



Univerzitet u Novom Sadu



Tehnološki fakultet Novi Sad

MILICA VINČIĆ



**ANTIOKSIDATIVNA, ANTIPROLIFERATIVNA I
ANTIMIKROBNA AKTIVNOST ODABRANIH
EKSTRAKATA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA**

Doktorska disertacija

U Novom Sadu, 2017.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD**

Ključna dokumentacijska informacija

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ

Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): Doktorska disertacija
VR

Ime i prezime autora: Milica Vinčić
AU

Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): Prof. dr Sonja Đilas, redovni profesor
MN

Naslov rada: Antioksidativna, antiproliferativna i antimikrobna
NR aktivnost odabranih ekstrakata tropova bobičastog voća

Jezik publikacije: srpski (latinica)
JP

Jezik izvoda: srpski /engleski
JI

Zemlja publikovanja: Republika Srbija
ZP

Uže geografsko područje: AP Vojvodina
UGP

Godina: 2017.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

Mesto i adresa: MA	Republika Srbija, 21000 Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1
Fizički opis rada: FO	6 poglavlja/ 179 stranica/ 72 slike/ 28 tabela/ 250 referenci
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Hemija hrane
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	ekstrakti tropova maline, kupine i borovnice; fenolna jedinjenja; HPLC analiza; antioksidativna aktivnost; antihiperglikemijska aktivnost; antiproliferativna aktivnost; antimikrobna aktivnost; obogaćeni sokovi
UDK	634.71/.73:663.814:66.094.3.097.8 (043.3)
Čuva se: ČU	Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	<p>U ovom radu su ispitani hemijski sastav, antioksidativna, antihiperglikemijska, antiproliferativna i antimikrobna aktivnost liofiliziranih metanolnih ekstrakata tropa maline (<i>Rubusidaeus</i> L) sorti Meeker (ETMM) i Willamette (ETMW), kupine (<i>Rubusfruticosus</i>L) sorti Čačanska bestrna (ETKČ) i Thornfree (ETKT) i divlje borovnice (<i>Vacciniummyrtillus</i> L) (ETB). Sadržaj ukupnih polifenola (TPh), flavonoida (TF) i antocijana (TAc) u ekstraktima tropova određeni su spektrofotometrijskim metodama. Identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja (fenolnihkiselina, flavonola i cijanidina) i vitamina C u ekstraktima tropova izvedena je HPLC analizom. Spektrofotometrijskim testovima određena je antioksidativna aktivnostna DPPH i ABTS⁺ radikale i redukciona sposobnost ekstrakata. ESR spektroskopijom utvrđen je uticaj ekstrakata na reaktivne hidroksil i superoksid anjon radikale. Antihiperglikemijska aktivnost ekstrakata određena je testom inhibicije α-glukozidaze. Antiproliferativna aktivnost ekstrakata tropova ispitana je <i>in vitro</i>, njihovim delovanjem na rast četiri histološki različite humane ćelije: HeLa (epitelni karcinom cerviksa), MCF7 (adenokarcinom dojke), HT-29 (adenokarcinom debelog creva) i MRC-5 (humani fetalni fibroblasti pluća). Antimikrobna aktivnost ekstrakata tropova bobičastog voća ispitana je na odabrane sojeve Gram-pozitivnih i Gram-negativnih</p>

bakterija, kvasaca i plesni disk difuzionom metodom i metodom „bunarčića”. Ispitana je i mogućnost primene liofiliziranih ekstrakata tropova bobičastog voća kao funkcionalnog dodatka sokovima od voća. Laboratorijski proizvedenim obogaćenim sokovima je određen sadržaj TPh, TF i TAc i utvrđena antioksidativna aktivnost testom redukcione sposobnosti i DPPH testom. Rezultati ispitivanja hemijskog sastava, antioksidativne, antihiper-glikemijske, antiproliferativne i antimikrobne aktivnosti ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB ukazuju da su svi ispitivani ekstrakti tropova potencijalni izvor prirodnih bioaktivnih jedinjenja, a antioksidativna aktivnost obogaćenih sokova ukazuje na mogućnost korišćenja ovih ekstrakata, kao funkcionalnih aditiva u proizvodnji različitih visoko vrednih prehrambenih proizvoda.

Datum prihvatanja teme od strane Senata:
DP

24. Mart 2016. godine

Datum odbrane:
DO

Članovi komisije:
(ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status)
KO

predsednik: Prof. dr Siniša Markov, redovni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad

član: Prof. dr Sonja Đilas, redovni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad

član: dr. Vesna Tumbas, docent, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad

član: dr Dragana Četojević-Simin, naučni savetnik, Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Institut za onkologiju Vojvodine

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY NOVI SAD**

Key words documentation

**Accession
number: ANO**

**Identification
number: INO**

**Document type:
DT** Monograph documentation

**Type of record:
TR** Textual printed material

**Contents code:
CC** PhD Thesis

**Author:
AU** Milica Vinčić

**Mentor:
MN** Prof. Sonja Đilas, full professor

**Title:
TI** Antioxidative, antiproliferative and antimicrobial activity of selected berry pomace extracts

**Language of text:
LT** Serbian (latin)

**Language of
abstract:
LA** Serbian/English

**Country of
publication:
CP** Republic of Serbia

**Locality of
publication:
LP** AP Vojvodina

**Publication year:
PY** 2017

**Publisher:
PU** Author's reprint

Publication place: PP	Serbia, 21000 Novi sad, Bulevar cara Lazara 1
Physical description: PD	6 Chapters, 179 Pages, 72 Figures, 28 Tables, 250 References
Scientific field SF	Technological engineering
Scientific discipline SD	Food chemistry
Subject, Key words SKW	Raspberry, blackberry and blueberry pomace extracts; phenolic compounds; HPLC analysis; antioxidant activity; antihyperglycaemic activity; antiproliferative activity; antimicrobial activity; enriched juices.
UC	634.71/.73:663.814:66.094.3.097.8 (043.3)
Holding data: HD	Library (Faculty of Technology), 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Note:	None

**Abstract:
AB**

This work examined the chemical composition, the antioxidant, antihyperglycaemic, antiproliferative and antimicrobial activity of the freeze-dried raspberry (*Rubus idaeus* L.) varieties Meeker (ETMM) and Willamette (ETMW), blackberry (*Rubus fruticosus* L.) varieties (ETKČ) and Thornfree (ETKT), and wild blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) (ETB) pomaces methanol extracts. The content of total polyphenols (TPh), total flavonoids (TF) and total anthocyanins (TAc) in the pomace extracts were determined spectrophotometrically. Identification and quantification of the phenolic compounds (phenol acids, flavonols and cyanidins) and ascorbic acid in the pomace extracts was performed by HPLC analysis. The antioxidant activities of the extracts was determined spectrophotometrically using DPPH and ABTS⁺ free radicals and reducing ability assay. ESR spectroscopy is used for determination of pomace extracts' influence on reactive hydroxyl and superoxide anion radicals. Antihyperglycaemic activity of the pomace extracts was determined using α -glucosidase inhibition assay. The antiproliferative activity of the pomace extracts was tested *in vitro*, testing their influence on the growth of four histologically different human tumor cells: HeLa (cervix epithelioid carcinoma), MCF7 (breast adenocarcinoma), HT-29 (colon adenocarcinoma) and MRC-5 (human fetal lung fibroblasts). Antimicrobial activity of berry pomace ex-

tracts was tested on selected strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeasts and molds with the disc diffusion method and the method of “wells”. The possibility of freeze dried berry pomace extracts application as a fruit functional additive was investigated as well. Laboratory produced enriched juice was tested in terms of TPH, TF and TAc content, reducing ability and DPPH scavenging ability as well. The results of testing the chemical composition, the antioxidative, antihyperglycaemic, antiproliferative and antimicrobial activities of ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT and ETB, indicate that all investigated pomace extracts are a potential source of natural bioactive compounds, and that the antioxidant activity enriched juice indicates the possibility of using these extracts, as a functional additive in the production of various high-value food products.

**Accepted on
Senate on:
AS**

March 24th, 2016.

**Defended:
DE**

**Thesis Defend
Board:
DB**

president: Dr. Siniša Markov, Full professor, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad

member: Dr. Sonja Đilas, Full professor, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad

member: Dr. Vesna Tumbas, Assistant professor, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad

member: Dr. Dragana Četojević-Simin, Principal research fellow, University of Novi Sad, Faculty of Medicine, Institute of Oncology of Vojvodina

ZAHVALNOST

Zahvaljujem se, na prvom mestu prof. dr Sonji Đilas, svom mentoru, na ukazanoj pomoći prilikom izrade ove disertacije. Hvala Vam na pruženom znanju, bilo je pravo zadovoljstvo i čast učiti od Vas i sarađivati sa Vama.

Dugujem zahvalnost i doc. dr Vesni Tumbas Šaponjac na velikoj pomoći prilikom izrade disertacije i svim ukazanim savetima. dr Jeleni Vulić i dr Slađani Stajčić hvala na lepoj saradnji. Branislavu Bastaji se zahvaljujem na pomoći prilikom tehničke izrade rada.

Prof. dr Siniši Markovu se zahvaljujem na svim pruženim sugestijama i uloženom trudu, koji su doprineli konačnoj formi teze. Prof. dr Dragoljubu Cvetkoviću i dr. Aleksandri Velićanski i hvala na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dela antimikrobne aktivnosti.

Zahvaljujem se naučnom savetniku dr. Dragani Četojević-Simin, na pruženoj stručnoj pomoći prilikom izrade disertacije.

Hvala mami, uji i Jeleni što su u svakom trenutku bili uz mene i verovali. Hvala za sve.

Hvala Lenki, Stefanu i Saši na razumevanju i podršci.

Disertacija je rađena u okviru projekta TR 31044 „Razvoj proizvoda i aditiva od voća i povrća sa visokim sadržajem bioaktivnih jedinjenja”, koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1.OSNOVNE KARAKTERISTIKE BOBIČASTOG VOĆA IZ PORODICA ROSACEAE I ERICACEAE	3
2.1.1. Malina	3
2.1.2. Kupina	5
2.1.3. Borovnica.....	7
2.2. BOBIČASTO VOĆE KAO IZVOR BIOAKTIVNIH JEDINJENJA.....	9
2.2.1. Fitohemikalije bobičastog voća	10
2.2.1.1. Fenolna i polifenolna jedinjenja	10
2.2.2. Nutrijenti bobičastog voća.....	19
2.2.2.1. Vitamini.....	20
2.2.2.2. Minerali	21
2.2.2.3. Esencijalne masne kiseline.....	22
2.2.2.4. Prehrambena vlakna	23
2.3. BIOLOŠKA AKTIVNOST BOBIČASTOG VOĆA.....	24
2.3.1. Antioksidativna aktivnost	26
2.3.2. Antihiperглиkemijska aktivnost.....	33
2.3.3. Antiproliferativna aktivnost.....	35
2.3.4. Antimikrobna aktivnost	40
2.4. SPOREDNI PROIZVODI PRERADE VOĆA	44
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	52
3.1. HEMIKALIJE I INSTRUMENTI.....	52
3.2. BILJNI MATERIJAL	53
3.3. DOBIJANJE EKSTRAKATA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA	54
3.4. SPEKTROFOTOMETRIJSKA ODREĐIVANJA SADRŽAJA POLIFENOLA U EKSTRAKTIMA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA	54
3.4.1.Određivanje sadržaja ukupnih polifenola	54
3.4.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	56
3.4.3. Određivanje sadržaja ukupnih antocijana.....	58
3.5. HPLC ANALIZA POLIFENOLA U EKSTRAKTIMA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA.....	59
3.5.1. Identifikacija i kvantifikacija fenolnih kiselina i flavonoida pomoću RP-HPLC-UV/Vis tehnike.....	59

3.5.2. Identifikacija antocijana pomoću HPLC-DAD-ESI/MS ⁿ tehnike i kvantifikacija pomoću RP-HPLC-DAD tehnike.....	60
3.6. ODREĐIVANJE SADRŽAJA VITAMINA C U EKSTRAKTIMA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA.....	61
3.7. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA SPEKTROFOTOMETRIJSKIM METODAMA.....	62
3.7.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti na DPPH radikale	62
3.7.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti na ABTS ⁺ radikale	63
3.7.3. Određivanje ukupne redukcijske sposobnosti	64
3.8. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA ELEKTRON SPIN REZONANTNOM SPEKTROSKOPIJOM	65
3.8.1. ESR spektralna analiza uticaja ekstrakata na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala.....	66
3.8.2. ESR spektralna analiza uticaja ekstrakata na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala.....	67
3.9. ODREĐIVANJE ANTIHIPERGLIKEMIJSKE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA	68
3.10. ODREĐIVANJE ANTIPROLIFERATIVNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA	69
3.10.1. Određivanje antiproliferativne aktivnosti ekstrakata.....	70
3.11. ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA	71
3.12. LABORATORIJSKA PROIZVODNJA VOĆNIH SOKOVA OBOGAĆENIH EKSTRAKTIMA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA	73
3.13. ODREĐIVANJE SADRŽAJA POLIFENOLNIH JEDINJENJA U SOKOVIMA BOBIČASTOG VOĆA	74
3.13.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola	74
3.13.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	74
3.13.3. Određivanje sadržaja ukupnih antocijana.....	74
3.14. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI SOKOVA BOBIČASTOG VOĆA	75
3.14.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti na DPPH radikale	75
3.14.2. Određivanje ukupne redukcijske sposobnosti	75
3.15. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	76
4. REZULTATI I DISKUSIJA	77
4.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE POLIFENOLNIH JEDINJENJA U EKSTRAKTIMA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA	77
4.2. HPLC ANALIZA POLIFENOLNIH JEDINJENJA U EKSTRAKTIMA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA	80
4.2.1. HPLC analiza ETMM i ETMW	80
4.2.2. HPLC analiza ETKČ i ETKT	83
4.2.3. HPLC analiza ETB	85

4.3. HPLC ANALIZA VITAMINA C	87
4.4. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA	88
4.4.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata tropova bobičastog voća spektrofotometrijskim metodama	89
4.4.1.1. Antioksidativna aktivnost ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB na DPPH radikale	89
4.4.1.2. Antioksidativna aktivnost ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB na ABTS ^{•+} radikale	92
4.4.1.3. Redukciona sposobnost ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB	95
4.4.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata tropova bobičastog voća elektron spin rezonantnom spektroskopijom	96
4.4.2.1. ESR spektralna analiza uticaja ekstrakata na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala	97
4.4.2.3. ESR spektralna analiza uticaja ekstrakata na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala	100
4.4.3. Korelaciona analiza sadržaja fitohemikalija i antioksidativne aktivnosti ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB	103
4.5. ANTIHIPERGLIKEMIJSKA AKTIVNOST EKSTRAKATA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA	106
4.5.1. Korelaciona analiza sadržaja fitohemikalija i antihiperглиkemijske aktivnosti ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB	110
4.6. ANTIPROLIFERATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA	112
4.6.1. Korelacija između sadržaja fitohemikalija i antiproliferativne aktivnosti ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB	120
4.7. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA	122
4.7.1. Antibakterijska i antifungalna aktivnost ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB	122
4.7.2. Korelacija između sadržaja fitohemikalija i antimikrobne aktivnosti ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB	137
4.8. SOKOVI BOBIČASTOG VOĆA OBOGAĆENI EKSTRAKTIMA TROPOVA ISTOG VOĆA	143
4.8.1. Sadržaj polifenolnih jedinjenja u sokovima	144
4.8.2. Antioksidativna aktivnost sokova	146
4.8.3. Korelacija između sadržaja polifenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti sokova	149
5. ZAKLJUČAK	151
6. LITERATURA	157

1. UVOD

Savremeni trend proizvodnje prehrambenih proizvoda usmeren je ka dobijanju kvalitetne i zdravstveno bezbedne funkcionalne hrane bez sintetskih aditiva. Poznato je da voće sadrži pored nutritivnih i značajnu količinu bioaktivnih jedinjenja: fenolnih kiselina (derivata benzoeve kiseline i cimetne kiseline), stilbena, karotenoida, kumarina, halkona, lignina, flavonoida (flavonola, flavona, dihidroflavonola, flavanona, antocijana) i njihovih glukozida. Biološka aktivnost ovih jedinjenja uslovljena je prvenstveno njihovim antioksidativnim kapacitetom, tj. sposobnošću uklanjanja reaktivnih kiseoničnih vrsta - uzročnika patoloških stanja humanog organizma. Stoga, konzumiranje prehrambenih proizvoda obogaćenih istim, kao i odgovarajućih dijetetskih proizvoda obezbeđuje željeni antioksidativni status i pomaže u prevenciji razvoja bolesti u kojima je oksidativni stres ključni uzročnik.

U novije vreme napušta se upotreba sintetskih antioksidanata, zbog njihovih toksičnih efekata, te se stoga težište interesovanja prebacuje na upotrebu prirodnih antioksidanata. Prirodni antioksidanti izolovani iz biljaka, gljiva, mikroorganizama i životinjskog tkiva su zdravstveno bezbedni i poseduju izuzetno visoku antioksidativnu aktivnost.

Mnoga ispitivanja dokazala su da prirodni antioksidanti mogu da utiču na sprečavanje razvoja bolesti izazvanih reaktivnim kiseoničnim vrstama, pa se s toga preporučuje konzumiranje namirnica obogaćenih istim. Višebrojne studije su pokazale da je visoka antioksidativna aktivnost bobičastog voća povezana sa visokim sadržajem polifenolnih jedinjenja (antocijana, fenolnih kiselina i dr.) i vitamina, pre svega vitamina C, i da njihov sadržaj ima pozitivan efekat na degenerativne i hronične bolesti. S obzirom na ta saznanja, novija istraživanja iz oblasti prirodnih antioksidanata proširila su se i na sporedne proizvode tokom prerade voća.

Poznato je da tokom tehnoloških postupaka prerade voća zaostaju velike količine sporednih proizvoda kao što su kožica, semenke, spoljna tkiva i postekstrakciona pogača (trop). Sporedni proizvodi predstavljaju ekonomski deficit, ekološki problem, ali i značajan gubitak biomase i fitonutrijenata.

Ekonomske analize koje se odnose na industrijsku preradu voća u Srbiji ukazuju na porast proizvodnje voćnih sokova, za razliku od ostalih prerađevina od voća, čija se proizvodnja smanjuje. U industriji sokova generišu se značajne količine sporednih proizvoda koji se

uglavnom tretiraju kao otpadni materijal. Danas se sporedni proizvodi voća koriste kao hrana za životinje, za proizvodnju prehrambenih vlakana i biogoriva, iako predstavljaju značajan izvor bioaktivnih antioksidanasa i bojnih materija, koji bi mogli naći primenu u funkciji aditiva u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

Osnovna ideja ove doktorske disertacije je da sagleda mogućnost iskorišćenja tropova odabranih vrsta bobičastog voća iz familija Ericaceae i Rosaceae, voća po kojem je Srbija na svetskom tržištu prepoznatljiva po proizvodnji. Malina, kupina i borovnica su odabrane kao vrste bobičastog voća koje su, pored biljnih vlakana i vitamina, izuzetno bogate fenolnim antioksidantima.

Rad na izvođenju ove doktorske disertacije podeljen je u sledeće faze:

- Dobijanje tropa bobičastog voća (dve sorte maline, Meeker i Willamette; dve sorte kupine, Čačanska bestrna i Thornfree i divlje borovnice sa područja Kopaonika) ceđenjem voća u laboratorijskim uslovima;
- Ekstrakcija tropova i liofilizacija dobijenih ekstrakata u cilju prevođenja u oblik pogodan za aplikaciju;
- Određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja (sadržaja ukupnih fenola, flavonoida i antocijana, kao i kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja ovih bioaktivnih jedinjenja) i vitamina C u ekstraktima;
- Ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata na reaktivne hidroksil ($\bullet\text{OH}$) i superoksid anjon ($\text{O}_2^{\bullet-}$) i stabilne 1,2-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) i katjon 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS^+) radikale i njihove redukcione sposobnosti;
- Ispitivanje antihiperглиkemijske aktivnosti ekstrakata određivanjem potencijala inhibicije aktivnosti α -glukozidaze;
- *In vitro* ispitivanje antiproliferativne aktivnosti ekstrakata na humane tumorske ćelijske linije;
- Ispitivanje antimikrobnog delovanja ekstrakata i određivanje minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije za potentne ekstrakte;
- Laboratorijsko dobijanje sokova obogaćenih dobijenim ekstraktima;
- Određivanje antioksidativne aktivnosti obogaćenih proizvoda.

2. OPŠTI DEO

2.1.OSNOVNE KARAKTERISTIKE BOBIČASTOG VOĆA IZ PORODICA ROSACEAE I ERICACEAE

Bobičasto voće obuhvata veliki broj biljnih vrsta, koje su najčešće zastupljene u porodicama Ericaceae i Rosaceae. Biljke iz porodice Ericaceae (vresovi) su drvenaste biljke, koje većinom imaju oblik malih grmova. Ova porodica broji oko 3000 vrsta, od kojih je najpoznatija borovnica (*Vaccinium myrtillus*). Plodovi su im najčešće u obliku bobica, koje su bogate šećerima, organskim kiselinama, vitaminima, mineralnim materijama, biljnim vlaknima i fitohemikalijama. Bobice su vrlo lepog izgleda i prijatnog ukusa. Ipak najrasprostranjenije i najbrojnije su biljke iz porodice Rosaceae (ruža), koja broji oko 3000–4000 vrsta. Plodovi im se razlikuju po obliku, veličini, boji, ukusu i sadržaju nutrijenata i fitohemikalija. Najpoznatiji predstavnici iz ove porodice su malina (*Rubus idaeus*) i kupina (*Rubus fruticosus*).

2.1.1. MALINA

Malina je višegodišnja, žbunasta, listopadna biljka iz porodice Rosaceae, iz roda *Rubus*. Sastoji se iz nadzemnih (list, cvet, seme i plod) i podzemnih (koren) organa. Malina u prvoj godini naraste do dva metra visine, do zime odrveni, a u drugoj i narednih godina se razgrana, cveta i donosi plod.

Poznato je više od 200 podvrsta malina, ali je samo nekoliko njih učestvovalo u stvaranju plemenitih sorti (Bobinaite i sar., 2012; Nikolić i sar., 2010):

- Crvena malina (*Rubus idaeus* L), od kojih su najznačajnije:
 1. Evropska crvena malina (*Rubus idaeus* ssp. *vulgatus* Arrhen), rasprostranjena u Evropi i Aziji,
 2. Američka crvena malina (*Rubus idaeus* ssp. *strigosus* Michx), rasprostranjena u Severnoj Americi i Aziji,
- Crna malina (*Rubus occidentalis* L), rasprostranjena u Severnoj Americi,
- Ljubičasta (purpurna) malina (*Rubus neglectus* Peck) je prirodni hibrid između crvene i crne maline, koja je karakteristična za istočno područje Severne Amerike.

Od tih podvrsta malina nastale su skoro sve današnje sorte malina s krupnim plodovima, kojih ima nekoliko stotina (Pichler, 2011).

Plod maline je složen, zbirni, sastavljen iz velikog broja koštunica (od 20–200), (Mišić, 2000) sakupljenih oko sasušene cvetne lože (slika 2.1). Pravilno formirani zreo plod se bere ceo, dok se nepravilno razvijen i mek plod osipa tokom berbe. Plodovi su crveni, crni, retko žuti ili belkasti, izduženog ili loptastog oblika, sočni i mesnati. Masa ploda većine plemenitih sorti maline kreće se od 3 do 6 g (Mišić, 2000; Nikolić i sar., 2010).



Slika 2.1. Plod maline

Plodovi maline su izuzetno osetljivi, njihov rok trajanja je izuzetno kratak, a svaka manipulacija ih dodatno oštećuje. Drugi problem je što plodovi ne sazrevaju istovremeno, što znači da je potrebno da se obavlja višekratna berba da bi se obezbedili maksimalni prinosi. Plodovi maline namenjeni potrošnji u svežem stanju i za zamrzavanje se beru dan–dva pre pune zrelosti, a plodovi namenjeni preradi u vreme pune zrelosti (Mišić, 2000).

Plod maline ima izuzetno povoljan hemijski sastav (tabela 2.1). Plodovi sadrže mnogo vode (oko 85%) i ukupnih ugljenih hidrata (oko 11%), koji su gradivni i energetski sastojci ploda. Najznačajniji šećeri u plodu maline su monosaharidi: glukoza (1,9–3,2%) i fruktoza (2,1–3,5%), dok je saharoza zastupljena u znatno manjoj količini (0,3–0,5%), (Mišić, 2000). Plod maline sadrži male količine vitamina. Od vitamina najzastupljeniji je vitamin C. U plodu maline se nalaze male količine pepela (oko 0,5%), a kalijum je najviše zastupljen među mineralnim materijama (Mišić, 2000; Nikolić i sar, 2010, FAO). Masne supstance, odnosno lipidi, smeštene su u semenu maline (0,3–0,5%). Pored navedenih nutrijenata, plod maline sadrži i značajne količine funkcionalnih jedinjenja sa izraženom biološkom aktivnošću (fitohemikalija): fenolnih kiselina, flavan-3-ola, antocijana i elagitanina. Ovako širok spektar i visok sadržaj nutrijenata i fitohemikalija svrstava malinu u funkcionalne namirnice.

Tabela 2.1. Prosečan osnovni hemijski sastav ploda maline na 100 g ploda
(USDA National Nutrient Database)

Sastojak	Jedinica	Sadržaj
Voda	g	85,75
Proteini (ukupno)	g	1,20
Masti (ukupno)	g	0,65
Ugljeni hidrati (ukupno)	g	11,94
Monosaharidi	g	4,21
Disaharidi	g	0,20
Dijetalna vlakna	g	6,5
Energetska vrednost	kcal	52

Tražnja za malinom na svetskom tržištu ima konstantan rast, tako da se i u našoj zemlji povećavaju površine zasada maline. Prema podacima Međunarodne organizacije za malinu (International Raspberry Organization - IRO) Srbija je vodeći proizvođač maline u svetu sa proizvodnjom u 2015. godini od 110.000 t (<http://www.internationalraspberry.net>). U Srbiji najveći problem predstavlja još uvek nerazvijena prerađivačka industrija za bobičasto voće, tako da se najveći deo izvozi u rashlađenom i zamrznutom stanju.

Zbog vrlo prijatne arome i ukusa, velike biološke, a male energetske vrednosti, malina je izuzetno pogodna sirovina, kako za domaću, tako i za industrijsku preradu. Plodovi se koriste u svežem, smrznutom ili prerađenom stanju. Od maline mogu da se proizvode raznovrsni prehrambeni proizvodi: džem, slatko od malina, želei, a kaša maline, kao poluproizvod, ima primenu u proizvodnji voćnih jogurta, sladoleda, pudinga, dečije hrane, ili instant napitaka (Pichler, 2011).

2.1.2. KUPINA

Kupina je polužbunasta biljka iz familije Roseaceae, iz roda *Rubus*, sa višegodišnjim podzemnim i dvogodišnjim nadzemnim delovima.

Plemenite sorte kupine se, u zavisnosti od tipa rasta izdanaka, mogu podeliti na (Blagojević i sar, 2012):

- Sorte uspravnog rasta (prava kupina), proizašle iz sledećih divljih vrsta:
 1. Američka uspravna sorta (*Rubus agritis* L.),
 2. Američka visokožbunasta kupina (*R. allegheniensis* Portr.),

3. Severnoamerička kupina (*R. fromdosus* Bigelow.),
 4. Korenoslisna (peršunasta) kupina (*R. laciniatus* Willd.).
- Sorte puzećeg rasta (streljajuća kupina), koje su proizašle iz sledećih vrsta kupine:
 1. Bujna puzeća kupina (*R. flagelatus* Willd.),
 2. Američka puzeća kupina (*R. invisus* Brit.),
 3. Puzeća kupina (*R. trivialis* Michx.),
 4. Severno američka puzeća kupina (*R. vitifolius* Sham.).

Plod kupine je, kao i plod maline, zbirna koštunica, sastavljen od velikog broja monokarpnih koštunica vezanih za jednu cvetnu ložu (slika 2.2). Plodovi su najčešće crne boje, vrlo sočni, izražene arome, specifičnog slatko–nakiselog ukusa, čija se masa kreće od 2–9 g (Veličković, 2000). Prema krupnoći plod može biti: vrlo krupan (mase preko 7 g), krupan (5–7 g), srednje krupan (3–5 g), i sitan (mase manje od 3 g), (Mratinić, 2000). Oblik ploda može biti: loptast, ovalan, zarubljeno kupast ili kupast. Vrlo bitna karakteristika plodova je čvrstoća, jer od nje u znatnoj meri zavisi transportabilnost, odnosno namena plodova (Mratinić, 2000).

Kupina, kao i većina bobičastog voća, ima nežne plodove sa izraženom respiracijom, neravnomernim sazrevanjem i nemogućnošću dozrevanja posle berbe (Mratinić, 2000). Plodovi se beru kada dostignu tehnološku zrelost, ili neposredno pred punu zrelost (1 do 2 dana), (Nikolić i sar, 2010).



Slika 2.2. Plod kupine

Plod kupine, kao i plod maline, ima izuzetno povoljan hemijski sastav (tabela 2.2). Sadržaj vode u kupini je 82,16–86,11% (Balaban-Marjanovic i sar, 2012), dok je sadržaj ugljenih hidrata oko 9% (Balaban-Marjanovic i sar, 2012, FAO). Procentualna zastupljenost organskih kiselina se kreće od 1,02–4,22%, a dominiraju jabučna i limunska kiselina (Nikolić i sar, 2010). Organske kiseline su korisne za stabilizaciju askorbinske kiseline i antocijana, zbog čega imaju ključnu ulogu u formiranju boje ploda i produžetku skladišne sposobnosti

svežih i prerađenih proizvoda (Zhao, 2007). Vitamin C je najzastupljeniji od vitamina, a kalijum od mineralnih materija. Posebno treba istaći visok sadržaj gvožđa u plodu kupine, zbog čega ima izuzetno velik značaj u sprečavanju i otklanjanju malokrvnosti. Kupina sadrži velike količine bojenih materija (odatle tako izražena boja), od kojih su najzastupljeniji antocijani. Pored antocijana, sadrži i druga polifenolna jedinjenja, tanine, fenolne kiseline i flavonoide, koji su prisutni u manjoj količini (Mertz i sar, 2007).

Tabela 2.2. Prosečan osnovni hemijski sastav kupine na 100 g ploda
(USDA National Nutrient Database)

Sastojak	Jedinica	Sadržaj
Voda	g	88,15
Proteini (ukupno)	g	1,39
Masti (ukupno)	g	0,49
Ugljeni hidrati (ukupno)	g	9,61
Dijetalna vlakna	g	5,3
Mono- i disaharidi	g	4,88
Energetska vrednost	Kcal	43

Na svetskim rang-listama, Srbija, posle SAD i Meksika, zauzima treće mesto po proizvodnji kupine (<http://srbi.ca/srbija-treca-u-svetu-po-proizvodnji-kupina>). Po privrednom značaju za našu zemlju, ova voćka nalazi se odmah iza maline i jagode (Nikolić i sar, 2010). U Srbiji je najzastupljenija sorta čačanska bestrna, koja je proizvedena na Institutu za voćarstvo u Čačku.

Plodovi kupine, zbog visoke biološke, hranljive i dijetetske vrednosti, izuzetno su pogodni za potrošnju u svežem stanju, za zamrzavanje, za bojenje drugih proizvoda i kao sirovina za preradu. Postoji širok spektar proizvoda od kupine: džem, slatko, marmelade, želei, sokovi, rakije, vino, sirće i dr. Lišće kupine se koristi za pripremu čajeva.

2.1.3. BOROVNICA

Borovnica je višegodišnja, žbunasta biljka skrivenosemenica, koja pripada porodici Ericaceae, rodu *Vaccinieae*. Pripada grupi acidofilnih voćki, koje dobro uspevaju samo na kiselim zemljištima, bogatim humusom i dovoljno vlažnim (Stančević, 2002).

Postoje šumske i selektovane borovnice. U stvaranju selektovanih sorti učestvovalo je 19 vrsta iz Severne Amerike, a među njima najveći značaj pripada sledećim vrstama (Nikolić i sar, 2010):

- Kanadska gorka niskožbunasta borovnica (*Vaccinium myrtilloides* Michaux),
- Niskožbunasta borovnica (*V. angustifolium* Aiton),
- Severna visokožbunasta borovnica (*V. corymbosum* L.),
- Jugoistočna visokožbunasta borovnica (*V. australe* Small),
- Borovnica „zečije oko” (*V. ashei* Reade).

Plod borovnice je najčešće okruglasto-spljoštenog oblika, tamno plave ili ljubičaste boje, blago nakiselog ukusa (slika 2.3). U plodu se nalazi veliki broj semenki, do 65, od kojih je većina nepotpuno razvijena (Nikolić i sar, 2010).

Berba borovnice traje od šest do osam nedelja, u zavisnosti od sorte (Blagojević i sar, 2011). Borovnica se bere u punoj zrelosti, kada su plodovi izrazito plave do crne boje, ako su namenjeni za čuvanje i upotrebu u svežem stanju. Ukoliko su plodovi namenjeni za preradu, tada se beru kada dostignu tehnološku zrelost. Crvenkasti, još nezreli plodovi su kiselog ukusa. Način berbe i manipulisanje obranim plodovima nakon berbe utiču na trajnost plodova.



Slika 2.3. Plod borovnice

Plod borovnice je vrlo povoljnog hemijskog sastava (tabela 2.3). Hranljiva i lekovita vrednost plodova borovnice ogleda se u sadržaju pojedinih materija: ugljenih hidrata, kiselina, vitamina, mineralnih soli i polifenola (Nikolić i sar, 2010). Ima veoma dobar odnos šećera i kiselina. Od vitamina, najzastupljeniji su vitamin C (Vračar, 2001, FAO) i vitamin K (FAO).

Sadržaj pektina u plodu je 0,7%, a celuloze 1,5% (Vračar, 2001). Od mineralnih materija u najvećoj količini sadrži kalijum, kalcijum, magnezijum i fosfor. Plod borovnice sadrži i visoku koncentraciju polifenola, posebno flavonoida, od kojih su najprisutniji antocijani, ali i fenolne kiseline (kafena, hlorogenska, *p*-kumarinska i ferulna kiselina) i proantocijanidine (Castrejón i sar, 2008).

Tabela 2.3. Prosečan osnovni hemijski sastav borovnice na 100 g ploda
(USDA National Nutrient Database)

Sastojak	Jedinica	Sadržaj
Voda	g	84,21
Proteini (ukupno)	g	0,74
Masti (ukupno)	g	0,33
Ugljeni hidrati (ukupno)	g	14,49
Dijetalna vlakna	g	2,4
Mono- i disaharidi	g	9,96
Energetska vrednost	Kcal	57

U Srbiji je podizanje zasada borovnice u velikoj ekspanziji. Zemljište jugozapadne Srbije je po hemijskom sastavu posebno pogodno za uzgoj borovnice.

Plodovi borovnice, kao i drugo bobičasto voće, imaju izuzetno hranljiva i lekovita svojstva, što doprinosi njihovoj visokoj upotrebnoj vrednosti. Borovnica može da se koristi u svežem stanju, ali najvećim delom se prerađuje ili koristi u smrznutom stanju. Plodovi mogu da se koriste u industriji za dobijanje sokova, želea, jogurta, marmelada, džemova i dr. Borovnica ne sadrži mnogo isparljivih jedinjenja, pa nije pogodna za proizvodnju alkoholnih pića (Šumić, 2014).

2.2. BOBIČASTO VOĆE KAO IZVOR BIOAKTIVNIH JEDINJENJA

Hrana i saznanja o ishrani danas imaju potpuno nove dimenzije i koncepte. U prošlosti je glavna uloga hrane bila preživljavanje i malo se pažnje posvećivalo njenim negativnim, odnosno pozitivnim efektima na zdravlje. Sve više dokaza ukazuje na zdravstvene prednosti voća, povrća, integralnih žitarica i drugih biljnih namirnica, zbog sinergije ili interakcije bioaktivnih jedinjenja i drugih hranljivih materija u namirnicama (Liu, 2013). Po navodima Arsića i saradnika (2003) nepravilna ishrana je jedan od glavnih uzročnika (šest od deset) smrti.

Brojna naučna istraživanja novijeg datuma ukazuju na pozitivnu korelaciju između konzumiranja voća i povrća i prevencije razvoja mnogih bolesti, kao što su neki kanceri, kardiovaskularne, neurodegenerativne i infektivne bolesti, dijabetes, i takođe starenja (Đilas i sar, 2010). Svetska zdravstvena organizacija (WHO) preporučuje dnevni unos od najmanje 400 g voća i povrća u cilju smanjenja kancerogenih oboljenja i bolesti izazvanih starenjem (Hoffmann, 2003; Lima i sar, 2014).

Prema *The Functional Food Science in Europe* (FUFOSE), funkcionalnom hranom se može smatrati namirnica ukoliko sadrži sastojke (nutritivne ili nenutritivne) koji povoljno deluju na jednu ili više funkcija organizma i to izvan okvira uobičajenih nutritivnih efekata i na način značajan za održavanje dobrog opšteg zdravstvenog stanja organizma ili za smanjenje rizika od bolesti. Funkcionalna hrana, hrana 21. veka, sadrži jednu ili više bioaktivnih komponenti, a to može biti makronutrijent (npr. omega-3-masne kiseline), mikronutrijent (vitamin, mineral), neesencijalni sastojak koji poseduje određenu energetska vrednost (oligosaharidi, likopen, konjugovana linolna kiselina, fitosterol) i/ili fitohemikalija (sulforafan, flavonoidi, fitoestrogeni) ili živi mikroorganizmi (probiotici) (Vulić, 2012).

Na globalnom nivou sve je veća potražnja za bobičastim voćem, koje sadrži značajne količine biološki aktivnih jedinjenja, pre svega prirodne polifenole i nutrijente, koje treba ugraditi u funkcionalnu hranu i farmaceutske proizvode (Kårlund i sar, 2014).

2.2.1. FITOHEMIKALIJE BOBIČASTOG VOĆA

Po definiciji, fitohemikalije su bioaktivne nenutritivne komponente biljnog porekla (sekundarni metaboliti biljaka), koje se vezuju za smanjenje mnogih hroničnih oboljenja. Ove supstance nisu esencijalne, ali se njihovim svakodnevnim unosom postižu pozitivni efekti po zdravlje ljudi (Liu, 2004). Više od 5000 fitohemikalija je identifikovano u voću, povrću, integralnim žitaricama, mahunarkama i orasima, ali i dalje veliki procenat ostaje nepoznat (Liu, 2013).

Sadržaj fitohemikalija u bobičastom voću zavisi od niza faktora, kao što su: sortiment, klimatski uslovi, uslovi i mesto gajenja, stepen zrelosti, postupak obrade i skladištenje voća (Häkkinen i sar, 2000). Količinom polifenola, fitohemikalija koje su najzastupljenije, posebno se ističe tamno obojeno bobičasto voće iz porodica *Ericaceae* (borovnice) i *Rosaceae* (kupina, malina, trešnja, višnja, jagoda) (Määttä-Riihinen, 2004).

2.2.1.1. Fenolna i polifenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja obuhvataju široko rasprostranjenu heterogenu grupu sekundarnih biljnih metabolita, sa fenolnim jezgrom kao osnovnim konstituentom. Identifikovano je više od 8000 ovih jedinjenja u biljnim vrstama (Pandey i sar, 2009), koja se po svojoj strukturi veoma razlikuju, od jednostavnih molekula, kao što su fenolne kiseline do visoko kondenzovanih jedinjenja, kao što su tanini. U prirodi se mogu nalaziti slobodni, ili u obliku gluko-

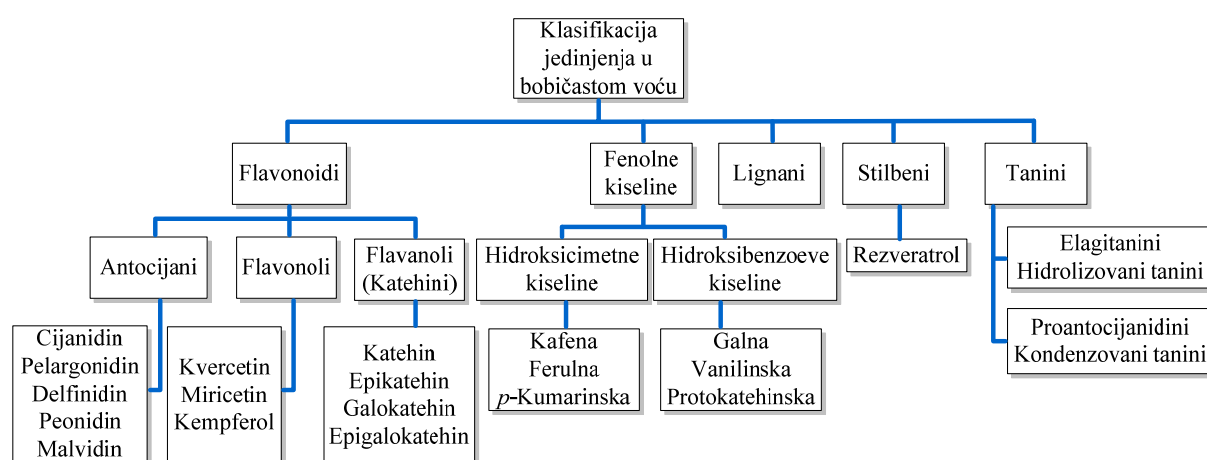
zida. Glukozidi sadrže monosaharidne jedinice i aglikonski deo, koji je zaslužan za biološku aktivnost polifenolnih jedinjenja. U hrani, polifenolna jedinjenja mogu da doprinesu gorčini, boji, ukusu, mirisu i oksidativnoj stabilnosti (Pandey i sar, 2009). Ova grupa jedinjenja je predmet mnogobrojnih istraživanja, a glavni razlog su njihova antioksidativna svojstva, obilje u ishrani i njihova uloga u prevenciji mnogih bolesti povezanih sa oksidativnim stresom, kao što su rak, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti (Manach i sar, 2004). U SAD potrošnja fenolnih jedinjenja, po stanovniku, iz voća i povrća je u opsegu 200–300 mg/dan (Lima i sar, 2014). Identifikacija i kvantifikacija ovih jedinjenja može dati ključne informacije povezane sa njihovim funkcijama kao antioksidantima, o kvalitetu hrane i potencijalnim efektima na zdravlje (Tumbas Šaponjac i sar, 2016).

Jedna od klasifikacija fenolnih jedinjenja zasniva se na broju ugljenikovih atoma vezanih za osnovni skelet fenola (tabela 2.4) (Antolovich i sar, 2000).

Tabela 2.4. Klasifikacija fenolnih jedinjenja (Antolovich i sar, 2000)

Osnovni skelet	Klasa	Jedinjenje
C6	Prosti fenoli	Katehol, hidrohinon, resorcinol
	Benzohinoni	
C6-C1	Fenolne kiseline	<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina, salicilna kiselina
C6-C2	Fenilsirćetne kiseline	<i>p</i> -hidroksifenilsirćetna kiselina
C6-C3	Cimetne kiseline	Kafena kiselina, ferulna kiselina
	Fenilpropeni	Eugenol, miristicin
	Kumarini	Umbeliferon, eskuletin, skopolin
	Hromoni	Eugenin
C6-C4	Naftohinoni	Juglon
C6-C1-C6	Ksantoni	Mangostin, mangiferin
C6-C2-C6	Stilbeni	Rezveratrol
	Antrahinoni	Emodin
C6-C3-C6	Flavonoidi	
	Flavoni	Apigenin, luteolin, sinensetin, nobiletin, tangeretin, diosmin
	Flavonoli	Kvercetin, kemferol, rutin
	Dihidroflavonoli	Dihidrokvercetin, dihidrokamferol
	Flavanoni	Hesperidin, naringenin, neohesperidin, narirutin, naringin, eriocitrin
	Antocijanidini	Pelargonidin, peonidin, delphinidin, petunidin, cijanidin
	Flavan-3-oli	Katehin, epikatehin, galokatehin, epigalokatehin
	Halkoni	Floridžin, arbutin, halkonaringenin
(C6-C3) ₂	Lignini	Pinorezinol
(C6-C3-C6) ₂	Biflavonoidi	Agatisflavon, amentoflavin

Fenolna jedinjenja doprinose kvalitetu voća i povrća (Lima i sar, 2014). Bobičasto voće predstavlja bogat izvor fenolnih jedinjenja, kao što su fenolne kiseline, flavonoidi (Kähkönen i sar, 1999; Häkkinen i sar, 1999), stilbeni, tanini, katehini (Peredes-López i sar, 2010; Bobinaite i sar, 2012). Pored toga, većina fenolnih jedinjenja je odgovorna za organoleptička svojstva voća i njihovih prerađevina, kao što su boja (npr. antocijani) i ukus bobičastog voća (npr. tanini), (Cheynier, 2005). Balasundram i saradnici (2006) su poredeći literaturne podatke za sadržaj fenolnih jedinjenja u voću, ustanovili da se bobičasto voće ističe po izuzetno visokom sadržaju ovih komponenti. Na slici 2.4 prikazan je pregled zastupljenih fenolnih jedinjenja u bobičastom voću.



Slika 2.4. Klasifikacija fenolnih jedinjenja u bobičastom voću (Paredes-López i sar, 2010)

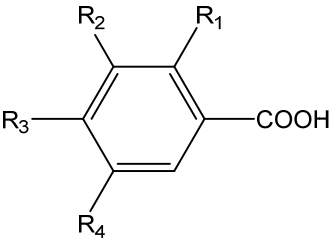
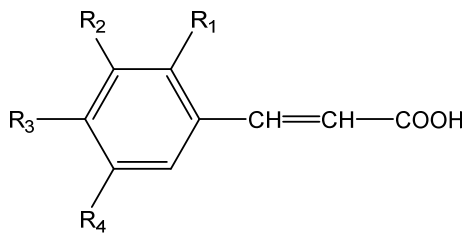
U skorije vreme malina, kupina i borovnica se promovisu kao vrste izuzetno bogate fenolnim komponentama, koje su značajne za njihovu antioksidativnu aktivnost kao „hvatači“ radikala i drugih mogućih pozitivnih uloga u ljudskom zdravlju, kao što je smanjenje rizika od raka, kardiovaskularnih i drugih oboljenja (Mertz i sar, 2007). Visoko prisustvo ukupnih polifenolnih jedinjenja dokazali su i Fredes i saradnici (2014), u plodu borovnice, maline i kupine, koji su brani u istoj fazi vegetacije, u fazi dospeća. Poređenjem ovih vrsta, utvrđen je sledeći redosled prisustva polifenola: kupina, borovnica, malina. Isti redosled su utvrdili i za prisustvo antocijana.

Fenolne kiseline

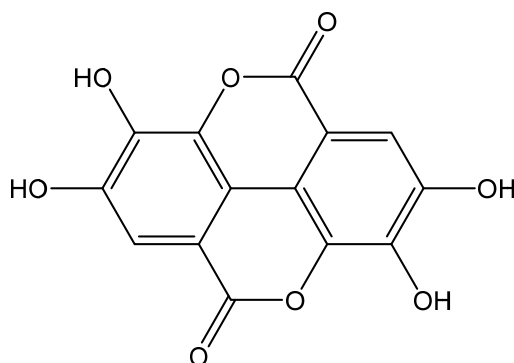
Fenolne kiseline su hidroksi i / ili funkcionalni derivati benzoeve i cimetne kiseline. Sastoje se od fenolnog jezgra i bočnog niza koji sadrži jedan (derivati benzoeve kiseline) ili tri (derivati cimetne kiseline) ugljenikova atoma. Derivati se razlikuju po stepenu hidroksi-

lacije i metilacije aromatičnog prstena, a broj i pozicija hidroksilnih (OH) grupa na aromatičnom prstenu stvaraju raznolikost (tabela 2.5). Fenolne kiseline u biljkama imaju brojne funkcije od kojih su najvažnije: asimilacija hranljivih materija, sinteza proteina, aktivnost enzima i fotosinteza.

Tabela 2.5. Podela fenolnih kiselina

Derivati hidroksibenzojeve kiseline	Derivati hidroksicimetne kiseline
 <p> $R_1=R_2=R_4=H$; $R_3=OH$ <i>p</i>-hidroksibenzojeva kiselina; $R_1=H$; $R_2=R_3=R_4=OH$ galna kiselina; $R_1=R_4=H$; $R_2=OCH_3$; $R_3=OH$ vanilinska kiselina; $R_1=H$; $R_2=R_4=OCH_3$; $R_3=OH$ siringinska kiselina; $R_1=H$; $R_2=R_4=OCH_3$; $R_3=OH$ protokatehinska kiselina </p>	 <p> $R_1=R_2=R_4=H$; $R_3=OH$ <i>p</i>-kumarinska; $R_1=R_4=H$; $R_2=R_3=OH$ kafena kiselina; $R_1=R_4=H$; $R_2=OCH_3$; $R_3=OH$ ferulna kiselina; $R_1=H$; $R_2=R_4=OCH_3$; $R_3=OH$ sinapinska kiselina </p>

Pored navedenih, fenolnim kiselinama pripada i elaginska kiselina (slika 2.5). Ova kiselina je derivat galne kiseline, koji nastaje laktonizacijom heksahidroksidifenske kiseline (HHDP), kondenzacionog proizvoda dva molekula galne kiseline.



Slika 2.5. Struktura elaginske kiseline

Fenolne kiseline se vrlo retko nalaze u slobodnom obliku (gotovo nikada ne prelazi 5% od ukupnog sadržaja u voću) (Manganaris i sar, 2014), a najčešće su u formi glukozida i

estara. Kafena, ferulna, *p*-kumarinska, protokatehinska i vanilinska kiselina su prisutne u gotovo svim biljkama (Liu, 2004; Liu, 2013). Bobičasto voće je bogato elaginskom kiselinom (Aiyer i sar, 2008), a posebno voćne vrste iz roda *Rubus* (crvena malina) i roda *Fragaria* (jagoda) (Puupponen-Pimiä i sar, 2005).

Flavonoidi

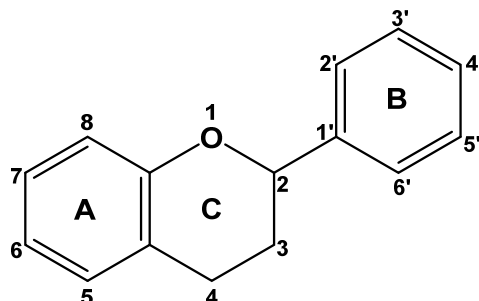
Flavonoidi su polifenolne fitohemikalije, koje predstavljaju veliku grupu sekundarnih metabolita biljaka (Häkkinen i sar, 1999). Iz biljaka je izdvojeno preko 4.000 vrsta flavonoida, što ukazuje na činjenicu da su široko rasprostranjena grupa jedinjenja u prirodi (tabela 2.6) (Yao i sar, 2004).

Tabela 2.6. Glavne podgrupe flavonoida, predstavnici i izvori hrane (Yao i sar, 2004)

Podgrupe	Boja	Predstavnici	Izvori namirnica	Komentar
Antocijani	Plava, crvena, ljubičasta	Cijanidin	Voće i cveće	Prirodne boje
Flavanoli	Bezbojni	Katehini, galokatehin, epikatehin, epigalokatehin, galat	Jabuke, hmelj, čaj i pivo	
	Žuti	Procijanidin Teaflavin	Vino, voćni sokovi Crni čaj	
Flavanoni	Bezbojni	Hesperidin	Citrusno voće	
	Bledi	Naringenin, eriodiktiol	Kim, pomorandže, grejpfrut, pepermint	Gorak ukus
	Žuti	Neohesperidin		
Flavoni	Svetlo žuti	Apigenin, hrisin, luteolin, Diosmetin, luteolin	Biljke, žitarice, voće, peršun, majčina dušica Povrće i cveće	Gorak ukus
Flavonoli	Svetlo žuti	Izorhamnetin, kemferol, kvercetin, miricetin, rutin	Luk, trešnja, jabuka, brokoli, kelj, paradajz, voće, čaj, crno vino	
Flavanonoli		Taksifolin	Limun, aurantium	
Izoflavoni	Bezbojni	Daidzein, genistein, glicitein, formononetin	Mahunarke (npr. soja)	

Nalaze se u obliku glukozida rastvornih u vodi, ili kao estri rastvorni sa taninskim materijama, dok se slobodni veoma retko nalaze. Osnovni strukturni skelet (C6-C3-C6) se sastoji iz dva benzenova prstena (A i B), međusobno povezana tročlanim alifatičnim ugljenič-

nim nizom preko C3 jedinice, koji sa atomom kiseonika formira heterociklični prsten C (piranski prsten). Osnovni strukturni skelet flavonoida je prikazan na slici 2.6. Razlike u strukturi heterocikličnog C prstena klasifikuju ova jedinjenja u sledeće grupe: flavonoli, flavoni, flavanoli (katehini), flavanoni, antocijanidini i izoflavonoidi (Liu, 2004).

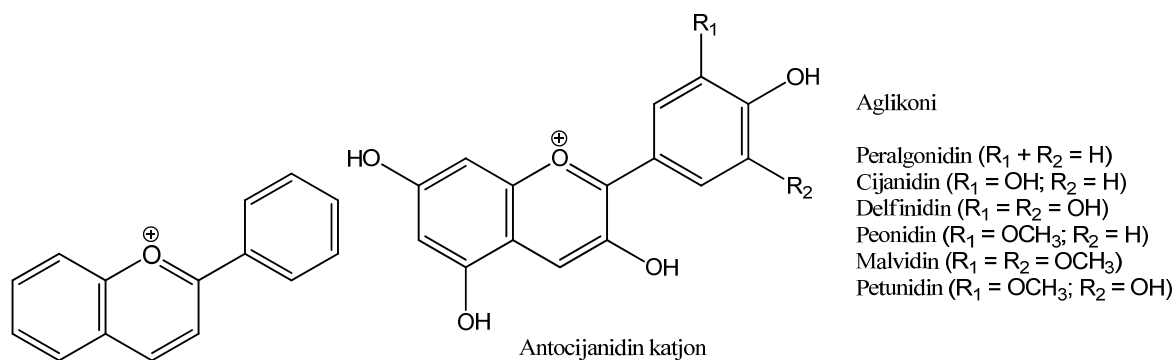


Slika 2.6. Osnovni strukturni skelet flavonoida

Raznovrsnost i veliki broj struktura flavonoida rezultat su brojnih modifikacija njihove osnovne strukture, kao što su: dodatne hidroksilacije, O-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezivanje neorganskog sulfata i najvažnije, glikolizacije hidroksilnih grupa (nastajanje O-glukozida) ili flavonoidnog jezgra (nastajanje C-glukozida), (Tumbas, 2010).

Glavne grupe flavonoida koje se nalaze u bobičastom voću su: antocijani, proantocijani, flavonoli i katehini (Oszmiański i sar, 2005).

Antocijani (*anthos*-cvet, *kyanos*-plav) predstavljaju klasu flavonoidnih jedinjenja sa karakterističnom strukturom C₆-C₃-C₆, sa preko 500 različitih jedinjenja. Oni predstavljaju važne polifenolne komponente voća, posebno bobičastog (Mitić i sar, 2011). Prvi put su izolovani 1835. godine. Uvek se javljaju u obliku glukozida, čijom hidrolizom nastaje antocijanidin (aglikon) i šećerna komponenta. Antocijani su odgovorni za plavu, ljubičastu, roza i crvenu boju voća. Osnovna struktura antocijana je prikazana na slici 2.7. Razlikuju se po broju hidroksilnih i/ili metoksilnih grupa, vrste, broja i položaja šećera u molekulu i vrste i broja alifatičnih ili aromatičnih kiselina koje su vezane za šećer molekula (Tepić, 2012). Šest različitih antocijanidina, koji se nalaze u prirodi (pelargonidin, cijanidin, delfinidin, peonidin, petunidin i malvidin), razlikuju se u položaju i broju hidroksilnih grupa i stepenu metilacije (Manganaris i sar, 2014) (slika 2.7). Njihova boja u znatnoj meri zavisi od hidroksilnih grupa u B prstenu, što je broj grupa veći to je boja intenzivnije plava (Tanaka i sar, 2008). Na boju antocijana utiču i prisustvo dvostrukih veza, porast supstitucije molekula, promena pH, stvaranje metalnih kompleksa i kopigmentacija.



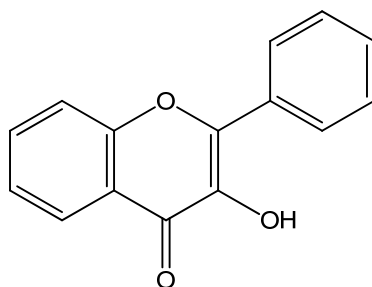
Slika 2.7. Osnovna struktura antocijana

Antocijani su vrlo nestabilni i veoma podložni degradaciji, na koju utiču brojni faktori poput: pH, temperatura skladištenja, hemijska struktura, koncentracija, svetlost, kiseonik, rastvarači, prisustvo enzima, flavonoida, proteina i metalnih jona (Castañeda-Ovando i sar, 2009; Su i sar, 2012).

Danas je sve veći interes za izolovanjem antocijana zbog niza pozitivnih osobina koje ispoljavaju. To su netoksični prirodni pigmenti, rastvorni u vodi, koji bi u skorije vreme mogli zameniti upotrebu sintetičkih boja i antioksidanata, zbog sumnje da oni pokazuju toksikološke efekte, odnosno da deluju kao promotori u karcinogenezi. Međutim, njihova nestabilnost, kao i nizak procenat ekstrahovanja iz biljnog materijala, jedan je od glavnih ograničavajućih faktora za primenu u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji.

Sadržaj antocijana u crvenom voću se tokom sazrevanja plodova povećava (Mitić i sar, 2012), dok se ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja smanjuje (Chu i sar, 2011). Bobičasto voće je izuzetno bogato antocijanima, pa tako 100 g bobica može da obezbedi do 500 mg antocijana (Manach i sar, 2005). Prema Evropskoj agenciji za bezbednost hrane, bezbedan unos hranom je 36 mg dnevno (Ćujić i sar, 2013). Borovnica i kupina se posebno ističu po visokom sadržaju antocijana.

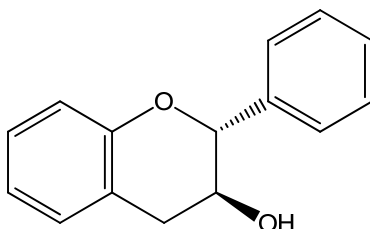
Flavonoli predstavljaju najrasprostranjeniju grupu flavonoida, izuzetno zastupljenu u biljnom svetu. Najpoznatiji su: mircetin, kvercetin i kamferol, koji se najčešće nalaze kao *O*-glukozidi.



Slika 2.8. Osnovna struktura flavonola (Cushnie i sar, 2005)

Velike varijacije u sadržaju flavonola u bobičastom voću mogu se pripisati različitim uslovima gajenja, širokim spektrom sorti i dr. Sadržaj flavonola je čak preko 30% od ukupnog sadržaja fenola kod borovnice, crne i crvene ribizle (Häkkinen i sar, 1999). Määttä-Riihinen i saradnici (2004) su ispitivali bobičasto voće roda *Rubus* i *Fragaria* i ustanovili da je tipičan flavonol glukozid prisutan u svim bobicama kvercetin-3-glukuronid. Nivo mircetina se povećava tokom zrenja u plodu borovnice (Jaakola i sar, 2002). U većini bobičastog voća flavonoli se nalaze u mezorkapu, dok se kod borovnice nalaze u egzokarpu (pokožici), a tek male količine u ostatku ploda. Bioraspoloživost kvercetina zavisi od šećerne komponente vezane za fenolnu strukturu (u konjugaciji sa glukozom njegova bioraspoloživost je povećana) (Graefe i sar, 2001).

Flavanoli (Flavan-3-oli) su definisani prisustvom hidroksilne grupe na C₃ (C prsten) i predstavljaju najkompleksniju grupu flavonoida, od jednostavnih monomera, do oligomernih i polimernih oblika, tzv. proantocijanidina (Fraga i sar, 2011). Ovu grupu jedinjenja, za razliku od drugih, karakteriše nepostojanje dvostruke veze između C₂ i C₃, kao i karbonilne grupe na C₄ u C prstenu, zbog čega, zajedno sa hidroksilacijom na C₃, ova jedinjenja imaju dva hiralna centra (na C₂ i C₃) (Tsao, 2010). Katehin je izomer sa *trans* konfiguracijom, a epikatehin sa *cis* konfiguracijom. Svaka od ovih konfiguracija ima po dva stereoizomera.



Slika 2.9. Osnovna struktura flavanola (Cushnie i sar, 2005)

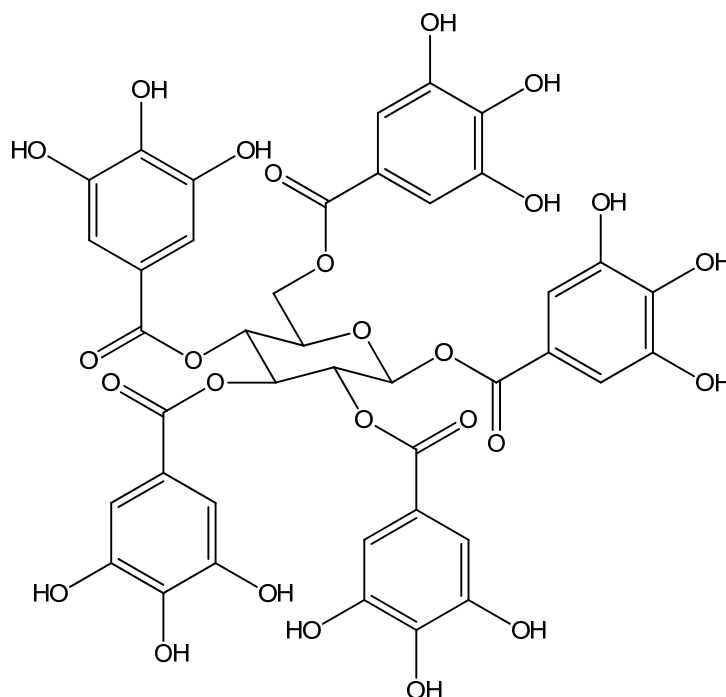
Oni se nalaze u obliku glukozida (mono-, di- i tri-glukozidi), najčešće vezani za glukozu i predstavljaju gradivne jedinice tanina. Flavanoli su žuto obojeni i najviše ih ima u jabukama, kruškama, jagodama, crnoj ribizli, kupini i drugom voću. Mogu da se nalaze kao prosti monomeri, (+)-katehin i (-)-epikatehin, koji su najčešće zastupljeni u biljkama (Tsao, 2010), kao oligomeri i kao polimerni proantocijanidini, koji čine kondezovane tanine. Flavan-3-oli mogu biti esterifikovani (galnom kiselinom) ili hidroksilovani (galokatehini).

Što se tiče metabolizma flavanola kod ljudi i životinja, ustanovljeno je da želudačna sredina ne utiče na stabilnost flavanola i procijanidina, i oni odlaze sa minimalnim modifikacijama u tanko crevo, gde mogu da se apsorbuju (Fraga i sar, 2010).

Tanini

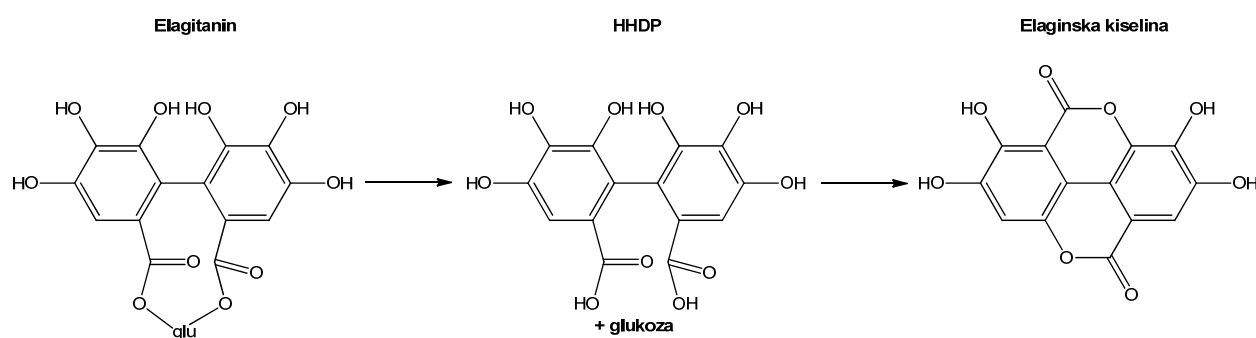
Tanini su složena, polifenolna i bezazotna jedinjenja. Na osnovu gradivnih jedinica i hemijske prirode, mogu se izdvojiti dve osnovne grupe tanina: hidrolizujući tanini (estri galne i elaginske kiseline) i kondenzovani tanini (proantocijanidini) (Dai i sar, 2010).

Hidrolizujući tanini su poliestri galne kiseline ili njenih derivata i centralnog molekula šećera (najčešće D-glukoze). Najpoznatiji hidrolizujući tanini su pentagaloilglukoza (slika 2.10) i njeni oligomeri, galotanini.



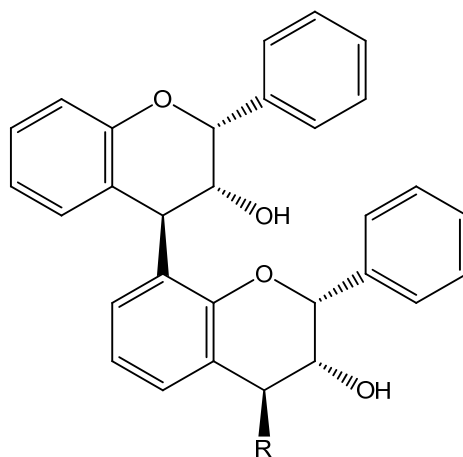
Slika 2.10. Struktura pentagaloilglukoze (Cushnie i sar, 2005)

Elagitanini (estri heksahidroksidifenske kiseline i poliola) takođe pripadaju grupi hidrolizujućih tanina. Kada se izlože delovanju baza ili jakih kiselina, dolazi do hidrolize estarskih veza i heksahidroksidifenska kiselina spontano prelazi u dimer galne kiseline, elaginsku kiselinu (u vodi nerastvoran dilakton) (slika 2.11).



Slika 2.11. Hidroliza elagitanina

Kondezovani tanini (proantocijanidini ili leukocijanidini) predstavljaju polikondenzovana jedinjenja velikih molekulskih masa, koji najčešće nastaju C-C kondenzacijom flavan-3-ola (katehina i epikatehina) ili ređe flavan-3,4-diola. U literaturi termin kondenzovani tanini najčešće se odnosi na oligomerne proantocijanidine (dimere, trimere, tetramare), iako se mogu naći i tanini sa stepenom polikondenzacije 50 i više (Bravo, 1998). Na slici 2.12 prikazana je osnovna struktura dimernog proantocijanidina.



Slika 2.12. Osnovna struktura dimernog proantocijanidina (Cushnie i sar, 2005)

Tanini su široko rasprostranjeni u kori i plodovima nekih biljaka, čak i u vrlo značajnom iznosu, često i više desetina procenata (Milić i sar, 2000). Sadržaj tanina je veoma visok u nezrelim plodovima voća, a tokom sazrevanja njihova koncentracija opada (Tepić, 2012). Tanini doprinose specifičnom oporom ukusu nezrelog voća.

Od bobičastog voća, po sadržaju proantocijanidina sa visokim stepenom kondenzacije izdvaja se aronija, a u manjim koncentracijama ova jedinjenja su prisutna u kupini (Nile i sar, 2014). Hidrolizujući tanini se nalaze u značajnim količinama u jagodi, malini i kupini (Shahidi i sar, 2004).

2.2.2. NUTRIJENTI BOBIČASTOG VOĆA

Hrana je sastavni deo života čoveka. Danas odabir namirnica koje čovek unosi u organizam, ima za cilj pozitivan učinak na njegovo zdravlje. Saznanja do kojih je došla savremena nauka, potvrdila su da postoji tesna veza između ishrane i zdravlja, tako da hrana, odnosno njeni sastojci učestvuju u modulaciji i kontroli različitih telesnih funkcija (Arsić i sar, 2003). Ishrana čoveka, koja je uravnotežena i raznolika, obezbeđuje mu nutrijente neophodne za normalno funkcionisanje i zdravlje organizma.

U zavisnosti od toga da li je organizam u stanju da ih sintetise, nutrijenti se dele na:

- Esencijalne: organizam nije u stanju uopšte da ih sintetise, ili ne u količinama koje su neophodne za njegovo normalno funkcionisanje. U esencijalne nutrijente se ubrajaju: vitamini, minerali, pojedine aminokiseline i masne kiseline;
- Neesencijalne: organizam može da ih sintetise. Proteini, masti i ugljeni hidrati pripadaju ovoj grupi nutrijenata.

Opšta podela nutrijenata, na osnovu potrebe organizma za njima, je na makronutrijente (proteini, aminokiseline, lipidi, masne kiseline, ugljeni hidrati) i mikronutrijente (minerali i vitamini). Makronutrijenti pružaju energiju i strukturni materijal (aminokiseline iz kojih se grade proteini, i lipidi od kojih se formiraju ćelijske membrane i pojedini tipovi signalnih molekula) i potrebni su organizmu u većim količinama. Mikronutrijenti su potrebni u malim količinama i imaju važnu ulogu:

- Kao kofaktori u metabolizmu, neophodni su za moduliranje aktivnosti mnogih enzima,
- Kao koenzimi u metabolizmu, vitamini ili metaboliti vitamina preuzimaju aktivnu ulogu u složenim biohemijskim reakcijama, npr. riboflavin i niacin učestvuju u lančanom prenosu elektrona,
- Kontrolne funkcije u procesima transkripcije koji regulišu ekspresiju gena,
- Kao strukturni elementi, neophodni za sintezu složenih proteina, npr. hromoproteina i metaloproteina,
- Kao antioksidanti.

