

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET



Ljubica Ivanović

Nutritivna vrijednost i osnovne fitohemijske osobine blitve
(*Beta*
***vulgaris* ssp. *cicla* L. Voss) gajene u različitim uslovima**
navodnjavanja i
prihranjivanja

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET



Ljubica Ivanović

**Nutritive and phytochemical properties of Swiss
chard (*Beta vulgaris* ssp. *cicla* L. Voss) grown
under different irrigation and fertilization regimes**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2023

Mentor:

dr Vladimir P. Beškoski, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Hemijski fakultet

Članovi komisije:

dr Vele Tešević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Hemijski fakultet

dr Dijana Đurović, docent
Univerzitet Donja Gorica-Fakultet za prehrambenu tehnologiju, bezbjednost hrane i ekologiju

dr Višnja Bogdanović, naučni saradnik
Institut za Onkologiju Vojvodine

dr Slađana Stanojević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane:

Zahvalnica

Doktorska disertacija "Nutritivna vrijednost i osnovne fitohemijske osobine blitve (Beta vulgaris ssp. cicla L.) gajene u različitim uslovima navodnjavanja i prihranjivanja" urađena je u laboratorijama Instituta za javno zdravlje Crne Gore u okviru projekta BIO ICT- Centra za izvrsnost u Crnoj Gori (2014-2019. god) koji je finansiran od strane Ministarstva nauke Crne Gore.

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru dr Vladimiru Beškoskom, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, za korisne savjete, razumijevanju kao i pomoći pruženoj prilikom izrade doktorskog rada.

Veliku zahvalnost dugujem dr Miroslavu Vrvicu, profesoru u penziji Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za nesebičnu pomoć, korisne savjete, ideje i sugestije, tokom doktorskih studija. Svim kolegama iz Instituta za javno zdravlje Crne Gore sam izuzetno zahvalna na pomoći tokom eksperimentalnog dijela ovog doktorata. Neizmjernu zahvalnost dugujem dr Ani Topalović, profesoru na Biotehničkom fakultetu Univerziteta Crne Gore, na ukazanoj pomoći, sugestijama i savjetima kako tokom doktorskih studija tako i pri izradi doktorske teze. Identifikcija polifenolnih jedinjenja i prateće NMR analize sprovedene su na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, gdje veliku zahvalnost za realizaciju dugujem profesoru dr Veletu Teševiću i dr Milki Jadranin. Veoma sam zahvalna doktorki Višnji Bogdanović sa Instituta za Onkologiju Vojvodine, koja je sprovedla ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata blitve i dodatno svojim sugestijama i savjetima doprinijela boljem kvalitetu cjelokupne disertacije. Dr Vladimiru Bojkoviću, profesoru na Arhitektonskom fakultetu Univerziteta Crne Gore, sam beskrajno zahvalna na tehničkoj podršci pri izradi doktorske teze.

Posebno osjećam i dugujem najveću zahvalnost svojoj majci, sestri i bratu na безусловnoj podršci i ljubavi.

Nutritivna vrijednost i osnovne fitohemijske osobine blitve (*Beta vulgaris* ssp. *cicla* L. Voss) gajene u različitim uslovima navodnjavanja i prihranjivanja

Sažetak

U okviru ove doktorske disertacije proučavan je nutritivni i fitonutritivni sadržaj blitve koja je gajena u uslovima različitih režima đubrenja i navodnjavanja, pri čemu su ispitivane i funkcionalne osobine blitve u cilju utvrđivanja njenog potencijala kao funkcionalne hrane.

U početnoj fazi eksperimenta određene su nutritivne, antinutritivne i fitonutritivne komponente u blitvi, kao i uticaj primjenjenih agrotehničkih mjera na pomenute komponente. Korišćenjem standardnih metoda za proksimativnu analizu (AOAC metode) utvrđeno je da svježa blitva ima sledeći sastav: voda- 89%, ukupni šećeri- 4,9%, proteini- 2,5%, pepeo- 1,8% i lipidi-0,45%. Savremenim instrumentalnim tehnikama (spektrofotometrija, ICP OES, tečna hromatografija) su kvantifikovane druge nutritivne, antinutritivne i fitonutritivne komponente u blitvi. Nađeno je da su prosječne koncentracije vitamina C, ukupnog hlorofila, karotenoida u 100 g svježe blitve su redom: 26,9 mg, 47,13 mg, 9,85 mg. Blitva ima visok sadržaj makro- i mikroelemenata od kojih su najzastupljeniji sledeći: kalijum (372,49 mg), kalcijum (178,6 mg), mangan (8,35 mg) i gvožđe (1,46 mg) izraženo na 100 g svježe blitve. Analizom ukupnog polifenolnog i flavonoidnog sadržaja pokazano je da je blitva bogata ovim fitonutrijentima, nakon čega su identifikovane i kvantifikovane četiri flavonoidne komponente: viteksin-2"-*O*-ksilozid, viteksin-6"-*O*-malonil-2"-*O*-ksilozid, izoramnetin-3,7-*O*-diglukozid i viteksin-6"-*O*-acetil-2"-*O*-ksilozid. Strukture ovih jedinjenja su potvrđene 1D i 2D NMR spektroskopijom (¹H NMR, ¹³C NMR, COSY, HSQC, HMBC). Osim toga, određen je sadržaj nitrata u blitvi, koji je bio u granicama dozvoljenih vrijednosti.

Statističkom analizom uticaja različitih režima navodnjavanja i đubrenja nađeno je da je đubrenje uticalo na prinos, morfološke karakteristike, količinu proteina, sadržaj fosfora, sadržaj izoramnetin-3,7-*O*-diglukozida, sadržaj hlorofila i vitamina C. Povećanjem količine primjenjene prihrane povećali su se svi pomenuti parametri, osim sadržaj fosfora i sadržaj izoramnetin-3,7-*O*-diglukozida, koji su bili niži sa povećanjem nivoa đubrenja. Interakcija navodnjavanja i đubrenja je značajno uticala na sadržaj Na i Cu i sadržaj viteksin-2"-*O*-ksilozida. Navodnjavanje nije imalo značajnog efekta na testirane parametre, osim na sadržaj nitrata, gdje je povećanjem nivoa navodnjavanja sadržaj nitrata u blitvi opadao, dok je povećanjem đubrenja rastao njihov sadržaj.

Poslednja faza eksperimenta je obuhvatila ispitivanje antioksidativne, antiproliferativne i antimikrobne aktivnosti ekstrakta blitve. Rezultati su pokazali antioksidativnu aktivnost vodenog ekstrakta blitve u vrijednosti IC₅₀=3,79 mg/ml (mjereno DPPH testom) dok je metanolni ekstrakt imao prosječni antioksidativni kapacitet od 8,0 (mjereno DPPH testom) odnosno 8,57 μmola ekvivalenta trolox-a/g (mjereno ABTS testom). Analizom antiproliferativne aktivnosti ekstrakta blitve je utvrđeno da postoji inhibicija rasta malignih MCF-7 ćelija i to 70% ćelija je inhibirano nakon 48 h inkubacije. Ispitivani ekstrakti blitve nijesu pokazali antimikrobnu aktivnost.

Ključne riječi: blitva, nutrijenti, fitonutrijenti, navodnjavanje, đubrenje, antioksidativnost, antiproliferativnost

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

Nutritive and phytochemical properties of Swiss chard (*Beta vulgaris* ssp. *cicla* L. Voss) grown under different irrigation and fertilization regimes

Abstrakt

In this doctoral dissertation, the nutritional and phytonutrient content of Swiss chard grown under different irrigation and fertilization regimes was studied, while the functional properties of Swiss chard were also examined in order to determine its potential as a functional food.

In the initial phase of the experiment, nutritional, anti-nutritive and phyto-nutritive components in Swiss chard were determined, as well as the influence of applied agrotechnical measurements on all tested parameters was monitored. Using standard methods for proximate analysis (AOAC methods), it was determined that fresh chard has the following composition: water- 89%, total sugars- 4,9 %, proteins- 2,5 %, ash- 1,8 % and lipids- 0,45%. Using modern instrumental techniques (spectrophotometry, ICP OES, liquid chromatography) other nutritional and phytonutritive components in Swiss chard were quantified. It was found that the average concentrations of vitamin C, total chlorophyll, carotenoids in 100 g of fresh chard are: 26,9 mg, 47,13 mg and 9,85 mg, respectively. Swiss chard has a high content of macro- and microelements, of which the most abundant are the following: potassium (372,49 mg), calcium (178,6 mg), followed by manganese (8,35 mg) and iron (1,46 mg) expressed per 100 g of fresh Swiss chard. The analysis of the total polyphenolic and flavonoid content showed that Swiss chard is rich in these phytonutrients, after which four flavonoid components were identified and quantified: vitexin-2"-*O*-xyloside, vitexin-6"-*O*-malonyl-2"-*O*-xyloside, isorhamnetin-3,7-*O*-diglucoside and vitexin-6"-*O*-acetyl-2"-*O*-xyloside. The structures of these compounds were confirmed by 1D and 2D NMR spectroscopy (¹H NMR,¹³C NMR, COSY, HSQC, HMBC). In addition, the content of nitrates in Swiss chard was determined, which was within the limits of permitted values.

A statistical analysis of the effect of different irrigation and fertilization regimes found that fertilization influenced the yield, morphological characteristics, amount of protein, as well as phosphorus, isorhamnetin-3,7-*O*-diglucoside, chlorophyll, and vitamin C content. With increasing the amount of fertilization, values for all parameters mentioned above increased, except phosphorus and isorhamnetin-3,7-*O*-diglucoside content, which were found to be lower with increasing fertilization level. The interaction of irrigation and fertilization significantly affected Na and Cu content, as well as the content of vitexin-2"-*O*-xyloside. Irrigation had no significant effect on the studied parameters, except for the nitrate content. While the increased level of irrigation led to decreased nitrate content in Swiss chard, with increasing fertilization their content increased.

The last phase of the experiment included investigation of the antioxidant, antiproliferative and antimicrobial activity of Swiss chard extract. The results showed the antioxidant activity of the aqueous extract of Swiss chard with an IC₅₀ value of 3,79 mg/ml (measured by the DPPH test), while the methanolic extract had an average antioxidant capacity of 8,0 (measured by the DPPH test), 8,57 μmol of trolox equivalents per gram (measured by ABTS test). Analysis of the antiproliferative activity of Swiss chard extract revealed that there is an inhibition of the growth of malignant MCF-7 cells and that 70% of the cells were inhibited after 48 hours of incubation. The studied Swiss chard extracts did not show antimicrobial activity.

Keywords: Swiss chard, nutrients, phytonutrients, irrigation, feeding, antioxidant, antiproliferative

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

Spisak skraćenica i simbola

AACC- (*eng. American Association of Cereal Chemist*)- Američko udruženje hemičara za ceralije
AAS- (*eng. Atomic Absorption Spectroscopy*)- Atomska apsorpciona spektroskopija
ABTS- (*eng. 2,2'-azobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfat)*- 2,2-azobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfat
ADI- (*eng. Acceptable Daily Intake*)- Prihvatljivi dnevni unos
AL- Rastvor amonijum-acetat-laktat
ANDI- (*eng. Aggregate Nutrient Density Index*)- Indeks gustine agregata nutrijenata
ANOVA- (*eng. Analysis of Variance*)- Analiza varijanse
AOAC- (*eng. Association of Official Analytical Chemists*)- Udruženje zvaničnih analitičkih hemičara
APPI- (*eng. Atmospheric Pressure Photo-Ionisation*)- Foto jonizacija pod atmosferskim pritiskom
APCI- (*eng. Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*)- Hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom
BHA- (*eng. Butylated Hydroxyanisole*)- Butilovani hidroksianizol
BHT- (*eng. Butylated Hydroxytoluene*)- Butilovani hidroksitoluen
CAE- (*eng. Catechin equivalent*)- ekvivalenti katehina
CCI- Indeks sadržaja hlorofila
Chl a- (*eng. Chlorophyll a*)- Hlorofil a
Chl b- (*eng. Chlorophyll b*)- Hlorofil b
COSY- (*eng. Correlation Spectroscopy*)- Korelisana spektroskopija
DAD- (*eng. Diode Array Detectors*)- Detektor sa nizom dioda
DNK- Dezoksiribonukleinska kiselina
DMEM- (*eng. Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
DPPH- (*eng. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*)- 1,1 difenil-2-pikrilhidrazil
DV- (*eng. Daily Value*)- Dnevna doza
EFSA- (*eng. European Food Safety Authority*)- Evropska agencija za bezbjednost hrane
ESI- (*eng. Elektrospray Ionisation*)- Elektro sprej jonizacija
FC- Folin–Ciocalteu
FCS- (*eng. Fetal Calf Serum*)- Fetalni teleći serum
FDA (*eng. US Food and Drug Administration*)- Uprava za hranu i lijekove
FOSHU (*eng. Food for Specified Health Use*)
GAE- (*eng. Gallic Acid Equivalent*)- Ekvivalenti galne kiseline
GIT- Gastrointestinalni trakt
GLVs- (*eng. Green Leafy Vegetables*)- Zeleno lisnato povrće
HMBC- (*eng. Heteronuclear Multiple Bond Correlation*)- Heteronuklearna korelacija preko više veza
HPLC- (*eng. High Performance Liquid Chromatography*)- Tečna hromatografija visokih performansi
HPLC MS- Tečna hromatografija visokih performansi sa masenom spektrometrijom
HSQC- (*eng. Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*)- Heteronuklearna višestruka kvantna koherencija
IC- Infracrvena spektroskopija
IC₅₀- Inhibitorna koncentracija, tj. koncentracija koja inhibira 50% reaktivne vrste
ICP-OES- (*eng. Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy*)- Optička emisiona spektroskopija induktivno spregnute plazme
IJZCG- Instituta za javno zdravlje Crne Gore
IPNI- (*eng. International Plant Names Index*)- Međunarodni indeks biljnih imena
iRNK- Informaciona ribonukleinska kiselina
LC- (*eng. Liquid Chromatography*)- Tečna hromatografija

LC MS- Tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom
MALDI- (*eng. Matrix-Assisted Laser Desorption*)- Matrikosom potpomognuta laserska desorpcija
MHA- (*eng. Mueller–Hinton agar*)- Miler-Hintonov agar
MS- (*eng. Mass Spectrometry*)- Masena spektrometrija
NO- (*eng. Nitric Oxide*)- Azot oksid
NMR- (*eng. Nuclear Magnetic Resonance*)- Nuklearna magnetna rezonanca
PDA- (*eng. Potato Dextrose Agar*)- Krompir-glukozni agar
RNS- (*eng. Reactiv Nitrogen Species*)- Reaktivne azotne vrste
ROS- (*eng. Reactive Oxigen Species*)- Reaktivne kiseonične vrste
SB- Svježa blitva
SD- Standardna devijacija
SDA- (*eng. Sabouraud Dextrose Agar*)- Saburo dekstrozni agar
SM- Suva masa
SPSS (*eng. Statistical Package for the Social Sciences*)- Statistički paketi za analizu podataka
TFC- (*eng. Total Flavonid Content*)- Ukupni sadržaj flavonoida
TIC- (*eng. Total Ion Chromatograph*)- Ukupni jonski hromatogram
TOF- (*eng. Time of Fly*)- Vremena preleta jona
TPC- (*eng. Total Polyphenol Content*)- Ukupni sadržaj polifenola
Trolox- (*eng. 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid*)- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina
USDA- (*eng. United States Department of Agriculture*)- Ministarstvo poljoprivrede Sjedinjenih Američkih Država
UV- (*eng. Ultraviolet*)- Ultravioletni
UV-Vis- Ultravioletno-vidljivo
VOR- (*eng. Vitexin-2''-O-rhamnoside*)- viteksin-2''-O-ramnozid
VOX- (*eng. Vitexin-2''-O-xyloside*)- viteksin-2''-O-ksilozid
WHO- (*eng. World Health Organization*)- Svjetska zdravstvena organizacija
WUE- (*eng. Water Use Efficacy*)- Efikasno korišćenje vode

Sadržaj

1. UVOD.....	13
2. Pregled literature.....	15
2.1. Karakteristike zelenog lisnatog povrća	16
2.2. Taksonomija i botanika blitve (<i>Beta vulgaris</i> ssp. <i>cicla</i> (L.) Voss).....	17
2.3. Faktori koji utiču na rast, razvoj i hemijski sastav biljke.....	17
2.3.1. Uticaj fizičko-hemijskih karakteristika zemljišta na kvalitet blitve	18
2.3.2. Uticaj klimatskih faktora na rast i nutritivni kvalitet blitve.....	19
2.4. Navodnjavanje i fertilizacija	19
2.4.1. Navodnjavanje usjeva.....	19
2.4.2. Značaj i primjena fertilizacije za gajenje biljaka	22
2.5. Morfološke karakteristike blitve i faktori koji utiču na morfologiju.....	23
2.6. Blitva u ishrani, nutritivni i fitonutritivni sastav blitve	23
2.6.1. Komponente u blitvi koje utiču na zdravlje čovjeka	25
2.7. Funkcionalna hrana	36
2.8. Funkcionalne osobine blitve.....	37
2.8.1. Antioksidativna aktivnost	37
2.8.2. Antiinflamatorna svojstva.....	39
2.8.3. Antidijabetska aktivnost	40
2.8.4. Antiproliferativna (antitumorska) aktivnost	40
2.9. Antinutritivne komponente blitve	41
2.10. Analitičke metode u hemiji hrane	42
2.10.1. Spektrofotometrijske metode za određivanje ukupnih fenola, flavonoida i antioksidativnog kapaciteta	42
2.10.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti	43
2.10.3. Tečna hromatografija visokih performansi.....	44
2.10.4. Optička emisiona spektroskopija induktivno spregnute plazme (ICP-OES).....	46
2.10.5. Atomska apsorpciona spektroskopija (AAS).....	46

2.10.6. Spektroskopija nuklearne magnetne rezonance (NMR spektroskopija).....	46
3. Materijal i metode.....	48
3.1. Blitva upotrebljena u studiji	49
3.1.1. Priprema zemljišta i tretmani đubrenja i navodnjavanja za gajenje blitve	49
3.2. Analiza zemljišta.....	50
3.2.1. Uzorkovanje i priprema zemljišta za analize.....	50
3.2.2. Mjerenje pH zemljišta.....	51
3.2.3. Određivanje ukupnog sadržaja humusa	51
3.2.4. Određivanje lakopristupačnog sadržaja P ₂ O ₅ i K ₂ O.....	52
3.2.5. Određivanje lako dostupnih elemenata u zemljištu	52
3.2.6. Određivanje provodljivosti zemljišta.....	53
3.3. Terenska mjerenja	53
3.4. Priprema biljnog materijala	53
3.5. Proksimativna analiza makronutrijenata uzoraka blitve	54
3.5.1. Određivanje ukupnog sadržaja azota u uzorcima blitve (Kjeldahl-ova digestija).....	54
3.5.2. Određivanje sadržaja sirovih vlakana	54
3.5.3. Ukupni ugljenihidrati i energetska vrijednost.....	54
3.6. Određivanje minerala iz blitve	55
3.7. Određivanje vitamina C.....	55
3.8. Određivanje hlorofila a i b i ukupnih karotenoida	55
3.9. Određivanje TPC, ukupnog sadržaja flavonoida i DPPH aktivnost vodenog ekstrakta blitve.....	55
3.9.1. Priprema vodenog ekstrakta blitve	55
3.9.2. Određivanje ukupnog sadržaja polifenola	56
3.9.3. Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida (TFC)	56
3.9.4. Određivanje antioksidativnog kapaciteta DPPH testom.....	56
3.10. Izolovanje i identifikacija polifenolnih jedinjenja blitve	56
3.10.1. Metanolna ekstrakcija.....	57

3.10.2. Tečno-tečna ekstrakcija <i>n</i> -butanolom.....	57
3.10.3. Uslovi tečne hromatografije pod kojima su rađene analize.....	58
3.10.4. Snimanje spektara 1D (¹ H, ¹³ C) i 2D NMR spektroskopije (COSY, HSQC, HMBC)..	59
3.11. Određivanje antioksidativne aktivnosti metanolnog ekstrakta blitve DPPH i ABTS testovima	59
3.11.1. DPPH test.....	59
3.11.2. ABTS test.....	59
3.12. Kvantifikovanje identifikovanih flavonoida u uzorcima blitve	59
3.13. Određivanje sadržaja nitrata u uzorcima blitve.....	60
3.14. Mikrobiološke analize - Antibiogram test.....	60
3.14.1. Uzorci blitve za pripremu ekstrakta blitve za mikrobiološku aktivnost.....	60
3.14.2. Podloge koje su korišćene za ispitivanje mikrobiološke aktivnosti.....	60
3.14.3. Postupak testa difuzije u agaru	61
3.15. Antiproliferativna aktivnost	61
3.15.1. Uzorci i korišćeni biološki materijal za ispitivanje proliferativne aktivnosti.....	61
3.15.2. Priprema ćelija	62
3.15.3. Metode korišćene u eksperimentu ispitivanja antiproliferativne aktivnosti ekstrakta blitve	62
3.16. Statistička analiza	63
4. Rezultati i diskusija.....	64
4.1. Rezultati mjerenja fizičko-hemijskih osobina zemljišta	65
4.2. Rezultati terenskog mjerenja i statistička analiza prinosa, morfoloških parametara i indeksa sadržaja hlorofila	67
4.3. Rezultati proksimativne analize u blitvi	69
4.3.1. Statistički rezultati efekta različite prihrane i navodnjavanja na sadržaj komponenti iz proksimativne analize	70
4.4. Rezultati makro- i mikroelemenata u tretiranoj blitvi	71
4.4.1. Sadržaj makroelemenata u tretiranim uzorcima blitve	71
4.4.2. Sadržaj mikroelemenata u uzorcima blitve.....	73

4.5. Rezultati sadržaja fitohemikalija različito tretirane blitve	74
4.5.1. Sadržaj vitamina C.....	75
4.5.2. Sadržaj ukupnog hlorofila, hlorofila a i b i ukupnih karotenoida u blitvi i efekat navodnjavanja i prihrane.....	76
4.5.3. Sadržaj TPC i TFC u uzorcima blitve.....	77
4.5.4. DPPH aktivnost vodenog ekstrakta blitve	78
4.6. Identifikacija polifenolnih jedinjenja u blitvi.....	80
4.6.1. UV-Vis i MS spektri komponenti iz ekstrakta blitve	80
4.6.2. Izolovanje, prečišćavanje i potvrđivanje strukture polifenolnih jedinjenja.....	84
4.7. DPPH i ABTS aktivnost metanolnog rastvora blitve	90
4.7.1. DPPH aktivnost metanolnog ekstrakta	90
4.7.2. ABTS aktivnost metanolnog ekstrakta	90
4.7.3. Rezultati statističke analize DPPH i ABTS testa, vodenog i metanolnog ekstrakta	91
4.8. Analiza individualnog sadržaja identifikovanih flavonoida u metanolnom ekstraktu.....	92
4.8.1. Rezultati uticaja primjenjenih mjera na sadržaj pojedinačnih flavonoida.....	94
4.9. Sadržaj nitrata u blitvi	95
4.9.1. Statistički rezultati efekta navodnjavanja i fertilizacije na sadržaj nitrata	96
4.10. Rezultati ispitivanja mikrobiološke aktivnosti metanolnih ekstrakata blitve.....	97
4.11. Rezultati antiproliferativne aktivnosti blitve.....	98
4.12. Statistički rezultati Pirsonove bivarijantne korelacije	100
5. ZAKLJUČCI.....	102

1. UVOD

Na globalnom nivou jedan od velikih problema u svijetu su glad, neuhranjenost i gojaznost, koji su danas dostigli neprihvatljive razmjere. Glad, neuhranjenost i gojaznost sa sobom povlače brojne bolesti koje usled toga poprimaju razmjere epidemije. Prema izvještaju Ujedinjenih Nacija, glad i gojaznost u svijetu bilježe trend rasta, tako je 2018. godine procijenjeno da je 850 miliona ljudi bilo gladno, dok je iste godine bilo gojazno 678 miliona odraslih ljudi (odnosno jedno od osmoro ljudi). Zdrava i adekvatna ishrana su od suštinskog značaja za održavanje zdravlja i prevenciju bolesti. Ishrana je poslednjih godina, zbog ubrzanog stila života, sve češće nepravilna i nezdrava i kao takva dovodi do razvoja brojnih hroničnih bolesti. Osim zdravstvenih problema nepravilna i nezdrava ishrana, utiče na društveni i ekonomski razvoj zemlje, što je sve podstaklo na brojna istraživanja (Tonetti et al. 2017; Dietz et al. 2015) koja imaju za cilj smanjenje ovih problema na globalnom nivou. Unapređenjem poljoprivredne proizvodnje biljaka koje se koriste kao hrana, može se postići da proizvedena hrana zadovolji osnovne nutritivne potrebe i istovremeno sadrži komponente koje povoljno utiču na zdravlje ljudi. Koncept funkcionalne hrane je razvijen upravo da bi se, između ostalog, adekvatnom ishranom smanjio broj ljudi koji pate od hroničnih bolesti i drugih bolesti povezanih sa nepravilnom ishranom.

Brojnim epidemiološkim studijama (Lima et al., 2014; Silva Dias, 2019; Nahak et al., 2014) je pokazano da ishrana koja je bogata voćem i povrćem smanjuje rizik od razvoja velikog broja hroničnih bolesti. Zeleno lisnato povrće se razmatra kao potencijalna funkcionalna hrana, zbog toga što pored osnovnih nutritivnih sastojaka neophodnih za balansiranu ishranu, sadrži i dodatne komponente koje pozitivno utiču na zdravlje čovjeka. Blitva pripada grupi nisko-energetskog i nutritivno-bogatog zelenog lisnatog povrća. Blitva sadrži srednje do visok sadržaj dijetetskih vlakana, visok sadržaj minerala i vitamina C, kao i nizak sadržaj lipida (Ivanovic et al., 2019). Osim toga, sadrži polifenolna jedinjenja, među kojima apigenin i derivate apigenina koji posjeduju brojne biohemijske funkcije, među kojima antitumorna i antioksidativna svojstva. Pored toga, blitva se lako gaji, naime vrlo je adaptivna kultura koja uspjeva u ekstremnijim uslovima životne sredine (Liu et al., 2013; Kolota et al., 2010; Devenci et al., 2019). Kao takva, a uzimajući u obzir njen nutritivni i fitonutritivni sastav, mogla bi se razmatrati mogućnost gajenja blitve na velikim površinama, gdje bi se agrotehničkim mjerama mogao postići kako visoki prinos tako i poboljšanje pojedinih nutritivnih i fitonutritivnih komponenti.

S tim u vezi, cilj ovog rada je ispitivanje nutritivnih i fitonutritivnih karakteristika blitve, koja je gajena na teritoriji Crne Gore, kao i utvrđivanje da li ima potencijal da se razmatra kao funkcionalna hrana. Osim toga, praćeno je kako različite norme navodnjavanja i različite količine prihrane (đubrenja) utiču na prinos i neke morfološke karakteristike kao i na nutritivne i fitonutritivne komponente blitve. U ovom radu je prema dostupnoj literaturi prvi put u svijetu istovremeno ispitivan efekat različitih tretmana navodnjavanja i prihrane na nutritivni i fitonutritivni sadržaj blitve.

Cilj ove disertacije je sumiran u sledećim stavkama, koje trebaju stvoriti cjelovitu i sveobuhvatnu sliku o sastavu blitve i njenom potencijalu da bude funkcionalna hrana, i to u primjenjenim uslovima za rast ove povrtarske kulture:

1. određivanje osnovnih fizičko-hemijskih parametara zemljišta na kome je blitva gajena;
2. terensko mjerenje prinosa, osnovnih morfoloških parametara i indeksa hlorofila blitve;
3. određivanje osnovnih nutrijenata i fitonutrijenata u blitvi gajenoj pod primjenjenim uslovima;
4. određivanje bioloških aktivnosti ekstrakta blitve: antioksidativnih, antimikrobnih i antiproliferativnih;
5. izolovanje, karakterizacija i kvantifikacija polifenolnih jedinjenja blitve;
6. ispitivanje efekata različitih režima prihrane i navodnjavanja na sve kvantifikovane parametre blitve.

2. Pregled literature

2.1. Karakteristike zelenog lisnatog povrća

Povrće je od davnina prepoznato kao izvor esencijalnih hranljivih supstanci (u nastavku nutrijenti) i fitonutrijenata koji doprinose unapređenju zdravlja i sprečavanju razvoja hroničnih bolesti. Nutrijenti su jedinjenja koje ljudski organizam ne može sintetisati, ili ih ne može sintetisati u dovoljnoj količini i stoga se moraju unositi adekvatnom ishranom. U esencijalne nutrijente ubrajaju se sledeće grupe jedinjenja: proteini, masti, ugljeni hidrati (makronutrijenti) zatim vitamini i minerali (mikronutrijenti). Pod pojmom fitonutrijenata podrazumjevamo prirodna jedinjenja koja se sintetišu u biljkama, poput polifenola, saponina, betalaina, hlorofila, karotenoida, terpenoida i sl.

Svjetska zdravstvena organizacija preporučuje da se na dnevnom nivou ishranom unese najmanje 400 g voća i neskrobnog povrća. Generalno posmatrano, među familijama (*Familia*) povrća najzastupljenije komponente nutrijenata i fitonutrijenata su: dijetetska vlakna, polifenoli (flavonoidi), karotenoidi, vitamin C, folati, kalcijum i selen (Dias, 2012; Silva Dias, 2019). Određeni fitonutrijenti, poput organosumpornih jedinjenja, su karakteristični za određene familije biljnih vrsta. Tako na primer od organosumpornih jedinjenja, za familiju Brassicaceae karakteristični su glukozinolati, dok su za familiju Alliaceae specifična tiosulfatna jedinjenja (Dias, 2012; Sanlier & Saban, 2018). Brojne epidemiološke studije su utvrdile da konzumiranje povrća dovodi do prevencije mnogih hroničnih bolesti i unapređenja zdravlja i da bi trebalo biti uključeno u svakodnevnu ishranu (Aune et al., 2017). U Američkom vodiču za zdravu i pravilnu ishranu, savjetuje se da dio svakodnevne ishrane bude zeleno lisnato povrće- GLVs (DeSalvo, 2016).

Zeleno lisnato povrće, kako je pomenuto, je preporučivo za svakodnevnu ishranu, pri tom relativno jeftino, za razliku od nekih egzotičnih vrsta i dodatno neke vrste iz ove grupe se koriste u tradicionalnoj medicini (Randhawa et al., 2015; Mensah et al., 2008). GLVs su predmet brojnih istraživanja zbog korisnog učinka na zdravlje ljudi i prisustva brojnih jedinjenja koja imaju biološku aktivnost (Khanam et al., 2012; Satheesh & Fanta, 2020; Gamba et al., 2020; Adeosun et al., 2016). U grupu GLVs ubrajaju se sledeće vrste: blitva, spanać, raštan, zelena salata, brokoli, kelj, peršun itd., koje uglavnom pripadaju familijama Brassicaceae, Chenopodiaceae i Asteraceae. Od davnina je zeleno lisnato povrće dio svakodnevne ishrane u raznim područjima, zbog toga što predstavlja odličan izvor esencijalnih aminokiselina, minerala, vitamina, vlakana kao i zbog toga što GLVs može da preživi u nepovoljnim uslovima životne sredine, poput suše, pa je čest izvor osnovnih nutrijenata u ruralnim područjima (Randhawa et al., 2015). GLVs među povrćem ima najveći ANDI, koji govori koliko nutrijenta se isporuči organizmu po unesenim kalorijama i vrednuje se u vrijednostima od 1 do 1000 (Silva Dias, 2019). Budući da GLVs ima ANDI 1000 to govori da ova grupa povrća isporučuje više prisutnih nutrijenata po kaloriji od drugih vrsta povrća. Tako među GLVs ANDI vrijednosti su u opsegu od 739 za spanać do 1000 za blitvu, kelj, i sl., dok u drugom povrću (koje ne pridada GLVs) su u opsegu od 234 za šparglu do 502 za rotkvicu (Silva Dias, 2019).

GLVs je bogato nutrijentima kao i fitonutrijentima, poput dijetetskih vlakna, vitamina (K, C, A i folne kiseline), minerala (Mg, Ca, K, Mn, Fe, Se, Zn), polifenola (flavonoida, fenolne kiseline, stilbeni), karotenoida (β -karotena i luteina), glukozinolata (npr. sulforafan), betalaina, alkaloida, saponina, koji se raspoređuju u različitim kombinacijama i količinama u različitim vrstama zelenog lisnatog povrća i povrća generalno (Kumar & Goel, 2019; Silva Dias, 2019; Khanam et al., 2012; Nahak et al., 2014; Mensah et al., 2008). Za neke vrste iz grupe GLVs se smatra da imaju ljekovita svojstva, neke djeluju kao antibiotici, neke vrste pak snižavaju krvni pritisak, neke vrste poboljšavaju plodnost žena (Mensah et al., 2008). Ova dejstva GLVs se pripisuju jedinjenjima iz grupe alkaloida, saponina, inulina, tanina koja su prepoznata u tradicionalnoj medicini zbog sličnih efekata (Mensah et al., 2008). Upravo fitonutrijenti se smatraju odgovornim za brojne biološke aktivnosti koje pokazuje GLVs, pri čemu su mehanizmi kojima ih ostvaruju kompleksni i često nisu uvijek razjašnjeni ni poznati (Shetty, 2013; Silva Dias, 2019; Kumar, 2017).

Takođe, treba reći da pomenuti fitonutrijenti kao i esencijalni nutrijenti, prisutni u GLVs, zbog svojih pozitivnih efekata na zdravlje čovjeka, su razlog što se brojne vrste povrća iz ove grupe razmatraju kao funkcionalna hrana.

2.2. Taksonomija i botanika blitve (*Beta vulgaris* ssp. *cicla* (L.) Voss)

Blitva (*Beta vulgaris* spp. *cicla* (L.) Voss (Slika 2.1) (izvor imena eng. *International Plant Names Index*) (IPNI, 2022), odnosno izvor klasifikacije Vilm. Blumengärtn., ed. 3. 1: 874. (1895), je podvrsta *Beta vulgaris* L. vrste, iz roda *Beta* L. i podfamilije Chenopodioidea (USDA, 2022). Podfamilija Chenopodioidea broji oko 1500 vrsta i koriste se u ljudskoj ishrani od davnina zbog hranljivosti i blagodetnog uticaja na zdravlje ljudi. Istoj podfamiliji pripadaju uglavnom zeljaste biljke, među kojima su poznate vrste zelenog lisnatog povrća poput spanaća i blitve, kao i korijenastog povrća poput cvekle i repe. Porijeklo blitve kao i drugih kultura *Beta vulgaris*, je od morske repe (*Beta vulgaris* subsp. *maritima*) sa podneblja Srednjeg Istoka, tj. oko područja Tigra i Eufrata, odakle se dalje njena rasprostranjenost, kao i drugih divljih sorti *Beta vulgaris*, širila zapadno na Mediteransku oblast i sjeverno na obalama Atlantskog okeana (Lim, 2016). Rimljani su još 1000 godina prije Hrista koristili blitvu kao hranu i do danas je u većoj ili manjoj mjeri u upotrebi širom svijeta, najviše u mediteranskom području (Ninfali & Angelino, 2013). Područje mediterana, Južne Amerike, USA, sjeverne Indije su područja koja se vezuju za kultivaciju blitve i njenu dostupnost tokom cijele godine (Schrader & Mayberry, 2003; Bozokalfa et al., 2011).



Slika 2.1: Blitva- *Beta vulgaris* ssp. *cicla* (L.) Voss (Izvor: autor)

Blitva je dvogodišnja biljka, koja može da raste na proljeće i na jesen, ali je prinos skoro duplo veći kada se posadi na proljeće (Kolota et al., 2010). Najčešće se rasađuje na proljeće za ljetnju berbu i ponovo na ljeto za zimsku berbu.

2.3. Faktori koji utiču na rast, razvoj i hemijski sastav biljke

Pitanje gladi i drugih problema povezanih sa ishranom, moglo bi naći odgovor u proizvodnji hrane koja bi dovela do proizvodnje biljnih kultura, koje su značajne za ishranu i zdravlje ljudi. Od izuzetne važnosti je usmjeriti sva znanja, istraživanja i iskustva koja su povezana sa pitanjima poljoprivredne proizvodnje, ishrane i zdravlja, ka proizvodnji kvalitetne hrane, koja bi zadovoljila osnovne nutritivne zahtjeve i dodatno prevenirala brojne bolesti današnjice. Da bi se omogućila, razvila i poboljšala poljoprivredna proizvodnja potrebno je poznavati faktore koji utiču na rast, razvoj i sastav biljaka.

Na rast, razvoj i hemijski sastav biljaka utiču brojni faktori, koje možemo podijeliti na unutrašnje i spoljašnje faktore. Unutrašnji faktori su genetika tj. nasleđe kojim je određeno samo funkcionisanje biljke, njen razvoj, pa će različite biljne vrste, čak i sorte unutar iste vrste, imati različite karakteristike (npr. morfologiju, prisustvo ili odsustvo neke komponente, varijabilnost u količini mineralnog sadržaja) (Rouphael et al., 2012; Cammarano et al., 2021; Bozokalfa et al., 2011; Samaniego et al., 2020). Spoljašnji faktori koji utiču na rast, razvoj i kvalitet biljaka su označeni kao faktori životne sredine, tj. abiotički, biotički i antropogeni faktori.

Biotički faktori su dio ekosistema kojeg čine živi organizmi - mikroorganizmi, biljke, životinje, koji svojim djelovanjem utiču na rast, razvoj, morfologiju i zastupljenost biljne kulture (Helaly et al., 2020).

U abiotičke faktore ubrajamo uticaj nežive prirode, poput temperature, vode, količine svjetlosti, broja kišnih dana, vjetrovi (koji se mogu posmatrati kroz klimatske faktore podneblja na kome se gaji biljka), fizičko-hemijskog sastava zemljišta, sastav reljefa (nagib terena, nadmorska visina) (Caruso et al., 2020; Christopoulos & Ouzounidou, 2020).

Antropološki faktori, tj. aktivnost čovjeka, koji imaju uticaj na rast, razvoj, nutritivni sastav biljaka, najčešće se posmatraju kroz primjenu agrotehničkih mjera – odgovarajućih načina navodnjavanja i fertilizacije u cilju dobijanja željenih osobina (prinos, određeni nutritivni sastav) gajene kulture (Mu et al., 2020; Wang & Xing, 2017; Wang et al., 2008).

Za rast i razvoj biljne vrste, zemljište treba da ima povoljne fizičke, hemijske i biološke osobine (El-Ramady et al., 2014). Za postizanje željene visine i kvaliteta prinosa, važno je sagledati osobine zemljišta, specifičnosti kulture i planirati adekvatno đubrenje i navodnjavanje. Fizičke osobine zemljišta, poput mehaničkog sastava, utiču na strukturu zemljišta, dok vodno-vazdušne osobine i toplotni režim zemljišta utiču na kvalitet, tj. plodnost zemljišta. Od mehaničkog sastava zavisi i adsorptivna sposobnost i akumulacija hranljivih supstanci u zemljištu. Hemijske osobine zemljišta koje su važne prilikom planiranja biljne proizvodnje su koncentracija H^+ jona (pH zemljišta), sadržaj humusa, sadržaj ukupnih karbonata i sadržaj pojedinih mikro- i makroelemenata.

2.3.1. Uticaj fizičko-hemijskih karakteristika zemljišta na kvalitet blitve

Blitva uspjeva na zemljištima prilično različitih fizičko-hemijskih karakteristika. Literaturni podaci ukazuju da blitva može da raste na zemljištima različite teksture (udjela krupnog i sitnog pjeska, praha i gline), neutralne do blago alkalne reakcije, sa ukupnim sadržajem karbonata od niskih do visokih vrijednosti (2,3-39,0%), srednje do bogate humoznosti (3,5-6,25%) (Topalovic et al., 2018). Takođe, blitva uspjeva i na zemljištu koje ima srednje do visok sadržaj pristupačnih nutrijenata (Topalovic et al., 2018).

Često je zemljište koje ima visok sadržaj NaCl limitirajući faktor za rast biljnih usjeva, međutim ne i za rast blitve, koja je halofilna biljka i koja može da uspjeva u sredini koja ima povećanu koncentraciju soli (Kaburagi et al., 2014; Liu et al., 2013). Salinitet zemljišta se izražava mjerenjem elektrolitičke provodljivosti zemljišta, koja je u korelaciji sa sadržajem natrijuma u blitvi (Topalovic et al., 2018). Međutim, povećan sadržaj natrijuma u zemljištu povezan je sa većim sadržajem natrijuma, nitrata i aktivnošću nitrat-reduktaze u listovima blitve (Kaburagi et al., 2014). Povećana aktivnost nitrat- reduktaze nastaje kada je povećana koncentracija Na^+ jona u medijumu, usled pozitivne korelacije sadržaja jona natrijuma iz sredine sa povećanom koncentracijom nitrata u listovima blive. Međutim, sadržaj azota u blitvi ne mora biti uslovljen koncentracijama natrijum hlorida u medijumu (Kaburagi et al., 2014).

Zemljište na kome je gajena blitva nije preporučljivo za ponovnu sadnju blitve najmanje 3 godine nakon berbe, jer blitva ne podnosi monokulturu. S tim u vezi, najbolje je da se blitva gaji nakon biljne kulture kod koje je sprovedena fertilizacija organskim đubrivima (Jurišić M., 2022).

Sadržaj karbonata u zemljištu je važan parametar zemljišta, jer je poznato da karbonati djeluju kao adsorbensi za fosfor i bor u karbonatnom zemljištu (Topalovic et al., 2006; Goldberg, 1997) i da postoji veza između sadržaja karbonata u zemljištu i sadržaja cinka, bora i bakra u listovima blitve

(Topalovic et al., 2018). Pokazano je da su sadržaj organske materije u zemljištu (humus) kao i provodljivost zemljišta u korelaciji sa sadržajem natrijuma u blitvi (Topalovic et al., 2018). Pomenute korelacije su značajne, jer bi se na osnovu sastava zemljišta mogao predvidjeti sadržaj određenih komponenti u blitvi.

2.3.2. Uticaj klimatskih faktora na rast i nutritivni kvalitet blitve

Kod planiranja biljne proizvodnje od posebne važnosti je praćenje klimatskih parametara koji uključuju: temperaturu, padavine (kiša, snijeg i takođe ekstremne varijante poplave i suše), vlažnost vazduha, broj sunčanih dana, opšte sezonske promjene, zatim promjene nivoa mora (za priobalne kulture).

Optimalna temperatura za gajenje (kultivaciju) blitve je u opsegu 16-24 °C. Najniža temperatura na kojoj će blitva proklijati je 5 °C dok pri nižim temperaturama blitva sporije raste (Jurišić M., 2022). Neke sorte blitve dobro podnose i temperature veće od 30 °C, kao i blage mrazove ukoliko je biljka mlada i dobro razvijena.

Blitva je veoma adaptivna kultura, kako u pogledu različitih fizičko-hemijskih karakteristika, tako i što se tiče podneblja (klimatskih uslova). Mediteranska klima najbolje pogoduje rastu blitve, međutim zbog svoje adaptibilnosti i fleksibilnosti uslova gajenja, blitva je prepoznata kao kultura koja se gaji svuda u svijetu (Bozokalfa et al., 2011; Ninfali & Angelino, 2013; Mzoughi et al., 2019). Osim mediteranske može da podnese i kontinentalne i planinske klimatske uslove u vegetativnoj fazi. U priobalnom području može i da prezimi (Jurišić M., 2022).

Blitva bolje toleriše smanjen nivo radijacije nego smanjenu koncentraciju CO₂ u atmosferi, ali se adekvatnom ventilacijom može povećati nivo CO₂ (kada se gaji u kontrolisanim uslovima) koji će biti dostupan blitvi i tako povećati fotosintetsku aktivnost, što ima pozitivan efekat na njen rast (Erwin & Gesick, 2017).

Značajno veći prinos blitve se dobija kada se blitva gaji u proljećnjem dijelu sezone, nego u jesenjem periodu, dok poželjnije osobine za preradu (veći sadržaj suve materije) daje blitva gajena u jesenjoj sezoni (Kolota et al., 2010). Osim uticaja na rast blitve, sezona gajenja utiče i na nutritivni sastav blitve i dodatno na raspodjelu nutrijenata u djelovima lista – lisnim pločama i peteljka (Kolota et al., 2010). Tako blitva gajena u proljeće ima veći sadržaj fosfora i u lisnim pločama i u peteljka od one gajene u jesenjem periodu, dok blitva gajena u jesenjem periodu više kalijuma i kalcijuma u oba dijela lista (Kolota et al., 2010). Sezona rasta blitve utiče i na sadržaj vitamina C, tako što u lisnim pločama u jesenjem periodu ima više ovog vitamina nego u proljeće. Sezona rasta ima uticaj na različitu raspodjelu magnezijuma u djelovima lista, koji je u proljećnoj sezoni rasta veći u pločama dok je u jesenjoj sezoni veći u peteljka (Kolota et al., 2010).

2.4. Navodnjavanje i fertilizacija

Od davnina najviše korišćene mjere u cilju dostizanja željenog prinosa i kvaliteta biljke su fertilizacija i navodnjavanje (Bernacchi & Vanlooche, 2015; Qin et al., 2015). Mada brojni faktori utiču na rast i razvoj biljne kulture, đubrenje i navodnjavanje su agrotehničke mjere koje imaju najveći uticaj, a mogu se kontrolisati. Izbor irigacionog sistema kao i način fertilizacije svakako zavisi od biljne kulture, stručnih i naučnih preporuka, ali i mogućnosti farmera (Heffer et al., 2015; Ierna & Mauromicale, 2012). Generalno, norma navodnjavanja mora biti usklađena sa dozama za đubrenje i obratno, što posebno važi za povrtarske kulture (Mostafa et al., 2019).

2.4.1. Navodnjavanje usjeva

Voda je neophodna za razvoj biljke iz više razloga, od reakcija fotosinteze gdje se koristi kao izvor elektrona, pa sve do reakcija metabolizma biljke gdje je rastvarač, zatim za održavanje turgora, sprečavanja isušivanja tkiva itd. Iako se veća količina vode iz zemljišta gubi u atmosferi isparavanjem odnosno transpiracijom, za fiziološke potrebe najviše se voda koristi u fotosintezi, koja je vitalna za rast biljke (Bernacchi & VanLoocke, 2015). Brojni faktori utiču na to koja

količina vode je potrebna za određeni usjev, poput klimatskih faktora (količina padavina-tačnije količine efektivnih padavina (dio padavina koji se zadržava u zoni korijenovog sistema), temperatura, itd.), evapotranspiracije i kako se ona mijenja tokom vegetacije, sastava i tipa zemljišta, zatim od početnih zaliha vode u zemljištu i promjena zaliha vode tokom vegetacije, vremena trajanja vegetacije, morfologije biljke (Bernacchi & Vanlooche, 2015), kao što je ilustrovano na Slici 2.2 (Slika 2.2 je preuzeta sa (FAO, 1985). Važno je odrediti optimalnu količinu vode za dati usjev, jer smanjena količina dostupne vode može zaustaviti ili smanjiti rast i kvalitet biljke, dok prevelika količina može da ispere potrebne nutrijente za rast (Maseko et al., 2020).

Navodnjavanje je agrotehnička mjera koja se koristi da bi se gajenoj kulturi (usjevu) obezbjedila dovoljna količina vode za njen rast i razvoj. Veliki broj faktora određuje koji sistem navodnjavanja je najbolje primjeniti, poput tipa i boniteta zemljišta, površine koja se navodnjava, cijene opreme sistema navodnjavanja. Navodnjavanje i izbor odgovarajuće tehnike navodnjavanja su posebno važni u sredinama gdje klimatski faktori ograničavaju dostupnost vode, npr. za sredine sa malom količinom padavina što ograničava sadnju većine usjeva (Patane et al., 2011; Djurović et al., 2016).

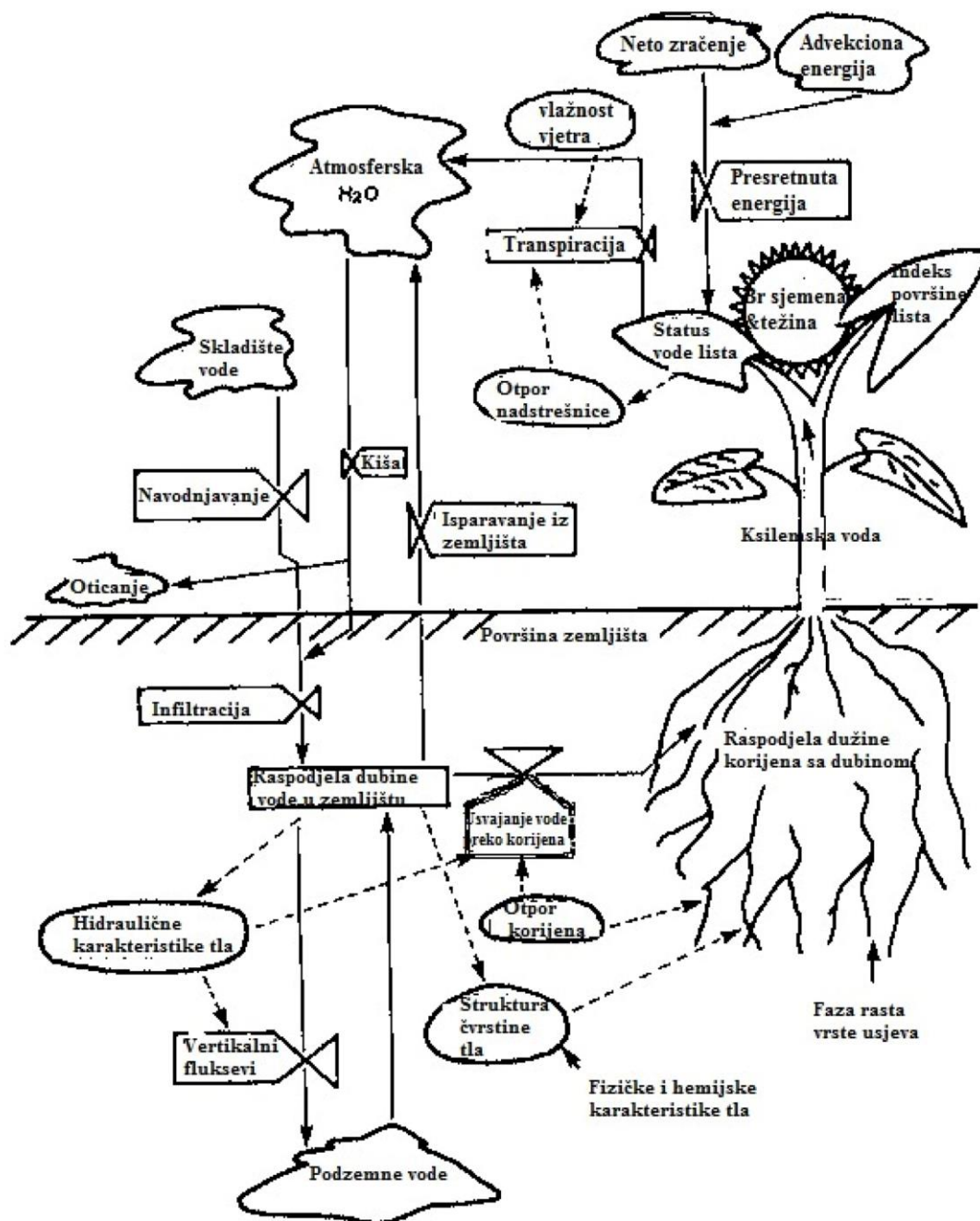
Osnovne metode irigacije uključuju četiri načina: površinsko navodnjavanje, podzemno navodnjavanje, navodnjavanje rasprskivačima i navodnjavanje preko sistema kap po kap (Madjar & Sostarić, 2009). Površinsko navodnjavanje je najstariji način navodnjavanja poljoprivrednih kultura. Zasniva se na principu slobodnog protoka vode u prirodi pod uticajem gravitacione sile. Kod površinskog navodnjavanja voda se primjenjuje na površinu na kojoj se gaji poljoprivredna kultura, gdje voda u tankom sloju stagnira ili teče po površini zemljišta infiltrirajući se do odgovarajuće dubine. Mada je površinsko navodnjavanje najstariji sistem navodnjavanja, njegovo korišćenje neće izgubiti primat ni u budućnosti, zbog toga jer se koriste prirodni uslovi bez velikog ulaganja, a potrebno je i manje energije. Podzemno navodnjavanje podrazumjeva dovod vode podzemnim cijevima, pri čemu se voda infiltrira u zemljište i uslijed kapilarnih sila voda dopijeva do zone korijenovog sistema poljoprivredne kulture. Navodnjavanje rasprskivačima je slično prirodnom zalivanju, tj. padanju kiše. Voda se pumpa kroz sistem cijevi, a zatim se raspršuje na poljoprivredne kulture i zemljište. Navodnjavanje preko sistema kap po kap je jedan od savremenih načina navodnjavanja i proizvod je savremene tehnologije – sistem može biti automatizovan i programiran (Madjar & Sostarić, 2009). Svaki od navedenih načina navodnjavanja imaju svoje prednosti za odgovarajuće uslove i potrebe. Parametar koji opisuje efikasnost korišćenja vode (WUE) veoma zavisi od načina navodnjavanja i povećanje WUE se može postići korišćenjem sistema navodnjavanja kap po kap (Wang & Xing, 2017). Potreba za poboljšanjem efikasnosti korišćenja vode je izražena kada se govori o sredinama gdje svježna voda nije dostupna, gdje su povećani troškovi isporuke vode i potreba za povećanjem prinosa gajene kulture (Maboko et al., 2017).

Za navodnjavanje povrtarskih kultura uglavnom je potreban veći nivo vlažnosti zemljišta, jer je korjenov sistem slabije razvijen u odnosu na nadzemni dio povrtarskih kultura, pa se transpiracijom gubi veća količina vode (Simonne et al., 2007). Blitva je biljka dubokog i razgranatog korijena i kao takva ne zahtijeva česta zalivanja, međutim u sušnim predjelima potrebno je navodnjavanje, mada je jako tolerantna na sušu (Jurišić M., 2022). Blitva koja se gaji u sredinama gdje su klimatski uslovi sa malim količinama padavina i sa visokim temperaturama, zahtjeva primjenu sistema navodnjavanja koji će u datim uslovima poboljšati efikasnost korišćenja vode (Maboko et al., 2017). Blitva je takođe jedna od rijetkih kultura koja toleriše navodnjavanje slanom vodom (Qing et al., 2008).

Optimalne količine vode (norme navodnjavanja) koju je potrebno primjeniti sve češće se određuju primjenom softvera, a zasnivaju se na proračunima koji uzimaju u obzir bitne faktore sa Slike 2.2. Osim za određivanje potrebne količine vode za navodnjavanje, ovakvi softveri koriste se za procjenu potencijalne (ET_c) i referentne evapotranspiracije (ET₀), sadržaja vode u zemljištu, relativnog prinosa, produktivnosti usvojene vode, troškove navodnjavanja. Pri određivanju normi zalivanja, kao jedan od načina navodnjavanja, softveri koriste formule iz literature poput „*FAO Irrigation and Drainage Paper No. 56*“ (Allen et al., 1998), pri čemu su ulazni podaci:

karakteristike klime i zemljišta na oglednom polju, kao i karakteristike biljne kulture (Allen et al., 1998).

Navodnjavanje utiče na sadržaj vitamina i minerala u zelenom povrću (Zeipina et al., 2015), i zato se može koristiti u svrhu poboljšanja komponenti koje pozitivno utiču na zdravlje. Kontrolisanje navodnjavanja je moguće jedino u zatvorenim sistemima, gdje su spoljni uticaji na potrebe vode umanjeni (Wang & Xing, 2017), dok gajenje usjeva na otvorenom podliježe uticaju atmosferskih padavina, čime je kontrola navodnjavanja znatno otežana (Ivanovic et al., 2019). Budući da za biljku potrebe vode nisu jedine potrebe i da na dostupnost vode mogu uticati drugi abiotički i biotički faktori, potrebno je simultano proučiti sve uticaje i prikupiti što više relevantnih podataka o rastu gajene kulture (Maseko et al., 2020).



Slika 2.2: Ključni faktori koji se razmatraju pri određivanju potrebne količine vode za usjev koji se navodnjava (FAO, 1985).

2.4.2. Značaj i primjena fertilizacije za gajenje biljaka

Fertilizacija je agrotehnička mjera koja ima za cilj da obezbijedi dovoljno hranljivih supstanci koji su neophodni za rast, prinos i kvalitet biljne vrste (Ohshiro et al., 2016). Za rast i razvoj biljke neophodni su sledeći makronutrijenti: azot, fosfor, kalijum, kalcijum, sumpor i magnezijum, i mikronutrijenti: bor, hlor, mangan, gvožđe, cink, bakar, molibden, kobalt (Maathuis, 2009; Hansch & Mendel, 2009). Mada su svi esencijalni nutrijenti podjednako važni za ishranu biljke, azot je potreban u mnogo većim količinama od drugih esencijalnih elemenata, pa se azotno đubrivo koristi najviše u cilju dobijanja maksimalnog prinosa (Shrivastav et al., 2020).

Kao sredstva za ishranu biljke najčešće se koriste đubriva koja sadrže glavne nutrijente (N, P, K) posebno ili u kombinaciji i koja se balansiraju prema potrebama biljne vrste, a mogu biti mineralna, organska ili organomineralna zavisno u kom obliku su zastupljeni makronutrijenti (Hafsi et al., 2011; Akamine et al., 2007).

Azot, makronutrijent kojeg biljke apsorbuju u najvećoj količini, učestvuje u sintezi proteina, formiranju hloroplasta, fotosintezi, zatim je važan za formiranje listova, pravilno razvijanje nadzemnog i podzemnog dijela i drugih integralnih funkcija za razvoj i rast biljke (Zhou et al., 2011; Bassi et al., 2018). Azot je najvažniji limitirajući faktor rasta – potreba za azotom je najveća na početku vegetacije i kao što je pomenuto najveće količine azota se primjenjuju u procesu fertilizacije (Miller et al., 2012; Leghari et al., 2016; Engelbrecht et al., 2010; El-Ramady et al., 2014). Treba napomenuti, da je od svih esencijalnih nutrijenata, upravljanje azotom u sistemu fertilizacije najteže, zato što treba obezbijediti adekvatnu količinu koja će biti dostupna biljci, jer se višak lako ispira i može dovesti do zagađenja životne sredine (Miller et al., 2012; Leghari et al., 2016). Azot se u đubrivima nalazi u obliku koji biljka može apsorbovati preko korijena (najčešće u obliku nitrnog i amonijum jona). Zeleno lisnato povrće zahtjeva veću količinu azota za dostizanje maksimalnog prinosa u odnosu na drugo povrće, što je i očekivano, posebno u odnosu na leguminoze koje zahtjevaju znatno manje azotnog đubriva zato što koriste azot iz atmosfere, indirektno (jer na korijenu ovih biljaka nastanjeni su mikroorganizmi koji mogu da fiksiraju azot iz vazduha i prevedu ga u dostupan oblik za biljku (Yang et al., 2021; Motseki, 2008).

Fosfor je esencijalni element za rast i razvoj biljke koji biljke primaju u formi ortofosfata, međutim zbog hemijske adsorpcije fosfora, njegova je dostupnost za biljku niska, ali se može poboljšati korišćenjem adekvatne prihrane. Fosfor je gradivni element biljke, jer je element koji ulazi u sastav nukleinskih kiselina, šećera i lipida. Takođe, fosfor učestvuje u procesima važnim za razvoj, kako na ćelijskom nivou tako i na nivou cijele biljke, što uključuje procese ćelijskog disanja, fotosinteze, sinteze skroba, transporta produkata i energije, klijanje sjemena, fiksaciju azota, a utiče i na razvoj korjena, cvjetanja i plodonošenje (Malhotra et al., 2018).

Kalijum, tj. njegov jon, je najzastupljeniji neorganski katjon (u nastavku kalijum), i veoma je važan za rast biljke. Kalijum nije gradivni element biljke, ali je aktivator enzima koji su uključeni u sintezu proteina, transport šećera, metabolizam azota i ugljenika, kao i enzima uključenih u proces fotosinteze (Xu et al., 2020). U procesima rasta biljke, kalijum stimuliše i kontroliše ATP-aze u ćelijskoj membrani koje su važne za kiselu stimulaciju ćelije kojom se aktivira opuštanje ćelijskog zida i aktiviranje hidrolaza. Kalijum ima veliku pokretljivost u biljci i važan je za regulaciju ćelijskog osmotskog pritiska i balans anjona i katjona u citoplazmi biljne ćelije, čime je kroz ove procese uključen u važne fiziološke procese (Oosterhuis et al., 2014). Takođe, ima značajnu ulogu u zaštiti biljke od biotičkog i abiotičkog stresa (Wang et al., 2013; Hafsi et al., 2011).

Kao i u slučaju navodnjavanja, optimalna količina prihrane za određenu biljnu vrstu zavisi od više faktora, poput tipa i karakteristika zemljišta, klimatskih faktora, vlažnosti zemljišta, stadijuma rasta biljne kulture, koje treba proučiti i imati u vidu prilikom primjene odgovarajuće vrste i količine prihrane (Ren et al., 2022). I ovdje su iskustva farmera i podaci iz literature od velike pomoći pri određivanju vrste i količine prihrane koje treba primijeniti.

2.5. Morfološke karakteristike blitve i faktori koji utiču na morfologiju

Morfološki, blitva ima razgranat i dubok korijen, debelu, hrskavu i jestivu stabljiku i velike robustne ovalne listove (dužina listova može biti od 10-25 cm, širina 1-4 cm), koje prožimaju najčešće bijele žile, ali one zavisno od vrste mogu biti i ljubičate, crveno-ljubičaste, žuto-narandžaste i žute (Skalicky et al., 2020; Lim, 2016; Kugler et al., 2007; Kugler et al., 2004). Prosječne morfološke karakteristike blitve koje su dobijene razmatranjem 12 sorti blitve su pokazale sledeće vrijednosti: težina 346 g, visina 506 mm, širina stabljike 23 mm, 10 listova po biljci (Pokluda & Kuben, 2018). Na ukupnu težinu blitve značajan efekat ima visina biljke i broj listova. Kada je srednja vrijednost težine blitve oko 400 g tada formira najšire petoleje (stabljike). Na kvalitet peteljki blitve značajan uticaj ima izbor sorte blitve (varijetet). Široke peteljke su nađene u sortama „Lucullus“, „Genfer Selma“, „Swiss Chard“ i „Bright Lights“ (Pokluda & Kuben, 2018). Značajan prinos i time komercijalnu upotrebu od 12 ispitivanih sorti pokazale su sorte „Gator“, „Zürcher Gelber“ i „Charlotte“ (Pokluda & Kuben, 2018).

Na morfološke karakteristike blitve utiče i fertilizacija, i to na način da povećanjem koncentracije azota u đubrivu broj listova, površina lista, svježja i suva masa lista se povećavaju što daje lisnatiju i veću blitvu (Engelbrecht et al., 2010; Miceli & Miceli, 2014). Dodatno, interakcioni efekat razmaka između biljaka i nivoa azotnog đubriva značajno utiče na visinu biljke, broj listova po biljci, težinu suve i svježje ukupne biljke (Hailay & Haymanot, 2019).

Kvalitet vode za navodnjavanje ima uticaj na strukturu lista blitve i na rast blitve. Tako profiltrirana voda za navodnjavanje, koja ima visok sadržaj soli, redukuje rast blitve i dovodi do akumulacije soli što ima za posledicu smanjenje sloja epiderma i mezofila kao i izduženje palisadnih ćelija lista blitve (Abdulmalek et al., 2017).

Gustina sadnje biljne kulture, tj. rastojanje između sadnica utiče na morfološke karakteristike biljke na način da djeluje na njeno mikrokruženje, utičući tako na njen rast i razvoj, kao i na prinos usjeva. Rastojanje između sadnica blitve ima uticaj i na indeks površine lista (Deveci et al., 2019). Optimalno rastojanje kod kultura koje imaju razvijene listove, poput blitve i drugog GLVs, je posebno značajno zbog obezbjeđivanja bolje iskorišćenosti svjetlosti koja utiče na produktivnost biljke (Echer et al., 2012). Najbolji prinos biljne kulture za tržište se postiže kada se na 0,56 m² posadi jedna sadnica biljke, odnosno maksimalni prinos se postiže kada se jedna sadnica gaji na 0,49 m² (Turbin et al., 2014). Najveća masa svježje (961,7 g/biljci) i tržišne svježje blitve (873,1 g /biljci) je u slučaju rastojanja između sadnica 0,5 m, dok najveći ukupni i tržišni prinos je postignut kada je rastojanje između biljaka 0,3 m (Márcia de M Echer et al. 2012).

2.6. Blitva u ishrani, nutritivni i fitonutritivni sastav blitve

Blitva botanički pripada istoj porodici kao spanać, pa su joj prehrambena i ljekovita svojstva slična, a pritom je jeftinija od spanaća. Blitva je dio mediteranskog načina ishrane, koji se smatra najblagotvornijim u prevenciji hroničnih bolesti (Martinez-Gonzalez et al., 2009). Jestivi dio blitve su listovi i stabljika, stabljike se obično odvoje od listova i kuvaju kao celer, dok se listovi mogu pripremati sirovi (salata) ili kuvati kao spanać. Svježja blitva na 100 g ima svega 19 kcal, a pored malog broja kalorija, ovo povrće sadrži bogat nutritivni sastav (USDA, 2017). Prema podacima američkog ministarstva poljoprivrede, glavne komponente koje ulaze u sastav blitve su sledeće: makronutrijenti (proteini, lipidi, šećeri), mikronutrijenti (vitamini, minerali) i drugi fitonutrijenti (USDA, 2017). U Tabeli 2.1 dat je prikaz nutijenata i nekih fitonutrijenata u 100 g svježje blitve, iz USDA baze podataka.

Tabela 2.1 Podaci o sadržaju nutrijenata i fitonutrijenata u 100 g sirove svježe blitve (USDA, 2017; Miceli & Miceli, 2014).

Nutrijent/Fitonutrijent	Sadržaj	Jedinica
<i>Makronutritivne komponente</i>		
Proteini	1,8	g
Ukupni lipidi	0,2	g
Ukupni šećeri (razlika)	3,74	g
<i>Ugljenohidratne komponente</i>		
Vlakna (ukupna)	1,6	g
<i>Amino kiseline</i>		
Triptofan	0,017	g
Leucin	0,13	g
Izoleucin	0,147	g
Fenilalanin	0,11	g
Lizin	0,099	g
Histidin	0,036	g
<i>Lipidi</i>		
Holesterol	0	mg
Masne kiseline, ukupne zasićene	0,03	g
Masne kiseline, ukupne mononezasićene	0,04	g
Masne kiseline, ukupne polinezasićene	0,07	g
<i>Makro- i mikroelementi</i>		
Kalcijum	51	mg
Gvožđe	1,8	mg
Magnezijum	81	mg
Fosfor	46	mg
Kalijum	379	mg
Natrijum	213	mg
Cink	0,36	mg
Bakar	0,179	mg
Selen	0,9	µg
<i>Vitamini</i>		
Ukupna L-askorbinska kiselina	30	mg
Tiamin	0,04	mg
Riboflavin	0,09	mg
Niacin	0,4	mg
Vitamin B6	0,099	mg
Ukupni folati	14	µg
RAE (Ekvivalenti aktivnosti retinola)	306	µg
Vitamin A	6120	IU
Vitamin E (α -tokoferol)	1,89	mg
Vitamin K1 (filokinon)	830	µg
<i>Ostalo</i>		
β -karoten	3647	µg
α -karoten	45	µg
Lutein i zeaksantin	11000	µg

Nutrijent/Fitonutrijent	Sadržaj	Jedinica
<i>Ostalo</i>		
Ukupni holin	18	mg
Ukupni hlorofil	46	mg
Betain	0,3	mg
Voda	92,66	g
Energija	19	kcal

2.6.1. Komponente u blitvi koje utiču na zdravlje čovjeka

Zbog bogatstva nutrijentima, niskog sadržaja lipida, malog broja kalorija preporučuje se da blitva bude dio svakodnevne ishrane. Od osnovnih komponenti blitva ima najveći sadržaj vode, slijede ugljeni hidrati, potom slijede ukupni proteini ili sadržaj pepela (zavisno od izvora literature), dok je najmanja količina ukupnih lipida, što joj daje energetska vrijednost 78 do 121,06 kJ zavisno od izvora podataka (USDA, 2017; Ivanovic et al., 2019; Mzoughi et al., 2019). U lipidnoj frakciji iz listova blitve su nađene zasićene, mononezasićene i polinezasićene masne kiseline (USDA, 2017; Mzoughi et al., 2019). Od zasićenih masnih kiselina najdominantnija je palmitinska kiselina (22,9%), praćena stearinskom kiselinom (8,2%), ostale nađene zasićene masne kiseline se kreću u opsegu od 0,1 do 3,8% (Mzoughi et al., 2019). Od nezasićenih masnih kiselina u lipidnoj frakciji izolovanoj iz listova blitve, nađene su sledeće: linoleinska (26,5%), oleinska (19,1%), palmitoleinska (6,3%), α -linoleinska kiselina (5,2%), eikozadienoinska (0,6%) i eikozenoinska kiselina (0,6%) (Mzoughi et al., 2019). U studiji Mzoughi i saradnika nađeno je da odnos nezasićenih/zasićenih masnih kiselina u lipidnoj frakciji listova blitve, iznosi 1,4 (Mzoughi et al., 2019), što je povoljan odnos u prevenciji kardiovaskularnih bolesti (Gamba et al., 2020).

Blitva je takođe izvor brojnih drugih komponenti, koje imaju pozitivne efekte na zdravlje, od kojih izdvajamo sledeće grupe: dijetetska vlakna, polifenolna jedinjenja, pigmenti (hlorofil, karotenoidi, betalaini), saponini (Mzoughi et al., 2019; Mroczek et al., 2021; Ivanovic et al., 2021; Ivanovic et al., 2019; Ninfali et al., 2007; Miceli & Miceli, 2014; Ninfali & Angelino, 2013).

2.6.1.1. Dijetetska vlakna u blitvi

Prema definiciji AACC-a, dijetetska vlakna su jestivi delovi biljaka ili analogni ugljeni hidrati koji su otporni na varenje i apsorpciju u tankom crijevu čovjeka sa kompletnom ili djelimičnom fermentacijom u debelom crijevu. Prema rastvorljivosti u vodi, dijele se na rastvorna i nerastvorna dijetetska vlakna. U nerastvorna dijetetska vlakna ubrajaju se komponente ćelijskog zida biljke-celuloza, hemiceluloza, lignin, sa ligninom povezane komponente (voskovi, kutin, suberin) i otporni skrob, dok se u rastvorna vlakna ubrajaju sledeće komponente: necelulozni polisaharidi kao nesvarljivi oligosaharidi, arabinoksilani, β -glukani, neke hemiceluloze, pektini, gume, sluzi i inulin (Ciudad-Mulero et al., 2019). Rastvorna vlakna u vodenoj sredini formiraju viskozni gel, ne digestuju se u tankom crijevu ali se lako fermentišu dejstvom mikroflora u debelom crijevu, dok nerastvorna vlakna ne formiraju gel pa je njihova fermentacija zbog toga ograničena (Cronin et al., 2021). Većina vlakana koja se u hrani nalazi uključuje oko dvije-trećine nerastvornih i jednu-trećinu rastvornih vlakana (Wong & Jenkins, 2007).

Dijetetska vlakna utiču na bioraspoloživost pa tako i na bioiskoristivost nutrijenata odnosno fitonutrijenata. Pojmove bioiskoristivost i bioraspoloživost treba razlikovati, bioiskoristivost predstavlja količinu unijetih nutrijenta/fitonutrijenata koji se vari, absorbuje i koristi u normalnom metabolizmu, dok je bioraspoloživost ona količina unijetih nutrijenata/fitonutrijenata koja je dostupna za apsorpciju u tankom crijevu nakon probave. Samo oni nutrijenti/fitonutrijenti koji se oslobode iz matriksa hrane (npr. voće i povrće) dejstvom probavnih enzima (u tankom crijevu) i bakterijske mikroflora (u debelom crijevu) su bioraspoloživa i zbog toga potencijalno bioiskoristiva

(Saura-Calixto et al., 2007). Dijetetska vlakna značajno utiču na nisku bioiskoristivost antioksidanasa iz voća i povrća, jer snižavaju njihovu bioraspoloživost u tankom crijevu čovjeka, zbog toga što antioksidansi u tankom crijevu fizički i hemijski interagiraju sa nesvarljivim polisaharidima iz ćelijskog zida (Palafox-Carlos et al., 2011).

Voće i povrće se generalno smatra odličnim izvorom rastvornih i nerastvornih dijetetskih vlakana (Cui et al., 2019). Listovi svježe blitve izuzetno su bogati ukupnim dijetetskim vlaknima, pri čemu je frakcija nerastvornih vlakana preko sedamnaest puta zastupljenija od frakcije rastvornih vlakana (Mzoughi et al., 2019). U literaturi je zabilježen ukupni sadržaj vlakana u 100 g svježe blitve od 0,7 g do 2,43 g (Ivanovic et al., 2019; USDA, 2017; Mzoughi et al., 2019). Dijetetska vlakna su neophodna za zdravo funkcionisanje gastrointestinalnog trakta i imaju status funkcionalnih komponenti (Pryeva & Safronova, 2019). Nutricionisti preporučuju vlakna u svakodnevnoj ishrani u cilju prevencije brojnih bolesti prije svega gastrointestinalnog trakta, kao i sistemskih bolesti koje su povezane sa poremećajima gastrointestinalnog trakta (Shah et al., 2020; Cronin et al., 2021).

2.6.1.2. Makro- i mikroelementi u blitvi

Makro- i mikroelementi su esencijalni u mnogim biohemijским i fiziološkim procesima u organizmu. Čovjek ishranom mora unositi minerale kako bi očuvao homeostazu i spriječio razvoj fizioloških poremećaja koji bi mogli dovesti do bolesti (Gharibzahedi & Jafari, 2017; Gupta & Gupta, 2014). Prema količini koja je potrebna za funkcionisanje organizma, mineralne elemente dijelimo na makroelemente, mikroelemente i elemente u tragovima. U makroelemente ubrajaju se: natrijum, magnezijum, kalcijum, fosfor, hlor i sumpor; u mikroelemente: cink, gvožđe, bakar, mangan, jod; dok u elemente u tragovima: selen, hrom, molibden, kobalt, silicijum i bor. Glavne uloge minerala u ljudskom organizmu su (Gomes & Rautureau, 2021; Rumeza et al., 2006):

- strukturna uloga, gdje učestvuju u formiranju kostiju, zuba i mekih tkiva
- učestvuju u održavanju normalnog srčanog ritma, u procesu kontrakcije mišića, u nervnoj provodljivosti, u procesu koagulacije krvi i u kiselo-baznoj ravnoteži krvi i tkiva
- utiču u regulaciji ćelijskog metabolizma tako što su kofaktori brojnih enzima i hormona, koji regulišu ćelijsku aktivnost.

Faktori životne sredine utiču na sadržaj minerala u zelenom lisnatom povrću, a prije svega sadržaj minerala u zemljištu i klimatski faktori (Ramjan et al., 2018).

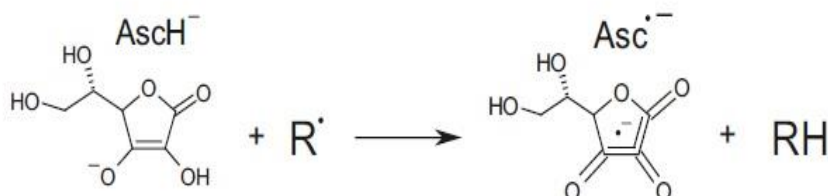
Blitva je odličan izvor makro- i mikroelemenata (Mzoughi et al., 2019; Kolota et al., 2010; Bozokalfa et al., 2011; Ivanovic et al., 2019; Ninfali & Angelino, 2013). Konzumiranje zelenog lisnatog povrća značajno doprinosi unosu minerala poput K, Ca, Mg i Fe (Melse-Boonstra, 2020; Arasaretnam et al., 2018). Bioiskoristivost kalijuma iz GLVs ima vrijednosti od 60-85% za voće i povrće i glavni ograničavajući faktor apsorpcije kalijuma iz izvora hrane je neobrađeni matriks, međutim i pored toga u poređenju sa drugim mineralima kalijum ima visoku bioiskoristivost (Melse-Boonstra, 2020). Kalcijum je takođe mineral, makroelement, koji se značajno unosi hranom konzumiranjem zelenog lisnatog povrća. Bioiskoristivost kalcijuma iz GLVs se kreće od 20 do 40% od ukupnog sadržaja, efikasnost apsorpcije kalcijuma zavisi od sadržaja fitinske kiseline (ili soli-fitata), sadržaja oksalne kiseline (ili soli-oksalata), dijetetskih vlakana u GLVs (Gupta et al., 2006; Melse-Boonstra, 2020). Ishrana bogata voćem i povrćem obezbjeđuje umjerene količine magnezijuma, pri čemu bioiskoristivost ovog minerala iz GLVs je u opsegu od 24 do 35% od ukupnog sadržaja (Bohn et al., 2004). Na apsorpciju magnezijuma, kao i kod kalcijuma, veliki uticaj ima sadržaj oksalata u GLVs, pa tako u spanaću koji je bogat oksalatima, bioiskoristivost magnezijuma je umnogome niža nego recimo u kelju koji ima nizak sadržaj oksalata (Bohn et al., 2004). Uz pomenute minerale u GLVs, u ovoj grupi povrća možemo naći veliku količinu gvožđa, međutim bioiskoristivost gvožđa je oko 12%, i posledica je nedigestivnosti ćelijskih komponenti u kojima se gvožđe skladišti u biljnim ćelijama (hloroplasti i mitohondrije) (Melse-Boonstra, 2020). Bioiskoristivost gvožđa zavisi i od drugih komponenti prisutnih u GLVs (Gupta et al., 2006) i kad

se gvožđe ne nalazi u obliku hema, što je slučaj u GLVs, njegova bioiskoristivost je povećana u prisustvu vitamina C (Arde et al., 2010).

2.6.1.3. Vitamini u blitvi

Vitamini su hemijska jedinjenja koja su neophodna za funkcionisanje organizma, budući da učestvuju u glavnim metaboličkim funkcijama organizma. Najčešće vitamini su kofaktori u ključnim enzimskim reakcijama, potom djeluju kao antioksidansi i stoga su neophodni za funkcionisanje brojnih sistema organa, posebno imunog sistema a i čitavog organizma (Maqbool et al., 2017). Voće i povrće su dobri izvori vitamina. Blitva ima visok sadržaj vitamina C, vitamina K i vitamina A (Ninfali & Angelino, 2013; Mzoughi et al., 2019; Kolota et al., 2010; Bozokalfa et al., 2011; Ivanovic et al., 2019).

Vitamin C (L-askorbinska kiselina) čovjek ne može da sintetiše već putem ishrane unosi u organizam. Vitamin C je u vodi rastvoran vitamin i njegova funkcija u organizmu se vezuje za njegova antioksidativna svojstva a važan je u prevenciji hroničnih, a prije svega kardiovaskularnih bolesti (Granger and Eck 2018).



Slika 2.3: Reakcija askorbinske kiseline, AscH^- (vitamin C) sa slobodnim radikalom R^\bullet (Lawson et al., 2018).

L-askorbinska kiselina je na fiziološkom pH uglavnom u jonizovanom obliku (AscH^-), dok je mali broj molekula askorbinske kiseline u nejonizovanoj formi (AscH_2) ili u potpuno jonizovanom obliku (Asc^{2-}) (Lawson et al., 2018; Lu et al., 2010). Dominantna forma vitamina C, odnosno askorbatni anjon (AscH^-), djeluje prema primarnom mehanizmu neutralisanja slobodnih radikala, redukuje se i postaje askorbatni radikal ($\text{Asc}^{\bullet-}$) (Slika 2.3). $\text{Asc}^{\bullet-}$ je slabo reaktivni radikal, jer je prilično stabilan, zbog strukture molekula (Slika 2.3). Dodatno, Vitamin C ima sposobnost da helira jone prelaznih metala, i tako sprečava njihovu katalitičku funkciju (sekundarni, tj. preventivni mehanizam). Multifunkcionalno dejstvo vitamina C svrstava ga u grupu moćnih antioksidanasa (Pehlivan, 2016).

Vitamin C u blitvi, kao i u drugom lisnatom povrću, ima veće vrijednosti u lisnoj ploči nego u petolejma lista i stabljici biljke (Kolota et al., 2010; Miceli & Miceli, 2014). U blitvi vrijednost vitamina C je oko 30 mg na 100 g svježe biljke. Preporučena dnevna doza unosa vitamina C je 60 mg, što će reći da se unosom 30 g blitve obezbjeđuje 15% preporučene dnevne doze (Ivanovic et al., 2019; USDA, 2017). Bioiskoristivost vitamina C iz voća i povrća je visoka i iznosi oko 80-90% (Melse-Boonstra, 2020), što znači da se oko 27 mg vitamina C može unijeti konzumiranjem 100 g svježe blitve, odnosno oko 13,5% DV kada se konzumira 30 g blitve, što je doza koja se najčešće služi (servira). L-askorbinska kiselina se lako oksiduje u L-dehidroaskorbinsku kiselinu, koja se može redukovati nazad u L-askorbinsku kiselinu. Askorbinska kiselina brzo se oksiduje u oblik L-dehidroaskorbinske kiseline pri neutralnom ili alkalnom pH, koji se nepovratno oksiduje u 2,3-diketogulonsku kiselinu (Pathy, 2018). Kiseonik, svjetlost, zatim razni procesi pri obradi hrane poput drobljenja, sječenja, sjeckanja, pranja, kuvanja, konzerviranja kao i prisustvo jona metala kao što su Cu^{2+} i Fe^{3+} mogu izazvati značajne gubitke vitamina C, tj. smanjiti njegovu bioraspoloživost (El-Ishaq & Obirinakem, 2015). Dodatno, bioiskoristivost vitamina C je niža u tankom crijevu nego

u želudcu zbog toga što kisela sredina smanjuje oksidaciju vitamina C kako hemijskim putem tako i enzimski (Rodríguez-Roque et al., 2013; Yaman et al., 2021). Uz to, bioiskoristivost vitamina C je smanjena formiranjem kompleksa između jona metala sa askorbinskom kiselinom (Yaman et al., 2021).

Vitamin K, tj. njegove aktivne forme K1 (filokinon) i vitamin K2 (menandion) su važni vitamini za proces zgrušavanja krvi i za izgradnju kostiju (DiNicolantonio et al., 2015). Zeleno lisnato povrće je odličan izvor vitamina K (u obliku vitamina K1), pri čemu su u blitvi nađene najviše vrijednosti među GLVs i to 830 µg na 100 g svježe blitve dok su vrijednosti u kelju 390 µg na 100 g svježeg kelja (USDA, 2017). Prema preporučenim dnevnim dozama za vitamin K1, koje iznose oko 90 µg za žene, odnosno 120 µg za muškarce (Harvard Health Publishing, 2020), teoretski 30 g svježe blitve bi sadržalo preko 2 puta veću količinu od prepuručene dnevne doze za muškarce, međutim bioiskoristivost vitamina K iz zelenog lisnatog povrća je manja od 5% (Melse-Boonstra, 2020). Preračunom se dobija da je manje od 41,5 µg vitamina K1 bioraspoloživo u 100 g svježe blitve. Mala bioiskoristivost vitamina K1 iz zelenog lisnatog povrća je vjerovatno usled toga što vitamin K ostaje zarobljen u ćelijskim strukturama (hloroplastima).

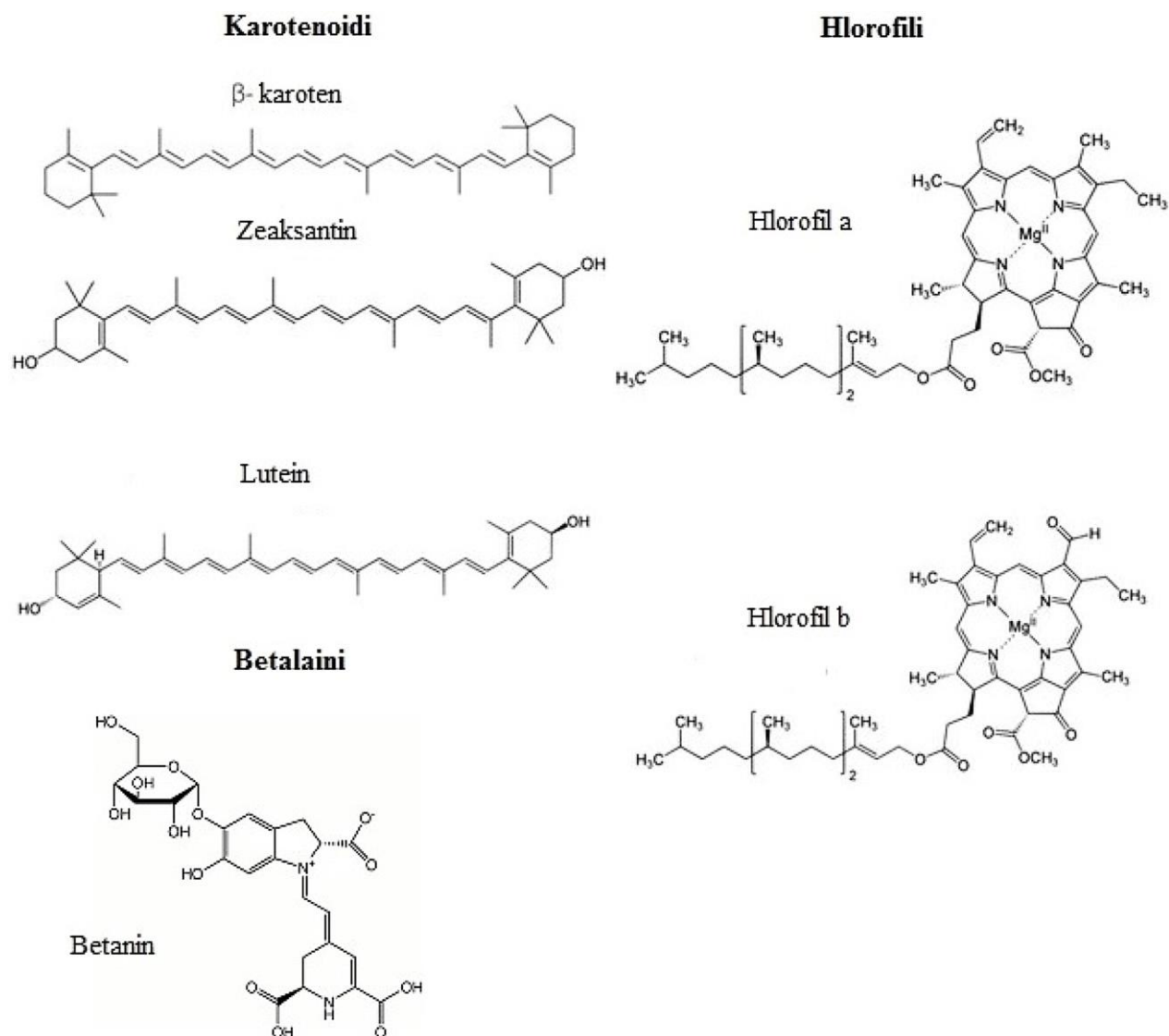
Vitamin E je liposolubilni vitamin, koji ima funkciju antioksidansa, tj. zaštitnu ulogu organizma od slobodnih radikala u lipidnoj sredini (Raederstorff et al., 2015). Vitamin E ima nekoliko formi, pri čemu je najaktivnija forma α -tokoferol. α -tokoferol djeluje primarno protiv lipidne peroksidacije u ćelijskoj membrani, tako što direktno neutrališe slobodne radikale (primarni mehanizam), pri čemu prelazi u oksidovanu formu, tj. u α -tokoferoksil radikal (Lawson et al., 2018). Vitamin C i vitamin E djeluju kooperativno u zaštiti ćelije od oksidacionog stresa, jer vitamin C regeneriše α -tokoferoksil radikal, tj. oksidovani oblik α -tokoferola (Lawson et al., 2018).

Vitamin E u blitvi je prisutan u količini od 1,89 mg na 100 svježe blitve, u obliku α -tokoferola (USDA, 2017). Preporučene dnevne doze ovog vitamina su 15 mg (Harvard Health Publishing, 2020) i o bioraspoloživosti ovog vitamina se jako malo zna kao i o njegovoj absorpciji (Reboul, 2017). Preračunom se dobije da 30 g svježe blitve sadrži 0,537 mg vitamina E, tj. 0,085% preporučene dnevne doze.

Vitamin A, tj. jedan od njegovih aktivnih oblika- retinol, ima funkciju u imunološkom sistemu, u očuvanju zdravlja očiju, rastu ćelija (Marzeda & Luszczki, 2019). U obliku retinola vitamin A je prisutan u hrani životinjskog porijekla, dok u formi β -karotena (provitamin A), koji nema fiziološku funkciju u organizmu dok se ne transformiše u retinol, je uglavnom prisutan u hrani biljnog porijekla. U blitvi i sličnom povrću, vitamin A se nalazi u formi provitamina A i to uglavnom kao β -karoten, i osobađanje β -karotena iz matriksa GLVs je glavni limitirajući faktor u bioiskoristivosti. Svega 5-10% od ukupnog sadržaja β -karotena u GLVs je bioraspoloživo (Melse-Boonstra, 2020), uglavnom iz istog razloga kao i vitamin K. Za biokonverziju β -karotena u retinol, uvodi se konverzioni faktor koji nam govori koliko β -karotena je potrebno za njegovu konverziju u 1 µg retinol. Nađeno je da je 2,1–3,8 µg β -karotena rastvorenog u ulju potrebno da bi se formirao 1 µg retinola (Van Loo-Bouwman et al., 2014). Prema podacima USDA u blitvi vitamin je prisutan sa 306 µg (provitamin A –uglavnom β -karoten) na 100 g svježe blitve (USDA, 2017). Dnevne potrebe vitamina A (retinola) su 700 µg za žene i 900 µg za muškarce (Harvard Health Publishing, 2020). Uzimajući u obzir nisku bioiskoristivost β -karotena, kao i faktor konverzije (npr. za vrijednost od 2,1), 100 g svježe blitve će zadovoljiti 2,8% DV za vitaminom A kod ženske osobe.

2.6.1.4. Pigmenti u blitvi

Hlorofil i karotenoidi su univerzalni pigmenti koji su prisutni u biljkama jer učestvuju u procesu fotosinteze. Pigmenti su hemijski raznovrsne strukture jedinjenja koje daju boju biljci i koristan indikator stepena zrelosti tokom uzgoja biljne kulture. Obojeno povrće sadrži pigmente poput hlorofila, karotena, antocijana, betalaina. Oni posjeduju biološke aktivnosti poput antioksidativnog dejstva, antimikrobne, antidijabetske, neuroprotektivne aktivnosti (Sharma et al., 2021). Na Slici 2.4 su prikazane strukturne formule pojedinih pigmenta koji su identifikovani u blitvi.



Slika 2.4: Hemijska struktura pojedinih pigmenta koji su nađeni u blitvi (izvor: (Johnson 2016; M. B. Kasiri. and S. Safapour 2015)).

Hlorofil je najzastupljeniji biljni pigment koji biljkama daje zelenu boju i u najvećim količinama se nalazi u lisnatom povrću. Postoje dva glavna oblika hlorofila, hlorofil a (chl a) i hlorofil b (chl b) koji se u voću i povrću nalaze u odnosu 3:1, dajući tipične plavo-zelene (chl a) ili žuto-zelene (chl b) boje. Hlorofil posjeduje antioksidativne osobine, pri čemu se smatra da najveći antioksidativni kapacitet pokazuje u sprečavanju lipidne oksidacije (Lanfer-Marquez et al., 2005). Treba istaći da do sada nije utvrđen mehanizam antioksidativnog djelovanja hlorofila, osim da antioksidativna svojstva ispoljava u lipofilnoj sredini u prisustvu svjetlosti (Perez-Galvez et al., 2020).

Antiproliferativna i antitumorska aktivnost ovog pigmenta mu se pripisuje usled toga što ometa ekspresiju iRNK (informaciona ribonukleinska kiselina) za hem-oksigenazu i aktivnost hem-oksigenaze, što utiče na redoks potencijal sredine (reaktivne kiseonične vrste i promjenjen odnos redukovani/oksidovani glutation) (Vankova et al., 2018). Antimutageno, uz antioksidativno i antitumorsko, dejstvo hlorofila je pripisano njegovom djelovanju preko različitih mehanizama kojima modifikuje genotoksični efekat, povećava sintezu glutation S-transferaze, smanjuje aktivnost enzima citohrom P450 kompleksa i dodatno preko procesa ćelijske diferencijacije i apoptoze ispoljava pomenute biološke aktivnosti (Inanc, 2011; Suparmi et al., 2016). Svježa blitva je bogata ukupnim hlorofilom i sadrži od 33 do 46 mg na 100 g svježe blitve (Ivanovic et al., 2019; Miceli & Miceli, 2014).

Karotenoidi su pigmenti koji povrću daju narandžastu i žutu boju. Ovoj grupi pripada preko 700 jedinjenja, među kojima su u povrću najčeće zastupljeni β -karoten, lutein, zeaksantin i likopen. Karotenoidi imaju važne fiziološke funkcije u organizmu čovjeka koje uglavnom potiču od β -karotena. Karotenoidi kao lipofilna jedinjenja umnogome doprinose u prevenciji bolesti masne jetre koja nije prouzrokovana alkoholom. Takođe smanjuju incidencu hepatocelularnog karcinoma, tako što u hepatocitima uklanjaju slobodne radikale, regulišu lipidni metabolizam modulacijom nekih gena i/ili suzbijanjem onkogenih signala (Elvira-Torales et al., 2019; Cicero & Colletti, 2017). Brojne biološke funkcije potiču od antioksidativnog djelovanja karotenoida. Antioksidativno dejstvo karotenoida potiče od konjugovanih dvostrukih veza, što im omogućava da reaguju sa slobodnim radikalima kako primarnim mehanizmom tako i sekundarnim, tj. indirektnim (preventivnim) mehanizmom (Young & Lowe, 2018). Naročito su efikasni u uklanjanju singletnog kiseonika i peroksidnih radikala iz reakcionog medijuma, kao i u sprečavanju njihovog formiranja (Perez-Galvez et al., 2020; Young & Lowe, 2018).

Bioiskoristivost karotenoida zavisi od njihovog oslobađanja iz matriksa hrane i od procesa koji za krajnji cilj imaju da karotenoide inkorporiraju u micle (procesi poput vezivanja žučnih soli i dejstva probavnih enzima) (Clevidence et al., 2000). Takođe bioiskoristivost karotenoida zavisi i od udjela dijetetskih vlakana kao i od udjela dijetetskih lipida koji se unose zajedno sa karotenoidima (Palafos-Carlos et al., 2011). Lipidi unijeti hranom zajedno sa karotenoidima su važni jer stimulišu izlučivanje žučnih kiselina u lumenu crijeva i posledično formiranje micela, čime povećavaju bioiskoristivost karotenoida (Yao, Tan, and Kim 2022). Sa druge strane dijetetska vlakna smanjuju bioiskoristivost karotenoida bilo na način što ih fizički zarobe u matriksu hrane bilo povećanjem viskoznosti želudačnog soka što ometa peristaltiku, tj. mješanje komponenti hrane čime se umanjuje proces varenja i samim tim i oslobađanje karotenoida iz matriksa hrane. Uz navedeno, dijetetska vlakna mogu indirektno smanjiti bioiskoristivost karotenoida tako što vežu žučne kiseline koje su potrebne za solubilizaciju hidrofobnih molekula (Yao et al., 2022; Palafos-Carlos et al., 2011).

Betalaini su grupa pigmenata rastvorljivih u vodi koji su stabilni na pH opsegu 3-7, sadrže jonizabilne karboksilne grupe i pozitivno naelektrisanje na atomu azota. Ovi pigmenti mogu biti žute, narandžaste, ružičaste (pink), crvene i purpurne boje. Betalaini su dalje podijeljeni u dvije grupe i to na betaksantine (žute, narandžaste) i betacijanine (crvene, ljubičaste) (Rahimi et al., 2019). Za razliku od hlorofila, karotenoida i antocijana ovi pigmenti imaju ograničenu rasprostranjenost. Karakteristično je njihovo prisustvo u porodici Chenopodiaceae, kojoj između ostalih vrsta pripada i blitva. U cvekli, koja je bliska blitvi po sistematizaciji, su nađene najveće količine betalaina, međutim blitva se svrstava u grupu namirnica koja je izuzetno bogata ovim pigmentima (Kugler et al., 2004; Gamba et al., 2020; Ninfali & Angelino, 2013). Naime, u određenim sortama blitve identifikovani su betalaini i to u petolejama i stabljici blitve (Kugler et al., 2004; Ninfali & Angelino, 2013), koji im daju obojenost stabljike i petoleje (Slika 2.5). U obojenoj blitvi je identifikovano 19 betaksantina i 9 betacijanina i pokazano je da ekstrati betalaina iz obojenih sorti blitve imaju potencijal da se koriste kao prirodne boje (Kugler et al., 2004; Kugler et al., 2007). Osim potencijala betalaina da se koriste kao aditivi (prirodne boje), betalaini, zbog jakih antioksidativnih osobina, pokazuju raznovrsne biološke aktivnosti i to: antiinflamatorne,

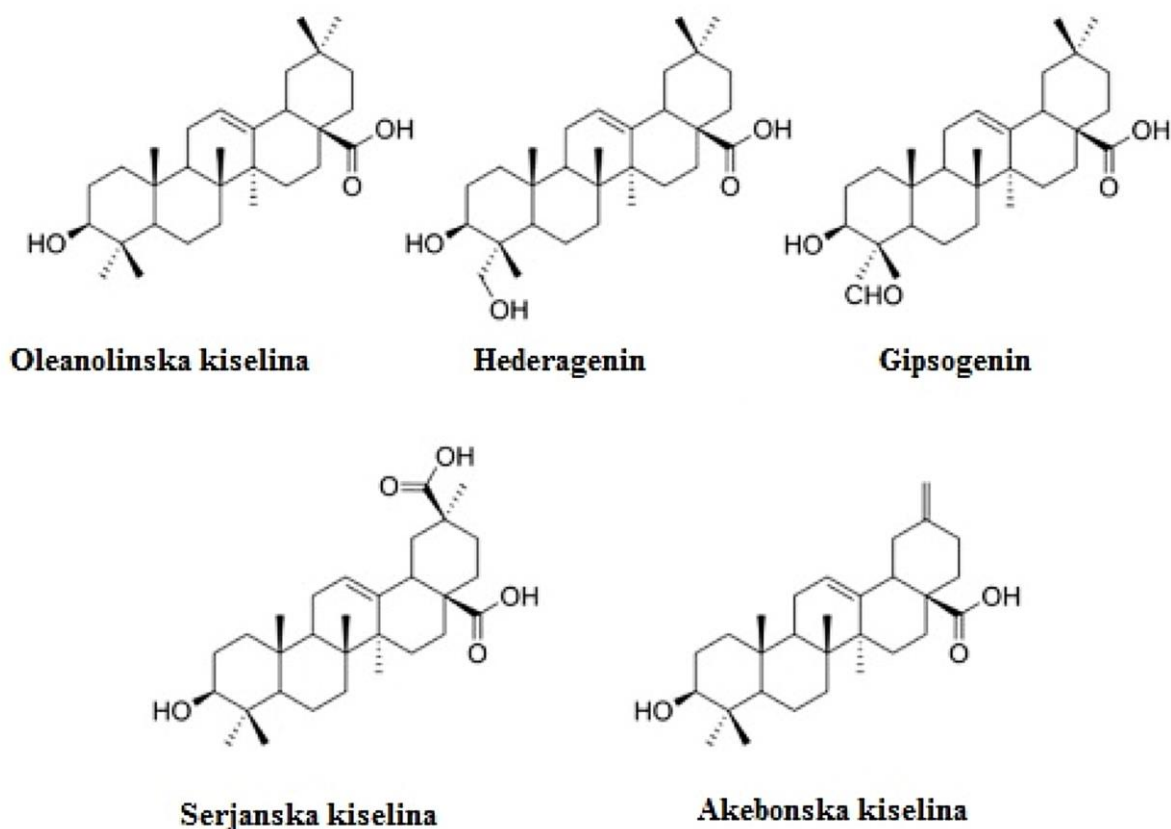
antitumorske, antimikrobne, antimalarične, antidiabeteske, što su značajne osobine za prevenciju, nekada i tretman raznih hroničnih bolesti (Madadi et al., 2020). Sve ove osobine preporučuju hranu bogatu ovim pigmentima kao dio ishrane i na taj način da se umanjuje rizik od razvoja hroničnih bolesti (Rahimi et al., 2019). Pokazano je da betain (jedinjenje iz grupe betalaina), u niskim koncentracijama je učinkovit u inhibiciji lipidne peroksidacije i razgradnje hema. Antioksidativne osobine betalaina potiču od njihove sposobnosti da budu donori elektrona i tako neutrališu slobodne radikale i spriječe njihove štetne učinke, direktnim (primarnim) mehanizmom (Young & Lowe, 2018). Elektron donorske sposobnosti betanina i indikaksantina su potvrđene mjerenjem njihovih redoks potencijala koja su bili 0,4 i 0,6 V, redom (Young & Lowe, 2018). Od strukture betalaina zavisi njihov „afinitet“ prema slobodnim radikalima, tako će na primer betanidin biti najučinkovitiji „protiv“ peroksid radikala i azot oksida. Antioksidativne osobine među jedinjenjima betalaina zavise od pH sredine, tako će betain najveću antioksidativnu sposobnost pokazati na pH vrijednostima iznad 4, dok betanidin najveći antioksidativni kapacitet postiže u pH rasponu od 2 do 4 (Young & Lowe, 2018).



Slika 2.5: Slike različito obojenih stabljika blitve (*B. vulgaris* L. ssp. *cicla* [L.] Alef. cv. Bright Lights) zajedno sa blitvom koja ima stabljike bijele boje (izvor: (Kugler et al., 2004)).

Antocijani su pigmenti koji povrću daju plavu, ljubičastu i crvenu boju, nalaze se u vakuoli biljne ćelije i pripadaju subgrupi flavonoida, tj. grupi polifenolnih jedinjenja. Antocijani pokazuju širok opseg bioloških aktivnosti poput zaštite od izlaganja sunčevoj svjetlosti i UV zracima, zbog njihove jake sposobnosti djelovanja kao skupljači slobodnih radikala, odnosno jakih antioksidativnih osobina, jakih antiinflamatornih i antiapoptičkih efekata (Speer et al., 2020). Studije pokazuju da ishrana bogata namirnicama koje sadrže visoke vrijednosti antocijana (bobičasto voće, šljive, korijenito povrće, legumi) smanjuju rizik za razvoj hroničnih bolesti, poput kancera (Speer et al., 2020; Horbowicz et al., 2008). Sacan i saradnici (Sacan & Yanardag, 2010) su pronašli da je sadržaj ukupnih antocijana blitvinog ekstrakta bio 0,47 $\mu\text{mol/g}$ ekstrakta (Sacan & Yanardag, 2010), međutim u literaturi nije objavljeno više podataka o prisustvu antocijana u blitvi osim već pomenutog, uz to treba istaći i da nije pronađena biljka koja sintetiše i betalaine i antocijane (Gamba et al., 2020).

2.6.1.5. Saponini u blitvi



Slika 2.6: Hemijske strukture aglikona saponina koji su nađeni u listovima blitve (Mroczek et al., 2021).

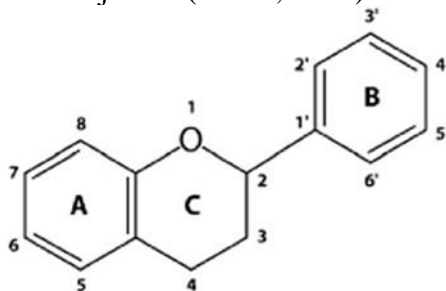
Saponini su grupa jedinjenja koja se sastoji od triterpenoidnog aglikonskog dijela (sapogenin – pentaciklični C₃₀ skelet) i jedne ili više šećernih jedinica (najčešće heksoze, deoksiheksoze, pentoze i uronske kiseline), s tim da umjesto šećernih jedinica mogu sadržati i drugi supstituent (Arslan & Cenzano, 2020). Saponini pokazuju antimikrobne, imunomodulatorne, antiinflamatorne, hepatoprotektivne, antidijabetske efekte i zato su važne komponente koje snižavaju rizik za razvoj hroničnih bolesti kada se konzumira hrana bogata ovom grupom jedinjenja (Singh et al., 2017). Blitva predstavlja vrijedan izvor saponina, među njima su derivati nekoliko različitih aglikona: oleanolinske kiseline, hederagenina, gipsogenina, serjanske kiseline i akebonske kiseline, čije su strukture prikazane na Slici 2.6. U različitim sortama blitve tentativno je nađeno 16 jedinjenja iz grupe saponina, pri čemu su u svim ispitivanim sortama nađeni isti saponini ali u različitim količinama (Mroczek et al., 2021). Među četiri ispitivane sorte blitve nađene su ukupne vrijednosti 16 saponina u opsegu od 125,53-397,09 µg/g suve materije (Mroczek et al., 2021).

2.6.1.6. Polifenoli u blitvi

Polifenoli su grupa jedinjenja koja su uglavnom karakteristična za biljke, i formiraju se kao produkti njenog sekundarnog metabolizma. Najčešće se sintetišu u stresnim uslovima, kada biljku napadne neki patogen, pod nepovoljnim klimatskim ili drugim abiotičkim i biotičkim uslovima (Di Lorenzo et al., 2021). U ovu grupu ubrajamo molekule niske molekulske mase, tj. jednostavne polifenolne strukture (jedna ili više fenolnih jedinica, kakve su fenolne kiseline i flavonoidi), zatim

molekule visoke molekulske mase, tj. polimere poput tanina i proantocijanidina i drugih kompleksnih struktura (Prodanov et al., 2008). Polifenolna jedinjenja, pored drugih komponenti, doprinose senzorskim osobinama voća i povrća (Issa-Issa et al., 2020). Polifenoli se u biljkama nalaze uglavnom u obliku glukozida, a mogu se naći u slobodnoj formi (aglikoni), dok su acetilovani, metilovani i sulfovani oblici takođe zastupljeni (Abbas et al., 2017). Osim konjugata polifenolnih jedinjenja sa malim molekulima, ove komponente mogu biti vezane za komponente ćelijskog zida, npr. lignine, što je čest slučaj sa fenolnim kiselinama (Abotaleb et al., 2020).

Polifenoli broje preko 8000 molekula, pri čemu su flavonoidi i fenolne kiseline najbrojnije grupe (Abbas et al., 2017). Flavonoidnu strukturu u osnovi čini skelet od petnaest ugljenikovih atoma tipa C6-C3-C6, odnosno dva benzenova prstena (A i B sa Slike 2.7) povezana piranskim prstenom (C), formirajući opštu strukturu flavonoida kao što je prikazano na Slici br 2.7 (Dias et al., 2021). Flavonoidi se dalje mogu podijeliti u podgrupe, na osnovu ugljenikovog atoma iz C prstena na kom je povezan B prsten i stepena nezasićenosti i oksidacije C prstena, na: flavone, flavonone, flavonole, izoflavonole, flavanole ili katehine i antocijanine (Karak, 2019).

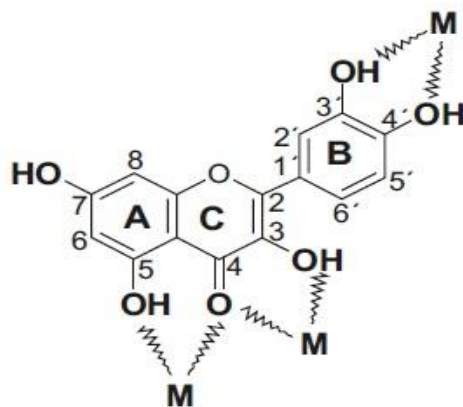


Slika 2.7: Prikaz osnovne strukture flavonoida (izvor Pal & Saha, 2014).

Fenolne kiseline se najčešće u biljkama nalaze u konjugovanom obliku (najdominantnije u obliku estara) sa raznim molekulima poput prostih šećera, organskih kiselina i biljnih polimera. Fenolne kiseline su uglavnom podjeljene u dvije subgrupe: benzoeve (hidroksibenzoeve) kiseline i cimetne (hidroksicimetne) kiseline (Kumar & Goel, 2019).

2.6.1.2.1. Antioksidativne osobine polifenola

Polifenoli su najzastupljenija jedinjenja u ljudskoj ishrani koja posjeduju antioksidativnu aktivnost (Leopoldini et al., 2011). Zbog strukture polifenola, moguć je širok spektar mehanizama kojima ova grupa jedinjenja može da neutrališe slobodne radikale. Polifenoli direktno mogu da neutrališu slobodne radikalske vrste bilo doniranjem atoma vodonika bilo doniranjem elektrona (Olszowy, 2019). Polifenoli mogu da zaustave proces lipidne peroksidacije u inicijalnoj fazi i u fazi propagacije lipidne peroksidacije, mehanizmima primarne neutralizacije doniranjem elektrona. Polifenolna jedinjenja koja imaju fenolnu hidroksilnu grupu, kojom redukuju slobodni radikal doniranjem elektrona, zaustavljaju proces lipidne peroksidacije. Nastali polifenolni radikal je stabilan zahvaljujući aromatičnim strukturama koje su karakteristične za ovu grupu jedinjenja (Fraga et al., 2010). Polifenoli mogu i preventivnim (sekundarnim) mehanizmom da ispolje antioksidativne kapacitete, što pokazuju heliranjem jona metala koji učestvuju kao katalizatori u lipidnoj peroksidaciji (Slika 2.8) (Lawson et al., 2018).



Slika 2.8: Molekulska struktura kvercentina u koordinacionoj vezi sa jonima metala (M) (Lawson et al., 2018).

Brojne epidemiološke studije ukazuju da dugotrajna ishrana namirnicama koje su bogate polifenolnim jedinjenjima smanjuje rizik od razvoja hroničnih bolesti poput kardiovaskularnih, neuroloških, dijabetesa, gojaznosti i drugih (Cory et al., 2018; Abotaleb et al., 2020; Pal & Saha, 2014; Karak, 2019). U voću i povrću se nalaze velike količine jedinjenja iz grupe polifenola, pa se smatraju dobrim izvorom istih (Lima et al., 2014). Uopšteno govoreći apsorpcija i transport brojnih potencijalnih bioaktivnih jedinjenja iz voća i povrća je kompleksna i nije dovoljno istražena, pa je pitanje njihove bioiskorisivosti i bioraspoloživosti na nivou pretpostavki.

Ranije se smatralo da se većina polifenola, budući da su uglavnom konjugovani za šećernu komponentu, zanemarljivo malo apsorbuju u gastrointestinalnom traktu (GIT) u kome ne postoje enzimi koji bi mogli hidrolizovati glikozidne veze, dok oni aglikonski oblici slobodno dospjevaju do krvotoka GIT-a (Manach et al., 2005; Domínguez-Avila et al., 2017). Međutim, ipak je ustanovljeno da glikolizovni flavonoidi, nakon što budu hidrolizovani (npr. β -glukozidazama) i oslobođeni od šećerne komponente, jednim dijelom bivaju apsorbovani i metabolisani u jetri i bubrezima do tzv. flavonoidnih sekundarnih metabolita (Donovan et al., 2007).

Polifenolna jedinjenja imaju malu bioiskorisivost, što je posledica interakcija sa matriksom hrane u kojoj se polifenoli izvorno nalaze i metaboličkih procesa u jetri, tankom i debelom crijevu (Di Lorenzo et al., 2021). Nakon unosa hrane, zavisno od stepena složenosti polifenolnih jedinjenja, obavlja se njihova digestija, s tim da se polifenoli male molekulske mase i dimerne strukture lako apsorbuju u tankom crijevu, dok se složenije strukture polifenola metabolišu tek u debelom crijevu ili se pak ne digestuju uopšte, nego se oslobađaju nepromjenjeni (Di Lorenzo et al., 2021; Fan & Pedersen, 2021). Dio polifenolnih jedinjenja koji se apsorbovao u tankom crijevu, u hepatocitima i enterocitima se transformiše kroz fazu 1 (oksidacija, redukcija i hidroliza) i fazu 2 (konjugacija, tj. povećanje rastvorljivosti) detoksikacionog sistema u rastvorne oblike koji se oslobađaju u cirkulaciju, odakle se dalje ili transportuju do drugih organa ili se izlučuju urinom (Di Lorenzo et al., 2021; Plamada & Vodnar, 2022). Veći dio hranom unesenih polifenolnih jedinjenja, njih 90-95%, se akumuliraju u debelom crijevu zajedno sa konjugatima polifenola dospjelih preko žuči, gdje bivaju metabolisani od strane bakterija crijevne mikroflore i potom apsorbovani i vraćeni u cirkulaciju (Di Lorenzo et al., 2021; Plamada & Vodnar, 2022).

Smatra se da flavonoidni sekundarni metaboliti, koji nastaju bilo nakon apsorpcije u tankom crijevu i dalje transformišu u jetri i bubrezima bilo da su nastali kao niskomolekulski katabolički produkti razlaganja bakterija mikroflore iz debelog crijeva, su odgovorni za antioksidativne osobine koje se pripisuju flavonoidima iz voća i povrća (Del Rio et al., 2010; Denny & Buttriss, 2007; Kroon et al., 2004). Kako je navedeno i ranije u tekstu, na bioiskorisivost i bioraspoloživost polifenola, tako i

flavonoida utiču dijetetska vlakna, na način da smanjuju njihovu bioiskoristivost (Palafos-Carlos et al., 2011).

Polifenoli koje se unose ishranom kao i njihovi metaboliti ponašaju se kao prebiotici i tako održavaju zdravu i stabilnu mikrofloru, koja je prije svega važna za normalno funkcionisanje imunološkog i sistema za varenje (Fan & Pedersen, 2021; Plamada & Vodnar, 2022).

Blitva, poput drugog zelenog povrća ima visok i raznovrstan sadržaj polifenolnih jedinjenja (Astrini et al., 2020; Mzoughi et al., 2019; Gamba et al., 2020; Santos et al., 2014; Ninfali et al., 2007; Ninfali & Angelino, 2013; Pyo et al., 2004). Ukupni sadržaj polifenola je ispitivan u svim dijelovima blitve, i najveća vrijednost je zabilježena u sjemenu blitve od 246,77 mg GAE, tj. ekvivalenta galne kiseline/100 g suve mase (Gennari et al., 2011) a u listovima blitve vrijednost 96,6 mg GAE/100g SM (Mzoughi et al., 2019). U listovima i stabljikama blitve je zabilježeno 157,8 mg GAE/100g svježe blitve, dok u je listovima registrovano 128,1 mg GAE/100g SB u sorti blitve CXS 2550 (crvena) (Pyo et al., 2004). Publikovani individualni sastav polifenolnih jedinjenja u blitvi prikazan je u Tabeli 2.2, iz koje se vidi da su u blitvi uglavnom prisutni polifenoli iz grupe fenolnih kiselina i iz flavonoidne podgrupe- flavanoli i flavoni.

Tabela 2.2 Prikaz polifenolnih jedinjenja koji su identifikovani u blitvi u dosadašnjoj literaturi

Polifenolno jedinjenje	Količina/jedinica mjere	Referenca
Benzoeve kiseline		
Galna kiselina	1,2-3,7 mg/100g SB (u listu i stabljici)	(Pyo et al., 2004)
Protokatehuinska kiselina	0,3-5,4 mg/100g SB (u listu i stabljici)	(Pyo et al., 2004)
<i>p</i> -hidroksi-benzoeva kiselina	1,9-4,7 mg/100g SB (u listu i stabljici)	(Pyo et al., 2004)
Vanilinska kiselina	0,9-5,4 mg/100g SB (u listu i stabljici)	(Pyo et al., 2004)
Siringinska kiselina; Derivati* siringinske kiseline	1,5-44,9 mg/100g SB (u listu i stabljici); 6,9 mg/100g SM	(Pyo et al., 2004); (Santos et al., 2014)
Cimetne kiseline		
Derivati* sinapinske kiseline	6,7 mg/100 g SM	(Santos et al., 2014)
Rozmarinska kiselina	102,0 mg/100g ekstrakta	(Mzoughi et al., 2019)
Hlorogenska kiselina	0,8-7,7 mg/100g SB (u listu i stabljici)	(Pyo et al., 2004)
Kofeinska kiselina; Derivat* kofeinske kiseline 1 Derivat* kofeinske kiseline 2	0,2-14,8 mg/100g SB (u listu i stabljici); 5,4 mg/100g SM; 2,0 mg/100g SM	(Pyo et al., 2004); (Santos et al., 2014)
<i>p</i> -kumarna kiselina; Derivati* <i>p</i> -kumarne kiseline; <i>p</i> -kumarna kiselina	3,7-10,4 mg/100g SB (u listu i stabljici); 0,7 mg/100g SM; 353 mg/100 g ekstrakta	(Pyo et al., 2004); (Santos et al., 2014); (Mzoughi et al., 2019)
Ferulinska kiselina	3,4-10,8 mg/100g SB (u listu i stabljici)	(Pyo et al., 2004)
Flavanoli		
Miricetin	0,1-3,1 mg/100g SB (u listu i stabljici)	(Pyo et al., 2004)

Polifenolno jedinjenje	Količina/jedinica mjere	Referenca
Flavanoli		
Kvercetin; Kvercetin-pentozilheksosid; Kvercetin-3-feruloilsoforozid; Derivat* kvercetina	0,3-7,5 mg/100g SB (u listu i stabljici); 26,1 mg/100g SM; 21,2 mg/100g SM; 17,1 mg/100g SM	(Pyo et al., 2004); (Santos et al., 2014)
Kempferol	0,5-9,2 mg/100g SB (u listu i stabljici)	(Pyo et al., 2004)
Rutin	List blitve (nema podataka o količini)	(Ninfali et al., 2007)
Izoramnetin-diglukozid	268,0 mg/100g SM (list)	(Santos et al., 2014)
Izoramnetin-3-pentazid-7-glukozid	130,0 mg/100g SM (list)	(Santos et al., 2014)
Izoramnetin-3-kafeoil-7-ramnozid	21,7 mg/100g SM (list)	(Santos et al., 2014)
Flavoni		
Apigenin-2"- <i>O</i> -pentoksid-8- <i>C</i> -heksozid (Viteksin-2- <i>O</i> -ksilozid)	425,8 mg/100g SM (list)	(Santos et al., 2014)
Apigenin-8- <i>C</i> -glukozid-2'-ramnozid (Viteksin-2- <i>O</i> -ramnosid)	Sjeme i list blitve (nije kvantifikovano)	(Ninfali et al., 2007; Gennari et al., 2011)
Apigenin acetilapiozilglukozid	88,8 mg/100g SM (list)	(Santos et al., 2014)
Apigenin malonilapiozilglukozid (Viteksin-6"- <i>O</i> -malonil-2"- <i>O</i> -ksilozid)	652,6 mg/100g SM (list)	(Santos et al., 2014)
Derivat* apigenina 1; Derivat* apigenina 2	47,6 mg/100g SM; 21,9 mg/100g SM (list)	(Santos et al., 2014)

*derivat(i) polifenolnih jedinjenja- neidentifikovani konjugati određenog polifenolnog jedinjenja;

2.7. Funkcionalna hrana

Funkcionalna hrana je ona hrana koja, osim što zadovoljava osnovne nutritivne funkcije, sadrži dodatne komponente koje imaju pozitivne fiziološke efekte na zdravlje ljudi. Koncept funkcionalne hrane osnovan je u Japanu, 1988. godine kada je Vlada te zemlje pokrenula projekat gdje se ispitalo kako pomoću hrane koja ima pozitivna dejstva na zdravlje smanjiti troškove liječenja. Kasnije je Ministarstvo zdravlja, rada i socijalnog staranja Vlade Japana usvojilo regulativu o funkcionalnoj hrani takozvana FOSHU (Iwatani & Yamamoto, 2019). Evropske, američke i japanske tvrdnje o zdravstvenim učincima funkcionalne hrane jesu djelimično slične prirode, ali su procedure odobravanja i upotrebe kao i regulatorni okviri različiti (Dominguez Diaz et al., 2020). Regulative koje se tiču funkcionalne hrane u svijetu se razlikuju od države do države, mada ide se ka fleksibilnijim kriterijumima u smislu tvrdnji o učinku na zdravlje, protokola kliničkih studija i traženih rezultata (Iwatani & Yamamoto, 2019).

Određene namirnice koje posjeduju jednu ili više bioaktivnih komponenti, za koje je naučnim ispitivanjima utvrđeno da posjeduju pozitivne efekte na fiziološke ili biohemijske procese u organizmu i to u koncentracijama u kojima su prisutne u namirnici, smatraju se funkcionalnom hranom. Biološke komponente iz funkcionalne hrane posjeduju jednu ili više sledećih bioloških

osobina: antioksidativna svojstva, antimikrobnu aktivnost, antitumorsku aktivnost, antidijabetsku aktivnost, antihipertenzivnost, neuroprotektivnost, hipoholesteričnu aktivnost, antiartritičnost, imunomodulatornu i aktivnost djelovanja na metabolizam hormona (Soumya et al., 2021). Sledeće bioaktivne komponente daju hrani funkcionalne osobine:

- funkcionalni ugljeni hidrati: rezistentni skrob, nedigestibilni oligosaharidi (npr. inulin, frukto-oligosaharidi), druga dijetetska vlakna (Yegin et al., 2020);
- lipidni molekuli: ω -3 masne kiseline, konjugovana linolna kiselina, karotenoidi (npr. likopen), biljni steroli (Ruiz et al., 2017; Giampieri & Battino, 2020; Jones & Abumweis, 2009);
- mikronutrijenti: vitamini i makro- i mikroelementi (Giampieri & Battino, 2020);
- fitohemikalije koje su produkti sekundarnog metabolizma biljaka- polifenolna jedinjenja, glukozinolati (sulforafan), betalaini itd. (Galanakis, 2021);
- živi mikroorganizmi (probiotici) (Syngai et al., 2016).

Funkcionalna hrana ima značajnu ulogu u održavanju zdravog stila života i prevenciji brojnih hroničnih bolesti, posebno raka, kardiovaskularnih bolesti, poremećaja gastrointestinalnog trakta, gojaznosti i neuroloških bolesti (Essa et al., 2021). Brojni prirodni proizvodi biljnog i životinjskog porijekla imaju komponente koje ih čine potencijalnom funkcionalnom hranom. Povrće, posebno GLVs je hrana koja ima potencijal funkcionalne hrane. Prednost prirodnih proizvoda koji imaju potencijal funkcionalne hrane, u odnosu na proizvode koji se dobijaju preradom prirodnih sirovina je što se komponente koje imaju povoljne biološke aktivnosti ne mogu narušiti tokom prerade. Voće i povrće, žitarice i slični proizvodi biljnog porijekla mogu se adekvatnim uslovima gajenja biljnih kultura poboljšati u smislu njihovog funkcionalnog potencijala.

2.8. Funkcionalne osobine blitve

Među funkcionalnim osobinama koje blitva posjeduje, antioksidativnost, antiinflamatornost, anti dijabetičnost i antiproliferativnost su najvažnije u prevenciji hroničnih bolesti. Komponente koje se nalaze u blitvi, nutrijenti i fitonutrijenti, posjeduju gore navedene biološke aktivnosti i odgovorne su za funkcionalne osobine blitve.

