



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREHRAMBENO INŽENJERSTVO

**Hemijski sastav i biološki potencijal ploda, soka
i tropa kultivisane i divlje kupine (*Rubus
fruticosus L.*)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:
dr Jelena Vulić, docent

Kandidat:
Miodrag Jazić, dipl.ing.

Novi Sad, 2019. godine

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

Ključna dokumentacijska informacija

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Miodrag Jazić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Jelena Vulić, docent
Naslov rada: NR	Hemijski sastav i biološki potencijal ploda, soka i tropa kultivisane i divlje kupine (<i>Rubus fruticosus L.</i>)
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2019.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Republika Srbija, 21000 Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1

Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja / stranica / slika / grafikona / referenci / priloga) 6 poglavlja/ 182 stranica/ 97 slika/ 29 tabela/ 394 reference
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Hemija hrane
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Plod, trop i sok kupine; hemijski sastav; ekstrakti kupine; fenolna jedinjenja; HPLC analiza; antioksidativna aktivnost; antihiperglikemijska aktivnost; antiproliferativna efekat; antimikrobna aktivnost.
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, 21 000 Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	U okviru ove disertacije ispitan je hemijski, mineralni i polifenolni sastav, kao i biološki potencijal četiri sorte kupina sa dva različita lokaliteta sjeverozapadnog dijela Bosne i Hercegovine, sa lokaliteta Verići (divlja i kultivisana sorta Čačanska bestrna) i sa lokaliteta Javorani (divlja sorta i kultivisana sorta Chester Thornles). Određen je sadržaj suve materije, pepela, sirove celuloze, ukupnih šećera, ukupna kiselost i sadržaj askorbinske kiseline. Sadržaj mineralnih materija detektovan je metodom optičke emisije spektrometrije (ICP-OES). Za izdvajanje ekstrakata je korištena klasična ekstrakciona tehnika prema <i>Soxhlet</i> -u uz upotrebu 80 % etanola (v/v). Spektrofotometrijskim metodama određen je sadržaj ukupnih polifenola, flavonida, flavonola, ukupnih i monomernih antocijana. Kvalitativnom i kvantitativnom HPLC metodom je utvrđen sadržaj pojedinačnih polifenolih jedinjenja. Biološki potencijal uzoraka je utvrđen u sistemima <i>in vitro</i> , gdje je određena: antioksidativna aktivnost, antihiperglikemijska aktivnost, antiproliferativni efekat i antimikrobna aktivnost. Antioksidativna aktivnost uzoraka je ispitana sa četiri metode: DPPH test, ABTS test, sposobnost neutralizacije hidroksil radikala i metodom inhibicije <i>Briggs Rauscher</i> -ovih oscilatornih reakcija. Antihiperglikemijska aktivnost ispitivanih uzoraka kupine je dokazan na osnovu sposobnosti inhibicije enzima α -glukozidaze. Antiproliferativni efekat ispitivanih uzoraka je određen prema inhibiciji rasta četiri humane ćelijske linije: HeLa (epitelnog karcinoma cerviksa), HT-29 (adenokarcinoma debelog crijeva), MRC-5 (zdravim ćelijama fibroblasti pluća) i prema ćelijskoj liniji MCF7 (adenokarcinoma dojke). Antimikrobna aktivnost je utvrđena prema gram pozitivnom soju (G^+) bakterija <i>S. Aureus</i> i gram negativnom (G^-) soju <i>E. coli</i> , rastu micelija <i>Aspergillus niger</i> i <i>Candida albicans</i> . Regresionom analizom prema Pirson-u su određeni odnosi između sadržaja polifenolnih jedinjenja i biološkog potencijala, sa statističkim značajem ($p \leq 0,01$).

**Datum prihvatanja teme od strane
Senata:
DP**

06. septembar 2018. godine

**Datum odbrane:
DO**

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

predsednik: dr Vesna Tumbas Šaponjac, vanredni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad

član: dr Jelena Vulić, docent, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad

član: dr Zoran Kukrić, redovni profesor, Univerzitet u Banjoj Luci, Prirodno-matematički fakultet Banja Luka

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

Key word 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	Miodrag Jazić
Mentor: MN	Jelena Vulić, PhD, Assistant professor
Title: TI	Chemical composition and biological potential of cultivated and wild blackberries (<i>Rubus fruticosus L.</i>)
Language of text: LT	Serbian (latin)
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2019
Publisher: PU	Author reprint

Publication place: Republic of Serbia, 21000 Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1
PP

Physical description: 6 Chapters, 182 Pages, 97 Figures, 29 Tables, 394 References
PD

Scientific field Technological engineering
SF

Scientific discipline Food chemistry
SD

Subject, Key words Blackberry fruit, pomace and blackberry juice; chemical
SKW composition; blackberry extracts; phenolic compounds; HPLC analysis; antioxidant activity; antihyperglycemic activity; antiproliferative activity; antimicrobial activity.

UC

Holding data: Library (Faculty of Technology), 21 000 Novi Sad, Bulevar
HD Cara Lazara 1

Note: None
N

Abstract: The chemical, mineral, polyphenolics composition and
AB biological potentials of four blackberries varieties from two different locations in the northwestern part of Bosnia and Herzegovina (Verići - wild and cultivated variety Čačanska bestrna and Javorani - wild and cultivated variety Chester Thornless) were determined. The contents of dry matter, ash, crude cellulose, total sugars, total acidity and ascorbic acid were obtained. The contents of mineral matter were detected by optical emission spectrometry (ICP-OES) method. A classic Soxhlet extraction technique with 80% ethanol (v/v) was applied to obtain extracts. The spectrophotometric methods were used to determine the content of total polyphenolics, flavonoids, flavonols, and total and monomer anthocyanins. The content of individual polyphenolic compounds was determined by HPLC method. The biological potentials (antioxidant activity, antihyperglycemic activity, antiproliferative effect and antimicrobial activity) of the samples were determined *in vitro* systems. The antioxidant activity was tested with four methods: DPPH test, ABTS test, ability to neutralize OH radicals and the method of inhibiting Briggs Rauscher oscillatory reactions. The antihyperglycaemic activity of the tested blackberry samples was based on the ability to inhibit α -glucosidase enzyme. The antiproliferative effect of the tested samples was determined by inhibiting the growth of four human cell lines: epithelial carcinoma of the cervix (HeLa), colon adenocarcinoma (HT-29), healthy lung fibroblast cells (MRC-5) and the cell line of breast adenocarcinoma (MCF7). The extracts showed the highest inhibitory effect on the cell line of breast adenocarcinoma (MCF-7). The antimicrobial activity was determined according to gram-positive bacteria (G^+) of *Staphylococcus aureus*, Gram-negative bacteria (G^-) *Escherichia coli*, growth of mycelium *Aspergillus niger* and fungi *Candida albicans*. The Pearson correlations were statistically determined the relationship between the content of polyphenolic compounds and biological potential, with statistical significance ($p \leq 0.01$).

Accepted on Senate on:
AS

6th September 2018.

Defended:
DE

Thesis Defend Board:
DB

president: Vesna Tumbas Šaponjac, PhD, Associate professor,
University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad

member: Jelena Vulić, PhD, Assistant professor, University of
Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad

member: Zoran Kukrić, PhD, Full professor, University of
Banja Luka, Faculty of Natural Sciences and Mathematics
Banja Luka

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DIO	3
2.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE PORODICE <i>ROSACEAE</i>	3
2.2. KUPINA.....	4
2.2.1. MORFOLOGIJA KUPINE	4
2.2.2. TRADICIONALNA UPOTREBA KUPINE	5
2.2.3. SORTE KUPINA	6
2.2.3.1. Divlja kupina.....	6
2.2.3.2. Pitoma kupina.....	7
2.3. HEMIJSKI SASTAV KUPINE	9
2.3.1. SADRŽAJ UGLJENIH HIDRATA U KUPINI.....	10
2.3.2. SADRŽAJ PROTEINA U KUPINI	13
2.3.3. SADRŽAJ MASNIH KISELINA U KUPINI.....	13
2.3.4. SADRŽAJ ORGANSKIH KISELINA U KUPINI	13
2.3.5. SADRŽAJ VITAMINA U KUPINI.....	14
2.3.6. SADRŽAJ TOKOFEROLA I TOKOTRIENOLA U KUPINI	15
2.3.7. SADRŽAJ KAROTENOIDA U KUPINI.....	16
2.3.8. SADRŽAJ MINERALNIH MATERIJA U KUPINI.....	17
2.4. KUPINA KAO IZVOR POLIFENOLNIH JEDINJENJA	18
2.4.1. FLAVONOIDI	20
2.4.2. ANTOCIJANI	21
2.4.3. FLAVONOLI	24
2.4.4. FLAVAN-3-OLI.....	25
2.4.5. FENOLNE KISELINE	26
2.4.6. TANINI	28
2.4.6.1. Elagitanini i derivati elaginske kiseline	29
2.5. BIOLOŠKA AKTIVNOST POLIFENOLNIH JEDINJENJA.....	30
2.5.1. SLOBODNI RADIKALI I OKSIDATIVNI STRES	30
2.5.1.1. Slobodni radikali	30
2.5.1.2. Oksidativni stres.....	31
2.5.2. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST POLIFENOLNIH JEDINJENJA	33
2.5.2.1. Antioksidativna aktivnost kupine.....	34
2.5.3. ANTIPROLIFERATIVNA AKTIVNOST POLIFENOLNIH JEDINJENJA	36
2.5.3.1. Pojam kancerogeneze.....	36
2.5.3.2. Antiproliferativna aktivnost kupine	37
2.5.4. ANTIHIPERGLIKEMIJSKA AKTIVNOST POLIFENOLNIH JEDINJENJA.....	39
2.5.4.1. Antihiperглиkemijska aktivnost kupine	40
2.5.5. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST POLIFENOLNIH JEDINJENJA.....	42
2.5.5.1. Antimikrobna aktivnost kupine.....	43

2.6. TEHNOLOŠKE KARAKTERISTIKE I UPOTREBA KUPINE	45
2.6.1. KVALITET I PROIZVODI OD KUPINE	45
2.6.2. SPOREDNI PROIZVODI PRERADE KUPINE	46
2.6.2.1. ISKORIŠTENJE I UPOTREBA TROPA KUPINE	46
3. EKSPERIMENTALNI DIO	48
3.1. HEMIKALIJE I REAGENSI	48
3.2. BILJNI MATERIJAL	48
3.3. DOBIJANJE EKSTRAKATA PLODA I TROPA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE	49
3.4. ODREĐIVANJE OSNOVNOG HEMIJSKOG SASTAVA PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE	49
3.5. ODREĐIVANJE SADRŽAJA MINERALNIH MATERIJU U PLODU, TROPU I SOKU KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE	50
3.6. ODREĐIVANJE HEMIJSKIH ELEMENATA U PLODU, TROPU I SOKU KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE	50
3.7. ODREĐIVANJE SADRŽAJA POLIFENOLNIH JEDINJENJA U PLODU, TROPU I SOKU KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE	51
3.7.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola	51
3.7.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	51
3.7.3. Određivanje sadržaja ukupnih flavonola	52
3.7.4. Određivanje sadržaja ukupnih i monomernih antocijana	52
3.7.5. Određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja HPLC metodom	53
3.7.5.1. Identifikacija i kvantifikacija polifenolnih kiselina i flavonoida HPLC metodom ..	54
3.7.5.2. Identifikacija i kvantifikacija antocijana HPLC metodom	54
3.7.6. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE	55
3.7.6.1. DPPH test	55
3.7.6.2. ABTS test	56
3.7.6.3. Neutralizacija uticaja hidroksil radikala ($\cdot\text{OH}$)	57
3.7.6.4. Metoda <i>Brigs-Rauscher</i> -ovih oscilatornih reakcija	58
3.8. BIOLOŠKI POTENCIJAL PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE	60
3.8.1. Određivanje antiproliferativne aktivnosti ploda, tropa i soka kultivisane i divlje kupine	60
3.8.1.1. Kulture ćelijskih linija	60
3.8.1.2. Priprema uzoraka	60
3.8.1.3. Sulphorhodamine B (SRB) test	61
3.8.2. Antihiperlipidemijska aktivnost ploda, tropa i soka kultivisane i divlje kupine	62

3.9. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE.....	63
3.10. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	64
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	65
4.1. HEMIJSKI SASTAV PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE	65
4.1.1. SADRŽAJ MINERALNIH MATERIJA PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE.....	69
4.2. PRINOS EKSTRAKCIJE PLODA I TROPA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE....	72
4.3. POLIFENOLNI SASTAV PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE	74
4.3.1. POLIFENOLNI SASTAV EKSTRAKATA PLODA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE	74
4.3.2. POLIFENOLNI SASTAV EKSTRAKATA TROPA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE	76
4.3.3. POLIFENOLNI SASTAV SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE.....	77
4.3.4. HPLC ANALIZA POLIFENOLNIH JEDINJENJA PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE.....	78
4.4. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE.....	108
4.4.1. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA PLODA, TROPA I SOKA KUPINA NA DPPH RADIKALE	108
4.4.2. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA PLODA, TROPA I SOKA KUPINA NA ABTS RADIKALE	112
4.4.3. ODREĐIVANJE SPOSOBNOSTI NEUTRALIZACIJE EKSTRAKATA PLODA, TROPA I MATIČNOG SOKA KUPINA NA HIDROKSIL RADIKALE	115
4.4.4. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST UZORAKA ODREĐENA NA OSNOVU SPOSOBNOSTI INHIBICIJE BRIGGS <i>RAUSCHER</i> -OVIH OSCILATORNIH REAKCIJA.....	117
4.4.5. KORELACIONA ANALIZA SADRŽAJA POLIFENOLNIH JEDINJENJA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE	119
4.5. ANTIHIPERGLIKEMJSKA AKTIVNOST PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE	122
4.5.1. ANTIHIPERGLIKEMJSKA AKTIVNOST EKSTRAKATA PLODA I TROPA KUPINE	122
4.5.2. ANTIHIPERGLIKEMJSKA AKTIVNOST SOKA KUPINE.....	124
4.5.3. KORELACIONA ANALIZA SADRŽAJA POLIFENOLNIH JEDINJENJA I ANTIHIPERGLIKEMIJSKE AKTIVNOSTI PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE.....	125

4.6. ANTIPROLIFERATIVNI EFEKAT PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE.....	127
4.6.1. ANTIPROLIFERATIVNI EFEKAT EKSTRAKATA PLODA I TROPA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE.....	128
4.6.2. ANTIPROLIFERATIVNI EFEKAT SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE.....	130
4.6.3. KORELACIONA ANALIZA SADRŽAJA POLIFENOLNIH JEDINJENJA I ANTIPROLIFERATIVNOG EFEKTA PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE	131
4.7. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE.....	133
4.7.1. ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE.....	133
4.7.2. ANTIFUGALNA AKTIVNOST PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE	137
4.7.2.1. Aktivnost prema soju gljivice <i>Aspergillus niger</i>	137
4.7.2.2. Aktivnost prema soju kvasca <i>Candida albicans</i>	138
4.7.3. KORELACIONA ANALIZA SADRŽAJA POLIFENOLNIH JEDINJENJA I ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE	141
5. ZAKLJUČAK.....	143
6. LITERATURA	148

1. UVOD

Kupina je ekonomski značajno voće, kako zbog visoke cijene plodova i izuzetno povoljnog hemijskog sastava, tako i zbog mogućnosti kultivisanja bez upotrebe pesticida. Na našim prostorima (Srbija i Bosna i Hercegovina), na skoro svim lokalitetima prisutne su samonikle vrste (divlja kupina), a intezivno se uzgajaju i kultivisane sorte (pitoma kupina). Kupina je prirodno nutritivno vrijedna hrana – zbog bogatog hemijskog sastava i izvrsnih organoleptičkih svojstava. Plod kultivisane kupine kao sirovina pokazuje izuzetan kvalitet u proizvodnji, dok plodovi samonikle kupine imaju visok nutritivni kvalitet i daju intenzivnije obojen sok. Uvidom u rezultate dosadašnjih istraživanja vidljive su značajne razlike u hemijskom i polifenolnom sastavu između sorti divlje kupine i pitomih sorti.

Manje od 10 % ukupne količine jagodastog voća se prodaje i konzumira svježe, zbog lake kvarljivosti (nutritivnog i mikrobiološkog propadanja). Ostale količine se prerađuju u sokove, džemove, žele, sirupe, voćna vina, ili se dodaju u konditorske proizvode, jogurte i razne druge namirnice (Kalušević i sar., 2016), čime se smanjuju kvalitet i zdravstvena korist. Tokom prerađivanja kupine u industriji zaostaju značajne količine tropa, u prosjeku od 20 do 30 %, posebno tokom proizvodnje matičnog soka i vina (Struck i sar., 2016; Ignat i sar., 2011).

Trop koji zaostaje kao otpad, sastoji se uglavnom od sjemenki, pokožice i vlakana, i kao takav je potencijalni izvor biološki aktivnih jedinjenja. U industriji ostaje najčešće neiskorišten i predstavlja kako ekonomski tako i ekološki problem. Prehrambena industrija, kao i mali prerađivači pokazuju u zadnje vrijeme sve veće interesovanje za iskorištenjem zaostalog biljnog materijala (tropa). Sagledavajući ekonomsku opravdanost iskorišćenja nusproizvoda industrije, trop kupine bi mogao biti upotrebljen za obogaćivanje prehrambenih proizvoda (vino, sokovi, voćni jogurt i konditorski proizvodi) i koristiti kao funkcionalni aditiv u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

Naučna javnost se sve više okreće ispitivanju biološki aktivnih molekula u hrani, njihovom biološkom potencijalu i blagodatima koje imaju na zdravlje čovjeka. Polifenolne komponente u hrani su samo jedna od mnogobrojnih biološki aktivnih molekula koji se u posljednje vrijeme aktivno istražuju, a biološka aktivnost ovih jedinjenja je potvrđena u brojnim eksperimentima. Biljni polifenoli kao prirodni antioksidanti mogu doprinijeti zaštiti od djelovanja slobodnih radikala, i tako spriječiti nastajanje mnogih degenerativnih bolesti. Polifenoli imaju širok spektar bioloških efekata, uključujući antioksidativna, antihiperlipidemijska, antikancerogena i antimikrobna svojstva. U prirodi se nalaze slobodni ili u obliku glukozida.

Pregledom literature uočeno je da su divlje sorte kupina za razliku od pitomih bile predmet manjeg broja istraživanja. U literaturi se nalazi i manji broj objavljenih podataka

dobijenih međusobnim poređenjem hemijskog i polifenolnog sastava, kao i poređenjem sadržaja sekundarnih metabolita i biološkog potencijala divljih i pitomih sorti kupine. Takođe, neznatan broj istraživanja se bavi problematikom dobijanja i vrjednovanja ekstrakata ploda i tropa, te uporednom analizom sa plodom i matičnim sokom kao glavnim proizvodom u industriji prerade voća.

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivanje je vršeno na svježim uzorcima ploda, tropa i soka kupine (dvije pitome i dvije divlje), kao i ekstraktima ploda i tropa kupina, sa dva različita lokaliteta sjeverozapadnog dijela Bosne i Hercegovine. Urađena je ekstrakcija biološki aktivnih jedinjenja iz tropa kultivisanih i divljih sorti kupine. Ispitana je razlika između hemijskog sastava, biološkog potencijala i antimikrobne aktivnosti kultivisanih i samoniklih sorti kupina. Takođe, određena je linearna povezanost između sadržaja polifenolnih komponenti, biološkog potencijala i antimikrobne aktivnosti.

Rad na izvođenju ove doktorske disertacije sastojao se iz više faza:

- Dobijanje tropa kupine (dvije pitome i dvije divlje sa dva različita lokaliteta sjeverozapadnog dijela Bosne i Hercegovine) cijedenjem voća u laboratorijskim uslovima;
- Ekstrakcija bioaktivnih jedinjenja iz ploda i tropa kupina, metodom po *Soxhlet*-u uz upotrebu prihvatljivog rastvarača za prehrambenu industriju;
- Određivanje osnovnog hemijskog sastava i sadržaja polifenolnih jedinjenja (sadržaja ukupnih fenola, flavonoida i antocijana, kao i kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja ovih bioaktivnih jedinjenja) ploda, tropa i soka kultivisanih i divljih sorti kupine;
- Ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata na stabilne 1,2-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) i katjon 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS⁺) radikale, sposobnost neutralizacije hidroksil (OH) radikala i metoda inhibicije *Briggs Rauscher*-ovih oscilatornih reakcija;
- Ispitivanje antihiperглиkemijske aktivnosti određivanjem potencijala inhibicije aktivnosti enzima α -glukozidaze;
- *In vitro* ispitivanje antiproliferativne aktivnosti na humane tumorske ćelijske linije;
- Ispitivanje antimikrobnog djelovanja metodom difuzije u agaru sa bunarčićima i metodom razređenja u agaru;
- Korelacione analize sadržaja polifenolnih komponenti, biološkog potencijala i antimikrobne aktivnosti.

2. OPŠTI DIO

2.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE PORODICE *ROSACEAE*

Familija ruža (lat. *Rosaceae*) je jedna od najraznovrsnijih i najrasprostranjenijih biljnih familija, koja broji 2.950 poznatih vrsta u 91 rodu (Christenhusz i Byng, 2016). Iako je taksonomija ove familije donekle sporna, obično se dijeli na četiri podfamilije: *Prunoideae* (lat. *Prunus*); *Maloideae* (lat. *Malus*, *Pyrus* i *Cotoneaster*); *Rosoideae*, (lat. *Rosa*, *Fragaria*, *Potentilla* i *Rubus*) i *Spiroideae* (lat. *Spirea*) (Shulaev i sar., 2016). Većina ovih vrsta je listopadna, dok su neke i zimzelene (Watson i Dallwitz, 1992). Neke osnovne karakteristike ove familije su prisustvo zalistaka, često je prisutan veliki broj prašnika (15 ili više), naizmjenični i jednostavni listovi, hipantijum se kreće od ravnog do čašastog ili cilindričnog, oslobođen ili ukrašen carpelima (Hummer i Janick, 2009; Nikolić, 2013). Cvjetovi biljaka su aktinomorfni (radijalno simetrični) i skoro uvijek hermafroditski, a generalno se opisuju kao "upadljivi" (Folta, 2008).

Rosaceae obuhvataju mnoge dobro poznate vrste, od zeljastih biljaka do žbunja i drveća, a tu spada: jestivo voće, ukrasno i ljekovito bilje. Ova familija je od velikog ekonomskog značaja, čija godišnja proizvodnja u svijetu (na osnovu statistike FAO-a) iznosi preko 100 miliona tona (Hummer i Janick, 2009). Podfamiliji *Rosoideae* pripada rod *Rubus*, zastupljen sa velikim brojem vrsta, koje su izuzetno polimorfne i rasprostranjene na čitavoj sjevernoj hemisferi (Mladenović, 2014). *Rubus* potiče od latinske riječi *Ruber* (crven), jer više vrsta ovog roda ima crven plod.

2.2. KUPINA

Kupina (*Rubus fruticosus L.*) je vrsta voća koja pripada podrodu *Eubatus* u rodu *Rubus* (Tabela 1). Veoma je kompleksna u smislu genetičke pozadine, karakteristika rasta i broja vrsta (Dai i sar., 2009; Clark i sar., 2007; Ryu i sar., 2014). Rasprostranjene su širom svijeta, uspjevaju od tropskih do umjerenih i hladnih predjela, pa se smatraju i kosmopolitskim biljkama. Prema pomološkoj podjeli voća, što najbolje odgovara praktičnim potrebama, kupina je slična malini (*Rubus idaeus*), i pripada grupi jagodastog voća (Šoškić, 2008).

Tabela 1. Mjesto kupine u sistematici biljaka (Mišić, 1989)

Odjeljak	Angiospermae (skrivenosjemenice)
Klasa	<i>Dicotyledones (dikotile)</i>
Podklasa	<i>Rosidae (ruže)</i>
Nadred	<i>Rosanae (ruže)</i>
Red	<i>Rosales (ruže)</i>
Familija	<i>Rosaceae (ruže)</i>
Podfamilija	<i>Rosaideae (jagodasto voće)</i>
Rod	<i>Rubus (Tourn) L. (malina i kupina)</i>
Podrod	<i>Eubatus Focke (kupine)</i>

2.2.1. MORFOLOGIJA KUPINE

Kupine su višegodišnje biljke koje obično nose dvogodišnje stabljike iz višegodišnjeg korijenovog sistema (Krewer i sar., 2004; Brouillet, 2015). Mogu da narastu 50 - 300 cm, a izuzetno su varijabilne u obliku lista i biljnog oblika. Stabljika je drvenasti grm, obično bodljikava ili dlakava, uspravna ili pognuta, puže ili se penje (Slika 1). Stabljike se mogu ukorijeniti na vrhovima kako bi se formirale nove biljke (Roy i sar., 1998; Bray i sar., 2003). Listovi su prstasto složeni sa pet listića, raspoređeni su naizmjenično i obično imaju zaliske, koji rastu bočno iz osnove lisne drške, izduženi su i glatki na licu, a na naličju bjeličasto-dlakavi. Cvjetovi su prečnika 2–3 cm, sa pet bijelih ili blijedo ružičastih latica. Obično su hermafroditni, petočlani sa velikom cvjetnom ložom (Mišić, 1989; Krewer i sar., 2004; Milenković-Andelković, 2016). Kupina cvjeta od maja do avgusta, nakon toga se iz svakog pojedinačnog cvijeta razvija sitni jagodasti plod crvene boje, koji kasnije potamni do tamnoplave ili skoro crne boje.

Plod je nabrana bobica dužine od 10 do 20 mm, sastoji se od otprilike dvadeset do pedeset drupeleta. Masa ploda pitomih sorti kupine u prosjeku se kreće od 4 do 8 g, pojedinačno mogu biti teške 3 do 12 g, a ponekad i više (Nikolić i Milivojević, 2010). Sjemenke kupine su duboko i nepravilno koštane, ovalne, svijetlo do tamno smeđe boje, dužine od 2,6 do 3,7 mm i širine od 1,6 do 2,5 mm (Krewer i sar., 2004; Šoškić, 1998).



Slika 1. Plod kupine (<http://www.lizzieharper.co.uk>)

2.2.2. TRADICIONALNA UPOTREBA KUPINE

Tradicionalno kupina se koristila u Kini za rješavanje problema kod infekcija urinarnog trakta i za liječenje bolesti bubrega, a stari Grci su kupine upotrebljavali za liječenje bolesti kostiju (Amidžić Klarić i sar., 2011). U narodu od davnina postoji vjerovanje da kupinovo vino utiče na poboljšanje krvne slike, dok napitak od korijena kupine liječi karcinom materice. Na našim prostorima od kupine se tradicionalno pripremaju čajevi, sokovi, džemovi i vina.

Listovi kupine se koriste u narodnoj medicini kao lijek protiv dijareja, hemoroida, upale crijeva, hroničnog nadražaja slijepog crijeva i anemije. Takođe, koristi se i za vanjsku upotrebu na koži, za zarastanje rana, kao antiseptik i dezinfekciono sredstvo (Verma i sar., 2014; Zia-Ul-Haq, 2014).

2.2.3. SORTE KUPINA

Kupine se uzgajaju u Evropi više od 2000 godina, u početku radi obezbjeđenja zaštitne barijere oko područja ljudskog stanovanja, zatim u medicinske svrhe i za ishranu (Takeda, 2017). Rod *Rubus* je vrlo varijabilan i obuhvata oko 400 okarakterisanih vrsta i mnogobrojne prelazne forme. Sorte koje se danas gaje međusobno se razlikuju po vremenu dozrijevanja, čvrstini i krupnoći ploda, veličini sjemenki i ukusu (Mišić, 1989). Poluuspravne sorte kao što je "*Loch Ness*," iz *James Hutton* Instituta, se najviše uzgajaju u Evropi, i predstavljaju glavni kultivar za umjerene dijelove Evrope. Takođe, prostor bivše Jugoslavije ima dugu istoriju u proizvodnji kupina za prerađivačko tržište, i pretežno se oslanjala na sorte „Čačanska bestrna“ i „Thornfree“. Na osnovu dosadašnjih istraživanja, kultivisana kupina kao sirovina je pokazala odličan kvalitet u proizvodnji, dok je divlja kupina pokazala veći nutritivni kvalitet i značajno snažniji biološki potencijal (Yilmaz i sar., 2009; Dujmović-Purgar i sar., 2012; Takeda, 2017).

2.2.3.1. Divlja kupina

Divlja kupina raste pored potoka i puteva, u živicama, na neobrađenom i zapuštenom zemljištu, kao voćka ili ukrasna biljka uzgaja se u vrtovima, a za veću proizvodnju na plantažama. U odnosu na gajene sorte plodovi divlje kupine su sitniji i sa većim sadržajem suve materije (Mladenović, 2014; Milenković-Andelković, 2016). Srednja vrijednost mase ploda kod sorti divlje kupine iznosi oko 1,8 g, od čega voda predstavlja od 81,5 do 83,5 %, ukupna suva materija od 16,6 do 18,2 %, ukupni šećeri od 5,41 do 8,67 %, organske kiseline od 0,67 do 0,87 % i drugi sastojci (mineralne materije, pektin, celuloza, proteini, ulja, vitamini) (Šoškić, 1998).

Na našim prostorima najčešće nalazimo rodove:

- *R. caesius* L. - kupina-ostruga, raste na visinama do 1.000 m.n.v., na vlažnim, zapuštenim i neobrađenim mjestima, na ivici šuma, pored rijeka i potoka;
- *R. candicans* - *Weihe et Nees*, subelasta kupina, sinonimi *R. fruticosus* L., *R. montanus* Lieb., *R. thyrsoides* Wine. Raste po brdskim terenima, utrinama i šumama;
- *R. canescens* Dc - sivkasta kupina, sinonimi: *R. triphyllus* Bell., *R. tomentosus* Bork., *R. hypoleucos* Vest. Raste u svim listopadnim šumama Srbije, na planinama i brdima, na pašnjacima i po obodu šuma;
- *R. Discolor*, *Weihe et Nees* - kupina, sinonimi: *R. procerus* P.J. Mill., *R. armeniacus* Focke, *R. karstianus* Borb., *R. hedycarpus* Focke, *R. macrostemon* Focke. Veoma je česta vrsta u Evropi. Sreće se na toplim i suvim staništima, utrinama i oko puteva;

- *R. hirtus Waldst. and Kit.* - dlakava kupina, sinonimi: *R. grandulosus Reich.* Vrsta je prisutna na većim planinama i brdima Srbije;
- *R. ulmifolius Schott* - kupinjača, sinonimi: *R. dalmaticus Gus.*, *R. rusticans Mesc.*, *R. amoenus Por.*, *R. fruticosus L.* U Srbiji je česta po nižim brdskim oblastima, naročito u zapadnom dijelu (Mladenović, 2014).



Slika 2. Divlje kupine roda *Rubus*

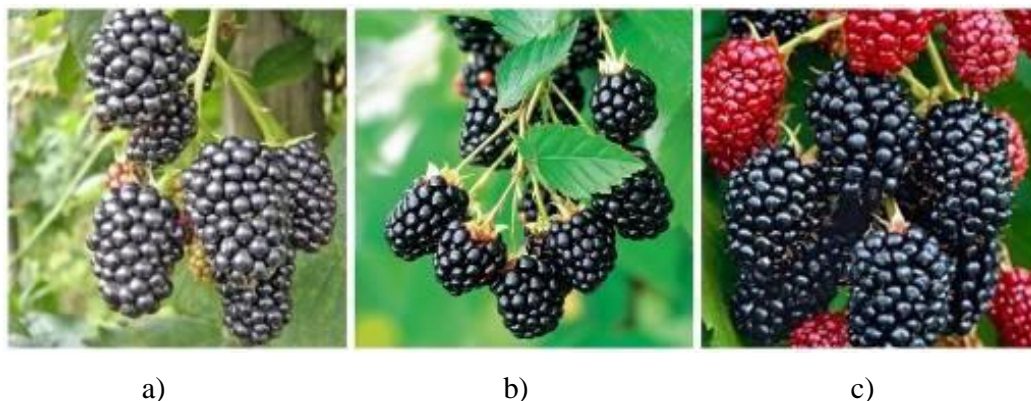
2.2.3.2. Pitoma kupina

Prilikom dobijanja plemenitih sorti kupina korištene su uglavnom vrste: evropska (obična) crna kupina, peršunasta kupina, visoka kupina, američka visokožbunasta kupina, američka uspravna kupina i puzeća kupina (Nikolić i Milivojević, 2010). Sorte pitomih kupina koje se kod nas najčešće uzgajaju su bez bodlji (bestrne), a opisane su još od vremena stare Grčke (Hummer i Janick, 2009). Na osnovu karakteristika rasta dijele se na: puzeće, poluuspravne i uspravne. Kod nas je najpopularnija poluuspravna sorta Čačanska bestrna koja daje dobre prinose, a sem toga je otporna i na mnoge zarazne bolesti i niske temperature.

Najčešće sorte kupina bez bodlji (bestrne):

- *Black satin*, američka sorta, kasnog je vremena zrenja, plodovi su krupni i čvrsti, sa tamnocrnim bobicama koje su blago oporog okusa. Plodovi su izuzetno pogodni za industrijsku preradu za proizvodnju džemova, slatka i želea, a veoma su pogodni i za svježu potrošnju (Miljković, 2005);
- *Čačanska bestrna*, domaća sorta kupine. Veoma je bujna i rodna sorta, sa kraćim vremenom zrenja i plodovima izuzetne krupnoće. Nedostatak je pojava promjene boje iz crne u crvenu, koja se javlja tokom zamrzavanja i čuvanja;

- **Chester Thornless**, američka sorta, nastala 1985. godine, kasnog je vremena zrenja. Plod je zarubljeno kupastog oblika i sjajno crne boje. Ukus ploda je prijatan, skladan, sa izbalansiranim sadržajem šećera i kiselina (Milivojević i sar., 2010);
- **Loch ness**, sorta porijeklom iz Poljske, rađa krupne, sjajne, crne plodove dobrog kvaliteta. Izdanci su poluuspravni i srednje bujni, otporni na nepovoljne vremenske uslove, kao i sorta "Chester";
- **Thornfree**, američka sorta, srednje kasnog je vremena zrenja. Plodovi su srednje krupni, zaobljenog kupastog oblika, blago oporog ukusa, sa pokožicom sjajne crne boje. Sorta koja je pogodnija za korištenje u svježem stanju (Miljković, 2005);
- **Jumbo**, nova i veoma prinosa sorta kupine sa krupnim plodovima. Plodovi su slatki, ukusni, bez posebnih karakteristika kiselosti i gorčine.



Slika 3. Pitoma kupina roda *Rubus*: a) Čačanska bestrna, b) Chester Thornless, c) Thornfree

Najčešće sorte pitomih kupina sa bodljama:

- **Darrow**, američka sorta, ima velike izduženo kupaste i često nepravilne, crne, sjajne plodove, sa kasnim vremenom zrenja. Plod je blagokiselog ukusa i dobrog kvaliteta, sazrijeva početkom jeseni;
- **Gazda**, sorta porijeklom iz Poljske, ima okrugle plodove srednje veličine, privlačne, sjajne i crne boje. Izdanci su uspravni sa malo bodlji i kratkim internodijama;
- **Illini Hardy**, američka sorta, ima srednje krupan plod, dobrog ukusa i kvaliteta. Sorta je kasnog vremena zrenja. Izdanci su uspravni, bujni i dobro podnose niske temperature;
- **Himalaya**, sorta porijeklom iz Njemačke, sazrijeva krajem jula i tokom prve dekade avgusta, slatko-nakiselog su okusa, sa karakterističnom i prijatnom aromom. Plod je srednje veličine do krupan, okruglastog oblika, sjajan i intenzivno crne boje (Mratinić, 2015; Miljković, 2005).

2.3. HEMIJSKI SASTAV KUPINE

Hemijski sastav plodova kupine je značajno uslovljen kultivarom, podnebljem gajenja, primjenjenim agrotehničkim mjerama, stepenom zrelosti, kao i načinom berbe, uslovima transporta i čuvanja plodova nakon berbe. Plod kupine ima dobre hemijske karaktersitike (Tabela 2).

Tabela 2. Prosječan hemijski sastav kupine (Kaume i sar., 2012)

Nutrienti		Vitamini / 100g ploda		Minerali / 100g ploda	
Voda /g	88,20	Askorbinska kiselina /mg	21,00	Kalcij /mg	29,0
Energija /g	43,0	Tiamin /mg	0,02	Željezo /mg	0,62
Proteini /g	1,39	Riboflavin /mg	0,03	Magnezij/mg	20,0
Ukupni lipidi /g	0,49	Niacin /mg	0,65	Fosfor /mg	22,00
Pepeo /g	0,37	Pantotenska kiselina /mg	0,28	Kalij /mg	162,0
Ugljenihidrati /g	9,61	Vitamin B6 /mg	0,03	Natrij /mg	1,0
Ukupna vlakna /g	5,30	Ukupni folati /μg	25,00	Cink /mg	0,53
Ukupni šećeri /g	4,88	Vitamin B12 /μg	-	Bakar /mg	0,17
Saharoza /g	0,07	Vitamin A /IU	214,0	Mangan /mg	0,65
Glukoza /g	2,31	α – tokoferol /mg	1,17	Selen /mg	0,40
Fruktoza /g	2,40	β – tokoferol /mg	0,04		
Maltoza /g	0,07	γ –tokoferol /mg	1,34		
Galaktoza /g	0,03	Δ - tokoferol /mg	0,90		
Skrob /g	-	Vitamin K /μg	19,8		

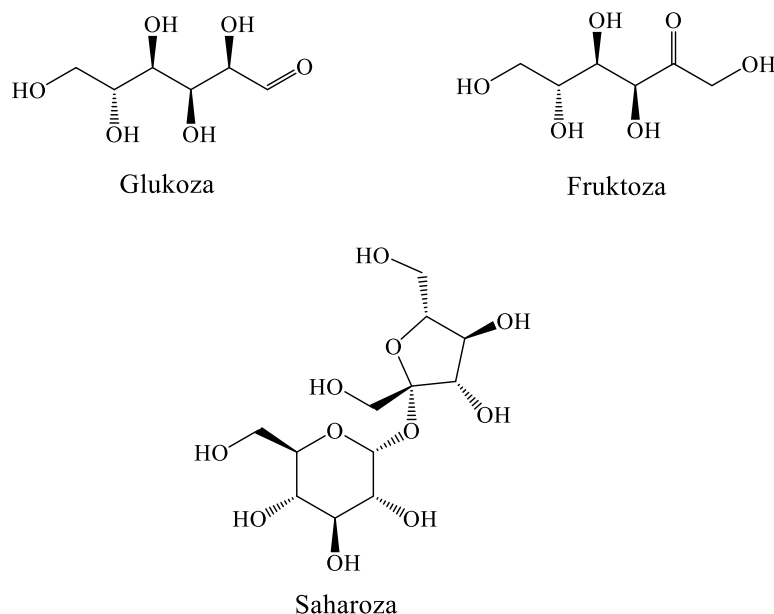
Kupina je veoma interesantna i značajna vrsta jagodastog voća u biološko-tehnološkom pogledu, sa širokom amplitudom gajenja (Katalinić, 2006). Najvažnije komponente nutritivnog sastava kupine su: voda, ugljeni hidrati, proteini, masti, pektinske materije, vitamini i mineralne materije (Niketić-Aleksić, 1988; Zhao, 2007).

Prosječan sadržaj suve materije u pitomjoj kupini iznosi 11,8 g, dok je sadržaj suve materije u divljoj kupini nešto veći i iznosi 16,72 g u 100 g svježe mase ploda (Šoškić, 1984; Vračar, 2001; Kaume i sar., 2012; Vasilišin i sar., 2009). Sadržaj vode u plodu kupine iznosi od

84,5 do 88,2 % (Vračar, 2001; Blagojević, 2012; Kaume i sar., 2012). Tehnološki gledano, voda utiče na dužinu vremena skladištenja i na potrošnju rezervnih supstanci u tkivu (Katalinić, 2006). Trenutak berbe plodova i tehnološka zrelost su u vezi sa sadržajem šećera, aromatskih komponenti, intenzitetom boje i odnosom sadržaja ukupnih šećera i kiselina.

2.3.1. SADRŽAJ UGLJENIH HIDRATA U KUPINI

Ugljeni hidrati u plodu kupine zajedno sa kiselinama čine osnovnu komponentu u formiranju ukusa, ali su takođe značajni i kao energetske i gradivne sastojke. Pojedini šećeri, naročito glukoza u plodu kupine i saharoza u plodu jagode imaju pozitivan uticaj na sadržaj antocijana, jer sprječavaju njihovu degradaciju tokom čuvanja (npr. zamrzavanja) (Kopjar i sar., 2012; Fan-Chiang i Wrolstad, 2010). Sadržaj ukupnih šećera u plodu kupine se kreće od 6,68 do 10,22 %, a glavni šećeri koje nalazimo u kupini su: glukoza, fruktoza i saharoza (Zia-Ul-Haq i sar., 2014) (Slika 4).



Slika 4. Hemijska struktura dominantnih ugljenih hidrata u plodu kupine

Saharoza je važan disaharid u voću, a osim što je dobar energetske izvor, tradicionalno se koristi i kao konzervans kako bi se spriječilo mikrobiološko kvarenje proizvoda od voća. Jagodasto voće sadrži od 2,5 do 15 % šećera (Jašić, 2010). Fruktoza ima veću slast u odnosu na glukoza, pa je tako njen sadržaj poželjan kao izvrsna organoleptička karakteristika voća (Zia-Ul-Haq i sar., 2014). Glukoza je najvažnije metaboličko gorivo, nastaje procesom fotosinteze i pohranjuje se u polimernom obliku kao škrob. Nastaje reakcijom jednog molekula α -D-glukopiranoze i jednog molekula β -D-fruktofuranoze, koji su povezani α - (1,2) glikozidnom

vezom. Prisustvo ugljenih hidrata u kupini zavisi od sorte (Tabela 3), stepena zrelosti, klimatskih uslova kao i uslova gajenja (Katalinić, 2006; Kaume i sar., 2012).

Tabela 3. Sadržaj ugljenih hidrata u sortama kupine uzgajanim u Srbiji (Zia-Ul-Haq i sar., 2014)

Sorta	Sadržaj invertnog šećera (%)	Sadržaj saharoze (%)	Sadržaj ukupnih šećera (%)
<i>Black Satin</i>	5.65	0.98	6,68
<i>Dirksen Thornless</i>	7.98	1.00	9,04
<i>Chester Thornless</i>	8.18	0.89	9,12
<i>Thornfree</i>	6.12	0,86	7,02
<i>Čačanska bestrna</i>	7.36	0,85	8,25
<i>Loch Ness</i>	9.01	0,90	9,96
<i>Navaho</i>	9.08	1,08	10,22

Prema podacima *National Nutrient Database for Standard Reference* (2016), monosaharidi najviše zastupljeni u plodu kupine su: fruktoza (2,4 mg/100 g svježeg ploda), glukoza (2,31 mg/100 g svježeg ploda), maltoza (0,07 mg/100 g svježeg ploda) i galaktoza (0,03 mg/100 g svježeg ploda). Sadržaj saharoze u kupini se kreće u količini od 0,85 do 1,08 g/100 g svježe mase ploda. U divljim sortama kupine saharoza se nalazi u mnogo manjim koncentracijama, u odnosu na ostale šećere, zbog prelaska u invertne šećere tokom zrenja plodova (Zia-Ul-Haq i sar., 2014).

Polisaharidi su polimerni molekuli ugljenih hidrata koji se sastoje od dugih lanaca monosaharidnih jedinica povezanih glikozidnim vezama, koji nakon hidrolize daju monosaharide ili oligosaharide. Njihova struktura se kreće od linearnih do visoko razgranatih lanaca. Dijelev se na rezervne polisaharide, kao što su škrob, glikogen i strukturne polisaharide kao što su celuloza i hitin. U zavisnosti od strukture, ovi makromolekuli mogu imati različita svojstva u odnosu na monosaharide od kojih su izgrađeni. Mogu biti amorfni i nerastvorljivi u vodi. Kada su svi monosaharidi u polisaharidu istog tipa, nazivaju se homopolisaharidi ili homoglikani, a kada je prisutno više od jedne vrste monosaharida nazivaju heteropolisaharidi ili heteroglikani (IUPAC, Compendium of Chemical Terminology, 1997).

Biljni polisaharidi pokazuju širok spektar biološke aktivnosti, kao što su imunostimulišuće, antikarcinogeno i antidijabetsko dejstvo. Kao što je već poznato za polisaharide algi, tako i biljni polisaharidi imaju antikoagulantnu aktivnost, i mogu se koristiti u prevenciji i

liječenju kardiovaskularnih bolesti (Wang i sar., 2017). Kod voćnih vrsta odnos rastvorljivih i nerastvorljivih vlakana je različit. Kupina spada u klasu voća kod kojih su vlakna manje rastvorljiva u vodi (Englyst i sar., 2008).

Skrob je polimer glukoze u kome su glukopiranozne jedinice vezane alfa-vezama. Sastoji se od smjese amiloze (15 - 20 %) i amilopektina (80 – 85 %). Amiloza se sastoji od linearnog lanca sa nekoliko stotina molekula glukoze, dok amilopektin čine razgranati molekuli od nekoliko hiljada jedinica glukoze. Skrob se u biljkama deponuje u korijenu, plodu i služi kao rezervni izvor energije, a sadržaj skroba u voću zavisi od stepena zrelosti plodova (Mratinić, 2015; Jašić, 2007).

Celuloza se sastoji od linearnog lanca od nekoliko stotina do više hiljada glukoznih jedinica koje su povezane β -(1,4) glikozidnim vezama. Hemijski je slabo reaktivna, i najviše se nalazi u pokožici voća, dijelom u kori i sjemenkama. Celuloza se ne razgrađuje u organima za varenje, već se izbacuje iz digestivnog trakta u nepromjenjenom obliku povlačeći sa sobom toksične materije. Ova osobina celuloze u nutritivnom smislu je veoma važna jer pospješuju peristaltiku crijeva (Mratinić, 2015; Vračar, 2001).

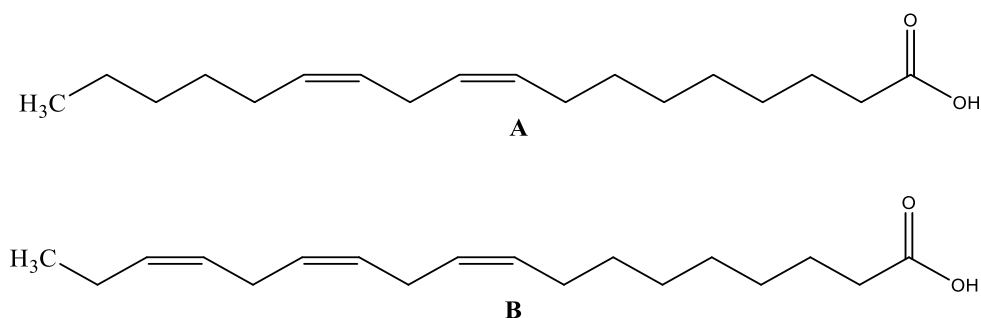
Pektini su izuzetno raznolika grupa kompleksnih polisaharida visoke molekulske mase koji su rastvorljivi u vodenim i kiselim rastvorima. Važan je polisaharid ćelijskog zida koji omogućava rast biljaka. Tokom sazrevanja ploda pektin se razlaže od strane enzima pektinaze i pektinesteraze, pri čemu plod postaje mekši, dok se srednje lamele razlažu i ćelije se razdvajaju jedna od druge (Braidwood i sar., 2013). Pektin je prikazan kao trijadna komponenta koja obuhvata homogalakturonan (HG), ramnogalakturonan-I (RG I) i ramnogalakturonan-II (RG II). Pektin je prirodni dio ljudske ishrane, dnevni unos pektina iz voća i povrća je oko 5 g u slučaju ako se dnevno konzumira oko 500 g voća i povrća. U ljudskoj digestiji, pektin se vezuje za holesterol u gastrointestinalnom traktu i usporava apsorpciju glukoze vezanjem ugljenih hidrata. Pektin je prema tome rastvorljivo dijetetsko vlakno (Ramirez i sar., 2007). Pektin se najčešće primjenjuje kao sastojak u džemovima, želeima, konditorskim proizvodima, desertima, jogurtima i mnogim drugim proizvodima. Umrežavanje HG sa Ca^{2+} se podstiče prisustvom dugotrajno neesterifikovanih uzastopnih galakturonskih lanaca (Sila i sar., 2008). U plodu kupine se nalaze značajne količine pektinskih supstanci koje se po sortama, u zavisnosti od varijeteta kreću od 0,39 % kod divljih kupina do 0,66 % kod pitomih sorti. Po visokom sadržaju pektina, izraženog u obliku kalcijum-pektata, odlikuju se sorte Bailey (0,61 %) i Thornfree (0,55 %) (Šoškić, 1984).

2.3.2. SADRŽAJ PROTEINA U KUPINI

Veliki broj sorti voća sadrži proteine u količinama manjim od 1% koji se u većini slučajeva sastoje se od aminokiselina povezanih peptidnom vezom. Sadržaj proteina u kupini je sličan kao i kod većine ostalog voća i kreće se u intervalu od 1,2 do 1,4 % (Vračar, 2001), dok je prema *National Nutrient Database for Standard Reference* (2016), sadržaj proteina u kupinama nešto veći i iznosi 1,39 %.

2.3.3. SADRŽAJ MASNIH KISELINA U KUPINI

Glavne masne kiseline sadržane u sjemenkama kupine su linolna i linoleinska (Slika 5), što kupinu čini odličnim izvorom nezaćineh masnih kiselina. Ove masne kiseline su dobar prirodan izvor antioksidanata, čime potencijalna upotreba kupina ima uticaj na promociju zdravlja i prevenciju bolesti. Tokom ekstrakcije ulja iz sjemenki pored triacilglicerola se ekstrahuju i prirodno prisutni antioksidanti (Micić, 2016).



Slika 5. Strukturne formule masnih kiselina prisutnih u kupinama: (A) - linolna kiselina i (B) - linoleinska kiselina

Masne kiseline ekstrahovane iz sjemenki kupina sastoje se od 50 do 70 % linolne, 10 – 32 % linolenske, 9 – 20 % oleinske, 2 – 5 % palmitinske i 1 - 3 % stearinske masne kiseline (Fang i sar., 2011). Bushman i saradnici (2004) su objavili, da je kod sjemenki pet vrsta kupina roda (*Rubus*) detektovano od 53 do 63 % linolne i 15 do 31 % linolne kiseline. Prema *National Nutrient Database for Standard Reference* (2016), sadržaj ukupnih zasićenih masnih kiselina u 100 g svježeg ploda kupine iznosi 0,014 g, sadržaj mononezasićenih 0,047 g i polinezasićenih masnih kiselina 0,280 g.

2.3.4. SADRŽAJ ORGANSKIH KISELINA U KUPINI

Organske kiseline u voću su slabe kiseline koje u potpunosti disociraju. Sadržaj ukupnih kiselina se odražava na ukus ploda koji još zavisi i od izbalansiranog odnosa šećera i kiselina. Organske kiseline su korisne za stabilizaciju askorbinske kiseline i antocijana, zbog čega imaju

ključnu ulogu u formiranju boje ploda i produžetku skladišne sposobnosti svježih i prerađenih plodova, a utiču i na regulaciju aktivnosti askorbinske kiseline (Charlotte i sar., 2005; Talcott, 2007; Milivojević i sar., 2011).

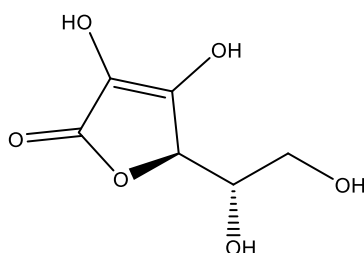
Najzastupljenije organske kiseline u plodu kupine su limunska, jabučna i sirćetna, pri čemu je dominantan sadržaj limunske i jabučne kiseline (Veberic i sar., 2014). Zastupljenost ukupnih kiselina u plodu kupine varira u intervalu od 1,02 do 4,22 % (Reyes-Carmona i sar., 2005). Sorta Čačanska bestrna odlikuje se najvećim prosječnim sadržajem ukupnih kiselina od 17,17 g/kg svježe mase ploda u poređenju sa pet sorti kupine: *Black Satin*, *Chester Thornless*, *Thornless Evergreen*, *Loch Ness* i *Thornfre* (Veberic i sar., 2014).

Fan-Chiang i Wrolstad (2010) uradili su analizu 52 uzorka ploda kupine. Utvrdili su prosječan sadržaj neisparljivih organskih kiselina: 280 mg jabučne kiseline, 599 mg izoliminske kiseline i 572 mg limunske kiseline u 100 g svježeg ploda. U tragovima su indentifikovane još i šikiminska, fumarinska i jantarna kiselina. Vrijednost pH definiše kiselost voća i služi kao mjerilo zrelosti voća (Vračar, 2001).

2.3.5. SADRŽAJ VITAMINA U KUPINI

Kupine nisu samo ukusne niskoenergetske namirnice, već i bogat izvor vitamina. U svježem plodu kupine se nalazi vitamini: A, E, B1, B2, B3, B5, B6, B9 i C. Doprinos vitamina C u ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti voća i povrća iznosi oko 10 % (Slinkard i Singleton, 1977).

Askorbinska kiselina (Slika 6), učestvuje u različitim metaboličkim reakcijama sa sposobnošću regeneracije drugih biološki važnih antioksidanata, kao što su glutation i vitamin E. Vitamin C je sposoban da neutrališe reaktivne vrste kiseonika u vodenoj fazi prije početka peroksidacije lipida (Sies i sar., 1992; Pala i Tabakçioglu, 2007). Askorbinska kiselina igra važnu ulogu u regulaciji bioloških oksido-redukcionih reakcija, zahvaljujući procesu primanja ili otpuštanja H^+ jona i pretvaranju L-askorbinske u L-dezoksiaskorbinsku kiselinu. Askorbinska kiselina može da djeluje i kao prooksidant u prisustvu Fe^{3+} jona, tako što redukuje Fe^{3+} u Fe^{2+} , a nastali Fe^{2+} , može formirati radikal "superoksid anjon" ili "hidroksil radikal" sa kiseonikom ili sa vodonik peroksidom kod nezasićenih masnih kiselina (Velagić-Habul, 2010).



Slika 6. Strukturna formula askorbinske kiseline

Prosječan sadržaj vitamina C u plodu kupine u mnogome zavisi od sorte, a kreće se u intervalu od 14,0 do 44 mg u 100 g svježe mase ploda (Pantelidis i sar., 2007; Zia-Ul-Haq i sar., 2014). Uticaj askorbinske kiseline se ogleda u sprječavanju tamnjenja i obezbojavanja plodova, kao i povećanju njihove trajnosti tako što inhibira fiziološke procese koji umanjuju kvalitet ploda tokom čuvanja (Lattanzio i sar., 2001; Voća i sar., 2006). Prema rezultatima istraživanja Stanisavljevića (1999), sadržaj vitamina C u plodu sorte Čačanska bestrna iznosi 17,2 mg u 100 g svježe mase ploda, dok su Veberic i saradnici (2014) ustanovili niže vrijednosti 8,63 mg u 100 g svježe mase ploda za istu sortu. Antioksidativna aktivnost vitamina C se uglavnom ispoljava u sinergizmu sa flavonoidima (Isler i sar., 1988; Kahkonen i sar., 2001).

Vitamini grupe B su klasa vitamina rastvorljivih u vodi i igraju važnu ulogu u metabolizmu ćelija. Ovoj grupi pripadaju vitamini: B₁-tiamin, B₂-riboflavin, B₃-niacin, B₅-pantotenska kiselina, B₆-piridoksin, B₇-biotin, B₉-folna kiselina i B₁₂-kobalamin. Vitamini grupe B su neophodni za pretvaranje ugljenih hidrata, masti i proteina u energiju kao i za njihovo korištenje za izgradnju i obnavljanje tjelesnih tkiva.

Prema podacima *National Nutrient Database for Standard Reference* (2016) sadržaj vitamina grupe B u kupinama je prikazan u Tabeli 4.

Tabela 4. Vitamini B grupe u 100g svježeg ploda kupine

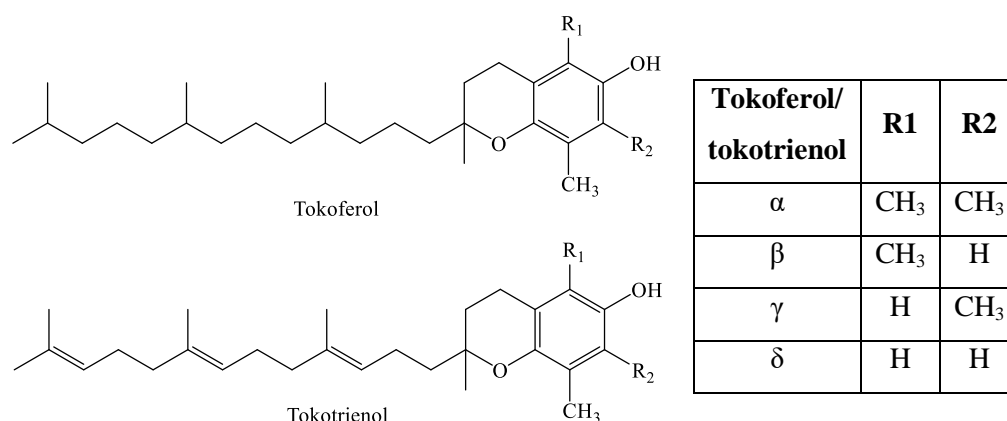
B1- Tiamin	0,02 mg
B2- Riboflavin	0,026 mg
B3- Niacin	0,646 mg
B5-Pantotenska kiselina	0,276 mg
B6- Piridoksin	0,030 mg
Ukupni folati	25,00 µg

2.3.6. SADRŽAJ TOKOFEROLA I TOKOTRIENOLA U KUPINI

Tokoferoli i tokotrienoli su klasa hemijskih jedinjenja koja se sastoji od metilisanih fenola, i u širem smislu ih nazivamo "vitamini E". Pojavljuju se u osam različitih stereoisomera, četiri tokoferola (alfa, beta, gama, delta) i četiri tokotrienola (alfa, beta, gama, delta) (Brigelius-Flohe i Traber, 1999; Murphy i sar., 2003). Vitamin E kao antioksidant sprječava oksidaciju nezasićenih masnih kiselina (membranskih lipida), te stupa u reakciju sa slobodnim radikalima. Unos većih količina vitamina E u ishrani štiti ćelije od uticaja slobodnih radikala, kontroliše zgrušavanje krvi, sprječava srčani udar i nastanak kancera (Dietrich i sar., 2006; Mene-Saffrane i

DellaPenna, 2010). Razlika u strukturi tokotrienola i tokoferola je u nezasićenom bočnom lancu (Slika 7).

α -tokoferol ima najveću bioraspodivnost i najviše je proučavan od svih tokoferola (Brigelius-Flohe i Traber, 1999). α -tokoferol predstavlja najvažniji antioksidant rastvorljiv u lipidima, štiti ćelijske membrane od oksidacije reagovanjem sa lipidnim radikalima koji nastaju u lančanoj reakciji lipidne peroksidacije (Traber i Atkinson, 2007).



Slika 7. Opšte strukturne formule tokoferola i tokotrienola

Barcia i saradnici (2010) su utvrdili da je ukupan sadržaj tokoferola u kupinama 0,825 mg na 100 g ploda, a Talcott (2007) je utvrdio nešto veći sadržaj tokoferola u kupinima (Tabela 5).

Tabela 5. Sadržaj tokoferola u 100 g ploda kupine

α-tokoferol	1.17 mg
β-tokoferol	0.04 mg
γ-tokoferol	1.34 mg
δ-tokoferol	0.9 mg

Tokoferoli imaju sposobnost da uklanjaju intermedijere slobodnih radikala i sprječavaju nastavak reakcije propagacije. Kao produkt ove reakcije nastaje α -tokoferoksil radikal koji se lako može regenerisati ponovo u aktivnu redukovanu formu, redukcijom pomoću drugih antioksidanata kao što su askorbat, retinol ili ubihinol (Wang i Quinn, 1999).

2.3.7. SADRŽAJ KAROTENOIDA U KUPINI

Karoteni su fotosintetički pigmenti važni za fotosintezu. Iako prisutni u malim količinama, u plodovima kupina mogu imati važnu ulogu, kao prekursori isparljivih sastojaka arome (jonona) (Perkins i sar., 2012). Dije se na dvije glavne klase: karoteni i ksantofili. Karoteni sadržani u

kupini su β -karoten i β -kriptoksantin. Sadržaj karotenoida u kupini je veoma nizak, a količina detektovanog β -karotena u svježem plodu kupine iznosi 118 μg , lutein–zeaksantina 128 μg u 100 g ploda, α -karoten i kriptoksantin nisu detektovani (Zia-Ul-Haq i sar., 2014). Sve u svemu, doprinos karotenoida iz kupine u ishrani je mali (Perkins i sar., 2012).

2.3.8. SADRŽAJ MINERALNIH MATERIJA U KUPINI

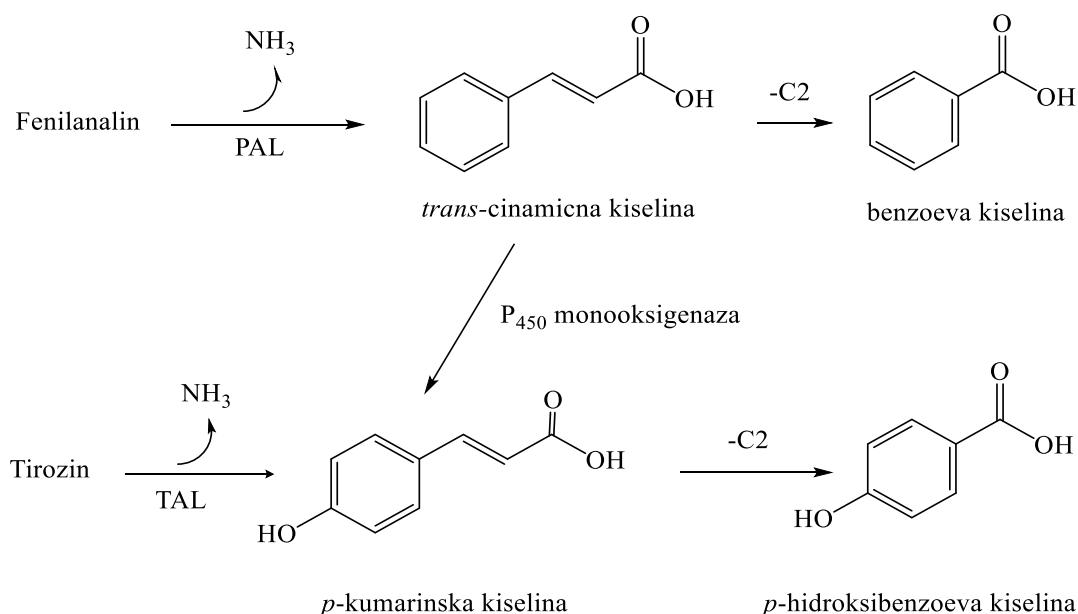
Sadržaj mineralnih materija u plodovima kupina je u velikoj mjeri uslovljen tipom zemljišta, fertilizacijom, klimatskim uslovima i sortom (Nour i sar., 2011). Različiti minerali imaju različite uloge kod biljaka. Magnezijum je glavna komponenta hlorofila i učestvuje u procesu fotosinteze i pomaže u apsorpciji i translokaciji fosfora (Hawkesford i sar., 2002). Kalcijum u plodu ima veoma značajnu ulogu kod održavanja integriteta i propusnosti ćelijskog zida (Guedes i sar., 2013). Bakar je neophodan za sintezu hlorofila i funkcioniše kao aktivator fotosintetskih enzima. Mangan ima važnu funkciju u reakcijama oksidacije i redukcije, i uključen je u asimilaciju ugljenika i vezan je na fotosistem I. Sadržaj cinka pozitivno utiče na sintezu i degradaciju ugljenih hidrata i učestvuje u biohemijskim reakcijama koje uključuju šećere (Malavolta i sar., 2002). Minerali kao što su kalcijum, fosfor i kalijum, kombinovani sa organskim kiselinama utiču na puferski kapacitet i na osnovu toga doprinose percepciji kiselosti voća (Kader, 2008).

Mineralne materije sa najvećim procentualnim sadržajem u plodu kupine su: kalijum, kalcijum, fosfor i magnezijum, a prosječan sadržaj iznosi: kalijum 260 mg, natrijum 23 mg, kalcijum 22 mg i magnezijum 9 mg u 100 g svježeg ploda kupine (Zlatković, 2003). Koncentracija mikroelementa u 100 g svježeg ploda je: cink 140 μg , bakar 50 μg , aluminijum 27 μg , mangan 33 μg , kobalt 1 μg , željezo 30 μg (Stefanut i sar., 2013). Takođe, sadržaj mineralnih materija pitomih i divljih sorti kupine je veoma heterogen, pitome kupine sadrže oko 1,5 puta više željeza, oko 2,5 puta veće količine hroma, dok divlje sorte sadrže oko 3 puta veće količine bakra i cinka, i nešto oko 2 puta veće količine mangana (Vasilišin i Grubačić, 2009).

Kao i većina drugih minerala, kalijum ima ulogu elektrolita, što znači da se rastvara da bi stvorio pozitivno nabijene jone koji regulišu metabolizam. Nedostatak Ca i Mg u ishrani ljudi je u velikoj mjeri povezan sa hipertenzijom i slabom apsorpcijom glukoze. Pokazalo se da nedostatak Fe dovodi do brojnih zdravstvenih problema kao što su oslabljen imuni sistem, inhibicija sinteze hemoglobina. Ostali bitni elementi u tragovima kao što su Zn, Cu, Mn i Se takođe igraju važnu ulogu u održavanju zdravlja (Alzahrana i sar., 2017). Nizak nivo selena u ishrani ljudi je povezan sa povećanim rizikom od nastanka raznih bolesti, kao što su karcinom i bolesti srca. Selen u hrani i biološkim materijalima egzistira u organskom obliku (ulazi u sastav seleno-proteina) (Tinggi, 2008; Bangladesm i sar., 2016).

2.4. KUPINA KAO IZVOR POLIFENOLNIH JEDINJENJA

Polifenolna jedinjenja su velika grupa sekundarnih metabolita biljaka, sadrže najmanje jedan aromatični prsten, jednu ili više hidroksilnih grupa, a njihove strukture mogu da variraju od jednostavnog fenolnog molekula do kompleksnih polimera visoke molekulske mase, kao što su tanini (Robards i sar., 1999; Milić i sar., 2000; Balasundram i sar., 2006; Bravo, 1998). Mogu se svrstati u jedinjenja rastvorljiva u vodi (flavonoidi, fenolne kiseline, fenilpropanoidi i hinoni) i jedinjenja nerastvorljiva u vodi (kondenzovani tanini, lignini i hidroksicinamične kiseline) (Rispaill i sar., 2005). Uglavnom se nalaze u voću, povrću i žitaricama (Huang i sar., 2005). Na prvi pogled nemaju očiglednu funkciju u biljkama, međutim danas je poznato da sekundarni metaboliti čine sastavne dijelove enzimskih sistema i da imaju zaštitnu ulogu u biljkama (djeluju kao odbrana od UV zračenja, oksidanata i patogena) (Pandey i Rizv, 2009; Manach i sar., 2004; Taiz i Zeiger, 2010). Većina polifenola se sintetizuje u visoko razgranatom fenil propanoidnom putu koji je odgovoran za biosintezu velikog broja hemijskih jedinjenja sa značajnim strukturnim razlikama. Prekursori za biosintezu polifenolnih jedinjenja su aminokiseline fenilalanin i tirozin. Fenilalanin se prvo pretvara u cimetnu kiselinu dejstvom enzima fenilalanin amonijak-lijaza (PAL) ili tirozin amonijak-lijaza (TAL), kada dolazi do uklanjanja molekula amonijaka iz aminokiselina. Tako nastali molekuli fenolnih kiselina se mogu dalje derivatizovati na različite fenilpropanoide ili hidroksicinamične kiseline (Slika 8) (Shahidi, 2015).



Slika 8. Nastajanje fenolnih kiselina iz fenilalanina i tirozina

U organizmu čovjeka i životinja ne mogu se sintetisati, te ih je potrebno unositi hranom (Kumar i Pandey, 2013).

Tabela 6. Podjela fenolnih jedinjenja (<http://www.biohemija.in.rs/PDF/BB.3.1.pdf>)

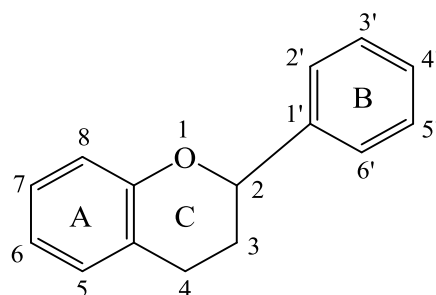
C kostur	Klase polifenola	Komponente
C6	Jednostavni fenoli	Katehol, hidrohinon
C6-C1	Hidroksibenzoati	4-hidroksibenzoat
C6-C2	Acetofenoni	4-hidroksiacetofenon
	Fenilacetati	4-hidroksifenilacetat
C6-C3	Hidroksicinamati	Kafeat
	Fenilpropeni	Eugenol
	Kumarini	Eskuletin
	Hromoni	2-metil-5-hidroksi-7-metoksihromon
C6-C4	Naftohinoni	Juglon
C6-C1-C6	Ksantoni	1,3,6,7-hidroksiksanton
	Stilbeni	Resveratrol
	Antrahinoni	Emodin
C6-C2-C6	Flavonoidi	Kvercetin
(C6-C3)2	Lignani	Pinorezinol
(C6-C3-C6)2	Biflavonoidi	Amentoflavon
(C6)n	Katehol melanini	Naftalen polimer
(C6-C3)n	Lignini	Guaiacil lignini
(C6-C3-C6)n	Kondenzovani tanini	Polimeri katehina

Kupine sadrže jednostavne fenole, flavonoide, lignine i kondenzovane tanine, zatim antocijane, flavonole, hlorogensku kiselinu i procijanidine. Navedena jedinjenja imaju visoku biološku i antioksidativnu aktivnost, te povoljno utiču na zdravlje ljudi (Koca i Karadeniz, 2009). Mnoge od ovih komponenti dobile su posebnu pažnju kao potencijalni zaštitni faktori protiv degenerativnih bolesti (Dai i sar., 2009), posebno elagitanini i cijanidin-3-glukozid koji predstavljaju glavne polifenolne komponente sadržane u kupini (Stajčić i sar., 2012).

Sadržaj ukupnih polifenola u divljoj kupini prema Koca i Karadeniz (2009) kreće se u rasponu od 264 do 379 mg u 100 g svježeg ploda, u odnosu na uzorke pitomih sorti kupine, gdje je utvrđen sadržaj ukupnih polifenola od 77 do 820 mgGAE/100 g svježeg ploda.

2.4.1. FLAVONOIDI

Flavonoidi su polifenolna jedinjenja koja čine veliku grupu sekundarnih metabolita biljaka (Cho i sar., 2004; Lee i sar., 2012; Panche i sar., 2016). Flavonoidi su važna klasa prirodnih proizvoda, široko rasprostranjeni u voću i povrću (Cho i sar., 2004). Danas se smatraju nezamjenjivim komponentama za primjenu u raznim nutritivnim, farmaceutskim, medicinskim i kozmetičkim proizvodima (Panche i sar., 2016). Osnovna struktura flavonoida je prikazana na slici 9.



Slika 9. Osnovna struktura flavonoida

Na osnovu strukture flavonoidnih aglikona moguće je izvršiti podjelu na: antocijanidine, izoflavone, izoflavanone, flavone, flavonole, dihidroflavonole, flavanone, flavane, flavanole, flavandiole, halkone, dihidrohalkone i aurone. Neki flavonoidi, kao što su tanini, ispoljavaju afinitet za umrežavanje i polimerizaciju (Winkel–Shirley, 2001). Flavonoidi predstavljaju širok spektar jedinjenja koja imaju važnu ulogu u zaštiti bioloških sistema od štetnog djelovanja oksidativnih procesa na makromolekule, kao što su ugljenihidrati, proteini, lipidi i DNA (Halliwell i Gutteridge, 1999). Flavonoidi štite biljke od različitih biotičkih i abiotičkih stresova i djeluju kao jedinstveni UV filteri (Panche i sar., 2016). Sklonost flavonoida da inhibiraju slobodne radikale zavisi od njihove hemijske strukture. Odnos struktura-aktivnost je dobro utvrđen *in vitro* i dokazan je u mnogim studijama (Heim i sar., 2002; Amić i sar., 2007). Flavonoidi imaju snažnu *in vitro* antioksidantnu aktivnost, sposobni su da djeluju na širok spektar reaktivnih vrsta kiseonika, azota i hlora, kao što su superoksidi, hidroksil radikal, peroksil radikali, hipohlorična kiselina i peroksinitritna kiselina. Takođe, mogu da heliraju jone metala, često smanjujući prooksidantnu aktivnost metalnih jona (Halliwell i Rafter, 2005). O-glikozilacija A ili B prstena smanjuje antiradikalnu sposobnost flavonoida (De Marino, 2012).

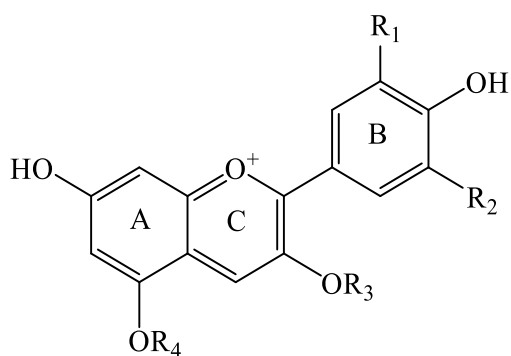
Flavonoidi imaju visok potencijal za hvatanje i neutralizaciju slobodnih radikala, zbog toga što doniranjem jednog H-atoma iz hidroksilne grupe daju flavonoid fenoksil radikal, koji je relativno stabilan zbog delokalizacije nesparenog elektrona i koji se dodatno stabilizuje

otpuštanjem još jednog H-atoma sa susjedne OH grupe, pri čemu nastaje neutralan molekul hinonske strukture. Pored toga, moguće su i reakcije kuplovanja između dva molekula flavonoid radikala (dimerizacija), ili između flavonoid radikala i slobodnog radikala koji je izazvao prvobitnu radikalsku reakciju (Rice-Evans i sar., 1995). Apsorpcijski spektar flavonoida je u području talasnih dužina (250 - 270 nm), zatim (330 - 350 nm), a kod nekih i (520 - 550 nm). Zbog širokog apsorpcijskog spektra doprinose različitim bojama biljaka.

Ishrana bogata sa flavonoidima je povezana sa smanjenim rizikom od bolesti povezanih sa starenjem, što je dokazano u nekoliko epidemioloških studija (Scalbert i Williamson, 2000; Vauzour i sar., 2010), a koncept da su flavonoidi i druga polifenolna jedinjenja imala uticaj, podržan je *in vivo* studijama na životinjskim modelima (Halliwell i Rafter, 2005).

2.4.2. ANTOCIJANI

Antocijani su najvažnija grupa flavonoida rastvorljivih u vodi, odgovorni su za crvenu, plavu i ljubičastu boju cvijeća, povrća i voća. Antocijani predstavljaju grupu dominantnih polifenola u kupini (Haminiuk i sar., 2012; Souza i sar., 2015). Njihova osnovna strukturna jedinica je jon 2-fenilhromenilijum (flavilijum), a prikazana je na Slici 10 (Hou i sar., 2004). Mogu se podijeliti u najmanje šest grupa, kao što su pelargonidin, cijanidin, delphinidin, peonidin, petunidin i malvidin.

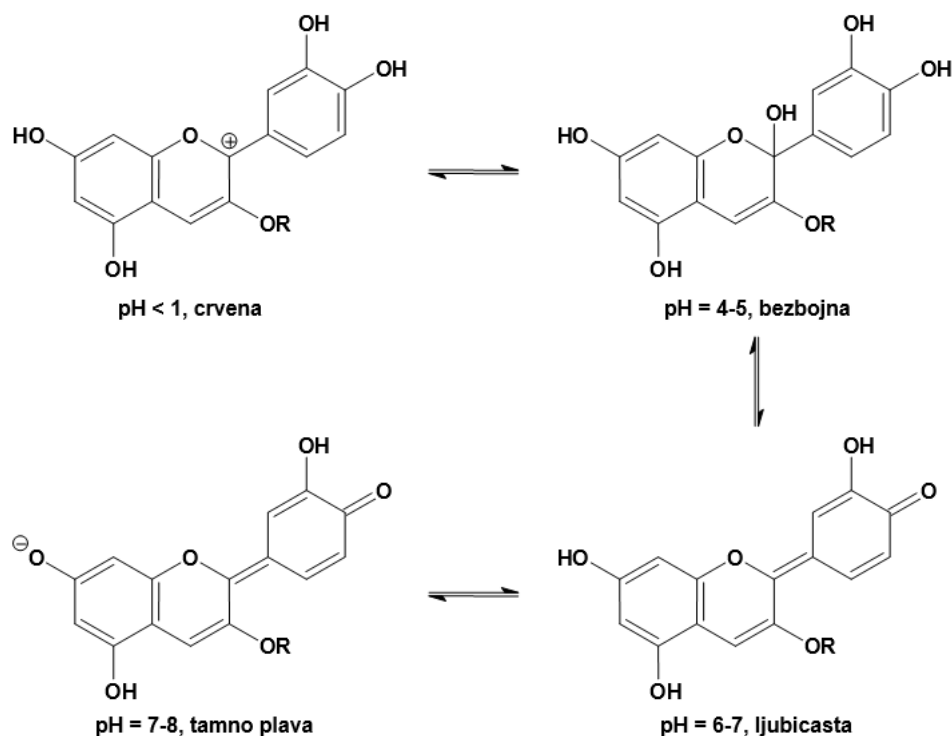


R1	R2	Antocijanin	Aglikon
H	H	pelargonin	pelargonidin
OH	H	cijanin	cijanidin
OCH ₃	H	peonin	peonidin
OH	OH	delfin	delfinidin
OCH ₃	H	petunin	petunidin
OCH ₃	OCH ₃	malvin	malvidin

Slika 10. Opšta strukturna formula antocijana

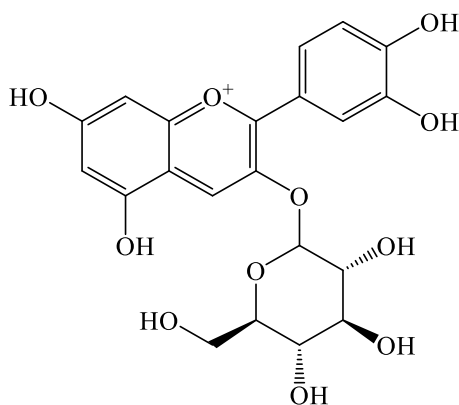
U posljednje vrijeme se sve više na tržištu pojavljuju prirodne boje, zbog zabrane sintetičkih boja, kao što su: *orange II*, *fast red*, *amaranth* i *rhodamine* (Raoi Sudershan, 2008). U prirodnim proizvodima se nalaze uglavnom u obliku koji je vezan sa glukozom, galaktozom ili ramnozom (Pantelidis i sar., 2007; Nour i sar., 2011). Raspored i broj OH grupa utiče na boju, pa je tako plava boja izraženija što je veći broj hidroksilnih grupa u B prstenu, dok se njihovim metilovanjem dobija crvena boja (Lee i sar., 2012; Veberic i sar., 2014).

Antocijani mogu biti u različitim oblicima prisutni u zavisnosti od pH sredine. Na Slici 11 se može vidjeti kako se te promjene u strukturi odražavaju na promjenu boje molekula. U kiseljoj sredini, antocijani su u obliku flavonijum katjona i tada su crveno obojeni, kod pH 4 su bezbojni, a plavi su pri neutralnoj vrijednosti pH.



Slika 11. Promjene u strukturi i boji antocijana pri promjeni pH vrijednosti

Studija rađena na ukupno šest genotipova kupina pokazuje da se sadržaj antocijana kreće u granicama od 114,4 do 241,5 mg u 100 g svježeg ploda kupine. U sličnoj studiji Fan-Chiang i Wrolstad (2005), nalaze da sadržaj monomernih antocijana u 51 kultivaru kupine iznosio od 70 do 201 mg u 100 g svježeg ploda kupine, a da su derivati cijanidina dominantni u skoro svim uzorcima. Koca i Karadeniz (2009) su proučavajući strukturu antocijana u plodu samonikle i sedam sorti pitome kupine, i utvrdili prisustvo 12 antocijana, od čega je identifikovano pet pikova, i to: cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3,5-diglukozid, peonidin-3-glukozid, pelargonidin-3-glukozid i cijanidin-3-rutinozid. Isti autori ističu da je sadržaj cijanidin-3-glukozida u plodu kupine u intervalu od 77,47 do 90,42 %. Slične vrijednosti sadržaja cijanidin-3-glukozida u plodu sorte *Navaho* dobili su i Cho i saradnici (2004), dok su vrijednosti istog parametra kod sorte *Arapaho* bile nešto niže. Mnoge studije ukazuju da je cijanidin-3-glukozid dominantan antocijan u kupini (Slika 12).



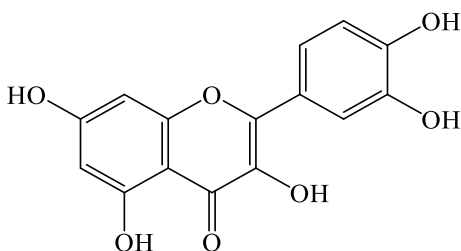
Slika 12. Hemijska struktura cijanidin-3-glukozida

Najzastupljeniji antocijani sadržani u kupinama su: cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-galaktozid, cijanidin-3-ksilozid, cijanidin-3-dioksalil-glukozid, cijanidin-3-rutinozid, cijanidin-3-sophorozid, cijanidin-3-glukozilrutinozid, cijanidin-3-arabinozid, malvidin-3-arabinozid, perlargonidin-3-glukozid, cijanidin-3-(3-malonil) glukozid i cijanidin-3-(6-malonil)-glukozid. Istraživanja Kaume i saradnici (2012) ukazuju da je cijanidin-3-dioksaloilglukozid, cviter – jonski antocijan, jedinstven samo za kupine.

Svjetlost, temperatura, pH, kiseonik, sadržaj šećera i prisustvo metala su značajni faktori destabilizacije antocijana (Souza i sar., 2015). Istraživanja su pokazala da grijanje pulpe od kupina utiče na gubitak antocijana od 8 do 80 % (Souza i sar., 2015). Formiranje kompleksnih jedinjenja sa metalima kao što aluminijum, željezo, bakar i kalaj utiče na brzinu destrukcije antocijana. Ovi kompleksi utiču na promjenu boje pigmenata (Jašić, 2010). Takođe, niske temperature tokom smrzavanja kupine dovode do degradacije antocijana (Hui, 2006).

2.4.3. FLAVONOLI

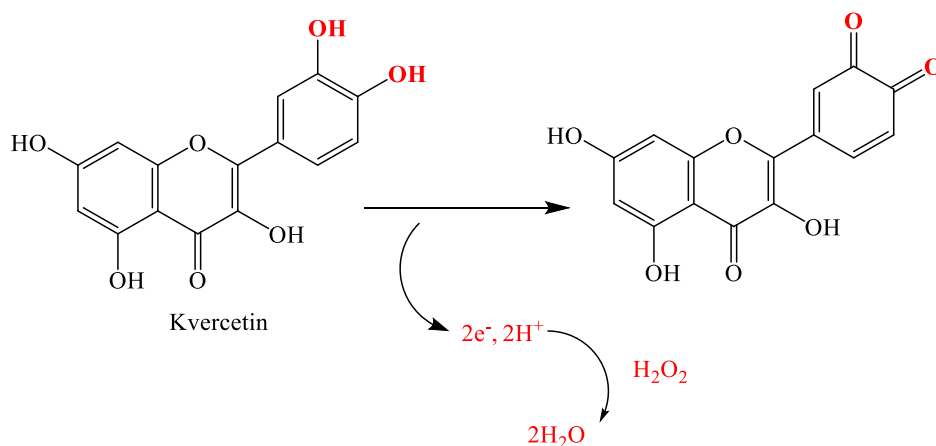
Flavonoli su flavonoidi sa 3-hidroksiflavonskom osnovom, a raznosvrstnost im potiče od različitih pozicija fenolnih grupa. Flavonoli se najvećim dijelom akumuliraju u pokožici plodova, a njihov sadržaj u značajnoj mjeri uslovljen je količinom svjetlosti i uslovima tokom čuvanja (Caridi i sar., 2007). Veći sadržaja polifenola u biljci je posljedica veće izloženosti uticaju spoljnih faktora (temperatura, patogeni, svjetlost) (Yilmaz i sar., 2009). Kvercetin je osnovni predstavnik svih flavonola, a njegova hemijska struktura predstavlja osnovni "kostur" za većinu drugih flavonola (Slika 13).



Slika 13. Hemijska struktura kvercetina

Sastav flavonola kod kupina je veoma složen, identifikovano je devet kvercetina i tri derivata kemferola, uključujući dva acilovana jedinjenja kvercetin-3-[6-(3-hidroksi-3-metilglutaroil)] galaktozid i kvercetin-3-oksalilpentozid (Siriwoharn i Wrolstad, 2004). Biološka aktivnost kvercetina pripisuje se njegovoj sposobnosti da *in vivo* neutrališe slobodne radikale (El Gharras, 2009).

U grupi flavonoida, kvercetin predstavlja najsnažniji hvatač reaktivnih vrsta kiseonika, uključujući superoksid, peroksil, alkoksil i hidrokstil radikale, kao i reaktivnih vrsta azota, kao što su: NO[•] i ONOO[•] (Milackova i sar., 2013). Rice-Evans (1996) navodi da je za jaku antioksidativnu aktivnost kvercetina odgovorna struktura sa dvije slobodne 3-hidroksi grupe u 3,4-orto poziciji B prstena. Papuc i saradnici (2017) navode da su flavonoli dobri donori vodonika i elektrona, i da vodonik peroksid konvertuju u vodu (Slika 14).



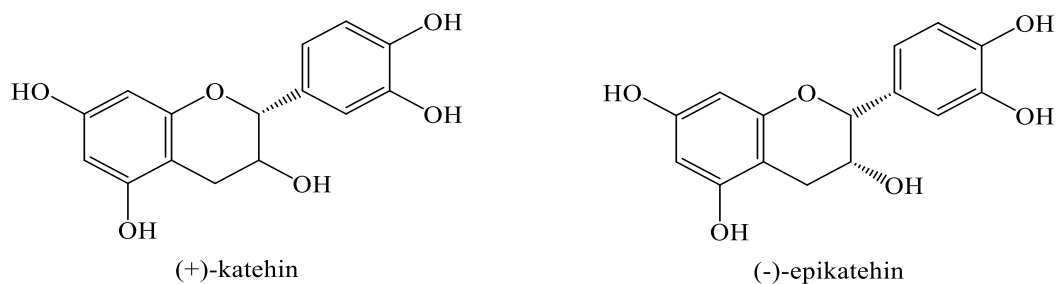
Slika 14. Mogući mehanizam reakcije kvercetina i vodonik peroksida

U studiji koja je obuhvatila pet genotipova kupina, kao glavni flavonoli u plodu kupine su pronađeni, kvercetin-3-galaktozid i kvercetin-3-glukozid (Cho i sar., 2004). Flavonoli sa najvećim procentom u kupinama su: miricetin, kvercetin, kempferol, često vezani sa glukozom i ramnozom, i u manjoj mjeri sa galaktozom, arabinozom i ksilozom (Siriwoharn i Wrolstad, 2004; Veberic i sar., 2010).

Sadržaj kempferola utvrđen u studiji na nekoliko sorti kultivisanih kupina, kretao se u granicama od 0,6 do 2,6 mg/kg ploda (Bilyk i Sapers, 1986). Valverde i saradnici (2012) u svojoj studiji navode da je katehin najzastupljeniji flavonol u kupinama, dok se u radu Milenković-Andelković (2016) navodi da je kvercetin-3-glukozid u većoj mjeri prisutan kod ploda divlje i pitome kupine, u odnosu na ekstrakte dretna, trnjine, maline, crne ribizle, šipurka, gloga i crvene ribizle.

2.4.4. FLAVAN-3-OLI

Najznačajniji predstavnici ove grupe jedinjenja su katehin i epikatehin. U jagodastom voću mogu se naći kako u svom monomernom obliku, tako i u formi dimera, trimera i polimera koji se nazivaju procijanidini.

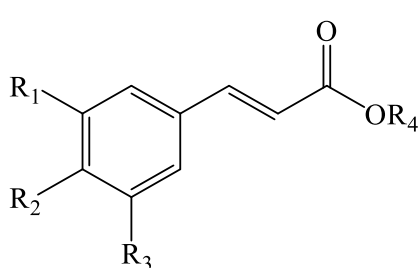


Slika 15. Hemijska struktura katehina i epikatehina

Flavan-3-oli su pretežno zastupljeni u sjemenu jagodastog voća. Tako na primjer sjeme kupine sadrži četiri puta veću koncentraciju epikatehina u poređenju sa cijelim plodom (Siriwoharn i sar., 2004). Najviše zastupljen flavon-3-ol u plodu kultivisane kupine je katehin, dok su u plodovima divljih sorti nađeni procijanidini (Milenković-Andelković, 2016).

2.4.5. FENOLNE KISELINE

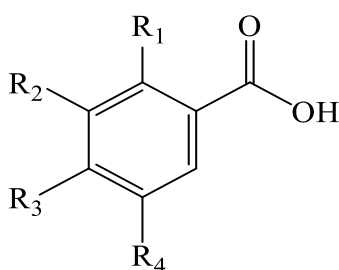
Fenolne kiseline su jedinjenja niske molekulske mase, koja se mogu podijeliti u dvije glavne grupe: derivati benzojeve kiseline na bazi C1 – C6 strukture i derivati cimetine kiseline (Slika 16), koji se zasnivaju na C3 – C6 strukturi (Tsao, 2010).



Cinamične kiseline	R1	R2	R3	R4
Kafena kiselina	OH	OH	H	H
Ferulna kiselina	OCH ₃	OH	H	H
Sinapinska kiselina	OCH ₃	OH	OCH ₃	H
p-kumarinska kiselina	H	OH	H	H
Hlorogenska kiselina	H	OH	OH	C ₇ H ₉ O ₃

Slika 16. Strukture cinamične kiseline

U grupu hidroksibenzoevih kiselina (Slika 17), ubrajaju se: galna, p-hidroksibenzoeva, vanilinska, siringinska, protokatehinska, salicilna, elaginska i gentisinska kiselina (Pereira i sar., 2009).



Benzojeve kiseline	R1	R2	R3	R4
Galna kiselina	R1	R2	R3	R4
Siringinska kiselina	OH	OH	H	H
Vanilinska kiselina	OCH ₃	OH	H	H
Protokatehinska kiselina	OCH ₃	OH	OCH ₃	H
p-hidroksibenzoeva kiselina	H	OH	H	H

Slika 17. Strukture benzojeve kiseline

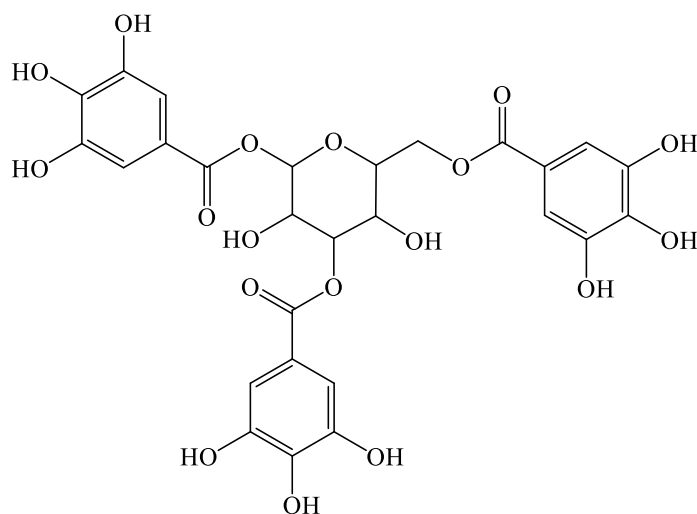
Hidroksibenzojeve kiseline su komponente kompleksnih struktura, kao što su hidrolizabilni tanini (galotanini u mangu i elagitanini u crvenim plodovima). Cimetna kiselina je jedna od najreprezentativnijih klasa fenolnih kiselina, a sadrže je: grožđe, čaj, zrna zelene kafe i sl. Hidroksicimetine kiseline su češće od hidroksibenzoevih i sastoje se uglavnom od p-kumarinske, kafene, ferulne i sinapinske kiseline. Rijetko se nalaze u slobodnom obliku, najčešće

su u konjugovanim oblicima, kao estri, osim u namirnicama koje su podvrgnute smrzavanju, sterilizaciji ili fermentaciji (Manach i sar., 2004; Vasco, 2009).

Osnovna razlika između hidroksibenzoevih i hidroksicimetnih kiselina je u stepenu hidroksilacije i metilacije aromatičnog prstena (Robbins, 2003). Elaginska, galna, protokatehinska, kafena, *p*-kumarinska i ferulna kiselina čine veliki udio u polifenolnom sadržaju plodova jagode, kupine i maline (Milivojević i sar., 2011). Djelovanje elaginske kiseline je izuzetno povoljno na ljudsko zdravlje (Losso i sar., 2007; Bakkalbasi i sar., 2009), međutim, u slobodnom obliku su malo zastupljene, i to kao produkt razlaganja elagitanina. Elaginska kiselina je hemijski jako vezana za ćelijske zidove u ćelijama ploda kupine, a najveći sadržaj ove kiseline utvrđen u sjemenkama (Siriwoharn i Wrolstad, 2004). Sellappan i saradnici (2002) navode, da su u u 100 g svježe mase ploda dvije sorte kupine (Choctaw i Kiowa), identifikovali galnu (6,42 i 4,12 mg), kafenu (1,38 i 3,64 mg), *p*-kumarinsku (2,08 i 0,40 mg), ferulnu (3,51 i 2,99 mg) i elaginsku kiselinu (33,81 i 30,01 mg). Navedeni rezultati potvrđuju navode Siriwoharn i Wrolstad (2004) da je elaginska kiselina dominantna fenolna kiselina u plodu kupine. Prema rezultatima istraživanja Milenković-Andelković (2016), veći sadržaj polifenolnih jedinjenja detektovan je u ekstraktu divlje i pitome kupine u odnosu na ispitivane ekstrakte drene, trnjine, maline, crne ribizle, šipurka, gloga i crvene ribizle. Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina je veći za 8 % kod divlje u odnosu na sadržaj utvrđen kod kultivisane kupine.

2.4.6. TANINI

Mogu se podijeliti na dvije glavne grupe: hidrolizujuće tanine (elagitanini i galotanini) i kondenzovane tanine (proantocijanidine). Hidrolizujući tanini su estri galne i elaginske kiseline sa poliolima, uglavnom glukozom (Tsao, 2010), dok se kondenzovani tanini sastoje od flavan-3-ola i flavan-3,4-diola, jedinica povezanih u polimere sa stepenom polimerizacije do 50 flavanolnih molekula (Bravo, 1998). Ima ih više u nezrelom voću, a tokom zrenja razgrađuje ih enzim tanaza (Jašić, 2010). Kao glavni nehidrolizovani elagitanin kod kupina prepoznat je lambertianin C i sanguin H-6. U obogaćenim frakcijama kupina utvrđen je udio sanguina H-6 od 12 %, lambertianina C 56 % i elaginske kiseline 1 % (Gancel i sar., 2011; Sangiovanni i sar., 2013).

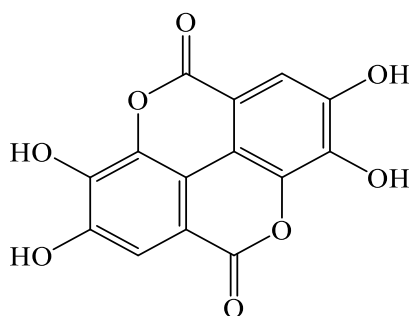


Slika 18. Taninska kiselina

U biljnom svijetu tanini se nalaze u citoplazmi parenhimskih ćelija različitih organa, predstavljaju zaštitu od insekata i ostalih štetočina. Tanini u voću su oporog ukusa, sa svojstvom degradacije proteina. U rastvoru sa proteinima se talože, imaju koloidna svojstva, te su nepoželjni u voćnim sokovima. U plodovima jagodastog voća prisutni su u intervalu od 0,02 do 0,037 %. Kupine, maline i jagode sadrže pretežno hidrolizujuće tanine, dok borovnice i brusnice sadrže pretežno kondenzovane tanine (Seeram, 2006).

2.4.6.1. Elagitanini i derivati elaginske kiseline

Elagitanini koji se nalaze u plodovima kupine se sastoje od glukoznog jezgra, esterifikovanog heksa-hidroksidifenilnom kiselinom. Pored elagitanina, u plodovima jagodastog voća se takođe mogu naći i elaginska kiselina, kako u slobodnoj, tako i u acilovanoj i glikozidnoj formi (Zafrilla i sar., 2001; Mullen i sar., 2003).



Slika 19. Elaginska kiselina

Jagodasto voće sadrži molekule glukoze esterifikovane heksahidroksidifenskom kiselinom (HHDP). Nakon hidrolize ellagitannina sa kiselinom ili bazom, heksahidroksidifenska kiselina se spontano preuređuje u oblik poznat kao elaginska kiselina. Iako je elaginska kiselina hidroksibenzoeva kiselina, većina elaginske kiseline u bobicama je prisutna u oblicima poznatim kao elagitanini i predstavljaju zasebnu klasu fenolnih kiselina. Pored elagitanina, jagodasto voće sadrži i elaginsku kiselinu u slobodnim, aciliranim i glikoziliranim oblicima (Zhao, 2007).

Siriwoharn i saradnici (2006) su odredili sadržaj elagitanina u plodovima kupine sorte Marion (511 mg/kg svježih plodova) i sorte Evergreen (682 mg/kg svježih plodova). Takođe, utvrđen je skoro duplo veći sadržaj elaginske kiseline kod plodova sorte Evergreen (36,2 mg/kg svježih plodova) u odnosu na vrijednosti kod sorte Marion (16,4 mg/kg svježih plodova), dok su u sjemenkama istih sorti utvrđene značajno veće i slične vrijednosti, kod sorte Evergreen (133 mg/kg sjemenki) i sorte Marion (145 mg/kg sjemenki) (Siriwoharn i Wrolstad, 2004). Prema istom autoru, oko 88 % od ukupno prisutnih derivata elaginske kiseline i elagitanina se nalazi u sjemenkama kupine, a ostatak u pulpi (Siriwoharn i Wrolstad, 2004; Siriwoharn i sar., 2006).

2.5. BIOLOŠKA AKTIVNOST POLIFENOLNIH JEDINJENJA

Postojeća literatura sugerise da dugoročna upotreba hrane koja je bogata polifenolima štiti organizam od određenih vrsta karcinoma, kardiovaskularnih bolesti, dijabetes tipa 2, osteoporoze, pankreatitisa, gastrointestinalnih problema, oštećenja pluća i neurodegenerativnih bolesti (Cory i sar., 2018). Brojna epidemiološka ispitivanja potvrđuju teoriju da antioksidanti iz biljaka mogu da spriječe nastanak nekih bolesti uzrokovanih oksidativnim stresom (Lobo i sar., 2010; Kumar i sar., 2013). Utvrđeno je da polifenoli sadržani u kupini posjeduju antiinflamatorna svojstva, inhibiraju proizvodnju slobodnih radikala, a mogu da inhibiraju i rast nekih ćelija karcinoma (Souza i sar., 2015; Struck i sar., 2016). Rezultati naučnih studija ukazuju da ljudi koji konzumiraju pet obroka voća i povrća u toku dana imaju za oko 50 % manju šansu za razvoj nekih vrsta karcinoma (Ren i sar., 2003; Surh, 2003). Utvrđeno je da ekstrakti kupine moduliraju aktivnost jednog od glavnih medijatora inflamacije NF- κ B nakon simulirane bakterije infekcije u eksperimentima *in vitro* u humanoj monocitnoj ćelijskoj liniji (Paur i sar., 2008).

2.5.1. SLOBODNI RADIKALI I OKSIDATIVNI STRES

2.5.1.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali se mogu definisati kao bilo koja molekulska vrsta sposobna za nezavisno postojanje i koja sadrži nespareni elektron u atomskoj orbitali (Halliwell, 1990). Predstavljaju visoko reaktivne vrste, sposobne da u unutrašnjosti i na membranama ćelija oštete biološke molekule kao što su DNK, proteini, ugljenihidrati i lipidi. Oni mogu ili donirati elektron ili prihvatiti elektron iz drugih molekula, pa se ponašaju kao oksidanti ili reduktanti (Lobo i sar., 2010).

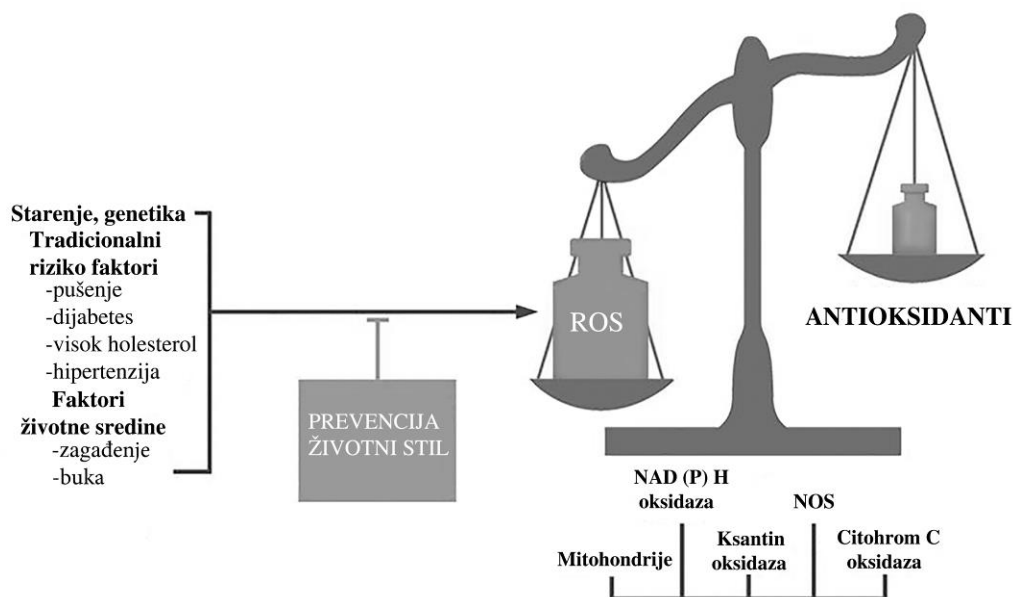
Porijeklo slobodnih radikala u ljudskom organizmu je raznovrsno, a to mogu biti endogeni izvori (mitohondrije, peroksizomi, endoplazmatski retikulum, fagocitne ćelije, itd.) i zagađivači iz vazduha, hemijski rastvarači, metabolički uzročnici (proces starenja, metabolizam, stres), hrana (aditivi, pržena hrana, alokohol i sl.), teški metali (željezo, bakar, cink i mangan), hlor, toksini, lijekovi i dr. (Phaniendra i sar., 2015). U ljudskom organizmu mitohondrije su glavni izvor slobodnih radikala. Superoksid anjon se stvara tokom autooksidacije ubisemihinona u prostoru unutrašnje membrane i matriksu mitohondrija. Takođe, vodonik peroksid formiran u mitohondrijama uključen je u redoks regulaciju ćelijskih signalnih puteva (Younes, 1999). Slobodni radikali mogu ući u reakciju na nekoliko načina, uključujući adiciju na dvostruku vezu, reakciju na nukleofilne grupe (tiolna, amino), oduzimanjem atoma vodonika od biomolekula i formiranjem dimera. Prisutna je i interakcija slobodnih radikala sa ćelijskim komponentama

(proteini, lipidi ili aminokiseline), što dovodi do formiranja sekundarnih radikala (Lobo i sar., 2010). Višak hidroksilnog radikala i peroksinitrita može izazvati peroksidaciju lipida, čime se oštećuju ćelijske membrane i lipoproteini. Ovakve promjene dovode do stvaranja malondialdehida (MDA) i konjugovanih dienskih jedinjenja, za koje se zna da su citotoksična i mutagena. Lipidna peroksidacija kao slobodno radikalska lančana reakcija se vrlo brzo širi i pogađa veći dio lipidnih molekula (Frei, 1997). Proteini se takođe mogu oštetiti oksidativnim stresom, podvrgavajući se konformacionim modifikacijama koje bi mogle da utvrde gubitak ili oštećenje njihove enzimske aktivnosti (Frei, 1997; Halliwell, 2006).

Kao što svi antioksidanti nisu dobri, tako ni svi slobodni radikali nisu loši, pa je prema tome život ravnoteža između ova dva hemijska pojma. Slobodni radikali u ljudskom tijelu obavljaju i mnoge važne funkcije, kontrolišu protok krvi kroz arterije, učestvuju u borbi protiv infekcija i signalizaciji molekula, npr. odgovorni su za uključivanje i isključivanje gena (Das Sarma, i sar., 2010; Halliwell, 2012). Prema tome može se reći da slobodni radikali i neradikalske reaktivne vrste imaju dvojaku prirodu koja je nedvosmisleno potvrđena (Đorđević i sar., 2008). Molekule koje nastaju iz proizvedenog superoksida ($O_2^{\cdot-}$) i azot oksida (NO^{\cdot}) enzimskom aktivnošću i inducibilne azot-monoksid-sintaze i NADPH oksidaze označavamo kao ROS (eng. *reactive oxygen species*) i RNS (eng. *reactive nitrogen species*). Kiseonikove slobodne vrste i reaktivne vrste azota su glavne komponente slobodno radikalskog sistema (Pala i Tabakçioğlu, 2007).

2.5.1.2. Oksidativni stres

Oksidativni stres se shvata kao stanje neravnoteže između fiziološke proizvodnje reaktivnih vrsta ROS/RNS i njihove eliminacije od strane organizma, jer u suprotnom dolazi do povećanja oksidativnog oštećenja organizma (Valko i sar., 2007). Termin "oksidativni stres" je prvi definisao Sies (1985), kao stanje u kome dolazi do poremećaja ravnoteže u odnosu prooksidanata/antioksidant. ROS se prirodno javljaju u ljudskom tijelu kao nusprodukti metabolizma, ako se ne uklone mogu da poremete puteve signalizacije ćelija i utiču na ekspresiju gena tako što modifikuju redoks status ćelije i utiču na konformaciju i funkciju proteina. Ljudsko tijelo posjeduje odbrambene mehanizme protiv oštećenja izazvanih slobodnim radikalima, kao što je "oksidativni stres", međutim, kumulativna oksidativna oštećenja dovode do nastanka raznih hroničnih bolesti (Halliwell, 2006). Oksidativni stres je jedan od glavnih uzroka oštećenja mitohondrijalne funkcije, oštećujući lipide, proteine, enzime oksidativne fosforilacije i DNK mitohondrija (Slika 20).



Slika 20. Grafički prikaz faktora oksidativnog stresa

Opšte je prihvaćeno da oksidacija membranskih lipida predstavlja jednu od ključnih faza u razvoju oksidativnog stresa. Oksidacija se nakon inicijacije (In), korak (1) u prisustvu molekularnog kiseonika nastavlja kao lančana reakcija sa koracima propagacija (2 i 3):

1. $\text{In}^\bullet + \text{RH} \rightarrow \text{InH} + \text{R}^\bullet$
2. $\text{R}^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{ROO}^\bullet$
3. $\text{ROO}^\bullet + \text{RH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{R}^\bullet$

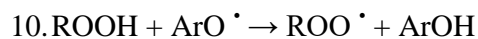
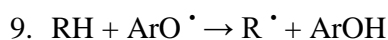
Direktan antioksidativni efekat fenolnih jedinjenja određen je u reakcijama sa reaktivnim vrstama kiseonika ili drugim radikalima, na inicijacijskom koraku (4), ili sa peroksil radikalima (ROO^\bullet) u toku propagacije, korak (5):

4. $\text{In}^\bullet + \text{ArOH} \rightarrow \text{InH} + \text{ArO}^\bullet$
5. $\text{ROO}^\bullet + \text{ArOH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{ArO}^\bullet$

Reakcije (4 i 5) mogu se odvijati preko nekoliko mehanizama. Uglavnom zavise od karakteristika rastvarača sa istim ukupnim odnosom reaktanata i proizvoda, ali se razlikuju u brzini hemijske reakcije (5 i 8). Fenoksil radikali (ArO^\bullet) se eliminišu u reakciji sa novonastalim ili postojećim fenoksil radikalom:

6. $\text{In}^\bullet + \text{ArO}^\bullet \rightarrow \text{ne radikali}$
7. $\text{ROO}^\bullet + \text{ArO}^\bullet \rightarrow \text{ne radikali}$
8. $\text{ArO}^\bullet + \text{ArO}^\bullet \rightarrow \text{ne radikali}$

Sposobnost fenola da djeluju kao antioksidanti za spijječavanje ili prekidanje lančane reakcije, a zavisi od odnosa konstanti brzine k_4/k_1 i k_5/k_3 , i njihove mogućnosti da ponovo uđu u korak propagacije:



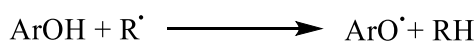
koji zavisi od odnosa konstanti $k_{9,10} / k_{6,7,8}$, i na taj način zavisi od stabilnosti fenoksil radikala (Alov i sar., 2015; Di Meo i sar., 2013). Stabilnost fenoksil radikala je objašnjena sposobnošću delokalizacije elektrona u više rezonantnih formi (Wang i sar., 2017).

Rezultati ukazuju da je oksidativni stres jedan od glavnih faktora u etiopatogenezi mnogih poremećaja uključujući karcinom, dijabetes, moždani udar, virusne infekcije, neurodegenerativne procese, infarkt, Alchajmerovu i Parkinsonovu bolest (Liu, 2004; Halliwell, 2006; Krishnamurthy i Wadhvani, 2012).

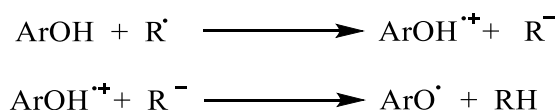
2.5.2. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST POLIFENOLNIH JEDINJENJA

Danas naučna javnost pokazuje sve veću zabrinutost u vezi sa upotrebom sintetičkih antioksidanta. Pokazalo se da imaju negativan uticaj na zdravlje ljudi, zbog svoje toksičnosti i karcinogenosti (Javanmardi i sar., 2003). Najčešće korišteni sintetički antioksidanti su: BHT, BHA, propil galat i terc butil-hidrohinon. Uprkos velikom broju dostupnih prirodnih i sintetičkih fenolnih i polifenolnih jedinjenja sa antioksidativnim/antiradikalnim svojstvima, postoji stalna potreba za razvojem novih antioksidanata poboljšanog kvaliteta i izolovanje takvih jedinjenja iz dostupnih prirodnih izvora. Dobrim antioksidantom se ne smatra samo onaj koji ima dobre efekte na zdravlje, nego treba razmisliti njegovu potencijalnu toksičnost, neželjene efekte i farmakokinetiku (Alov i sar., 2015). Mnoge studije ukazuju da u većini slučajeva, antioksidativna aktivnost biljaka potiče od jedinjenja kao što su flavoni, izoflavoni, flavonoidi i antocijani, a ne u najvećoj meri kao što je u tradicionalnoj medicini smatrano, od askorbinske kiseline (Farrukh i sar., 2012). Antocijani zbog visokog potencijala, te kao prirodni i bezopasni pigmenti, predmet su sve većeg broja studija u raznim oblastima, kao što su razvoj analitičkih metoda za njihovu izolaciju, identifikaciju i upotrebu u hrani i farmaceutskim proizvodima (Prior i sar., 2006; Ćujić i sar., 2013).

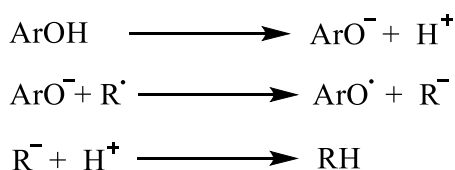
Polifenolna jedinjenja sadrže najmanje jednu hidroksilnu grupu (OH) koja je vezana za benzenski prsten i ima ulogu antioksidanta (Rojano i sar., 2008). Postoje tri predložena mehanizma djelovanja polifenola kao antioksidanata, prvi je HAT (*eng.* *H-atom transfer*), prenos H-atoma od polifenola do slobodnih radikala:



Drugi mehanizam je ET-PT (*eng. electron transfer–proton transfer*), koji se odvija u dva koraka, iniciran prenosom elektrona i praćen oslobađanjem protona:



Treći mehanizam je SPLET (*eng. sequential proton loss – electron transfer*) je obrnuti mehanizam u odnosu na ET-PT, a iniciran je gubitkom protona. Anjon polifenola prolazi elektronski transfer:



Tokom ovog procesa slobodan radikal uklanja atom vodonika iz antioksidanta (ArOH), koji postaje radikal i time se završava proces konvertovanjem radikala u stabilniji produkt i završavaju oksido lančanu reakciju redukcijom intermedijera u stabilan oblik (Di Meo i sar., 2013; Siti Azima i sar., 2014).

2.5.2.1. Antioksidativna aktivnost kupine

Pretpostavka je da postoji povezanost između ishrane bogatom antioksidantima i smanjenja oksidativnog oštećenja DNK. Prema tome prirodni antioksidanti mogu biti od uticaja na prevenciju nekih bitnih faktora u nastanku karcinoma (Lobo i sar., 2010; Limberaki i sar., 2012). U eksperimentima *in vitro* je dokazano da ekstrakti kupine imaju različita bioaktivna svojstva uključujući zaštitu od endotelne disfunkcije i vaskularne insuficijencije (Serraino i sar., 2003). Reyes-Carmona i saradnici (2005) su utvrdili antioksidativnu aktivnost kupina iz različitih klimatskih regiona na osnovu testova ORAC (*eng. