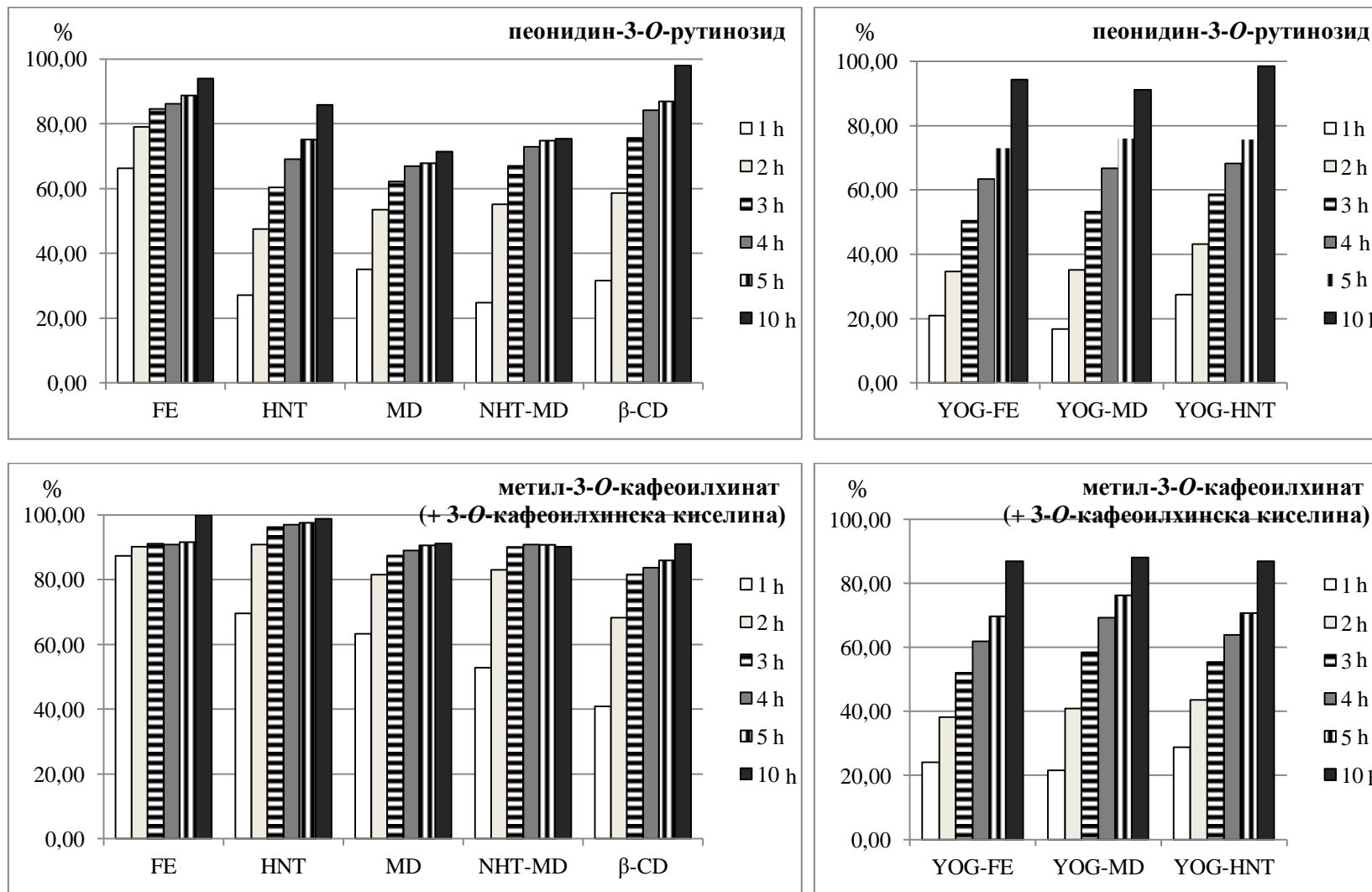
Контролисано отпуштање биоактивних једињења тропа вишње из одговарајућих инкапсулата

Профили контролисаног отпуштања антоцијана екстракта тропа вишње (цијанидин-3-*O*-(2'глукозил)рутинозид и цијанидин-3-*O*-рутинозид) из свих анализираних инкапсулата су били слични профилима антоцијана екстрахованих из дрена и трњине. Такође се уочава веома сличан начин отпуштања флавонолних гликозида кверцетин-3-*O*-рутинозида и изорамнетин-3-*O*-рутинозида. Као најбољи носач за контролисано отпуштање ових једињења се издваја халојзит, али је и са осталим носачима постигнуто успорено, односно постепено отпуштање током прва три часа. Сва наведена једињења се из сувог екстракта врло брзо отпуштају у воденој средини. Већ у првом сату је отпуштено преко 70% од укупног садржаја ових једињења.

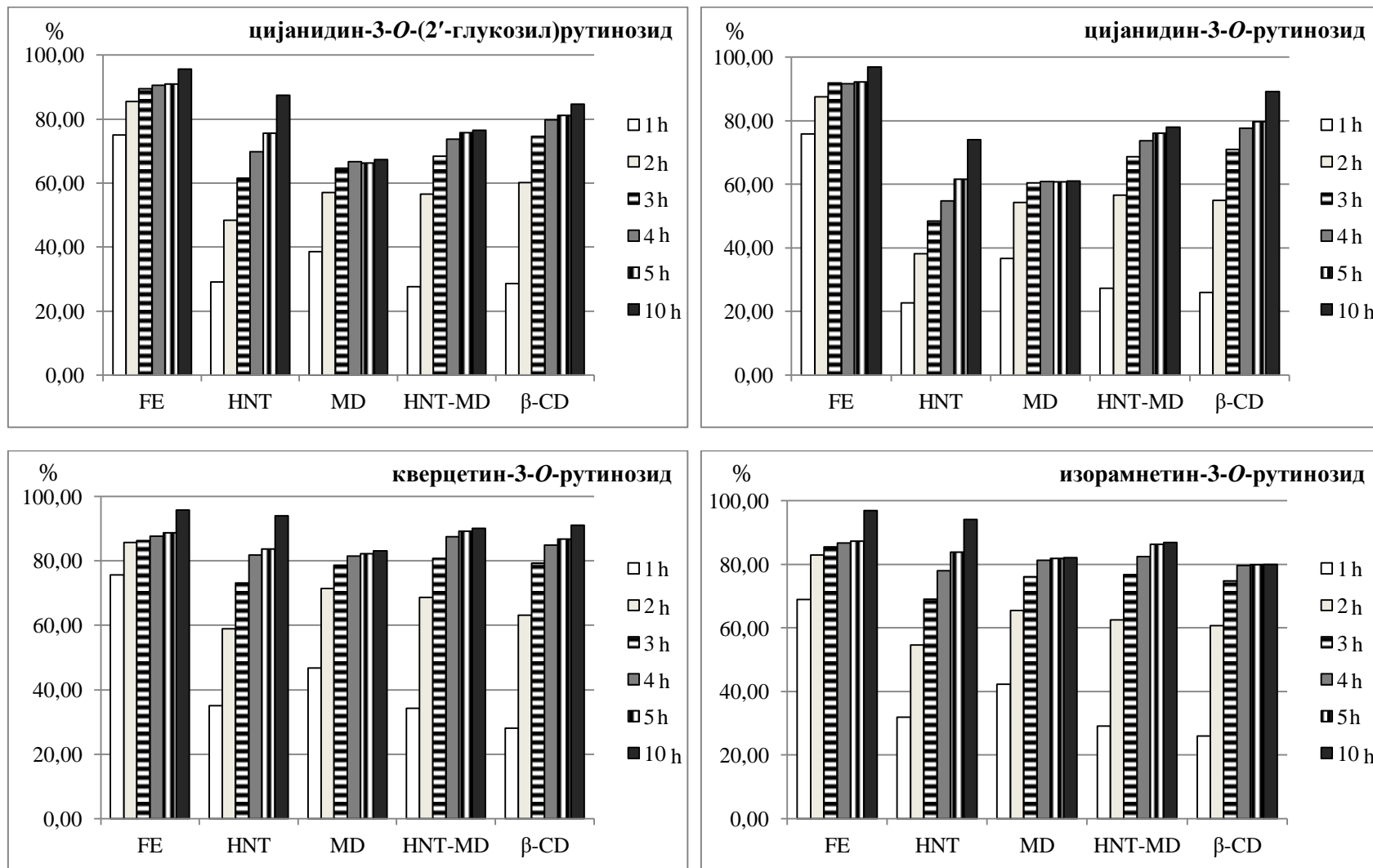
Деривати фенолних киселина, метил естри 3-*O*-кафеоилхинске, 5-*O*-кафеоилхинске и 3-*O*-*p*-кумароилхинске се као и претходно поменути антоцијани и флавонолни гликозиди, због своје добре растворљивости у воденој средини, већ у првом сату у потпуности ослободе из сувог екстракта. Као најбољи носачи за деривате фенолних киселина из тропа вишње показали су се β -циклодекстрин, а затим халојзит, из којих се ова једињења ослобађају постепено током прва 3 h.



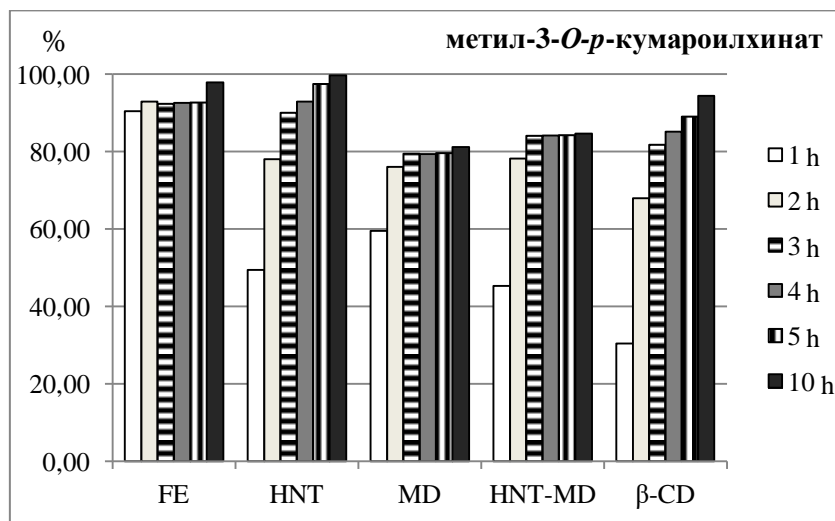
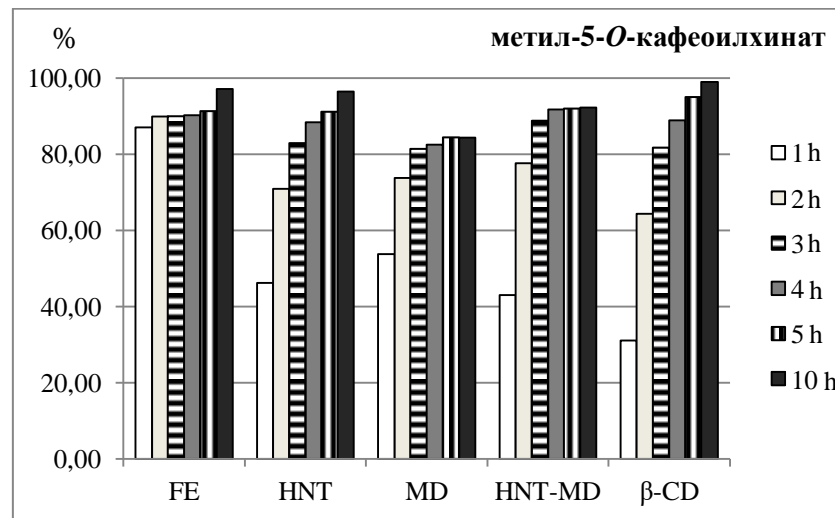
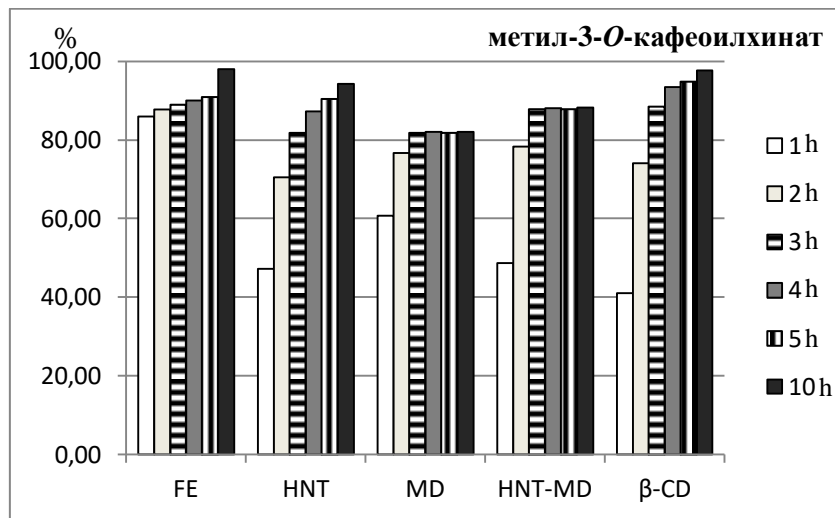
Слика 4.33. Контролисано отпуштање биоактивних једињења трњине из инкапсулата и обогаћеног јогурта
 Ознаке: FE – екстракт воћа, HNT – халојзит, MD – малтодекстрин, NHT-MD – халојзит-малтодекстрин, β-CD – β-циклодекстрин, Yog – јогурт



Слика 4.33 (наставак). Контролисано отпуштање биоактивних једињења трњине из инкапсулата и обогаћеног јогурта
 Ознаке: FE – екстракт воћа, HNT – халојзит, MD – малтодекстрин, NHT-MD – халојзит-малтодекстрин, β-CD – β-циклодекстрин, Yog – јогурт



Слика 4.34. Контролисано отпуштање биоактивних једињења тропа вишње из инкапсулата
 Ознаке: FE – екстракт воћа, HNT – халојзит, MD – малтодекстрин, HNT-MD – халојзит-малтодекстрин, β-CD – β-циклодекстрин



Слика 4.34 (наставак). Контролисано отпуштање биоактивних једињења тропа вишње из инкапсулата
 Ознаке: FE – екстракт воћа, HNT – халојзит, MD – малтодекстрин, HNT-MD – халојзит-малтодекстрин, β-CD – β-циклодекстрин



5. Закључак

Плодови воћа су богат извор секундарних биомолекула који имају утицај на очување доброг здравља и лечење болести код људи. У оквиру ове дисертације је урађена фитохемијска карактеризација плодова воћа различитих врста родова *Prunus* L. и *Cornus* L. и испитан је њихов биолошки потенцијал.

На основу анализе фенолног профила плодова воћа 15 различитих врста рода *Prunus*, изведени су следећи закључци:

- ❖ У врстама рода *Prunus* од фенолних структура доминирају једињења из група фенолних киселина, флавонола и антоцијана;
- ❖ Најбогатији фенолним једињењима су плодови магриве, степске вишње и трњине;
- ❖ У зависности од воћне врсте, доминантна фенолна једињења су фенолне киселине или антоцијани;
- ❖ Од фенолних киселина су идентификоване хидроксициметне киселине, а најзаступљенији су деривати кафеене, кумаринске и једино код степске вишње, гликозиди ферулне киселине;
- ❖ Од флавонолних једињења су идентификовани гликозиди кверцетина, кемферола и изорамнетина, а једино фенолно једињење које је забележено код свих врста је кверцетин-3-*O*-рутинозид;
- ❖ Међу идентификованим антоцијанима доминирају гликозиди цијанидина и пеонидина;
- ❖ У плодовима шљиве, влашкаче, тургуње и белошљиве су најзаступљенији били 3-*O*-кафеоилхинска киселина и метил-3-*O*-кафеоилхинат, а од флавоноидних једињења кверцетин-3-*O*-рутинозид;
- ❖ Плодови црвенолисног, црвеног и белог ринглова су имали знатно нижи садржај фенолних једињења у поређењу са осталим испитиваним врстама. Најдоминантнија једињења у плодовима ринглова су били кверцетин-3-*O*-рутинозид и кверцетин-пентозид;
- ❖ Бресква и кајсија, су као и анализирани ринглови, садржале ниске количине фенолних једињења. У узорку брескве су у највећем садржају били присутни 3-*O*-кафеоилхинска киселина и 5-*O*-кафеоилхинска киселина, а у узорку кајсије кверцетин-3-*O*-рутинозид;
- ❖ Гајена и дивља трешња су се одликовале високим садржајем метил-3-*O*-кафеоилхината и цијанидин-3-*O*-рутинозида.
- ❖ Код вишње и степске вишње од фенолних киселина је доминантно присуство метил-5-*O*-кафеоилхината, а степска вишња се одликује и високим садржајем деривата ферулне киселине. Од флавонолних једињења су најзаступљенији били кверцетин-3-*O*-рутинозида и изорамнетин-3-*O*-рутинозид. Једино у овим врстама и у веома високом садржају је одређен цијанидин-3-*O*-(2'-глукозил)рутинозид, а у високом уделу је заступљен и цијанидин-3-*O*-рутинозид;
- ❖ Магриву карактерише присуство високе количине хексозида *m*-кумаринске киселине. Од флавонолних деривата су најзаступљенији кверцетин-3-*O*-

дирамнозил-хексоид, кверцетин-3-*O*-рутиноид и кверцетин-3-*O*-глукоид. Од антоцијана у високом садржају су одређени цијанидин-3-*O*-глукоид, цијанидин-3-*O*-рутиноид и цијанидин-3-*O*-(2'-ксилозил)рутиноид.

- ❖ Трњина је од свих испитиваних врста рода *Prunus* садржала највеће количине метил-3-*O*-кафеоилхината, а карактерисали су ју је и високи садржаји антоцијана цијанидин-3-*O*-рутинозида, цијанидин-3-*O*-глукозида и пеонидин-3-*O*-рутинозида.

У оквиру испитивања биолошког потенцијала су одређени антиоксидантни капацитет, антипролиферативна активност према ћелијама карцинома дебелог црева (НТ-29 ћелије), способност инхибиције α -амилазе и α -глукозидазе и способност инхибиције ензима дипептидил-пептидазе III (DPP III).

На основу резултата биолошких активности анализираних врста рода *Prunus* могу да се изведу следећи закључци:

- ❖ према укупном антиоксидантном капацитету се истичу степска вишња, трњина, дивља трешња, магрива и облачинска вишња;
- ❖ најбољу антипролиферативну активност према НТ-29 ћелијама су испољили степска вишња, трњина, кајсија, црвени ринглов и облачинска вишња;
- ❖ најбољу способност инхибиције α -амилазе и α -глукозидазе су испољиле трњина и степска вишња, а ово воће је показало и најбољу способност инхибиције DPP III ензима.

Кластер анализом која је спроведена на основу фенолног профила и РСА анализом која је изведена на основу фенолног профила и биолошких активности су се груписале међусобно сличне врсте. Издвојиле су се врсте са највишим садржајем фенолних једињења, а то су уједно биле и врсте са највећим биолошким потенцијалом: степска вишња, трњина, магрива, дивља трешња и облачинска вишња.

Анализом плодова 15 различитих генотипова трњине (*Prunus spinosa* L.) је утврђен исти фенолни профил код свих узорака. Најдоминантнија фенолна једињења су 3-*O*-кафеоилхинска киселина (неохлорогенска) и њен естар метил-3-*O*-кафеоилхинат, затим цијанидин-3-*O*-рутиноид и цијанидин-3-*O*-глукоид. Сви генотипови трњине су испољили антиоксидантни капацитет, антипролиферативну активност према НТ-29 ћелијама и способност инхибиције α -амилазе и α -глукозидазе. Само један од испитиваних генотипова није испољио способност инхибиције DPP III.

РСА анализа фенолног профила и биолошких активности генотипова трњине је показала да су антоцијани (цијанидин-3-*O*-глукоид, пеонидин-3-*O*-глукоид, пеонидин-3-*O*-рутиноид) и деривати кверцетина (кверцетин-3-*O*-глукоид и кверцетин-3-*O*-рутиноид) дали највећи допринос антиоксидантном капацитету, антипролиферативној активности према НТ-29 ћелијама и способностима инхибиције α -амилазе и DPP III. Управо ови параметри су издвојили генотипове трњине са највећим садржајем фенолних једињења и највећим биолошким потенцијалом.

Фитохемијском карактеризацијом плодова 7 различитих генотипова дрена (*Cornus mas* L.) су утврђени исти фенолни и иридоидни профили код свих анализираних сорти и селекција. Најдоминантнија једињења у свим узорцима су од иридоидних структура били логанска киселина и корнузид, а од фенолних антоцијани цијанидин-3-*O*-галактозид и пеларгонидин-3-*O*-галактозид. Сви генотипови дрена су испољили антиоксидантни капацитет, антипролиферативну активност према НТ-29 ћелијама и способност инхибиције α -амилазе и α -глукозидазе. Само селекција *Apatinski rani* није испољила способност инхибиције DPP III. Сорта *Svetlyachock* се издвојила по највећем садржају фенолних и иридоидних једињења и по најбољем биолошком потенцијалиу, на основу свих испитиваних биолошких активности.

РСА анализа је издвојила иридоидна једињења по способности инхибиције ензима DPP III и α -амилазе, као и по капацитету неутрализације слободног DPPH радикала. Елагинска киселина је имала највећи допринос антипролиферативној активности према НТ-29 ћелијама, а пеларгонидин-3-*O*-галактозид и пеларгонидин-3-*O*-робинобиозид су дали највећи допринос способности инхибиције α -глукозидазе.

Постоје индикације да би квалитативна и квантитативна заступљеност појединих фенолних и иридоидних једињења могла да се користи у хемотаксономске сврхе за идентификацију и класификацију врста родова *Prunus* и *Cornus*, али би за тачно утврђивање ових једињења требало да се ураде додатна истраживања којима би се испитао већи број сорти и генотипова у оквиру сваке врсте.

Резултати фитохемијске карактеризације и биолошких активности воћа родова *Prunus* и *Cornus* потврђују почетну хипотезу да фитохемијски састав плодова воћа узрокује њихов биоактивни потенцијал. Иако су утврђене статистички значајне позитивне корелације између појединих фенолних и иридоидних једињења и одређених биолошких активности, може да се закључи да је биоактивност последица синергистичког деловања више различитих структура.

Анализом молекуларног докинга фенолних и иридоидних једињења из испитиваног воћа за ензиме α -амилазу, α -глукозидазу и DPP III ензим су се флавоноидне структуре са већим бројем везаних шећерних јединица издвојиле као потентнији инхибитори сва три ензима. Међу фенолним једињењима одређеним у воћу рода *Prunus* највећи афинитет везивања за α -амилазу је имао антоцијан цијанидин-3-*O*-рутинозид, којим су најбогатије биле дивља трешња и магрива. Највећи афинитет везивања за α -глукозидазу је одређен за цијанидин-3-*O*-(2'-ксилозил)рутинозид, антоцијан чији је садржај био највећи у магриви. Кверцетин-3-*O*-рутинозид, флавонолни гликозид који је одређен код свих анализираних врста рода *Prunus*, се такође истакао као потентни инхибитор α -глукозидазе, а од свих анализираних једињења је имао највећи афинитет везивања за DPP III. Од фенолних и иридоидних једињења дрена, највећи афинитет везивања за сва три ензима је израчунат за пеларгонидин-3-*O*-робинобиозид. Ове фенолне структуре могу да послуже као полазна

једињења у рационалном дизајну лекова. Посебну примену могу да имају у дизајну лекова за тип 2 дијабетеса, с обзиром на улогу α -амилазе и α -глукозидазе у метаболизму шећера.

У овој дисертацији су нанотубе халојзита први пут употребљене као носачи воћних екстраката. Нанотубе халојзита, малтодекстрин, халојзит-малтодекстрински композит и β -циклодекстрин су се показали као одговарајући носачи за инкапсулацију екстраката дрена, трњине и тропа вишње. Инкапсулацијом у ове носаче је постигнуто контролисано, односно дуготрајније отпуштање биоактивних једињења. Обогаћивањем јогурта инкапсулатима у халојзиту и малтодекстрину је постигнуто још дуже време отпуштања биоактивних конституената.

Екстракти инкапсулираног воћа у β -циклодекстрину су изазвали умерену, дозно-зависну инхибицију раста хуманих туморских и не-туморских ћелија, односно аденокарцинома дојке (MCF7), аденокарцинома дебелог црева (HT-29) и феталних фибробласта плућа (MRC-5) у испитаном опсегу концентрација.

У зависности од концентрације поједини инкапсулати су *in vitro* деловали пролиферативно или антипролиферативно на раст хуманих ћелијских линија. Даља истраживања о биодоступности инкапсулираних екстраката *in vivo* би могла да допринесу одабиру инкапсулата са оптималним карактеристикама.

Резултати указују на могућу примену испитиваних инкапсулата у обогаћивању прехранбених производа и производњи функционалне хране и отварају могућности за додатна истраживања нових и/или модификованих носача којима би се омогућило дуже време ослобађања активних супстанци и циљана достава биоактивних једињења одговарајућим ћелијама.



6. Summary

Fruits are rich source of secondary biomolecules with beneficial effects on human health. Within this thesis phytochemical characterisation of fruits from different species of *Prunus* L. and *Cornus* L. genera and their biological potential were assessed.

Based on determined phenolic profiles of 15 different species of *Prunus* genus following conclusions were made:

- ❖ Among *Prunus* species the most dominant phenolic compounds are phenolic acids, flavonols and anthocyanins classes;
- ❖ The fruits richest in the phenolic compounds are mahaleb cherry, steppe cherry and blackthorn;
- ❖ Depending on fruit species, the most dominant compounds are phenolic acids or anthocyanins;
- ❖ Among phenolic acids hydroxycinnamic acids, especially derivatives of caffeic acid, and coumaric acid were dominant and only in steppe cherry samples, ferulic acid glycosides were identified as well;
- ❖ Among flavonol compounds quercetin-, kaempferol-, and isorhamnetin- glycosides were present. All the samples quercetin 3-*O*-rutinoside;
- ❖ Among identified anthocyanins, the most dominant were glycosides of cyanidin and peonidin;
- ❖ In fruits of plum, vlaškača, damson plum, and white damson 3-*O*-caffeoylquinic acid, methyl 3-*O*-caffeoylquinic acid, and quercetin 3-*O*-rutinoside were dominant compounds;
- ❖ Fruits of purple-leaf, red, and white cherry plum had significantly lower quantities of phenolic compounds compared with other fruits. The most dominant phenolic compounds in cherry plums were quercetin 3-*O*-rutinoside and quercetin pentoside;
- ❖ Peach and apricot, as the investigated cherry plums, had low quantities of phenolic compounds. The most dominant compounds in peach were 3-*O*-caffeoylquinic acid and 5-*O*-caffeoylquinic acid, while in apricot it was quercetin 3-*O*-rutinoside;
- ❖ Sweet cherry and wild cherry were abundant with methyl 3-*O*-caffeoylquinic acid and cyanidin 3-*O*-rutinoside;
- ❖ In sour cherry and steppe cherry methyl 5-*O*-caffeoylquinic acid was the most abundant hydroxycinnamic derivative. Steppe cherry was characterised by the presence of ferulic acid derivatives. Among flavonols, in sour and steppe cherry the most abundant were quercetin 3-*O*-rutinoside and isorhamnetin 3-*O*-rutinoside. Only in these species were detected high amounts of cyanidin 3-*O*-(2'-glucosyl)rutinoside. Very high amounts of cyanidin 3-*O*-rutinoside were detected, as well;
- ❖ Mahaleb cherry was characterised with high amounts of *m*-coumaric acid hexoside. Among flavonols, there were high amounts of quercetin dirhamnosyl hexoside, quercetin 3-*O*-rutinoside, and quercetin 3-*O*-glucoside. Among anthocyanins, high amounts of cyanidin 3-*O*-glucoside, cyanidin 3-*O*-rutinoside, cyanidin 3-*O*-(2'-xylosyl)rutinoside were present;

- ❖ Blackthorn had the highest content of methyl 3-*O*-caffeoylquinic acid, compared with all examined *Prunus* species. Blackthorn was characterised with high amounts of cyanidin 3-*O*-rutinoside, cyanidin 3-*O*-glucoside, and peonidin 3-*O*-rutinoside.

The assessment of biological potential included the determination of antioxidant capacity, antiproliferative activity on HT-29 cell line (colon adenocarcinoma), and α -amylase, α -glucosidase, and dipeptidyl peptidase III (DPP III) inhibitory activities.

Based on results of biological activities of examined *Prunus* species there could be given next conclusions:

- ❖ Fruits with highest total antioxidant capacity were steppe cherry, blackthorn, wild cherry, mahaleb cherry and sour cherry;
- ❖ The highest antiproliferative effect on HT-29 cells had steppe cherry, blackthorn, bapricot, red cherry plum, and sour cherry;
- ❖ The best inhibitory activity of α -amylase, α -glucosidase, and DPP III enzymes showed blackthorn and steppe cherry.

Cluster analysis performed on the results of phenolic profiles of *Prunus* species and principal component analysis (PCA) performed on the results of phenolic profile and biological activities, showed that genetically similar species tend to group together. Species with the highest phenolic content, outstands in the assays on biological potential in following order: steppe cherry > blackthorn > mahaleb cherry > wild cherry > sour cherry.

Further analysis on fruits of 15 different genotypes of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) showed very similar qualitative phenolic profiles for all examined samples. The most dominant compounds were 3-*O*-caffeoylquinic acid (neochlorogenic acid) and its methyl ester, followed in content by cyanidin 3-*O*-rutinoside and cyanidin 3-*O*-glucoside. All examined genotypes showed high antioxidant capacity, antiproliferative activity on HT-29 cell line, and α -amylase and α -glucosidase inhibitory potential. Only one sample did not express inhibitory activity towards DPP III enzyme.

PCA analysis of phenolic profile and biological potential of blackthorn genotypes revealed that anthocyanins (cyanidin 3-*O*-glucoside, peonidin 3-*O*-glucoside, and peonidin 3-*O*-rutinoside) and quercetin derivatives (quercetin 3-*O*-glucoside and quercetin 3-*O*-rutinoside) contributed the most to the antioxidant and antiproliferative activities and to α -glucosidase and DPP III inhibitory potential. Blackthorn genotypes with the highest total phenolic content expressed the highest biological potential.

Phytochemical characterisation of 7 different genotypes of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) fruits showed the same qualitative phenolic and iridoid profile in all tested cultivars and selections. The most dominant iridoid compounds were loganic acid and cornuside, and cyanidin 3-*O*-galactoside and pelargonidin 3-*O*-galactoside among phenolic compounds.

All genotypes expressed significant antioxidant capacity, antiproliferative activity on HT-29 cells and α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities. Only selection *Apatinski rani* did not express inhibitory potential towards DPP III enzyme. Based on all given assays, cultivar *Svetlyachock*, with the highest content of phenolic compounds, showed the highest biological potential.

PCA analysis pointed out that the iridoids showed significant inhibitory effect on DPP III and α -amylase enzymes, and significant DPPH scavenging activity; ellagic acid gave the highest contribution to the antiproliferative activity, while pelargonidin 3-*O*-galactoside and pelargonidin 3-*O*-robinobioside gave the highest contribution to α -glucosidase inhibitory activity.

There are clues that qualitative and quantitative patterns of certain phenolic and iridoid compounds could be used for chemotaxonomic purposes, for identification and classification of *Prunus* and *Cornus* species, but further investigations are needed on larger number of cultivars and genotypes within each species.

The results obtained for phytochemical characterisation and biological activities of fruits of *Prunus* and *Cornus* genera confirm the hypothesis that phytochemicals present in fruits contribute their bioactivity to a large extent. Based on obtained results, there were positive correlations between specific phenolic and iridoid compounds and certain biological activities, but in general, synergistic effects of variety of phytochemicals can not be neglected as well.

Molecular docking analysis of phenolics and iridoids present in examined fruits and three different enzymes (α -amylase, α -glucosidase, and DPP III) showed that flavonoid structures with higher number of sugar moieties had better inhibitory potential of all three cases. Among phenolic compounds from *Prunus* fruits the highest binding affinity for α -amylase expressed cyanidin 3-*O*-rutinoside, which was the dominant compound in wild cherry and mahaleb cherry fruits. The highest binding affinity for α -glucosidase expressed cyaniding 3-*O*-(2'-xylosyl)rutinoside, anthocyanin that was most dominant in mahaleb cherry. Quercetin 3-*O*-rutinoside also showed high inhibitory activity against α -glucosidase and was pointed out as the best inhibitor of DPP III enzyme. This compound was present in all examined *Prunus* fruits samples. Among iridoid and phenolic compounds presented in cornelian cherry fruits, pelargonidin 3-*O*-robinobioside was distinguished as the most potent inhibitor of all three enzymes. Phenolic constituents with the highest inhibitory potential could be used as initial lead compounds in rational drug design. They could be specifically useful in design of drugs for type 2 diabetes, concerning the role of α -amylase and α -glucosidase in carbohydrate metabolism.

Halloysite nanotubes, maltodextrin, halloysite-maltodextrin composite, and β -cyclodextrin were shown as appropriate carriers for encapsulation of cornelian cherry and blackthorn fruit extracts and sour cherry pomace extract. The encapsulation with these carriers provided controlled release, *i.e.* longer release time of bioactive compounds. Addition of encapsulates into yoghurt provided prolonged release time of bioactive molecules.

The extracts of cornelian cherry and blackthorn fruits and sour cherry pomace extract showed dose-dependant antiproliferative activities towards human tumor and non-tumor cell lines: MCF7 (breast adenocarcinoma), HT-29 (colon adenocarcinoma) and MRC-5 (fetal lung fibroblasts). However, the encapsulates expressed either proliferative or antiproliferative effects, depending on applied dose.

Obtained results indicate the possibility of application of prepared encapsulates in food industry for food enrichment and functional food production. Further investigations of new or modified functional food carriers need to be conducted for providing longer and target specific controlled release of bioactive constituents.



7. Литература

- Abdal Dayem, A., Choi, H. Y., Yang, G. M., Kim, K., Saha, S. K., & Cho, S. G. (2016). The anti-cancer effect of polyphenols against breast cancer and cancer stem cells: molecular mechanisms. *Nutrients*, 8(9), 581. <https://doi.org/10.3390/nu8090581>
- Abirami, A., Sinsinwar, S., Rajalakshmi, P., Brindha, P., Rajesh, Y. B., & Vadivel, V. (2019). Antioxidant and cytoprotective properties of loganic acid isolated from seeds of *Strychnos potatorum* L. against heavy metal induced toxicity in PBMC model. *Drug and Chemical Toxicology*, 1–11. <https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1681445>
- Abramić, M., Zubanović, M., & Vitale, L. (1988). Dipeptidyl peptidase III from human erythrocytes. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*, 369(1), 29–38.
- Abrankó, L., & Clifford, M. N. (2017). An unambiguous nomenclature for the acyl-quinic acids commonly known as chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(18), 3602–3608. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00729>
- Agić, D., Brkić, H., Tomić, S., Karačić, Z., Špoljarević, M., Lisjak, M., & Abramić, M. (2017). Validation of flavonoids as potential dipeptidyl peptidase III inhibitors: Experimental and computational approach. *Chemical biology and drug design*, 89, 619–627. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12887>
- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4), 875–877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>
- Akhtar, M., & Dickinson, E. (2007). Whey protein–maltodextrin conjugates as emulsifying agents: An alternative to gum arabic. *Food Hydrocolloids*, 21(4), 607–616. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.07.014>
- Albahari, P., Jug, M., Radić, K., Jurmanović, S., Brnčić, M., Brnčić, S. R., & Vitali Čepo, D. (2018). Characterization of olive pomace extract obtained by cyclodextrin-enhanced pulsed ultrasound assisted extraction. *LWT - Food Science and Technology*, 92, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.011>
- Almada, A. (2014). Nutraceuticals and Functional Foods: Aligning with the Norm or Pioneering Through a Storm. In: D. Bagchi (Ed.), *Nutraceutical and functional food regulations in the United States and around the world* (2nd ed., Ch. 1, pp. 3–10). Academic Press an imprint of Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-405870-5.00001-3>
- Alrgei, H. O. S., Dabić, D. Č., Natić, M. M., Rakonjac, V. S., Milojković-Opsenica, D., Tešić, Ž. L., & Fotirić Akšić, M. M. (2016). Chemical profile of major taste-and health-related compounds of Oblačinska sour cherry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(4), 1241–1251. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7212>
- Alvani, K., Qi, X., & Tester, R. F. (2011). Use of carbohydrates, including dextrans, for oral delivery. *Starch-Stärke*, 63(7), 424–431. <https://doi.org/10.1002/star.201000110>

- Alvarez-Parrilla, E., Laura, A., Torres-Rivas, F., Rodrigo-Garcia, J., & González-Aguilar, G. A. (2005). Complexation of apple antioxidants: chlorogenic acid, quercetin and rutin by β -cyclodextrin (β -CD). *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 53(1), 121–129. <https://doi.org/10.1007/s10847-005-1620-z>
- Ameer, K., Shahbaz, H. M., & Kwon, J.-H. (2017). Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 295–315. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12253>
- Andersen, Ø.M., & Jordheim, M. (2006). The Anthocyanins. In: Andersen, Ø.M., Markham, K.R., Eds. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 471–553. ISBN 9780849320217
- Andrés-Lacueva, C., Medina-Rejon, A., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Khan, N. Chiva-Blanch, G., Zamora-Ros, R., Rotches-Ribalta, M., and Lamuela-Raventós, R.M. (2010) Phenolic compounds: chemistry and occurrence in fruits and vegetables. In Laura A. de la Rosa, Emilio Alvarez-Parrilla and Gustavo A. Gonzalez-Aguilar (eds), *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, nutritional value and stability*. Wiley-Blackwell, pp. 53–87.
- Андрић, С., Костић, Т., Андрић, Н., Зорић, С. (2006). *Упоредна физиологија животиња: скрипта за студенте биологије*. Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду. стр 122.
- Antolak, H., Czyzowska, A., Sakač, M., Mišan, A., Đuragić, O., & Kregiel, D. (2017). Phenolic compounds contained in little-known wild fruits as antiadhesive agents against the beverage-spoiling bacteria *Asaia* spp. *Molecules*, 22(8), 1256. <https://doi.org/10.3390/molecules22081256>
- Bae, E. K., & Lee, S. J. (2008). Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *Journal of microencapsulation*, 25(8), 549–560. <https://doi.org/10.1080/02652040802075682>
- Baer-Dubowska, W., Szaefer, H., & Krajka-Kuzniak, V. (1998). Inhibition of murine hepatic cytochrome P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds. *Xenobiotica*, 28(8), 735–743. <https://doi.org/10.1080/004982598239155>
- Bagchi, D. (2014). *Nutraceutical and functional food regulations in the United States and around the world* (2nd ed., preface). Academic Press an imprint of Elsevier.
- Balasubashini, M. S., Rukkumani, R., Viswanathan, P., & Menon, V. P. (2004). Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(4), 310–314. <https://doi.org/10.1002/ptr.1440>
- Barać, G., Milić, B., Magazin, N., Ognjanov, V., Keserović, Z., Ivanišević, D., Kaladžić, M., Vuković, D., Mihaljević, I., Tomaš, V., Viljevac-Vuletić, M., & Horvat, D. (2020). Sorte i selekcije voćaka iz severozapadne Srbije i istočne Hrvatske. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Srbija.

- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., & Komes, D. (2018). Overview of polyphenols and their properties. In *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications* (pp. 3–44). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00001-4>
- Bender, M.L., Komiyama, M., 1978. Cyclodextrin Chemistry. Springer-Verlag, Berlin. Benesi, H.A.,
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1999). Ferric reducing antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299, 15–27.
- Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020). The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety – Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709. <https://doi.org/10.3390/antiox9080709>
- Blando, F., Albano, C., Liu, Y., Nicoletti, I., Corradini, D., Tommasi, N., Gerardi, C., Mita, G., & Kitts, D. D. (2016). Polyphenolic composition and antioxidant activity of the under-utilised *Prunus mahaleb* L. fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(8), 2641–2649. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7381>
- Blando, F., Gerardi, C., & Nicoletti, I. (2004). Sour cherry (*Prunus cerasus* L) anthocyanins as ingredients for functional foods. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004(5), 253–258.
- Bondonno, N. P., Dalgaard, F., Kyrø, C., Murray, K., Bondonno, C. P., Lewis, J. R., ... & Tjønneland, A. (2019). Flavonoid intake is associated with lower mortality in the Danish Diet Cancer and Health Cohort. *Nature communications*, 10(1), 1–10.
- Bouzaiene, N. N., Jaziri, S. K., Kovacic, H., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K., & Luis, J. (2015). The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. *European journal of pharmacology*, 766, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.09.044>
- Braunberger, C., Zehl, M., Conrad, J., Wawrosch, C., Strohbach, J., Beifuss, U., & Krenn, L. (2015). Flavonoids as chemotaxonomic markers in the genus *Drosera*. *Phytochemistry*, 118, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.08.017>
- Brindza, P., Brindza, J., Tóth, D., Klimenko, S. V., & Grigorieva, O. (2006). Slovakian cornelian cherry (*Cornus mas* L.): potential for cultivation. In *XXVII International Horticultural Congress-IHC2006: II International Symposium on Plant Genetic Resources of Horticultural 760* (pp. 433–437). 10.17660/ActaHortic.2007.760.59
- Bulani, V. D., Kothavade, P. S., Kundaikar, H. S., Gawali, N. B., Chowdhury, A. A., Degani, M. S., & Juvekar, A. R. (2016). Inclusion complex of ellagic acid with β -cyclodextrin: Characterization and in vitro anti-inflammatory evaluation. *Journal of molecular structure*, 1105, 308–315. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.08.054>
- Cásedas, G., Les, F., Gómez-Serranillos, M. P., Smith, C., & López, V. (2016). Bioactive and functional properties of sour cherry juice (*Prunus cerasus*). *Food & function*, 7(11), 4675–4682. DOI: [10.1039/C6FO01295G](https://doi.org/10.1039/C6FO01295G)

- Catchpole, O., Mitchell, K., Bloor, S., Davis, P., & Suddes, A. (2018). Anti-gastrointestinal cancer activity of cyclodextrin-encapsulated propolis. *Journal of Functional Foods*, *41*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.023>
- Cavallaro, G., Chiappisi, L., Pasbakhsh, P., Gradzielski, M., & Lazzara, G. (2018). A structural comparison of halloysite nanotubes of different origin by Small-Angle Neutron Scattering (SANS) and Electric Birefringence. *Applied Clay Science*, *160*, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2017.12.044>
- Cavallaro, G., Lazzara, G., Milioto, S., & Parisi, F. (2016). Steric stabilization of modified nanoclays triggered by temperature. *Journal of Colloid and Interface Science*, *461*, 346–351. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.09.046>
- Ceci, C., Lacal, P. M., Tentori, L., De Martino, M. G., Miano, R., & Graziani, G. (2018). Experimental evidence of the antitumor, antimetastatic and antiangiogenic activity of ellagic acid. *Nutrients*, *10*(11), 1756. <https://doi.org/10.3390/nu10111756>
- Çelik, S. E., Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2015). Antioxidant capacity of quercetin and its glycosides in the presence of β -cyclodextrins: influence of glycosylation on inclusion complexation. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, *83*(3), 309–319.
- Četojević-Simin, D. (2015). Tumor cell growth activity of fruit and pomace extracts. In: Owen, J. P. (Ed) *Fruit and Pomace Extracts: Biological Activity, Potential Applications and Beneficial Health Effects*, Nova Science Publishers New York, pp. 241-253.
- Chang, J., Block, T. M., & Guo, J. T. (2013). Antiviral therapies targeting host ER alpha-glucosidases: current status and future directions. *Antiviral research*, *99*(3), 251–260.
- Cheng, J. C., Dai, F., Zhou, B., Yang, L., & Liu, Z. L. (2007). Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: mechanism and structure–activity relationship. *Food chemistry*, *104*(1), 13–139. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.012>
- Cho, A. S., Jeon, S. M., Kim, M. J., Yeo, J., Seo, K. I., Choi, M. S., & Lee, M. K. (2010). Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and chemical toxicology*, *48*(3), 937–943. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.01.003>
- Choi, E. J., Bae, S. M., & Ahn, W. S. (2008). Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Archives of pharmacal research*, *31*(10), 1281. <https://doi.org/10.1007/s12272-001-2107-0>
- Chou, C. C., Yang, J. S., Lu, H. F., Ip, S. W., Lo, C., Wu, C. C., ... & Teng, Y. H. (2010). Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Archives of pharmacal research*, *33*(8), 1181–1191. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-0808-y>
- Choudhury, R., Srail, S. K., Debnam, E., & Rice-Evans, C. A. (1999). Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration. *Free Radical Biology and Medicine*, *27*(3–4), 278–286. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00054-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00054-4)

- Chowdhury, D. F. (2019). Medical Biotechnology and Healthcare. In: M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology* (3rd ed., vol 5, pp. 615–627). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00312-8>
- Christenhusz, M. J.M. & Byng, J. W. (2016): The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* 261(3), 201–217. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.261.3.1>
- Churchman, G. J., Pasbakhsh, P., & Hillier, S. (2016). The rise and rise of halloysite. *Clay Minerals*, 51(3), 303–308. <https://doi.org/10.1180/claymin.2016.051.3.00>
- Cilek, B., Luca, A., Hasirci, V., Sahin, S., & Sumnu, G. (2012). Microencapsulation of phenolic compounds extracted from sour cherry pomace: effect of formulation, ultrasonication time and core to coating ratio. *European Food Research and Technology*, 235(4), 587–596. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1786-8>
- Clifford, M. N. (2000a). Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1033–1043. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1033::AID-JSFA595>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1033::AID-JSFA595>3.0.CO;2-T)
- Clifford, M. N. (2000b). Anthocyanins—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1063–1072. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1063::AID-JSFA605>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1063::AID-JSFA605>3.0.CO;2-Q)
- Commission Directive 2003/95/EC, 2003. Commission Directive 2003/95/EC of October 27, 2003 amending Directive 96/77/EC laying down specific purity criteria on food additives other than colours and sweeteners (Text with EEA relevance).
- Craig, W. J. (1997). Phytochemicals: guardians of our health. *Journal of the American Dietetic Association*, 97(10), S199–S204. [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(97\)00765-7](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(97)00765-7)
- Curti, V., Di Lorenzo, A., Dacrema, M., Xiao, J., Nabavi, S. M., & Daglia, M. (2017). In vitro polyphenol effects on apoptosis: An update of literature data. *Seminars in cancer biology*, 46, 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2017.08.005>
- Czank, C., Cassidy, A., Zhang, Q., Morrison, D. J., Preston, T., Kroon, P. A., Botting, N. P., & Kay, C. D. (2013). Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a ¹³C-tracer study. *The American of Clinical Nutrition*, 97(5), 995–1003. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.049247>
- Četojević-Simin, D. (2015). Tumor cell growth activity of fruit and pomace extracts. In: Owen, J. P. (Ed) *Fruit and Pomace Extracts: Biological Activity, Potential Applications and Beneficial Health Effects*, Nova Science Publishers New York, pp. 241-253.
- Četojevic-Simin, D.D., Bogdanovic, G.M., Cvetkovic, D.D., Velicanski, A.S. (2008). Antiproliferative and antimicrobial activity of traditional Kombucha and *Satureja montana* L. Kombucha. *Journal of BUON.*, 13(3), 395-401.
- Četojević-Simin, D. D., Velićanski, A. S., Cvetković, D. D., Markov, S. L., Četković, G. S., Tumbas Šaponjac, V. T., Vulić, J. J., Čanadanović-Brunet, J. M., & Djilas, S. M. (2015). Bioactivity of

- Meeker and Willamette raspberry (*Rubus idaeus* L.) pomace extracts. *Food Chemistry*, 166, 407-413. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.063>
- Dai, F., Miao, Q., Zhou, B., Yang, L., & Liu, Z. L. (2006). Protective effects of flavonols and their glycosides against free radical-induced oxidative hemolysis of red blood cells. *Life Sciences*, 78(21), 2488–2493. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.10.009>
- Dalgaard, F., Bondonno, N. P., Murray, K., Bondonno, C. P., Lewis, J. R., Croft, K. D., ... & Tjønneland, A. (2019). Associations between habitual flavonoid intake and hospital admissions for atherosclerotic cardiovascular disease: a prospective cohort study. *The Lancet Planetary Health*, 3(11), e450–e459.
- da Rosa, C. G., Borges, C. D., Zambiazzi, R. C., Rutz, J. K., da Luz, S. R., Krumreich, F. D., Benvenuti, E., V., & Nunes, M. R. (2014). Encapsulation of the phenolic compounds of the blackberry (*Rubus fruticosus*). *LWT-Food Science and Technology*, 58(2), 527–533. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.042>
- Das, A., & Sen, C. K. (2014). Nutritional Supplements and Functional Foods: Functional Significance and Global Regulations. In: D. Bagchi (Ed.), *Nutraceutical and Functional Food Regulations in the United States and Around the World* (2nd ed., Ch. 2, pp. 13–30). Academic Press an imprint of Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-405870-5.00002-5>
- Davies, K. J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB life*, 50(4-5), 279–289. <https://doi.org/10.1080/713803728>
- Desai, K. G. H., & Jin Park, H. (2005). *Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. Drying Technology*, 23(7), 1361–1394. doi:10.1081/drt-200063478
- De Flora, S., Izzotti, A., D'Agostini, F., Balansky, R. M., Noonan, D., & Albin, A. (2001). Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 480, 9–22. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00165-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00165-8)
- de Oliveira, A. D., & Beatrice, C. A. G. (2018). Polymer nanocomposites with different types of nanofiller. *Nanocomposites-Recent Evolutions*, 103–104. <https://dx.doi.org/10.5772/intechopen.81329>
- Dey, P. M., & Harborne, J. B. (Eds.). (1997). *Plant biochemistry*. Elsevier.
- Dias, K., Nikolaou, S., & De Giovanni, W. F. (2012). The in vitro antioxidant properties of the Al-queracetin/βCD and Al-catechin/βCD inclusion compounds, rationalized in terms of their electrochemical behaviour. *Medicinal Chemistry Research*, 21(10), 2920–2925.
- Dillard, C. J., & German, J. B. (2000). Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(12), 1744–1756. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(20000915\)80:12<1744::AID-JSFA725>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-0010(20000915)80:12<1744::AID-JSFA725>3.0.CO;2-W)

- Dinda, B., Kyriakopoulos, A. M., Dinda, S., Zoumpourlis, V., Thomaidis, N. S., Velegraki, A., Markopoulos, C., & Dinda, M. (2016). *Cornus mas* L. (cornelian cherry), an important European and Asian traditional food and medicine: Ethnomedicine, phytochemistry and pharmacology for its commercial utilization in drug industry. *Journal of Ethnopharmacology*, 193, 670–690. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.09.042>
- Deniau, B., Rehfeld, L., Santos, K., Dienelt, A., Azibani, F., Sadoune, M., Kounde, P.R., Samuel, J.L., Tolpannen, H., Lassus, J., Harjola, V.P., Vodovar, N., Bergmann, A., Hartmann, O., Mebazaa, A., & Blet, A. (2020). Circulating dipeptidyl peptidase 3 is a myocardial depressant factor: dipeptidyl peptidase 3 inhibition rapidly and sustainably improves haemodynamics. *European Journal of Heart Failure*. 22(2), 290–299. <https://doi.org/10.1002/ejhf.1601>
- Dewick, 2009 Dewick, P. M. (2009). *Medicinal natural products: A biosynthetic approach*, 3rd Edition. John Wiley & Sons, Ltd. ISBN: 987-0-470-74168-9
- Dinda, B., Debnath, S., & Harigaya, Y. (2007). Naturally occurring iridoids. A review, part 1. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 55(2), 159–222. <https://doi.org/10.1248/cpb.55.159>
- Duarte, G. S., & Farah, A. (2011). Effect of simultaneous consumption of milk and coffee on chlorogenic acids' bioavailability in humans. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(14), 7925–7931. <https://doi.org/10.1021/jf201906p>
- Dudeja, P., & Gupta, R.K. (2016). Nutraceuticals. In: R.K. Gupta, P. Dudeja, & S. Minhas (Eds.), *Food Safety in the 21st Century: Public Health Perspective* (1st ed., Ch. 40, pp. 491–496). ISBN 978-0-12-801773-9; <https://doi.org/10.1016/C2014-0-01094-5>
- Dwek, R. A., Butters, T. D., Platt, F. M., & Zitzmann, N. (2002). Targeting glycosylation as a therapeutic approach. *Nature reviews Drug discovery*, 1(1), 65–75.
- Dzydzan, O., Bila, I., Kucharska, A. Z., Brodyak, I., & Sybirna, N. (2019). Antidiabetic effects of extracts of red and yellow fruits of cornelian cherries (*Cornus mas* L.) on rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Food & Function*, 10(10), 6459–6472. DOI: [10.1039/C9FO00515C](https://doi.org/10.1039/C9FO00515C)
- Eker, M. E., Aaby, K., Budic-Leto, I., Rimac Brnčić, S., El, S. N., Karakaya, S., ... & de Pascual-Teresa, S. (2020). A review of factors affecting anthocyanin bioavailability: Possible implications for the inter-individual variability. *Foods*, 9(1), 2. <https://doi.org/10.3390/foods9010002>
- El Kantar, S., Rajha, H. N., Boussetta, N., Vorobiev, E., Maroun, R. G., & Louka, N. (2019). Green extraction of polyphenols from grapefruit peels using high voltage electrical discharges, deep eutectic solvents and aqueous glycerol. *Food Chemistry*, 295, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.111>
- El-Naggar, L. J., & Beal, J. L. (1980). Iridoids. A review. *Journal of Natural Products*, 43(6), 649–707.
- Esfanjani, A. F., Assadpour, E., & Jafari, S. M. (2018). Improving the bioavailability of phenolic compounds by loading them within lipid-based nanocarriers. *Trends in Food Science & Technology*, 76, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.002>

- Fantini, M., Benvenuto, M., Masuelli, L., Frajese, G. V., Tresoldi, I., Modesti, A., & Bei, R. (2015). In vitro and in vivo antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: perspectives on cancer treatment. *International journal of molecular sciences*, 16(5), 9236–9282. <https://doi.org/10.3390/ijms16059236>
- Farah, A., & Duarte, G. (2015). Bioavailability and Metabolism of Chlorogenic Acids from Coffee Chapter 87 in Preedy, V.R. *Coffee in Health and Disease Prevention*. Academic Press. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5-00087-5>
- Farrell, T. L., Dew, T. P., Poquet, L., Hanson, P., & Williamson, G. (2011). Absorption and metabolism of chlorogenic acids in cultured gastric epithelial monolayers. *Drug Metabolism and Disposition*, 39(12), 2338–2346. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.040147>
- Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Lyan, B., Lamaison, J. L., & Scalbert, A. (2007). Strawberry pelargonidin glycosides are excreted in urine as intact glycosides and glucuronidated pelargonidin derivatives in rats. *British Journal of Nutrition*, 98(6), 1126–1131. <https://doi.org/10.1017/S0007114507764772>
- Fernandes, A., Rocha, M. A., Santos, L. M., Brás, J., Oliveira, J., Mateus, N., & de Freitas, V. (2018). Blackberry anthocyanins: β -Cyclodextrin fortification for thermal and gastrointestinal stabilization. *Food chemistry*, 245, 426–431. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.109>
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *nature*, 408(6809), 239–247.
- Fresco, P., Borges, F., Marques, M. P. M., & Diniz, C. (2010). The anticancer properties of dietary polyphenols and its relation with apoptosis. *Current pharmaceutical design*, 16(1), 114–134. DOI: <https://doi.org/10.2174/138161210789941856>
- Gandia-Herrero, F., Jimenez-Atienzar, M., Cabanes, J., Garcia-Carmona, F., & Escribano, J. (2010). Stabilization of the bioactive pigment of Opuntia fruits through maltodextrin encapsulation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(19), 10646–10652. <https://doi.org/10.1021/jf101695f>
- Gao, C., Bhattarai, P., Chen, M., Zhang, N., Hameed, S., Yue, X., & Dai, Z. (2018). Amphiphilic drug conjugates as nanomedicines for combined cancer therapy. *Bioconjugate chemistry*, 29(12), 3967–3981. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00692>
- Ghisalberti, E. L. (1998). Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. *Phytomedicine*, 5(2), 147–163. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(98\)80012-3](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(98)80012-3)
- Giovannelli, L., Testa, G., De Filippo, C., Cheynier, V., Clifford, M. N., & Dolara, P. (2000). Effect of complex polyphenols and tannins from red wine on DNA oxidative damage of rat colon mucosa in vivo. *European Journal of Nutrition*, 39(5), 207–212. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s003940070013.pdf>
- Gironés-Vilaplana, A., Baenas, N., Villaño, D., & Moreno, D. A. (2014). Iberian-American Fruits Rich in Bioactive Phytochemicals for Nutrition and Health. LIMENCOP S.L., First Edition. Alicante, Spain.

- Gironés-Vilaplana, A., Villaño, D., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2013). New isotonic drinks with antioxidant and biological capacities from berries (maqui, açai and blackthorn) and lemon juice. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(7), 897–906. <https://doi.org/10.3109/09637486.2013.809406>
- Golonko, A., Pienkowski, T., Swislocka, R., Lazny, R., Roszko, M., & Lewandowski, W. (2019). Another look at phenolic compounds in cancer therapy the effect of polyphenols on ubiquitin-proteasome system. *European journal of medicinal chemistry*, 167, 291–311. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.044>
- Gonçalves, J., Ramos, R., Luís, A., Rocha, S., Rosado, T., Gallardo, E., & Duarte, A. P. (2019). Assessment of the Bioaccessibility and Bioavailability of the Phenolic Compounds of *Prunus avium* L. by in Vitro Digestion and Cell Model. *ACS Omega*, 4(4), 7605–7613. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03499>
- Górnas, P., Neunert, G., Baczyński, K., & Polewski, K. (2009). Beta-cyclodextrin complexes with chlorogenic and caffeic acids from coffee brew: Spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling study. *Food Chemistry*, 114(1), 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.048>
- Guimarães, R., Barros, L., Calhella, R. C., Carvalho, A. M., Queiroz, M. J. R., & Ferreira, I. C. (2014). Bioactivity of different enriched phenolic extracts of wild fruits from Northeastern Portugal: a comparative study. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69(1), 37–42. DOI 10.1007/s11130-013-0394-5
- Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Queiroz, M. J. R., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. (2013). Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. *Food Chemistry*, 141(4), 3721–3730. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.071>
- Gulati, N., Laudet, B., Zohrabian, V. M., Murali, R., & Jhanwar-Uniyal, M. (2006). The antiproliferative effect of Quercetin in cancer cells is mediated via inhibition of the PI3K-Akt/PKB pathway. *Anticancer research*, 26(2A), 1177–1181. <http://ar.iiarjournals.org/content/26/2A/1177.full.pdf+html>
- Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of toxicology*, 86(3), 345–391. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>
- Gupta, K., & Panda, D. (2002). Perturbation of microtubule polymerization by quercetin through tubulin binding: a novel mechanism of its antiproliferative activity. *Biochemistry*, 41(43), 13029–13038. <https://doi.org/10.1021/bi025952r>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
- Harangi, J., Béke, G., Harangi, M., & Mótyán, J. A. (2012). The digestable parent cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 73(1–4), 335–339. <https://doi.org/10.1007/s10847-011-0061-0>
- Harborne, J. B. (1989). *Methods in plant biochemistry. Volume 1. Plant phenolics*. Academic Press Ltd. ISBN 0-12-461011-0

- Haslam, E., & Cai, Y. (1994). Plant polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Natural product reports*, 11, 41–66. <https://doi.org/10.1039/NP9941100041>
- He, J., & Giusti, M. M. (2010). Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual review of food science and technology*, 1, 163–187.
- Hedges, A.R., Shieh, W.J., Sikorski, C.T., 1995. Use of cyclodextrins for encapsulation in the use and treatment of food products. In: S. J. Risch & G. A. Reineccius (Eds.), *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients* (pp. 60–71) ACS Symp. Ser. 590. American Chemical Society.
- Hollman, P. C., de Vries, J. H., van Leeuwen, S. D., Mengelers, M. J., & Katan, M. B. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *The American journal of clinical nutrition*, 62(6), 1276–1282. <https://doi.org/10.1093/ajcn/62.6.1276>
- Homoki, J. R., Nemes, A., Fazekas, E., Gyémánt, G., Balogh, P., Gál, F., ... & Remenyik, J. (2016). Anthocyanin composition, antioxidant efficiency, and α -amylase inhibitor activity of different Hungarian sour cherry varieties (*Prunus cerasus* L.). *Food chemistry*, 194, 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.130>
- Hosseinpour-Jaghdani, F., Shomali, T., Gholipour-Shahraki, S., Rahimi-Madiseh, M., & Rafieian-Kopaei, M. (2017). *Cornus mas*: a review on traditional uses and pharmacological properties. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 14(3). <https://doi.org/10.1515/jcim-2016-0137>
- Hou, L., Zhou, B., Yang, L., & Liu, Z. L. (2004). Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by flavonols and their glycosides. *Chemistry and Physics of Lipids*, 129(2), 209–219. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2004.02.001>
- Howard, L. R., Brownmiller, C., Prior, R. L., & Mauromoustakos, A. (2013). Improved stability of chokeberry juice anthocyanins by β -cyclodextrin addition and refrigeration. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(3), 693–699. <https://doi.org/10.1021/jf3038314>
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Huang, J., Zhang, Y., Dong, L., Gao, Q., Yin, L., Quan, H., Chen, R., Fu, X. & Lin, D. (2018). Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. *Journal of ethnopharmacology*, 213, 280–301. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.11.010>
- Huang, W. Y., Cai, Y. Z., & Zhang, Y. (2009). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and cancer*, 62(1), 1–20. <https://doi.org/10.1080/01635580903191585>
- Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. (1996). VMD-Visual Molecular Dynamics. *Journal of molecular graphics*, 14, 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Ieri, F., Pinelli, P., & Romani, A. (2012). Simultaneous determination of anthocyanins, coumarins and phenolic acids in fruits, kernels and liqueur of *Prunus mahaleb* L. *Food chemistry*, 135(4), 2157–2162. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.083>

- Jaganathan, S. K., Supriyanto, E., & Mandal, M. (2013). Events associated with apoptotic effect of *p*-Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 19(43), 7726. [10.3748/wjg.v19.i43.7726](https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i43.7726)
- Jaiswal, R., Karaköse, H., Rühmann, S., Goldner, K., Neumüller, M., Treutter, D., & Kuhnert, N. (2013). Identification of phenolic compounds in plum fruits (*Prunus salicina* L. and *Prunus domestica* L.) by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry and characterization of varieties by quantitative phenolic fingerprints. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(49), 12020–12031. <https://doi.org/10.1021/jf402288j>
- Jaiswal, R., & Kuhnert, N. (2011). How to identify and discriminate between the methyl quinates of chlorogenic acids by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, 46(3), 269–281. <https://doi.org/10.1002/jms.1889>
- Jang, G. H., Kim, H. W., Lee, M. K., Jeong, S. Y., Bak, A. R., Lee, D. J., & Kim, J. B. (2018). Characterization and quantification of flavonoid glycosides in the *Prunus* genus by UPLC-DAD-QTOF/MS. *Saudi journal of biological sciences*, 25(8), 1622–1631. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.08.001>
- Janick, J. (2005). The origins of fruits, fruit growing, and fruit breeding. *Plant breeding reviews*, 25, 255–320.
- Jayaprakasam, B., Olson, L. K., Schutzki, R. E., Tai, M. H., & Nair, M. G. (2006). Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in Cornelian cherry (*Cornus mas*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(1), 243–248. <https://doi.org/10.1021/jf0520342>
- Jayaprakasam, B., Vareed, S. K., Olson, L. K., & Nair, M. G. (2005). Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1), 28–31. <https://doi.org/10.1021/jf049018+>
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). 78th JECFA, November 2013.
- Јовановић, Б. (1973). *Флора СР Србије*, V том, (Ур.) Јосифовић, М. Београд: Српска академија наука и уметности. стр. 175–179.
- Juadjur, A., & Winterhalter, P. (2012). Development of a novel adsorptive membrane chromatographic method for the fractionation of polyphenols from bilberry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(10), 2427–2433. <https://doi.org/10.1021/jf2047724>
- Kalita, D., Holm, D. G., LaBarbera, D. V., Petrash, J. M., & Jayanty, S. S. (2018). Inhibition of α -glucosidase, α -amylase, and aldose reductase by potato polyphenolic compounds. *PLoS One*, 13(1), e0191025. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191025>
- Kalogeropoulos, N., Yannakopoulou, K., Gioxari, A., Chiou, A., & Makris, D. P. (2010). Polyphenol characterization and encapsulation in β -cyclodextrin of a flavonoid-rich *Hypericum perforatum* (St John's wort) extract. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 882–889. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.016>

- Kayano, S. I., Kikuzaki, H., Ikami, T., Suzuki, T., Mitani, T., & Nakatani, N. (2004). A new bipyrrole and some phenolic constituents in prunes (*Prunus domestica* L.) and their oxygen radical absorbance capacity (ORAC). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 68(4), 942-944. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.942>
- Kawa-Rygielska, J., Adamenko, K., Kucharska, A. Z., Prorok, P., & Piórecki, N. (2019). Physicochemical and antioxidative properties of Cornelian cherry beer. *Food chemistry*, 281, 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.093>
- Кесеровић, З., Магазин, Н., Милић, Б., Дорић, М. (2016). *Воћарство и виноградарство (део Воћарство)*. Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду.
- Kfoury, M., Hădărugă, N.G., Hădărugă, D.I., Fourmentin, S. (2016). Cyclodextrins as encapsulation material for flavors and aroma, Chapter 4 In: A. M. Grumezescu (Ed.), Encapsulations. Volume 2 in: Nanotechnology in the Agri-Food Industry. London, Nikki Levy.
- Kim, D. H., Jung, E. A., Sohng, I. S., Han, J. A., Kim, T. H., & Han, M. J. (1998). Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Archives of pharmacal research*, 21(1), 17–23. <https://doi.org/10.1007/BF03216747>
- Kirakosyan, A., Seymour, E. M., Llanes, D. E. U., Kaufman, P. B., & Bolling, S. F. (2009). Chemical profile and antioxidant capacities of tart cherry products. *Food Chemistry*, 115(1), 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.042>
- Koester, L. S., Xavier, C. R., Mayorga, P., & Bassani, V. L. (2003). Influence of β -cyclodextrin complexation on carbamazepine release from hydroxypropyl methylcellulose matrix tablets. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 55(1), 85–91. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(02\)00127-3](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(02)00127-3)
- Komaki, E., Yamaguchi, S., Maru, I., Kinoshita, M., Kakehi, K., Ohta, Y., & Tsukada, Y. (2003). Identification of anti- α -amylase components from olive leaf extracts. *Food Science and Technology Research*, 9(1), 35–39. <https://doi.org/10.3136/fstr.9.35>
- Konishi, Y., & Kobayashi, S. (2004). Transepithelial transport of chlorogenic acid, caffeic acid, and their colonic metabolites in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(9), 2518–2526. <https://doi.org/10.1021/jf035407c>
- Krejčová, K., Deasy, P. B., & Rabišková, M. (2013). Diclofenac sodium entrapment and release from halloysite nanotubules. *Ceska a Slovenska Farmacie: casopis Ceske farmaceuticke spolecnosti a Slovenske farmaceuticke spolecnosti*, 62(1), 28–34.
- Kremr, D., Bajer, T., Bajerová, P., Surmová, S., & Ventura, K. (2016). Unremitting problems with chlorogenic acid nomenclature: a review. *Química Nova*, 39(4), 530–533. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20160063>
- Kucharska, A. Z. (2012). Związki aktywne owoców derenia (*Cornus mas* L.) Active compounds of cornelian cherry fruits. Wrocław: UWP (in Polish).

- Kucharska, A. Z., Polarczyk, E., Sokół-Łętowska, A. (2007). Właściwości antyoksydacyjne produktów z owoców derenia jadalnego (*Cornus mas* L.) [Antioxidant properties of cornelian cherry fruit products]. Konferencja Naukowa. Naturalne przeciwutleniacze od surowca do organizmu (pp. 34–35). 29–30. January, Poznań [in Polish].
- Kucharska, A. Z., Sokół-Łętowska, A., Oszmiański, J., Piórecki, N., & Fecka, I. (2017). Iridoids, phenolic compounds and antioxidant activity of edible honeysuckle berries (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* Sevest.). *Molecules*, 22(3), 405. <https://doi.org/10.3390/molecules22030405>
- Kucharska, A. Z., Szumny, A., Sokół-Łętowska, A., Piórecki, N., & Klymenko, S. V. (2015). Iridoids and anthocyanins in cornelian cherry (*Cornus mas* L.) cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.12.016>
- Kurkov, S. V., & Loftsson, T. (2013). Cyclodextrins. *International journal of pharmaceutics*, 453(1), 167–180. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.055>
- Kwon, S. H., Kim, H. C., Lee, S. Y., & Jang, C. G. (2009). Loganin improves learning and memory impairments induced by scopolamine in mice. *European journal of pharmacology*, 619(1–3), 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.06.062>
- Lafay, S., Gil-Izquierdo, A., Manach, C., Morand, C., Besson, C., & Scalbert, A. (2006). Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. *The Journal of nutrition*, 136(5), 1192–1197. <https://doi.org/10.1093/jn/136.5.1192>
- Lai, X., Agarwal, M., Lvov, Y. M., Pachpande, C., Varahramyan, K., & Witzmann, F. A. (2013). Proteomic profiling of halloysite clay nanotube exposure in intestinal cell co-culture. *Journal of Applied Toxicology*, 33(11), 1316–1329. <https://doi.org/10.1002/jat.2858>
- Laine, P., Kylli, P., Heinonen, M., & Jouppila, K. (2008). Storage stability of microencapsulated cloudberry (*Rubus chamaemorus*) phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(23), 11251–11261. <https://doi.org/10.1021/jf801868h>
- Lakka, A., Lalas, S., & Makris, D. P. (2020). Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin as a Green Co-Solvent in the Aqueous Extraction of Polyphenols from Waste Orange Peels. *Beverages*, 6(3), 50. <https://doi.org/10.3390/beverages6030050>
- Lakkis, J. M. (2016). *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems* (2nd ed., pp. 1–13). John Wiley & Sons, Ltd.
- Lambert, J. D., Sang, S., & Yang, C. S. (2007). Biotransformation of green tea polyphenols and the biological activities of those metabolites. *Molecular pharmaceutics*, 4(6), 819–825. <https://doi.org/10.1021/mp700075m>
- Landy, D., Tetart, F., Truant, E., Blach, P., Fourmentin, S., & Surpateanu, G. (2007). Development of a competitive continuous variation plot for the determination of inclusion compounds stoichiometry. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57(1–4), 409–413. <https://doi.org/10.1007/s10847-006-9226-7>

- Laskowski, R.A. & Swindells, M.B. (2011). LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *Journal of chemical information and modeling*, 51(10), 2778–2786. <https://doi.org/10.1021/ci200227u>
- Lebovitz, H. E. (1998). Postprandial hyperglycaemic state: importance and consequences. *Diabetes research and clinical practice*, 40, S27–8. PMID: 9740499.
- Lefranc, F., Tabanca, N., & Kiss, R. (2017). Assessing the anticancer effects associated with food products and/or nutraceuticals using in vitro and in vivo preclinical development-related pharmacological tests. *Seminars in cancer biology*, 46, 14–32. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.06.004>
- Leroy-Lechat, F., Wouessidjewe, D., Andreux, J. P., Puisieux, F., & Duchêne, D. (1994). Evaluation of the cytotoxicity of cyclodextrins and hydroxypropylated derivatives. *International journal of pharmaceutics*, 101(1-2), 97–103. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)90080-9](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)90080-9)
- Li, H., Xu, X., Liu, M., Sun, D., & Li, L. (2010). Microcalorimetric and spectrographic studies on host–guest interactions of α -, β -, γ - and M β -cyclodextrin with resveratrol. *Thermochimica acta*, 510(1–2), 168–172. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2010.07.011>
- Liang, N., & Kitts, D. D. (2016). Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. *Nutrients*, 8(1), 16. <https://doi.org/10.3390/nu8010016>
- Lisuzzo, L., Cavallaro, G., Milioto, S., & Lazzara, G. (2019a). Layered composite based on halloysite and natural polymers: A carrier for the pH controlled release of drugs. *New Journal of Chemistry*, 43(27), 10887–10893. <https://doi.org/10.1039/c9nj02565k>
- Lisuzzo, L., Cavallaro, G., Pasbakhsh, P., Milioto, S., & Lazzara, G. (2019b). Why does vacuum drive to the loading of halloysite nanotubes? The key role of water confinement. *Journal of Colloid and Interface Science*, 547, 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.04.012>
- Liu, L., & Guo, Q. X. (2002). The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 42(1–2), 1–14. <https://doi.org/10.1023/A:1014520830813>
- Liu, M., Jia, Z., Jia, D., & Zhou, C. (2014). Recent advance in research on halloysite nanotubes-polymer nanocomposite. *Progress in polymer science*, 39(8), 1498–1525.
- Lodovici, M., Casalini, C., De Filippo, C., Copeland, E., Xu, X., Clifford, M., & Dolara, P. (2000). Inhibition of 1, 2-dimethylhydrazine-induced oxidative DNA damage in rat colon mucosa by black tea complex polyphenols. *Food and Chemical Toxicology*, 38(12), 1085–1088. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00109-5](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00109-5)
- Lo Piparo, E., Scheib, H., Frei, N., Williamson, G., Grigorov, M., & Chou, C.J. (2008). Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human alpha-amylase. *Journal of medicinal chemistry*, 51(12), 3555–3561. <https://doi.org/10.1021/jm800115x>
- Lowe, M. E. (2004) Amylase. *Encyclopedia of Gastroenterology*, 57–58 <https://doi.org/10.1016/B0-12-386860-2/00025-3>

- Lu, F., Zahid, M., Wang, C., Saeed, M., Cavalieri, E. L., & Rogan, E. G. (2008). Resveratrol prevents estrogen-DNA adduct formation and neoplastic transformation in MCF-10F cells. *Cancer Prevention Research, 1*(2), 135–145. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-08-0037
- Luca, A., Cilek, B., Hasirci, V., Sahin, S., & Sumnu, G. (2013). Effect of degripping of phenolic extract from sour cherry pomace on encapsulation efficiency—production of nano-suspension. *Food and Bioprocess Technology, 6*(9), 2494-2502. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0880-z>
- Lvov, Y., & Abdullayev, E. (2013). Functional polymer–clay nanotube composites with sustained release of chemical agents. *Progress in Polymer Science, 38*(10–11), 1690–1719. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.05.009>
- Lvov, Y., Aerov, A., & Fakhrullin, R. (2014). Clay nanotube encapsulation for functional biocomposites. *Advances in Colloid and Interface Science, 207*, 189–198. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2013.10.006>
- Lvov, Y. M., Shchukin, D. G., Mohwald, H., & Price, R. R. (2008). Halloysite clay nanotubes for controlled release of protective agents. *ACS nano, 2*(5), 814–820. <https://doi.org/10.1021/nn800259q>
- Lvov, Y., Wang, W., Zhang, L., & Fakhrullin, R. (2016). Halloysite clay nanotubes for loading and sustained release of functional compounds. *Advanced Materials, 28*(6), 1227–1250. <https://doi.org/10.1002/adma.201502341>
- Љубојевић, М., Огњанов, В., Сентић, И., Дулић, Ј. (2018). *Воћне врсте у пејзажном пројектовању*. Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду.
- Määttä, K. R., Kamal-Eldin, A., & Törrönen, A. R. (2003). High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of phenolic compounds in berries with diode array and electrospray ionization mass spectrometric (MS) detection: Ribes species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*(23), 6736–6744. <https://doi.org/10.1021/jf0347517>
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release—a review. *International journal of food science & technology, 41*(1), 1–21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.00980.x>
- Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Assadpoor, E., & Dehnad, D. (2016). Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. *International journal of biological macromolecules, 85*, 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.011>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition, 79*(5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition, 81*(1), 230S–242S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.230S>

- Mantegna, S., Binello, A., Boffa, L., Giorgis, M., Cena, C., & Cravotto, G. (2012). A one-pot ultrasound-assisted water extraction/cyclodextrin encapsulation of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. *Food Chemistry*, 130(3), 746–750. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.038>
- Martinović, A., & Cavoski, I. (2020). The exploitation of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) cultivars and genotypes from Montenegro as a source of natural bioactive compounds. *Food chemistry*, 318, 126549. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126549>
- Massaro, M., Cavallaro, G., Colletti, C. G., D'Azzo, G., Guernelli, S., Lazzara, G., Pieraccini, S., & RIELA, S. (2018). Halloysite nanotubes for efficient loading, stabilization and controlled release of insulin. *Journal of colloid and interface science*, 524, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.04.025>
- McClements, D. J. (2012). Requirements for food ingredient and nutraceutical delivery systems. In *Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals* (pp. 3–18). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857095909.1.3>
- McDougall, G. J., Shpiro, F., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., & Stewart, D. (2005). Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glucosidase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(7), 2760–2766. <https://doi.org/10.1021/jf0489926>
- McGhie, T. K., & Walton, M. C. (2007). The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Molecular nutrition & food research*, 51(6), 702–713. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700092>
- Meschini, S., Pellegrini, E., Condello, M., Occhionero, G., Delfino, S., Condello, G., & Mastrodonato, F. (2017). Cytotoxic and Apoptotic Activities of *Prunus spinosa* Trigno Ecotype Extract on Human Cancer Cells. *Molecules*, 22, 1578–1594. <https://doi.org/10.3390/molecules22091578>
- Milenković-Andelković, A., Radovanović, B., Andelković, M., Radovanović, A., Nikolić, V., & Randelović, V. (2015). The anthocyanin content and bioactivity of cornelian cherry (*Cornus mas*) and wild blackberry (*Rubus fruticosus*): fruit extracts from the Vlasina region. *Advanced technologies*, 4(2), 26–31. doi: 10.5937/savteh1502026M
- Mishra, P., Mishra, S., & Mahanta, C. L. (2014). Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Emblica officinalis*) juice powder. *Food and Bioproducts Processing*, 92(3), 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.08.003>
- Милатовић, Д. (2013). *Кајсија*. Научно воћарско друштво Србије, Чачак, Србија.
- Митић М. (2011). *Кинетика деградације фенолних једињења хидроксил радикалима*. Докторска дисертација. Департман за хемију, Прородно-математички факултет, Универзитет у Нишу.
- Мишан, А., Арсић, И., Ђорђевић, С., Гадић, В., Псодоров, Ђ. (2013). *Функционална храна и лековито биље* (стр. 18–65). Научни институт за прехранбене технологије Нови Сад.
- Мишић, П. (2002). *Специјално оплемењивање воћака*. Београд: Институт за истраживања у пољопривреди Србија и Партедон.

- Mocan, A., Diuzheva, A., Carradori, S., Andruch, V., Massafra, C., Moldovan, C., Sisea, C., Petzer, J. P., Petzer, A., Zara, S., Marconi, G. D., Zengin G., Crişan, G., Locatelli, M., & Marconi, G. D. (2018). Development of novel techniques to extract phenolic compounds from Romanian cultivars of *Prunus domestica* L. and their biological properties. *Food and Chemical Toxicology*, *119*, 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.045>
- Morris, G.M., Ruth, H., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S. & Olson, A.J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, *30*, 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Mosinger, J., Tománková, V., Němcová, I., & Zýka, J. (2001). Cyclodextrins in analytical chemistry. *Analytical letters*, *34*(12), 1979–20004. <https://doi.org/10.1081/AL-100106834>
- Мратинић, Е., Којић, М. (1998). *Самоникле врсте воћака Србије*. Београд: Институт за истраживања у пољопривреди.
- Müller, L., Bednář, P., Barták, P., Lemr, K., & Ševčík, J. (2005). Estimation of partition coefficients by MEKC Part 2: Anthocyanins. *Journal of separation science*, *28*(12), 1285–1290. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500072>
- Naasani, I., Oh-hashii, F., Oh-hara, T., Feng, W. Y., Johnston, J., Chan, K., & Tsuruo, T. (2003). Blocking telomerase by dietary polyphenols is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer research*, *63*(4), 824–830.
- Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., & Scaccini, C. (2002). Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(20), 5735–5741. <https://doi.org/10.1021/jf0257547>
- Natić, M., Pavlović, A., Bosco, F. L., Stanisavljević, N., Zagorac, D. D., Akšić, M. F., & Papetti, A. (2019). Nutraceutical properties and phytochemical characterization of wild Serbian fruits. *European Food Research and Technology*, *245*(2), 469–478. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3178-1>
- Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., ... & WenHua, L. (2018). Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *97*, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>
- Nerurkar, P. V., Hwang, P. W., & Saksa, E. (2015). Anti-diabetic potential of noni: The Yin and the Yang. *Molecules*, *20*(10), 17684–17719. <https://doi.org/10.3390/molecules201017684>
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products*, *79*(3), 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>
- Ning, Z.W., Zhai, L.X., Huang, T., Peng, J., Hu, D., Xiao, H.T., Wen, B., Lin, C.Y., Zhao, L., & Bian, Z.X. (2019). Identification of α -glucosidase inhibitors from cyclocarya paliurus tea leaves using UF-UPLC-Q/TOF-MS/MS and molecular docking. *Food & Function*, *10*(4), 1893–1902. <https://doi.org/10.1039/C8FO01845F>

- Norkaew, O., Thitisut, P., Mahatheeranont, S., & Pawin, B. (2019). Effect of wall materials on some physicochemical properties and release characteristics of encapsulated black rice anthocyanin microcapsules. *Food Chemistry*, 294(May), 493–502. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.086>
- Nowicka, P., Wojdyło, A., & Samoticha, J. (2016). Evaluation of phytochemicals, antioxidant capacity, and antidiabetic activity of novel smoothies from selected *Prunus* fruits. *Journal of Functional Foods*, 25, 397–407. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.024>
- Olivas-Aguirre, F. J., Rodrigo-García, J., Martínez-Ruiz, N. D. R., Cárdenas-Robles, A. I., Mendoza-Díaz, S. O., Álvarez-Parrilla, E., González-Aguilar, G. A., De La Rosa, L. A., Ramos-Jiménez, A., Wall-Medrano, A. (2016). Cyanidin-3-O-glucoside: Physical-chemistry, foodomics and health effects. *Molecules*, 21(9), 1264. <https://doi.org/10.3390/molecules21091264>
- Oliveira, H., Fernandes, I., Bras, N. F., Faria, A., De Freitas, V., Calhau, C., & Mateus, N. (2015). Experimental and theoretical data on the mechanism by which red wine anthocyanins are transported through a human MKN-28 gastric cell model. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(35), 7685–7692. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00412>
- Ouyang, Y., Chen, L., Qian, L., Lin, X., Fan, X., & Teng, H. (2020). Fabrication of caseins nanoparticles to improve the stability of cyanidin 3-O-glucoside. *Food Chemistry*, 317(February), 126418. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126418>
- Panahi, F., Yousefi, R., Mehraban, M. H., & Khalafi-Nezhad, A. (2013). Synthesis of new pyrimidine-fused derivatives as potent and selective antidiabetic α -glucosidase inhibitors. *Carbohydrate research*, 380, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.07.008>
- Pang, X., Shimizu, A., Kurita, S., Zankov, D.P., Takeuchi, K., Yasuda-Yamahara, M., Kume, S., Ishida, T., & Ogita, H. (2016) Novel therapeutic role for dipeptidyl peptidase III in the treatment of hypertension. *Hypertension*. 68, 630–641. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07357>
- Pantelidis, G. E., Vasilakakis, M., Manganaris, G. A., & Diamantidis, G. R. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food chemistry*, 102(3), 777–783. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.021>
- Pasbakhsh, P., Churchman, G. J., & Keeling, J. L. (2013). Characterisation of properties of various halloysites relevant to their use as nanotubes and microfibre fillers. *Applied Clay Science*, 74, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2012.06.014>
- Passamonti, S., Vrhovsek, U., & Mattivi, F. (2002). The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochemical and biophysical research communications*, 296(3), 631–636. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00927-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00927-0)
- Patil, S. P., & Laddha, K. S. (2017). Simple method of isolation of loganin from nux vomica fruits and its quantification by HPLC. *International journal of Pharmacognosy*, 4(1), 39–42.

- Pawlowska, A. M., Camangi, F., & Braca, A. (2010). Quali-quantitative analysis of flavonoids of *Cornus mas* L.(Cornaceae) fruits. *Food chemistry*, 119(3), 1257–1261. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.063>
- Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., & Santos-Buelga, C. (2012). The flavonoid paradox: conjugation and deconjugation as key steps for the biological activity of flavonoids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(9), 1822–1825. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5697>
- Picariello, G., De Vito, V., Ferranti, P., Paolucci, M., & Volpe, M. G. (2016). Species- and cultivar-dependent traits of *Prunus avium* and *Prunus cerasus* polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 45, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.10.002>
- Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G., & Henriques, M. (2014). Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydrate polymers*, 101, 121–135. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.078>
- Поповић, М. (2005). *Биохемија биљака*. Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду. стр. 436.
- Поповић, Б. М., & Штајнер, Д. (2008). *Оксидативни стрес*. Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду. стр. 3–33.
- Potter, D. (2011). *Prunus*. In: Kole, C. (eds) *Wild crop relatives: Genomic and breeding resources, temperate fruits*. Berlin, Springer-Verlag. 2011. 129–145.
- Правилник о квалитету скроба и производа од скроба за прехранбене сврхе, „Службени лист СРЈ“, бр. 33 од 14. јула 1995, „Службени лист СЦГ“, бр. 56 од 26. децембра 2003 - др. правилник, 4 од 23. јануара 2004 - др. правилник
- Правилник о здравственој исправности дијететских производа; „Службени гласник РС“, бр. 45 од 3. јула 2010, 27 од 20. априла 2011, 50 од 18. маја 2012, 21 од 25. фебруара 2015, 75 од 31. августа 2015, 7 од 31. јануара 2017, 103 од 26. децембра 2018 - др. правилник
- Premi, M., & Sharma, H. K. (2017). Effect of different combinations of maltodextrin, gum arabic and whey protein concentrate on the encapsulation behavior and oxidative stability of spray dried drumstick (*Moringa oleifera*) oil. *International journal of biological macromolecules*, 105, 1232–1240. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.160>
- Rahman, S., Cao, S., Steadman, K. J., Wei, M., & Parekh, H. S. (2012). Native and β -cyclodextrin-enclosed curcumin: entrapment within liposomes and their *in vitro* cytotoxicity in lung and colon cancer. *Drug delivery*, 19(7), 346–353. <https://doi.org/10.3109/10717544.2012.721143>
- Rahman, B., Schneider, H. P., Bröer, A., Deitmer, J. W., & Bröer, S. (1999). Helix 8 and helix 10 are involved in substrate recognition in the rat monocarboxylate transporter MCT1. *Biochemistry*, 38(35), 11577–11584. <https://doi.org/10.1021/bi990973f>
- Răileanu, M., Todan, L., Voicescu, M., Ciuculescu, C., Maganu, M. (2013) A way for improving the stability of the essential oils in an environmental friendly formulation, *Materials Science &*

- Engineering C: Materials for Biological Applications*, 33(6), 3281–3288.
[10.1016/j.msec.2013.04.012](https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.04.012)
- Ramos, S. (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular nutrition & food research*, 52(5), 507–526.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.200700326>
- Rasouli, H., Hosseini-Ghazvini, S. M. B., Adibi, H., & Khodarahmi, R. (2017). Differential α -amylase/ α -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes. *Food & function*, 8(5), 1942–1954.
<https://doi.org/10.1039/C7FO00220C>
- Ratnasooriya, C. C., & Rupasinghe, H. V. (2012). Extraction of phenolic compounds from grapes and their pomace using β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 134(2), 625–631.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.014>
- Rechner, A. R., Smith, M. A., Kuhnle, G., Gibson, G. R., Debnam, E. S., Srail, S. K. S., Moore, K. P. & Rice-Evans, C. A. (2004). Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(2), 212–225.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.09.022>
- Renaud, S. D., & de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339(8808), 1523–1526. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)91277-F](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)91277-F)
- Riela, S., Massaro, M., Colletti, C. G., Bommarito, A., Giordano, C., Milioto, S., Noto, R., Poma, P., Lazzara, G. (2014). Development and characterization of co-loaded curcumin/triazole-halloysite systems and evaluation of their potential anticancer activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 475(1), 613–623. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.09.019>
- Rocha, S., Sousa, A., Ribeiro, D., Correia, C. M., Silva, V. L., Santos, C. M., Silva, A. M. S., Araújo, A. N., Fernandes, E., & Freitas, M. (2019). A study towards drug discovery for the management of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the carbohydrate-hydrolyzing enzymes α -amylase and α -glucosidase by chalcone derivatives. *Food & function*, 10(9), 5510–5520.
<https://doi.org/10.1039/C9FO01298B>
- Rocks, N., Bekaert, S., Coia, I., Paulissen, G., Guéders, M., Evrard, B., Van Heugen, J-C., Chiap, P., Foidart, J-M., Noel, A., & Cataldo, D. (2012). Curcumin–cyclodextrin complexes potentiate gemcitabine effects in an orthotopic mouse model of lung cancer. *British journal of cancer*, 107(7), 1083–1092. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.379>
- Roy, S., Metya, S. K., Sannigrahi, S., Rahaman, N., & Ahmed, F. (2013). Treatment with ferulic acid to rats with streptozotocin-induced diabetes: effects on oxidative stress, pro-inflammatory cytokines, and apoptosis in the pancreatic β cell. *Endocrine*, 44(2), 369–379. <https://doi.org/10.1007/s12020-012-9868-8>
- Ruiz-Rodríguez, B. M., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Fernández-Ruiz, V., de Cortes Sánchez-Mata, M., Cámara, M., & Tardío, J. (2014). Wild blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and hawthorn (*Crataegus*

- monogyna* Jacq.) fruits as valuable sources of antioxidants. *Fruits*, 69(1), 61–73.
<https://doi.org/10.1051/fruits/2013102>
- Sadjadi, S. (2020). Halloysite-based hybrids/composites in catalysis. *Applied Clay Science*, 189, 105537.
<https://doi.org/10.1016/j.clay.2020.105537>
- Saézn, C., Tapia, S., Chávez, J., & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114(2), 616–622.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.095>
- Sanchez, V., Baeza, R., Galmarini, M. V., Zamora, M. C., & Chirife, J. (2013). Freeze-drying encapsulation of red wine polyphenols in an amorphous matrix of maltodextrin. *Food and Bioprocess Technology*, 6(5), 1350–1354. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0654-z>
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270–276.
- Santangelo, R., Silvestrini, A., & Mancuso, C. (2019). Ginsenosides, catechins, quercetin and gut microbiota: Current evidence of challenging interactions. *Food and Chemical Toxicology*, 123, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.042>
- Sasaki, R., Nishimura, N., Hoshino, H., Isa, Y., Kadowaki, M., Ichi, T., Tanaka, A., Nishiumi, S., Fukuda, I., Ashida, H., Horio, F., & Tsuda, T. (2007). Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to downregulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice. *Biochemical pharmacology*, 74(11), 1619–1627.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.08.008>
- Satish, S., Tharmavaram, M., & Rawtani, D. (2019). Halloysite nanotubes as a nature's boon for biomedical applications. *Nanobiomedicine*, 6, 1849543519863625.
<https://doi.org/10.1177/1849543519863625>
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287–306.
<https://doi.org/10.1080/1040869059096>
- Sengul, H., Surek, E., & Nilufer-Erdil, D. (2014). Investigating the effects of food matrix and food components on bioaccessibility of pomegranate (*Punica granatum*) phenolics and anthocyanins using an in-vitro gastrointestinal digestion model. *Food Research International*, 62, 1069–1079.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.055>
- Serra, A. T., Duarte, R. O., Bronze, M. R., & Duarte, C. M. (2011a). Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. *Food Chemistry*, 125(2), 318–325.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.088>
- Serra, A. T., Matias, A. A., Almeida, A. P., Bronze, M. R., Alves, P. M., de Sousa, H. C., & Duarte, C. M. (2011b). Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 2. Evaluation of SCF extracts as promising natural chemotherapeutical agents. *The Journal of Supercritical Fluids*, 55(3), 1007–1013. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.06.006>

- Shepherd, R., Robertson, A., & Ofman, D. (2000). Dairy glycoconjugate emulsifiers: casein–maltodextrins. *Food Hydrocolloids*, 14(4), 281–286. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(99\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(99)00067-3)
- Shih, P. H., Yeh, C. T., & Yen, G. C. (2007). Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(23), 9427–9435. <https://doi.org/10.1021/jf071933i>
- Shishehbor, F., Azemi, M. E., Zameni, D., & Saki, A. (2016). Inhibitory effects of hydroalcoholic extracts of barberry, sour cherry and Cornelian cherry on α -amylase and α -glucosidase activities. *Int. J. Pharm. Res. Allied Sci*, 5, 423–428.
- Shishir, M. R. I., Xie, L., Sun, C., Zheng, X., & Chen, W. (2018). Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 34–60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.018>
- Shuang, S. M., Pan, J. H., Guo, S. Y., Cai, M. Y., & Liu, C. S. (1997). Fluorescence study on the inclusion complexes of rutin with β -cyclodextrin, hydroxypropyl- β -cyclodextrin and γ -cyclodextrin. *Analytical letters*, 30(12), 2261–2270. <https://doi.org/10.1080/00032719708001737>
- Siegel, R., DeSantis, C., & Jemal, A. (2014). Colorectal cancer statistics, 2014. *CA: A cancer journal for clinicians*, 64(2), 104–117. <https://doi.org/10.3322/caac.21220>
- Siegel, R. A., Rathbone, M. J. (2012). Overview of Controlled Release Mechanisms. In: Siepmann J., Siegel R., Rathbone M. (eds) *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery. Advances in Delivery Science and Technology*. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0881-9_2
- Simini, B. (2000). Serge Renaud: from French paradox to Cretan miracle. *The Lancet*, 355(9197), 48. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)71990-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71990-5)
- Singh, R. (2016). Chemotaxonomy: a tool for plant classification. *Journal of Medicinal Plants*, 4(2), 90–93.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney, S., Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107–1112. <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107>
- Sokol-Łętowska, A., Kucharska, A. Z., Wińska, K., Szumny, A., Nawirska-Olszańska, A., Mizgier, P., & Wyspiańska, D. (2014). Composition and antioxidant activity of red fruit liqueurs. *Food chemistry*, 157, 533–539. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.083>
- Sousa, J. M. S., de Abreu, F. A. P., Ruiz, A. L. T. G., da Silva, G. G., Machado, S. L., Garcia, C. P. G., ... & Dionísio, A. P. (2020). Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from a by-product of juice processing: assessment of its toxicity, antiproliferative and antimicrobial activities. *Journal of Food Science and Technology*, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04594-0>

- Souza, A. C. P., Gurak, P. D., & Marczak, L. D. F. (2017). Maltodextrin, pectin and soy protein isolate as carrier agents in the encapsulation of anthocyanins-rich extract from jaboticaba pomace. *Food and Bioprocess Processing*, 102, 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.12.012>
- Sozański, T., Kucharska, A. Z., Dzimira, S., Magdalan, J., Szumny, D., Matuszewska, A., Nowak, B., Piórecki, N., Szelağ, A. & Trocha, M. (2018). Loganic acid and anthocyanins from cornelian cherry (*Cornus mas* L.) fruits modulate diet-induced atherosclerosis and redox status in rabbits. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 27(11), 1505–1513. doi: 10.17219/acem/74638
- Sozański, T., Kucharska, A. Z., Rapak, A., Szumny, D., Trocha, M., Merwid-Ląd, A., Dzimira, S., Piasecki, T., Piórecki, N., Magdalan, J., & Szelağ, A. (2016). Iridoid–loganic acid versus anthocyanins from the *Cornus mas* fruits (cornelian cherry): common and different effects on diet-induced atherosclerosis, PPARs expression and inflammation. *Atherosclerosis*, 254, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.10.001>
- Sozański T, Kucharska AZ, Szumny A, Magdalan J, Bielska K, Merwid-Ląd A, Woźniak A, Dzimira S, Piórecki N, Trocha M (2014): The protective effect of the *Cornus mas* fruits (cornelian cherry) on hypertriglyceridemia and atherosclerosis through PPAR α activation in hypercholesterolemic rabbits, *Phytomedicine* 21 (13): 1774–1784. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.09.005>
- Spangenberg, J. E., Jacomet, S., & Schibler, J. (2006). Chemical analyses of organic residues in archaeological pottery from Arbon Bleiche 3, Switzerland—evidence for dairying in the late Neolithic. *Journal of archaeological science*, 33(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2005.05.013>
- Špoljarić, J., Tomić, A., Vukelić, B., Salopek-Sondi, B., Agić, D., Tomić, S., & Abramić, M. (2011). Human dipeptidyl peptidase III: the role of Asn406 in ligand binding and hydrolysis. *Croatica Chemica Acta*, 84(2), 259–268.
- Стојановић, Б. (2014). *Хемијски састав и антиоксидативна активност метанолних и ацетонских екстраката пулпе и коре одабраних врста воћа са подручја Југоисточне Србије*. Докторска дисертација. Департман за хемију, Природно-математички факултет, Универзитет у Нишу.
- Стојиловић, М. (2001). *Врт – извор здравља и среће*. Издавач – аутор
- Stražišar, M., Andrenšek, S., & Šmidovnik, A. (2008). Effect of β -cyclodextrin on antioxidant activity of coumaric acids. *Food Chemistry*, 110(3), 636–642. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.051>
- Świerczewska, A., Buchholz, T., Melzig, M. F., & Czerwińska, M. E. (2019). In vitro α -amylase and pancreatic lipase inhibitory activity of *Cornus mas* L. and *Cornus alba* L. fruit extracts. *Journal of food and drug analysis*, 27(1), 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.06.005>
- Talavéra, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Lamaison, J. L., & Rémésy, C. (2003). Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *The Journal of nutrition*, 133(12), 4178–4182. <https://doi.org/10.1093/jn/133.12.4178>
- Talavéra, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Manach, C., Lamaison, J. L., & Rémésy, C. (2004). Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. *The Journal of nutrition*, 134(9), 2275–2279. <https://doi.org/10.1093/jn/134.9.2275>

- Tiptiri-Kourpeti, A., Fitsiou, E., Spyridopoulou, K., Vasileiadis, S., Iliopoulos, C., Galanis, A., Vekiari, S., Pappa, A., & Chlichlia, K. (2019). Evaluation of Antioxidant and Antiproliferative Properties of *Cornus mas* L. Fruit Juice. *Antioxidants*, 8(9), 377. <https://doi.org/10.3390/antiox8090377>
- Tiwari, A. K. (2004). Antioxidants: new-generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders. *Current science*, 1092–1102. <https://www.jstor.org/stable/24109318>
- Tiwari, B. K., Brunton, N. P., & Brennan, C. (Eds.). (2013). *Handbook of plant food phytochemicals: sources, stability and extraction*. John Wiley & Sons. John Wiley & Sons, Ltd., The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, UK, Str. 13.
- Tolun, A., Altintas, Z., & Artik, N. (2016). Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization. *Journal of biotechnology*, 239, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.001> Get rights and content
- Tomasik, P., Horton, D. (2012) Chapter 2 - Enzymatic conversions of starch. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 68, 59–436. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396523-3.00001-4>
- Tommasini, S., Raneri, D., Ficarra, R., Calabrò, M. L., Stancanelli, R., & Ficarra, P. (2004). Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with β -cyclodextrin. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 35(2), 379–387. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00647-2](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00647-2)
- Trindade, G. G., Thirivikraman, G., Menezes, P. P., França, C. M., Lima, B. S., Carvalho, Y. M., ... & Araújo, A. A. (2019). Carvacrol/ β -cyclodextrin inclusion complex inhibits cell proliferation and migration of prostate cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 125, 198–209. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.003>
- Trott, O. & Olson, A.J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31, 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Tsuda, T., Horio, F., & Osawa, T. (1998). Dietary cyanidin 3-O- β -D-glucoside increases ex vivo oxidation resistance of serum in rats. *Lipids*, 33(6), 583–588. <https://doi.org/10.1007/s11745-998-0243-5>
- Tsuda, T., Horio, F., & Osawa, T. (1999). Absorption and metabolism of cyanidin 3-O- β -D-glucoside in rats. *FEBS letters*, 449(2-3), 179–182. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00407-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00407-X)
- Turner, A., Chen, S. N., Nikolic, D., van Breemen, R., Farnsworth, N. R., & Pauli, G. F. (2007). Coumaroyl iridoids and a depside from cranberry (*Vaccinium macrocarpon*). *Journal of natural products*, 70(2), 253–258. <https://doi.org/10.1021/np060260f>
- Ucchesu, M., Sarigu, M., Del Vais, C., Sanna, I., d'Hallewin, G., Grillo, O., & Bacchetta, G. (2017). First finds of *Prunus domestica* L. in Italy from the Phoenician and Punic periods (6th–2nd centuries bc). *Vegetation History and Archaeobotany*, 26(5), 539–549.
- Ulubelde, M. (1990). A numerical taxonomic study of plum (*Prunus* spp.) based on leaf phenolic compounds. Abstracts 2. Poster. XXIIIth Intepnational Horticultural Congress, Abs. 3001, Firenze

- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, *160*(1), 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Veličković, J. M., Kostić, D. A., Stojanović, G. S., Mitić, S. S., Mitić, M. N., Ranđelović, S. S., Đorđević A. S. (2014). Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit. *Hemijska industrija*, *68* (3), 297–303. <https://doi.org/10.2298/HEMIND130312054V>
- Vergaro, V., Abdullayev, E., Lvov, Y. M., Zeitoun, A., Cingolani, R., Rinaldi, R., & Loporatti, S. (2010). Cytocompatibility and uptake of halloysite clay nanotubes. *Biomacromolecules*, *11*(3), 820–826. <https://doi.org/10.1021/bm9014446>
- Vergaro, V., Lvov, Y. M., & Loporatti, S. (2012). Halloysite clay nanotubes for resveratrol delivery to cancer cells. *Macromolecular bioscience*, *12*(9), 1265–1271. <https://doi.org/10.1002/mabi.201200121>
- Walle, T., Otake, Y., Walle, U. K., & Wilson, F. A. (2000). Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. *The Journal of nutrition*, *130*(11), 2658–2661. <https://doi.org/10.1093/jn/130.11.2658>
- Wang, L. S., & Stoner, G. D. (2008). Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer letters*, *269*(2), 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.05.020>
- Wang, T., Li, X., Zhou, B., Li, H., Zeng, J., & Gao, W. (2015). Anti-diabetic activity in type 2 diabetic mice and α -glucosidase inhibitory, antioxidant and anti-inflammatory potential of chemically profiled pear peel and pulp extracts (*Pyrus* spp.). *Journal of Functional foods*, *13*, 276–288. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.049>Get rights and content
- Watanabe, Y., Bowden, T. A., Wilson, I. A., & Crispin, M. (2019). Exploitation of glycosylation in enveloped virus pathobiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1863*(10), 1480–1497. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.05.012>
- Williamson, G. (2002). The use of flavonoid aglycones in *in vitro* systems to test biological activities: based on bioavailability data, is this a valid approach?. *Phytochemistry Reviews*, *1*(2), 215–222. <https://doi.org/10.1023/A:1022515602191>
- Wisnuwardani, R. W., De Henauw, S., Ferrari, M., Forsner, M., Gottrand, F., Huybrechts, I., ... & Marcos, A. (2020). Total Polyphenol Intake Is Inversely Associated with a Pro/Anti-Inflammatory Biomarker Ratio in European Adolescents of the HELENA Study. *The Journal of Nutrition*, *150*(6), 1610–1618.
- Yamabe, N., Noh, J. S., Park, C. H., Kang, K. S., Shibahara, N., Tanaka, T., & Yokozawa, T. (2010). Evaluation of loganin, iridoid glycoside from Corni Fructus, on hepatic and renal glucolipototoxicity and inflammation in type 2 diabetic db/db mice. *European journal of pharmacology*, *648*(1–3), 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.08.044>

- Yang, J., Wu, Y., Shen, Y., Zhou, C., Li, Y. F., He, R. R., & Liu, M. (2016). Enhanced therapeutic efficacy of doxorubicin for breast cancer using chitosan oligosaccharide-modified halloysite nanotubes. *ACS applied materials & interfaces*, 8(40), 26578–26590. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b09074>
- Yendluri, R., Lvov, Y., de Villiers, M. M., Vinokurov, V., Naumenko, E., Tarasova, E., & Fakhrullin, R. (2017). Paclitaxel encapsulated in halloysite clay nanotubes for intestinal and intracellular delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(10), 3131–3139. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.05.034>
- Yilmaz, K. U., Ercisli, S., Zengin, Y., Sengul, M., & Kafkas, E. Y. (2009). Preliminary characterisation of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) genotypes for their physico-chemical properties. *Food Chemistry*, 114(2), 408–412. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.055>
- Yilmaz, F. M., Görgüç, A., Karaaslan, M., Vardin, H., Ersus Bilek, S., Uygun, Ö., & Bircan, C. (2019). Sour cherry by-products: compositions, functional properties and recovery potentials—a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(22), 3549–3563. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1496901>
- Yoo, W., Yoo, D., Hong, E., Jung, E., Go, Y., Singh, S. B., ... & Lee, D. (2018). Acid-activatable oxidative stress-inducing polysaccharide nanoparticles for anticancer therapy. *Journal of Controlled Release*, 269, 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.023>
- Yuan, P., Tan, D., & Annabi-Bergaya, F. (2015). Properties and applications of halloysite nanotubes: Recent research advances and future prospects. *Applied Clay Science*, 112–113, 75–93. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2015.05.001>
- Xu, J., Tan, T., Janson, J. C., Kenne, L., & Sandström, C. (2007). NMR Studies on the interaction between (–)-epigallocatechin gallate and cyclodextrins, free and bonded to silica gels. *Carbohydrate research*, 342(6), 843–850. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.01.007>
- Wu, H. K., Chuang, W. C., & Sheu, S. J. (1998). Separation of nine iridoids by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, 803(1–2), 179–187. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01227-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01227-2)
- Zadernowski, R., Naczki, M., & Nesterowicz, J. (2005). Phenolic acid profiles in some small berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2118–2124. <https://doi.org/10.1021/jf040411p>
- Zhao, C., Giusti, M. M., Malik, M., Moyer, M. P., & Magnuson, B. A. (2004). Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6122–6128. <https://doi.org/10.1021/jf049517a>
- Zhao, M., Wang, H., Yang, B., & Tao, H. (2010). Identification of cyclodextrin inclusion complex of chlorogenic acid and its antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 120(4), 1138–1142. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.044>

- Zhou, B., Miao, Q., Yang, L., & Liu, Z. L. (2005). Antioxidative effects of flavonols and their glycosides against the free-radical-induced peroxidation of linoleic acid in solution and in micelles. *Chemistry–A European Journal*, 11(2), 680–691. <https://doi.org/10.1002/chem.200400391>
- Zhu, W., Jia, Q., Wang, Y., Zhang, Y., & Xia, M. (2012). The anthocyanin cyanidin-3-O- β -glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: involvement of a cAMP–PKA-dependent signaling pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(2), 314–327. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.483>
- Ziberna, L., Tramer, F., Moze, S., Vrhovsek, U., Mattivi, F., & Passamonti, S. (2012). Transport and bioactivity of cyanidin 3-glucoside into the vascular endothelium. *Free radical biology and medicine*, 52(9), 1750–1759. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.027>
- Zohary, D. (1992). Is the European plum, *Prunus domestica* L., a *P. cerasifera* EHRH. x *P. spinosa* L. allo-polyploid?. *Euphytica*, 60(1), 75–77.
- Zou, T. B., Feng, D., Song, G., Li, H. W., Tang, H. W., & Ling, W. H. (2014). The role of sodium-dependent glucose transporter 1 and glucose transporter 2 in the absorption of cyanidin-3-O- β -glucoside in Caco-2 cells. *Nutrients*, 6(10), 4165–4177. <https://doi.org/10.3390/nu6104165>

Интернет странице и софтвери:

Protein Data Bank, PDB; <https://www.rcsb.org/> (датум приступа: март 2020.)

UniProt <https://www.uniprot.org/> (датум приступа: март 2020.)

BLAST сервер <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (датум приступа: март 2020.)

PROCHECK сервер <https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/> (датум приступа: март 2020.)

PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (датум приступа: март 2020.)

The Functional Food Center, FFC <https://www.functionalfoodcenter.net/> (датум приступа: 16.12.2020.)

The U.S. Food and Drug Administration, FDA www.fda.gov (датум приступа: 16.12.2020.)

FAOSTAT – statistical database of FAO (енгл. Food and Agriculture Organisation of the United Nations) <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (датум приступа: 15.10.2019.)

<https://www.institut-cacak.org> (датум приступа: 06.02.2020.)

8. Прилог

Прилог 1. UPLC-Q-TOF-MS/MS анализа екстракта воћа рода *Prunus*Табела III. Идентификација фенолних једињења у екстрактима воћа рода *Prunus*

| | t_R UPLC (min) | λ_{max} (nm) | MS ¹ (<i>m/z</i>) | MS/MS (intensity) (<i>m/z</i>) | Једињење | шљива | влашкача | тургуња | белошљива | црвенол. ринглов | црвени ринглов | бели ринглов | гајена трешња | дивља трешња | вишња | степска вишња | магрива | трњина | бресква | кајсија |
|-----|------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|--|-------|----------|---------|-----------|---------------------|-------------------|-----------------|------------------|-----------------|-------|------------------|---------|--------|---------|---------|
| 1. | 3,09 | 324 | 353,088 | 191(100)/ 179(10)/ 135(70) | кафеоилхинска киселина | | Tr | X | X | | X | X | | | | | | | X | |
| 2. | 3,28 | 324 | 353,088 | 191(50)/ 179(25)/ 135(100) | 3- <i>O</i> - кафеоилхинска киселина | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | X | X | X |
| 3. | 3,73 | | 487,143 | 163(25)/ 119(100) | <i>m</i> -кумаринска киселина- дихексозид (изомер 1) | | | | | | | | | | | | X | | | |
| 4. | 3,82 | 278 | 577,1343 | 289 | димер В 1 | | | | | | | | | | | | | | X | X |
| 5. | 4,01 | 311 | 337,091 | 195(100)/ 163(60) | <i>p</i> -кумароилхинска киселина | | Tr | X | X | | | | Tr | | | | | | X | |
| 6. | 4,14 | 324 | 341,087 | 179(15)/ 161(50)/ 135(100) | кафеоилхинска киселина- хексозид | X | | | | | | | | | | | | | | |
| 7. | 4,2 | 277 | 325,091 | 163(30)/ 119(100) | <i>m</i> -кумаринска киселина- хексозид (изомер 1) | | | | | | | | | | | | X | | | |
| 8. | 4,29 | 325 | 353,088 | 191(100)/ 135(10) | 5- <i>O</i> - кафеоилхинска киселина | | X | X | X | | X | X | | | | | | | X | X |
| 9. | 4,29 | 280 | 289,067 | | (+)-катехин | | Tr | Tr | Tr | | | | X | | | | | | X | X |
| 10. | 4,39 | | 487,143 | 163(25)/ 119(100) | <i>m</i> -кумаринска киселина- дихексозид (изомер 2) | | | | | | | | | | | | X | | | |
| 11. | 4,45 | 329 | 367,102 | 161(100)/ 133(100) | метил-3- <i>O</i> -кафеоилхинат (изомер 1) | X | X | X | X | | | | X | | | | | X | | |
| 12. | 4,54 | | 529,152 | 161(100)/ 133(10) | метил-ди-кафеоилхинат-1 | | | | | | | | X | | | | | Tr | | |
| 13. | 4,90 | 325 | 367,102 | 161(100)/ 133(58) | метил-3- <i>O</i> -кафеоилхинат (изомер 2) | X | X | X | X | | | | X | X | X | | | | | |
| 14. | 4,98 | | 355,102 | 193(60)/ 149(75)/ 134(100) | ферулна киселина- хексозид | | | | | | | | | | X | | | | | |
| 15. | 5,03 | | 353,088 | 191 (100)/ 135 (30) | кафеоилхинска киселина | | | | | | | | | | | | | | X | |
| 16. | 5,20 | | 289,067 | | (-)-епикатехин | | Tr | Tr | X | | | | | | X | X | | | X | X |
| 17. | 5,25 | 307 | 337,091 | 195 (100)/ 163 (60) | <i>p</i> -кумароилхинска киселина | | | | | | | X | | | | X | | | | |
| 18. | 5,42 | | 351,11 | 145(90)/ 117(100) | метил-3- <i>O</i> - <i>p</i> - кумароилхинат (изомер 1) | | | | | | | | X | | X | X | | | | |
| 19. | 5,57 | | 771,195 | 301 | кверцетин-3- <i>O</i> -рутинозил- глюкозид | | | | | | | | | | X | | | | | |
| 20. | 5,65 | 277 | 325,091 | 163(70)/ 119(100) | <i>m</i> -кумаринска киселина- хексозид (изомер 2) | | | | | | | | | | | | X | | | |

| | t_R UPLC (min) | λ_{max} (nm) | MS ¹ (<i>m/z</i>) | MS/MS (intensity) (<i>m/z</i>) | Једињење | шљива | влашката | тургуња | белошљива | црвенол. ринглов | црвени ринглов | бели ринглов | гајена трешња | дивља трешња | вишња | степска вишња | магрива | трњина | бресква | кајсија |
|-----|------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|--|-------|----------|---------|-----------|---------------------|-------------------|-----------------|------------------|-----------------|-------|------------------|---------|--------|---------|---------|
| 21. | 5,70 | 311 | 351,11 | 145(100)/ 117(90) | метил-3- <i>O-p</i> -кумароилхинат (изомер 2) | X | X | X | X | | | | X | X | X | X | | X | | |
| 22. | 5,78 | | 367,102 | 161(100)/ 133(100) | метил-4- <i>O</i> -кафеоилхинат | X | X | X | X | | | | Tr | X | | | | X | | |
| 23. | 5,95 | | 351,11 | 145(100)/ 117(70) | метил-4- <i>O-p</i> -кумароилхинат (изомер 1) | | X | X | | | | | | | X | X | | | | |
| 24. | 5,95 | 255 /353 | 755,203 | 301(100) | кверцетин-3- <i>O</i> -дирамнозил-хексозид | | | | | | | | | | | | X | | | |
| 25. | 6,00 | | 335,076 | 161(75)/ 133(100)/ 135(25) | кафеоилшникмска киселина | | X | X | X | | | | | | | | | | | |
| 26. | 6,05 | 326 | 381,117 | 161(100) | етил-4- <i>O</i> -кафеоилхинат | X | X | X | X | | | | X | | | | | X | | |
| 27. | 6,23 | 329 | 367,102 | 179(10)/ 161(25)/ 135(100) | метил-5- <i>O</i> -кафеоилхинат | X | X | X | X | | X | X | X | X | X | X | | Tr | | |
| 28. | 6,32 | 255 /353 | 595,128 | 301(100) | кверцетин-пентозил- хексозид | | | | | | | | | | | | X | | | |
| 29. | 6,41 | 266 /249 | 739,201 | 285(100) | кемферол-3- <i>O</i> - дирамнозил-хексозид | | | | | | | | | | | | X | | | |
| 30. | 6,42 | | 355,102 | 193(60)/ 149(75)/ 134(100) | ферулна киселина- хексозид | | | | | | | | | | | X | | | | |
| 31. | 6,55 | 280 | 441,173 | 175(100) | (-)-епикатехин галат | | | | | | | | | | | | | | | X |
| 32. | 6,61 | 312 | 351,11 | 145(100)/ 117(70) | метил-4- <i>O-p</i> -кумароилхинат (изомер 2) | | | | | | | | X | | X | X | | | | |
| 33. | 6,64 | | 595,128 | 301 | кверцетин-3- <i>O</i> -пентозил- хексозид (1) | | | | | | | | | | | | | X | | |
| 34. | 6,74 | 257 /354 | 609,1470 | 301 | кверцетин-3- <i>O</i> -рутинозид | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 35. | 6,90 | | 595,128 | 301 | кверцетин-3- <i>O</i> -пентозил- хексозид (2) | | | | | | | | | | | | | | | |
| 36. | 6,93 | | 463,082 | 301 | кверцетин-3- <i>O</i> -галактозид | | Tr | X | X | | | | | | | | | | X | |
| 37. | 7,02 | | 463,082 | 301 | кверцетин-3- <i>O</i> -глукозид | | Tr | X | Tr | Tr | Tr | X | | | | | | | X | |
| 38. | 7,29 | | 351,11 | 163(15)/ 145(40)/ 117(100) | метил-5- <i>O-p</i> -кумароилхинат (изомер 1) | | | | | | | | | | X | X | | | | |
| 39. | 7,34 | | 433,0761 | 301 | кверцетин-пентозид (1) | | | | | X | X | X | | | | | | | | |
| 40. | 7,34 | | 609,1470 | 301 | кверцетин-3- <i>O</i> -рамнозил- хексозид | | | | | X | X | X | | | | | | | | |
| 41. | 7,44 | 266 /347 | 593,1473 | 285 | кемферол-3- <i>O</i> -рутинозид | X | Tr | X | X | | | | | | X | X | X | | | |

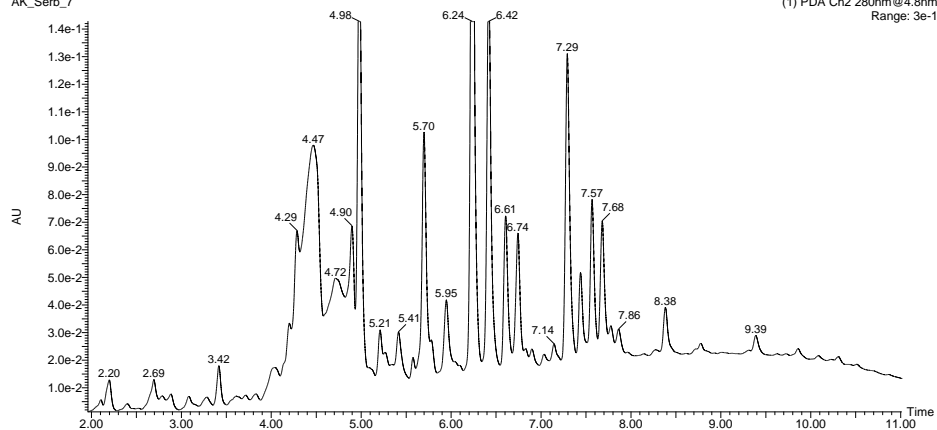
| | t_R UPLC (min) | λ_{max} (nm) | MS ¹ (<i>m/z</i>) | MS/MS (intensity) (<i>m/z</i>) | Једињење | шљива | влашката | тургуља | белошљива | црвенол. ринглов | црвени ринглов | бели ринглов | гајена трешња | дивља трешња | вишња | степска вишња | магрива | трњина | бресква | кајсија |
|-----|------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|---|-------|----------|---------|-----------|---------------------|-------------------|-----------------|------------------|-----------------|-------|------------------|---------|--------|---------|---------|
| 42. | 7,58 | 255 /355 | 623,1501 | 315 | изорамнетин-3- <i>O</i> - рутинозид | X | X | Tr | Tr | | Tr | | | | X | X | | | X | |
| 43. | 7,64 | | 609,1470 | 301 | кверцетин-3- <i>O</i> -рамнозил- хексозид | | | | | X | X | X | | | | | | | | |
| 44. | 7,66 | | 433,0718 | 301 | кверцетин-пентозид (2) | | | | | X | X | X | | | | | | | | |
| 45. | 7,68 | | 351,11 | 163(10)/ 145(35)/ 117(100) | метил-5- <i>O-p</i> - кумароилхинат (изомер 2) | | | | | | | | | | | X | | | | |
| 46. | 7,80 | | 447,092 | 301 | кверцетин-рамнозид | | | | | X | | X | | | | | | | | |
| 47. | 7,98 | | 505,102 | 301 | кверцетин- ацетилхексозид | | | | | | | | | | | | | | | X |
| 48. | 10,08 | | 301,036 | 151(80)/ 121(100)/ 107(85) | кверцетин | | | | | X | X | X | X | | | | | X | | |
| 49. | | | 611,1577 | 287,0562 | цијанидин-3- <i>O</i> -софорозид | | | | | | | | | | X | X | | | | |
| 50. | 4,32 | | 757,2159 | 611,1577 / 287,0527 | цијанидин-3- <i>O</i> -(2'- глукозил)рутинозид | | | | | | | | | | X | X | | | | |
| 51. | 4,50 | | 449,1049 | 287,0527 | цијанидин-3- <i>O</i> -глукозид | | | X | | | | | X | X | X | X | X | X | Tr | |
| 52. | 4,53 | | 727,2068 | 595,1670 / 449,1092 / 287,0562 | цијанидин-3- <i>O</i> -(2'- ксилозил)рутинозид | | | | | | | | | | X | X | X | | | |
| 53. | 4,71 | | 595,167 | 287,0562 | цијанидин-3- <i>O</i> -рутинозид | | X | X | | X | Tr | | X | X | X | X | X | X | | |
| 54. | 5,14 | | 579,1716 | 433,1103 / 271,0618 | пеларгонидин-3- <i>O</i> - рутинозид | | | | | | | | X | X | | | | | | |
| 55. | 5,25 | | 463,1239 | 301,0691 | пеонидин-3- <i>O</i> -глукозид | | | Tr | | | | | | | | | | X | | |
| 56. | 5,36 | | 609,182 | 301,0709 | пеонидин-3- <i>O</i> -рутинозид | Tr | X | X | | | | | X | X | X | X | | X | | |

Прилог 2. HPLC-PDA хроматограми екстракта воћа рода *Prunus* на 280 nm, 320 nm и 360 nm

Шљива (*P. domestica* cv. Чачанска родна)