Bobičasto voće je pored fenola, posebno antocijana, izuzetno bogato mikronutrijentima i vlaknima (Basu i sar, 2010).

2.2.2.1. Vitamini

Vitamini su veoma značajan sastojak bobičastog voća, koji ih zajedno sa mineralnim materijama čini izuzetno fiziološki vrednim i sa brojnim enzimima obezbeđuju pravilno funkcionisanje organizma. Oni mogu da deluju kao koenzimi, antioksidanti (vitamini C i E) ili imaju hormonsku aktivnost (vitamini D i A). Sadržaj pojedinih vitamina za malinu, kupinu i borovnicu prikazan je u tabeli 2.7.

Tabela 2.7. Prosečan sadržaj vitamina u plodu kupine, maline i borovnice na 100 g ploda
(USDA National Nutrient Database, www.ars.usda.gov)

Sastojak	Jedinica	Kupina	Malina	Borovnica
Vitamin B ₁	mg	0,02	0,03	0,037
Vitamin B ₂	mg	0,026	0,04	0,041
Vitamin B ₃	mg	0,646	0,6	0,418
Vitamin B ₆	mg	0,030	0,06	0,052
Vitamin C	mg	21	26,20	9,7
Vitamin E	μg	1,17	0,87	0,57
Vitamin K	μg	19,80	7,80	19,30

Bobičasto voće se posebno ističe po visokom sadržaju vitamina C, koji je esencijalni nutrijent za ljudski organizam. Na sadržaj vitamina C u voću i povrću mogu da utiču mnogi faktori: razlike u genotipovima, klimatski uslovi, stepen zrelosti, način berbe, postupak obrade i manipulacije nakon berbe (Golding i sar, 2015). Sadržaj se smanjuje i tokom skladištenja, a stepen smanjenja zavisi od uslova skladištenja, poput nivoa kiseonika, temperature i svetlosti. Poredeći malinu, kupinu i borovnicu, sadržaj vitamina C je najviši u malini (Atala i sar, 2009) (tabela 2.4).

Vitamin E (tokoferoli) je esencijalni liposolubilni mikronutrijent. Ima značajnu biološku i antioksidativnu aktivnost.

Antioksidativno delovanje tokoferola je vrlo kompleksno. α -Tokoferol hvata lipidne peroksil radikale (LOO[•]) i druge slobodne radikale koji nastaju tokom lipidne peroksidacije, prelazeći u tokoferil radikal, i na taj način usporava ili prekida ovu lančanu reakciju. Tokoferil radikal se sinergističkim delovanjem u reakciji sa vitaminom C ili ubihinonom (redukovani oblik koenzima-Q) prevodi u neradikalski oblik - α -tokoferol (regeneracija vitamin E).

Poredeći malinu, kupinu i borovnicu, sadržaj vitamina E je najviši u kupini (tabela 2.7) (Gogoša i sar, 2014).

2.2.2.2. Minerali

Minerali su zajedno sa vitaminima uključeni u metaboličke procese, formiranje ćelijskih membrana i krvnih elemenata, rad srčanog mišića i razvoj mozga, a značajni su i za

povećanje imuniteta. Bobičasto voće je bogato pored vitamina i mineralima (npr. 100 g maline, kupine ili borovnice, moglo bi da obezbedi više od 50% preporučenog dijetetskog unosa za mangan (*RDA-Recommended Dietary Allowance*) (Skrovankova i sar, 2015). Minerali u organizmu imaju izuzetno značajnu ulogu. Kalijum, hlor i natrijum održavaju homeostazu, dok su natrijum, kalijum, kalcijum i magnezijum ključni za prenos nervnih impulsa i regulaciju krvnog pritiska. Fosfor i magnezijum učestvuju u metabolizmu glukoze, aminokiselina i vitamina. Malina, kupina i borovnica imaju visok sadržaj kalijuma, kalcijuma, magnezijuma i fosfora (tabela 2.8).

Gogoša i saradnici (2014) su ustanovili, takođe, opadajući trend sadržaja analiziranih elemenata u kupini, malini i borovnici: Ca > Mg > Fe > Zn i potvrdili da se ovo voće može koristiti kao alternativni izvor minerala u svakodnevnoj ishrani.

Tabela 2.8. Prosečan sadržaj minerala u plodu kupine, maline i borovnice na 100 g ploda
(*USDA National Nutrient Database, www.ars.usda.gov*)

Sastojak	Jedinica	Kupina	Malina	Borovnica
Natrijum	Mg	1	1	1
Kalijum	Mg	162	151	77
Kalcijum	Mg	29	25	6
Fosfor	Mg	22	29	12
Magnezijum	Mg	20	22	6
Gvožđe	Mg	0,62	0,69	0,28
Cink	Mg	0,53	0,42	0,16

2.2.2.3. Esencijalne masne kiseline

Polinezasićene masne kiseline sa 18, 20 i 22 ugljenikova atoma i sa dve do šest dvostrukih veza pripadaju grupi esencijalnih masnih kiselina. Njih organizam ne može da sintetise i moraju se unositi isključivo putem hrane (Arvindakshan i sar, 2003). One su osnovni sastojci fosfolipida membrana, utiču na fluidnost ćelijske membrane, modulišu aktivnost enzima, nosača i membranskih receptora, učestvuju u proizvodnji eikosanoida (prostaglandina, prostaciklina, tromboksana, leukotriena), signalnoj transdukciji i aktiviranju faktora nuklearne transkripcije (Zamaria, 2004). Najvažniji predstavnici ove grupe su omega-6- i

omega-3-masne kiseline. Omega-3-masne kiseline utiču na krvni pritisak i smanjenje rizika od arteroskleroze.

Prosečni sadržaj zasićenih, mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina u plodu kupine, maline i borovnice prikazan je u tabeli 2.9.

Tabela 2.9. Prosečan sadržaj masnih kiselina u plodu kupine, maline i borovnice na 100 g ploda (*USDA National Nutrient Database, www.ars.usda.gov*)

Sastojak	Jedinica	Kupina	Malina	Borovnica
Zasićene masne kiseline	Mg	14	20	28
Mononezasićene masne kiseline	Mg	47	60	47
Polinezasićene masne kiseline	Mg	280	38	146

Kafkas i saradnici (2007) su utvrdili da je u svim ispitivanim sortama maline (Heritage, Meeker, Tulameen, Willamette, Canby, Hollanda Boduru i Newburgh) najzastupljenija linoleinska kiselina, C18:2n-6, (omega-6) sa 37,73–55,42% udela i α -linoleinska kiselina, C18:3n-3, (omega-3) sa udelom od 21,64–28,28% u ukupnim masnim kiselinama.

Seme bobičastog voća predstavlja značajan izvor esencijalnih masnih kiselina, pa tako ulje dobijeno ceđenjem semena bobica takođe predstavlja veoma važan proizvod sa nutritivnog aspekta. Van Hoed i saradnici (2009) ustanovili su da su ulja dobijena iz semena maline, kupine, borovnice, kivija i jagode bogata polinezasićenim masnim kiselinama. Sadržaj linoleinske kiseline je najviši sledećim redosledom: ulje semena kupine, ulje semena borovnice i ulje semena maline. Ulje semenki maline sadrži 97,8% nezasićenih masnih kiselina od ukupnih masti, što ukazuje da je odličan izvor esencijalnih masnih kiselina (Radočaj i sar, 2014).

2.2.2.4. Prehrambena vlakna

Prehrambena (dijetetska) vlakna se na osnovu hemijske strukture i sposobnosti pojedinih frakcija da se ekstrahuju u definisanim uslovima (pH i temperatura primenjenog rastvarača) dele na: nerastvorljiva (celuloze, hemiceluloze, lignini) i rastvorljiva (pektini, β -glukani, gume i sluzi). Nerastvorljiva vlakna utiču na peristaltiku creva i nalaze se uglavnom u mekinjama, integralnim žitaricama i kožici voća i, za razliku od rastvorljivih, manje su zastupljena u samom voću i povrću. Nerastvorljiva vlakna imaju pozitivan uticaj na peristal-

tiku debelog creva i bolesti vezane za njega. Rastvorljiva vlakna smanjuju rizik od srčanih bolesti, snižavaju nivo holesterola, triglicerida i glukoze u krvi (Górecka i sar, 2010), odnosno usporavaju resorpciju glukoze iz tankog creva, te im se zbog toga pripisuje zaštitno delovanje na kardiovaskularne bolesti i dijabetes (Gaćina, 2014).

Poslednjih godina naučno je dokazano da prehrambena vlakna iz voća, zahvaljujući većem sadržaju rastvorljivih vlakana, nižem sadržaju fitinske kiseline, većem kapacitetu vezivanja vode i ulja, boljoj fermentabilnosti u digestivnom traktu i nižoj kalorijskoj vrednosti, imaju bolja nutritivna svojstva u odnosu na vlakna žitarica (Chau i sar, 2003).

Saura-Calixto (1998), analizirajući interakcijske veze polisaharida sa polifenolnim jedinjenjima u tropu grožđa, uvodi koncept prehrambenih vlakana sa antioksidativnim osobinama. Prehrambena vlakna iz voća najčešće su povezana sa taninima (Arranz i sar, 2009). Međutim, iako se zna da je jedan deo polifenola bobičastog voća povezan estarskim vezama sa polisaharidima ćelijskog zida, koncept prehrambenih vlakana sa antioksidativnim osobinama još uvek je neispitan, ili nedovoljno ispitan na prehrambenim vlaknima većine vrsta ovog voća iz porodica Rosaceae i Ericaceae.

Glavni polimeri dijetetskih vlakana zastupljeni u voću i povrću su: celuloza, pektinske materije, ksiloglukani, drugi ne-celulozni polisaharidi, lignini, kutin i voskovi (Gyurova i sar, 2015). I bobičasto voće je bogato dijetetskim vlaknima (celuloza, hemiceluloza, pektin), (Skrovankova i sar, 2015). Prosečni sadržaj prehrambenih vlakana u kupini je 5,3 g/100 g ploda, malini 6,5 g/100 g ploda, a u borovnici 2,4 g/100 g ploda (*USDA National Nutrient Database*, www.ars.usda.gov). Preporučeni dnevni unos vlakana za odraslo stanovništvo iznosi od 20 do 25 g (Gyurova i sar, 2015).

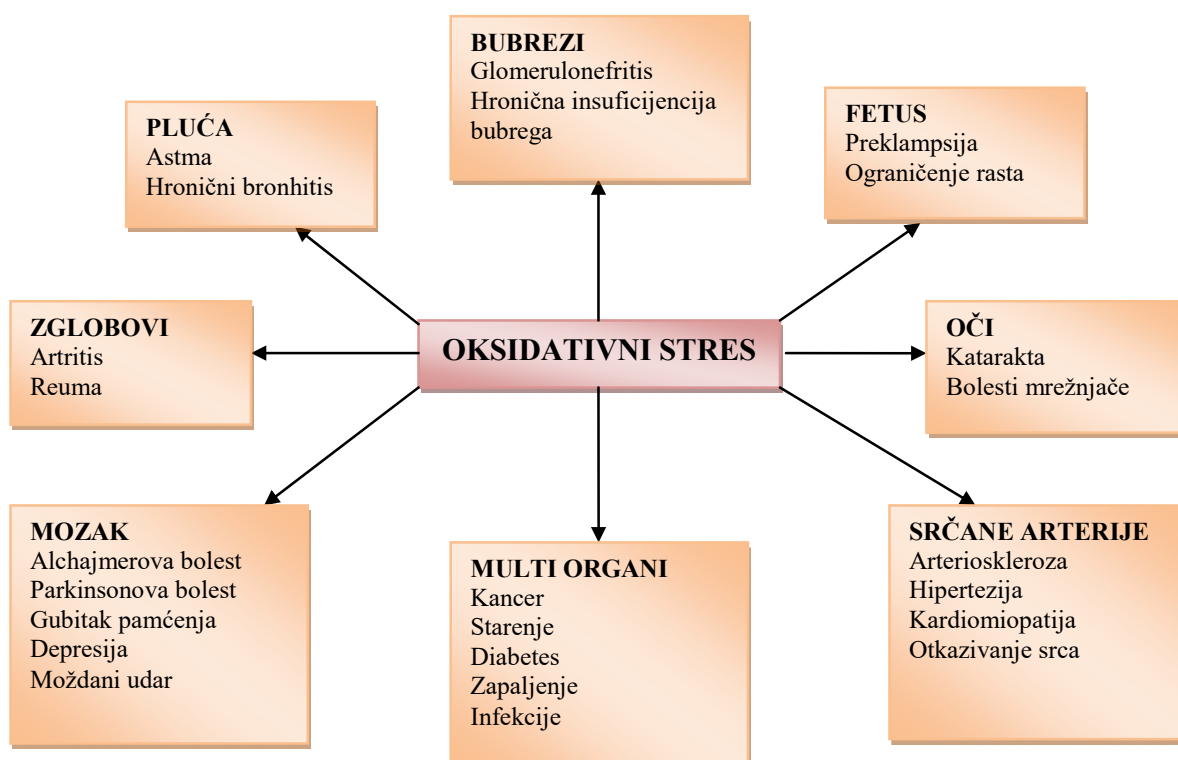
2.3. BIOLOŠKA AKTIVNOST BOBIČASTOG VOĆA

Poznato je da reaktivne vrste kiseonika (superoksid anjon, hidroksil, hidroperoksil, peroksil, alkoksil, karbonatni, ugljendioksidni radikali, vodonik peroksid, hipobromna i hipohlorna kiselina, ozon, singletni kiseonik, organski peroksidi, peroksinitrit, peroksinitritna kiselina) - ROS (od eng. *Reactive Oxygen Species*), kao i druge prooksidativne vrste (npr. reaktivne vrste hlora (RCS - od eng. *Reactive Chlorine Species*) i azota (RNS - od eng. *Reactive Nitrogen Species*) imaju dvostruku ulogu u biološkim sistemima, odnosno oni istovremeno mogu biti korisni i štetni za ljudski organizam (Valko i sar, 2006; Buonocore i sar, 2010).

Pri niskim ili umerenim koncentracijama neki od njih ostvaruju svoju fiziološku ulogu, kao što je odbrana od infekcija agenasa u procesu fagocitoze, proizvodnja energije, rast ćelija, funkcije u unutarćelijskoj komunikaciji (Stajčić, 2012).

Pod normalnim uslovima nastajanje prooksidativnih vrsta je u ravnoteži sa antioksidativnom zaštitom organizma. Međutim, pod uticajem različitih endogenih i/ili egzogenih faktora koji deluju stresno, ova ravnoteža može da se naruši, odnosno može da dođe do povećane produkcije prooksidanata i/ili smanjenja antioksidativne zaštite organizma. Ovakvo stanje, poznato pod nazivom *oksidativni stres*, može proizvesti oštećenja primarnih biomolekula, poput lipida, proteina, DNK, što dovodi do brojnih hroničnih oboljenja, kao što su ateroskleroza, šlog, kancer, dijabetes, astma, artritis i druge bolesti koje su povezane sa starenjem (slika 2.13) (Cai i sar, 2004).

Brojna epidemiološka ispitivanja potvrđuju teoriju da prirodni antioksidanti mogu da spreče rani razvoj bolesti uzrokovanih oksidativnim stresom (Đilas i sar, 2010). Zbog toga, konzumiranjem hrane bogate prirodnim antioksidantima (voće, povrće, prirodni sokovi, žitarice, vino, čokolada, itd) ili hrane obogaćene ovim sastojcima, može da se obezbedi željenji antioksidativni status i pomogne u prevenciji razvoja bolesti u kojima je oksidativni stres uzročnik.



Slika 2.13. Posledice oksidativnog stresa na ljudski organizam (Pham-Huy i sar, 2008)

Danas se veliki broj istraživanja usmerava u cilju ispitivanja uticaja izolovanih jedinjenja iz bobičastog voća na razna patološka stanja. Brojna ispitivanja pokazuju da fitohemikalije u bobičastom voću pokazuju širok opseg bioloških efekata, uključujući i antioksidativna, antihiperглиkemijska, antikancerogena i antimikrobna svojstva (Bobinaité i sar, 2012, Radočaj i sar, 2014). Većina ispitivanja se radi u *in vitro* modelima, koji nisu u potpunosti relevantni sa *in vivo* modelima, zbog loše apsorpcije i metabolizma fenolnih jedinjenja (Valverde i sar, 2012). Nivo ovih komponenti se pojavljuje u smanjenim koncentracijama u krvi ili u urinu, ili u izmenjenoj formi od one koja je uneta u organizam. Apsorpcija zavisi od biorasploživosti (Lima i sar., 2014), a na biorasploživost fenolnih jedinjenja utiču brojni faktori, poput razlike u strukturama ćelijskog zida, lokacija glukozida u ćelijama i vezivanje fenolnih jedinjenja unutar matrice hrane (Balasundram i sar, 2006). Međutim njihova biorasploživost nije jako visoka, zato što se slabije apsorbuju, a brzo katabolišu (Biasi i sar, 2011). Ipak, ustanovljeno je da tokom unosa hrane bogate fenolnim komponentama, mogu da se detektuju ova jedinjenja u plazmi i krvi (Lima i sar, 2014). Unos 240 g svežih jagoda ili 100 g smrznutih borovnica povećava antioksidativni kapacitet krvne plazme za 14–30%, što ukazuje da se fitohemikalije sa antioksidativnom aktivnošću apsorbuju u organizmu (Đilas i sar, 2010). Takođe, intenzitet i način metabolisanja fitohemikalija u jetri i bubrezima i stepen njihove distribucije u tkivima utiče na aktivnost fitohemikalija *in vivo*.

2.3.1. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST

Najbolju i trenutno važeću definiciju antioksidanta dali su Halliwell i Gutteridge po kojoj je „antioksidant supstanca koja, prisutna u malim koncentracijama u odnosu na supstrat koji se oksidiše, značajno odlaže ili inhibira oksidaciju supstrata“ (Tumbas, 2010). Generalno, značaj antioksidanata nesumnjivo je u tome što štite prehrambene proizvode od oksidativnih transformacija, a sa druge strane su podrška i dopuna *in vivo* postojećem antioksidativnom sistemu zaštite razvijenom kod svih aerobnih organizama.

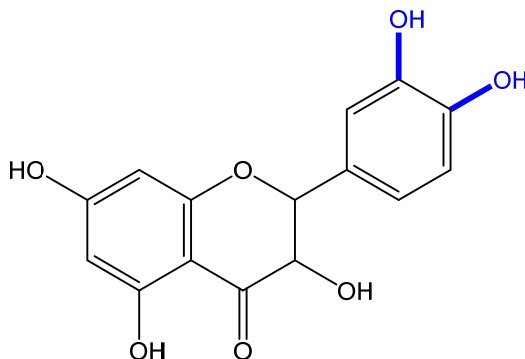
Potreba za prirodnim izvorima antioksidanata je sve veća, jer su sintetički antioksidanti, uprkos efikasnosti, pokazali neke negativne efekte po zdravlje ljudi. Antioksidanti, koji se apsorbuju iz hrane koju unosimo u organizam, igraju značajnu ulogu u sprečavanju mnogobrojnih bolesti koje su rezultat oksidativnog oštećenja (Wang i sar, 2012).

Mnoge biljke, žitarice, voće, povrće, ulja, začini i drugi biljni materijali poseduju antioksidativna svojstva, pre svega zbog visokog sadržaja fenolnih jedinjenja (Radojković i sar, 2012) i drugih prirodnih antioksidanata (vitamin C i E) i karotenoida (Manganaris i sar,

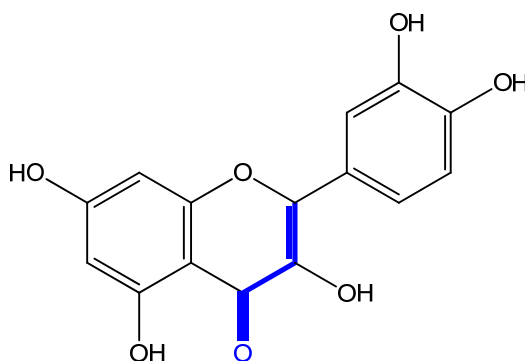
2014). Visoka antioksidativna aktivnost bobičastog voća prvenstveno se pripisuje visokom sadržaju polifenolnih jedinjenja i vitamina C (Manganaris i sar, 2014). Antioksidativna aktivnost ovih jedinjenja je rezultat njihove redoks sposobnosti, koja im omogućava da budu donori vodonikovih atoma (Kähkönen i sar, 1999) i da uklanjaju slobodne radikale. Pored toga, fenolna jedinjenja mogu da deluju kao redukujući agensi, „kvenčeri“ singletnog kiseonika, heliraju jone metala (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} i Mg^{2+}), aktiviraju antioksidativne i inhibiraju prooksidativne enzime (ksantin oksidaza, enzimi citohroma P450, NAD(P)H oksidaza i dr).

Flavonoidi, koji se mogu naći u hrani, predstavljaju ubedljivo najzastupljeniju klasu, sa učešćem od približno 2/3 svih fenolnih jedinjenja. Antioksidativno delovanje polifenolnih jedinjenja, odnosno sposobnost prekidanja slobodnoradikalskih lančanih reakcija (npr. inhibiranje ili zaustavljanje oksidacije lipida) uslovljeno je njihovim strukturnim karakteristikama (Stajčić, 2012). Na antioksidativnu aktivnost flavonoida utiče:

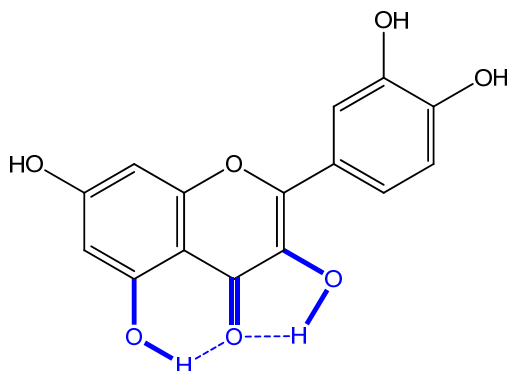
- prisustvo hidroksilnih grupa u B prstenu (naročito *o*-dihidroksilne grupe), koje imaju najbolje elektron-donorske osobine i doprinose većoj stabilnosti molekula u radikalskom obliku i učestvuju u delokalizaciji elektrona,



- 2,3-dvostruka veza piranskog prstena u konjugaciji sa keto-grupom na C₄-atomu (zbog delokalizacije),

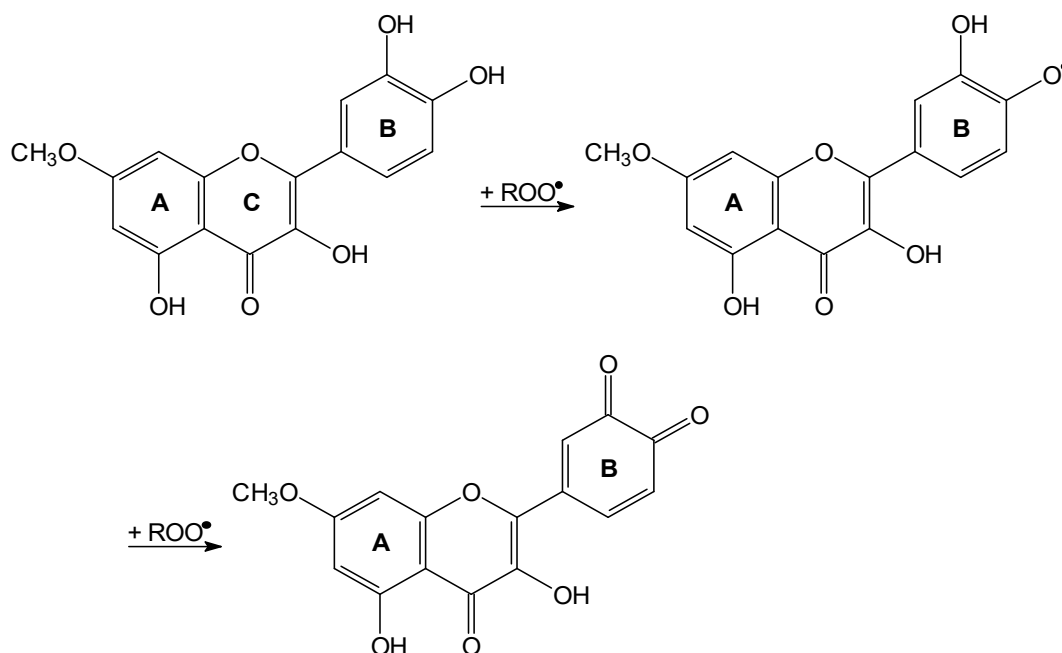


- hidroksilne grupe na C₃ i C₅ kao „hvatači“ slobodnih radikala, i njihova sposobnost stvaranja vodoničnih veza sa keto grupom (Dai i sar, 2010).



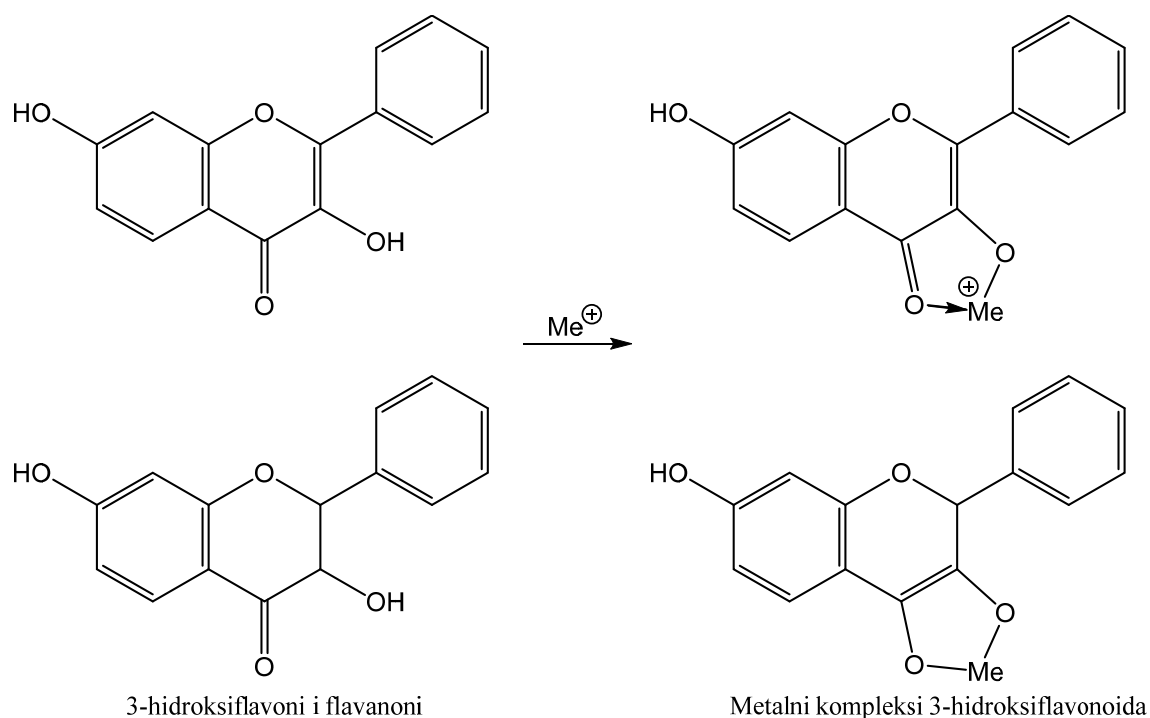
Antioksidativni mehanizmi karakteristični za flavonoide su: otpuštanje vodonika, „hvatanje“ slobodnih radikala i heliranje metala (gvožđe, bakar, i dr).

Za otpuštanje vodonika zaslužen je prisustvo dve hidroksilne grupe *orto* položaju na C₃ i C₄ B prstena (slika 2.14), dok hidroksilne grupe na C₅ u B prstenu i na C₃ u C prstenu dodatno povećavaju sposobnost otpuštanja vodonika. Na povećanu sposobnost otpuštanja vodonikovog atoma imaju uticaj i 5,8 ili 7,8 dihidroksilne grupe u A prstenu.



Slika 2.14. Mehanizam reakcije otpuštanja vodonika

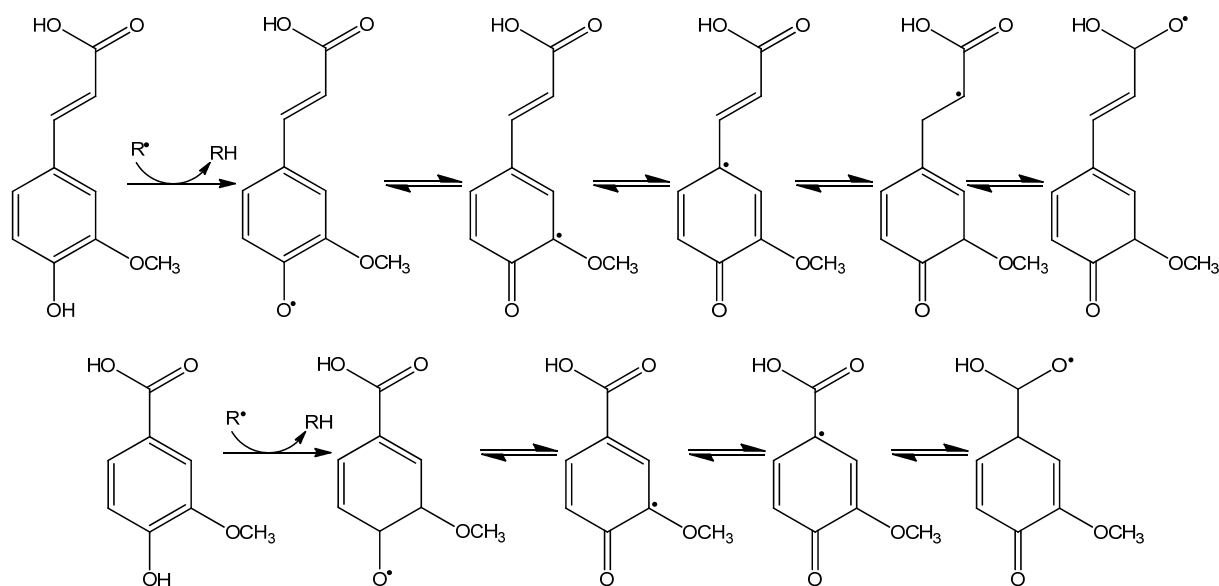
Podaci iz studije Mladěnka i saradnika (2011) ukazuju da je 6,7-dihidroksi konformacija u prstenu A najefikasniji položaj za heliranje, a zatim sledi 3-hidroksi-4-keto položaj sa 2,3-dvostrukom vezom (slika 2.15) i kateolnim B prstenom. Takođe, i 5-hidroksi-4-keto položaj je mogući položaj za heliranje, ali manje značajan u poređenju sa prethodno navedenim.



Slika 2.15. Helirajući mehanizam 3-hidroksiflavonoida

Na antioksidativnu aktivnost antocijana i flavonola utiče stepen hidroksilacije i metilacije. Antocijanidini, kojima nedostaje *o*-dihidroksi struktura u B prstenu (malvidin, pelargonidin, petunidin i peonidin) pokazuju manju aktivnost na DPPH radikale, u odnosu na cijanidin i delfinidin (Kähkönen i sar, 2003). Uopšteno, flavonoli se smatraju boljim antioksidantima od antocijana, što se može pripisati 2,3 dvostrukoj vezi u konjugaciji sa 4-keto grupom u C prstenu, koja dozvoljava lokalizaciju elektrona u B prstenu (Manganaris i sar, 2014).

Antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina zavisi od broja hidroksilnih grupa u molekulu, odnosno sa povećanjem broja hidroksilnih grupa raste i njihova antioksidativna aktivnost. Karboksilna grupa u molekulima derivata benzojeve kiseline, zbog svojih elektron akceptorskih osobina, umanjuje sposobnost odavanja atoma vodonika iz hidroksilnih grupa (Stajčić, 2012). Derivati hidroksicimetne kiseline, zbog CH=CH-COOH grupe, odnosno prisustva dvostruke veze, koja učestvuje u stabilizaciji nastalog alkoksi radikala rezonancijom, pokazuju mnogo bolju antioksidativnu aktivnost nego derivati hidroksibenzojeve kiseline (Dai i sar, 2010). Mehanizam antioksidativnog delovanja derivata benzojeve i cimetne kiseline prikazan je na slici 2.16.



Slika 2.16. Antioksidativno delovanje derivata benzoeve i cimetne kiseline

Malina je bogata fenolnim jedinjenjima, kao što su fenolne kiseline (elaginska kiselina i njeni konjugati), flavonoidi (flavan-3-oli i njihovi oligomeri, kvercetin) i antocijani (Tumbas Šaponjac i sar, 2015). Za antioksidativnu aktivnost maline najzaslužnije su, pored vitamina C, dve klase jedinjenja: antocijani i elagitanini (Beekwilder i sar, 2005; Bobinaite i sar, 2012). Sadržaj elagitanina u malini je prema Puupponen-Pimiä i saradnicima (2005) 146 mg/g ekstrakta. Udeo elaginske kiseline u ukupnim fenolnim jedinjenjima u malini i jagodi iznosi više od 50% (Häkkinen i sar, 1999). Iako na sadržaj fenolnih jedinjenja može uticati primenjena metoda ekstrakcije (Lima i sar, 2014), sadržaj ovih komponenti je neosporno visok u bobičastom voću.

Sariburun i saradnici (2010) su pokazali da antioksidativna aktivnost kupine u prvom redu zavisi od sadržaja flavonoida i antocijana, dok su elagitanini odgovorni za čak 50% antioksidativne aktivnosti kupine. Od flavonola u plodu kupine je najzastupljeniji katehin (Valverde i sar, 2012). Burdulis i saradnici (2008) navode da su antocijani u plodu kupine i borovnice od primarnog značaja. U plodu borovnice antioksidativna aktivnost se prvenstveno pripisuje antocijanima (Smith i sar, 2000), koji čine 35% u ukupnim flavonoidima i nešto manje od 30% u ukupnim fenolima (Tumbas i sar, 2010). Prema Puupponen-Pimiä i saradnicima (2005) njihov sadržaj je 336 mg/g ekstrakta, a Grace i saradnici (2014) su takođe ustanovili izuzetno visok sadržaj ovih jedinjenja, posebno u *V. uliginosum* (220,0 mg/100 g). Od antocijanidina u plodu borovnice zastupljeni su delfinidin, petunidin, malvidin (Grace i sar, 2014) i peonidin (Valverde i sar, 2012). Od flavonoida je najzastupljeniji kvercetin

(Häkkinen i sar, 2000; Tumbas i sar, 2010; Valverde i sar, 2012). Stepen zrelosti voća je u pozitivnoj korelaciji sa antioksidativnom aktivnosti (Reque i sar, 2014).

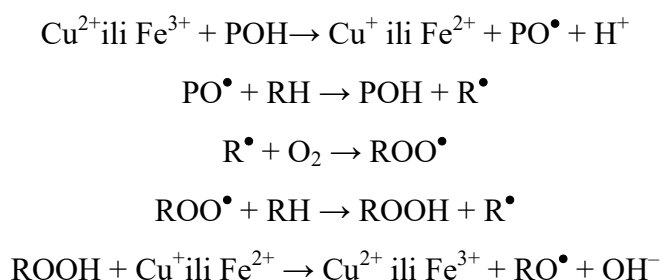
Pantelidis i saradnici (2007) su ustanovili najveću antioksidativnu aktivnost, poredeći veći broj uzoraka bobičastog voća (malina, kupina, malina*kupina, crvena ribizla, ogrozd i trešnja sorte Cornelian) za malinu, kupinu i malinu*kupinu (određivana FRAP testom). Oni su takođe ustanovili istim redosledom i visok sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja za sve sorte, što ukazuje da oni znatno utiču na antioksidativnu aktivnost ($r > 0,91$). U svim sortama (malina, kupina i malina*kupina) ustanovili su visok sadržaj antocijana. U njihovoj studiji za sorte kupine i maline*kupine ustanovljen je najviši sadržaj antocijana (104-198 mg/100g svežeg voća), što je u saglasnosti i sa rezultatima istraživanja Mitića i saradnika (2014). Mitić i saradnici (2014) su takođe ustanovili da kupina u svim rađenim testovima (FRAP, ABTS, DPPH i TRP test) pokazuje najvišu antioksidativnu aktivnost u odnosu na sve ispitivane vrste (aronija, malina, kupina, trešnja, trnjina) i da postoji jaka korelacija između antioksidativne aktivnosti i ukupnih antocijana.

Poiana i saradnici (2010) su utvrdili da u bobičastom voću između sadržaja ukupnih fenola, antocijana i vitamina C postoji pozitivna korelacija sa antioksidativnom aktivnosti ($r > 0,95$). Takođe, ustanovili su da je tokom skladištenja (deset meseci na -18°C) došlo do gubitka antioksidativne aktivnosti kod ispitivanih uzoraka maline, kupine i borovnice, što je i za očekivati, s obzirom da je došlo i do gubitka sadržaja polifenola, antocijana i vitamina C. I Nohynek i saradnici (2006) su ustanovili da, u toku skladištenja od godinu dana na -20°C , dolazi do velikog gubitka antocijana i elagitanina, posebno kod maline. Zabeleženi gubitak antioksidativne aktivnosti je bio najmanji za borovnicu (oko 23%), a najveći za malinu (oko 37%). Kårlund i saradnici (2014) povezuju smanjenje sadržaja antocijana u malini tokom skladištenja sa sortom, uslovima smrzavanja i uslovima životne sredine, ali i sa formiranjem helata između slobodnih antocijana i metalnih katjona, reakcije sa slobodnim radikalima i oslobađanja polifenol oksidaza iz matriksa maline.

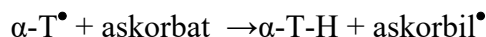
Pervin i saradnici (2013) su ustanovili da i ekstrakt lista borovnice (*V. corymbosum*) poseduje dobru antioksidativnu aktivnost na ABTS, DDPH i nitrit radikale, ali skromnu helirajuću sposobnost, u poređenju sa kontrolom (EDTA).

Navedeni rezultati nedvosmisleno ukazuju da je uticaj fenolnih jedinjenja na antioksidativnu aktivnost bobičastog voća izuzetno velik i da se u prvom redu njima pripisuje. Ipak, treba naglasiti da fenolna jedinjenja u velikim koncentracijama i pod posebnim uslovima (npr. visoka pH vrednost i visoka koncentracija metalnih jona, prisustvo molekuskog kiseonika i dr) iskazuju prooksidativnu aktivnost (Rietjens i sar, 2002). Prisustvo jona prelaznih metala

dovodi do prooksidativnog delovanja fenolnih jedinjenja (POH) na sledeći način (Dai i sar, 2010):

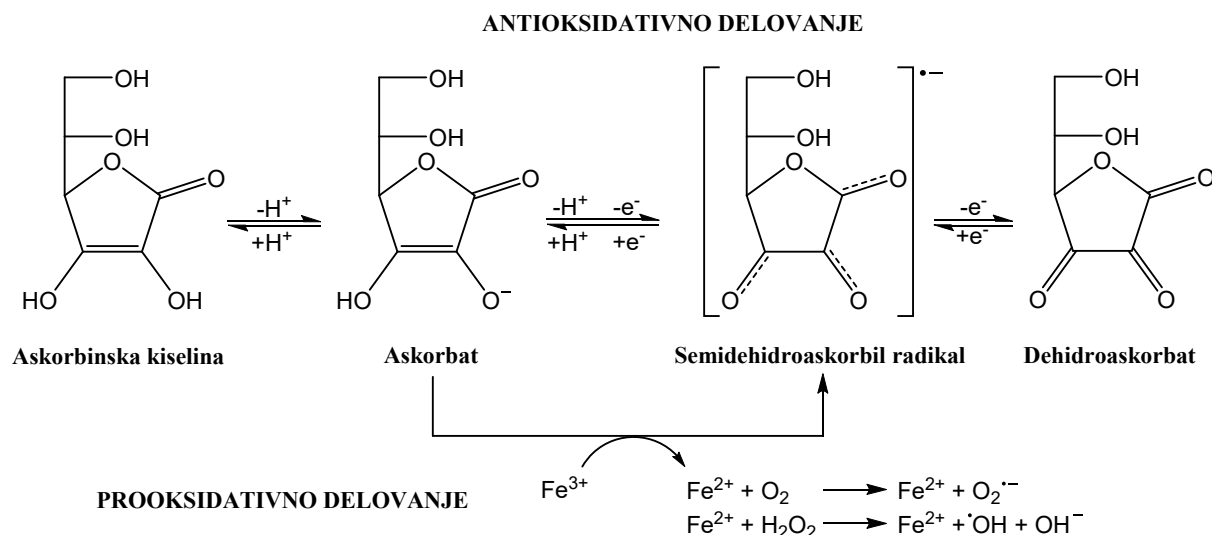


Vitamin C (askorbinska kiselina) je takođe od velikog značaja za antioksidativnu aktivnost bobičastog voća. On je najefikasniji redukujući hidrosolubilni antioksidat. U zavisnosti od reakcionih uslova ispoljava sledeće antioksidativne osobine: deluje kao hvatač peroksil, superoksid anjon, hidroksil, tiil, sulfenil i nitroksid radikala, inaktivira singletne oblike kiseonika i neutrofilne oksidante, deaktivira delovanje hipohlorne kiseline i redukuje nitrozoamine u neaktivne proizvode (Čanadanović-Brunet, 1998). Njegov značaj je i u tome što deluje i sinergistički, odnosno regeneriše α -tokoferol (α -T-H, vitamin E) iz tokoferil radikala (α -T $^\bullet$) (Buettner, 1993):



Mehanizam antioksidativnog delovanja ovog vitamina zasniva se na tome što on deluje kao donor/akceptor H-atoma i elektrona, pa je dobar "hvatač" mnogih slobodnoradikal-skih i neradikal-skih vrsta (slika 2.17).

U normalnim fiziološkim uslovima, s obzirom da su joni metala *in vivo* kompleksno vezani za proteine, vitamin C ispoljava svoju antioksidativnu aktivnost (Stajčić, 2012). Ipak, unosom izuzetno velikih doza vitamina C, kao i u uslovima povećane koncentracije metala, odnosno u procesu destrukcije tkiva i oslobađanja metala iz kompleksa sa proteinima, vitamin C može delovati prooksidativno (Tumbas, 2010). U tom slučaju vitamin C redukuje Fe^{3+} u Fe^{2+} uz nastajanje hidroksil radikala (Fentonova reakcija) (slika 2.17), koji uzrokuje oštećenja humanog tkiva.



Slika 2.17. Antioksidativno i prooksidativno delovanje vitamina C

2.3.2. ANTIHIPERGLIKEMIJSKA AKTIVNOST

Dijabetes je bolest dvadesetprvog veka, čija je prevalenca u stalnom porastu. Smatra se da će broj dijabetičara narasti daleko iznad 300 miliona do 2025. godine (Obok i sar, 2012). Iako je dijabetes smatran kao bolest odraslih, veliki problem je što se sa ovom bolešću u skorije vreme suočavaju sve više i deca. Način života, prvenstveno ishrana, u znatnoj meri mogu da utiču na smanjenje rizika od nastanka dijabetesa. Ishrana bogata fitonutrijentima, kao što su borovnice i drugo bobičasto voće, može smanjiti rizik od mnogih vrsta hroničnih bolesti (Wang i sar, 2012), pa i dijabetesa (slika 2.18).

Slika 2.18. Ishrana bogata fitonutrijentima (<http://diets-doctor.com>)

U praksi se razlikuju četiri vrste dijabetesa (Teofilović, 2017):

- dijabetes tip I (uzrokovan destrukcijom β -ćelija pankreasa i obično potpunim deficitom insulina);
- dijabetes tip II (uzrokovan smanjenom sekrecijom insulina i udružen sa rezistencijom na insulin);
- gestacijski dijabetes (javlja se u trudnoći, najčešće se sam i povlači);
- sekundarni dijabetes (može biti uzrokovan dugotrajnom upotrebom lekova ili oštećenjem funkcije β -ćelija pankreasa).

Hiperglikemija je stanje abnormalnog rasta nivoa glukoze u plazmi, a dijabetes tipa II je rezultat insulinske neosetljivosti (Adefegha, 2010). Zbog velike količine glukoze u krvi, prevazilazi se kapacitet tubula za resorpciju glukoze, dolazi do pojave glukozurije i poliurije, a time i do dehidracije, žeđi i povećanog unosa tečnosti (Teofilović, 2017). U varenje ugljenih hidrata su uključeni enzimi α -amilaza i α -glukozidaza. α -Amilaza je uključena u razgradnju dugih lanaca ugljenih hidrata, a α -glukozidaza razlaže skrob i disaharide do glukoze (Nair i sar, 2013).

U šećernoj bolesti hiperglikemija nastaje zbog tri razloga (Kokić, 2009):

- smanjenja lučenja insulina iz β -ćelija pankreasa;
- smanjenja iskorišćenja glukoze;
- porasta proizvodnje glukoze u jetri (pojačana glikogenoliza i glukoneogeneza).

Produžena hiperglikemija dovodi do povećane proizvodnje reaktivnih vrsta kiseonika i izmene endogenih antioksidanata (Adefegha, 2010).

Rastući broj dijabetičara, kao i negativne nuspojave sintetskih lekova koji se koriste u lečenju ove bolesti, doveli su do povećanja istraživanja alternativnih lekova, koji su relativno jeftini i sa minimalnim sporednim efektom (Oboh i sar, 2012). Lekovi, kao što je akarboza, usporavaju rast nivoa glukoze u krvi posle jela inhibicijom enzima α -amilaze i α -glukozidaze, koji su odgovorni za digestiju složenih ugljenih hidrata (Dubois, 2014). Novije studije imaju ideju za pronalaskom novih inhibitora α -amilaze i α -glukozidaze iz prirodnih izvora, kao što su biljke, u cilju minimiziranja efekata toksičnosti i neželjenih inhibitora koji se trenutno koriste za kontrolu hiperglikemije (Nair i sar, 2013).

Terapeutski pristup u lečenju dijabetesa je smanjenje hiperglikemije nakon obroka (Wan i sar, 2012), a najvažniji pristup pri ovom lečenju je da se spreči apsorpcija glukoze inhibicijom α -glukozidaze (Liu i sar, 2014). Inhibitori enzima (α -amilaze i α -glukozidaze) usporavaju varenje ugljenih hidrata, odnosno produžavaju ukupno vreme varenja, što izaziva

smanjenje stope apsorpcije glukoze i posledično smanjuju porast glukoze u plazmi posle jela (Obloh i sar, 2012). Inhibicija aktivnosti α -glukozidaze polifenolima, dobijenih iz bobičastog voća, nudi potencijal za dijabetičare tipa II da kontrolišu glikemiju preko dijetetskih sredstava (Boath i sar, 2012).

Antihiperglikemijsko dejstvo ekstrakata bobičastog voća i njihovih sporednih proizvoda može se pripisati prvenstveno prisustvu fenolnih jedinjenja. Ekstrakti bobica, koji su bogati polifenolnim jedinjenjima imaju mogućnost inhibicije ovih enzima *in vitro*. Polifenoli mogu da stupe u interakciju sa proteinima i inhibiraju aktivnost enzima, uključujući i dejstvo α -amilaze i α -glukozidaze (Grussu i sar, 2011; Gironés-Vilaplana i sar, 2014).

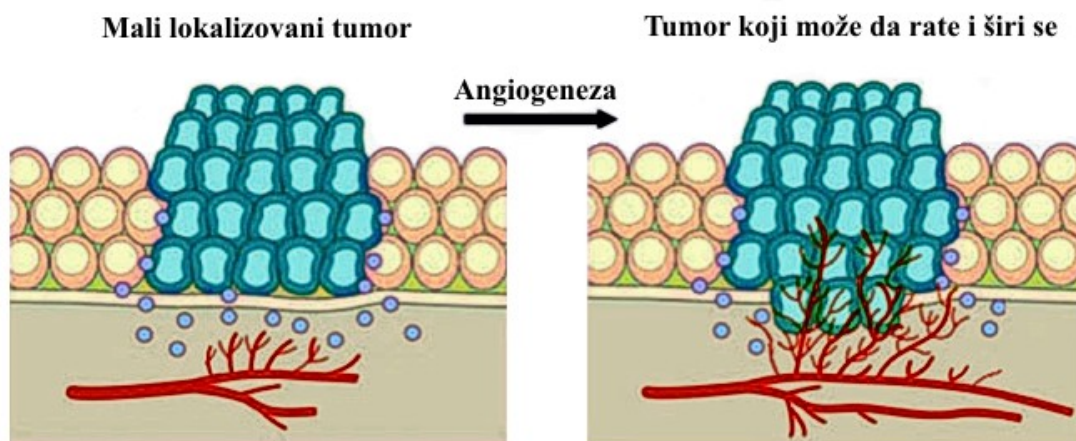
Zhang i saradnici (2010) su ustanovili da su četiri fenolne komponente maline, elaginska kiselina, cijanidin-diglukozid, perlagonidin-3-rutinozid i katehin aktivni inhibitori α -glukozidaze. Inhibicija α -glukozidaze ekstraktima bobica je u vezi sa sadržajem antocijana, pa su zbog toga fenolne fitohemikalije mogući prirodni izvor inhibitora α -glukozidaze (Wang i sar, 2012). Boath i saradnici (2012) su dokazali da ekstrakti crne ribizle i oskоруše, koji se razlikuju po sastavu polifenola, efikasno inhibiraju α -glukozidazu, sa $EC_{50}^{A_{HgA}}$ od 20, odnosno 30 μ g GAE/ml, koje su niže od $EC_{50}^{A_{HgA}}$ vrednosti za akarbozu, hlorogensku kiselinu i cijanidin-3-O-glukozid (40 μ g/ml, 300 μ g/ml i 205 μ g/ml, redom). Od polifenola, u ekstraktu crne ribizle dominantni su bili antocijani (~70% od ukupnih polifenola), ali je takođe sadržao i primetne količine flavonola i derivata cimetine kiseline, dok je ekstrakt oskоруše bio bogat derivatima hidroksicimetine kiseline, posebno hlorogenskom kiselinom (~63% od ukupnih polifenola) i imao nizak sadržaj antocijana.

Wan i saradnici (2012) su, poredeći ekstrakt cveta borovnice (čist izolat) i klinički inhibitor α -glukozidaze, akarbozu, ustanovili da flavonol glukozidi i fenilpropanoid supstituisani katehini pokazuju znatno izraženiju inhibiciju aktivnosti α -glukozidaze (IC_{50} vrednosti su u opsegu od 28,89 – 88,66 μ M) u poređenju sa akarbozom ($IC_{50} = 200 \mu$ M).

Test inhibicije α -glukozidaze je pokazao da borovnice i kupine mogu inhibirati najmanje 50% aktivnosti α -glukozidaze pod primenjenim eksperimentalnim uslovima i unutar 60 minuta (Dubois, 2014). Istraživanje je pokazalo da ekstrakti sa većim sadržajem fenolnih jedinjenja iskazuju jaču inhibitornu aktivnost.

2.3.3. ANTIPROLIFERATIVNA AKTIVNOST

Kancer (rak, tumor) je bolest sa relativno visokom stopom mortaliteta. Tumori mogu biti maligni i benigni. Maligni metastaziraju i šire se u okolinu, infiltrirajući se u okolna tkiva, dok benigni rastu ekspanzivno ne dajući metastaze (slika 2.19).



Slika 2.19. Širenje tumora (<http://antioksidans.com>)

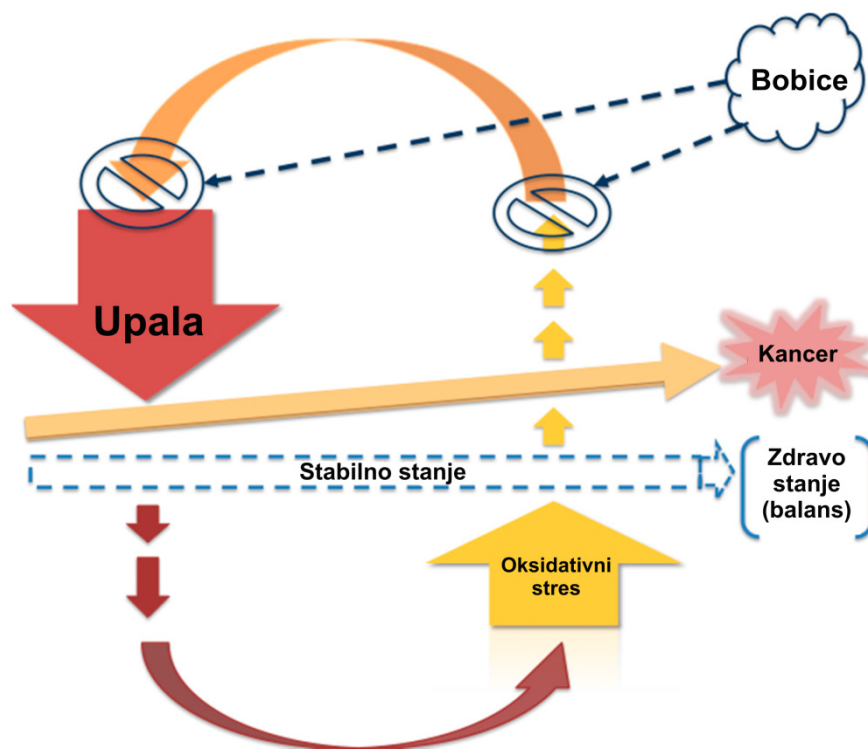
Metastaza kancera je kompleksan proces širenje ćelija tumora iz primarne neoplazme ka udaljenim mestima, gde se formiraju sekundarni tumori (Weng i sar, 2012). Sekundarni (metastazirani) tumori, su izuzetno opasni.

Oksidativna oštećenja se smatraju glavnim faktorom koji dovodi do kancerogeneze. Kancerogeneza je višestepeni proces i sastoji se od: inicijacije, promocije, progresije, invazije i metastaze. Inicijacija tumora započinje oštećenjem DNK, u ćeliji ili populaciji ćelija, izazvanim dejstvom kancerogena (npr. zračenje, dim cigarete, infekcija, inflamacija, različite hemijske supstance, oksidativni stres, ishrana). Ukoliko oštećena DNK izbegne popravku (reparaciju), može doći do genske mutacije. Dobijena somatska mutacija u oštećenoj ćeliji može biti stvorena u toku mitoze, koja prouzrokuje nastanak klona mutiranih ćelija. Promocija tumora je selektivna klonska ekspanzija početnih ćelija – stvaranje aktivne proliferativne višćelijske premaligne ćelijske populacije. To je dugoročni proces koji može biti, u zavisnosti od prisutnih promotora, prekinut ili povratan. Tokom progresije, premaligne ćelije se razvijaju u tumore kroz proces klonske ekspanzije. U kasnijim fazama razvoja tumora, invazije i nastanka metastaze, ćelije tumora se odvajaju od primarne tumorske mase, migriraju kroz okolna tkiva prema krvnim ili limfnim sudovima, i stvaraju sekundarne lezije. Metastaza je glavni uzrok smrtnosti kancera (Dai i sar, 2010).

Operacija, hemoterapija i zračenje su načini koje konvencionalna medicina primenjuje u lečenju ove bolesti. S druge strane, hemoprevencija predstavlja značajnu strategiju u smanjenju stope progresije i formiranja kancera (Weng i sar, 2012). Priroda predstavlja izuzetno važan izvor hemopreventivnih jedinjenja u borbi sa kancerom (de Molina i sar, 2015). Rizik od oboljevanja od kancera je dva puta veći kod osoba sa niskim unosom voća i povrća, nego kod osoba sa visokim unosom (Liu, 2004). Block i saradnici (1992) su razmatrajući oko 200

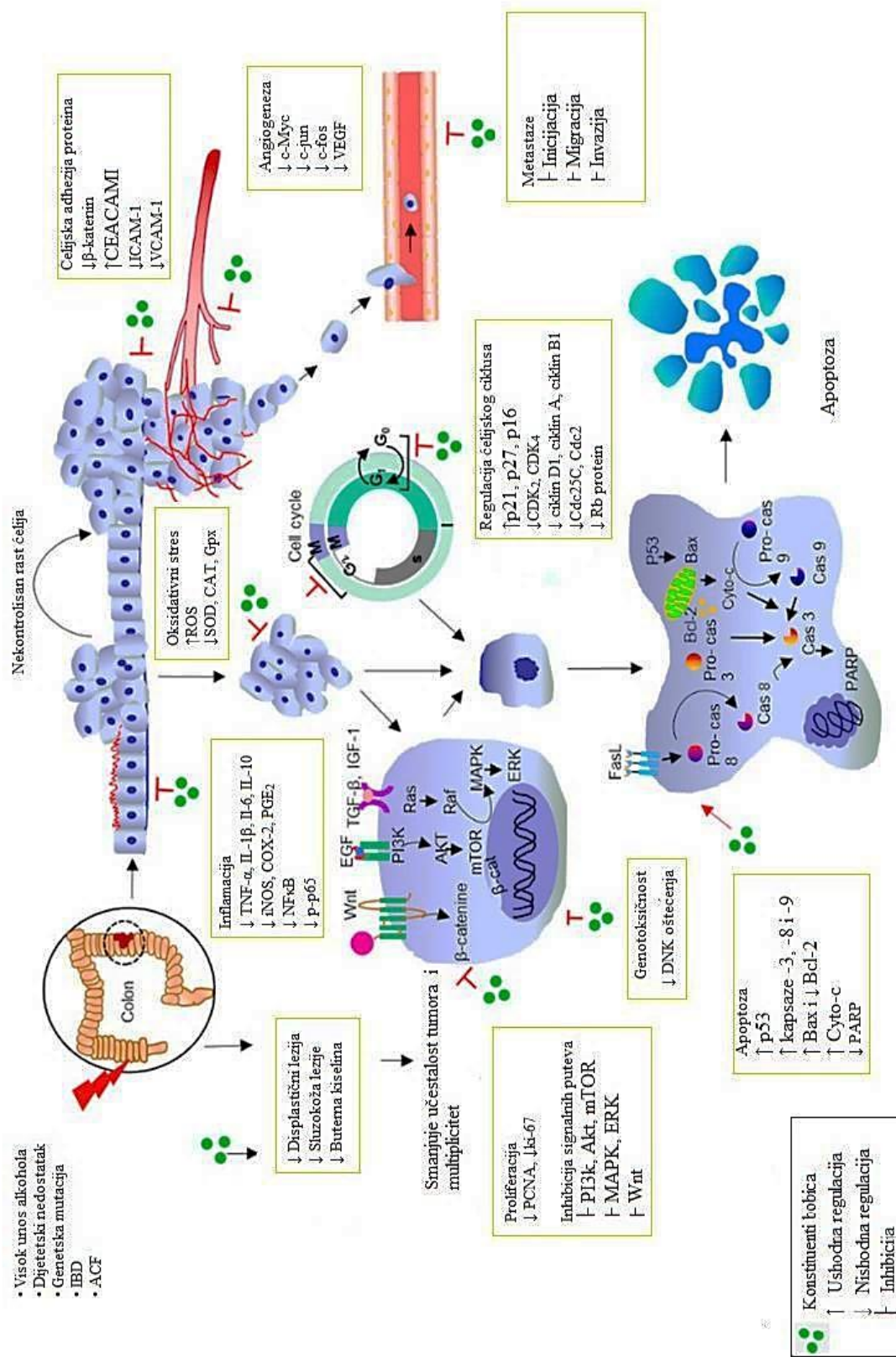
studija ustanovili da voće ima značajan zaštitni efekat kod kancera jednjaka, usne duplje i larinksa (potvrđeno u 28 od 29 studija), kod kancera pankreasa i želuca (potvrđeno u 26 od 30 studija), debelog creva i bešike (potvrđeno u 23 od 38 studija), cerviksa, jajnika i endometrijuma (potvrđeno u 11 od 13 studija). Danas se čak preporučuje preventivno konzumiranje bobica (bobičastog voća) radi sprečavanja pojave malignih ćelija. Ipak, treba napomenuti da one nisu lek u suzbijanju malignih oboljenja i ne mogu da mu budu zamena, ali su dobra zaštita od njih (Diaconeasa i sar, 2015).

Dosadašnje studije su potvrdile da postoje blagotvorni efekti bobica ili njihovih konstituenata, uključujući slabljenje upala, inhibiciju angiogeneze, zaštitu od oštećenja DNK, kao i efekat na apoptozu i proliferaciju malignih ćelija (slika 2.20) (Kristo i sar, 2016).



Slika 2.20. Prikaz doprinosa oksidativnog stresa i inflamacije u deregulaciji/poremećaju homeostatske ravnoteže u ćeliji, što dovodi do raka. Bobice putem svojih mnogobrojnih sastojaka (sinergističko delovanje) mogu prekinuti ovaj ciklus (Kristo i sar, 2016)

Hemoprotektivni potencijal bobičastog voća može biti objašnjen, bar delimično, njihovom sposobnošću u borbi protiv oksidativnog stresa i upala (Aqil i sar, 2015). Nedavni istraživački radovi pokazuju da je skoro 75% svih slučajeva raka debelog creva u direktnoj vezi sa načinom ishrane (Jaganathan i sar, 2014). Na slici 2.21 je ilustrativno prikazano hemoprotektivno dejstvo plodova bobica u borbi sa rakom debelog creva.



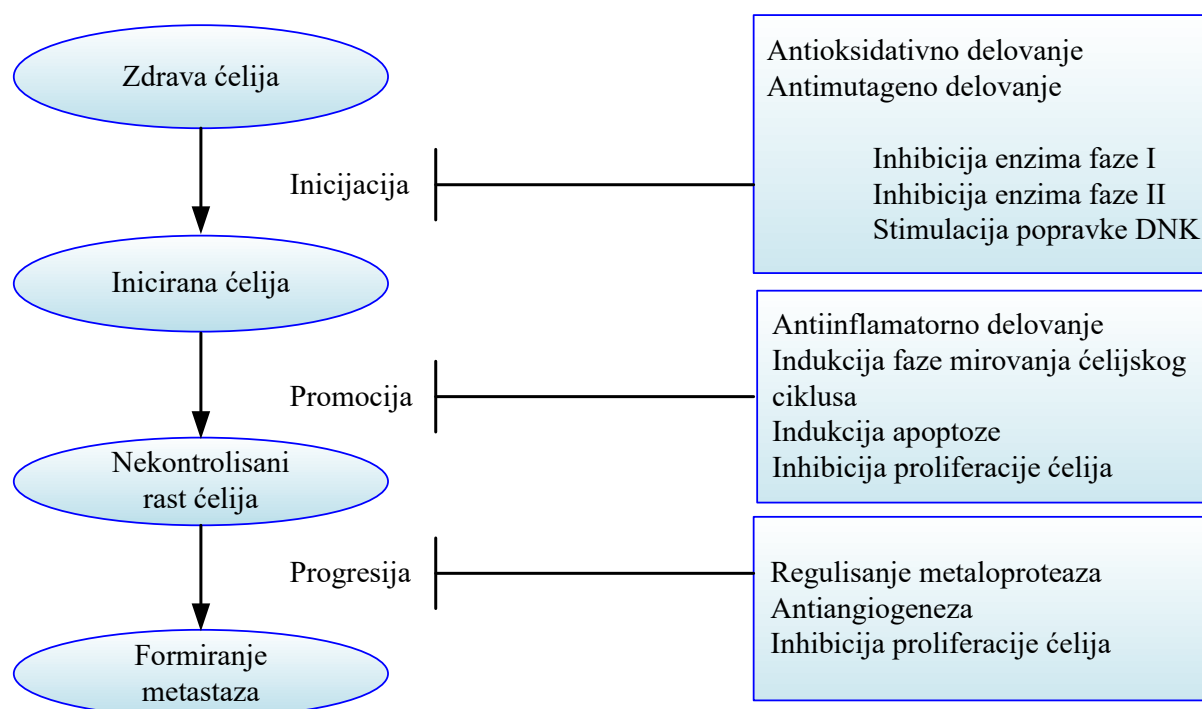
Slika 2.21. Hemoprotektivno dejstvo bobica protiv raka debelog creva (Afrin i sar, 2016)

Maldonado-Celis i saradnici (2014) su ispitivali citotoksičnu i antiproliferativnu aktivnost vodenog ekstrakta *Vaccinium meridionale* na dve ćelijske linije raka debelog creva: primarni tumor SW480 i metastatski tumor SW620, i ustanovili njegovu aktivnost na vitalnost ćelija smanjenjem ili suzbijanjem njihovog rasta. Antiproliferativni efekat je ustanovljen progresivnim smanjenjem rasta ćelija SW480 i SW620, pri različitim koncentracijama vodenog ekstrakta (50–200 mg/ml) i postizanja inhibicije rasta (65,8 i 71 %) nakon 72 h tretmana. Iako svi mehanizmi nisu razjašnjeni, autori pripisuju ovo delovanje antocijanima, ili njihovom sinergističkom delovanju sa drugim komponentama, pre svega fenolnim kiselinama, koje su izuzetno zastupljene.

Diaconeasa i saradnici (2015) su ustanovili da frakcije bogate antocijanima dobijene iz komercijalnih sokova borovnice i crne ribizle inhibiraju proliferaciju HeLa, A2780 i B16F10 tumorskih ćelija.

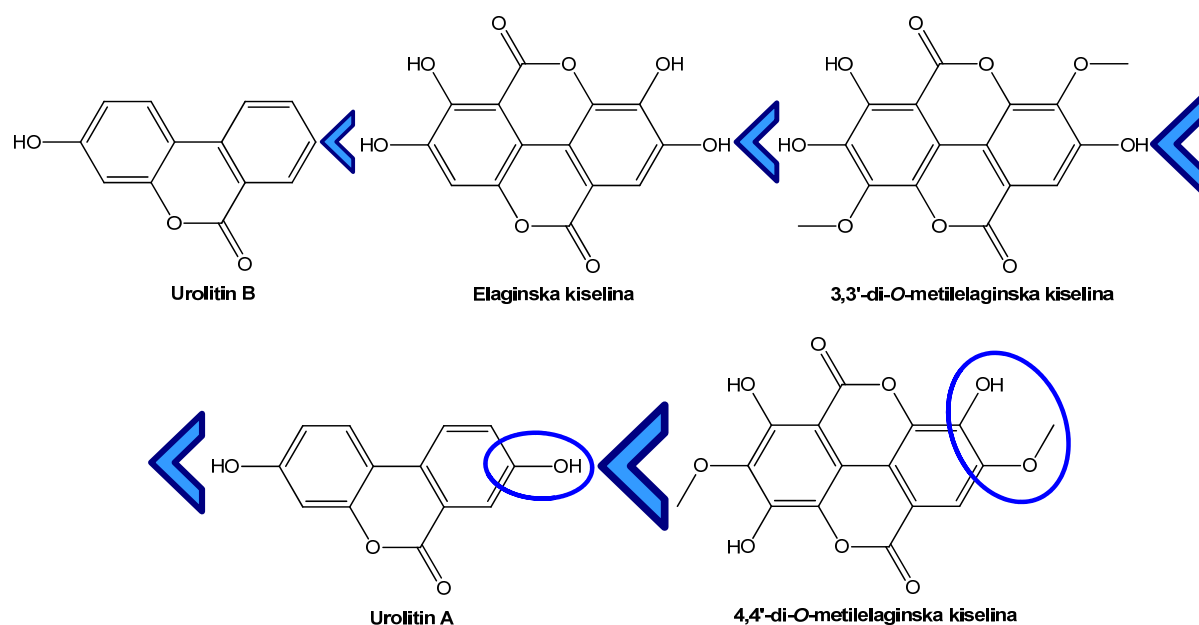
Ekstrakti grožđa, borovnice i aronije, bogati antocijanima, su pokazali inhibitorne efekte na rast ćelija raka debelog creva HT-29 (Zhao i sar, 2004). Ekstrakt aronije je pokazao najjača inhibitorna svojstva. Delovanjem 25 µg/ml ekstrakta, nakon 48 h približno 50% ćelija je bilo ihibirano.

Dai i saradnici (2010) su predložili potencijalne antikancer mehanizame delovanja biljnih polifenola tokom razvoja kancera, koji su prikazani na slici 2.22.



Slika 2.22. Potencijalni antikancer mehanizami delovanja biljnih polifenola tokom razvoja kancera (Dai i sar, 2010)

Bobičasto voće je bogato elaginskom kiselinom, posebno malina. Wang i saradnici (2012a) su ispitali uticaj elaginske kiseline na angionezu i VEGFR-2 signalni put kod raka dojke. Oni su ustanovili da elaginska kiselina značajno inhibiše niz angiogeneznih procesa indukovanih VEGF, uključujući proliferaciju, migraciju i formiranje „cevi” endotelnih ćelija. De Molina i saradnici (2015) su ispitivali antiproliferativne osobine elaginske kiseline i njenih derivata na ćelije raka debelog creva. Ustanovili su sledeći redosled aktivnosti, od najniže do najviše i ovaj redosled su pripisali strukturnim razlikama:



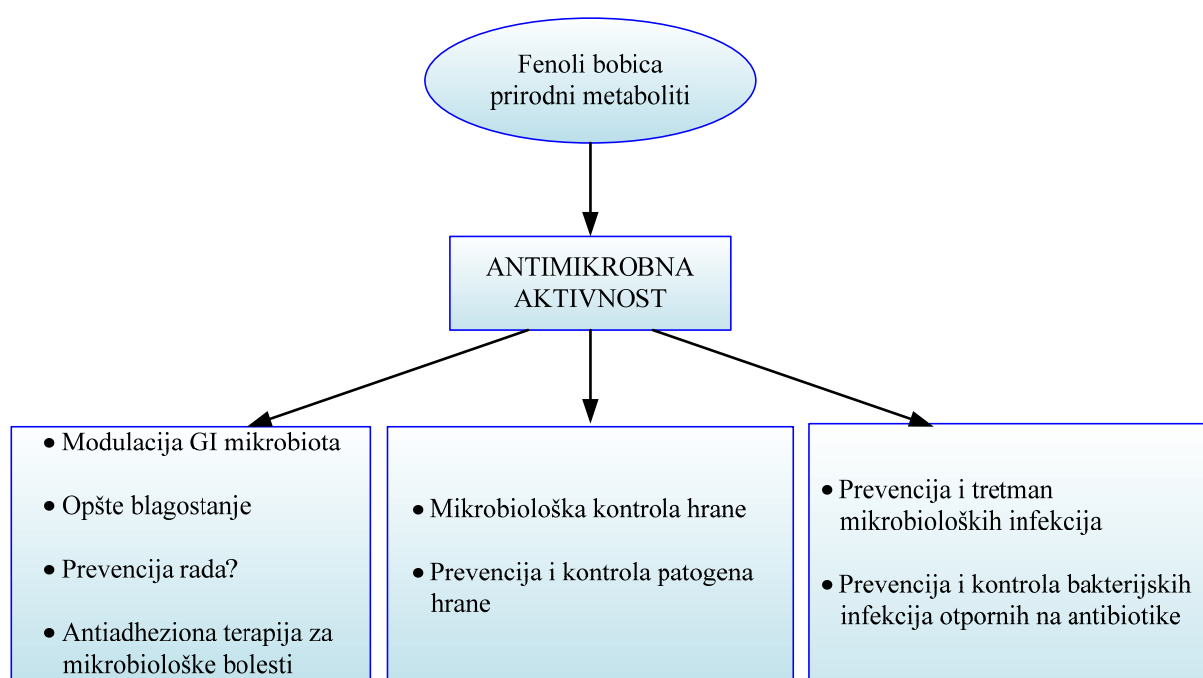
Ding i saradnici (2006) su ustanovili da cijanidin-3-glukozid ispoljava hemopreventivne i hemoterapeutske aktivnosti kod eksperimentalnih životinja, verovatno putem ometanja signala molekularne transdukcije AP-1, MAPK, NF- κ B, COX-2 i TNF α , preko svog ROS „skevindžer” kapaciteta.

Postoji velika razlika između *in vivo* i *in vitro* sistema, jer *in vitro* sistemi ne uzimaju u obzir složenu homeostatičku situaciju koja se javlja u *in vivo* sistemima (de Moura i sar, 2013). Zbog toga ispitivanja u budućnosti treba više proširiti na *in vivo* modele i na taj način posvetiti pažnju ovim jedinjenjima u medicinske svrhe.

2.3.4. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST

Antimikrobna aktivnost biljaka zavisi od sorte, uslova rasta i skladištenja sirovina, kao i od primenjene metode za izolovanje aktivnih supstanci (Viskelis i sar, 2009). Glavne klase jedinjenja sa antimikrobnom aktivnosti izolovane iz biljaka su: fenolna jedinjenja (prosti

fenoli, fenolne kiseline, hinoni, flavonoidi, flavononi, flavonoli, tanini, kumarini), terpenoidi i esencijalna ulja, alkaloidi, lektini i polipeptidi, poliacetileni (Cowan, 1999). Lekovite biljke predstavljaju odličan izvor za dobijanje prirodnih proizvoda sa antimikrobnom aktivnosti, bez štetnih efekata. Upotreba prirodnih antimikrobnih agenasa je izuzetno važna u kontroli i lečenju ljudskih, životinjskih i biljnih bolesti mikrobiološkog porekla (Ljaljević Grbić i sar, 2008). Glavna ideja farmaceutske i prehrambene industrije je dobijanje i implementacija novih antimikrobnih prirodnih proizvoda u terapijama i ishrani. Ova ideja je, u skorije vreme, dovela do intenziviranja proučavanja polifenolnih jedinjenja, izolovanih iz bobičastog voća, kao antimikrobnih agenasa za potrebe ovih grana industrije (slika 2.23).



Slika 2.23. Efekti antimikrobne aktivnosti fenola bobica protiv ljudskih patogenih bakterija (Puupponen-Pimiä i sar, 2005b)

Generalno, fenolna jedinjenja, pri niskim pH uslovima, mogu stvarati komplekse sa proteinima na spoljnoj membrani ćelije mikroorganizama posredstvom nespecifičnih sila, kao što su vodonične veze i hidrofobni efekti, stvaranje kovalentnih veza, i promenom Na^+/H^+ antitransportnih sistema da, pri niskom osmotskom pritisku u okruženju, smanje toleranciju bakterija. Ove interakcije rezultuju smrću mikroorganizama (Shen i sar, 2014).

Bobičasto voće u nordijskim zemljama ima dugu tradiciju u lečenju mnogih bolesti, npr. brusnica za lečenje mokraćne infekcije (White i sar, 2009), a borovnica, kao lekovita biljka se koristi u lečenju dijareje i noćnog vida (Puupponen-Pimiä i sar, 2005b). Proanto-

cijanidini iz brusnice, borovnice i drugih *Vaccinium* vrsta sprečavaju vezivanje *E. coli* za epitelne ćelije urinarnog trakta (Howell i sar, 1998). Sa tim dokazom odbacila se dotadašnja tvrdnja da je borovnica lekovita zbog smanjenja pH urina, nakon konzumiranja.

Citoplazmatska membrana mikroorganizama se sastoji od dvosloja fosfolipida, sa ugrađenim proteinima, semipermeabilna je i reguliše prenos rastvorenih supstanci i metabolita. Prirodna jedinjenja deluju na bakterijsku ćeliju tako što dovode do narušavanja citoplazmatske membrane i koagulacije ćelijskog sadržaja, utiču na aktivni transport i protok elektrona u ćeliji (Burt, 2004). U inhibiciju rasta bakterija, uključeno je nekoliko mehanizama: destabilizacija i permeabilizacija ćelijske membrane, inhibicija ekstracelularnih mikrobioloških enzima i lišavanje podloge potrebne za rast mikroba (Burdulis i sar, 2008). Fenoli napadaju ćelijski zid, prodiru unutra i reaguju sa citoplazmom i ćelijskim proteinima (Puupponen-Pimiä i sar, 2005a), utičući na propustljivost membrane. Prema Cushnie-u i saradnicima (2005), antibakterijski mehanizmi delovanja različitih flavonoida su:

- Inhibicija sinteze nukleinske kiseline;
- Inhibicija funkcije citoplazmatske membrane;
- Inhibicija energetskog metabolizma.

U literature postoje brojni podaci o antimikrobnoj aktivnosti, sadržaju fenolnih jedinjenja i antioksidativnoj aktivnosti začina i lekovitog bilja. Međutim, veoma je teško direktno upoređivati saopštene rezultate i uspostaviti razumnu vezu između antioksidativne aktivnosti, sadržaja fenola i antimikrobne aktivnosti, zato što je ispitan mali broj uzoraka začina i lekovitog bilja, i što su korištene različite metode određivanja i različiti sojevi bakterija (Shan i sar, 2007).

Puupponen-Pimiä i saradnici (2001) ispitivali su antimikrobnu aktivnost ekstrakata bobičastog voća na probiotike i patogene vrste u ljudskom organizmu, koje se nalaze u crevnom traktu. Ispitivali su sedamnaest čistih fenolnih jedinjenja iz osam različitih ekstrakata bobičastog voća. Generalno, ustanovili su da svi uzorci pokazuju izrazito antimikrobno delovanje prema Gram-negativnim (*Salmonella* i *Escherichia*), ali ne i prema Gram-pozitivnim bakterijama (*Lactobacillus*). Fenolne kiseline su pokazale aktivnost samo prema Gram-negativnim bakterijama, dok su antocijanidini inhibirali rast samo *E. coli*, a nisu imali uticaja na druge bakterije. Miricetin je jedini pokazao snažne inhibitorne efekte na rast svih sojeva *Lactobacillus* ljudskog porekla.

U sledećoj studiji Puupponen-Pimiä i saradnici (2005a) su dokazali da fitohemikalije iz bobica selektivno inhibiraju patogene bakterije. Pokazali su da su močvarna jagoda i malina najbolji inhibitori, a stafilokoke i salmonele najosetljivije bakterije. Fenolna jedinjenja, po-

sebno elagitanini, su se pokazala kao odlična inhibitorna jedinjenja protiv stafilokoka. Inhibiciji *Salmonella*, pored fenolnih jedinjenja doprinose i druga jedinjenja prisutna u bobicama, poput organskih kiselina. Antocijani iz bobičastog voća pokazuju antibakterijsku aktivnost, sa bakteriostatskim efektom na *E. coli*, zahvaljujući antiadhezionom efektu.

Naredna ispitivanja Puupponen-Pimiä i saradnika (2005b) su pokazala da ekstrakti bobica bogati polifenolnim jedinjenjima inhibiraju rast enteropatogenih bakterija poput vrsta roda: *Salmonella*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Helicobacter*, *Bacillus*, *Clostridium* i *Campylobacter*, a polifenolna jedinjenja iz borovnice deluju bakteriostatski na tri soja *Staphylococcus aureus*. Na osnovu ovih i prethodnih istraživanja, oni tvrde da je pH izuzetno bitan faktor za aktivnost. Razlika u delovanju prema Gram-negativnim i Gram-pozitivnim bakterijama bi se mogla objasniti činjenicom da postoji razlika u površinskoj strukturi ćelija ovih bakterija. Takođe stepen hidroksilacije može da utiče na antimikrobnu aktivnost čistih fenolnih jedinjenja (veći broj hidroksilnih grupa u B prstenu flavonola i flavona u korelaciji je sa povećanjem antimikrobne aktivnosti prema bakterijama mlečne kiseline).

S druge strane, Bobinaité i saradnici (2013) su ispitivali antimikrobnu aktivnost metanolnih i etanolnih ekstrakata ploda, pulpe i tropa maline na *B. subtilis*, *S. typhimurium*, *E. faecalis* i *S. aureus*. Najjaču antimikrobnu aktivnost na ispitivane Gram-pozitivne bakterije i kvasce je pokazao trop maline, koji je ujedno imao i najviši sadržaj fenola i elagitanina. Za razliku od prethodnih navoda, svi uzorci su pokazali bolju antimikrobnu aktivnost na Gram-pozitivne bakterije. Oni to objašnjavaju činjenicom da Gram-negativne bakterije sadrže spoljnu membranu, koja je dobra barijera za spoljne agense, dok Gram-pozitivne bakterije sadrže samo spoljni peptidoglikanski sloj, koji je mnogo lošija barijera za antimikrobna jedinjenja. Takođe, uzorci ekstrahovani 80% etanolom pokazuju jaču aktivnost od metanolnih.

Od 12 ispitivanih nordijskih bobica, prema Nohynek-u i saradnicima (2006) ekstrakt močvarne jagode je pokazao najsnažniji antimikrobni efekat na ljudske patogene, a zatim slede malina i jagoda. S obzirom da su ove vrste i najbogatije elagitaninima, njima se najviše pripisuje antimikrobni efekat. *Helicobacter pylori* i *Bacillus cereus* su bile najosetljivije prema ekstraktima, a *Campylobacter jejuni* i *Candida* su inhibirane samo ekstraktom močvarne jagode, maline i jagode. S obzirom da ekstrakti bobica inhibiraju rast patogena gastrointestinalnog trakta, mogu se koristiti u terapijske svrhe.

Burdulis i saradnici (2008) su ispitivali antimikrobnu aktivnost ekstrakata različitih sorti borovnice i ustanovili da su sve sorte pokazale vrlo sličnu antimikrobnu aktivnost. Ekstrakti borovnice i ljuske borovnice najveću antimikrobnu aktivnost su pokazale prema *E.*

E. coli, *Citrobacter freundii* i *Enterococcus faecalis* su bile najosetljivije od osam testiranih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija.

U kiseloj sredini kondenzovani tanini se spontano oksiduju do hinona i reaguju sa nukleofilnim grupama proteina, ostvaruju kovalentne veze i grade ireverzibilne komplekse. Na ovaj način, tanini reaguju sa proteinima površinskih slojeva sluznice i kože, ali i sa digestivnim i drugim enzimima, sa proteinima gljiva, bakterija i virusa. Zbog toga deluju antimikrobno. Antimikrobni efekat tanina zavisi i od vrste mikroorganizama (Puupponen-Pimiä i sar, 2005a). Tanini su tek nedavno priznati kao potencijalna zaštita zuba (efikasniji i od fluorida), jer svojom strukturom omogućavaju vezivanje bakterija i na taj način sprečavaju karijes (Chandrasekaran, 2014).

Pervin i saradnici (2013) su pokazali da ekstrakt lista borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) takođe pokazuje antimikrobnu aktivnost na sve testirane bakterije, pri čemu je jače antimikrobno dejstvo iskazao prema Gram-negativnim (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*), nego prema Gram-pozitivnim (*S. aureus* i *E. faecalis*) bakterijama.

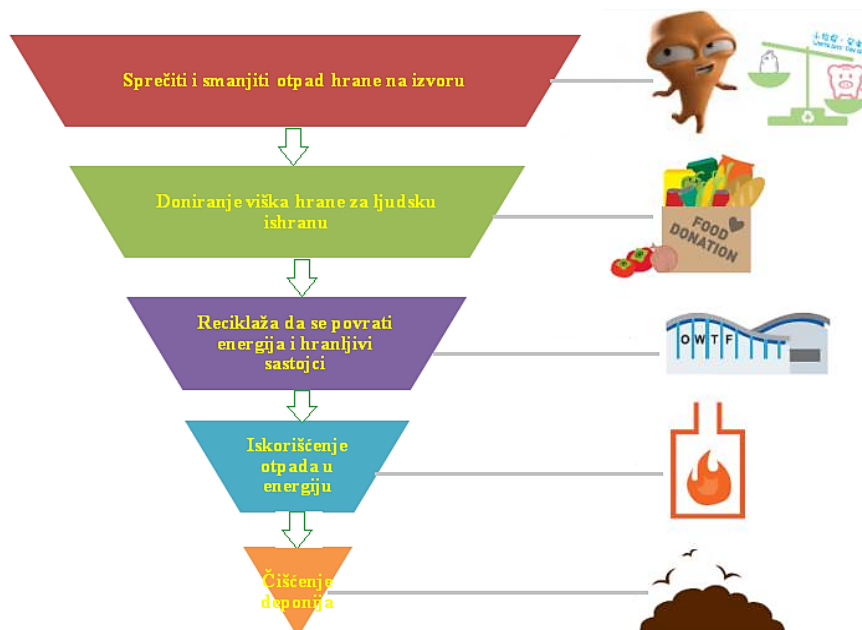
Viskeliš i saradnici (2009) su ispitivali antimikrobni efekat tropa bobičastog voća (četiri vrste američke brusnice) i pokazali da su najosetljivije *Bacillus cereus* i *Micrococcus luteus* od deset testiranih Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija. Takođe, ovi autori su utvrdili da su karakteristike tropa, dobijenog u procesu proizvodnje soka od bobičastog voća, iste ili čak bolje od ekstrakata dobijenih iz celih plodova bobica.

2.4. SPOREDNI PROIZVODI PRERADE VOĆA

Današnja prehrambena industrija je drugi najveći generator otpada koji se odlaže u životnu sredinu, posle otpada iz domaćinstava (Joshi i sar, 2012). Tokom industrijske prerade voća nastaju i velike količine sporednih proizvoda (ljuska, semenke, potkožna tkiva i postekstrakciona pogača, odnosno trop), koji se uglavnom tretiraju kao otpad, koji pored ekonomskog deficita za industriju, predstavlja i ekološki problem. Dokazano je da ovi sporedni proizvodi sadrže velike količine fitohemikalija i predstavljaju značajan izvor prirodnih antioksidanata (Balasundram i sar, 2006), prehrambenih vlakana, prirodnih boja i drugih komponenti, koje imaju pozitivan efekat na čovekovo zdravlje (Oreopoulou i sar, 2007). Danas se u svetu sporedni proizvodi industrijske prerade voća koriste kao hrana za životinje, za dobijanje biogoriva i prehrambenih vlakana, a takođe su i izvori prirodnih aditiva prehrambenim proizvodima (Vulić i sar, 2013).

Otpad koji nastaje tokom prerade voća, ukoliko se ne odlaže na pravi način predstavlja velik problem. S obzirom da je veoma podložan mikrobiološkom kvarenju, pre dalje eksploatacije neophodno ga je osušiti. Troškovi njegovog sušenja, skladištenja i transporta uvećavaju znatno troškove proizvodnje proizvoda od voća. Trop brusnice ima nizak sadržaj proteina, što predstavlja ograničavajući faktor za njegovo iskorišćenje kao hrane za životinje. Zbog njegovog niskog pH predstavlja ekološki problem, kada se odlaže u zemlju ili na deponije otpada (White i sar, 2009). Pronalaženje idejnog rešenja eksploatacije i iskorišćenja otpada, sa zadovoljavanjem ekonomskog aspekta, umnogome bi rešio značajne probleme industrije prerade voća.

Količine sporednih proizvoda, koje nastaju tokom industrijske proizvodnje su velike i konstantno se uvećavaju sa rastom industrijalizacije. Prehrambena industrija godišnje proizvodi više miliona tona sporednih proizvoda, a posebno u sektorima prerade voća i žitarica (Mildner-Szkudlarz i sar, 2016). U budućnosti postoji tendencija da se kroz niz koraka smanji količina otpada i poveća njegova iskorišćenost: smanjenje otpada na samom izvoru, ponovna upotreba, recikliranje i pretvaranje u obnovljivu energiju (slika 2.24). Prema podacima FAO iz 2011, svetska proizvodnja korenastog bilja, voća i povrća je 350 miliona tona, a ostatke čini čak 140 miliona tona.



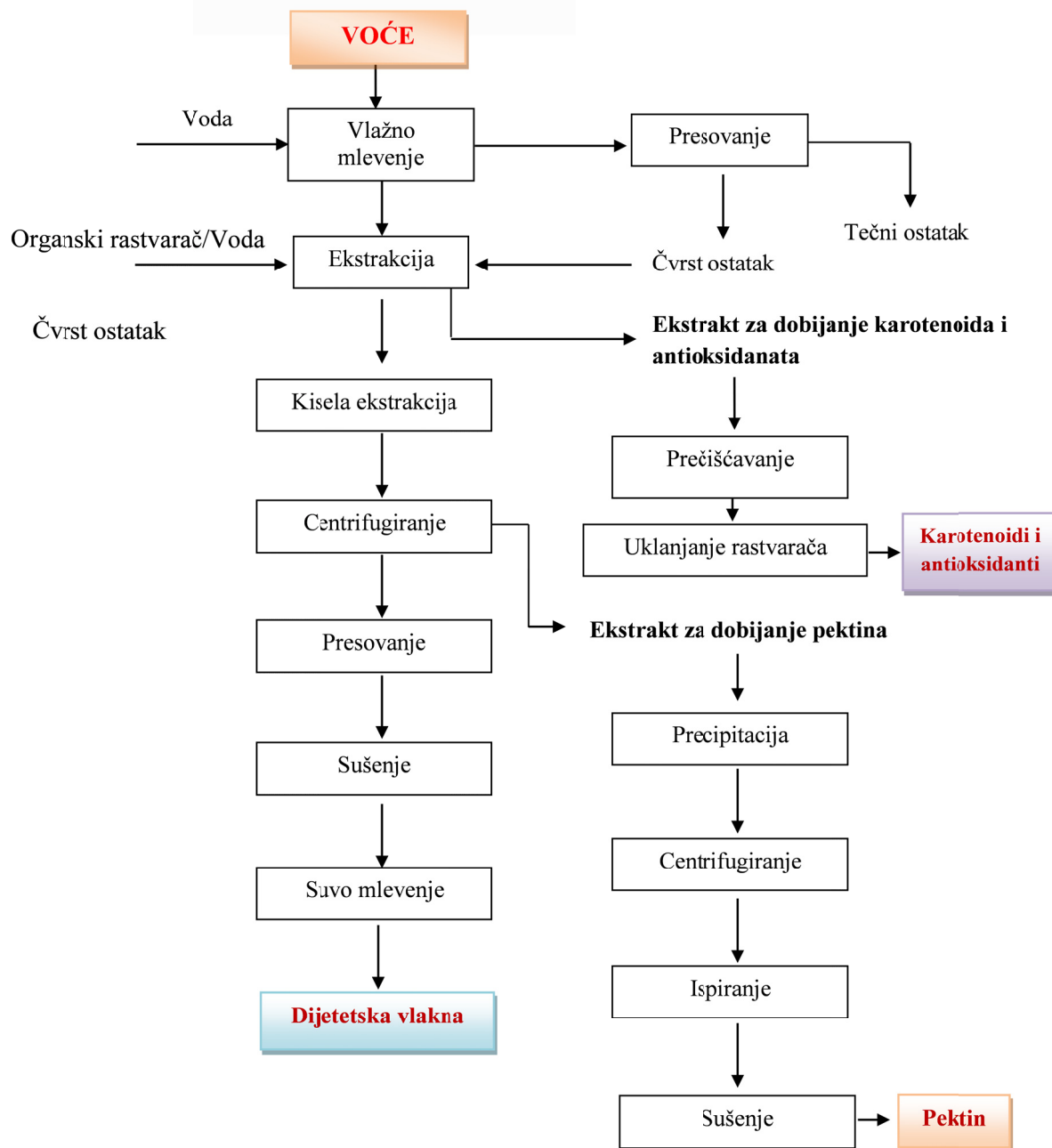
Slika 2.24. Hijerarhija upravljanja otpadom

Prerada voća je ekonomski opravdana, jer je preradna vrednost voća veća od njegove prodajne (tržišne) cene (Bulatović i sar, 2012). Tokom proizvodnje voćnih sokova zaostaju velike količine otpada. Trop voća može da sadrži čak i preko 30% od mase ploda i dobija se u

značajnim količinama, a smatra se otpadnim proizvodom (Salaheen i sar, 2014). Trop voća se ne može direktno iskoristiti kao hrana za životinje, jer je siromašan proteinima i previše kiseo. Trop bobica, također, nije nutritivno dovoljan da se odmah koristi kao stočna hrana, zbog čega proizvod mora biti dopunjen drugim hranljivim materijama, čime smanjuje svoju konkurentnost na tržištu (Cerda i sar, 2016).

Industrija sokova zauzima značajno mesto u prehrambenoj industriji. Evropska industrija sokova proizvela je u 2012. godini 10,4 miliona tona soka i nektara (Rohm i sar, 2015). Tokom proizvodnje soka sadržaj bioaktivnih komponenti se može smanjiti u procesu enzimske depektinizacije ili pasterizacije, ostavljajući velike količine ovih komponenti u sporednim proizvodima, npr. tropu (Jurgoński i sar, 2014). Plodovi voća imaju veću antioksidativnu aktivnost, u poređenju sa bilo kojim izvedenim proizvodom (Reque i sar, 2014), ali zaostale količine u sporednim proizvodima nisu zanemarljive. Trop, zaostao nakon presovanja voća prilikom procesa dobijanja soka (slika 2.25) ili pripreme za konzervisanje (White i sar, 2009), sastoji se od ljuske, semena i peteljke. Mogućnosti za iskorišćenje voćnog tropa su brojne, s obzirom da sadrži bioaktivne komponente. Stoga, ugrađivanje bioaktivnih jedinjenja, koja zaostaju tokom prerade voća, u hranu doprinosi povećanju vrednih hranljivih i funkcionalnih materija (Rohm i sar, 2015).

Tropovi bobica ili njihovi ekstrakti mogu naći primenu u raznim granama industrije. Savremen način života nameće svest o zdravoj ishrani, te potrošači danas preferiraju proizvode obojene prirodnim bojama, izolovanim iz voća, povrća, lekovitog bilja i začina, pre nego obojene štetnim sintetičkim bojama. Tropovi bobičastog voća su značajan izvor tih pigmenata i boja, uglavnom antocijana i karotenoida. Takođe, sve je veća tendencija da se sporedni proizvodi bobičastog voća iskoriste i implementiraju u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Jedinstven sastav masnih kiselina i visok sadržaj tokoferola, kao i zaštitni efekat protiv oksidativnog stresa i relativno dobar vek trajanja, čini ulje dobijeno iz tropa maline poželjnim za dobijanje dijetetskog suplemenata, kao dodatak u pasti za zube, šamponima, kremi za prevenciju iritacije kože, kremi posle brijanja, karminima, itd. (Brodowska, 2017).



Slika 2.25. Mogućnost iskorišćenja voćnog troša, (Đilas i sar, 2009)

Sporedni proizvodi nastali tokom obrade voća izuzetno su bogati polifenolnim jedinjenjima i prehrambenim vlaknima (Mildner-Szkudlarz i sar, 2016). Trop maline je važan izvor polifenola, elaginske kiseline, elagitanina, tokoferola, nezasićenih masnih kiselina i dijetetskih vlakana. Prema tome, ovaj trop se može smatrati potencijalnom sirovinom za dobijanje proizvoda bogatih polifenolima ili dijetetskim vlaknima, koji mogu da doprinesu funkcionalnim osobinama hrane, kada se koriste kao aditivi. Dijetetska vlakna dobijena iz otpada nastalog preradom maline mogu se koristiti u kreiranju funkcionalnih prehrambenih proizvoda (Brodowska, 2017). Još jedan od vidova primene sporednih proizvoda je njihova

upotreba kao antimikrobnih agenasa. Studije potvrđuju da su polifenolna jedinjenja (elagitanini), koja se nalaze u tropu bobica, uključujući i malinu, pokazala veoma efikasnu ulogu u inhibiciji rasta patogenih bakterija: *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Mycobacterium*, *Salmonella* i *Staphylococcus* vrsta, kao i nekih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Ali, 2012). Bobinaité i saradnici (2013) su ustanovili da je inhibitorni efekat izolovanih ekstrakata maline (celih bobica, pulpe i tropa) prema Gram-pozitivnim bakterijama i kvascima bio u dobrom odnosu sa sadržajem ukupnih fenola i elagitanina.

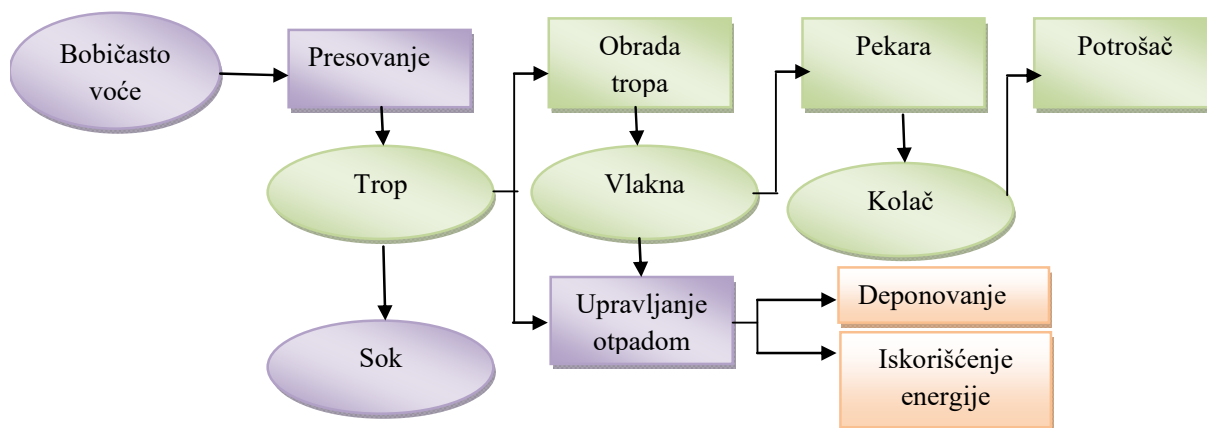
White i saradnici (2009) su analizirali sušeni trop brusnice i ustanovili sledeći sadržaj: 4,5% vlage, 2,2% proteina, 12,0% masti, 65,5% nerastvorljivih vlakana 5,7% rastvorljivih vlakana, 8,4% ostalih ugljenih hidrata, 1,1% pepela i 0,6% ukupnih polifenola. Takođe, ustanovili su da su od polifenola, najdominantniji flavonoli. Nešto manje od 50% flavonola je ostalo u tropu ($358,4 \pm 16,3$ mg/100 g s.m), što ukazuje na njihovu stabilnost tokom obrade.

Oszmiański i saradnici (2016) su, u svojoj studiji koju su sproveli, ustanovili da je trop aronije bogatiji izvor bioaktivnih polifenola u odnosu na sušeno voće. Takođe, zbog manjeg sadržaja vode, liofilizacija i drobljenje tropa su lakši nego u slučaju celih bobica, kao i da trop može lakše biti osušen i manje higroskopian, jer sadrži manje šećera. Osušeni trop, dobijen pod odgovarajućim uslovima, se može koristiti za proizvodnju funkcionalne hrane, u obliku pilula, ili praha, ili kao dodatak hrani u cilju poboljšanja biološke vrednosti namirnica.

Osim ekstrakcije i izolovanja pektina iz jabučnog tropa i kore citrusa, jedan od značajnijih pravaca upotrebe sporednih proizvoda iz industrije bobičastog voća jeste dobijanje koncentrata vlakana i prevođenje odgovarajućim tehnološkim postupcima u oblik pogodan za primenu u prehrambenoj industriji (Šarić, 2016). Sve više se pojedine namirnice obogaćuju vlaknima. Tropovi su, takođe, bogati i prehrambenim vlaknima i zbog toga se mogu posmatrati kao alternativni izvor vlakana, ali i bioaktivnih komponenti. Žitarice i pekarski proizvodi se najviše obogaćuju prehrambenim vlaknima (slika 2.26).

Posebno se keksovi, u pekarskoj i konditorskoj industriji koriste kao izvori pogodni za uključivanje različitih nutritivno bogatih sastojaka. Obogaćivanjem pekarskih proizvoda prehrambenim vlaknima iz voća, postiže se bolji nutritivni kvalitet, veća količina ukupnih i rastvorljivih vlakana, niža kalorijska vrednost, veći antioksidatovni kapacitet, bolja fermentabilnost i sposobnost zadržavanja vode (Stajčić, 2012). Na ovaj način dobijamo proizvode koji su, u nutritivnom smislu, mnogo bolji, ali samim tim i privlačniji za konzumente. Tokom definisanja procesa pečenja potrebno je uzeti u obzir stabilnost bioaktivnih komponenti, kako bi se osiguralo njihovo optimalno zadržavanje u dobijenim proizvodima. Mildner-Szkudlarz i saradnici (2016) su ispitali uticaj dodatka tropa maline i brusnice na kvalitet i teksturu

mafina. Niža temperatura pečenja je bila bolja za elaginsku kiselinu i tokotrienole, ali lošija za flavonole, tokoferole i antocijane. Na osnovu dobijenih rezultata ustanovili su da su srednji uslovi pečenja (180 °C, tokom 20 minuta) obezbedili najbolju mikrostrukturu i teksturu uz optimalno zadržavanje fitohemikalija u novom proizvodu.



Slika 2.26. Iskorišćenje tropa bobica u proizvodnji hrane na bazi žitarica (Rohm i sar, 2015)

U disertaciji Šarić (2016) je ispitivana primena osušenih i samlevenih tropova maline i kupine, kao sastojaka prehrambenih proizvoda, u formulaciji bezglutenskog keksa, sa ciljem njegovog funkcionalnog obogaćivanja. Ustanovljeno je da je formulacija, u kojoj je bezglutenska smeša zamenjena sa 28,2% tropa borovnice i 1,8% tropa maline, optimalna i da je time postignuto značajno poboljšanje nutritivnih svojstava bezglutenskog keksa. Poređenjem dobijenih vrednosti za sastav makronutrijenata, utvrđeno je da se supstitucijom dela bezglutenske smeše tropom borovnice i maline dobija proizvod značajno obogaćen prehrambenim vlaknima, sa manjim sadržajem zasićenih masnih kiselina i nižom energetsom vrednošću (Šarić, 2016). Takođe sprovedena je dijetetska interventna studija na 20 zdravih, normalno uhranjenih ispitanika ženskog pola, i ustanovljeno je da se konzumiranjem kreiranog bezglutenskog keksa u količini od 32 g dnevno, postiže značajna redukcije LDL holesterola, i povećanje nivoa adiponektina u krvi.

Górecka i saradnici (2010) su određivali sadržaj vlakana u tropu maline i mogućnost dodatka u kolače. Sadržaj vlakana u tropu maline iznosi 77,5% s.m, a nerastvorljiva frakcija je zastupljena sa 75% s.m. Takođe sadržaj lignina i celuloze je visok. Ustanovili su da se korišćenjem tropa maline povećao sadržaj vlakana u kolačima, kao i da je dodatak uticao na oragnoleptičke karakteristike dobijenog proizvoda (voćni miris, voćni ukus i dr).

Prehrambena vlakna se mogu dodavati i u napitke, povećavajući na taj način njihovu viskoznost i stabilnost. Rastvorljiva vlakna se češće primenjuju zbog bolje disperznosti u vodi od nerastvorljivih vlakana (Stajčić, 2012), dok se kod marmelada i džemova najčešće dodaju pektini sa različitim stepenom esterifikacije. Na ovaj način uspelo bi se u tome da se funkcionalna jedinjenja, zaostala u tropu povrate ponovo u lanac ishrane (Khanal i sar, 2009).

Trop borovnice sadrži od 25% do 50% od ukupnih procijanidina prisutnih usvežem voću (Khanal i sar, 2009). S obzirom da su u plodu borovnice antocijani skoncentrisani najvećim delom u ljusci, Reque i saradnici (2014) su ustanovili visok sadržaj antocijana u tropu. Takođe, oni su ustanovili da je gubitak antocijana u brašnu, dobijenom sušenjem tropa, 32%, a u sušenoj borovnici 42%. Antioksidativna aktivnost brašna je opala za 66%, a sušene borovnice za 46%, u poređenju sa plodom. Međutim, bez obzira na navedene gubitke i brašno i sušena borovnica su dobar izvor antocijana.

Trop maline i kupine, nastao tokom proizvodnje soka, uglavnom se sastoji od semenki. Semenke sadrže lipide i dve esencijalne masne kiseline, linolnu i α -linoleinsku kiselinu, sa poželjnim odnosom 2-4:1, (Radočaj i sar, 2014). Kao što je već navedeno, semenke se mogu iskoristiti za dobijanje visokokvalitetnog ulja, sa dobrim antioksidativnim osobinama, koje bi moglo naći značajnu primenu u prehrambenim, farmaceutskim i kozmetičkim proizvodima (Brodowska, 2017).

Ispitivanjem ulja tropa divlje i gajene borovnice, divlje brusnice, maline i divlje crne aronije, Dulf i saradnici (2012) su ustanovili da ulja tropova, zbog izuzetnog balansa n-6 i n-3 masnih kiselina, kao i visokog sadržaja β -sitosterola mogu biti odličan izvor nezasićenih masnih kiselina (37 % do 69 %) i fitosterola. To je još jedan od dokaza da se sporedni proizvodi mogu iskoristiti u proizvodnji funkcionalne hrane i/ili kao dodaci ishrani.

Zbog niza pozitivnih svojstava implementacija fitohemikalija iz sporednih proizvoda prerade voća je odličan način iskorišćenja otpada. Na ovaj način prehrambena industrija bi u mnogome rešila veliki problem odlaganja otpada, koji je glavni trošak prerađivačke industrije sokova. Klinička ispitivanja o potencijalnoj prevenciji hroničnih bolesti otkrila su da kompleks mešavina fitohemikalija u hrani ima aditivne i sinergetske efekte, tako da ne može biti zamenjen pojedinačnim jedinjenjima u dijetetskim suplementima (Rohm i sar, 2015). Istovremeno, prilikom korišćenja fenolnih jedinjenja, izolovanih iz agroindustrijskih sporednih proizvoda, kao prehrambenih antioksidanata, neophodno je razmotriti i praktične aspekte, kao što su efikasnost ekstrakcije, dostupnost dovoljnih količina sirovina, toksičnost i bezbednost postupaka (Balasundram i sar, 2006). U okvirima iskorišćenja tropova voća, jabuka i citrusno voće su najviše ispitivani, dok je iskorišćenost bobičastog voća tek u ekspanziji.

Jedna od daljih smernica za ispitivanje fitohemikalija dobijenih iz sporednih proizvoda voća jeste ispitivanje stabilnosti i interakcije fitohemikalija sa drugim sastojcima hrane za vreme obrade i skladištenja. Takođe, treba uzeti u obzir da je funkcionalna hrana na granici između hrane i lekova, tako da njeno dobijanje zahteva opsežna ispitivanja u cilju zaštite potrošača. S druge strane, proizvođač mora da ispoštuje i ekonomski aspekt, kako bi plasirani proizvodi i patenti imali konkurentnu vrednost na tržištu.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

Eksperimentalni deo ove disertacije urađen je u laboratorijama za Organsku hemiju, Hemiju hrane i Mikrobiologiju Tehnološkog fakulteta Novi Sad, Univerziteta u Novom Sadu, Laboratoriji za ćelijske kulture Instituta za onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici i Fito-hemijskoj laboratoriji Departmana za nauku i tehnologiju hrane, CEBAS-CSIC, Mursija, Španija.

3.1. HEMIKALIJE I INSTRUMENTI

Reagensi i hemikalije koji su korišćeni u eksperimentalnom radu bili su analitičke čistoće, osim onih za HPLC analize (HPLC čistoće). Etanol, natrijum-karbonat i aluminijum(III)-hlorid su proizvodi kompanije „Zorka” Šabac. Natrijum-nitrit i natrijum-hidroksid nabavljeni su iz kompanije „Lachner”, Brno, Češka. Vitamin C (askorbinska kiselina), pufer pH 1 (KCl/HCl), gvožđe(III)-hlorid, amonijum-acetat, metafosforna kiselina, vodonik-peroksid, metanol, mravlja kiselina, sirćetna kiselina, dimetilformamid (DMF), dimetilsulfoksid (DMSO) i acetonitril su proizvedeni u „J. T. Baker”, Deventer, Holadnija. Folin-Ciocalteu reagens, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijum so (ABTS), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kiselina (troleks), 5,5-dimetil-1-pirolin-N-oksid (DMPO), kalijumsuperoksid, 4-nitrofenil α -D-glukopiranozid, α -glukozidaza iz *Saccharomyces cerevisiae*, trihlorsirćetna kiselina, kalijum-ferricijanid, kalijum-fosfat i natrijum-hlorid i svi standardi polifenolnih jedinjenja korišćenih u HPLC analizama (kafena, protokatehinska, siringinska, ferulna, vanilinska, kumarinska, galna, hlorogenska, elaginska, *p*-hidroksibenzoeva, sinapinska, ruzmarinska i gentisinska kiselina, rutin, katehin, epikatehin, epikatehingalat, kvercetin, miricetin, luteolin, kempferol, cijanidin-hlorid) proizvedeni su u „Sigma-Aldrich”, Sent Luis, SAD. Magnezijum(IV)-oksid je proizvod kompanije „Alfa Aesar”, Karlsrue, Nemačka. Pufer pH 4,5 (sirćetna kiselina/natrijum-acetat) proizveden je u kompaniji „Merck”, Darmštat, Nemačka.

Absorbance u spektrofotometrijskim testovima su merene pomoću UV-1800 spektrofotometra („Shimadzu”, Kjoto, Japan), osim u testu za određivanje antihiperglikemijske aktivnosti, gde su merene pomoću Infinite[®]M200 čitača mikrotitar ploče („Tecan”, Groding, Austrija) i mikrotitar ploča sa 96 otvora (Nune, Roskilde, Danska). Razvijanje boje u anti-proliferativnom testu praćeno je pomoću fotometra „Multiscan Ascent”, „Labsystems”, Helsinki, Finska. Antioksidativna aktivnost na hidroksil i superoksid anjon radikale određivana je na elektron spin rezonantnom (ESR) spektrometru „Bruker 300E“ (Rajnšteten, Nemačka). Identifikacija i kvantifikacija fenolnih kiselina, flavonoida i vitamina C rađena je HPLC metodom na uređaju „Shimadzu Prominence” („Shimadzu”, Kjoto, Japan) koji sadrži LC-20AT binarnu pumpu, CTO-20A thermostat i SIL-20A automatski dozator povezan sa SPD-20AV UV/Vis detektorom. Identifikacija i kvantifikacija dobijenih pikova izvršena je primenom „LC Solution softvera” („Shimadzu”, Kjoto, Japan). HPLC-DAD-ESI/MSⁿ analize antocijana su rađene primenom tandem masene spektrometrije na uređaju „Agilent HPLC 1100 serije” koji je opremljen sa elektron sprej jonizatoriom (ESI), DAD detektorom i masenim detektorima („Agilent Technologies”, Valdbron, Nemačka). Maseni analizator je jon trap spektrometar (model G2445A) opremljen sa ESI interfejsom. Kontrola rada izvedena je primenom LCMSD softvera (Agilent, version 4.1). Liofilizator, model „Chris Alpha 2-4 LSC” proizveden je u „Martin Christ”, Osterode am Harc, Nemačka. Homogenizator visokih performansi (ultraturaks, model „SilentCrusher M, DIAX 900”) i šejker (model „Unimax 1010”) su proizvodnje „Heidolph Instruments GmbH”, Kelhajm, Nemačka, a rotacioni vakuum uparivač (model „Rotavapor R-210”) je proizvod kompanije „Büchi Labortechnik”, Flavil, Švajcarska. Centrifuga, model „EBA 21”, je proizvedena u „Hettich Zentrifugen”, Tutlingen, Nemačka, a mini-centrifuga „Microspin 12” u „Biosan”, Riga, Letonija.

3.2. BILJNI MATERIJAL

Kao polazni biljni materijal korišćeni su plodovi maline (*Rubus idaeus* L.) sorti Meeker i Willamette, kupine (*Rubus fruticosus* L.) sorti Čačanska bestrna i Thornfree i divlja borovnica (*Vaccinium myrtillus* L.). Malina i kupina su dobijene od „Alfa RS”, Lipolist, Srbija. Borovnica, poreklom iz prirodnog staništa (područje Kopaonika) je nabavljena od firme „ITN”, Beograd, Srbija. Sveže neoštećene bobice su pakovane odmah, zamrznute i čuvane u zamrzivaču na -20 °C do upotrebe.

3.3. DOBIJANJE EKSTRAKATA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA

Tropovi odabranog bobičastog voća dobijeni su ceđenjem odmrznutog voća u laboratorijskim uslovima.

Dobijeni tropovi (20 g) ekstrahovani su smešom metanola i vode u različitim zapreminskim odnosima (80% i 60%), sa i bez dodatka 0,05% sirćetne kiseline, na sobnoj temperaturi, korišćenjem homogenizatora. Ekstrakcija je ponovljena dva puta sa različitim zapreminom rastvarača: 160 ml u toku 60 minuta i 80 ml u toku 30 minuta. Dobijeni ekstrakti su spojeni i upareni do suva na rotacionom vakuum uparivaču na temperaturi 40 °C. Prinosi ekstrakata kretali su se u opsegu 1,80–3,37 g za tropove maline, 1,74–1,97 g za tropove kupine i 1,74–2,31 g za trop borovnice. Najveći prinosi ekstrakata dobijeni su ekstrakcijom sa 80% metanolom uz dodatak 0,05% sirćetne kiseline:

- ekstrakt tropa maline sorte Meeker (ETMM), $m=2,57$ g (12,85%),
- ekstrakt tropa maline sorte Willamette(ETMW), $m=3,37$ g (16,85%),
- ekstrakt tropa kupine sorte Čačanska bestrna (ETKČ), $m=1,89$ g (9,45%),
- ekstrakt tropa kupine sorte Thornfree (ETKT), $m=1,97$ g (9,85%),
- ekstrakt tropa borovnice (ETB), $m=2,31$ g (11,56%),

pa su zbog toga ovi ekstrakti korišćeni u daljim ispitivanjima.

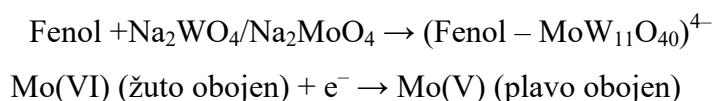
Odabrani ekstrakti tropova osušeni su liofilizacijom u laboratorijskom liofilizatoru u toku 48 časova, pri promenljivom temperaturnom režimu u intervalu od -40 °C do 30 °C. Prinosi liofiliziranih ekstaraka iznosili su: $m_{ETMM}=2,06$ g (10,30%), $m_{ETMW}=2,34$ g (11,30%), $m_{ETKČ}=1,73$ g (8,65%), $m_{ETKT}=1,81$ g (9,03%), odnosno $m_{ETB}=1,92$ g (9,60%).

3.4. SPEKTROFOTOMETRIJSKA ODREĐIVANJA SADRŽAJA POLIFENOLA U EKSTRAKTIMA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA

3.4.1. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH POLIFENOLA

Sadržaj ukupnih polifenola (eng. *total polyphenols* – TPh) u liofiliziranim ekstraktima tropova određen je metodom po Folin-Ciocalteu (Singleton i sar, 1999). Ova metoda je zasnovana na merenju redukujućeg kapaciteta polifenolnih jedinjenja, čijom disocijacijom

nastaje proton i fenoksidni anjon, koji redukuje Folin-Ciocalteu reagens do plavo obojenog jona (Fenol – MoW₁₁O₄₀)⁴⁻:



Rastvor postaje intenzivno plave boje, čiji je intenzitet srazmeran količini polifenolnih jedinjenja. Intenzitet boje se meri spektrofotometrijski, na talasnoj dužini od 750 nm.

Rastvori i reagensi:

1. 20%-ni rastvor Na₂CO₃: 10 g Na₂CO₃ rastvoreno je uz zagrevanje (70 °C) u 40 ml destilovane vode;
2. 2M Folin-Ciocalteu reagens razblažen sa destilovanom vodom (1:2);
3. Standardni rastvor galne kiseline: 5 mg galne kiseline rastvoreno je u 5 ml metanola (C=1 mg/ml);
4. Rastvori liofiliziranih ekstrakata tropova: 100 mg ETMW, odnosno ETMM rastvoreno je u 10 ml destilovane vode (C=10 mg/ml), a 50 mg ETKČ, ETKT, odnosno ETB rastvoreno je u 10 ml destilovane vode (C=5 mg/ml).

Spektrofotometrijsko određivanje:

Za određivanje sadržaja ukupnih polifenola koristi se kalibraciona kriva standardnog rastvora galne kiseline. Postupak pripreme rastvora različite koncentracije galne kiseline, potrebnih za dobijanje kalibracione krive, prikazan je u tabeli 3.1.

Tabela 3.1. Priprema rastvora galne kiseline

C [mg/ml]	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	SP
V _{galne kis.} [ml]	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	/
V _{metanol} [ml]	0,09	0,08	0,06	0,04	0,02	/	1,0
V _{voda} [ml]	7,90						
V _{FC (1:2)} [ml]	0,50						
V _{20% Na₂CO₃} [ml]	1,5						
Nakon 2h meri se apsorbanca na λ _{max} =750 nm							

Na osnovu izmerenih vrednosti apsorbanaci (A_{750}) u zavisnosti od različitih koncentracija galne kiseline (c) konstruisana je kalibraciona kriva na osnovu koje je dobijena sledeća jednačina:

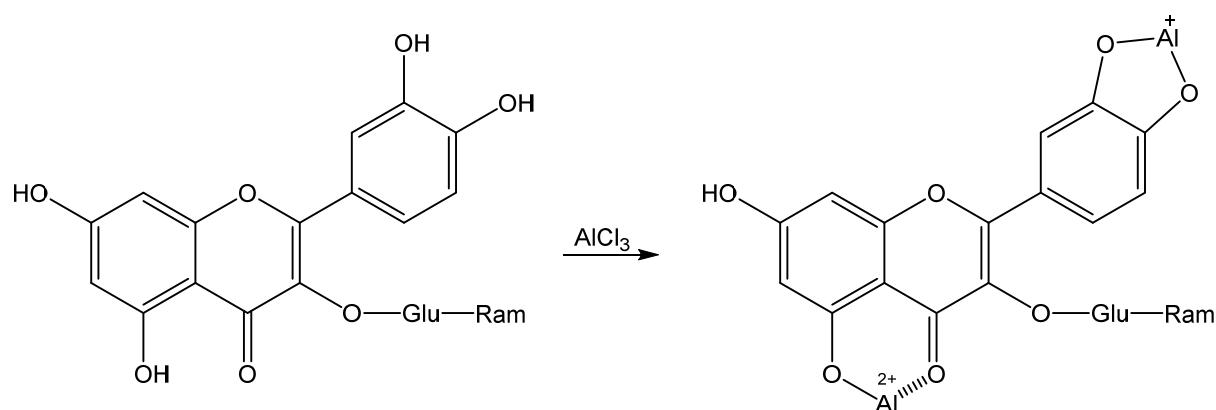
$$C = (A_{750} - 0,011) / 0,8609$$

Reakciona smeša pripravljena je mešanjem 0,1 ml ekstrakta (vodeni rastvor ETMM ili ETMW koncentracije 10 mg/ml; vodeni rastvor, ETKČ, ETKT ili ETB koncentracije 5 mg/ml), 7,9 ml destilovane vode, 0,5 ml Folin-Ciocalteu reagensa (1:2) i 1,5 ml 20% Na_2CO_3 . Istovremeno je pripravljena i slepa proba: 8 ml destilovane vode, 0,5 ml Folin-Ciocalteu reagensa (1:2) i 1,5 ml 20% Na_2CO_3 . Nakon 2 h izmerena je apsorbanca na talasnoj dužini od 750 nm (A_{750}).

Na osnovu izmerene apsorbance, primenom jednačine koja definiše matematičku zavisnost koncentracije galne kiseline i apsorbance, izračunata je koncentracija (mg/ml) polifenolnih jedinjenja, a zatim je sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u ekstraktu tropa izražen kao ekvivalent galne kiseline (mg GAE/g suvog ekstrakta).

3.4.2. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH FLAVONOIDA

Ukupni flavonoidi (eng. *total flavonoids* – TF) u liofiliziranim ekstraktima tropova određeni su metodom po Zhishenu i saradnicima (1999). Flavonoidi i flavonglukozidi iz biljnog materijala imaju osobinu da sa metalima grade odgovarajuće metalo-komplekse, pri čemu je značajan kompleks sa Al^{3+} :



Slika 3.1. Struktura rutina i njegovog kompleksa sa Al^{3+}

Rastvori i reagensi:

1. 5%-ni rastvor natrijum-nitrita (NaNO_2): 0,5 g NaNO_2 rastvoreno je u 10 ml destilovane vode;
2. 10%-ni rastvor $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$: 1,7 g $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ rastvoreno je u 10 g destilovane vode;
3. 1 mol/l rastvor NaOH : 4 g NaOH rastvoreno je u 100 ml destilovane vode;
4. Standardni rastvor rutina: 2,5 mg rutina rastvoreno je u 5 ml destilovane vode ($C=0,5$ mg/ml standardnog rastvora rutina);
5. Rastvor liofiliziranog ekstrakta tropa: 200 mg ekstrakta tropa rastvoreno je u 10 ml destilovane vode ($C=20$ mg/ml).

Spektrofotometrijsko određivanje:

Postupak pripreme rastvora rutina koji su korišćeni za izradu kalibracione krive prikazan je u tabeli 3.2.

Tabela 3.2. Priprema rastvora rutina

C [mg/ml]		0,025	0,05	0,1	0,2	0,3	0,5	SP
V[ml] Uzorka/ vode	V_{rutina} [ml]	0,05	0,10	0,20	0,40	0,60	1,00	/
	V_{vode} [ml]	0,95	0,90	0,80	0,60	0,40	/	1,00
V_{vode} [ml]		5,00						
$V_{5\% \text{NaNO}_2}$ [ml]		0,30						
Posle 5 min								
$V_{10\% \text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}}$ [ml]		0,30						
Rastvor požuti; posle 6 min								
V_{NaOH} [ml]		2,00						
Rastvor pocrveni; dopuniti vodom do 10 ml i meriti apsorbancu na $\lambda_{\text{max}}=510$ nm								

Rastvori liofiliziranih ekstrakata tropova pripremljeni su na isti način, kao i standardni rastvori rutina, samo što je umesto rastvora rutina korišćen 1 ml rastvora liofiliziranog ekstrakta tropa (koncentracije $C=20$ mg/ml). Apsorbance reakcionih smeša izmerene su na talasnoj dužini od 510 nm (A_{510}).

Na osnovu izmerenih vrednosti apsorbance u zavisnosti od koncentracije rutina konstruisana je kalibraciona kriva na osnovu koje je dobijena sledeća jednačina:

$$C = (A_{510} - 0,0105) / 0,9251$$

Primenom dobijene jednačine, na osnovu izmerene apsorbance ispitivanog ekstrakta, izračunata je koncentracija ukupnih flavonoida (mg/ml), a zatim je sadržaj flavonoida u ekstraktu tropa izražen kao ekvivalent rutina (mg RE/g suvog ekstrakta).

3.4.3. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH ANTOCIJANA

Kvantitativno određivanje ukupnih antocijana (nedegradiranih monomera i proizvoda njihove degradacije) zasniva se na osobini antocijana, da pri promeni pH vrednosti sredine, reverzibilno menjaju svoju strukturu, pri čemu dolazi i do promena apsorpcionog spektra.

Tokom vremena, kao i pod uticajem različitih faktora (temperatura, kiseonik, vitamin C i dr.), dolazi do degradacije monomera antocijana, koji se povezuju međusobno ili sa drugim prisutnim jedinjenjima (npr. taninima) formirajući na taj način proizvode degradacije. Iako količina monomera antocijana opada, intezitet boje se ne menja, jer u reakcijama kondenzacije nastaju obojeni kondenzacioni proizvodi koji su čak i stabilniji od monomernih (slobodnih) antocijana.

Sadržaj ukupnih antocijana (eng. *total anthocyanins* – TAc) u liofiliziranim ekstraktima tropova određen je „singl” metodom (Lee i sar, 2006), pri čemu je izmerena apsorbance rastvora antocijana pri pH 1, proporcionalna sadržaju ukupnih antocijana.

Rastvori i reagensi:

1. Pufer pH 1;
2. Rastvor liofiliziranog ekstrakta tropa: 50 mg ekstrakta rastvoreno je u 10 ml vode (C=5 mg/ml).

Spektrofotometrijsko određivanje:

Od vodenog rastvora ekstrakta (C=5 mg/ml) odmereno je po 0,5 ml i sipano u odmerne sudove od 5 ml, koji su zatim dopunjeni puferom pH 1. Nakon 15 min izmerene su apsorbance na 510 nm (A_{510}) i 700 nm (A_{700} , zbog korekcije zamućenja). Slepna proba je bila destilovana voda (5 ml).

Koncentracija ukupnih antocijana u ekstraktu izračunata je prema formuli:

$$C_{uk} \text{ (mg/l)} = (A_{uk} \times M \times F \times 1000) / (\epsilon \times l)$$

gde su:

A_{uk} - apsorbance razblaženog ekstrakta, koja je izračunata prema formuli:

$$A_{uk} = (A_{510} - A_{700})$$

$M=449,2$ g/mol (molekulska masa cijanidin 3-*O*-glukozida);

$F=10$ (faktor razblaženja ekstrakta);

$E=26900$ dm³ mol⁻¹ cm⁻¹ (molarni koeficijent apsorpcije cijanidin 3-*O*-glukozida);

$l=1$ cm (debljina kivete).

Sadržaj antocijana u ekstraktu tropa je zatim izražen kao ekvivalent cijanidin 3-*O*-glukozida (mg CyGE/g suvog ekstrakta).

3.5. HPLC ANALIZA POLIFENOLA U EKSTRAKTIMA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA

Priprema uzorka:

Liofilizirani ekstrakti tropova bobičastog voća (100 mg) ekstrahovani su u zatvorenim polipropilenskim epruvetama sa 1,5 ml 50% metanola na ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 1 h, zatim u mraku na 4 °C u toku 24 h, a nakon toga ponovo na ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 1 h. Nakon ekstrakcije, dobijena ekstrakciona smeša centrifugirana je 5 min na 13945,75 × g. Pre injektovanja odvojeni supernatanti profiltrirani su kroz 0,2 μm špric filter sa teflonskom (PTFE) membranom (ANOTOP 10 Plus, „Whatman”, Mejdston, Engleska).

3.5.1. IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA FENOLNIH KISELINA I FLAVONOIDA POMOĆU RP-HPLC-UV/VIS TEHNIKE

Identifikacija i kvantifikacija fenolnih kiselina i flavonoida u ekstraktima tropova izvršena je tečnom hromatografijom visoke rezolucije na obrnutim fazama sa UV/Vis detektorom (eng. reversed phase high-performance liquid chromatography – UV/Vis detection, RP-HPLC-UV/Vis).

Razdvajanje fenolnih jedinjenja izvršeno je na Luna C18 RP koloni, (250 mm × 4,6 mm, veličina čestica 5 μm; Phenomenex, „Torens”, Kalifornija, SAD), koja je zaštićena pretkolonom C18, 4 x 30 mm (Phenomenex, „Torens”, Kalifornija, SAD). Kao mobilna faza korišćen je sistem rastvarača: A (acetonitril) i B (1% mravlja kiselina) pri protoku od 1 ml/min i primenom sledećeg linearnog gradijenta: 0–10 min od 10 do 25% A; 10–20 min linearan porast do 60% A, od 20 do 30 min linearan porast do 70% A. Kolona je uravnotežena na početne uslove, 10% A, 10 min uz dodatnih 5 min za stabilizaciju. Standardi polifenolnih jedinjenja su rastvarani u 50% metanolu. Hromatogrami su snimljeni pri različitim talasnim

dužinama: 280 nm za derivate hidroksibenzoeve kiseline (galna, protokatehinska, vanilinska i siringinska kiselina) i za elaginsku kiselinu, 320 nm za derivate hidroksicimetne kiseline (kafena, hlorogenska, kumarinska, ferulna, sinapinska i ruzmarinska kiselina) i za gentsinsku kiselinu, 360 nm za flavonoide (kvercetin, rutin, luteolin, miricetin, kempferol, katehin, epikatehin i epikatehinalat).

Na osnovu dobijenih hromatograma i kalibracionih dijagrama standardnih rastvora fenolnih jedinjenja izračunate su koncentracije identifikovanih fenolnih kiselina i flavonoida (mg/g suvog ekstrakta).

3.5.2. IDENTIFIKACIJA ANTOCIJANA POMOĆU HPLC-DAD-ESI/MSN TEHNIKE I KVANTIFIKACIJA POMOĆU RP-HPLC-DAD TEHNIKE

Identifikacija antocijana u liofiliziranim ekstraktima tropova izvršena je primenom visokopritisne tečne hromatografije kuplovanom sa detektorom sa serijom dioda i tandem masenom spektrometrijom sa elektrosprej jonizacijom (eng. high-performance liquid chromatography–diode array detection–electrospray ionization–tandem mass spectrometry; HPLC-DAD-ESI/MS n), a kvantifikacija primenom visokopritisne tečne hromatografije na obrnutim fazama sa detektorom sa serijom dioda (eng. reversed phase high-performance liquid chromatography–diode array detection; RP-HPLC-DAD).

Hromatografske analize izvršene su na koloni Luna C18 (250 mm × 4,6 mm, veličina čestica 5 μm; Phenomenex, „Torens”, Kalifornija, SAD). Kao mobilna faza za razdvajanje antocijana korišćen je sistem rastvarača: A (1% mravlja kiselina) i B (acetonnitril) pri protoku od 1 ml/min i primenom sledećeg linearnog gradijenta: 8–15% B (0–25 min), 15–22% B (25–55 min), 22–4% B (55–60 min) i pri nepromenljivom sastavu mobilne faze, 4% B (60–70 min). Zapremina injektovanja bila je 30 μl. Hromatogrami su snimljeni na 520 nm. Uslovi za jonizaciju podešeni su na 350°C. Na kapilaru je primenjivan napon od 4 kV. Azot je korišćen pri protoku od 11 l/min i kao gas raspršivač pri pritisku od 60 psi. Analiza je izvršena u opsegu od m/z 100 do m/z 1200. Eksperimenti kolizijom-indukovane fragmentacije izvedeni su u jon trapu primenom helijuma kao kolizionog gasa, sa naponom pojačavanja ciklusa od 0,3 do 2 V. MS podaci dobijeni su u pozitivnom jonizacionom modu. MS n je izvedena u automatskom modu prećenjem produkt jona u MS($n-1$).

Za kvantitativna određivanja, HPLC analiza izvedena je na koloni Luna C18 (250 mm × 4,6 mm, veličina čestica 5 μm; Phenomenex) sa pretkolonom C18 (4 × 3 mm, Phenomenex, „Torens”, Kalifornija, SAD). Kao mobilna faza korišćen je sistem rastvarača: A (5%

mravlja kiselina) i B (acetonitril) pri protoku od 1 ml/min. Primenjen je isti linearni gradijent kao i za identifikaciju. Zapremina injektovanja bila je 20 μ l. Hromatogrami su snimljeni na 520 nm. Kvantifikacija antocijana izvedena je primenom jedinog dostupnog standardnog jedinjenja cijanidin 3-*O*-glukozida, a sadržaj antocijana u ekstraktu izražen je kao ekvivalent cijanidin 3-*O*-glukozida (mg CyGE/g suvog ekstrakta).

3.6. ODREĐIVANJE SADRŽAJA VITAMINA C U EKSTRAKTIMA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA

Priprema uzorka:

100 mg uzorka liofiliziranog ekstrakta tropa bobičastog voća ekstrahovano je na ultrazvučnom kupatilu sa 1,5 ml 3%-nog rastvora metafosforne kiseline, koja je rastvorena u 8%-tnom rastvoru sirćetne kiseline, u toku 15 minuta. Nakon ekstrakcije uzorak je centrifugiran na 1200 o/min, u toku 15 minuta i profiltriran kroz špric filter sa hidrofilinom poliamid/najlon (PA) membranom veličine pora 0,45 μ m (Millipore, „Bedford”, Masačusets, SAD).

Hromatografsko određivanje:

Određivanje sadržaja vitamina C u ekstraktima tropova izvršeno je HPLC tehnikom. Hromatogrami su snimljeni na talasnoj dužini od 265 nm. Razdvajanje vitamina C izvršeno je na NUCLEODUR Shinx RP koloni (250 mm \times 4 mm, 5 μ m prečnik čestica; „Machery Nagel”, Duren, Nemačka) koja je zaštićena odgovarajućom pretkolonom. Rastvor amonijum-acetata, koncentracije 0,1 mol/l (pH 5,1), korišćen je kao pokretna faza u HPLC analizi. Protok pokretne faze je bio 0,4 ml/min, a temperatura kolone 37 °C. Analize su trajale 6 minuta. Standard vitamina C je rastvoren 3%-nim rastvorom metafosforne kiseline, koja je rastvorena u 8%-tnom rastvoru sirćetne kiseline.

Na osnovu dobijenih hromatograma i kalibracionog dijagrama standardnog rastvora vitamina C izračunata je koncentracija vitamina C u uzorcima ekstrakta (mg/g suvog ekstrakta).

3.7. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA SPEKTROFOTOMETRIJSKIM METODAMA

3.7.1. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI NA DPPH RADIKALE

Uticaj liofiliziranih ekstrakata tropova bobičastog voća na sadržaj DPPH radikala određen je modifikovanom metodom po Chenu i saradnicima (1999).

Rastvori i reagensi:

1. 95% metanol;
2. Rastvor DPPH[•]: 1,97 mg DPPH[•] rastvoreno je u 50 ml 95% metanola;
3. Rastvor liofiliziranog ekstrakta tropa: 50 mg ekstrakta rastvoreno je u 10 ml destilovane vode (C=5 mg/ml);
4. Rastvor troloksa (sintetički antioksidant): 10 mg troloksa rastvoreno je u 10 ml metanola (C=1 mg/ml).

Spektrofotometrijsko određivanje:

Radna proba pripremljena je mešanjem 1 ml rastvora ekstrakta i 2 ml sveže pripremljenog metanolnog rastvora DPPH[•], a slepa proba mešanjem 1 ml destilovane vode i 2 ml metanolnog rastvora DPPH[•]. Reakciona smeša je izmešana vorteksom 1 min i ostavljena na tamnom mestu, na sobnoj temperaturi, 30 min. Opseg finalnih ispitivanih koncentracija ekstrakata tropova obe sorte maline je bio 0,005–0,200 mg/ml, a ekstrakata tropova obe sorte kupine i borovnice 0,003–0,250 mg/ml. Kao referentni sintetički antioksidant korišćen je troloks, koji je pripremljen u seriji metanolnih rastvora koncentracije 0,0025–0,2500 mg/ml. Apsorbanca je merena na 517 nm (A_{517}).

Antioksidativna aktivnost ekstrakata na DPPH[•] ($AA_{DPPH^{\bullet}}$) određena je na osnovu jednačine:

$$AA_{DPPH^{\bullet}} (\%) = 100 - (A_{uzorka}/A_{slepe\ probe}) \times 100$$

gde su:

A_{uzorka} – A_{517} uzorka,

$A_{slepe\ probe}$ – A_{517} slepe probe.

$EC_{50}^{DPPH^{\bullet}}$ vrednost definisana je kao koncentracija uzorka pri kojoj je neutralisano 50% DPPH[•] u uslovima koje definiše metoda, a dobijena je računski iz jednačine linearne regresije korišćenjem Microsoft Office Exel (Espin i sar, 2000).

3.7.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI NA ABTS^{•+} RADIKALE

Antioksidativna aktivnost liofiliziranih ekstrakata tropova bobičastog voća ispitana je na ABTS katjon radikale (ABTS^{•+}) modifikovanom metodom po Menau i saradnicima (2011).

Rastvori i reagensi:

1. 0,1 M Acetatni pufer pH 5,0: 0,5719 ml glacijalne sirćetne kiseline dodato je u 100 ml bidestilovane vode, a pH je podešen sa NaOH;
2. Rastvor ABTS: 5,5 mg ABTS rastvoreno je u 10 ml 0,1 M acetatnog pufera;
3. MnO₂ (na vrh špatule, za aktivaciju ABTS);
4. Rastvor liofiliziranog ekstrakta tropa: 50 mg ekstrakta tropa rastvoreno je u 10 ml destilovane vode (C=5 mg/ml);
5. Rastvor troloksa: 25 mg troloksa rastvoreno je u 10 ml etanola (C=2,5 mg/ml).

Spektrofotometrijsko određivanje:

Sveže pripremljen rastvor ABTS katjon radikala razblaživan je 0,1 M acetatnim puferom po potrebi, dok apsorbancu rastvora (slepe probe) ne postigne maksimalnu vrednost od 1,2. Nakon 35 min apsorbance reakcionih smeša bile su iznad 0,1.

Polazni rastvori ekstrakata razblaženi su 0,1 M acetatnim puferom kako bi se dobile serije razblaženja ekstrakata finalnih koncentracija 0,0006–0,0375 mg/ml za ETMM i ETMW, 0,0006–0,0150 mg/ml za ETKČ i ETKT i 0,0006–0,0500 mg/ml za ETB. Kao referentni sintetički antioksidant korišćen je troloks, koji je pripremljen u seriji rastvora koncentracije 0,01–2,00 mg/ml.

Reakciona smeša pripremljena je mešanjem 5 µl rastvora ekstrakta (radna proba) ili 0,1 M acetatnog pufera (slepa proba) i 3995 µl rastvora ABTS^{•+}. Apsorbancu je merena nakon 34 min na 414 nm (A_{414}).

Antioksidativna aktivnost ekstrakata na ABTS^{•+} ($AA_{ABTS^{\bullet+}}$) izračunata je na osnovu jednačine:

$$AA_{ABTS^{\bullet+}} (\%) = 100 - (A_{uzorka}/A_{slepe\ probe}) \times 100$$

gde su:

$A_{uzorka} - A_{414}$ uzorka,

$A_{slepe\ probe} - A_{414}$ slepe probe.

$EC_{50}^{ABTS^{•+}}$ vrednost definisana je kao koncentracija uzorka pri kojoj je neutralisano 50% $ABTS^{•+}$ radikala u uslovima koje definiše metoda, a dobijena je računski iz jednačine linearne regresije korišćenjem Microsoft Office Exel (Espin i sar, 2000).

3.7.3. ODREĐIVANJE UKUPNE REDUKCIONE SPOSOBNOSTI

Ukupna redukciona sposobnost (eng. *reducing power* - RP) liofiliziranih ekstrakata tropova bobičastog voća određena jespektrofotometrijskom metodom po Oyaizu (1986), koja se zasniva na praćenju apsorbance na talasnoj dužini od 700 nm u zavisnosti od koncentracije uzorka. Boje rastvora variraju od žute boje slepe probe, koja potiče od Fe^{3+} , do različitih nijansi plave i zelene boje (potiče od Fe^{2+} jona u rastvoru). Prisustvo redukujućih sredstava, odnosno antioksidanata, dovodi do redukcije Fe^{3+} u Fe^{2+} jon.

Rastvori i reagensi:

1. 1% kalijum-fericijanid ($K_3[Fe(CN)_6]$);
2. 10% trihlorsirćetna kiselina (formula);
3. 0,1% ferihlorid ($FeCl_3$);
4. 200 mmol/l Na-fosfatni pufer pH 6,6: Na-fosfatni pufer pH 6,6 dobijen je mešanjem 62,5 ml rastvora A i 37,5 ml rastvora B; **rastvor A:** 200 mmol/l NaH_2PO_4 (6 g NaH_2PO_4 rastvoreno je u 250 ml destilovane vode); **rastvor B:** 200 mmol/l Na_2HPO_4 (7,1 g Na_2HPO_4 rastvoreno je u 250 ml destilovane vode);
5. Rastvor liofiliziranog ekstrakta tropa: 100 mg ekstrakta rastvoreno je u 10 ml destilovane vode ($C=10$ mg/ml);
6. Rastvor troloksa (referentni sintetički antioksidant): 100 mg troloksa rastvoreno je u 10 ml metanola ($C=10$ mg/ml).

Spektrofotometrijsko određivanje:

Polazni rastvori ekstrakata razblaženi su vodom kako bi se dobile serije razblaženja ekstrakata koncentracija 0,05–1,00 mg/ml za ETMM i ETMW, odnosno 0,01–2,00 mg/ml za ETKČ, ETKT i ETB. Kao referentni standard antioksidanta korišćen je metanolni rastvor troloksa, koji je pripremljen u seriji rastvora koncentracije 0,05–1,00 mg/ml. 1 ml rastvora

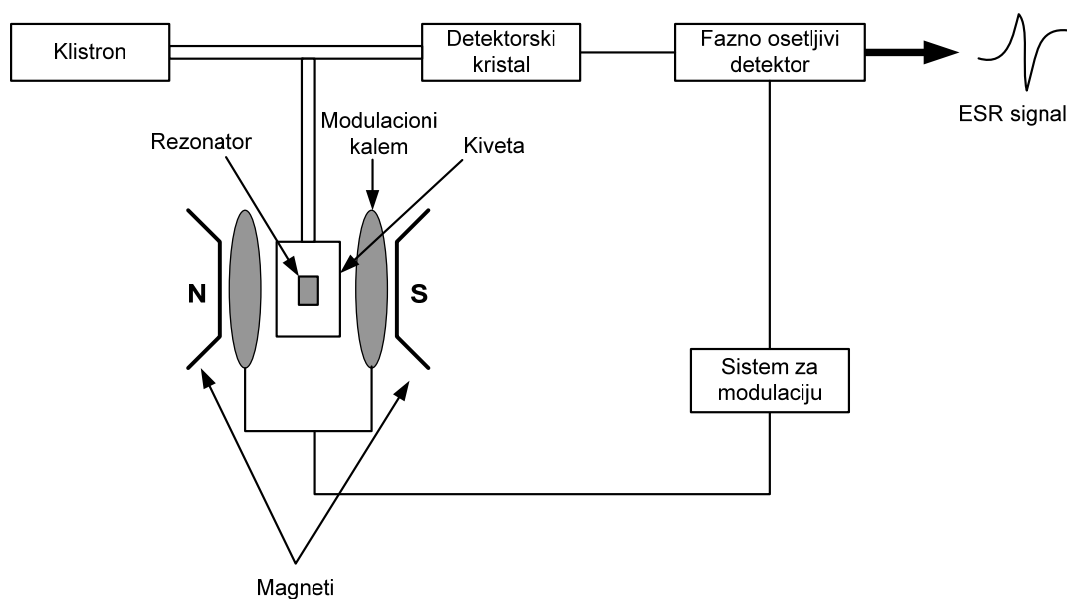
ekstrakta dodat je u 1 ml destilovane vode, 1 ml fosfatnog pufera i 1 ml rastvora $K_3[Fe(CN)_6]$. Istovremeno je pripremljena i slepa proba: 2 ml destilovane vode dodato je u 1 ml fosfatnog pufera i 1 ml rastvora $K_3[Fe(CN)_6]$. Sadržaj smeše je inkubiran 20 min na $50\text{ }^\circ\text{C}$ u vodenom kupatilu. Nakon hlađenja, u smešu je dodat 1 ml trihlorsirćetne kiseline. Zatim je smeša centrifugirana 10 min na 3000 o/min. Nakon centrifugiranja pažljivo je odvojeno 2 ml supernatanta u koji je dodato 2 ml destilovane vode i 0,4 ml 0,1% ferihlorida.

Apsorbance uzorka i slepe probe su izmerene na 700 nm (A_{700}). Za svaki ispitivani uzorak konstruisana je kriva zavisnosti između izmerenih vrednosti A_{700} i koncentracije rastvora ekstrakta.

$RP_{0,5}$ vrednost definisana je kao koncentracija uzorka pri kojoj vrednost A_{700} iznosi 0,50, a dobijena je računski iz jednačine linearne regresije.

3.8. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA ELEKTRON SPIN REZONANTNOM SPEKTROSKOPIJOM

Antioksidativna aktivnost liofiliziranih ekstrakata tropova bobičastog voća određena je elektron spin rezonantnom (ESR) spektroskopijom. Blok šema ESR spektrometra prikazana je na slici 3.2.



Slika 3.2. Blok šema ESR spektrometra

3.8.1. ESR SPEKTRALNA ANALIZA UTICAJA EKSTRAKATA NA STVARANJE I TRANSFORMACIJU SUPEROKSID ANJON RADIKALA

Superoksid anjon radikali ($O_2^{\bullet-}$) su pripremljeni rastvaranjem KO_2 /kraunetar (10 mM/20 mM) u osušenom DMSO. Reakciona smeša se sastojala od 5 μ l ovog rastvora, 0,5 ml osušenog DMSO i 5 μ l rastvora DMPO u DMSO (2 M) (Đilas i sar, 2012). Uticaj ekstrakata na formiranje i transformaciju njihovih DMPO/OOH „spin adukata” ispitana je dodavanjem dimetilformamidnih rastvora ekstrakata, koncentracije 10 mg/ml, u reakcionu smešu u opsegu finalnih koncentracija:

ETMM i ETMW: 0,01–2,50 mg/ml;

ETKČ i ETKT: 0,02–1,00 mg/ml;

ETB: 0,01–1,50 mg/ml.

Paralelno je ispitan i uticaj dimetilformamidnog rastvora troloksa (referentni sintetički antioksidant) na stvaranje i transformaciju $O_2^{\bullet-}$, u opsegu koncentracija 0,1–1,8 mg/ml.

Reakcione smeše su prenete u Bruker ER-160FC kvarcnu kivetu za rastvore, a spektri su snimljeni na ESR spektrometru, pri sledećim uslovima:

– frekvencija modulacije	100 kHz
– amplituda modulacije	4,00 G
– vremenska konstanta	40,96 ms
– vremenski opseg merenja	327,68 ms
– centar polja	3440,00 G
– ukupan opseg merenja	100,00 G
– frekvencija mikrotalasnog područja	9,64 GHz
– jačina struje	$1,00 \times 10^4$
– snaga mikrotalasnog područja	20 mW
– temperatura merenja	23 °C

Antioksidativna aktivnost ($AA_{O_2^{\bullet-}}$) ekstrakata definisana je izrazom:

$$AA_{O_2^{\bullet-}} (\%) = 100 \times (h_0 - h_x) / h_0$$

gde je:

h_0 – visina drugog pika ESR signala slepe probe;

h_x – visina drugog pika ESR signala uzorka sa ekstraktom ili sa troloksom.

$EC_{50}^{O_2^{\bullet-}}$ vrednost (koncentracija uzorka koja redukuje koncentraciju superoksid anjon radikala u uslovima koje definiše metoda za 50%) izračunata je iz grafika zavisnosti $AA_{O_2^{\bullet-}}$ (%) od koncentracije uzorka.

3.8.2. ESR SPEKTRALNA ANALIZA UTICAJA EKSTRAKATA NA STVARANJE I TRANSFORMACIJU HIDROKSIL RADIKALA

Hidroksil radikali ($\bullet OH$) dobijeni su u Fentonovoj reakciji i detektovani „spin trapping“ metodom u sistemu koji se sastojao od: 0,2 ml H_2O_2 (2 mM), 0,2 ml $FeCl_2$ (0,3 mM), 0,2 ml N,N-dimetilformamida (DMF) i 0,2 ml DMPO (112 mM) kao „spin trapa“ (slepa proba) (Đilas i sar., 2012). Uticaj ekstrakata tropova bobičastog voća na stvaranje i transformaciju „spin adukata“ hidroksil radikala ispitan je dodavanjem dimetilformamidnih rastvora, koncentracije 10 mg/ml, u reakcioni sistem u opsegu finalnih koncentracija:

ETMM i ETMW: 0,01–0,50 mg/ml;

ETKČ i ETKT: 0,10–3,00 mg/ml;

ETB: 0,75–7,00 mg/ml.

Paralelno je ispitan i uticaj sintetičkog antioksidanta troloksa na stvaranje i transformaciju „spin adukata“ $\bullet OH$, u opsegu koncentracija 0,10–0,80 mg/ml.

ESR spektri snimljeni su 2,5 min nakon mešanja i prenošenja u Bruker ER-160FC kvarcnu kivetu za vodene rastvore, na ESR spektrometru, pri sledećim radnim karakteristikama:

– frekvencija modulacije	100 kHz
– amplituda modulacije	0,226 G
– vremenska konstanta	80,72 ms
– vremenski opseg merenja	327,68 ms
– centar polja	3440,00 G
– ukupan opseg merenja	100,00 G
– frekvencija mikrotalasnog područja	9,64 GHz
– jačina struje	$5,00 \times 10^5$
– snaga mikrotalasnog područja	20 mW
– temperatura merenja	23 °C

Antioksidativna aktivnost (AA_{OH}^{\bullet}) ekstrakata definisana je izrazom:

$$AA_{OH}^{\bullet}(\%) = 100 \times (h_0 - h_x)/h_0$$

gde je:

h_0 – visina drugog pika ESR signala slepe probe;

h_x – visina drugog pika ESR signala uzorka sa ekstraktom ili sa troloksom.

$EC_{50}^{\bullet OH}$ vrednost (koncentracija uzorka koja redukuje koncentraciju hidroksil radikala u uslovima koje definiše metoda za 50%) izračunata je iz grafika zavisnosti $AA^{\bullet OH}$ (%) od koncentracije uzorka.

3.9. ODREĐIVANJE ANTIHIPERGLIKEMIJSKE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA

Uticaj liofiliziranih ekstrakata tropova bobičastog voća na inhibiciju aktivnosti α -glukozidaze (antihiperглиkemijska aktivnost) određen je modifikovanom metodom po Chanu i saradnicima (2010). Metoda se zasniva na merenju porasta apsorbance na 405 nm koja potiče od 4-nitrofenola oslobođenog iz 4-nitrofenil- α -D-glukopiranozidaze (pripremljene u 10 mM fosfatnom puferu, pH 7) nakon 10 minuta inkubacije sa ispitivanim ekstraktom na 37 °C.

Rastvori i reagensi:

1. Pufer: 10 mM kalijum-fosfat, pH 7;
2. Supstrat 4-nitrofenil α -D-glukopiranozid (2 mM): 3,01 mg supstrata rastvoreno je u 5 ml pufera;
3. Enzim α -glukozidaza: 1,35 mg enzima rastvoreno je u 1 ml pufera, odmeren je alikvot od 40 μ l u posudu od 10 ml i dopunjeno do crte;
4. Rastvori uzoraka: 100 mg ekstrakta tropa preliveno sa 1 ml pufera, smeša je promešana na vorteksu u toku jednog minuta, zatim centrifugirana u trajanju od 2 min na 3000 o/min, i nakon toga je odvojen supernatant.

Postupak:

Reakcione smeše su pripremljene u otvorima mikrotitar ploča na sledeći način: 100 μ l supstrata je pomešano sa 20 μ l uzorka i 100 μ l rastvora enzima. Apsorbanca 4-nitrofenola oslobođenog iz 4-nitrofenil- α -D-glukopiranozida izmerena je na 405 nm, pre i nakon inkubacije od 10 min na 37°C.

Slepa proba kontrole se sastojala od 100 μ l supstrata i 120 μ l pufera, kontrola od 100 μ l supstrata, 20 μ l pufera i 100 μ l enzima, slepa proba za uzorak od 100 μ l supstrata, 20 μ l

uzorka i 100 μ l pufera. Slepa proba kontrole i uzorka se nije pripremala u triplikatu (samo jedan otvor). Apsorbance kontrole i uzorka su merene u triplikatu (tri otvora), a od njih su oduzete vrednosti za odgovarajuće slepe probe.

Antihiperглиkemijska aktivnost (AHgA) izračunata je na osnovu jednačine:

$$\text{AHgA (\%)} = (\Delta A_{\text{kontrola}} - \Delta A_{\text{uzorka}}) / \Delta A_{\text{kontrola}} \times 100$$

gde su:

$\Delta A_{\text{kontrola}}$ i ΔA_{uzorka} – razlike apsorbanci reakcione smeše kontrole i reakcione smeše sa uzorkom pre dejstva enzima i nakon 10 minuta inkubacije sa enzimom.

EC_{50}^{AHgA} vrednost (koncentracija uzorka koja redukuje koncentraciju 4-nitrofenola za 50%) izračunata je iz grafika zavisnosti AHgA (%) od koncentracije ekstrakta.

3.10. ODREĐIVANJE ANTIPROLIFERATIVNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA

Gajenje ćelijskih kultura:

Za određivanje uticaja ekstrakata tropova bobičastog voća na rast ćelija korišćene su humane tumorske ćelijske linije HeLa (epitelni karcinom cerviksa), MCF7 (adenokarcinom dojke), HT-29 (adenokarcinom debelog creva), kao i linija humanih zdravih ćelija MRC-5 (fetalni fibroblasti pluća). Ćelije su kultivisane u DMEM (Dulbecco modifikacija Iglovog medijuma) medijumu sa dodatkom 100 μ l/ml fetalnog (telećeg) seruma (FBS), 100 μ g/ml streptomicina i 100 IU/ml penicilina, u erlenmajerima od 25 cm^2 na 37 $^{\circ}\text{C}$, u atmosferi 95% vazduha i 5% CO_2 i pri visokoj relativnoj vlažnosti. Ćelije su subkultivisane dva puta nedeljno upotrebom 1 mg/ml tripsina sa 0,4 mg/ml EDTA i tretirane u logaritamskoj fazi rasta.

Priprema uzoraka:

Od ekstrakata tropova bobičastog voća, početne koncentracije 50 mg/ml (RTB) ili 25 mg/ml (ETMM, ETMW, ETKČ i ETKT), rastvorenih u DMSO, pripremljena je serija od četiri ili više rastvora dvostrukih razblaženja u DMSO.

3.10.1. ODREĐIVANJE ANTIPROLIFERATIVNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA

Ćelije su inkubirane u prisustvu ekstrakata i lekova. Intenzitet ćelijskog rasta određen je merenjem ukupne količine proteina kolorimetrijskim SRB (sulforhodamin B) testom po Skehanu i saradnicima (1990), koji su modifikovali Četojević-Simin i saradnici (2009). SRB je anjonska boja koja se u blago kiseloj sredini elektrostatički vezuje za pozitivno naelektrisane aminokiselinske ostatke ćelijskih proteina dajući izrazito stabilne konjugate koji fluoresciraju jarko crveno. Nakon vezivanja proteina i ispiranja viška boje, dodatkom slabe baze TRIS, SRB se kvantitativno ekstrahuje iz ćelije i meri se apsorbancu na 540 nm (A_{540}) na osnovu koje se određuje ćelijski rast.

Postupak:

Suspenzije ćelija, gustine $3-5 \times 10^3$ ćelija po otvoru, dodate su u 199 μ l (za ekstrakte) ili 180 μ l (za lekove) DMEM medijuma sa 50 mg/ml FBS u mikrotitar ploče sa 96 otvora (Sarsdt, Njuton, SAD) i preinkubirane 24 h na 37°C. U svaki otvor dodato je po 1 μ l (ekstrakta) ili 20 μ l (leka) serije razblaženja do postizanja željenih finalnih koncentracija u opsegu od 0,156–5,000 mg/ml (ETB) i 0,005–2,500 mg/ml (ETMM, ETMW, ETKČ i ETKT). U kontrole je dodata ekvivalentna zapremina rastvarača. Koncentracija DMSO u ćelijskoj kulturi bila je ≤ 5 μ l/ml. Posle dodavanja uzoraka, probe su inkubirane 48 h na 37 °C, što je adekvatno vremenu od 2–3 generacije ćelija u kontroli. Nakon inkubacije, ćelije su fiksirane sa 0,5 g/ml TCA u toku 1 h na 4 °C, isprane destilovanom vodom i obojene sa 4 mg/ml SRB u 10 ml/l sirćetnoj kiselini (75 μ l po otvoru) u toku 30 min, na sobnoj temperaturi. Ploče su zatim isprane 4 puta sa 10 ml/l sirćetnom kiselinom (200 μ l po otvoru) da bi se uklonio višak boje. SRB je ekstrahovan iz ćelije dodatkom 10 mmol/l TRIS (200 μ l po otvoru). Apsorbancu dobijenog rastvora merena je na 540 nm (A_{540} , specifična talasna dužina za SRB) i 620 nm (A_{620} , referentna talasna dužina za uklanjanje apsorbance pozadine).

Efekat na ćelijski rast izražen je kao procenat od kontrole (K%) i računat prema formuli:

$$K (\%) = (A_u/A_k) \times 100$$

gde je:

A_u – apsorbancu uzorka izračunata prema formuli $A_u = A_{540} - A_{620}$,

A_k – apsorbancu kontrole (A_{620}).

Svi tretmani ispitani su u osam ponavljanja. Antiproliferativna aktivnost ekstrakta izražena je kao EC_{50} vrednost (koncentracija ekstrakta/standarda pri kojoj je ćelijski rast

inhibiran za 50%). Ova vrednost očitana je iz krivih zavisnosti ćelijskog rasta od finalne koncentracije ekstrakta/standarda dobijenih polinomskom regresionom analizom (software Origin 8.0, OriginLab, USA).

3.11. ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA

Antimikrobna aktivnost ekstrakata tropova maline, kupine i borovnice ispitana je agar-difuzionim metodama: disk-difuzionom i metodom „bunarčića“ (Mayo, 1998). Liofilizirani ekstrakti su rastvoreni u sterilnoj destilovanoj vodi do koncentracije 50 mg/ml. Kao test mikroorganizmi za ispitivanje antibakterijske aktivnosti ekstrakata bili su odabrani referentni sojevi (ATCC - American Type Culture Collection) i divlji sojevi (izolovani iz hrane i vode za piće) Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija. Sojevi Gram-negativnih bakterija bili su: *Escherichia coli* (ATCC 10536 i ATCC 25922), *Escherichia coli* (izolat iz čaja), *Salmonella* spp. (izolat iz čaja), *Salmonella* Tiphymurium (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) i *Pseudomonas aeruginosa* (izolat iz vode). Sojevi Gram-pozitivnih bakterija bili su: *Staphylococcus aureus* (ATCC 11632), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Staphylococcus saprophyticus* (izolat iz mlečnog krema), *Bacillus* sp. (izolat iz paprike) i *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932 i izolat iz mladog sira). Divlji sojevi bakterija indentifikovani su uređajem Vitek[®]2 Compact System (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francuska). Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata prema eukariotskim mikroorganizmima odabrani su sojevi kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* (112, Hefebank Weihenstephan) i *Candida albicans* (divlji izolat) i plesni *Aspergillus niger* (ATCC 16404 ili divlji izolat) i *Penicillium aurantiogriseum* (divlji izolat).

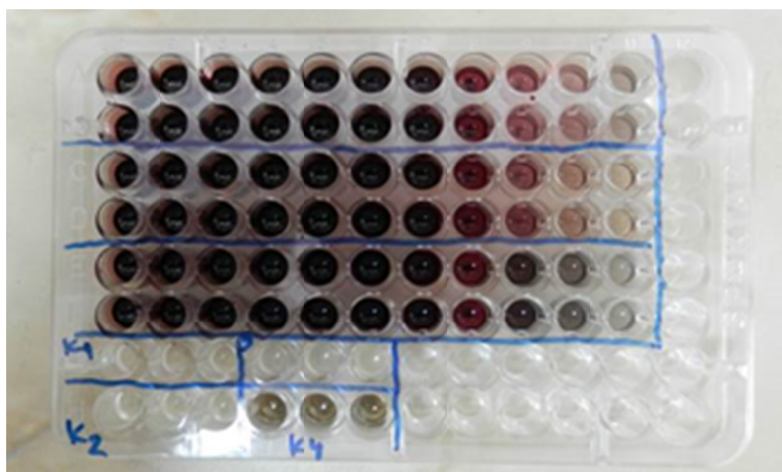
Bakterijske kulture su najpre gajene na kosom Müeller-Hinton agaru (Himedia, Mumbai, Indija) 24 h na 37 °C, osim *B. cereus* i *Bacillus* sp. koji su inkubirani na 30 °C. Čelije su zatim suspendovane u sterilnom rastvoru NaCl (0,9%). Koncentracija ćelija u suspenziji za inokulaciju je podešena na 1×10^6 cfu/ml, što je procenjeno uređajem Densicheck (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francuska). 2 ml ove suspenzije je homogenizovano sa 18 ml istopljenog (i temperiranog na 45 °C) Müeller-Hinton agara i razliveno u Petri ploče. Nakon što je podloga želirala, primenjena je disk difuziona metoda koja je podrazumevala nanošenje sterilnih diskova prečnika 6 mm (Himedia, Mumbai, Indija) na površinu istih, a zatim dodavanje 15 µl ispitivanog ekstrakta na diskove. Na svaku podlogu je nanet i po jedan disk sa anti-

biotikom (30 µg cefotaxime/10 µg clavulanic acid po disku, Bioanalyse[®], Ankara, Turska). U agar-difuzionoj metodi sa bunarčićima („metoda bunarčića“) su u inokuliranim i razlivenim podlogama, nakon želiranja, napravljeni bunarčići uz pomoć sterilne staklene cevi prečnika 9 mm i vakuum pumpe. U bunarčiće je zatim uneta odgovarajuća zapremina (50 i 100 µl) ekstrakta. U slučaju obe metode, nakon nanošenja ekstrakta, Petri ploče su ostavljene 1 h u frižideru na 8 °C kako bi se osigurala difuzija sastojaka ekstrakta u podlogu, nakon čega su ploče inkubirane 24 h na 37 °C, odnosno 30 °C (*B. cereus* i *Bacillus* sp.). Nakon inkubacije izmeren je prečnik zona inhibicije u mm. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata izvedeno je u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

Na identičan način su pripremljene i kulture kvasaca i plesni i izvedena inokulacija podloga za ispitivanje antifungalne aktivnosti ekstrakata disk-difuzionom metodom i „metodom bunarčića“. Jedina razlika je ta što je kao podloga za kultivaciju kultura korišćen Sabouraud dekstrozni agar-SDA (Himedia, Mumbai, Indija). Inkubacija podloga je vršena 48 h na 30 °C (za kvasce) i 5–7 dana na 25 °C (za plesni).

Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) ekstrakata izvedeno je mikrodilucionom metodom. Od početnih koncentracija ekstrakata tropova kupine (50 mg/ml za sve bakterijske sojeve osim za *Bacillus cereus* i *Bacillus* sp. gde je početna koncentracija bila 100 mg/ml), borovnice (100 mg/ml za sve bakterijske sojeve osim za *Bacillus cereus* i *Bacillus* sp. gde je početna koncentracija bila 200 mg/ml) i maline (50 mg/ml za sve bakterijske sojeve) pripremljene su serije opadajućih koncentracija. 1 ml suspenzije za inokulaciju gustine ćelija 1×10^6 cfu/ml je homogenizovano sa 9 ml Müeller-Hinton bujona (Himedia, Mumbai, Indija) duple koncentracije. Po 100 µl inokulisanog bujona je razliveno u mikrotitar ploče (Spektar, Čačak, Srbija). Zatim je u ista udubljenja (bunarčiće) mikrotitar ploče naneto po 100 µl ispitivanog ekstrakta odgovarajuće opadajuće koncentracije, zbog čega se koncentracija ekstrakta smanjuje dva puta, što je uzeto u obzir kod izražavanja rezultata.

Sve ploče sadržale su neinokulisanu kontrolu (blank; 100 µl neinokulisane podloge pomešano sa 100 µl ekstrakta najveće koncentracije) i pozitivnu kontrolu za svaki mikroorganizam (inokulisanu podlogu bez ekstrakta). Mikrotitar ploče (slika 3.3) su inkubirane 24 h na 37 °C, odnosno 30 °C (*B. cereus* i *Bacillus* sp.). Nakon perioda inkubacije, 100 µl iz svakog bunarčića zasejano je metodom poseva na Plate Count Agar (Himedia, Mumbai, Indija) i inkubirano pri istim uslovima.



Slika 3.3. Mikrotitar ploča sa ekstraktom tropa borovnice

Mikrodilucionom metodom određene su i MIC i minimalne fungicidne koncentracije (Minimal Fungicid Concentration, MFC) ekstrakata prema sojevima kvasaca i plesni koji su pokazali osetljivost u agar difuzionim testovima. Od početnih koncentracija ekstrakata tropova kupine (50 mg/ml za *Saccharomyces cerevisiae*) i maline (50 mg/ml za *Saccharomyces cerevisiae*, odnosno 200 mg/ml za plesni) pripremljene su serije opadajućih koncentracija. Kao podloga u mikrotitar pločama korišćen je Sabouraud dekstrozni bujon (Himedia, Mumbai, Indija). Inkubacija je vršena 48 h na 30 °C (za kvasce) i 5–7 dana na 25 °C (za plesni). Nakon perioda inkubacije, 100 µl iz svakog bunarčića zasejano je metodom poseva na SDA i inkubirano na isti način kao i mikrotitar ploče.

Određivanje MIC, MBC i MFC ekstrakata je izvedeno u 3 ponavljanja. Nakon perioda inkubacije izbrojane su kolonije i izračunat stepen inhibicije prema sledećem izrazu:

$$\text{Stepen inhibicije (\%)} = (N_0 - N)/N_0 \times 100$$

gde je:

N_0 – broj kolonija iz pozitivne kontrole;

N – broj kolonija iz bunarčića sa ekstraktom.

3.12. LABORATORIJSKA PROIZVODNJA VOĆNIH SOKOVA OBOGAĆENIH EKSTRAKTIMA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA

Matični sok odabranog bobičastog voća (malina sorte Meeker i Willamette, kupina sorte Čačanska bestrna i Thornfree i divlja borovnica) dobijen je u laboratorijskim uslovima

ceđenjem svežeg voća. Od dobijenih matičnih sokova pripremljeni su 10% vodeni rastvori (S). U razblaženi matični sok (100 ml) dodata je određena količina liofiliziranog ekstrakta tropa istog voća (1,9054 g ETMM, 1,1449 g ETMW, 0,6630 g ETKČ, 0,5664 g ETKT, odnosno 0,4833 g ETB). Koncentracija fenolnih jedinjenja iz ekstrakta tropa (izražena kao ekvivalent galne kiseline) u dobijenom obogaćenom voćnom soku (OS) iznosila je 50 mg/100 ml obogaćenog soka.

3.13. ODREĐIVANJE SADRŽAJA POLIFENOLNIH JEDINJENJA U SOKOVIMA BOBIČASTOG VOĆA

3.13.1. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH POLIFENOLA

Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u matičnim i obogaćenim voćnim sokovima određen je metodom po Folin-Ciocalteu (Singleton i sar, 1999). Određivanje je rađeno po postupku koji je opisan u poglavlju 3.4.1, samo što je za pripremu reakcione smeše je umesto 0,1 ml rastvora ekstrakta odmeravana ista zapremina uzorka soka. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u soku izražen kao ekvivalent galne kiseline (mg GAE/ml soka).

3.13.2. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH FLAVONOIDA

Ukupni flavonoidi u matičnim i obogaćenim voćnim sokovima određeni su metodom po Zhishenu i saradnicima (1999), opisanom u poglavlju 3.4.2.

Rastvori sokova pripremljeni su na isti način, kao i standardni rastvori rutina, samo što je umesto rastvora rutina korišćen 1 ml matičnog (10% vodeni rastvor) ili obogaćenog soka. Apsorbance reakcionih smeša izmerene su na talasnoj dužini od 510 nm (A_{510}).

Na osnovu izmerene apsorbance ispitivanog soka, primenom jednačine navedene u poglavlju 3.4.2, izračunata je koncentracija ukupnih flavonoida (mg/ml), a zatim je sadržaj ukupnih flavonoida u soku izražen kao ekvivalent rutina (mg RE/ml soka).

3.13.3. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH ANTOCIJANA

Sadržaj ukupnih antocijana u matičnim i obogaćenim voćnim sokovima određen je „singl” metodom (Lee i sar, 2006). Određivanje je rađeno po postupku opisanom u poglavlju 3.4.3, pri čemu je umesto vodenog rastvora ekstrakta odmeravana ista zapremina uzorka soka. Sadržaj antocijana u soku izražen je kao ekvivalent cijanidin 3-*O*-glukozida (mg CyGE/ml soka).

3.14. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI SOKOVA BOBIČASTOG VOĆA

3.14.1. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI NA DPPH RADIKALE

Antioksidativna aktivnost sokova (10%-vodeni rastvor matičnog soka odabranog bobičastog voća bez i sa dodatkom liofiliziranog ekstrakta tropa istog voća) određena je spektrofotometrijski, DPPH testom. U 1 ml vodenog rastvora soka različitih koncentracija dodata su 3 ml metanola i 1 ml svežeg rastvora DPPH[•] koncentracije 0,3 mM (0,03 g je rastvoreno u 250 ml metanola). Uzorci su mešani 1 min i ostavljeni na sobnoj temperaturi 10 min. Nakon toga, apsorbanca uzorka izmerena je na talasnoj dužini od 517 nm. Paralelno je pripremljena i slepa proba. Finalni udeo soka u reakcionoj smeši bio je u opsegu 0,0001–0,1 ml soka/ml reakcione smeše.

AA_{DPPH} vrednost sokova definisana je izrazom:

$$AA_{DPPH} (\%) = 100 - (A_{uzorka}/A_{slepe\ probe}) \times 100$$

gde su:

A_{uzorka} – apsorbanca uzorka,

$A_{slepe\ probe}$ – apsorbanca slepe probe.

EC_{50}^{DPPH} vrednost (udeo soka u reakcionoj smeši, izražen u ml soka/ml reakcione smeše, čija AA_{DPPH} vrednost dostiže 50%) određena je na osnovu linearne zavisnosti AA_{DPPH} vrednosti od udela soka u reakcionoj smeši.

3.14.2. ODREĐIVANJE UKUPNE REDUKCIONE SPOSOBNOSTI

Ukupna redukciona sposobnost (RP) matičnih i obogaćenih voćnih sokova određena je spektrofotometrijskom metodom po Oyaizu (1986), koja je opisana u poglavlju 3.7.3.

Za analizu je pripremljena serija razblaženih vodenih rastvora sokova. Udeo soka u 1 ml rastvora bio u opsegu 0,01–0,5 ml. Apsorbance uzorka i slepe probe su izmerene na 700 nm (A_{700}). Za svaki ispitivani uzorak konstruisana je kriva zavisnosti između izmerenih vrednosti A_{700} i koncentracije rastvora sokova.

$RP_{0,5}$ vrednost definisana je kao koncentracija uzorka soka pri kojoj vrednost A_{700} iznosi 0,50, a dobijena je računski iz jednačine linearne regresije.

3.15. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Svi rezultati su prikazani kao srednje vrednosti tri ponavljanja \pm standardna greška, osim ako nije naznačeno drugačije. Podaci su obrađeni primenom softverskih paketa Microsoft Excel for Windows 10 (Windows, Redmond, Vašington, SAD), Origin 7 (OriginLab Corporation, Northampton, SAD, 1991-2002), OriginPro 8 SRO (OriginLab Corporation, Northampton, SAD) i Statistica (StatSoft, Inc. , version 10.0.Talsa, Oklahoma, SAD). Stepen linearne korelacije između dve varijable je meren korišćenjem Pirsonovog koeficijenta korelacije ($|r|$).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

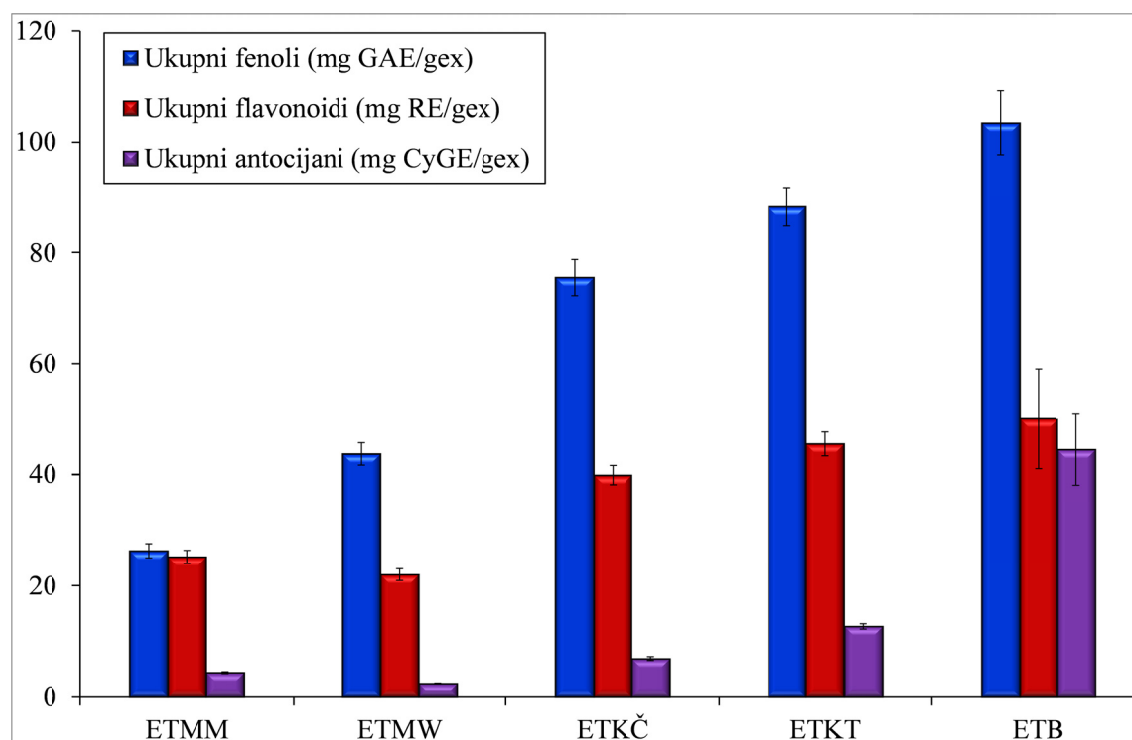
4.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE POLIFENOLNIH JEDINJENJA U EKSTRAKTIMA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA

Bobičasto voće sa visokim sadržajem biološki aktivnih jedinjenja, može da odigra veoma značajnu ulogu u smanjenju rizika od mnogih hroničnih bolesti (Turmanidze i sar, 2016).

Razumevanje fiziologije i biohemijske osnove sadržaja vitamina i antioksidanata tokom razvoja i sazrevanja ploda je potrebno kako bi se odabralo najbolje vreme za berbu i kako bi se sprečio gubitak hranljivih materija tokom berbe i naknadne obrade (Miret i sar, 2016). Samim tim količine nutrijenata i fitohemikalija bile bi veće i u sporednim proizvodima koji zaostaju nakon prerade voća u sok, vino i marmeladu (Dabbou i sar, 2017).

Sporedni proizvodi voća i povrća su obećavajući izvori visoko vrednih supstanci poput fitohemikalija (karotenoida, fenola i flavonoida), antioksidanata, antimikrobnih sredstava, vitamina i dijetetskih masti, koji imaju povoljne tehnološke ili nutritivne osobine (Dabbou i sar, 2017).

Sadržaj antioksidativnih jedinjenja polifenolne strukture, ukupnih polifenola (TPh), ukupnih flavonoida (TF) i ukupnih antocijana (TAc) u ekstraktima tropova maline, kupine i borovnice određen je odgovarajućim spektrofotometrijskim metodama. Na slici 4.1. prikazan je uporedni dijagram rezultata spektrofotometrijskih određivanja sadržaja polifenolnih jedinjenja u ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB.



Slika 4.1. Sadržaj polifenolnih jedinjenja u ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB

Sadržaj TPh određen je metodom po Folin-Ciocalteu, koja se zasniva na redukcionoj sposobnosti fenolnih hidroksilnih grupa. U ETB je određen najviši sadržaj TPh (103,46 mg GAE/g suvog ekstrakta), dok je najniži u ETMM (26,30 mg GAE/g suvog ekstrakta). Vulić i saradnici (2011) su ispitujući sadržaj polifenolnih jedinjenja u tropovima maline, kupine i borovnice takođe ustanovili prisutnost ukupnih fenolnih jedinjenja istim redosledom: trop borovnice > trop kupine > trop maline. Ovaj redosled sadržaja TPh utvrđen je i za cele plodove ovih bobica: borovnica > kupina > malina (Nila i sar, 2014). De Souza i saradnici (2014) su poredeći literaturne podatke za različito bobičasto voće ustanovili izuzetno visok sadržaj ukupnih fenola za kupinu (850,52 mg GAE/100 g), dok je znatno niži sadržaj utvrđen u malini i borovnici (357,83 mg GAE/100 g, odnosno 305,38 mg GAE/100 g). To ukazuje da na sadržaj antioksidanata polifenolne strukture u voću utiču: genetski faktori (vrsta, sorta), stepen zrelosti, uslovi na terenu i naknadna obrada (Manganaris i sar, 2014, Genskowsky i sar, 2016, Kazimierczak i sar, 2016).

Iako je sadržaj TPh u ekstraktima tropova maline (ETMM i ETMW) niži nego u ETKČ, ETKT i ETB, oni takođe predstavljaju značajan izvor ovih jedinjenja.

Sadržaj TF, određen spektrofotometrijskom metodom po Zhishen i saradnicima (1999) je bio najviši u ETB (50,05 mg RE/g suvog ekstrakta), a najniži u ETMW (22,00 mg RE/g suvog ekstrakta). Na biosintezu flavonoida u voću značajno utiče fotoperiod, intezitet

svetlosti (količina) i kvalitet svetlosti (spektar), kao i interakcija svetlosti sa drugim faktorima sredine (Zoratti i sar, 2014). Na sadržaj flavonoida utiču i uslovi gajenja i kasnije tretiranje biljnih sirovina. Vulić i saradnici (2011) su ustanovili viši sadržaj TF u tropu maline (591,65 mg/100 g svežeg tropa), nego u tropu kupine (245,48 mg/100 g svežeg tropa), što potvrđuje činjenicu da sadržaj ovih jedinjenja zavisi od mnogo faktora.

ETB je izuzetno bogat antocijanima (44,63 mg CyGE/g suvog ekstrakta), koji čine oko 90% ukupnih flavonoida i oko 43% ukupnih polifenola. U ETMW je određen najniži sadržaj TAc (2,32 mg CyGE/g suvog ekstrakta). Vulić i saradnici (2011) su takođe ustanovili da je sadržaj ukupnih antocijana u tropu borovnice čak oko dvadeset puta veći nego u tropu maline, odnosno oko devet puta nego u tropu kupine. Basu i saradnici (2010) i Nohynek i saradnici (2006) su ispitujući veći broj bobica ustanovili da se borovnica ističe po visokom sadržaju antocijana. Marhuenda i saradnici (2016) su ipak HPLC-DAD analizom ustanovili da je sadržaj ukupnih antocijana u kupini čak oko osam puta viši nego u borovnici, što takođe pokazuje da sadržaj ovih jedinjenja zavisi od mnogobrojnih faktora (vrsta, sorta, stepen zrelosti i dr).

Studije o prisustvu antocijana u grožđu i crvenom vinu dominiraju, ali mnogobrojno drugo voće, posebno bobičasto voće i pojedino povrće, takođe su bili predmet brojnih istraživanja (Amarowicz i sar, 2009). Međutim, literaturnih podataka o sporednim proizvodima voća i povrća nema mnogo, s obzirom da je ova oblast istraživanja tek u ekspanziji.

Sadržaj TPh određen metodom po Folin-Ciocalteu ne pruža kompletnu sliku o kvantitetu i kvalitetu polifenolnih jedinjenja u ispitivanim ekstraktima. Različita fenolna jedinjenja imaju različit odziv na Folin-Ciocalteu reagens (Stajčić, 2012). Moguće prisustvo interferirajućih jedinjenja (šećeri, aromatični amini, sumpor-dioksid, vitamin C, organske kiseline, Fe(II) i ostale supstance koje nisu polifenolnog porekla), utiču na nerealno povećanje rezultata (Singelton, 1999). Zbog toga je kompletna kvalitativna i kvantitativna analiza polifenolnih jedinjenja u ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB izvršena primenom HPLC metode.

4.2. HPLC ANALIZA POLIFENOLNIH JEDINJENJA U EKSTRAKTIMA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA

Identifikacija i kvantifikacija fenolnih kiselina i flavonoida u ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB izvršena je RP-HPLC-UV/Vis tehnikom. Detekcija razdvojenih pikova izvršena je na tri talasne dužine: 280 nm, 320 nm i 360 nm.

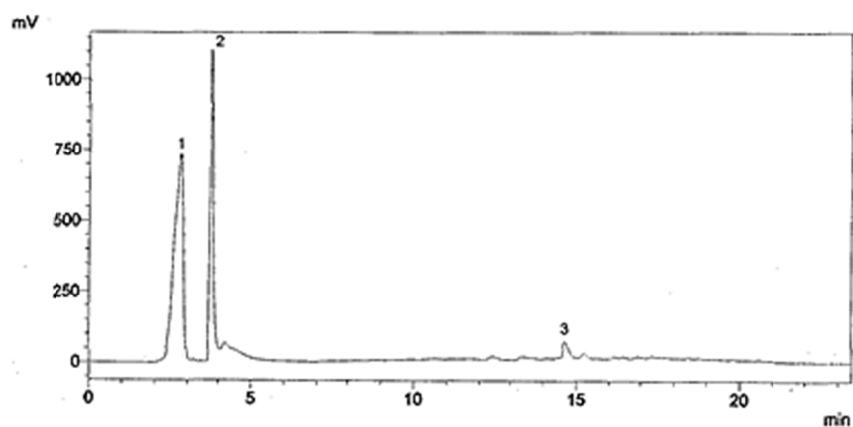
Identifikacija antocijana u liofiliziranim ekstraktima tropova izvršena je primenom HPLC-DAD-ESI/MS n , a kvantifikacija primenom RP-HPLC-DAD tehnike.

4.2.1. HPLC ANALIZA ETMM I ETMW

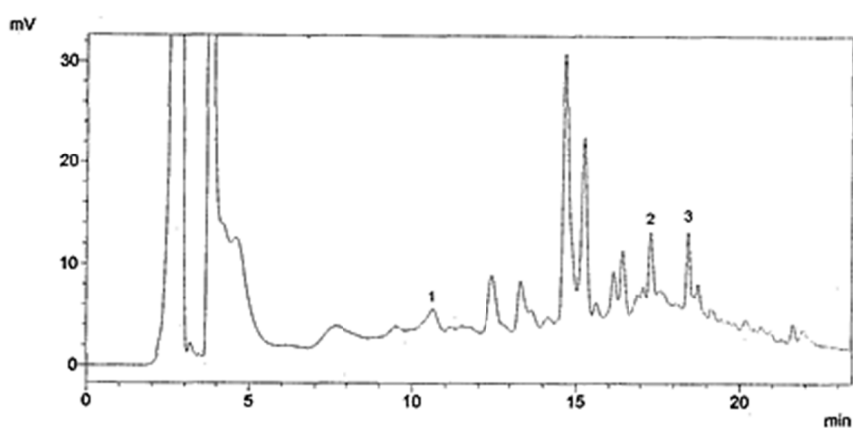
Na slici 4.2. prikazani su HPLC hromatogrami fenolnih kiselina i flavonoida detektovanih u ETMW na talasnim dužinama 280 nm (a), 320 nm (b) i 360 nm (c), a na slici 4.3. prikazan je HPLC hromatogram antocijana u ETMM.

U tabeli 4.1. prikazani su rezultati HPLC analize polifenolnih jedinjenja u ETMM i ETMW. U ETMM i ETMW kao dominantne komponente detektovane su protokatehinska (9,779 mg/g suvog ekstrakta, odnosno 12,779 mg/g suvog ekstrakta) i galna kiselina (4,534mg/g suvog ekstrakta, odnosno 7,302 mg/g suvog ekstrakta). Galna kiselina učestvuje u stvaranju hidrolizujućih galotanina, a njenom kondenzacijom nastaje dimer - elaginska kiselina (Tumbas, 2012), koji takođe ulazi u sastav elagitanina.

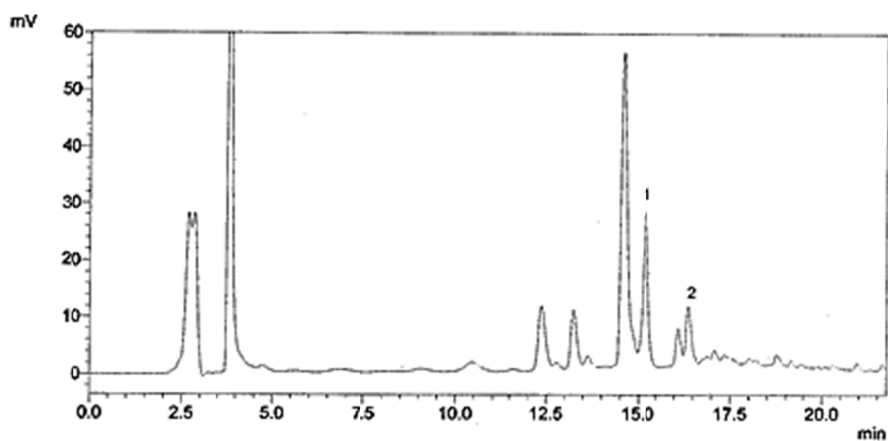
Prema većini literaturnih podataka, jedno od najznačajnijih jedinjenja iz klase polifenola u plodu maline jeste elaginska kiselina i elagitanini. Elaginska kiselina je detektovana i u ispitivanim ekstraktima tropova i dominantnija je u ETMW (0,629 mg/g suvog ekstrakta), nego u ETMM (0,122 mg/g suvog ekstrakta). Zbog svojih antioksidativnih i antivirusnih osobina (Thakur i sar, 2008), elaginska kiselina se može koristiti kao dodatak hrani (Komorsky-Lovrić i sar, 2011). Elagitanini iz bobica familije *Rubus* uključuju dimerni sanguin H-6, sanguin H-10 i trimerni lambertianin C (Kähkönen i sar, 2012). S obzirom da primenjena metoda nije obuhvatala identifikaciju elagitanina, kvantifikacija ovih jedinjenja nije izvršena u ovoj tezi.



a)

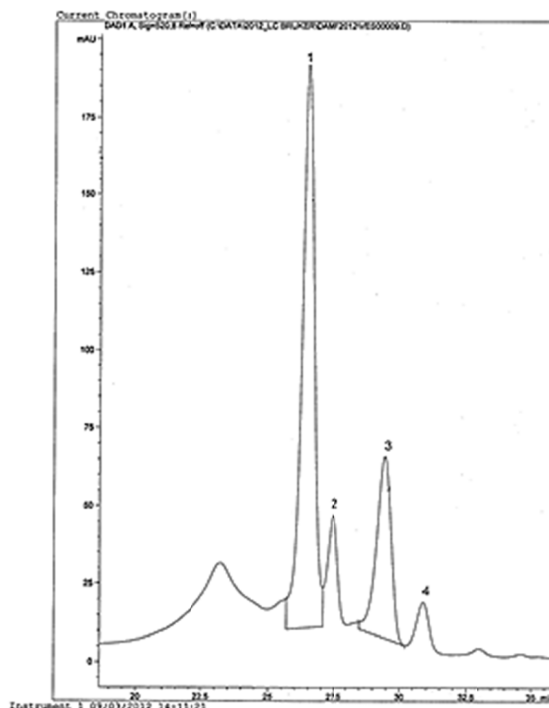


b)



c)

Slika 4.2. HPLC hromatogrami ETMW: a) 1 - galna kiselina, 2 - protokatehinska kiselina i 3- elaginska kiselina, razdvojene komponente detektovane su na 280 nm; b) 1 - kafena kiselina, 2 - sinapinska kiselina i 3 - ferulna kiselina, razdvojene komponente detektovane su na 320 nm; c) 1 - rutin i 2 - miricetin, razdvojene komponente detektovane su na 360 nm.



Slika 4.3. HPLC hromatogram ETMM: 1 - cijanidin-3-soforozid, 2 - cijanidin-3-(2-glukozilrutinozid), 3 - cijanidin-3-glukozid i 4 - cijanidin-3-rutinozid, razdvojene komponente detektovane su na 520 nm.

Tabela 4.1. Kvalitativan i kvantitativan sastav polifenolnih jedinjenja u ETMM i ETMW

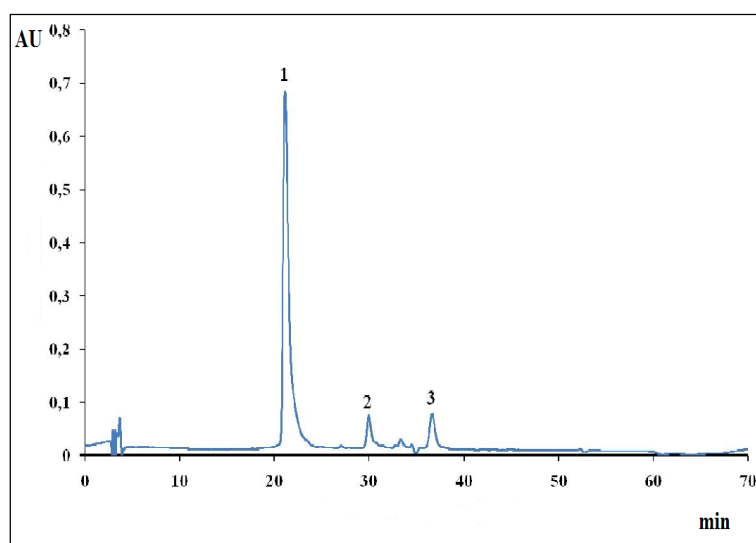
Fenolna jedinjenja	Sadržaj (mg/g suvog ekstrakta)	
	ETMM	ETMW
Protokatehinska kiselina	9,779 ± 0,458	12,779 ± 0,456
Galna kiselina	4,534 ± 0,213	7,302 ± 0,436
Siringinska kiselina	n.d.	0,154 ± 0,006
Kafena kiselina	n.d.	0,046 ± 0,003
Ferulna kiselina	0,194 ± 0,007	0,024 ± 0,001
Sinapinska kiselina	0,037 ± 0,001	0,039 ± 0,001
Elaginska kiselina	0,122 ± 0,005	0,629 ± 0,023
Katehin	n.d.	1,795 ± 0,069
Rutin	0,052 ± 0,002	0,077 ± 0,002
Miricetin	0,009 ± 0,000	0,026 ± 0,001
Luteolin	0,004 ± 0,000	0,003 ± 0,000
Kvercetin	0,003 ± 0,000	0,002 ± 0,000
Cijanidin-3-soforozid	2,280 ± 0,111	1,244 ± 0,042
Cijanidin-3-(2-glukozilrutinozid)	0,285 ± 0,012	n.d.
Cijanidin-3-glukozid	0,675 ± 0,023	0,047 ± 0,001
Cijanidin-3-rutinozid	0,180 ± 0,006	n.d.

n.d. - nije detektovan

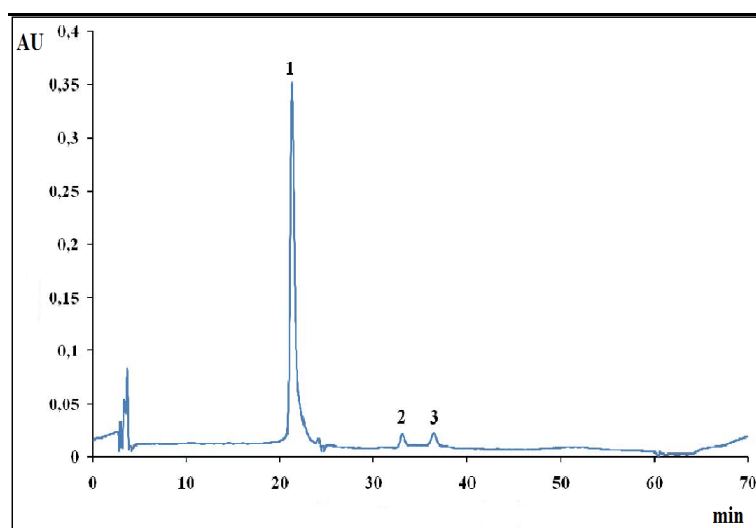
U plodu maline dominantan antocijan je cijanidin-3-soforozid (Borges i sar, 2009, Kula i sar, 2016), koji je dominantan i u ETMM i ETMW. Flavanoli i flavonoli su prisutniji u ETMW, dok su antocijani više zastupljeni u ETMM.

4.2.2. HPLC ANALIZA ETKČ I ETKT

Na slici 4.4. prikazani su hromatogrami antocijana detektovanih u ETKČ (a) i ETKT (b).



a)



b)

Slika 4.4. HPLC hromatogrami ETKČ (a) i ETKT (b); 1- cijanidin-3-glukozid, 2- cijanidin-3-malonilglukozid i 3- cijanidin-3-dioksalilglukozid, razdvojene komponente detektovane su na 520 nm.

Kvalitativan i kvantitativan sastav polifenolnih jedinjenja u ETKČ i ETKT prikazan je u tabeli 4.2. Od fenolnih kiselina, derivati hidroksibenzojeve kiseline su dominantna jedinjenja u ispitivanim ekstraktima tropa kupine, kao i u ETMM i ETMW. U ETKČ su najdominantnije galna i vanilinska kiselina (10,462 mg/g suvog ekstrakta, odnosno 9,569 mg/g suvog ekstrakta), dok su u ETKT najzastupljenije protokatehinska i vanilinska kiselina (27,929 mg/g suvog ekstrakta, odnosno 13,089 mg/g suvog ekstrakta).

Tabela 4.2. Kvalitativan i kvantitativan sastav polifenolnih jedinjenja u ETKČ i ETKT

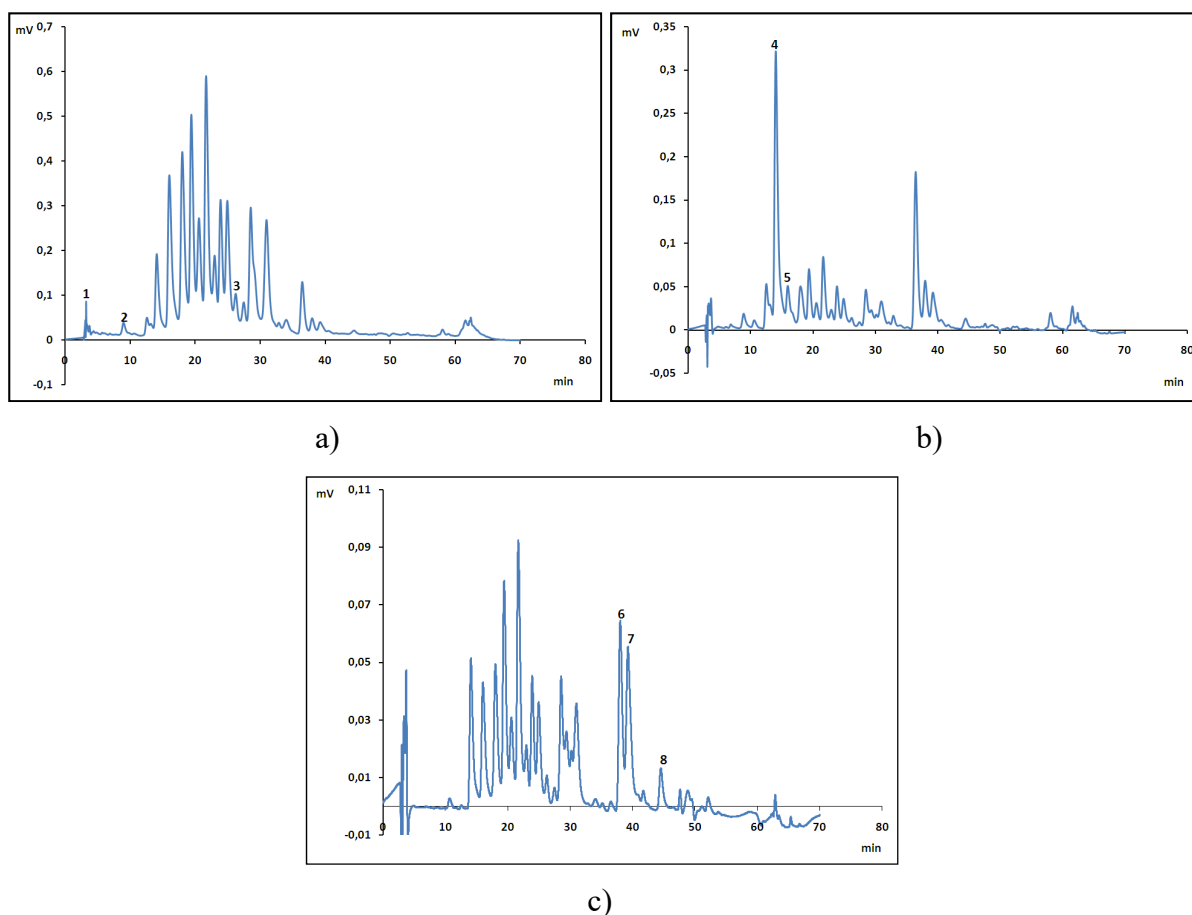
Fenolna jedinjenja	Sadržaj (mg/g suvog ekstrakta)	
	ETKČ	ETKT
Kafena kiselina	0,202 ± 0,010	0,462 ± 0,023
Protokatehinska kiselina	3,364 ± 0,168	27,929 ± 1,442
Siringinska kiselina	5,605 ± 0,280	6,421 ± 0,321
Ferulna kiselina	0,135 ± 0,007	0,093 ± 0,046
Vanilinska kiselina	9,555 ± 0,478	13,089 ± 0,654
Kumarinska kiselina	0,041 ± 0,002	0,124 ± 0,006
Gentisinska kiselina	0,719 ± 0,036	0,702 ± 0,004
Sinapinska kiselina	0,129 ± 0,006	0,153 ± 0,008
Galna kiselina	10,462 ± 0,523	9,569 ± 0,478
Elaginska kiselina	0,410 ± 0,020	0,604 ± 0,030
Miricetin	0,100 ± 0,005	0,116 ± 0,006
Rutin	0,773 ± 0,039	0,558 ± 0,028
Katehin	1,627 ± 0,081	1,869 ± 0,093
Epikatehin	1,471 ± 0,074	1,174 ± 0,059
Epikatehinalat	0,834 ± 0,042	0,443 ± 0,022
Kvercetin	0,038 ± 0,002	0,022 ± 0,001
Luteolin	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,000
Cijanidin-3-glukozid	15,722 ± 0,792	15,486 ± 0,772
Cijanidin-3-malonilglukozid	0,213 ± 0,015	2,101 ± 0,110
Cijanidin-3-dioksalilglukozid	0,246 ± 0,017	2,553 ± 0,136

Flavanoli su zastupljeni i u ETKČ i ETKT, katehin (1,627 mg/g suvog ekstrakta, odnosno 1,869 mg/g suvog ekstrakta) i epikatehin (1,471 mg/g suvog ekstrakta, odnosno 1,174 mg/g suvog ekstrakta), kao i katehin esterifikovan galnom kiselinom. Flavonoli su zastupljeniji u ekstraktima tropa kupine nego u ETMM i ETMW.

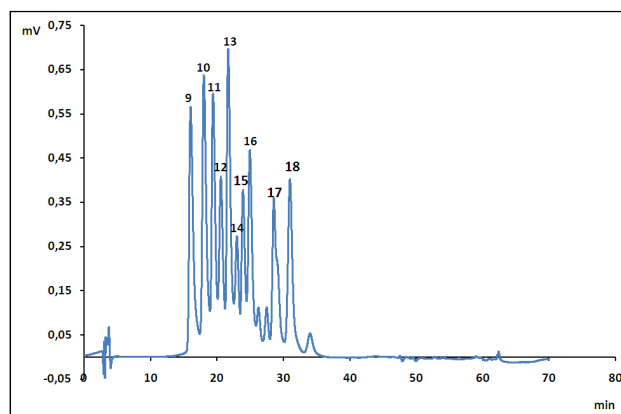
Cho i saradnici (2004) su saopštili da je pet zajedničkih antocijana: cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-rutinozid, cijanidin-3-ksilozid, cijanidin-3-malonilglukozid, cijanidin-3-dioksalilglukozid, prisutno u različitim sortama kupine. U ETKČ i ETKT prisutni su cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-malonilglukozid i cijanidin-3-dioksalilglukozid, a najdominantniji antocijanin je cijanidin-3-glukozid (15,722 mg/g suvog ekstrakta, odnosno 15,486 mg/g suvog ekstrakta), koji je i prema istraživanjima Cho i saradnika (2004) najdominantniji u plodu kupine.

4.2.3. HPLC ANALIZA ETB

Na slici 4.5. prikazani su HPLC hromatogrami polifenolnih jedinjenja detektovanih u ETB na talasnim dužinama 280 nm (a), 320 nm (b) i 360 nm (c). Na slici 4.6. prikazan je HPLC hromatogram antocijana u ETB, detektovanih na talasnoj dužini 520 nm.



Slika 4.5. HPLC hromatogram ETB: a) 1 - protokatehinska kiselina, 2 - galna kiselina i 3 - elaginska kiselina, razdvojene komponente detektovane su na 280 nm; b) 4 - ferulna kiselina i 5 - sinapinska kiselina, razdvojene komponente detektovane su na 320 nm c) 6 - rutin, 7 - miricetin i 8 - kempferol, razdvojene komponente detektovane su na 360 nm.



Slika 4.6. HPLC hromatogram antocijana ETB: 9- delfinidin-3-glukozid, 10- cijanidin-3-galaktozid, 11- cijanidin-3-glukozid, 12- petunidin-3-galaktozid, 13- cijanidin-3-arabinozid, 14- petunidin-3-glukozid, 15- cijanidin-3-ksilozid, 16- malvidin-3-galaktozid, 17- peonidin-3-glukozid i 18- malvidin-3-arabinozid, razdvojene komponente detektovane su na 520 nm.

U tabeli 4.3. je prikazan kvalitativan i kvantitvan sastav polifenolnih jedinjenja u ETB.

Dominantna jedinjenja u ETB su protokatehinska i galna kselina (35,180 mg/g suvog ekstrakta, 31,981 mg/g suvog ekstrakta). Od flavonola identifikovani su rutin, miricetin i kempferol, a dominantan je rutin (2,353 mg/g suvog ekstrakta). ETB se posebno ističe po visokom sadržaju antocijana.

Delfinidin-3-galaktozid, delfinidin-3-arabinozid, petunidin-3-galaktozid, malvidin-3-galaktozid i malvidin-3-arabinozid su prema Cho i saradnicima (2004) najzastupljeniji antocijani u pet različitih genotipova borovnice. HPLC analizom antocijana utvrđeno je da su u ispitanom ETB prisutni glukozidi cijanidina, delfinidina, petunidina, malvidina i peonidina, od kojih su petunidin-3-galaktozid, cijanidin-3-arabinozid i petunidin-3-glukozid dominantni (54,291 mg/g suvog ekstrakta, 52,589 mg/g suvog ekstrakta i 45,190 mg/g suvog ekstrakta). Visok sadržaj antocijana u ETB je očekivan, zato što su ova jedinjenja u plodu borovnice najvećim delom skoncentrisana u kožici (Lee i sar, 2004). Reque i saradnici (2014) su ispitujući sadržaj antocijana u borovnici i njenim proizvodima ustanovili da plod i trop sadrže značajne količine antocijana (1775,75 mg/100 g suve materije ploda, odnosno 1572,15 mg/100 g suve materije tropa). Dosta niži sadržaj ovih jedinjenja utvrdili su u sušenoj borovnici, soku i brašnu.

Tabela 4.3. Kvalitativan i kvantitavan sastav polifenolnih jedinjenja u ETB

Fenolno jedinjenje	Sadržaj (mg/g suvog ekstrakta)
Protokatehinska kiselina	35,180 ± 1,091
Galna kiselina	31,981 ± 1,235
Ferulna kiselina	2,245 ± 0,092
Sinapinska kiselina	0,151 ± 0,017
Elaginska kiselina	0,258 ± 0,016
Rutin	2,353 ± 0,109
Miricetin	0,238 ± 0,013
Kempferol	0,009 ± 0,001
Delfinidin-3-glukozid	21,630 ± 0,890
Cijanidin-3-galaktozid	29,003 ± 1,053
Cijanidin-3-glukozid	31,494 ± 1,272
Petunidin-3-galaktozid	54,291 ± 2,046
Cijanidin-3-arabinozid	52,589 ± 2,021
Petunidin-3-glukozid	45,190 ± 2,156
Cijanidin-3-ksilozid	10,139 ± 0,367
Malvidin-3-galaktozid	26,167 ± 1,246
Peonidin-3-glukozid	22,319 ± 0,743
Malvidin-3-arabinozid	3,535 ± 0,148

Na osnovu analize dobijenih sadržaja fenolnih jedinjenja, može se zaključiti da u ETB postoji obilje biološki aktivnih jedinjenja, koja mogu pozitivno uticati na zdravlje ljudi samostalno ili u sinergizmu. Zbog toga se ETB može okarakterisati kao visokovredan funkcionalni sastojak i njegova primena u prehrambenoj industriji je i te kako moguća.

4.3. HPLC ANALIZA VITAMINA C

Prema istraživanjima Miret i saradnika (2016) glavne promene u ukupnoj količini vitamina C događaju se tokom zrenja ploda maline i prelaska iz crvene u tamnocrvenu fazu, kada nivoi askorbata naglo porastu. Sadržaj vitamina C (askorbata) u voću je visok, ali vrlo promenljiv i posebno osetljiv na period pre i posle berbe. Stabilnost vitamina C zavisi od mnogobrojnih faktora: koncentracije kiseonika, pH sredine, temperature, izloženosti svetlosti i prisustva teških metala. Gubitak vitamina C je približno deset puta veći u prisustvu kiseo-

nika u odnosu na gubitak u anaerobnim uslovima (Šumić, 2014). Naknadna obrada voća i skladištenje, još dodatno smanjuju sadržaj vitamina C.

Sadržaj vitamina C u ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB određen je HPLC metodom. Rezultati analize ukazuju da je najviši sadržaj vitamina C utvrđen u ETMW (0,97 mg/g suvog ekstrakta). Nešto niži sadržaj ovog vitamina utvrđen je u ETKT (1,44 mg/g suvog ekstrakta), ETMM (0,49 mg/g suvog ekstrakta) i ETKČ (0,16 mg/g suvog ekstrakta). Najniži sadržaj vitamina C je određen u ETB (0,06 mg/g suvog ekstrakta). Uzimajući u obzir da je vitamin C nestabilan, da se lako oksiduje, a da se na povišenim temperaturama raspada, niži sadržaji su očekivani.

4.4. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA

Endogeni antioksidativni sistemi imaju presudnu funkciju u borbi protiv oksidativnog stresa, ali antioksidanti, koji se unose putem hrane su takođe važni (Ayoub i sar, 2016). Zbog bezbednosnih razloga i ograničenja o korišćenju sintetičkih antioksidanata, prirodni antioksidanti dobijeni iz jestivih materijala i jestivih sporednih proizvoda privlače sve veće interesovanje (Shahidi i sar, 2015). Klinička ispitivanja na eksperimentalnim životinjama su pokazala da neki od sintetskih antioksidanata imaju kancerogeno dejstvo, te je u poslednjih trideset godina objavljeno dosta naučnih radova koji potvrđuju primenu prirodnih antioksidanata, koji nisu pokazali ovakvu fiziološku aktivnost (Milić i sar, 2000). Antioksidativni kapacitet maline i drugih bobica, je u korelaciji sa različitim bioaktivnim jedinjenjima, koja imaju antioksidativna svojstva (Skrovankova i sar, 2015). Antocijani, tanini, ukupni fenoli i askorbinska kiselina široko su izučavani zbog mogućih pozitivnih korelacija sa antioksidativnom aktivnosti.

Odnos između povećanog unosa voća i povrća i smanjenja rizika od hroničnih bolesti, može se pripisati njihovoj antioksidativnoj aktivnosti (Ayoub i sar, 2016). Takođe, Diaconeasa i saradnici (2014) su ustanovili da bobice (borovnice, kupine, maline i brusnice) analizirane u njihovoj studiji sadrže veliku količinu fenolnih jedinjenja i kao takve pokazuju visoku antioksidativnu aktivnost.

4.4.1. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA SPEKTROFOTOMETRIJSKIM METODAMA

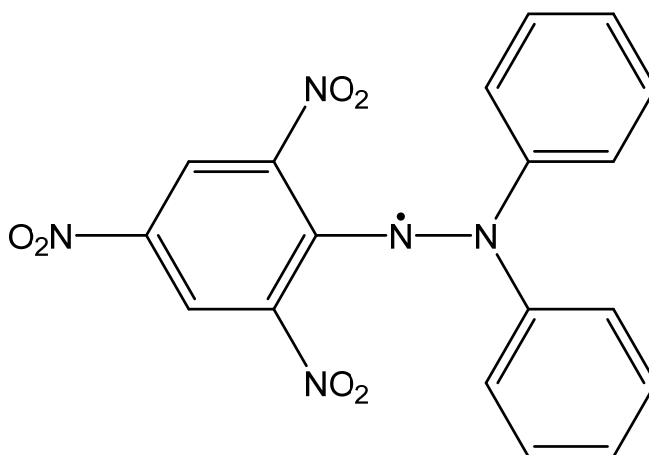
Kada se antioksidant nađe u složenom okruženju, on reaguje u zavisnosti od svoje hemijske prirode, što za rezultat ima dobijanje drugačijih brojnih vrednosti rezultata, za svaki od navedenih testova. Dobijene vrednosti često mogu da budu u slaboj korelaciji i zato je potrebno izvesti više ovih testova, da bi se sa sigurnošću mogla proceniti antioksidativna aktivnost ispitivane supstance, odnosno ekstrakata (Bernaert i sar, 2012). Odnosno, različiti testovi za ispitivanje antioksidativne aktivnosti, pružaju različite mogućnosti antioksidantima da ispolje svoju aktivnost.

Za ispitivanje antioksidativne aktivnosti ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB odabrana su tri spektrofotometrijska testa: DPPH test, ABTS^{•+} test i test redukcione sposobnosti, koji se veoma često koriste za procenu antioksidativne aktivnosti.

4.4.1.1. Antioksidativna aktivnost ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB na DPPH radikale

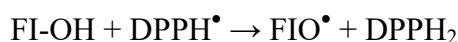
Spektrofotometrijska metoda, koja je korišćena za određivanje antioksidativne aktivnosti na DPPH radikale se zasniva na merenju sposobnosti neutralizacije DPPH radikala u reakciji sa prisutnim antioksidantima.