2.8.1. Antioksidativna aktivnost

2.8.1.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali su atomi, molekuli ili joni koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona što ih čini veoma nestabilnim i reaktivnim vrstama. Reaktivne radikalske vrste svakodnevno nastaju u ćeliji u fiziološkim i u patološkim stanjima. U fiziološkim stanjima nastaju: tokom procesa oksidativne fosforilacije, dejstvom enzima ksantin-oksidade, u peroksizomima, tokom fagocitoze, u sintezi arahidonata, tokom apoptoze, u aktivaciji nekoliko transkripcionih faktora, diferencijaciji ćelije (Phaniendra et al., 2015; Weidinger & Kozlov, 2015; Zukowski et al., 2018). U patološkim stanjima reaktivne vrste nastaju u zapaljenskim reakcijama, ishemijskim procesima, u povrjeđenom tkivu itd. (Poprac et al., 2017; Pizzino et al., 2017; Phaniendra et al., 2015). Osim ovih tzv. unutarćelijskih generatora, slobodni radikali mogu nastati usled dejstva spoljašnjih faktora kao što su dim iz cigarete, zagađivači životne sredine, zračenje, pesticidi, ozon, industrijski rastvarači, metali itd. (Phaniendra et al., 2015; Chen et al., 2020).

Slobodne radikale, koji najčešće nastaju u organizmu, možemo podijeliti u reaktivne kiseonične vrste i reaktivne azotne vrste. Superoksid anjon (O_2°), hidroksil radikal (OH°), vodonik peroksid (H_2O_2) (koji ne sadrži nesporeni elektron, ali se ubraja u slobodne radikale) kao i drugi organski peroksidi, su pripadnici ove grupe.

Najvažniji RNS predstavnici su azot oksid (NO, takođe nema nesporeni elektron), azot oksid radikal (NO°), azot dioksid radikal (NO_2°), peroksinitit ($ONOO^{\circ}$) koji nastaje u reakciji azot oksida i superoksid anjona kao i drugi oksidi azota i produkti koji nastaju kada azot oksid (NO) reaguje sa peroksil radikalom (RO°) i alkosil radikalom (ROO°) (Weidinger & Kozlov, 2015; Lawson et al.,

2018; Sharma, 2014). ROS i RNS reaguju sa drugim molekulima, pokreću lančanu reakciju čija propagacija ometa normalne ćelijske procese što dovodi do oštećenja ćelije (Sharma, 2014; Lawson et al., 2018).

Štetnost slobodnih radikala se ispoljava u njihovoj mogućnosti da kao vrlo reaktivne vrste mogu da reaguju sa ključnim ćelijskim biomolekulima- DNK, proteinima i lipidima. Ciljna mjesta za reakciju reaktivnih vrsta sa DNK molekulom su heterociklične baze i šećerni skelet DNK molekula (Dizdaroglu & Jaruga, 2012). U reakciji, npr. hidrosilnog radikala sa molekulom DNK dolazi do strukturnih promjena nukleotida ili do promjene broja nukleotida (delecija i adicija) što dovodi do mutacije koja pak može dovesti do razvića kancera (Lobo et al., 2010; Dizdaroglu & Jaruga, 2012). Reakcija proteina sa slobodnim radikalima dovodi do disfunkcije enzima, transportnih proteina i receptora usled reakcije reaktivnih vrsta sa R ostacima amino kiselina, koje su važne za biološku aktivnost proteina (Lobo et al., 2010; Pizzino et al., 2017; Hybertson et al., 2011). Što se tiče lipida i njihove izloženosti, reaktivne vrste poput hidroksi radikala, peroksi nitrita, perhidroksil radikala reaguju sa masnim kiselinama iz lipida ćelijske membrane i formiraju lipidni radikal (L^\bullet). Ovaj radikal sa kiseonikom daje lipid peroksil radikal (LOO^\bullet), koji reaguje sa vodonikom iz susjedne masne kiseline i formira se lipid hidroperoksid (LOOH). LOOH se lako razlaže na lipid alkoksil radikal (LO^\bullet) i uspostavlja se propagaciona reakcija koja dalje oštećuje važne molekule. Na ovaj način dolazi do razgradnje lipida, ćelijska membrana se dezintegriše i narušava ćelijska homeostaza (Recknagel et al., 2020; Weidinger & Kozlov, 2015).

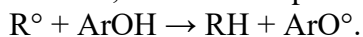
Dugotrajna izloženost reaktivnim radikalskim vrstama dovodi do narušavanja ravnoteže između stvaranja slobodnih radikala i antioksidativne odbrane ćelije, što dovodi do stanja označenog kao oksidativni stres. Oksidativni stres se povezuje sa hroničnim bolestima, poput kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, neurodegenerativnih poremećaja (Alchajmerova bolest i Parkinsonova bolest), inflamatornih procesa, kancera i procesa starenja (Hybertson et al., 2011; Liguori et al., 2018).

2.8.1.2. Antioksidansi

Mehanizam kojim ćelija kontroliše nivo reaktivnih vrsta (ROS, RNS) uključuje molekulske vrste koje su poznate kao antioksidansi. Antioksidativna svojstva posjeduje svako jedinjenje koje može da neutrališe slobodne radikale i tako zaustavi lančanu reakciju prije nego dođe do oštećenja vitalnih makromolekula (Oroian & Escriche, 2015; Brewer, 2011). Mehanizmi kojima antioksidansi neutrališu slobodne radikalske vrste su raznoliki i mogu se podijeliti u tri vrste (Lobo et al., 2010; Bouayed & Bohn 2010; Lu et al. 2010):

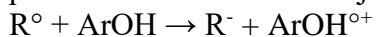
Primarni mehanizam ili direktno zaustavljanje slobodnih radikala, kada dolazi do raskidanja i stvaranja hemijskih veza između antioksidansa i reaktivne vrste.

-Antioksidans može da se ponaša kao donor atoma vodonika, koji služi za neutralizaciju slobodnog radikala, što možemo predstaviti reakcijom:



Antioksidativna sposobnost molekula u ovom slučaju zavisi od energije disocijacije O-H veze, antioksidans je jači što je veza slabija.

-Antioksidans može da bude donor elektrona i sam postane radikalski katjon, što možemo predstaviti sledećom reakcijom:



U ovom slučaju, jačina antioksidansa zavisi od jonizacionog potencijala, što je niži jonizacioni potencijal lakše se elektron oslobađa (Hwang & Lamb, 2012; Lu et al., 2010).

Sekundarni mehanizam ili preventivni (indirektni) mehanizam, kada antioksidansi uklanjaju već nastale radikale (tzv. „skevindžeri“-sakupljači) djelujući na neki od sledećih načina: donori elektrona, inhibitori pojedinih enzima, helatori radikalskih vrsta (sekvestori), razlagači lipidnih peroksida nastalih u lipidnoj peroksidaciji (Bendary et al., 2013; Pisoschi & Pop, 2015; Hwang & Lamb, 2012; Lü et al., 2010).

Tercijarni mehanizam ili multifunkcionalni mehanizam je kombinacija predhodna dva mehanizma i najmoćniji antioksidansi pripadaju ovoj kategoriji zato što na više načina mogu da spriječe štetno dejstvo reaktivnih vrsta (Lu et al., 2010).

2.8.1.3. Antioksidativne osobine blitve

Antioksidativne osobine blitve potiču od antioksidacionog potencijala njenih komponenti koje imaju sposobnost da primarnim, sekundarnim ili tercijarnim mehanizmom neutrališu slobodne radikale (Ninfali & Angelino, 2013; Sacan & Yanardag, 2010; Pyo et al., 2004; Ivanovic et al., 2021). Antioksidativni potencijal ekstrakta blitve može se odrediti *in vitro* antioksidativnim testovima koji se uglavnom zasnivaju na neutralizaciji slobodnih radikala, poput najčešće korišćenih DPPH, ABTS i hidroksil radikala.

Mjerenjem DPPH aktivnosti 100 µg/ml vodenog ekstrakta blitve i dva vještačka antioksidansa-BHT i BHA, pokazana je sledeća aktivnost: 81,6 47,5 i 81,6%, redom nabrojano (Sacan & Yanardag, 2010). DPPH aktivnost BHA je bliska ekstraktu blitve, dok je BHT pokazao slabiji sakupljački potencijal prema DPPH radikal.

Vodeni ekstrakt blitve je slabije neutralisao ABTS radikal, bilo je potrebno 1093,14 µg/ml ekstrakta blitve da neutrališe 50% ABTS radikala (IC₅₀ inhibitorna koncentracija, tj. koncentracija kojom se neutrališe 50% slobodnog radikala), dok je poređenja radi, rutin to postigao sa oko deset puta nižom koncentracijom (113,70 µg/ml) (Sacan & Yanardag, 2010).

Skupljačka aktivnost vodenog ekstrakta blitve prema hidroksilnom radikal, jednom od najreaktivnih iz ROS grupe, izražena preko IC₅₀ vrijednosti je 157,94 µg/ml (Sacan & Yanardag, 2010). Ekstrakt blitve ima sličnu aktivnost prema hidroksilnom radikal kao L-skorbinska kiselina (IC₅₀=116,04 µg/ml), kao i nižu u odnosu na Trolox (IC₅₀=46,76 µg/ml) i u odnosu na BHA (IC₅₀=51,54 µg/ml) (Sacan & Yanardag, 2010).

Statističkom analizom rezultata antioksidativnih testova (hidroksil, DPPH i ABTS testovi), kojima je mjerena aktivnost ekstrakta blitve nađena je visoka koreacija sa ukupnim sadržajem polifenola (korelacioni koeficijent > 0,9) (Sacan & Yanardag, 2010; Pyo et al., 2004), što može ukazivati da veliki dio antioksidativne aktivnosti u pomenutim testovima potiče od polifenolnih jedinjenja.

2.8.2. Antiinflamatorna svojstva

U sjemenu blitve su identifikovani polifenolni amidi (*N-cis*-feruloil 3-*O*-metildopamin, *N-cis*-feruloil tiramin, *N-trans*-feruloil 3-*O*-metildopamin i *N-trans*-feruloil tiramin) koji su u *in vitro* uslovima pokazali da inhibiraju proizvodnju azot oksida u makrofagima (koji su aktivirani lipopolisaharidima) eksperimentalnih životinja (Kim et al., 2003; Gennari et al., 2011). Koncentracije fenolnih amida iz sjemena blitve, koje su inhibirale 50% aktivnosti azot oksid sintaze, bile su u opsegu od 13 do 18 µM (Gennari et al., 2011). Zbog inhibitornih svojstava fenolnih amida ova jedinjenja su predložena za razvoj novih lijekova sa antiinflamatornim efektom.

Betanin, iz grupe betalaina, koji se može naći u nekim sortama blitve (u onim koje imaju obojene petoleje i stabljikama) pokazuje antiinflamatornu aktivnost, kroz inhibiciju aktivnosti enzima ciklooksigenaze (Gennari et al., 2011). Ciklooksigenaza je jedan od ključnih enzima u procesu inflamacije, jer katalizuje formiranje medijatora zapaljenja, tj. prostaglandina, iz arahidonske kiseline. Naime, čitava grupa betalaina je značajna u pogledu njihovih antiinflamatornih svojstava (Moreno-Ley et al., 2021) i daju povoda za istraživanja mehanizama kojima smanjuju zapaljenske procese.

2.8.3. Antidijabetska aktivnost

Dijabetes je metabolička bolest koja je posljednjih godina poprimila razmjere epidemije i koja se karakteriše nemogućnošću održanja normalnog nivoa glukoze u krvi (Tao et al., 2015). To je hronična sistemska bolest koja oštećuje pluća, bubrege, srce, krvne sudove, oči i druge organe usled poremećene glikemije i propratne inflamacije (Daryabor et al., 2020). U cilju kontrole ove bolesti poželjno je imati proizvode koji će spriječiti ili odložiti apsorpciju glukoze iz hrane. U ovu svrhu dijabetičari u Turskoj koriste blitvu kao alternativni način kojim žele postići smanjenje nivoa glukoze u krvi (Gezginci-Oktayoglu et al., 2014).

Hipoglikemijski efekat ekstrakta blitve na dijabetičnim pacovima je utvrđen u eksperimentu Bolkent i saradnika (BolKent et al., 2000). Ovaj efekat je dao osnova za dalje ispitivanje i utvrđivanje hipoglikemijske aktivnosti ekstrakta blitve. Nađeno je da ekstrakt blitve pokazuje inhibitorni efekat na enzimsku aktivnost α -glukozidaze i α -amilaze (Mzoughi et al., 2019), enzima kojima se odlaže digestija i apsorpcija ugljenih hidrata. Etanolni ekstrakt listova blitve je u IC_{50} koncentracijama od 0,13 mg/mL za α -glukozidazu, odnosno 1,03 mg/mL za α -amilazu, inhibirao aktivnost ovih enzima (Mzoughi et al., 2019). Mehanizam kao i koje komponente su odgovorne za inhibiciju ova dva enzima, nije utvrđen. Pretpostavlja se da bi saponini mogli doprinijeti ovakvom efektu, budući da je poznato da djeluju inhibitorno na procese glukoneogeneze i glikogenolize (Shehadeh et al., 2021). Kvercetin takođe ispoljava antidijabetsku aktivnost tako što učestvuje u brojnim procesima kontrole nivoa šećera u krvi, poput inhibicije apsorpcije glukoze kroz enterocite (inhibicijom GLUT2 glukoznog transportera), uticaja na sekreciju i senzibilizaciju insulina, kao i uticaja na poboljšanu iskorišćenost glukoze u perifernim tkivima (Haddad & Eid, 2016; Gezginci-Oktayoglu et al., 2014). Takođe druga jedinjenja iz grupe polifenola, poput jedinjenja iz grupe C-glikozil flavona, koja su pronađena u listovima i sjemenu blitve, snažno inhibiraju aktivnost α -glukozidaze (Li et al., 2009) i mogu biti odgovorni za snažan hipoglikemijski efekat koji je zabilježen kod dijabetičkih pacova.

2.8.4. Antiproliferativna (antitumorska) aktivnost

Prema podacima WHO kancer je vodeći uzrok smrtnosti među ljudskom populacijom, na svakih 6 umrlih, jedan je od kancera. Najčešći kanceri su kancer dojke, pluća, kancer kolona i rektuma i prostate (World Health Organisation, 2022).

Antiproliferativna aktivnost ekstrakta blitve pokazana je u *in vitro* ekperimentima na komercijalnim kancer ćelijama (Ivanovic et al., 2021; Ninfali et al., 2007). Komponente blitve sa antiproliferativnom aktivnošću pripadaju grupi jedinjenja polifenola i betalaina (Brewer, 2011; Lima et al., 2014; Bendary et al., 2013; Rahimi et al., 2019).

Betalaini, kako je navedeno mogu se naći u nekim sortama blitve, dok su više zastupljeni u drugim vrstama iz porodice Chenopodiaceae, poput cvekle. Jedan mehanizam koji objašnjava antitumorsko dejstvo betalaina je ometanje razmjene metabolita između ćelija kancera (koje su izrazito metabolički aktivne ćelije) i okolnih tkiva, i posledično umanjivanje njihove sposobnosti infiltracije (Reddy et al., 2005; Kapadia et al., 2003).

Ključni polifenoli koji su pronađeni u lišću i sjemenu blitve sa antitumorskim svojstvima su viteksin, viteksin-2"-O-ksilozid (VOX) i viteksin-2"-O-ramnozid (VOR) (Ninfali et al., 2007; Gennari et al., 2011). Ova jedinjenja pripadaju flavonoidnoj subgrupi flavona i zapravo su glikolizovani derivati apigenina, koji je jedan od najispitivanih polifenola zbog antitumorskih efekata (Salmani et al., 2017; Abdelhady & Motaal, 2016). Apigenin indukuje apoptozu u humanim ćelijskim linijama melanoma A375 i C8161 stimulacijom signalnih puteva koji aktiviraju apoptozu (Zhao et al., 2017). Cijepanje PARP proteina se smatra centralnim indikatorom apoptoze, i za njegovo cijepanje je zadužena efektorska kaspaza 3, koju aktivira apigenin (Zhao et al., 2017). Takođe, na istim humanim ćelijama melanoma, je pokazano da apigenin inhibira ERK fosforilizaciju (ekstracelularna signal regulisana kinaza) koja je jedna od uvodnih kinaza u brojnim procesima ćelijskog razvoja pa i proliferacije i AKT/mTOR signalni put koji su anti-apoptoski

signalni putevi (Zhao et al., 2017). Sa ovim u vezi, slično je nađeno da u humanim tumorskim ćelijama debelog crijeva HCT116, apigenin inhibira neke signalne puteve koji regulišu prelazak ćelije iz postsintetičke G2 faze u M fazu ćelijskog ciklusa (Lee et al., 2014). Na ćelijskim linijama humanog melanoma SK-MEL-24, je pokazano da u *in vitro* uslovima apigenin ima antiproliferativno dejstvo. Pri dozama od 30 μM , odnosno 60 μM , pokazuje značajni citotoksični odnosno antimigracioni potencijal (Ghiu et al., 2021). Zabilježena su slična antitumorska dejstva apigenina, poput zaustavljanja proliferacije i indukcije apoptoze, na humanim melanoma ćelijskim linijama A375 u *in vitro* eksperimentalnim uslovima (Ghiđu et al., 2019). Apigenin je inhibirao rast humanih ćelijskih linija tumora bubrega ACHN, 786-0 i Caki-1, gdje je na ovim ćelijama indukovao DNK oštećenja, zaustavljanje G2/M ćelijskog ciklusa, akumulaciju tumorskog antigena p53 i apoptozu (Meng et al., 2017). Rast ćelijskih linija kancera prostate i dojke, DU-145 i MDA-MB-231 je takođe bio zaustavljen dodatkom apigenina, na način da se apigenin vezao preko ER β (Estrogenski receptor subtip β) receptora (Mak et al., 2006).

Viteksin-2-O''-ksilozid i viteksin-2-O''-ramnozid su glikolizovani derivati apigenina, i kao takvi su pokazali antiproliferativne efekte na ispitivanim tumorskim ćelijskim linijama u *in vitro* uslovima (Scarpa et al., 2018; Ninfali et al., 2007).

Apigenin, kako je navedeno, u *in vitro* studijama pokazuje ohrabrujuće aktivnosti poput antiproliferativnih i proapoptotskih, na raznim humanim tumorskim ćelijskim linijama, koje su obećavajuće u korišćenju apigenina u preventivne i terapijske svrhe. Međutim veliki je jaz između efekata apigenina koji su uočeni u *in vitro* studijama i ostvarivanje njegovih efekata u praksi, tj. u liječenju ili prevenciji kancera, prije svega zbog njegove male bioiskoristivosti kod ljudi (Madunic et al., 2018).

2.9. Antinutritivne komponente blitve

Komponente koje se nalaze u hrani, a u ljudskom organizmu dovode do smanjenja bioiskoristivosti nutrienata ili pak same djeluju štetno po zdravlje (direktno ili indirektno) su označene kao antinutritivne komponente. Naime, listovi blitve sadrže nitrate i oksalate koji su označeni kao antinutritivne komponente (Bavec et al., 2010; Guil et al., 1997). Biljke uglavnom nitrate koriste kao izvor azota (Ranasinghe & Marapana, 2018). Glavni izvor nitrata u ishrani čovjeka je povrće (oko 80%) (Hord et al., 2009), posebno lisnato zeleno povrće (Ranasinghe & Marapana, 2018). Brojni faktori utiču na akumulaciju nitrata u povrću, poput: vrste povrća, sastava zemljišta, inteziteta svjetlosti, temperature, vlažnosti vazduha, gustine rasta, trajanja perioda rasta, vremena berbe, vremena skladištenja i upotreba azotnih đubriva. Od pomenutih faktora najveći uticaj imaju azotno đubrenje i intenzitet svjetlosti (Correia et al., 2010; Gruda, 2005).

Nitrati pokazuju relativno malu toksičnost, međutim oko 25% nitrata unesenih ishranom se redukuje do nitrita u pljuvački dejstvom oralne mikroflore (Kanady et al., 2012). Nitriti su veoma toksični, dovode do stanja methemoglobinemije (stanje povećanog sadržaja methemoglobina u krvi), a posebno visoku toksičnost ostvaruju u reakciji sa biogenim aminima jer formiraju dokazane kancerogene supstance-nitrozamine (Loh et al., 2011). Prema klasifikaciji povrća na osnovu sadržaja nitrata u svježem uzorku izraženih u mg/kg, blitva spada u povrće koje ima veoma visok sadržaj nitrata (≥ 2500) (Santamaria, 2006). Evropskom Regulativom broj 1258/2011, koja govori o maksimalnoj dozvoljenoj količini nitrata u pojedinom zelenom lisnatom povrću (spanać, zelena salata, rukola), su postavljene sledeće granične vrijednosti: 3500 mg nitrata /kg svježeg spanaća (za zamrznuti spanać do 2000 mg/kg), za zelenu salatu (vrijednosti su od 3000 do 5000 mg/kg svježeg uzorka, zavisno od vremena žetve) (EU Regulative 1258/2011). Zbog toksičnosti, WHO je odredila prihvatljivi dnevni unos (ADI) za nitrate koji iznosi 3,7 mg/kg tjelesne težine, za nitrite 0,06 mg/kg ili 222 mg/dan za odraslu osobu od 60 kg tjelesne težine, koji je potvrdila i EFSA (Keller et al., 2020). Sadržaj nitrata u listovima zelenog povrća se može smanjiti tako što se listovi zelenog lisnatog povrća prvo prokuvaju u vodi a zatim u 5% rastvoru natrijum-hlorida (Afiomah & Iwuozor, 2020).

Posljednjih godina brojna istraživanja o prevenciji kardiovaskularnih bolesti su dovela do saznanja da nitrati imaju i pozitivne efekte na zdravlje ljudi (Hordet al., 2009; Ranasinghe, 2018). Naime, nitriti, koji su nastali od hranom unesenih nitrata, u usnoj duplji, dijelom se redukuju do azot oksida (NO), dejstvom bakterija iz usne duplje i gastrointestinalnog trakta (Kanady et al., 2012; Hord et al., 2009; Ranasinghe & Marapana, 2018). NO je važan signalni molekul u organizmu čovjeka, koji dovodi do vazodilatacije krvnih sudova i tako snižava krvni pritisak (Habermeyer et al., 2015; Hord et al., 2009). Osim toga, smatra se da NO koji nastaje u organizmu nakon unosa hrane koja sadrži nitrata, u gastrointestinalnom traktu inhibira rast patogenih bakterija i tako doprinosi stabilnosti mikrobne flore (Santamaria, 2006). Takođe, neke studije upućuju na to da vitamin C i polifenolna jedinjenja iz voća i povrća, olakšavaju neenzimsku redukciju nitrata do NO i na taj način smanjuju dostupnost nitrata, i mogućnost da preko nitrita formiraju kancerogene nitrozamine (Rocha et al., 2009; Erkekoglu & Baydar, 2010).

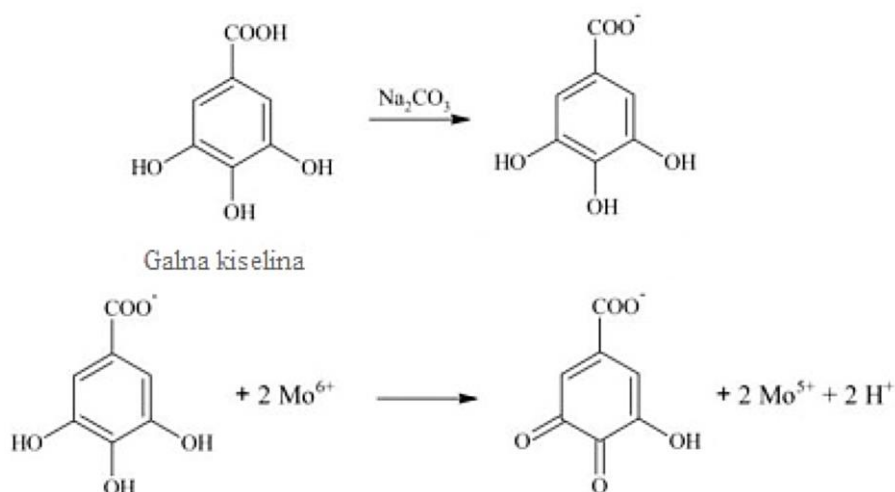
Oksalati su antinutrijenti zato što vezuju neke mikronutrijente i tako sprečavaju njihovu bioiskoristivost. Dodatno, ishrana koja sadrži povećan unos oksalata se povezuje sa pojavom kamena u bubregu (koji je najčešće kalcijum oksalat) (Natesh et al., 2017; Mercola, 2019). Međutim, koncentracija oksalata u mladim listovima blitve je niska, za razliku od starijih listova blitve koji sadrže nepoželjne koncentracije oksalata (Simpson et al., 2009).

2.10. Analitičke metode u hemiji hrane

2.10.1. Spektrofotometrijske metode za određivanje ukupnih fenola, flavonoida i antioksidativnog kapaciteta

2.10.1.1. Određivanje ukupnih fenola

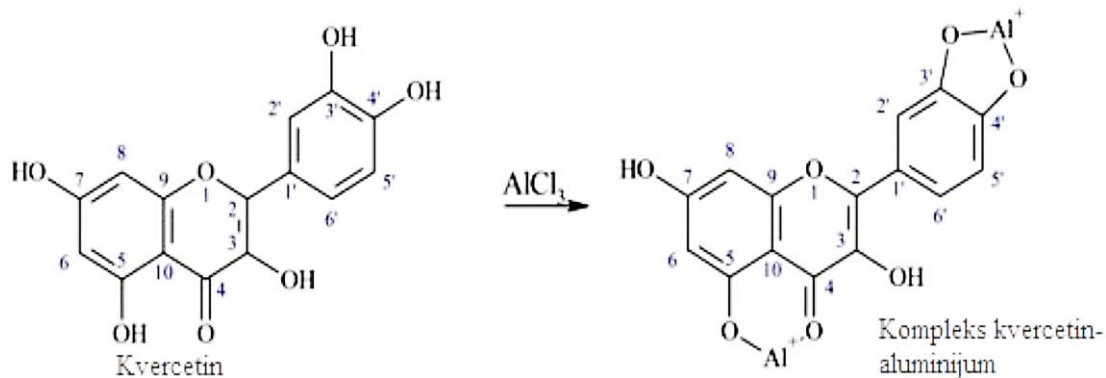
Sadržaj ukupnih polifenola se uobičajeno određuje Folin–Ciocalteu (FC) metodom. Široko se primjenjuje u ispitivanjima ekstrakta voća i povrća. Metoda se zasniva na reakcijama oksido-redukcije FC reagensa i polifenola u baznoj sredini, kao što je ilustrovano na Slici 2.9. Folin–Ciocalteu reagens je žute boje i sastoji se od smješe fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline. FC reagens oksiduje polifenole, u baznoj sredini pri čemu se molibden (VI) redukuje u molibden (V) i nastaje stabilni plavo-ljubičasti kompleks, koji se potom spektrofotometrijski može izmjeriti na talasnoj dužini apsorpcionog maksimuma nastalog kompleksa $\lambda=750$ nm (Martono et al., 2019).



Slika 2.9: Prikaz reakcije galne kiseline sa FC reagensom (izvor slike Martono et al., 2019).

2.10.1.2. Određivanje ukupnih flavonoida

Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida se najčešće određuje kolorimetrijski sa aluminijum(III)-hloridom. Metoda se zasniva na osobini flavonoidnih struktura da formira obojene metalo-komplekse kao što je prikazano na Slici 2.10 (Martono et al., 2019). Hidroksidne i keto grupe flavonoida formiraju kompleks sa jonima metala (Al^{3+}) uz prisustvo $NaNO_2$ i $NaOH$ koji daju žutu boju čiji se intezitet mjeri spektrofotometrijski na talasnoj dužini $\lambda=510$ nm (Martono et al., 2019).



Slika 2.10: Formiranje kompleksa kvercentina sa $AlCl_3$ (izvor slike Martono et al., 2019).

2.10.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti

2.10.2.1. DPPH antioksidativni test

DPPH antioksidativni test je najviše korišćeni metod za utvrđivanje antioksidativnog kapaciteta prirodnih proizvoda. Princip rada ovog testa je neutralizacija stabilnog radikala $DPPH^{\cdot}$ transferom vodonika koji je donor elektrona sa antioksidansa (A-H), kao što je ilustrovano na Slici 2.11 (Resat et al., 2016; Prior et al., 2005). Neutralizacijom DPPH radikala, dolazi do promjene boje iz ljubičaste u žutu, što se mjeri na talasnoj dužini od 510 nm (Slika 2.11).



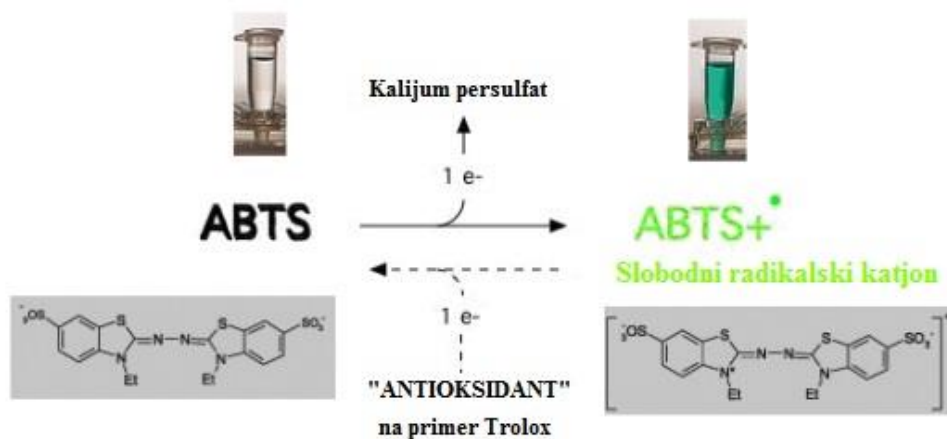
Slika 2.11: Redukcija DPPH radikala ($DPPH^{\cdot}$) sa antioksidansom (A-H) koja dovodi do promjene boje iz početne ljubičaste u žutu (izvor: CHIMACTIV, 2016).

DPPH test se najviše koristi za određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata voća i povrća. Polifenolna jedinjenja su u najvećoj mjeri jedinjenja koja redukuju DPPH radikal, pri čemu nastaje stabilni polifenolni radikal (na Slici 2.11 označen A^{\cdot}). Takođe i druga jedinjenja koja imaju antioksidativna svojstva i ispoljavaju ih primarnim, tj. direktnim mehanizmom neutralizacije slobodnih radikala (doniraju vodonik i elektron), doprinose antioksidativnoj aktivnosti u DPPH testu. Antioksidativna aktivnost u DPPH testu se često prikazuje IC_{50} vrijednostima, pri čemu je

sposobnost nekog proizvoda (ili jedinjenja) da neutrališe slobodne radikale veća što je IC₅₀ vrijednost niža.

2.10.2.2. ABTS test

ABTS antioksidativni test se zasniva na stvaranju stabilnog katjonskog radikala (ABTS^{•+}) koji ima apsorpcione maksimume na talasnim dužinama od 414, 645, 734 i 815 nm i koji se u prisustvu antioksidanasa obezboji (Slika 2.12). ABTS^{•+} nastaje u reakciji ABTS-a rastvorenog u vodi sa kalijum persulfatom, u odnosu 1:1, u mraku tokom 12-16 sati. Nakon toga se katjonski radikal koristi za ispitivanje antioksidacionih svojstava ispitivanog uzorka, mjerenjem apsorbanca na 734 nm (Resat et al., 2016; Prior et al., 2005). Katjonski radikal (ABTS^{•+}) se neutrališe transferom elektrona sa antioksidansa. Kao standard za pravljenje kalibracione krive koristi se najčešće Trolox koji je ekvivalent α -tokoferola u vodenoj sredini ili vitamin C.



Slika 2.12: ABTS hemijska reakcija (Boligon et al., 2014).

2.10.3. Tečna hromatografija visokih performansi

Hromatografija je analitička tehnika koja se koristi za razdvajanje i identifikaciju komponenata koje se nalaze u smješi. Hromatografske metode mogu biti preparativne i analitičke. Preparativna hromatografija je tehnika prečišćavanja i služi za razdvajanje komponenti smješe u svrhu njihove dalje analize. Analitička hromatografija je hromatografska metoda koja se koristi za kvalitativno i kvantitativno određivanje komponenti smješe. Prema prirodi mobilne faze hromatografiju možemo podijeliti na tečnu i gasnu. U tečnoj hromatografiji (LC) mobilna faza je tečnost, dok stacionarna faza može biti čvrsta ili tečna, pri čemu je uglavnom čvrsta. Kada je stacionarna faza tečnost, onda je ona najčešće hemijski vezana kao tanak film na čvrstoj fazi i tako impregnirana tečnost mora biti nerastvorna u mobilnoj fazi (Reuhs, 2017). Particiona tečna hromatografija se može podijeliti prema polarnosti stacionarne i mobilne faze, na normalno faznu (kod koje je stacionarna faza polarna a mobilna faza nepolarna) i reverzno faznu (kod koje je mobilna faza polarna a stacionarna nepolarna). Da li će se koristiti normalno fazna ili reverzno fazna hromatografija zavisi prvenstveno od osobina ispitivanih supstanci, njihove polarnosti, rastvorljivosti, jonizabilnosti, veličine njihovih molekula (Coskun, 2016).

Tečna hromatografija je dinamički fizičko-hemijski proces kojim se komponente smješe razdvajaju na osnovu različite raspodjele između dvije faze, stacionarne i mobilne. Komponente smješe prolaze kroz hromatografski sistem nošene mobilnom fazom i pri tome se raspoređuju na

stacionarnoj fazi uslijed različitih interakcija sa njom. Komponenta sa najvećim afinitetom prema stacionarnoj fazi se poslednja eluira. To je zato što visok afinitet podrazumjeva više vremena za putovanje kroz sistem.

Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC), poznata i kao tečna hromatografija visokog pritiska, je napredni tip tečne hromatografije u smislu osjetljivosti, tačnosti i preciznosti. HPLC sistem se sastoji od rezervoara za mobilnu fazu, pumpe, injektora (autosamplera), kolone sa termostatom i detektora. U cilju povećanja efikasnosti i smanjenja granice detekcije, hromatografija se kombinuje sa drugim metodama: masenom spektrometrijom, UV-Vis, IC spektroskopijom a mogu se međusobno kombinovati različite hromatografske metode. Stoga se u tečnoj hromatografiji najčešće koriste sledeći detektori: UV-Vis, maseni spektrometar, florescentni, refraktometrijski i elektrohemijski detektor.

U analitici komponenti koje imaju biološku aktivnost, posebno u karakterizaciji polifenolnih jedinjenja najviše se koriste UV-Vis i maseni detektori (MS) (Yuan et al., 2019; Keskes et al., 2018).

2.10.3.1. UV-Vis detekcija u tečnoj hromatografiji

UV-Vis detektori se koriste u tečnoj hromatografiji da detektuju i identifikuju analite u uzorku, koji absorbuju u ultraljubičastom i/ili vidljivom dijelu elektromagnetnog zračenja. Ovaj selektivni detektor ima najviše aplikacija u tečnoj hromatografiji. Princip funkcionisanja ovog detektora zasniva se na propuštanju vidljive i ultraljubičaste svetlosti kroz uzorak u protočnoj ćeliji, a zatim mjerenjem apsorpcije na jednoj ili više talasnih dužina. Intenzitet apsorpcije se detektuje kao signal (pik) na hromatogramu. Pik na hromatogramu ima dvije karakteristike i to retenciono vrijeme i površinu pika, koje se koriste u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi. Količina apsorbirane svetlosti daje informacije o svojstvima uzorka od interesa. Dodatno, pojedini UV-Vis (poput DAD) detektori imaju mogućnost snimanja ukupnog UV-Vis spektra analita, što doprinosi kvalitativnoj analizi (Wysocki & Dong, 2019).

2.10.3.2. Tečna hromatografija- masena spektrometrija (LC-MS)

LC-MS tehnika je kombinacija tečne hromatografije i masene spektrometrije. Kombinacija tečne hromatografije visoke performanse sa masenom spektrometrijom (HPLC-MS) koristi se u analizi kompleksnih smješa. Masena spektroskopija ima široku primjenu u analitici pri identifikaciji i kvantifikaciji jedinjenja i pruža informacije o strukturi nepoznatih jedinjenja (Yuan et al., 2019; Pitt, 2009). HPLC-MS se najčešće koristi za analizu jedinjenja koja su temperaturno nestabilna, koja su veoma polarna ili imaju veliku masu (makromolekuli).

Maseni spektrometri funkcionišu tako što prevode molekule analita u naelektrisano tj. jonizovano stanje (u jonizatoru masenog spektrometra), uz naknadnu analizu jona i bilo kojih jona fragmenata koji nastaju u jonskom izvoru, na osnovu njihovog odnosa mase i naelektrisanja (m/z) (u analizatoru masenog spektrometra). Postoji nekoliko načina koji omogućavaju jonizaciju i analizu jonskih fragmenata, koje podrazumjevaju različite tipove masenih spektrometara sa različitim kombinacijama ovih procesa (jonizacije i analize). Od jonskih izvora u masenoj spektrometriji koriste se: ESI (elektro sprej jonizacija), APCI (hemijaska jonizacija pod atmosferskim pritiskom), APPI (foto jonizacija pod atmosferskim pritiskom) i MALDI (matriksom potpomognuta laserska desorpcija) (Pitt, 2009).

Što se tiče analizatora, u masenoj spektrometriji postoje sledeći: kvadrupolni analizator, analizator na bazi vremena preleta jona, TOF analizator, jonska zamka, električni analizator, magnetni analizator i drugi (Pitt, 2009). U kvalitativnoj i kvantitativnoj analitici poznatih jedinjenja i u identifikaciji nepoznatih jedinjenja najčešće se koriste kvadrupolni i TOF analizator.

U kvadrupolnim analizatorima kvadrupol predstavljaju četiri paralelne elektode u kojima se promjenom napona sa vremenom skeniraju vrijednosti odnosa mase i naelektrisanja (m/z), što daje

odgovarajući spektar. Joni se u kvadrupolu kreću u smjeru elektrode koja ima suprotno naelektrisanje od jona, a prije sudara sa elektrodom kvadrupola mijenja se polaritet elektrode. U kolizionoj ćeliji kvadrupolnog analizatora se događa proces nazvan disocijacija izazvana kolizijom (sudarom) jona (koji su u jonskom izvoru formirani) sa inertnim gasom (N₂ ili Ar) što rezultira fragmentacijom jona (Pitt, 2009). Kvadrupolni analizator može da sadrži jedan kvadrupol za filtriranje mase ili da sadrži tri kvadrupola (tj. tandemska maseni sistem) označena kao Q1, Q2, Q3, gdje Q1 i Q3 rade kao filteri masa dok Q2 deluje kao koliziona ćelija i postavljen je između Q1 i Q3 (Pitt, 2009). Prednost tandemske MS je znatno povećana specifičnost analize u odnosu na analizator koji sadrži jedan kvadrupol.

TOF analizator radi tako što ubrzava jone formirane u jonskom izvoru primjenjujući visoki napon. Brzina jona, pa samim tim i vrijeme potrebno da putuju kroz cijev do detektora zavise od njihovih m/z vrednosti. Ako svi joni imaju isto naelektrisanje, njihove kinetičke energije će biti identične i brzina svakog takvog jona će zavisi samo od njegove mase, tako da joni manje mase prvo stignu do detektora, dok težim jonima treba više vremena. TOF analizator može izuzetno brzo da dobije spektre sa visokom osjetljivošću. Prednost TOF analizatora je brzina, međutim TOF analizator ima lošiju rezoluciju u odnosu na druge analizatore (električne ili magnetne). Takođe ima visoku tačnost mase, što omogućava određivanje molekulske formule malih molekula (Pitt, 2009).

2.10.4. Optička emisiona spektroskopija induktivno spregnute plazme (ICP-OES)

ICP-OES je instrumentalna analitička tehnika koja je najsvestranija tehnika u neorganskoj analitici. Plazma koja je jedno od osnovnih agregatnih stanja, sastavljena je od pozitivnih jona i elektrona, što će reći da su čestice u plazmi naelektrisane i pod uticajem električnog polja. Princip rada ICP OES je primjena plazme koja pobuđuje elemente komponenti (atome) u analiziranom uzorku. Plazmom (koja je ekstremno zagrijana, na 5726.85-6726.85 °C) pobuđeni atomi kada se vrate u niskoenergetki položaj, emituju zračenje koje odgovara talasnim dužinama fotona, koje se mjere. U ICP OES tehnici detekcija se vrši optičkim sistemom i nije poželjna jonizacija atoma u plazmi, što se minimizira dodatkom SeCl (donor elektrona) (Pucarevic, 2019). Svaki element ima svoj karakterističan spektar emisije koji se mjeri spektrometrom i koji je veoma komplikovan, međutim razvijeni softveri omogućavaju analizu spektralnih linija na bazi poznatih kombinacija talasnih dužina koji su karakteristični za svaki element. Intenzitet svjetlosti na određenoj talasnoj dužini je proporcionalan količini metala u plamenu (Pucarevic, 2019; De la Guardia & Armenta, 2011).

2.10.5. Atomska apsorpciona spektroskopija (AAS)

AAS je instrumentalna analitička tehnika kojom se određuje koncentracija atoma/jona metala u ispitivanom uzorku. Princip rada AAS zasniva se na sposobnosti atoma ili jona da apsorbuju svjetlost na određenim, jedinstvenim talasnim dužinama za svaki atom/ion. Kada se ispitivani uzorak izloži svjetlosti na karakterističnoj talasnoj dužini jednog od atoma/jona elementa, tada će samo atomi ili joni tog elementa apsorbovati svjetlost primjenjene talasne dužine. Količina svjetlosti koja se apsorbuje na karakterističnoj talasnoj dužini atoma ili jona posmatranog elementa je direktno proporcionalna koncentraciji tog elementa (atoma/jona) (Wolfgong, 2016; Pucarevic, 2019).

2.10.6. Spektroskopija nuklearne magnetne rezonance (NMR spektroskopija)

NMR spektroskopija je neinvazivna i nerazarajuća analitička tehnika koja se prvi put koristila početkom šezdesetih godina prošlog vijeka za strukturna određivanja. Danas se brojne tehnike NMR spektroskopije koriste za karakterizaciju, odnosno određivanje strukture molekula, kao i druge brojne primjene u oblastima hemije i fizike, poslednjih godina sve više i u praćenju metaboličkih procesa *in vivo* (Milosavljevic, 2004). Uz kristalografiju X zraka, NMR je najčešće tehnika izbora u određivanju strukture jedinjenja, dok je zajedno sa masenom spektrometrijom često

korišćena u svrhu kvantifikacije i identifikacije jedinjenja u kompleksnom uzorku (Van der Hooft & Rankin, 2018).

U NMR spektroskopiji pojedina jezgra atoma iz molekula koji su pod uticajem jakog magnetnog polja će se ponašati kao mali magneti. Primjenom elektromagnetnog zračenja, tačnije dijela elektromagnetnog spektra-spektra radiofrekventnih talasa od 300 cm do 30 cm (tj. frekvenca od 100 MHz do 1 GHz) na uzorak, aktivna jezgra će stupiti u rezonancu sa radiofrekventnim talasima. Do apsorpcije radiofrekventnih talasa će doći ukoliko se u uzorku nalaze jezgra koja imaju ugaoni momenat (spin), koji nije 0, što je u slučaju ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F ili ^{15}N (aktivna jezgra) (Milosavljević 2004). Rezonantne frekvencije jezgara se zatim mjere i pretvaraju u odgovarajući NMR signal, i zavisno od jezgra atoma koji se snima dobija se i odgovarajući NMR spektar (za vodonik je ^1H NMR, za ugljenik je ^{13}C NMR itd.). Ipak, od pomenutih jednodimenzionalnih (1D) NMR tehnika, osnovna NMR aktivna jezgra u organskim molekulima su vodonik i ugljenik i zbog toga se ^1H i ^{13}C NMR tehnike najčešće koriste u identifikaciji nepoznatih jedinjenja u nekom uzorku (Mohamed et al., 2020). Za interpretaciju spektara jednodimenzionalnih NMR tehnika uzimaju se sledeći podaci: hemijska pomjeranja (položaji signala u spektru), relativne površine signala (integrali) i oblik (multiplicitet) signala (Milosavljevic, 2004).

I dok je ^1H NMR spektroskopija najviše proučavana NMR spektroskopska tehnika, zbog relativno jednostavne interpretacije spektara, osjetljivosti detekcije i podataka koje pruža o strukturi i geometriji molekula, to je ^{13}C NMR spektroskopija zbog malog udjela spina aktivnog izotopa ^{13}C u prirodi (oko 1.11%) postala široko primjenljivana tek sa razvojem tehnike. Pored male obilnosti aktivnog jezgra ^{13}C smanjenoj osjetljivosti ^{13}C NMR tehnike doprinosi i žiromagnetni odnos koji je četiri puta manji od žiromagnetnog odnosa protona (Milosavljevic, 2004). Posledica manje osjetljivosti ^{13}C NMR je potreba za većom količinom uzorka prilikom snimanja ^{13}C NMR spektra. Princip rada i podaci koji su potrebni za interpretaciju ^{13}C NMR je isti kao u slučaju ^1H NMR spektroskopije s tim da je aktivno jezgro ugljenika (^{13}C) koje se snima, pa shodno tome daje podatke vezane za jezgro ugljenika (Milosavljevic, 2004).

Osim 1D NMR tehnika, u NMR spektroskopiji koriste se i dvodimenzionalne (2D) homonuklearne i heteronuklearne tehnike poput: COSY, HSQC, HMBC koje između ostalih primjena, koriste se za dobijanje kompletne karakterizacije jedinjenja prisutnih u uzorku. COSY, HMQC i HMBC su dvodimenzionalne NMR tehnike koje se temelje na skalarnom sprezanju jezgara (kroz kovalentne veze), za razliku od NOESY i ROESY tehnika koje se temelje na dipolnom sprezanju (kroz prostor) (Kraljevic, 2015; Milosavljevic, 2004).

COSY tehnika je dvodimenzionalna homonuklearna NMR tehnika koja pokazuje korelaciju između vodonika koji su međusobno kuplovani u ^1H NMR spektru. Tehnika se bazira na sprezi protona duž 2 ili 3 hemijske veze gdje su signali lako vidljivi, dok se za veći opseg posmatra duže vrijeme akvizicije. 2D COSY spektar sadrži dvije vrste signala: dijagonalne i korelacione (koji su izvan dijagonale). Dijagonalni signal je obični protonski NMR spektar molekula, dok je korelacioni signal posledica interakcije protona koji su spregnuti (i daju dva različita hemijska pomjeranja), tj. signal koji potiče od protona između kojih je došlo do prenosa magnetizacije (Milosavljevic, 2004).

2D HSQC tehnikom se određuje korelacija između hetero jezgra (najčešće između protona i ^{13}C ili ^{15}N) koji su u skalarnoj sprezi kroz jednu hemijsku vezu. ^1H - ^{13}C HSQC spektar povezuje hemijska pomjeranja protona sa hemijskim pomjeranjem ugljenika za koji je direktno vezan, kroz J_{CH} kuplovanje pri čemu se dobija jedan pik po paru kuplovanih atoma (Milosavljevic, 2004). Na horizontalnoj x-osi je prikazan ^1H spektar, dok je ^{13}C spektar prikazan na vertikalnoj y-osi. HSQC tehnika je nezamjenjiva za određivanje spektra drugog jezgra kada je poznat spektar jednog jezgra.

HMBC je heteronuklearna 2D NMR tehnika koja se zasniva na sprezanju vodonika i ugljenika koji su udaljeni za dvije, tri ili četiri kovalentne veze. U ^1H - ^{13}C HMBC spektru na horizontalnoj x-osi je prikazan ^1H spektar, dok je ^{13}C spektar prikazan na vertikalnoj y-osi. Primjenom tehnike HMBC utvrđuje se povezanost između atoma koji pripadaju različitim molekulskim fragmentima. HMBC spektri su važni za detekciju kvaternarnih ugljenika i služe za povezivanje posebnih strukturnih

fragmenata koji su dobijenih analizom COSY i HSQC spektara (Boysen & Hearn, 2010). Interpretacija HMBC je najizazovnija u procesu određivanja strukture nepoznatog jedinjenja jer korelacije sa dvije ili tri veze mogu biti izuzetno slabe ili se uopšte ne pojavljuju u spektru, a zatim ne postoji jednostavan metod za razlikovanje signala koji potiču od sprezanja između dvije i tri veze (Reynolds, 2017; Boysen & Hearn, 2010).

3. Materijal i metode

3.1. Blitva upotrebljena u studiji

Za gajenje blitve, koja je korišćena u ovoj studiji da bi se utvrdio njen nutritivni i fitonutritivni sastav kao i efekat različitih tretmana navodnjavanja i prihranjivanja, korišćeno je Verca F1 hibridno (Clause, Francuska) sjeme. Korišćeno sjeme daje listove tamno zelene boje, blago naborane sa peteljkom bijele boje sa veoma dobrom otpornošću na cvjetanje. Sjeme blitve je posijano u plastičnim ležištima koja su snadbjevena supstratom. Rasadi blitve su gajeni u stakleniku a oni rasadi koji su imali 4-5 listova su presađeni 15.04.2015. godine, na prethodno pripremljeno zemljište na oglednom imanju Biotehničkog fakulteta Univerziteta Crne Gore u Lješkopolju (koordinate 42.447155°N i 19.206541°E), u Podgorici. Zemljište je u martu bilo pripremljeno za kultivaciju blitve. Rasađivanje blitve je obavljeno na sledeći način: razmak sadnje - 25 cm biljka od biljke, u osam traka po oglednoj parceli površine 10,5 m² (3 m × 3,5 m).

3.1.1. Priprema zemljišta i tretmani đubrenja i navodnjavanja za gajenje blitve

Zemljište na kom je postavljen eksperiment je bila pjeskovita ilovača. Analiza zemljišta kao dio ovog eksperimenta je ukazala na neophodni predtretman koji je potrebno uraditi da bi se omogućili optimalni uslovi za gajenje blitve. Predtretman je obavljen 20.03.2015. godine, kada je u zemljište dodat kalcijum-hidroksid u količini od 70 g/m² i organsko peletirano đubrivo 163 g/m², čiji sastav je bio sledeći: organska materija 67%, ukupni azot 5%, fosfor (P₂O₅) 3%, kalijum (K₂O) 2% a pH 7,2. Primjenjeno organsko đubrivo dovodi do povećanja humusa u zemljištu za 0,1-0,2% na godišnjem nivou, bogato je aminokiselinama, bez patogenih mikroorganizama i sjemena korova.

3.1.1.1. Tretmani prihrane

U eksperimentu su korišćena sledeća đubriva:

-Đubrivo NPK 11-11-21 (YaraMila Cropcare) je kompleksno granulirano đubrivo bez hlora, koje biljkama obezbeđuje konstantnu ishranu. U zemljištima sa navodnjavanjem može se koristiti kao osnovno, starter đubrivo ali i za prihranu. U ovom eksperimentu je korišćeno kao osnovno đubrivo.

-SLAVOL (tečno mikrobiološko đubrivo) je đubrivo koje je stimulator rasta i koje je sertifikovano za primjenu kako u tradicionalnoj tako i u organskoj poljoprivrednoj proizvodnji.

-NPK-vodorastvorljiva đubriva 24-8-16 i 15-30-15 (Yara FERTICARE™).

Krajem marta (27.03.2015. godine), zemljište je tretirano sa 40 g/m² 11-11-21 NPK đubrivom, tj. primjenjene su sledeće pojedinačne koncentracije komponenti: 16,75 g N/m², 12,36 g P₂O₅/m² i 14,79 g K₂O/m² za optimalni nivo đubrenja (€100). Ostala dva korišćena tretmana uključivala su smanjenu količinu đubiva za 50% (€50) i povećanu količinu NPK đubriva za 50% (€150) u odnosu na optimalnu količinu. Nakon osnovnog đubrenja zemljišta, u junu (06.06.2015. godine) je obavljeno uzorkovanje zemljišta (za dobijanje fizičko-hemijskih karakteristika) i zaštita blitve sa fungicidom Coragen i insekticidom Actara, pri čemu je primijenjeno i mikrobiološko folijarno đubrivo SLAVOL. Par dana kasnije, 10.06.2015. godine (Slika 3.1.), obavljena je prihrana blitve, pri čemu je korišćeno 70 g 24-8-16 + 35 g 15-30-15 NPK đubriva po parceli, za optimalni nivo (€100) što odgovara pojedinačnim koncentracijama komponenti: 2,10 g N/m², 1,53 g P₂O₅/m² i 1,57 g K₂O/m². Za druga dva tretmana je primjenjena 50% manja količina (€50) odnosno 50% veća količina (€150) od optimalne količine đubriva. Za đubrenje su napravljeni odgovarajući rastvori i sa istom zapreminom (40 L) su zalivane parcele.



Slika 3.1: Situacija sa terena 10.06.2015. kada je obavljena prihrana blitve (Izvor: autor)

3.1.1.2. Tretman navodnjavanja

Navodnjavanje za tretman koji se odnosio na optimalnu količinu vode (N100) je obavljan u 10 navrata u periodu od početka juna (06.06.2015. godine) do kraja eksperimenta (22.06.2015. godine) sa ukupnom količinom vode od $0,059 \text{ m}^3/\text{m}^2$. Za ogled koji je sproveden u cilju ove doktorske disertacije je primjenjivano različito navodnjavanje sa normama 50%, 100% i 150% u odnosu na optimalne potrebe biljke. Za izračunavanje normi za navodnjavanje korišćen je ACIMAS odnosno EXCEL-IRR program (autor Dr Mladen Todorović). To je verzija softvera za procjenu: potencijalne i referentne evapotranspiracije, sadržaja vode u zemljištu, potrebne količine vode za navodnjavanje, relativnog prinosa, produktivnosti usvojene vode, troškova navodnjavanja, itd. Program koristi osnovne poznate formule iz preporučene literature FAO 56 Penman-Monteith metod (Allen et al., 1998). Kod određivanja normi zalivanja, ulazni podaci su klimatski podaci i karakteristike zemljišta na oglednom polju i karakteristike kulture. Klimatski podaci su prikupljeni sa meteorološke stanice koja je instalirana na odgovarajućem mjestu u blizini oglednih parcela.

U Tabeli 3.1. su sumirane korišćene varijante (kombinacije tri nivoa prihrane i tri norme navodnjavanja) gdje je za svaku varijantu odrađeno po tri ponavljanja, koje su bile u 27 parcela, i dodatne tri kontrolne parcele (N100Đ0, N0Đ100 i N0Đ0), što je zbirno dalo 30 uzoraka blitve (sa 30 parcela). Branje blitve koja je gajena pod različitim tretmanima đubrenja i navodnjavanja je obavljeno 22.06.2015. godine.

Tabela 3.1 Varijante za tretman blitve (Đ-đubrenje, N-navodnjavanje).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Varijante	Đ ₁₀₀	Đ ₁₀₀	Đ ₁₀₀	Đ ₅₀	Đ ₅₀	Đ ₅₀	Đ ₁₅₀	Đ ₁₅₀	Đ ₁₅₀
	N ₁₀₀	N ₅₀	N ₁₅₀	N ₁₀₀	N ₅₀	N ₁₅₀	N ₁₀₀	N ₅₀	N ₁₅₀

3.2. Analiza zemljišta

3.2.1. Uzorkovanje i priprema zemljišta za analize

Zemljište je uzorkovano u dva navrata, prvi put 19.03.2015. godine prije obrade zemljišta i primjene organskog peletiranog đubriva i kalcifikacije, u cilju pripreme za kultivaciju. Drugo mjerenje je relevantno za temu ovog doktorata, bilo je 06.06.2015. godine, nakon branja uzoraka blitve koji su bili za potrebe Biotehničkog fakulteta u Podgorici. Zemljište je analizirano u cilju određivanja fizičko-hemijskih parametara zemljišta na kome se blitva gajila.



Slika 3.2: Uzorkovanje zemljišta 19.03.2015. (lijevo) i 06.06.2019. (desno) (Izvor: autor).

Uzorkovanje zemljišta za potrebe ove studije (06.06.2015. godine), je urađeno na dubini 0-30 cm, na 30 mjesta, koja su odgovarala tretmanima blitve. Uzorci su smješteni u PVC kese, obilježeni prema tretmanu, transportovani na Biotehnički fakultet, gdje su u Centru za ispitivanje zemljišta i melioracije, urađene osnovne analize zemljišta. Analize zemljišta su urađene prema postupcima iz Praktikum za agrohemiju, autora Džamića i saradnika (Džamić i sar., 1996).

Zemljište koje je obilježeno na terenu (30 uzoraka), je osušeno na vazduhu i prije početka ispitivanja je oslobođena krupnijih komada šljunka i sličnog materijala i biljnih i životinjskih ostataka, potom je usitnjeno, homogenizovano i prosijano kroz sito sa otvorima promjera 1 mm i 2 mm.

3.2.2. Mjerenje pH zemljišta

3.2.2.1. Određivanje aktivne kiselosti

Aktivna kiselost je određena u suspenziji zemljišta u destilovanoj vodi elektrohemijском metodom. Izmjereno je 10,0 g vazdušno-suvog zemljišta (frakcija veličine čestica do 1 mm) i prelijeto u čašu od 50 cm³. Menzуром je odmjereno 25 cm³ destilovane vode, i dobro promješano (tj. odnos zemljište: voda = 1 : 2.5). Suspenzija se ostavi da stoji 30 minuta i u tom intervalu tri puta se izmješa u trajanju od 1 minuta. Nakon zadnjeg miješanja, ostavi se da odstoji 15 minuta i mjeri se koncentracija H⁺-jona pomoću pH-metra (WTW Lab-pH Meter inoLab Level 1), uranjanjem dvojne kombinovane elektrode u pripremljenu suspenziju.

3.2.2.2. Određivanje supstitucione kiselosti

Supstituciona kiselost (fiziološki aktivna kiselost) je određena u suspenziji zemljišta u 1 M rastvoru KCl, elektrohemijском metodom. Izmjereno je 10,0 g vazdušno-suvog zemljišta i prelijeto u čašu od 50 cm³. Menzуром je odmjereno 25 cm³ 1M KCl, i dobro promješano i pripremljeno za mjerenje pH prema postupku opisanom za određivanje aktivne kiselosti.

3.2.3. Određivanje ukupnog sadržaja humusa

Ukupni sadržaj humusa je određen metodom Metoda Išćerikova u modifikaciji Kocmana, koja se zasniva na oksidaciji organskih materija zemljišta pomoću rastvora KMnO₄. Nakon odmjerenja 300-500 mg vazdušno-suvog zemljišta, zemljište je kvantitativno prelijeto u erlenmajer. Menzуром je odmjereno 130 cm³ destilovane vode i prelijeto u erlenmajer. Zatim je dodato 20 cm³ sumporne kiseline (razblažena u odnosu 1:4). Potom je u erlenmajer pipetirano tačno 50 cm³ 0,1 N rastvora KMnO₄ (0,02M), kojem je ranije tačno ustanovljena koncentracija-titar. Erlenmajer je zatim zagrijevan na rešou. Kada je suspenzija proključala nastavljeno je zagrijevanje još 15 min ali na tiho ključanje.

Nakon 15 minuta tihog ključanja erlenmajer je skinut sa rešoa i odmah je vruć rastvor titrovano sa rastvorom oksalne kiseline (0,1N ili 0,05M), koja je dodavana sve dok se ljubičasti sadržaj u erlenmajeru potpuno ne obezboji. Pošto obezbojavanje teče postepeno, potrebno je dodati izvjestan suvišak oksalne kiseline. Taj suvišak oksalne kiseline se ustanovljava retitracijom sa rastvorom KMnO_4 iz druge birete. Rastvor KMnO_4 , pri retitraciji je dodat kap po kap do pojave slabo ružičaste boje, koja označava završnu tačku titracije. Na taj način je titracija završena i pristupa se izračunavanju zapremine utrošenog KMnO_4 .

Humus se izražava u % i izračunava sledećom formulom:

$$\text{Humus (\%)} = \frac{A * 0.514 * 1.72}{B} * 100$$

A - broj cm^3 utrošenog 0,1N rastvora KMnO_4 na oksidaciju organske materije u odvazi (g) zemljišta 0,514 mg ili (0,000514 g) - konstantan je broj koji označava da svaki cm^3 0,1N KMnO_4 oksiduje 0,514 mg ugljenika iz humusa u ugljendioksid. 1,72 - je koeficijent za prevođenje nađenog ugljenika u humus. B - odvaga zemljišta u miligramima. Ako se koeficijent 0,514 izražava u g, onda se uzeta odvaga takođe izražava u g.

3.2.4. Određivanje lakopristupačnog sadržaja P_2O_5 i K_2O

Lakopristupačni fosfor i kalijum u zemljištu su određeni nakon ekstrakcije fosfora i kalijuma AL rastvorom (rastvor amonijum-acetat-laktat).