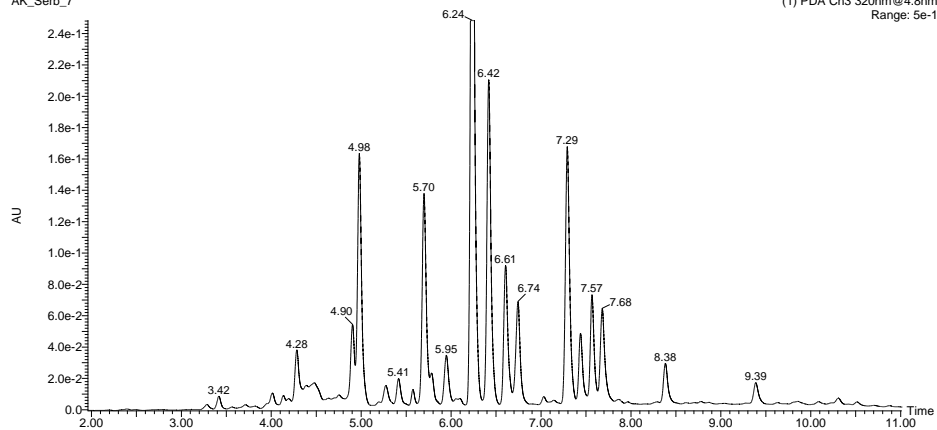
28-10-2019

AK_Serb_7



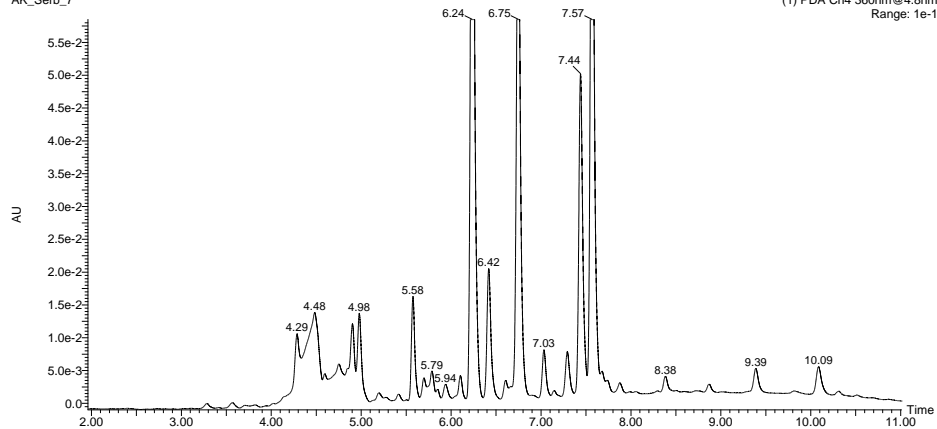
28-10-2019

AK_Serb_7

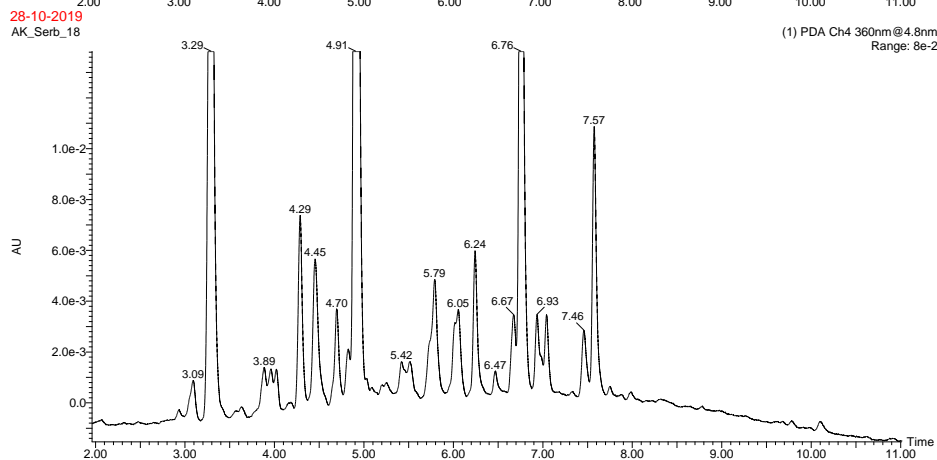
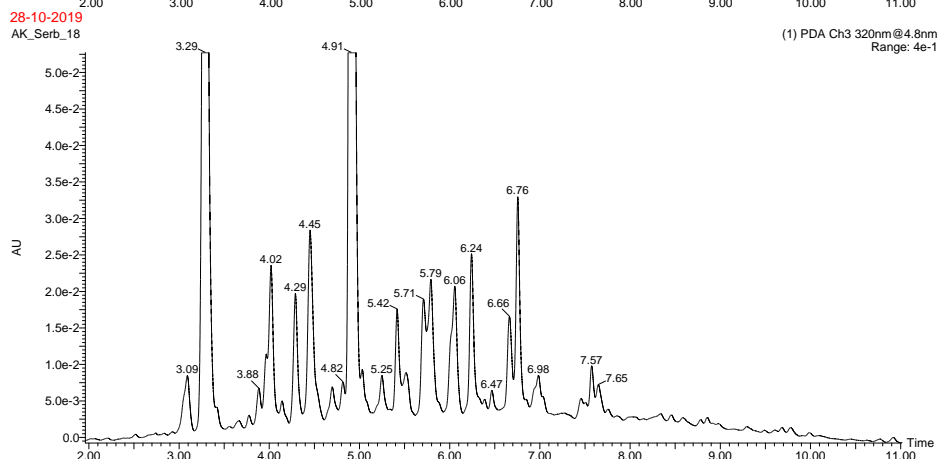
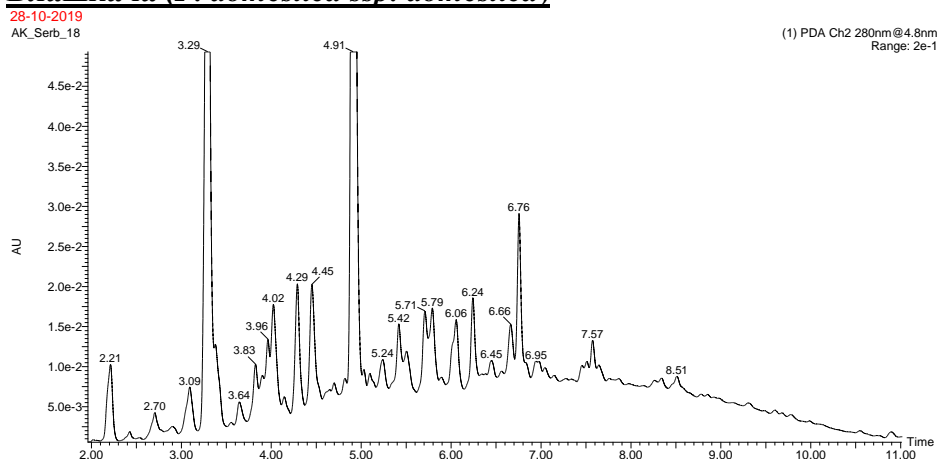


28-10-2019

AK_Serb_7



Влашкача (*P. domestica* ssp. *domestica*)

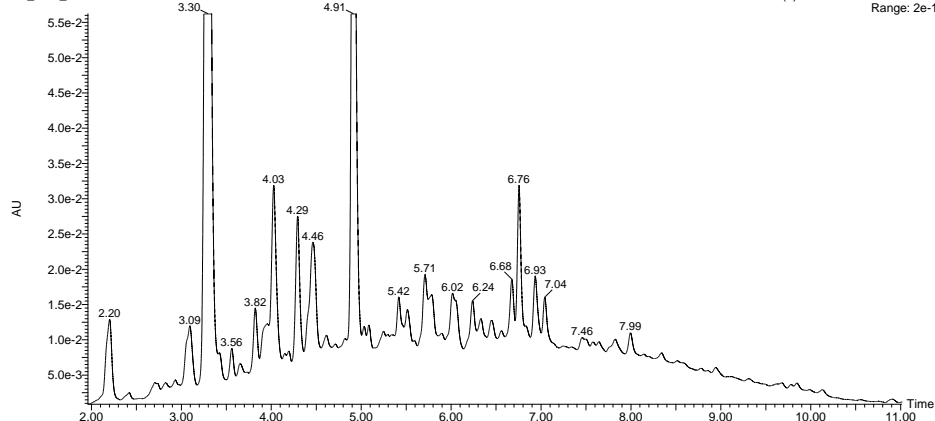


Тургуња (*P. domestica ssp. insititia*)

28-10-2019

AK_Serb_17

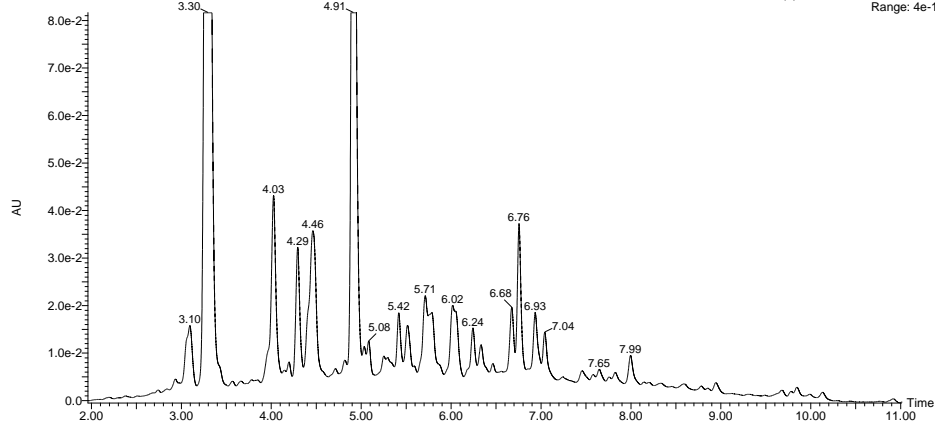
(1) PDA Ch2 280nm@4.8nm
Range: 2e-1



28-10-2019

AK_Serb_17

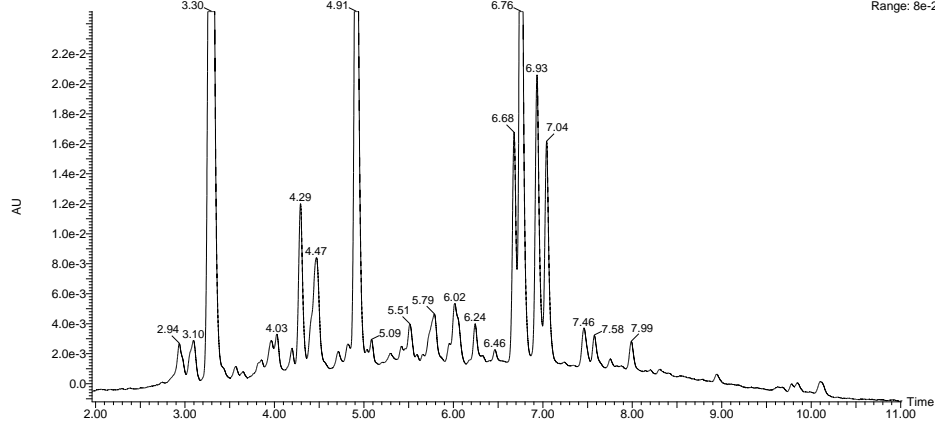
(1) PDA Ch3 320nm@4.8nm
Range: 4e-1



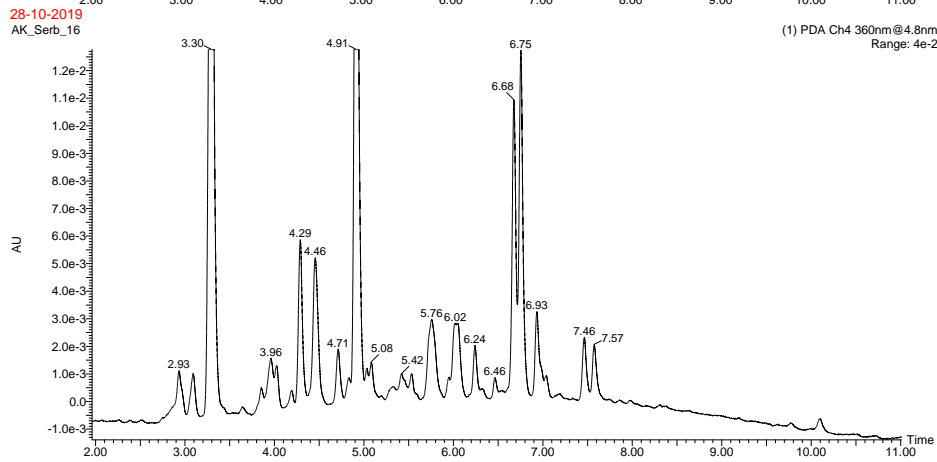
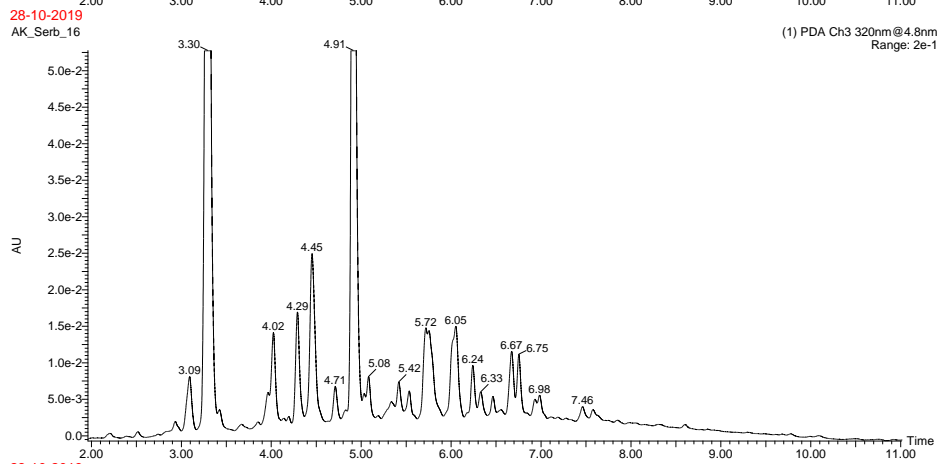
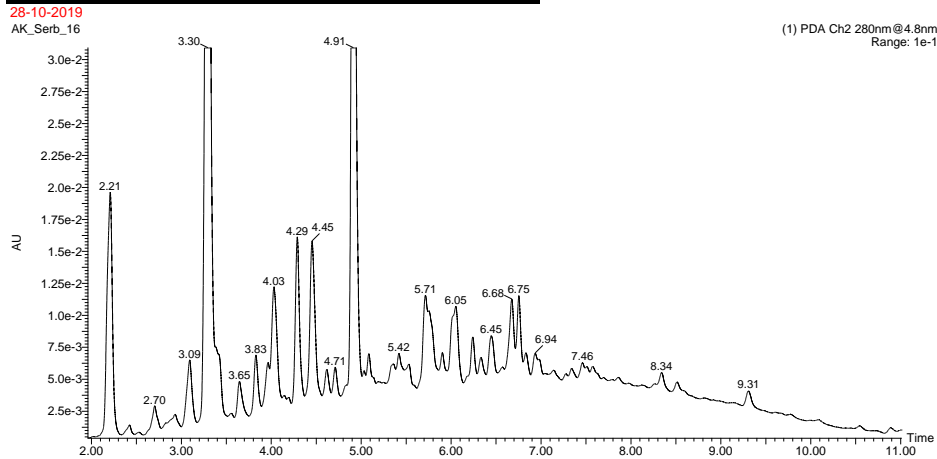
28-10-2019

AK_Serb_17

(1) PDA Ch4 360nm@4.8nm
Range: 8e-2



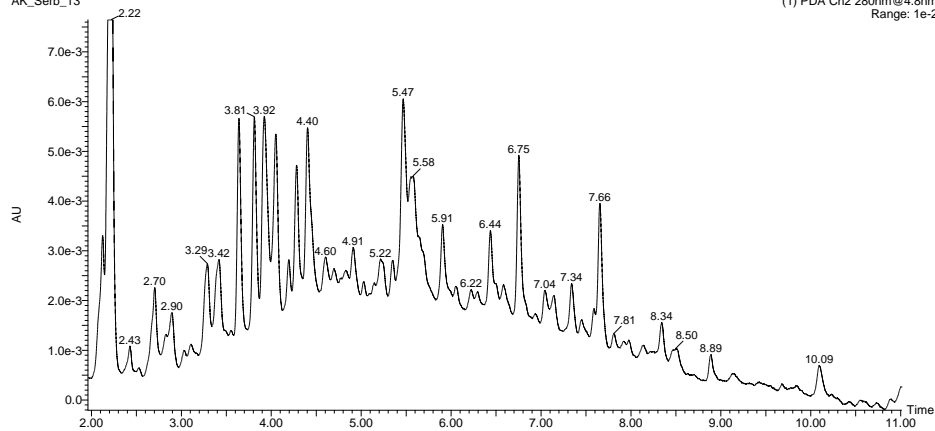
Белошљива (*P. domestica ssp. insititia*)



Црвенолисни ринглов (*P. pissardi*)

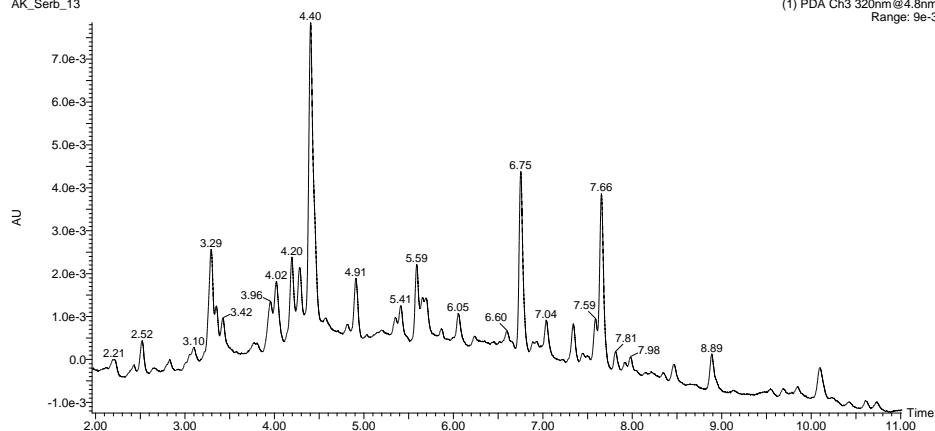
28-10-2019
AK_Serb_13

(1) PDA Ch2 280nm@4.8nm
Range: 1e-2



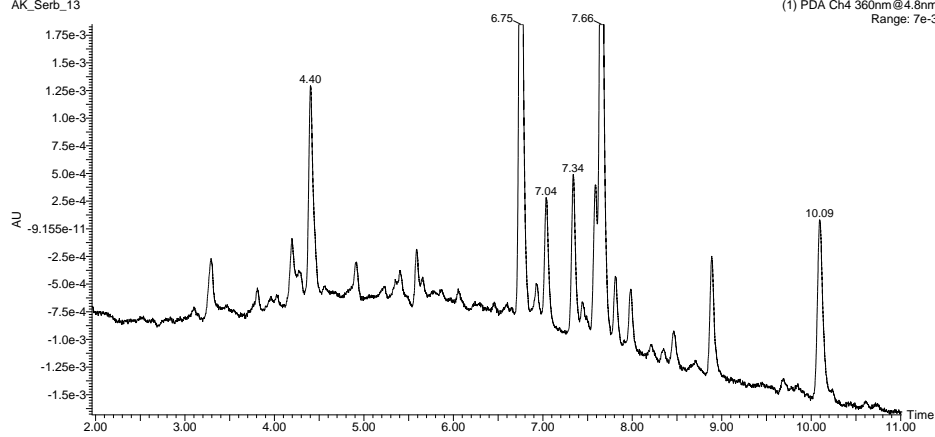
28-10-2019
AK_Serb_13

(1) PDA Ch3 320nm@4.8nm
Range: 9e-3



28-10-2019
AK_Serb_13

(1) PDA Ch4 360nm@4.8nm
Range: 7e-3

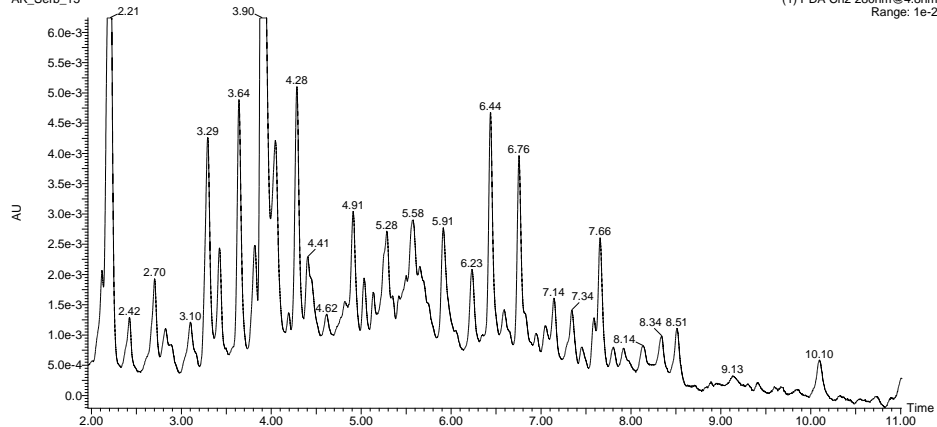


Црвени ринглов (*P. cerasifera*)

28-10-2019

AK_Serb_15

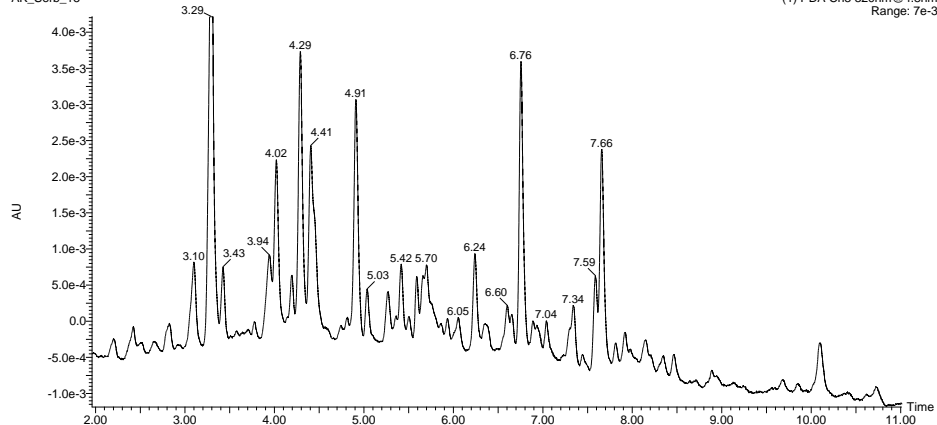
(1) PDA Ch2 280nm@4.8nm
Range: 1e-2



28-10-2019

AK_Serb_15

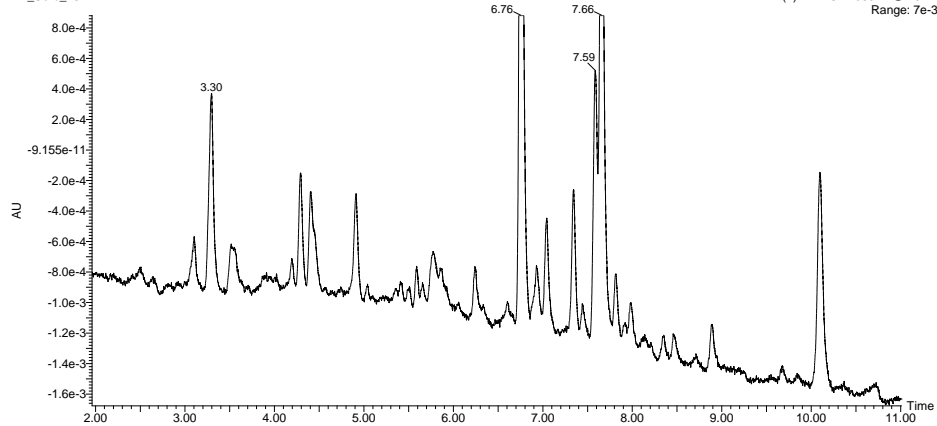
(1) PDA Ch3 320nm@4.8nm
Range: 7e-3



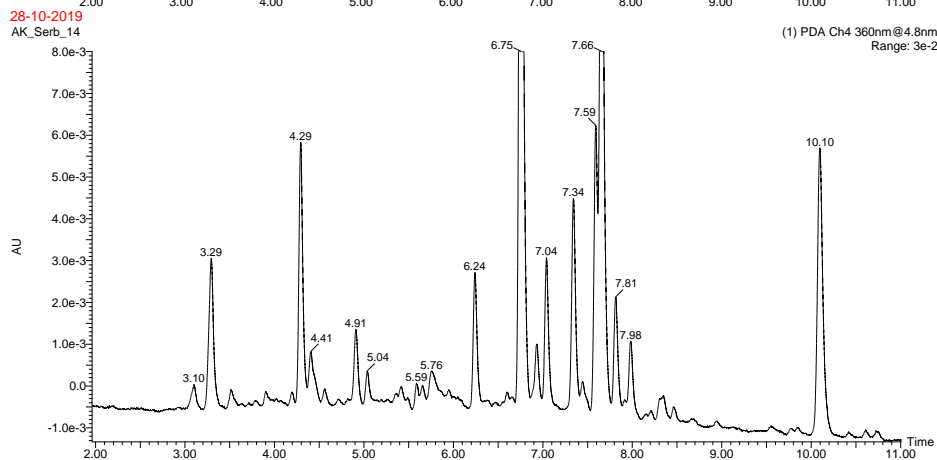
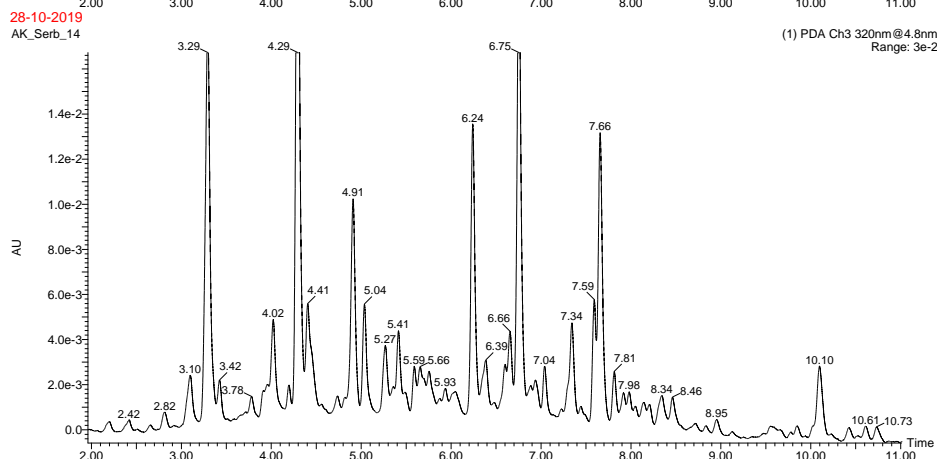
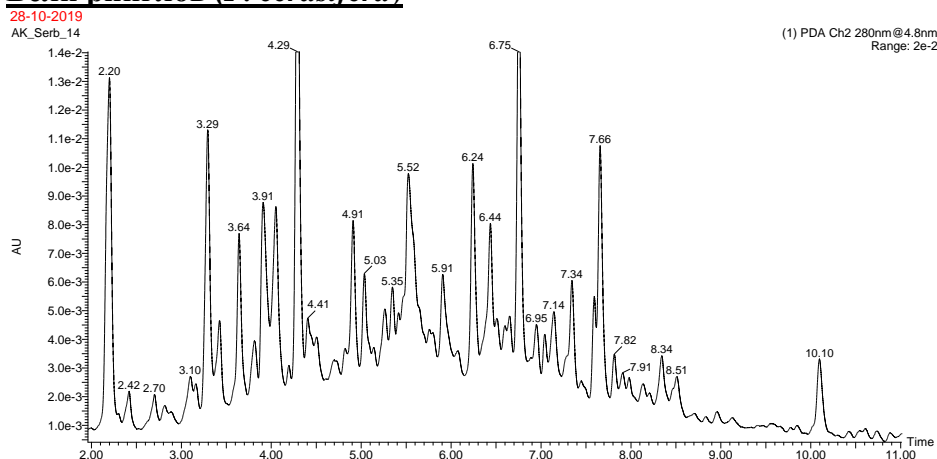
28-10-2019

AK_Serb_15

(1) PDA Ch4 360nm@4.8nm
Range: 7e-3



Бели ринглов (*P. cerasifera*)

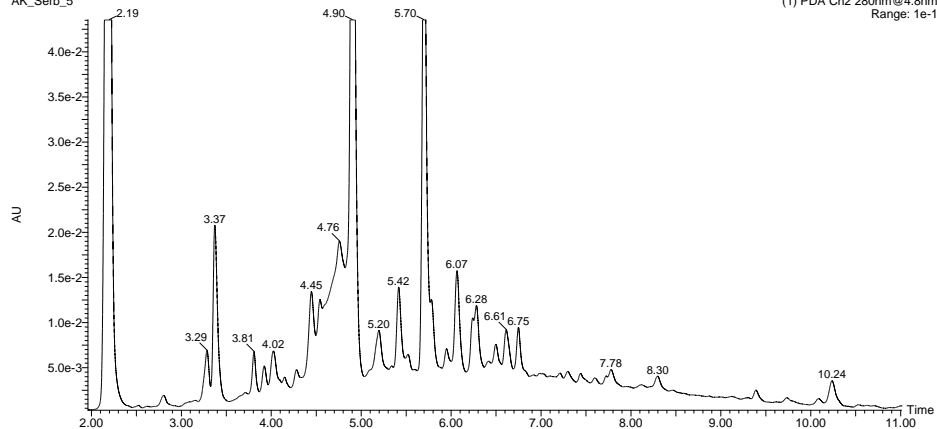


Трешња (*P. avium* cv. New star)

28-10-2019

AK_Serb_5

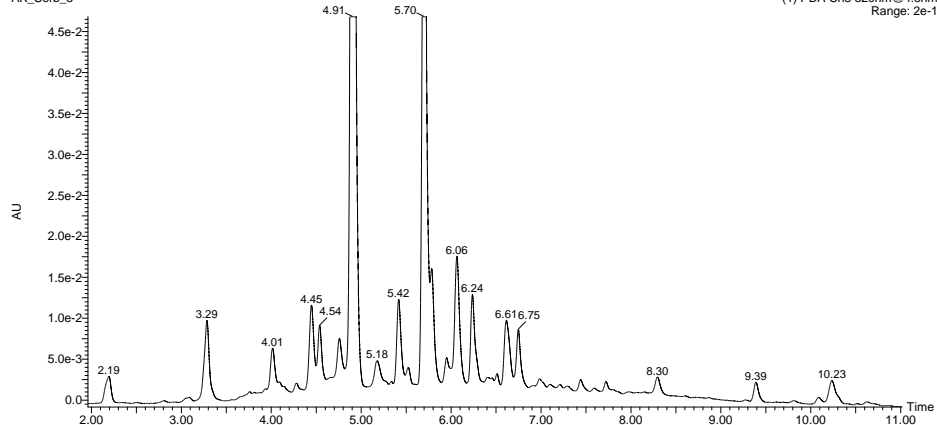
(1) PDA Ch2 280nm@4.8nm
Range: 1e-1



28-10-2019

AK_Serb_5

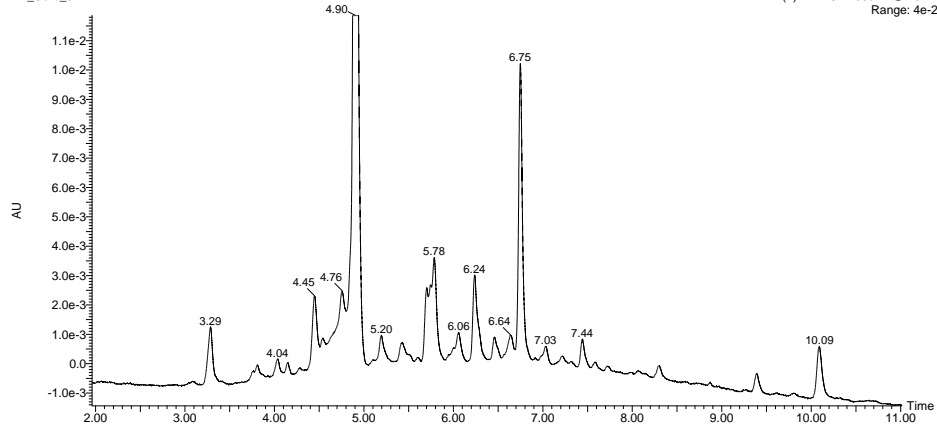
(1) PDA Ch3 320nm@4.8nm
Range: 2e-1



28-10-2019

AK_Serb_5

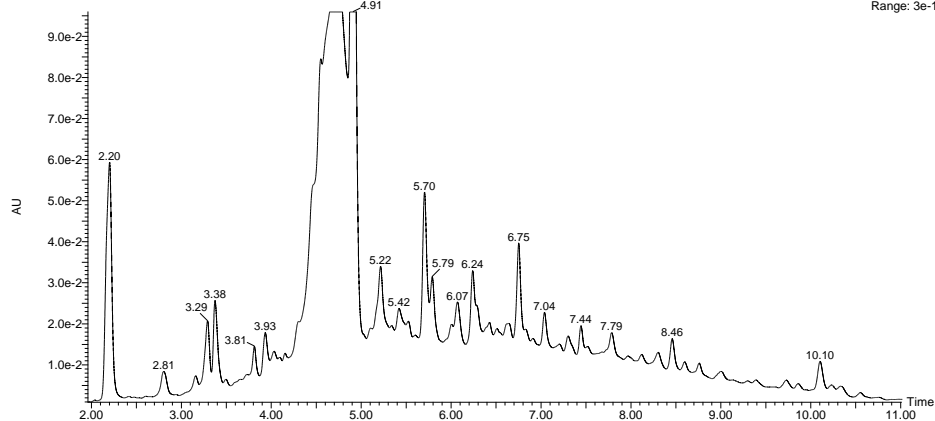
(1) PDA Ch4 360nm@4.8nm
Range: 4e-2



Дивља трешња (*P. avium*)

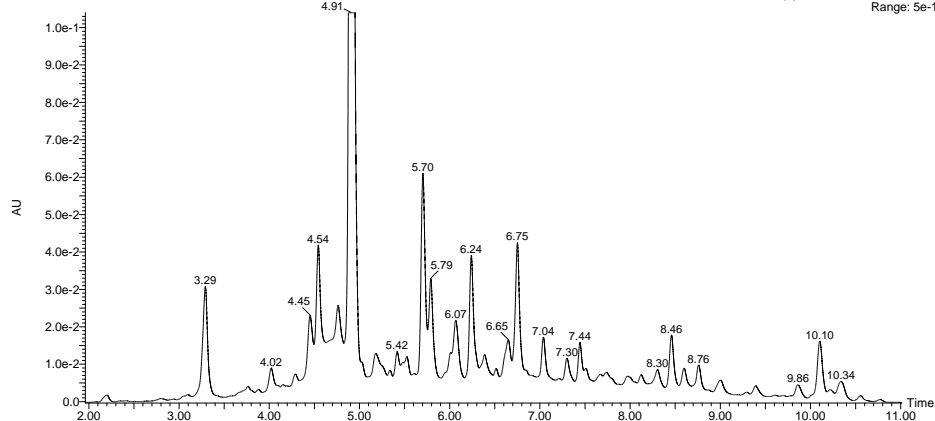
28-10-2019
AK_Serb_11

(1) PDA Ch2 280nm@4.8nm
Range: 3e-1



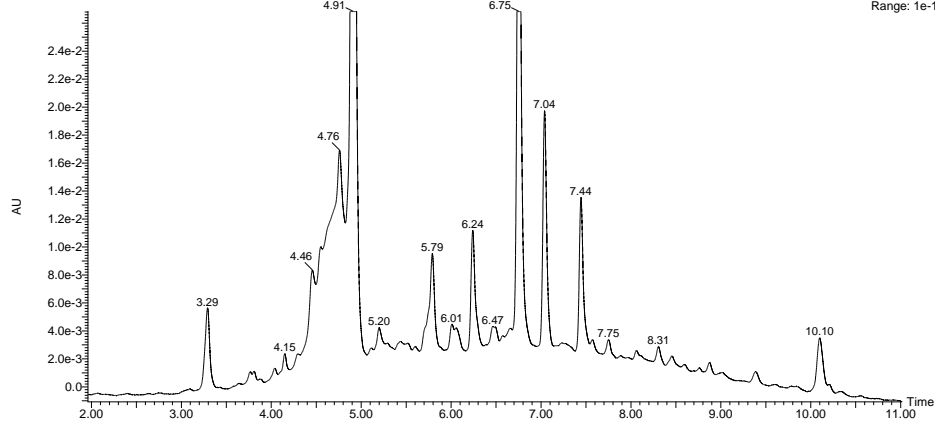
28-10-2019
AK_Serb_11

(1) PDA Ch3 320nm@4.8nm
Range: 5e-1



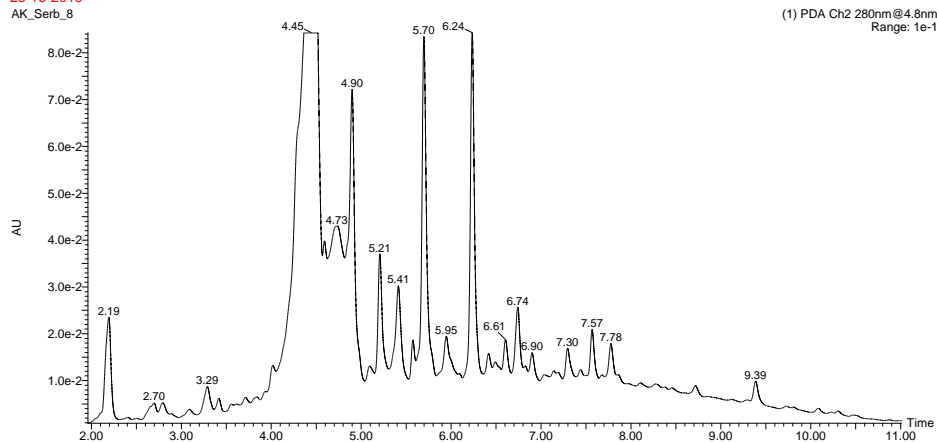
28-10-2019
AK_Serb_11

(1) PDA Ch4 360nm@4.8nm
Range: 1e-1

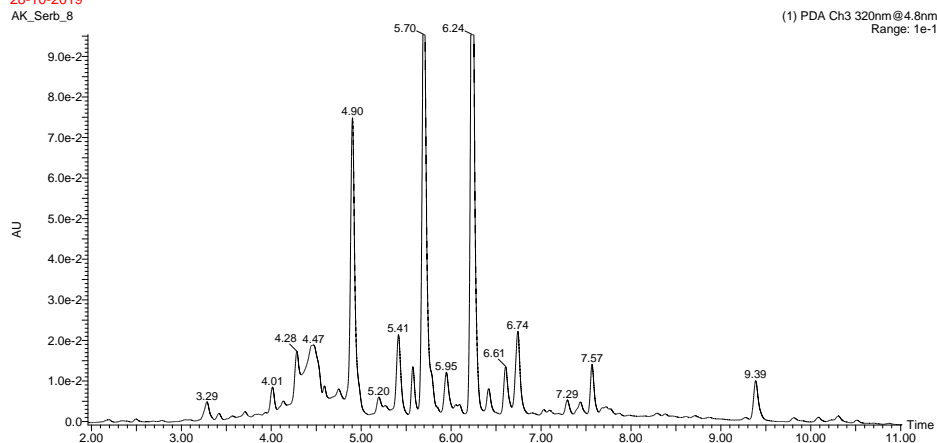


Вишња (*P. cerasus* cv. Облачинска)

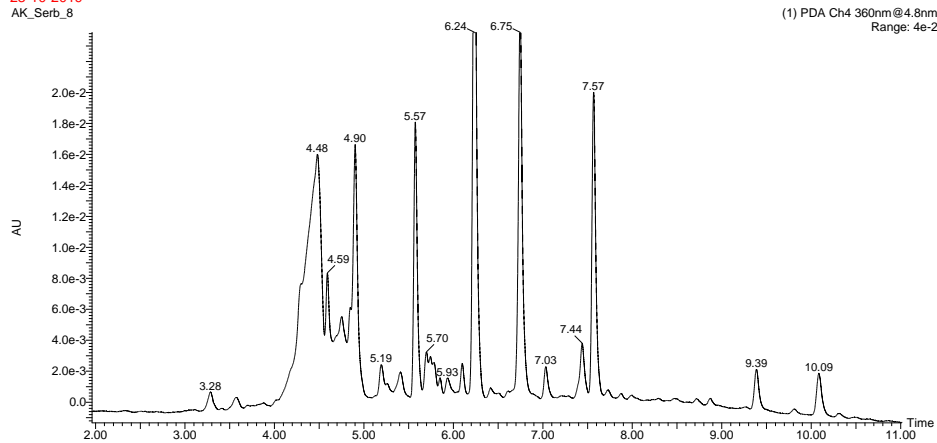
28-10-2019
AK_Serb_8



28-10-2019
AK_Serb_8



28-10-2019
AK_Serb_8

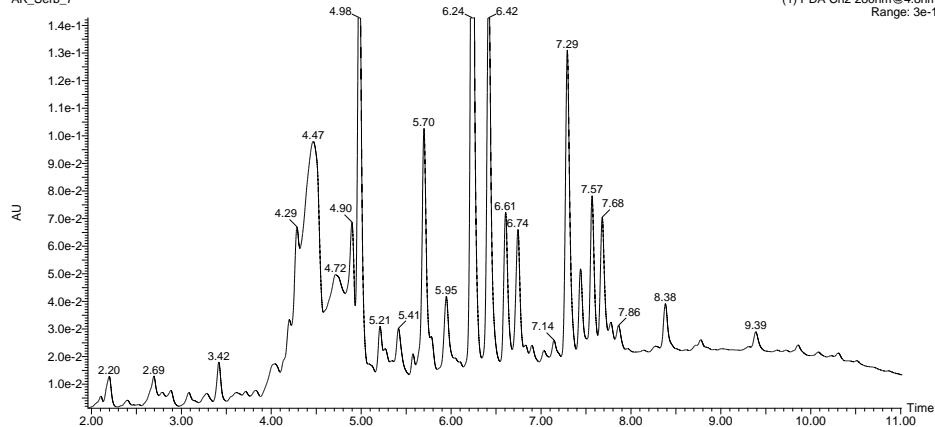


Степска вишња (*P. fruticosa*)