Slobodni DPPH radikali se najčešće koriste u antioksidativnim testovima za određivanje sposobnosti prirodnih sekundarnih metabolita prisutnih u ekstraktima da predaju labilan vodonikov atom slobodnim radikalima. Ovaj mehanizam predstavlja najčešći i najjednostavniji mehanizam antioksidativne zaštite ($\text{DPPH}^{\bullet} + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}^{\bullet}$). DPPH[•] je stabilan slobodni radikal i ima sledeću hemijsku strukturu:

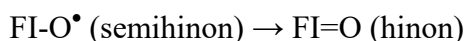
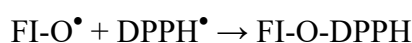
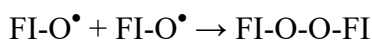


Zbog nesparenog elektrona DPPH[•] apsorbuje svetlost u vidljivom delu spektra, na talasnoj dužini od 517 nm (jarko ljubičasta boja). Kada se ovaj elektron spari u prisustvu antioksidanata, apsorbanca na ovoj talasnoj dužini opada, odnosno boja se menja od ljubičaste do žute. Transformacija boje iz ljubičaste u žutu je stehiometrijski proporcionalna broju elektrona koji su predati.

Mehanizam delovanja flavonoida sa DPPH[•], putem otpuštanja vodonika je:

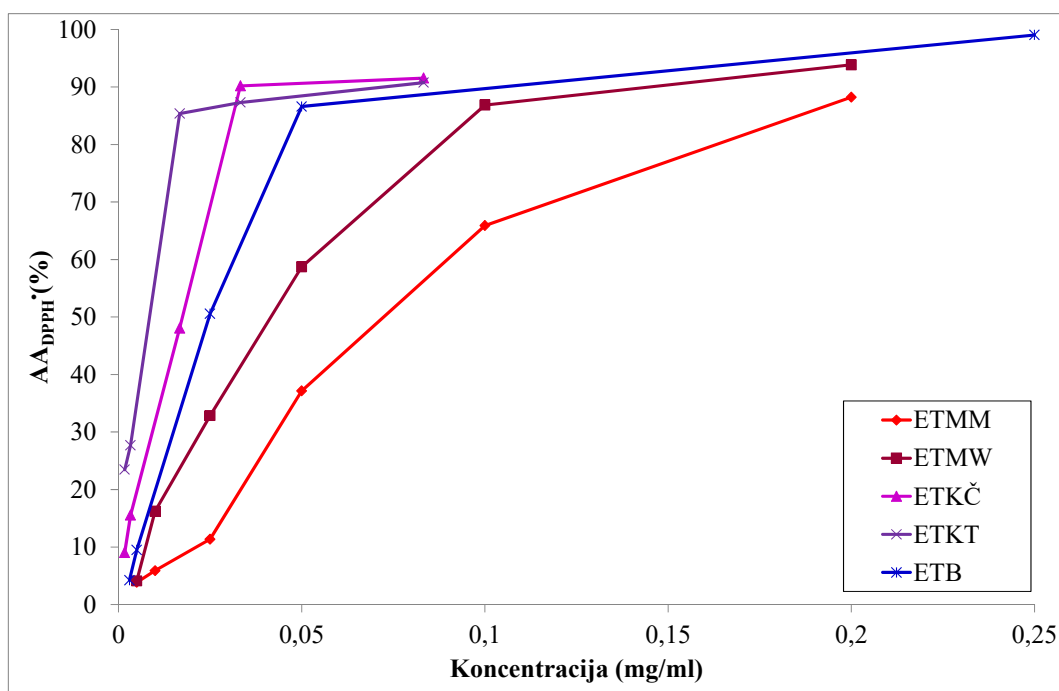


A predloženi mehanizmi završavanja slobodnoradikalских reakcija u prisustvu flavonoida su (Tumbas, 2010):



Spektrofotometrijskom metodom je utvrđeno da su ispitivani ekstrakti tropova bobičastog voća uticali na transformaciju DPPH[•] radikala, u zavisnosti od koncentracije i vrste primenjenog ekstrakta (slika 4.7). Dobijeni rezultati pokazuju da AA_{DPPH[•]} vrednost raste sa porastom koncentracije ekstrakata. ETKT i ETKČ su pokazali najjaču antioksidativnu aktivnost na DPPH[•]. I ETB je pokazao izraženu antioksidativnu aktivnost. Antioksidativna aktivnost tropa borovnice je nedavno potvrđena visokim procentom inhibicije (oko 65%) skevindžer aktivnosti DPPH radikala (Dabbou i sar, 2017). Novije studije pokazuju da sadržaj antocijana, hlorogenske kiseline i kvercetina veoma zavisi od sorte borovnica, dok su sezonske varijacije imale relativno mali efekat na njihov sadržaj (Kraujalytė i sar, 2015). Praveći paralelu sa sadržajem fenolnih jedinjenja, određenih HPLC analizom i spektrofotometrijski, najviši sadržaj ovih jedinjenja je određen upravo u ovim ekstraktima. Očigledno je da je visok sadržaj antocijana u vezi sa antioksidativnom aktivnosti (Genskowsky i sar, 2016), kao i ukupnim fenolima i flavonoidima.

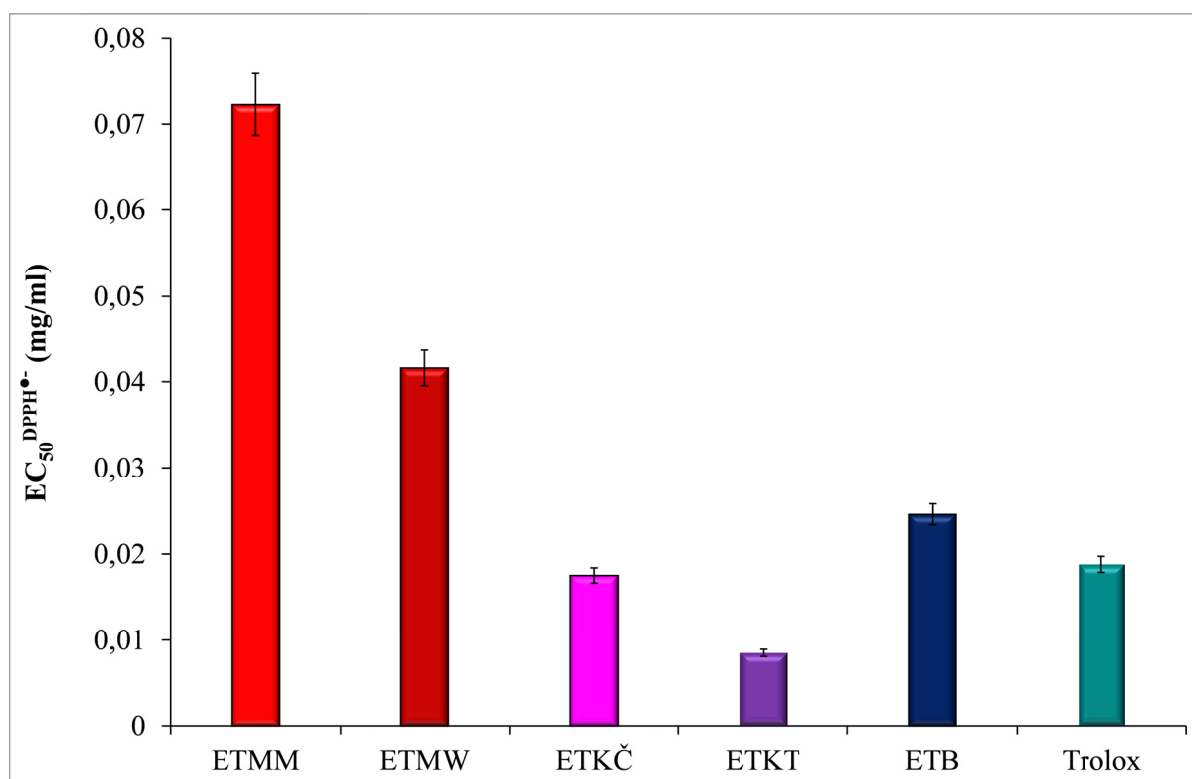
Fazio i saradnici (2013) su ispitujući antioksidativnu aktivnost na DPPH[•] radikale ekstrakata semenki kupine i bobica zove, ustanovili višu antioksidativnu aktivnost ekstrakta semenki kupine, koji je bio bogatiji fenolnim jedinjenjima. Ovo je još jedan od dokaza da fenolna jedinjenja doprinose antioksidativnom kapacitetu.



Slika 4.7. Antioksidativna aktivnost ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB na DPPH•

EC_{50} vrednost (koncentracija antioksidanta koja uzrokuje smanjenje početne koncentracije DPPH• za 50% u uslovima koje definiše metoda) je parametar koji se često koristi kao merilo antioksidativne aktivnosti (Fazio i sar, 2013), pri čemu niže EC_{50} vrednosti odgovaraju višoj antioksidativnoj aktivnosti. Na slici 4.8 su prikazane $EC_{50}^{DPPH\bullet}$ vrednosti, izračunate na osnovu $AA_{DPPH\bullet}$ ekstrakata ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB i sintetičkog antioksidanta troloksa.

Antioksidativna aktivnost ekstrakata na DPPH•, izražena kao $EC_{50}^{DPPH\bullet}$ vrednost opada sledećim redosledom: ETKT > ETKČ > ETB > ETMW > ETMM. U ETMM i ETMW su ustanovljeni niži sadržaji ukupnih fenola i flavonoida, u odnosu na ETKČ, ETKT i ETB, što je u saglasnosti sa tvrdnjom da fenolna jedinjenja utiču na antioksidativna svojstva. Poređenjem $EC_{50}^{DPPH\bullet}$ vrednosti ekstrakata sa $EC_{50}^{DPPH\bullet}$ vrednošću za troloks (0,0188 mg/ml), uočava se da je antioksidativna aktivnost ETKT ($EC_{50}^{DPPH\bullet}=0,0085$ mg/ml) i ETKČ ($EC_{50}^{DPPH\bullet}=0,0175$ mg/ml) izraženija od troloksa. ETB ($EC_{50}^{DPPH\bullet}=0,0246$ mg/ml) je pokazao dobru aktivnost, sličnu troloksu, dok su ETMM ($EC_{50}^{DPPH\bullet}=0,0723$ mg/ml) i ETMW ($EC_{50}^{DPPH\bullet}=0,0416$ mg/ml) pokazali umerenu antioksidativnu aktivnost. Vulić i saradnici (2011) su ispitujući antioksidativnu aktivnost na DPPH• radikale tropova borovnice, kupine, jagode i maline, dobili sledeće $EC_{50}^{DPPH\bullet}$ vrednosti: 0,040, 0,017, 0,038 i 0,040 mg/ml, redom. I u ovom radu trop kupine je pokazao najbolju antioksidativnu aktivnost.



Slika 4.8. EC₅₀^{DPPH•} vrednosti ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT, ETB i troloksa

4.4.1.2. Antioksidativna aktivnost ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB na ABTS^{•+} radikale

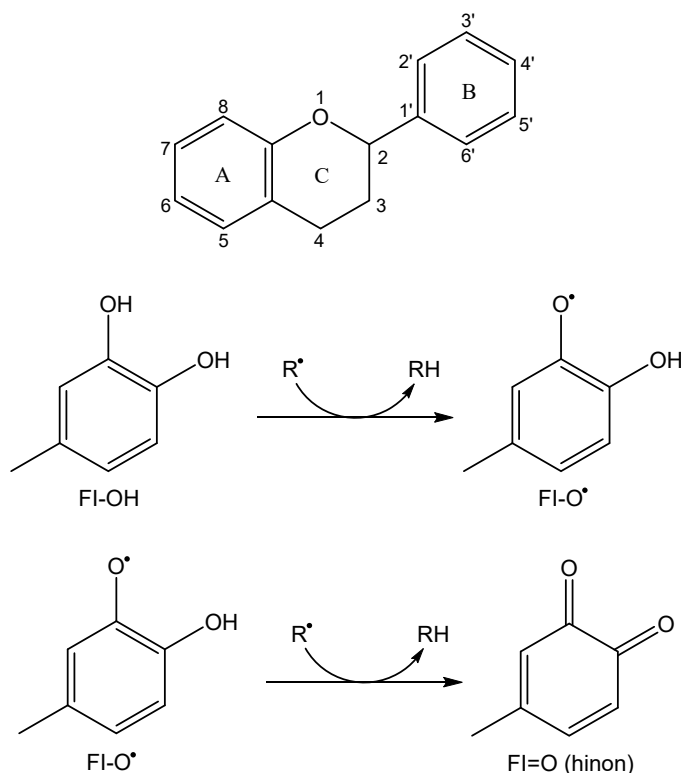
ABTS katjon radikal (ABTS^{•+}) se, pored DPPH radikala, često koristi za određivanje sposobnosti prirodnih jedinjenja da predaju vodonikov atom slobodnim radikalima, najčešći i najjednostavniji mehanizam antioksidativne zaštite.

Za razliku od DPPH radikala koji je ograničen na reakcije sa antioksidantima manje polarnosti, ABTS^{•+} je pogodan za određivanje antioksidativnog kapaciteta i hidrofilnih i lipofilnih antioksidanata, pošto se dobro rastvara i u vodi i u organskim rastvaračima, i nije pod uticajem jonske jačine rastvora (Apak i sar, 2013).

ABTS^{•+} je stabilan slobodni radikal i ima sledeću hemijsku strukturu:

ABTS^{•+} je zeleno obojen i apsorbuje svetlost u vidljivom delu spektra, na talasnoj dužini od 414 nm (zeleno boja). Kada se ovaj elektron spari u prisustvu antioksidanata, apsorbanca na ovoj talasnoj dužini opada, odnosno rastvor se obezboji.

Mehanizam dejstva terminacije slobodnoradikalских reakcija sa flavonoidima prikazan je na slici 4.9. Međutim ne vode sve reakcije obavezno i završetku slobodnoradikalских reakcija, jer njihovi nastali produkti i proizvodi njihovog razlaganja mogu ponovo reagovati sa radikalima.

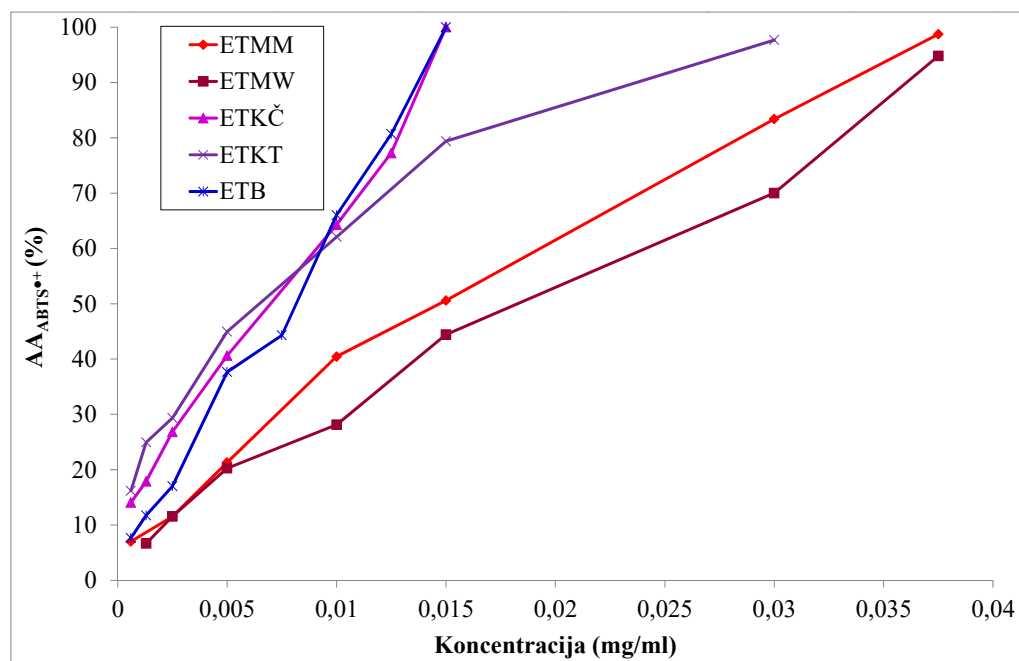


Slika 4.9. Mehanizam antioksidativnog dejstva flavonoida (Meng i sar, 2010)

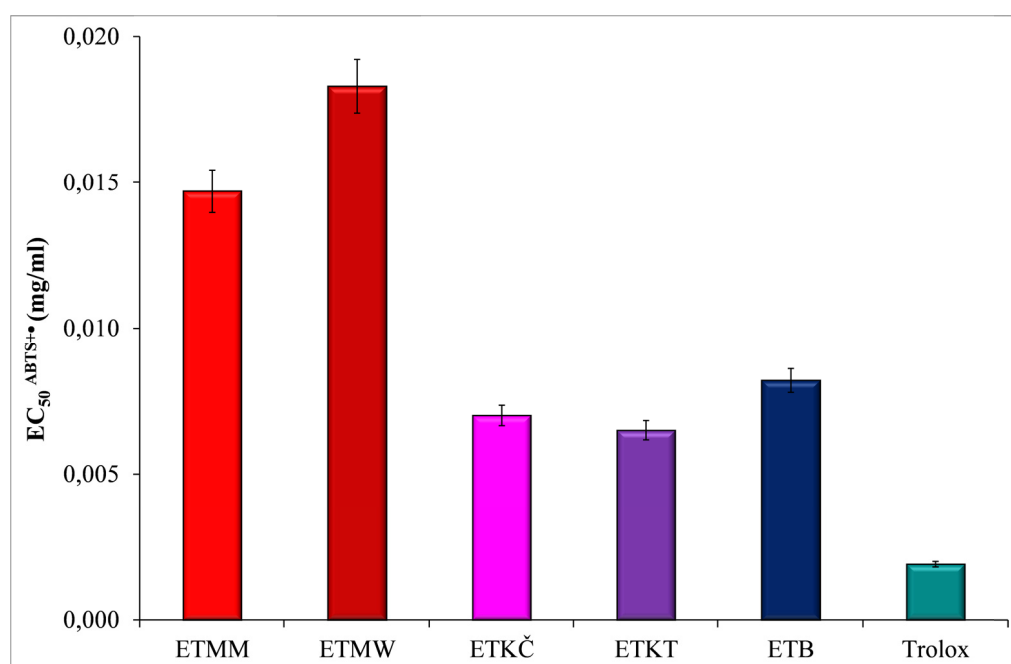
Na slici 4.10 prikazana je grafička zavisnost $AA_{ABTS^{•+}}$ od koncentracije za sve ispitivane ekstrakte tropova. Spektrofotometrijskim testom na ABTS^{•+}, ETKČ, ETKT i ETB su ispoljili bolju antioksidativnu aktivnost od ETMM, ETMW. Obzirom da je kod ovih ekstrakata tropova utvrđen i najviši sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i antocijana, rezultati su očekivani. ETKČ je u ispitivanom opsegu koncentracija pokazao najbolju antioksidativnu aktivnost. Pri niskoj koncentraciji od 0,015 mg/ml potpuno je neutralisao ABTS^{•+}, odnosno postigao antioksidativnu aktivnost od aktivnost 100%.

Utvrđeni redosled antioksidativne aktivnosti ekstrakata i troloksa na ABTS^{•+} radikale, izražene kao $EC_{50}^{ABTS^{•+}}$ vrednosti, je sledeći: troloks > ETKT > ETKČ > ETB > ETMM > ETMW (slika 4.11). Svi ekstrakti tropova su pokazali nešto niže antioksidativno dejstvo na

ABTS^{•+} radikale u odnosu na troloks ($EC_{50}^{ABTS^{•+}} = 0,0019$ mg/ml). Antioksidativna aktivnost ETKT, ETKČ i ETB ($EC_{50}^{ABTS^{•+}} = 0,0065$ mg/ml, $EC_{50}^{ABTS^{•+}} = 0,0070$ mg/ml, $EC_{50}^{ABTS^{•+}} = 0,0082$ mg/ml, redom) je relativno slična, i nešto izraženija u odnosu na aktivnost ETMM i ETMW ($EC_{50}^{ABTS^{•+}} = 0,0147$ mg/ml, $EC_{50}^{ABTS^{•+}} = 0,0183$ mg/ml, redom).



Slika 4.10. Antioksidativna aktivnost ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB na ABTS^{•+} radikale



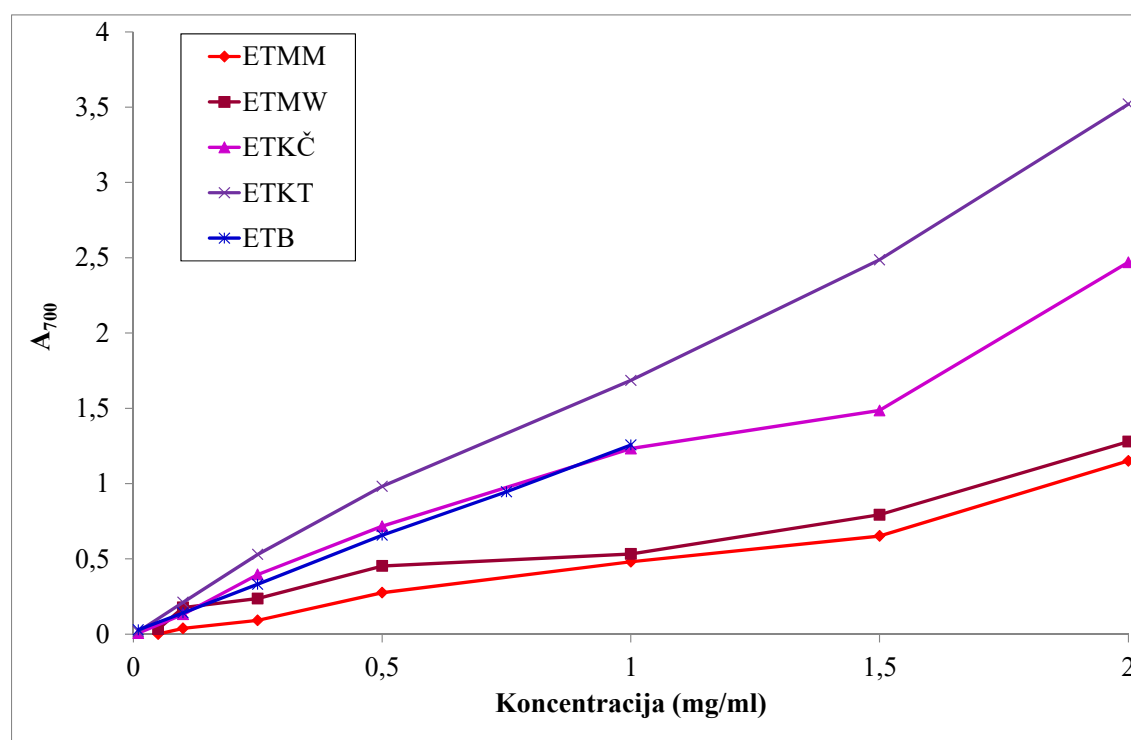
Slika 4.11. $EC_{50}^{ABTS^{•+}}$ vrednosti ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT, ETB i troloksa

4.4.1.3. Redukciona sposobnost ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB

Redukciona sposobnost povezana je sa antioksidativnom aktivnošću i može da služi kao značajan indikator aktivnosti. Fenolna jedinjenja iz ekstrakata bobica, kao elektron donori, prekidaju lanac radikalskih reakcija konvertovanjem slobodnih radikala u stabilnije neradikalske proizvode (Ayoub i sar, 2016). *In vivo*, ishod redukcionih reakcija je da prekine lanac radikalskih reakcija, koje inače mogu biti vrlo štetne (Kilic i sar, 2014).

Metoda po Oyaizu (1986), koja je korišćena za određivanje ukupne redukcionne sposobnosti, zasniva se na praćenju apsorbance u zavisnosti od koncentracije rastvora ekstrakata tropova. Prisustvo antioksidanata iz ispitivanih ekstrakata tropova, izaziva redukciju Fe^{3+} u Fe^{2+} .

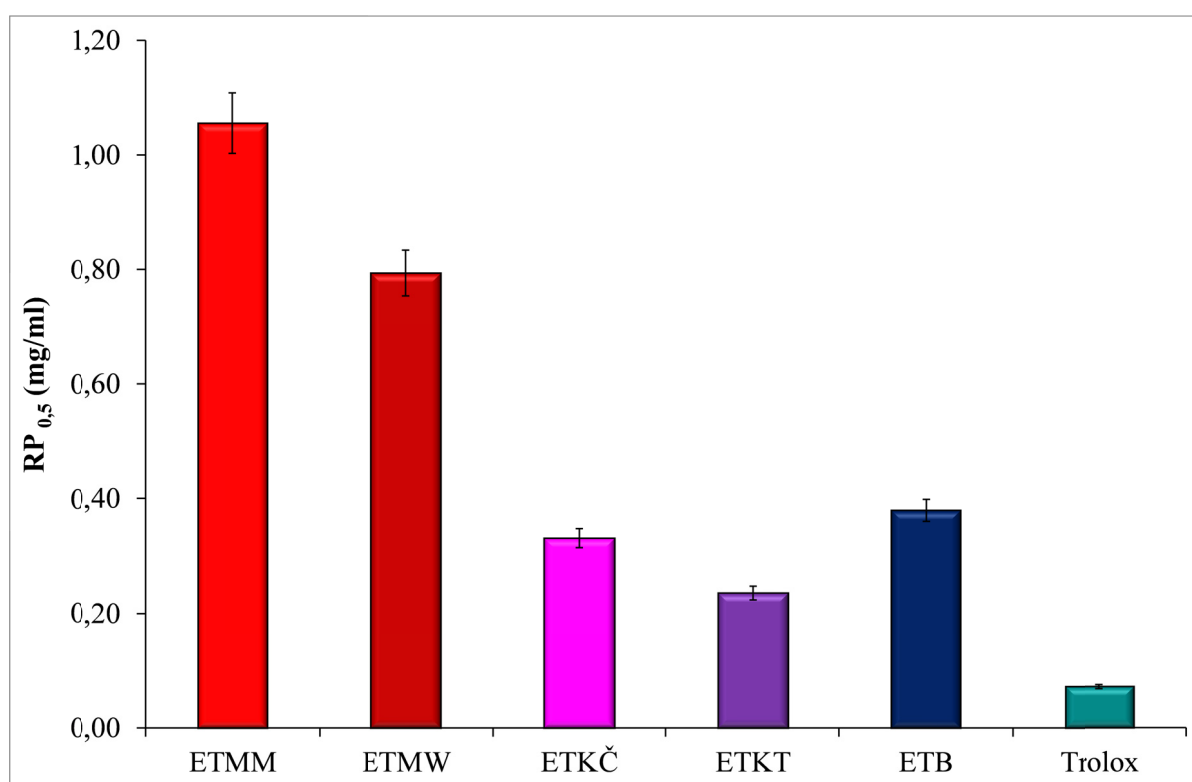
Na slici 4.12 prikazana je redukciona sposobnost ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB. Sa grafika se može uočiti da sa porastom koncentracije raste i redukciona sposobnost. U ispitivanom opsegu koncentracija najjaču redukcionu sposobnost ispoljio je ETKT.



Slika 4.12. Redukciona sposobnost ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB

U cilju poređenja rezultata izračunate su $RP_{0,5}$ vrednosti (koncentracija ekstrakta pri apsorbanci 0,5; što je $RP_{0,5}$ vrednost niža, to je veća sposobnost uzorka da hvata slobodne radikale). Na osnovu određenih $RP_{0,5}$ vrednosti za ekstrakte i trolox (slika 4.13), redosled

redukcijske sposobnosti je sledeći: troloks > ETKT > ETKČ > ETB > ETMW > ETMM. Ekstrakti tropova sa višim sadržajem fenolnih jedinjenja su pokazali bolju redukcionu sposobnost, ali nižu od troloksa ($RP_{0,5}=0,0716$ mg/ml). $RP_{0,5}$ vrednosti za ETKT, ETKČ i ETB ($RP_{0,5}=0,2358$ mg/ml, $RP_{0,5}=0,3310$ mg/ml, $RP_{0,5}=0,3792$ mg/ml, redom) ukazuju da ovi ekstrakti imaju sličan potencijal redukcijske sposobnosti. Najnižu redukcionu sposobnost pokazao je ETMM ($RP_{0,5}=1,0556$ mg/ml). Vulić i saradnici (2011) su ispitujući redukcionu sposobnost ekstrakata tropova četiri vrste bobičastog voća (jagode, maline, kupine i borovnice), utvrdili da je ekstrakt tropa jagode pokazao najvišu redukcionu sposobnost ($RP_{0,5}=0,35$ mg/ml), a ekstrakt tropa kupine najnižu ($RP_{0,5}=0,57$ mg/ml).



Slika 4.13. $RP_{0,5}$ vrednosti ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB i troloksa

4.4.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA ELEKTRON SPIN REZONANTNOM SPEKTROSKOPIJOM

Elektron spin rezonantna (ESR) spektroskopija je snažna i direktna instrumentalna metoda za detekciju slobodnih radikala, generisanih hemijski ili formiranih u biološkim sistemima (He i sar, 2014). ESR je vrlo moćna, savremena i veoma precizna spektroskopska

analitička tehnika, koja se može koristiti za nesmetano praćenje fizičkih i hemijskih procesa i za određivanje strukture paramagnetnih supstanci.

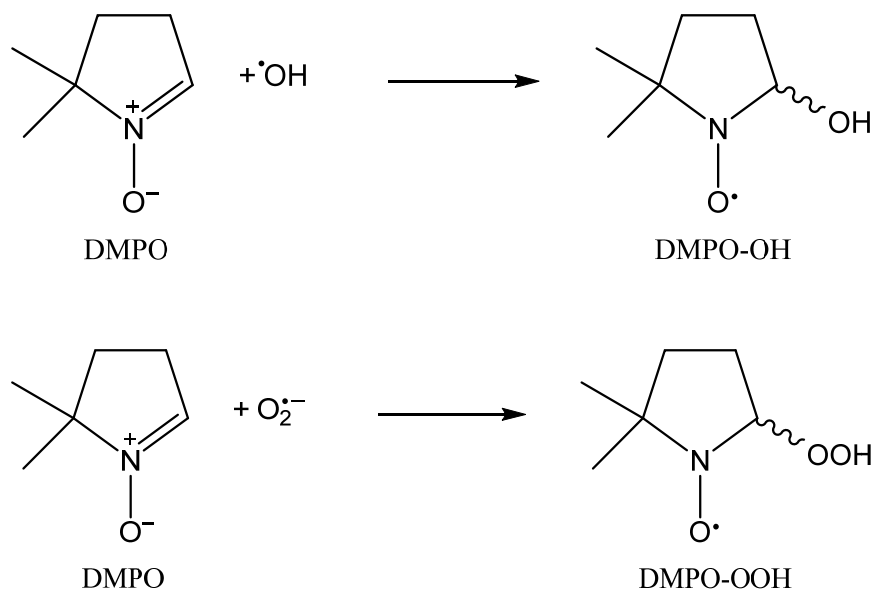
ESR spektroskopija je primenjiva za sve paramagnetne sisteme koji imaju zbirni elektron spinski momenat različit od 0. Ovu metodu karakteriše velika osetljivost (moguće je detektovati koncentracije do 10^{-12} mol/l), mala masa ispitivane materije (do 0,1 g) i nedestruktivnost paramagnetne materije. Iako je osetljivost ove metode veoma visoka, detekcija kratkoživećih, relativno nestabilnih, reaktivnih slobodnoradikalnih vrsta nije moguća zbog njihovog kratkog vremena života. ROS (superoksid anjon radikali, hidroksil radikali i drugi) su obično veoma reaktivni i prisutni u niskim koncentracijama, što predstavlja glavno ograničenje za njihovu detekciju (He i sar, 2014).

Jedna od tehnika koja omogućava njihovu detekciju je „spin trapping“ tehnika, kojom se nestabilni slobodni radikali „hvataju“ pomoću određenih organskih jedinjenja tzv. „spin trapova“ i nastaju stabilni radikali tzv. „spin adukti“ koji se mogu detektovati ESR spektroskopijom.

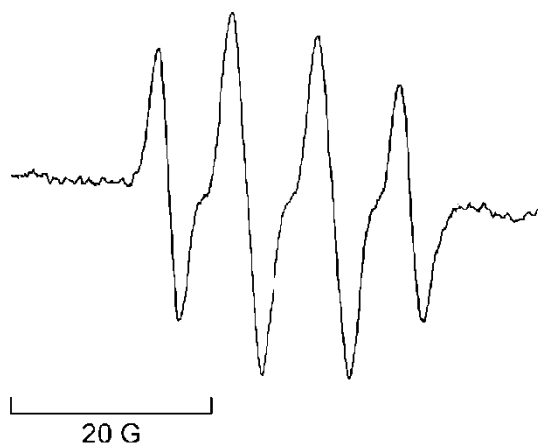
4.4.2.1. ESR spektralna analiza uticaja ekstrakata na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala

Iako je superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$) slab oksidacioni agens, on je prekursor u stvaranju vrlo reaktivnih hidroksil radikala i singlet kiseonika. Superoksid anjon radikal se može generisati enzimski, sistemom ksantin/ksantin oksidaza ili hemijskim putem, sa smešom kalijum superoksida i kraunetra. Prednost hemijskog generisanja superoksid anjon radikala za određivanje antioksidativne aktivnosti je jednoznačnost interpretiranih rezultata. Naime, jedinjenja prisutna u ekstraktima mogu, pored antioksidativnog dejstva ispoljiti i inhibitorno dejstvo na enzimski sistem ksantin/ksantin oksidaza. Ovaj problem je prevaziđen kada je izvor superoksid anjon radikala hemijski sistem.

ESR spektralna određivanja slobodnih superoksid anjon radikala u navedenom model sistemu izvršena su „spin trapping“ metodom, upotrebom DMPO kao „spin trap“ jedinjenja. Nastali reaktivni $O_2^{\bullet-}$ u prisustvu „spin trapa“ DMPO formiraju relativno stabilne nitroksid radikale, DMPO-OOH „spin adukta“:

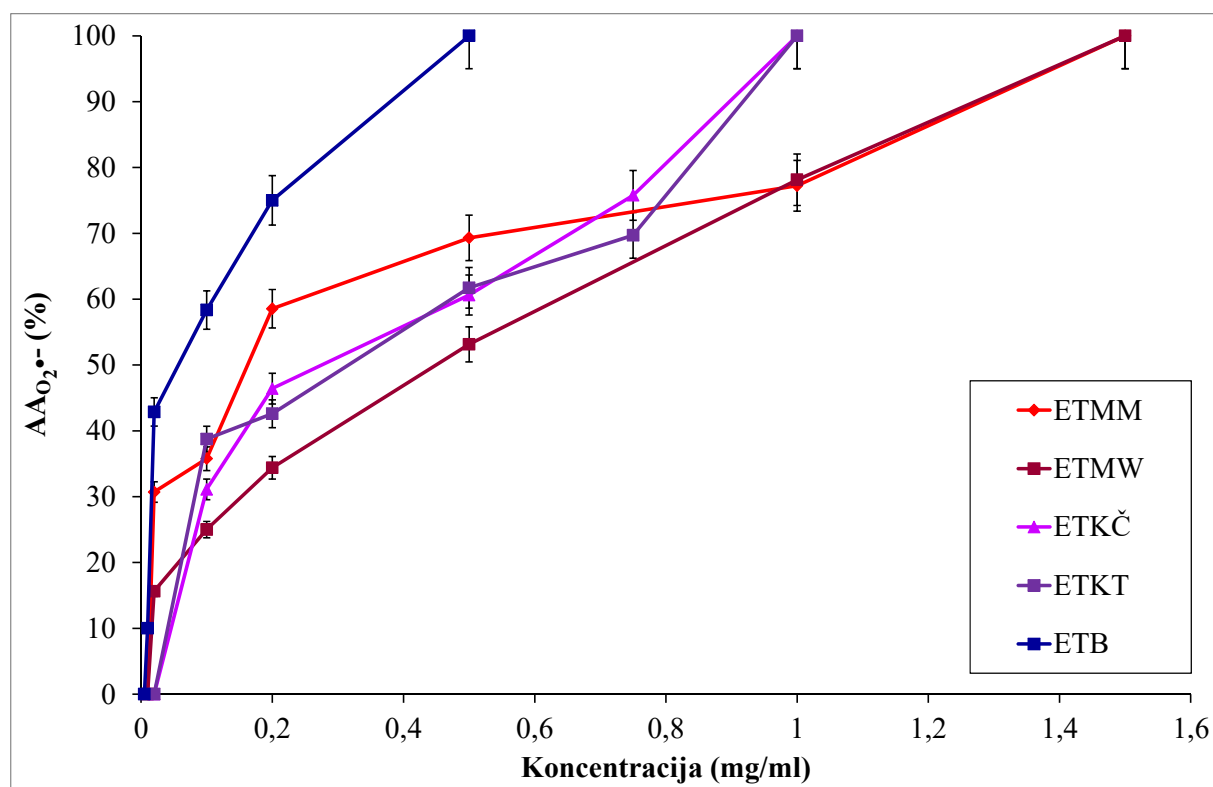


Hiperfina struktura ESR signala stabilizovanih superoksid anjon radikala, odnosno DMPO-OOH „spin adukata“ (slika 4.14) sastoji se od četiri linije, a konstante hiperfinog cepanja imaju vrednost $a_N = 12,65 \text{ G}$, $a_{\text{H}\beta} = 10,4 \text{ G}$ i $a_{\text{H}\gamma} = 1,3 \text{ G}$.



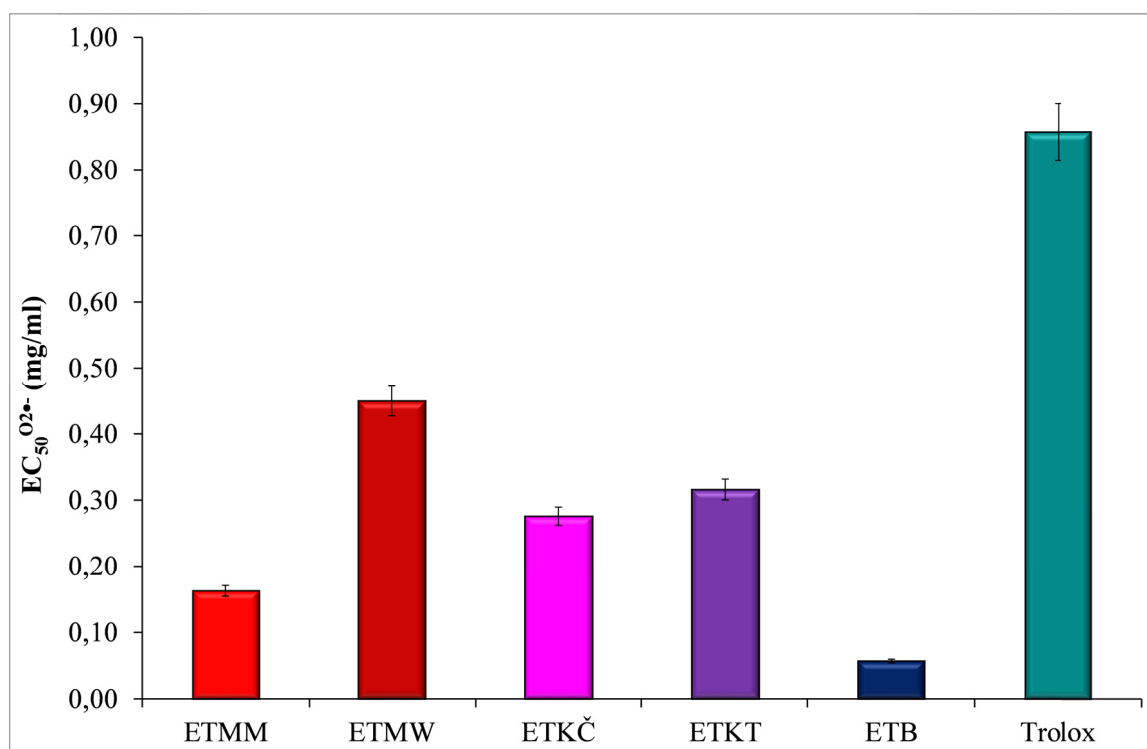
Slika 4.14. ESR spektar DMPO-OOH „spin adukata“ superoksid anjon radikala (slepa proba)

Na slici 4.15 prikazana je grafički zavisnost $AA_{\text{O}_2^{\cdot-}}$ (%) od koncentracije ekstrakta (mg/ml), za sve ispitivane ekstrakte tropova. Sa grafika se može videti da su svi ekstrakti pokazali koncentracijski zavisnu antioksidativnu aktivnost na superoksid anjon radikale. Svi ekstrakti su efikasno uticali na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala. ETB je potpuno uklonio superoksid anjon radikale iz reakcione smeše ($AA_{\text{O}_2^{\cdot-}} = 100\%$) pri koncentraciji od 0,5 mg/ml, dok su ETKČ i ETKT, odnosno ETMM i ETMW potpuno eliminisali prisustvo superoksid anjon radikala (gasili ESR signal) tek pri koncentracijama od 1,0 mg/ml, odnosno 1,5 mg/ml, redom.



Slika 4.15. Uticaj ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB na stvaranje i transformaciju superoksid anjon radikala

Na osnovu izračunatih $EC_{50}^{O_2^{\bullet-}}$ vrednosti (slika 4.16) utvrđen je sledeći redosled antioksidativne aktivnosti ekstrakata: $ETB > ETMM > ETKČ > ETKT > ETMW$. ETB ($EC_{50}^{O_2^{\bullet-}}=0,0569$ mg/ml) je pokazao najizraženiju antioksidativnu aktivnost na $O_2^{\bullet-}$ radikale. S obzirom da je u ETB određen i najviši sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida i antocijana, u prvom redu se njima može pripisati izražena antioksidativna aktivnost. Najnižu aktivnost pokazao je ETMW ($EC_{50}^{O_2^{\bullet-}}=0,4499$ mg/ml). Antioksidativna aktivnost troloksa na superoksid anjon radikale ($EC_{50}^{O_2^{\bullet-}}=0,8575$ mg/ml) je bila znatno niža od svih ispitivanih ekstrakata. Ovo je u skladu sa mišljenjem velikog broja autora, koji antioksidativnu aktivnost pripisuju delovanju biljnih fenola (Mišan, 2009).



Slika 4.16. EC₅₀ O₂•⁻ vrednosti ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB i troloksa

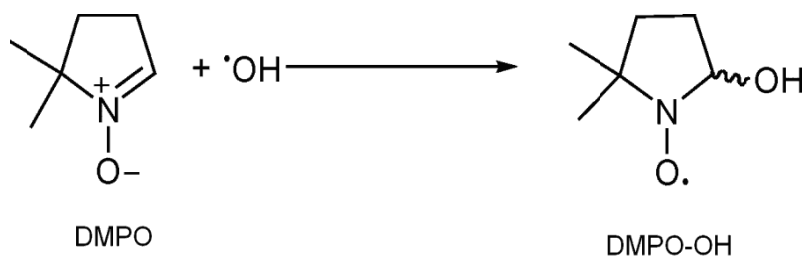
4.4.2.3. ESR spektralna analiza uticaja ekstrakata na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala

Za određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata tropova bobičastog voća na reaktivne hidroksil radikale (OH•) korišćen je DMPO, kao „spin trap“ jedinjenje. Nastali DMPO-OH „spin adukti“, koji imaju relativno dugo vreme života, su relativno stabilni i pogodni za detekciju ESR-om (Čanadanović-Brunet, 1998).

Glavni izvor OH• je Fentonova reakcija, u kojoj učestvuju jon gvožđa, ili neki prelazni jon metala i H₂O₂ (Kell, 2010):

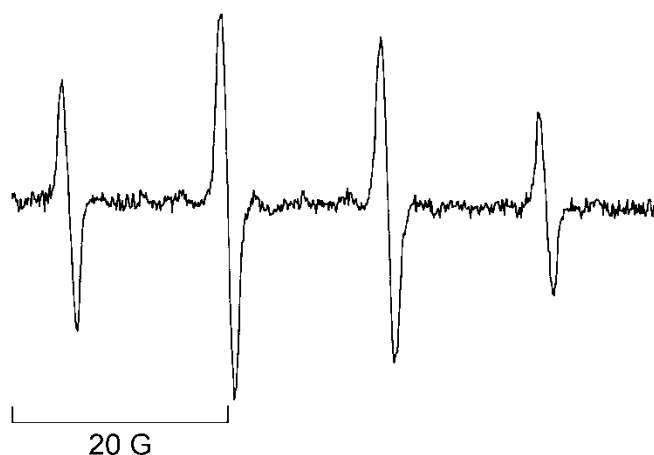


Nastali reaktivni •OH radikali u prisustvu „spin trapa“ DMPO formiraju stabilne nitroksid radikale, odnosno DMPO-OH „spin adukte“, sledećim reakcionim mehanizmom:



Ovaj antioksidativni test daje informaciju, ne samo o antioksidativnoj (“skevindžer”) aktivnosti ekstrakata na slobodne hidroksil radikale, već i o sposobnosti jedinjenja prisutnih u ekstraktima da stvaraju komplekse sa jonima gvožđa i da na taj način sprečavaju stvaranje hidroksil radikala Fentonovom reakcijom.

Na slici 4.17 je prikazan ESR spektar DMPO-OH „spin adukata“ nastalih u Fentonovom model sistemu.

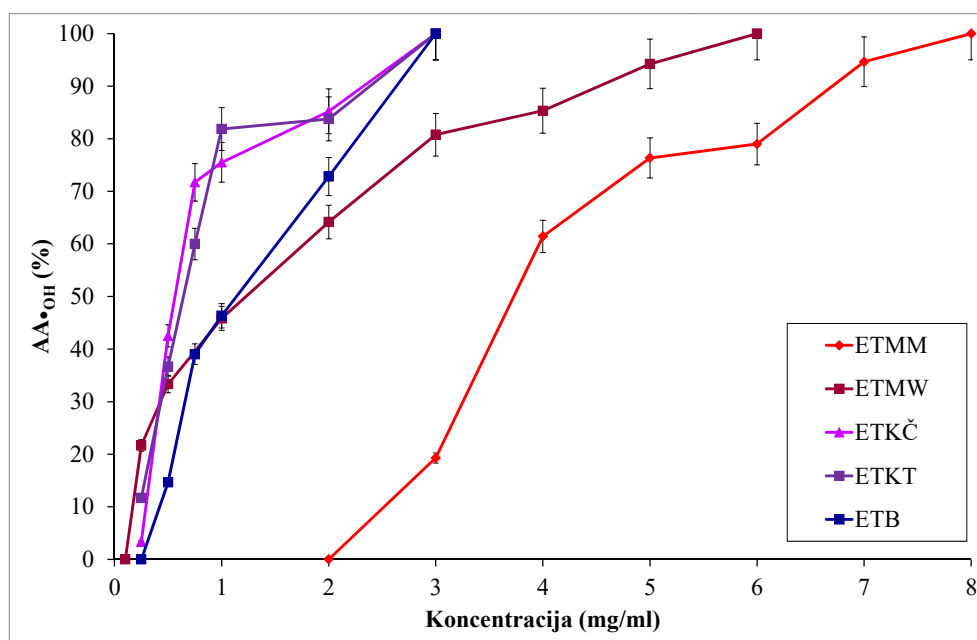


Slika 4.17. ESR spektar DMPO-OH „spin adukata“ nastalih u Fentonovom model sistemu (slepa proba)

Hiperfina struktura ovog ESR spektra je predstavljena sa četiri linije relativnog intenziteta 1:2:2:1 i istih konstanti hiperfinog cepanja za jedan ^{14}N -atom ($I = 1$) $a_{\text{N}} = 14,9$ G, i za jedan ^1H -atom ($I = 1/2$) $a_{\text{H}} = 14,9$ G.

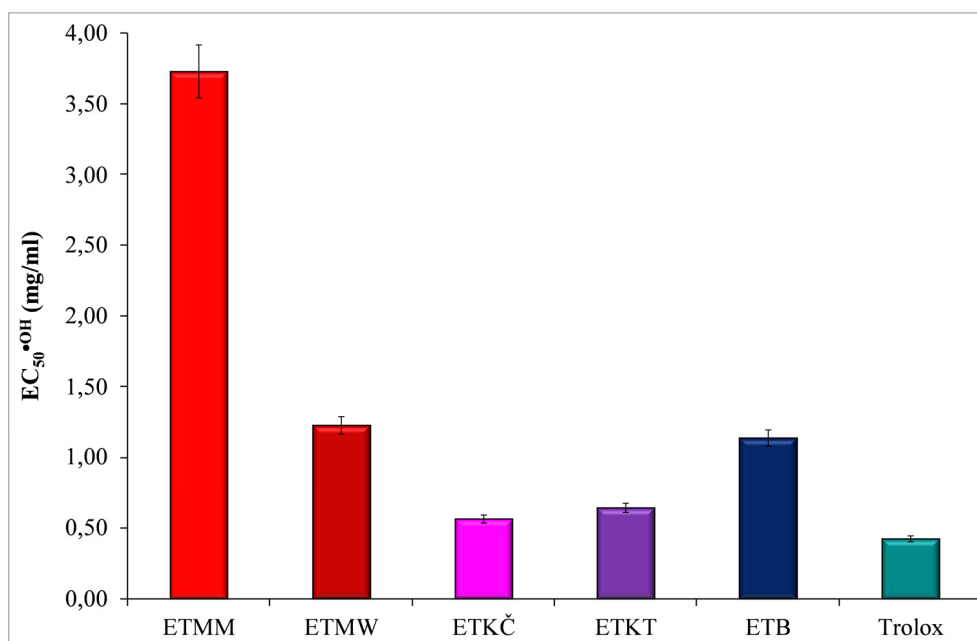
Hidroksil radikal ($\bullet\text{OH}$) je hemijski najreaktivnija forma „aktiviranog kiseonika“, koja nastaje tokom univalentne redukcije molekuskog kiseonika i ova forma je najodgovornija za citotoksične efekte kiseonika (Halliwell, 2006).

Na slici 4.18 prikazan je uticaj ekstrakata tropova na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala u Fentonovom model sistemu. Dobijeni rezultati ukazuju da svi ispitivani ekstrakti tropova inhibiraju stvaranje $\bullet\text{OH}$, ili utiču na njihovu transformaciju tokom Fentonove reakcije, odnosno pokazuju antioksidativnu aktivnost. Daleko slabiju antioksidativnu aktivnost na $\bullet\text{OH}$ pokazao je ETMM, u odnosu na sve druge ispitivane ekstrakte, koji su pokazali vrlo izraženu, relativno sličnu antioksidativnu aktivnost. ETKČ, ETKT i ETB su potpuno eliminisali $\bullet\text{OH}$ iz reakcione smeše ($\text{AA}\cdot_{\text{OH}} = 100\%$) pri istoj primenjenoj koncentraciji od 3,00 mg/ml. Isti efekat je postignut sa 6,00 mg/ml ETMW, odnosno sa 8,00 mg/ml ETMM.



Slika 4.18. Uticaj ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB na stvaranje i transformaciju hidroksil radikala u Fentonovom model sistemu

$EC_{50}^{\bullet OH}$ vrednosti ispitivanih ekstrakata (slika 4.19), dobijene na osnovu $AA_{\bullet OH}$, ukazuju na sledeći redosled antioksidativne aktivnosti: ETKČ > ETKT > ETB > ETMW > ETMM. ETKČ i ETKT ($EC_{50}^{\bullet OH}=0,5642$ mg/ml, odnosno $EC_{50}^{\bullet OH}=0,6429$ mg/ml) su pokazali bolju aktivnost u odnosu na druge ekstrakte, ali nešto malo lošiju u odnosu na troloks ($EC_{50}^{\bullet OH}=0,4240$ mg/ml). Antioksidativna aktivnost ETMM ($EC_{50}^{\bullet OH}=3,7288$ mg/ml) na hidroksil radikale je bila znatno niža u odnosu na ostale ekstrakte tropova.



Slika 4.19. $EC_{50}^{\bullet OH}$ vrednosti ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT, ETB i troloksa

4.4.3. KORELACIONA ANALIZA SADRŽAJA FITOHEMIKALIJA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT I ETB

Korelacija između sadržaja polifenolnih jedinjenja i vitamina C i antioksidativne aktivnosti ekstrakata tropova ispitana je Pirsonovim testom korelacije, a za analizu su korišćene vrednosti sledećih parametara: $EC_{50}^{DPPH\bullet}$, $EC_{50}^{ABTS^{\bullet+}}$, $RP_{0,5}$, $EC_{50}^{O_2^{\bullet-}}$ i $EC_{50}^{\bullet OH}$. Rezultati su prikazani u tabeli 4.3.

Vrlo dobra korelacija je određena između sadržaja TPh i $EC_{50}^{ABTS^{\bullet+}}$ i sadržaja TF i $EC_{50}^{ABTS^{\bullet+}}$ ($|r|=0,84$, odnosno $|r|=0,93$). Između TPh i $EC_{50}^{DPPH\bullet}$ određena je vrlo dobra korelacija ($|r|=0,86$), dok je sa TF ustanovljena dobra korelacija ($|r|=0,77$). Korelacija između TAc i $EC_{50}^{DPPH\bullet}$, odnosno $EC_{50}^{ABTS^{\bullet+}}$ je bila osrednja. Odnos između antioksidativne aktivnosti i ukupnih polifenola kvalifikuje se boljom korelacijom, nego sa ukupnim antocijanima (Skrovankova i sar, 2015). Bunea i saradnici (2011) su, ispitujući antioksidativnu aktivnost pet sorti borovnice (dve divlje i tri kultivisane sorte), Pirsonovim testom korelacije utvrdili da su antioksidativne aktivnosti na DPPH i $ABTS^+$ radikale u vrlo dobroj korelaciji sa sadržajem TPh, TF i TAc. Wang i saradnici (2014) su u svojoj studiji (koju su sproveli za *Vaccinium uliginosum* L) ustanovili da antocijani više doprinose boljoj antioksidativnoj aktivnosti nego flavonoli. Oni su ustanovili vrlo dobru korelaciju između TPh i antioksidativne aktivnosti na DPPH \bullet ($r=0,91$), odnosno $ABTS^{\bullet+}$ ($r=0,89$), kao i između TAc i DPPH \bullet ($r=0,85$), odnosno $ABTS^{\bullet+}$ ($r=0,87$), dok je korelacija sa flavonolima slaba. De Souza i saradnici (2014) su ustanovili vrlo dobar koeficijent korelacije ($r=0,91$) za TPh i DPPH test ispitujući antioksidativnu aktivnost za kupinu, crvenu malinu, jagodu, borovnicu i trešnju. Kraujalytė i saradnici (2015) su ispitivali dvadeset genotipova borovnice i ustanovili vrlo dobru korelaciju ($r=0,93$) između sadržaja TPh i $EC_{50}^{ABTS^{\bullet+}}$.

Antioksidativna aktivnost kupine je u vrlo dobroj korelaciji sa sadržajem antocijana (Ivanovic i sar, 2014). Antocijani ispitivanih ekstrakata tropova mnogo bolje koreliraju sa $EC_{50}^{ABTS^{\bullet+}}$, nego sa $EC_{50}^{DPPH\bullet}$, odnosno njihov uticaj je veći na $ABTS^{\bullet+}$ radikale (tabela 4.4). Kilic i saradnici (2014) su utvrdili da je elaginska kiselina efikasan antioksidant u različitim *in vitro* ispitivanjima, uključujući redukcionu sposobnost, DPPH \bullet , $ABTS^{\bullet+}$ i superoksid anjon radikal „skevindžer“ aktivnost, kada se upoređi sa standardnim antioksidantima, kao što su BHA, BHT, tokoferol i askorbinska kiselina. Koeficijenti korelacije prikazani u tabeli 4.4 ukazuju da je između elaginske kiseline i $EC_{50}^{DPPH\bullet}$ ustanovljena dobra korelacija ($|r|=0,58$), dok je sa $EC_{50}^{ABTS^{\bullet+}}$ utvrđena slaba korelacija ($|r|=0,03$).

Tabela 4.4. Pirsonov test koleracije između sadržaja polifenolnih jedinjenja i vitamina C i EC₅₀^{DPPH•}, EC₅₀^{ABTS•+}, RP_{0,5}, EC₅₀^{O2•-} i EC₅₀^{•OH}

Korelacija	TPh	TF	Tac	Protokatehinska kiselina	Galna kiselina	Ferulna kiselina	Sinapinska kiselina	Elaginska kiselina	Rutin	Miricetin	Cijanidin-3-glukozid	Vitamin C	EC ₅₀ ^{DPPH•}	EC ₅₀ ^{ABTS•+}	RP _{0,5}	EC ₅₀ ^{O2•-}	EC ₅₀ ^{•OH}
TPh	1																
TF	0,96	1															
Tac	0,76	0,76	1														
Protokatehinska kiselina	0,69	0,67	0,82	1													
Galna kiselina	0,77	0,73	0,98	0,74	1												
Ferulna kiselina	0,62	0,62	0,97	0,72	0,97	1											
Sinapinska kiselina	0,96	0,98	0,63	0,57	0,62	0,47	1										
Elaginska kiselina	0,19	0,02	0,30	0,05	0,24	0,42	0,13	1									
Rutin	0,82	0,81	0,97	0,69	0,99	0,95	0,71	0,27	1								
Miricetin	0,94	0,91	0,94	0,77	0,94	0,86	0,85	0,08	0,97	1							
Cijanidin-3-glukozid	0,94	0,95	0,90	0,68	0,90	0,81	0,89	0,14	0,95	0,99	1						
Vitamin C	0,13	0,19	0,44	0,15	0,52	0,58	0,11	0,70	0,55	0,36	0,42	1					
EC ₅₀ ^{DPPH•}	0,86	0,77	0,33	0,39	0,37	0,15	0,87	0,58	0,44	0,63	0,65	0,18	1				
EC ₅₀ ^{ABTS•+}	0,84	0,93	0,47	0,40	0,44	0,31	0,96	0,03	0,57	0,70	0,79	0,11	0,80	1			
RP _{0,5}	0,92	0,87	0,45	0,45	0,47	0,27	0,95	0,41	0,56	0,73	0,77	0,05	0,98	0,98	1		
EC ₅₀ ^{O2•-}	0,34	0,52	0,73	0,42	0,66	0,77	0,36	0,85	0,70	0,58	0,62	0,67	0,14	0,37	0,05	1	
EC ₅₀ ^{•OH}	0,75	0,57	0,24	0,26	0,33	0,10	0,69	0,72	0,37	0,53	0,52	0,15	0,94	0,58	0,88	0,34	1

*vrlo dobra korelacija ($|r| > 0.8$), dobra korelacija ($|r| > 0.5$), srednja korelacija ($|r| > 0.3$) i slaba korelacija ($|r| < 0.3$)

Visoka antioksidativna aktivnost i značajna pozitivna korelacija između sadržaja TPh, TF, odnosno TAc i DPPH radikal „skevindžer“ aktivnosti, pokazuju da se bobičasto voće može smatrati kao dobar izvor prirodnih antioksidanata, koji mogu imati potencijalne pozitivne efekte po zdravlje (Stajčić i sar, 2012).

Visok stepen korelacije utvrđen je između $RP_{0,5}$ i sadržaja fenolnih jedinjenja. Utvrđena je vrlo dobra korelacija sa TPh i TF ($|r|=0,92$, odnosno $|r|=0,87$) i sinapinskom kiselinom ($|r|=0,95$), dok je sa TAc korelacija osrednja ($|r|=0,45$). Vrlo dobru korelaciju $RP_{0,5}$ sa TPh i TF ustanovili su i Sasikumar i saradnici (2015), u svojoj studiji, koja je rađena sa malinom (*Rubus ellipticus Smith*). Dobra korelacija $RP_{0,5}$ određena je sa rutinom, miricetinom i cijanidin-3-glukozidom (tabela 4.4). Navedeni rezultati korelacione analize ukazuju da se dobra redukciona sposobnost može pripisati fenolnim jedinjenjima. Kilic i saradnici (2014) su saopštili da elaginska kiselina pokazuje izrazitu redukcionu sposobnost. U ovom radu utvrđena je osrednja korelacija $RP_{0,5}$ sa elaginskom kiselinom ($|r|=0,41$).

Dobra korelacija utvrđena je između TAc i $EC_{50}^{O_2^{\bullet-}}$ ($|r|=0,73$). Brojne studije pokazuju da su antocijani snažni antioksidanti (Pérez i sar, 2014). Korelacija sa cijanidin-3-glukozidom je dobra ($|r|=0,62$). Korelaciona analiza pokazuje da antocijanima možemo pripisati dobru antioksidativnu aktivnost na $O_2^{\bullet-}$ radikale. Odatle opravdanost za najnižu vrednost $EC_{50}^{O_2^{\bullet-}}$ za ETB. Sa TPh je ustanovljena osrednja (0,34), dok je sa TF utvrđena dobra korelacija ($|r|=0,52$). Korelacija sa rutinom i miricetinom je takođe bila dobra ($|r|=0,70$, odnosno $|r|=0,58$), kao i sa galnom ($|r|=0,66$) i ferulnom kiselinom ($|r|=0,77$). Galna kiselina sprečava užeglost, izazvanu lipidnom peroksidacijom i koristi se u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji i materijalima za pakovanje hrane (Mittal i sar, 2014). Ferulna kiselina, takođe ispoljava antioksidativno delovanje kao odgovor na slobodne radikale, putem doniranja vodonikovog atoma iz fenolne hidroksilne grupe i kao rezultat toga pokazuje jaku antiinflamatornu aktivnost (Kumar i sar, 2014). Izveštaj o prvoj upotrebi ferulne kiseline kao konzervansa hrane je sačinjen u Japanu, kada je upotrebljena da sačuva pomorandže i da inhibira autooksidaciju lanenog ulja (Kumar i sar, 2014). Stabilizacija rezonancom ferulne kiseline je glavni uzrok njene antioksidativne prirode. Posebno visok sadržaj ferulne kiseline, određen HPLC analizom, ustanovljen je u ETMM. Vrlo dobra korelacija je utvrđena između $EC_{50}^{O_2^{\bullet-}}$ i elaginske kiseline ($|r|=0,85$).

Korelacijom između sadržaja fitohemikalija i antioksidativne aktivnosti na $\bullet OH$ radikale, utvrđena je dobra korelacija između TPh, TF i $EC_{50}^{\bullet OH}$ ($|r|=0,75$, odnosno $|r|=0,57$), dok je sa TAc i $EC_{50}^{\bullet OH}$ korelacija slaba ($|r|=0,24$). Studije izvedene na ćelijskim kulturama,

animalnim modelima, kao i klinička istraživanja, pokazala su da elaginska kiselina ima blagotvoran efekat po zdravlje protiv mnogih hroničnih bolesti, izazvanih oksidativnim oštećenjima, uključujući rak, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti (Dalvi i sar, 2017). Fenolna jedinjenja, kao što je *p*-kumarinska kiselina, ili elaginska kiselina i njihovi estri, trebalo bi da su u većoj meri povezana sa antioksidativnim kapacitetom od antocijana i askorbinske kiseline (Skrovankova i sar, 2015). U ovom radu određena korelacija $EC_{50}^{\bullet OH}$ sa elaginskom kiselinom ($|r|=0,72$) je dobra, dok je korelacija sa vitaminom C slaba, što je u saglasnosti sa navedenim literaturnim podacima.

Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja, fenolnih kiselina, flavonoida i antocijana u ispitivanim ekstraktima tropova je visok i u korelaciji sa antioksidativnom aktivnosti, što sugerise da fenolna jedinjenja doprinose njihovom antioksidativnom kapacitetu. Podaci iz disertacije, kao i literaturni navodi, ukazuju da se ispitivani ekstrakti tropova, potencijalno mogu koristiti kao prirodni izvori antioksidanata fenolne strukture.

4.5. ANTIHIPERGLIKEMIJSKA AKTIVNOST EKSTRAKATA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA

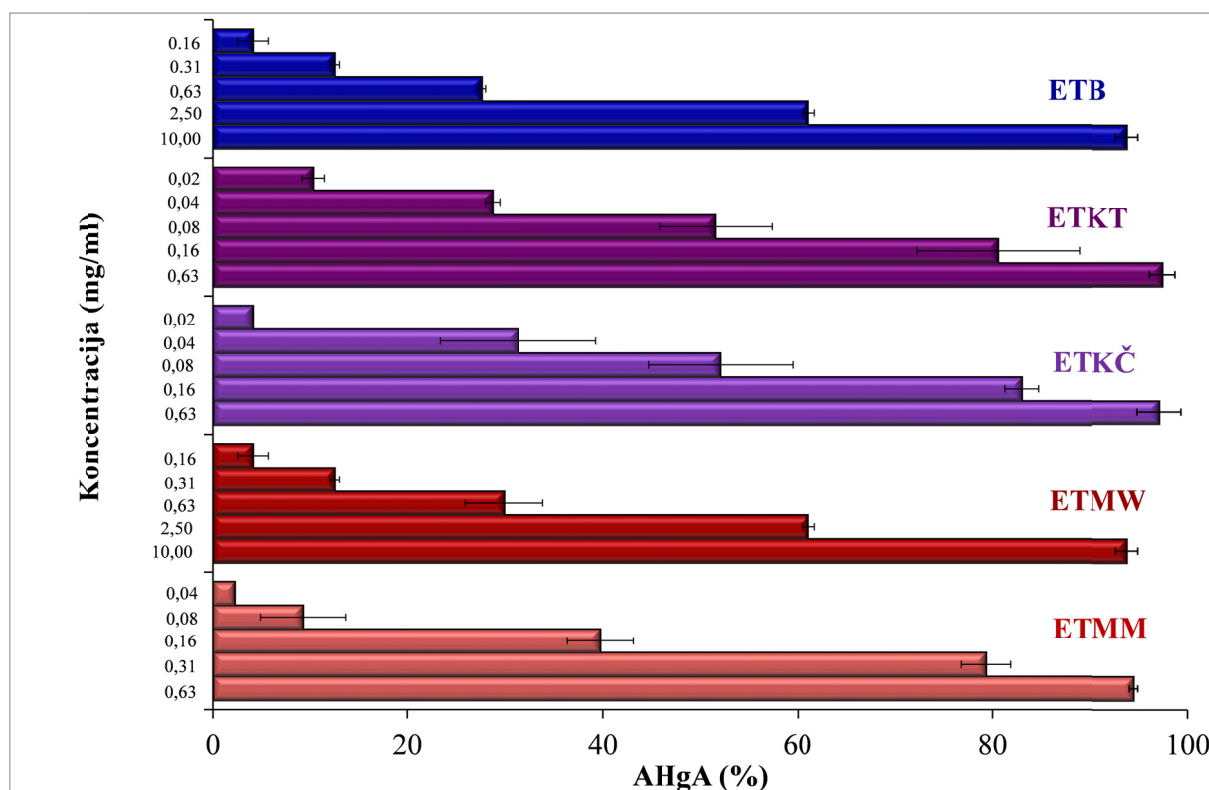
Dijabetes tipa II je svetski, ubedljivo, najprisutniji endokrini poremećaj, koji karakteriše hronična hiperglikemija, promene u metabolizmu masti i disfunkcija insulina (Rojo i sar, 2010). Jedan od pristupa lečenju jeste inhibicija enzima, kako bi se sprečila apsorpcija glukoze. Mnogi inhibitori α -glukozidaze, koji su fitonutrijenti, poput flavonoida, alkaloida, terpenoida, antocijana, glukozida, fenolnih komponenti i dr. su izolovani iz biljaka (Kumar i sar, 2011). Zabeleženo je više od 1200 biljnih vrsta, koje se koriste širom sveta zbog navodne hiperglikemijske aktivnosti (Tundis i sar, 2010). Polifenoli bobičastog voća su dobri inhibitori α -glukozidaze (Boath i sar, 2012).

Inhibicijom enzima α -glukozidaze usporava se porast nivoa šećera u krvi nakon unosa ugljenih hidrata u organizam. Smatra se da se inhibicijom ovog enzima može efikasno regulisati usvajanje glukoze i kontrolisati dijabetes tipa II. U patogenezu dijabetesa uključen je oksidativni stres. Takođe, sistem antioksidativne zaštite, koji reguliše nivo oksidativnog stresa, je poremećen kod dijabetesa.

U lečenju dijabetesa koriste se sintetički inhibitori α -glukozidaze (npr. akarboza koja se u Evropi i Kini prodaje kao *Glucobay* i proizvodi ga Bayer AG). Pored njihove visoke efikasnosti, oni pokazuju i neželjene efekte, pa postoji potreba za pronalaženjem bezbednijih prirodnih alternativa.

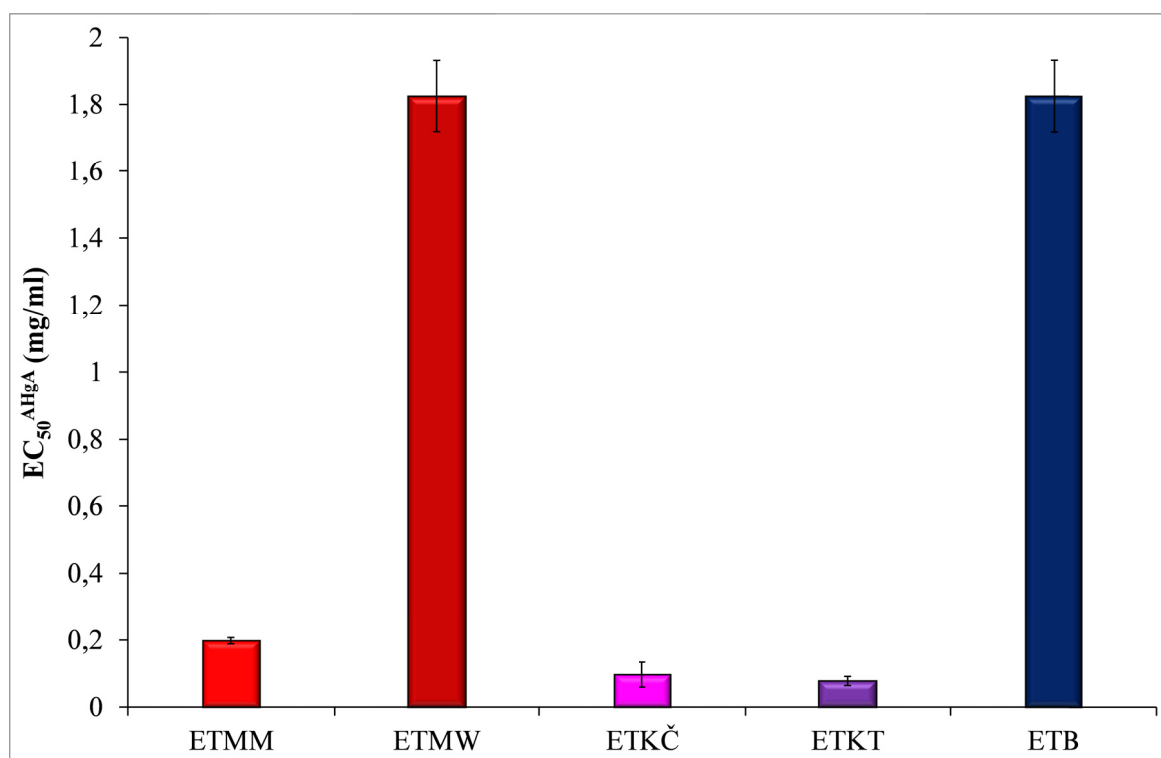
Istraživanja na laboratorijskim životinjama i na ljudima pokazala su da biljke bogate polifenolnim jedinjenjima imaju antihiperglikemijski efekat. Pretpostavlja se da se terapijski efekat postiže putem inhibicije α -glukozidaze i/ili α -amilaze. Utvrđeno je da ekstrakti koji sadrže polifenolna jedinjenja pokazuju sličan potencijal inhibicije enzima α -glukozidaze kao i akarboza. Stoga, prirodni inhibitori α -glukozidaze i α -amilaze iz biljnih izvora predstavljaju izuzetno dobru strategiju za kontrolu hiperglikemije (Tundis i sar, 2010).