3.2.4.1. Postupak za određivanje fosfora

Postupak ekstrakcije: Odmjereno je 5 g osušenog zemljišta, koje je prosijano kroz sito od 2 mm i stavljeno u polietilensku bocu od 500 ml. Uzorak je prelišen sa 100 ml radnog rastvora AL, i potom su boce zatvorene i postavljene na rotacionu mućkalicu 2 h, na temperaturi 20°C i brojem obrataja 35-40/minuti. *Postupak pripreme za instrumentalnu analizu:* Nakon ekstrakcije, ekstrakt je profiltriran sve do dobijanja bistrog filtrata. Od bistrog filtrata je uzeto 25 ml i preneseno u normalni sud od 100 ml, u kome su dodati sledeći rastvori: 9 ml 8 N sumporne kiseline, 10 ml 1,44% amonijum molibdata, 2 ml 2% rastvora askorbinske kiseline. Identičan postupak je izveden za seriju kalibracionih rastvora i za slijepu probu (radni rastvor AL). U normalni sud je potom dodato oko 80 ml destilovane vode, ostavljeno u sušnici na 95°C , 1h. Nakon što se ohladilo, normalni sud je dopunjen vodom do crte i dobro promućkan. Ovako pripremljeni rastvori uzorka, standardnih rastvora i slijepa probe su zatim očitani na spektrofotometru (Varian, Cary 100) na talasnoj dužini 580 nm. Sadržaj lakopristupačnog fosfora je očitano sa kalibracione krive kao mg P_2O_5 na 100 g zemljišta.

3.2.4.2. Postupak za određivanje lakopristupačnog kalijuma

Postupak ekstrakcije je identičan kao i za fosfor. Posle ekstrakcije rastvor je profiltriran. Iz profiltriranog rastvora potom je direktno određen kalijum na AAS (AA-6800, Shimadzu). Za pravljenje kalibracione krive korišćena je serija radnih standardnih rastvora sa koje je potom očitano sadržaj lakopristupačnog kalijuma kao mg K_2O na 100 g zemljišta.

3.2.5. Određivanje lako dostupnih elemenata u zemljištu

3.2.5.1. Određivanje pristupačnih Fe, Mn, Zn i Cu u zemljištu

Metoda za određivanje pristupačnog sadržaja Fe, Mn, Cu i Zn u zemljištu se zasniva na mjerenju mikroelemnata na AAS nakon ekstrakcije DTPA rastvorom (Dietilentriaminpentasilicetne kiseline). *Postupak ekstrakcije:* Odmjereno je 20,0 g zemljišta (frakcija < 2 mm) i prenesena u odgovarajuće plastične boce, potom je dodato 40 ml ekstrakcionog sredstva ($5 \times 10^{-3}\text{M}$ DTPA, $1 \times 10^{-2}\text{M}$ CaCl_2 i

0,1M trietanolamina) i ostavljeno na mućkalici 2h. Nakon filtracije kroz papir Whatman br. 42, rastvor je spreman za analizu na AAS (AA-6800, Shimadzu). Na osnovu mjerenja apsorpcije u seriji radnih standardnih rastvora za svaki element, napravljena je kalibraciona kriva pomoću koje je izračunata njihova koncentracija u uzorcima zemljišta i rezultat izražen u mg po kg zemljišta.

3.2.5.2. Određivanje pristupačnih Ca i Mg u zemljištu

Postupak: Odmjereno je 1 g zemljišta i prelijeto u bocu od 100 ml, potom je dodato 50 ml 1 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ i ostavljeno na mućkalicu pola sata. Nakon filtriranja u filtratu je određena koncentracija Ca i Mg na AAS (AA-6800, Shimadzu). Koncentracije jona magnezijuma i kalcijuma su očitane sa kalibracione krive koja je dobijena mjerenjem apsorpcije standardnih rastvora.

3.2.6. Određivanje provodljivosti zemljišta

Provodljivost zemljišta je određena mjerenjem vodene suspenzije zemljišta (1:5) na konduktometru (Hanna Instruments HI-4522).

3.3. Terenska mjerenja

Branje blitve je organizovano, kako nalaže agronomska praksa, kada su listovi blitve bili zreli, 22.06.2020. godine. Blitva je uzorkovana od strane stručnog tima sa Biotehničkog fakulteta iz Podgorice, koji su procijenili zrelost listova. Mjerenja prosječne dužine lista, prosječnog broja listova, prinosa (kg blitve/m^2) i indeksni sadržaj hlorofila (CCI) su obavljani na terenu tj. *in situ*. Za mjerenje CCI je korišćen CCM-200 plus (Opti-Science, Inc.).



Slika 3.3: Uzorkovanje blitve na terenu (lijevo) i kasnije priprema u laboratoriji za analize (desno) 22.06.2015. god (Izvor: autor).

3.4. Priprema biljnog materijala

Po obavljenim terenskim mjerenjima, uzorci su spakovani i obilježeni u plastične kese i ručnim frižiderima transportovani do Instituta za javno zdravlje Crne Gore (IJZCG). U laboratorijama instituta jestivi dijelovi, listovi i petiljke su oprani pod česmenskom vodom i dva puta isprani destilovanom vodom. Potom su uzorci ocijeđeni potpuno od zaostale vode na filter papiru. Jedan dio uzoraka je zatim homogenizovan u blenderu u tamnoj prostoriji, na sobnoj temperaturi ($25\text{ }^\circ\text{C}$). Nakon homogenizacije, odvojen je dio uzoraka za proksimativnu analizu nutrijenata i za određivanje hlorofila, ukupnih karotenoida i sadržaja nitrata. Preostali svježi homogenizovani uzorci su spakovani i obilježeni u plastične vakumirane kese i zamrznuti na $-25\text{ }^\circ\text{C}$ do odgovarajuće analize.

Drugi dio uzoraka je ostavljen da se suši na sobnoj temperaturi u ventiliranoj tamnoj prostoriji. Nakon što su uzorci osušeni i homogenizovani, spakovani su u vakumirane plastične kese i zamrznuti (-25 °C) do odgovarajućih analiza.

3.5. Proksimativna analiza makronutrijenata uzoraka blitve

Sadržaj vlage je određen sušenjem homogenizovanih uzoraka svježe blitve na 105 °C do konstantne mase, po metodi AOAC: 950.46 (Latimer, 2012). Određivanje sadržaja pepela je sprovedeno spaljivanjem na 520 °C do konstantne mase u peći za žarenje, prema metodi AOAC 930.30 (Latimer, 2012). Ukupni lipidi su određeni kontinuiranom ekstrakcijom sa petroletrom korišćenjem Sokslet ekstrakcionog sistema na 45–60 °C, prema metodi AOAC 948.15 (Latimer, 2012).

3.5.1. Određivanje ukupnog sadržaja azota u uzorcima blitve (Kjeldahl-ova digestija)

Izmjereno je 0,5-2,0 g homogenizovanog uzorka svježe blitve na celofan foliju. Folija je zatim stavljena u kivetu po Kjeldahl-u u kojoj je odmjereno 15 g anhidrovanog K₂SO₄ i 0,5 g bakar-(II)-sulfata pentahidrata. Zatim je u kivetu za digestiju usuto 25 mL 96% sumporne kiseline. Sadržaj iz kivete je blago promješšan okretanjem kivete, nakon čega je kiveta priključena na aparaturu za destilaciju i sadržaj digeriran 60-90 min uz zagrijavanje (od 370-400 °C), prilikom čega je organski azot preveden u amonijum jon. Nakon digestije, kiveta je ohlađena dodatkom 250 ml vode. Potom je sadržaj destilovan (oko 5 min) u cilju odvajanja amonijaka od ostatka digestione smješe, što je postignuto dodatkom 45% NaOH (prevođenje amonijum jona u amonijak). Destilat je potom sakupljen u posudu koja sadrži 25 ml 4% borne kiseline. Udio azota je potom određen titracijom nastalog amonijum borata sa hlorovodoničnom kiselinom, potom je preračunat % ukupnog azota nakon čega je dobijen sadržaj ukupnih proteina množenjem sa 6,25. Određivanja azota (proteina) je urađeno prema postupku AOAC 991.20 metode (Latimer, 2012).

3.5.2. Određivanje sadržaja sirovih vlakana

Sadržaj ukupnih nerastvornih vlakana („celuloza“) je određen po metodi Scharrer–Kurscher-a (Matissek & Steiner, 2006). Sadržaj ukupnih nerastvornih vlakana je izračunat iz razlike ukupnih sirovih nerastvornih vlakana ("sirova celuloza") i mineralnog sadržaja (sadržaj pepela) iz svakog pojedinačnog uzorka blitve.

Ukupna sirova nerastvorna vlakna određna su gravimetrijski, nakon rastvaranja ostalih komponenti u smješi kiseline. Izmjeren je 1 g dobro usitnjenog uzorka i stavljen u normalni sud od 100 ml, u koji je dodato 25 ml 80% sirćetne kiseline i 2,5 ml koncentrovane azotne kiseline, nakon čega se smješa kuvala pola sata uz povratni vazdušni hladnjak. Sadržaj u normalnom sudu je povremeno promješšan. Nakon kuvanja, tako zagrijan rastvor je profiltriran kroz osušeni i izmjereni lončić za filtriranje 1-G-3 uz slabu evakuaciju. Nastali talog je potom prvo ispran sa oko 10 ml vruće smješe sirćetne i azotne kiseline, zatim vrućom vodom i na kraju sa etanolom. Potom su lončići uz filtriranje stavljeni u sušnicu oko 30 minuta, na temperaturi od 100-110 °C, nakon čega su ohlađeni i brzo izmjereni. Dobijena masa je sadržaj sirove celuloze (celuloza, hemiceluloza, lignin i vezane mineralne komponente).

3.5.3. Ukupni ugljenihidrati i energetska vrijednost

Ukupni ugljenihidrati su izračunati oduzimanjem zbira ukupnih proteina, ukupnih lipida, ukupnog pepela, sadržaja vlage i ukupnih sirovih vlakana od 100.

Energetska vrijednost, u kJ, je izračunata po sledećoj formuli (USDA, 2017):

$$E = [(2,44 \times (\text{g ukupnih proteina}) + 8,37 \times (\text{g ukupnih lipida}) + 3,57 \times (\text{g ukupnih ugljenihhidrata})] / 0,24.$$

3.6. Određivanje minerala iz blitve

Individualni mineralni sastav u uzorcima blitve je određen AOAC metodom 984.15 (Latimer, 2012). Određen je sadržaj makroelemenata (Na, Mg, Ca, K i P) i mikroelemenata (Fe, Mn, Zn, Cu, Cr i Co). Homogenizovani uzorci (1 g) su digestovani sa 1,0 mL 30% H₂O₂ i 7,0 mL HNO₃ u mikrotalasnom digestivnom sistemu (ETOS1, Milestone). Nakon digestivne procedure i hlađenja uzoraka, digestovani uzorci su razblaženi destilovanom vodom (Milli Q) do krajnje zapremine 25,0 mL. Analiza individualnog mineralnog sadržaja je određena ICP-OES tehnikom (ICP-OES, SPECTRO ARCOS, Kleve, Germany). Rezultati su izraženi u mg ili µg na 100 g svježe blitve.

3.7. Određivanje vitamina C

Sadržaj vitamina C u uzorcima svježe blitve je određen korišćenjem Reflectometer RQflex10 Reflectoquant sa Reflectoquant trakama testa za askorbinsku kiselinu (Reflectoquant® Ascorbic Acid Test, 2016). Korišćeni su i standardi askorbinske kiseline od 20 mg/L i 80 mg/L za provjeru metode. Aparat direktno čita koncentraciju vitamina C u uzorku i to kao mg/L. Izmjeren je 1 g svježe blitve u kivetu od 50 ml i dodato je 10 mL destilovane vode. Nakon snažnog miješanja na vorteksu, uzorci su profiltrirani i direktno mjereni. Rezultati su prikazani kao mg vitamina C na 100 g svježeg uzorka.

3.8. Određivanje hlorofila a i b i ukupnih karotenoida

Hlorofil a, hlorofil b i ukupni karotenoidi u odmrznutim i homogenizovanim uzorcima blitve određeni su spektrofotometrijski prema proceduri Sumanta i saradnika (Sumanta et al., 2014). Postupak je bio sledeći: Odmjeren je 0,5 g homogenizovanih svježih uzoraka blitve i pomješano sa 10 mL 80% acetona na vorteksu, nakon čega su uzorci centrifugirani 10 000 rpm, 15 min na 4 °C. Supernatant je odvojen i 0,5 mL je pomješano sa 4,5 mL acetona. Apsorbanca krajnje smjese je mjerena na spektrofotometru (Varian, Cary 3E UV-VIS Spectrophotometer) na sledećim talasnim dužinama: 470, 663,2 i 646,8 nm. Jednačine po kojima je kvantifikovan sadržaj hlorofila a, hlorofila b i ukupnih karotenoida su bile sledeće:

$$\text{chl a} = 12,25 * A_{663,2} - 279 * A_{646,8}$$

$$\text{chl b} = 21,5 * A_{646,8} - 5,1 * A_{663,2}$$

$$\text{Ukupni karotenoidi} = (1000 * A_{470} - 1,82 * \text{chl a} - 85,02 * \text{chl b}) / 198$$

Rezultati su prikazani u mg na 100 g svježe mase uzoraka blitve.

3.9. Određivanje TPC, ukupnog sadržaja flavonoida i DPPH aktivnost vodenog ekstrakta blitve

3.9.1. Priprema vodenog ekstrakta blitve

Homogenizovani svježi uzorci blitve su korišćeni za pripremu vodenog ekstrakta. Nakon odmrzavanja uzorci su procijeđeni od viška vode i ocijeđeni na filter papiru. Zatim je 5 g uzoraka odmjeren u 50 mL destilovane vode i potom kuvano na 45 min na 60–70 °C, po modifikovanoj metodi Sacan i Jangarda (Sacan & Yanardag, 2010). Nakon toga ekstrakti su procijeđeni na filter papiru i upareni na vakuum uparivaču. Ostatak suvog ekstrakta je za sve uzorke bio u opsegu od 1,55-1,73 g (oko 30%). Potom su napravljeni ekstrakti od 10 mg/ml u vodi i nakon toga napravljena su razblaženja u opsegu od 1,0 do 10,0 mg/ml. Ovi ekstrakti su korišćeni za ispitivanje antioksidativnih svojstava vodenih ekstrakta blitve (sadržaj ukupnih fenola, sadržaj ukupnih flavonoida i DPPH aktivnost).

3.9.2. Određivanje ukupnog sadržaja polifenola

Ukupni sadržaj polifenola vodenih ekstrakata blitve je određen spektrofotometrijski po Folin-Ciocalteu metodi (Slinkard & Singleton, 1977).

Postupak: Reakciona smješa se sastojala od 0,1 mL vodenog ekstrakta blitve (0,1 ml, $c=1,0$ mg/mL), (pripremljenog po postupku 3.9.1), 4,5 mL destilovane vode (MilliQ), 0,1 mL FC reagensa (3 puta razblažen) i 0,3 mL 2% Na_2CO_3 . Nakon što je pomješana na vorteksu ostavljena je da reaguje u mraku 2 h, uz povremeno mješanje na vorteksu. Posle 2 h izmjerene su apsorbance na $\lambda_{\text{max}} = 750$ nm, na spektrofotometru (Varian Cary 3E UV-Vis). Uporedo su kalibracioni rastvori galne kiseline (0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pripremljeni po istom postupku kao i slijepa proba. Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u vodenom ekstraktu izražen je kao ekvivalent galne kiseline (μg GAE/mg vodenog ekstrakta).

3.9.3. Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida (TFC)

Sadržaj ukupnih flavonoida određen je kolorimetrijski po metodi Sakanaka i saradnika (Sakanaka et al., 2005).

Postupak: Pripremljeni vodeni ekstrakti uzoraka blitve (postupak 3.9.1) ($c=1$ mg/mL), su odmjereni u zapremini od 0,5 mL u epruvetama u kojim je dalje dodato 2,5 mL destilovane vode i 0,15 mL 5% NaNO_2 rastvora. Nakon 6 minuta, 0,3 mL 10% AlCl_3 rastvora je dodato i ostavljeno na sobnoj temperaturi 5 minuta. Potom je u reakcionu smještu dodato 1 mL 1 M NaOH i rastvor je razblažen do 5 mL sa destilovanom vodom. Pripremi uzoraka po opisanoj proceduri prethodila je ista priprema kalibracionih standarda i slijepa probe. Za konstrukciju kalibracione prave korišćeni su standardi katehina u opsegu 20-100 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Nakon završetka postupka odmah je očitana absorbanca na 510 nm na spektrofotometru (Varian Cary 3E UV-Vis). Na osnovu izmjerenih apsorbanci, sa kalibracione krive standardnog rastvora katehina očitana je koncentracija za uzorke pri čemu je sadržaj ukupnih flavonoida izražen kao ekvivalent katehina po mg vodenog ekstrakta (μg CAE/mg ekstrakta).

3.9.4. Određivanje antioksidativnog kapaciteta DPPH testom

Antioksidativna aktivnost vodenih ekstrakata blitve je određena DPPH testom po metodi Brand-Williams i saradnika (Brand-Williams et al., 1995).

Postupak: Rastvor DPPH je napravljen u metanolu ($6 \times 10^{-5} \text{M}$) neposredno prije izvođenja testa. Alikvot od 3,9 mL metanolnog DPPH rastvora je pomješan sa 0,1 mL vodenog ekstrakta blitve (pripremljen po postupku 3.9.1), različite koncentracije za svaki uzorak (koncentracije od 1,0 do 10 mg/mL). Reaktivna smješa je promješana na vorteksu i ostavljena u mraku na sobnoj temperaturi 30 min. Smanjenje apsorbance je mjereno na 517 nm nasuprot metanola. Procenat inhibicije slobodnih radikala usled antioksidativnih osobina ekstrakta su izračunati po sledećoj formuli:

% hvatanja slobodnih DPPH radikala = $100 \times (A_0 - A_{\text{uzorka}}) / A_0$, gdje je A_0 -apsorbanca kontrole; A_{uzorka} -apsorbanca uzorka

3.10. Izolovanje i identifikacija polifenolnih jedinjenja blitve

Za izolovanje i identifikovanje polifenolnih jedinjenja, korišćen je kompozitni uzorak koji je nastao miješanjem jednakih količina suvih uzoraka blitve (svi tretmani, tj. 30 uzoraka). Kombinovanom metodom LC/MS je urađena analiza metanolnog i *n*-butanolnog ekstrakta blitve pri čemu su dobijeni MS i UV Vis spektri komponenti iz ekstrakata. Potom su na osnovu spektara i literaturnih podataka jedinjenja identifikovana tentativno. Zatim su izolovane identifikovane komponente (4 flavonoida) i u cilju potvrđivanja njihovih struktura, snimljeni su ^1H NMR i po potrebi ^{13}C NMR i 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC) spektri.

3.10.1. Metanolna ekstrakcija

Odmjereno je 5,94 g homogenizovanog i osušenog kompozitnog uzorka blitve i ekstrahovano sa 200 mL smješe voda/metanol (1:1). Ekstrakt je najprije ostavljen 60 min na ultrazvučnom kupatilu, a zatim preko noći. Potom je supernatant procijeđen kroz filter-papir i tako odvojen od taloga. Talog je reekstrahovan pomoću 150 mL smješe voda/metanol (1:1) na ultrazvučnom kupatilu tokom 60 min i potom profiltriran na filter-papiru. Ekstrakt i reekstrakt su pomiješani i potom je rastvarač uklonjen uparavanjem na rotacionom vakuum-uparivaču. Suvi ekstrakt je rastvoren u metanolu i analiziran tehnikom tečne hromatografije-masene spektrometrije, tj. LC-MS (Uslovi LC-MS 1, kasnije objašnjeni uslovi).

3.10.1.1. Razdvajanje kolonskom hromatografijom na poliamidu

Metanolni ekstrakt je grubo razdvojen gravitacionom kolonskom hromatografijom na poliamidu kao stacionarnoj fazi. Nakon nanošenja metanolnog ekstrakta, eluiranje je započeto vodom (50 mL), nastavljeno smješom vode i metanola, pri čemu se udio metanola povećavao za 10% (takođe zapremina svake smješe po 50 mL) i na kraju sa 50 mL čistog metanola. Na 7 g poliamida razdvajano je oko 500 mg ekstrakta, a postupak je ponovljen 4 puta.

Frakcije su zatim snimljene na NMR spektrometru Varian Gemini 2000 (200 MHz za ^1H). Potom su, na osnovu ^1H NMR spektara, frakcije iste polarosti spojene.

3.10.1.2. Prečišćavanje frakcija semi-preparativnom reverzno-faznom tečnom hromatografijom

Iz frakcija koje su nastale nakon prečišćavanja na poliamidu, uklonjen je metanol na rotacionom vakuum uparivaču i izmjerena masa suvog ostatka i potom napravljene koncentracije ekstrakta od 10 mg/ml u metanolu (sve frakcije su za dalje prečišćavanje pravljene na ovaj način, nakon uparavanja metanola).

Dobijene frakcije su analizirane LC-MS tehnikom (LC-MS uslovi 2), kojom se utvrđuje koje frakcije je potrebno dalje prečišćavati. Prečišćavanje metanolnih frakcija je dalje izvođeno semi preparativnom reverzno-faznom tečnom hromatografijom sve do dobijanja frakcija u kojoj se određena komponenta nalazila $\geq 90\%$. Frakcionisanje na semi preparativnoj tečnoj hromatografiji je izvođeno, redom pod uslovima koji su označeni kao LC uslovi 3, 4, 5, 6 i 7 između kojih je rađena LCMS analiza (LC uslovi 2), kako je i navedeno.

3.10.2. Tečno-tečna ekstrakcija *n*-butanolom

Homogenizovani kompozitni uzorak blitve je odmjeren (22,26 g) i ekstrahovan sa 400 mL smješe voda/metanol (1:1). Ekstrakt je prvo ostavljen na ultrazvučnom kupatilu 60 min, potom preko noći. Ujutru je ekstrakt profiltriran kroz filter-papir, a talog je reekstrahovan pomoću 200 mL smješe voda metanol (1:1) 60 min, na ultrazvučnom kupatilu. Nakon što je reekstrakt profiltriran kroz filter-papir, spojen je sa ekstraktom. Iz kombinovanih rastvora, rastvarač je uparen na rotacionom vakuum uparivaču i izmjerena masa suvog ekstrakta.

Od suvog ostatka vodeno-metanolnog ekstrakta, 7,46 g je rastvoreno u 85 ml vode i prebačeno u lijevak za odvajanje. Vodeni ekstrakt je u lijevku za odvajanje ispran tri puta sa po 50 mL metilena-hlorida. Gornji, vodeni sloj je odvojen i ekstrahovan četiri puta sa po 70 mL *n*-butanola. *n*-butanolni slojevi su odvojeni, spojeni i osušeni anhidrovanim natrijum-sulfatom. Rastvarač je uklonjen uparavanjem na rotacionom vakuum uparivaču i izmjerena je masa suvog ostatka.

3.10.2.1 Prečišćavanje frakcija na semi preparativnoj reverzno faznoj hromatografiji

Napravljen je metanolni rastvor suvog ekstrakta i analiziran LC-MS tehnikom (LC uslovi 1). Od suvog ostatka *n*-butanolnog ekstrakta je odmjereno 611,7 mg i pripremljeni su metanolni rastvori koncentracije 12,5 mg/mL. Rastvor je zatim prečišćen semi-preparativnom reverzno-faznom

tečnom hromatografijom, pod uslovima označenim kao LC uslovi 3. Dobijene frakcije su potom analizirane tečno-masenom hromatografijom (LC-MS uslovi 2), kao i u slučaju metanolne ekstrakcije. Prečišćavanje frakcija je nastavljeno semi-preparativnom reverzno-faznom tečnom hromatografijom pod uslovima, redom LC uslovi 7 i 6 između kojih je urađena LC MS analizom (LC-MS uslovi 2).

3.10.3. Uslovi tečne hromatografije pod kojima su rađene analize

LC-MS uslovi 1

Analiza pod LC uslovi 1 je rađena tečnom hromatografijom-masenom spektrometrijom (LC/MS sistemu), sastavljenom od LC dijela (Agilent Technologies 1200 series) koga čine vakuum degaser, binarna pumpa, termostatirani kolonski kompartmen, DAD detektor i MS dio (Agilent Technologies 6210 Time of Flight). Korišćena je kolona Zorbax Eclipse Plus (150 × 4,6 mm i.d., 1,8 µm), LC sledeći uslovi: eluent smješa 0,2 % mravlja kiselina u vodi (A) i acetonitril (B) pri čemu je korišćen elucioni program: 0 – 20 min, 5 – 16% B, 20 – 28 min, 16 – 40% B, 28 – 32 min, 40 – 70% B, 32 – 36 min, 70 – 99% B, 36 – 45 min, 99% B, 45 – 46 min, 99 – 5% B, 46 – 51 min, 5% B, pri konstantnom protoku od 0.95 mL/min; temperatura kolone i eluenta 40 °C; UV spektri su snimani u opsegu 190-450 nm i u istom opsegu su bilježeni i hromatogrami i MS uslovi: negativni mod, napon kapilare 4000 V, temperatura nebulizacionog gasa 350 °C, brzina gasa za sušenje 12 L/min, pritisak nebulajzera 45 psig, napon na fragmentoru 140 V, napon na skimeru 60 V, radio-frekventni napon oktopola 250 V, opseg m/z 100–2000), za snimanje ESI masenih spektara visoke rezolucije i za praćenje toka gravitacione kolonske i semi-preparativne tečne hromatografije.

LC-MS uslovi 2

Analiza pod LC uslovima 2 je obavljena na istoj opremi i kao LC uslovi 1, pri čemu su LC uslovi rada bili: eluent smješa 0.2% mravlja kiselina u vodi (A) i acetonitril (B) sa sledećim elucionim programom: 0 – 0,5 min, 5% B, 0,5 – 10 min, 5 – 95% B, 10 – 15 min, 95% B, 15 – 15,5 min, 95 – 5% B, 15,5 – 19 min, 5% B; pri konstantnom protoku 0.5 mL/min; temperatura kolone kao i UV oblast u kom su snimani spektri i bilježeni hromatogrami i MS uslovi su isti kao u LC-MS uslovima 1.

LC uslovi 3-7

Analize pod uslovima LC uslovi 3-7 su rađeni na istoj opremi za semi-preparativnu reverzno-faznu tečnu hromatografiju, ali pod različitim elucionim programom koji je dat u nastavku. Korišćena je kolona Zorbax Eclipse XDB (250 × 9,4 mm; 5µm) zagrijana na 27 °C. Kao eluent korišćena je smješa 0,2% mravlje kiseline u vodi (A) i acetonitrila (B). Protok je 4,00 mL/min. Hromatogrami su bilježeni na sledećim talasnim dužinama 260, 270, 330 и 370 nm, a UV spektri su snimani u opsegu od 190-450 nm.

LC uslovi 3: Elucioni program: 0 – 5 min, 15% B, 5 – 26 min, 15 – 40% B, 26 – 30 min, 40% B, 30 – 31 min, 40 – 15% B, 31 – 35 min, 15% B.

LC uslovi 4: Elucioni program: 0 – 15 min, 20 – 36% B, 15 – 18 min, 36 – 70% B, 18 – 20 min, 70 – 100% B, 20 – 21 min, 100 – 20% B, 21 – 25 min, 20% B.

LC uslovi 5: Elucioni program: 0 – 30 min, 7% B, 30 – 32 min, 7 – 50% B, 32 – 35 min, 50 – 100% B, 35 – 36 min, 100 – 7% B, 36 – 40 min, 20% B.

LC uslovi 6: Elucioni program: 0 – 20 min, 20 – 30% B, 20 – 30 min, 30 – 60% B, 30 – 35 min, 60 – 80% B, 35 – 36 min, 80 – 20% B, 36 – 40 min, 20% B.

LC uslovi 7: Elucioni program: 0 – 15 min, 20 – 30% B, 15 – 20 min, 30 – 50% B, 20 – 23 min, 50 – 80% B, 23 – 25 min, 80 – 100% B, 25 – 26 min, 100 – 20% B, 26 – 30 min, 20% B.

Napomena: Postupak frakcionisanja je detaljno opisan u master radu Hristine Šalipur (Salipur, 2016).

3.10.4. Snimanje spektara 1D (¹H, ¹³C) i 2D NMR spektroskopije (COSY, HSQC, HMBC)

Strukture četiri jedinjenja, izolovana iz metanolnih i *n*-butanolnih ekstrakta koje su identifikovane LC MS analizom iz frakcija u kojima su bili prisutni više od 90%, su potvrđene primjenom NMR spektroskopije: 1D i 2D NMR spektroskopije (¹H, ¹³C, COSY, HSQC, HMBC). ¹H NMR spektri su snimljeni za sve četiri identifikovane komponente dok su ¹³C, COSY, HSQC, HMBC spektri snimljeni za komponentu 1 (tj. za viteksin-2"-*O*-ksilozid).

3.11. Određivanje antioksidativne aktivnosti metanolnog ekstrakta blitve DPPH i ABTS testovima

Metanolni ekstrakti uzoraka blitve su pripremljeni prema istom postupku kao za izolovanje i kvantifikovanje individualnih flavonoida (postupak 3.10.1.).

3.11.1. DPPH test

Ispitivanje hvatačke aktivnosti metanolnog ekstrakta DPPH testom je rađen spektrofotometrijski po metodi Brand-Williams i saradnika (Brand-Williams et al., 1995). Postupak testa je identičan kao za vodeni ekstrakt, pri čemu je DPPH aktivnost izražena kao ekvivalenti μmol Troloksa/g suve mase. Kao standard za pravljenje kalibracione prave koristio se Trolox u opsegu 1000-3000 mM.

3.11.2. ABTS test

Ispitivanje hvatačke aktivnosti metanolnog ekstrakta ABTS testom je rađen spektrofotometrijski po metodi Re-a i saradnika (Re et al., 1999). ABTS radikalski katjon je napravljen reakcijom 2mM ABTS sa 70 mM K₂S₂O₈. Smješa ABTS i kalijum persulfata je ostavljena da reaguje 12 h na sobnoj temperaturi u mraku. Formirani katjonski radikal (ABTS^{•+}) je potom razblažen metanolom do absorbance (na 734 nm) 0,700 ± 0,02. Posle toga, 100 μL metanolnog ekstrakta blitve (koji je pripremljen po postupku opisanom u 3.10.1 dijelu) je dodato u epruvetu sa 2 mL ABTS rastvora i absorbanca je snimana nakon 6 min reakcije, koristeći metanol kao blank. Kalibraciona kriva je dobijena korišćenjem Troloksa kao standarda u opsegu 100-500 μM i rezultati su prikazani kao μmol Troloksa/g suve mase.

3.12. Kvantifikovanje identifikovanih flavonoida u uzorcima blitve

Nakon identifikovanja polifenolonih jedinjenja u vodeno-metanolnom ekstraktu blitve urađena je kvantifikacija pojedinačnih identifikovanih jedinjenja na HPLC-u (Agilent 1260 Infinity) tečnom hromatografu (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Identifikovani flavonoidi su ekstrahovani po postupku opisanom u dijelu 3.10.1., nakon čega je uzorak profiltiran kroz mikrofiltere promjera 0,45 μm, i spreman za analizu na HPLC-u.

Razdvajanje identifikovanih komponenti je urađeno na koloni Zorbax Eclipse Plus C18 (75 × 4.6 mm, 3.5 μm) na temperaturi kolone od 40 °C. Mobilne faze koja su korišćene su: HPLC voda (u 0,2% mravljoj kiselini, mobilna faza A) i metanol (mobilna faza B). Postavljen je sledeći gradijent mobilnih faza po sledećem programu: 0 min, 5% B; 10 min, 20% B; 20 min, 50% B; 22 min, 99% B; 24 min, 99% B; 25 min, 5% B, pri protoku od 1 mL/min i injekcionom zapreminom od 10 μL. Detekcija jedinjenja je postignuta korišćenjem UV-Vis detektora (DAD) koji je snimao spektre u oblasti od 190 do 550 nm, pri čemu je svaki "run" sniman na 230, 270 i 340 nm. Kvantifikacija identifikovanih flavonoida je urađena metodom eksternih standarda na 340 nm, pri čemu su kao standardi korišćeni viteksin-2"-*O*-ksilozid i viteksin-6"-acetil-2"-*O*-ksilozid, za određivanje ove

dvije komponente u smješi, dok su druga dva flavonoida (viteksin-6"-malonil-2"-*O*-ksilozid i izoramnetin-3,7-*O*-diglukozid) kvantifikovana tentativno korišćenjem viteksin-*O*-ramnozida kao eksternog standarda.

3.13. Određivanje sadržaja nitrata u uzorcima blitve

Sadržaj nitrata je ispitivan u svježim uzorcima blitve tehnikom tačne hromatografije prema standardnoj metodi EN 12014-2:2017 (EN 12014-2:2017). Nakon što je blitva sa terena pripremljena prema postupku koji je opisan, odmjereno je oko 10 g uzorka svježe blitve u erlenmajeru od 500 mL. Potom je u erlenmajer dodato oko 400 mL vruće vode (zagrijana do oko 80 °C) i ostavljeno u ključalom vodenom kupatilu 15 min. Potom je erlenmajer ohlađen na sobnoj temperaturi, prebačen sadržaj u normalni sud od 500 mL, razblažen do crte i snažno promućkan. Potom je profiltriran kroz grubi filter papir (koji ne sadrži azot). Potom je profiltriran alikvot kroz mikrofilter (0,45 µm) za HPLC analizu. Sadržaj nitrata je analiziran na HPLC sistemu (Prominence LC-20AB, Shimadzu, Japan) sa PDA detektorom na talasnoj dužini 205 nm.

3.14. Mikrobiološke analize - Antibiogram test

Mikrobiološka aktivnost različitih uzoraka ekstrakta blitve je ispitivana antibiogram testom, metodom difuzije u agaru (Turnidge & Bell, 2005).

3.14.1. Uzorci blitve za pripremu ekstrakta blitve za mikrobiološku aktivnost

Uzorci blitve koji su testirani na mikrobiološku aktivnost su pripremljeni tako što su suvi homogenizovani uzorci blitve istih tretmana spajani, što će reći da budući da su za svaku varijantu tretmana bila po tri ponavljanja (ukupno 27), nakon spajanja istih tretana dobili smo 9 kompozitnih uzoraka tretirane blitve i plus 3 kontrolna uzorka. Od ovih uzoraka su pravljene metanolni ekstrakti (postupk 3.10.1.), u početnoj koncentraciji od 10 mg/ml.

Metanolni ekstrakti uzoraka blitve su zatim korišćeni u svrhu ispitivanja njihove mikrobiološke aktivnosti. Test mikroorganizmi koji su korišćeni za ovo ispitivanje su bakterijske kulture *Escherichia coli* (ATCC 25922) i *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698), kvasac *Candida albicans* (ATCC 24433) i plesan *Aspergillus niger*. Navedeni sojevi su za potrebe testa održavani na odgovarajućim čvrstim hranljivim podlogama na 4°C uz redovno presijavanje na svježe podloge. Za potrebe testa, od pomenutih sojeva napravljene su suspenzije mikroorganizama u fiziološkom rastvoru.

3.14.2. Podloge koje su korišćene za ispitivanje mikrobiološke aktivnosti

Podloge su pripremljene suspendovanjem odgovarajuće količine (sve korišćene podloge su komercijalno proizvedene u dehidratisanom stanju) u destilovanoj vodi, nakon čega su podloge sterilisane u autoklavu 20 minuta na 121°C.

3.14.2.1. Miler-Hintonov agar (MHA)

Miler-Hintonov agar je korišćen za praćenje rasta kultura *Escherichia coli* i *Micrococcus lysodeikticus*. Korišćena je Torlakova podloga sledećeg sastava, g/L:

Kazein hidrolizat	17,5
Mesni ekstrakt	3,0
Skrob	1,5
Agar	16,0.

Razlivena je MHA podloga u Petrijevu šolju kao dvoslojni agar, na način da je prvo usut jedan dio otopljene podloge koji je ostavljen da se ohladi. Potom je dodato 100 µL suspenzije korišćenih sojeva praćeno razlivanjem drugog prohlađenog sloja podloge.

3.14.2.2. Saburo dektrozni agar (SDA)

SDA je podloga je korišćena za praćenje rasta *Candida albicans*. Korišćena je Torlakova podloga sledećeg sastava, g/L:

Pepton Torlak	10,0
Dekstroza	40,0
Agar	15,0.

U Petrijevu šolju je dodato 100 μ L suspenzije soja *Candida albicans* i potom je razlivena prohladena SDA podloga (ohladna na oko 45-50 °C).

3.14.2.3. Krompir-glukozni agar (PDA)

PDA podloga je korišćena za rast *Aspergillus niger*. Korišćena je komercijalna podloga sledećeg sastava, g/L:

Dekstroza	20,0
Ekstrakt krompira	4,0
Agar	15,0.

Slično kao i prethodno, podloga je razlivena u Petrijevu šolju, nakon hlađenja i potom dodata suspenzija *Aspergillus niger* (proizvoljno).

3.14.3. Postupak testa difuzije u agaru

Nakon izlivanja podloga u Petrijeve šolje i zasijavanja mikroorganizama podloge su ostavljene da očvrstnu. Kada su agarne ploče očvrstnule, na agarnim pločama su bušačem (sterilni uslovi) napravljeni otvori prečnika 10 mm u koje se unosi 100 μ L odgovarajućeg ekstrakta blitve (10 mg/mL). Potom su Petrijeve šolje ostavljene u frižideru (na +4 °C) oko 2h, i onda su prebačene u termostat na odgovarajućim temperaturama, za bakterije (MH podloga) na 37°C, za *C. albicans* (SDA podloga) i plesni *A. Niger* (PDA podloga) na 28 °C.

Nakon 24 h su pregledani rezultati za bakterije, a nakon 48 h za sojeve *Candida albicans* i *Aspergillus niger*.

3.15. Antiproliferativna aktivnost

3.15.1. Uzorci i korišćeni biološki materijal za ispitivanje proliferativne aktivnosti

Od osušenih uzoraka (postupak pripreme biljnog materijala) napravljen je kompozitni uzorak od svih tretmana blitve. Osim kompozitnog uzorka korišćen je i uzorak blitve koji nije tretiran (N0D0). Napravljeni su metanolni ekstrakti od ova dva uzorka, na način kako je ranije opisano (postupak 3.10.1.), i praćen je efekat ovih ekstrakata na proliferaciju korišćenih ćelijskih linija. Ekstrakti blitve su označeni kao netretirani i tretirani.

Napravljene su serije razblaženja metanolnih ekstrakta u 0,9% NaCl da bi se dobile radne koncentracije u opsegu 3,125 do 50 μ g/mL. Razblaženja su profiltrirana kroz sterilne mikrofiltere promjera 0,22 μ m i korišćena za ispitivanje efekta na proliferaciju odabranih ćelijskih linija. Finalne koncentracije su bile 10 puta manje od radnih koncentracija, što je postignuto dodatkom ekstrakcionog rastvora u eksperimentalnim otvorima mikrotitar ploča sa 96 otvora. Za praćenje ćelijske proliferacije usled prisustva metanolnog ekstrakta blitve, korišćene su komercijalno dostupne humane kontinuirane ćelijske linije i to: ćelije adenokarcinoma dojke MCF-7 (ATCC CRL 3435) i ćelije adenokarcinoma debelog crijeva HT-29 (ATCC HTB 38).

3.15.2. Priprema ćelija

Ćelije su rasle zalijepljene za podlogu kao jedan sloj ćelija ("monolayer"), u medijumu za kulturu ćelija - DMEM sa dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma, 2 mM glutamina, penicilina (100 IJ/ml) i streptomocina (100 µg/mL). Ćelijske linije su održavane u sudovima za kulturu na 37 °C, u atmosferi sa 100% vlažnosti i 5% CO₂. Presijavane su dva puta nedeljno u koncentraciji 50000-100000 ćelija/ml, pri čemu se jednoćelijska suspenzija dobija sa 0,1% tripsinom u 0,04% EDTA.

3.15.3. Metode korišćene u eksperimentu ispitivanja antiproliferativne aktivnosti ekstrakta blitve

3.15.3.1 DET test

Broj ćelija i njihova vijabilnost određeni su testom odbacivanja boje sa 0,1% tripan plavim po metodi Strobera (Strober, 2001). Metoda bojenja se zasniva na činjenici da tripan plavo ulazi u ćeliju ukoliko je narušen integritet ćelijske membrane. Pri tome se mrtve ćelije boje u plavo, pa je na ovaj način moguće razlikovati žive od mrtvih ćelija pod svjetlosnim mikroskopom.

Postupak rada: Ćelijska suspenzija (50 µl) je razblažena sa (200 µl) 0,5% rastvora tripan plavog u fiziološkom rastvoru i ćelije su za manje od 3 minuta brojane u hemocitometru na invertnom mikroskopu (Reichert Jung). Broj ćelija u 1 mL ćelijske suspenzije izračunat je prema sledećoj formuli, uzimajući u obzir dimenzije komore i razblaženje: $N = N_0 \times 10^4 \times 5$, gdje je N ukupan broj živih ćelija u 1 mL suspenzije, N₀ je broj živih ćelija izbrojan po kvadratu komore hemocitometra, 5 je faktor dilucije, 10⁴ korekcionni faktor.

Procent vijabilnosti ćelija je izračunat prema sledećoj formuli: $V(\%) = (N_0/N_0+M_0) \times 100$, gdje je M₀ broj mrtvih ćelija izbrojan po kvadratu komore hemocitometra.

3.15.3.2. SRB test

Indukovana citotoksičnost tretiranog i netretiranog ekstrakta blitve je mjerena SRB – sulforodamin B testom prema metodi Shekan-a (Skehan et al., 1990). Princip metode se sastoji da u uslovima slabo kisele sredine, SRB boja se veže za proteinske aminokiselinske ostatke i obezbjeđuje senzitivni indeks sadržaja ćelijskih proteina.

Ćelije su sakupljene u logaritamskoj fazi rasta, istaložene centrifugiranjem (10 min na 200 × g) i izbrojane u 0,1% tripan plavom (DET test). Vijabilne ćelije su posijane u oktoplikatu u mikrotitar ploče sa 96 otvora, tako da je u 180 µL medijuma sa 10% FCS bilo po 10 000 ćelija (za 24 h vremenskog tretmana), odnosno 4000 ćelija (za 48 h vremenskog tretmana). Ploče sa zasijanim ćelijama ostavljene su u termostatu na 37 °C, sa 5% CO₂ naredna 24 časa. Po isteku inkubacije, u sve otvore osim kontrolnih dodato je po 20 µL odgovarajućih koncentracija tretiranih i netretiranih ekstrakata i inkubacija je nastavljena pod istim uslovima u toku 24 i 48 h. Nakon završene inkubacije ćelije su fiksirane dodatkom 50 µL 50% TCA po jednom otvoru ploče. Ćelije su ostavljene 1h na +4 °C i četiri puta isprane destilovanom vodom (da bi se uklonili proteini seruma, medijum i lakši metaboliti). Ćelije su bojene pomoću 0,4% rastvora SRB u 1% sirćetnoj kiselini. Nakon 30 minuta višak boje je ispran 1% sirćetnom kiselinom. Ploče su zatim osušene na vazduhu. Boja je neposredno pred merenje ekstrahovana TRIS puferom (200 µL 10 mmol/dm³, pH=10,5). Apsorbanca je mjerena spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj od 690 nm. Kao kontrola pri očitavanju rezultata korišćene su ćelije bez dodatka ispitivane supstance. Slijepa proba bio je rastvor medijuma bez ćelija ("blank").

Procentat preživljavanja ćelija je izražen procentom prema formuli: $\% = (A_s/A_k) \times 100$, pri čemu je A_k apsorbanca kontrolnih uzoraka, a A_s apsorbanca testiranih uzoraka.

3.16. Statistička analiza

Rezultati svih analiza su izražene kao srednja vrijednost \pm SD (standardna devijacija). Podaci su obrađeni korišćenjem SPSS programa (SPSS v23 (Armonk, New York)). Značajne razlike između srednjih vrijednosti za varijante različitog nivoa navodnjavanja i đubrenja (bez kontrola) utvrđene su dvosmjernom ANOVA-om i Dankanovim testom za nivo $p \leq 0,05$. Pirsonova linearna korelacija predstavljena je koeficijentom korelacije i stepenom značajnosti.

4. Rezultati i diskusija

U okviru ove disertacije gajena je blitva u različitim režimima navodnjavanja i prihrane. Određeni su osnovni fizičko-hemijski parametri zemljišta, na kojem je blitva gajena u različitim režimima prihrane i navodnjavanja. Nakon što je blitva prispjela za uzorkovanje, obavljena su terenska mjerenja koja su podrazumjevala mjerenja prinosa blitve, mjerenje morfoloških karakteristika blitve i mjerenje sadržaja indeksa hlorofila. Potom su rađene laboratorijske analize osnovnih nutritivnih i pojedinih fitonutritivnih komponenti, kao i antioksidativni testovi u različito tretiranim uzorcima blitve. Urađena je analiza, za blitvu karakteristične antinutritivne komponente, tj. analiza nitrata u različito tretiranim uzorcima blitve. Potom su metanolni ekstrakti ispitivani antioksidativnim testovima (DPPH i ABTS test). Dalje je analizom polifenola u blitvi identifikovano prisustvo četiri flavonoidne komponente u metanolnom ekstraktu blitve, koje su potom izolovane i njihove strukture potvrđene snimanjem 1D i 2D NMR spektara. Istovremeno, za sve pomenute analize i analizirane parametre (morfološke, nutritivne, fitonutritivne, antioksidativne) različito tretirane blitve je urađena statistička analiza da bi se utvrdilo da li različiti režimi prihrane, navodnjavanja i ukrštene interakcije ove dvije agrotehničke mjere imaju uticaja na testirane parametre i na koji način.

Potom je, osim gore pomenutih antioksidativnih aktivnosti, ispitivana mikrobiološka i antiproliferativna aktivnost metanolnih ekstrakata kompozitnih uzoraka blitve, u cilju utvrđivanja potencijalnih zdravstvenih benefita blitve, i eventualno razmatranja blitve kao funkcionalne hrane.

4.1. Rezultati mjerenja fizičko-hemijskih osobina zemljišta

Prije nego su primijenjene agrotehničke mjere popravke zemljišta za potrebe ove studije, zemljište je uzorkovano u cilju određivanja osnovnih fizičko-hemijskih parametara. Osim što su fizičko-hemijski parametri zemljišta važni za primjenu agrotehničkih mjera, oni mogu da ukažu i objasne pojedine rezultate za analizirane parametre biljke (blitve).

Dobijeni rezultati fizičko-hemijskih mjerenja u prosječnim uzorcima zemljišta za svaku eksperimentalnu parcelu prikazani su u Tabeli 4.1.

Tabela 4.1 Fizičko-hemijski parametri uzoraka zemljišta na kojem je uzgajana blitva za ovu studiju, prikazano prema tretmanima koji su primjenjeni za potrebe ovog doktorata.

Tretman	pH	pH	EC	Humus	P ₂ O ₅	K ₂ O	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Cu
	H ₂ O	KCl	μS/cm	%	mg/100 g				mg/kg			
N0Đ100	5,6	5,1	48,4	5,0	5,9	24,1	179,7	13,9	39,8	21,1	2,4	15,0
N100Đ0	5,6	5,0	32,6	4,7	5,6	22,8	186,4	13,0	42,4	19,6	1,8	14,6
N0Đ0	5,7	5,1	43,7	5,1	5,9	36,6	179,1	13,5	38,4	21,2	2,7	19,9
1N50Đ50	5,8	5,0	68,4	4,2	7,1	23,6	165,8	9,8	38,9	12,4	1,4	11,6
2N50Đ50	5,6	5,0	61,2	5,3	6,7	36,6	187,7	13,4	40,4	19,7	1,9	14,6
3 N50Đ50	5,7	5,1	63,3	5,0	6,6	48,0	178,9	13,8	36,4	15,9	1,7	11,7
1N50Đ100	5,8	5,2	77,7	4,4	7,8	24,0	162,7	10,0	37,2	12,44	1,8	12,3
2 N50Đ100	5,5	5,0	95,2	4,6	7,5	25,1	178,5	11,8	41,2	16,2	1,7	13,0
3 N50Đ100	5,8	5,2	94,6	5,2	6,8	36,6	177,4	11,5	35,4	10,3	1,3	11,3
1N50Đ150	5,4	4,8	76,4	4,3	6,8	23,4	150,9	11,0	41,6	11,6	1,4	11,5
2N50Đ150	5,6	5,0	84,0	5,54	6,7	34,7	160,1	10,8	37,4	15,4	1,5	12,1
3N50Đ150	5,5	5,0	75,3	5,1	7,8	38,5	171,4	13,5	35,9	17,8	1,5	12,8

Tretman	pH H ₂ O	pH KCl	EC μS/cm	Humus %	P ₂ O ₅	K ₂ O	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Cu
					mg/100 g				mg/kg			
1N100Đ50	5,8	5,3	61,2	4,5	7,8	23,6	177,3	11,2	40,0	12,9	1,7	12,1
2N100Đ50	5,5	4,9	80,0	4,8	8,1	36,6	171,5	12,6	40,6	17,3	1,7	12,7
3 N100Đ50	5,7	5,0	54,5	4,7	6,1	24,1	170,5	11,9	35,9	13,0	1,7	12,3
1N100Đ100	5,7	5,0	109,4	4,2	9,2	25,3	165,8	10,1	37,9	13,25	1,64	12,0
2 N100Đ100	5,70	5,0	67,2	4,2	6,3	23,6	189,6	12,8	41,3	17,5	1,5	13,4
3 N100Đ100	5,7	5,1	86,1	5,3	6,2	38,5	185,4	12,8	36,2	12,9	1,4	11,2
1N100Đ150	5,7	5,0	73,8	3,9	7,0	25,0	149,9	10,11	42,8	14,8	1,7	11,8
2N100Đ150	5,6	5,0	84,0	5,5	6,7	34,7	160,1	10,8	37,4	15,4	1,5	12,1
3N100Đ150	5,5	5,0	75,3	5,1	7,8	38,5	171,4	13,5	35,9	17,8	1,5	12,8
1N150Đ50	5,5	4,9	70,2	4,5	7,0	24,9	173,2	12,1	39,2	12,9	1,5	11,7
2N150Đ50	5,7	5,1	81,8	5,0	5,6	38,5	168,3	11,6	36,0	11,7	1,4	11,4
3 N150Đ50	5,8	5,1	46,3	4,6	7,5	38,5	176,5	12,8	36,2	16,6	1,5	14,1
1N150Đ100	6,5	5,8	85,4	4,5	13,0	33,2	198,7	13,5	39,5	15,9	2,4	15,0
2 N150Đ100	5,5	4,8	77,6	4,5	6,6	21,7	158,3	11,1	43,0	14,6	1,8	13,6
3 N150Đ100	5,7	4,9	81,0	4,40	6,8	40,4	172,24	11,8	36,0	13,5	1,5	11,3
1N150Đ150	5,6	5,0	82,1	4,5	7,6	29,5	167,8	11,4	40,3	14,6	1,7	11,3
2N150Đ150	5,7	5,0	131,5	5,1	9,2	36,6	195,2	13,3	36,2	14,7	1,7	12,9
3N150Đ150	5,5	4,9	83,6	4,8	8,3	34,7	167,1	12,5	37,0	21,6	1,7	12,5

Kako se iz Tabele 4.1 može vidjeti, zemljište na kojem je gajena blitva za potrebe ovog eksperimenta, ima pH vrijednost u opsegu od 5,4 do 5,8, mjereno u vodenom ekstraktu, odnosno u kalijum-hloridnom ekstraktu zemljišta pH je bilo u opsegu 4,8-5,3. Na osnovu klasifikacije zemljišta prema Thun-u, ovo zemljište se klasifikuje kao kiselo do slabo kiselo (Manojlović & Čabilovski, 2020).

Provodljivost zemljišta, koja reflektuje koncentraciju soli u zemljištu i time ukazuje na salinitet zemljišta, kretala se od 32,6-131,5 μS/cm (3,3-13,1 mS/m). Niske vrijednosti električne provodljivosti za ovo zemljište ukazuju da zemljište nije zaslanjeno (Simons J. & Bennett D., 2022), što je i očekivano s obzirom da dugo godina zemljište nije obrađivano, tj. đubreno. Međutim, slične vrijednosti električne provodljivosti nađene su za zemljište sa istog podneblja, u studiji Topalović i saradnici, gdje je električna provodljivost zemljišta na kome je gajena blitva, imala maksimalnu vrijednost od 163,3 μS/cm (Topalovic et al., 2018). Naime, blitva je i halofitna biljka, što znači da raste u zemljištu koje ima veće koncentracije soli (Kaburagi et al. 2014; Liu et al., 2013), što samo potvrđuje njenu „fleksibilnost“ u pogledu uslova rasta.

Količina humusa kao specifične organske materije, određena je brojnim faktorima poput bio-mase, klime, vlažnosti zemljišta i načina njegovog korišćenja (Powlson et al., 2013). Količina humusa u zemljištu na kom je sprovedena ova studija je prilično ujednačena u svim parcelama; minimalna vrijednost je bila 3,9, maksimalna 5,5% (Tabela 4.1). Na osnovu klasifikacije zemljišta prema sadržaju humusa po Šeper Šahtšabel-u (Manojlović & Čabilovski, 2020), zemljište koje sadrži

dobijene procenete humusa smatra se zemljištem koje je bogato do veoma bogato organskom materijom, odnosno umjereno do jako humozno (Topalovic et al. 2018; Džamic i sar., 1996). Sadržaj nutrijenata u zemljištu, koji su potrebni za rast biljke, kako se može vidjeti iz Tabele 4.1, ukazuje na prilično ujednačen hemijski sastav tj. plodnost zemljišta za sve parcele. Dobijene vrijednosti za lakopristupačni fosfor i kalijum su redom imale sledeće opsege: 5,6-13,0 mg P₂O₅/100 g odnosno 22,8-48,0 K₂O mg/100g zemljišta. Klasifikacija ispitivanog zemljišta na osnovu lakopristupačnog fosfora i kalijuma spada u zemljište niskog do srednje siromašnog u pogledu lakopristupačnog fosfora, odnosno dobro obezbeđeno do ekstremno obezbeđeno zemljište u sadržaju lakopristupačnog kalijuma (Manojlović & Čabilovski, 2020). Sadržaj ostalih ispitivanih elemenata u zemljištu je takođe bio manje-više ujednačen (Tabela 4.1) u svim uzorcima zemljišta. Sumirano, možemo zaključiti da su vrijednosti ispitivanih nutrijenata u zemljištu bile srednje do visoke. Sličan sadržaj nutrijenata je nađen u zemljištu koji je po tipu i podneblju bio blizak sa zemljištem koje se koristilo u ovoj studiji i na kome je takođe bila gajena blitva. Znatna razlika je bila u sadržaju kalcijuma, koji je u studiji Topalović i saradnici bio u opsegu od 698 do 2266 mg/100 g zemljišta (Topalovic et al., 2018). Zabilježena razlika je vjerovatno posledica zemljišta koje je bogatije kalcijum karbonatom, što ukazuje i pH zemljišta koje je u pomenutoj studiji imalo neutralnu do blago alkalnu rekaciju (Topalovic et al., 2018).

4.2. Rezultati terenskog mjerenja i statistička analiza prinosa, morfoloških parametara i indeksa sadržaja hlorofila

Prinos, morfološki parametri i indeksni sadržaj hlorofila uzgajane kulture su pokazatelji rasta i razvoja gajenog usjeva. Ovi parametri takođe mogu ukazati na eventualno patološko stanje biljke kao i na stepen razvoja odnosno stadijum razvića uzgajane biljne kulture.

U Tabeli 4.2 su prikazani parametri rasta blitve mjereni na terenu: prinos, prosječna dužina lista, prosječan broj listova i indeks sadržaja hlorofila u blitvi kao i statistički rezultati efekta različite prihrane i navodnjavanja na pomenute parametre.

Rezultati statističkog ispitivanja efekta različite primjene NPK prihrane na parametre rasta, pokazali su uticaj na prinos, dužinu lista, broj listova i indeksni sadržaj hlorofila ispitivane blitve ($p \leq 0,05$), dok efekti različitog navodnjavanja i ukrštene interakcije prihrane i navodnjavanja nisu pokazali da imaju statističkog značaja. Za prinos, dužinu lista, broj listova i indeksni sadržaj hlorofila nađeno je da je tretman sa povećanom količinom NPK prihrane (Đ150) imao statistički veću vrijednost od optimalnog odnosno redukovano tretmana NPK prihrane (Đ100 i Đ50). Nije bilo značajne razlike između tretmana Đ100 i Đ50, posmatrajući ove parametre.

Primjena osnovnih nutrijenata za biljku kroz primjenu NPK prihrane utiče na rast biljke, njenu morfologiju, prinos i sastav (Ullah et al., 2016). Azot je esencijalan za brojne procese koji omogućavaju rast biljke, sintezu hlorofila, amino kiselina itd.; Kalijum pomaže u regulaciji biljnog metabolizma; Fosfor je ključan za metaboličke procese koji uključuju transfer energije iz jedne tačke biljke u drugu i takođe je važan za proces cvjetanja biljke (Hopkins & Huner, 2008).

Prinos koji je dobijen za različite tretmane blitve je imao srednje vrijednosti od 0,81 do 1,47 kg/m², pri čemu je najveća srednja vrijednost dobijena za tretman N100Đ150 dok je najmanja srednja vrijednost nađena sa parcela koje su tretirane N50Đ50. U studiji Miceli i saradnika najveći prinos od 7,3 kg/m² dobijen je kada je aplikovano 200 kg/ha azota (Miceli & Miceli, 2014), dok su Kolota i saradnici našli najveći prinos pri aplikaciji 150+50 kg N/ha, od 46,02 tona/ha, tj. 4,6 kg/m² (Kolota & Czerniak, 2010).

Prosječna dužina lista za primjenjene tretmane je bila u granicama srednjih vrijednosti od 20,9 cm do 33,7 cm a najveće srednje vrijednosti su dobijene za tretmane u kojima je prihrana bila aplikovana u količinama 50% većim od optimalnih (Đ150). Trend rasta površine lista blitve sa povećanjem količine azota u primjenjenim azotnim prihranama, takođe je nađen i u studiji Eengelbrehta i saradnika, gdje je najznačajni porast zabilježen prilikom primjene uree kao izvor

azota u količinama od 0 do 800 kg N/ha, kada je površina lista porasla sa 68 na 2976 cm² (Engelbrecht et al., 2010).

Iz Tabele 4.2 se vidi da je prosječan broj listova blitve bio najveći za tretmane prihrane koje su sadržale 50% veće količine azota od optimalnih (Đ150). Porast broja listova po biljci nakon povećanja primjene azotnog đubriva je zabilježen i u drugim studijama, gdje su tretmani od 100, 150 i 200 kg N/ha dali broj listova oko 21, tj. za 6 više od kontrolnih uzorak (Miceli & Miceli, 2014), odnosno povećanje nivoa azota od 300 do 800 kg/ha je značajno povećao prosječan broj listova po biljci (sa 17,5 na 36) (Engelbrecht et al., 2010).

Indeksni sadržaj hlorofila u uzorcima tretirane blitve nađen je u opsegu od 17,1 do 23,7, dajući najveću vrijednost za tretman N50Đ150 (Tabela 4.2). Mjerenje indeksa hlorofila *in situ* je veoma koristan podatak budući da su rast i produktivnost biljke proporcionalne koncentraciji hlorofila, tj. aktivnosti hloroplastnih pigmenata, što može da posluži za praćenje fiziološkog statusa biljke (Pal et al., 2012; Perez-Galvez et al., 2018). Indeks sadržaja hlorofila je u ovoj studiji mjeren u cilju ispitivanja eventualne korelacije sa dugim komponentama u blitvi koje su određene, o čemu će biti riječi kasnije u tekstu.

Očekivano je da se poboljšanje rasta biljke postize praćenjem parametara rasta poput prinosa, morfoloških karakteristika, nekih fizioloških parametara, kroz prihranu koja će sadržati osnovne nutrijente (N, P, K) (Kolota et al., 2010; Erwin & Gesick, 2017; Motseki, 2008; Xu et al., 2020; Zhou et al., 2011; Miller et al., 2012; Miceli & Miceli, 2014; Engelbrecht et al., 2010; Echer et al., 2012). Stoga su dobijeni rezultati u pogledu uticaja prihrane na parametre prinosa i morfologije blitve očekivani, budući da N, P, K imaju vitalnu ulogu u rastu, razvoju i prinosu biljnih kultura (Ullah et al., 2016). Rezultati drugih studija koje su pratile efekat fertilizacije povećanjem količine azota su pokazala slično, tj. da se povećanjem količine azota u prihrani povećava prinos, površina lista, broj listova, svježa i suva masa lista i drugi parametri rasta (Miceli & Miceli, 2014; Engelbrecht et al., 2010; Kolota & Czerniak, 2010). Tako je nađeno da povećanje količine azota u đubrivu u vrijednostima iznad 100 kg/ha (Miceli & Miceli, 2014), odnosno do vrijednosti od 800 kg/ha (Engelbrecht et al., 2010) dovodi do povećanja prinosa i morfoloških karakteristika blitve.

Tabela 4.2 Prikaz podataka prinosa, indeksa hlorofila i morfoloških parametara blitve sa terenskog mjerenja za tretmane blitve i statistički podaci dvovarijantne ANOVA (Đ vrijednosti za prihranu, N vrijednost za navodnjavanje i ukrštene interakcije Đ×N).

Tretman	Prinos (kg/m ²)	Prosječna dužina lista (cm)	Prosječan broj listova	CCL
Kontrole				
N0Đ0	0,32±1,25	20,90±1,38	3,20±0,34	21,60±0,27
N100Đ0	0,38±1,67	23,10±1,98	4,20±0,54	25,40±1,11
N0Đ100	0,52±1,62	22,20±2,19	3,90±1,13	40,20±0,35
Tretmani				
N50Đ50	0,81±1,40	27,20±0,95	4,33±0,68	17,10±2,00
N100Đ50	0,97±2,27	29,80±3,12	4,67±0,74	20,50±1,06
N150Đ50	0,90±1,33	29,30±1,01	4,33±0,30	18,77±2,94
N50Đ100	1,07±1,30	30,00±0,89	5,67±1,11	22,37±1,10
N100Đ100	0,98±1,18	28,97±1,60	5,13±0,40	19,33±0,86
N150Đ100	1,29±3,98	30,33±1,76	5,50±0,26	17,73±1,46
N50Đ150	1,37±2,22	33,00±0,36	7,33±1,99	23,70±2,31
N100Đ150	1,47±3,94	31,87±2,58	7,77±1,74	23,27±3,06
N150Đ150	1,46±3,90	33,70±1,82	7,30±1,87	20,90±1,80

Tretman	Prinos (kg/m ²)	Prosječna dužina lista (cm)	Prosječan broj listova	CCL
ANOVA				
Đubrenje (Đ)	10,396*	13,013*	14,734*	8,757*
Navodnjavanje (N)	0,624	0,917	0,169	1,836
Đ×N	0,518	1,101	0,169	2,231

Podaci su izraženi kao srednja vrijednost±SD (standardna devijacija) koja potiče od tri mjerenja za isti tretman sa različitim parcela, dok su kontrole prikazane kao srednja vrijednost±SD triplikata iz iste parcele (n=3). CCL-indeks hlorofila; *značajno za p≤0,05.

4.3. Rezultati proksimativne analize u blitvi

Makronutrijenti su komponente hrane koje su esencijalne za ljudsku ishranu, jer makronutrijenti daju energetska vrijednost hrane. U makronutrijenete se ubrajaju proteini, ugljeni hidrati, lipidi. Proksimativna analiza blitve je urađena da bi se dobili podaci o sadržaju ukupnih proteina, ukupnih lipida, sadržaju pepela, vlage i ugljenih hidrata. Ukupni ugljeni hidrati (bez celuloze) su određeni kao razlika zbira higroskopne vode, pepela, sirovih proteina, ukupnih lipida i ukupne celuloze (ukupna nerastvorna vlakna) do 100% .

Rezultati proksimativnih analiza komponenti različito tretiranih uzoraka blitve kao i energetska sadržaj je prikazan u Tabeli 4.3. Sadržaj vlage u uzorcima blitve je najdominantniji i ima srednju vrijednost svih tretmana 88,91 g/100 g svježe blitve, što su vrijednosti koje su nešto niže od vrijednosti dobijenih iz baze podataka USDA 92,66 g/100 g SB (USDA, 2017), odnosno iz druge studije blitve gdje je sadržaj vlage bio 93,35 g/100 g SB (Mzoughi et al., 2019).

Ukupni šećeri su drugi glavni konstituenti nađeni u uzorcima blitve (Tabela 4.3), pri čemu je sadržaj srednjih vrijednosti bio od 4,65 g/100 g (I0F100) do 6,84 g/100 g (I100F0). Dobijena srednja vrijednost za ukupne šećere je nešto veća od vrijednosti iz USDA baze od 3,74 g/100 g svježe blitve (USDA, 2017), odnosno veća i od 2,16 g/100 g SB, objavljene u drugoj studiji divlje blitve (Mzoughi et al., 2019).

Sadržaj pepela u uzorcima je prilično ujednačen među testiranim uzorcima sa srednjim vrijednostima među istim tretmanima koje su bile u opsegu od 1,78 g do 1,92 g na 100 g SB. Sadržaj pepela je direktno povezan sa ukupnim sadržajem minerala (mako- i mikroelemenata), i nešto veće vrijednosti su određene nego što je to zabilježeno u drugim studijama blitve, u kojima je prijavljen sadržaj pepela od 1,30 g /100 g SB (Mzoughi et al., 2019). Blitva ima visok sadržaj pepela i poput drugih vrsta iz grupe GLVs smatra se odličnim izvorom makro- i mikroelemenata zbog visokog kapaciteta ove grupe povrća da ih akumulira (Natesh et al., 2017).

Svi uzorci blitve iz ove studije imali su ukupan sadržaj lipida manji od 0,45 g /100 g svježe blitve. Nizak sadržaj ukupnih lipida je zabilježen i u drugim sličnim studijama (Mzoughi et al., 2019; USDA, 2017).

U pogledu sadržaja ukupnih proteina, najveći sadržaj je pronađen za tretman blitve N50Đ150 - gdje je srednja vrijednost bila 2,75 g/100 g SB, što je veća vrijednost od one nađene u USDA bazi podataka (1,8 g/100 g SB)(USDA, 2017), odnosno znatno viši sadržaj od vrijednosti za divlju blitvu 0,6637 g/100 g SB (Mzoughi et al., 2019). Veći saržaj ukupnih proteina u blitvi iz ove studije je očekivan, budući da je blitva koja je imala najveću srednju vrijednost za tretman N50Đ150 od svih tretmana tretirana prihranom 50% većom od optimalne.

Energetska vrijednost testirane blitve je u opsegu od 105,37 do 136,75 kJ. Veća energetska vrijednost testirane blitve u odnosu na podatke USDA, gdje je energetska vrijednost blitve 79 kJ (USDA, 2017), je posledica većeg sadržaja proteina, šećera i lipida u testiranoj blitvi.

Srednja vrijednost sirovih vlakana (ukupne celuloze) u testiranim uzorcima blitve je 0,77 g/100 g SB, što je nešto niže u odnosu na podatke USDA (1,6 g/100 g SB)(USDA, 2017), odnosno znatno

niže od vrijednosti koje su objavili Mzoughi i saradnici 2,43 g/100 g SB (Mzoughi et al., 2019). Preporuka je da se na dnevnom nivou unese oko 7 g biljnih vlakana da bi se smanjio rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti (Barreira et al., 2017). U tom smislu konzumiranje 100 g svježe blitve iz ove studije bi zadovoljilo oko 15% preporučene dnevne doze biljnih vlakana.

Uočene razlike u pogledu sadržaja makronutrijenata dobijeni proksimativnom analizom različito tretirane blitve se mogu objasniti različitim faktorima koji utiču na sastav blitve, poput sorte (genetski faktori), perioda kada je blitva ubrana i uslova u kojima je blitva gajena (klima, tip i sastav zemljišta, navodnjavanje, đubrenje) (Miceli & Miceli, 2014; Gruda, 2005; Engelbrecht et al., 2010; Topalovic et al., 2018; Abdulmalek et al., 2017). Blitva je u pogledu makronutrijenata veoma pogodna namirnica da se uvrsti u svakodnevnu ishranu, jer sadrži nisku kaloričnu vrijednost a dobar je izvor osnovnih makronutrijenata i vlakana.

4.3.1. Statistički rezultati efekta različite prihrane i navodnjavanja na sadržaj komponenti iz proksimativne analize

Statistički rezultati proksimativne analize sadržaja blitve iz Table 4.3 nisu pokazali statistički značajnu razliku u pogledu različitih tretmana navodnjavanja i prihrane, kao ni na interakciju $\text{Đ} \times \text{N}$ ($p > 0,05$), osim u slučaju ukupnog sadržaja proteina. Naime, različiti tretmani prihrane su imali efekta na ukupni sadržaj proteina u blitvi (Tabela 4.3). Povećanje količine primjenjenog đubriva povećalo je sadržaj proteina u blitvi. Kako je napomenuto, azot je esencijalni element za rast i produktivnost biljke i neophodan je za sintezu proteina, između ostalih njegovih uloga u rastu i razvoju biljke (Ueda et al., 2017). Uticaj povećanog đubrenja na sadržaj proteina u blitvi je očekivan, budući da rast biljnih kultura zavisi od prisustva dostupnog azota u zemljištu (Wang et al., 2008). Slična zapažanja su uočili i drugi istraživači koji su našli da je sadržaj ukupnog azota u blitvi bio veći kada je primjenjena prihrana koja je sadržala 100 kg N/ha nego kada je aplikovano 50 kg N/ha (Kolota et al., 2010), odnosno da povećanje azota u prihrani povećava sadržaj ukupnog azota (time i proteina) u blitvi (Hailay & Haymanot, 2019).

Tabela 4.3 Rezultati proksimativne analize različito tretirane blitve i rezultati dvovarijantne ANOVA (Đ vrijednosti za prihranu, N vrijednost za navodnjavanje i ukrštene interakcije $\text{Đ} \times \text{N}$).

Tretman	Vlaga g/100g SB	Pepeo g/100g SB	Proteini g/100g SB	Lipidi g/100g SB	Sirova vlakna g/100g SB	Ukupni šećeri g/100g SB	Energija (kJ)
Kontrole							
I0F0	89,47±0,82	1,91±0,06	1,93±0,13	0,45±0,04	0,62±0,11	5,62±0,63	136,75±0,25
I100F0	88,21±1,20	1,87±0,06	1,89±0,06	0,45±0,05	0,74±0,15	6,84±1,23	109,12±0,46
I0F100	90,21±0,60	1,80±0,11	2,41±0,09	0,37±0,04	0,56±0,06	4,65±0,60	118,50±0,38
Tretmani							
I50F50	88,38±0,94	1,87±0,13	2,26±0,10	0,41±0,03	0,73±0,12	6,35±1,19	133,21±3,17
I100F50	89,72±0,62	1,91±0,06	2,31±0,14	0,41±0,02	0,65±0,05	5,00±0,54	105,37±1,85
I150F50	89,06±0,97	1,91±0,05	2,33±0,14	0,38±0,06	0,67±0,25	5,65±0,98	120,96±3,23
I50F100	88,89±0,81	1,85±0,04	2,51±0,12	0,36±0,06	0,72±0,05	5,67±0,67	112,21±2,95
I100F100	88,44±1,30	1,81±0,08	2,35±0,06	0,38±0,08	0,77±0,35	6,25±1,29	131,50±4,25
I150F100	89,61±0,59	1,83±0,08	2,31±0,09	0,36±0,03	0,64±0,03	5,25±0,64	113,71±1,75
I50F150	87,95±1,40	1,92±0,09	2,75±0,05	0,31±0,03	0,76±0,07	6,31±1,33	133,67±5,04
I100F150	88,77±0,18	1,78±0,03	2,63±0,15	0,36±0,03	0,59±0,11	5,87±0,05	126,29±0,74
I150F150	88,20±0,81	1,88±0,08	2,63±0,14	0,38±0,04	0,68±0,06	6,23±0,93	131,83±3,14

ANOVA							
Tretman	Vlaga g/100g SB	Pepeo g/100g SB	Proteini g/100g SB	Lipidi g/100g SB	Sirova vlakna g/100g SB	Ukupni šećeri g/100g SB	Energija (kJ)
Đ	1,814	1,663	25,585*	1,918	1,148	0,532	-
N	1,133	1,129	1,444	0,984	0,502	0,611	-
Đ×N	1,186	1,097	1,266	0,431	0,357	1,146	-

Podaci su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD koja potiče od tri mjerenja za isti tretman sa različitih parcela, dok su kontrole prikazane kao srednja vrijednost \pm SD triplikata iz iste parcele (n=3). *statistički značajno za $p \leq 0,05$.

4.4. Rezultati makro- i mikroelemenata u tretiranoj blitvi

Minerali su nutrijenti koji su neophodni za brojne biokemijske i fiziološke procese u živim organizmima. Uloga minerala može biti strukturna (ulaze u strukturu tkiva- kosti, krv i sl.), ili regulatorna (održavaju normalnu funkciju ćelija- npr. transport kroz ćelijsku membranu, ulaze u strukturu regulatornih enzima, gdje imaju važnu ulogu u njihovoj aktivnosti kao kofaktori) (Fraga, 2005; Hansch & Mendel, 2009). U zavisnosti od količine u ljudskom organizmu, dijelimo ih na makroelemente, koji su prisutni u većim količinama i mikroelemente koji su prisutni u malim količinama tj. u tragovima. Blitva se smatra odličnim izvorom i jednih i drugih minerala, posebno Fe, Mn, Mg, K (Bozokalfa et al., 2011; Ninfali & Angelino, 2013). Sadržaj makro i mikroelemenata u uzorcima blitve prikazan je u Tabelama 4.4 i 4.5.

Statistički rezultati različitog nivoa navodnjavanja koji su primjenjeni u ovom eksperimentu nisu pokazali da ono ima uticaj na sadržaj makro- i mikroelemenata u uzorcima blitve ($p > 0,05$). Različiti nivoi fertilizacije, na mineralni sadržaj, su imali značajnog uticaja jedino na sadržaj fosfora u ispitivanim uzorcima blitve ($p < 0,05$). Nađeno je da je koncentracija fosfora značajno niža za tretman gdje je prihrana primjenjena u količini većoj od optimalne (Đ150) u odnosu na optimalni tretman (Đ100), što navodi na zaključak da sadržaj fosfora opada sa povećanjem đubrenja (Tabela 4.4). Posmatrajući interakciju navodnjavanja i đubrenja na mineralni sadržaj nađeno je da imaju statistički značajan uticaj na koncentraciju Na i Cu ($p \leq 0,05$) (Tabela 4.4 i 4.5). Sadržaj Na i Cu je bio najniži za N100Đ150 tretman dok je maksimalnu vrijednost postigao za N100Đ50 tretman. Ovo bi se moglo objasniti suprotnim efektom koncentracije nutrijenata u zemljištu u uslovima povećane i smanjene fertilizacije na akumulaciju Na i Cu u blitvi pod uslovima optimalnog navodnjavanja. Fosfor u zemljištu u povećanim količinama (u većim dozama primjenjene fosforne prihrane) može da spriječi apsorpciju mikroelemenata, zbog stvaranja teško rastvorljivih fosfata sa mikroelementima poput Cu, Fe i Mn (Meng et al., 2021), što bi moglo objasniti efekat na sadržaj Cu u blitvi, koji je najmanju vrijednost imao pri aplikovanju 50% veće količine NPK đubriva od optimalnih vrijednosti (Đ150).

4.4.1. Sadržaj makroelemenata u tretiranim uzorcima blitve

Što se tiče makroelemenata, nađeno je da je kalijum prisutan u najvećoj koncentraciji od svih testiranih elemenata (Tabela 4.4), gdje su srednje vrijednosti koncentracija kalijuma bile u opsegu od 339,04 do 417,19 mg/100 g SB. Koncentracije ostalih makroelemenata su bile u opsegu srednjih vrijednosti od 113,71 do 169,24, 91,83 do 122,41 i 153,94 do 231,14 mg/100 g svježe blitve, za Na, Mg i Ca, redom (Tabela 4.4). Poređenjem srednje vrijednosti za makroelemente sa onim koje je objavila USDA, može se uočiti da je sadržaj kalijuma u ispitivanim uzorcima, koji je imao vrijednost 372,42 g/100 g, približan vrijednosti koju je objavila USDA- 379 mg K/100 g svježe blitve (USDA, 2017). Prosječna količina magnezijuma u uzorcima blitve (101,99 mg/100 g SB) je blago veća od one koju je USDA objavila (81 mg/100 g SB), dok je za natrijum (139,61 mg/100 g

SB) blago niža od vrijednosti USDA- 213 mg/100 g SB (USDA, 2017). Sa druge strane, prosječna koncentracija kalcijuma (178,59 mg/100 g SB) u blitvi gajenoj pod primjenjenim različitim tretmanima prihrane i navodnjavanja je oko četiri puta veća od one koju je USDA objavila (51 mg/100 g SB) (USDA, 2017). Prosječna vrijednost fosfora u testiranim uzorcima blitve je 46,99 mg/100 g SB, što je blisko vrijednosti koju je USDA objavila (46 mg/100 g SB) (USDA, 2017). Značajne razlike u sadržaju najzastupljenih makronutrijenata Na, K, Ca i Mg u odnosu na sadržaj makroelemenata iz ove studije su nađene u studiji divlje blitve, koja je pokazala sadržaj pomenutih elemenata u sledećem koncentracijama 6,2 (Na), 70,25 (K), 154,1 (Ca) i 307,1 mg na 100 g SB (Mg) (Mzoughi et al., 2019). Blitva koja je tretirana optimalnim količinama đubriva (Đ100) iz studije Topalović i saradnika imala je bliske vrijednosti dobijenim u ovoj studiji za sadržaj makroelemenata, koje su iznosile za P, Ca, K, Mg i Na- 4,63, 25,99, 44,74, 8,17 i 23,8 g/kg suve blitve (Topalovic et al., 2018). Sadržaj makroelemenata u blitvi, osim što zavisi od sorte gajene kulture (Pokluda & Kuben, 2018), od tipa i sastava zemljišta (Topalovic et al., 2018), zavisi i od sezone u kojoj je blitva uzgajana (Kolota et al., 2010).

Srednje vrijednosti makroelemenata koje su nađene u ispitivanim uzorcima blitve mogu da obezbjede 1,74, 3,19, 7,65, 11,17, i 1,41% od potrebnih dnevnih vrijednosti za Na, K, Mg, Ca i P, redom nabrojano (Ivanovic et al., 2019), prilikom unosa 30 g svježe blitve. Referentne vrijednosti za DV koje su korišćene su: Na=2,4 g; K=3,5 g; Mg=0,4 g, Ca=1 g i P=1 g su preuzete od FDA (FDA, 2013). Bioiskoristivost pojedinih makroelemenata iz povrća se kreće oko 20-90%, što takođe treba imati na umu prilikom razmatranja DV (Melse-Boonstra, 2020).

Tabela 4.4 Mineralni sadržaj (makroelemenata) različito tretirane blitve i rezultati dvovarijantne ANOVA (Đ vrijednosti za đubrenje, N vrijednost za navodnjavanje i ukrštene Đ×N.

Tretman	Na (mg/100 g SB)	K (mg/100 g SB)	Mg (mg/100 g SB)	Ca (mg/100 g SB)	P (mg/100 g SB)
Kontrole					
N0Đ0	133,01±0,21	349,14±0,14	95,24±0,09	166,44±0,09	37,76±0,24
N100Đ0	169,24±0,19	391,15±0,21	122,41±0,13	231,14±0,04	25,76±0,51
N0Đ100	165,20±0,24	355,21±0,15	111,11±0,11	179,04±0,05	26,20±1,29
Tretmani					
N50Đ50	128,28±18,76	375,05±19,45	98,42±6,87	183,13±23,71	46,08±0,55
N100Đ50	163,38±21,48	417,19±51,66	108,34±13,21	202,92±28,46	54,43±5,21
N150Đ50	138,05±4,94	370,29±18,61	100,97±7,67	172,25±17,82	53,81±4,18
N50Đ100	139,24±15,95	376,37±24,07	98,87±10,16	165,85±18,19	52,39±2,86
N100Đ100	130,19±3,59	366,19±36,78	91,83±8,91	168,90±9,68	60,52±18,84
N150Đ100	121,65±10,90	339,04±67,11	96,68±2,70	166,75±2,49	63,96±9,85
N50Đ150	146,38±28,41	386,72±14,25	106,04±4,52	180,70±3,13	44,61±6,37
N100Đ150	113,71±9,18	359,35±17,99	94,32±7,09	153,94±21,37	46,04±5,05
N150Đ150	126,96±9,81	384,15±8,37	99,68±2,76	172,11±9,19	52,40±3,33
ANOVA					
Đ	2,257	1,433	2,115	3,320	4,580*
N	0,821	0,639	0,194	0,323	2,936
Đ×N	3,712*	1,321	1,603	2,017	0,253

Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ±SD koja potiče od tri mjerenja za isti tretman sa različitim parcela, dok su kontrole prikazane kao srednja vrijednost±SD triplikata iz iste parcele (n=3). *stepen značajnosti p≤0,05; Đ-đubrenje, N-navodnjavanje.

4.4.2. Sadržaj mikroelemenata u uzorcima blitve

Sadržaj srednjih vrijednosti mikroelemenata za različite tretmane u 100 g svježe blitve je prikazan u Tabeli 4.5. Koncentracije Cu, Zn, Fe i Mn su nađene u mg količinama dok su Co i Cr prisutni u μg količinama (Tabela 4.5). Koncentracije srednjih vrijednosti Cu, Fe i Zn u različito tretiranim uzorcima blitve su nađene u opsegu od 0,28 do 0,54, 0,98 do 2,75 i od 0,58 do 0,84 mg/100 g SB, redom nabrojano (Tabela 4.5). Uzimajući srednje vrijednosti svih tretmana u uzorcima blitve za Cu, Fe i Zn (0,38, 1,47 i 0,66 mg/100 g SB, redom) i referentne DV (2, 18 i 15 mg, redom) (FDA, 2013), 30 g svježe blitve obezbjeđuje oko 5,7, 2,4 i 1,3% DV mikroelemenata, redom nabrojano (Ivanovic et al., 2019). I u slučaju mikroelemenata treba uzeti u obzir bioiskoristivost ovih elemenata iz povrća, koja za gvožđe iznosi oko 12%, dok za druge mikroelemente nije poznata (Melse-Boonstra, 2020).

Količine Fe, Cu i Zn u blitvi koje su objavljene iz drugih studija su imale slične vrijednosti za Fe, Cu i Zn – 2,94, 0,15 i 0,30 mg/100 g SB, redom nabrojano (Mzoughi et al., 2019), odnosno 10,38 (Fe), 1,43 (Cu) i 3,40 (Zn) mg/100 g suve blitve za primjenjenu optimalnu količinu NPK prihrane (Topalovic et al., 2018). Iz USDA baze podataka, vrijednosti za Fe, Cu i Zn su bile sledeće: 1,8; 0,179 i 0,36 mg/100 g SB (USDA, 2017), što su vrijednosti koje su bliske sa dobijenim količinama mikroelemenata iz ove studije.

Koncentracija Mn u svim ispitivanim uzorcima blitve (Tabela 4.5), je uočljivo veća od količine Mn koja je zabilježena od strane USDA (0,366 mg/100 g SB)(USDA, 2017) i veća od vrijednosti za Mn koje su nađene u drugom zelenom lisnatom povrću, poput kupusa Mn=0,658 mg/100 g SB, spanaća Mn=0,897 mg/100 g SB i kelja Mn=0,659 mg/100 g SB (USDA, 2017). Mzoughi i saradnici su našli sadržaj mangana u divljoj blitvi 0,32 mg na 100 g SB (Mzoughi et al., 2019), dok je kod Topalović i saradnika nađena vrijednost od 17,75 mg/100 g suve blitve za optimalnu količinu đubriva (Topalovic et al., 2018).

Ovako velika koncentracija Mn koja je zabilježena u ispitivanim uzorcima blitve iz ove studije, znatno veća od vrijednosti koje su nađene u drugim studijama blitve, mogla bi biti objašnjena relativno kiselim pH zemljišta ili korijenskim ekskudatima, koji su uticali na povećanu apsorpciju Mn iz zemljišta. Mangan je važan mikroelement za brojne fiziološke procese u organizmu čovjeka, prije svega neophodan je za aktivnost enzima superoksid dismutaze, gdje kao kofaktor učestvuje u oksidaciji superoksid radikala (Holley et al., 2011). Ipak, visoke količine mangana mogu biti toksične, pri čemu je određena prihvatljiva količina za ovaj mikroelement koja se može unijeti u odrasli organizam (za osobu stariju od 19 godina) u opsegu 1,0–10,0 mg/dan (EFSA, 2006), što znači da se 100 g blitve iz ove studije može bezbjedno konzumirati a da ne dođe do neželjenih reakcija.

Što se tiče mikroelemenata Co i Cr, njihove koncentracije su bile u opsegu od 2,84 do 3,62 μg /100 g SB i 3,24 do 8,21 μg /100 g SB, redom (Tabela 4.5). Kobalt je dio vitamina B12 i potrebe ljudskog organizma za ovim mikroelementom su nadomještene unosom vitamina B12, dok je hrom važan u metabolizmu masti i ugljenih hidrata (EFSA, 2006). Procjenjene dnevne preporučene količine Co unesenih preko vitamina B12 su 2,4 μg /dan za odraslu osobu (EFSA, 2006). EFSA je takođe ustanovila odgovarajući unos hroma hranom za odraslu osobu od 19-50 godina starosti, 35 μg /dan (EFSA, 2006).

Tabela 4.5 Mineralni sadržaj (mikroelemenata) različito tretirane blitve i rezultati dvo-varijantne ANOVA (Đ vrijednosti za đubrenje, N vrijednost za navodnjavanje i uticaj interakcije Đ×N).

Tretman	Cu (mg/100g SB)	Zn (mg/100g SB)	Cr (µg/100 g SB)	Mn (mg/100 g SB)	Fe (mg/100 g SB)	Co (µg/100 g SB)
Kontrole						
Đ0N0	0,46±0,01	0,59±0,04	8,21±0,14	8,83±0,15	2,14±0,01	3,41±0,01
N100Đ0	0,54±0,01	0,84±0,08	5,63±0,22	9,07±0,24	2,00±0,01	3,02±0,13
N0Đ100	0,48±0,05	0,77±0,04	7,64±0,19	8,53±0,35	2,75±0,01	3,62±0,07
Tretmani						
N50Đ50	0,33±0,05	0,58±0,04	4,17±0,66	7,90±1,28	1,23±0,39	2,90±0,43
N100Đ50	0,41±0,06	0,70±0,12	3,97±0,83	9,74±1,38	1,29±0,03	2,84±0,28
N150Đ50	0,34±0,03	0,59±0,05	5,29±1,50	7,98±0,33	1,45±0,45	3,15±0,25
N50Đ100	0,38±0,03	0,66±0,08	3,24±1,10	8,13±1,17	1,24±0,05	3,13±0,12
N100Đ100	0,33±0,02	0,62±0,09	4,26±0,78	7,92±1,30	1,23±0,08	3,13±0,30
N150Đ100	0,32±0,03	0,63±0,09	3,36±0,08	8,11±0,47	0,97±0,08	2,89±0,40
N50Đ150	0,35±0,02	0,69±0,08	3,29±0,50	8,35±0,92	1,16±0,17	3,21±0,22
N100Đ150	0,28±0,02	0,61±0,06	3,32±0,42	6,94±1,24	0,98±0,14	2,88±0,41
N150Đ150	0,35±0,04	0,70±0,05	3,90±1,11	8,68±0,91	1,15±0,31	3,38±0,21
ANOVA						
Đ	1,793	0,607	3,381	0,736	2,495	0,898
N	0,671	0,012	1,134	0,033	0,244	0,899
Đ×N	4,555*	1,794	1,285	2,574	0,956	1,295

Podaci su izraženi kao srednja vrijednost u g na 100 g svježe blitve±SD koja potiče od tri mjerenja za isti tretman sa različitim parcelama, dok su kontrole prikazane kao srednja vrijednost±SD triplikata iz iste parcele (n=3);

*statistički značajno za p≤0,05;

4.5. Rezultati sadržaja fitohemikalija različito tretirane blitve

U ovom dijelu studije ispitivan je sadržaj pigmenata (hlorofila a, hlorofila b i ukupnih karotenoida), vitamina C, ukupni fenolni sadržaj i ukupni flavonoidni sadržaj u blitvi kao i praćenje uticaja različitog nivoa navodnjavanja i prihrane na pomenute parametre. Rezultati izmjerenih vrijednosti sumirani su u Tabeli 4.6, zajedno sa rezultatima dvosmjerne ANOVA analize.

Table 4.6: Sadržaj fitonutrijenata različito tretirane blitve i rezultati dvosmjerne ANOVA (Đ vrijednosti za đubrenje, N vrijednost za navodnjavanje i uticaj interakcije Đ×N).

Tretman	TPC µg GAE/mg ekstrakta	TFC µg CAE/mg ekstrakta	Vitamin C mg/100g	Hlorofil a mg/100g	Hlorofil b mg/100g	Karotenoidi mg/100g
Kontrole						
N0Đ0	151,65±0,35	13,89±0,57	26,11±1,65	20,60±2,05	8,80±1,92	6,21±2,03
N100Đ0	126,45±0,28	11,04±1,16	33,05±0,95	17,60±1,26	9,21±1,29	4,41±1,30
N0Đ100	148,05±0,42	13,89±0,38	26,10±0,65	42,80±1,14	19,80±1,18	11,40±1,25
Tretmani						
N50Đ50	145,35±2,13	11,67±2,20	25,87±2,20	30,87±7,76	13,93±3,19	9,73±9,28
N100Đ50	132,00±11,25	11,50±1,09	24,67±2,08	40,40±8,84	18,07±2,55	11,87±12,56
N150Đ50	130,60±1,80	11,09±0,96	27,0±1,00	33,60±10,4	16,01±4,57	10,87±2,86
N50Đ100	132,20±10,20	10,84±1,02	25,07±3,49	23,73±3,24	10,67±2,50	7,13±0,90
N100Đ100	138,75±9,40	12,05±1,04	25,27±2,19	30,40±6,69	13,33±2,08	9,33±1,68
N150Đ100	128,85±13,21	11,19±0,60	25,07±0,90	29,93±8,00	13,67±2,33	9,13±3,77

Tretman	TPC µg GAE/mg ekstrakta	TFC µg CAE/mg ekstrakta	Vitamin C mg/100g	Hlorofil a mg/100g	Hlorofil b mg/100g	Karotenoidi mg/100g
N50Đ150	139,50±13,51	12,15±1,33	29,67±2,08	39,13±13,61	17,39±5,55	12,01±4,52
N100Đ150	136,8±18,17	11,20±0,94	28,33±4,16	45,40±13,16	20,27±6,04	13,40±5,72
N150Đ150	152,85±19,32	12,38±0,95	29,67±0,58	28,20±10,09	17,87±5,15	12,67±1,79
ANOVA						
Đ	1,276	1,122	7,727*	4,378*	4,912*	3,309
N	0,164	0,427	0,562	1,376	1,466	0,703
Đ×N	1,433	1,696	0,250	0,129	0,138	0,029

Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ±SD koja potiče od tri mjerenja za isti tretman sa različitih parcela, dok su kontrole prikazane kao srednja vrijednost ±SD triplikata iz iste parcele (n=3). * statistički značajno za $p \leq 0,05$.

4.5.1. Sadržaj vitamina C

U literaturi se mogu naći podaci različitih studija blitve kojima je zajedničko to da je blitva bogat izvor vitamina C. Vitamin C je u vodi rastvoran vitamin koji ima značajni antioksidativni kapacitet u hidrofilnoj sredini i ovaj vitamin mora biti obezbjeđen ishranom jer ljudi ne mogu da sintetišu askorbinsku kiselinu (Hillstrom et al., 2003). Vitamin C učestvuje u brojnim fiziološkim procesima, od kojih su najvažniji biosinteza kolagena gdje djeluje kao kofaktor za najmanje osam enzima, učestvuje u sintezi hormona nadbubrežne žlijezde, važan je u sintezi holesterola u jetri i njegovoj transformaciji u žučne kiseline itd. (Padayatty & Levine, 2016).

Sadržaj vitamina C u uzorcima blitve iz ove studije bio je u opsegu između 24,67 mg i 33,05 mg/100 g svježe blitve (Tabela 4.6). Srednja vrijednost u ispitivanim uzorcima blitve je 26,90 mg na 100 g svježe blitve što je blisko vrijednostima od 30 mg/100 g SB, koje je objavila USDA (USDA, 2017). Drugo zeleno lisnato povrće, prema bazi podataka USDA ima sledeće vrijednosti sadržaja vitamina C: spanać- 30,3 mg/100 g svježeg uzorka- kelj- 93,4 mg/100 g svježeg uzorka; brokoli- 91,3 mg/100 g svježeg uzorka (USDA, 2017). Nešto veću količinu vitamina C u blitvi su objavili Hailay i Haymanot, kada blitva nije dodatno tretirana azotnim đubrivom, oko 32 mg/100 g svježe blitve (Hailay & Haymanot, 2019). Kolota i Czerniak su našli da je sadržaj vitamina C u blitvi oko 37 mg/100 g SB, kada je blitva tretirana sa 100 kg N/ha (Kolota & Czerniak, 2010). U studiji Miceli i saradnika dobijeni sadržaj vitamina C u svježoj blitvi koja nije dodatno tretirana azotnom prihranom je 4,36 mg/100 g SB (Miceli & Miceli, 2014), što je znatno niža vrijednost od dobijene u ovoj studiji (za tretman bez đubrenja i navodnjavanja dobijeno je 26,11 mg/100 g SB). Slične vrijednosti su nađene u blitvi koja je prije žetve tretirana organskim đubrivom dajući vrijednosti oko 5,3 mg vitamina C/100 g SB, i nije bilo razlike u odnosu na netretiranu blitvu (kontrolu) (Daiss et al., 2008). Slično zapažanje u smislu odsustva efekta organskog gajenja u sadržaju vitamina C, u odnosu na konvencionalno gajenu blitvu, je ranije objavljeno (organska - 24,7; konvencionalna 23,4 mg/100g SB) (Moreira et al., 2003), sa tim da su vrijednosti količine vitamina C oko četiri puta veće. Na sadržaj vitamina C u blitvi utiče i sezona gajenja, tako da je blitva gajena u jesenjem periodu imala veći sadržaj- oko 59,0 dok je u proljećnoj sezoni sadržaj vitamina C bio oko 38 mg/100 g SB (Kolota et al., 2010).

Preporučena dnevne vrijednost za unos vitamina C je 60 mg, što znači da bi 30 g svježe blitve iz ove studije obezbjedila 12,3–16,5% od preporučene dnevne vrijednosti (FDA, 2013). Međutim, brojni faktori koji su navedeni ranije u tekstu utiču na nisku bioiskoristivost vitamina C iz povrća i prema dostupnim podacima ona iznosi 3,5% (Thakur et al., 2020).

Statistički rezultati ove studije, u kojoj je ispitivan uticaj navodnjavanja, fertilizacije i njihove interakcije su pokazali da je samo fertilizacija imala značajnog uticaja na sadržaj vitamina C u blitvi ($p < 0,05$). Dalja statistička obrada je pokazala da je količina vitamina C bila znatno veća u tretmanu Đ150 u poređenju sa tretmanima Đ50 i Đ100 (Tabela 4.6). Dobijeni rezultati ukazuju da povećan

nivo NPK fertilizera stimulise biosintezu vitamina C u blitvi. Slično zapažanje u pogledu uticaja primjene optimalnih ili iznad optimalnih količina azota preko fertilizacije (100 ili 150 kg N/ha) je značajno povećalo sadržaj vitamina C (Hailay & Haymanot, 2019; Miceli & Miceli, 2014; Dzida & Pitura, 2008). Međutim, postoje studije koje su našle da se sa povećanjem azota u fertilizeru snižava količina vitamina C u biljci ili nema uticaja na količinu vitamina C (Stefanelli et al., 2010; Rajasree & Pillai, 2012; Kolota et al., 2010). Suprotni rezultati iz različitih studija ukazuju da uticaj više faktora, poput biljne vrste odnosno sorte u okviru iste vrste (genetski faktori), klimatskih faktora, načina fertilizacije i drugih faktora životne sredine i agrotehničkih mjera imaju uticaj na rast, razvoj i sastav biljke (Kolota et al., 2010; Topalovic et al., 2018; Hailay & Haymanot, 2019; Roupheal et al., 2012).

4.5.2. Sadržaj ukupnog hlorofila, hlorofila a i b i ukupnih karotenoida u blitvi i efekat navodnjavanja i prihrane

Spektrofotometrijskom metodom u acetonskom ekstraktu blitve određen je sadržaj hlorofila a, hlorofila b (tj. ukupni hlorofil a+b) i ukupnih karotenoida u različito tretiranoj blitvi u pogledu navodnjavanja i fertilizacije pri čemu su rezultati sumirani u Tabeli br 4.6. Ukupni sadržaj hlorofila (a+b) u uzorcima blitve je bio u opsegu srednjih vrijednosti između 26,81 i 65,67 mg/100 g svježe blitve (Tabela 4.6), sa srednjom vrijednošću svih tretmana od 47,13 mg/100 g SB, pri čemu je blitva koja nije tretirana (N0Đ0) imala vrijednost 29,4 mg/100 g SB. Sličnu vrijednost ukupnog hlorofila u svježoj blitvi su objavili Miceli & Miceli, koji su našli 31,83 mg/100 g SB što je srednja vrijednost u blitvi koja nije tretirana dodatnom prihranom azota (0 kg N/ha) (Miceli & Miceli, 2014). Mzoughi i saradnici su našli znatno niže koncentracije chl a i chl b u divljoj jestivoj blitvi-0,22 (chl a) i 0,06 (chl b) mg/100 g SB (Mzoughi et al., 2019). Razlog ovako niskih vrijednosti hlorofila a i b može biti posledica toga što su koristili suvi i sprášeni uzorak, kako se može vidjeti iz njihove metodologije određivanja pigmenata (Mzoughi et al., 2019). Nasuprot ovim niskim vrijednostima, u literaturi su objavljeni podaci o sadržaju ukupnog hlorofila u vrijednosti 121,37 mg/100 g (Asimovic et al., 2016). Poređenja radi, drugo zeleno lisnato povrće gajeno na području Mediterana poput koprive ima vrijednost ukupnog hlorofila 359,62 mg/100 g svježeg uzorka, maslaćak 248,25 mg/100 g svježeg uzorka (Znidarcic et al., 2011), što su vrijednosti 4-6 puta veće od onih nađenoj u blitvi. Drugo zeleno lisnato povrće je sadržalo manje hlorofila od blitve i tospanać 69,1 mg, zelena salata 28,3 mg (Bohn & Walczyk, 2004), brokoli 72,32 mg, kelj 58,88 mg na 100 g svježeg uzorka (Asimovic et al., 2016). Dobijene vrijednosti se razlikuju kako među biljnim vrstama tako i među biljkama iste vrste. Očekivano je da različite biljne vrste imaju različiti sadržaj ukupnog hlorofila, što je određeno samom genetikom vrste i spoljašnjim faktorima poput klimatskih faktora. Dodatno, treba napomenuti da kod uzorkovanja različiti djelovi biljke mogu biti korišćeni, pri čemu različiti djelovi biljke imaju različiti sadržaj hlorofila. Tako recimo, upravo blitva ima znatno veći sadržaj ukupnog hlorofila u listu u odnosu na peteljku, a i jedno i drugo su jestivi djelovi blitve i u ovom eksperimentu je korišćen list i peteljka, što je moglo dati nižu vrijednost hlorofila same biljke. Osim toga, i sama procedura određivanja hlorofila može imati uticaj na rezultat pri čemu izbor rastvarača ima značajnu ulogu kao i sam postupak ekstrakcije, koji doprinosi poboljšanju prinosa ekstrakcije kada se koristi mehanička obrada u kombinaciji sa sonikacijom prilikom ekstrakcije pigmenata (Branisa et al., 2014).

Što se tiče ukupnog sadržaja karotenoida, on se u ispitivanim uzorcima blitve kretao od 4,41 do 13,4 mg/100 g SB (Table 4.6). Nađene vrijednosti su nešto više od ranije objavljenih podataka koje su našle da je u različitim sortama blitve ukupni sadržaj karotenoida varirao od 3,7 do 9,6 mg/100 g svježeg uzorka, izršeni kao suma luteina i β -karotena (Reif et al., 2013). Slično kao u slučaju hlorofila, Mzoughi i saradnici su našli znatno niži sadržaj karotenoida, koristeći isti postupak kao za hlorofil (0,07 mg/100 g svježeg uzorka takođe izraženih kao suma β -karotena i likopena) (Mzoughi et al., 2019).

Drugo zeleno lisnato povrće poput onog iz familije Brassicaceae, sadrži sumu luteina i β -karotena u opsegu od 0,5 to 19,6 mg/100 g svježeg uzorka (Reif et al., 2013). Sadržaj karotenoida u zelenom lisnatom povrću iz Mediteranske oblasti u vrstama maslačak, baštenska rukola i divlja rukola je bio redom, 6,34, 8,24 i 7,18 mg/100 g (Znidarcic et al., 2011). Na osnovu ovih podataka možemo tvrditi da se blitva gajena u Crnoj Gori pri primjenjenim uslovima ima veoma visok sadržaj karotenoida. Razlike u ukupnom sadržaju karotenoida u ovim studijama svakako su posledica različitih vrsta/sorti, različitih uslova gajenja i sl. (Znidarcic et al., 2011; Kopsell et al., 2007; Kopsell et al., 2004), jer je sadržaj ukupnih karotenoida u biljci određen fiziološkim, genetičkim i faktorima životne sredine (Kopsell et al., 2007).

Sadržaj hlorofila i karotenoida u biljnim vrstama je osjetljiv na uslove rasta biljke poput primjenjenih količina azota u prihrani (Miceli & Miceli, 2014). U ovoj studiji je takođe nađeno da različiti tretmani fertilizacije imaju statističkog značaja ($p < 0,05$) na količinu hlorofila a, hlorofila b dok je za sadržaj ukupnih karotenoida na granici ($p = 0,05$). Fertilizacija sa najvećom količinom NPK đubriva ima pozitivan efekat na sadržaj hlorofila a i b. Nađena je značajna razlika između tretmana Đ150 i Đ100 (Tabela 4.6). Iz priloženog možemo reći da veća količina primjenjenog NPK đubriva povećava sintezu hlorofila, što je u saglasnosti sa uticajem glavnih nutrijenata biljke (azot, fosfor i kalijum) korišćenih individualno ili u kombinaciji, na kvalitet i rast i razvoj biljne vrste (Ohshiro et al., 2016). Miceli i Miceli (Miceli & Miceli, 2014) su izvjestili da blitva ima veći sadržaj hlorofila sa povećanjem količine azota u đubrivu, slično je zapaženo i za spanać (Nemadodzi et al., 2017). Navodnjavanje kao i interakcija đubrenja i navodnjavanja na sadržaj pigmenta nije imala uticaja ($p > 0,05$).

4.5.3. Sadržaj TPC i TFC u uzorcima blitve

Kozumiranje povrća koje je bogato sadržajem polifenola i flavonoida je povezano sa prevencijom bolesti koje nastaju kao posledica oksidativnog stresa (Slavin & Lloyd, 2012; Ballistreri et al., 2012). Zeleno lisnato povrće se smatra odličnim izvorom raznih fitonutrijenata, među kojima su polifenolna jedinjenja koja imaju antioksidativna, antiinflamatorna, antiproliferativna svojstva i koja daju funkcionalnost hrani bogatoj ovom grupom jedinjenja (Santos et al., 2014; Khanam et al., 2012). Zbog toga je u okviru ove studije određen ukupni sadržaj polifenolnih jedinjenja i ukupnih flavonoidnih jedinjenja kao i ispitivanje da li navodnjavanje i fertilizacija imaju uticaja na ove parametre.

Ukupan sadržaj polifenola i flavonoida u vodenim ekstraktima blitve koja je gajena pod uslovima različitog đubrenja i navodnjavanja je prikazan u Tabeli 4.6. TPC je bio u opsegu srednjih vrijednosti od 126,45 do 152,85 $\mu\text{g GAE/mg}$ vodenog ekstrakta, gdje je za kontrolni uzorak blitve (N0Đ0) TPC imao vrijednost 151,65 $\mu\text{g GAE/mg}$ vodenog ekstrakta. Prethodna studija koja je ispitala ukupni sadržaj polifenola, takođe u vodenom ekstraktu blitve, je pokazala vrijednost od 31,09 μg ekvivalenta pirokatehola/mg ekstrakta (Sacan & Yanardag, 2010). Oko pet puta veća vrijednost ukupnog sadržaja fenola u vodenom ekstraktu blitve koja je uzgajana u Crnoj Gori za potrebe ove studije može biti posledica korišćenja različitog ekvivalenta kojim se izražava ukupna količina fenolnih jedinjenja. Potvrđeno je da polifenolna jedinjenja imaju različitu reaktivnost sa FC reagensom (Everette et al., 2010), što može biti razlog ovih rezultata. TPC u etanolnom ekstraktu divlje blitve je pokazao vrijednosti 96,58 mg GAE po g ekstrakta (Mzoughi et al., 2019), što su oko tri puta veće vrijednosti od nađenih u ovoj studiji. Što se tiče drugog zelenog povrća, TPC sadržaj je imao sledeće vrijednosti: 95,78 μg ekvivalenta ferulične kiseline/g suvog uzorka spanaća; 80,84 μg ekvivalenta ferulične kiseline/g suvog uzorka zelene salate (Khanam et al., 2012) i oko 6 mg GAE/g suvog uzorka kelja (Yoon et al., 2020).

Ukupni sadržaj flavonoida u uzorcima blitve koja je različito tretirana u pogledu navodnjavanja i fertilizacije je bio u opsegu srednjih vrijednosti različitih tretmana od 10,84 do 13,89 μg ekvivalenta katehina/mg vodenog ekstrakta, gdje je za kontrolni uzorak blitve (N0Đ0) TFC imao srednju vrijednost svih tretmana 13,89 μg ekvivalenta katehina/mg vodenog ekstrakta (Tabela 4.6).

Istraživanje u kom je određen ukupni sadržaj flavonoida u vodenom ekstraktu blitve pokazao je vrijednost TFC blisku rezultatima ove studije 11,88 µg ekvivalenta katehina/mg ekstrakta (Sacan & Yanardag, 2010). U slučaju određivanja ukupnog sadržaja flavonoida korišćen je isti ekvivalent, katehin, za izražavanje količine flavonoida, što može dodatno potvrditi tvrdnje o različitim vrijednostima dobijenim za ukupne polifenole. U etanolnom ekstraktu divlje blitve nađeno je 30,09 mg ekvivalenta katehina/ g ekstrakta (Mzoughi et al., 2019), što je oko tri puta veća vrijednost od TFC nađenih u ovoj studiji. Ukupni sadržaj flavonoida u drugom GLVs je imao sledeće vrijednosti: 44,85 µg ekvivalenta rutina/g suvog uzorka spanaća, 31,67 µg ekvivalenta rutina/g suvog uzorka zelene salate (Khanam et al., 2012) i 2,2 mg ekvivalenta katehina/g suvog uzorka kelja (Yoon et al., 2020).

Nađeni sadržaj TPC i TFC u blitvi ukazuje na visok sadržaj polifenolnih jedinjenja u blitvi, što govori da se blitva može posmatrati kao značajan izvor ovih jedinjenja. Brojni faktori utiču na sadržaj polifenola u biljkama i to su faktori koji utiču na rast, razvoj i nutritivni/fitonutritivni sastav biljaka, poput genetskih faktora, klimatskih faktora, tipa zemljišta, agrotehničkih mjera i drugih faktora životne sredine (Maciel et al., 2011; Rop et al., 2011; Everette et al., 2010).

Iz Tabele br 4.6 se može vidjeti da različiti nivoi navodnjavanja i prihrane kao ni njihova interakcija nisu imali statistički značajan uticaj na TPC i TFC ($p \geq 0,05$). Ovakav rezultat može biti usled toga što TPC i TFC kao pokazatelji sadržaja polifenolnih jedinjenja, tj. sekundarnih metabolita, nisu bili izloženi potrebnom stresu sa ovim primjenjenim tretmanima. Vrlo vjerovatno da je zemljište na kom je blitva gajena sadržalo dovoljnu količinu nutrijenata za rast blitve i za sintezu primarnih biljnih metabolita, nezavisno od prisustva ili odsustva tretmana đubrenja i/ili navodnjavanja. Takođe i gore pomenuti faktori (genetički, faktori životne sredine, klima i drugi) još dodatno su mogli da utiču na izostanak efekta različitog navodnjavanja i prihrane na sadržaj TPC i TFC (Rop et al., 2011; Cheynier et al., 2013).

4.5.4. DPPH aktivnost vodenog ekstrakta blitve

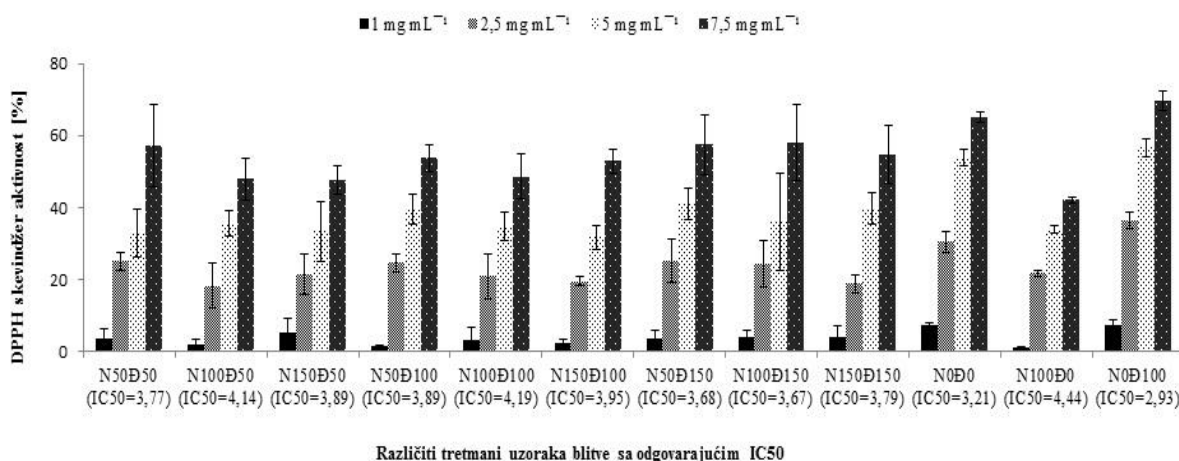
U cilju ispitivanja antioksidativne aktivnosti blitve koja je gajana u različitim uslovima navodnjavanja i đubrenja, urađen je DPPH test vodenih i metanolnih ekstrakata uzoraka blitve, kao i ABTS test metanolnih ekstrakata uzoraka blitve. Osim mjerenja antioksidativnosti cilj je bio i ispitati da li različito navodnjavanje i/ili đubrenje blitve, kao i njihova interakcija ima efekta na ove parametre.

Antioksidativni kapacitet nekog povrća (ili hrane uopšteno) koji se izmjeri DPPH, ABTS testom ili nekim drugim antioksidativnim testom, samo po sebi ne može se iskoristiti za utvrđivanje funkcionalnosti neke hrane, međutim oni nam mogu reći da li takva hrana ima potencijal da bi se mogla razmatrati kao funkcionalna.

Koncept funkcionalnosti hrane, kao što je rečeno, je složen i potrebno je, osim osnovnih nutritivnih kvaliteta, da hrana posjeduje i jedan ili više benefita na zdravlje čovjeka. Brojne komponente izolovane iz biljaka koje imaju dokazane korisne efekte na zdravlje čovjeka to ostvaruju upravo zbog toga što posjeduju antioksidativna svojstva i zbog toga je važno imati uvid i u ove *in vitro* antioksidativne testove.

Vodeni ekstrakt je ispitivan zbog toga što najpribližnije simulira stvarne uslove prilikom konzumacije blitve. Metanolni ekstrakti su ispitivani jer su iz istih ekstrakata okarakterisana polifenolna jedinjenja (kasnije u tekstu). DPPH i ABTS antioksidativni testovi pokazuju kako se ekstrakti uzorka (blitve) ponašaju kao sakupljači slobodnih radikala (DPPH i ABTS-a). Mjera uspješnosti u DPPH testu vodenog ekstrakta blitve je praćena preko IC_{50} vrijednosti, dok su metanolni ekstrakti u oba testa praćeni preko ekvivalenta Trolox-a.

4.5.4.1. Antioksidativna aktivnost vodenog ekstrakta blitve mjerena DPPH testom



Slika 4.1: Zavisnost DPPH aktivnosti vodenog ekstrakta blitve od različitih tretmana sa odgovarajućim IC₅₀ vrijednostima.

Na Slici 4.1 je prikazana DPPH aktivnost vodenih ekstrakata različito tretiranih uzoraka blitve. Sa Slike 4.1 možemo vidjeti da je IC₅₀ vrijednost među uzorcima bila u opsegu od 2,93 do 4,44 mg/ml vodenog ekstrakta, dajući najveću vrijednost za kontrolni uzorak (N100Đ0). Vodeni ekstrakt blitve iz druge studije u kojoj su ispitali DPPH aktivnost blitve, imao je IC₅₀ vrijednost 23,85 µg/mL (Sacan & Yanardag, 2010), tj. oko 100 manju vrijednost od onih nađenih u ovoj studiji, a samim tim bolji antioksidativni potencijal. Druga nezavisna studija, koja je ispitala antioksidativnu aktivnost etanolnog ekstrakta blitve našla je da koncentracija od 0,75 mg/ml etanolnog ekstrakta neutrališe 50% DPPH radikala u testiranom rastvoru (Mzoughi et al., 2019). Sposobnost sakupljanja DPPH radikala je bolja što je sadržaj polifenolnih jedinjenja veći, jer mehanizam kojim se neutrališe DPPH radikal je mehanizam kojim fenolna i flavonoidna jedinjenja kao i vitamin C neutrališu slobodne radikale, tj. ispoljavaju antioksidativnu aktivnost (Quintero-Soto et al., 2018; Orsavova et al., 2019). Stoga možemo reći da je blitva iz studije Sacana i saradnika sadržala veću količinu antioksidativnih jedinjenja od onih koje su nađene u ovoj studiji. Antioksidativna jedinjenja, koja se ponašaju kao skupljači DPPH radikala pripadaju grupi polifenola, što može da znači da je veća IC₅₀ vrijednost posledica toga da je blitva iz studije Sacana i saradnika, gajena u uslovima koji stimulišu sintezu ovih jedinjenja.

Metanolni rastvor blitve iz studije Pyo i saradnika je maksimalnu DPPH aktivnost postigao pri koncentraciji ekstrakta od 500 µg/mL, pri čemu je neutralisao 87% DPPH radikala prisutnog u testiranom rastvoru (Pyo et al., 2004). U ovoj studiji neutralisanje sličnog procenta DPPH radikala (85,9%) je postignuto pri koncentraciji ekstrakta od 10 mg/ml. Kako se može zaključiti antioksidativna aktivnost blitve u ovoj studiji bila je za oko 20 puta manja u odnosu na rezultat DPPH testa iz studije Pyo-a i saradnika.

Što se tiče drugih povrtarskih vrsta iz grupe zelenog lisnatog povrća, u analizi ekstrakta brokolija IC₅₀ vrijednost je postignuta pri koncentraciji etanolnog ekstrakta od 0,44 mg/mL dok je vodeni ekstrakt brokolija pokazao vrijednost od 2,3 mg/ml (Bidchol et al., 2011). Analizom vodenometanolnog rastvora spanaća nađeno je da se pri koncentraciji ekstrakta od 7,4 mg/mL neutrališe 50% prisutnog DPPH radikala u rastvoru (Bajpai et al., 2005). Metanolni ekstrakt kelja je pokazao

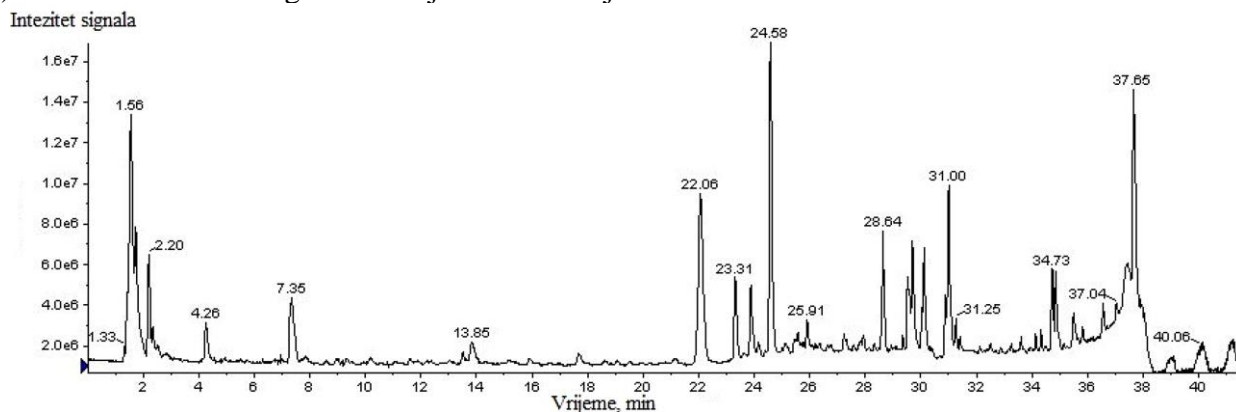
IC₅₀ vrijednost od 400 µg/mL (Ayaz et al., 2008). Etanolni ekstrakt zelene salate koja je gajena konvencionalnim načinom je pokazala IC₅₀ vrijednost 220.77 µg/mL, dok je etanolni ekstrakt organski gajene zelene salate imao vrijednost od 185,14 µg/mL (Silva et al., 2018). Zeleno lisnato povrće se smatra veoma značajnim izvorom jedinjenja sa antioksidativnim svojstvima kojima doprinose upravo polifenolna jedinjenja koja su uglavnom ta koja neutrališu DPPH radikal (Nawaz et al., 2018; Quintero-Soto et al., 2018).

4.6. Identifikacija polifenolnih jedinjenja u blitvi

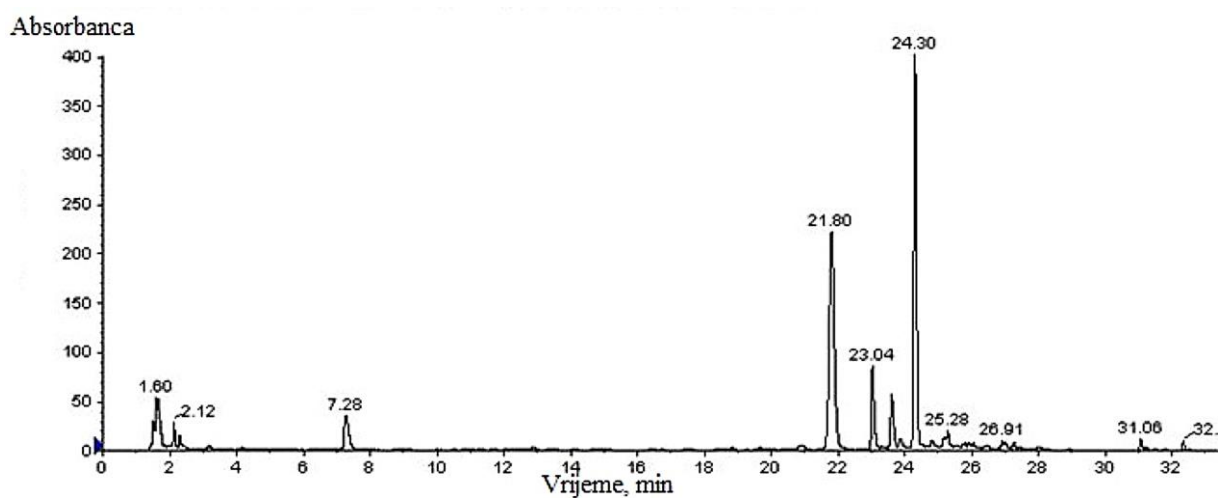
4.6.1. UV-Vis i MS spektri komponenti iz ekstrakta blitve

Budući da su analize TPC, TFC i DPPH aktivnosti vodenih ekstrakata pokazale značajno prisustvo polifenolnih jedinjenja, urađena je LC MS analiza (LC uslovi 1) metanolnog i *n*-butanolnog ekstrakta blitve u cilju identifikovanja polifenolnih jedinjenja. Nakon što su dobijene prečišćene frakcije identifikovanih komponenti, snimljeni su ¹H NMR spektri svake frakcije i ¹³C NMR i 2D NMR za komponentu 1.

LC-MS analiza oba ekstrakta pokazala je prisustvo četiri glavne polifenolne komponente u smješi, čije su molekulske formule date u nastavku C₂₆H₂₈O₁₄ (M = 564), C₂₈H₃₂O₁₇ (M = 640), C₂₈H₃₀O₁₅ (M = 606) i C₂₉H₃₀O₁₇ (M = 650). Na Slici 4.2 prikazan je hromatogram *n*-butanolnog ekstrakta (metanolni ekstrakt je identičan) a) TIC, tj. ukupni jonski hromatogram (u negativnom ESI modu), b) LC UV-Vis hromatogram snimljen na talasnoj dužini 268 nm.



a)



b)

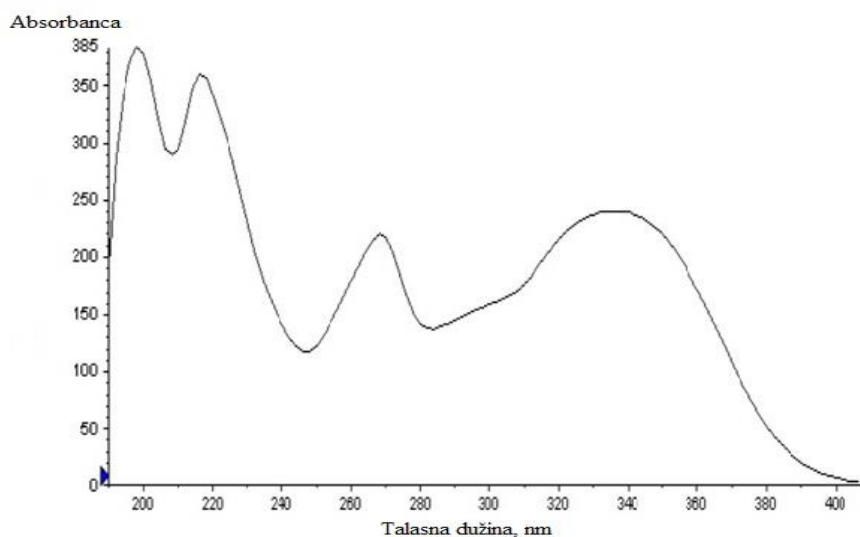
Slika 4.2: Hromatogram *n*-butanolnog ekstrakta blitve a) Ukupni jonski hromatogram, b) LC-UV-Vis hromatogram snimljen na $\lambda=268$ nm.

U Tabeli 4.7 su sumirani podaci LC MS analize (uslovi LC 1) za četiri komponente iz ekstrakta blitve, odakle su dobijeni pojedinačni UV-Vis i MS spektri za svaku komponentu. U Tabeli 4.7 su prikazana retenciona vremena, talasna dužina na kojoj je najveća apsorpcija (λ_{\max}) sa (sh) „sholder“ (tzv. „ramena“ UV-Vis spektara), molekulska masa negativnog jona $[M-H]^-$ i molekulska formula, kao i nazivi tih komponenti koji su utvrđeni poređenjem pomenutih podataka sa literaturnim podacima.

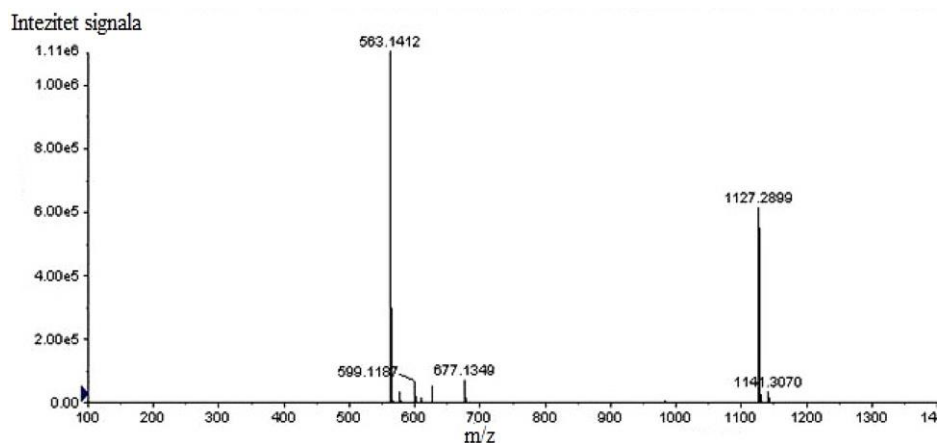
Tabela 4.7 Retenciona vremena (R_t), maximum UV apsorpcije, molekulska masa negativnog jona i molekulska formula identifikovanih jedinjenja.

Jedinjenje	R_t (min) UV-Vis/TIC hromatogram	λ_{\max} (nm)	$[M-H]^-$ (m/z)	Molekulska formula
(1) viteksin-2''- <i>O</i> -ksilozid	21,80/22,06	268, 338	563,1412	$C_{26}H_{28}O_{14}$
(2) izoramnetin-3,7- <i>O</i> -diglukozid	23,04/23,31	254, 268sh, 356	639,1523	$C_{28}H_{32}O_{17}$
(3) viteksin-6''- <i>O</i> -acetil-2''- <i>O</i> -ksilozid	23,61/23,88	268, 338	605,1532	$C_{28}H_{30}O_{15}$
(4) viteksin-6''- <i>O</i> -malonil-2''- <i>O</i> -ksilozid	24,30/24,56	270, 335	649,1388	$C_{29}H_{30}O_{17}$

Analizom UV-Vis i MS spektara je utvrđeno da komponenta 1 iz Tabele 4.7, na retencionom vremenu (R_t) LC UV-Vis hromatograma $R_t=21,80$ min ima maksimum apsorpcije na 263 i 338 nm, odnosno $R_t=22,07$ min na TIC-u, ima molekulsku masu negativnog jona 563,1412 m/z (Slika 4.3 a i b), koji odgovaraju literaturnim podacima za viteksin-2''-*O*-ksilozid (Gil et al., 1998; Santos et al., 2014; Sakalem et al., 2012).



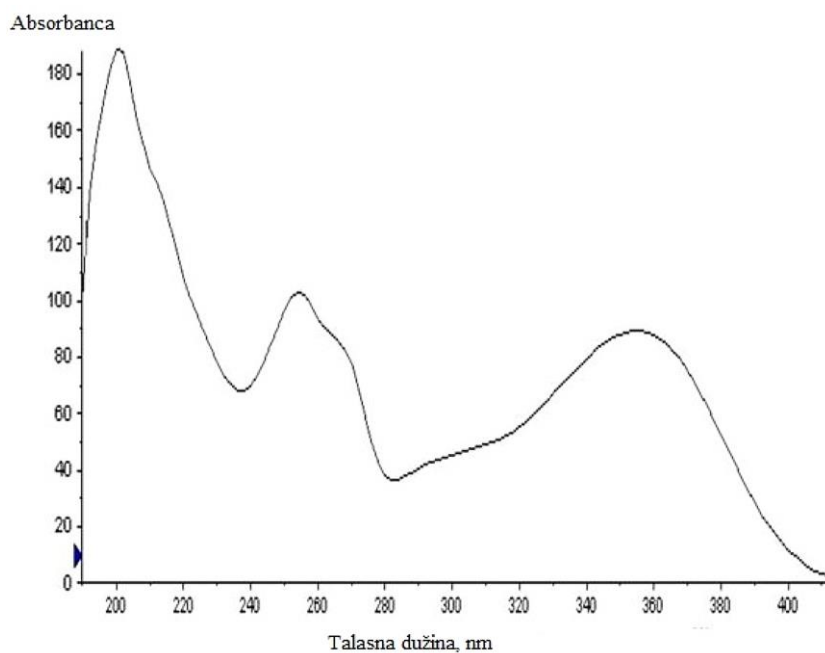
a)



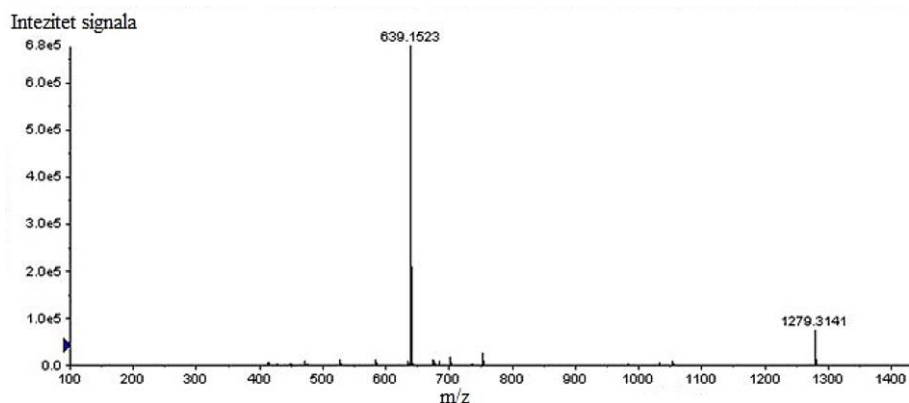
b)

Slika 4.3: a) UV-vis spektar viteksin-2''-*O*-ksilozid, b) maseni spektar viteksin-2''-*O*-ksilozid (negativni ESI mod).

Slika 4.4 a i b, pokazuje UV-Vis i MS spektre komponente 2 iz Tabele 4.7, koja na LC UV-Vis hromatogramu ima retenciono vrijeme na 23,04 odnosno 23,31 min na TIC-u, gdje se vidi maksimum apsorpcije na 254, 268 (sh), 356 nm, kao i negativni jon molekulske mase 639,1523 *m/z*. Poređenjem sa podacima iz literature nađeno je da se ovi podaci podudaraju sa flavonom izoramnetin-3,7-*O*-diglukozid (Lin et al., 2011; Boukhris et al., 2016; Santos et al., 2014).



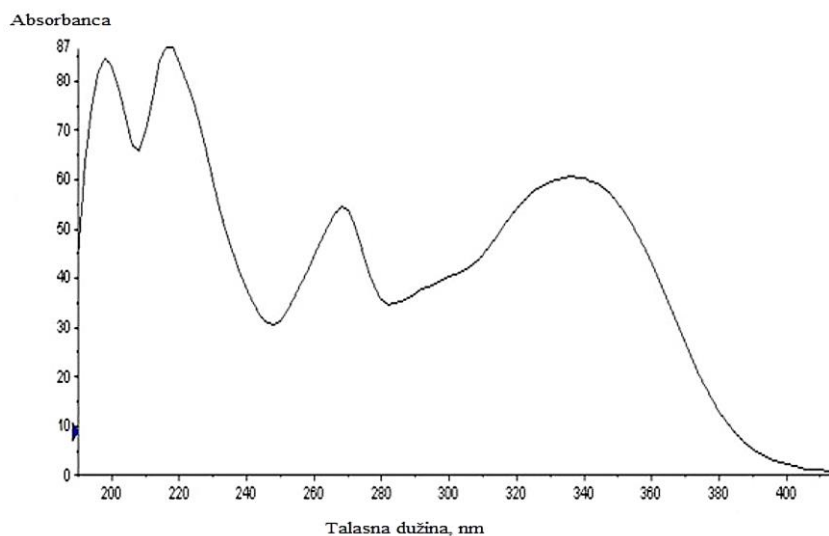
a)



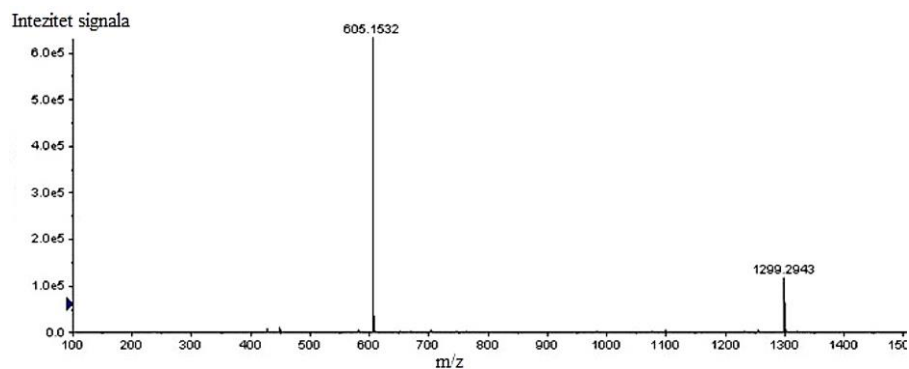
b)

Slika 4.4: a) UV-Vis spektar izoramnetin-3,7-*O*-diglukozida b) Maseni spektar izoramnetin-3,7-*O*-diglukozida (negativni ESI mod).

Komponenta 3 iz Tabele 4.7, čije retenciono vrijeme je na 23.61 min (LC UV-Vis hromatogram), odnosno na 23.88 min (TIC), je pokazala apsorpcioni maksimum na 268 i 338 nm i molekulsku masu negativnog jona 605.1532 *m/z*, što je prikazano na Slici 4.5 a i b. To su podaci koji su identifikovani za viteksin-6''-*O*-acetil-2''-*O*-ksilosid (Santos et al., 2014; Gil et al., 1998).



a)

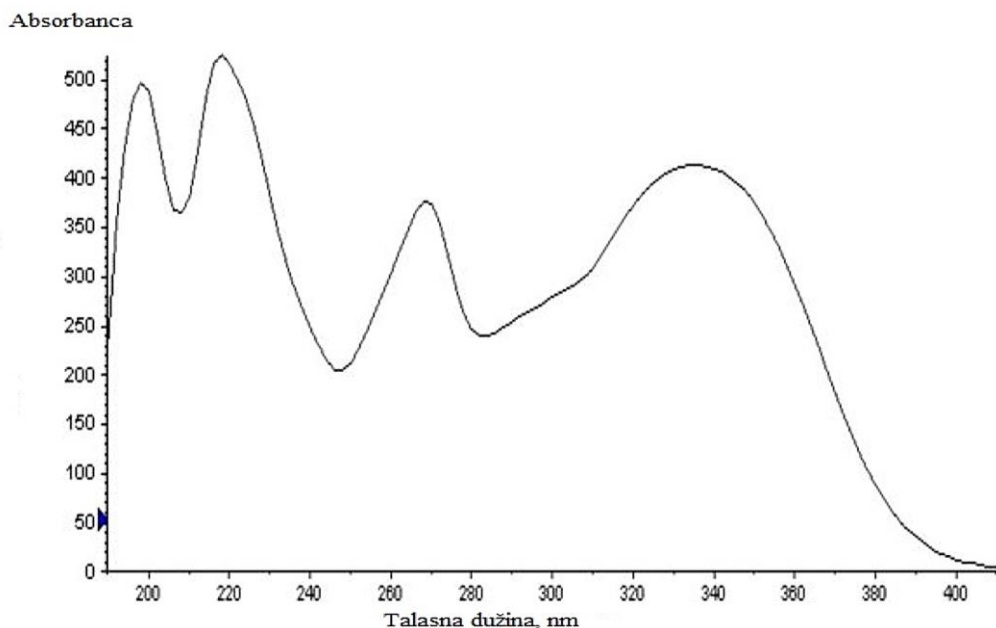


b)

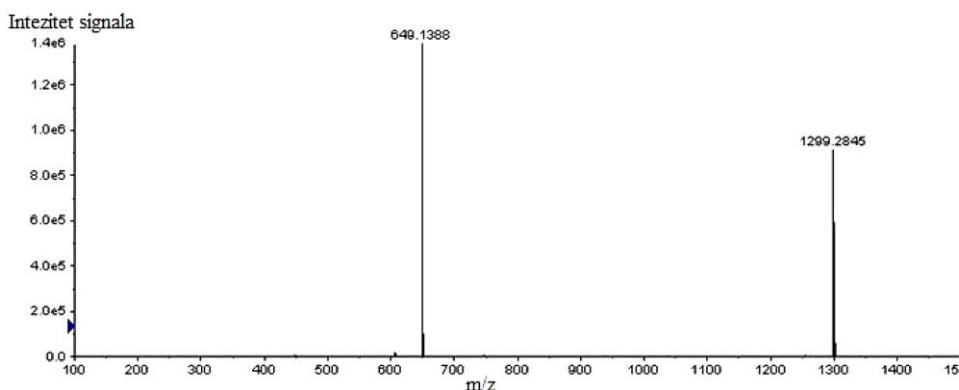
Slika

4.5: a) UV-Vis spektar viteksin-6''-*O*-acetil-2''-*O*-ksilosid; b) Maseni spektar viteksin-6''-*O*-acetil-2''-*O*-ksilosid (negativni ESI mod).

Slično kao i u slučaju prethodne tri komponente, jedinjenje 4 iz Tabele 4.7, koje ima retenciono vrijeme 24,30 odnosno 24,56 min na odgovarajućem hromatogramu, pokazuje apsorpcioni maksimum na talasnim dužinama 270 i 335 nm i ima molekulska masu negativnog jona 649.1388 m/z , što je predstavljeno na Slici 4.6 a i b. Dobijeni podaci za komponentu 4 odgovaraju literaturnim podacima za vitexin-6''-*O*-malonil-2''-*O*-ksilozid (Santos et al., 2014; Gil et al., 1998).



a)



b)

Slika 4.6: a) UV-Vis spektar viteksin-6''-*O*-malonil-2''-*O*-ksilozida, b) Maseni spektar viteksin-6''-*O*-malonil-2''-*O*-ksilozida (negativni ESI mod).

Santos i saradnici, ispitujući sadržaj polifenolnih jedinjenja u blitvi, između ostalih, objavili su prisustvo sve četiri komponente iz Tabele 4.7, dok su Nifali i saradnici objavili da su u blitvi glavni flavonoidi takođe bili derivati apigenina (viteksin-2-*O*-ksilozid i viteksin-2-ramnozid) uz izoramnetin-3-gentiobiosid i rutin (Santos et al., 2014; P. Ninfali et al., 2007).

Ostali pikovi sa hromatograma na osnovu UV-Vis i MS spektara nisu upućivali na to da se radi o polifenolnim jedinjenjima.

4.6.2. Izolovanje, prečišćavanje i potvrđivanje strukture polifenolnih jedinjenja

Polifenolna jedinjenja su izolovana iz vodeno-metanolnog ekstrakta (od kojih je dobijen metanolni i *n*-butanolni ekstrakt) u kojim je LC MS analizom (LC uslovi 1) utvrđeno prisustvo četiri flavonoidne komponente koje su identifikovane na osnovu UV-Vis i MS spektralnih podataka i poređenjem sa literaturnim podacima (Tabela 4.7). Dalje su, prečišćavanjem frakcija metanolnog i *n*-butanolnog ekstrakta blitve (gravitacionom kolonskom hromatografijom na poliamidu i semi-preparativnom tečnom hromatografijom (LC uslovi 3, 4, 5, 6, 7) (Uslovi opisani u 3.10.3. dijelu), uz propratnu LC-MS analizu (LC uslovi 2), dobijene sledeće frakcije u kojima su naznačene komponente bile prisutne u više od 90%:

Metanolni ekstrakt:

BL_8_2 (jedinjenje molekulske mase 640)

BL_8_4_3_2 i BL_10_3_3 (jedinjenje molekulske mase 606)

BL_5_1_2_1 i BL_10_3_2 (jedinjenje molekulske mase 564)

n-butanolni ekstrakt:

Bl_BUT7-3 (jedinjenje molekulske mase 650)

BL_BUT1-2 (jedinjenje molekulske mase 564).

Dobijene prečišćene frakcije su korišćene za snimanje 1D NMR i 2D NMR spektara za komponentu 1 (tj. za viteksin-2''-*O*-ksilozid), dok je za preostale tri urađena ¹H NMR spektralna analiza za potvrdu identifikovanih jedinjenja.

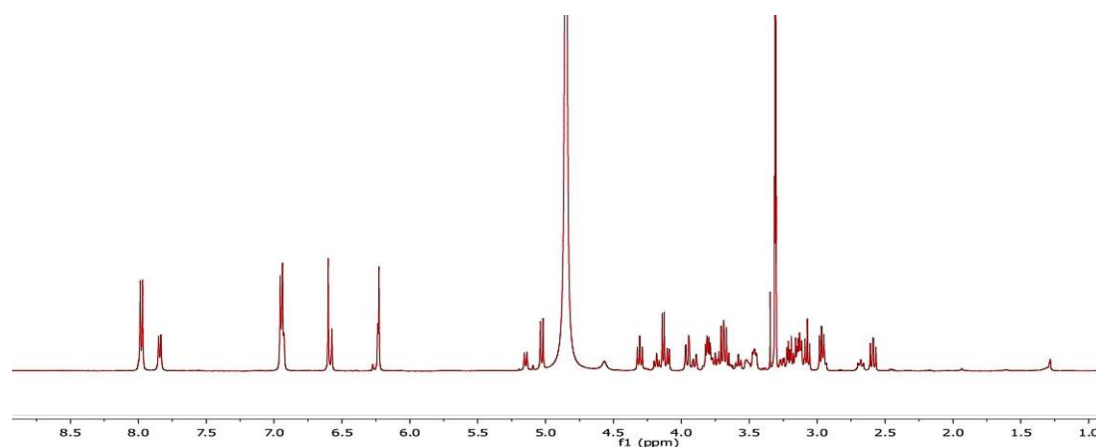
Napomena: Rezultati fracionisanja i prečišćavanja metanolnog i *n*-butanolnog ekstrakta kao i rezultati propratne LC-MS analize frakcija tokom prečišćavanja je detaljno opisana u master radu K. Šalipur (Salipur, 2016).

4.6.2.1. 1D i 2D NMR spektri

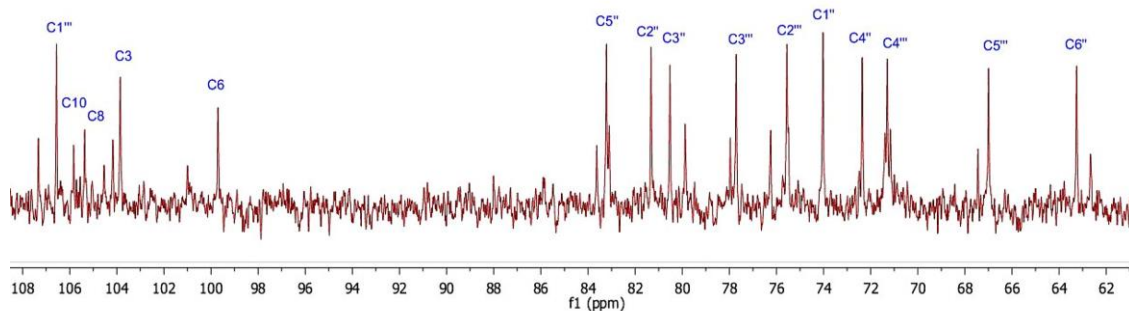
NMR spektroskopijom potvrđena je struktura polifenolnih jedinjenja (4 flavonoidna jedinjenja) koja su identifikovana pomoću LC MS analize (LC uslovi 1).

4.6.2.1.1. 1D i 2D NMR spektri viteksin-2''-*O*-ksilozid-a

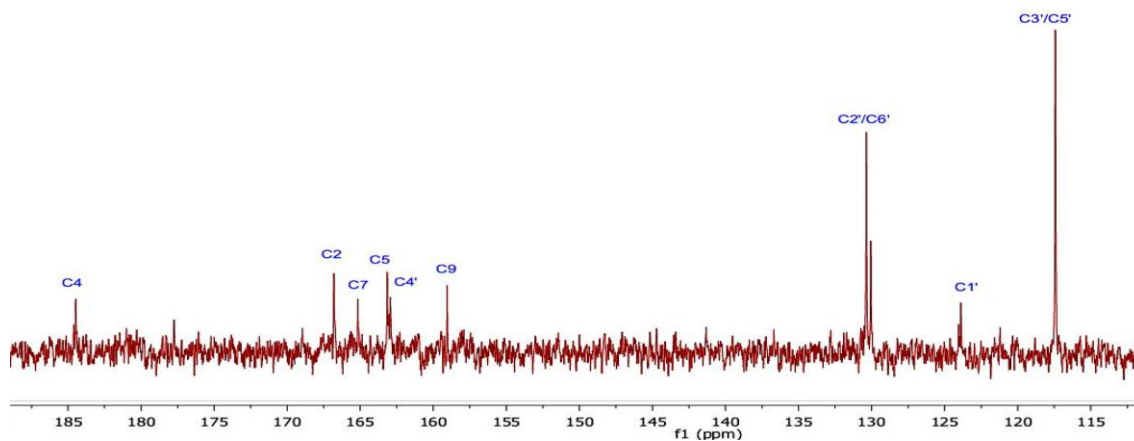
Na Slici 4.7 (a, b, c) prikazani su ¹H i ¹³C NMR spektri viteksin-2''-*O*-ksilozid.



a)



b)

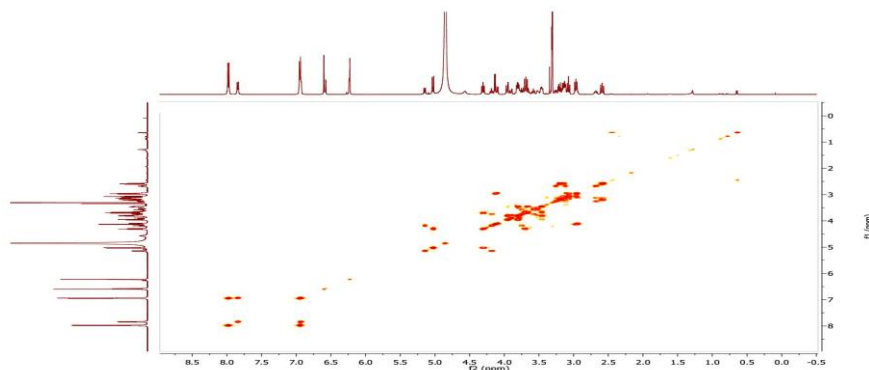


c)

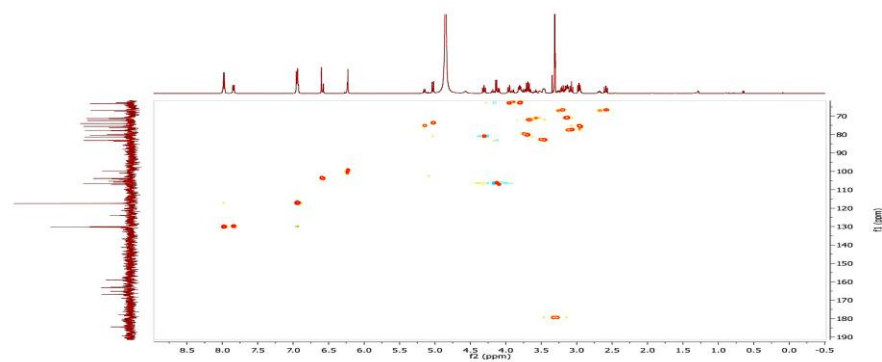
Slika 4.7 (a, b, c): Odgovarajući NMR spektri za viteksin-2''-*O*-ksilozid:
a) ^1H NMR; b i c) ^{13}C NMR spektar.

U ^1H NMR spektru uočavaju se signali u regionu od 3,2 ppm do 5,03 ppm karakteristični za proton ugljenohidratnog prstena (*O*-ksilozil i *C*-glukozid), dok su u regionu od 6,59 do 7,98 ppm signali za proton flavonoidnog dijela molekula (Slika 4.7 a). ^{13}C NMR spektar pokazuje prisustvo keto grupe na C4 flavonoidnom dijelu molekula, što je signal hemijskog pomjeranja 185,12 ppm spektra ^{13}C NMR (Slika 4.7 c), zatim karakterističnu alifatičnu metilensku grupu (C6'') (δC 62,90) sa ^{13}C NMR spektra (Slika 4.7 b). Ostali signali iz ^{13}C NMR spektra (Slika 4.7 b i c) odgovaraju strukturi viteksin-2''-*O*-ksilozida.

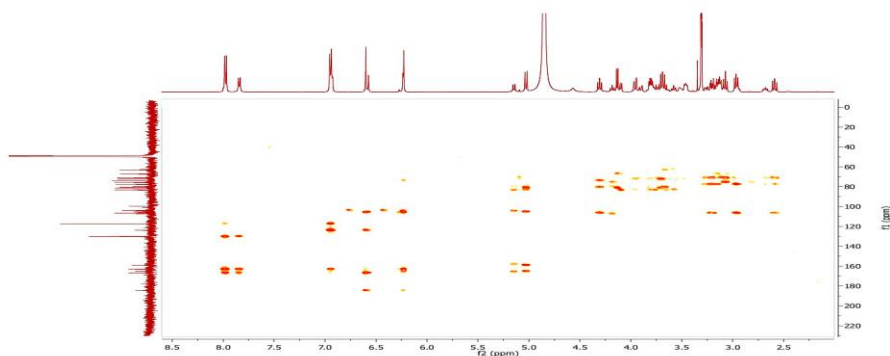
2D NMR (COSY, HSQC i HMBC) spektri viteksin-2''-*O*-ksilozida prikazani su na Slici 4.8 (a, b, c), redom. 2D NMR spektri su omogućili da se odrede signali koji se preklapaju u 1D NMR spektrima.



a)



b)



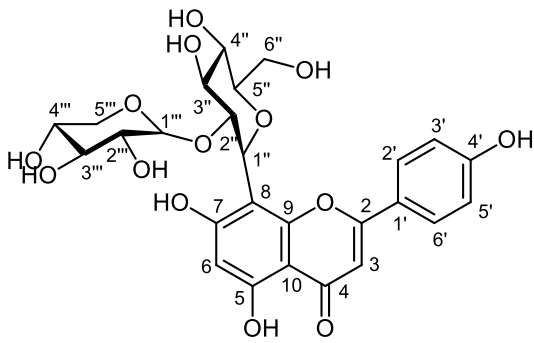
c)

Slika 4.8 (a, b, c): Prikaz odgovarajućih 2D NMR spektara za 2D NMR za viteksin-2''-*O*-ksilozida, a) COSY; b) HSQC; c) HMBC.

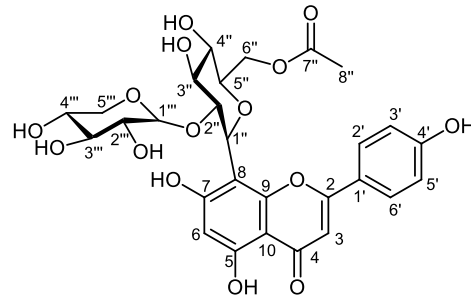
H-H COSY spektar (Slika 4.8 a) je potvrdio postojanje četiri nezavisna spinska sistema koja su prisutna zbog sledećih H-H korelacija koje postoje u strukturi viteksin-2''-*O*-ksilozida: H2'/H3' (7,86/6,95) i H5'/H6' (6,95/7,98) koje potiču iz aromatičnog prstena flavonoidnog dijela molekula, H1''/H2''(5,03/4,30), H2''/H3''(4,30/3,69), H3''/H4''(3,69/3,67), H4''/H5''(3,67/3,46), H5''/H6''(3,46/3,80) korelacije između protona iz glukoznog dijela i H1'''/H2'''(4,13/2,96), H2'''/H3'''(2,96/3,08) i protoni iz ksiloznog dijela molekula H3'''/H4''' (3,08/3,13), H4'''/H5''' (3,13/3,20).

H-C HSQC spektar (Slika 4.8 b) omogućava da se utvrdi koji su protoni i ugljenici međusobno direktno vezani što je omogućilo da se nađu hemijska pomjeranja za sledeće atome ugljenika iz ¹³C NMR spektra, C2' (130,03), C3'(17,08), C5'(117,08), C6'(130,03), C1''(73,68), C2''(80,97), C3''(80,16), C4''(72,0), C5''(82,84), C6''(62,90), C1'''(106,23), C2'''(75,20), C3'''(77,36), C4'''(70,97) i C5''' (66,65). Osim toga, kvarternerni ugljenici (C2, C4, C5, C7, C8, C9, C10, C1', C4') potvrđuju odsustvo signala u HSQC spektru.

HMBC spektar (Slika 4.8 c) ukazuje na korelacije između protona i ugljenika udaljenih za dvije ili tri veze (²⁻³J_{C-H}). Prisustvo korelacija ugljenika C2 sa protonima H3, H2' i H6; C4 sa H3; C5 sa H6; C7 i C8 sa H6 i H1'' s tim da su C7 korelacije sa H6 i H1'' na većem hemijskom pomjeranju od C8 sa istim protonima usled prisustva hidroksilne grupe; C9 sa H1''; C10 sa H3 i H6; C1' sa H3, H3' i H5'; C4' sa H2', H3', H5' i H6'- su potvrdile položaj kvaternernih ugljenikovih atoma u apigeninskom dijelu molekula. Takođe, HMBC spektar je potvrdio da je diglukozid direktno vezan za flavonoidnu strukturu preko ugljenika u položaju C8 na osnovu korelacija H''' protona sa C8, C7 i C9 ugljenicima. Prisustvo korelacija H''' protona sa ugljenikom C2'' u HMBC spektru je dokazalo da se radi o α (2→1) glikozidnoj vezi. Na Slici 4.9 je prikazana struktura viteksin-2''-*O*-ksilozida koja odgovara dobijenim spektralnim podacima.



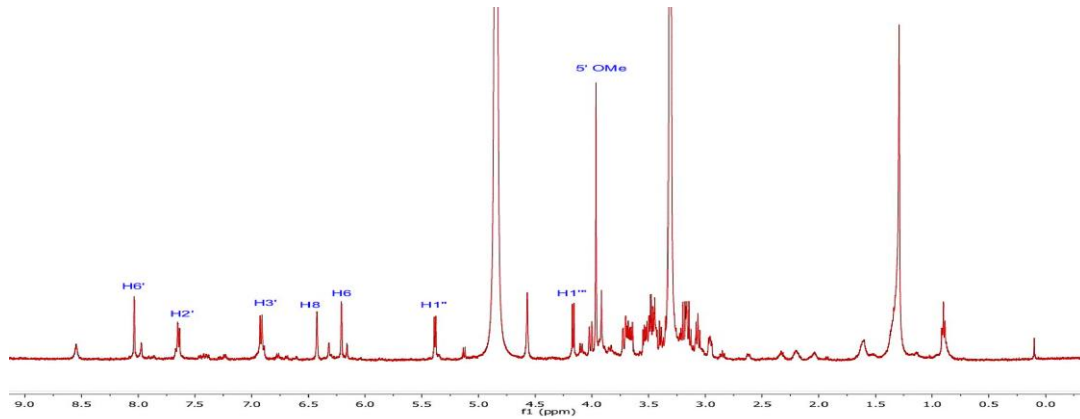
Slika 4.9: Struktura viteksin-2''-*O*-ksilozida.



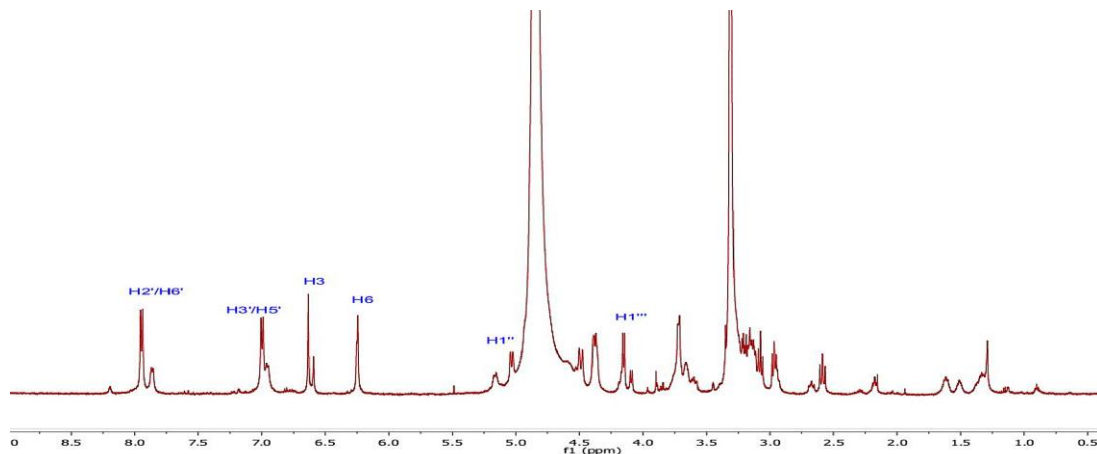
Slika 4.10: Struktura viteksin-6''-acetil-2''-*O*-ksilozida.

4.6.2.1.2. ^1H NMR spektri Izoramnetin-3.7-*O*-diglukozid, viteksin-6''-acetil-2''-*O*-ksilozida i vitexin-6''-*O*-malonil-2''-*O*-ksilozida

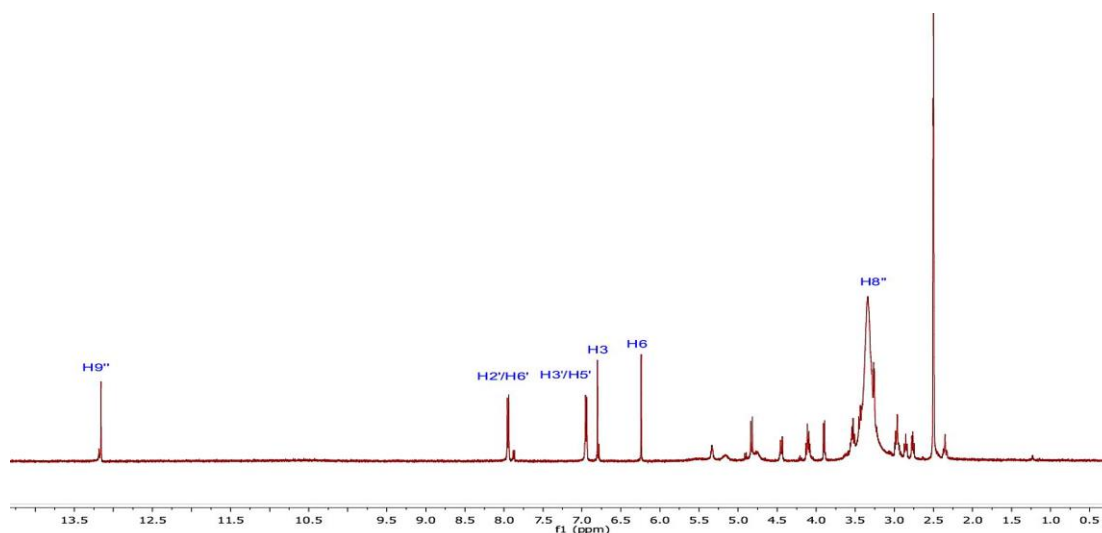
Strukture izoramnetin-3.7-*O*-diglukozida, viteksin-6''-acetil-2''-*O*-ksilozida i vitexin-6''-*O*-malonil-2''-*O*-ksilozida su potvrđene snimanjem ^1H NMR čiji su spektri prikazani na Slici 4.11 a,b,c, redom.



a)



b)

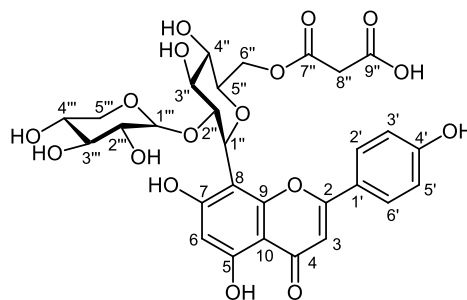
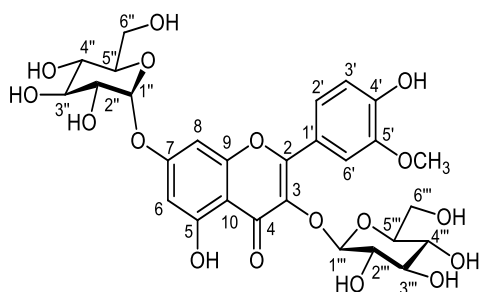


c)

Slika 4.11 a, b, c: ^1H NMR spektri a) izoramnetin-3,7-*O*-diglukozida, b) viteksin-6''-acetil-2''-*O*-ksilozida i c) viteksin-6''-malonil-2''-*O*-ksilozida.

Struktura izoramnetin-3,7-*O*-diglukozida (Slika 4.12) je potvrđena snimanjem ^1H NMR spektra (Slika 4.11 a) i 2D NMR spektra (COSY). U ^1H NMR spektru, registruju se hemijska pomjeranja anomernih protona sa prve glukoze jedinice (5,51 ppm, d (dublet), ($J=7,3$ Hz, $\text{H}1''$) i druge glukoze jedinice (4,08 ppm, d, ($J=7,8$ Hz, $\text{H}1'''$)) što ukazuje da su obje glukoze jedinice povezane *O*-glikozidnom vezom za flavonolnu strukturu, prva preko C7, druga preko C3 atoma (Rosch et al., 2004; Maksoud & El Hadidi, 1988). Karakteristični signal od metoksi grupe je zabilježen na δ 3,84 ppm, što je vrijednost pomjeranja karakteristična za metoksi grupu flavonolne strukture izoramnetinskog aglikona (Rosch et al., 2004).

Strukture vitexin-6''-*O*-acetil-2''-*O*-ksilozida (Slika 4.10) i viteksin-6''-*O*-malonil-2''-*O*-ksilozida (Slika 4.13) potvrđene su takođe ^1H NMR spektrima, koji su prikazani na Slici 4.11 b i c. Potvrda strukture ova dva derivata apigenina se zasniva na razlikama u odnosu na strukturu viteksin-2''-*O*-ksiozida-a. Vitexin-6''-*O*-malonil-2''-*O*-ksilozid se razlikuje od viteksin-2''-*O*-ksiozida po prisustvu malonil grupe u 6'' položaju ksiloze jedinice (Slika 4.13), što se registruje u spektru na hemijskom pomjeranju 3,35 s (singlet) ppm, što je karakterističan signal malonil grupe i slaže se sa literaturnim podacima za viteksin-6''-*O*-malonil-2''-*O*-ksilozid (Svehlikova et al., 2004). Viteksin-6''-*O*-acetil-2''-*O*-ksilozid se razlikuje od viteksina-2''-*O*-ksilozida-a po prisustvu acetil grupe na C6'' atomu, što se detektuje signalom od metil grupe u spektru.



Slika 4.12: Struktura izoramnetin-3,7-*O*-diglukozida. **Slika 4.13:** Struktura viteksin-6''-malonil-2''-*O*-ksilozida.

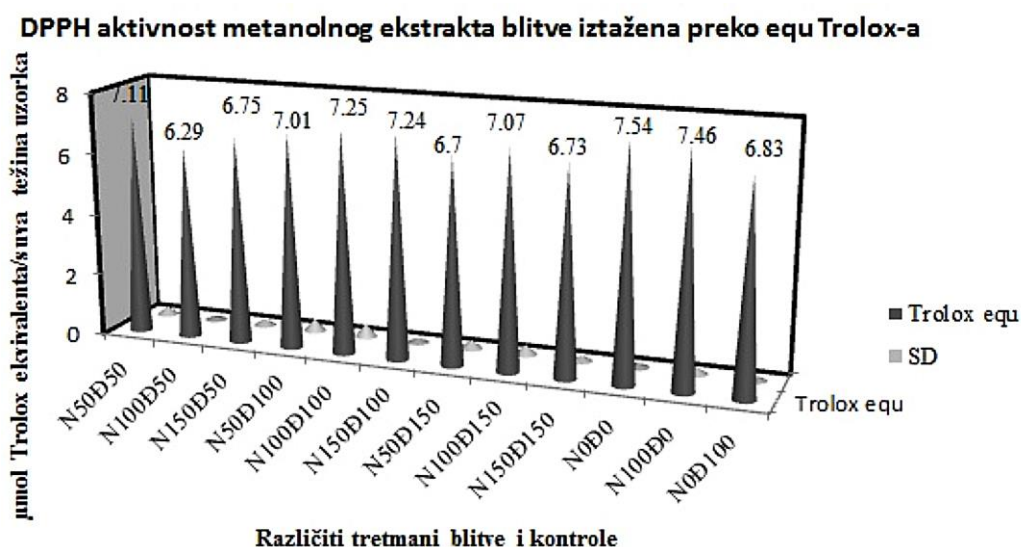
4.7. DPPH i ABTS aktivnost metanolnog rastvora blitve

Antioksidativni potencijal metanolnih rastvora različito tretirane blitve je ispitivan da bi se dobio bolji uvid u antioksidativni kapacitet, uporedili rezultati sa istraživanjima koji su izražavali DPPH i ABTS aktivnost preko ekvivalenta Trolox-a i konačno zbog toga što je isti ekstrakt korišćen za utvrđivanje individualnih polifenolnih jedinjenja.

Rezultati sakupljačke aktivnosti metanolnih rastvora, mjenjenih DPPH i ABTS testom, različito tretiranih uzoraka blitve su prikazani na Slikama 4.14 i 4.15, gdje je aktivnost izražena kao μmol ekvivalenta Trolox-a/suvoj težini uzorka. Trolox je jedinjenje koje je analog α -tokoferola u vodenoj sredini, tj. referentno jedinjenje za hidrofilne antioksidanse.

4.7.1. DPPH aktivnost metanolnog ekstrakta

DPPH aktivnost metanolnih ekstrakata blitve (Slika 4.14) je imala srednju vrijednost svih tretmana od 7,0 μmol ekvivalenta Trolox-a/g suvog uzorka. Nešto veća DPPH aktivnost određena je mjerenjem etanolnog ekstrakta blitve u studiji Tiverona i saradnika gdje je objavljena vrijednost 9,1 μmol Trolox/g suvog uzorka (Tiveron et al., 2012). Što se tiče DPPH aktivnosti drugog povrća u studiji Li-a i saradnika, koji su ispitivali aktivnost u metanolnom rastvoru, vrijednost je bila u granicama od 1,11 do 9,54 μmol Troloxa/g svježeg uzorka, pri čemu je najveću vrijednost pokazao prokelj, dok je npr. brokoli pokazao 3,85 μmol Troloxa/g svježeg uzorka, kupus 1,64 i karfiol 2,71 μmol Troloxa/g svježeg uzorka (Li et al., 2018). U pomenutoj studiji Tiverona, praćena je DPPH aktivnost etanolnih ekstrakata i drugog povrća pri čemu su se vrijednosti kretale od 2,3 do 77,2 μmol Trolox/g suvog uzorka, pri čemu je najveću vrijednost pokazao etanolni ekstrakt zelene salate (Tiveron et al., 2012). Drugo povrće je u istoj studiji pokazalo sledeće vrijednosti: spanać 50,9, brokoli 33,4, peršun 10,8 μmol Trolox/g suvog uzorka (Tiveron et al., 2012).



Slika 4.14: DPPH aktivnost metanolnih ekstrakata različito tretirane blitve izražene preko ekvivalenta Trolox-a.

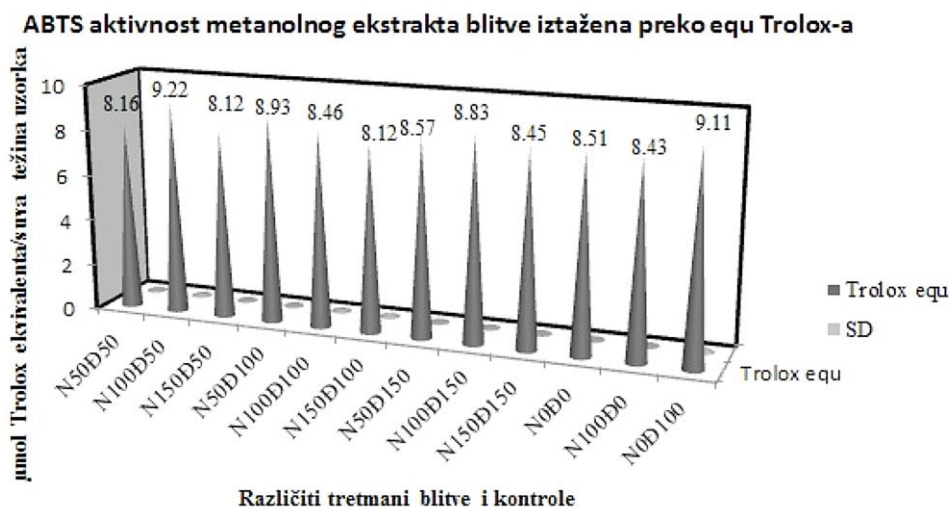
4.7.2. ABTS aktivnost metanolnog ekstrakta

Sposobnost metanolnog ekstrakta različito tretirane blitve iz ove studije da neutrališe ABTS^+ radikal je bila ekvivalentna μmol Trolox-a od 8,12 do 9,22 po g suvog uzorka (Slika 4.15). Slično kao u DPPH testu, neutralizacija ABTS^+ radikala se dešava tako što komponente koje imaju antioksidativna svojstva doniraju elektron, pri čemu polifenolna jedinjenja u najvećoj mjeri doprinose antioksidativnoj aktivnosti i u ABTS testu (Li et al., 2018; Orsavova et al., 2019). Izmjerena vrijednost etanolnog ekstrakta blitve u ABTS testu je nešto više od dva puta veća od

vrijednosti iz ove studije, tj. 25,4 $\mu\text{mol Trolox/g}$ suvog uzorka (Tiveron et al., 2012). Mada su DPPH vrijednosti iz studije Tiverona i saradnika i vrijednosti dobijene u ovoj studiji vrlo usaglašene, teško je pretpostaviti usled čega su razlike u rezultatima ABTS testa, uzimajući u obzir sličnosti u principu DPPH i ABTS testa. Mogući razlozi za ove razlike pripisani su različitim sezonama rasta i tretmanima pojedinačnih uzoraka povrća nakon žetve. Pored toga, pošto su uključeni mnogi faktori, mogući razlozi različitih rezultata između naše studije i prethodnih kako u pogledu DPPH rezultata, tako i ABTS, mogu biti posledica različitih ekstrakcionih metoda (Kalia et al., 2008).

Rezultati ABTS testa za etanolne ekstrakte drugog povrća su bili sledeći: spanać- 41,2 $\mu\text{mol Trolox/g}$ suvog uzorka; peršun 30,7 $\mu\text{mol Trolox/g}$ suvog uzorka; zelena salata 85,8 $\mu\text{mol Trolox/g}$ suvog uzorka, brokoli 43,0 $\mu\text{mol Trolox/g}$ suvog uzorka (Tiveron et al., 2012), kelj oko 60 $\mu\text{mol Trolox/g}$ suvog uzorka (Zietz et al., 2010).

Rezultati koji su dobijeni ispitivanjem antioksidativne aktivnosti blitve gajene u različitim uslovima navodnjavanja i đubrenja ukazuju da blitva ima potencijal da se razmatra kao funkcionalna hrana. Među povrćem blitva ima srednje do visok sadržaj komponenti koje pokazuju antioksidativnu aktivnost mjerenu DPPH i ABTS testom.



Slika 4.15: ABTS aktivnost metanolnih ekstrakta različito tretirane blitve izražene preko ekvivalenta Trolox-a.

4.7.3. Rezultati statističke analize DPPH i ABTS testa, vodenog i metanolnog ekstrakta

Statistički podaci rezultata DPPH i ABTS testa su prikazani u Tabeli 4.8. Primjenjeni režimi prihrane (Đ) i interakcija đubrenja i navodnjavanja (N×Đ) su imale uticaj ($p \leq 0,05$) na antioksidativnu aktivnost metanolnog ekstrakta blitve koja je mjerena DPPH testom (Tabela 4.8). Takođe iz Tabele 4.8 se vidi da različito đubrenje, navodnjavanje kao i njihova interakcija nisu imali uticaja na rezultat DPPH testa vodenog ekstrakta blitve i ABTS testa.

Tabela 4.8 Statistički podaci dvovarijantne ANOVA analize za DPPH aktivnost (vodeni i metanolni ekstrakt) i ABTS aktivnost različitih tretmana blitve.

ANOVA	DPPH (vodeni ekstrakt)	DPPH (metanolni ekstrakt)	ABTS
Đubrenje (Đ)	0,154	6,298*	0,05
Navodnjavanje (N)	0,351	0,146	0,759
N×Đ	0,672	4,342*	0,793

*stepen značajnosti $p \leq 0,05$

Ipak, kako se može vidjeti iz Tabele 4.8, optimalni tretman đubrenja (Đ100) je značajno doprinio većoj DPPH aktivnosti metanolnih rastvora blitve od tretmana Đ50 i Đ150 koji su proizveli blitvu sa sličnim DPPH aktivnostima. Daljom analizom varijanse interakcije đubrenja i navodnjavanja (N×Đ) na aktivnost DPPH utvrđeno je da optimalni nivoi đubrenja i navodnjavanja (Đ100N100) blitve proizvode najveću antioksidativnu aktivnost metanolnog ekstrakta mjereno DPPH testom, dok je najniža aktivnost bila pronađena za tretmane sa povećanim ili smanjenim nivoom đubrenja za sve tri norme navodnjavanja (N100Đ50, N50Đ150, N150Đ150 i N150Đ50).

U literaturi mogu se naći podaci gdje je različito đubrenje imalo efekta na DPPH aktivnost ekstrakta određene biljne kulture, kao što ima i podataka gdje se taj uticaj nije vidio (Amarowicz et al., 2020; Alizadeh et al., 2010). Razlozi za ovaj rezultat mogu biti razni, posebno zbog toga što su jedinjenja koja pokazuju antioksidativnu sposobnost (u DPPH i ABTS testu) obično produkti sekundarnog metabolizma biljke, koji se u biljci najčešće sintetišu u stresnim uslovima (suša, visok nivo UV zračenja, i sl.) (Maciel et al., 2011; Rop et al., 2011; Everette et al., 2010). Izostanak efekta primjenjenih mjera na rezultat ABTS testa metanolnog ekstrakta blitve, dok je istovremeno pokazan efekat različitog đubrenja (Đ) i interakcije đubrenja i navodnjavanja na metanolni ekstrakt blitve izmjeren DPPH testom, je vjerovatno posledica različitih primjenjenih analitičkih metoda. Naime, Fernandez-Pančon i saradnici su pokazali da na mjerenje antioksidativnog kapaciteta velikog uticaja ima korišćena analitička metoda (Fernandez-Panchon et al., 2008). Izostanak uticaja primjenjenih mjera na rezultat DPPH testa vodenog ekstrakta blitve, za razliku od DPPH testa metanolnog ekstrakta, vjerovatno je posledica različitog fitonutritivnog sastava i/ili različitog odnosa prisutnih komponenti u ovim ekstraktima. Dodatno, pokazan je sinergistički efekat pojedinih polifenolnih jedinjenja, kada se nađu u određenoj binarnoj kombinaciji pri mjerenju biološke aktivnosti u *in vivo* uslovima (Cai et al., 2012), čime se može objasniti i rezultat statističke analize DPPH testa dva ispitivana ekstrakta.

4.8. Analiza individualnog sadržaja identifikovanih flavonoida u metanolnom ekstraktu

Nakon što su identifikovani flavonoidi u metanolno-vodenom ekstraktu, određena je njihova koncentracija tečnom hromatografijom pod opisanim uslovima (opisano u 3.12). Posle određivanja koncentracije u svim uzorcima blitve, obrađena je statistička analiza u cilju ispitivanja eventualnog uticaja primjenjenjenih agrotehničkih mjera na sadržaj pojedinačnih flavonoida. Rezultati sadržaja identifikovanih flavonoida, kao i statistički podaci dvosmjerne ANOVA su prikazani u Tabeli 4.9.

Tabela 4.9 Koncentracija flavonoida u uzorcima različito tretirane blitve sa podacima ANOVA analize (Đ vrijednosti za prihranu, N vrijednost za navodnjavanje i ukrštene interakcije Đ×N).

Flavonoidi identifikovani u blitvi	viteksin-2''-O-ksilozid (µg/g SM)	izoramnetin-3,7-O-diglukozid (µg/g SM)	viteksin-6''-O-acetil-2''-O-ksilozid (µg/g SM)	viteksin-6''-O-malonil-2''-O-ksilozid (µg/g SM)
Kontrole				
N0Đ0	10237,55±0,25	2268,49±0,49	658,98±0,81	8103,17±0,73
N100Đ0	9772,18±0,36	2483,46±0,38	707,02±0,67	7951,89±0,69
N0Đ100	8454,29±0,58	1776,30±0,91	660,66±0,92	7507,46±0,47
Tretmani				
N50Đ50	10444,60±177,31	2384,32±216,46	813,98±88,47	9005,13±599,50
N100Đ50	9859,86±81,57	2231,23±202,15	819,27±56,13	9134,60±417,93
N150Đ50	10141,91±1026,99	2175,45±313,07	769,52±177,72	9541,45±1068,29

Flavonoidi identifikovani u blitvi	viteksin-2''-O-ksilozid (µg/g SM)	izoramnetin-3,7-O-diglukozid (µg/g SM)	viteksin-6''-O-acetil-2''-O-ksilozid (µg/g SM)	viteksin-6''-O-malonil-2''-O-ksilozid (µg/g SM)
N50Đ100	9858,28±850,22	2269,11±285,34	624,00±315,38	7324,26±3068,21
N100Đ100	9790,97±783,61	2235,55±143,63	853,74±78,53	9519,36±978,15
N150Đ100	8428,49±779,04	1981,64±42,92	672,25±85,66	7595,99±1079,01
N50Đ150	9957,81±387,35	1789,98±105,31	691,87±178,84	8543,03±1726,38
N100Đ150	8989,92±1043,83	1626,49±184,37	703,72±136,61	8365,65±1178,71
N150Đ150	10536,53±307,22	1607,33±453,18	678,02±36,02	8695,25±337,54

ANOVA

Đ	2,922	14,872*	1,288	1,372
N	1,432	1,921	0,919	0,588
Đ×N	3,445*	0,201	0,555	0,879

Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ±SD koja potiče od tri mjerenja za isti tretman sa različitim parcela, dok su kontrole prikazane kao srednja vrijednost±SD triplikata iz iste parcele (n=3). * statistički značajno za p≤0,05; Đ-đubrenje, N-navodnjavanje.

Iz Tabele 4.9 može da se vidi da je najzastupljenije flavonoidno jedinjenje u ekstraktu blitve viteksin-2''-O-ksilozid koji se nalazi u koncentracijama od 8454,29 (N150Đ100) do 10536,53 µg/g suvog uzorka (N150Đ150), odmah za njim, viteksin-6''-O-malonil-2''-O-ksilozid čije koncentracije su bile u opsegu 7324,26 do 9541,45 µg/g suvog uzorka. Oko četiri puta manje koncentracije izoramnetin-3,7-O-diglukozida su pronađene u testiranim uzorcima blitve, pokazujući maksimalnu vrijednost za kontrolni uzorak N100Đ0 (2483,46 µg/g suvog uzorka). Najmanje zastupljeni flavonoid od četiri identifikovana je viteksin-6''-O-acetil-2''-O-ksilozid koji je pronađen u koncentracijama od 624,0 do 853,74 µg/g suvog uzorka. U istraživanju u kome je mjerena koncentracija polifenolnih jedinjenja u mladoj blitvi nakon ekstrakcije iz suvih uzorka, dobijeni su sledeći rezultati za flavonoide identifikovane u ovoj studiji: viteksin-2''-O-ksilozid 4257,8 µg/g suvog uzorka, viteksin-6''-O-malonil-2''-O-ksilozid 6526,0 µg/g suvog uzorka, viteksin-6''-O-acetil-2''-O-ksilozid 888,5 µg/g suvog uzorka i izoramnetin-3,7-O-diglukozida 2680,3 µg/g suvog uzorka (Santos et al., 2014). Poređenjem rezultata sa studijom Santosa i saradnika, može se uočiti da je viteksin-2''-O-ksilozid bio nešto više od dva puta zastupljeniji u ovoj studiji, dok su preostala tri flavonoida pokazala manje više sličan nivo zastupljenosti.

Kako je navedeno, tri identifikovana flavonoida su derivati apigenina i pripadaju subgrupi flavona dok izoramnetin diglukozid pripada subgrupi flavonola. Apigenin i derivati apigenina su veoma biološki aktivna jedinjenja i široko su zastupljena među povrćem, začinskim biljem i voćem, posebno u peršunu, celeru, blitvi, origanu, pomorandžama itd. (Madunic et al., 2018; Ali et al., 2017; Wang et al., 2019; Ninfali & Angelino, 2013). Optimistične procjene o unosu flavonoida ishranom kažu da se oko 1 g flavonoida unosi u formi glikozida odnosno oko 650 mg u obliku aglikona (Kuhnau, 1976). Druga studija procjenjuje da se samo oko 23 mg flavonoida unese ishranom odraslih Holanđana na dnevnom nivou (Hertog et al., 1993). Dnevni unos apigenina procjenom EFSA-e je 3±1 mg dnevno, u Kini je oko 4,23 mg/dan, u Americi oko 0,13-1,35 mg/dnevno i Australiji oko 0,45 mg/dan (Wang et al., 2019). Blitva je odličan izvor derivata apigenina i umnogome doprinosi unosu ovog flavonoida što je i preporučuje između ostalih nutritivnih komponenti da bude dio svakodnevne ishrane zbog korisnih efekata na zdravlje čovjeka

(Ninfali & Angelino, 2013; Santos et al., 2014). U blitvi iz ove studije derivati apigenina su bili zastupljeni u opsegu 16,40-20,93 mg/g suvog uzorka blitve, dok mlada blitva iz studije Santosa i saradnika ima oko 12,37 mg mg/g suvog uzorka (Santos et al., 2014). Apigenin kao i njegovi derivati sa svojim dokazanim pozitivnim efektima na brojne biološke procese (Madunic et al., 2018; Ali et al., 2017), doprinose funkcionalnosti hrane koja ih sadrži. Osim derivata apigenina, blitva koja je proučavana u ovom istraživanju, sadrži i izoramnetin-3,7-*O*-diglukozid. *In vitro* studije izoramnetina takođe pokazuju brojne korisne biološke aktivnosti ovog flavonola, prije svega antioksidativnost, antimikrobno djelovanje, prevencija gojaznosti, antidijabetsko dejstvo (Kalai et al., 2022). Zajedno sa derivatima apigenina utiče u velikoj mjeri na korisna svojstva blitve u smislu poboljšanja i očuvanja zdravlja (Ivanovic et al., 2021; Ninfali et al., 2007; Ninfali & Angelino, 2013).

Bioraspoloživost i bioiskoristivost apigenina i njegovih derivata nisu u velikoj mjeri istraženi. Međutim, ono što je poznato je da je bioiskoristivost apigenina oko 30% (DeRango-Adem & Blay, 2021) a slično se može očekivati u pogledu bioiskoristivosti njegovih derivata. Vrsta glikozidne jedinice koja je povezana sa flavonoidnim skeletom određuje mjesto i obim apsorpcije glikolizovanih flavonoida, dok pozicija na kojoj je šećer vezan za flavonoidnu strukturu upućuje na mehanizam apsorpcije glikolizovanih flavonoida (Donovan et al., 2007). Što su pak razlike u ovom pogledu manje između apigenina i njegovih derivata manje su i razlike u smislu njihove bioiskoristivosti. Naime, mjerenjem koncentracije viteksin-2"-*O*-ksilozida u krvi portalne vene došlo se do podataka da je bio u neizmjenjenom obliku i kao redukovani monoglikozid, koji je podvrgnut glukuronidaciji. Mjerenjem u žuči je potvrđeno da je u jetri viteksin-2"-*O*-ksilozid stigao u neizmjenjenoj formi koji je enterohepatičnom cirkulacijom vraćen u tanko crijevo radi ponovne apsorpcije (Angelino et al., 2013). U cekumu je nađeno oko 26% VOX-a (Angelino et al., 2013). Upravo razlog male bioiskoristivosti VOX-a, kao i drugih polifenola, je u činjenici da podliježu dejstvima enzima iz Faze II koji katalizuju reakcije konjugacije (npr. glukuronidacija kao što je slučaj sa VOX-om) (Hu et al., 2017). Naime, konjugacijom oni postaju izrazito hidrofilni što olakšava njihovo izlučivanje iz organizma, čime se sprečava njihova bioiskoristivost (Wu et al., 2012). Da li postoji mogućnost prevazići sistemsku cirkulaciju i učiniti da se bioiskoristivost polifenola učini efikasnijim je pitanje na kome se i dalje radi kao na velikom izazovu i neki rezultati upućuju da nije sve tako beznačajno. Naime, zbog dokazanih bioloških aktivnosti koje su korisne za čovjeka u brojnim *in vitro* studijama pokreću se istraživanja u smjeru koji treba da dovede do bolje bioiskoristivosti ovih struktura.

4.8.1. Rezultati uticaja primjenjenih mjera na sadržaj pojedinačnih flavonoida

Efekte različitih tretmana navodnjavanja i đubrenja kao i njihove interakcije na koncentracije identifikovanih flavonoidnih jedinjenja u blitvi su prikazani u Tabeli 4.9. Različite primjene đubrenja imale su značajan uticaj na izoramnetin-3,7-*O*-diglukozid. Dalja statistička obrada je pokazala da je veća primjena NPK đubriva proizvela blitvu sa nižim koncentracijama izoramnetin-3,7-*O*-diglukozida. Najveća koncentracija izoramnetin-3,7-*O*-diglukozida utvrđena je kada je blitva bila tretirana sa 50% smanjenim nivoom navodnjavanja i đubrenja (N50Đ50), dok je najniža koncentracija bila nakon tretmana N150Đ150. Različiti tretmani đubrenja utiču na sadržaj flavonoida u biljnim kulturama, uglavnom na način da manja količina primjene đubriva rezultira većim sadržajem flavonoida (Stefanelli et al., 2010). Povećana akumulacija flavonoida pod nižom dostupnošću azota od optimalne iz đubriva može se djelimično objasniti hipotezom ravnoteže ugljenika/hranljivih materija (Massad et al., 2012), sa pretpostavkom da su koncentracije sekundarnih metabolita na bazi ugljenika (kao što su flavonoidi) u obrnutoj korelaciji sa dostupnošću azota. Rezultati ovog istraživanja su u skladu sa većinom studija koje su ispitivale uticaj đubrenja na sadržaj polifenola/flavonoida (Stefanelli et al., 2010; Unuk et al., 2006). Različite primjene đubrenja nisu imale značajan uticaj na ostala tri jedinjenja flavonoida u blitvi (Tabela 4.9).

Sumiranjem literaturnih podataka može se reći da uticaj različitih režima đubrenja (kroz inkrementalnu primjenu N) dovodi do smanjenja sadržaja pojedinačnih polifenola (Stefanelli et al., 2010) ili uopšte ne utiče na njihov sadržaj (Unuk et al., 2006). Različiti rezultati u pogledu uticaja đubrenja na sadržaj pojedinačnih polifenola su posledica činjenice da je sadržaj polifenola u biljkama određen brojnim faktorima. Faktori poput genetskih, klimatskih, agrotehničkih imaju značajan uticaj na kvalitativni i kvantitativni sadržaj polifenola što je navedeno više puta (Sharma et al., 2019).

Analiza varijanse pokazala je značajan uticaj interakcije đubrenja i navodnjavanja na sadržaj viteksin-2"-*O*-ksilozida i na DPPH test metanolnog ekstrakta. Najmanji sadržaj viteksin-2"-*O*-ksilozida dobijen je za tretmane N150Đ100 i N100Đ150, dok je najveći sadržaj VOX-a nađen za tretman blitve N50Đ50 kao i za tretman N150Đ150. Stoga bi ovi rezultati mogli biti korisni u manipulisanju kombinacijom đubrenja polja i navodnjavanja, kako bi se proizvela blitva koja sadrži visok sadržaj biološki aktivnih komponenti.

Različiti režimi navodnjavanja nisu uticali na količine identifikovanih flavonoidnih jedinjenja, kao ni na jedan parametar praćen ovom studijom (osim na sadržaj nitrata). Primjena značajne količine vode za navodnjavanje je suštinski faktor za proizvodnju svježeg povrća (Yu et al., 2006). Međutim, efikasno korišćenje vode je kritično za održivu poljoprivrednu proizvodnju, tako da je neophodno identifikovati optimalne potrebe za vodom koristeći bazu podataka za usjeve gdje se mogu naći preporuke. Brojne studije su pokazale da su kvalitet proizvodnje i specifične fitokemikalije u hortikulturama pod režimom deficitarnog navodnjavanja (50%) viši nego u režimu punog tj., optimalnog navodnjavanja (100%) (Du et al., 2008; Gomez-Rico et al., 2007; Malejane et al., 2018). Kako je pokazano u proučavanju drugih parametara kvaliteta blitve (Ivanovic et al., 2019), navodnjavanje nije značajno uticalo na nutrijente i fitohemikalije u blitvi. Kako je ovo istraživanje postavljeno u uslovima otvorenog polja, vjerovatno da je izostanak efekta navodnjavanja na testirane parametre bio usled klimatskih faktora (uglavnom padavina) koje su poremetile program navodnjavanja.

4.9. Sadržaj nitrata u blitvi

Nitrati su komponente koje su zastupljene u većoj količini u grupi zelenog lisnatog povrća nego što je to slučaj u drugim vrstama povrća. Agronomski faktori, poput količine azota koji se primjenjuje preko fertilizacije, zatim faktori životne sredine i genetički faktori utiču na količinu nitrata u sirovom zelenom lisnatom povrću (Santamaria, 2006). Budući da se u ovom eksperimentu koristilo đubrenje, bilo je potrebno odrediti sadržaj nitrata kao i da li postoji uticaj primjenjenih režima na količinu nitrata u blitvi. Količina nitrata u zelenom lisnatom povrću može da bude u koncentraciji koja je štetna po ljudsko zdravlje. Zbog toga su od strane regulatornih tijela propisane maksimalno dozvoljene vrijednosti za nitrata (EU Regulative 1258/2011) kao što je to slučaj i sa drugim štetnim komponentama koje mogu da ugroze bezbjednost hrane, tj. zdravlje čovjeka, kako je pomenuto ranije u tekstu.

U Tabeli 4.10 su prikazani rezultati sadržaja nitrata u testiranim uzorcima svježe blitve. Vrijednosti koje su nađene za sadržaj nitrata su bile u opsegu od 425.43 do 2452.82 mg/kg. Najveća vrijednost je bila u uzorcima blitve koja je tretirana sa 50% većom količinom prihrane od optimalne (Đ150) a najniža u uzorcima blitve gdje nije bilo tretmana đubrenjem. Uzimajući u obzir da je ADI za nitrata 3,7 mg/kg tjelesne težine, odnosno za odraslu osobu od 60 kg 222 mg/dan (Keller et al., 2020), unos 100 g svježe blitve iz ove studije bi bio bezbjedan u pogledu nitrata (osim za tretman N50Đ150, gdje se prelazi vrijednost od 222 mg/dan). Dobijeni rezultati su usaglašeni sa drugim studijama koje su našle da se nitrati u blitvi akumuliraju u većoj količini sa porastom primjenjene količine azota (Dzida & Pitura, 2008; Engelbrecht et al., 2010; Miceli & Miceli, 2014; Kolota & Czerniak, 2010). U blitvi koja je bila podvrgnuta fertilizaciji sa količinama azota od 0, 50, 100, 150 i 200 kg/ha, dobijene su vrijednosti nitrata od 590,9 do 3571,0 mg/kg svježe blitve (Miceli & Miceli, 2014), gdje je maksimalna vrijednost postignuta pri najvećoj primjenjenoj količini azota, dok je minimalni

sadržaj nitrata nađen u netretiranoj blitvi. U studiji Kolote i saradnika u listovima i stabljikama blitve je izmjeren sadržaj nitrata koji je bio u opsegu od 255 do 1162 mg/kg u listovima, odnosno od 1290-5539 mg/kg u stabljikama, pri primjeni azota u količinama od 50-200 kg/ha, pri čemu su minimalne doze pri primjeni 50 kg/ha (tj. 50% manja vrijednost od optimalnih 100 kg/ha), dok su maksimalne vrijednosti pri najvećoj količini primjenjenog azota (Kolota & Czerniak, 2010). Na sadržaj nitrata u blitvi, osim količine azota koja se primjenjuje utiče i izvor preko koga se azot aplikuje, pa je tako nađeno da urea i kalijum nitrat daju znatno veći sadržaj nitrata u blitvi nego kada se kao izvor azota koristi amonijum nitrat (Dzida & Pitura, 2008). Sezona u kojoj blitva raste takođe utiče na sadržaj nitrata, te je tako nađeno da u jesenjoj sezoni rasta i listovi i peteljke blitve sadrže veću količinu nitrata od blitve gajene na proljeće (Kolota et al., 2010).

4.9.1. Statistički rezultati efekta navodnjavanja i fertilizacije na sadržaj nitrata

Rezultati statističke analize uticaja različitih normi navodnjavanja i prihrane su pokazali da obje primjenjene mjere imaju efekat na sadržaj nitrata u blitvi (Tabela 4.10), dok interakcija navodnjavanja i prihrane nije imala značajan efekat. Povećanjem količine primjenjene prihrane sadržaj nitrata se povećao, pri čemu su značajne razlike postojale između sve tri primjenjene količine prihrane (Đ50, Đ100 i Đ150). Slična zapažanja su uočili i drugi autori koji su ispitivali sadržaj nitrata u blitvi u zavisnosti od količine primjenjenog azotnog đubriva (Miceli & Miceli, 2014; Kolota & Czerniak, 2010; Dzida & Pitura, 2008; Dzida & Pitura, 2008; Engelbrecht et al., 2010). Sadržaj nitrata u povrću zavisi od brojnih faktora pri čemu najviše od primjene fertilizacije i od inteziteta svjetlosti (Khan et al., 2018).

U slučaju navodnjavanja efekat na sadržaj nitrata je bio takav da sa povećanjem normi navodnjavanja sadržaj nitrata u blitvi je opadao (tj. najveći sadržaj nitrata je zabilježen u uslovima deficitarnog navodnjavanja N50). Daljom statističkom obradom utvrđena je značajna razlika između tretmana N50 i N100 odnosno N150, dok između N100 i N150 normi nije postojala značajna razlika u pogledu efekta na sadržaj nitrata. Dobijeni rezultat u pogledu uticaja navodnjavanja može da se objasni činjenicom da sa povećanjem količine dostupne vode (Maynard & Hochmuth, 2007), dolazi do ispiranja nitrata iz zone korijena čime se i akumulacija nitrata u biljnom usjevu smanjuje. Poznato je da se nitrati vežu za koloide zemljišta negativnom fizičkom adsorpcijom zbog čega se lako ispiraju. Količina vode koja se primjenjuje kroz navodnjavanje biljnih usjeva ima uticaj na sadržaj nitrata u biljnim usjevima, pored uticaja na druge parametre rasta biljke (El-Metwally et al., 2021; Saady et al., 2020). Zabilježena su slična zapažanja i u drugim studijama, koje su našle da se u uslovima smanjene dostupnosti vode akumuliraju nitrati u listovima ispitivanih biljaka (Tamme et al., 2010; Schiattone et al., 2018).

Tabela 4.10 Rezultati analize nitrata u različitim tretmanima uzoraka blitve kao i statistički podaci uticaja navodnjavanja i fertilizacije na sadržaj nitrata.

Tretman	Nitrati mg/kg svježe blitve
Kontrole	
Đ0N0	1504,3±12,41
N100Đ0	425,43±17,05
N0Đ100	1452,55±10,55
Tretmani	
N50Đ50	723,35±63,61
N100Đ50	643,99±66,30
N150Đ50	494,28±29,93

Tretman	Nitrati mg/kg svježe blitve
N50Đ100	1566,75±197,01
N100Đ100	1438,17±104,70
N150Đ100	1266,60±68,78
N50Đ150	2452,82±106,22
N100Đ150	2154,87±139,81
N150Đ150	2157,63±143,04
ANOVA	
Đ	469,954*
N	13,511*
Đ×N	0,928

Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ±SD koja potiče od tri mjerenja za isti tretman sa različitim parcela, dok su kontrole prikazane kao srednja vrijednost±SD triplikata iz iste parcele (n=3); * statistički značajno za $p \leq 0,05$; Đ-đubrenje, N-navodnjavanje.

4.10. Rezultati ispitivanja mikrobiološke aktivnosti metanolnih ekstrakata blitve

U cilju ispitivanja potencijalnih mikrobioloških aktivnosti, urađen je antibiogram test, kako bi se utvrdilo da li metanolni ekstrakt blitve pokazuje stimulatornu ili pak inhibitornu aktivnost prema odabranim mikroorganizmima. Zeleno lisnato povrće, zbog prisustva bioloških aktivnih supstanci i fitonutrijenata, ima širok opseg bioloških aktivnosti poput antioksidativnih i antimikrobnih aktivnosti (Hossaini et al., 2020; Kim et al., 2013).

Rezultati praćenja mikrobiološke aktivnosti metanolnog ekstrakta blitve nisu pokazale nijedan vid aktivnosti na testiranim mikroorganizmima, bilo inhibiciju rasta bilo pospješivanje rasta, što se može vidjeti na odabranim Slikama 4.16-4.19. Na slikama se vidi da su mikroorganizmi porasli u prisustvu ekstrakta blitve (50 i 100 μ L), ne stvarajući zonu inhibicije, što ukazuje na odsustvo inhibitorne aktivnosti metanolnog ekstrakta blitve. Takođe, ekstrakt blitve nije djelovao ni stimulatorno na rast odabranih mikroorganizama, jer u zoni ekstrakta se ne vidi pojačan rast mikroorganizma (Slike 4.16-4.19).

Rezultati ispitivanja mikrobiološke aktivnosti metanolnih ekstrakta blitve na rast odabranih mikroorganizama nije pokazao mikrobiološku aktivnost.



Slika 4.16: Rast *E. coli* u prisustvu ekstrakta blitve.



Slika 4.17: Rast *M. lysodeikticus* u prisustvu ekstrakta blitve.



Slika 4.18: Rast *C. Albicans* u prisustvu ekstrakta blitve.



Slika 4.19: Rast *A. niger* u prisustvu ekstrakta blitve.

4.11. Rezultati antiproliferativne aktivnosti blitve

Nakon što je iz metanolnog ekstrakta blitve identificirano prisustvo flavonoida koji pokazuju biološke aktivnosti, cilj je bio ispitati da li isti ekstrakt pokazuje aktivnost prema određenim komercijalnim malignim ćelijskim linijama. U tu svrhu je napravljen kompozitni uzorak blitve koji je sadržao sve tretmane blitve i jedan kontrolni uzorak, tj. blitva koja nije bila tretirana (N0Đ0). Ispitivan je uticaj metanolnog ekstrakta ova dva uzorka na ćelijske linije adenokarcinoma dojke MCF-7 i ćelije adenokarcinoma debelog crijeva HT-29, nakon 24h i nakon 48h.

Rezultati aktivnosti ekstrakta blitve na odabranim ćelijskim linijama su prikazani na Slikama 4.20 i 4.21. Kada posmatramo MCF-7 ćelije nakon 24 h inkubacije opaža se linearan odgovor procenta preživljavanja ćelija na primjenjene koncentracije ekstrakta od tretirane i netretirane blitve, na način da procenat preživljavanja ćelija raste sa opadanjem koncentracija primjenjenih ekstrakta. Ekstrakt tretirane blitve nakon 24 h inkubacije imao je IC_{50} vrijednost (koncentracija ekstrakta koja dovodi do preživljavanja 50% ćelija) 32,97 $\mu\text{g/ml}$, odnosno za netretirani ekstrakt 86,45 $\mu\text{g/ml}$. Kako se može vidjeti sa Slike 4.20 a i b odgovori oba ekstrakta su bili slični, ali je kriva proliferacije ćelija u odnosu na primjenjenu koncentraciju bila pravilnija i imala je veći nagib za netretirani ekstrakt blitve, tako da je dobijena IC_{50} vrijednost bila van opsega (86,45 $\mu\text{g/ml}$) i morala je da bude ekstrapolirana.

Nakon 48 h inkubacije, procenat preživljavanja ćelija značajno opada i za primjenjenu najveću koncentraciju tretiranog ekstrakta blitve (50 $\mu\text{g/ml}$) preživljava samo oko 20% ćelija, i IC_{50} vrijednost se pomjera ka nižim koncentracijama i iznosi 20,73 $\mu\text{g/ml}$. Sličan je trend i u slučaju netretiranog ekstrakta blitve (Slika 4.20 b), opada procenat preživljavanja i IC_{50} vrijednost je 23,33 $\mu\text{g/ml}$.

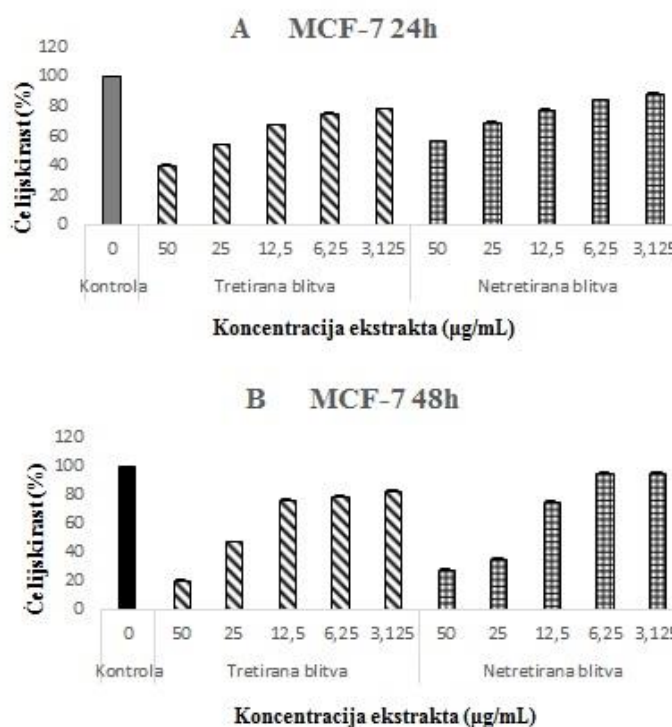
Rezultati uticaja tretiranog i netretiranog ekstrakta blitve na rast HT-29 ćelijskih linija su mnogo slabiji (Slika 4.21 a,b). Nakon 24 h, kako se može vidjeti i sa slike, kriva rasta ćelija nema linearan tok i najintezivniji je odgovor pri primjeni najveće koncentracije kod netretiranog ekstrakta gdje je procenat preživljavanja oko 80%. Dužom inkubacijom efekat na preživljavanje ćelija se pojačava (Slika 4.21 b), pa nakon 48 h imamo oko 69% preživljavanja pri primjeni najveće koncentracije ekstrakta tretirane blitve, odnosno oko 75% preživljavanja u slučaju ekstrakta netretirane blitve. I nakon 48 h odgovor preživljavanja ćelija u zavisnosti od koncentracija primjenjenih ekstrakata nije bio linearan, zbog čega IC_{50} vrijednosti nisu mogle biti izračunate za HT-29 ćelije.

Zajednička tvrdnja za obje kulture je da dužom inkubacijom najveća primjenjena koncentracija ekstrakta u oba slučaja pokazuje najintezivniji efekat. Antiproliferativni efekat ekstrakta blitve bio je efikasniji za ćelije MCF-7 nego za ćelije HT-29.

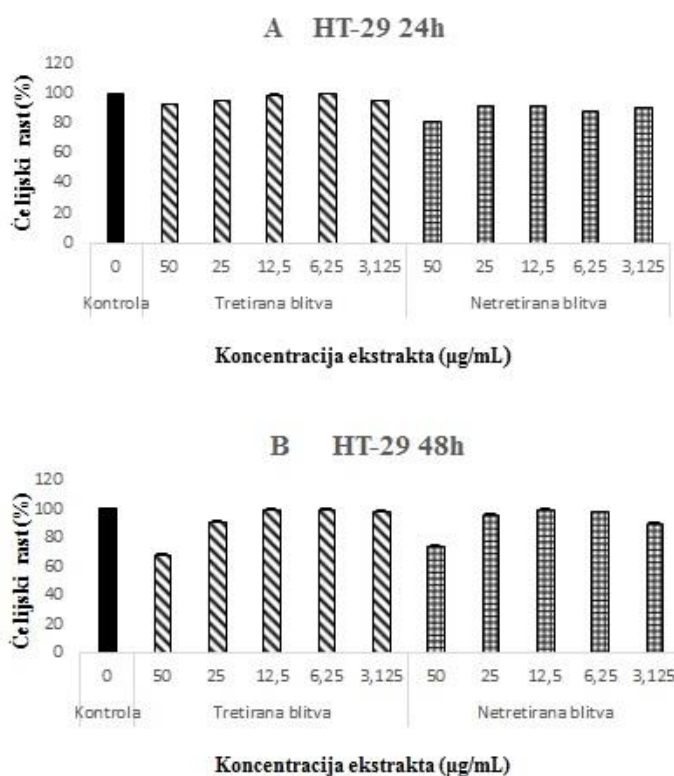
Poznato je da su flavonoidi, između ostalih njihovih pozitivnih efekata, odgovorni za antiproliferativna svojstva blitve (Ninfali et al., 2007). Takođe, vjeruje se da flavonoidna jedinjenja deluju sinergistički sa drugim fitohemikalijama, dajući poboljšane antiproliferativne efekte (Chandra et al., 2012; Phan et al., 2018; Yang et al., 2013). Primjenjeni ekstrakti tretirane i netretirane blitve sadrže tri derivata apigenina (viteksin-2"-*O*-ksilozid, viteksin-6"-*O*-acetil-2"-*O*-

ksilozid i viteksin-6"-*O*-malonil-2"-*O*-ksilozid) i izoramnetin-3,7-*O*-diglukozid, pri čemu najveću koncentraciju viteksin-2"-*O*-ksilozida. Ninfali i saradnici pokazali su da ekstrakt blitve, koji se uglavnom sastoji od derivata apigenina (viteksin-2"-*O*-ksilozida, viteksin-2"-*O*-ramnozid), izoramnetin-3-gentiobiozid-a i rutina, inhibira brzinu sinteze dezoksiribonukleinske kiseline u ćelijama MCF-7 (Ninfali et al., 2007). Ekstrakt koji je sadržao viteksin-2"-*O*-ksilozid i jedinjenja iz grupe fenolnih alkaloida je pokazao antiproliferativni efekat na CaCo-2 (ćelije kancera kolona) i HepG2 (ćelije kancera jetre) (Scarpa et al., 2018) ćelijskim linijama u *in vitro* uslovima. Na osnovu navedenog, može da se pretpostavi da su za pozitivan rezultat inhibicije rasta MCF-2 ćelija u ovoj studiji odgovorni upravo identifikovani flavonoidi.

Dodatno, Papi i saradnici su pokazali da je prečišćeno VOX jedinjenje iz sjemena blitve efikasno u inhibiciji proliferacije ćelija raka crijeva, tj. RKO, Caco2 i LoVo ćelijskih linija (Papi et al., 2013). VOX jedinjenja inhibiraju crijevne ćelijske linije putem indukcije apoptoze. U ovom istraživanju je dobijen veoma loš odgovor ćelijske linije HT-29 na primjenjene ekstrakte blitve, koji su između ostalih jedinjenja sadržali VOX. Očekivano je bilo, budući da su primjenjeni ekstrakti sadržali VOX da reakcija na rast HT-29 ćelija bude efektivnija. Međutim, rezultati naše studije sugerišu da kombinacija i sinergistička aktivnost fitohemikalija u ekstraktima blitve imaju značajan uticaj na ćelijsku proliferaciju i efekti bi se mogli razlikovati od efekta pojedinačnih, prečišćenih jedinjenja, kao što je ranije objavljeno (Papi et al., 2013). Da bi se donijeli tačni zaključci u vezi slabog odgovora HT-29 ćelija na primjenjene ekstrakte blitve, potrebno bi bilo ispitati kakav efekat na rast HT-29 ćelija ima svaki pojedinačni identifikovani flavonoid, čime bi se utvrdilo da li postoji antagonistički uticaj. Takođe bilo bi značajno utvrđivanje tačnog mehanizma kojim VOX izaziva inhibiciju rasta ćelija kancera debelog crijeva (RKO, Caco2 i LoVo), tj. na koji način se indukuje apoptoza, koji su sve faktori uključeni i kao najvažnije preko kojih receptora. Moguće je da receptori za koje se vezuje VOX na pomenutim ćelijskim linijama (RKO, Caco2 i LoVo) uopšte nisu prisutni na HT-29 ćelijskim linijama, što bi onda objasnilo slabiji odgovor iz ove studije.



Slika 4.20: Proliferativna aktivnost MCF-7 ćelijskih linija usled dejstva ekstrakta tretirane i netretirane blitve, posle A) 24 h i B) 48 h.



Slika 4.21: Proliferativna aktivnost HT-29 ćelijskih linija usled dejstva ekstrakta tretirane i netretirane blitve, posle A) 24 h i B) 48 h.

4.12. Statistički rezultati Pirsonove bivarijantne korelacije

Pirsonova korelacija je statistička metoda kojom se utvrđuje korelacija između dvije kontinuirane varijable sa intervalne ili razmjerne skale. Svi parametri koji su ispitivani u ovom eksperimentu u svježim uzorcima blitve su obrađeni u SPSS, u cilju određivanja korelacije među parametrima, za stepen značajnosti $p \leq 0,01$ i $p \leq 0,05$. Međutim iako je veliki broj korelacija među parametrima utvrđen, za stepen značajnosti $p \leq 0,01$ ili $p \leq 0,05$, ovdje će biti prikazani rezultati korelacija između indeksa hlorofila i parametara blitve koji su određivani iz svježeg uzorka.

Postoje tri osnovne komponente korelacije i to:

1) koeficijent korelacije koji pokazuje stepen povezanosti dvije varijable, pri čemu su određene orjentacione granične vrijednosti za ocjenu koeficijenta korelacije (r):

-vrijednost korelacionog koeficijenta do 0,2; veoma niska korelacija,

-od 0,2 do 0,4; niska korelacija,

-od 0,4 do 0,6; srednje visoka korelacija,

-od 0,6 do 0,8; visoka korelacija,

-od 0,8 do 1,0; veoma visoka korelacija.

2) predznak korelacije, tj. da li je povezanost dvije varijable pozitivna ili negativna

3) značajnost koeficijenta, tj. pomenuti stepen značajnosti p.

Indeks hlorofila, koji se mjeri na terenu, je relativna vrijednost koja predstavlja odnos transmitancije na 931 nm i 653 nm. CCl se mjeri optičkim uređajem tzv. hlorofilmetrom. Potrebno je često mjeriti sadržaj hlorofila u listovima biljke, posebno kada se mijenjaju uslovi u kojima se biljka gaji, jer on odražava fiziološki status i kvalitet biljke. Za ovakav način praćenja sadržaja hlorofila upravo su pogodni pomenuti terenski hlorofilmetri (Pal et al., 2012). Postoji snažna povezanost između izmjerene koncentracije hlorofila nakon ekstrakcije (laboratorijsko mjerenje) i

izmjerenog indeksa hlorofila (terensko mjerenje), što omogućava predviđanje sadržaja hlorofila terenskim mjerenjem (Almansoori et al., 2021).

Rezultati Pirsonove korelacije indeksa hlorofila sa parametrima koji su pokazali povezanost (za stepen značajnosti $p \leq 0,01$ ili $p \leq 0,05$) su prikazani u Tabeli 4.11, zajedno sa podacima korelacije. Iz Tabele 4.11 se može vidjeti da postoji statistički značajna pozitivna korelacija između vrijednosti indeksnog sadržaja hlorofila i sadržaja hlorofila a i b, vitamina C, ukupnih proteina, ukupnih karotenoida, ukupnih lipida i nitrata (Tabela 4.11). Povezanost indeksa hlorofila sa hlorofilom a i b je pozitivna, sa srednje visokom korelacijom za stepen značajnosti $p \leq 0,01$, sa proteinima je pozitivna korelacija, sa korelacionim koeficijentom koji označava veoma visoku korelaciju, za stepen značajnosti $p \leq 0,01$ (Tabela 4.11). Sadržaj indeksa hlorofila pokazuje pozitivnu korelaciju sa sadržajem nitrata koja je prema korelacionom koeficijentu označena kao visoka korelacija (Tabela 4.11). Ukupni karotenoidi i vitamin C su povezani sa indeksom hlorofila pozitivnom korelacijom, sa korelacionim koeficijentom koji označava srednje visoku korelaciju za stepen značajnosti $p \leq 0,05$, odnosno $p \leq 0,01$, redom. Lipidi su sa sadržajem hlorofila u negativnoj korelaciji, sa srednje visokim stepenom korelacije. Dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost predviđanja parametara rasta i kvaliteta blitve, što daje mogućnost uticanja na kvalitet blitve još u fazi gajenja.

Tabela 4.11: Prikaz podataka (korelacioni koeficijent i stepen značajnosti) Pirsonove korelacije, između sadržaja indeksa hlorofila i određenih parametara svježe blitve.

Parametri svježe blitve	CCL
Proteini	$p=0,000$; $r=0,815$
Vitamin C	$p=0,008$; $r=0,503$
Karotenoidi	$p=0,032$; $r=0,413$
Chl a	$P=0,005$; $r=0,523$
Chl b	$P=0,004$ $r=0,53$
Lipidi	$P=0,025$; $r=-0,430$
itrati	$P=0,001$; $r=0,623$

p- je stepen značajnosti; r-Pirsonov korelacioni koeficijent

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu svih izloženih i diskutovanih rezultata u ovoj doktorskoj disertaciji, mogu se formulirati sledeći zaključci:

- ✓ Ispitivanjem fizičko-hemijskih parametara zemljišta nađeno je da je blitva gajena na zemljištu koje se klasifikuje kao slabo kiselo do kiselo, niskog saliniteta, bogato do veoma bogato organskom materijom (humus), koje je srednje do veoma bogato nutrijentima.
- ✓ Prinos blitve svih primjenjenih tretmana i kontrola je imao srednju vrijednost 0,96 kg/m², pri čemu najveću vrijednost postiže pri tretmanu koji je imao optimalnu normu navodnjavanja i prihranu koja je bila 50% veća od optimalne (N100Đ150), dok je najmanji prinos bio u kontrolnom uzorku (N0Đ0). Prosječna dužina lista među svim tretmanima i kontrolama je 28,36 cm, srednja vrijednost prosječnog broja listova 5,28.
- ✓ Efekat različite prihrane je uticao na prinos i na morfološke parametre blitve koja je gajena u primjenjenim uslovima rasta. Sa povećanjem količine NPK prihrane došlo je do povećanja prinosa i morfoloških parametara.
- ✓ Proksimativna analiza je pokazala da je u blitvi najviše vode (prosjek 89%), ukupnih šećera (4,9%), proteina (2,5%), pepela (ukupni minerali) (1,8%) i lipida (0,4%), što je dalo prosječnu energetska vrijednost od 133,74 kJ (odnosno 31,94 kcal).
- ✓ Među komponentama određenim proksimativnom analizom, jedino je primjena prihrane imala uticaja na sadržaj proteina u blitvi. Povećanjem nivoa prihrane povećao se sadržaj proteina u blitvi.
- ✓ Praćenje individualnog sadržaja makro- i mikroelemenata u različitim tretmanima blitve i kontrolnim uzorcima su pokazali da je blitva bogata mineralima, kako makroelementima tako i mikroelementima. Među testiranim makroelementima najviše je zastupljen kalijum (372,49 mg/100 g), pa slijede kalcijum (178,6 mg/100 g), natrijum (139,61 mg/100 g), magnezijum (101,99 mg/100 g) i fosfor (47,0 mg/100 g). Što se tiče testiranih mikroelemenata, u najvećoj količini je pronađen mangan (8,35 mg/100 g), kojeg slijede gvožđe (1,46 mg/100 g) cink (0,66 mg/100 g), bakar (0,38 mg/100 g), hrom (4,69 µg/100 g) i kobalt (3,13 µg/100 g). Mangan je u blitvi bio prisutan u većim količinama nego što je to uobičajeno vjerovatno kao posledica nešto kiselijeg zemljišta na kome je blitva gajena.
- ✓ Uticaj različitih nivoa prihrane na individualni sadržaj makro- i mikroelemenata u blitvi je pokazan jedino na količinu fosfora. Sa povećanjem primjenjene količine prihrane opada sadržaj fosfora u blitvi. Posmatrajući interakciju navodnjavanja i prihrane na koncentracije makro- i mikroelemenata značajan uticaj je nađeno na sadržaj Na i Cu u blitvi. Sadržaj Na i Cu je imao najnižu vrijednost za N100Đ150 tretman dok je najveću vrijednost imao za N100Đ50 tretman.
- ✓ Analizom fitohemikalija u blitvi nađeno je da sadrži visok sadržaj pigmenata, hlorofila a i b, kao i ukupnih karotenoida. Takođe, blitva gajena u ovom eksperimentu je bogata vitaminom C. Sadržaj ukupnih fenola i ukupnih flavonoida ukazuje da se u blitvi nalaze srednje do visoke količine ovih komponenti u poređenju sa drugim vrstama povrća.
- ✓ Efekat različite prihrane ima uticaj na sadržaj hlorofila a, hlorofila b i vitamina C dok je za sadržaj ukupnih karotenoida na granici (p=0,05), dok na TPC i TFC nije bilo značajnog uticaja u blitvi gajenoj za potrebe ove studije. Fertilizacija sa najvećom količinom NPK prihrane ima pozitivan efekat na sadržaj hlorofila a i b i vitamina C, te se može reći da veća količina primjenjenog NPK đubriva povećava sintezu ukupnog hlorofila i vitamina C. Izostanak efekta primjenjenih tretmana na sadržaj TPC i TFC je vjerovatno usled toga što blitva nije bila izložena „stresu“, koji bi izazvao promjene u sadržaju ovih komponenti.

- ✓ Ispitivana antioksidativna aktivnost ekstrakata blitve ukazala je da vodeni ekstrakt blitve ima visoku antioksidativnu aktivnost. Srednja vrijednost svih testiranih uzoraka za IC_{50} = 3,79 mg/ml, što ako je poredimo sa drugim povrćem ukazuje na visok antioksidativni kapacitet. Slična zapažanja u pogledu visokog antioksidativnog kapaciteta su pokazana na metanolnim ekstraktima blitve za primjenjene antioksidativne testove. Efekti navodnjavanja i prihrane na testirane antioksidativne parametre nije bio uočen, osim uticaja prihrane i interakcije prihrane i navodnjavanja (Đ×N) na DPPH aktivnost metanolnog ekstrakta. Optimalni tretman đubrenja (Đ100) je značajno doprinio većoj DPPH aktivnosti metanolnih rastvora blitve u poređenju sa tretmanima Đ50 i Đ150 koji su proizvodili blitvu čiji metolni ekstrakt je imao sličnu DPPH aktivnost. Što se tiče uticaja interakcije đubrenja i navodnjavanja (N×Đ) na rezultat DPPH testa, utvrđeno je da optimalni nivoi đubrenja i navodnjavanja (Đ100N100) blitve proizvode najveću antioksidativnu aktivnost metanolnog ekstrakta.
- ✓ U metanolno-vodenom ekstraktu blitve su identifikovani polifenoli koji pripadaju grupi flavonoida: viteksin-2"-*O*-ksilozid, viteksin-6"-*O*-malonil-2"-*O*-ksilozid, izoramnetin-3,7-*O*-diglukozid i viteksin-6"-*O*-acetil-2"-*O*-ksilozid. Nakon identifikacije, njihove strukture su potvrđene NMR spektroskopijom.
- ✓ Kvantitativna analiza identifikovanih flavonoida pokazala je da je u svim uzocima blitve najzastupljeniji bio viteksin-2"-*O*-ksilozid, a za njim redom: viteksin-6"-*O*-malonil-2"-*O*-ksilozid, izoramnetin-3,7-*O*-diglukozid i najmanje zastupljen viteksin-6"-*O*-acetil-2"-*O*-ksilozid. Efektom različite prihrane može se, kako je pokazano, djelovati samo na koncentraciju izoramnetin-3,7-*O*-diglukozida, na način da veća primena NPK prihrane proizvodi blitvu sa nižim koncentracijama izoramnetin-3,7-*O*-diglukozida. Pokazan je uticaj interakcije đubrenja i navodnjavanja na sadržaj viteksin-2"-*O*-ksilozida. Najmanji sadržaj viteksin-2"-*O*-ksilozida dobijen je za tretmane N150Đ100 i N100Đ150, dok je najveći sadržaj VOX-a nađen za tretman blitve N50Đ50 kao i za tretman N150Đ150. Stoga bi ovi rezultati mogli biti korisni u korišćenju kombinacija prihrane i navodnjavanja kako bi se proizvela blitva koja sadrži visok sadržaj biološki aktivnih komponenti.
- ✓ Rezultati antiproliferativne aktivnosti ekstrakta blitve na maligne ćelijske linije MCF-7 i HT-29 su pokazali da inhibira proliferaciju MCF-7 ćelijskih linija nakon inkubacije od 48h za 70%. Odgovor ćelijske linije HT-29 na primjenjene ekstrakte je nelinearan i niži u odnosu na MCF-7 ćelije. Dužom inkubacijom efekat na preživljavanje ćelija obje linije se pojačava.
- ✓ Rezultati antimikrobne aktivnosti su pokazali da testirani ekstrakti blitve nisu imali antimikrobna svojstva.
- ✓ Sadržaj nitrata u svježoj blitvi svih testiranih uzoraka je u količinama koje su bezbjedne za konzumaciju a prema poslednjim istraživanjima nitrati doprinose prevenciji kardiovaskularnih bolesti. Na sadržaj nitrata u blitvi tretmani prihrane i navodnjavanja su imale uticaja i to na način da povećanje prihrane povećava sadržaj nitrata, odnosno povećanje normi navodnjavanja smanjuje sadržaj nitrata.
- ✓ Zabilježen je izostanak efekta navodnjavanja u odnosu na sve testirane parametre iz ove studije, osim na sadržaj nitrata. Naime, vjerovatno usled velikog broja kišnih dana u toku rasta blitve došlo je do izostanka efekta ove mjere.
- ✓ Iz priloženog možemo da sumiramo da je blitva koja je gajena na teritoriji Crne Gore (klimatski uslovi), pod primjenjenim uslovima imala bogat nutritivni i fitonutritivni sadržaj. Blitva iz ove studije sadrži komponente koje imaju antioksidativna i antiproliferativna svojstva, čime se može smatrati potencijalno funkcionalnom hranom.

6. LITERATURA

- Abbas M., Saeed F., d Anjum F. M., Afzaal M., Tufail Tabussam., Bashir M. S., Ishtiaq A., Hussain S., Suleria H. A. R. Natural Polyphenols: An Overview. *International Journal of Food Properties*. 20 (8) (2017) 1689–99.
- Abdelhady M. I.S., Motaal A. A. A Cytotoxic C-Glycosylated Derivative of Apigenin from the Leaves of *Ocimum Basilicum* Var. *Thyrsiflorum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 26 (6) (2016) 763–66.
- Abdulmalek M., Ximba B. J., Lewu F. B. Soil Properties, Growth, Mineral Content and Ultra-Structural Leaf Morphology of Swiss Chard in Response to Landfill Leachates Used as Irrigation Water. *International Journal of Agriculture and Biology*. 19 (3) (2017) 403–9.
- Abotaleb M., Liskova A., Kubatka P., Busselberg D. Therapeutic Potential of Plant Phenolic Acids in the Treatment of Cancer. *Biomolecules*. 10 (2) (2020) 221-243.
- Adeosun A. M., Ighodaro O. M., Aminu A. O., Ogunlana A. I. The Antioxidant and Phenolic Profiles of Five Green Vegetables Grown in Southern Nigeria. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*. 15 (4) (2016) 391–97.
- Afiomah C. S, Iwuozor K. Nutritional and Phytochemical Properties of Beta Vulgaris Linnaeus (Chenopodiaceae)—A Review. *Nigerian Journal of Pharmaceutical and Applied Science Research*. 9 (4) (2020) 38–44.
- Akamine H., Hossain M. A., Ishimine Y., Yogi K., Hokama K., Iraha Y., Aniya Y. Effects of Application of N, P and K Alone or in Combination on Growth, Yield and Curcumin Content of Turmeric (*Curcuma Longa L.*). *Plant Production Science*. 10 (1) (2007) 151-154.
- Ali F., Rahul, Naz F., Jyoti S., Siddique Y. H. Health Functionality of Apigenin: A Review. *International Journal of Food Properties*. 20 (6) (2017) 1197–1238.
- Alizadeh A., Khoshkhui M., Javidnia K., Firuzi O., Tafazoli E., Khalighi A. Effects of Fertilizer on Yield, Essential Oil Composition, Total Phenolic Content and Antioxidant Activity in *Satureja Hortensis L.* (Lamiaceae) Cultivated in Iran. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4 (1) (2010) 033–040.
- Allen R. G., Pereira L.S., RaesD. , Smith M. Crop Evapotranspiration: Guidelines for Computing Crop Requirements. *Irrigation and Drainage Paper No. 56, FAO* (1998).
- Almansoori T., Majeda S., Aljazeri M. Rapid and Nondestructive Estimations of Chlorophyll Concentration in Date Palm (*Phoenix Dactylifera L.*) Leaflets Using SPAD-502+ and CCM-200 Portable Chlorophyll Meters. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 33 (7) (2021) 532–43.
- Amarowicz R., Cwalina-Ambroziak B., Janiak M. A., Bogucka B. Effect of N Fertilization on the Content of Phenolic Compounds in Jerusalem Artichoke (*Helianthus Tuberosus L.*) Tubers and Their Antioxidant Capacity. *Agronomy*. 10 (8) (2020) 1215-1227.
- Angelino D., Berhow M., Ninfali P., Jeffery E. H. Caecal Absorption of Vitexin-2-O-Xyloside and Its Aglycone Apigenin, in the Rat. *Food and Function*. 4 (9) (2013) 1339–45.
- Arasaretnam S., Kiruthika A., Mahendran T. Nutritional and Mineral Composition of Selected Green Leafy Vegetables. *Ceylon Journal of Science*. 47 (1) (2018) 35-41.
- Aride P. H. R., Ferreira M. S., Duarte R. M., De Oliveira A. M., De Freitas D.V., dos Santos A. L. W., Nozawa S. R., Val A. L. Ascorbic Acid (Vitamin C) and Iron Concentration in Tambaqui, *Colossoma Macropomum*, Iron Absorption. *Journal of the World Aquaculture Society*. 41 (SUPPL. 2) (2010) 291–97.
- Arslan I., Cenzano A. M. N-Triterpene Saponins in Cancer Therapy: A Review of Mode of Action. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 30 (1) (2020) 1–6.
- Ašimović Z., Čengić L., Hodžić J., Murtić S. Spectrophotometric determination of total chlorophyll content in fresh vegetables. *God. LXI Broj*, 66 (2016)104-107.
- Astrini N.J., Rakhmawati T., Sumaedi S., Bakti I.G.M.Y. Identifying Objective Quality Attributes of Functional Foods. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*. 12 (2) (2020) 24–39.

- Aune D., Giovannucci E., Boffetta P., Fadnes L. T., Keum N. N., Norat T., Greenwood D. C., Riboli E., Vatten L. J., Tonstad S. Fruit and Vegetable Intake and the Risk of Cardiovascular Disease, Total Cancer and All-Cause Mortality-A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Studies. *International Journal of Epidemiology*. 46 (3) (2017) 1029–56.
- Ayaz F.A., Hayirlioglu-Ayaz S., Alpay-Karaoglu S., Grúz J., Valentová K., Ulrichová J., Strnad M. Phenolic Acid Contents of Kale (*Brassica Oleracea* L. Var. *Acephala* DC.) Extracts and Their Antioxidant and Antibacterial Activities. *Food Chemistry*. 107 (1) (2008) 19–25.
- Bajpai M., Mishra A., Prakash D. Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Some Leafy Vegetables. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 56 (7) (2005) 473–81.
- Ballistreri G., Continella A., Gentile A., Amenta M., Fabroni S., Rapisarda P. Fruit Quality and Bioactive Compounds Relevant to Human Health of Sweet Cherry (*Prunus Avium* L.) Cultivars Grown in Italy. *Food Chemistry*. 140 (4) (2012) 630–38.
- Barreira L., Resek E., Rodrigues M. J., Rocha M. I., Pereira H., Bandarra N., da Silva M. M., Varela J., Custódio L. “Halophytes: Gourmet Food with Nutritional Health Benefits? *Journal of Food Composition and Analysis*. 59 (2017) 35–42.
- Bassi D., Menossi M., Mattiello L. Nitrogen Supply Influences Photosynthesis Establishment along the Sugarcane Leaf. *Scientific Reports*. 8 (2018) 2327.
- Bavec M., Turinek M., Grobelnik-Mlakar S., Slatnar A., Bavec F. Influence of Industrial and Alternative Farming Systems on Contents of Sugars, Organic Acids, Total Phenolic Content, and the Antioxidant Activity of Red Beet (*Beta Vulgaris* L. Ssp. *Vulgaris* Rote Kugel). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*- 58 (22) (2010) 11825–31.
- Bendary E., Francis R. R., Ali H. M.G., Sarwat M. I., El Hady S. Antioxidant and Structure–Activity Relationships (SARs) of Some Phenolic and Anilines Compounds. *Annals of Agricultural Sciences*. 58 (2) (2013) 173–81.
- Bernacchi C.J., VanLoocke A. Terrestrial Ecosystems in a Changing Environment: A Dominant Role for Water. *Annual Review of Plant Biology*. 66 (1) (2015) 599–622.
- Bidchol A.M., Wilfred A., Abhijna P., Harish R. Free Radical Scavenging Activity of Aqueous and Ethanolic Extract of *Brassica Oleracea* L. Var. *Italica*. *Food Bioprocess. Technol* 4 (7) (2011) 1137–43.
- Bohn T., Davidsson L., Walczyk T., Hurrell R. F. Fractional Magnesium Absorption Is Significantly Lower in Human Subjects from a Meal Served with an Oxalate-Rich Vegetable, Spinach, as Compared with a Meal Served with Kale, a Vegetable with a Low Oxalate Content. *British Journal of Nutrition*. 91 (4) (2004) 601–6.
- Bohn T., Walczyk T. Determination of Chlorophyll in Plant Samples by Liquid Chromatography Using Zinc-Phthalocyanine as an Internal Standard. *Journal of Chromatography A*. 1024 (1–2) (2004) 123–28.
- Boligon A. A., Machado M. M., Athayde M. L. Technical Evaluation of Antioxidant Activity. *Medicinal Chemistry*. 4 (7) (2014) 517–22.
- Bolkent S., Yanardag R., Tabakoglu-Oguz A., Ozsoy-Sacan O. Effects of Chard (*Beta Vulgaris* L. Var. *Cicla*) Extract on Pancreatic B Cells in Streptozotocin-Diabetic Rats: A Morphological and Biochemical Study. *Journal of Ethnopharmacology*. 73 (1–2) (2000) 251–59.
- Bouayed J., Bohn T. Exogenous Antioxidants—Double-Edged Swords in Cellular Redox State. *Health Beneficial Effects at Physiologic Doses versus Deleterious Effects at High Doses Oxid Med Cell Longev*. 3 (4) (2010) 228–37.
- Boukhris M. A., Destandau E., El Hakmaoui A., El Rhaffari L., Elfakir C. A Dereplication Strategy for the Identification of New Phenolic Compounds from *Anvillea Radiata* (Coss. & Durieu). *Comptes Rendus Chimie*. 19 (9) (2016) 1124–32.
- Boysen R. I., Hearn M. T.W. Modern Methods in Natural Products Chemistry. *Comprehensive*

- Natural Products II: Chemistry and Biology*. 9 (1) (2010) 5–49.
- Bozokalfa M. K., Yagmur B., Ascioğul T. K., Esiyok D. Diversity in Nutritional Composition of Swiss Chard (*Beta Vulgaris* Subsp. L. Var. *Cicla*) Accessions Revealed by Multivariate Analysis. *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation*. 9 (4) (2011) 557–66.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology*. 28 (1) (1995) 25–30.
- Branisa J., Jenisova Z., Porubská M., Jomova K., Valko M. Spectrophotometric Determination of Chlorophylls and Carotenoids. An Effect of Sonication and Sample Processing. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 3 (2) (2014) 61–64.
- Brewer M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 10 (4) (2011) 221–47.
- Cai S., Wang O., Wang M., He J., Wang Y., Zhang D., Zhou F., Ji B. In Vitro Inhibitory Effect on Pancreatic Lipase Activity of Subfractions from Ethanol Extracts of Fermented Oats (*Avena Sativa* L.) and Synergistic Effect of Three Phenolic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60 (29) (2012) 7245–51.
- Cammarano D., Ronga D., Francia E., Akar T., Al-Yassin A., Benbelkacem A., Grando S., Romagosa I., Stanca A. M., Pecchioni N. Genetic and Management Effects on Barley Yield and Phenology in the Mediterranean Basin. *Frontiers in Plant Science*. 12 (2021).
- Caruso G., Formisano L., Cozzolino E., Pannico A., El-Nakhel C., Roupheal Y., Tallarita A., Cenvinzo V., De Pascale S. Shading Affects Yield, Elemental Composition and Antioxidants of Perennial Wall Rocket Crops Grown from Spring to Summer in Southern Italy. *Plants*. 9 (8) (2020) 1–15.
- Chandra S., Keluskar V., Naik Z., Sah K., Shetty A., Ammanagi R., Bagewadi A. Additive and Synergistic Effect of Phytochemicals in Prevention of Oral Cancer. *European Journal of General Dentistry*. 1 (3) (2012) 142–147.
- Chen Q., Sun H., Song W., Cao F., Tian C., Zhang Y. L. Size-Resolved Exposure Risk of Persistent Free Radicals (PFRs) in Atmospheric Aerosols and Their Potential Sources. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 20 (22) (2020) 14407–17.
- Cheynier V., Comte G., Davies K. M., Lattanzio V., Martens S. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*. 72 (2013) 1–20.
- Chimactiv, 2016. [http://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe/\[29.06.2022.\]](http://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe/)
- Christopoulos M., Ouzounidou G. Climate Change Effects on the Perceived and Nutritional Quality of Fruit and Vegetables. *Journal of Innovation Economics & Management*. 34 (1) (2020) 79–99.
- Cicero A.F.G., Colletti A. Effects of Carotenoids on Health: Are All the Same? Results from Clinical Trials. *Current Pharmaceutical Design* 23 (17) (2017) 2422–2427.
- Ciudad-Mulero M., Fernandez-Ruiz V., Matallana-Gonzalez M. C., Morales P. Dietary Fiber Sources and Human Benefits: The Case Study of Cereal and Pseudocereals. In *Advances in Food and Nutrition Research*. 90 (2019) 83–134.
- Clevidence B., Paetau I., Smith J. C. Bioavailability of Carotenoids from Vegetables. *HortScience*. 35 (4) (2000) 585–88.
- Correia M., Barroso A., Barroso M. F., Soares D., Oliveira M. B.P.P., Delerue-Matos C. Contribution of Different Vegetable Types to Exogenous Nitrate and Nitrite Exposure. *Food Chemistry*. 120 (4) (2010) 960–66.
- Cory H., Passarelli S., Szeto J., Tamez M., Mattei J. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition*. 5 (2018) (Article 87).
- Coskun O. Separation Techniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*. 3 (2) (2016) 156–60.

- Cronin P., Joyce S. A., O'toole P. W., O'connor E. M. Dietary Fibre Modulates the Gut Microbiota. *Nutrients*. 13 (5) (2021) 1655- 1677.
- Cui J., Lian Y., Zhao C., Du H., Han Y., Gao W., Xiao H., Zheng J. Dietary Fibers from Fruits and Vegetables and Their Health Benefits via Modulation of Gut Microbiota. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 18 (5) (2019) 1514–32.
- Daiss N., Lobo M. G., Socorro A. R., Brückner U., Heller J., Gonzalez M. The Effect of Three Organic Pre-Harvest Treatments on Swiss Chard (*Beta Vulgaris* L. Var. *Cycla* L.) Quality. *European Food Research and Technology*. 226 (3) (2008) 345–53.
- Daryabor G., Atashzar M. R., Kabelitz D., Meri S., Kalantar K. The Effects of Type 2 Diabetes Mellitus on Organ Metabolism and the Immune System. *Frontiers in Immunology*. 11 (Article 1582) (2020).
- DeSalvo K.B., Olson R., Casavale K.O. Dietary Guidelines for Americans. *JAMA*. 315 (5) (2016) 457-458.
- De la Guardia M., Armenta S. Multianalyte Determination versus One-at-a-Time Methodologies. In *Comprehensive Analytical Chemistry*. 57 (2011) 121–56.
- Del Rio D., Costa L. G., Lean M. E. J., Crozier A. Polyphenols and Health: What Compounds Are Involved? *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 20 (1) (2010) 1–6.
- Denny A., Buttriss J. Plant Foods and Health: Focus on Plant Bioactives. *Synthesis Report*, no. 4 (2007).
- De Rango-Adem E. F., Blay J. Does Oral Apigenin Have Real Potential for a Therapeutic Effect in the Context of Human Gastrointestinal and Other Cancers? *Frontiers in Pharmacology*. 12 (Article number 681477) (2021).
- Deveci M., Ozturk S., Altıntas S., Arın L. The Effect of Irrigation Water Salinity on the Morphological and Physiological Traits of Swiss Chard (*Beta Vulgaris* L. Var. *Cicla* Moq.). *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*. 7 (6) (2019) 903-907.
- Dias J.S. Major Classes of Phytonutriceuticals in Vegetables and Health Benefits: A Review. *Journal of Nutritional Therapeutics*. 1 (2012) 31-62.
- Dias M. C., Pinto D. C. G. A., Silva A. M. S. Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*. 26 (17) (2021) 5377-5393.
- Dietz W. H., Baur L.A., Hall K., Puhl R. M., Taveras E.M., Uauy R., Kopelman P. Management of Obesity: Improvement of Health-Care Training and Systems for Prevention and Care. *The Lancet*. 385 (9986) (2015) 2521–33.
- Di Lorenzo C., Colombo F., Biella S., Stockley C., Restani P. Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients*. 13 (1) (2021) 1–30.
- Di Nicolantonio J. J., Bhutani J., O'Keefe J. H. The Health Benefits of Vitamin K. *Open Heart*. 2 (1) (2015).
- Dizdaroglu M., Jaruga P. Mechanisms of Free Radical-Induced Damage to DNA. *Free Radical Research*. 46 (4) (2012) 382–419.
- Djurović N., Cosic M., Stricevic R., Savic S., Domazet M. Effect of Irrigation Regime and Application of Kaolin on Yield, Quality and Water Use Efficiency of Tomato. *Scientia Horticulturae*. 201(2016) 271–78.
- Domínguez-Avila A. J., Olivas-Aguirre F. J., de la Rosa L. A., Abraham-Medrano W. A., González-Aguilar G. A. Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health (2nd edition): Chapter 7: Flavonoids and Their Relation to Human Health. Vol. 1. (2017) 139-151.
- Dominguez Diaz L., Fernandez-Ruiz V., Camara M. An International Regulatory Review of Food Health-Related Claims in Functional Food Products Labeling. *Journal of Functional Foods* 68 (Article 103896) (2020).
- Donovan J. L., Manach C., Faulks R. M., Kroon P. A. Absorption and Metabolism of Dietary Plant Secondary Metabolites. In *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the*

- Human Diet - Chapter 8: Absorption and Metabolism of Dietary Plant Secondary Metabolites . (2007) 303–51.
- Du T., Kang S., Zhang J., Li F., Yan B. Water Use Efficiency and Fruit Quality of Table Grape under Alternate Partial Root-Zone Drip Irrigation. *Agricultural Water Management*. 95 (6) (2008) 659–68.
- Dzamic R., Stevanovic D., Jakovljevic M. *Praktikum Iz Agrohemiije*. Edited by Nedeljko Tica. (1996) Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Dzida K., Pitura K. The Influence of Varied Nitrogen Fertilization on Yield and Chemical Composition of Swiss Chard (*Beta Vulgaris* L. Var. *Cicla* L.). *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*. 7 (3) (2008) 15–24.
- Echer M. de M., Zoz T., Rossol C. D., Steiner F., Castagnara D. D., Lana M. do C. Plant Density and Nitrogen Fertilization in Swiss Chard. *Horticultura Brasileira*. 30 (4) (2012) 703–7.
- EFSA. *TOLERABLE UPPER INTAKE LEVELS FOR VITAMINS AND MINERALS*. *Scientific Committee on Food Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies* (2006).
- El-Ishaq A., Obirinakem S. Effect of Temperature and Storage on Vitamin C Content in Fruits Juice. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science*. 1 (2) (2015) 17–21.
- El-Ramady H. R., Alshaal T. A., Amer M., Domokos-Szabolcsy E., Elhawati N., Prokisch J., Fari M. Sustainable Agriculture Reviews; Chapter 11: Soil Quality and Plant Nutrition. Vol. 14 (2014) 345–447.
- El-Metwally I., Gerjes L., Saady H. Interactive Effect of Soil Mulching and Irrigation Regime on Yield, Irrigation Water Use Efficiency and weeds of Trickle-Irrigated Onion. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 68 (8)(2021) 1103-1116.
- Elvira-Torales L. I., Garcia-Alonso J., Periago-Caston M. J. Nutritional Importance of Carotenoids and Their Effect on Liver Health: A Review. *Antioxidants*. 8 (7) (2019) 229-252.
- EN 12014-2:2017. HPLC/IC method for the determination of nitrate content of vegetables and vegetable products. Standard, 18 pages.
- Engelbrecht G. M., Ceronio G. M., Motseki P. C. Effect of Nitrogen Levels and Sources on Production of Swiss Chard (*Beta Vulgaris* Var. *Cicla*). *South African Journal of Plant and Soil*. 27 (3) (2010) 229–34.
- Erkekoglu P., Baydar T. Evaluation of the Protective Effect of Ascorbic Acid on Nitrite- and Nitrosamine-Induced Cytotoxicity and Genotoxicity in Human Hepatoma Line. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 20 (2) (2010) 45–52.
- Erwin J., Gesick E. Photosynthetic Responses of Swiss Chard, Kale, and Spinach Cultivars to Irradiance and Carbon Dioxide Concentration. *HortScience*. 52 (5) (2017) 706–12.
- Essa M. M., Bishir M., Bhat A., Chidambaram S. B., Al-Balushi B., Hamdan H., Govindarajan N., Freidland R. P., Qoronfleh M. W. Functional Foods and Their Impact on Health. *Journal of Food Science and Technology*. (2021).
- EU Commission Regulation No 1258/2011 of 2 December 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for nitrates in foodstuffs.
- Everette D. J., Bryant Q. M., Green A. M., Abbey Y. A., Wangila G. W., Walker R.B. Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin-Ciocalteu Reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58 (14) (2010) 8139–44.
- Fan Y., Pedersen O. Gut Microbiota in Human Metabolic Health and Disease. *Nature Reviews Microbiology*. 19 (1) (2021) 55–71.
- FDA. Guidance for Industry: A Food Labeling Guide, 2013. [https://www.fda.gov/media/81606/download/\[28.12.2022.\]](https://www.fda.gov/media/81606/download/[28.12.2022.]).
- Fernandez-Panchon M. S., Villano D., Troncoso A. M., Garcia-Parrilla M. C. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds: From in Vitro Results to in Vivo Evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48 (7) (2008) 649–71.
- Food and Agriculture organization of the United nations, 1985.

- [http://www.fao.org/3/x5648e/x5648e0e.htm/\[28.12.2022.\]](http://www.fao.org/3/x5648e/x5648e0e.htm/[28.12.2022.])
- Fraga C. G. Relevance, Essentiality and Toxicity of Trace Elements in Human Health. *Molecular Aspects of Medicine*. 26 (4-5) (2005) 235-44.
- Fraga C. G., Galleano M., Verstraeten S. V., Oteiza P. I. Basic Biochemical Mechanisms behind the Health Benefits of Polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*. 31 (6) (2010) 435–45.
- Galanakis C. M. Functionality of Food Components and Emerging Technologies. *Foods*. 10 (1) (2021) 128-154.
- Gamba M., Raguindin P. F., Asllanaj E., Merlo F., Glisic M., Minder B., Bussler W., Metzger B., Kern H., Muka T. Bioactive Compounds and Nutritional Composition of Swiss Chard (Beta Vulgaris L. Var. Cicla and Flavescens): A Systematic Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 61 (20) (2020) 3465-3480.
- Gennari L., Felletti M., Blasa M., Angelino D., Celeghini C., Corallini A., Ninfali P. Total Extract of Beta Vulgaris Var. Cicla Seeds versus Its Purified Phenolic Components: Antioxidant Activities and Antiproliferative Effects against Colon Cancer Cells. *Phytochemical Analysis*. 22 (3) (2011) 272–79.
- Gezginci-Oktayoglu S., Sacan O., Bolkent S., Ipci Y., Kabasakal L., Sener G., Yanardag R. Chard (Beta Vulgaris L. Var. Cicla) Extract Ameliorates Hyperglycemia by Increasing GLUT2 through Akt2 and Antioxidant Defense in the Liver of Rats. *Acta Histochemica*. 116 (1) (2014) 32–39.
- Gharibzahedi S. M. T., Jafari S. M. The Importance of Minerals in Human Nutrition: Bioavailability, Food Fortification, Processing Effects and Nanoencapsulation. *Trends in Food Science and Technology*. 62: (2017) 119–32.
- Ghitu A., Schwiebs A., Radeke H. H., Avram S., Zupko I., Bor A., Pavel I. Z., Dehelean C.A., Oprean C., Bojin F., Farcas C., Soica C., Duicu O., Danciu C. A Comprehensive Assessment of Apigenin as an Antiproliferative, Proapoptotic, Antiangiogenic and Immunomodulatory Phytocompound. *Nutrients*. 11 (4) (2019) 858-877.
- Ghiu A., Pavel I. Z., Avram S., Kis B., Minda D., Dehelean C.A., Buda V., Folescu R., Danciu C. An in Vitro-In Vivo Evaluation of the Antiproliferative and Antiangiogenic Effect of Flavone Apigenin against SK-MEL-24 Human Melanoma Cell Line. *Analytical Cellular Pathology*. (2021).
- Giampieri F., Battino M. Bioactive Phytochemicals and Functional Food Ingredients in Fruits and Vegetables. *International Journal of Molecular Sciences*. 21 (9) (2020) 3278- 3281.
- Gil M. I., Ferreres F., Tomás-Barberán F. A. Effect of Modified Atmosphere Packaging on the Flavonoids and Vitamin C Content of Minimally Processed Swiss Chard (Beta Vulgaris Subspecies Cyclo). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46 (5) (1998) 2007–12.
- Goldberg S. Reactions of Boron with Soils. *Plant and Soil*. 193 (2) (1997) 35–48.
- Gomes C., Rautureau M. (Eds). Minerals *Latu Sensu* and Human Health. (2021) 81-179.
- Gomez-Rico A., Salvador M. D., Moriana A., Perez D., Olmedilla N., Ribas F., Fregapane G. Influence of Different Irrigation Strategies in a Traditional Cornicabra Cv. Olive Orchard on Virgin Olive Oil Composition and Quality. *Food Chemistry*. 100 (2) (2007) 568–78.
- Granger M., Eck P. Dietary Vitamin C in Human Health. In *Advances in Food and Nutrition Research*. 83 (2018) 281–310.
- Gruda N. Impact of Environmental Factors on Product Quality of Greenhouse Vegetables for Fresh Consumption. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 24 (3) (2005) 227–47.
- Guil J. L., Rodríguez-Garcí I., Torija E. Nutritional and Toxic Factors in Selected Wild Edible Plants. *Plant Foods for Human Nutrition*. 51 (2) (1997) 99–107.
- Gupta S., Lakshmi A. J., Prakash J. In Vitro Bioavailability of Calcium and Iron from Selected Green Leafy Vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86 (13) (2006) 2147–52.
- Gupta U. C., Gupta S. C. Sources and Deficiency Diseases of Mineral Nutrients in Human Health

- and Nutrition: A Review. *Pedosphere*. 24 (1) (2014) 13–38.
- Habermeyer M., Roth A., Guth S., Diel P., Engel K. H., Epe B., Furst P. et al. Nitrate and Nitrite in the Diet: How to Assess Their Benefit and Risk for Human Health. *Molecular Nutrition and Food Research*. 59 (1) (2015) 106–28.
- Haddad P., Eid Ho. The Antidiabetic Potential of Quercetin: Underlying Mechanisms. *Current Medicinal Chemistry*. 24 (4) (2016) 355–64.
- Hafsi C., h Atia A., Lakhdar A., Debez A., Abdelly C. Differential Responses in Potassium Absorption and Use Efficiencies in the Halophytes *Catapodium Rigidum* and *Hordeum Maritimum* to Various Potassium Concentrations in the Medium. *Plant Production Science*. 14 (2) (2011) 135–140.
- Hailay G., Haymanot A. The Response of Swiss Chard (*Beta Vulgaris* L.) to Nitrogen Levels and Intra-Row Spacing in Debre Berhan Central Ethiopia. *Journal of Horticulture and Postharvest Research*. 2 (2) (2019) 105–16.
- Hansch R., Mendel R. R. Physiological Functions of Mineral Micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology*. 12 (3) (2009) 259–66.
- Heffer P., Magen H., Mikkelsen R., Wichelns D. Managing Water and Fertilizer for Sustainable Agricultural Intensification. *International Fertilizer Industry Association*. (2015) 1–257.
- Helaly A. A., Hassan S. M., Craker L. E., Mady E. Effects of Growth-Promoting Bacteria on Growth, Yield and Nutritional Value of Collard Plants. *Annals of Agricultural Sciences*. 65 (1) (2020) 77–82.
- Hertog M. G.L., Hollman P. C.H., Katan M. B., Daan D., Kromhout K. Intake of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids and Their Determinants in Adults in the Netherlands. *Nutrition and Cancer*. 20 (1) (1993) 21–29.
- Hillstrom R.J., Yacopin-Ammons A. K., Lynch S.M. Vitamin C Inhibits Lipid Oxidation in Human HDL. *Journal of Nutrition*. 133 (10) (2003) 3047–51.
- Holley A. K., Bakthavatchalu V., Velez-Roman J. M., Clair D. K. S. Manganese Superoxide Dismutase: Guardian of the Powerhouse. *International Journal of Molecular Sciences*. 12 (10) (2011) 7114–62.
- Hopkins W. G., Huner N. P.A. Introduction to Plant Physiology 4th Edition. *John Wiley & Sons*. 39 (5) (2008) 561–63.
- Horbowicz H., Kosson R., Grzesiuk A., Debski H. Anthocyanins of Fruits and Vegetables - Their Occurrence, Analysis and Role in Human Nutrition. *Vegetable Crops Research Bulletin*. 68 (1) (2008) 5–22.
- Hord N. G., Tang Y., Bryan N. S. Food Sources of Nitrates and Nitrites: The Physiologic Context for Potential Health Benefits. *American Journal of Clinical Nutrition*. 90 (1) (2009) 1–10.
- Hossaini F., Munshi S. K., Chakraborty M. Antimicrobial Effects of Different Extracts of Medicinally Used Green Leafy Vegetables Collected from Local Market of Dhaka, Bangladesh. *Food Research*. 4 (3) (2020) 860–65.
- Hu M., Wu B., Liu Z. Bioavailability of Polyphenols and Flavonoids in the Era of Precision Medicine. *Molecular Pharmaceutics*. 14 (9) (2017) 2861–63.
- Hwang K., Lamb D.J. Molecular Mechanisms of Antioxidants in Male Infertility. In: Parekattil S., Agarwal A. (eds) *Male Infertility*. Springer, New York, NY (2012).
- Hybertson B. M., Gao B., Bose S. K., McCord J. M. Oxidative Stress in Health and Disease: The Therapeutic Potential of Nrf2 Activation. *Molecular Aspects of Medicine*. 32 (4–6) (2011) 234–46.
- Ierna A., Mauromicale G. Tuber Yield and Irrigation Water Productivity in Early Potatoes as Affected by Irrigation Regime. *Agricultural Water Management*. 115 (2012) 276–84.
- İnanc L. A. Chlorophyll: Structural Properties, Health Benefits and Its Occurrence in Virgin Olive Oils. *Akademik Gıda* 9(2) (2011) 26-32.
- IPNI (2022). International Plant Names Index. (<http://www.ipni.org>). [25.06.2022.]. Issa-Issa H.,

- Guclu G., Noguera-Artiaga L., López-Lluch D., Poveda R., Kelebek H., Selli S., Carbonell-Barrachina A. A. Aroma-Active Compounds, Sensory Profile, and Phenolic Composition of Fondillón. *Food Chemistry*. 316 (Article no 126353) (2020).
- Ivanovic Lj., Milasevic I., Topalovic A., Đurovic D., Mugosa B., Knezevic M., Vrvic M. Nutritional and Phytochemical Content of Swiss Chard from Montenegro, under Different Fertilization and Irrigation Treatments. *British Food Journal*. 121 (2) (2019) 411–25.
- Ivanovic Lj., Topalovic A., Bogdanovic V., Đurovic D., Mugosa B., Jadranin M., Tesevic V., Beskoski V. Antiproliferative Activity and Antioxidative Potential of Swiss Chard from Montenegro, Grown under Different Irrigation and Fertilization Regimes. *British Food Journal*. 123 (7)(2021) 2335–48.
- Iwatani S., Yamamoto N. Functional Food Products in Japan: A Review. *Food Science and Human Wellness*. 8 (2) (2019) 96–101.
- Johnson M.P. Photosynthesis. *Essays in Biochemistry*. 60 (3)(2016) 255-273..
- Jones P. J. H., Abumweis S. S. Phytosterols as Functional Food Ingredients: Linkages to Cardiovascular Disease and Cancer. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 12 (2) (2009) 147–51.
- Jurišić M., AGRO-BASE CD, 2022, <https://www.agroklub.rs/sortna-lista/povrce/blitva-134/> [20.06.2022.].
- Kaburagi E., Morikawa Y., Yamada M., Fujiyama H. Sodium Enhances Nitrate Uptake in Swiss Chard (Beta Vulgaris Var. Cicla L.). *Soil Science and Plant Nutrition*. 60 (5) (2014) 651–58.
- Kalai F. Z., Boulaaba M., Ferdousi F., Isoda H. Effects of Isorhamnetin on Diabetes and Its Associated Complications: A Review of In Vitro and In Vivo Studies and a Post Hoc Transcriptome Analysis of Involved Molecular Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*. 23 (2) (2022) 704-729.
- Kalia K., Sharma K., Singh H. P., Singh B. Effects of Extraction Methods on Phenolic Contents and Antioxidant Activity in Aerial Parts of Potentilla Atrosanguinea Lodd. and Quantification of Its Phenolic Constituents by RP-HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56 (21) (2008) 10129–34.
- Kanady J. A., Aruni A. W., Ninnis J. R., Hopper A. O., Blood J. D., Byrd Be. L., Holley L. R., et al. Nitrate Reductase Activity of Bacteria in Saliva of Term and Preterm Infants. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*. 27 (4) (2012) 193–200.
- Kapadia G. J., Azuine M. A., Sridhar R., Okuda Y., Tsuruta A., Ichiishi E., Mukainake T., et al. Chemoprevention of DMBA-Induced UV-B Promoted, NOR-1-Induced TPA Promoted Skin Carcinogenesis, and DEN-Induced Phenobarbital Promoted Liver Tumors in Mice by Extract of Beetroot. *Pharmacological Research*. 47 (2) (2003) 141–48.
- Karak P. Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 10 (4) (2019) 1567–74.
- Kasiri M.B., Safapour S. Exploring and Exploiting Plants Extracts as the Natural Dyes/Antimicrobials in Textiles Processing. *Color, Colorants and Coatings*. 8 (May) (2015) 87-114.
- Keller R. M., Beaver L., Prater M. C., Hord N. G. Dietary Nitrate and Nitrite Concentrations in Food Patterns and Dietary Supplements. *Nutrition Today* . 55 (5) (2020) 218–26.
- Keskes H., Belhadj S., Jlalil L., El Feki A., Sayadi S., Allouche N. LC–MS–MS and GC–MS Analyses of Biologically Active Extracts of Tunisian Fenugreek (Trigonella Foenum-Graecum L.) Seeds. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 12 (1) (2018) 209–20.
- Khan K. A., Yan Z., He D. Impact of Light Intensity and Nitrogen of Nutrient Solution on Nitrate Content in Three Lettuce Cultivars Prior to Harvest. *Journal of Agricultural Science*. 10 (6) (2018) 99-109.
- Khanam U. K. S., Oba S., Yanase E., Murakami Y. Phenolic Acids, Flavonoids and Total Antioxidant Capacity of Selected Leafy Vegetables. *Journal of Functional Foods*. 4 (4) (2012)

- Kim S. J., Cho A. R., Han J. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Leafy Green Vegetable Extracts and Their Applications to Meat Product Preservation. *Food Control*. 29 (1) (2013) 112–20.
- Kim Y., Han M. S., Lee J. S., Kim J., Kim Y. C. Inhibitory Phenolic Amides on Lipopolysaccharide-Induced Nitric Oxide Production in RAW 264.7 Cells from Beta Vulgaris Var. Cicla Seeds. *Phytotherapy Research*. 17 (8) (2003) 983–85.
- Kolota E., Czerniak K. The Effects of Nitrogen Fertilization on Yield and Nutritional Value of Swiss Chard. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*. 9 (2) (2010) 31–37.
- Kolota E., Sowinska K. A., Czerniak K. Yield and Nutritional Value of Swiss Chard Grown for Summer and Autumn Harvest. *Journal of Agricultural Science*. 2 (4) (2010) 120–124.
- Kopsell D. A., Kopsell D. E., Curran-Celentano J. Carotenoid Pigments in Kale Are Influenced by Nitrogen Concentration and Form. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87 (5) (2007) 900–907.
- Kopsell D. A., Kopsell D. E., Lefsrud M. G., Curran-Celentano J., Dukach L. E. Variation in Lutein, β -Carotene, and Chlorophyll Concentrations among Brassica Oleracea Cultigens and Seasons. *HortScience*. 39 (2) (2004) 361–64.
- Kraljević Gazivoda T. Određivanje Struktura Organskih Spojeva. Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zavod za organsku kemiju. (2015).
- Kroon P.A., Clifford M.N., Crozier A., Day A. J., Donovan J. L., Manach C., Williamson G. How Should We Assess the Effects of Exposure to Dietary Polyphenols in Vitro? *American Journal of Clinical Nutrition*. 80 (1) (2004) 15–21.
- Kugler F., Graneis Stephan, Stintzing Florian C., Carle R. Studies on Betaxanthin Profiles of Vegetables and Fruits from the Chenopodiaceae and Cactaceae. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*. 62 (5–6) (2007) 311–18.
- Kugler F., Stintzing F. C., Carle R. Identification of Betalains from Petioles of Differently Colored Swiss Chard (Beta Vulgaris L. Ssp. Cicla [L.] Alef. Cv. Bright Lights) by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (10) (2004) 2975–81.
- Kuhnau J. The Flavonoids. A Class of Semi-Essential Food Components: Their Role in Human Nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics*. 24 (1976) 117–91.
- Kumar B. R. Application of HPLC and ESI-MS Techniques in the Analysis of Phenolic Acids and Flavonoids from Green Leafy Vegetables (GLVs). *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 7 (6) (2017) 349–64.
- Kumar N., Goel N. Phenolic Acids: Natural Versatile Molecules with Promising Therapeutic Applications. *Biotechnology Reports*. 24 (2019) (e00370).
- Lanfer-Marquez U. M., Barros R. M.C., Sinnecker P. Antioxidant Activity of Chlorophylls and Their Derivatives. *Food Research International*. 38 (8–9) (2005) 885–91.
- Latimer G.W. Official Methods of Analysis of AOAC International, 19th Edition, Edited by Latimer. Association of Official Analysis Chemists International. Meryland, USA: AOAC International (2012).
- Lawson M., Jomova K., Poprac P., Kuca K., Musílek K., Valko M. Free Radicals and Antioxidants in Human Disease. In: Al-Gubory K., Laher I. (eds) *Nutritional Antioxidant Therapies: Treatments and Perspectives*. Springer, Cham. (2018) 283–305.
- Lee Y., Sung B., Kang Y. J., Kim D. H., Jang J. Y., Hwang S. Y., Kim M., et al. Apigenin-Induced Apoptosis Is Enhanced by Inhibition of Autophagy Formation in HCT116 Human Colon Cancer Cells. *International Journal of Oncology* 44 (5) (2014) 1599–1606.
- Leghari S. J., Wahocho N. A., Laghari G. M., Laghari A. H., Bhabhan G. M., Talpur K. H., Bhutto T. A., Wahocho S. A., Lashari A. A. Role of Nitrogen for Plant Growth Rowth and Development : A Review. *Advan Ces In Environmental Biology*. 10 (9) (2016) 209–214.

- Leopoldini M., Russo N., Toscano M. The Molecular Basis of Working Mechanism of Natural Polyphenolic Antioxidants. *Food Chemistry*. 125 (2) (2011) 288–306.
- Li H., Song F., Xing J., Tsao R., Liu Z., Liu S. Screening and Structural Characterization of α -Glucosidase Inhibitors from Hawthorn Leaf Flavonoids Extract by Ultrafiltration LC-DAD-MSn and SORI-CID FTICR MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 20 (8) (2009) 1496–1503.
- Li Z., Lee H. W., Liang X., Liang D., Wang Q., Huang D., Ong C. N. Profiling of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of 12 Cruciferous Vegetables. *Molecules*. 23 (5) (2018) 1139–1155. 2018.
- Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte D., Gargiulo G., et al. Oxidative Stress, Aging, and Diseases. *Clinical Interventions in Aging*. 13 (2018) 757–72.
- Lim T. K. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. Volume 12, *Modified Stems, Roots, Bulbs*. (2016).
- Lima G. P. P., Vianello F., Correa C. R., da Silva Campos R. A., Borguini M. G.. Polyphenols in Fruits and Vegetables and Its Effect on Human Health. *Food and Nutrition Sciences*. 05 (11) (2014) 1065–82.
- Lin L. Z., o Sun J., Chen P., Harnly J. UHPLC-PDA-ESI/HRMS/MSn Analysis of Anthocyanins, Flavonol Glycosides, and Hydroxycinnamic Acid Derivatives in Red Mustard Greens (Brassica Juncea Coss Variety). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59 (22) (2011) 12059–72.
- Liu L., Ueda A., Saneoka H. Physiological Responses of White Swiss Chard (Beta Vulgaris L. Subsp. Cicla) to Saline and Alkaline Stresses. *Australian Journal of Crop Science*. 7 (7) (2013) 1046–52.
- Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health. *Pharmacognosy Reviews*. 4 (8) (2010) 118–26.
- Loh Y. H., Jakszyn P., Luben R. N., Mulligan A. A., Mitrou P. N., Khaw K. T. N-Nitroso Compounds and Cancer Incidence: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk Study. *American Journal of Clinical Nutrition*. 93 (5) (2011) 1053–61.
- Lu J. M., Lin P. H., Yao Q., Chen C. Chemical and Molecular Mechanisms of Antioxidants: Experimental Approaches and Model Systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 14 (4) (2010) 840–60.
- Maathuis F. J. M. Physiological Functions of Mineral Macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology*. 12 (3) (2009) 250–58.
- Maboko M. M., Plooy C. P. D., Sithole M. A., Mbave A. Swiss Chard (Beta Vulgaris L.) Water Use Efficiency and Yield under Organic and Inorganic Mulch Application. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 19 (6) (2017) 1345–54.
- Maciel L. F., da Oliveira C. S., da Bispo E. S., Spínola da Miranda M. P. Antioxidant Activity, Total Phenolic Compounds and Flavonoids of Mangoes Coming from Biodynamic, Organic and Conventional Cultivations in Three Maturation Stages. *British Food Journal*. 113 (9) (2011) 1103–13.
- Madadi E., Mazloum-Ravasan S., Yu J. S., Ha J. W., Hamishehkar H., Kim K. H. Therapeutic Application of Betalains: A Review. *Plants*. 9 (9) (2020) 1–27.
- Madjar, S., Šoštarić J. Navodnjavanje Poljoprivrednih Kultura. Sveučilište "J.J. Strossmayer" u Osijeku, Poljoprivredni fakultet (2009).
- Madunić J., Madunić I. V., Gajski G., Popić J., Garaj-Vrhovac V. Apigenin: A Dietary Flavonoid with Diverse Anticancer Properties. *Cancer Letters*. 413 (2018) 11–22.
- Mak P., Leung Y. K., Tang W. Y., Harwood C., Ho S. M. Apigenin Suppresses Cancer Cell Growth through ER β . *Neoplasia*. 8 (11) (2006) 896–904.

- Maksoud S. A., El Hadidi M. N. The Flavonoids of *Balanites Aegyptiaca* (Balanitaceae) from Egypt. *Plant Systematics and Evolution*. 160 (3–4) (1988) 153–58.
- Malejane D. N., Tinyani P., Soundy P., Sultanbawa Y., Sivakumar D. Deficit Irrigation Improves Phenolic Content and Antioxidant Activity in Leafy Lettuce Varieties. *Food Science and Nutrition*. 6 (2) (2018) 334–41.
- Malhotra Hina V., Sharma S., Pandey R. Phosphorus Nutrition: Plant Growth in Response to Deficiency and Excess. In book: *Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance*. Springer, Singapore. (2018) 171–90.
- Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Rémésy C. Bioavailability and Bioefficacy of Polyphenols in Humans. I. Review of 97 Bioavailability Studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 81 (1 Suppl) (2005) 230S-242S.
- Manojlović M., Čabilovski R. Praktikum Iz Agrohemiije. Edited by Latković D. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad (2020).
- Maqbool M. A., Aslam M, Akbar W., Iqbal Z. Biological Importance of Vitamins for Human Health: A Review. *Journal of Agriculture and Basic Science*. 2 (3) (2017) 49-58.
- Martinez-Gonzalez M. A., Bes-Rastrollo M., Serra-Majem L., Lairon D., Estruch R., Trichopoulou A. Mediterranean Food Pattern and the Primary Prevention of Chronic Disease: Recent Developments. *Nutrition Reviews*. 67 (SUPPL. 1) (2009) S111-6.
- Martono Y., Yanuarsih F. F., Aminu N. R., Muninggar J. Fractionation and Determination of Phenolic and Flavonoid Compound from *Moringa Oleifera* Leaves. *Journal of Physics: Conference Series* 1307 (1) (2019) 012014.
- Marzeda P., Luszczki J. Role of Vitamin A in Health and Illness. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*. 13 (3) (2019) 137–42.
- Maseko I., Ncube B., Tesfay S., Fessehazion M., Modi A. T., Mabhaudhi T. Productivity of Selected African Leafy Vegetables under Varying Water Regimes. *Agronomy*. 10 (6) (2020) 916-930.
- Massad T. J., Dyer L. A., Vega C. G. Costs of Defense and a Test of the Carbon-Nutrient Balance and Growth-Differentiation Balance Hypotheses for Two Co-Occurring Classes of Plant Defense. *PLoS ONE* 7 (10) (2012) e47554.
- Matissek R., Steiner G. *Lebensmittelanalytik. Grundzüge "Methoden" Anwendungen* (2006).
- Maynard D. N., Hochmuth G. J. *Knott's Handbook for Vegetable Growers*. (2007)
- Melse-Boonstra A. Bioavailability of Micronutrients From Nutrient-Dense Whole Foods: Zooming in on Dairy, Vegetables, and Fruits. *Frontiers in Nutrition*. 7 (2020) (Article 101).
- Meng S., Zhu Y., Li J. F., Wang X., Liang Z., Li S. Q., Xu X., et al. Apigenin Inhibits Renal Cell Carcinoma Cell Proliferation. *Oncotarget*. 8 (12) (2017) 19834–42.
- Meng X., Chen W. W., Wang Y.Y., Huang Z. R., Ye X., Chen L. S., Yang L. T. Effects of Phosphorus Deficiency on the Absorption of Mineral Nutrients, Photosynthetic System Performance and Antioxidant Metabolism in *Citrus Grandis*. *PLoS ONE*. 16 (2) (2021) e0246944.
- Mensah J. K., Okoli R. I., Ohaju-Obodo J. O., Eifediyi K. Phytochemical, Nutritional and Medical Properties of Some Leafy Vegetables Consumed by Edo People of Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. 7 (14) (2008) 2304–9.
- Mercola J. The Damaging Effects of Oxalates on the Human Body. *Mercola*. (2019).
- Miceli A., Miceli C. Effect of Nitrogen Fertilization on the Quality of Swiss Chard at Harvest and during Storage as Minimally Processed Produce. *Journal of Food Quality*. 37 (2) (2014) 125–34.
- Miller A. J., Xu G., Fan X. Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. *Annual Review of Plant Biology*. 63 (3) (2012) 153–82.
- Milosavljević S. *Strukturne Instrumentalne Metode*. Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu. 2004.

- Mohamed M. A., Hir Z. A. M., Mokthar W. N. A. W., Osman N. S. Features of Metal Oxide Colloidal Nanocrystal Characterization. In *Colloidal Metal Oxide Nanoparticles*. (2020) 83–122.
- Moreira M. Del R., Roura S. I., Del Valle C. E. Quality of Swiss Chard Produced by Conventional and Organic Methods. *LWT - Food Science and Technology*. 36 (1) (2003) 135–41.
- Moreno-Ley C. M., Osorio-Revilla G., Hernández-Martínez D. M., Ramos-Monroy O. A., Gallardo-Velázquez T. Anti-Inflammatory Activity of Betalains: A Comprehensive Review. *Human Nutrition and Metabolism*. 25 (2021) (Artical 200126).
- Mostafa H., Mohamed M. H., Zahran M. Response of Lettuce Plants to Application of Compost Levels under Various Irrigation Regimes. *Middle East Journal of Agriculture Research*. 8 (2) (2019) 662–74.
- Motseki P. C. (2008). THE EFFECT OF NITROGEN FERTILISATION ON THE GROWTH , YIELD AND QUALITY OF SWISS CHARD (Beta Vulgaris Var . Cicla). Doktorska disertacija, In the Faculty of Natural and Agricultural Sciences Department of Soil, Crop and Climate Sciences University of the Free State Bloemfontein.
- Mroczek A., Klimczak U., Kowalczyk M. Determination of Saponins in Leaves of Four Swiss Chard (Beta Vulgaris L.) Cultivars by UHPLC-CAD/QTOF-MS/MS. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 71 (2) (2021) 147–59.
- Mu D., Hawks J., Diaz A. Impacts on Vegetable Yields, Nutrient Contents and Soil Fertility in a Community Garden with Different Compost Amendments. *AIMS Environmental Science*. 7 (4) (2020) 350–65.
- Mzoughi Z., Chahdoura H., Chakroun Y., Camara M., Fernandez-Ruiz V., Morales P., Mosbah H., Flamini G., Snoussi M., Majdoub H. Wild Edible Swiss Chard Leaves (Beta Vulgaris L. Var. Cicla): Nutritional, Phytochemical Composition and Biological Activities. *Food Research International*. 119 (2019) 612–21.
- Nahak G., Suar M., Sahu R. K. Antioxidant Potential and Nutritional Values of Vegetables: A Review. *Research Journal of Medicinal Plant*. 8 (2) (2014) 50–81.
- Natesh N. H., Asiedu S. K., Abbey L. An Overview of Nutritional and Anti Nutritional Factors in Green Leafy Vegetables. *Horticulture International Journal*. 1 (2) (2017) 58-65.
- Nawaz H., Shad M. A., Muzaffar S. Chapte 2: Phytochemical Composition and Antioxidant Potential of Brassica. *Brassica Germplasm - Characterization, Breeding and Utilization*. (2018).
- Nemadodzi L. E., Araya H., Nkomo M., Ngezimana W., Mudau N. F. Nitrogen, Phosphorus, and Potassium Effects on the Physiology and Biomass Yield of Baby Spinach (Spinacia Oleracea L.). *Journal of Plant Nutrition*. 40 (14) (2017) 2033–44.
- Ninfali P., Bacchiocca M., Antonelli A., Biagiotti E., Di Gioacchino A. M., Piccoli G., Stocchi V., Brandi G. Characterization and Biological Activity of the Main Flavonoids from Swiss Chard (Beta Vulgaris Subspecies Cyccla). *Phytomedicine*. 14 (2–3) (2007) 216–21.
- Ninfali P., Angelino D. Nutritional and Functional Potential of Beta Vulgaris Cicla and Rubra. *Fitoterapia*. 89 (1) (2013) 188–99.
- Ohshiro M., Hossain M. A., Nakamura I., Akamine H., Tamaki M., Bhowmik P. C., Nose A. Effects of Soil Types and Fertilizers on Growth, Yield, and Quality of Edible Amaranthus Tricolor Lines in Okinawa, Japan. *Plant Production Science*. 19 (1) (2016) 61–72.
- Olszowy M. What Is Responsible for Antioxidant Properties of Polyphenolic Compounds from Plants? *Plant Physiology and Biochemistry*. 144 (2019) 135–43.
- Oosterhuis D. M., Loka D. A., Kawakami E. M., Pettigrew W. T. The Physiology of Potassium in Crop Production. *Advances in Agronomy*. 126 (2014) 203–33.
- Oroian M., Escriche I. Antioxidants: Characterization, Natural Sources, Extraction and Analysis. *Food Research International*. 74 (2015) 10–36.
- Orsavova J., Hlavacova I., Mlcek J., Snopek L., Misurcova L. Contribution of Phenolic

- Compounds, Ascorbic Acid and Vitamin E to Antioxidant Activity of Currant (*Ribes L.*) and Gooseberry (*Ribes Uva-Crispa L.*) Fruits. *Food Chemistry*. 284 (2019) 323–33.
- Padayatty S. J., Levine M. Vitamin C: The Known and the Unknown and Goldilocks. *Oral Diseases*. 22 (6) (2016) 463–93.
- Pal P. K., Singh R. D., Prasad R. Non-Destructive Estimation of Chlorophyll and Nitrogen Content in Leaf of *Rosa Damascena* (Mill). *Soil Science and Plant Nutrition*. 58 (5) (2012) 604–10.
- Pal S., Saha C. A Review on Structure-Affinity Relationship of Dietary Flavonoids with Serum Albumins. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 32 (7) (2014) 1132–47.
- Palafox-Carlos H., Ayala-Zavala J. F., González-Aguilar G. A. The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. *Journal of Food Science*. 76 (1) (2011) R6–R15.
- Papi A., Farabegoli F., Iori R., Orlandi M., De Nicola G. R., Bagatta M., Angelino D., Gennari L., Ninfali P. Vitexin-2-O-Xyloside, Raphasatin and (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Synergistically Affect Cell Growth and Apoptosis of Colon Cancer Cells. *Food Chemistry*. 138 (2–3) (2013) 1521–30.
- Patane C., Tringali S., Sortino O. Effects of Deficit Irrigation on Biomass, Yield, Water Productivity and Fruit Quality of Processing Tomato under Semi-Arid Mediterranean Climate Conditions. *Scientia Horticulturae*. 129 (4) (2011) 590–96.
- Pathy K. Process for Preparation of Vitamin C and Method for Determination of Vitamin C in Tablets. *Surgery & Case Studies: Open Access Journal*. 1 (3) (2018).
- Pehlivan F. E. In Vitamin C Chapter 2: Vitamin C: An Antioxidant Agent. (2016) 23–35.
- Perez-Galvez A., Viera I., Roca M. Chemistry in the Bioactivity of Chlorophylls: An Overview. *Current Medicinal Chemistry*. 24 (40) (2018) 4515–36.
- Perez-Galvez A., Viera I., Roca M. Carotenoids and Chlorophylls as Antioxidants. *Antioxidants*. 9 (6) (2020) 1–39.
- Phan M. A. T., Paterson J., Bucknall M., Arcot J. Interactions between Phytochemicals from Fruits and Vegetables: Effects on Bioactivities and Bioavailability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 58 (8) (2018) 1310–29.
- Phaniendra A., Jestadi D. B., Periyasamy L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 30 (1) (2015) 11–26.
- Pisoschi A. M., Pop A. The Role of Antioxidants in the Chemistry of Oxidative Stress: A Review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 97 (2015) 55–74.
- Pitt J. J. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *The Clinical Biochemist. Reviews* 30 (1) (2009) 19–34.
- Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrito F., Altavilla D., Bitto A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017 (2017).
- Plamada D., Vodnar D. C. Polyphenols—Gut Microbiota Interrelationship: A Transition to a New Generation of Prebiotics. *Nutrients*. 14 (1) (2022) 137-164.
- Plant database. United States Department of Agriculture (<https://plants.usda.gov/home/plantProfile?symbol=BEVUC>)[28.12.2022.].
- PLANTS Database. 2005. *Choice Reviews Online* 42 (12): 42Sup-0242-42Sup – 0242.
- Pokluda R., Kuben J. Comparison of Selected Swiss Chard (*Beta Vulgaris* Ssp. *Cicla L.*) Varieties. *Horticultural Science*. 29 (3) (2018) 114–18.
- Poprac P., Jomova K., Simunkova M., Kollar V., Rhodes C.J., Valko M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*. 38 (7) (2017) 592–607.
- Powlson D., Smith P., De Nobili M. Soil Organic Matter. In *Soil Conditions and Plant Growth*, (2013) 86–131.
- Prior R. O. L. P., Ou B., Huang D. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*. 53 (6) (2005) 1841–56.
- Prodanov M., Garrido I., Vacas V., Lebrón-Aguilar R., Duenas M., Gómez-Cordoves C., Bartolome B. Ultrafiltration as Alternative Purification Procedure for the Characterization of Low and High Molecular-Mass Phenolics from Almond Skins. *Analytica Chimica Acta*. 609 (2) (2008) 241–51.
- Pucarević M. Instrumentalne Metode Analize u Upravljanju Životnom Sredinom u Poljoprivredi. (2019).
- Pyo Y. H., Lee T. C., Logendra L., Rosen R. T. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of Swiss Chard (*Beta Vulgaris* Subspecies *Cycla*) Extracts. *Food Chemistry*. 85 (1) (2004) 19–26.
- Pyryeva E. A., Safronova A. I. The Role of Dietary Fibers in the Nutrition of the Population. *Voprosy Pitaniia*. 88 (6) (2019) 5–11.
- Qin W., Wang D., Guo X., Yang T., Oenema O. Productivity and Sustainability of Rainfed Wheat-Soybean System in the North China Plain: Results from a Long-Term Experiment and Crop Modelling. *Scientific Reports*. 5 (2015) (Artical no 17514).
- Qing T. Z., Inoue M., Inosako K., Irshad M., Kondo K., Guo Y. Q., Shi P. W. Ameliorative Effect of Mulching on Water Use Efficiency of Swiss Chard and Salt Accumulation under Saline Irrigation. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 6 (3–4) (2008) 480–85.
- Quintero-Soto M. F., Saracho-Peña A. G., Chavez-Ontiveros J., Garzon-Tiznado J. A., Pineda-Hidalgo K. V., Delgado-Vargas F., Lopez-Valenzuela J. A. Phenolic Profiles and Their Contribution to the Antioxidant Activity of Selected Chickpea Genotypes from Mexico and ICRISAT Collections. *Plant Foods for Human Nutrition*. 73 (2) (2018) 122–29.
- Raederstorff D., Wyss A., Calder P. C., Weber P., Eggersdorfer M. Vitamin E Function and Requirements in Relation to PUFA. *British Journal of Nutrition*. 114 (8) (2015) 1113–22.
- Rahimi P., Abedimanesh S., Mesbah-Namin S. A., Ostadrahimi A. Betalains, the Nature-Inspired Pigments, in Health and Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 59 (18) (2019) 2949–78.
- Rajasree G., Pillai G. R. Effect of Nitrogen Nutrition on Fruit Quality and Shelf Life of Cucurbitaceous Vegetable Bitter Gourd. *Journal of Plant Nutrition*. 35 (8) (2012) 1139–53.
- Ramjan M., Ansari M.T., Ramjan C. M. Factors Affecting of Fruits, Vegetables and Its Quality. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 6 (6) (2018) 16–18.
- Ranasinghe R. Nitrate and Nitrite Content of Vegetables: A Review RASN Ranasinghe, and RAUJ Marapana. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 7 (4) (2018) 322–28.
- Ranasinghe R., Marapana R. Nitrate and Nitrite Content of Vegetables: A Review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 7 (4) (2018) 322–28.
- Randhawa M. A., Khan A. A., Javed M. S., Sajid M. W. Green Leafy Vegetables: A Health Promoting Source. *Handbook of Fertility: Nutrition, Diet, Lifestyle and Reproductive Health*. (2015).
- Re R., Nicoletta P., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26 (9–10) (1999) 1231–37.
- Reboul E. Vitamine Bioavailability: Mechanisms of Intestinal Absorption in the Spotlight. *Antioxidants*. 6 (4) (2017) 95-106.
- Recknagel R. O., Glende E. A., Britton R. S. Free Radical Damage and Lipid Peroxidation. In *Hepatotoxicology*, (2020) 401–36.
- Reddy M. K., Alexander-Lindo R. L., Nair M. G. Relative Inhibition of Lipid Peroxidation, Cyclooxygenase Enzymes, and Human Tumor Cell Proliferation by Natural Food Colors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (23) (2005) 9268–73.
- Reflectoquant® Ascorbic Acid Test. (2016).
[https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Ascorbic-Acid-Test,MDA_CHEM-116981?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F/\[28.12.2022.\]](https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Ascorbic-Acid-Test,MDA_CHEM-116981?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F/[28.12.2022.])

- Reif C., Arrigoni E., Scharer H., Nystrom L., Hurrell R. F. Carotenoid Database of Commonly Eaten Swiss Vegetables and Their Estimated Contribution to Carotenoid Intake. *Journal of Food Composition and Analysis*. 29 (1) (2013) 64–72.
- Ren T., Li Y. E., Miao T., Hassan W., Zhang J., Wan Y., Cai A. Characteristics and Driving Factors of Nitrogen-Use Efficiency in Chinese Greenhouse Tomato Cultivation. *Sustainability (Switzerland)*. 14 (2) (2022) 805-819.
- Resat A., Ozyurek M., Guclu K., Capanoglu E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64 (5) (2016) 997–1027.
- Reuhs B.L. High-Performance Liquid Chromatography. In *Food Analysis*. Nielsen S.S. (eds) Food Analysis. Food Science Text Series. Springer, Cham. (2017).
- Reynolds, W. F. Natural Product Structure Elucidation by NMR Spectroscopy. In *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy*. (2017) 567–96.
- Rocha B. S., Gago B., Barbosa R. M., Laranjinha J. Dietary Polyphenols Generate Nitric Oxide from Nitrite in the Stomach and Induce Smooth Muscle Relaxation. *Toxicology*. 265 (1–2) (2009) 41–48.
- Rodríguez-Roque M. J., Rojas-Grau M. A., Elez-Martínez P, Martín-Belloso O. Changes in Vitamin C, Phenolic, and Carotenoid Profiles throughout in Vitro Gastrointestinal Digestion of a Blended Fruit Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61 (8) (2013) 1859–67.
- Rop O., Sochor J., Jurikova T., Zitka O., Skutkova H., Mlcek J., Salas P., et al. Effect of Five Different Stages of Ripening on Chemical Compounds in Medlar (*Mespilus Germanica* L.). *Molecules*. 16 (1) (2011) 74–91.
- Rosch D., Krumbein A., Mugge C., Kroh L.W. Structural Investigations of Flavonol Glycosides from Sea Buckthorn (*Hippophaë Rhamnoides*) Pomace by NMR Spectroscopy and HPLC-ESI-MS(n). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (13) (2004) 4039–46.
- Rouphael Y., Cardarelli M., Bassal A., Leonardi C., Giuffrida F., Colla G. Vegetable Quality as Affected by Genetic Agronomic and Environmental Factors. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 10 (3–4) (2012) 680–88.
- Ruiz J. C. R., Vazquez E. De La L. O., Campos M. R. S. Encapsulation of Vegetable Oils as Source of Omega-3 Fatty Acids for Enriched Functional Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57 (7) (2017) 1423–34.
- Rumeza H., Iqbal Z., Iqbal M., Hanif S., Rasheed M. Use of Vegetables as Nutritional Food: Role in Human Health. *Journal of Agricultural and Biological Science*. 1 (1) (2006) 18–19.
- Sacan O., Yanardag R. Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Activities of Chard (*Beta Vulgaris* L. Var. Cicla). *Food and Chemical Toxicology*. 48 (5) (2010) 1275–80.
- Sakalem M. E., Negri G., Tabach R. Chemical Composition of Hydroethanolic Extracts from Five Species of the *Passiflora* Genus. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 22 (6) (2012) 1219–32.
- Sakanaka S., Tachibana Y., Okada Y. Preparation and Antioxidant Properties of Extracts of Japanese Persimmon Leaf Tea (*Kakinoha-Cha*). *Food Chemistry*. 89 (4) (2005) 569–75.
- Salipur H. Izolovanje i određivanje strukture flavonoidnih jedinjenja iz blitve (*Beta vulgaris cicla*). Master Rad: Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet. (2016).
- Salmani J. M. M., Zhang X. P., Jacob J. A., Chen B. A. Apigenin's Anticancer Properties and Molecular Mechanisms of Action: Recent Advances and Future Prospectives. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 15 (5) (2017) 321–29.
- Samaniego I., Espin S., Cuesta X., Arias V., Rubio A., Llerena W., Angos I., Carrillo W. Analysis of Environmental Conditions Effect in the Phytochemical Composition of Potato (*Solanum Tuberosum*) Cultivars. *Plants*. 9 (7) (2020) 1–13.
- Santamaria P. Nitrate in Vegetables: Toxicity, Content, Intake and EC Regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86 (1) (2006) 10–17.
- Sanlier N., Saban G. M. The Benefits of Brassica Vegetables on Human Health. *J Human Health*

- Res. 1(1) (2018) 104-117. *Agriculture* 86 (1): 10–17.
- Santos J., Oliveira M. B. P. P., Ibanez E., Herrero M. Phenolic Profile Evolution of Different Ready-to-Eat Baby-Leaf Vegetables during Storage. *Journal of Chromatography A*. 1327 (2014) 118–31.
- Satheesh N., Fanta S. W. Kale: Review on Nutritional Composition, Bio-Active Compounds, Anti-Nutritional Factors, Health Beneficial Properties and Value-Added Products. *Cogent Food and Agriculture*. 6 (1) (2020) 1811048.
- Saudy H. S., El-Metwally I. M., El-Samad G. A. A. Physio-Biochemical and Nutrient Constituents of Peanut Plants under Bentazone Herbicide for Broad-Leaved Weed Control and Water Regimes in Dry Land Areas. *Journal of Arid Land*. 12 (4) (2020) 630–39.
- Saura-Calixto F., Serrano J., Goni I. Intake and Bioaccessibility of Total Polyphenols in a Whole Diet. *Food Chemistry*. 101 (2) (2007) 492–501.
- Scarpa E. S., Antonini E., Palma F., Mari M., Ninfali P. Antiproliferative Activity of Vitexin-2-O-Xyloside and Avenanthramides on CaCo-2 and HepG2 Cancer Cells Occurs through Apoptosis Induction and Reduction of pro-Survival Mechanisms. *European Journal of Nutrition*. 57 (4) (2018) 1381–95.
- Schiattone M. I., Viggiani R., Di Venere D., Sergio L., Cantore V., Todorovic M., Perniola M., and Candido V. Impact of Irrigation Regime and Nitrogen Rate on Yield, Quality and Water Use Efficiency of Wild Rocket under Greenhouse Conditions. *Scientia Horticulturae*. 229 (2018)182–92.
- Schrader W. L., Mayberry K. S. Beet and Swiss Chard Production in California. *UC Agriculture & Natural Resources*. Publication 8096. (2003).
- Shah B. R., Li B., Sabbah H. A., Xu W., Mraz J. Effects of Prebiotic Dietary Fibers and Probiotics on Human Health: With Special Focus on Recent Advancement in Their Encapsulated Formulations. *Trends in Food Science and Technology*. 102 (2020) 178–92.
- Sharma A., Shahzad B., Rehman A., Bhardwaj R., Landi M., Zheng B. Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules*. 24 (13) (2019).
- Sharma N. Free Radicals, Antioxidants and Disease. *Biology and Medicine*. 6 (3) (2014) 214-220.
- Sharma S., Katoch V., Kumar S., Chatterjee S. 2021. Functional Relationship of Vegetable Colors and Bioactive Compounds: Implications in Human Health. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 92 (2021) (Artical no 108615).
- Shehadeh M. B., Suaifan G. A.R.Y., Abu-Odeh A. M. Plants Secondary Metabolites as Blood Glucose-Lowering Molecules. *Molecules*. 26 (14) (2021) 4333-4379.
- Shetty A. A., Magadam S., Managanv K. Vegetables as Sources of Antioxidants. *Journal of Food & Nutritional Disorders*. 2 (1) (2013).
- Shrivastav P., Prasad M., Singh T. B., Yadav A., Goyal D., Ali A., Dantu P. K. Role of Nutrients in Plant Growth and Development. In: Naeem M., Ansari A., Gill S. (eds) *Contaminants in Agriculture*. Springer, Cham. (2020).
- Silva C. K. C., da Silva K. B., de Miranda P. R. B., de Araujo Gomes T. C., da Silva J. J. M., Souza M. A., dos Santos A. F., da Costa J. G. Fertilizer Source Influence on Antioxidant Activity of Lettuce. *African Journal of Agricultural Research*. 13 (50) (2018) 2855–61.
- Silva Dias J. Chapter: Nutritional Quality and Effect on Disease Prevention of Vegetables. In *Nutrition in Health and Disease - Our Challenges Now and Forthcoming Time* (2019).
- Simonne E. H., Dukes M. D., Zotarelli L. Chapter 8: Principles and Practices of Irrigation Management for Vegetables. In *Edis*. (2007) 17-27.
- Simons J., Bennett D., 200. <https://www.agric.wa.gov.au/soil-salinity/measuring-soil-salinity/>[30.06.2022.].
- Simpson T. S., Savage G. P., Sherlock R., Vanhanen L. P. Oxalate Content of Silver Beet Leaves (*Beta Vulgaris* Var. Cicla) at Different Stages of Maturation and the Effect of Cooking with

- Different Milk Sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57 (22) (2009) 10804–8.
- Singh B., Singh J. P., Singh N., Kaur A. Saponins in Pulses and Their Health Promoting Activities: A Review. *Food Chemistry*. 233 (2017) 540–49.
- Skalicky M., Kubes J., Shokoofeh H., Tahjib-Ul-Arif M., Vachova P., Hejnak V. Betacyanins and Betaxanthins in Cultivated Varieties of Beta Vulgaris L. Compared to Weed Beets. *Molecules*. 25 (22) (2020) 5395-5410.
- Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J. T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening.” *Journal of the National Cancer Institute*. 82 (13) (1990) 1107–12.
- Slavin JI, Lloyd B. Health Benefits of Fruits and Vegetables. *Advances in Nutrition*. 3 (4) (2012) 506–16.
- Slinkard K., Singleton V. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*. 28 (1) (1977) 49–55.
- Soumya N. P. P., Mini S., Sivan S. Ko., Mondal S. Bioactive Compounds in Functional Food and Their Role as Therapeutics. *Bioactive Compounds in Health and Disease*. 4 (3) (2021) 24–39.
- Speer H., D’Cunha N. M., Alexopoulos N. I., McKune A. J., and Naumovski N. Anthocyanins and Human Health—a Focus on Oxidative Stress, Inflammation and Disease. *Antioxidants*. 9 (5) (2020) 366-379.
- Stefanelli D., Goodwin I., Jones R. Minimal Nitrogen and Water Use in Horticulture: Effects on Quality and Content of Selected Nutrients. *Food Research International*. 43 (7) (2010) 1833–43.
- Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*. 111 (1) (2001) A3.B.1-A3.B.3.
- Sumanta N., Haque C. I., Nishika J., Suprakash R. Spectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Extracting Solvents. *Research Journal of Chemical Sciences Res. J. Chem. Sci.* 4 (9) (2014) 2231–2606.
- Suparmi S., Fasitasari M., Martosupono M., Mangimbulude J. C. Comparisons of Curative Effects of Chlorophyll from *Sauropus Androgynus* (L) Merr Leaf Extract and Cu-Chlorophyllin on Sodium Nitrate-Induced Oxidative Stress in Rats. *Journal of Toxicology*. 2016 (5) (2016) 1-7.
- Svehlikova V., Bennett R. N., Mellon F. A., Needs P. W., Piacente S., Kroon P. A., Bao Y. Isolation, Identification and Stability of Acylated Derivatives of Apigenin 7-O-Glucoside from Chamomile (*Chamomilla Recutita* [L.] Rauschert). *Phytochemistry*. 65 (16) (2004) 2323–32.
- Syngai G. G., Gopi R., Bharali R., Dey S., Lakshmanan G. M. A., Ahmed G. Probiotics - the Versatile Functional Food Ingredients. *Journal of Food Science and Technology*. 53 (2) (2016) 921–33.
- Tamme T., Reinik M., Roasto M. Nitrates and Nitrites in Vegetables: Occurrence and Health Risks. In *Bioactive Foods in Promoting Health*. (2010) 307–21.
- Tao Z., Shi A., Zhao J. Epidemiological Perspectives of Diabetes. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 73 (1) (2015) 181–85.
- Thakur N., Raigond P., Singh Y., Mishra T., Singh B., Lal M. K., Dutt S. Recent Updates on Bioaccessibility of Phytonutrients. *Trends in Food Science and Technology*. 97 (2020) 366–80.
- Tiveron A. P., Melo P. S., Bergamaschi K. B., Vieira T. M. F. S., Regitano-d’Arce M. A. B., and Alencar S. M. Antioxidant Activity of Brazilian Vegetables and Its Relation with Phenolic Composition. *International Journal of Molecular Sciences*. 13 (7) (2012) 8943–57.
- Tonetti M. S., Jepsen S., Jin L., Otomo-Corgel J. Impact of the Global Burden of Periodontal Diseases on Health, Nutrition and Wellbeing of Mankind: A Call for Global Action. *Journal of Clinical Periodontology*. 44 (5) (2017) 456–62.
- Topalovic A., Knezevic M., Trifunovic S., Novakovic M., Pesic M., Đurovic D. Effects of Soil Properties and Fertilization on Quality and Biological Activity of Swiss Chard. *European Journal of Horticultural Science*. 83 (6) (2018) 374–81.

- Topalovic A., Pfenndt L. B., Perovic N., Dordevic D., Trifunovic S., Pfenndt P. A. The Chemical Characteristics of Soil Which Determine Phosphorus Partitioning in Highly Calcareous Soils. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 71 (11) (2006) 1219–36.
- Turbin V. A., Sokolov A. S., and Kosterna R. R. E. Effect of Plant Density on the Growth, Development and Yield of Brussels Sprouts (*Brassica Oleracea* L. Var. *Gemmifera* L.). *Acta Agrobotanica*. 67 (4) (2014) 51–58.
- Turnidge J. D., Bell J M. Chapter 2: Antimicrobial Susceptibility on Solid Media. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*. (2005).
- Ueda Y., Konishi M., Yanagisawa S. Molecular Basis of the Nitrogen Response in Plants. *Soil Science and Plant Nutrition*. 63 (4) (2017) 329–41.
- Ullah S., Liu L., Anwar S., Tuo X., Khan S., Wang B., Peng D. Effects of Fertilization on Ramie (*Boehmeria Nivea* L.) Growth, Yield and Fiber Quality. *Sustainability (Switzerland)* 8 (9) (2016) 887-895.
- Unuk T., Tojnko S., Stopar M., Cmelik Z. Polyphenol Content in Apple Fruits as Affected by Crop Load and Rate of Applied Nitrogen. *Acta Horticulturae*. 721 (2006) 173–76.
- USDA. USDA: U.S. Department of Agriculture. (2017)/[https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/169991/nutrients/\[28.12.2022.\]](https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/169991/nutrients/[28.12.2022.]).
- Van der Hooft J.J.J., Rankin N.. Metabolite Identification in Complex Mixtures Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. In: Webb G. (eds) *Modern Magnetic Resonance*. Springer, Cham. (2018)
- Van Loo-Bouwman C. A., Naber T. H. J., Schaafsma G. A Review of Vitamin A Equivalency of β -Carotene in Various Food Matrices for Human Consumption. *British Journal of Nutrition*. 111 (12) (2014) 2153–66.
- Vankova K., Markova I., Jasprova J., Dvorak A., Subhanova I., Zelenka J., Novosadova I., et al. Chlorophyll-Mediated Changes in the Redox Status of Pancreatic Cancer Cells Are Associated with Its Anticancer Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018 (2018) Artcal ID 4046167 1-11.
- Wang M., Zheng Q., Shen Q., Guo S. The Critical Role of Potassium in Plant Stress Response. *International Journal of Molecular Sciences*. 14 (4) (2013) 7370–90.
- Wang M., Firrman J., Liu L. S., Yam K. A Review on Flavonoid Apigenin: Dietary Intake, ADME, Antimicrobial Effects, and Interactions with Human Gut Microbiota. *BioMed Research International*. 2019 (9) (2019) 1-18.
- Wang X., Xing Y. Evaluation of the Effects of Irrigation and Fertilization on Tomato Fruit Yield and Quality: A Principal Component Analysis. *Scientific Reports*. 7 (1) (2017).
- Wang Z. H., Li S. X., Malhi S. Effects of Fertilization and Other Agronomic Measures on Nutritional Quality of Crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88 (1) (2008) 7–23.
- Weidinger A., Kozlov A. V. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules*. 5 (2) (2015) 472–84.
- Wolfgong W. J. Chemical Analysis Techniques for Failure Analysis: Part 1, Common Instrumental Methods. In *Handbook of Materials Failure Analysis with Case Studies from the Aerospace and Automotive Industries*. (2016) 279-307.
- Wong J.M.W., Jenkins D.J.A. Carbohydrate Digestibility and Metabolic Effects. *Journal of Nutrition*. 137 (11) (2007) 2539S-2546S.
- World Health Organisation, 2022. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer/\[28.06.2022.\]](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer/[28.06.2022.])
- Wu B., Basu S., Meng S., Wang X., Hu M. Regioselective Sulfation and Glucuronidation of Phenolics: Insights into the Structural Basis. *Current Drug Metabolism*. 12 (9) (2012) 900–916.
- Wysocki J., Dong M.W. Ultraviolet Detectors: Perspectives, Principles, and Practices. *LCGC North*

- America*. 37 (10) (2019) 750-759.
- Xu X., Du X., Wang F., Sha J., Chen Q., Tian G., Zhu Z., Ge S., Jiang Y. Effects of Potassium Levels on Plant Growth, Accumulation and Distribution of Carbon, and Nitrate Metabolism in Apple Dwarf Rootstock Seedlings. *Frontiers in Plant Science*. 11 (2020) Article 904.
- Yaman M., Catak J., Ugur H., Gurbuz M., Belli I., Tanyıldız S. N., Yıldırım H., et al. The Bioaccessibility of Water-Soluble Vitamins: A Review. *Trends in Food Science and Technology*. 109 (2021) 552–63.
- Yang J., Lan L., Jin Y., Yu N., Wang D., Wang E. Mechanisms Underlying Legume–Rhizobium Symbioses. *Journal of Integrative Plant Biology*. 64 (2) (2021) 244–267.
- Yang S. H., Liao P. H., Pan Y. F., Chen S. L., Chou S. S., Chou M. Y. The Novel P53-Dependent Metastatic and Apoptotic Pathway Induced by Vitexin in Human Oral Cancer OC2 Cells. *Phytotherapy Research*. 27 (8) (2013) 1154–61.
- Yao Y., Tan P., Kim J. E. Effects of Dietary Fats on the Bioaccessibility and Bioavailability of Carotenoids: A Systematic Review and Meta-Analysis of in Vitro Studies and Randomized Controlled Trials. *Nutrition Reviews*. 80 (4) (2022) 741–61.
- Yegin S., Kopec A., Kitts D. D., Zawistowski J. Dietary Fiber: A Functional Food Ingredient with Physiological Benefits. In *Dietary Sugar, Salt and Fat in Human Health*, (2020) 531–55.
- Yoon H. I., Zhang W., Son J. E. Optimal Duration of Drought Stress near Harvest for Promoting Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity in Kale with or without UV-B Radiation in Plant Factories. *Plants*. 9 (3) (2020) 295-308.
- Young A. J., Lowe G. L. Carotenoids—Antioxidant Properties. *Antioxidants*. 7 (2) (2018) 28-32.
- Yu H. M., Li Z. Z., Gong Y. S., Mack U., Feger K. H., Stahr K. Water Drainage and Nitrate Leaching under Traditional and Improved Management of Vegetable-Cropping Systems in the North China Plain. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 169 (1) (2006) 47–51.
- Yuan B., Byrnes D. R., Dinssa F. F., Simon J. E., Wu Q. Identification of Polyphenols, Glycoalkaloids, and Saponins in Solanum Scabrum Berries Using HPLC-UV/Vis-MS. *Journal of Food Science*. 84 (2) (2019) 235–43.
- Zeipina S., Alsina I., Lepse L., Duma M. The Effect of Irrigation on the Biochemical Content of Leafy Vegetables. In. *Proc. 25th NJF Congress NORDIC VIEW TO SUSTAINABLE RURAL DEVELOPMENT*. (2015) 209–13.
- Zhao G., Han X., Cheng W., Ni J., Zhang Y., Lin J., Song Z. Apigenin Inhibits Proliferation and Invasion, and Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Melanoma Cells. *Oncology Reports*. 37 (4) (2017) 2277–85.
- Zhou Y. H., Zhang Y. L., Wang X. M., Cui J. X., Xia X. J., Shi K., Yu J. Q. Effects of Nitrogen Form on Growth, CO₂ Assimilation, Chlorophyll Fluorescence, and Photosynthetic Electron Allocation in Cucumber and Rice Plants. *Journal of Zhejiang University: Science B*. 12 (2) (2011) 126–34.
- Zietz M., Weckmuller A., Schmidt S., Rohn S., Schreiner M., Krumbein A., Kroh L. W. Genotypic and Climatic Influence on the Antioxidant Activity of Flavonoids in Kale (*Brassica Oleracea* Var. *Sabellica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58 (4) (2010) 2123–30.
- Znidarcic D., Ban D., Sircelj H. Carotenoid and Chlorophyll Composition of Commonly Consumed Leafy Vegetables in Mediterranean Countries. *Food Chemistry*. 129 (3) (2011) 1164–68.
- Zukowski P., Maciejczyk M., Waszkiel D. Sources of Free Radicals and Oxidative Stress in the Oral Cavity. *Archives of Oral Biology*. 92 (2018) 8–17.

A. BIOGRAFSKI PODACI O KANDIDATKINJI

Ljubica (Žarko) Ivanović rođena je 29. novembra 1983. godine u Nikšiću, Crna Gora. Osnovnu školu i gimnaziju je završila u Nikšiću. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2002. godine kao redovan student, a diplomirala u oktobru 2009. godine sa prosječnom ocjenom 8,85 sa završnim radom pod naslovom „Fiziološko-biohemijska i hemotaksonomska karakterizacija bakterija izolovanih iz zemljišta kontaminiranog naftom i njenim derivatima”. Doktorske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program doktor biohemijskih nauka upisala je u oktobru 2014. godine i do sada položila sve ispite predviđene planom i programom sa prosječnom ocjenom 10,00.

Od 2014. do 2018. godine bila je angažovana na projektu Centar izvrsnosti u bioinformatici, kao PhD student istraživač, koji je finansiran od strane Ministarstva nauke Crne Gore. Od 2018. godine zaposlena je u Institutu za javno zdravlje Crne Gore, na odjeljenju Centra za zdravstvenu ekologiju u laboratoriji za tečnu hromatografiju, kao analitičar. Kao istraživač bila je angažovana je na dva bilateralna projekta, oba u saradnji sa Republikom Slovenijom u periodu od 2018-2020/21. U okviru bilateralnog projekta Phytochemical screening of juice from wild pomegranate (*Punica granatum* L.) (2018-2021), ostvarena je posjeta odsjeku agronomije, Katedri za voćarstvo, vinogradarstvo i povrtarstvo, Biotehničkog fakulteta, Univerziteta u Ljubljani (Slovenija) u periodu od 05. do 17. novembra 2018. godine. Drugi bilateralni projekat na kome je bila angažovana je “Geografsko porijeklo meda primjenom multielementarne i izotropske analize zemljišta, biljaka I meda“, takođe finansiran od strane Ministarstva nauke Crne Gore. Od 2020 godine, kao istraživač, dio je projekta “Centar izvrsnosti za digitalizaciju procjene rizika u oblasti bezbjednosti hrane i preciznu sertifikaciju autentičnosti prehrambenih proizvoda (FoodHub)” (01.01.2020 - 31.12.2022), koji realizuje Fakultet za prehrambenu tehnologiju, bezbjednost hrane i ekologiju, Univerziteta Donja Gorica, pod pokroviteljstvom Ministarstva nauke Crne Gore.

B. OBJAVLJENI NAUČNI RADOVI KOJI ČINE DIO DISERTACIJE

Ljubica Ivanović je do sada prezentovala rezultate svog naučno-istraživačkog rada u 5 radova sa SCI liste od kojih dva rada u istaknutom međunarodnom časopisu čine dio disertacije. Radovi se nalaze u sledećim kategorijama: jedan rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (kategorija M21), tri rada u istaknutom međunarodnom časopisu (kategorija M22) i jedan u međunarodnom časopisu (kategorija M23). Takođe jedan rad je prezentovan u tematskom zborniku vodećeg međunarodnog značaja (kategorija M13). Dio rezultata proisteklih iz disertacije prezentovan je u vidu saopštenja na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja.

Radovi u časopisima međunarodnog značaja koji čine disertaciju:

M22, Rad u istaknutom međunarodnom časopisu

1. **Ivanović Lj.**, Milašević I., Topalović A., Djurović D., Mugoša B., Knežević M., Vrvic M. (2018) Nutritional and phytochemical content of Swiss chard from Montenegro, under different fertilization and irrigation treatments, *British Food Journal*, 121 (2), 411-425. <https://doi.org/10.1108/BFJ-03-2018-0142>
2. **Ivanović L.**, Topalović A., Bogdanović V., Đurović D., Mugoša B., Jadranin M., Tešević V. and Beškoski V. (2021) Antiproliferative activity and antioxidative potential of Swiss chard from Montenegro, grown under different irrigation and fertilization regimes, *British Food Journal*, 123 (7) 2335-2348. <https://doi.org/10.1108/BFJ-11-2020-1062>

Ostali naučni radovi:

M13, Rad u tematskom zborniku vodećeg međunarodnog značaja

1. Topalović A., Knežević M., Bajagić B., **Ivanović Lj.**, Milašević I., Đurović D., Mugoša B., Podolski-Renić A., Pešić M. (2020), Grape (*Vitis vinifera* L.): health benefits and effects of growing conditions on quality parameters, In: "Biodiversity and Biomedicine: Our Future", Chapter 20; July 2020; <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819541-3.00020-7>

M21, Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu

1. Topalović A., Knežević M., **Ivanović Lj.**, Gačnik S., Mikulic-Petkovsek M. (2021) Phytochemical screening of wild pomegranate (*Punica granatum* L.) juices from the market; *Journal of Food Composition and Analysis*; 100, 103933. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103933>

M22, Rad u istaknutom međunarodnom časopisu

1. Bigović M., Đurović D., Nikolić I., **Ivanović Lj.**, Bajić B. (2022) Profile, Sources, Ecological and Health Risk Assessment of PAHs in Agricultural Soil in a Pljevlja Municipality; *International Journal of Environmental Research*; 16 (Artical No. 90). <https://doi.org/10.1007/s41742-022-00472-z>

M23, Rad u međunarodnom časopisu

1. Bigović M., Pantović S., Milašević I., **Ivanović Lj.**, Đurović D., Slavic V., Popović M., Vrvic M., Roganović M. (2019) Organic composition of Igalo bay peloid (Montenegro), Indian journal of traditional knowledge, 18(4), 837-848.
<https://www.researchgate.net/publication/337649285>

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Љубица Ивановић

Број индекса ДБ03/2014

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Нутритивна вриједност и основне фитохемијске особине блитве (*Beta vulgaris* ssp. *cicla* L. Voss) гајене у различитим условима наводњавања и прихрањивања”

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

Потпис аутора

У Београду, _____

образац изјаве о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Љубица Ивановић

Број индекса ДБ03/2014

Студијски програм Биохемија

Наслов рада „Нутритивна вриједност и основне фитохемијске особине блитве (*Beta vulgaris* ssp. *cicla* L. Voss) гајене у различитим условима наводњавања и прихрањивања”

Ментор др Владимир Бешкоски, редовни професор Универзитета у Београду - Хемијског факултета

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

образац изјаве о коришћењу

Изјава о коришћењу

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

„Нутритивна вриједност и основне фитохемијске особине блитве (*Beta vulgaris* ssp. *cicla* L. Voss) гајене у различитим условима наводњавања и прихрањивања”

која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

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

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

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

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

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

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