28-10-2019

AK_Serb_7

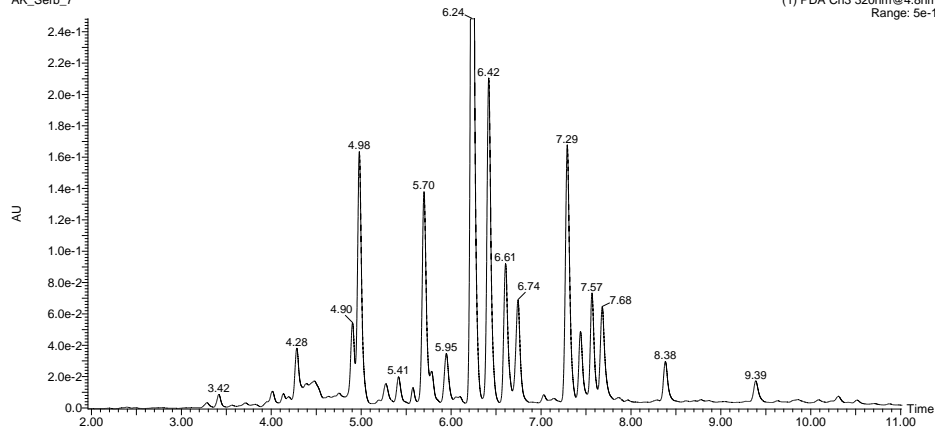
(1) PDA Ch2 280nm@4.8nm
Range: 3e-1



28-10-2019

AK_Serb_7

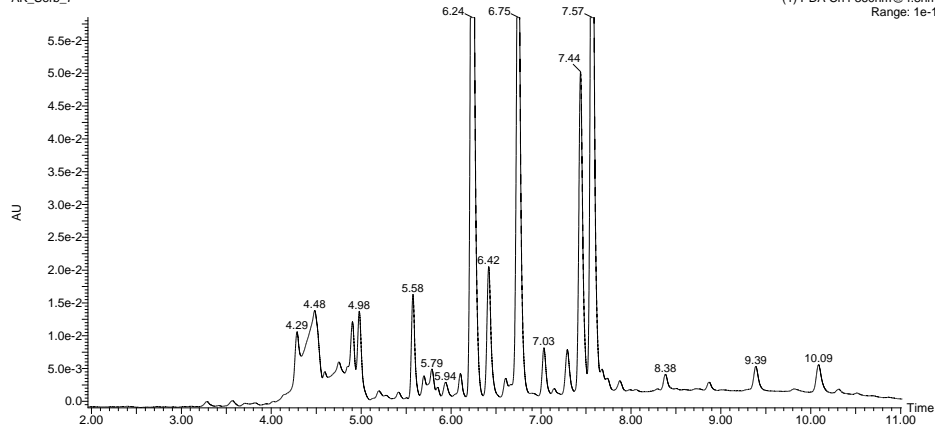
(1) PDA Ch3 320nm@4.8nm
Range: 5e-1



28-10-2019

AK_Serb_7

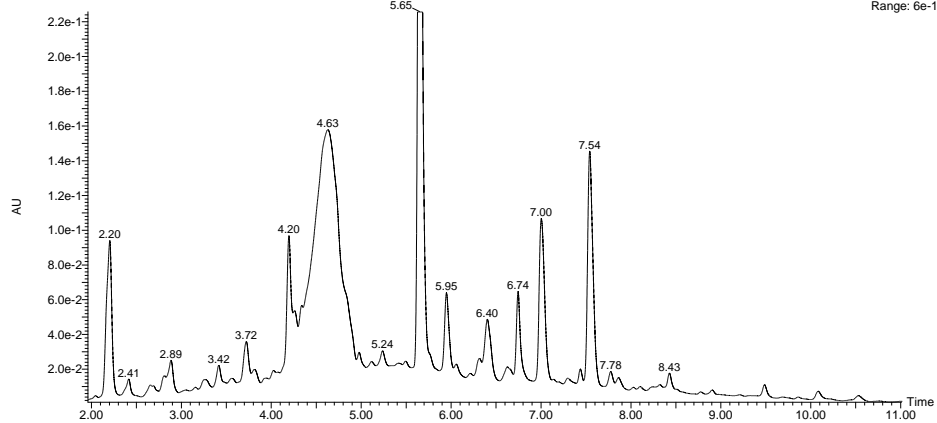
(1) PDA Ch4 360nm@4.8nm
Range: 1e-1



Магрива (*P. mahaleb*)

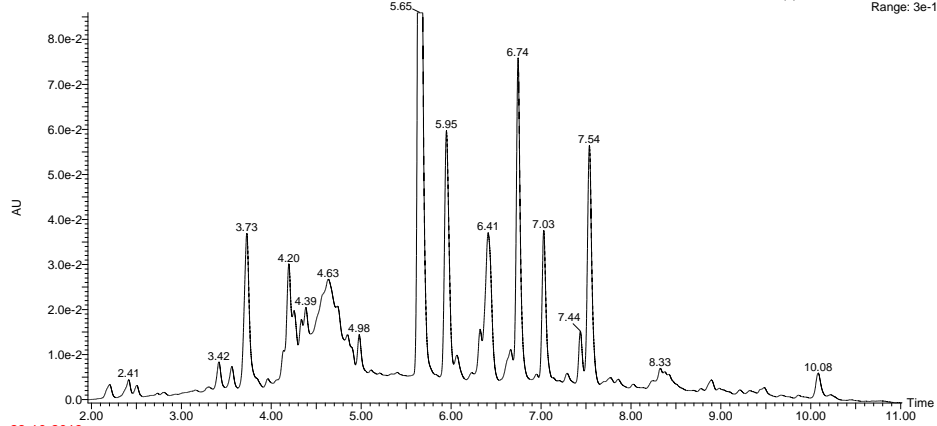
28-10-2019
AK_Serb_6

(1) PDA Ch2 280nm@4.8nm
Range: 6e-1



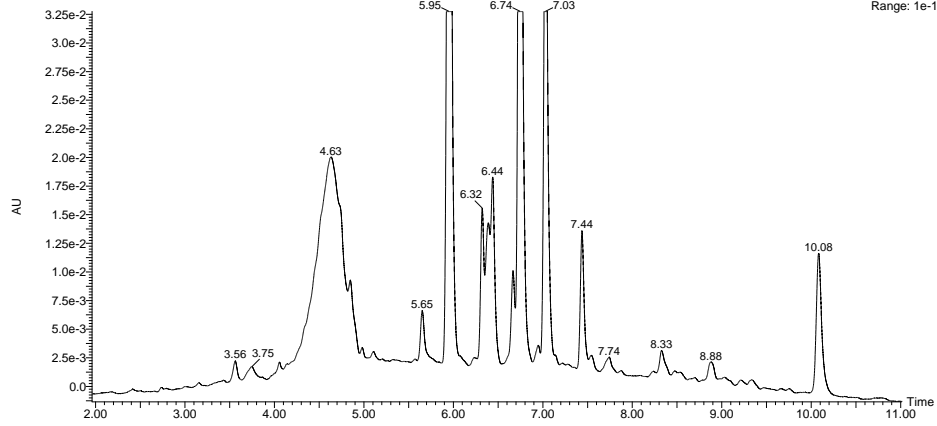
28-10-2019
AK_Serb_6

(1) PDA Ch3 320nm@4.8nm
Range: 3e-1



28-10-2019
AK_Serb_6

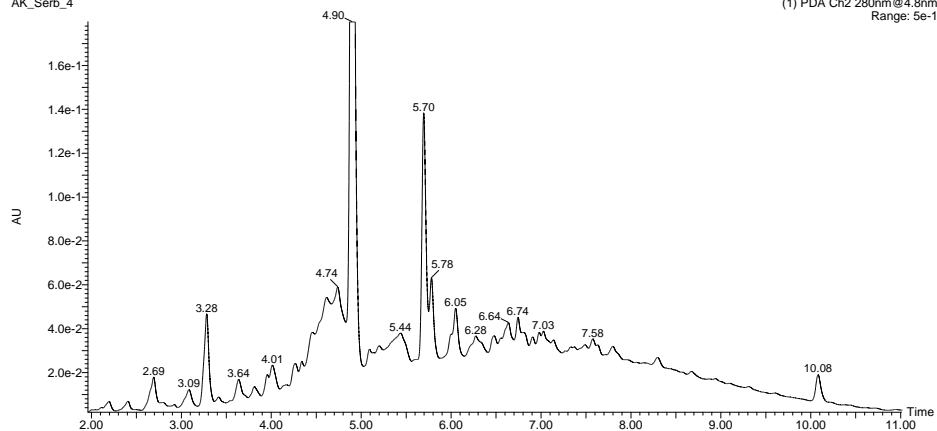
(1) PDA Ch4 360nm@4.8nm
Range: 1e-1



Трњина (*P. spinosa*)

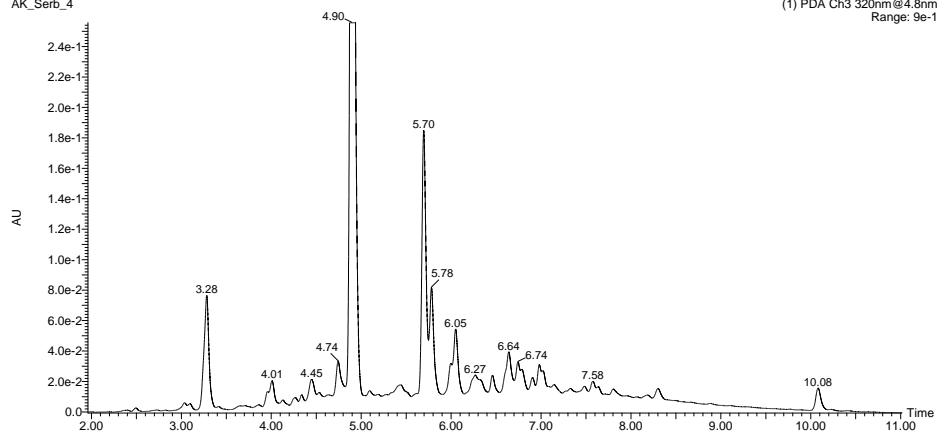
28-10-2019
AK_Serb_4

(1) PDA Ch2 280nm@4.8nm
Range: 5e-1



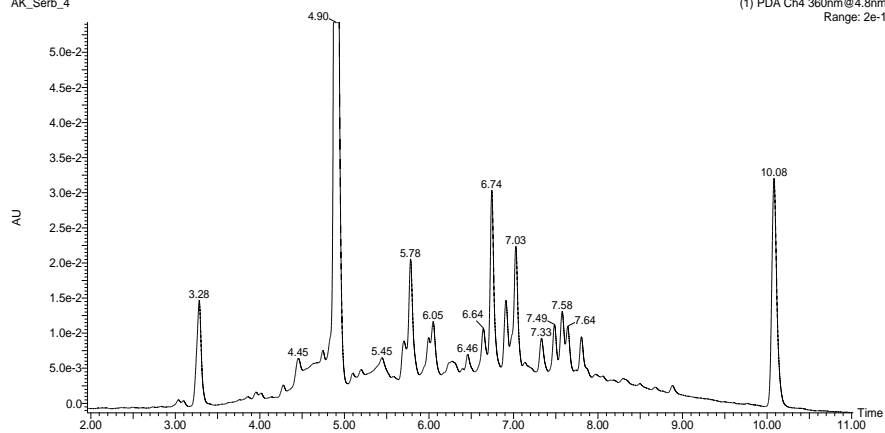
28-10-2019
AK_Serb_4

(1) PDA Ch3 320nm@4.8nm
Range: 9e-1

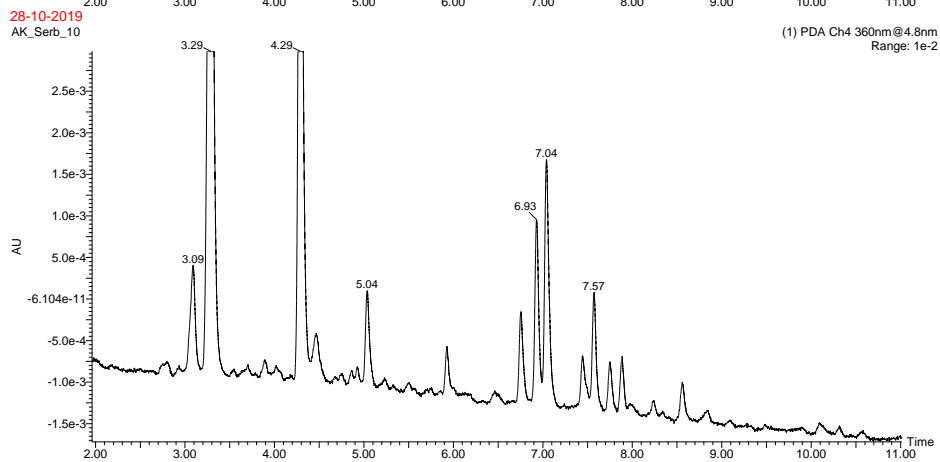
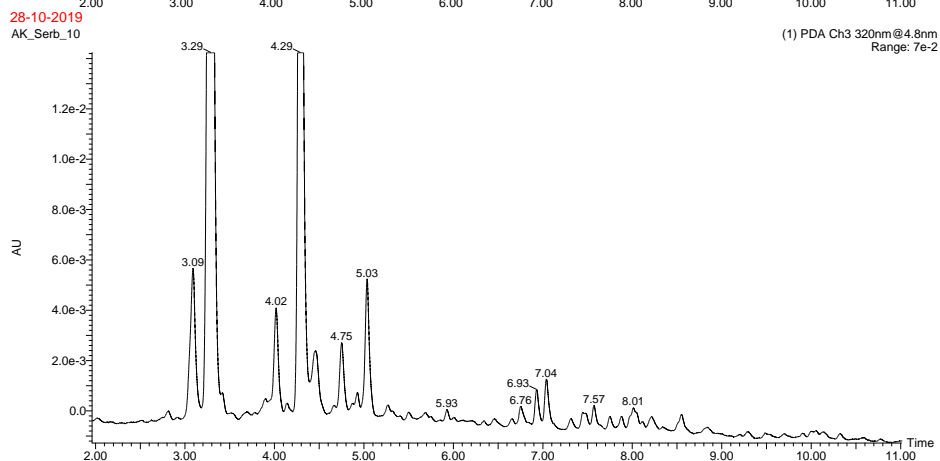
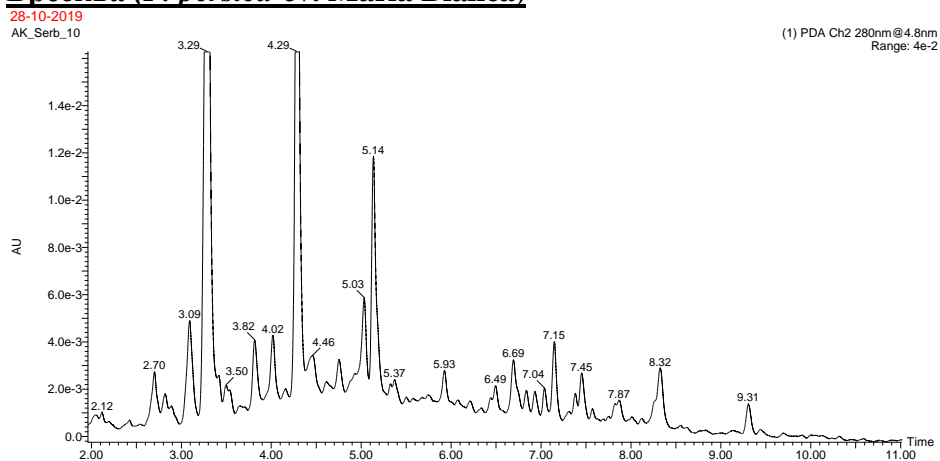


28-10-2019
AK_Serb_4

(1) PDA Ch4 360nm@4.8nm
Range: 2e-1



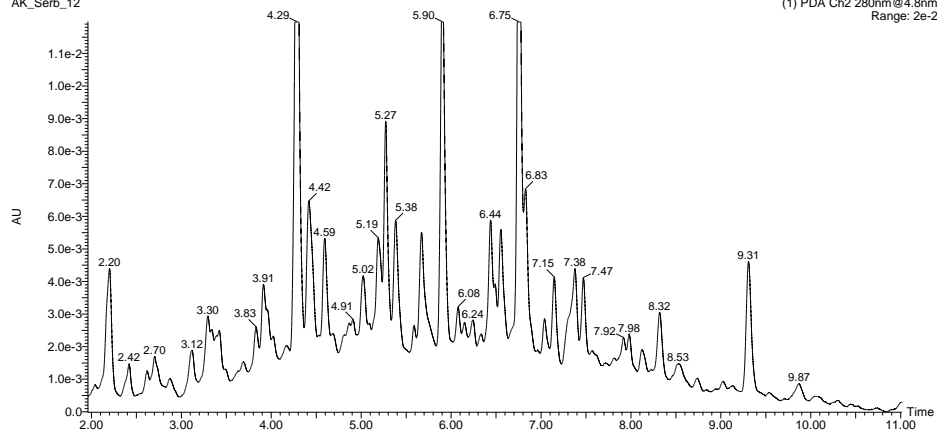
Бресква (*P. persica* cv. Maria Bianca)



Кајсија (*P. armeniaca* cv. Buda)

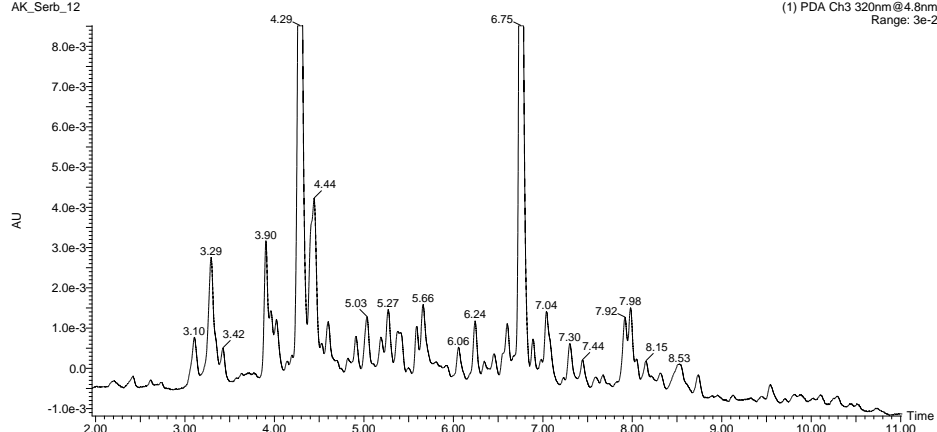
28-10-2019
AK_Serb_12

(1) PDA Ch2 280nm@4.8nm
Range: 2e-2



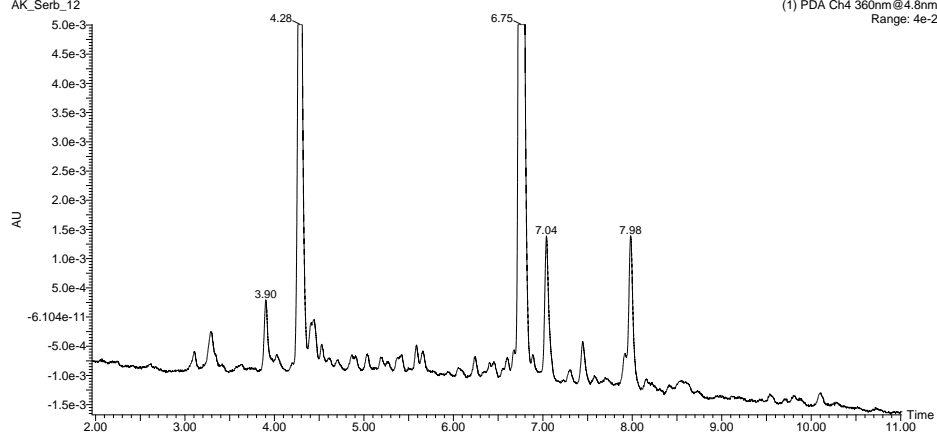
28-10-2019
AK_Serb_12

(1) PDA Ch3 320nm@4.8nm
Range: 3e-2



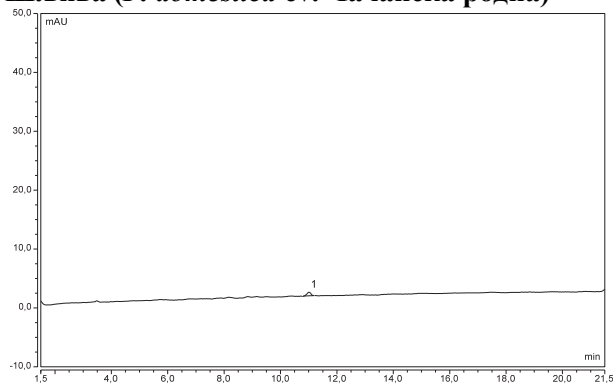
28-10-2019
AK_Serb_12

(1) PDA Ch4 360nm@4.8nm
Range: 4e-2



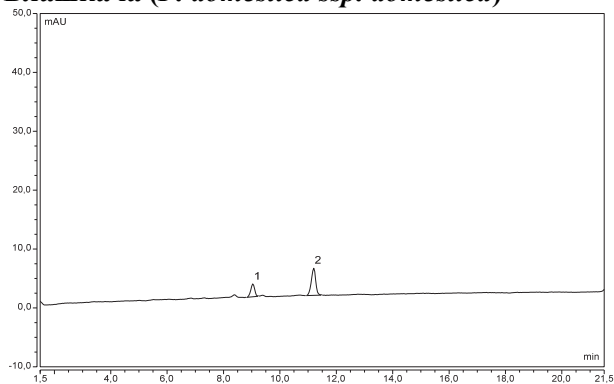
Прилог 3. HPLC-PDA хроматограми (520 nm) квантитативне анализе антоцијана у екстрактима воћа рода *Prunus*

Шљива (*P. domestica* cv. Чачанска родна)



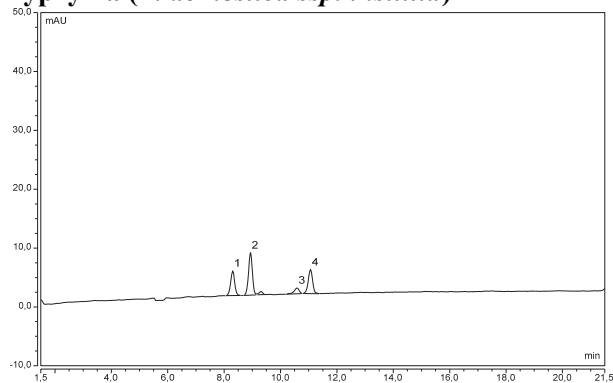
1 – Pn 3-rut

Влашкача (*P. domestica* ssp. *domestica*)



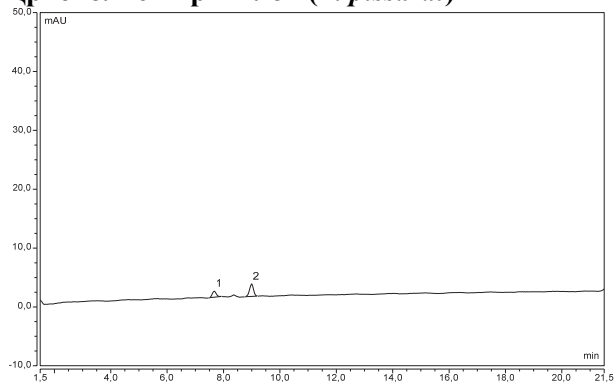
1 – Cy 3-rut; 2 – Pn 3-rut

Тургуња (*P. domestica* ssp. *insititia*)



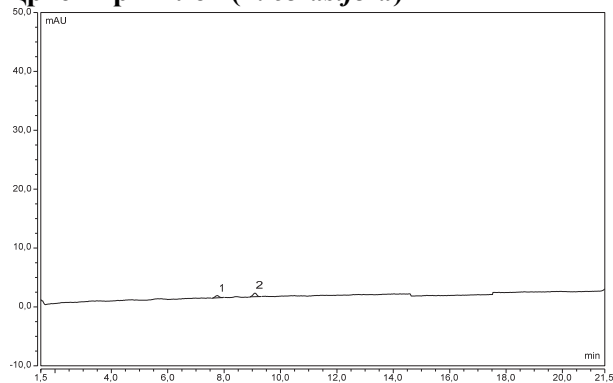
1 – Cy-3-gal; 2 – Cy 3-rut; 3 – Pn 3-glc; 4 – Pn 3-rut

Црвенолисни ринглов (*P. pissardi*)



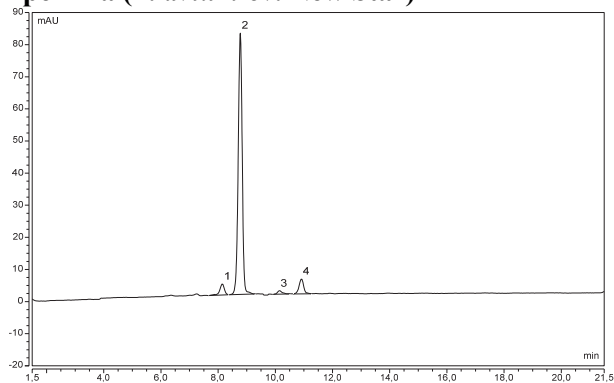
1 – Cy-3-gal; 2 – Cy-3-rut

Црвени ринглов (*P. cerasifera*)



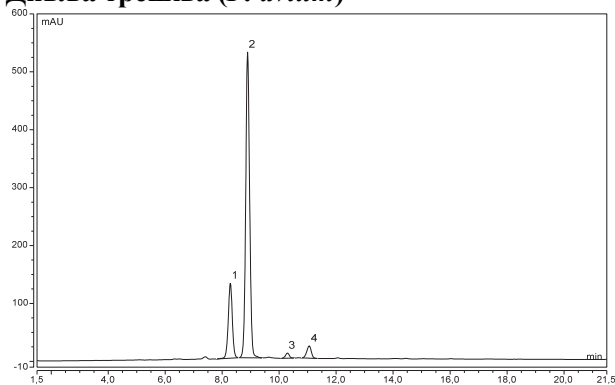
1 – Cy-3-gal; 2 – Cy-3-rut

Трешња (*P. avium* cv. *New Star*)



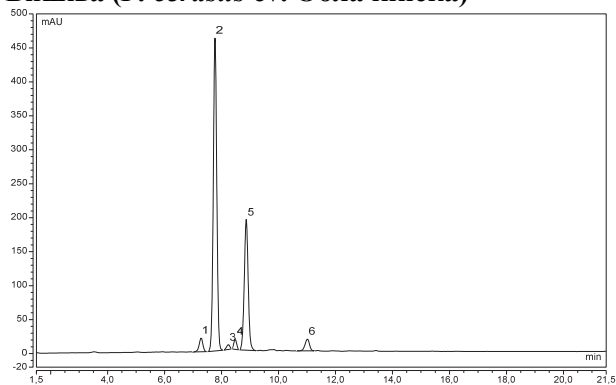
1 – Cy-3-glc; 2 – Cy-3-rut; 3 – Pg-3-rut; 4 – Pn-3-rut

Дивља трешња (*P. avium*)



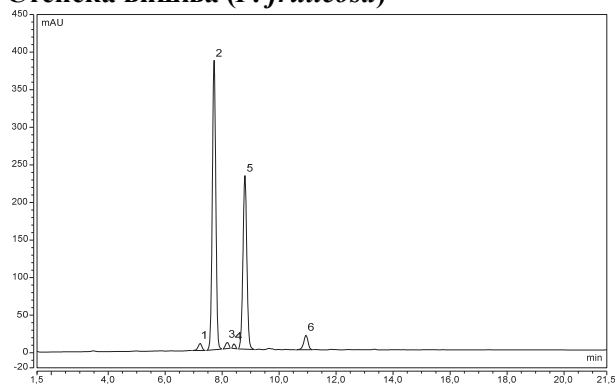
1 – Cy-3-glc; 2 – Cy-3-rut; 3 – Pg-3-rut; 4 – Pn-3-rut

Вишња (*P. cerasus* cv. Облачинска)



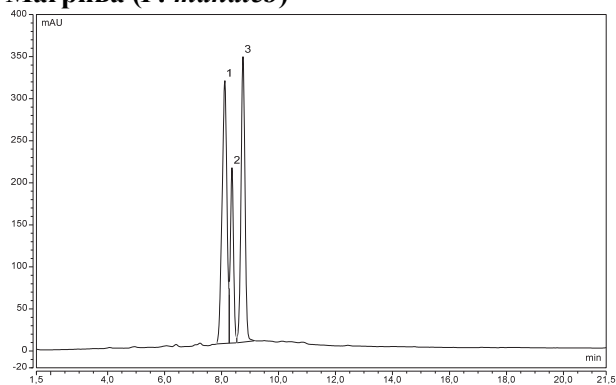
1 – Cy-3-sof; 2 – Cy-3-glc-rut; 3 – Cy-3-glc; 4 – Cy-3-xyl-rut; 5 – Cy-3-rut; 6 – Pn-3-rut

Степска вишња (*P. fruticosa*)



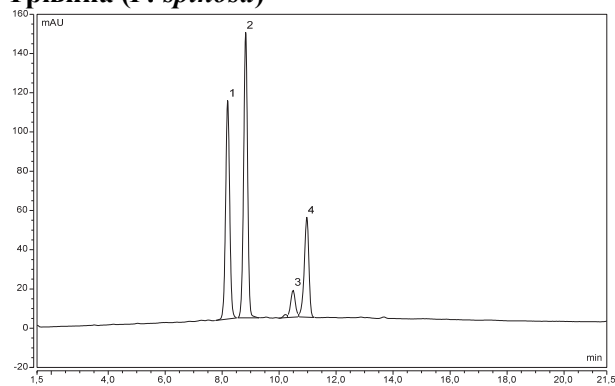
1 – Cy-3-sof; 2 – Cy-3-glc-rut; 3 – Cy-3-glc; 4 – Cy-3-xyl-rut; 5 – Cy-3-rut; 6 – Pn-3-rut

Магрива (*P. mahaleb*)



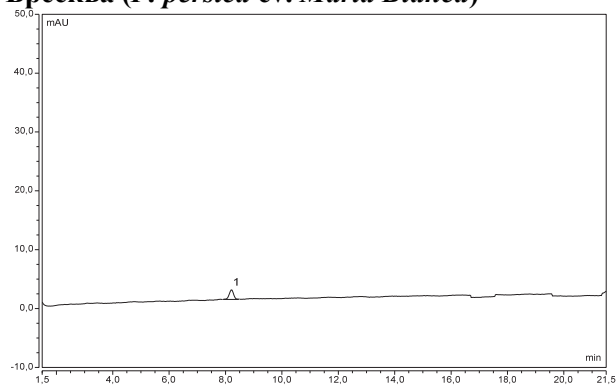
1 – Cy-3-glc; 2 – Cy-3-xyl-rut; 3 – Cy-3-rut

Трњина (*P. spinosa*)



1 – Cy-3-glc; 2 – Cy-3-rut; 3 – Pn-3-glc; 4 – Pn-3-rut

Бресква (*P. persica* cv. *Maria Bianca*)



1 – Cy-3-glc

Белошљива (*P. domestica* ssp. *insititia*)

Н.Д.

Бели ринглов (*P. cerasifera*)

Н.Д.

Кајсија (*P. armeniaca* cv. *Buda*)

Н.Д.

Прилог 4. UV спектри пикова детектованих у екстракту магриве и стандарда *o*-, *m*- и *p*-кумаринске киселине.

| | | |
|---|--|---|
| | | |
| <p>UV спектар једињења бр. 3 у табели у Прилогу 1. ($t_{UPLC} = 3,73 \text{ min}$)</p> | <p>UV спектар једињења бр. 20 у табели у Прилогу 1. ($t_{UPLC} = 5,65 \text{ min}$)</p> | |
| | | |
| <p>UV спектар стандарда <i>o</i>-кумаринске киселине.</p> | <p>UV спектар стандарда <i>m</i>-кумаринске киселине.</p> | <p>UV спектар стандарда <i>p</i>-кумаринске киселине.</p> |

Прилог 6. РСА анализа воћа рода *Prunus*

Табела П6.1. Карактеристичне вредности и проценат објашњење варијабилности

| Фактор | Карактеристична вредност (<i>енг.</i> eigenvalue) | Објашњена варијабилност (%) | Кумулатив карактеристичних вредности | Кумулатив објашњене варијабилности (%) |
|--------|---|-----------------------------|--------------------------------------|--|
| 1 | 16,587 | 36,86 | 16,587 | 36,86 |
| 2 | 9,225 | 20,50 | 25,812 | 57,36 |
| 3 | 8,788 | 19,53 | 34,600 | 76,89 |
| 4 | 3,054 | 6,79 | 37,654 | 83,68 |
| 5 | 2,792 | 6,21 | 40,446 | 89,88 |
| 6 | 1,682 | 3,74 | 42,128 | 93,62 |
| 7 | 1,366 | 3,04 | 43,494 | 96,65 |
| 8 | 0,678 | 1,51 | 44,173 | 98,16 |
| 9 | 0,327 | 0,73 | 44,499 | 98,89 |
| 10 | 0,304 | 0,68 | 44,803 | 99,56 |
| 11 | 0,102 | 0,23 | 44,906 | 99,79 |
| 12 | 0,052 | 0,11 | 44,957 | 99,91 |
| 13 | 0,031 | 0,07 | 44,988 | 99,97 |
| 14 | 0,012 | 0,03 | 45,000 | 100,00 |

Табела П6.2. Факторске координате варијабли

| Варијабла | Ф1 | Ф2 | Варијабла | Ф1 | Ф2 |
|-----------|--------|--------|---------------|--------|--------|
| 1 | 0,184 | -0,077 | 24 | 0,262 | -0,017 |
| 2 | 0,382 | -0,043 | 25 | -0,305 | -0,238 |
| 3 | -0,307 | -0,239 | 26 | -0,566 | 0,542 |
| 4 | -0,680 | -0,372 | 27 | -0,388 | -0,250 |
| 5 | -0,340 | 0,913 | 28 | -0,529 | -0,322 |
| 6 | -0,777 | -0,458 | 29 | -0,494 | 0,826 |
| 7 | -0,278 | -0,239 | 30 | -0,364 | 0,902 |
| 8 | -0,267 | -0,288 | 31 | -0,643 | 0,357 |
| 9 | -0,701 | -0,399 | 32 | -0,089 | 0,098 |
| 10 | -0,680 | -0,372 | 33 | -0,417 | -0,260 |
| 11 | -0,681 | -0,378 | 34 | -0,667 | -0,365 |
| 12 | -0,680 | -0,372 | TPA | -0,833 | 0,235 |
| 13 | -0,680 | -0,372 | TF | -0,827 | 0,464 |
| 14 | -0,340 | 0,913 | TA | -0,784 | 0,404 |
| 15 | -0,340 | 0,913 | TP | -0,899 | 0,385 |
| 16 | -0,340 | 0,913 | FC | -0,961 | -0,115 |
| 17 | 0,171 | -0,030 | FRAP | -0,974 | 0,055 |
| 18 | -0,799 | 0,352 | DPPH | -0,956 | -0,101 |
| 19 | -0,417 | -0,260 | HT29 | -0,615 | -0,600 |
| 20 | -0,571 | 0,734 | α -Amy | -0,583 | -0,338 |
| 21 | -0,189 | -0,225 | α -Gls | -0,912 | -0,165 |
| 22 | -0,795 | -0,084 | DPP III | -0,666 | -0,415 |
| 23 | -0,738 | -0,441 | | | |

Скраћенице: Бројеви 1–34 представљају фенолна једињења из табеле 4.1; FC – Folin-Ciocalteu редукциони тест, FRAP – капацитет редукције Fe^{3+} јона, DPPH – капацитет неутрализације DPPH радикала, HT-29 – антипролиферативна активност према ћелијама хуманог аденокарцинома дебелог црева, α -Amy – способност инхибиције α -амилазе, α -Gls – способност инхибиције α -глюкозидазе, DPP III – способност инхибиције дипептидил-пептидазе III.

Табела П6.3. Факторске координате испитиваних врста рода *Prunus*

| Узорак | Ф1 | Ф2 |
|---------------------|---------|--------|
| шљива | 2,166 | -0,400 |
| влашкача | 1,093 | -0,544 |
| тургуња | 1,220 | -0,015 |
| белошљива | 2,422 | -0,506 |
| црвенолисни ринглов | 3,306 | -0,353 |
| црвени ринглов | 3,089 | -0,596 |
| бели ринглов | 2,490 | 0,025 |
| трешња | 2,376 | -0,295 |
| дивља трешња | -1,682 | 1,121 |
| вишња | -1,423 | -1,023 |
| степска вишња | -10,015 | -4,086 |
| магрива | -5,002 | 10,029 |
| трњина | -6,144 | -2,856 |
| бресква | 3,276 | -0,256 |
| кајсија | 2,829 | -0,245 |

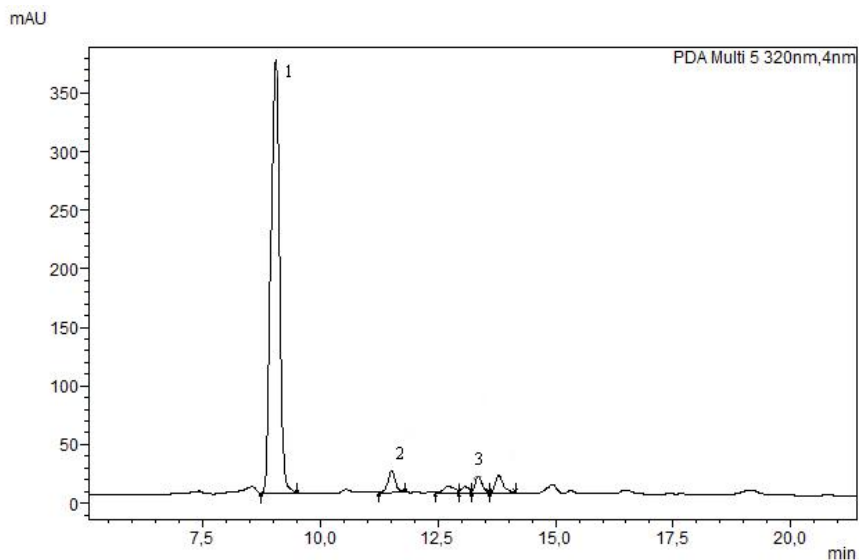
Табела Пб.4. Доприноси (%) варијабли РСА факторима (Ф1 и Ф2)

| Варијабла | Ф1 | Ф2 | Варијабла | Ф1 | Ф2 |
|-----------|------|------|---------------|------|------|
| 1 | 0,20 | 0,07 | 24 | 0,41 | 0,00 |
| 2 | 0,88 | 0,02 | 25 | 0,56 | 0,62 |
| 3 | 0,57 | 0,62 | 26 | 1,93 | 3,18 |
| 4 | 2,79 | 1,50 | 27 | 0,91 | 0,68 |
| 5 | 0,70 | 9,05 | 28 | 1,69 | 1,12 |
| 6 | 3,64 | 2,27 | 29 | 1,47 | 7,40 |
| 7 | 0,47 | 0,62 | 30 | 0,80 | 8,82 |
| 8 | 0,43 | 0,90 | 31 | 2,49 | 1,38 |
| 9 | 2,96 | 1,73 | 32 | 0,05 | 0,10 |
| 10 | 2,79 | 1,50 | 33 | 1,05 | 0,73 |
| 11 | 2,80 | 1,55 | 34 | 2,68 | 1,44 |
| 12 | 2,79 | 1,50 | TPA | 4,18 | 0,60 |
| 13 | 2,79 | 1,50 | TF | 4,13 | 2,34 |
| 14 | 0,70 | 9,05 | TA | 3,70 | 1,77 |
| 15 | 0,70 | 9,05 | TP | 4,87 | 1,60 |
| 16 | 0,70 | 9,05 | FC | 5,57 | 0,14 |
| 17 | 0,18 | 0,01 | FRAP | 5,72 | 0,03 |
| 18 | 3,85 | 1,34 | DPPH | 5,51 | 0,11 |
| 19 | 1,05 | 0,73 | HT29 | 2,28 | 3,91 |
| 20 | 1,96 | 5,84 | α -Amy | 2,05 | 1,24 |
| 21 | 0,21 | 0,55 | α -Gls | 5,02 | 0,30 |
| 22 | 3,81 | 0,08 | DPP III | 2,67 | 1,86 |
| 23 | 3,29 | 2,11 | | | |

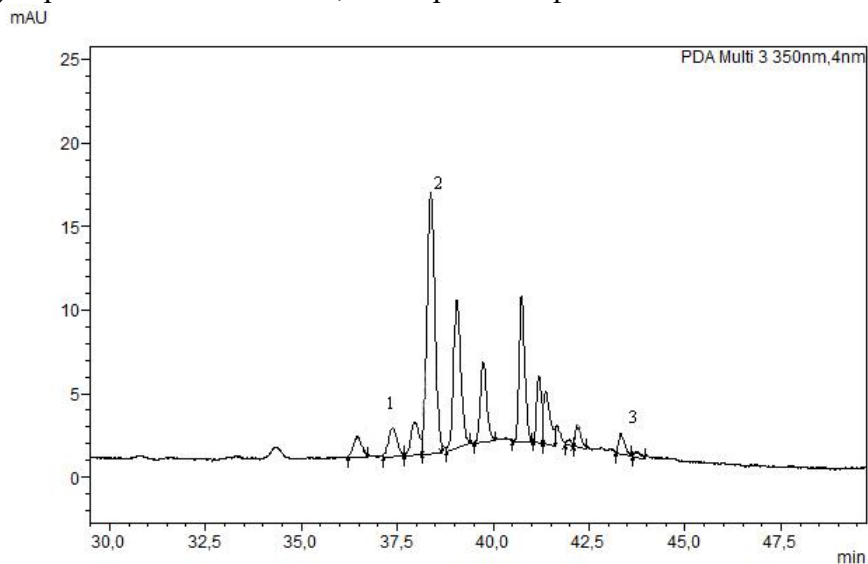
Скраћенице: Бројеви 1–34 представљају фенолна једињења из табеле 4.1; FC – Folin-Ciocalteu редукциони тест, FRAP – капацитет редукције Fe^{3+} јона, DPPH – капацитет неутрализације DPPH радикала, HT-29 – антипролиферативна активност према ћелијама хуманог аденокарцинома дебелог црева, α -Amy – способност инхибиције α -амилазе, α -Gls – способност инхибиције α -глюкозидазе, DPP III – способност инхибиције дипептидил-пептидазе III.

Табела Пб.5. Доприноси (%) испитиваних врста рода *Prunus* РСА факторима (Ф1 и Ф2)

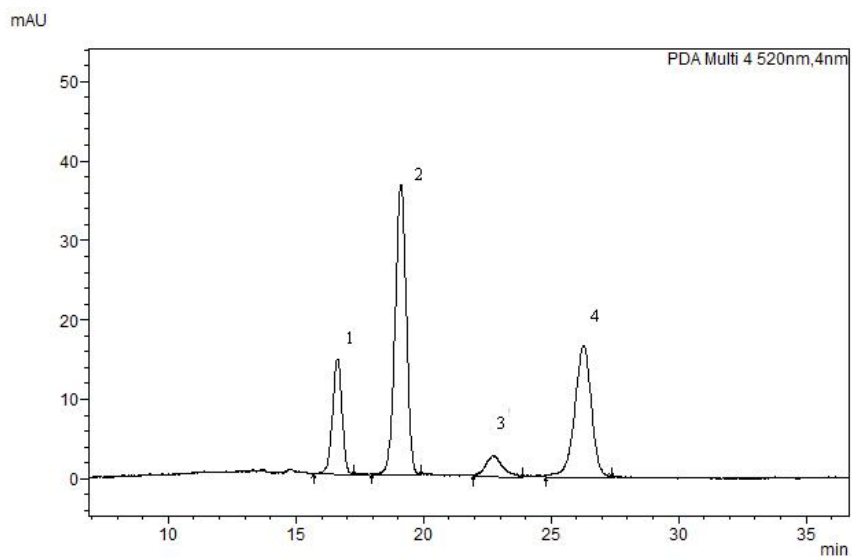
| Узорак | Ф1 | Ф2 |
|---------------------|-------|-------|
| шљива | 2,02 | 0,12 |
| влашкача | 0,51 | 0,23 |
| тургуња | 0,64 | 0,00 |
| белошљива | 2,53 | 0,20 |
| црвенолисни ринглов | 4,71 | 0,10 |
| црвени ринглов | 4,11 | 0,28 |
| бели ринглов | 2,67 | 0,00 |
| трешња | 2,43 | 0,07 |
| дивља трешња | 1,22 | 0,97 |
| вишња | 0,87 | 0,81 |
| степска вишња | 43,20 | 12,93 |
| магрива | 10,77 | 77,88 |
| трњина | 16,26 | 6,32 |
| бресква | 4,62 | 0,05 |
| кајсија | 3,45 | 0,05 |

Прилог 7. HPLC-PDA хроматограми трњине (*Prunus spinosa* L., генотип *B1*) на 320 nm, 350 nm и 520 nm

1 – метил-3-*O*-кафеоилхинска киселина + 3-*O*-кафеоилхинска киселина, 2 – дериват *p*-кумароилхинске киселине, 3 – дериват кафеоилхинске киселине



1 – кверцетин-3-*O*-глукозид, 2 – кверцетин-3-*O*-рутинозид, 3 – кверцетин



1 – цијанидин-3-*O*-глукозид, 2 – цијанидин-3-*O*-рутинозид, 3 – пеонидин-3-*O*-глукозид,
4 – пеонидин-3-*O*-рутинозид

Прилог 8. Корелациона матрица фитохемијског састава и биолошких активности генотипова трњине (*Prunus spinosa* L.)

| | Me+3CQA | p CoQAder | CQAder | Q3glu | Q3rut | Q | Cy3glu | Cy3rut | Pn3glu | Pn3rut | FC | FRAP | DPPH | HT-29 | α -Amy | α -Gls | DPP III |
|---------------|--------------|--------------|--------|--------------|--------------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------|
| Me+3CQA | 1,000 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| p CoQAder | 0,773 | 1,000 | | | | | | | | | | | | | | | |
| CQAder | 0,511 | 0,069 | 1,000 | | | | | | | | | | | | | | |
| Q3glu | 0,378 | 0,578 | -0,330 | 1,000 | | | | | | | | | | | | | |
| Q3rut | 0,360 | 0,130 | -0,152 | 0,611 | 1,000 | | | | | | | | | | | | |
| Q | 0,199 | -0,097 | 0,629 | -0,141 | -0,028 | 1,000 | | | | | | | | | | | |
| Cy3glu | 0,756 | 0,751 | 0,068 | 0,858 | 0,581 | -0,049 | 1,000 | | | | | | | | | | |
| Cy3rut | 0,917 | 0,653 | 0,392 | 0,552 | 0,629 | 0,155 | 0,870 | 1,000 | | | | | | | | | |
| Pn3glu | 0,269 | 0,285 | -0,383 | 0,877 | 0,830 | -0,198 | 0,747 | 0,538 | 1,000 | | | | | | | | |
| Pn3rut | 0,197 | 0,186 | -0,495 | 0,685 | 0,888 | -0,279 | 0,548 | 0,454 | 0,894 | 1,000 | | | | | | | |
| FC | 0,635 | 0,727 | -0,183 | 0,723 | 0,654 | -0,315 | 0,817 | 0,750 | 0,686 | 0,731 | 1,000 | | | | | | |
| FRAP | 0,585 | 0,736 | -0,012 | 0,785 | 0,497 | -0,210 | 0,855 | 0,703 | 0,607 | 0,498 | 0,880 | 1,000 | | | | | |
| DPPH | 0,567 | 0,722 | -0,352 | 0,841 | 0,579 | -0,263 | 0,819 | 0,625 | 0,737 | 0,684 | 0,833 | 0,705 | 1,000 | | | | |
| HT-29 | 0,403 | 0,725 | -0,538 | 0,622 | 0,348 | -0,513 | 0,598 | 0,410 | 0,509 | 0,594 | 0,816 | 0,621 | 0,847 | 1,000 | | | |
| α -Amy | 0,387 | 0,694 | -0,568 | 0,802 | 0,520 | -0,413 | 0,698 | 0,464 | 0,709 | 0,702 | 0,808 | 0,652 | 0,927 | 0,925 | 1,000 | | |
| α -Gls | 0,283 | 0,466 | -0,288 | 0,709 | 0,390 | 0,150 | 0,529 | 0,319 | 0,508 | 0,379 | 0,362 | 0,386 | 0,673 | 0,462 | 0,629 | 1,000 | |
| DPP III | 0,350 | 0,372 | -0,294 | 0,402 | 0,625 | -0,320 | 0,441 | 0,491 | 0,578 | 0,713 | 0,707 | 0,435 | 0,511 | 0,570 | 0,640 | 0,090 | 1,000 |

Подебљане вредности *Pearson*-ових коефицијената корелације (r) се сматрају статистички сигнификантним за $P < 0,01$.

Скраћенице: 3CQA – 3-*O*-кафеоилхинска киселина, Me3CQA – метил-3-*O*-кафеоилхинат, CoQA der – дериват *p*-кумароилхинске киселине, CQA der – дериват кафеоилхинске киселине, Q3glu – кверцетин-3-*O*-глукозид, Q3rut – кверцетин-3-*O*-рутинозид, Q – кверцетин, Cy3glu – цијанидин-3-*O*-глукозид, Cy3rut – цијанидин-3-*O*-рутинозид, Pn3glu – пеонидин-3-*O*-глукозид, Pn3rut – пеонидин-3-*O*-рутинозид; FC – Folin-Ciocalteu редукциони тест, FRAP – капацитет редукције Fe³⁺ јона, DPPH – капацитет неутрализације DPPH радикала, HT-29 – антипролиферативна активност према ћелијама хуманог аденокарцинома дебелог црева, α -Amy – способност инхибиције α -амилазе, α -Gls – способност инхибиције α -глукозидазе, DPP III – способност инхибиције дипептидил-пептидазе III.

Прилог 9. РСА анализа генотипова трњине (*Prunus spinosa* L.)

Табела П9.1. Карактеристичне вредности и проценат објашњење варијабилности

| Фактор | Карактеристична вредност (енг. eigenvalue) | Објашњена варијабилност (%) | Кумулатив карактеристичних вредности | Кумулатив објашњене варијабилности (%) |
|--------|--|-----------------------------|--------------------------------------|--|
| 1 | 9,744 | 57,32 | 9,744 | 57,32 |
| 2 | 2,854 | 16,79 | 12,598 | 74,11 |
| 3 | 1,618 | 9,51 | 14,216 | 83,62 |
| 4 | 1,328 | 7,81 | 15,544 | 91,44 |
| 5 | 0,625 | 3,67 | 16,169 | 95,11 |
| 6 | 0,298 | 1,76 | 16,467 | 96,87 |
| 7 | 0,227 | 1,33 | 16,694 | 98,20 |
| 8 | 0,165 | 0,97 | 16,859 | 99,17 |
| 9 | 0,057 | 0,33 | 16,916 | 99,50 |
| 10 | 0,040 | 0,24 | 16,956 | 99,74 |
| 11 | 0,027 | 0,16 | 16,983 | 99,90 |
| 12 | 0,009 | 0,06 | 16,993 | 99,96 |
| 13 | 0,006 | 0,03 | 16,999 | 99,99 |
| 14 | 0,001 | 0,01 | 17,000 | 100,00 |

Табела П9.2. Факторске координате варијабли

| Варијабла | Ф1 | Ф2 |
|---------------|--------|--------|
| 3CQA+ Me3CQA | -0,618 | 0,719 |
| pCoQAdер | -0,726 | 0,369 |
| CQAdер | 0,272 | 0,937 |
| Q3glu | -0,882 | -0,069 |
| Q3rut | -0,715 | -0,062 |
| Q | 0,253 | 0,650 |
| Cy3glu | -0,898 | 0,333 |
| Cy3rut | -0,750 | 0,590 |
| Pn3glu | -0,830 | -0,222 |
| Pn3rut | -0,782 | -0,373 |
| FC | -0,937 | 0,048 |
| FRAP | -0,834 | 0,212 |
| DPPH | -0,936 | -0,060 |
| HT29 | -0,818 | -0,270 |
| α -Amy | -0,906 | -0,286 |
| α -Gls | -0,594 | -0,013 |
| DPP III | -0,669 | -0,195 |

Скраћенице: 3CQA – 3-*O*-кафеоилхинска киселина, Me3CQA – метил-3-*O*-кафеоилхинат, CoQA дер – дериват *p*-кумароилхинске киселине, CQA дер – дериват кафеоилхинске киселине, Q3glu – кверцетин-3-*O*-глукозид, Q3rut – кверцетин-3-*O*-рутинозид, Q – кверцетин, Cy3glu – цијанидин-3-*O*-глукозид, Cy3rut – цијанидин-3-*O*-рутинозид, Pn3glu – пеонидин-3-*O*-глукозид, Pn3rut – пеонидин-3-*O*-рутинозид; FC – Folin-Ciocalteu редукциони тест, FRAP – капацитет редукције Fe³⁺ јона, DPPH – капацитет неутрализације DPPH радикала, HT-29 – антипролиферативна активност према ћелијама хуманог аденокарцинома дебелог црева, α -Amy – способност инхибиције α -амилазе, α -Gls – способност инхибиције α -глукозидазе, DPP III – способност инхибиције дипептидил-пептидазе III.

Табела П9.3. Факторске координате испитиваних генотипова трњине

| Узорак | Ф1 | Ф2 |
|----------|--------|--------|
| B1 | -5,466 | -1,097 |
| B2 | -2,603 | -1,097 |
| BL1 | -6,384 | -0,106 |
| BL2 | -2,525 | -0,327 |
| BL3 | -1,204 | -2,212 |
| TR-MB/1 | 1,146 | 1,698 |
| TR-MB/2 | 0,181 | 2,287 |
| TR-MB/3 | 4,336 | -2,163 |
| TR-MB/4 | 2,292 | -1,774 |
| TR-MB/5 | 1,109 | 2,011 |
| TR-MB/6 | 0,574 | 1,870 |
| TR-MB/7 | 1,062 | 1,212 |
| TR-MB/8 | 1,068 | 1,674 |
| TR-MB/9 | 4,038 | -2,179 |
| TR-MB/10 | 2,376 | 0,205 |

Табела П9.4. Доприноси (%) варијабли РСА факторима (Ф1 и Ф2)

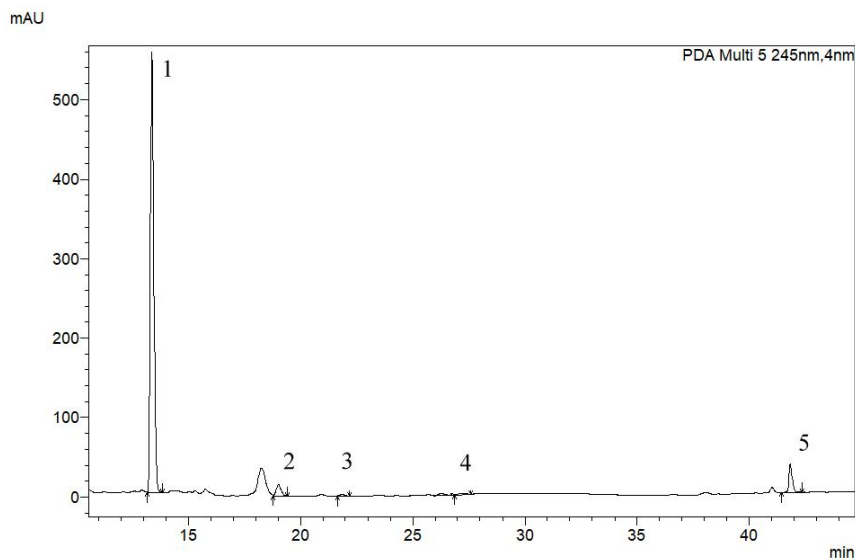
| Варијабла | Ф1 | Ф2 |
|------------------|-----------|-----------|
| 3CQA+ Me3CQA | 3,92 | 18,11 |
| pCoQAdер | 5,41 | 4,78 |
| CQAdер | 0,76 | 30,76 |
| Q3glu | 7,97 | 0,17 |
| Q3rut | 5,25 | 0,14 |
| Q | 0,65 | 14,79 |
| Cy3glu | 8,28 | 3,88 |
| Cy3rut | 5,78 | 12,22 |
| Pn3glu | 7,06 | 1,73 |
| Pn3rut | 6,28 | 4,88 |
| FC | 9,01 | 0,08 |
| FRAP | 7,13 | 1,57 |
| DPPH | 8,99 | 0,13 |
| HT29 | 6,86 | 2,56 |
| α -Amy | 8,42 | 2,87 |
| α -Gls | 3,62 | 0,01 |
| DPP III | 4,60 | 1,33 |

Скраћенице: 3CQA – 3-*O*-кафеоилхинска киселина, Me3CQA – метил-3-*O*-кафеоилхинат, CoQA der – дериват *p*-кумароилхинске киселине, CQA der – дериват кафеоилхинске киселине, Q3glu – кверцетин-3-*O*-глукозид, Q3rut – кверцетин-3-*O*-рутинозид, Q – кверцетин, Cy3glu – цијанидин-3-*O*-глукозид, Cy3rut – цијанидин-3-*O*-рутинозид, Pn3glu – пеонидин-3-*O*-глукозид, Pn3rut – пеонидин-3-*O*-рутинозид; FC – Folin-Ciocalteu редукциони тест, FRAP – капацитет редукције Fe³⁺ јона, DPPH – капацитет неутрализације DPPH радикала, HT-29 – антипролиферативна активност према ћелијама хуманог аденокарцинома дебелог црева, α -Amy – способност инхибиције α -амилазе, α -Gls – способност инхибиције α -глукозидазе, DPP III – способност инхибиције дипептидил-пептидазе III.

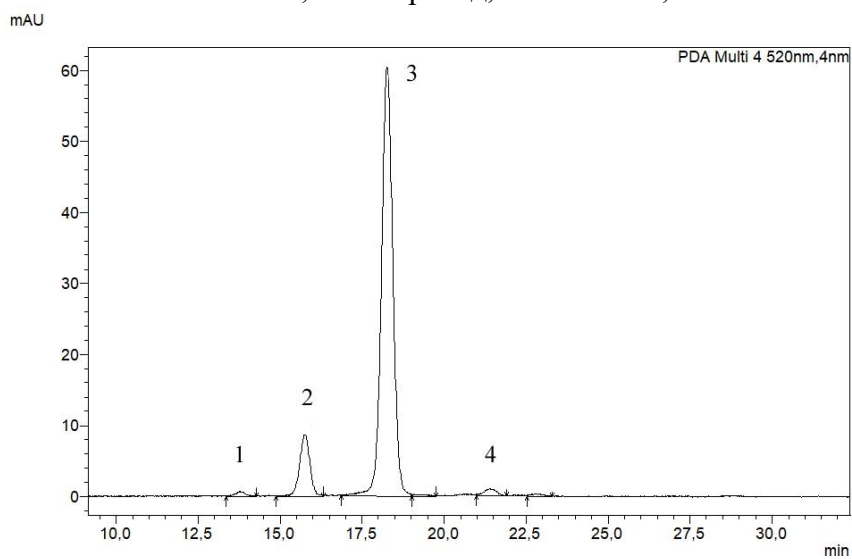
Табела П9.5. Доприноси (%) испитиваних генотипова трњина РСА факторима (Ф1 и Ф2)

| Узорак | Ф1 | Ф2 |
|---------------|-----------|-----------|
| B1 | 21,90 | 3,01 |
| B2 | 4,97 | 3,01 |
| BL1 | 29,88 | 0,03 |
| BL2 | 4,67 | 0,27 |
| BL3 | 1,06 | 12,25 |
| TR-MB/1 | 0,96 | 7,22 |
| TR-MB/2 | 0,02 | 13,09 |
| TR-MB/3 | 13,78 | 11,71 |
| TR-MB/4 | 3,85 | 7,87 |
| TR-MB/5 | 0,90 | 10,12 |
| TR-MB/6 | 0,24 | 8,75 |
| TR-MB/7 | 0,83 | 3,68 |
| TR-MB/8 | 0,84 | 7,01 |
| TR-MB/9 | 11,95 | 11,89 |
| TR-MB/10 | 4,14 | 0,10 |

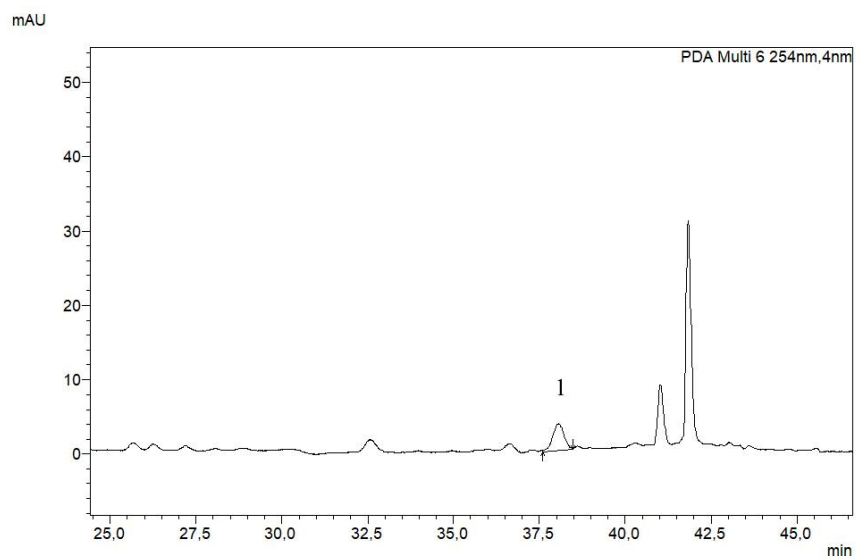
Прилог 10. Хроматограми екстракта дрена (*Cornus mas* L.; *Apatinski rani*) на 245 nm (иридоиди), 520 nm (антоцијани), 254 nm (елагинска киселина), 350 nm (флавоноиди), 320 nm (хидроксициметне киселине), 280 nm (једноставне фенолне киселине).



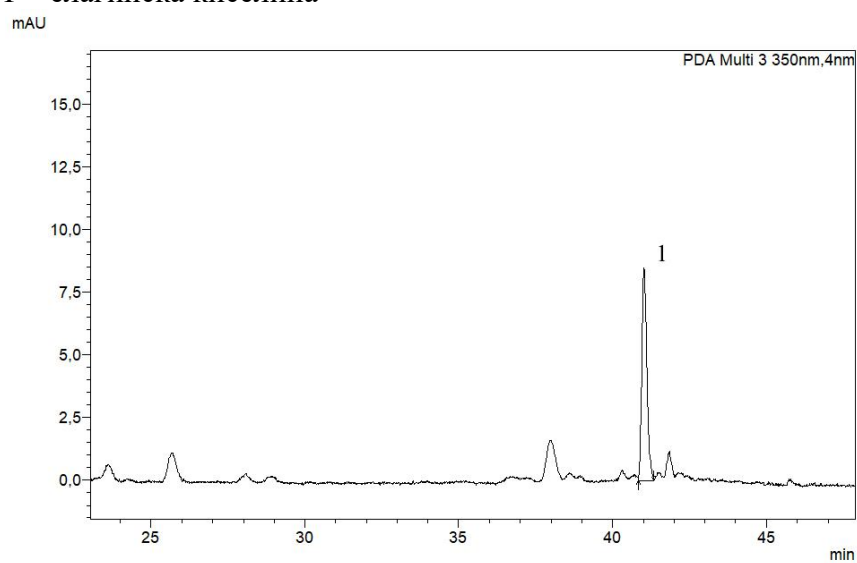
1 – логанска киселина, 2 – сверозид, 3 – логанин, 4 – секоксилоганин, 5 – корнузид



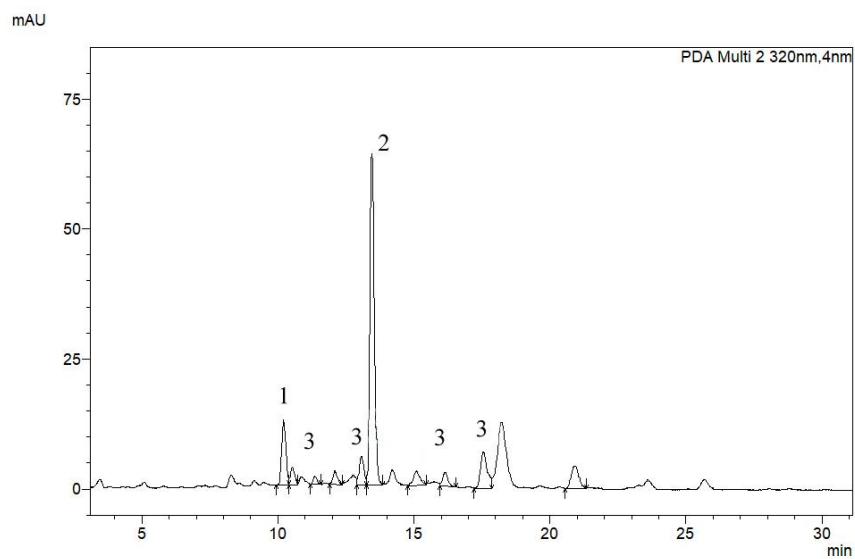
1 – делфинидин-3-*O*-галактозид, 2 – цијанидин-3-*O*-галактозид, 3 – пеларгонидин-3-*O*-галактозид, 4 – пеларгонидин-3-*O*-робинобиозид



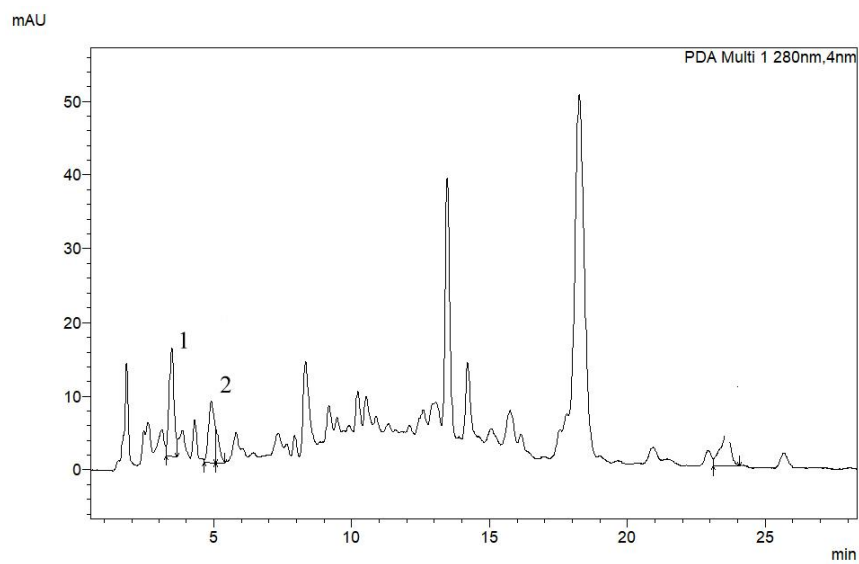
1 – елагинска киселина



1 – кемферол-3-*O*-галактозид



1 – *cis*-кафтаринска киселина, 2 – *trans*-кафтаринска киселина, 3 – деривати *p*-кумаринске киселине



1 – дериват галне киселине, 2 – гална киселина

Прилог 11. Корелациона матрица фитохемијског састава и биолошких активности генотипова дрена (*Cornus mas* L.)

| | LA | Sw | Ln | Sec | Cn | Dp3gal | Cy3gal | Pg3gal | Pg3rob | Kf3gal | GA der | GA | EA | c CftA | t CftA | p CoA sum | FC | FRAP | DPPH | HT-29 | α -Amy | α -Gls | DPP III | |
|---------------|--------------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|--------------|--------------|--------|--------|--------------|--------|--------------|--------------|--------|-----------|--------------|-------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------|--|
| LA | 1,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sw | 0,936 | 1,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ln | 0,321 | 0,360 | 1,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sec | 0,790 | 0,901 | 0,618 | 1,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cn | 0,274 | 0,442 | 0,461 | 0,590 | 1,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Dp3gal | 0,390 | 0,498 | -0,050 | 0,525 | 0,244 | 1,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cy3gal | 0,361 | 0,503 | 0,043 | 0,590 | 0,411 | 0,980 | 1,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pg3gal | -0,162 | -0,055 | -0,217 | 0,095 | 0,291 | 0,784 | 0,820 | 1,000 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pg3rob | -0,418 | -0,215 | -0,290 | -0,026 | 0,199 | 0,623 | 0,675 | 0,900 | 1,000 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Kf3gal | -0,525 | -0,649 | -0,684 | -0,722 | -0,291 | 0,085 | 0,033 | 0,514 | 0,408 | 1,000 | | | | | | | | | | | | | | |
| GA der | 0,524 | 0,577 | 0,320 | 0,674 | 0,060 | 0,843 | 0,803 | 0,466 | 0,314 | -0,257 | 1,000 | | | | | | | | | | | | | |
| GA | 0,353 | 0,504 | 0,780 | 0,742 | 0,587 | 0,537 | 0,616 | 0,339 | 0,225 | -0,467 | 0,691 | 1,000 | | | | | | | | | | | | |
| EA | 0,683 | 0,789 | 0,376 | 0,879 | 0,653 | 0,806 | 0,866 | 0,517 | 0,306 | -0,317 | 0,749 | 0,737 | 1,000 | | | | | | | | | | | |
| c CftA | 0,580 | 0,498 | 0,288 | 0,570 | 0,022 | 0,759 | 0,708 | 0,454 | 0,161 | -0,048 | 0,909 | 0,567 | 0,707 | 1,000 | | | | | | | | | | |
| t CftA | 0,511 | 0,385 | -0,104 | 0,304 | -0,133 | 0,775 | 0,676 | 0,518 | 0,192 | 0,275 | 0,757 | 0,268 | 0,564 | 0,902 | 1,000 | | | | | | | | | |
| p CoA sum | 0,037 | 0,245 | 0,095 | 0,455 | 0,467 | 0,859 | 0,925 | 0,889 | 0,855 | 0,073 | 0,666 | 0,642 | 0,730 | 0,515 | 0,424 | 1,000 | | | | | | | | |
| FC | 0,601 | 0,751 | 0,136 | 0,795 | 0,521 | 0,898 | 0,933 | 0,600 | 0,465 | -0,242 | 0,767 | 0,606 | 0,950 | 0,653 | 0,578 | 0,800 | 1,000 | | | | | | | |
| FRAP | 0,522 | 0,702 | 0,302 | 0,820 | 0,630 | 0,866 | 0,930 | 0,622 | 0,499 | -0,290 | 0,765 | 0,754 | 0,964 | 0,632 | 0,493 | 0,858 | 0,973 | 1,000 | | | | | | |
| DPPH | 0,842 | 0,930 | 0,626 | 0,993 | 0,562 | 0,474 | 0,528 | 0,007 | -0,132 | -0,747 | 0,644 | 0,711 | 0,848 | 0,556 | 0,302 | 0,365 | 0,751 | 0,770 | 1,000 | | | | | |
| HT-29 | 0,719 | 0,839 | -0,100 | 0,662 | 0,362 | 0,750 | 0,726 | 0,314 | 0,184 | -0,250 | 0,570 | 0,332 | 0,766 | 0,449 | 0,521 | 0,483 | 0,862 | 0,769 | 0,664 | 1,000 | | | | |
| α -Amy | 0,868 | 0,932 | 0,023 | 0,708 | 0,307 | 0,458 | 0,431 | -0,081 | -0,197 | -0,496 | 0,411 | 0,215 | 0,638 | 0,318 | 0,345 | 0,142 | 0,684 | 0,575 | 0,745 | 0,912 | 1,000 | | | |
| α -Gls | -0,086 | -0,082 | -0,464 | -0,025 | -0,412 | 0,591 | 0,521 | 0,593 | 0,627 | 0,345 | 0,518 | -0,114 | 0,184 | 0,477 | 0,547 | 0,501 | 0,386 | 0,279 | -0,093 | 0,205 | -0,019 | 1,000 | | |
| DPP III | 0,689 | 0,832 | 0,635 | 0,986 | 0,604 | 0,495 | 0,579 | 0,118 | 0,055 | -0,747 | 0,649 | 0,747 | 0,850 | 0,509 | 0,207 | 0,499 | 0,777 | 0,818 | 0,965 | 0,592 | 0,629 | 0,014 | 1,000 | |

Подбљане вредности *Pearson*-ових коефицијената корелације (r) се сматрају статистички сигнификантним за $P < 0,01$.

Скраћенице: LA – логанска киселина, Sw – сверозид, Sec – секоксилоганин, Ln – логанин, Cn – корнузид, Dp3gal – делфинидин-3-*O*-галактозид, Cy3glu – цијанидин-3-*O*-глукозид, Cy3gal – цијанидин-3-*O*-галактозид, Pg3glu – пеларгонидин-3-*O*-глукозид, Pg3gal – пеларгонидин-3-*O*-галактозид, Pg3rob – пеларгонидин-3-*O*-робинобиозид, Kf3gal – кемферол-3-*O*-галактозид, GA – гална киселина, GA der – дериват галне киселине, cCftA – *cis*-кафтаринска киселина, tCftA – *trans*-кафтаринска киселина, pCoAsum – сума деривата *p*-кумаринске киселине, EA – елагинска киселина, FC – Folin-Ciocalteu редукциони тест, FRAP – капацитет редукције Fe^{3+} јона, DPPH – капацитет неутрализације DPPH радикала, HT-29 – антипролиферативна активност према ћелијама хуманог аденокарцинома дебелог црева, α -Amy – способност инхибиције α -амилазе, α -Gls – способност инхибиције α -глукозидазе, DPP III – способност инхибиције дипептидил-пептидазе III.

Прилог 12. РСА анализа генотипова дрена (*Cornus mas* L.)

Табела П12.1. Карактеристичне вредности и проценат објашњење варијабилности

| Фактор | Карактеристична вредност (енг. eigenvalue) | Објашњена варијабилност (%) | Кумулатив карактеристичних вредности | Кумулатив објашњене варијабилности (%) |
|--------|--|-----------------------------|--------------------------------------|--|
| 1 | 12,560 | 54,61 | 12,560 | 54,61 |
| 2 | 5,216 | 22,68 | 17,776 | 77,29 |
| 3 | 2,450 | 10,65 | 20,226 | 87,94 |
| 4 | 1,633 | 7,10 | 21,859 | 95,04 |
| 5 | 0,835 | 3,63 | 22,694 | 98,67 |
| 6 | 0,306 | 1,33 | 23,000 | 100,00 |

Табела П12.2. Факторске координате варијабли

| Варијабла | Ф1 | Ф2 |
|---------------|--------|--------|
| LA | -0,698 | 0,501 |
| Sw | -0,819 | 0,478 |
| Ln | -0,358 | 0,596 |
| Sec | -0,891 | 0,420 |
| Cn | -0,523 | 0,249 |
| Dp3gal | -0,851 | -0,495 |
| Cy3gal | -0,884 | -0,455 |
| Pg3gal | -0,482 | -0,820 |
| Pg3rob | -0,308 | -0,818 |
| Kf3gal | 0,381 | -0,800 |
| GA der | -0,846 | -0,193 |
| GA | -0,747 | 0,148 |
| EA | -0,978 | 0,010 |
| cCftA | -0,749 | -0,212 |
| tCftA | -0,601 | -0,412 |
| pCoA sum | -0,734 | -0,549 |
| FC | -0,965 | -0,159 |
| FRAP | -0,967 | -0,125 |
| DPPH | -0,862 | 0,496 |
| HT29 | -0,807 | 0,013 |
| α -Amy | -0,678 | 0,380 |
| α -Gls | -0,268 | -0,743 |
| DPP III | -0,862 | 0,391 |

Скраћенице: LA – логанска киселина, Sw – сверозид, Sec – секоксилантин, Ln – логанин, Cn – корнузид, Dp3gal – делфинидин-3-О-галактозид, Cy3glu – цијанидин-3-О-глукозид, Cy3gal – цијанидин-3-О-галактозид, Pg3glu – пеларгонидин-3-О-глукозид, Pg3gal – пеларгонидин-3-О-галактозид, Pg3rob – пеларгонидин-3-О-робинобиозид, Kf3gal – кемферол-3-О-галактозид, GA – гална киселина, GA der – дериват галне киселине, cCftA – *cis*-кафтаринска киселина, tCftA – *trans*-кафтаринска киселина, pCoAsum – сума деривата *p*-кумаринске киселине, EA – елагинска киселина, FC – Folin-Ciocalteu редукциони тест, FRAP – капацитет редукције Fe³⁺ јона, DPPH – капацитет неутрализације DPPH радикала, HT-29 – антипролиферативна активност према ћелијама хуманог аденокарцинома дебелог црева, α -Amy – способност инхибиције α -амилазе, α -Gls – способност инхибиције α -глукозидазе, DPP III – способност инхибиције хумане дипептидил-пептидазе III

Табела П12.3. Факторске координате испитиваних генотипова

| Узорак | Ф1 | Ф2 |
|-----------------------|--------|--------|
| <i>Apatinski rani</i> | 3,052 | -0,889 |
| <i>Vačka</i> | -0,993 | 3,401 |
| <i>KIC1</i> | 1,904 | -0,279 |
| <i>R1</i> | 3,688 | -2,624 |
| <i>Elegantnyi</i> | -0,187 | 2,374 |
| <i>Semen</i> | -0,575 | 0,489 |
| <i>Svetlyachok</i> | -6,889 | -2,471 |

Табела П12.4. Доприноси (%) варијабли РСА факторима (Ф1 и Ф2)

| Варијабла | Ф1 | Ф2 |
|---------------|------|-------|
| LA | 3,88 | 4,80 |
| Sw | 5,34 | 4,38 |
| Ln | 1,02 | 6,81 |
| Sec | 6,32 | 3,39 |
| Cn | 2,17 | 1,19 |
| Dp3gal | 5,77 | 4,69 |
| Cy3gal | 6,22 | 3,97 |
| Pg3gal | 1,85 | 12,88 |
| Pg3rob | 0,76 | 12,84 |
| Kf3gal | 1,16 | 12,26 |
| GA der | 5,70 | 0,72 |
| GA | 4,44 | 0,42 |
| EA | 7,61 | 0,00 |
| cCftA | 4,47 | 0,86 |
| tCftA | 2,88 | 3,25 |
| pCoA sum | 4,29 | 5,77 |
| FC | 7,41 | 0,48 |
| FRAP | 7,45 | 0,30 |
| DPPH | 5,91 | 4,72 |
| HT29 | 5,19 | 0,00 |
| α -Amy | 3,66 | 2,76 |
| α -Gls | 0,57 | 10,59 |
| DPP III | 5,92 | 2,93 |

Скраћенице: LA – логанска киселина, Sw – сверозид, Sec – секоксилоганин, Ln – логанин, Cn – корнузид, Dp3gal – делфинидин-3-О-галактозид, Cy3glu – цијанидин-3-О-глукозид, Cy3gal – цијанидин-3-О-галактозид, Pg3glu – пеларгонидин-3-О-глукозид, Pg3gal – пеларгонидин-3-О-галактозид, Pg3rob – пеларгонидин-3-О-робинобиозид, Kf3gal – кемферол-3-О-галактозид, GA – гална киселина, GA der – дериват галне киселине, cCftA – *cis*-кафтаринска киселина, tCftA – *trans*-кафтаринска киселина, pCoAsum – сума деривата *p*-кумаринске киселине, EA – елагинска киселина, FC – Folin-Ciocalteu редукциони тест, FRAP – капацитет редукције Fe³⁺ јона, DPPH – капацитет неутрализације DPPH радикала, HT-29 – антипролиферативна активност према ћелијама хуманог аденокарцинома дебелог црева, α -Amy – способност инхибиције α -амилазе, α -Gls – способност инхибиције α -глукозидазе, DPP III – способност инхибиције дипептидил-пептидазе III

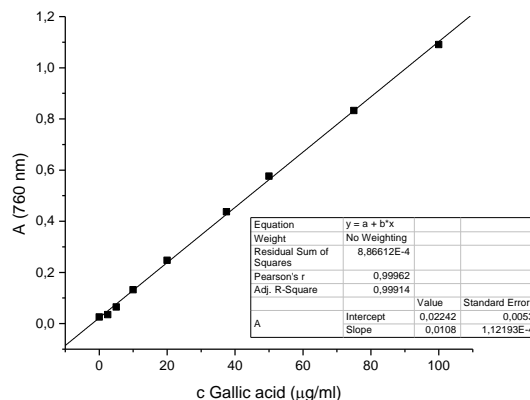
Табела П12.5. Доприноси (%) испитиваних генотипова РСА факторима (Ф1 и Ф2)

| Узорак | Ф1 | Ф2 |
|-----------------------|-------|-------|
| <i>Apatinski rani</i> | 12,36 | 2,52 |
| <i>Vačka</i> | 1,31 | 36,95 |
| <i>KIC1</i> | 4,81 | 0,25 |
| <i>RI</i> | 18,05 | 22,00 |
| <i>Elegantnyi</i> | 0,05 | 18,00 |
| <i>Semen</i> | 0,44 | 0,76 |
| <i>Svetlyachok</i> | 62,98 | 19,51 |

Прилог 13. Калибрационе криве спектрофотометријских одређивања способности редукције Фолин-Чокалте реагенса (FC тест) и способности редукције гвожђе(III)-јона (FRAP тест), и криве зависности способности неутрализације DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил) радикала, способности инхибиције α -амилазе и способности инхибиције α -глукозидазе за одговарајућа стандардна једињења

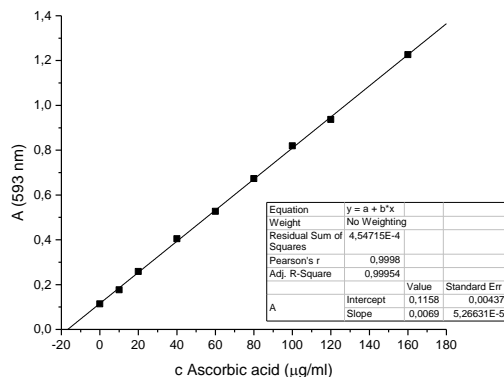
FC тест

| Гална киселина | | | | |
|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| c (µg/ml) | A ₁ | A ₂ | A ₃ | A _{sr} |
| 0 | 0,026 | 0,022 | 0,030 | 0,026 |
| 2,5 | 0,033 | 0,035 | 0,036 | 0,035 |
| 5,0 | 0,066 | 0,064 | 0,064 | 0,065 |
| 10,0 | 0,133 | 0,128 | 0,135 | 0,132 |
| 20,0 | 0,248 | 0,246 | 0,249 | 0,248 |
| 37,5 | 0,447 | 0,429 | 0,436 | 0,437 |
| 50,0 | 0,581 | 0,577 | 0,571 | 0,576 |
| 75,0 | 0,840 | 0,834 | 0,823 | 0,832 |
| 100,0 | 1,090 | 1,096 | 1,086 | 1,091 |



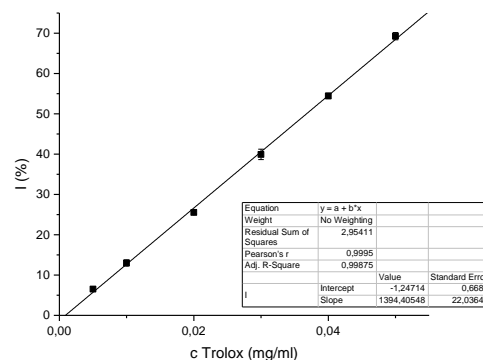
FRAP тест

| Аскорбинска киселина | | | | |
|----------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| c (µg/ml) | A ₁ | A ₂ | A ₃ | A _{sr} |
| 0 | 0,120 | 0,112 | 0,109 | 0,114 |
| 10 | 0,180 | 0,177 | 0,173 | 0,177 |
| 20 | 0,263 | 0,269 | 0,243 | 0,258 |
| 40 | 0,408 | 0,409 | 0,396 | 0,404 |
| 60 | 0,531 | 0,518 | 0,532 | 0,527 |
| 80 | 0,646 | 0,666 | 0,708 | 0,673 |
| 100 | 0,846 | 0,804 | 0,807 | 0,819 |
| 120 | 0,935 | 0,940 | 0,937 | 0,937 |
| 160 | 1,215 | 1,240 | 1,224 | 1,226 |



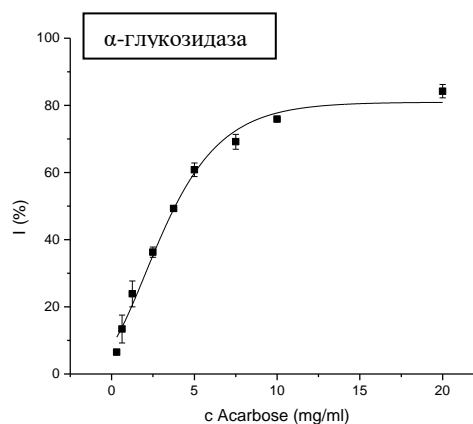
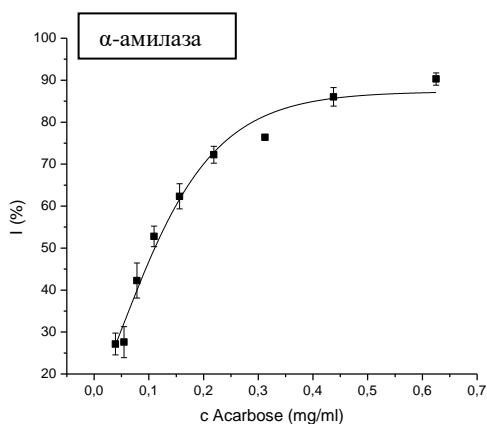
DPPH тест

| Тролокс | Апсорбација | | | Инхибиција | | | |
|-----------|----------------|----------------|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| | A ₁ | A ₂ | A ₃ | I ₁ (%) | I ₂ (%) | I ₃ (%) | I _{sr} (%) |
| c (mg/ml) | | | | | | | |
| 0,005 | 0,808 | 0,805 | 0,798 | 5,99 | 6,34 | 7,16 | 6,50 |
| 0,010 | 0,745 | 0,755 | 0,743 | 13,32 | 12,16 | 13,55 | 13,01 |
| 0,020 | 0,638 | 0,643 | 0,639 | 25,77 | 25,19 | 25,65 | 25,54 |
| 0,030 | 0,529 | 0,509 | 0,511 | 38,45 | 40,78 | 40,55 | 39,93 |
| 0,040 | 0,385 | 0,396 | 0,394 | 55,21 | 53,93 | 54,16 | 54,43 |
| 0,050 | 0,258 | 0,273 | 0,262 | 69,98 | 68,24 | 69,52 | 69,25 |
| контрола | 0,852 | 0,861 | 0,858 | | | | 0,036± 0,00 |



α-амилаза

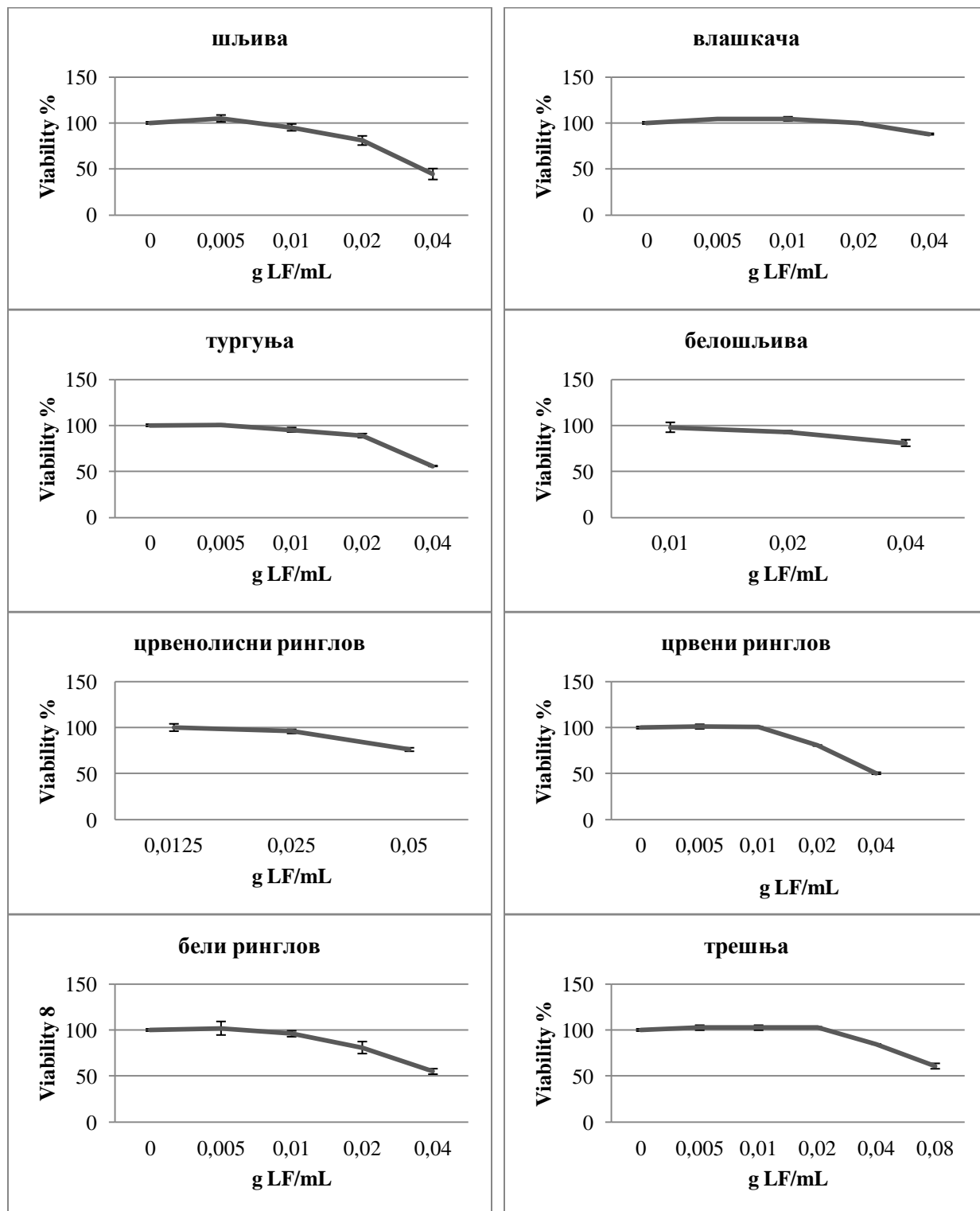
| Акарбоза c (mg/ml) | Апсорбанција | | | | | | | Инхибиција | | | |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------|------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| | A ₁ | A ₂ | A ₃ | A _{кор} | A ₁ -A _{кор} | A ₂ -A _{кор} | A ₃ -A _{кор} | I ₁ (%) | I ₂ (%) | I ₃ (%) | I _{sr} (%) |
| 0,039 | 0,468 | 0,451 | 0,451 | 0,182 | 0,286 | 0,269 | 0,269 | 24,14 | 28,65 | 28,65 | 27,14 |
| 0,055 | 0,465 | 0,465 | 0,489 | 0,200 | 0,265 | 0,265 | 0,289 | 29,71 | 29,71 | 23,34 | 27,59 |
| 0,078 | 0,400 | 0,436 | 0,453 | 0,212 | 0,188 | 0,224 | 0,241 | 50,13 | 40,58 | 36,07 | 42,26 |
| 0,109 | 0,369 | 0,375 | 0,387 | 0,199 | 0,170 | 0,176 | 0,188 | 54,91 | 53,32 | 50,13 | 52,79 |
| 0,156 | 0,331 | 0,332 | 0,351 | 0,196 | 0,135 | 0,136 | 0,155 | 64,19 | 63,93 | 58,89 | 62,33 |
| 0,219 | 0,289 | 0,301 | 0,303 | 0,193 | 0,096 | 0,108 | 0,110 | 74,54 | 71,35 | 70,82 | 72,24 |
| 0,313 | 0,270 | 0,268 | 0,272 | 0,181 | 0,089 | 0,087 | 0,091 | 76,39 | 76,92 | 75,86 | 76,39 |
| 0,438 | 0,244 | 0,230 | 0,245 | 0,187 | 0,057 | 0,043 | 0,058 | 84,88 | 88,59 | 84,62 | 86,03 |
| 0,625 | 0,250 | 0,245 | 0,239 | 0,208 | 0,042 | 0,037 | 0,031 | 88,86 | 90,19 | 91,78 | 90,27 |
| контрола | 0,536 | 0,550 | 0,567 | 0,174 | | | | | | IC ₅₀ | 0,11±0,01 |

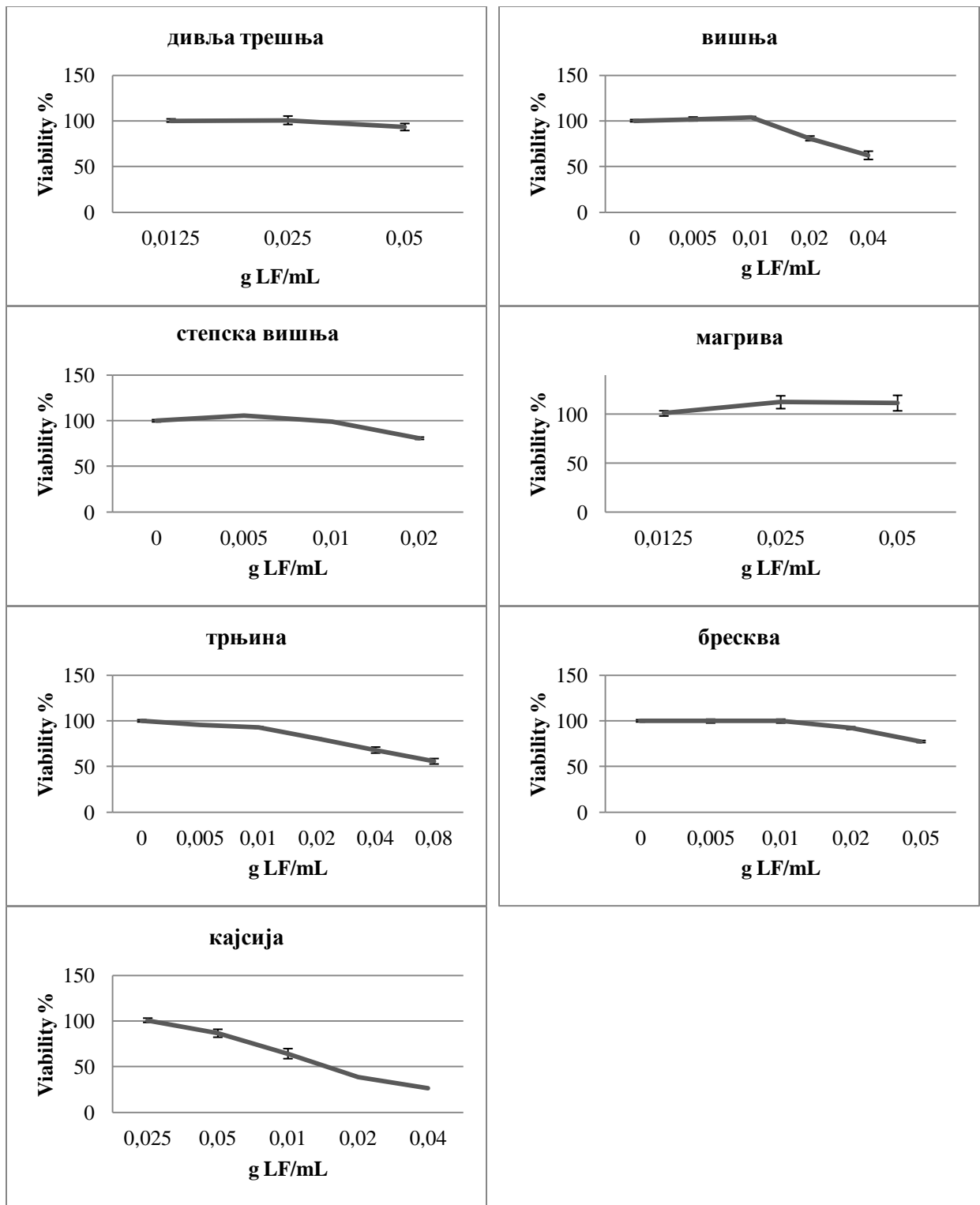


α-глюкозидаза

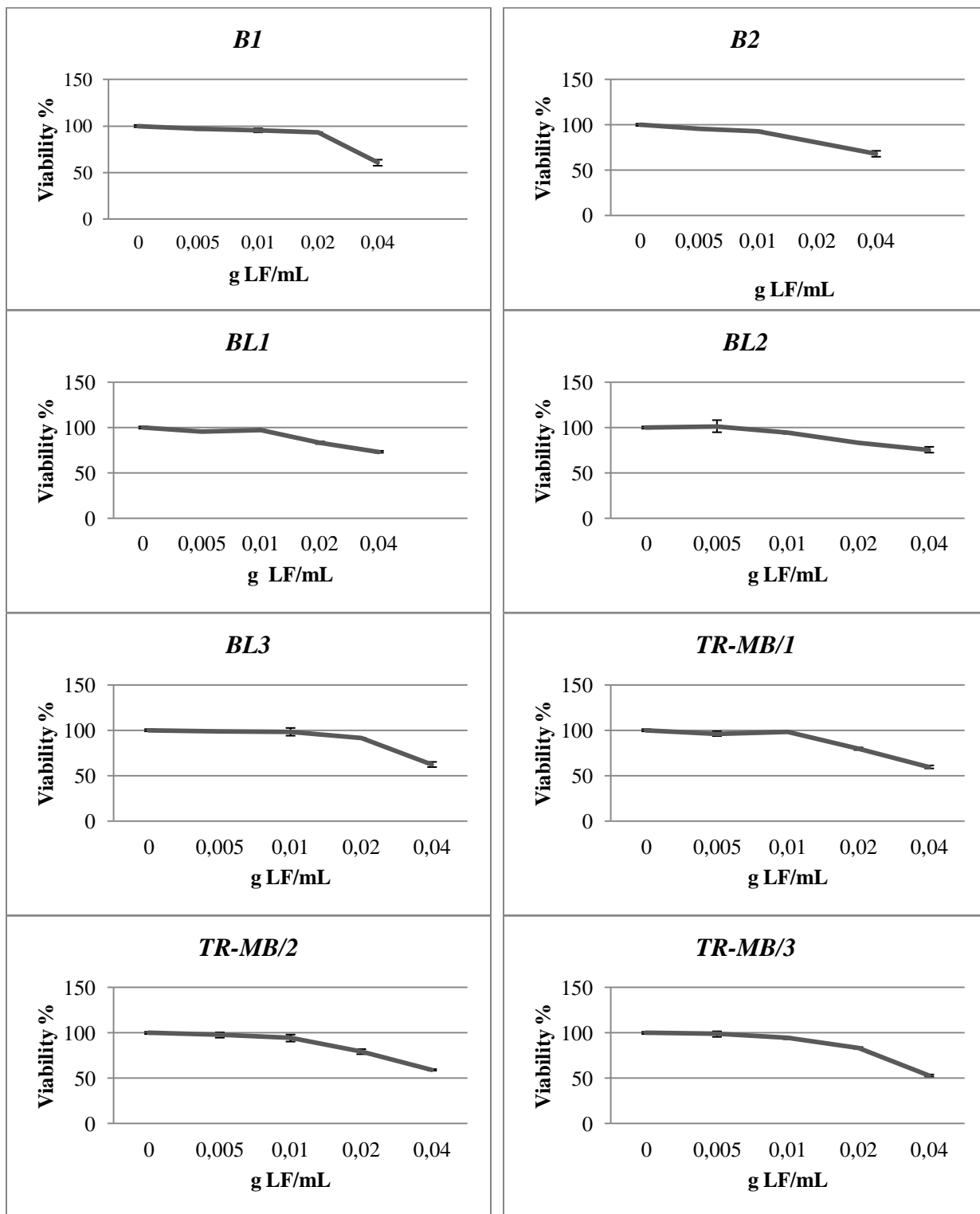
| Акарбоза c (mg/ml) | Апсорбанција | | | Инхибиција | | | |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| | A ₁ | A ₂ | A ₃ | I ₁ (%) | I ₂ (%) | I ₃ (%) | I _{sr} (%) |
| 0,3125 | 0,872 | 0,957 | 0,931 | 11,40 | 2,71 | 5,40 | 27,14 |
| 0,625 | 0,849 | 0,813 | 0,894 | 13,69 | 17,40 | 9,12 | 27,59 |
| 1,25 | 0,706 | 0,774 | 0,768 | 28,28 | 21,37 | 21,92 | 42,26 |
| 2,5 | 0,611 | 0,640 | 0,631 | 37,94 | 34,94 | 35,90 | 52,79 |
| 3,75 | 0,496 | 0,503 | 0,499 | 49,63 | 48,92 | 49,32 | 62,33 |
| 5 | 0,407 | 0,381 | 0,368 | 58,62 | 61,27 | 62,59 | 72,24 |
| 7,5 | 0,328 | 0,288 | 0,295 | 66,66 | 70,77 | 70,06 | 76,39 |
| 10 | 0,237 | 0,239 | 0,236 | 75,91 | 75,75 | 76,06 | 86,03 |
| 20 | 0,135 | 0,156 | 0,175 | 86,28 | 84,14 | 82,26 | 90,27 |
| контрола | 0,997 | 0,986 | 0,969 | | | IC ₅₀ | 3,73±0,08 |

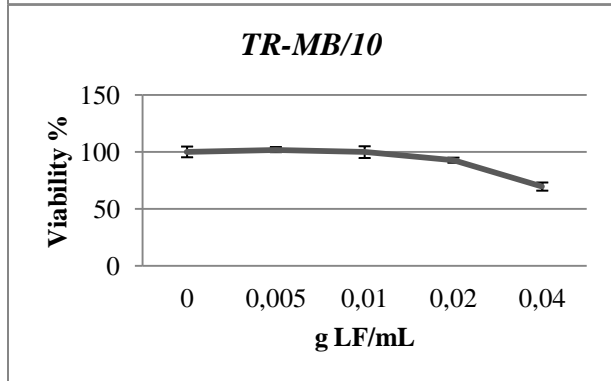
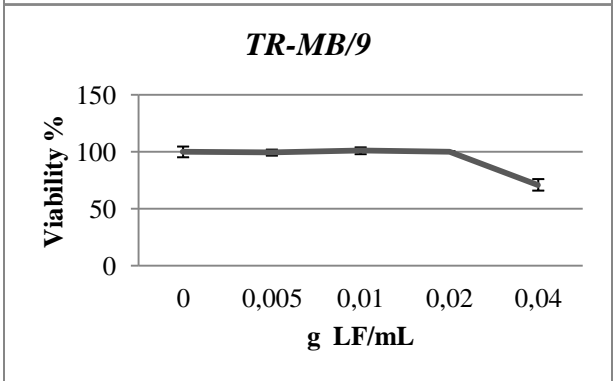
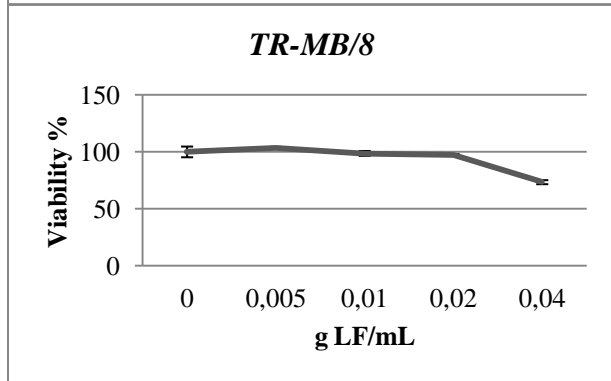
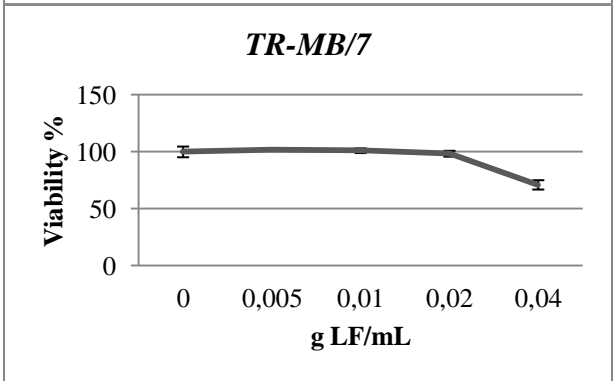
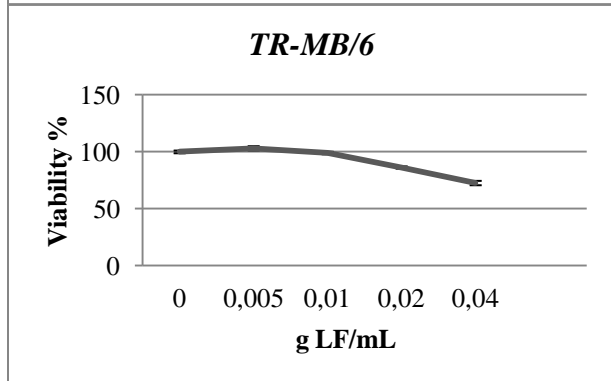
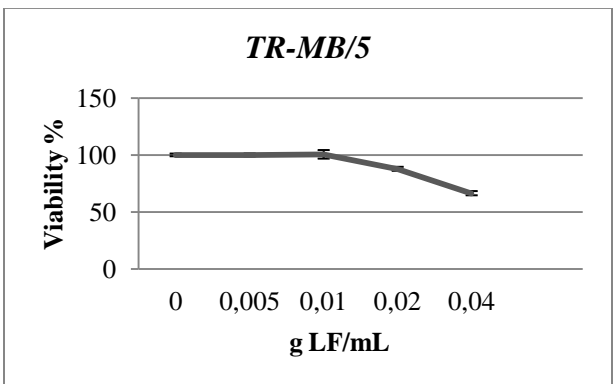
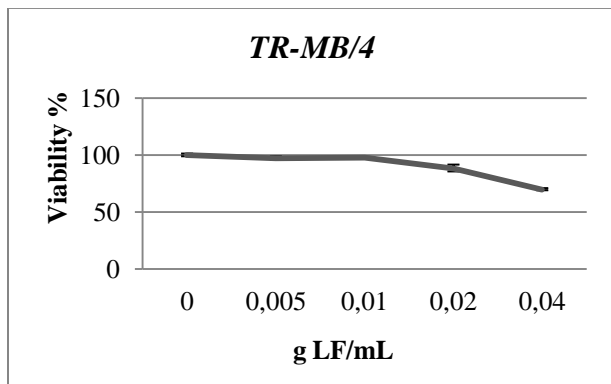
Прилог 14. Вијабилност Сасо-2 ћелија као мерило цитотоксичности екстраката воћа рода *Prunus*, генотипова трњине и генотипова дрена



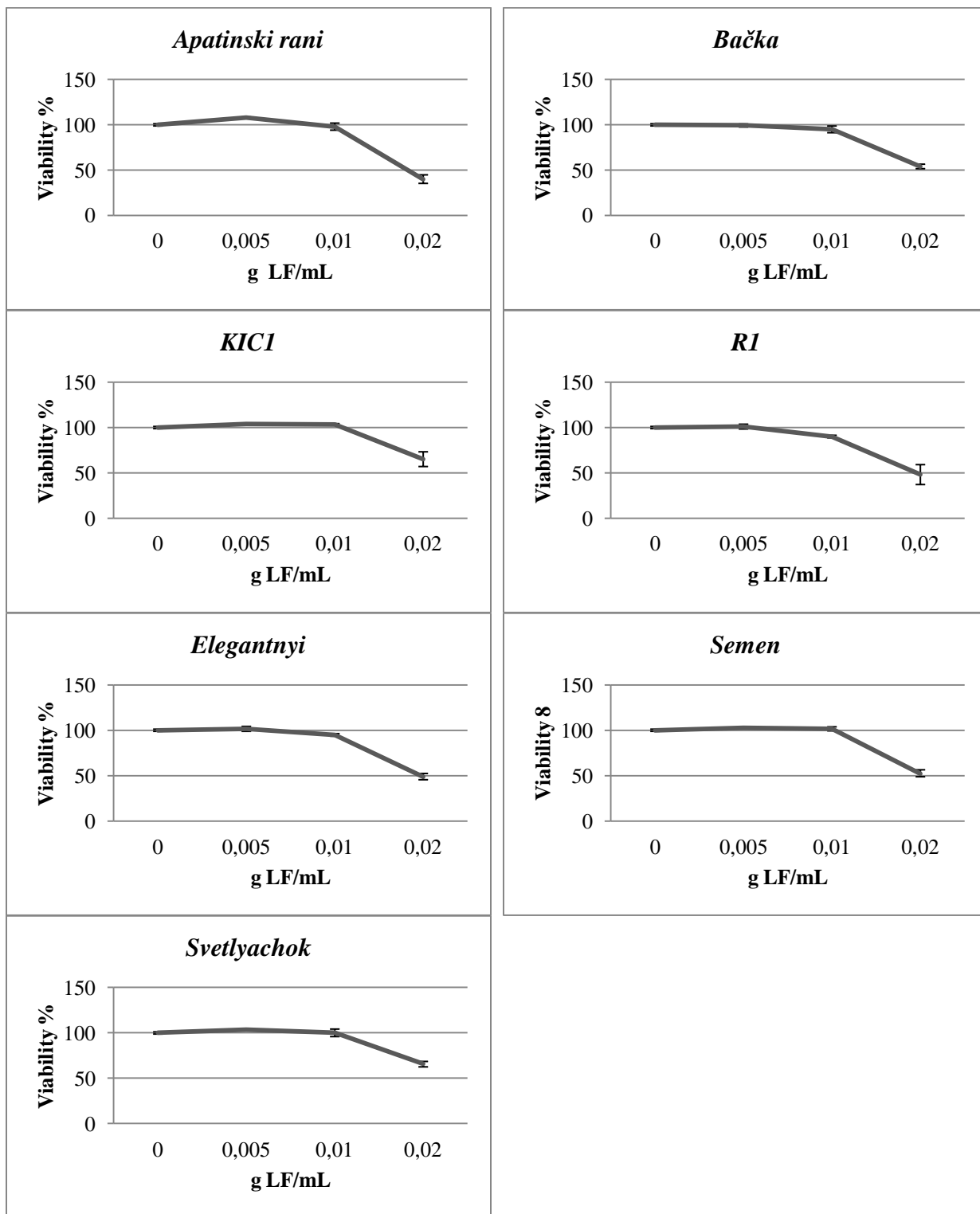


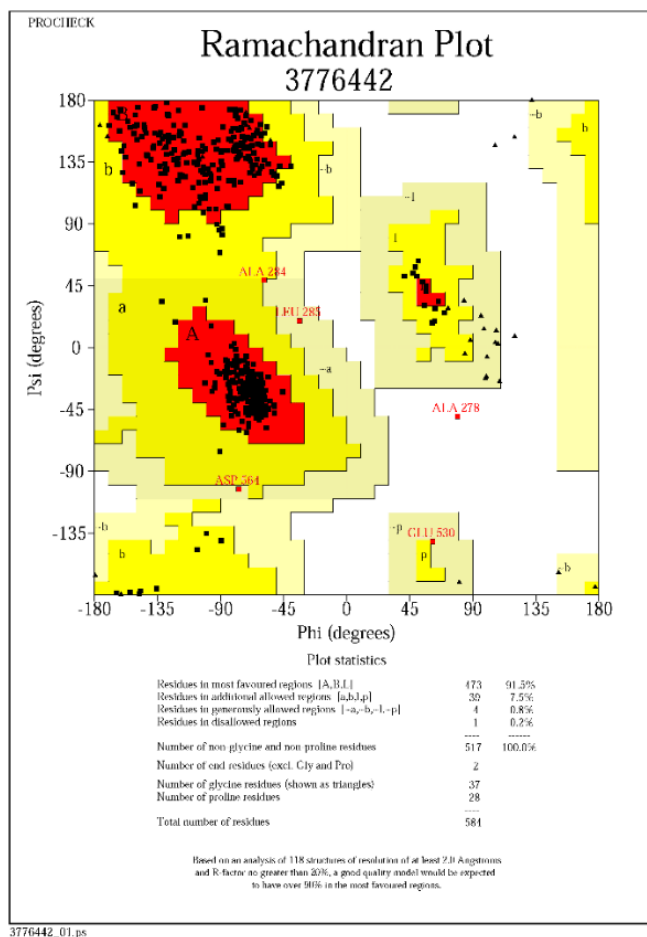
Генотипови трњине





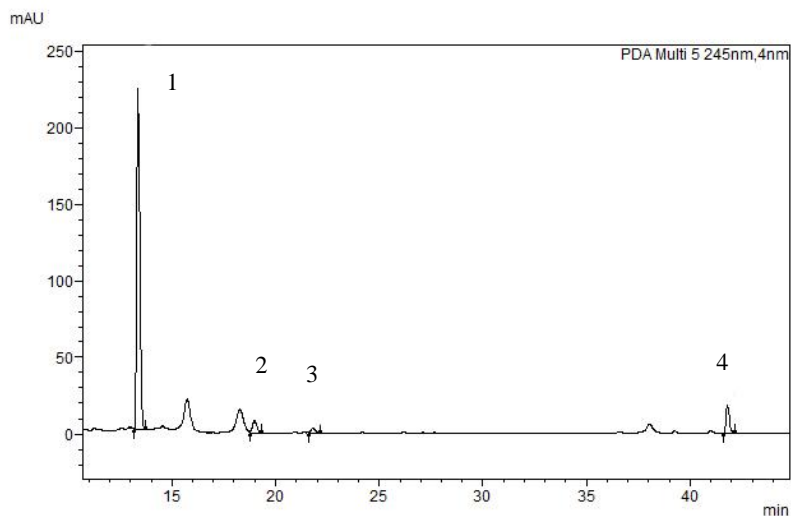
Генотипови дрена



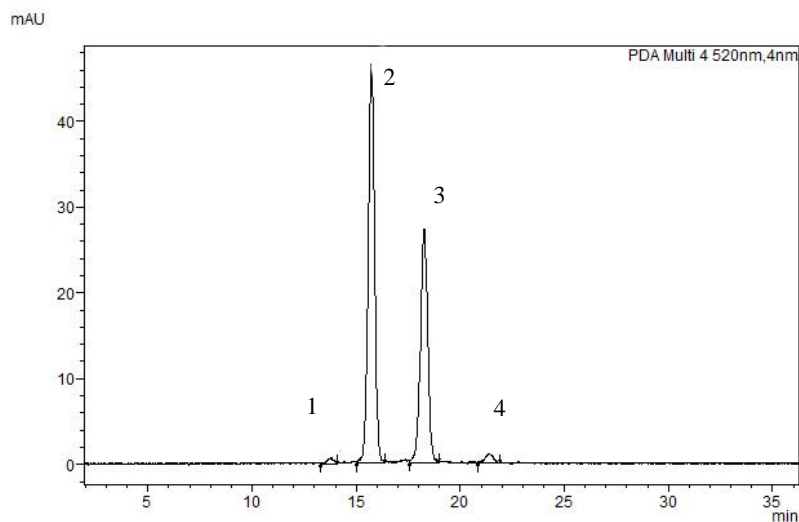
Прилог 15. Рамачандранов дијаграм модела α -глюкозидазе

Слика П.15. Рамачандранов дијаграм модела структуре квашчеве α -глюкозидазе генерисаног преко ПРОСНЕК валидационог сервера. Црвеном бојом су приказани најповољнији региони (енгл. the most favoured regions; 91,5 % аминокиселина), жутом бојом су приказани додатно дозвољени региони (енгл. additional allowed regions; 7,5 % аминокиселина), светло жуто су обојени веома дозвољени региони (енгл. generously allowed regions; 0,8 % аминокиселина) и бело обојени су недозвољени региони (енгл. disallowed regions; 0,2 % аминокиселина).

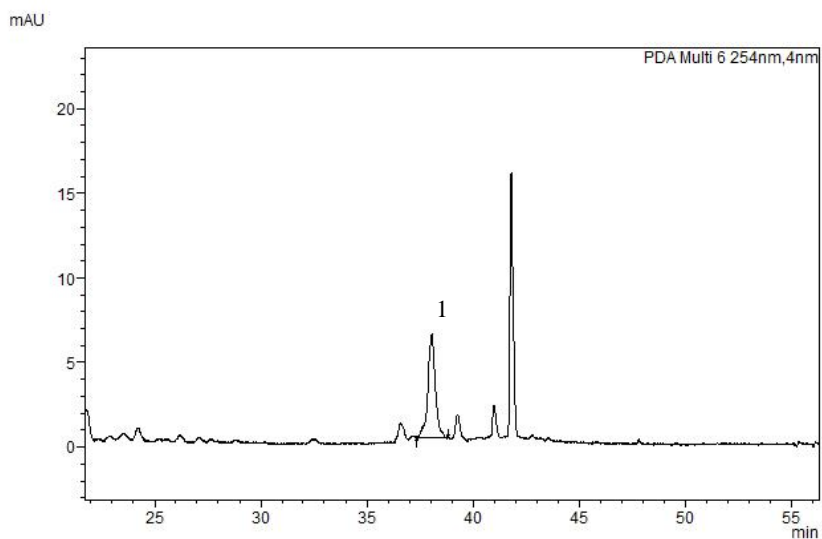
Прилог 16. HPLC-PDA хроматограми екстракта узорка дрена (*Cornus mas* L.) коришћеног за инкапсулације, на 245 nm (иридоиди), 520 nm (антоцијани), 254 nm (елагинска киселина), 350 nm (флавоноли) и 320 nm (хидроксициметне киселине).



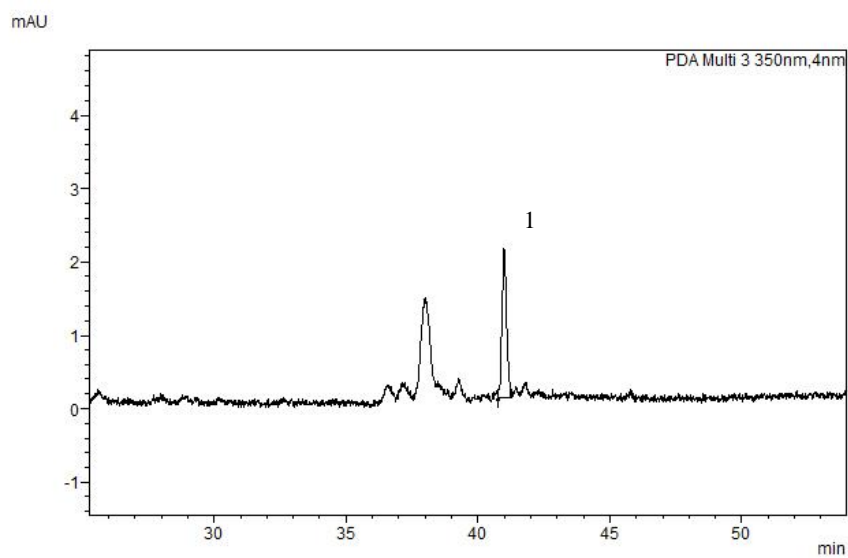
1 – логанска киселина, 2 – сверозид, 3 – логанин, 4 – корнузид



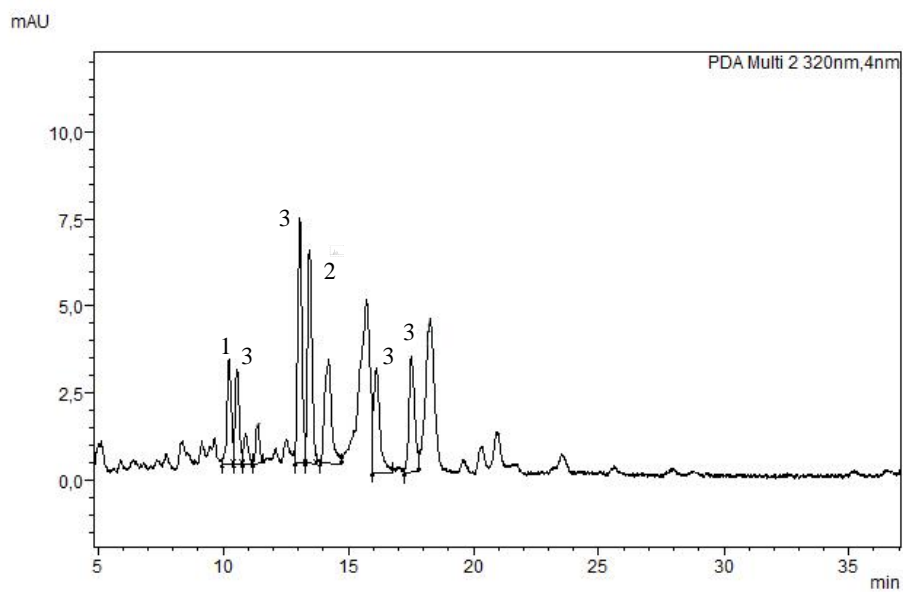
1 – делфинидин-3-*O*-галактозид, 2 – цијанидин-3-*O*-галактозид, 3 – пеларгонидин-3-*O*-галактозид, 4 – пеларгонидин-3-*O*-робинобиозид



1 – елагинска киселина

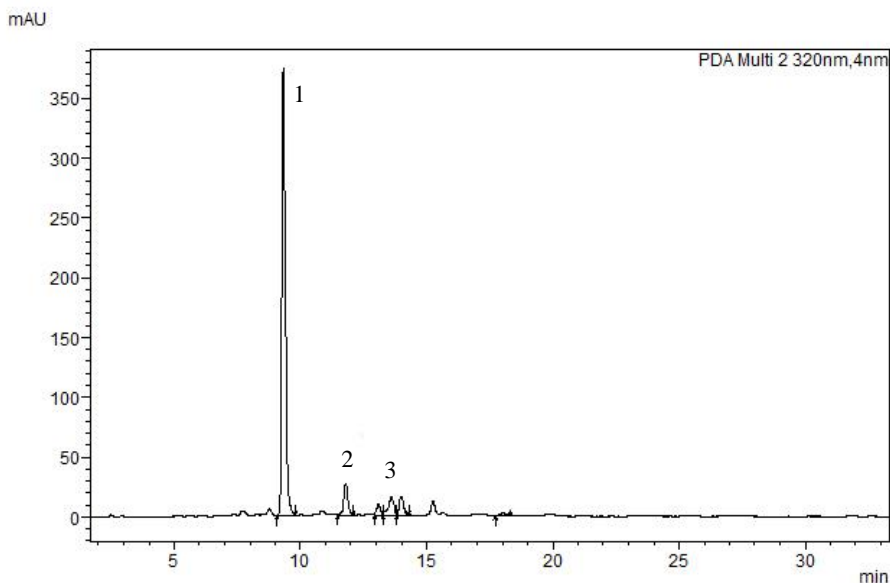


1 – кемферол-3-*O*-галактозид

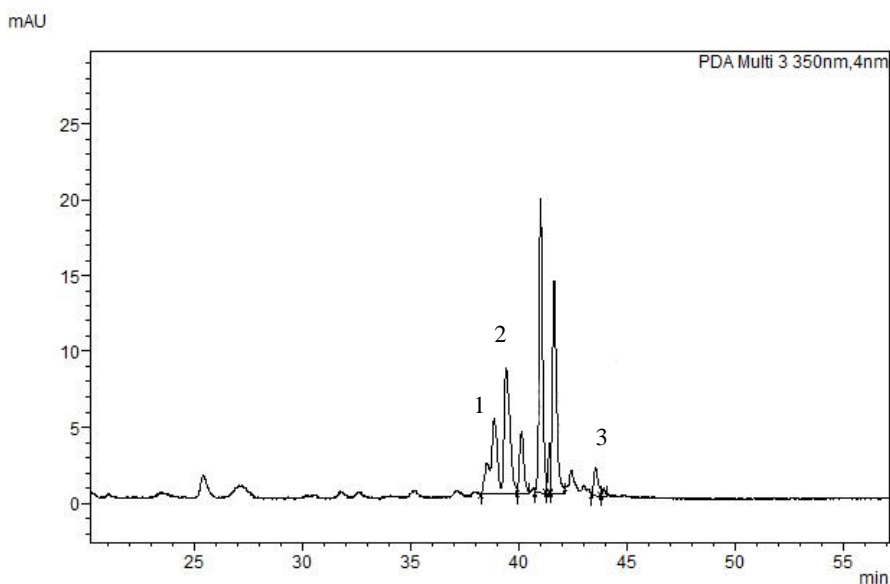


1 – *cis*-кафтаринска киселина, 2 – *trans*-кафтаринска киселина, 3 – деривати *p*-кумаринске киселине

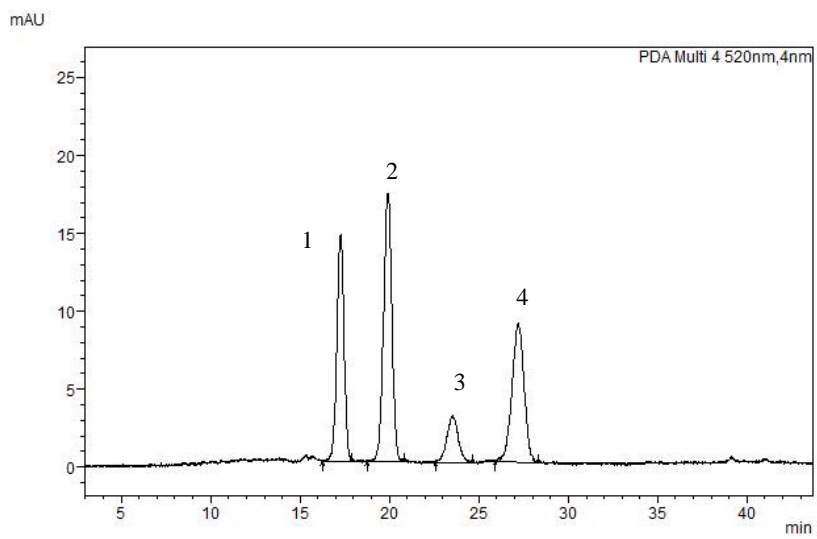
Прилог 17. HPLC-PDA хроматограми екстракта узорка трњине (*Prunus spinosa* L.) коришћеног за инкапсулације, на 320 nm (хидроксициметне киселине), 350 nm (флавоноли) и 520 nm (антоцијани).



1 – метил-3-*O*-кафеоилхинат + 3-*O*-кафеоилхинска киселина, 2 – дериват *p*-кумаринске киселине, 3 – дериват кафеоилхинске киселине

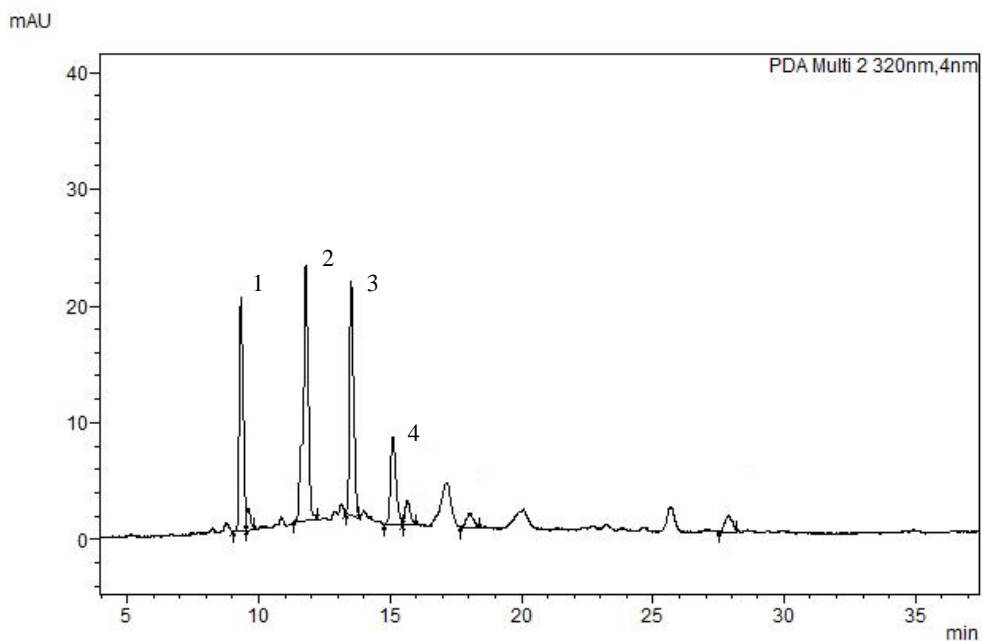


1 – кверцетин-3-*O*-глукозид, 2 – кверцетин-3-*O*-рутинозид, 3 – кверцетин

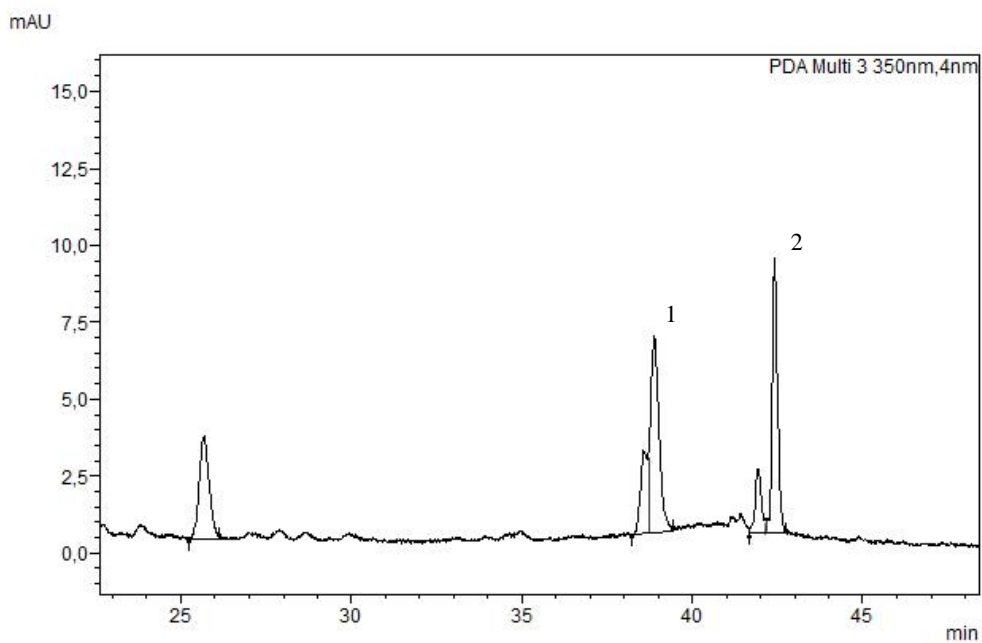


1 – цијанидин-3-*O*-глюкозид, 2 – цијанидин-3-*O*-рутинозид, 3 – пеонидин-3-*O*-глюкозид, 4 – пеонидин-3-*O*-рутинозид

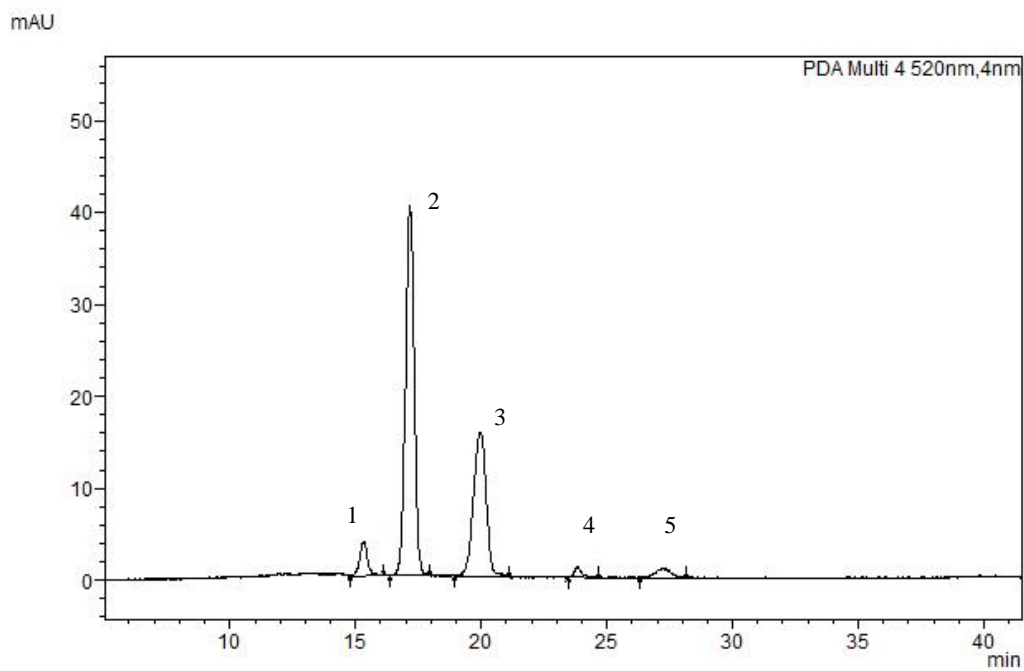
Прилог 18. HPLC-PDA хроматограми екстракта узорка тропа вишње (*Prunus cerasus* L.) коришћеног за инкапсулације, на 320 nm (хидроксициметне киселине), 350 nm (флавоноли) и 520 nm (антоцијани).



1 – 3-*O*-кафеоилхинска киселина, 2 – дериват *p*-кумаринске киселине, 3 – 5-*O*-кафеоилхинска киселина, 4 – дериват кафеене киселине



1 – кверцетин-3-*O*-рутинозид, 2 – изорамнетин-3-*O*-рутинозид



1 – цијанидин-гликозид, 2 – цијанидин-3-*O*-(2'-глукозил)рутинозид, 3 – цијанидин-3-*O*-рутинозид, 4 – цијанидин-гликозид, 5 – пеонидин-3-*O*-рутинозид

Научне публикације резултата дисертације

Food Chemistry 302 (2020) 125373



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Comparison between polyphenol profile and bioactive response in blackthorn (*Prunus spinosa* L.) genotypes from north Serbia-from raw data to PCA analysis



B.M. Popović^{a,*}, B. Blagojević^a, R. Ždero Pavlović^a, N. Mičić^a, S. Bijelić^a, B. Bogdanović^a,
A. Mišan^b, Catarina M.M. Duarte^c, Ana Teresa Serra^{c,d}

^a Department of Field and Vegetable Crops, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad, Serbia

^b Institute of Food Technology, University of Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, Novi Sad 21000, Serbia

^c Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa (ITQB NOVA), Oeiras, Portugal

^d IBET, Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Apartado 12, Oeiras, Portugal

ARTICLE INFO

Keywords:

Blackthorn
Polyphenols
 α -Amylase and α -Glucosidase activities
Antiproliferative effect
PCA

ABSTRACT

The aim of this work was to investigate and compare the phenolic profile of 15 wild growing blackthorn (*Prunus spinosa* L.) genotypes from the slopes of Fruška Gora mountain in north Serbia. Their effect in inhibiting i) α -amylase and α -glucosidase activities and ii) colorectal cancer cell line (HT29) growth was also studied. Blackthorn fruit extracts exhibited high phenolic content being rich in anthocyanins. Principal component analysis was used to correlate the bioactive response with phenolic composition. It was found that derivatives quercetin and anthocyanin peonidin are the major contributors of the inhibition of carbohydrates hydrolyzing enzymes as well as with the antiproliferative effect of blackthorn. Among all samples, the genotype from Beška locality showed the higher capacity in inhibiting α -amylase, α -glucosidase and HT29 cell growth. Because of high anthocyanin content and higher bioactive response, these genotypes could be recommended for the further cultivation and investigation.

1. Introduction

Fruit consumption has been shown in epidemiological studies to be related with a reduce the risk of cancer and cardiovascular diseases (Block, Patterson, & Subar, 1992). Despite there are a high number of scientific reports studying the health promoting effect of many spices, fruits, crops, herbs and teas, there are few information about the characterization of wild fruits which grow mainly in forests. The majority of these samples are not sufficiently explored and used although in earlier times it was the only food and drug trafficking.

In recent years increasing attention has been paid by consumers to wild or less known fruits, such as cornelian cherry (Popović, Štajner, Slavko, & Sandra, 2012) and also fruits from genus *Prunus* (*Prunus avium*-wild cherry and *Prunus spinosa*-blackthorn), (Guimarães et al., 2013), wild apple (Rehman et al., 2018) and wild pear (Baltas, 2017). Although there are some publications considering blackthorn (Meschini et al., 2017; Ruiz-Rodríguez et al., 2014; Velickovic et al., 2013) this fruit is still insufficiently investigated, especially Serbian varieties and genotypes.

Prunus spinosa L. (blackthorn) belongs to the rose family (*Rosaceae*). The plant grows as a shrub on wild, uncultivated areas both in the south and north Serbia. Blackthorn fruits are commonly eaten raw and also prepared in jams or macerated with sugar, honey and brandy to obtain a digestive and laxative liqueur (Ruiz-Rodríguez et al., 2014). It has also been used as astringent, diuretic and purgative. Wild fruits of *Arbutus unedo* (strawberry tree), *Prunus spinosa*, *Rosa canina* and *Rosa micrantha* (wild roses) have already been analyzed and compared in terms of phytochemical composition (Guimarães et al., 2013). It was found that *P. spinosa* possessed the highest levels of phenolic acids and flavonoids, including anthocyanins, flavonols, and flavones, although no flavan-3-ols could be identified in its fruits. *P. spinosa* fruits presented the highest concentration in phenolic acids and flavone/ols, being 3-*O*-caffeoyl-quinic acid and quercetin 3-*O*-rutinoside the major compounds present in this fruit. In leaves of *P. spinosa* coumarins, flavonoids, norisoprenoid glycosides and also various proanthocyanidin derivatives were found.

Veličković et al. showed that blackthorn varieties from southeast Serbia presents neochlorogenic acid, caffeic acid, myricetin, quercetin and cyanidin and peonydin glucosides as major polyphenol components

* Corresponding author.

E-mail address: popovicb@polj.uns.ac.rs (B.M. Popović).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125373>

Received 10 May 2019; Received in revised form 24 July 2019; Accepted 14 August 2019

Available online 14 August 2019

0308-8146/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Food Chemistry 335 (2021) 127619



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

An *in vitro* and *in silico* evaluation of bioactive potential of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) extracts rich in polyphenols and iridoids



Bojana Blagojević^{a,*}, Dejan Agić^b, Ana Teresa Serra^{c,d}, Sara Matić^e, Mihaela Matovina^e, Sandra Bijelić^f, Boris M. Popović^a

^a Department of Field and Vegetable Crops, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad, Serbia

^b Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1, 31 000 Osijek, Croatia

^c Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa (ITQB NOVA), Oeiras, Portugal

^d IBET, Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Apartado 12, Oeiras, Portugal

^e Division of Organic Chemistry and Biochemistry, Ruder Bošković Institute, Bijenička 54, 10 000 Zagreb, Croatia

^f Department of Fruit Growing, Viticulture, Horticulture and Landscape Architecture, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad, Serbia

ARTICLE INFO

Keywords:

Cornelian cherry
Cornus mas
Antioxidants
HT29
 α -Amylase
 α -Glucosidase
Dipeptidyl peptidase III

ABSTRACT

In the present research, seven different cornelian cherry (*Cornus mas* L.) cultivars and selections were examined. *In vitro* and *in silico* methods were applied for determining and correlating phytochemical constituents and biological potential. Loganic acid, cornuside, cyanidin 3-galactoside, and pelargonidin 3-galactoside were determined as the most dominant compounds, presenting $\geq 90\%$ of the all detected iridoid and phenolic constituents in the extracts. Cornelian cherry fruits were characterized by high antioxidant capacity and anti-proliferative activity on human colon cancer cells (HT29). It was observed the strong inhibitory potential of α -amylase, α -glucosidase, and dipeptidyl peptidase III (DPP III) enzyme activities. Principal component analysis (PCA) was used as a very helpful tool to discriminate the constituents with the highest contribution to tested bioactivities and to highlight the most potent genotypes. PCA, together with binding energies measurements and docking analysis, pointed out pelargonidin 3-robinobioside as the strongest inhibitor of α -glucosidase.

1. Introduction

Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) belongs to Cornaceae family and it is a perennial shrub mostly grown in Balkan and Apennine peninsulas, central Europe and southwest Asia. It is known since ancient times, and its fruits have been used in ethnomedicinal purposes mostly for intestinal diseases, inflammations, sore throat, and fever treatments (Dinda et al., 2016). Fruits are consumed fresh, but also processed, in form of jam, syrup, juice, as well as alcoholic beverages, like liqueur, wine, beer (Bijelić, Gološin, Todorović, Cerović, & Popović, 2011; Kawa-Rygielska, Adamenko, Kucharska, Prorok & Piórecki, 2019).

The characteristic of cornelian cherry fruits is the presence of iridoids. Not many fruits contain these compounds. Apart from *Cornus* species (Kucharska, Szumny, Sokół-Letowska, Piórecki & Klymenko, 2015; Yamabe et al., 2010), iridoids are found in some berries (Kucharska, Sokół-Letowska, Oszmiński, Piórecki & Fecka, 2017), and some exotic fruits, such as noni (Nerurkar, Hwang, & Saks, 2015).

Cornelian cherry fruits present also a plentiful source of phenolic compounds that exhibit numerous biological activities (Popović, Štajner, Kevrešan, & Bijelić, 2012).

Researches on cornelian cherry biological activities which have been performed till now obtained promising results. Cornelian cherry fruits manifest potent antioxidant, anti-inflammatory, and anti-proliferative activities (Moldovan, Filip, Clichici, Suharschi, Bolfa, & David, 2016; Tiptiri-Kourpeti et al., 2019). Polyphenol and iridoid constituents of cornelian cherry fruits exhibit positive immunomodulatory effect (Piekarska, Szczypka, Kucharska, & Gorczykowski, 2018), antiinflammatory, antisclerotic (Sozański et al., 2016), antidiabetic (Jayaprakasam, Olson, Schutzki, Tai & Nair, 2006) properties in animal models, and *in vitro* inhibition of α -amylase and lipase (Świerczewska, Buchholz, Melzig & Czerwińska, 2019).

Cornelian cherry presents a very promising functional fruit due to its powerful biological potential. Regarding its traditional use and prospective uses in food and beverage production (Dinda et al., 2016;

* Corresponding author.

E-mail addresses: bojana.blagojevic@polj.uns.ac.rs (B. Blagojević), dejan.agic@fazos.hr (D. Agić), tserra@itqb.unl.pt (A.T. Serra), sara.matic@irb.hr (S. Matić), mmatovina@irb.hr (M. Matovina), sbijelic@polj.uns.ac.rs (S. Bijelić), boris.popovic@polj.uns.ac.rs (B.M. Popović).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127619>

Received 17 May 2020; Received in revised form 7 July 2020; Accepted 17 July 2020

Available online 25 July 2020

0308-8146/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

LWT

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt

Halloysite nanotubes as a carrier of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) bioactives

Bojana Blagojević^{a,*}, Dragana Četojević-Simin^b, Filippo Parisi^c, Giuseppe Lazzara^c, Boris M. Popović^a

^a Department of Field and Vegetable Crops, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000, Novi Sad, Serbia

^b Oncology Institute of Vojvodina, Dr Goldmana 4, 21204, Sremska Kamenica, Serbia

^c Dipartimento di Fisica e Chimica, Università Degli Studi di Palermo, Viale Delle Scienze, Pad. 17, Palermo, 90128, Italy

ARTICLE INFO

Keywords:

Halloysite
Cornelian cherry
Iridoids
Anthocyanins
Bioactivity

ABSTRACT

Cornelian cherry fruit extract rich in anthocyanins and iridoids was encapsulated in the halloysite nanotubes in order to obtain a stable nanoscale system for better delivery and prolonged release of bioactive constituents. The cyclic vacuum technique was used for halloysite nanotubes-cornelian cherry composite preparation and the loading of 8.5 wt% was achieved. Pure cornelian cherry extract exhibited antiproliferative effect on HT-29, MCF7, and MRC-5 cells, pristine halloysite nanotubes affected the growth of MCF7 cells, while halloysite nanotubes-cornelian cherry composites demonstrated proliferative activity in all tested cells. The sustained release of anthocyanins was achieved by this encapsulation strategy. Additional implementation of halloysite nanotubes-cornelian cherry into yogurt prolonged the release of iridoid molecules. Obtained results indicate that halloysite nanoclay is a suitable nanocarrier for cornelian cherry constituents that can be utilized in food and pharmaceutical industries.

1. Introduction

Halloysite is naturally occurring nanoclay, with chemical formula $\text{Al}_2\text{SiO}_5(\text{OH})_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (Lvov & Abdullayev, 2013). It has been known for more than a hundred years and it was used for ceramics. At the beginning of the 21st century, its intensive usage has been started, especially for medicinal purposes, cosmetics, agriculture, catalysis, etc. (Churchman, Pasbakhsh, & Hillier, 2016; Sadjadi, 2020; Yuan, Tan, & Annabi-Bergaya, 2015).

A wide range of its usage, halloysite owes to its structure. The most usual halloysite form is elongated tube usually 1 μm long and approximately 50 nm wide outer diameter and 15 nm inner lumen diameter (Lvov, Aerov, & Fakhrullin, 2014). It should be noted that the characteristic sizes are highly dependent on the deposit (Cavallaro, Chiappisi, Pasbakhsh, Grdzielski, & Lazzara, 2018; Pasbakhsh, Churchman, & Keeling, 2013). The silica layer is on the outer surface and it is negatively charged (-30 mV), while the alumina layer is on the inner surface providing positive charge ($+25$ mV). This charge difference allows the binding of different molecules in the lumen and on the outer surface

area.

Nanoscale systems of delivery of bioactive compounds represent a novel technology approach for improved bioavailability and bioactivity, predominantly because of controlled and sustained delivery management. Halloysite nanotubes (HNT) became a promising nanocarrier for bioactive compounds. Its biocompatibility and non-toxicity were confirmed in several studies, justifying its usage in biological investigations (Fakhrullina, Akhatova, Lvov, & Fakhrullin, 2015; Lai et al., 2013; Lvov, DeVilliers, & Fakhrullin, 2016; Naumenko, Guryanov, Yendluri, Lvov, & Fakhrullin, 2016; Vergaro et al., 2010). Pristine and functionalized HNT were shown to be a good system for entrapping secondary biomolecules, such as curcumin (Riela et al., 2014) and resveratrol (Vergaro, Lvov, & Leporatti, 2012).

Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) fruit has high bioactive potential, but it is underused not sufficiently investigated. Cornelian cherry (CC) fruit is an abundant source of bioactive molecules, especially of polyphenols and iridoids (Kucharska, Szumny, Sokól-Letowska, Piórecki, & Klymenko, 2015). CC fruit constituents are proved to manifest beneficial health effects, such as antidiabetic (Dzydzan, Bila, Kucharska, Brodyak,

* Corresponding author.

E-mail addresses: bojana.blagojevic@polj.uns.ac.rs (B. Blagojević), ddaageerr@gmail.com (D. Četojević-Simin), filippo.parisi@unipa.it (F. Parisi), giuseppe.lazzara@unipa.it (G. Lazzara), boris.popovic@polj.uns.ac.rs (B.M. Popović).

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110247>

Received 15 June 2020; Received in revised form 9 September 2020; Accepted 16 September 2020

Available online 19 September 2020

0023-6438/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

LWT

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt

A one step enhanced extraction and encapsulation system of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) polyphenols and iridoids with β -cyclodextrin

Boris M. Popović^a, Bojana Blagojević^a, Dragana Latković^{a,*}, Dragana Četojević-Simin^b, Alicja Z. Kucharska^c, Filippo Parisi^d, Giuseppe Lazzara^d

^a Department of Field and Vegetable Crops, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000, Novi Sad, Serbia

^b Oncology Institute of Vojvodina, Put Doktora Goldmana 4, 21204, Srenska Kamenica, Serbia

^c Department of Fruit, Vegetable and Plant Nutraceutical Technology, Faculty of Food Science, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Chelmońskiego 37, 51-630, Wrocław, Poland

^d Dipartimento di Fisica e Chimica, Università Degli Studi di Palermo, Viale Delle Scienze, Pad. 17, Palermo, 90128, Italy

ARTICLE INFO

Keywords:

Polyphenols
Iridoids
Cornelian cherry
Ultrasound-assisted extraction
 β -cyclodextrin

ABSTRACT

The objective of this study was simultaneous extraction and encapsulation of cornelian cherry active principles. As an encapsulating agent, β -cyclodextrin (β -CD) was used to enhance the ultrasound-assisted extraction of cornelian cherry polyphenols and iridoids. Lyophilized cornelian cherry fruit was extracted by four different solvents: pure water, 50% aqueous ethanol (conventional system), 1.5% β -CD water solution and 1.5% β -CD aqueous ethanol solution. The highest enhancement of the extraction efficiency was observed for flavonoids and anthocyanins, especially for cyaniding 3-galactoside and pelargonidin 3-galactoside. Water-ethanolic extract was used to form inclusion complexes between β -CD and cornelian cherry bioactives in the solid form. The encapsulation efficiency of cornelian cherry polyphenols in β -CD was 65.62%. Due to the polyphenol encapsulation within β -CD, the extract showed better solubility in water, higher antioxidant power (for 40.61%), and the release of anthocyanins from the dried powder was prolonged for 50% in the first 2 h making it suitable for diverse applications in food and pharmaceutical industries.

1. Introduction

Cornus mas L. (Cornaceae family) is a European and Asiatic shrub known as cornelian cherry whose fruits have been used in traditional medicine in various countries. Fruits from several *Cornus* spp. have been characterized as antibacterial, antihistamine, anti-allergic, antimicrobial, antimalarial, and antidiabetic agents, with potential to be used in treatment of some medical conditions such as gastrointestinal disorders and diarrhea, and to improve liver and kidney functions (Blagojević et al., 2021; Hosseinpour-Jaghdani, Shomali, Gholipour-Shahraki, Rahimi-Madiseh, & Rafieian-Kopaei, 2017; Popović, Štajner, Kevrešan, & Bijelić, 2012). Medicinal benefits from cornelian cherry fruits are attributed to the polyphenols and iridoids among which loganic acid and cornuside as well as anthocyanins of cyanidin, delphinidin and pelargonidin are the most dominant (Blagojević et al., 2021). Apart from health benefits, antioxidant properties of polyphenol and iridoid compounds potentiate the usage of cornelian cherry fruits in the food industry as a source of protective food agents or as anthocyanin-based

natural dyes, as well (Blagojević et al., 2021; Blagojević, Četojević-Simin, Parisi, Lazzara, & Popović, 2020).

Conventional methods for the extraction of bioactives from plant material such as Soxhlet extraction and maceration have been intensively used despite certain disadvantages such as excessive consumption of time, energy and polluting organic solvents (Ameer, Shahbaz, & Kwon, 2017). The objective of “the green chemistry approach” is to obtain higher extraction efficiency with reduced extraction time, quantity of solvent, global energy consumption, economical costs and quantity of generated waste. Pure water is considered to be the greenest solvent because it is non-toxic, non-corrosive, non-flammable, environmentally friendly and widely available at low cost. The only disadvantage of water is its limitation to extract less-polar compounds. The extraction by water can be enhanced using microwave irradiation (MW) or ultrasound (ultrasound assisted extraction UAE). Also, the ability of water to extract a wide range of compounds can be enhanced by using different co-solvents, such as ethanol and glycerol as well as “green additives” like sugars (El Kantar et al., 2019). According to Albahari

* Corresponding author.

E-mail address: dragana.latkovic@polj.uns.ac.rs (D. Latković).

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110884>

Received 24 September 2020; Received in revised form 4 January 2021; Accepted 8 January 2021

Available online 21 January 2021

0023-6438/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

БИОГРАФИЈА

Бојана Благојевић је рођена 21. јуна 1990. године. Основну школу Милош Црњански и средњу школу 22. октобар, одељење гимназије, завршила је у Жабљу. Носилац је бројних школских диплома са такмичења из области хемије и биологије. Основне студије на програму Биохемија на Департману за хемију, биохемију и заштиту животне средине Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду је завршила 2013. године са просечном оценом 9,94, а мастер академске студије на истом студијском програму је завршила 2014. године са просечном оценом 10,00. За дипломски рад под називом „Одређивање садржаја деривата 1,8-дихидроксиантрахинона у одабраним врстама подфамилије Polygonoideae“ је у мају 2014. године освојила награду фонда Ненада Костића за најбоље дипломске и мастер радове из области хемијских наука. Добитник је и признања Српског хемијског друштва за одличан успех током студија. Била је стипендиста Фонда за младе таленте Републике Србије школске 2012/2013. и 2013/2014. године.



Током основних и докторских студија је била на неколико стручних усавршавања у иностранству. Током лета 2012. године је провела 6 недеља у програму Летње школе хемије у Грацу из области биотехнологије, у септембру 2015. године је провела 2 недеље на студијском боравку на Департману за биологију биљака Универзитета у Сегедину, у оквиру пројекта *PLANTTRAIN* (Hungary-Serbia IPA Cross-border Co-operation Programme), а месец дана у току лета 2019. године је боравила на Департману за физичку хемију Универзитета у Палерму где се усавршавала у области инкапсулације.

Коаутор је осам научних радова који су публиковани у међународним часописима категорије M21 и M23 и више од двадесет саопштења са међународних научних скупова штампаних у изводу, као и три саопштења са међународних научних скупова штампана у целости.

Од октобра 2016. године је запослена на Пољопривредном факултету Универзитета у Новом Саду као асистент за ужу научну област Хемија и биохемија.

Нови Сад, 26.02.2021.

Бојана Благојевић

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

| | |
|--|--|
| Редни број: РБР | |
| Идентификациони број: ИБР | |
| Тип документације: ТД | Монографска документација |
| Тип записа: ТЗ | Текстуални штампани материјал |
| Врста рада (дипл., маг., докт.): ВР | Докторска дисертација |
| Име и презиме аутора: АУ | Бојана Благојевић |
| Ментор (титула, име, презиме, звање): МН | Др Борис Поповић, редовни професор Пољопривредног факултета у Новом Саду Др Емилија Свирчев, доцент Природно- математичког факултета у Новом Саду |
| Наслов рада: НР | Фитохемијска карактеризација и биолошке активности екстраката и инкапсулата воћа родова <i>Prunus L.</i> и <i>Cornus L.</i> |
| Језик публикације: ЈП | српски језик (ћирилично писмо) |
| Језик извода: ЈИ | срп. / енг. |
| Земља публикавања: ЗП | Република Србија |
| Уже географско подручје: УГП | АП Војводина |
| Година: ГО | 2021. |
| Издавач: ИЗ | ауторски репринт |
| Место и адреса: МА | Нови Сад, Трг Доситеја Обрадовића 3 |

| | |
|--------------------------|---|
| Физички опис рада: ФО | број поглавља 8 / страница 288 / слика 72 / табела 19 / референци 324 / прилога 18 |
|--------------------------|---|

| | |
|---|--|
| Научна област: НО | Биохемија |
| Научна дисциплина: НД | Биохемија биљака |
| Предметна одредница, кључне речи: ПО | <i>Prunus</i> , <i>Cornus</i> , фенолни профил, иридоидни профил, антиоксидантни капацитет, антипролиферативна активност, α -амилаза, α -глукозидаза, дипептидил-пептидаза III, инкапсулације, халојзит, малтодекстрин, β -циклодекстрин, <i>controlled release</i> |
| УДК | |
| Чува се: ЧУ | Библиотека Департмана за хемију, биохемију и заштиту животне средине, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом саду, Трг Доситеја Обрадовића 3, Нови Сад |
| Важна напомена: ВН | - |
| Извод: ИЗ | <p>Плодови воћа 15 врста рода <i>Prunus</i> L., 15 генотипова трњине (<i>P. spinosa</i> L.) и 7 генотипова дрена (<i>Cornus mas</i> L.) су анализирани у погледу фитохемијске карактеризације и биолошких активности. HPLC анализом је за све врсте одређен фенолни профил, а за плодове дрена и иридоидни профил. Биоактивни потенцијал је процењен на основу антиоксидантног капацитета (Фолин-Чокалте, FRAP и DPPH тест), антипролиферативне активности према HT-29 ћелијама (аденокарцином дебелог црева), способности инхибиције ензима α-амилазе, α-глукозидазе и дипептидил-пептидазе III (DPP III). Статистичке методе анализе, кластер, корелациона и анализа главних компонената (PCA) су издвојиле генетички сродне врсте и једињења која дају највећи допринос појединим биолошким активностима. Молекулским докингом су издвојена једињења која имају најбољу способност инхибиције α-амилазе, α-глукозидазе и DPP III ензима.</p> <p>Екстракти плодова трњине, дрена и тропа вишње су инкапсулирани у халојзит, малтодекстрин, халојзит-малтодекстрински композит и β-циклодекстрин. Испитана су физичкохемијска својства инкапсулата, ефикасност инкапсулације, антипролиферативна активност према туморским ћелијама MCF7 (аденокарцином дојке), HT-29 (аденокарцином дебелог црева) и нетуморским MRC-5 ћелијама (фетални фибробласти плућа), као и контролисано отпуштње активних супстанци из инкапсулата (<i>controlled release</i>).</p> |
| Датум прихватања теме од стране Сената: ДП | 30. 01. 2020. |

| | |
|--|---|
| <p>Датум одбране: ДО</p> | |
| <p>Чланови комисије: (име и презиме / титула / звање / назив организације / статус) КО</p> | <hr/> <p>Председник: др Неда Мимица-Дукић редовни професор Природно-математички факултет у Новом Саду</p> <hr/> <p>Ментор: др Борис Поповић редовни професор Пољопривредни Факултет у Новом Саду</p> <hr/> <p>Ментор: др Емилија Свирчев доцент Природно-математички факултет у Новом Саду</p> <hr/> <p>Члан: др Јасна Чанадановић-Брунет редовни професор Технолошки факултет у Новом Саду</p> <hr/> <p>Члан: др Драгана Четојевић-Симин научни саветник Институт за онкологију Војводине, Сремска Каменица</p> |

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES**

KEY WORD DOCUMENTATION

| | |
|--------------------------------|---|
| Accession number: ANO | |
| Identification number: INO | |
| Document type: DT | Monograph documentation |
| Type of record: TR | Textual printed material |
| Contents code: CC | |
| Author: AU | Bojana Blagojević |
| Mentor: MN | Dr Boris Popović, Full professor, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad Dr Emilija Svirčev, Assistant professor, Faculty of Sciences University of Novi Sad |
| Title: TI | Phytochemical characterisation and biological activities of extracts and encapsulates of fruits of <i>Prunus</i> L. and <i>Cornus</i> L. genera |
| Language of text: LT | Serbian (Cyrillic) |
| Language of abstract: LA | Srb. / Eng. |
| Country of publication: CP | Republic of Serbia |
| Locality of publication: LP | AP Vojvodina |
| Publication year: PY | 2021. |
| Publisher: PU | Author's reprint |
| Publication place: PP | Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3 |

| | |
|------------------------------|--|
| Physical description: PD | Chapters 8 / pages 288 / figures 72 / tables 19 / references 324 / appendices 18 |
| Scientific field SF | Biochemistry |
| Scientific discipline SD | Biochemistry of medicinal plants |
| Subject, Key words SKW | <i>Prunus</i> , <i>Cornus</i> , phenolic profile, iridoid profile, antioxidant capacity, antiproliferative activity, α -amylase, α -glucosidase, dipeptidyl-peptidase III, encapsulation, halloysite, maltodextrin, β -cyclodextrin, <i>controlled release</i> |
| UC | |
| Holding data: HD | Library of Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Republic of Serbia |
| Note: N | - |
| Abstract: AB | <p>Fruits of 15 species of <i>Prunus</i> L. genus, 15 blackthorn (<i>P. spinosa</i> L.) genotypes and 7 cornelian cherry (<i>Cornus mas</i> L.) genotypes were phytochemically characterised and their biological activities were assessed. By HPLC analysis phenolic profile was determined for all examined fruits and iridoid profile for cornelian cherry fruits. Bioactive potential was estimated by antioxidant capacity (Folin-Ciocalteu, FRAP and DPPH tests), antiproliferative activity towards HT-29 cells (colon adenocarcinoma), α-amylase, α-glucosidase, and dipeptidyl peptidase III (DPP III) inhibitory activities. Statistical analysis methods – cluster, correlations and principal component analysis (PCA) highlighted genetically similar species and compounds which contributed mostly to certain biological activities. Molecular docking analysis pointed out the best inhibitors of α-amylase, α-glucosidase, and DPP III enzymes.</p> <p>The extracts of blackthorn and cornelian cherry fruits, and sour cherry pomace extract were further encapsulated in halloysite, maltodextrin, halloysite-maltodextrin composite and β-cyclodextrin. Physicochemical characterisation of encapsulates, encapsulation efficacy, antiproliferative effects on human cell lines MCF7 (breast adenocarcinoma), HT-29 (colon adenocarcinoma) and MRC-5 (fetal lung fibroblasts), and controlled release of bioactive molecules were assessed.</p> |
| Accepted on Senate on: AS | 30. 01. 2020. |

| | |
|----------------------------|---|
| Defended: DE | |
| Thesis Defend Board: DB | <hr/> <p style="text-align: center;"> President: Neda Mimica-Dukić, PhD Associate Professor Faculty of Sciences, University of Novi Sad </p> <hr/> <p style="text-align: center;"> Mentor: Boris Popović, PhD Professor Faculty of Agriculture, University of Novi Sad </p> <hr/> <p style="text-align: center;"> Mentor: Emilija Svirčev, PhD Assistant Professor Faculty of Sciences, University of Novi Sad </p> <hr/> <p style="text-align: center;"> Member: Jasna Čanadanović-Brunet, PhD Full Professor Faculty of Technology, University of Novi Sad </p> <hr/> <p style="text-align: center;"> Member: Dragana Četojević-Simin, PhD Full Research Professor Oncology Institute of Vojvodina, Sremska Kamenica </p> |

План третмана података

| |
|--|
| Назив пројекта/истраживања |
| Фитохемијска карактеризација и биолошке активности екстраката и инкапсулата воћа родова <i>Prunus L.</i> и <i>Cornus L.</i> |
| Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање |
| а) Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду, Нови Сад, Србија б) Department of Fruit, Vegetable and Plant Nutraceutical Technology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Wrocław, Poland б) Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa (ITQB NOVA), Oeiras, Portugal г) Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (iBET), Oeiras, Portugal д) Dipartimento di Fisica e Chimica, Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italia ђ) Fakultet agrobiotehničkih znanosti, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek , Hrvatska |
| Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање |
| Биосенсинг технологије и глобални системи за континуирана истраживања и интегрисано управљање екосистемима (бр. ИИИ43002) и Функционални производи на бази жита намењени особама са метаболичким поремећајима (бр. ТР31029) – пројекти Министарства, просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије и <i>In vitro</i> испитивања антиканцерогеног и антидијабетског деловања домаћих врста и дивљих сродника воћа рода <i>Prunus</i> – пројекат Покрајинског секретаријата за образовање и научноистраживачку делатност АПВ. |
| 1. Опис података |
| 1.1 Врста студије <i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> <u>експериментална студија</u> |
| 1.2 Врсте података а) квантитативни б) квалитативни |

1.3. Начин прикупљања података

а) анкете, упитници, тестови

б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи

в) генотипови: навести врсту – врсте рода *Prunus* L. – шљива (*P. domestica* L.), влашкача (*P. domestica* L. ssp. *domestica*), тургуња (*P. domestica* L. ssp. *insititia*), белошљива (*P. domestica* L. ssp. *insititia*), црвенолисни ринглов (*P. pissardi* Carrière), црвени и бели ринглов (*P. cerasifera* Ehrh.), трњина (*P. spinosa* L.), трешња (*P. avium* L.), вишња (*P. cerasus*), степска вишња (*P. fruticosa* Pall.), магрива (*P. mahaleb* L.), кајсија (*P. armeniaca* L.), бресква (*P. persica* Batsch.), и врста рода *Cornus* – дрен (*C. mas* L.)

г) административни подаци: навести врсту _____

д) узорци ткива: навести врсту _____

ђ) снимци, фотографије: навести врсту _____

е) текст, навести врсту _____

ж) мапа, навести врсту _____

з) остало: описати _____

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

а) Excel фајл, датотека .xlsx

б) SPSS фајл, датотека _____

в) PDF фајл, датотека .pdf

г) Текст фајл, датотека .docx

д) JPG фајл, датотека .jpg

ђ) Остало, датотека .stat, .opj, .lcd, PDB

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли: код испитивања врста рода *Prunus* је било укупно 45 варијабли (38 фитохемијских параметара и 7 биолошких активности), код испитивања генотипова трњине (*P. spinosa*) укупно 17 варијабли (10 фитохемијских параметара и 7 биолошких активности) и код генотипова дрена (*C. mas*) укупно 23 варијабле (17 фитохемијских параметара и 7 биолошких активности)

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.): све анализе фитохемијског састава и биолошких активности плодова воћа су урађене на 15 врста у оквиру рода *Prunus*, 15 генотипова трњине (*P. spinosa*) и 7 генотипова дрена (*C. mas*); анализе инкапсулата су урађене за инкапсулате 3 различите воћне врсте (дрен, трњину и троп вишње) са 4 носача (халојзит,

малтодекстрин, халојзит-малтодекстрински композит, β-циклодекстрин).

1.3.3. Поновљена мерења

а) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) временски размак између поновљених мера је 1–60 минута

б) варијабле које се више пута мере односе се на фитохемијску карактеризацију (фенолни и иридоидни профил) и биолошке активности (антиоксидантни капацитет, антипролиферативно дејство, способност инхибиције ензима α-амилазе, α-глукозидазе и дипептидил-пептидазе III) екстракта воћа, физичкохемијску карактеризацију инкапсулата, антипролиферативну активност и количину ослобођених активних конституената из инкапсулата

в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као нису именовани нови фајлови, јер је на основу три узастопна понављања дата средња вредност која је коришћена у анализама и налази се у постојећим фајловима

Напомене: _____ / _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, навести тип лабораторијски експерименти

б) корелационо истраживање, навести тип извршене су корелациона и анализа главних компонента (РСА) између фитохемијског састава и биолошких активности како би се установио допринос појединачних једињења одређеној биолошкој активности

ц) анализа текста, навести тип _____

д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

Спектрофотометри, течни хроматографи (HPLC) са масеним (MS/MS) и детектором са низом диода (PDA), скенирајући електронски микроскоп (SEM), термогравиметријски анализатор

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да Не

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) Колики је број недостајућих података? _____

б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не

в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података је контролисан софтвером Statistica for Windows, v.13 (StatSoft, 2020).

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола података уноса у матрицу је урађена поређењем са протоколима који су попуњавани приликом мерења, а потом и филтрирањем података у фајловима excel формата.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Заједнички портал свих докторских дисертација и извештаја комисија о њиховој осеци на универзитетима у Србији (NaRDUS) и у репозиторијуму докторских дисертација у Новом Саду (CRIS).

3.1.2. URL адреса _____

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

Докторска дисертација ће бити депонована у Заједнички портал свих докторских дисертација и извештаја комисија о њиховој оцењени на универзитетима у Србији (NaRDUS) и у репозиторијуму докторских дисертација у Новом Саду (CRIS).

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

_____ / _____

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? Неограничено.

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да Не

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на

учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- a) Подаци нису у отвореном приступу
 - b) Подаци су анонимизирани
 - c) Остало, навести шта
-
-

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

a) јавно доступни

b) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области (односи се само на оригиналне = метаподатке)

c) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Истраживачи могу да користе податке у циљу међулабораторијског поређења интраиндивидуалне варијабилности и аналитичке варијабилности после контактирања особе одговорне за податке.

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

Уски круг истраживача који буде заинтересован за прикупљене оригиналне податке ће датим подацима моћи да приступи без лиценце/шифре, а биће им послат електронским путем.

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Бојана Благојевић, мејл адреса: bojana.blagojevic@polj.uns.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Бојана Благојевић, мејл адреса: bojana.blagojevic@polj.uns.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Бојана Благојевић, мејл адреса: bojana.blagojevic@polj.uns.ac.rs