U ovom radu ispitan je potencijal inhibitornog efekta ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB na α -glukozidazu. U ispitivanom opsegu koncentracija od 0,02 - 10,00 mg/ml svi ekstrakti tropova su inhibirali aktivnost α -glukozidaze, odnosno pokazali antihiperglikemijsku aktivnost (slika 4.20). Rezultati ispitivanja ukazuju da antihiperglikemijska aktivnost raste sa porastom koncentracije ekstrakata.



Slika 4.20. Uticaj ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB na aktivnost α -glukozidaze

Na slici 4.21 prikazane su EC_{50}^{AHgA} vrednosti za sve ispitivane ekstrakte tropova.



Slika 4.21. EC_{50}^{AHgA} vrednosti ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB

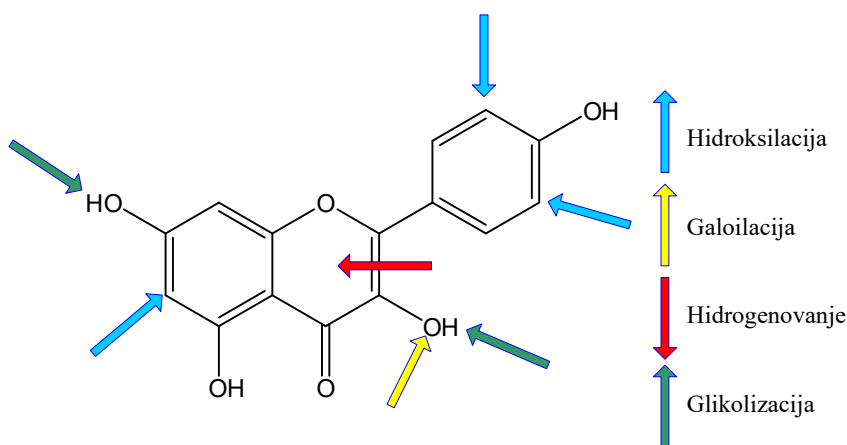
ETMM ($EC_{50}^{AHgA}=0,198$ mg/ml), ETKČ ($EC_{50}^{AHgA}=0,097$ mg/ml) i ETKT ($EC_{50}^{AHgA}=0,078$ mg/ml), su pokazali značajno veću AHgA u odnosu ETMW i ETB. Utvrđen je sledeći redosled antihiperглиkemijske aktivnosti ekstrakata: ETKT > ETKČ > ETMM > ETMW > ETB. Nair i saradnici (2013) su, ispitujući antihiperглиkemijsku aktivnost akarboze na α -glukozidazu, utvrdili da EC_{50} vrednost za akarbozu iznosi $\sim 0,05$ mg/ml. Poređenjem EC_{50}^{AHgA} vrednosti ispitivanih ekstrakata tropova sa vrednošću za akarbozu, može se zaključiti da ETKT i ETKČ pokazuju veoma dobru antihiperглиkemijsku aktivnost, sličnu akarbozi. Tumbas Šaponjac i saradnici (2015) su ispitujući trop dve sorte jagode (Clery i Marmolada) utvrdili EC_{50}^{AHgA} vrednost za trop sorte Marmolada od 0,60 mg/ml, odnosno za trop sorte Clery od 1,90 mg/ml, i zaključili da navedeni tropovi jagode imaju umerenu antihiperглиkemijsku aktivnost. Približne EC_{50}^{AHgA} vrednosti su dobijene za ETMW ($EC_{50}^{AHgA}=1,825$ mg/ml) i ETB ($EC_{50}^{AHgA}=1,83$ mg/ml).

Kožica svih 33 testiranih sorti borovnice, prema ispitivanjima koja su izveli Wang i saradnici (2012), imala je viši inhibitorski efekat na α -glukozidazu u odnosu na meso, što ukazuje na to da inhibitorski efekat na α -glukozidazu borovnice potiče uglavnom od bioaktivnih polifenolnih jedinjenja prisutnih u koži. Najviši koeficijent korelacije je uočen između sadržaja ukupnih antocijana u ekstraktu koži (r=0,92) i ekstraktu mesa ovog voća (r=0,82). Flores i saradnici (2013) su poredili biološku aktivnost antocijana dobijenih ekstrakcijom

celih plodova ili tropa borovnice acetonom, etanolom i metanolom. Ekstrakcija tropa borovnice etanolom, praćena ekstrakcijom na čvrstoj fazi, je bila najefikasnija za dobijanje najviših koncentracija antocijana, koji poseduju blagu α -amilaza i visoku α -glukozidaza inhibitornu aktivnost.

Istraživanja Zhanga i saradnika (2010) su pokazala da ekstrakti 7 sorti maline potentno inhibiraju aktivnost α -glukozidaze sa EC_{50}^{AHgA} vrednostima od 16,8 do 34,2 $\mu\text{g/ml}$ i samim tim mogu obezbediti alternativnu opciju za prevenciju u lećenju dijabetesa tipa II. Prema njihovim ispitivanjima elaginska kiselina, cijanidin-diglukozid, perlagonidin-3-rutinozid i katehin su identifikovani kao aktivne komponente u malini, zaslužne za inhibiciju α -glukozidaze.

Brojna istraživanja ukazuju na pozitivne efekte pojedinih polifenola na dijabetes tipa II, odnosno na inhibiciju aktivnosti α -glukozidaze (Boath i sar, 2012; Flores i sar, 2013; Rojo i sar, 2012; Tumbas Šaponjac i sar, 2015). Xiao i Högger (2015) su ispitivali kako pojedini strukturni elementi flavonoida i fenolnih kiselina utiču na njihovu inhibitornu aktivnost na α -glukozidazu i zaključili sledeće (slika 4.22): (1) hidroksilacija i galoilacija flavonoida i katehina poboljšava inhibiciju, (2) glikozilacija i hidrogenovanje ($C_2=C_3$ dvostruka veza) flavonoida smanjuju inhibiciju, (3) cijanidin glukozidi pokazuju veću inhibiciju nego cijanidini, (4) oligomeri proantocijanidina pokazuju jaću inhibiciju nego njihovi polimeri, (5) hidroksilacija i glikozilacija stilbenima smanjuje inhibiciju, (6) Kafeoilkvininske kiseline pokazuju snažnu inhibiciju, međutim, ferulna, hidroksicimetna i galna kiselina jedva inhibiraju α -glukozidazu, (7) metoksilacija na 4-OH u *trans*-cimetnoj kiselini će promeniti inhibitorno dejstvo, (8) mono-glikozilacija halkona smanjuje inhibiciju, međutim, diglikozilacija halkona znatno smanjuje inhibiciju.



Slika 4.22. Potencijalna mesta flavonoida koja su značajna za inhibitorno dejstvo na α -glukozidazu (Xiao i Högger, 2015)

Boath i saradnici (2012) su saopštili da efikasnost inhibicije različitih pojedinačnih fenolnih jedinjenja na α -glukozidazu zavisi od njihovog mesta delovanja, njihovog mehanizma i njihovog afiniteta vezivanja. Sinergističko ili antagonističko dejstvo između različitih fenolnih jedinjenja može da potencira ili redukuje inhibiciju.

Dobijeni rezultati i druge objavljene studije su još jedan od dokaza da bobičasto voće i njihovi sporedni proizvodi nude dobar potencijal za upotrebu u prehrambenoj industriji kao funkcionalni dodaci ishrani i/ili u farmaceutskoj industriji za dobijanje terapijskih sredstava na biljnoj bazi.

4.5.1. KORELACIONA ANALIZA SADRŽAJA FITOHEMIKALIJA I ANTIHIPERGLIKEMIJSKE AKTIVNOSTI ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT I ETB

Test korelacije rađen je između EC_{50}^{AHgA} i sadržaja TPh, TF, TAc, fenolnih kiselina, flavonoida i vitamina C. Vrednosti dobijenih koeficijenata korelacije (tabela 4.5) ukazuju na dobru korelaciju između antihiperглиkemijske aktivnosti i sadržaja galne ($|r|=0,56$) i ferulne kiseline ($|r|=0,57$) u ispitivanim ekstraktima tropova.

Slaba inhibitorna aktivnost galne i ferulne kiseline (Xiao i sar, 2015) može da bude jedan od razloga umerene aktivnosti ETB, koji je imao najveći sadržaj navedenih kiselina, a pokazao najslabiju aktivnost. Osrednja korelacija uočena je sa sadržajem TAc, rutina, miricetina i protokatehinske kiseline, a sa ostalim ispitivanim jedinjenjima korelacija je bila slaba. Giampieri i saradnici (2012) su saopštili da protokatehinska kiselina i derivati kafene kiseline deluju inhibitorno na aktivnost α -glukozidaze.

Iako je u studiji Wang i saradnika (2012) ustanovljen vrlo dobar koeficijent korelacije između inhibitorne aktivnosti ekstrakata kožice borovnice i ekstrakata mesa borovnice (33 sorte su ispitivane) na α -glukozidazu i TPh i TAc, u ovoj disertaciji korelacija je osrednja. U ETB je ustanovljen i HPLC analizom i spektrofotometrijski najviši sadržaj antocijana, a ipak je pokazao najlošiju AHgA. To je još jedan od pokazatelja da sadržaji fitohemikalija, kao i njihov uticaj na biološku aktivnost (antioksidativnu, antihiperглиkemijsku, antiproliferativnu i antimikrobnu) zavisi od niza faktora (period berbe, međusobni uticaji sa drugim komponentama, pripreme uzoraka i dr).

Tabela 4.5. Pirsonov test koleracije između sadržaja polifenolnih jedinjenja i vitamina C i EC_{50}^{AHgA} vrednosti

Korelacija	TPh	TF	TAc	Protokatehinska kiselina	Galna kiselina	Ferulna kiselina	Sinapinska kiselina	Elaginska kiselina	Rutin	Miricetin	Cijanidin-3-glukozid	Vitamin C	EC_{50}^{AHgA}
TPh	1												
TF	0,96	1											
TAc	0,76	0,76	1										
Protokatehinska kiselina	0,69	0,67	0,82	1									
Galna kiselina	0,77	0,73	0,98	0,74	1								
Ferulna kiselina	0,62	0,62	0,97	0,72	0,97	1							
Sinapinska kiselina	0,96	0,98	0,63	0,57	0,62	0,47	1						
Elaginska kiselina	0,19	0,02	0,30	0,05	0,24	0,42	0,13	1					
Rutin	0,82	0,81	0,97	0,69	0,99	0,95	0,71	0,27	1				
Miricetin	0,94	0,91	0,94	0,77	0,94	0,86	0,85	0,08	0,97	1			
Cijanidin-3-glukozid	0,94	0,95	0,90	0,68	0,90	0,81	0,89	0,14	0,95	0,99	1		
Vitamin C	0,13	0,19	0,44	0,15	0,52	0,58	0,11	0,70	0,55	0,36	0,42	1	
EC_{50}^{AHgA}	0,14	0,07	0,48	0,41	0,56	0,57	0,15	0,13	0,43	0,33	0,20	0,19	1

***vrlo dobra korelacija** ($|r| > 0,8$), **dobra korelacija** ($|r| > 0,5$), **osrednja korelacija** ($|r| > 0,3$) i **slaba korelacija** ($|r| < 0,3$)

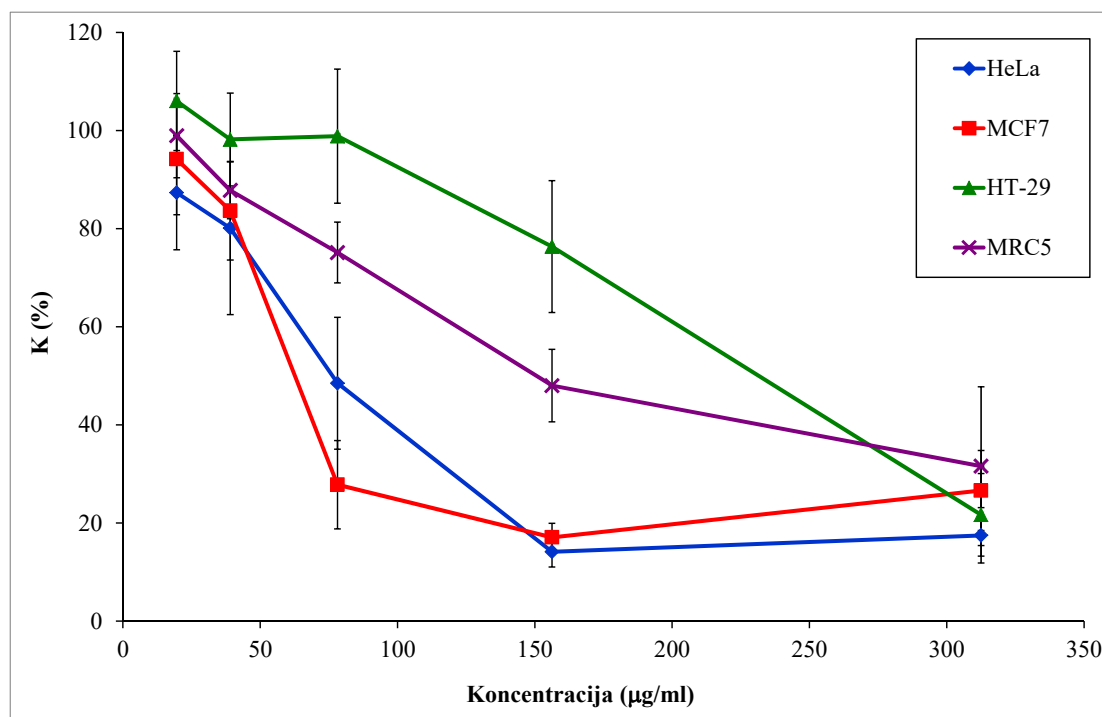
4.6. ANTIPROLIFERATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA

Trenutne statistike iz Sjedinjenih Američkih Država pokazuju da je u 2014. godini bilo 1.665.540 novih slučajeva raka i 585.720 umrlih, što odgovara 1600 smrtnih slučajeva dnevno (Jaganathan i sar, 2014). Navedeni podaci svakako su značajno uticali na intenziviranje istraživanja vezanih za iznalaženje prirodnih jedinjenja koja bi imala pozitivne efekte u prevenciji razvoja i/ili lečenju ove bolesti.

Biološki testovi na humanim ćelijskim linijama koji se baziraju na odgovoru cele ćelije predstavljaju snažan indikator metaboličkih, biohemijskih i genetskih promena koje nastaju delovanjem ispitivanih supstanci.

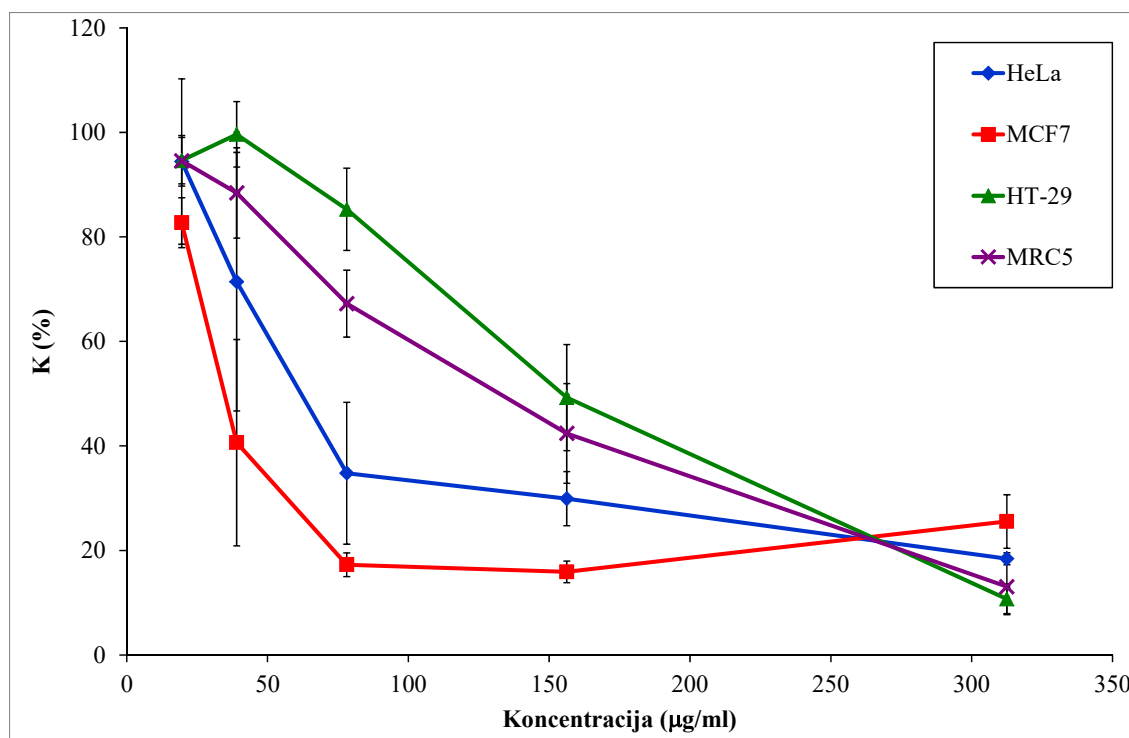
Antiproliferativna aktivnost ekstrakata ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB ispitana je *in vitro*, njihovim delovanjem na rast četiri histološki različite humane ćelije: HeLa (epitelni karcinom cerviksa), MCF7 (adenokarcinom dojke), HT-29 (adenokarcinom debelog creva) i MRC-5 (humani fetalni fibroblasti pluća). Ispitivani ekstrakti tropova uticali su na rast tumorskih ćelija u zavisnosti od primenjene koncentracije i vrste ćelijske linije.

Na slikama 4.23 i 4.24 grafički je prikazan uticaj ETMM i ETMW na rast HeLa, MCF7, HT-29 i MRC-5 ćelijskih linija.



Slika 4.23. Antiproliferativna aktivnost ETMM na rast HeLa, MCF7, HT-29, MRC-5 ćelijskih linija

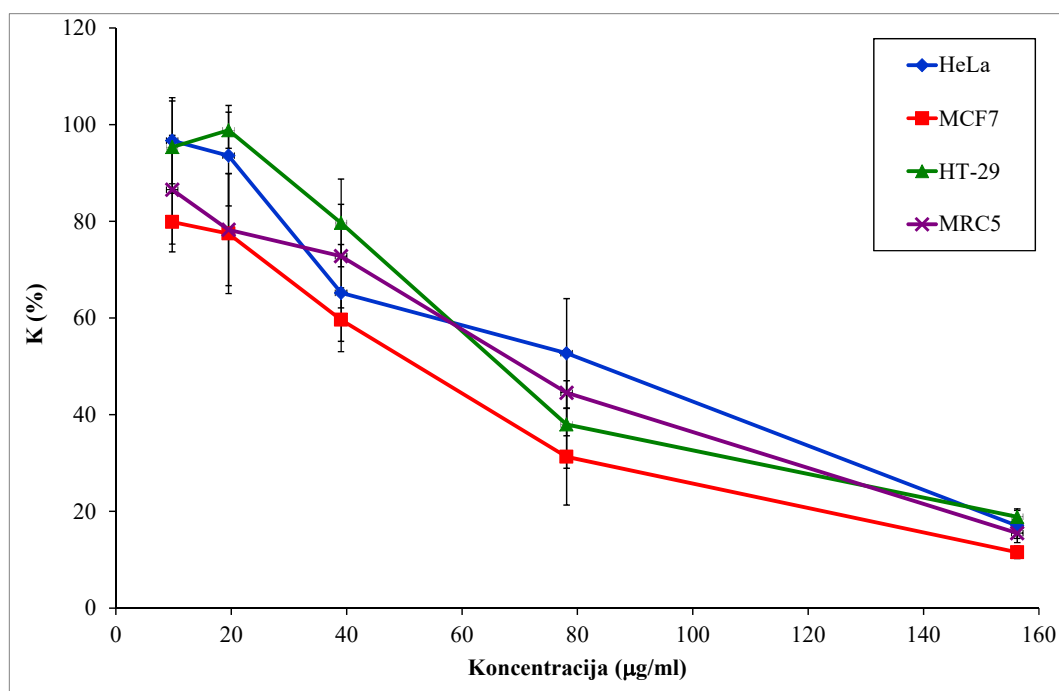
Rezultati ispitivanja, prikazani na slici 4.23, pokazuju da je ETMM iskazao koncentracijsku zavisnost inhibitorne aktivnosti na rast sve četiri ćelijske linije u ispitivanom opsegu koncentracija (od 19,53-312,50 $\mu\text{g/ml}$), jedino što pri koncentracijama od 39,06 - 78,12 $\mu\text{g/ml}$ nije uočena značajnija aktivnost na rast ćelijske linije HT-29.



Slika 4.24. Antiproliferativna aktivnost ETMW na rast HeLa, MCF7, HT-29, MRC-5 ćelijskih linija

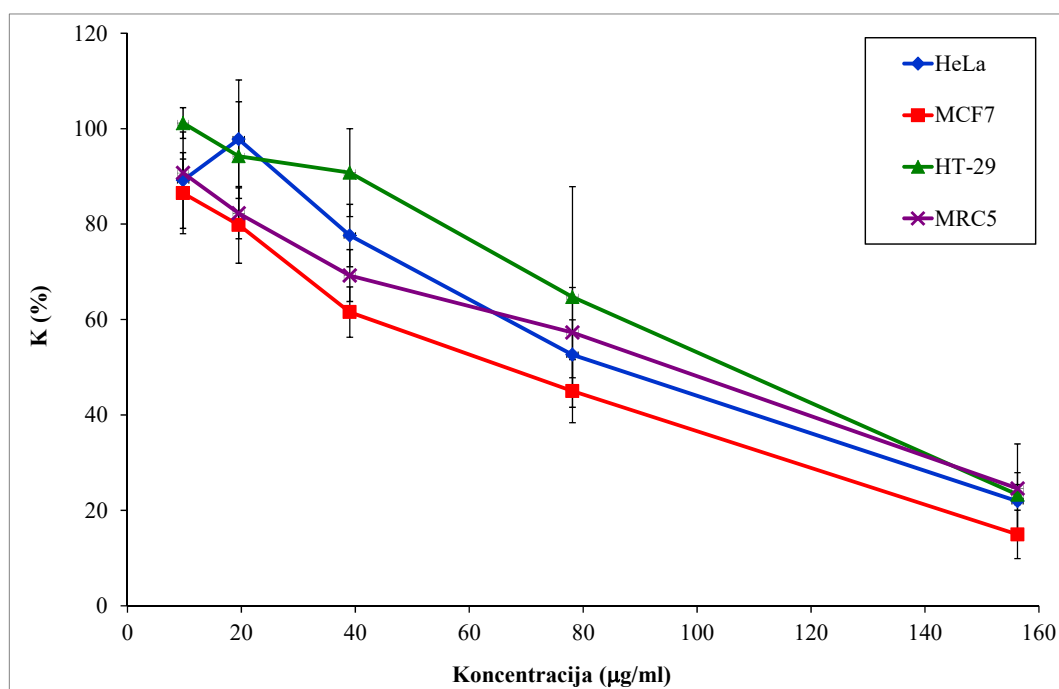
Na slici 4.24 može se uočiti koncentracijska zavisnost inhibitorne aktivnosti ETMW na rast HeLa, MCF7, HT-29 i MRC-5 ćelijskih linija u celokupnom opsegu ispitivanih koncentracija (od 19,53 - 312,50 $\mu\text{g/ml}$).

Na slikama 4.25. i 4.26 prikazana je antiproliferativna aktivnost ETKČ i ETKT na rast HeLa, MCF7, HT-29, MRC-5 ćelijskih linija.



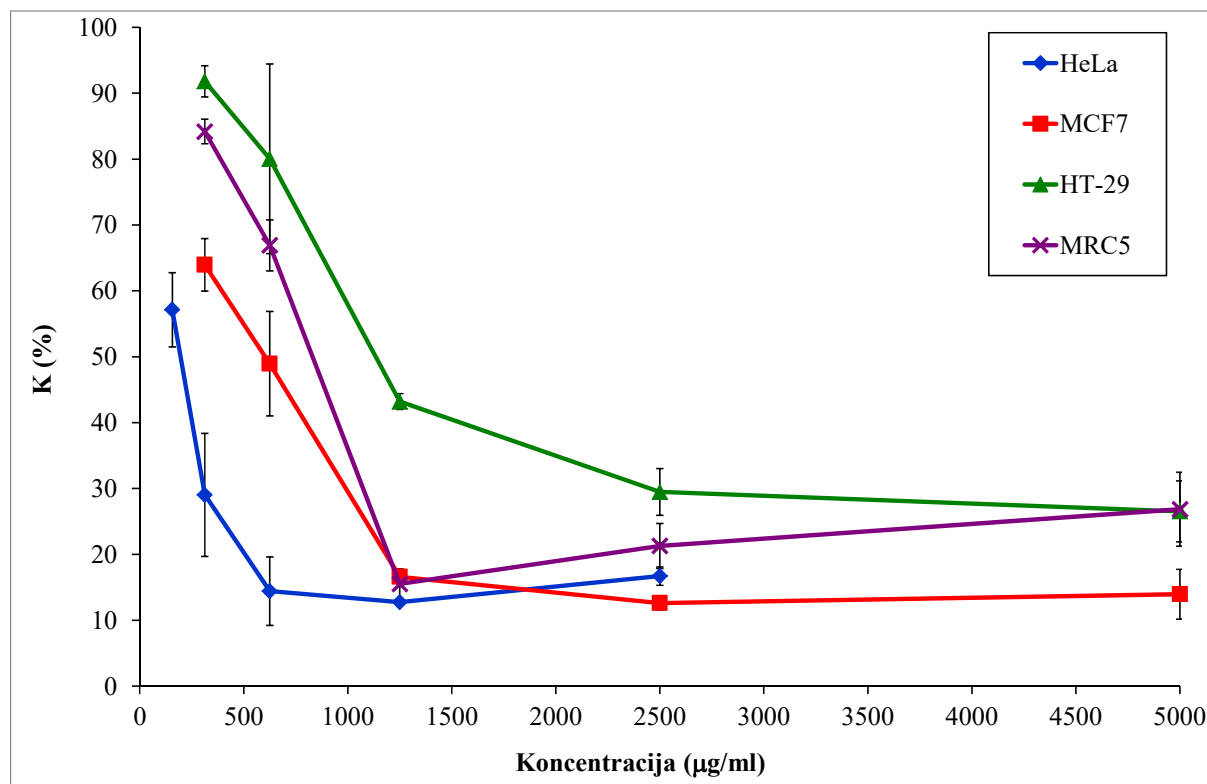
Slika 4.25. Antiproliferativna aktivnost ETKČ na rast HeLa, MCF7, HT-29, MRC-5 ćelijskih linija

ETKČ je u ispitivanom opsegu koncentracija (od 9,76–156,25 µg/ml) pokazao izraženu antiproliferativnu aktivnost prema svim ispitivanim ćelijskim linijama. Najveća aktivnost ovog ekstrakta zapažena je prema MCF7 ćelijskoj liniji.



Slika 4.26. Antiproliferativna aktivnost ETKT na rast HeLa, MCF7, HT-29 i MRC-5 ćelijskih linija

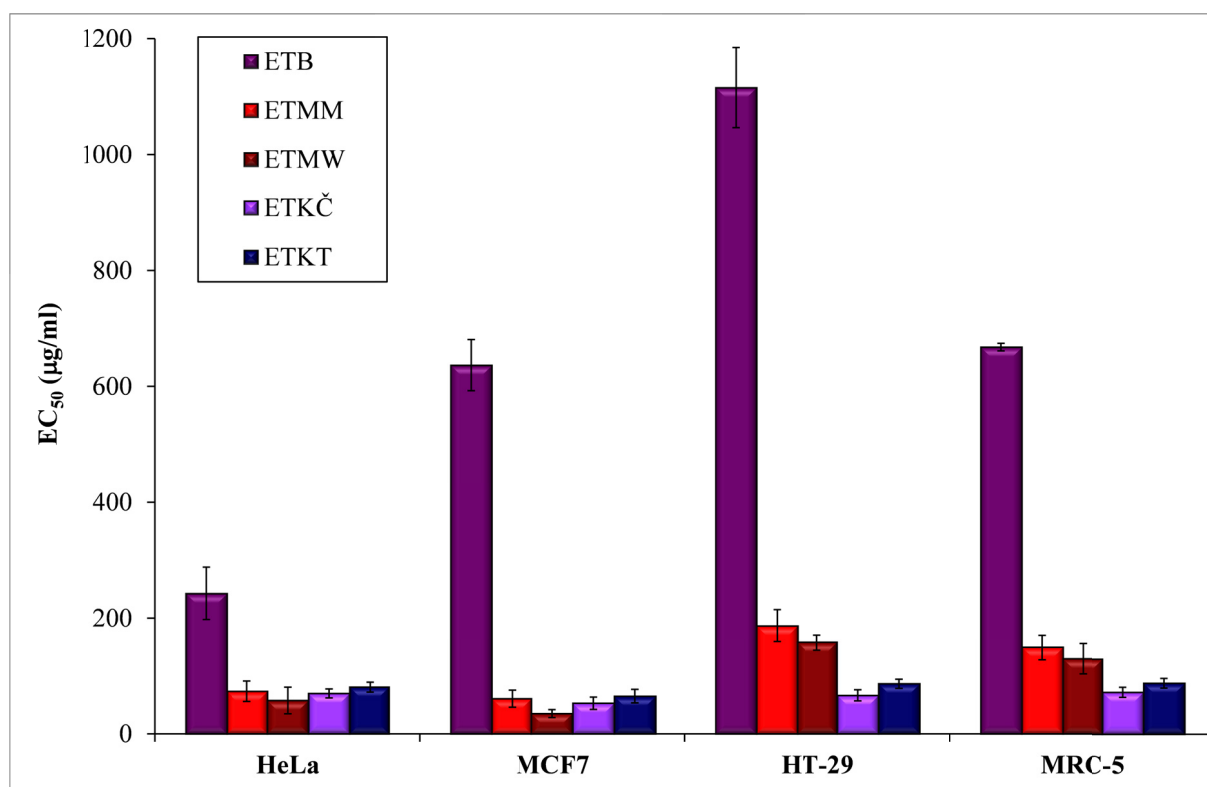
Dobra antiproliferativna aktivnost utvrđena je i za ETKT (slika 4.25). U ispitivanom opsegu koncentracija (od 9,76–156,25 $\mu\text{g/ml}$) uočava se koncentracijska zavisnost inhibitorne aktivnosti na rast svih ćelijskih linija. Najveću aktivnost ekstrakt je ispoljio prema MCF7 ćelijskoj liniji.



Slika 4.27. Antiproliferativna aktivnost ETB na rast HeLa, MCF7, HT-29 i MRC-5 ćelijskih linija

ETB je pokazao najslabije antiproliferativno dejstvo (slika 4.27) u poređenju sa svim ispitivanim ekstraktima tropova maline i kupine. Inhibitorno dejstvo na rast HeLa, MCF7, HT-29 i MRC-5 ćelijskih linija zapaženo je pri relativno visokim koncentracijama, u opsegu od 312,50–5000 $\mu\text{g/ml}$.

Na osnovu dobijenih rezultata i konstruisanih krivih zavisnosti ćelijskog rasta od finalne koncentracije ekstrakta, dobijenih polinomskom regresionom analizom, očitane su EC_{50} vrednosti - koncentracije ekstrakata koje izazivaju inhibiciju rasta ćelija za 50% (slika 4.28).



Slika 4.28. EC_{50} vrednosti ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB

Poređenjem dobijenih vrednosti za EC_{50}^{HeLa} , EC_{50}^{MCF7} , EC_{50}^{HT-29} i EC_{50}^{MRC-5} utvrđen je sledeći redosled antiproliferativne aktivnosti ispitivanih ekstrakata na HeLa i MCF7 ćelijske linije: $ETMW > ETKČ > ETMM > ETKT > ETB$, dok je redosled antiproliferativne aktivnosti ekstrakata na HT-29 i MRC-5 ćelijske linije bio: $ETKČ > ETKT > ETMW > ETMM > ETB$.

ETMM i ETMW su pokazali izraženu antiproliferativnu aktivnost na sve 4 ispitivane humane ćelijske linije, pri čemu je ETMW na svim ćelijskim linijama pokazao jače antiproliferativno delovanje. Najbolja aktivnost ovih ekstrakata je uočena prema HeLa i MCF7 humanim ćelijskim linijama (za ETMM: $EC_{50}^{HeLa}=73,11$ i $EC_{50}^{MCF7}=60,29$ $\mu\text{g/ml}$, a za ETMW: $EC_{50}^{HeLa}=57,27$ $\mu\text{g/ml}$ i $EC_{50}^{MCF7}=34,85$ $\mu\text{g/ml}$). Vulić i saradnici (2014) ustanovili su da efekti liofilizirane maline na rast ćelijskih linija zavise od koncentracije ekstrakta i vrste ćelijskih linija. Prema njihovim istraživanjima, najizraženiji efekat, tj. najniža EC_{50} vrednost je dobijena za MCF7 ćelijsku liniju ($EC_{50}^{MCF7}=395,07$ $\mu\text{g/ml}$). Paudel i saradnici (2014) su ispitivali antiproliferativnu aktivnost ekstrakata crne maline na rast HT-29 ćelijske linije. Metaboličkim ispitivanjem bioaktivnosti hemijskih konstituenata crne maline baziranim na NMR su utvrdili da cijanidin-3-rutinozid i cijanidin-3-ksilozilrutinozid dominantno doprinose biološkoj aktivnosti ovih ekstrakata, ali da i derivati salicilne kiseline (npr. glukozil ester salicilne

kiseline), kvercetin-3-rutinozid, kvercetin-3-glukozid, *p*-kumarinska kiselina, epikatehin, metil derivati elaginske kiseline i limunska kiselina značajno doprinose antiproliferativnoj aktivnosti ekstrakata bobica. Peiffer i saradnici (2014) su ispitali uticaj ekstrakta crne maline na rak jednjaka. U ovom radu pacovi su injektirani sa N-nitrozometilbenzilaminom (NMBA) tri puta nedeljno, tokom 5 nedelja, a potom su hranjeni sa kontrolnom hranom ili hranom koja je sadržala 6,1% liofilizirane crne maline (LCM), frakcije ekstrakta bogate antocijanima dobijene iz LCM, ili frakcije ekstrakta bogate protokatehinskom kiselinom dobijene iz LCM. Životinje su kontrolisane u 15, 25. i 35. nedelji, kako bi se kvantifikovao razvoj preneoplastičnih lezija i tumora u jednjaku, a ispitana je i ekspresija inflamatornih biomarkera. U 15. i 25. nedelji, sve eksperimentalne dijete bile su podjednako efikasne u smanjenju NMBA, indukovanih tumora jednjaka, kao i u smanjenju ekspresije pentraksina-3 (PTKS3) i produkciji citokina mononuklearnih ćelija periferne krvi, kao odgovor na interleukin (IL)-1b i TNF- α . Ovo je još jedan od dokaza da polifenolne komponente pokazuju antikancerogena svojstva.

ETKČ i ETKT su pokazali, takođe, izuzetno antiproliferativno delovanje na sve 4 ispitivane humane ćelijske linije. Antiproliferativna aktivnost ETKČ je bila malo izraženija od ETKT. U odnosu na ETMM ($EC_{50}^{HT-29}=187 \mu\text{g/ml}$; $EC_{50}^{MRC-5}=149 \mu\text{g/ml}$), ETMW ($EC_{50}^{HT-29}=157 \mu\text{g/ml}$; $EC_{50}^{MRC-5}=129 \mu\text{g/ml}$) kao i ETB ($EC_{50}^{HT-29}=1115,45 \mu\text{g/ml}$; $EC_{50}^{MRC-5}=667 \mu\text{g/ml}$), uzorci ETKČ i ETKT ($EC_{50}^{HT-29}=66,02 \mu\text{g/ml}$; $EC_{50}^{MRC-5}=71,70 \mu\text{g/ml}$, odnosno $EC_{50}^{HT-29}=85,99 \mu\text{g/ml}$; $EC_{50}^{MRC-5}=87,28 \mu\text{g/ml}$) su pokazali daleko izraženiju aktivnost prema HT-29 i MRC-5 ćelijskim linijama. Kako su spektrofotometrijska i HPLC analiza utvrdile da je sadržaj flavonoida i ukupnih polifenolnih jedinjenja u ETKČ i ETKT izuzetno visok, može se pretpostaviti da su polifenolna jedinjenja najzaslužnija za jako antiproliferativno delovanje ovih ekstrakata. Moguće je pretpostaviti da polifenolna jedinjenja, kao snažni antioksidanti, mogu da utiču na redoks stanje ćelije i na taj način dovedu do ćelijske proliferacije. Veliki broj autora je potvrdio da su polifenolna jedinjenja jaki antioksidanti sa potencijalom da sprečavaju oksidativna oštećenja izazvana reaktivnim kiseoničnim vrstama, štiteći od kardiovaskularnih oboljenja i kancera (Nile i sar, 2014). U poređenju sa crvenom (*Rubus rosifolius*) i crnom malinom (*Rubus racemosus*), kupina (*Rubus jamaicensis*) je pokazala najveći ukupni kapacitet, za inhibiciju rasta humanih tumorskih ćelija debelog creva, dojke, pluća i želuca i to za 50, 24, 54 i 37%, redom (Bowen-Forbes i sar, 2010).

Ispitivani ETB je pokazao izraženije antiproliferativno dejstvo na 3 od 4 ispitivane humane ćelijske linije, pri čemu je najbolja aktivnost uočena prema HeLa ćelijskoj liniji ($EC_{50}^{HeLa}=242,93 \mu\text{g/ml}$). Za HT-29 ćelijsku liniju određena EC_{50} vrednost je bila veća od

1000 $\mu\text{g/ml}$ ($\text{EC}_{50}^{\text{HT-29}}=1115,45 \mu\text{g/ml}$). Adams i saradnici (2010) su pokazali, ne samo da se konzumiranjem borovnica kod miševa smanjio tumor, već i aktivnost AKT i NF κ B, koji su markeri za metastatski potencijal u tumorima dojke. Njihovi rezultati istraživanja ukazuju da unos borovnica može biti ključna komponenta dugoročne strategije za prevenciju raka dojke.

Faria i saradnici (2010) su ispitujući antikancerogena svojstva ekstrakata borovnice, ekstrakta antocijana i adukta ekstrakta antocijana i pirogroždane kiseline, na dve ćelijske linije kancera dojke (MDA-MB-231 i MCF7) ustanovili da su oba ekstrakta u toku inkubacije od 24 h efikasno inhibirala proliferaciju ćelija pri netoksičnim koncentracijama od 250 $\mu\text{g/ml}$. Adukt ekstrakta antocijana i pirogroždane kiseline je pokazao bolju aktivnost prema MDA-MB-231 ćelijskoj liniji. Ovaj adukt bi mogao da aktivira kapsazu-3 u MCF7 ćelijama, izazivajući smetnje u ćelijskom signalnom putu apoptoze.

Seeram i saradnici (2006) su ustanovili da ekstrakti kupine, crne maline, borovnice, brusnice, crvene maline i jagode inhibiraju proliferaciju tumorskih ćelijskih linija: usne duplje (KB), jezika (CAL-27), dojke (MCF7), debelog creva (HT-29, HCT116) i prostate (LNCaP) u opsegu koncentracija od 25 do 200 $\mu\text{g/ml}$. Sa povećanjem koncentracija ekstrakata bobica primeno je povećanje inhibicije proliferacije ćelija u svim ćelijskim linijama, sa različitim stepenom jačine. Posebno izraženu aktivnost pokazali su ekstrakti kupine, borovnice i crne maline.

Flavonoid kvercetin inhibira proliferaciju ćelija i pojačava apoptozu *in vitro*, odnosno inhibira formiranje ranih preneoplastičnih lezija debelog creva (Warren i sar, 2009). Moguće je da su efekti na proliferaciju i apoptozu posledica sposobnosti kvercetina za suzbijanjem ekspresije proinflamatornih medijatora.

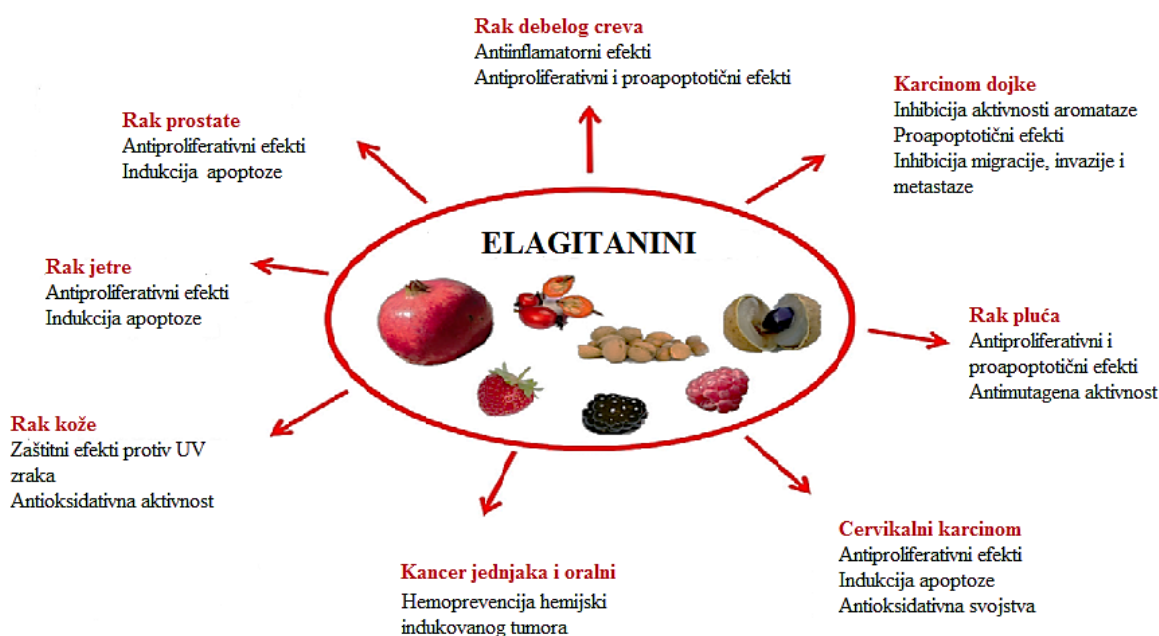
Antocijani indukuju apoptozu u različitim ćelijama raka, preko mitohondrijalnog puta (Sehitoglu i sar, 2014). Nedavno je pokazano da antocijani stimulišu ekspresiju tumora supresor gena putem demetilacije promotora CDKN2A, i SFRP2, SFRP5, i WIF1 (Sehitoglu i sar, 2014).

Devi i saradnici (2014) su utvrdili antikancerogeno delovanje galne kiseline na dva najčešća karcinoma, rak debelog creva (ćelijska linija HCT-15) i dojke (ćelijska linija MDA-MB-231). Štaviše, tretirane ćelije pokazale su morfološke promene poput smanjenja broja ćelija, ćelijsko skupljanje, odvajanje od supstrata, kondenzaciju i fragmentaciju hromatina i prisustvo apoptotičnih tela. Ovo su znaci apoptoze u tretiranim ćelijama.

Losso i saradnici (2004) su ispitivali citoksični potencijal i antiproliferativnu aktivnost elaginske kiseline prema HEL 299 ćelijama (normalni humani fibroblasti pluća), Caco-2 (adenokarcinom debelog creva), MCF7 (adenokarcinom dojke) i DU145 (humani karcinom

prostate). Utvrdili su da elaginska kiselina pokazuje selektivnu citotoksičnost i antiproliferativnu aktivnost, i indukuje apoptozu u Caco-2, MFC7 i DU 145 ćelijama kancera bez toksičnih efekata na vijabilnost normalnih humanih fibroblasta pluća.

Elaginska kiselina ulazi u sastav elagitanina, za koje je dokazano da imaju niz pozitivnih svojstava i da su veoma zastupljeni u bobičastom voću. Kupina (plod i semenke) sadrži niz elagitanina, uključujući pedunkulagin, kasuariktin, sanguin H-6 (lambertianin A), i lambertianin (C i D) (Mertz i sar, 2007, Hager i sar, 2008). Takođe je ustanovljeno i da malina obiluje elagitaninima. Ismail i saradnici (2016) su saopštili da su elagitanini, pored izotiocijanata, polifenola, flavonoida, indola, retinoida, tokoferola, veoma važna klasa fitohemikalija koja poseduje izrazitu hemoprotektivnu, antikancerogenu i antiproliferativnu aktivnost prema različitim humanim kancerima (slika 4.29).



Slika 4.29. Hemoprotektivna, antikancerogena i antiproliferativna aktivnost bobičastog voća koje sadrži elagitanine (Ismail i sar, 2016)

Polifenolna jedinjenja bobičastog voća su prirodni antioksidanti, pa zato njihova potrošnja može igrati vitalnu ulogu u smanjenju oksidativnog stresa i sprečavanju degenerativnih bolesti, uključujući i kancer. Kombinacija ovih agenasa sa lekovima, koji deluju na reaktivne kiseonične vrste na zavisani ili nezavisani način, se predlaže kao dobar način za suzbijanje ćelija raka (Yuan i sar, 2015).

4.6.1. KORELACIJA IZMEĐU SADRŽAJA FITOHEMIKALIJA I ANTIPROLIFERATIVNE AKTIVNOSTI ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT I ETB

Korelacija između sadržaja TPh, TF, TAc, fenolnih kiselina, flavonoida i vitamina C u ekstraktima tropova maline, kupine i borovnice i antiproliferativne aktivnosti ekstrakata tropova na sve 4 ispitivane humane ćelijske linije (EC_{50} vrednosti) analizirana je Pirsonovim testom. Rezultati korelacione analize prikazani su u tabeli 4.6.

Vrlo dobra korelacija uočena je između svih EC_{50} vrednosti i TAc (od $|r|=0,95$ za EC_{50}^{HT-29} i EC_{50}^{MRC-5} do $|r|=0,99$ za EC_{50}^{HeLa}). EC_{50} vrednosti za sve ćelijske linije su dobro korelirale sa TPh i TF.

Od fenolnih kiselina veoma dobru korelaciju sa EC_{50} vrednostima za sve ćelijske linije su pokazale galna i ferulna kiselina (od $|r|=0,95$ do $|r|=1$), a dobru korelaciju protokatehinska kiselina (od $|r|=0,72$ do $|r|=0,77$). Sinapinska kiselina je dobro korelirala sa EC_{50}^{HeLa} , a osrednje sa EC_{50} vrednostima za ostale ćelijske linije. Osrednja, relativno slična, korelacija utvrđena je između EC_{50} vrednosti za sve četiri ćelijske linije i elaginske kiseline.

Sve EC_{50} vrednosti su pokazale vrlo dobru korelaciju sa rutinom (od $|r|=0,90$ do $|r|=0,95$) i miricetinom (od $|r|=0,80$ do $|r|=0,89$). Veoma dobra korelacija je uočena i između cijanidin 3-glukozida i EC_{50}^{HeLa} ($|r|=0,89$), odnosno EC_{50}^{MCF7} ($|r|=0,89$), a dobra sa EC_{50}^{HT-29} i EC_{50}^{MRC-5} ($|r|=0,74$). Dobra vrednost korelacije je nađena i između vitamina C i svih EC_{50} vrednosti (od $|r|=0,52$ do $|r|=0,54$).

Kako rezultati dosadašnjih istraživanja ukazuju da su za antiproliferativnu aktivnost bobičastog voća odgovorna polifenolna jedinjenja (Seeram i sar, 2006), antocijani (Sehitoglu i sar, 2014; Faria i sar, 2014; Paudel i sar, 2014), flavonoli (Paudel i sar, 2014) Seeram i sar, 2006; Warren i sar, 2009) flavanoli (Paudel i sar, 2014; Seeram i sar, 2006; Warren i sar, 2009), elagitanini, galotanini (Ismail i sar, 2016), proantocijanidini (Seeram i sar, 2006) i fenolne kiseline (Ismail i sar, 2016; Pan i sar, 2014; Paudel i sar, 2014), može se zaključiti da su dobijeni rezultati korelacione analize između sadržaja TPh, TF, TAc, fenolnih kiselina i flavonoida i antiproliferativne aktivnosti ekstrakata tropova maline, kupine i borovnice na ispitivane humane ćelijske linije u saglasnosti sa literaturnim navodima.

Iako dobijeni rezultati korelacione analize ukazuju da se antiproliferativna aktivnost ispitivanih ekstrakata tropova maline, kupine i borovnice može pripisati antocijanima, flavonoidima, fenolnim kiselinama i vitaminu C, ipak treba naglasiti da je teško odrediti doprinos pojedinačnih jedinjenja ukupoj aktivnosti, jer je često aktivnost ekstrakata rezultat sinergističkog dejstva ovih jedinjenja (Tumbas, 2012).

Tabela 4.6. Pirsonov test korelacije između sadržaja TPh, TF, TAc, fenolnih kiselina, flavonoida i vitamina C i EC₅₀ vrednosti za ispitivane humane ćelijske linije

Korelacija	TPh	TF	Tac	Protokatehinska kiselina	Galna kiselina	Ferulna kiselina	Sinapinska kiselina	Elaginska kiselina	Rutin	Miricetin	Cijanidin-3-glukozid	Vitamin C	EC ₅₀ ^{HeLa}	EC ₅₀ ^{MCF7}	EC ₅₀ ^{HT-29}	EC ₅₀ ^{MRC-5}	
TPh	1																
TF	0,96	1															
Tac	0,76	0,76	1														
Protokatehinska kiselina	0,69	0,67	0,82	1													
Galna kiselina	0,77	0,73	0,98	0,74	1												
Ferulna kiselina	0,62	0,62	0,97	0,72	0,97	1											
Sinapinska kiselina	0,96	0,98	0,63	0,57	0,62	0,47	1										
Elaginska kiselina	0,19	0,02	0,30	0,05	0,24	0,42	0,13	1									
Rutin	0,82	0,81	0,97	0,69	0,99	0,95	0,71	0,27	1								
Miricetin	0,94	0,91	0,94	0,77	0,94	0,86	0,85	0,08	0,97	1							
Cijanidin-3-glukozid	0,94	0,95	0,90	0,68	0,90	0,81	0,89	0,14	0,95	0,99	1						
Vitamin C	0,13	0,19	0,44	0,15	0,52	0,58	0,11	0,70	0,55	0,36	0,42	1					
EC ₅₀ ^{HeLa}	0,67	0,67	0,99	0,77	0,98	1,00	0,53	0,39	0,95	0,89	0,84	0,52	1				
EC ₅₀ ^{MCF7}	0,64	0,63	0,98	0,74	0,98	1,00	0,49	0,39	0,95	0,87	0,82	0,54	1,00	1			
EC ₅₀ ^{HT-29}	0,55	0,53	0,95	0,72	0,95	0,99	0,37	0,41	0,90	0,80	0,74	0,54	0,98	0,99	1		
EC ₅₀ ^{MRC-5}	0,54	0,52	0,95	0,72	0,95	0,99	0,37	0,42	0,90	0,80	0,74	0,54	0,98	0,99	1,00	1	

*vrlo dobra korelacija ($|r| > 0,8$), dobra korelacija ($|r| > 0,5$), osrednja korelacija ($|r| > 0,3$) i slaba korelacija ($|r| < 0,3$)

4.7. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA TROPOVA BOBIČASTOG VOĆA

Zbog česte upotrebe konvencionalnih antibiotika, otpornost patogenih mikroorganizama raste među ljudima, domaćim, pa čak i divljim životinjama (Velhner i sar, 2012). Biljni materijal sa antimikrobnom aktivnosti mogao bi biti odlična zamena konvencionalnim antibioticima. U novije vreme prah semenki maline se koristi za proizvodnju antibiotika neomicina, koga postupkom površinske fermentacije proizvodi *Streptomyces marinensis*, (Pertuzatti i sar, 2015). Ovaj antibiotik je važan aminoglukozid, koji ima široku primenu u proizvodnji farmaceutskih preparata, jer je efikasan protiv G (+) bakterija, G (-) bakterija i mikobakterija.

Potrošnja bobica, bilo kao svežeg voća, u formulaciji praha, ili u pićima, je povezana sa velikim brojem zdravstvenih benefita, počevši od antibakterijskih i antivirusnih efekata, zaštite od upala, raka i srčanih bolesti (Folmer i sar, 2014).

U ovoj disertaciji ispitana je antimikrobna aktivnost ekstrakata tropova bobičastog voća, ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB na odabrane sojeve bakterija, kvasaca i plesni disk difuzionom metodom i metodom „bunarčića“. Za razliku od disk difuzione metode, kod koje se na sterilni disk može naneti maksimalno 15 µl ekstrakta, metoda „bunarčića“ omogućava da se u inokulisanu hranljivu podlogu aplikuje veća zapremina ekstrakta.

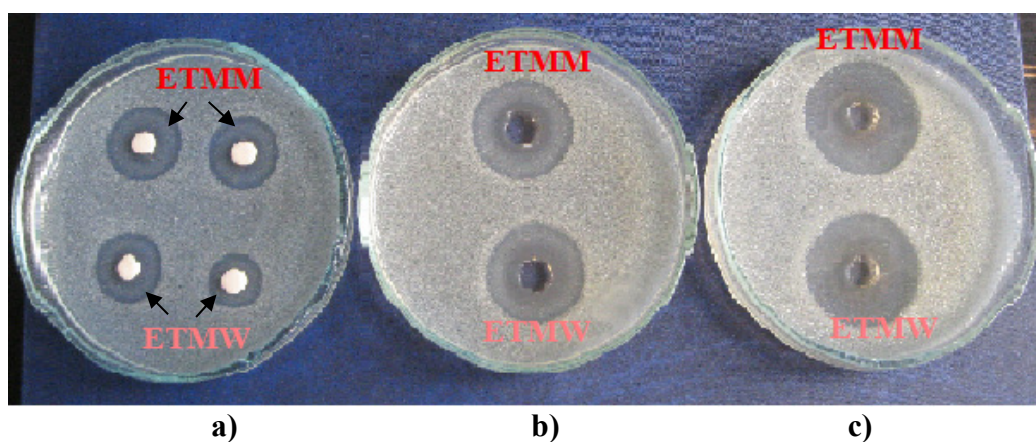
4.7.1. ANTIBAKTERIJSKA I ANTIFUNGALNA AKTIVNOST ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT I ETB

U tabeli 4.7 prikazani su rezultati ispitivanja antibakterijske i antifungalne aktivnosti ETMM i ETMW, a na slikama 4.30, 4.31 i 4.32 antibakterijska aktivnost ovih ekstrakata prema *Salmonella* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, odnosno *Salmonella* Typhymurium ATCC 14028.

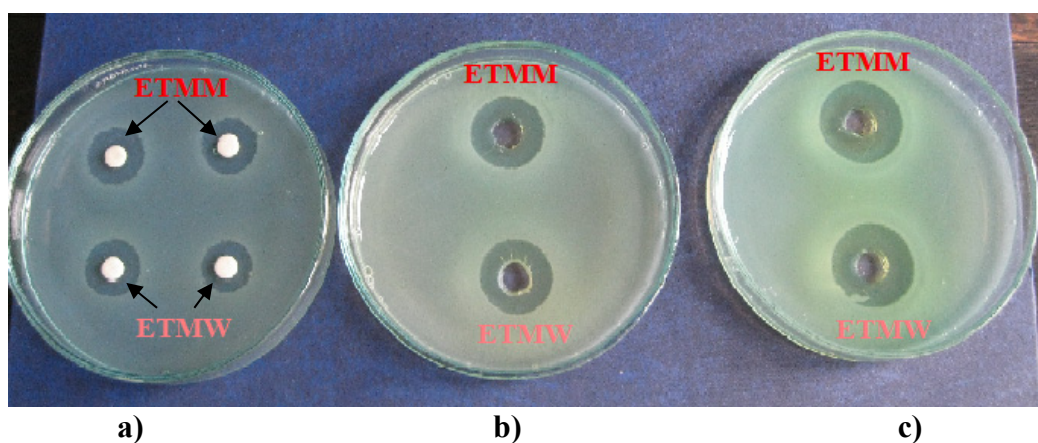
Tabela 4.7. Antimikrobna aktivnost ETMM i ETMW izražena kao srednja vrednost prečnika inhibicije (mm), uključujući prečnik diska (6 mm) i bunarčića (9 mm)

Test mikroorganizam	Ekstrakt tropa	Metoda		
		Disk difuziona	Metoda „bunarčića”	
			15 μ l	50 μ l
G (-) bakterije				
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	ETMM	21,75 \pm 0,50*	27,33 \pm 0,58*	34,32 \pm 1,54*
	ETMW	20,00 \pm 0,85*	25,67 \pm 0,58*	31,67 \pm 0,58*
<i>Escherichia coli</i> ***	ETMM	18,25 \pm 1,50**	25,33 \pm 0,58*	30,67 \pm 0,58*
	ETMW	17,25 \pm 0,96**	25,67 \pm 0,58*	30,67 \pm 0,58*
<i>Salmonella</i> Typhymurium ATCC 14028	ETMM	22,00 \pm 0,82*	29,50 \pm 1,00*	35,50 \pm 1,00*
	ETMW	23,00 \pm 1,73*	30,00 \pm 1,00*	34,00 \pm 1,63*
<i>Salmonella</i> sp.***	ETMM	21,75 \pm 1,15**	31,33 \pm 2,08**	33,33 \pm 0,58**
	ETMW	18,00 \pm 2,00**	28,33 \pm 1,53**	33,33 \pm 1,15**
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	ETMM	18,25 \pm 0,50*	22,67 \pm 0,58*	25,00 \pm 1,00*
	ETMW	16,75 \pm 0,50*	22,0 \pm 1,00*	24,67 \pm 0,58*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ***	ETMM	15,75 \pm 1,26*	20,67 \pm 0,58*	24,00 \pm 1,00*
	ETMW	15,50 \pm 1,00*	21,33 \pm 1,15*	24,67 \pm 0,58*
G (+) bakterije				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 11632	ETMM	34,75 \pm 0,96*	41,50 \pm 4,43*	48,50 \pm 1,00*
	ETMW	33,25 \pm 0,96*	39,00 \pm 1,15*	46,00 \pm 1,63*
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ***	ETMM	11,75 \pm 0,96*	23,00 \pm 1,00*	39,00 \pm 1,00*
	ETMW	12,25 \pm 0,96*	21,00 \pm 0,50*	38,00 \pm 1,00*
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	ETMM	22,50 \pm 0,58*	32,00 \pm 0,58*	36,00 \pm 1,00*
	ETMW	24,25 \pm 0,96*	28,75 \pm 2,50*	36,00 \pm 1,63*
<i>Bacillus</i> sp.***	ETMM	11,50 \pm 1,00**	20,00 \pm 1,83**	26,75 \pm 0,96**
	ETMW	10,00 \pm 0,82**	18,67 \pm 0,58**	27,33 \pm 1,15**
<i>Listeria monocytogenes</i> ***	ETMM	10,00 \pm 0,05*	16,67 \pm 0,58*	30,00 \pm 1,00*
	ETMW	10,75 \pm 0,50*	17,33 \pm 0,58*	30,33 \pm 0,58*
Kvasci				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 112	ETMM	8,75 \pm 0,50**	15,25 \pm 0,96*	19,25 \pm 0,50*
	ETMW	8,00 \pm 0,25**	13,00 \pm 0,50*	18,75 \pm 1,26*
<i>Candida albicans</i> ***	ETMM	nd	nd	nd
	ETMW	nd	nd	nd
Plesni				
<i>Aspergillus niger</i> ***	ETMM	8,00 \pm 0,50**	17,75 \pm 0,50**	18,25 \pm 0,50**
	ETMW	8,00 \pm 0,50**	17,50 \pm 0,58**	18,75 \pm 0,50**
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> ***	ETMM	10,00 \pm 0,82*	14,00 \pm 1,41*	16,75 \pm 0,50*
	ETMW	8,75 \pm 0,96*	13,25 \pm 0,50*	14,75 \pm 0,50*

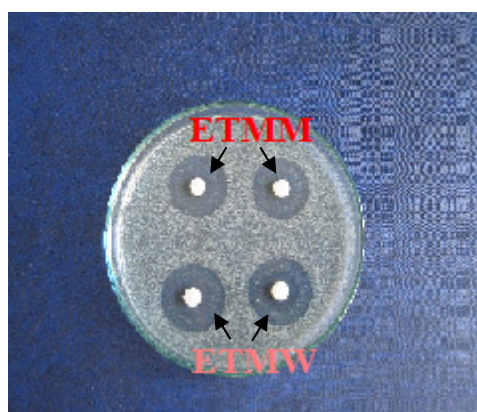
nd - nije detektovana zona inhibicije; * - čista zona oko diska / bunarčića; ** - zona redukovano-rasta; *** - divlji izolat.



Slika 4.30. Antibakterijska aktivnost ETMM i ETMW na *Salmonella* sp. određena **a)** disk difuzionom metodom, **b)** metodom „bunarčića” pri zapremini od 50 µl i **c)** metodom „bunarčića” pri zapremini od 100 µl



Slika 4.31. Antibakterijska aktivnost ETMM i ETMW na *Pseudomonas aeruginosa* određena **a)** disk difuzionom metodom, **b)** metodom „bunarčića” pri zapremini od 50 µl i **c)** metodom „bunarčića” pri zapremini od 100 µl



Slika 4.32. Antibakterijska aktivnost ETMM i ETMW na *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 određena disk difuzionom metodom

Rezultati ispitivanja (tabela 4.7 i slike 4.30, 4.31 i 4.32) ukazuju da su ETMM i ETMW delovali inhibitorno na sve test mikroorganizme, izuzev na kvasac *Candida albicans*. Disk difuzionom metodom su dobijene manje zone inhibicije za sve test mikroorganizme, što je i očekivano, jer se sa povećanjem zapremine ekstrakta povećava prečnik zone inhibicije. Oba ekstrakta su pokazala sličnu antibakterijsku aktivnost na G (-) bakterije i G (+) bakterije. Za većinu bakterija (izuzev divljeg izolata *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. i *Bacillus* sp.) već sa 15 µl javile su se čiste zone oko diska, koje ukazuju na moguću baktericidnu aktivnost ispitivanih ekstrakata. Od G (-) bakterija najmanju osetljivost na oba ekstrakta je pokazao divlji izolat *Pseudomonas aeruginosa* (zona inhibicije je 15,75 mm za ETMM, odnosno 15,50 mm za ETMW), a od G (+) bakterija divlji izolat *Listeria monocytogenes* (zona inhibicije je 10,00 mm za ETMM, odnosno 10,75 mm za ETMW). Oba ekstrakta delovala su antifungalno na ispitivane plesni i kvasac *Saccharomyces cerevisiae* 112, a čista zona inhibicije oko diska je zapažena samo za divlji izolat *Penicillium aurantiogriseum* (zona inhibicije je 10,00 mm za ETMM, odnosno 8,75 mm za ETMW).

Ispitivanja antimikrobne aktivnosti ETMM i ETMW metodom „bunarčića” (Tabela 4.7 i slike 4.30 i 4.31) ukazuju da su čiste zone oko bunarčića dobijene za sve bakterije, izuzev za divlje izolate *Salmonella* sp. i *Bacillus* sp., kao i za divlji izolat plesni *Penicillium aurantiogriseum*. Od G (-) bakterija najveću osetljivost na oba ekstrakta su pokazale vrste *Escherichia* i *Salmonella*, a od G (+) bakterija vrste roda *Staphylococcus*. Kod G (+) bakterija su uočene značajne razlike u osetljivosti na ekstrakte između referentnih sojeva i izolata, odnosno uočena je veća otpornost divljih izolata prema ETMM i ETMW.

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je najniža koncentracija izražena u mg/ml, koja pod određenim *in vitro* uslovima dovodi do značajnog smanjenja vijabilnosti inokuluma (> 90 %). Minimalna baktericidna i minimalna fungicidna koncentracija (MBC i MFC) su koncentracije izražene u mg/ml, koje pod određenim *in vitro* uslovima smanjuju za 99,99 % broj mikroorganizama u podlozi sa određenim inokulumom (Burt, 2004). Kada se izračuna stepen redukcije ćelija usled delovanja ispitivanog ekstrakta, on ukazuje da li se radi o minimalnoj inhibitornoj ili minimalnoj baktericidnoj, odnosno fungicidnoj koncentraciji.

U tabeli 4.8. prikazane su vrednosti MIC i MBC/MFC za ETMM i ETMW. MIC i MBC ekstrakata tropa maline kretale su se u opsegu 0,29–0,59 mg/ml, odnosno 0,39–0,78 mg/ml. Između ispitivanih bakterija nije bilo velike razlike u osetljivosti/otpornosti prema ETMM i ETMW, kao ni razlike u aktivnosti ova dva ispitivana ekstrakta. MIC za kvasce i plesni i MFC vrednosti ekstrakata bile su mnogo veće u odnosu na MIC za bakterije i MBC, što potvrđuje veću otpornost kvasaca i plesni prema ETMM i ETMW. Od ispitivanih kvasaca

i plesni najosetljiviji je kvasac *Saccharomyces cerevisiae* 112 (MIC=4,69 mg/ml i MFC=6,25 mg/ml za ETMM; MIC=4,49 mg/ml i MFC=6,25 mg/ml za ETMW). Od plesni, divlji izolat *Penicillium aurantiogriseum* je bio osjetljiviji na oba ekstrakta od divljeg izolata *Aspergillus niger*, pri čemu je veća osjetljivost zapažena na ETMM (MIC=18,75 mg/ml i MFC=25,00 mg/ml za ETMM; MIC=37,50 mg/ml i MFC=50,00 mg/ml za ETMW).

Tabela 4.8. MIC i MBC/MFC koncentracije za ETMM i ETMW

Test mikroorganizam	MIC (mg/ml)		MBC/MFC (mg/ml)	
	Ekstrakt tropa			
	ETMM	ETMW	ETMM	ETMW
G (-) bakterije				
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	0,29	0,59	0,39	0,78
<i>Escherichia coli</i> *	0,59	0,29	0,78	0,39
<i>Salmonella</i> Typhymurium ATCC 14028	0,39	0,39	0,78	0,78
<i>Salmonella</i> sp.*	0,39	0,39	0,78	0,78
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0,29	0,29	0,39	0,39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	0,29	0,29	0,39	0,39
G (+) bakterije				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 11632	0,29	0,29	0,39	0,39
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> *	0,39	0,39	0,78	0,78
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	0,29	0,29	0,39	0,39
<i>Bacillus</i> sp.*	0,29	0,29	0,39	0,39
<i>Listeria monocytogenes</i> *	0,39	0,58	0,78	0,78
Kvasci				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 112	4,69	4,49	6,25	6,25
Plesni				
<i>Aspergillus niger</i> *	50,00	50,00	75,00	75,00
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> *	18,75	37,50	25,00	50,00

* - divlji izolat

Vrednosti MIC, MBC i MFC utvrđene mikromodulacionom metodom koriste se za određivanje antimikrobnog delovanja, ali one ne pokazuju način delovanja antimikrobnog agensa. Za procenu modaliteta antibakterijskog i antifungalnog delovanja koristi se odnos MBC:MIC i MFC:MIC. Ukoliko se taj odnos kreće između 1:1 i 2:1 antimikrobni agens ubija mikroorganizme, odnosno ispoljava baktericidno/fungicidno delovanje, a ukoliko je on veći od 2:1, antimikrobni agens inhibira rast, ali ne ubija mikroorganizme, odnosno ispoljava bakteriostatsko/fungiostatsko delovanje (Hafidh i sar, 2011). Na osnovu izračunatog odnosa MBC:MIC i MFC:MIC (od 1,32:1 do 2,00:1) može se zaključiti da ETMM i ETMW deluju baktericidno/fungicidno, odnosno ubijaju mikroorganizme ispitivane u ovom radu.

Veliki broj dosadašnjih ispitivanja govori o činjenici da antimikrobna aktivnost bobica ne zavisi samo od fenolnih jedinjenja, već da su u pitanju višestruki mehanizmi i sinergija raznih prisutnih jedinjenja (slabe organske kiseline, fenolne kiseline, tanini i njihove smeše različitih hemijskih oblika) (Cisowska i sar, 2011, Pertuzatti i sar, 2016). Takođe, efekat pH je veoma važan (Liepiņa i sar, 2013, Pertuzatti i sar, 2016) u slučaju mikrobicidnog delovanja voćnih kiselina, koje su membranski aktivne supstance i utiču na permeabilnost ćelijske membrane (Ördögh i sar, 2010). Pravilna obrada biljnog materijala je još jedan od ključnih faktora pri svakom određivanju njegove aktivnosti. Obrada materijala uslovljava izdvajanje hemijskih materija u ispitivanom uzorku, tako da različiti postupci mogu da dovedu do izdvajanja različitih aktivnih principa (Krstić i sar, 2014).

Bobinaité i saradnici (2013) su ispitivali antimikrobnu aktivnost metanolnih i etanolnih ekstrakata tropa maline na *B. subtilis*, *S typhimurium*, *E. faecalis*, *S. aureus* i utvrdili bolju antimikrobnu aktivnost na Gram (+) bakterije. Dobijene vrednosti MIC i MBC ETMM i ETMW za *Bacillus subtilis* (MIC=0,29 mg/ml; MBC=0,39 mg/ml), *Staphylococcus aureus* (MIC=0,29 mg/ml; MBC=0,39 mg/ml) i *Salmonella Typhimurium* (MIC=0,39 mg/ml; MBC=0,78 mg/ml) ukazuju da su dobijeni rezultati u saglasnosti sa navodima ovih autora.

Antibakterijska aktivnost maline nije u potpunosti razjašnjena, ali brojne studije ovu aktivnost maline objašnjavaju prisustvom antocijana, elagitanina i organskih kiselina (Krstić i sar, 2014).

Nohynek i saradnici (2006) su odredili da je sadržaj elagitanina u malini visok (200 mg/kg suve materije), dok u borovnici nije uopšte detektovan. Nohynek i saradnici (2006) pripisuju dobru antibakterijsku aktivnost maline upravo ovoj grupi jedinjenja. Elagitanini iz brusnice, maline i jagode, predstavljaju jednu od komponenata koje najverovatnije izazivaju inhibiciju *Salmonella* sp. (Nila i sar, 2014).

U tabeli 4.9. i na slikama 33 i 34 prikazani su rezultati određivanja antimikrobne aktivnosti ETKČ i ETKT. Manje zone inhibicije za sve test mikroorganizme dobijene su disk difuzionom metodom, što ukazuje da se antimikrobna aktivnost ovih ekstrakata povećava sa povećanjem zapremine. Oba ekstrakta tropa kupine pokazala su dobru antibakterijsku aktivnost na sve ispitivane bakterije, ali nešto slabiju u odnosu na antibakterijsku aktivnost ETMM i ETMW (tabela 4.7). Zona redukovanoog rasta utvrđena je za *Bacillus* sp, *Staphylococcus saprophyticus* (slike 4.34a i 4.34b) i *Salmonella* sp. Od G (-) bakterija najveću osteljivost su pokazali sojevi roda *Salmonella*. Najveću osteljivost od G (+) bakterija su pokazale *Bacillus* vrste i *Listeria monocytogenes*.

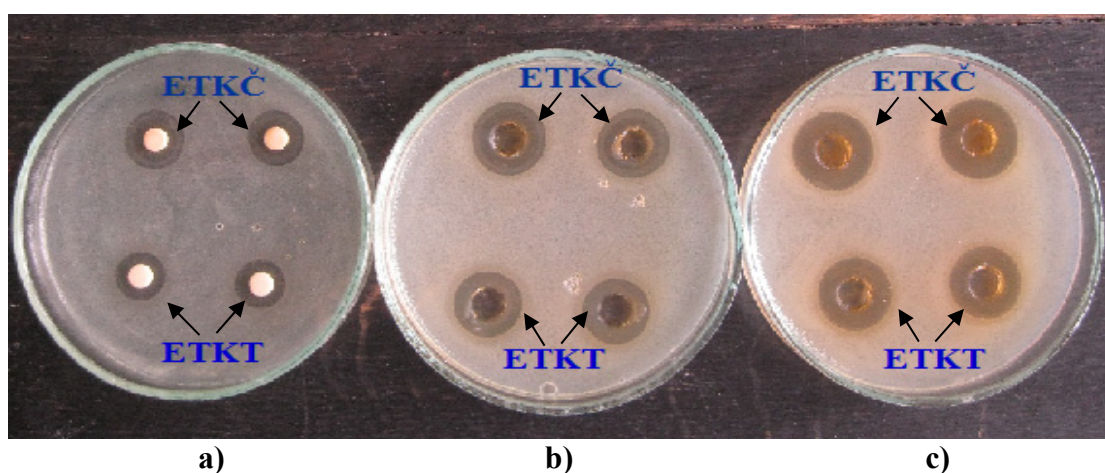
Za većinu bakterija (izuzev izolata *Staphylococcus saprophyticus* i *Salmonella* sp.) već sa 15 µl javile su se čiste zone oko diska, koje ukazuju na veoma dobru antibakterijsku aktivnost ispitivanih ekstrakata. Metodom „bunarčića” dobijene su čiste zone oko bunarčića za sve bakterije, izuzev izolata *Staphylococcus saprophyticus*, pri zapremini od 50 µl ETKČ i ETKT. Prema svim testiranim bakterijama ETKČ pokazao je izraženiju antibakterijsku aktivnost od ETKT, izuzev za izolat *Escherichia coli* (pri zapremini od 50 µl zona inhibicije za ETKT je 18,00 mm, a za ETKČ 17,50 mm).

Rezultati ispitivanja prikazani u tabeli 4.9 pokazuju da ETKČ i ETKT prema odabranim mikroorganizmima sa eukariotskim tipom ćelije iskazuju značajno manje delovanje nego prema bakterijskim izolatima. Ispitani ekstrakti tropova nisu pokazali inhibitorno dejstvo prema kvascu *Candida albicans* i plesnima *Aspergillus niger* i *Penicillium aurantiogriseum*. Za kvasac *Saccharomyces cerevisiae* zona inhibicije je detektovana samo metodom „bunarčića” pri zapremini ekstrakata od 100 µl.

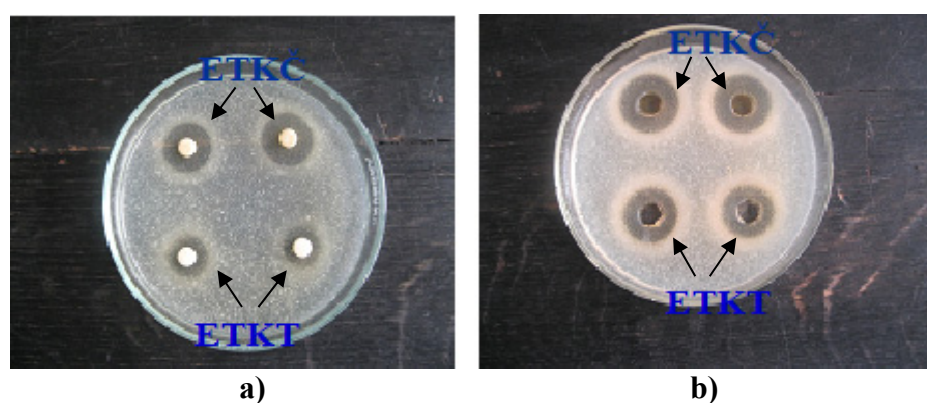
Tabela 4.9. Antimikrobna aktivnost ETKČ i ETKT, izražena kao srednja vrednost prečnika inhibicije (mm), uključujući prečnik diska (6 mm) i bunarčića (9 mm)

Test mikroorganizam	Ekstrakt tropa	Metoda		
		Disk difuziona	Metoda „bunarčića”	
			15µl	50 µl
Gram (-) bakterije				
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	ETKČ	17,00 ± 0,82*	21,25 ± 0,96*	25,25 ± 0,50*
	ETKT	15,00 ± 1,41*	19,25 ± 0,5*	23,00 ± 0,00*
<i>Escherichia coli</i> ***	ETKČ	13,50 ± 3,11*	17,50 ± 2,89*	22,00 ± 1,15*
	ETKT	13,50 ± 1,29*	18,00 ± 0,00*	20,00 ± 1,15*
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	ETKČ	16,75 ± 3,20*	21,25 ± 1,50*	28,50 ± 4,64*
	ETKT	14,25 ± 1,71*	20,50 ± 0,58*	25,75 ± 3,77*
<i>Salmonella sp.</i> ***	ETKČ	19,25 ± 3,30**	26,25 ± 2,63*	31,25 ± 2,22*
	ETKT	15,00 ± 2,45**	22,50 ± 1,29*	26,00 ± 1,41*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	ETKČ	14,75 ± 1,26*	18,50 ± 1,29*	22,75 ± 0,50*
	ETKT	13,00 ± 0,82*	17,25 ± 0,50*	21,00 ± 0,00*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ***	ETKČ	16,82 ± 1,26*	19,75 ± 0,96*	23,00 ± 0,82*
	ETKT	14,00 ± 0,82*	18,00 ± 0,00*	21,50 ± 0,58*
Gram (+) bakterije				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 11632	ETKČ	11,00 ± 3,56*	19,75 ± 2,06*	29,75 ± 3,77*
	ETKT	10,25 ± 3,30*	16,00 ± 1,83*	23,25 ± 1,71*
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ***	ETKČ	16,75 ± 0,50**	21,50 ± 1,29**	26,25 ± 0,50*
	ETKT	12,00 ± 2,94**	18,50 ± 0,58**	25,50 ± 1,91*
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	ETKČ	19,50 ± 3,70*	27,25 ± 2,06*	34,25 ± 2,36*
	ETKT	16,75 ± 0,96*	21,25 ± 2,22*	30,50 ± 0,58*
<i>Bacillus sp.</i> ***	ETKČ	17,50 ± 2,89**	27,00 ± 2,16*	36,00 ± 2,94*
	ETKT	14,25 ± 0,96**	22,00 ± 1,54*	27,75 ± 1,71*
<i>Listeria monocytogenes</i> ***	ETKČ	15,25 ± 1,71*	23,75 ± 3,30*	31,50 ± 1,00*
	ETKT	13,50 ± 1,29*	20,25 ± 0,96*	28,00 ± 1,15*
Kvasci				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 112	ETKČ	nd	nd	12,00 ± 0,00*
	ETKT	nd	nd	11,00 ± 0,00*
<i>Candida albicans</i> ***	ETKČ	nd	nd	nd
	ETKT	nd	nd	nd
Plesni				
<i>Aspergillus niger</i> ***	ETKČ	nd	nd	nd
	ETKT	nd	nd	nd
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> ***	ETKČ	nd	nd	nd
	ETKT	nd	nd	nd

nd - nije detektovana zona inhibicije; * - čista zona oko diska / bunarčića; ** - zona redukovano-
nog rasta; *** - divlji izolat.



Slika 4.33. Antibakterijska aktivnost ETKČ i ETKT na *Escherichia coli* određena **a)** disk difuzionom metodom, **b)** metodom „bunarčića” pri zapremini od 50 μ l i **c)** metodom „bunarčića” pri zapremini od 100 μ l



Slika 4.34. Antibakterijska aktivnost ETKČ i ETKT na *Staphylococcus saprophyticus* određena **a)** disk difuzionom metodom i **b)** metodom „bunarčića” pri zapremini od 50 μ l

U tabeli 4.10. prikazane su MIC i MBC/MFC za ETKČ i ETKT. Navedeni rezultati ukazuju da oba ekstrakta tropa kupine inhibiraju rast svih ispitivanih mikroorganizama. Dobijene vrednosti za MIC i BIC ukazuju na veći antibakterijski potencijal ETKČ, u odnosu na ETKT. ETKČ najefikasnije deluje na *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 i *Staphylococcus aureus* ATCC 11632 (MIC=0,39 mg/ml, MBC=0,78 mg/ml), dok je ETKT najefikasniji prema *Escherichia coli* ATCC 25922 (MIC=0,78 mg/ml, MBC=1,56 mg/ml), *Staphylococcus aureus* ATCC 11632 i izolatu *Pseudomonas aeruginosa* (MIC=1,56 mg/ml, MBC=3,13 mg/ml). Oba ekstrakta imaju visoke vrednosti MIC i MBC za *Bacillus cereus*

ATCC 10876 (MIC=18,75 mg/ml i MBC=25 mg/ml za ETKT, odnosno MIC=25 mg/ml, MBC>25 mg/ml za ETKČ) i *Bacillus* sp. (MIC=18,75 mg/ml i MBC=25 mg/ml za ETKČ, odnosno MIC>25 mg/ml, MBC>25 mg/ml za ETKT), što ukazuje na nisku antibakterijsku aktivnost prema ovim sojevima.

Tabela 4.10. MIC i MBC/MFC koncentracije za ETKČ i ETKT

Test mikroorganizam	MIC (mg/ml)		MBC/MFC (mg/ml)	
	Ekstrakt tropa			
	ETKČ	ETKT	ETKČ	ETKT
Gram (-) bakterije				
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,78	0,78	1,56	1,56
<i>Escherichia coli</i> *	0,78	3,13	1,56	6,25
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	1,17	9,38	1,56	12,50
<i>Salmonella</i> sp.*	1,17	6,25	1,56	12,50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0,39	4,69	0,78	6,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	0,78	1,56	1,56	3,13
Gram (+) bakterije				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 11632	0,39	1,56	0,78	3,13
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> *	0,59	3,13	0,78	6,25
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	25,00	18,75	>25,00	25,00
<i>Bacillus</i> sp.*	18,75	>25,00	25,00	>25,00
<i>Listeria monocytogenes</i> *	0,78	4,69	1,56	6,25
Kvasci				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,69	9,38	6,25	12,50

* - divlji izolat

Odnosi MBC:MIC i MFC:MIC (od 1,33:1 do 2:1) ukazuju da ETKČ i ETKT deluju baktericidno/fungicidno na mikroorganizme ispitivane u ovom radu.

HPLC analizom utvrđeno je da su derivati hidroksibenzojeve kiseline i antocijani dominantna jedinjenja u ETKČ i ETKT. Iako u ovoj disertaciji nisu određivani, dokazano je

da su elagitanini u plodu kupine većim delom zastupljeni u semenkama, nego u mesu (Wu, 2008), pa je za očekivati da zaostanu i u tropu u znatnoj količini. Najverovatnije da su ove grupe jedinjenja, različitim mehanizmima najzaslužnije za dobru antimikrobnu aktivnost ETKČ i ETKT.

Ördögh i saradnici (2010) su ispitivali antibakterijsku aktivnost ekstrakta tropa kupine i saopštili da navedeni ekstrakt nije pokazao nikakvu antimikrobnu aktivnost. Međutim, rezultati ispitivanja Kirscha i saradnika (2008) su pokazala da je ekstrakt tropa kupine inhibirao rast bakterija *Serratia marcescens* i *Bacillus* vrsta preko 50% ili 75%, redom. Imajući u vidu navedena saopštenja i rezultate prezentovane u tabelama 4.9 i 4.10, može se zaključiti da antimikrobna aktivnost ekstrakata tropa kupine zavisi od čitavog niza različitih faktora koji utiču na sadržaj polifenolnih jedinjenja, tanina, organskih kiselina i drugih jedinjenja u ekstraktu tropa (vrsta i sorta kupine, uslovi uzgajanja, stepeni zrelosti, način prerade, vrsta ekstragensa), kao i mehanizma delovanja i sinergističkih efekata između ovih bioaktivnih jedinjenja (Marhuenda i sar, 2016; Nohynek i sar, 2006).

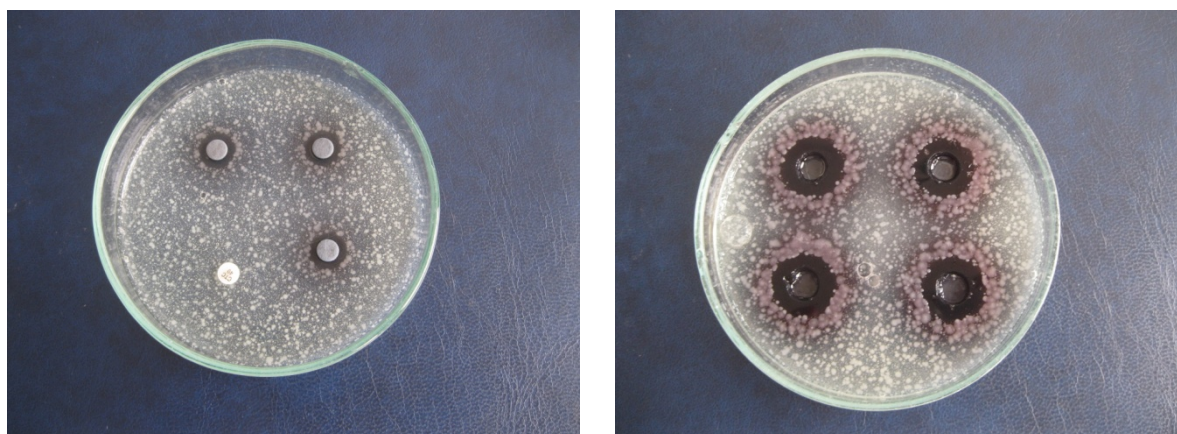
Rezultati antimikrobne aktivnosti ETB određene disk difuzionom metodom i metodom „bunarčića” prikazani su u tabeli 4.11. Rezultati pokazuju da ispitani ekstrakt tropa nije pokazao inhibitorno dejstvo prema *Escherichia coli*, kvascima *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* i plesnima *Aspergillus niger* i *Penicillium aurantiogriseum*. Za bakterije *Salmonella tiphymurium*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* i *Bacillus cereus* zona inhibicije je detektovana samo metodom „bunarčića” pri zapremini od 100 µl.

Na slikama 4.35 i 4.36 prikazana je antibakterijska aktivnost ETB na *Bacillus* sp. i *Staphylococcus saprophyticus*.

Tabela 4.11. Antimikrobna aktivnost ETB, izražena kao srednja vrednost prečnika inhibicije (mm), uključujući prečnik diska (6 mm) i bunarčića (9 mm)

Test mikroorganizam	Metoda		
	Disk difuziona	Metoda „bunarčića“	
	15 µl	50 µl	100 µl
Gram (-) bakterije			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	nd	11,25 ± 0,50**	14,00 ± 0,00**
<i>Escherichia coli</i> ***	nd	nd	nd
<i>Salmonella</i> Tiphymurium ATCC 14028	nd	nd	14,50 ± 1,00**
<i>Salmonella</i> sp.***	nd	nd	13,25 ± 0,50**
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	nd	nd	11,00 ± 0,00**
Gram (+) bakterije			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 11632	9,67 ± 0,58*	13,00 ± 0,00*	15,75 ± 0,50*
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ***	8,67 ± 0,58*	13,50 ± 0,58*	15,75 ± 0,96*
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932	nd	12,25±0,5*	14,50 ± 0,58*
<i>Listeria monocytogenes</i> ***	7,67 ± 0,58*	11,50 ± 0,58*	14,00 ± 0,00*
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	nd	nd	12,50 ± 0,58**
<i>Bacillus</i> sp.***	10,33 ± 0,58*	14,50 ± 0,58*	16,25 ± 0,50*
Kvasci			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hefebank 112	nd	nd	nd
<i>Candida albicans</i> ***	nd	nd	nd
Plesni			
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	nd	nd	nd
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> ***	nd	nd	nd

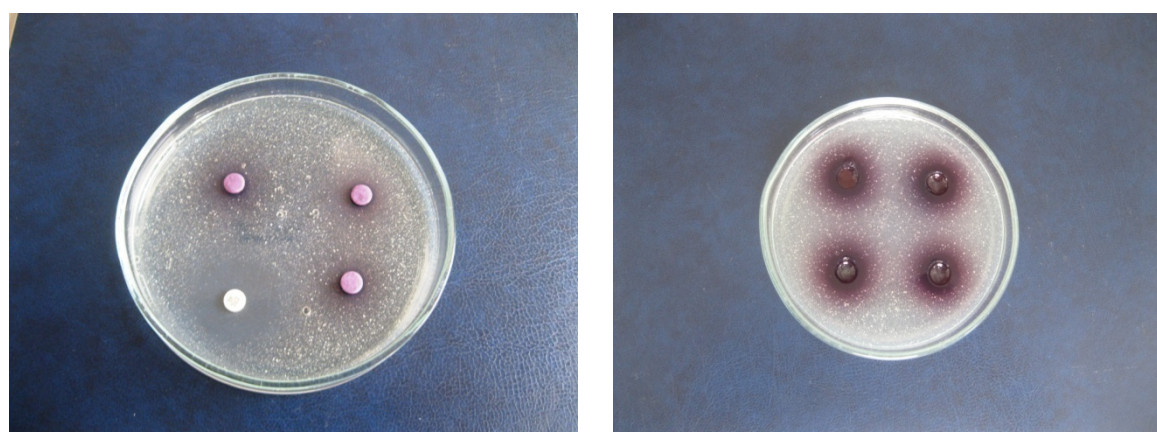
nd – nije detektovana zona inhibicije; * - čista zona oko diska / bunarčića; ** - zona redukovano rasta; *** - divlji izolat.



a)

b)

Slika 4.35. Antibakterijska aktivnost ETB na *Bacillus* sp. određena **a)** disk difuzionom metodom i **b)** metodom „bunarčića” pri zapremini od 50 μ l



a)

b)

Slika 4.36. Antibakterijska aktivnost ETB na *Staphylococcus saprophyticus* određena **a)** disk difuzionom metodom i **b)** metodom „bunarčića” pri zapremini od 100 μ l.

U tabeli 4.12. prikazane su MIC i MBC za ETB. Vrednosti MIC i MBC su u opsegu 3,13–37,50 mg/ml, odnosno 6,25–>100 mg/ml. Za većinu ispitanih Gram (+) bakterija dobijene su manje vrednosti MIC i MBC, u odnosu na Gram (-) bakterije, što ukazuje na veću otpornost Gram (-) bakterija prema ETB. Razlika u delovanju prema Gram (+) i Gram (-) bakterija objašnjava se činjenicom da postoji razlika u površinskoj strukturi ćelijskog zida ovih bakterija (Puupponen-Pimiä i sar, 2005,b, Krisch i sar, 2008). Antocijani posebnu antibakterijsku aktivnost iskazuju prema Gram (+) pozitivnim bakterijama (Cisowska i sar, 2011). Mehanizmi u osnovi antocijana uključuju obe membrane i intracelularne interakcije ovih jedinjenja. S obzirom da je najveći sadržaj antocijana određen u ETB, antibakterijska aktivnost ovog ekstrakta prvenstveno se može pripisati ovoj grupi jedinjenja. Rezultati uka-

zuju da su sojevi *Bacillus* najotporniji od svih ispitivanih bakterija, dok su najosetljiviji izolat *Staphylococcus saprophyticus* i referentni soj *Staphylococcus aureus*, za koje je MBC ekstrakta iznosila 6,25 mg/ml.

Tabela 4.12. MIC i MBC koncentracije za ETB

Tekst mikroorganizam	MIC (mg/ml)	MBC/MFC (mg/ml)
Gram (-) bakterije		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	25,00	37,50
<i>Escherichia coli</i> *	37,50	50,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	12,50	25,00
<i>Salmonella</i> Tiphymurium ATCC 14028	43,75	50,00
<i>Salmonella</i> sp.*	37,50	50,00
Gram (+) bakterije		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932	6,25	12,50
<i>Listeria monocytogenes</i> *	6,25	12,50
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 11632	4,68	6,25
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> *	3,13	6,25
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	37,50	>100,00
<i>Bacillus</i> sp.*	37,50	>100,00

* - divlji izolat

Na osnovu odnosa MBC:MIC (od 1,14:1 do 2,00:1) može se zaključiti da **ETB** deluje baktericidno, odnosno ubija bakterije ispitivane u ovom radu.

U literaturi nema podataka o antimikrobnoj aktivnosti tropa borovnice pa se korelacija rezultata u tom smislu ne može izvesti. Ipak, s obzirom da postoje brojni podaci vezani sa ekstrakt ploda borovnice, izvesna poređenja su moguća.

Burdulis i saradnici (2009) su ispitivali ekstrakte 2 vrste i 7 sorti borovnica. Ispitivana količina ekstrakta je iznosila 50 µl po bunarčiću. Prema *Escherichia coli* zona inhibicije

je iznosila od 13,66–17,33 mm, prema *Pseudomonas aeruginosa* 12,30–14,66 mm, a prema *Salmonella typhimurium* 11–20 mm. Na osnovu rezultata iz tabele 4.11 vidi se da je za primenjenih 50 µl ETB zona inhibicije prema referentnom soju *Escherichia coli* iznosila 11,25 mm, dok prema *Pseudomonas aeruginosa* i *Salmonella typhimurium* nije bilo delovanja. Takođe, vidi se inhibitorno dejstvo ekstrakta borovnice na *Saccharomyces cerevisiae* (zone inhibicije 10–17 mm), dok ETB u količini od čak 100 µl ne pokazuje inhibitornu aktivnost prema *Saccharomyces cerevisiae* (tabela 4.11). Ovi rezultati mogu da ukazuju na veću aktivnost ekstrakta borovnice od ETB.

Rezultati ispitivanja Rodriguez-Rodrigueza i saradnika (2012) koji se odnose na sok od borovnice (količina 50 µl po bunarčiću) su pokazali da zona inhibicije prema *Staphylococcus aureus* iznosi 4,1 mm/1 mg ispitivanog uzorka, a prema *Escherichia coli* zona inhibicije iznosi 7,2 mm/1 mg ispitivanog uzorka. Rezultati iz tabele 4.11 pokazuju da primenjenih 50 µl ekstrakta tropa stvara zonu inhibicije prema referentnom soju *Escherichia coli* od 11,25 mm, a prema *Staphylococcus aureus* 13 mm. U ovom poređenju rezultata ETB pokazuje znatno veću aktivnost u odnosu na sok od borovnice.

Ispitivanjem antimikrobne aktivnosti komponenata niskožbunaste borovnice, Lacombe i saradnici (2012) su dobili rezultate koji pokazuju veću osetljivost *Listeria monocytogenes* (zona inhibicije 20,7 mm), *Salmonella typhimurium* (zona inhibicije 20,7 mm) i *Escherichia coli* O157:H7 (zona inhibicije 20,1 mm) od osetljivosti istih test mikroorganizama na ETB (tabela 4.11).

Ispitivanjem liofilizata borovnice koncentracije 2 mg/ml Puupponen-Pimiä i saradnici (2005, b) su pokazali da *Listeria monocytogenes* ne ispoljava nikakav inhibitoran efekat, dok se u tabeli 4.11 može videti da je za primenjenih 50 µl ekstrakta tropa zona inhibicije iznosila 12,25 mm, što ukazuje na veću aktivnost ETB od liofilizata borovnice.

Poređenjem MIC i MBC/MFC vrednosti za ETMM (MIC: 0,29–50 mg/ml; MBC: 0,39–0,78 mg/ml; MFC: 4,69–75,00 mg/ml), ETMW (MIC: 0,29–50 mg/ml; MBC: 0,39–0,78 mg/ml; MFC: 4,49–75,00 mg/ml), ETKČ (MIC: 0,39–25,00 mg/ml; MBC: 0,78–>25,00 mg/ml; MFC: 4,69–>25,00 mg/ml), ETKT (MIC: 0,78–>25,00 mg/ml; MBC: 1,56–>25,00 mg/ml; MFC: 9,38–>25,00 mg/ml) i ETB (MIC: 3,13–37,50 mg/ml; MBC: 6,25–>100,00 mg/ml) uočava se da je najveća otpornost bakterija, kvasaca i plesni utvrđena prema ETB, odnosno da je antimikrobna aktivnost ovog ekstrakta najmanja.

Navedeni rezultati ispitivanja ukazuju da bi, zbog visokog antimikrobnog potencijala, ispitivani ekstrakti tropova bobičastog voća mogli da zamene sintetička antimikrobna sredstva koja se koriste u proizvodnji hrane, ili nekim drugim granama industrije (npr. koz-

metičke i farmaceutske industrije), što bi svakako imalo i pozitivan uticaj na poverenje potrošača o sigurnosti proizvoda.

4.7.2. KORELACIJA IZMEĐU SADRŽAJA FITOHEMIKALIJA I ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT I ETB

Pirsonov test korelacije rađen je između sadržaja polifenolnih jedinjenja i vitamina C u ekstraktima tropova maline, kupine i borovnice i MIC i MBC za G (+) i G (-) bakterijske sojeve za sve ispitivane ekstrakte tropova.

U tabelama 4.13 i 4.14 prikazane su vrednosti koeficijenata korelacije ($|r|$) između sadržaja TPh, TF, TAc, fenolnih kiselina, flavonoida i vitamina C i MIC, odnosno MBC za G (+) bakterije.

MIC vrednosti za *Bacillus cereus* i *Bacillus* sp. su pokazale vrlo dobru korelaciju sa TPh ($|r|=0,85$, $|r|=0,91$, redom), TF ($|r|=0,87$, $|r|=0,93$, redom) i sinapinskom kiselinom ($|r|=0,93$, $|r|=0,98$, redom). Korelacija MIC za sve G (+) bakterije sa TAc je slaba. Vrlo dobra korelacija je ustanovljena između MIC za *Staphylococcus saprophyticus* i galne kiseline ($|r|=0,82$), a sa TPh, TF i sinapinskom kiselinom korelacija je dobra ($r>0,50$). MIC za sve testirane G (+) bakterije koreliraju dobro sa rutinom, miricetinom i cijanidin-3-glukozidom, sa TAc slabo, a sa protokatehinskom kiselinom korelacija nije pozitivna.

Vrlo dobra korelacija utvrđena je između MBC za *Bacillus cereus* i *Bacillus* sp. i TPh ($|r|=0,95$), TF ($|r|=0,95$), TAc ($|r|=0,89$), ferulne ($|r|=0,81$), sinapinske ($|r|=0,90$) i galne kiseline ($|r|=0,90$) i koreliranih antocijana ($|r|=0,95$ za rutin; $|r|=0,99$ za miricetin i $|r|=1,00$ za cijanidin-3-glukozid). MBC za *Bacillus cereus* i *Bacillus* sp. vrlo dobro koreliraju sa galnom kiselinom ($|r|=0,90$), dok su korelacije sa elaginskom kiselinom i vitaminom C čak negativne. Korelacija MBC za *Staphylococcus saprophyticus* sa TPh, TF, sinapinskom kiselinom, miricetinom, cijanidin-3-glukozidom i vitaminom C je dobra ($|r|>0,50$). MBC za sve testirane G (+) bakterije dobro koreliraju sa protokatehinskom kiselinom.

Tabela 4.13. Pirsonov test korelacije između sadržaja TPh, TF, TAc, fenolnih kiselina, flavonoida i vitamina C i MIC za G (+) bakterije

Korelacija	TPh	TF	TAc	Protokatehinska kiselina	Galna kiselina	Ferulna kiselina	Sinapinska kiselina	Elaginska kiselina	Rutin	Miricetin	Cijamidin-3-glikozid	Vitamin C	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	
TPh	1															
TF	0,96	1														
TAc	0,76	0,76	1													
Protokatehinska kiselina	0,69	0,67	0,82	1												
Galna kiselina	0,77	0,73	0,98	0,74	1											
Ferulna kiselina	0,62	0,62	0,97	0,72	0,97	1										
Sinapinska kiselina	0,96	0,96	0,63	0,57	0,62	0,47	1									
Elaginska kiselina	0,19	0,02	0,30	0,05	0,24	0,42	0,13	1								
Rutin	0,82	0,81	0,97	0,70	0,99	0,95	0,71	0,27	1							
Miricetin	0,94	0,91	0,94	0,77	0,94	0,86	0,85	0,08	0,97	1						
Cijamidin-3-glikozid	0,94	0,95	0,90	0,68	0,90	0,81	0,89	0,14	0,95	0,99	1					
Vitamin C	0,13	0,19	0,44	0,15	0,52	0,58	0,11	0,70	0,55	0,36	0,42	1				
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0,72	0,75	0,40	0,72	0,29	0,18	0,76	0,35	0,34	0,55	0,54	0,50	1			
<i>Bacillus cereus</i>	0,85	0,87	0,44	0,25	0,47	0,31	0,93	0,11	0,60	0,71	0,79	0,26	0,54	1		
<i>Bacillus</i> sp.	0,91	0,93	0,48	0,50	0,46	0,30	0,98	0,23	0,57	0,74	0,79	0,04	0,82	0,93	1	

* vrlo dobra korelacija ($|r| > 0,8$), dobra korelacija ($|r| > 0,5$)osrednja korelacija ($|r| > 0,3$) i slaba korelacija ($|r| < 0,3$)

Tabela 4.14. Pirsonov test korelacije između sadržaja TPh, TF, TAc, fenolnih kiselina, flavonoida i vitamina C i MBC za G (+) bakterije

Korelacija	TPh	TF	TAc	Protokatehinska kiselina	Galna kiselina	Ferulna kiselina	Sinapinska kiselina	Elaginska kiselina	Rutin	Miricetin	Cijanidin-3-glikozid	Vitamin C	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i> sp.
TPh	1														
TF	0,96	1													
TAc	0,76	0,76	1												
Protokatehinska kiselina	0,69	0,67	0,82	1											
Galna kiselina	0,77	0,73	0,98	0,74	1										
Ferulna kiselina	0,62	0,62	0,97	0,72	0,97	1									
Sinapinska kiselina	0,96	0,96	0,63	0,57	0,62	0,47	1								
Elaginska kiselina	0,19	0,02	0,30	0,05	0,24	0,42	0,13	1							
Rutin	0,82	0,81	0,97	0,70	0,99	0,95	0,71	0,27	1						
Miricetin	0,94	0,91	0,94	0,77	0,94	0,86	0,85	0,08	0,97	1					
Cijanidin-3-glikozid	0,94	0,95	0,90	0,68	0,90	0,81	0,89	0,14	0,95	0,99	1				
Vitamin C	0,13	0,19	0,44	0,15	0,52	0,58	0,11	0,70	0,55	0,36	0,42	1			
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0,69	0,72	0,40	0,75	0,30	0,20	0,73	0,34	0,33	0,54	0,52	0,52	1		
<i>Bacillus cereus</i>	0,95	0,95	0,89	0,69	0,90	0,81	0,90	0,12	0,95	0,99	1,00	0,40	0,53	1	
<i>Bacillus</i> sp.	0,95	0,95	0,89	0,69	0,90	0,81	0,90	0,12	0,95	0,99	1,00	0,40	0,53	1	1

* vrlo dobra korelacija ($|r| > 0,8$), dobra korelacija ($|r| > 0,5$) osrednja korelacija ($|r| > 0,3$) i slaba korelacija ($|r| < 0,3$)

Rezultati Pirsonovog testa korelacije između sadržaja TPh, TF, TAc, fenolnih kiselina, flavonoida i vitamina C i MIC, odnosno MBC za G (-) bakterije prikazani su u tabelama 4.15 i 4.16.

MIC za *Salmonella* Typhimarium i *Salmonella* sp. vrlo dobro koreliraju ($|r| > 0,80$) sa TPh, TF, TAC, protokatehinskom, galnom i ferulnom kiselinom, rutinom, miricetinom i cijanidin-3-glukozidom. Dobra korelacija ($|r| > 0,50$) je utvrđena sa sinapinskom kiselinom, a negativna korelacija sa elaginskom kiselinom i vitaminom C. Korelacija između MIC za *Pseudomonas aeruginosa* i TPh ($|r|=0,85$), TF ($|r|=0,86$), TAc ($|r|=0,87$), galne kiseline ($|r|=0,99$), miricetina ($|r|=0,89$) i cijanidin-3-glukozida ($|r|=0,84$) je vrlo dobra. Dobra korelacija je utvrđena sa protokatehinskom kiselinom ($|r|=0,54$), ferulnom ($|r|=0,74$), sinapinskom kiselinom ($|r|=0,77$) i rutinom ($|r|=0,80$), a korelacija sa elaginskom kiselinom i vitaminom C je veoma slaba. MIC za *Escherichia coli* i *Escherichia coli* ATTC veoma dobro koreliraju sa TAc ($|r|=1,0$ i $|r|=0,98$, redom), protokatehinskom kiselinom ($|r|=0,87$ i $|r|=0,90$, redom) i ferulnom kiselinom ($|r|=0,99$ i $|r|=1,00$, redom), rutinom ($|r|=0,96$), miricetinom ($|r|=0,91$ i $|r|=0,89$, redom) i cijanidin-3-glukozidom ($|r|=0,86$ i $|r|=0,84$, redom). Između MIC za *Escherichia coli* i *Escherichia coli* ATTC i TPh i TF je utvrđena dobra korelacija, a sa elaginskom kiselinom korelacija je osrednja. Korelacija između MIC za *Escherichia coli* i *Escherichia coli* ATTC i vitaminom C je osrednja, odnosno dobra.

MBC vrednosti za *Salmonella* Typhimarium i *Salmonella* sp. vrlo dobro koreliraju ($|r| > 0,80$) sa TPh, TF, TAC, galnom i ferulnom kiselinom, rutinom, miricetinom i cijanidin-3-glukozidom. Sa protokatehinskom i sinapinskom kiselinom utvrđena je dobra korelacija, a sa elaginskom kiselinom i vitaminom C negativna korelacija. Između MBC za *Pseudomonas aeruginosa* i TPh ($|r|=0,84$), TF ($|r|=0,83$), TAc ($|r|=0,96$), ($|r|=0,93$), galne ($|r|=0,94$) i ferulne kiseline ($|r|=0,88$), rutina ($|r|=0,90$), miricetina ($|r|=,94$) i cijanidin-3-glukozida ($|r|=0,89$) korelacija je vrlo dobra. MBC za *Escherichia coli* vrlo dobro korelira samo sa galnom kiselinom ($|r|=0,81$), a dobro korelira sa TPh, TF i sinapinskom kiselinom. Korelacija između MBC za *Escherichia coli* ATTC i TAc, protokatehinske i ferulne kiseline, rutina, miricetina i cijanidin-3-glukozida je vrlo dobra ($|r| > 0,80$) dok je korelacija sa TPh, TF, galnom i sinapinskom kiselinom dobra. Sa elaginskom kiselinom utvrđena je osrednja, a sa vitaminom C dobra korelacija.

Tabela 4.15. Pirsonov test korelacije između sadržaja TPh, TF, TAc, fenolnih kiselina, flavonoida i vitamina C i MIC za G (-) bakterije

Korelacija	TPh	TF	TAc	Proto-katehinska kis.	Galna kis.	Ferulna kis.	Sinapijska kis.	Elaginska kis.	Rutin	Miricetin	Cijanidin-3-glikozid	Vitamin C	<i>Salmonella</i> Typhimarium	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC
TPh	1																
TF	0,96	1															
TAc	0,76	0,76	1														
Proto katehinska kis.	0,69	0,67	0,82	1													
Galna kis.	0,77	0,73	0,98	0,74	1												
Ferulna kis.	0,62	0,62	0,97	0,72	0,97	1											
Sinapijska kis.	0,96	0,96	0,63	0,57	0,62	0,47	1										
Elaginska kis.	0,19	0,02	0,30	0,05	0,24	0,42	0,13	1									
Rutin	0,82	0,81	0,97	0,70	0,99	0,95	0,71	0,27	1								
Miricetin	0,94	0,91	0,94	0,77	0,94	0,86	0,85	0,08	0,97	1							
Cijanidin-3-glikozid	0,94	0,95	0,90	0,68	0,90	0,81	0,89	0,14	0,95	0,99	1						
Vitamin C	0,13	0,19	0,44	0,15	0,52	0,58	0,11	0,70	0,55	0,36	0,42	1					
<i>Salmonella</i> Typhimarium	0,82	0,81	0,98	0,92	0,93	0,91	0,70	0,16	0,92	0,94	0,90	0,24	1				
<i>Salmonella</i> sp.	0,80	0,79	0,99	0,88	0,96	0,94	0,67	0,21	0,95	0,95	0,90	0,32	1,00	1			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,85	0,86	0,87	0,96	0,80	0,74	0,77	0,01	0,80	0,89	0,84	0,02	0,96	0,92	1		
<i>Escherichia coli</i>	0,72	0,70	1,00	0,81	0,98	0,99	0,57	0,31	0,96	0,91	0,86	0,45	0,96	0,99	0,84	1	
<i>Escherichia coli</i> ATCC	0,67	0,65	0,98	0,74	0,99	1,00	0,51	0,34	0,96	0,89	0,84	0,54	0,93	0,96	0,77	0,99	1

* vrlo dobra korelacija ($r > 0,8$), dobra korelacija ($|r| > 0,5$), osrednja korelacija ($|r| > 0,3$) i slaba korelacija ($|r| < 0,3$)

Tabela 4.16. Pirsonov test korelacije između sadržaja TPPh, TF, TAc, fenolnih kiselina, flavonoida i vitamina C i MBC za G (-) bakterije

Korelacija	TPPh	TF	TAc	Proto-katehinska kis.	Galna kis.	Ferulna kis.	Sinapinska kis.	Elaginska kis.	Rutin	Miricetin	Cijanidin-3-glikozid	Vitamin C	<i>Salmonella</i> Typhimarium	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC
TPPh	1																
TF	0,96	1															
TAc	0,76	0,76	1														
Proto katehinska kis.	0,69	0,67	0,82	1													
Galna kis.	0,77	0,73	0,98	0,74	1												
Ferulna kis.	0,62	0,62	0,97	0,72	0,97	1											
Sinapinska kis.	0,96	0,96	0,63	0,57	0,62	0,47	1										
Elaginska kis.	0,19	0,02	0,30	0,05	0,24	0,42	0,13	1									
Rutin	0,82	0,81	0,97	0,70	0,99	0,95	0,71	0,27	1								
Miricetin	0,94	0,91	0,94	0,77	0,94	0,86	0,85	0,08	0,97	1							
Cijanidin-3-glikozid	0,94	0,95	0,90	0,68	0,90	0,81	0,89	0,14	0,95	0,99	1						
Vitamin C	0,13	0,19	0,44	0,15	0,52	0,58	0,11	0,70	0,55	0,36	0,42	1					
<i>Salmonella</i> Typhimarium	0,84	0,83	0,96	0,93	0,91	0,88	0,73	0,12	0,90	0,94	0,89	0,18	1				
<i>Salmonella</i> sp.	0,84	0,83	0,96	0,93	0,91	0,88	0,73	0,12	0,90	0,94	0,89	0,18	1	1			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,84	0,83	0,96	0,93	0,91	0,88	0,73	0,12	0,90	0,94	0,89	0,18	1	1	1		
<i>Escherichia coli</i>	0,76	0,75	1,00	0,84	0,98	0,97	0,63	0,26	0,96	0,94	0,89	0,40	0,97	0,97	0,97	1	
<i>Escherichia coli</i> ATCC	0,69	0,67	0,99	0,74	0,99	1,00	0,54	0,34	0,97	0,90	0,85	0,54	0,90	0,90	0,90	0,20	1

* vrlo dobra korelacija ($|r| > 0,8$), dobra korelacija ($|r| > 0,5$), osrednja korelacija ($|r| > 0,3$) i slaba korelacija ($|r| < 0,3$)

Na osnovu svih navedenih rezultata korelacione analize može se zaključiti da su za antimikrobnu aktivnost ispitivanih ekstrakata tropova maline, kupine i borovnice u velikoj meri odgovorna polifenolna jedinjenja, ali se ne može zanemariti ni uticaj nekih drugih jedinjenja prisutnih u ekstraktima, kao ni sinergistički efekat između prisutnih antimikrobno aktivnih jedinjenja. Navedeni zaključak je u saglasnosti sa rezultatima istraživanja Kirscha i saradnika (2008), Marhuenda i saradnika (2016) i Nohyneca i saradnika (2006) koji su navedeni u delu 4.8.1. ove disertacije, kao i sa saopštenjem Nile i saradnika (2014) da su razne vrste rodova *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., *Helicobacter* spp., i *Bacillus* spp. Najosetljivije na fenole bobica.

4.8. SOKOVI BOBIČASTOG VOĆA OBOGAĆENI EKSTRAKTIMA TROPOVA ISTOG VOĆA

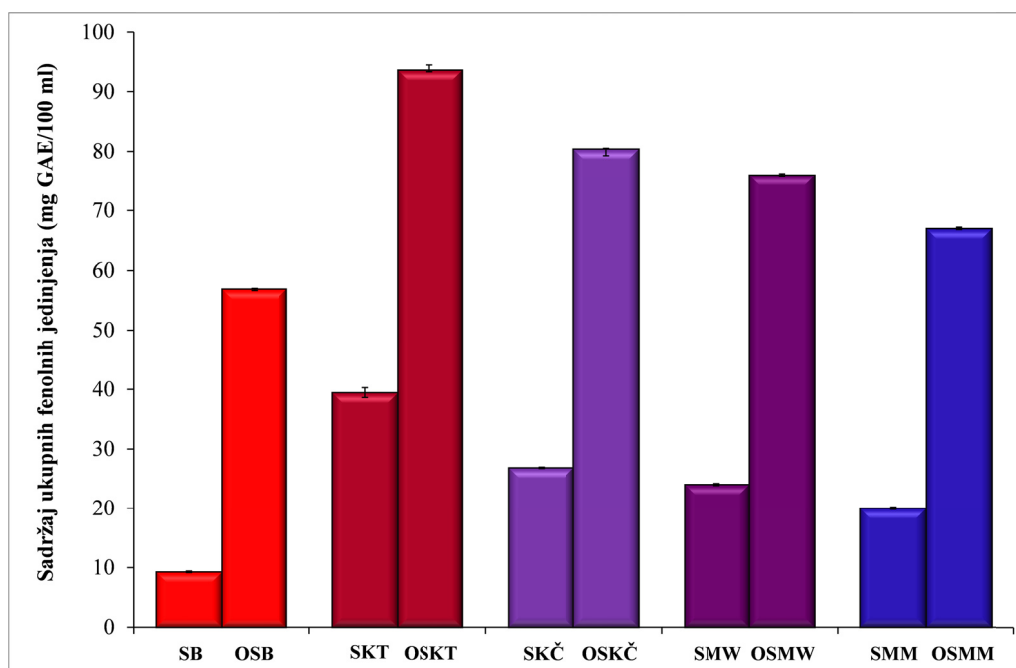
Jedan od ciljeva ove disertacije je bio da se ispita mogućnost primene liofiliziranih ekstrakata bobičastog voća kao funkcionalnog dodatka prehrambenim proizvodima.

Rezultati istraživanja prikazani u prethodnim poglavljima ove disertacije ukazuju da su tropovi bobičastog voća bogati bioaktivnim jedinjenjima, posebno polifenolima. Ovo saznanje nedvosmisleno ukazuje i da su sokovi dobijeni ceđenjem ovog voća siromašniji u sadržaju bioaktivnih jedinjenja u odnosu na voće iz kojeg su dobijeni. Upravo ova saznanja su bila i razlog da se ispita mogućnost obogaćivanja voćnih sokova ekstraktima tropova istog voća u cilju dobijanja obogaćenih sokova koji bi imali istu ili veću bioaktivnost od voća iz kojeg su proizvedeni.

Obogaćeni sokovi maline sorti Meeker i Willamette, kupine sorti Čačanska bestrna i Thornfree i divlje borovnice proizvedeni su u laboratorijskim uslovima dodatkom odgovarajućih količina liofiliziranih ekstrakata tropova voća u 10% vodeni rastvor soka koji je dobijen ceđenjem istog voća. Koncentracija dodatih fenolnih jedinjenja iz ekstrakata tropova (izražena kao ekvivalent galne kiseline) u obogaćenim sokovima iznosila je 50 mg/100 ml obogaćenog soka. Efikasnost obogaćivanja praćena je određivanjem sadržaja polifenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti sokova.

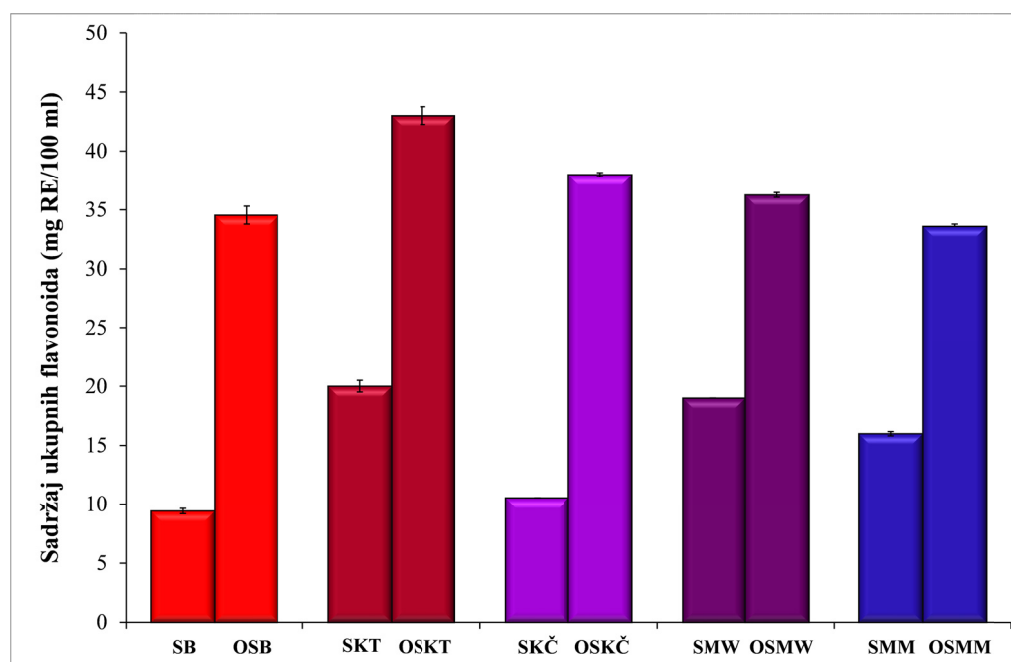
4.8.1. SADRŽAJ POLIFENOLNIH JEDINJENJA U SOKOVIMA

Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja (TPh), ukupnih flavonoida (TF) i ukupnih antocijana (TAc) u neobogaćenim (10% vodeni rastvori matičnih sokova) i obogaćenim sokovima maline sorti Meeker (SMM i OSMM) i Willamette (SMW i OSMW), kupine sorti Čačanska bestrna (SKČ i OSKČ) i Thornfree (SKT i OSKT) i divlja borovnica (SB i OSB) prikazani su na slikama 4.37., 4.38 i 4.39.



Slika 4.37. Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u neobogaćenim i obogaćenim sokovima

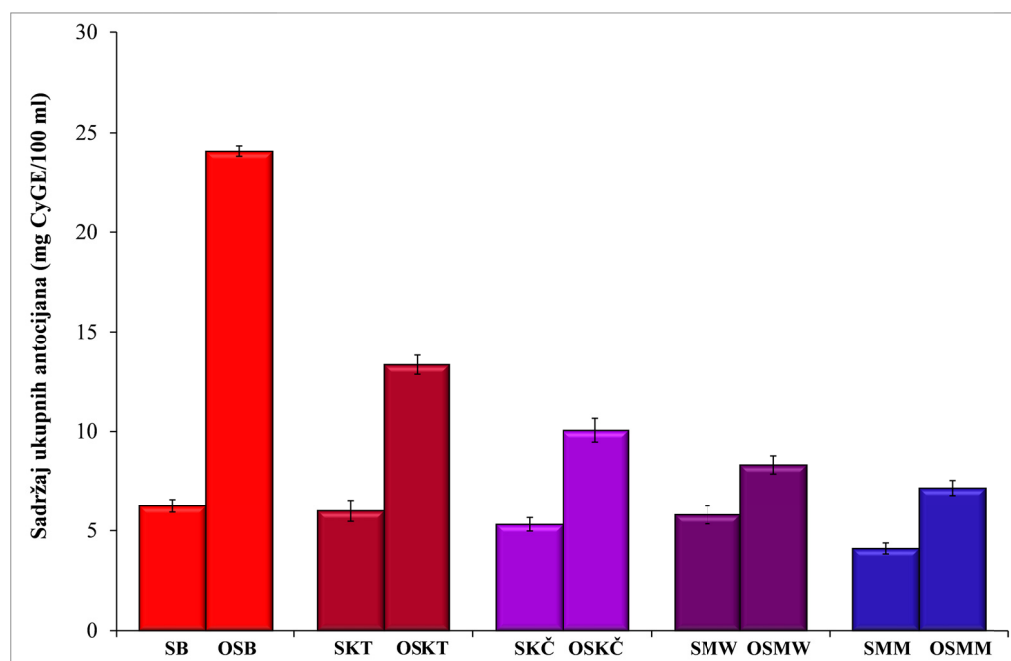
Rezultati ispitivanja su pokazali da je sadržaj TPh u svim obogaćenim sokovima bio veći za oko 50 mg GAE/100 ml soka. Utvrđeno povećanje sadržaja TPh je bilo očekivano pošto su obogaćeni sokovi proizvedeni tako da sadržaj fenolnih jedinjenja iz ekstrakata tropova bude 50 mg GAE/100 ml obogaćenog soka. Sadržaj TPh u obogaćenim sokovima je bio znatno veći u odnosu na sokove iz kojih su proizvedeni. Najmanje povećanje zapaženo je u OSKT, koji je imao 2,37 puta veći sadržaj TPh od SKT, a najveće u OSB, u kome je sadržaj TPh u odnosu na sadržaj u SB povećan oko 6 puta. Od neobogaćenih sokova najveći sadržaj TPh je imao SKT (39,45 mg GAE/100 ml), a od obogaćenih sokova OSKT (93,66 mg GAE/100 ml). Najmanji sadržaj TPh je određen u SB (9,29 mg GAE/100 ml), odnosno u OSB (56,92 mg GAE/100 ml). Navedeni rezultati sadržaja TPh u SB i OSB ukazuju da sok borovnice sadrži znatno manju količinu ovih jedinjenja u odnosu na ekstrakt tropa, što je u saglasnosti sa rezultatima prikazanim u poglavlju 4.1. ove disertacije (od svih ispitivanih ekstrakata tropova ETB je imao najveći sadržaj polifenolnih jedinjenja).



Slika 4.38. Sadržaj ukupnih flavonoida u neobogaćenim i obogaćenim sokovima

Sadržaj TF u obogaćenim sokovima je bio od oko 2 (u OSMM, OSMW i OSKT) do oko 3,6 puta veći (u OSKČ i OSB) u odnosu na sadržaj u odgovarajućim neobogaćenim sokovima (slika 4.38.). U neobogaćenim sokovima bio je u opsegu od 9,42 mg RE/100 ml soka u SB do 20,02 mg RE/100 ml soka u SKT, a u obogaćenim sokovima od 33,58 mg RE/100 ml soka u OSMM do 43,02 mg RE/100 ml soka u OSKT.

Obogaćeni sokovi su bili bogatiji u sadržaju TAc od neobogaćenih sokova (slika 4.39).



Slika 4.39. Sadržaj ukupnih antocijana u neobogaćenim i obogaćenim sokovima

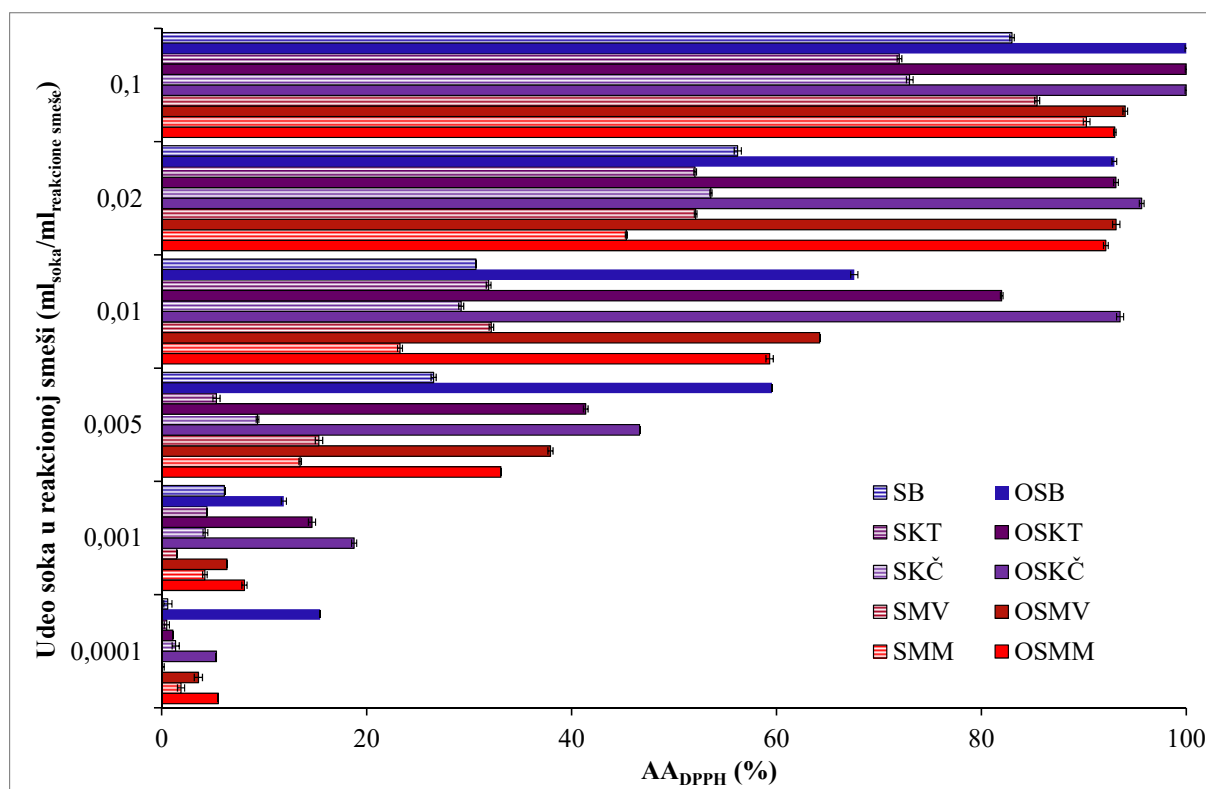
Sadržaj TAc je povećan od 1,43 (u OSMW) do 3,85 puta (u OSB). Razlike u sadržaju TAc u neobogaćenim sokovima su bile znatno manje u odnosu na razlike u obogaćenim sokovima. Najniži sadržaj TAc je bio u SMM (TAc=4,10 mg CyGE/100 ml soka), odnosno OSMM (7,16 mg CyGE/100 ml soka), a najviši u SB (6,25 mg CyGE/100 ml soka), odnosno OSB (24,09 mg CyGE/100 ml soka).

4.8.2. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST SOKOVA

Antioksidativna aktivnost neobogaćenih i obogaćenih sokova bobičastog voća ispitana je spektrofotometrijski, DPPH testom, a određena je i njihova redukciona sposobnost.

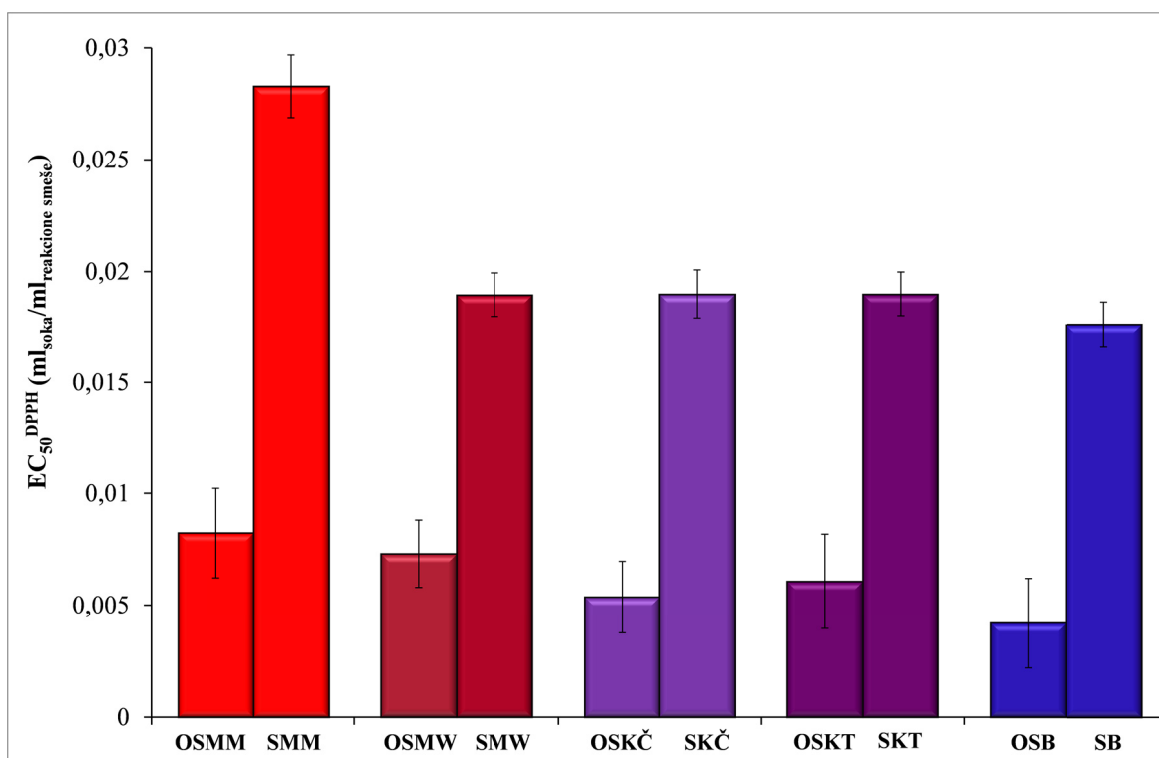
Uticaj SMM, OSMM, SMW, OSMW, SKČ, OSKČ, SKT, OSKT, SB i OSB na transformaciju DPPH radikala prikazan je na slici 4.40.

Svi sokovi pokazali su koncentracijsku zavisnost antioksidativne aktivnosti na DPPH radikale. Antioksidativna aktivnost obogaćenih sokova je značajno izraženija od aktivnosti neobogaćenih sokova. Od neobogaćenih sokova SMM pokazao je najizrazitije delovanje (opseg AA_{DPPH} vrednosti: 1,89–90,26%) dok je najmanju antioksidativnu aktivnost pokazao SKT (opseg AA_{DPPH} vrednosti: 0,49–72,00%) u celokupnom opsegu ispitivanih koncentracija (0,0001–0,1 ml soka/ml reakcione smeše).

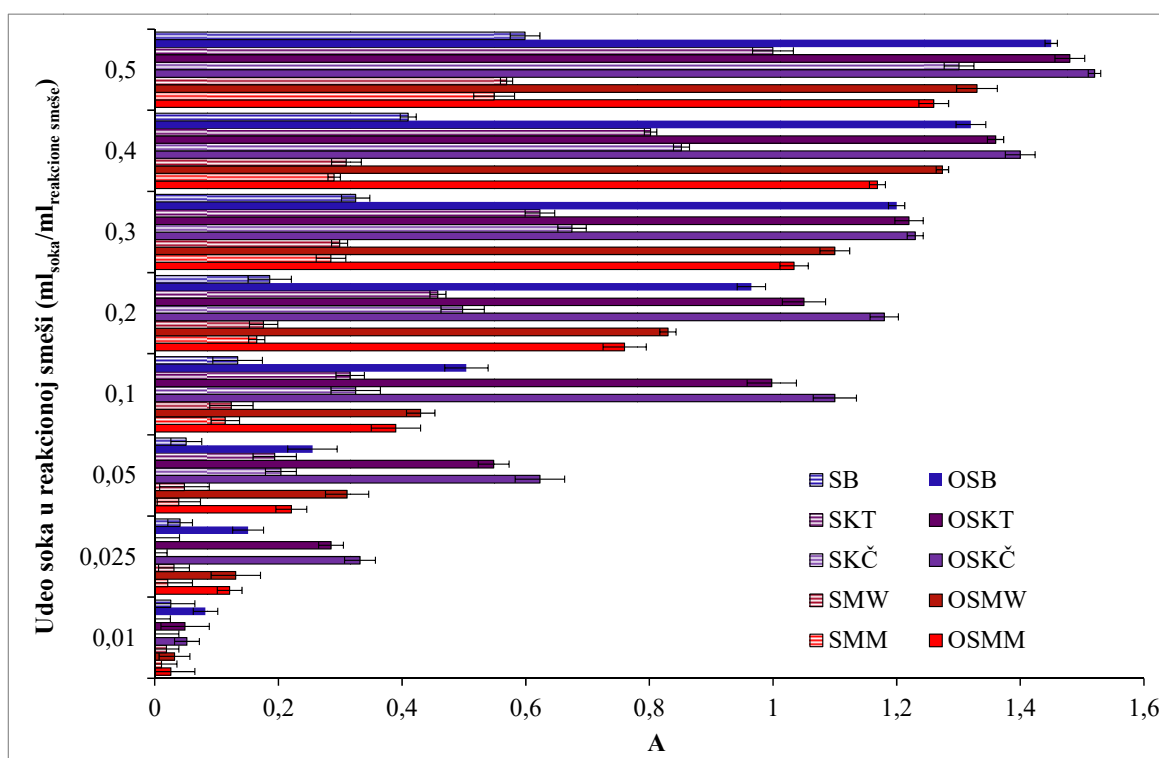


Slika 4.40. Antioksidativna aktivnost neobogaćenih i obogaćenih sokova na DPPH radikale

Na slici 4.41 prikazane su EC_{50}^{DPPH} vrednosti, izračunate na osnovu vrednosti AA_{DPPH} ispitivanih sokova.



Slika 4.41. EC_{50}^{DPPH} vrednosti neobogaćenih i obogaćenih sokova na DPPH radikale



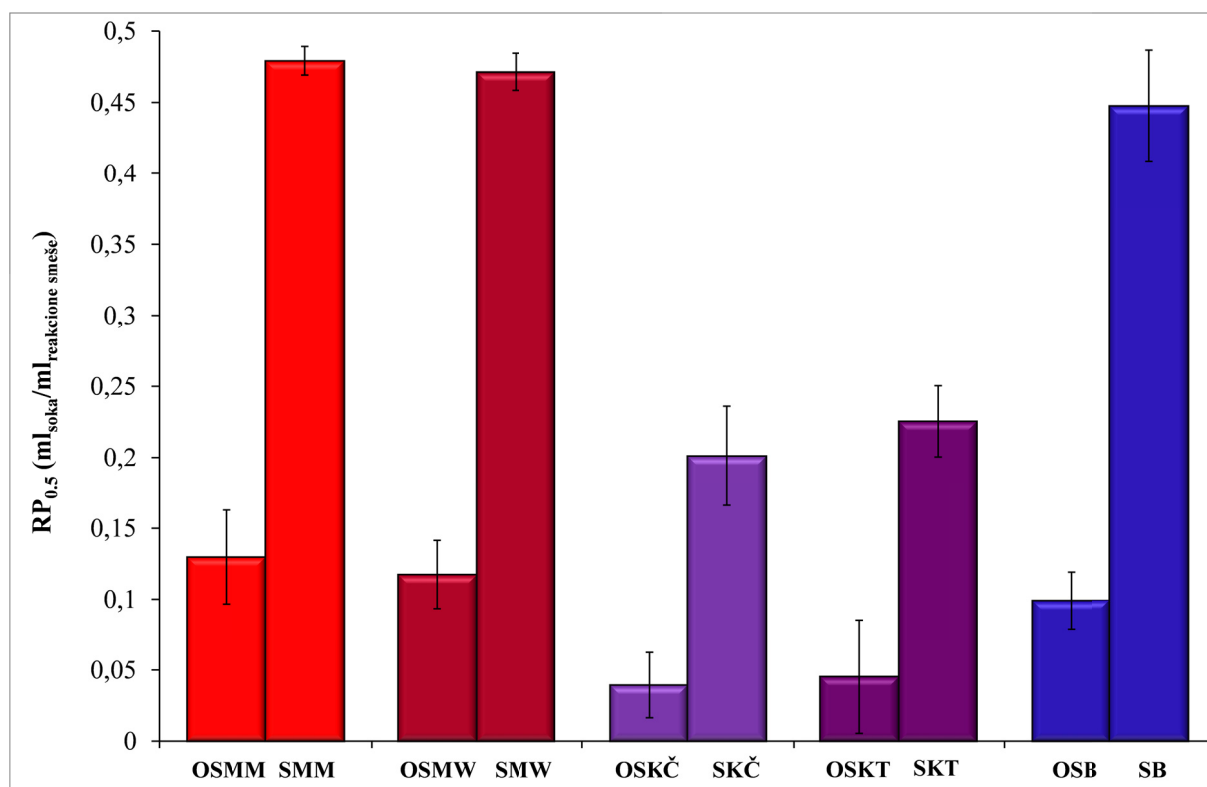
Slika 4.42. Redukciona sposobnost neobogaćenih i obogaćenih sokova

Na osnovu prikazanih EC_{50}^{DPPH} vrednosti (slika 4.41) može se zaključiti da najjače antioksidativno delovanje od obogaćenih sokova pokazuje OSB ($EC_{50}^{DPPH}=0,004$ ml soka/ml reakcione smeše), a najslabije OSMM ($EC_{50}^{DPPH}=0,008$ ml soka/ml reakcione smeše).

Na slici 4.42 prikazana je redukciona sposobnost neobogaćenih i obogaćenih sokova maline, kupine i borovnice, koja raste sa porastom koncentracije u celokupnom opsegu ispitivanih koncentracija (0,01 – 0,50 ml soka/ml reakcione smeše). Obogaćeni sokovi su pokazali znatno bolju redukcionu sposobnost.

U cilju poređenja rezultata izračunate su $RP_{0,5}$ vrednosti za sve sokove, a rezultati su predstavljeni na slici 4.43.

Na osnovu prikazanih $RP_{0,5}$ vrednosti može se zaključiti da svi obogaćeni sokovi imaju znatno bolju redukcionu sposobnost od neobogaćenih sokova. Najjaču redukcionu sposobnost od neobogaćenih sokova pokazao je SKČ ($RP_{0,5}=0,201$ ml soka/ml reakcione smeše), a od obogaćenih sokova OSKČ ($RP_{0,5}=0,039$ ml soka/ml reakcione smeše). Najslabiju redukcionu sposobnost pokazali su SMM ($RP_{0,5}=0,479$ ml soka/ml reakcione smeše), odnosno OSMM ($RP_{0,5}=0,127$ ml soka/ml reakcione smeše).



Slika 4.43. $RP_{0,5}$ vrednosti neobogaćenih i obogaćenih sokova

Svi navedeni rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti obogaćenih sokova ukazuju da je višestruko povećanje njihovog antioksidativnog delovanja u odnosu na neoboga-

ćene sokove uzrokovano antioksidativnim jedinjenjima iz dodanih ekstrakata tropova, pa se na osnovu toga može zaključiti da bi ispitivani ETMM, ETMW, ETKČ, ETKT i ETB mogli da se koriste kao funkcionalni aditivi u proizvodnji različitih prehrambenih proizvoda.

4.8.3. KORELACIJA IZMEĐU SADRŽAJA POLIFENOLNIH JEDINJENJA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI SOKOVA

Korelacija između sadržaja polifenolnih jedinjenja, TPh, TF i TAc, i antioksidativne aktivnosti sokova ispitana je Pirsonovim testom korelacije (tabela 4.17), a za analizu su korišćene vrednosti parametara EC_{50}^{DPPH} i $RP_{0,5}$.

Koeficijenti korelacije prikazani u tabeli 4. 17 ukazuju na izuzetno dobru korelaciju između sadržaja TPh i TF ($|r|=0,97$) u sokovima. TF dobro korelira sa TAc, dok je korelacija između TAc i TPh osrednja.

Vrlo dobra korelacija ($|r|>0,8$) utvrđena je između sadržaja TPh, odnosno TF i antioksidativne aktivnosti na DPPH radikale, kao i između TPh, odnosno TF i redukcione sposobnosti. Dobra korelacija je zabeležena između sadržaja TAc i EC_{50}^{DPPH} ($|r|=0,70$), i između TAc i $RP_{0,5}$ ($|r|=0,55$). Nešto veća vrednost korelacionog koeficijenta za TAc i EC_{50}^{DPPH} ukazuje da su za antioksidativnu aktivnost na DPPH radikale od polifenolnih jedinjenja sokova u velikoj meri odgovorni antocijani. Upravo ova korelacija ukazuje zašto je OSB, koji je imao najveći sadržaj TAc, pokazao najbolju antioksidativnu aktivnost na DPPH radikale od svih ispitivanih sokova. Takođe, lošija korelacija između TAc i $RP_{0,5}$ može da bude jedno od obrazloženja zašto ovaj sok nije pokazao najbolju redukcionu sposobnost.

Tabela 4.17. Pirsonov test korelacije između TPh, TF i TAc i EC_{50} vrednosti DPPH[•] testa i $RP_{0,5}$ vrednosti testa redukcione sposobnosti za ispitivane sokove

Korelacija	TPh	TF	TAc	EC_{50}^{DPPH}	$RP_{0,5}$
TPh	1				
TF	0,97	1			
TAc	0,47	0,59	1		
EC_{50}^{DPPH}	0,85	0,86	0,70	1	
$RP_{0,5}$	0,85	0,81	0,55	0,86	1

* vrlo dobra korelacija ($|r| > 0,8$), dobra korelacija ($|r| > 0,5$), osrednja korelacija ($|r| > 0,3$)
i slaba korelacija ($|r| < 0,3$)

Pirsonovim testom korelacije utvrđena je i vrlo dobra korelacija ($|r|=0,86$) između rezultata dva primenjena antioksidativna testa, EC_{50}^{DPPH} i $RP_{0,5}$.

U dostupnoj literaturi nema podataka o antioksidativnoj aktivnosti sokova obogaćenih ispitivanim ekstraktima tropova bobičastog voća, pa se korelacija rezultata u tom smislu ne može izvesti.

Navedeni rezultati korelacione analize sugerišu da su za antioksidativnu aktivnosti ispitivanih obogaćenih sokova maline, kupine i borovnice u velikoj meri odgovorna polifenolna jedinjenja, ali se ne može isključiti ni uticaj nekih drugih jedinjenja, kao ni sinergizam između svih antioksidativno aktivnih jedinjenja prisutnih u ovim sokovima.

5. ZAKLJUČAK

U radu su ispitani hemijski sastav, antioksidativna, antihiperglikemijska, antiproliferativna i antimikrobna aktivnost liofiliziranih metanolnih ekstrakata tropa maline (*Rubus idaeus* L) sorti Meeker (ETMM) i Willamette (ETMW), kupine (*Rubus fruticosus* L) sorti Čačanska bestrna (ETKČ) i Thornfree (ETKT) i divlje borovnice (*Vaccinium myrtillus* L) (ETB), kao i mogućnost primene ovih ekstrakata kao funkcionalnog dodatka sokovima od voća.

Ispitivanja hemijskog sastava ekstrakata tropova obuhvatila su spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenola (TPh), ukupnih flavonoida (TF) i ukupnih antocijana (TAc) i HPLC analizu fenolnih jedinjenja i vitamina C.

Najviši sadržaj TPh, TF i TAc određen je u ETB (103,46 mg GAE/g suvog ekstrakta, 50,05 mg RE/g suvog ekstrakta, 44,63 mg CyGE/g suvog ekstrakta, redom). Najniži sadržaj TPh utvrđen je u ETMM (26,30 mg GAE/g suvog ekstrakta), a TF i TAc u ETMW (22,00 mg RE/g suvog ekstrakta, 2,32 mg CyGE/ g suvog ekstrakta, redom).

HPLC analizom utvrđeno je da su u ETMM i ETMW dominantne komponente protokatehinska (9,779 mg/g suvog ekstrakta, 12,779 mg/g suvog ekstrakta, redom) i galna kiselina (4,534 mg/g suvog ekstrakta, 7,302 mg/g suvog ekstrakta, redom). Od antocijana, cijanidin-3-soforozid je dominantan u oba ekstrakta tropa maline. U ETKČ od fenolnih kiselina najzastupljenije su galna i vanilinska kiselina (10,462 mg/g suvog ekstrakta, odnosno 9,555 mg/g suvog ekstrakta), dok su u ETKT dominantne protokatehinska i vanilinska kiselina (27,929 mg/g suvog ekstrakta, 13,089 mg/g suvog ekstrakta, redom). U ETKČ i ETKT najzastupljeniji antocijan je cijanidin-3-glukozid (15,722 mg/g suvog ekstrakta, odnosno 15,486 mg/g suvog ekstrakta). Od flavanola u ETKČ i ETKT su zastupljeni katehin i epikatehin, kao i katehin esterifikovan galnom kiselinom. Od fenolnih kiselina u ETB dominantne su protokatehinska (35,180 mg/g suvog ekstrakta) i galna kiselina (31,981 mg/g suvog ekstrakta). ETB se posebno ističe po visokom sadržaju antocijana, a petunidin-3-galaktozid, cijanidin-3-arabinozid i petunidin-3-glukozid su dominantni (54,291 mg/g suvog ekstrakta, 52,589 mg/g suvog ekstrakta i 45,190 mg/g suvog ekstrakta, redom).

Sadržaj vitamina C određen je HPLC analizom. U ETKT određen je najviši (1,44 mg/g suvog ekstrakta), a u ETB najniži sadržaj vitamina C (0,06 mg/g suvog ekstrakta).

Primenom spektrofotometrijskih metoda određena je antioksidativna aktivnost ekstrakata tropova na relativno stabilne DPPH i ABTS⁺ radikale, kao i njihova redukciona sposobnost.

Najveću antioksidativnu aktivnost na DPPH radikale pokazali su ETKT ($EC_{50}^{DPPH\bullet}=0,0085$ mg/ml) i ETKČ ($EC_{50}^{DPPH\bullet}=0,0175$ mg/ml). Antioksidativna aktivnost ovih ekstrakata je bolja u odnosu na sintetički antioksidant troloks ($EC_{50}^{DPPH\bullet}=0,0188$ mg/ml). ETB ($EC_{50}^{DPPH\bullet}=0,0246$ mg/ml) je pokazao dobru aktivnost, sličnu troloksu, dok su ETMM ($EC_{50}^{DPPH\bullet}=0,0723$ mg/ml) i ETMW ($EC_{50}^{DPPH\bullet}=0,0416$ mg/ml) pokazali umerenu antioksidativnu aktivnost.

Svi ekstrakti tropova su pokazali dobru antioksidativnu aktivnost na ABTS⁺ radikale, ali nešto manju u odnosu na troloks ($EC_{50}^{ABTS\bullet+}=0,0019$ mg/ml). Antioksidativna aktivnost ETKT, ETKČ i ETB ($EC_{50}^{ABTS\bullet+}=0,0065$ mg/ml, $EC_{50}^{ABTS\bullet+}=0,0070$ mg/ml, $EC_{50}^{ABTS\bullet+}=0,0082$ mg/ml, redom) je relativno slična, i nešto izraženija u odnosu na aktivnost ETMM i ETMW ($EC_{50}^{ABTS\bullet+}=0,0147$ mg/ml, $EC_{50}^{ABTS\bullet+}=0,0183$ mg/ml, redom).

Ispitivanjem redukcionne sposobnosti ekstrakata tropova utvrđeno je da ETKT, ETKČ i ETB ($RP_{0,5}=0,2358$ mg/ml, $RP_{0,5}=0,3310$ mg/ml, $RP_{0,5}=0,3792$ mg/ml, redom) imaju sličan potencijal redukcionne sposobnosti. Najnižu redukcionu sposobnost pokazao je ETMM ($RP_{0,5}=1,0556$ mg/ml). Redukciona sposobnost svih ekstrakata je lošija u odnosu na troloks ($RP_{0,5}=0,0716$ mg/ml).

Antioksidativna aktivnost ekstrakata tropova odabranog bobičastog voća na reaktivne superoksid anjon ($O_2^{\bullet-}$) i hidroksil ($\bullet OH$) radikale određena je ESR spektroskopijom.

ETB je pokazao najizraženiju antioksidativnu aktivnost na $O_2^{\bullet-}$ radikale ($EC_{50}^{O_2^{\bullet-}}=0,0569$ mg/ml). Najnižu aktivnost pokazao je ETMW ($EC_{50}^{O_2^{\bullet-}}=0,4499$ mg/ml). Antioksidativna aktivnost trolokse na $O_2^{\bullet-}$ ($EC_{50}^{O_2^{\bullet-}}=0,8575$ mg/ml) je bila znatno niža od aktivnosti svih ispitivanih ekstrakata.

ETKČ i ETKT su pokazali bolju antioksidativnu aktivnost na $\bullet OH$ ($EC_{50}^{\bullet OH}=0,5642$ mg/ml, odnosno $EC_{50}^{\bullet OH}=0,6429$ mg/ml) od drugih ekstrakata tropova, ali nešto malo lošiju u odnosu na troloks ($EC_{50}^{\bullet OH}=0,4240$ mg/ml). Antioksidativna aktivnost ETMM ($EC_{50}^{\bullet OH}=3,7288$ mg/ml) na $\bullet OH$ je bila znatno niža u odnosu na ostale ekstrakte tropova.

Pirsonovim testom korelacije utvrđena je korelacija između sadržaja fitohemikalija i $EC_{50}^{DPPH\bullet}$, $EC_{50}^{ABTS\bullet+}$ i $RP_{0,5}$ vrednosti. Vrlo dobra korelacija određena je između sadržaja TPh i antioksidativne aktivnosti na DPPH[•] ($|r|=0,86$), kao i između sadržaja TPh i TF i

antioksidativne aktivnosti na ABTS^{•+} ($|r|=0,84$, $|r|=0,93$, redom). Vrlo dobra korelacija utvrđena je i između redukcijske sposobnosti ekstrakata tropova i sadržaja TPh, TF i sinapinske kiseline ($|r|=0,92$, $|r|=0,87$, $|r|=0,95$, redom).

Korelacionom analizom (korelirane su $EC_{50}^{O_2^{•-}}$ i $EC_{50}^{OH^{•}}$ vrednosti i sadržaji fitohemikalija) utvrđena je vrlo dobra korelacija između antioksidativne aktivnosti ekstrakata tropova na $O_2^{•-}$ i sadržaja TF i TAc ($|r|=0,52$, $|r|=0,73$). Zabeležena je i dobra korelacija sa sadržajem rutina, miricetina i cijanidin-3-glukozida ($|r|=0,70$, $|r|=0,58$, odnosno $|r|=0,62$), kao i sa sadržajem galne ($|r|=0,66$) i ferulne kiseline ($|r|=0,77$). Dobra korelacija utvrđena je između sadržaja TPh, TF, sinapinske ($|r|=0,69$) i elaginske kiseline i antioksidativne aktivnosti ekstrakata tropova na $OH^{•}$ ($|r|=0,75$, $|r|=0,57$, $|r|=0,69$, $|r|=0,72$, redom).

Antihyperglikemijska aktivnost ekstrakata tropova ispitana je testom inhibicije α -glukozidaze. Svi ekstrakti su iskazali koncentracijsku zavisnost inhibitorne aktivnosti na α -glukozidazu u ispitivanom opsegu koncentracija. Na osnovu antihyperglikemijske aktivnosti, izražene kao EC_{50}^{AHgA} , utvrđeno je da su ETMM (0,20 mg/ml), ETKČ (0,10 mg/ml) i ETKT (0,08 mg/ml) pokazali značajno veću AHgA u odnosu na druge ispitivane ekstrakte tropova (ETMW i ETB).

Korelacionom analizom (korelirane su EC_{50}^{AHgA} vrednosti i sadržaji fitohemikalija), ustanovljena je dobra korelacija između antihyperglikemijske aktivnosti ekstrakata i sadržaja galne i ferulne kiseline ($|r|=0,56$, odnosno $|r|=0,57$).

Antiproliferativna aktivnost ekstrakata tropova ispitana je *in vitro*, njihovim delovanjem na rast četiri histološki različite humane ćelijske linije: HeLa (epitelni karcinom cerviksa), MCF7 (adenokarcinom dojke), HT-29 (adenokarcinom debelog creva) i MRC-5 (humani fetalni fibroblasti pluća).

ETMM, ETMW, ETKČ i ETKT su pokazali izraženu antiproliferativnu aktivnost na sve 4 ispitivane humane ćelijske linije. Najbolju aktivnost prema HeLa i MCF7 humanim ćelijskim linijama je pokazao ETMW ($EC_{50}^{HeLa}=57,27 \mu\text{g/ml}$ i $EC_{50}^{MCF7}=34,85 \mu\text{g/ml}$), dok je ETKČ pokazao daleko izraženiju aktivnost na rast HT-29 i MRC-5 ćelijskih linija ($EC_{50}^{HT-29}=66,02 \mu\text{g/ml}$; $EC_{50}^{MRC-5}=71,70 \mu\text{g/ml}$). ETB je pokazao najslabije antiproliferativno dejstvo na rast svih ćelijskih linija u odnosu na ekstrakte tropova maline i kupine. Najbolja aktivnost ovog ekstrakta uočena prema HeLa ćelijskoj liniji ($EC_{50}^{HeLa}=242,93 \mu\text{g/ml}$).

Korelacionom analizom između EC_{50} vrednosti za sve ispitane humane ćelijske linije i sadržaja fitohemikalija, ustanovljena je vrlo dobra korelacija između sadržaja TAc i antiproliferativne aktivnosti ekstrakata prema HeLa, MCF7, HT-29 i MRC-5 ćelijskim linijama

($|r|=0,99$, $|r|=0,98$, $|r|=0,95$, $|r|=0,95$, redom). Vrlo dobra korelacija je utvrđena i sa sadržajem galne i ferulne kiseline i rutina. Utvrđena je i vrlo dobra korelacija između sadržaja miricetina i antiproliferativne aktivnosti ekstrakata tropova na rast HeLa i MCF7 ćelijskih linija.

Za ispitivanja antimikrobne aktivnosti ekstrakata tropova na odabrane sojeve bakterija, kvasaca i plesni korišćene su disk difuziona metoda i metoda „bunarčića”.

ETMM i ETMW delovali su inhibitorno na sve test mikroorganizme, izuzev na kvasac *Candida albicans*. Oba ekstrakta su pokazala sličnu antibakterijsku aktivnost. Za većinu bakterija (izuzev divljeg izolata *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. i *Bacillus* sp.) već sa 15 μ l javile su se čiste zone oko diska. Od G (-) bakterija najveću osetljivost na oba ekstrakta su pokazale vrste *Escherichia* i *Salmonella*, a od G (+) bakterija vrste roda *Staphylococcus*. Kod G (+) bakterija uočena je veća otpornost divljih izolata prema ovim ekstraktima. MIC i MBC ETMM i ETMW kretale su se u opsegu 0,29–0,59 mg/ml, odnosno 0,39–0,78 mg/ml. MIC za kvasce i plesni i MFC vrednosti ekstrakata bile su mnogo veće u odnosu na iste parametre za bakterije. Od ispitivanih kvasaca i plesni najosetljiviji je bio kvasac *Saccharomyces cerevisiae* 112. Od plesni, divlji izolat *Penicillium aurantiogriseum* je bio osetljiviji na oba ekstrakta od divljeg izolata *Aspergillus niger*, pri čemu je veća osetljivost zapažena na ETMM.

ETKČ i ETKT su pokazali dobru antibakterijsku aktivnost na sve ispitivane bakterije, ali nešto slabiju u odnosu na antibakterijsku aktivnost ETMM i ETMW. Od G (-) bakterija najveću osetljivost su pokazali sojevi roda *Salmonella*, a od G (+) bakterija *Bacillus* vrste i *Listeria monocytogenes*. Ovi ekstrakti nisu pokazali inhibitorno dejstvo prema eukariotskim mikroorganizmima. MIC i MBC/MFC vrednosti su ukazale da oba ekstrakta tropa kupine inhibiraju rast svih ispitivanih mikroorganizama, pri čemu je ETKČ pokazao nešto veći antibakterijski potencijal. ETKČ najefikasnije je delovao na *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 i *Staphylococcus aureus* ATCC 11632 (MIC=0,39 mg/ml, MBC=0,78 mg/ml), dok je ETKT bio najefikasniji prema *Escherichia coli* ATCC 25922 (MIC=0,78 mg/ml, MBC=1,56 mg/ml), *Staphylococcus aureus* ATCC 11632 i izolatu *Pseudomonas aeruginosa* (MIC=1,56 mg/ml, MBC=3,13 mg/ml). Oba ekstrakta pokazala su slabu antibakterijsku aktivnost prema *Bacillus cereus* ATCC 10876 i *Bacillus* sp.

ETB je pokazao inhibitorno dejstvo prema *Escherichia coli*, kvascima *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* i plesnima *Aspergillus niger* i *Penicillium aurantiogriseum*. Za bakterije *Salmonella typhimurium*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* i *Bacillus cereus* zona inhibicije je detektovana samo metodom „bunarčića” pri zapremini od 100 μ l. MIC i MBC ETB su bile u opsegu 3,13–37,50 mg/ml, odnosno 6,25–>100 mg/ml.

Sojevi roda *Bacillus* bili su najotporniji od svih ispitivanih bakterija, a najosetljiviji su bili izolat *Staphylococcus saprophyticus* i referentni soj *Staphylococcus aureus*, za koje je MBC ekstrakta iznosila 6,25 mg/ml.

Korelacionom analizom ustanovljen je veliki uticaj polifenolnih jedinjenja na anti-mikrobnu aktivnost. Za sve ispitivane G (+) bakterije i G (-) bakterije utvrđene su vrlo dobre i dobre korelacije sa sadržajem TPh i TF.

Obogaćeni sokovi odabranog bobičastog voća proizvedeni su u laboratorijskim uslovima dodatkom liofiliziranih ekstrakata tropova voća (50 mg TPh ekstrakta/100 ml obogaćenog soka) u 10% vodeni rastvor soka koji je dobijen ceđenjem istog voća. Efikasnost obogaćivanja utvrđena je na osnovu sadržaja TPh, TF i TAc i antioksidativne aktivnosti sokova određene DPPH testom i testom redukcione sposobnosti.

Sadržaj TPh, TF i TAc u obogaćenim sokovima je bio znatno veći u odnosu na sokove iz kojih su proizvedeni. Najveći sadržaj TPh i TF je određen u OSKT (93,66 mg GAE/100 ml soka, 43,02 mg RE/100 ml soka, redom), dok je najmanji sadržaj TPh određen u OSB (56,92 mg GAE/100 ml soka), a TF u OSMM (33,58 mg RE/100 ml soka). Najniži sadržaj TAc je bio u OSMM (7,16 mg CyGE/100 ml soka), a najviši u OSB (24,09 mg CyGE/100 ml soka).

Svi obogaćeni sokovi su pokazali znatno izraženiju antioksidativnu aktivnost u odnosu na neobogaćene sokove. Najjače antioksidativno delovanje na DPPH radikale pokazao je OSB ($EC_{50}^{DPPH\bullet}=0,004$ ml soka/ml reakcione smeše), a najslabije OSMM ($EC_{50}^{DPPH\bullet}=0,008$ ml soka/ml reakcione smeše). Najjaču redukcionu sposobnost pokazao je OSKČ ($RP_{0,5}=0,039$ ml soka/ml reakcione smeše), a najslabiju OSMM ($RP_{0,5}=0,127$ ml soka/ml reakcione smeše).

Korelacionom analizom utvrđena je vrlo dobra korelacija između sadržaja TPh, odnosno TF i antioksidativne aktivnosti na DPPH radikale ($|r|=0,85$, odnosno $|r|=0,86$), kao i redukcione sposobnosti obogaćenih sokova ($|r|=0,85$, odnosno $|r|=0,81$).

Sumarni rezultati korelacione analize pokazali su da su za antioksidativnu, antihiper-glikemijsku, antiproliferativnu i antimikrobnu aktivnost ispitivanih ekstrakata tropova u velikoj meri odgovorna polifenolna jedinjenja, ali ne može se isključiti ni uticaj nekih drugih jedinjenja, kao ni sinergizam između svih bioaktivnih jedinjenja prisutnih u ovim ekstraktima.

Rezultati ove disertacije ukazuju na neke od mogućnosti korišćenja ekstrakata tropova ispitivanog bobičastog voća. Ekstrakti ovih tropova, zahvaljujući visokom sadržaju antioksidanata fenolne strukture i dokazanoj dobroj antioksidativnoj aktivnosti, mogli bi se koristiti kao funkcionalni dodaci u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Za-

hvaljujući dokazanoj antioksidativnoj, antiproliferativnoj i antihiperглиkemijskoj aktivnosti ispitivani ekstrakti tropova bi mogli da se primenjuju kao pomoćna sredstva u prevenciji oksidativnog stresa i degenerativnih bolesti, uključujući i kancer i dijabetes II, ili u kombinaciji sa odgovarajućim lekovima u lečenju ovih bolesti. Zbog dokazanog antimikrobnog potencijala, mogao bi se ispitati, u realnim uslovima, potencijal dobijenih ekstrakata kao zamene za sintetička antimikrobna sredstva koja se koriste u proizvodnji hrane, ili nekim drugim granama industrije (npr. kozmetičke i farmaceutske industrije), što bi svakako imalo i pozitivan uticaj na poverenje potrošača u sigurnost proizvoda.

6. LITERATURA

- Adams, L. S., Phung, S., Yee, N., Seeram, N. P., Li, L., & Chen, S. (2010). Blueberry phytochemicals inhibit growth and metastatic potential of MDA-MB-231 breast cancer cells through modulation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Cancer research*, 70(9), 3594–3605.
- Adefegha, A. O. A. S. A. (2010). Inhibitory effects of aqueous extract of two varieties of ginger on some key enzymes linked to type-2 diabetes in vitro. *Journal of Food and Nutrition Research*, 49(1), 14–20.
- Afrin, S., Giampieri, F., Gasparini, M., Forbes-Hernandez, T. Y., Varela-López, A., Quiles, J. L., Mezzetti, B., & Battino, M. (2016). Chemopreventive and therapeutic effects of edible berries: A focus on colon cancer prevention and treatment. *Molecules*, 21(2), 169.
- Aiyer, H. S., Vadhanam, M. V., Stoyanova, R., Caprio, G. D., Clapper, M. L., & Gupta, R. C. (2008). Dietary berries and ellagic acid prevent oxidative DNA damage and modulate expression of DNA repair genes. *International journal of molecular sciences*, 9(3), 327–341.
- Ali, L. (2012). Pre-harvest factors affecting quality and shelf-life in raspberries and blackberries (*Rubus* spp. L.) (Vol. 2012, No. 58).
- Amarowicz, R., Carle, R., Dongowski, G., Durazzo, A., Galensa, R., Kammerer, D., Maiani, G. & Piskula, M.K. (2009), Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. *Molecular nutrition & food research*, 53, S151–S183.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., & Ryan, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125(5), 989–1009.
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K.M., Özyürek, M., & Güclü, K. (2013). Method of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report)*. *Pure and Applied Chemistry*, 85(5), 957–998.

- Aqil, F., Munagala, R., Jeyabalan, J., Joshi, T., Gupta, R. C., & Singh, I. P. (2015). The Indian Blackberry (Jamun), Antioxidant Capacity, and Cancer Protection. *Cancer: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. Amsterdam.
- Arranz, S., Saura-Calixto, F., Shaha, S., & Kroon, P. A. (2009). High contents of nonextractable polyphenols in fruits suggest that polyphenol contents of plant foods have been underestimated. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7298–7303.
- Arsić, I., Đorđević, S., Ristić, M., & Runjajić-Antić, D. (2003). Lekovito bilje u proizvodnji funkcionalne hrane. *Lekovite sirovine*, 23(23), 15–22.
- Arvindakshan, M., Sitasawad, S., Debsikdar, V., Ghate, M., Evans, D., Horrobin, D. F., Bennet, C., Ranjekar, P. K., & Mahadik, S. P. (2003). Essential polyunsaturated fatty acid and lipid peroxide levels in never-medicated and medicated schizophrenia patients. *Biological psychiatry*, 53(1), 56–64.
- Atala, E., Vásquez, L., Speisky, H., Lissi, E., & López-Alarcón, C. (2009). Ascorbic acid contribution to ORAC values in berry extracts: An evaluation by the ORAC-pyrogallol red methodology. *Food Chemistry*, 113(1), 331–335.
- Ayoub, M., de Camargo, A. C., & Shahidi, F. (2016). Antioxidants and bioactivities of free, esterified and insoluble-bound phenolics from berry seed meals. *Food chemistry*, 197, 221–232.
- Balaban-Marjanovic, Z., Grujic, S., Jasic, M., & Vujadinovic, D. (2012). Testing of chemical composition of wild berries. In *Third International Scientific Symposium „Agrosym 2012“, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 15-17 November, 2012. Book of Proceedings* (pp. 154–160). Faculty of Agriculture, University of East Sarajevo.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191–203.
- Basu, A., Rhone, M., & Lyons, T. J. (2010). Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutrition reviews*, 68(3), 168–177.
- Beekwilder, J., Jonker, H., Meesters, P., Hall, R. D., van der Meer, I. M., & Ric de Vos, C. H. (2005). Antioxidants in raspberry: on-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3313–3320.
- Bernaert, N., De Paepe, D., Bouten, C., De Clercq, H., Stewart, D., Van Bockstaele, E., De Loose, M., & Van Droogenbroeck, B. (2012). Antioxidant capacity, total phenolic

- and ascorbate content as a function of the genetic diversity of leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*). *Food chemistry*, 134(2), 669–677.
- Biasi, F., Astegiano, M., Maina, M., Leonarduzzi, G., & Poli, G. (2011). Polyphenol supplementation as a complementary medicinal approach to treating inflammatory bowel disease. *Current medicinal chemistry*, 18(31), 4851–4865.
- Blagojević, R., & Božić, V. (2012) Tehnologija proizvodnje kupine. Kancelarija za program podrške u privatnom sektoru za podršku sektoru voćarstva i bobičastog voća u Južnoj Srbiji, Niš.
- Blagojević, R., & Nikolić, Z. (2011), Jagodasto voće. Dis publik. Beograd.
- Block, G., Patterson, B., & Subar, A. (1992). Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutrition and cancer*, 18(1), 1–29.
- Boath, A. S., Stewart, D., & McDougall, G. J. (2012). Berry components inhibit α -glucosidase in vitro: Synergies between acarbose and polyphenols from black currant and rowanberry. *Food chemistry*, 135(3), 929–936.
- Bobinaitė, R., Viškelis, P., & Venskutonis, P. R. (2012). Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars. *Food Chemistry*, 132(3), 1495–1501.
- Bobinaitė, R., Viškelis, P., Šarkinas, A., & Venskutonis, P. R. (2013). Phytochemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of raspberry fruit, pulp, and marc extracts. *CyTA-Journal of Food*, 11(4), 334–342.
- Borges, G., Degeneve, A., Mullen, W., & Crozier, A. (2009). Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants, and cranberries. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(7), 3901–3909.
- Bowen-Forbes, C. S., Zhang, Y., & Nair, M. G. (2010). Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of food composition and analysis*, 23(6), 554–560.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317–333.
- Brodowska, A. J. (2017). European Journal of Biological Research: Raspberry pomace – composition, properties and application, 7 (2), 86–96.
- Buettner, G. R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Archives of biochemistry and biophysics*, 300(2), 535–543.

- Bulatović, M. L., Rajić, Z., & Ralević, I. L. (2012). Economic features of processed fruit production in Serbia. *Economics of Agriculture/Ekonomika Poljoprivrede*, 59(4).
- Bunea, A., Rugina, D. O., Pinte, A. M., Sconta, Z., Bunea, C. I., & Socaciu, C. (2011). Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of some wild and cultivated blueberries from Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39(2), 70.
- Buonocore, G., Perrone, S., & Tataranno, M. L. (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. In *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 15(4): 186–190.
- Burdulis, D., Sarkinas, A., Jasutiene, I., Stackevicene, E., Nikolajevs, L., & Janulis, V. (2008). Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits. *Acta poloniae pharmaceutica*, 66(4), 399–408.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223–253.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life sciences*, 74(17), 2157–2184.
- Čanadanović-Brunet, J. (1998). Kiseonikovi slobodni radikali i prirodni antioksidanti. Zadužbina Andrejević. Beograd.
- Castaneda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Pérez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food chemistry*, 113(4), 859–871.
- Castrejón, A. D. R., Eichholz, I., Rohn, S., Kroh, L. W., & Huyskens-Keil, S. (2008). Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry*, 109(3), 564–572.
- Cerda, A., Martínez, M. E., Soto, C., Zúñiga, M. E., & Poirrier, P. (2016). Methanisation of spent maqui berry pomace via enzymatic treatment. *Renewable Energy*, 87, 326–331.
- Četojević-Simin, D., Beara, I., & Simin, N. (2015). Ne-tumor/tumor IC₅₀ odnos kao parameter za procenu antitumorske *in vitro* aktivnosti vrsta roda *Plantago*, *Allium* i *Tuber*. *Lekovite sirovine*, 35 (35), 103–111.
- Četojević-Simin, D., Svirčev, Z., & Baltić, V. (2009). *In vitro* cytotoxicity of cyanobacteria from water systems of Serbia. *Journal of Balcan Union of Oncology*, 14 (2), 289–294.

- Chan, H.H., Sun, H.D., Reddy, M.V.B., & Wu, T.S. (2010). Potent α -glucosidase inhibitors from the roots of *Panax japonicas* C.A.Meyer var. major. *Phytochemistry*, 71, 1360–1364.
- Chandrasekaran, S. (2014). Role of tannins in oral health care. *International Journal of Pharmaceutical Science and Health Care*, 3(4), 39–44.
- Chau, C. F., & Huang, Y. L. (2003). Comparison of the chemical composition and physico-chemical properties of different fibers prepared from the peel of *Citrus sinensis* L. Cv. Liucheng. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2615–2618.
- Chen, Y., Wang, M., Rosen, R.T., & Ho, C.-T. (1999). 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging active components from *Polygonum multiflorum* Thunb. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2226–2228.
- Cheynier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 223S–229S.
- Cho, M.J., Howard, L.R., Prior, R.L., & Clarck, R.J. (2004). Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1771–1782.
- Chu, W. K., Cheung, S. C., Lau, R. A., & Benzie, I. F. (2011). Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). *Lester Packer, Ph. D.*, 55.
- Cisowska, A., Wojnicz, D., & Hendrich, A. B. (2011). Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin. *Natural product communications*, 6(1), 149–156.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564–582.
- Ćujić, N., Kundaković, T., & Šavikin, T. (2013). Antocijani-Kemijska analiza i biološka aktivnost. *Lek. Sirov. 2013*; 33: 19, 37.
- Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), 343–356.
- Dabbou, S., Renna, M., Lussiana, C., Gai, F., Rotolo, L., Kovitvadhi, A., Brugiapaglia, A., Helal, A. N., Schiavone, A., Zoccarato, I., & Gasco, L. (2017). Bilberry pomace in growing rabbit diets: effects on quality traits of hind leg meat. *Italian Journal of Animal Science*, 1–9.
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313–7352.

- Dalvi, L. T., Moreira, D. C., Andrade, R., Ginani, J., Alonso, A., & Hermes-Lima, M. (2017). Ellagic acid inhibits iron-mediated free radical formation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 173, 910–917.
- Devi, Y. P., Uma, A., Narasu, M. L., & Kalyani, C. (2014). Anticancer activity of gallic acid on cancer cell lines, HCT-15 and MDA MB 231. *International Journal of Research in Applied, Natural and Social Sciences*, 2, 269–72.
- Diaconeasa, Z., Florica, R., Rugină, D., Lucian, C., & Socaciu, C. (2014). HPLC/PDA–ESI/MS identification of phenolic acids, flavonol glycosides and antioxidant potential in blueberry, blackberry, raspberries and cranberries. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(11), 781–785.
- Diaconeasa, Z., Leopold, L., Rugină, D., Ayvaz, H., & Socaciu, C. (2015). Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin rich extracts from blueberry and blackcurrant juice. *International journal of molecular sciences*, 16(2), 2352–2365.
- Đilas, S., Čanadanović-Brunet, J., & Četković, G. (2009). By-products of fruits processing as a source of phytochemicals. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 15(4), 191–202.
- Đilas, S., Čanadanović-Brunet, J., Tumbas, V., & Četković, G. (2010). Biološka aktivnost bobičastog voća, *Glasnik hemičara, tehnologa i ekologa Republike Srpske*, (4), 1–11.
- Đilas, S., Knez, Ž., Četojević-Simin, D., Tumbas, V., Škerget, M., Čanadanović-Brunet, J., & Četković, G. (2012). *In vitro* antioxidant and antiproliferative activity of three rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract formulations. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 2052–2062.
- Ding, M., Feng, R., Wang, S. Y., Bowman, L., Lu, Y., Qian, Y., Castranova, V., Jiang, B. H., & Shi, X. (2006). Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 281(25), 17359–17368.
- Dubois, S. (2014). The Ability of Berry Extracts to Inhibit Alpha-Glucosidase In Vitro.
- Dulf, F. V., Andrei, S., Bunea, A., & Socaciu, C. (2012). Fatty acid and phytosterol contents of some Romanian wild and cultivated berry pomaces. *Chemical Papers*, 66(10), 925–934.
- Espin, J.C., Soler-Rivas, C., & Wichers, H.J. (2000). Characterisation of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oils fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 648–656.

- Faria, A., Pestana, D., Teixeira, D., De Freitas, V., Mateus, N., & Calhau, C. (2010). Blueberry anthocyanins and pyruvic acid adducts: anticancer properties in breast cancer cell lines. *Phytotherapy research*, 24(12), 1862–1869.
- Fazio, A., Plastina, P., Meijerink, J., Witkamp, R. F., & Gabriele, B. (2013). Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from Southern Italy: Fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts. *Food chemistry*, 140(4), 817–824.
- Flores, F. P., Singh, R. K., Kerr, W. L., Pegg, R. B., & Kong, F. (2013). Antioxidant and enzyme inhibitory activities of blueberry anthocyanins prepared using different solvents. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(18), 4441–4447.
- Folmer, F., Basavaraju, U., Jaspars, M., Hold, G., El-Omar, E., Dicato, M., & Diederich, M. (2014). Anticancer effects of bioactive berry compounds. *Phytochemistry reviews*, 13(1), 295–322.
- Fraga, C. G., Litterio, M. C., Prince, P. D., Calabró, V., Piotrkowski, B., & Galleano, M. (2010). Cocoa flavanols: effects on vascular nitric oxide and blood pressure. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 48(1), 63–67.
- Fredes, C., Montenegro, G., Zoffoli, J. P., Santander, F., & Robert, P. (2014). Comparison of the total phenolic content, total anthocyanin content and antioxidant activity of polyphenol-rich fruits grown in Chile. *Ciencia e Investigacion Agraria*, 41(1), 49–60.
- Gaćina, N. (2014). Alternativne sirovine prehrambenih vlakana. *Zbornik radova Veleučilišta u Šibeniku*, (1-2/2014), 123–130.
- Genskowsky, E., Puente, L. A., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J., Muñoz, L. A., & Viuda-Martos, M. (2016). Determination of polyphenolic profile, antioxidant activity and antibacterial properties of maqui [*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz] a Chilean blackberry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 4235–4242.
- Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J.M., Quiles, J.L., Mezzetti, B., & Battino, M. (2012). The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, 28, 9–19.
- Gironés-Vilaplana, A., Baenas, N., Villaño, D., Speisky, H., García-Viguera, C., & Moreno, D. A. (2014). Evaluation of Latin-American fruits rich in phytochemicals with biological effects. *Journal of Functional Foods*, 7, 599–608.
- Gogoșă, I., Alda, L. M., Bordean, D., Rada, M., Velciov, A., Popescu S., Alda, S., & Gergen, I. (2014). Preliminary research regarding the use of some berries (blueberries,

- blackberries and raspberries) as supplementary sources of bio minerals. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 18(4), 108–112.
- Golding, J. B., Blades, B. L., Satyan, S., Spohr, L. J., Harris, A., Jessup, A. J., Archer, J. R., Davies, J. B., & Banos, C. (2015). Low dose gamma irradiation does not affect the quality or total ascorbic acid concentration of “Sweetheart” passionfruit (*Passiflora edulis*). *Foods*, 4(3), 376–390.
- Górecka, D., Pacholek, B., Dziedzic, K., & Górecka, M. (2010). Raspberry pomace as a potential fiber source for cookies enrichment. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 9(4), 451–461.
- Grace, M. H., Esposito, D., Dunlap, K. L., & Lila, M. A. (2014). Comparative analysis of phenolic content and profile, antioxidant capacity and anti-inflammatory bioactivity in Wild Alaskan and commercial *Vaccinium* berries. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(18), 4007.
- Graefe, E. U., Wittig, J., Mueller, S., Riethling, A. K., Uehleke, B., Drewelow, B., Pforte, H., Jacobasch, G., Derendorf, H., & Veit, M. (2001). Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 41(5), 492–499.
- Grussu, D., Stewart, D., & McDougall, G. J. (2011). Berry polyphenols inhibit α -amylase in vitro: identifying active components in rowanberry and raspberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2324–2331.
- Gyurova, D., & Enikova, R. (2015). Dietary fibers—definitions, classifications and analytical methods for the physiological assessment of their content in foods. *Journal of BioScience & Biotechnology*, 209–213.
- Hafidh, R.R., Abdulmir, A.S., Vern, L. S., Abu Baker, F., Abas, F., Jahanshiri, F., & Sekawi, Z. (2011). Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *The Open Microbiology Journal*, 5, 96–106.
- Hager, T. J., Howard, L. R., Liyanage, R., Lay, J. O., & Prior, R. L. (2008). Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF- MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 661–669.
- Häkkinen, S. H., & Törrönen, A. R. (2000). Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food research international*, 33(6), 517–524.

- Häkkinen, S., Heinonen, M., Kärenlampi, S., Mykkänen, H., Ruuskanen, J., & Törrönen, R. (1999). Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International*, 32(5), 345–353.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2), 312–322.
- He, W., Liu, Y., Wamer, W. G., & Yin, J. J. (2014). Electron spin resonance spectroscopy for the study of nanomaterial-mediated generation of reactive oxygen species. *Journal of food and drug analysis*, 22(1), 49–63.
- Hoffmann, K., Boeing, H., Volatier, J. L., & Becker, W. (2003). Evaluating the potential health gain of the World Health Organization's recommendation concerning vegetable and fruit consumption. *Public health nutrition*, 6(8), 765.
- Howell, A. B., Vorsa, N., Marderosian, A. D., & Foo, L. Y. (1998). Inhibition of the adherence of P-fimbriated *Escherichia coli* to uroepithelial-cell surfaces by proanthocyanidin extracts from cranberries. *New England Journal of Medicine*, 339(15), 1085 – 1086.
- <http://antioksidans.com>
- <http://srbi.ca/srbija-treca-u-svetu-po-proizvodnji-kupina/>
- <http://www.internationalraspberry.net/>
- Ismail, T., Calcabrini, C., Diaz, A. R., Fimognari, C., Turrini, E., Catanzaro, E., Akhtar, S., & Sestili, P. (2016). Ellagitannins in cancer chemoprevention and therapy. *Toxins*, 8(5), 151.
- Ivanovic, J., Tadic, V., Dimitrijevic, S., Stamenic, M., Petrovic, S., & Zizovic, I. (2014). Antioxidant properties of the anthocyanin-containing ultrasonic extract from blackberry cultivar “Čačanska Bestrna”. *Industrial Crops and Products*, 53, 274–281.
- Jaakola, L., Määttä, K., Pirttilä, A. M., Törrönen, R., Kärenlampi, S., & Hohtola, A. (2002). Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiology*, 130(2), 729-739.
- Jaganathan, S. K., Vellayappan, M. V., Narasimhan, G., Supriyanto, E., Dewi, D. E. O., Narayanan, A. L. T., Balaji, A., Subramanian, A. P., & Yusof, M. (2014). Chemopreventive effect of apple and berry fruits against colon cancer. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(45), 17029.

- Joshi, V. K., Kumar, A., & Kumar, V. (2012). Antimicrobial, antioxidant and phytochemicals from fruit and vegetable wastes: A review. *International Journal of Food and Fermentation Technology*, 2(2), 123.
- Jurgoński, A., Juśkiewicz, J., Zduńczyk, Z., Matusevicius, P., & Kołodziejczyk, K. (2014). Polyphenol-rich extract from blackcurrant pomace attenuates the intestinal tract and serum lipid changes induced by a high-fat diet in rabbits. *European journal of nutrition*, 53(8), 1603–1613.
- Kafkas, E., Özgen, M., Özoğul, Y., & Türemiş, N. (2008). Phytochemical and fatty acid profile of selected red raspberry cultivars: A comparative study. *Journal of Food Quality*, 31(1), 67–78.
- Kähkönen, M. P., & Heinonen, M. (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(3), 628–633.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(10), 3954–3962.
- Kähkönen, M., Kylli, P., Ollilainen, V., Salminen, J. P., & Heinonen, M. (2012). Antioxidant activity of isolated ellagitannins from red raspberries and cloudberries. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(5), 1167–1174.
- Kårlund, A., Moor, U., Sandell, M., & Karjalainen, R. O. (2014). The impact of harvesting, storage and processing factors on health-promoting phytochemicals in berries and fruits. *Processes*, 2(3), 596–624.
- Kazimierczak, R., Hallmann, E., Kowalska, K., & Rembiałkowska, E. (2016). Biocompounds content in organic and conventional raspberry fruits. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 18(5), 40–42.
- Kell, D. B. (2010). Towards a unifying, systems biology understanding of large-scale cellular death and destruction caused by poorly liganded iron: Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's, prions, bactericides, chemical toxicology and others as examples. *Archives of toxicology*, 84(11), 825–889.
- Khanal, R. C., Howard, L. R., Brownmiller, C. R., & Prior, R. L. (2009). Influence of extrusion processing on procyanidin composition and total anthocyanin contents of blueberry pomace. *Journal of Food Science*, 74(2), H52–H58.
- Kilic, I., Yeşiloğlu, Y., & Bayrak, Y. (2014). Spectroscopic studies on the antioxidant activity of ellagic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 130, 447–452.

- Kokić, S. (2009). Dijagnostika i liječenje šećerne bolesti tipa 2. *Medix*, 15 (80/81), 90–98.
- Komorsky-Lovrić, Š., & Novak, I. (2011). Determination of ellagic acid in strawberries, raspberries and blackberries by square-wave voltammetry. *International Journal of Electrochemical Science*, 6(10), 4638–4647.
- Kraujalytė, V., Venskutonis, P. R., Pukalskas, A., Česonienė, L., & Daubaras, R. (2015). Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes. *Food chemistry*, 188, 583–590.
- Krisch, J., Galgóczy, L., Tölgyesi, M., Papp, T., & Vágvölgyi, C. (2008). Effect of fruit juices and pomace extracts on the growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Acta Biologica Szegediensis*, 52(2), 267–270.
- Kristo, A. S., Klimis-Zacas, D., & Sikalidis, A. K. (2016). Protective Role of Dietary Berries in Cancer. *Antioxidants*, 5(4), 37.
- Krstić, T., Suvajdžić, Lj., Stojanović, S., Velhner, M., Milanov, D., Bojić, G., & Ilić, N. (2014). Different antimicrobial effects of raspberry depending on the method of active components isolation. *Food and Feed Research*, 41(2), 125–130.
- Kula, M., Majdan, M., Głód, D., & Krauze-Baranowska, M. (2016). Phenolic composition of fruits from different cultivars of red and black raspberries grown in Poland. *Journal of Food Composition and Analysis*, 52, 74–82.
- Kumar, N., & Pruthi, V. (2014). Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*, 4, 86–93.
- Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V., & Prakash, O. (2011). α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy reviews*, 5(9), 19.
- Lacombe, A., Wu, V.C.H., White J., Tadepalli S., & Andre E.E. (2012): The antimicrobial properties of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) fractional components against foodborne pathogens and the conservation of probiotic *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Microbiology*, 30, 124–131.
- Lee, J., Durst, R.W., & Wrolstad. (2006). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88, 1269–1279.
- Lee, J., & Wrolstad, R. E. (2004). Extraction of anthocyanins and polyphenolics from blueberry processing waste. *Journal of food science*, 69(7), 564–573.

- Liepiņa, I., Nikolajeva, V., & Jākobsone, I. (2013). Antimicrobial activity of extracts from fruits of *Aronia melanocarpa* and *Sorbus aucuparia*. *Environmental And Experimental Biology J*, 11, 195–199.
- Lima, G. P. P., Vianello, F., Corrêa, C. R., da Silva Campos, R. A., & Borguini, M. G. (2014). Polyphenols in fruits and vegetables and its effect on human health. *Food and Nutrition sciences*, 2014.
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of nutrition*, 134(12), 3479S–3485S.
- Liu, R. H. (2013). Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 4(3), 384S–392S.
- Liu, X., Zhu, L., Tan, J., Zhou, X., Xiao, L., Yang, X., & Wang, B. (2014). Glucosidase inhibitory activity and antioxidant activity of flavonoid compound and triterpenoid compound from *Agrimonia Pilosa* Ledeb. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 12.
- Ljaljević Grbić, M., Stupar, M., Vukojević, J., Soković, M., Mišić, D., Grubišić, D., & Ristić, M. (2008). Antifungal activity of *Nepeta rtanjensis* essential oil. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 73(10), 961–965.
- Losso, J. N., Bansode, R. R., Trappey, A., Bawadi, H. A., & Truax, R. (2004). In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid. *The Journal of nutritional biochemistry*, 15(11), 672–678.
- Määttä-Riihinen, K. R., Kamal-Eldin, A., & Törrönen, A. R. (2004). Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6178–6187.
- Maldonado-Celis, M. E., Arango-Varela, S. S., & Rojano, B. A. (2014). Free radical scavenging capacity and cytotoxic and antiproliferative effects of *Vaccinium meridionale* Sw. against colon cancer cell lines. *Rev. Cubana Plant Med*, 19(2), 172–184.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727–747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 230S–242S.

- Manganaris, G. A., Goulas, V., Vicente, A. R., & Terry, L. A. (2014). Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(5), 825–833.
- Marhuenda, J., Alemán, M. D., Gironés-Vilaplana, A., Pérez, A., Caravaca, G., Figueroa, F., & Zafrilla, P. (2016). Phenolic composition, antioxidant activity, and in vitro availability of four different berries. *Journal of Chemistry*, 2016.
- Mayo, W. J. (1998). Chemical methods of control: Antimicrobial drugs. In T. R. Johnson, & C. L. Case (Eds.), *Laboratory experiments in microbiology* (pp. 179–181). San Francisco: The Benjamin/Cummings Publishing Company.
- Mena, P., García-Viguera, C., Navarro-Rico, J., Moreno, D. A., Bartual, J., Saura, D., & Martí, N. (2011). Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(10), 1893–1906.
- Meng, X., Munishkina, L. A., Fink, A. L., & Uversky, V. N. (2010). Effects of various flavonoids on the-synuclein fibrillation process. *Parkinson's Disease*, 2010.
- Mertz, C., Cheynier, V., Günata, Z., & Brat, P. (2007). Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8616–8624.
- Mildner-Szkudlarz, S., Bajerska, J., Górnaś, P., Segliņa, D., Pilarska, A., & Jesionowski, T. (2016). Physical and bioactive properties of muffins enriched with raspberry and cranberry pomace powder: A promising application of fruit by-products rich in biocompounds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(2), 165–173.
- Milić, B., Đilas, S., & Čanadanović-Brunet, J. (2000a). Ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata žalfije (*Salvia officinalis* L.) ESR spektroskopijom. *Acta periodica technologica*, 31, 635–644.
- Milić, Lj. B., Đilas, M. S., Čanadanović-Brunet, M. J., Sakač, B. M. (2000). Biljni polifenoli. Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Miret, J. A., & Munné-Bosch, S. (2016). Abscisic acid and pyrabactin improve vitamin C contents in raspberries. *Food chemistry*, 203, 216–223.
- Mišan, A. (2009). Antioksidantna svojstva lekovitog bilja u hrani. Doktorska disertacija.
- Mišić, D. (2000). Malina, Poljoprivredna biblioteka, Beograd.

- Mitić, M. (2011). Kinetika degradacije fenolnih jedinjenja hidroksil radikalima. Doktorska disertacija. Univerzitet u Nišu, Niš.
- Mitić, M. N., Obradović, M. V., Kostić, D. A., Micić, R. J., & Pecev, E. T. (2012). Polyphenol content and antioxidant activity of sour cherries from Serbia. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly/CICEQ*, 18(1), 53–62.
- Mitić, M. N., Obradović, M. V., Kostić, D. A., Nasković, D. Č., & Micić, R. J. (2011). Phenolics content and antioxidant capacity of commercial red fruit juices. *Hemijska industrija*, 65(5), 611–619.
- Mitic, V., Jovanovic, V. S., Dimitrijevic, M., Cvetkovic, J., Simonovic, S., & Mandic, S. N. (2014). Chemometric analysis of antioxidant activity and anthocyanin content of selected wild and cultivated small fruit from Serbia. *Fruits*, 69(5), 413–422.
- Mittal, A. K., Kumar, S., & Banerjee, U. C. (2014). Quercetin and gallic acid mediated synthesis of bimetallic (silver and selenium) nanoparticles and their antitumor and antimicrobial potential. *Journal of colloid and interface science*, 431, 194–199.
- Mladěnka, P., Macáková, K., Filipický, T., Zatloukalová, L., Jahodář, L., Bovicelli, P., Proietti Silvestri, I., Hrdina, R., & Saso, L. (2011). In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *Journal of inorganic biochemistry*, 105(5), 693–701.
- Molina, A. R. de, Vargas, T., Molina, S., Sánchez, J., Martínez-Romero, J., González-Vallinas, M., Martín-Hernández, R., Sánchez-Martínez, R., Gómez Cedrón, M. de, Dávalos, A., Calani, L., Del Rio, D., González-Sarrías, A., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A., & Reglero, G. (2015). The ellagic acid derivative 4, 4'-di-O-methylellagic acid efficiently inhibits colon cancer cell growth through a mechanism involving WNT16. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 353(2), 433–444.
- Moura, C. F. G. de, Noguti, J., Jesus, G. P. P. de, Ribeiro, F. A., Garcia, F. A., Gollucke, A. P., Aguiar, O. J. & Ribeiro, D. A. (2013). Polyphenols as a chemopreventive agent in oral carcinogenesis: putative mechanisms of action using in-vitro and in-vivo test systems. *European Journal of Cancer Prevention*, 22(5), 467–472.
- Mratinić, E. (2000). Kupina. Poljoprivredna biblioteka, Beograd.
- Nair, S. S., Kavrekar, V., & Mishra, A. (2013). In vitro studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts. *European Journal of Experimental Biology*, 3(1), 128–132.
- Nikolić, M., Milivojević, J. (2010). Jagodaste voćke: tehnologija gajenja. Naučno voćarsko društvo Srbije, Čačak.

- Nile, S. H., & Park, S. W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30(2), 134–144.
- Nohynek, L. J., Alakomi, H. L., Kähkönen, M. P., Heinonen, M., Helander, I. M., Oksman-Caldentey, K. M., & Puupponen-Pimiä, R. H. (2006). Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and cancer*, 54(1), 18–32.
- Oboh, G., Ademiluyi, A. O., Akinyemi, A. J., Henle, T., Saliu, J. A., & Schwarzenbolz, U. (2012). Inhibitory effect of polyphenol-rich extracts of jute leaf (*Corchorus olitorius*) on key enzyme linked to type 2 diabetes (α -amylase and α -glucosidase) and hypertension (angiotensin I converting) in vitro. *Journal of Functional Foods*, 4(2), 450–458.
- Ördögh, L., Galgóczy, L., Krisch, J., Papp, T., & Vágvolgyi, C. (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of fruit juices and pomace extracts against acne-inducing bacteria. *Acta Biologica Szegediensis*, 54(1), 45–49.
- Oreopoulou, V., & Russ, W. (Eds.). (2007). *Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry*. New York, NY, USA:: Springer.
- Oszmiański, J., & Lachowicz, S. (2016). Effect of the Production of Dried Fruits and Juice from Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) on the Content and Antioxidative Activity of Bioactive Compounds. *Molecules*, 21(8), 1098.
- Oszmiański, J., & Wojdyło, A. (2005). *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 221(6), 809–813.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucoseamine, *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44, 307–315.
- Pan, J., Yin, D., Ma, L., Zhao, Y., Zhao, J., & Guo, L. (2014). Dimer and tetramer of gallic acid: facile synthesis, antioxidant and antiproliferative activities. *Letters in Drug Design & Discovery*, 11(1), 27–32.
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(5), 270–278.
- Pantelidis, G. E., Vasilakakis, M., Manganaris, G. A., & Diamantidis, G. R. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food chemistry*, 102(3), 777–783.

- Paredes-López, O., Cervantes-Ceja, M. L., Vigna-Pérez, M., & Hernández-Pérez, T. (2010). Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life - a review. *Plant foods for human nutrition*, 65(3), 299–308.
- Paudel, L., Wyzgoski, F. J., Giusti, M. M., Johnson, J. L., Rinaldi, P. L., Scheerens, J. C., & Reese, R. N. (2014). NMR-based metabolomic investigation of bioactivity of chemical constituents in black raspberry (*Rubus occidentalis* L.) fruit extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(8), 1989–1998.
- Peiffer, D. S., Zimmerman, N. P., Wang, L. S., Ransom, B. W., Carmella, S. G., Kuo, C. T., Siddiqui, J., Chen, J. H., Oshima, K., Huang, Y. W. Hecht, S. S., & Stoner, G. D. (2014). Chemoprevention of esophageal cancer with black raspberries, their component anthocyanins, and a major anthocyanin metabolite, protocatechuic acid. *Cancer Prevention Research*, 7(6), 574–584.
- Pérez, C., del Castillo, M. L. R., Gil, C., Blanch, G. P., & Flores, G. (2014). Anthocyanins constituents, antioxidant and anti-inflammatory activity of strawberries: comparison with other berry fruits. In *Strawberries, cultivation, antioxidant properties and health benefits*, (pp. 39–55). Nova Publisher.
- Pertuzatti, P. B., & Barcia, M. T. (2015). Biotransformation in temperate climate fruit: A focus on berries. *American Journal of Food Science and Technology*, 3(4A), 12–17.
- Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T., Rebello, L. P. G., Gómez-Alonso, S., Duarte, R. M. T., Duarte, M. C. T., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2016). Antimicrobial activity and differentiation of anthocyanin profiles of rabbiteye and highbush blueberries using HPLC-DAD-ESI-MS n and multivariate analysis. *Journal of Functional Foods*, 26, 506–516.
- Pervin, M., Hasnat, M. A., & Lim, B. O. (2013). Antibacterial and antioxidant activities of *Vaccinium corymbosum* L. leaf extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3(6), 444–453.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*, 4(2), 89–96.
- Pichler, A. (2011). Primena orošavanja svežih malina u cilju očuvanja svežine i mase malina za domaću potrošnju i izvoz. Doktorski rad, Osijek.
- Poiana, M. A., Moigradean, D., Raba, D., Alda, L. M., & Popa, M. (2010). The effect of long-term frozen storage on the nutraceutical compounds, antioxidant properties and color indices of different kinds of berries. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 8(1), 54–58.

- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Alakomi, H. L., & Oksman-Caldentey, K. M. (2005b). The action of berry phenolics against human intestinal pathogens. *Biofactors*, 23(4), 243–251.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Alakomi, H. L., & Oksman-Caldentey, K. M. (2005a). Bioactive berry compounds - novel tools against human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(1), 8–18.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Hartmann-Schmidlin, S., Kähkönen, M., Heinonen, M., Määttä-Riihinen, K., & Oksman-Caldentey, K. M. (2005). Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Journal of applied microbiology*, 98(4), 991–1000.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., & Oksman-Caldentey, K. M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of applied microbiology*, 90(4), 494–507.
- Radočaj, O., Vujasinović, V., Dimić, E., & Basić, Z. (2014). Blackberry (*Rubus fruticosus* L.) and raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oils extracted from dried press pomace after longterm frozen storage of berries can be used as functional food ingredients. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(8), 1015–1024.
- Radojković, M. M., Zeković, Z. P., Vidović, S. S., Kočar, D. D., & Mašković, P. Z. (2012). Free radical scavenging activity and total phenolic and flavonoid contents of mulberry (*Morus* spp. L., Moraceae) extracts. *Hemijska industrija*, 66(4), 547–552.
- Reque, P. M., Steffens, R. S., Silva, A. M. D., Jablonski, A., Flôres, S. H., Rios, A. D. O., & Jong, E. V. D. (2014). Characterization of blueberry fruits (*Vaccinium* spp.) and derived products. *Food Science and Technology (Campinas)*, 34(4), 773–779.
- Rietjens, I. M., Boersma, M. G., de Haan, L., Spenkelink, B., Awad, H. M., Cnubben, N. H., van Zanden, J. J., van der Woude, H., Alink, G. M., & Koeman, J. H. (2002). The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environmental toxicology and pharmacology*, 11(3), 321–333.
- Rodríguez-Rodríguez, J.C., Samudio-Echeverry, I.J.P., & Sequeda-Castañeda L.G. (2012): Evaluation of the Antibacterial Activity of Four Ethanolic Extracts of Bryophytes and Ten Fruit Juices of Commercial Interest in Colombia against Four Pathogenic Bacteria, *Acta Horticulture*, 964, ISHS, 251–258.
- Rohm, H., Brennan, C., Turner, C., Günther, E., Campbell, G., Hernando, I., & Kontogiorgos, V. (2015). Adding value to fruit processing waste: innovative ways to incorporate

- fibers from berry pomace in baked and extruded cereal-based foods—a SUSFOOD project. *Foods*, 4(4), 690–697.
- Rojo, L. E., Ribnicky, D., Logendra, S., Poulev, A., Rojas-Silva, P., Kuhn, P., Dorn, R., Grace, M. H., Lila, M. A., & Raskin, I. (2012). In vitro and in vivo anti-diabetic effects of anthocyanins from Maqui Berry (*Aristotelia chilensis*). *Food chemistry*, 131(2), 387–396.
- Salaheen, S., Nguyen, C., Hewes, D., & Biswas, D. (2014). Cheap extraction of antibacterial compounds of berry pomace and their mode of action against the pathogen *Campylobacter jejuni*. *Food Control*, 46, 174–181.
- Sariburun, E., Şahin, S., Demir, C., Türkben, C., & Uylaşer, V. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. *Journal of food science*, 75(4), C328–C335.
- Šarić, B. (2016). Iskorišćenje tropa borovnice i maline u formulaciji bezglutenskog keksa sa dodatkom vrednošću. Doktorska disertacija. Novi Sad.
- Sasikumar, J. M., Poulin, R. C., Meseret, C. E., & Selvakumar, P. (2015). In vitro analysis of antioxidant capacity of Indian yellow raspberry (*Rubus ellipticus* Smith.). *International Food Research Journal*, 22(4), 1338–1346.
- Saura-Calixto, F. (1998). Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4303–4306.
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H. S., & Heber, D. (2006). Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(25), 9329–9339.
- Sehitoglu, M. H., Farooqi, A. A., Qureshi, M. Z., Butt, G., & Aras, A. (2014). Anthocyanins: targeting of signaling networks in cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(5), 2379–81.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of functional foods*, 18, 820–897.
- Shahidi, F., & Naczk, M. (2004). Phenolic compounds in fruits and vegetables. In: Phenolics in food and nutraceuticals. Boca Raton, FL: CRC Press, 131–156.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of food microbiology*, 117(1), 112–119.

- Shen, X., Sun, X., Xie, Q., Liu, H., Zhao, Y., Pan, Y., Hwang, C., & Wu, V. C. (2014). Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. *Food control*, 35(1), 159–165.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, *Methods in enzymology* 299C, 152–178.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., & Vistica, D. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of National Cancer Institute*, 82, 1107–1112.
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., & Sochor, J. (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International journal of molecular sciences*, 16(10), 24673–24706.
- Smith, M. A. L., Marley, K. A., Seigler, D., Singletary, K. W., & Meline, B. (2000). Bioactive properties of wild blueberry fruits. *Journal of Food Science*, 65(2), 352–356.
- Souza, V. R. de, Pereira, P. A. P., Silva, T. L. T. da, Olivera Lima, L. C. de, Pio, R., & Queiroz, F. (2014). Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, 156, 362–368.
- Stajčić, S. (2012). Visokovredna funkcionalna jedinjenja iz sporednih proizvoda prerade paradajza. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet. Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 1–167.
- Stajčić, S. M., Tepić, A. N., Đilas, S. M., Šumić, Z. M., Čanadanović-Brunet, J. M., Četković, G. S., Vulić, J. J., & Tumbas, V. T. (2012). Chemical composition and antioxidant activity of berry fruits. *Acta Periodica Technologica*, (43), 93–105.
- Stančević, A. (2002). Praktično voćarstvo. Neven, Zemun.
- Su, Z. (2012). Anthocyanins and flavonoids of *Vaccinium* L. *Pharmaceutical Crops*, 3, 7–37.
- Šumić, Z. (2014). Optimizacija sušenja voća u vakuumu. Doktorska disertacija. Tehnološki sfakultet. Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., & Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, 54(4), 733–749.

- Teofilović, B. (2017). Biohemijska i hemijska karakterizacija ekstrakata bosiljka i uticaj farmaceutsko-tehnološke formulacije na glikemijski, lipidni i oksido-redukциони status kod oglednih životinja. Doktorska disertacija.
- Tepić, A. (2012). Bojene materije voća i povrća. Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Thakur, K., & Pitre, K. S. (2008). Polarographic (DCP & DPP) determination of ellagic acid in strawberries & pharmaceutical formulations. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 55(1), 143–146.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246.
- Tumbas Šaponjac, V., Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., & Djilas, S. (2016). Detection of Bioactive Compounds in Plants and Food Products. In *Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food* (pp. 81–109). Springer International Publishing.
- Tumbas Šaponjac, V., Gironés-Vilaplana, A., Djilas, S., Mena, P., Četković, G., Moreno, D. A., Čanadanović-Brunet, J., Vulić, J., Stajčić, S., & Vinčić, M. (2015a). Chemical composition and potential bioactivity of strawberry pomace. *RSC Advances*, 5(7), 5397–5405.
- Tumbas, V. (2010). Antiradikalska i antiproliferativna aktivnost ekstrakata odabranih biljaka iz familija *Ericaceae* i *Rosaceae*. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Tumbas, V., Čanadanović-Brunet, J., Gille, L., Đilas, S., & Četković, G. (2010). Superoxide anion radical scavenging activity of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). *Journal of Berry Research*, 1(1), 13–23.
- Tumbas-Šaponjac, V. T., Četković, G. S., Stajčić, S. M., Vulić, J. J., Čanadanović-Brunet, J. M., & Đilas, S. M. (2015). Optimization of the bioactive compounds content in raspberry during freeze-drying using response surface method. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 21(1-1), 53–61.
- Tundis, R., Loizzo, M. R., & Menichini, F. (2010). Natural products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 10(4), 315–331.
- Turmanidze, T., Gulua, L., Jgenti, M., & Wicker, L. (2016). Effect of Calcium Chloride Treatments on Quality Characteristics of Blackberry Fruit During Storage. *International Journal of Food and Allied Sciences*, 2(2), 36–41.

- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1–40.
- Valverde, M. E., Peredes-López, O. (2012). *Berries: Bioactive Constituents and Their Impact on Human Health*. Nova Biomedical Books. New York, (Carlo Tuberoso Editor).
- Van Hoed, V., De Clercq, N., Echim, C., Andjelkovic, M., Leber, E., Dewettinck, K., & Verhé, R. (2009). Berry seeds: a source of specialty oils with high content of bioactives and nutritional value. *Journal of Food Lipids*, 16(1), 33–49.
- Velhner, M., Suvajdžić, L., Petrović, J., & Šeperanda, M. (2012). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* in wild animals. *Arhiv Veterinarske Medicine*, 5 (2), 35–44.
- Veličković, M. (2000). *Jagodasto voće*. Biblioteka Poljoprivredni savetnik, Novi Beograd.
- Viskelis, P., Rubinskienė, M., Jasutienė, I., Šarkinas, A., Daubaras, R., & Česonienė, L. (2009). Anthocyanins, antioxidative, and antimicrobial properties of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) and their press cakes. *Journal of food science*, 74(2), C157–C161.
- Vračar, Lj. (2001). *Priručnik za kontrolu kvaliteta svežeg i prerađenog voća, povrća i pečurki i osvežavajućih bezalkoholnih pića*. Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Vulić, J. (2012). *Funkcionalne i antioksidativne osobine tropa cvekle (*Beta vulgaris*)*, Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Vulić, J. J., Čebović, T. N., Čanadanović, V. M., Četković, G. S., Djilas, S. M., Čanadanović-Brunet, J. M., Velićanski, A. S., Cvetković, D. D., & Tumbas, V. T. (2013). Antiradical, antimicrobial and cytotoxic activities of commercial beetroot pomace. *Food & function*, 4(5), 713–721.
- Vulić, J. J., Velićanski, A. S., Četojević-Simin, D. D., Tumbas-Šaponjac, V. T., Đilas, S. M., Cvetković, D. D., & Markov, S. L. (2014). Antioxidant, antiproliferative and antimicrobial activity of freeze-dried raspberry. *Acta Periodica Technologica*, 45, 99–116.
- Vulić, J., Tumbas, V., Savatović, S., Đilas, S., Četković, G., & Čanadanović-Brunet, J. (2011). Polyphenolic content and antioxidant activity of the four berry fruits pomace extracts. *Acta periodica tehnologica*, 42, 271–279.
- Wan, C., Yuan, T., Cirello, A. L., & Seeram, N. P. (2012). Antioxidant and α -glucosidase inhibitory phenolics isolated from highbush blueberry flowers. *Food chemistry*, 135(3), 1929–1937.

- Wang, L. J., Su, S., Wu, J., Du, H., Li, S. S., Huo, J. W., Zhang, Y., & Wang, L. S. (2014). Variation of anthocyanins and flavonols in *Vaccinium uliginosum* berry in Lesser Khingan Mountains and its antioxidant activity. *Food chemistry*, 160, 357–364.
- Wang, N., Wang, Z. Y., Mo, S. L., Loo, T. Y., Wang, D. M., Luo, H. B., Yang, D. P., Chen, Z. L., Shen, J. G., & Chen, J. P. (2012a). Ellagic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenesis effects via VEGFR-2 signaling pathway in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 134(3), 943–955.
- Wang, S. Y., Camp, M. J., & Ehlenfeldt, M. K. (2012). Antioxidant capacity and α -glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (*Vaccinium* spp.) cultivars. *Food Chemistry*, 132(4), 1759–1768.
- Warren, C. A., Paulhill, K. J., Davidson, L. A., Lupton, J. R., Taddeo, S. S., Hong, M. Y., Chapkin, R., & Turner, N. D. (2009). Quercetin may suppress rat aberrant crypt foci formation by suppressing inflammatory mediators that influence proliferation and apoptosis. *The Journal of nutrition*, 139(1), 101–105.
- Weng, C. J., & Yen, G. C. (2012). Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer treatment reviews*, 38(1), 76–87.
- White, B. L., Howard, L. R., & Prior, R. L. (2009). Proximate and polyphenolic characterization of cranberry pomace. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(7), 4030–4036.
- Wu, R. (2008). Effects of refrigeration storage and processing technologies on the bioactive compounds and antioxidant capacities of blackberries ('Marion' and 'Evergreen'). Doctoral dissertation.
- www.ars.usda.gov
- Xiao, J. B., & Högger, P. (2015). Dietary polyphenols and type 2 diabetes: current insights and future perspectives. *Current medicinal chemistry*, 22(1), 23–38.
- Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 59(3), 113–122.
- Yuan, B., Okusumi, S., Yoshino, Y., Moriyama, C., Tanaka, S., Hirano, T., Takagi, N., & Toyoda, H. (2015). Delphinidin induces cytotoxicity and potentiates cytotoxic effect in combination with arsenite in an acute promyelocytic leukemia NB4 cell line. *Oncology reports*, 34(1), 431–438.

- Zamaria, N. (2004). Alteration of polyunsaturated fatty acid status and metabolism in health and disease. *Reproduction Nutrition Development*, 44(3), 273–282.
- Zhang, L., Li, J., Hogan, S., Chung, H., Welbaum, G. E., & Zhou, K. (2010). Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition. *Food Chemistry*, 119(2), 592–599.
- Zhao, C., Giusti, M. M., Malik, M., Moyer, M. P., & Magnuson, B. A. (2004). Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6122–6128.
- Zhao, Y. (2007). *Berry fruit: value-added products for health promotion*. Taylor&Francis group, New York.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, *Food Chemistry* 64, 555–559.
- Zoratti, L., Karppinen, K., Luengo Escobar, A., Häggman, H., & Jaakola, L. (2014). Light-controlled flavonoid biosynthesis in fruits. *Frontiers in plant science*, 5, 534.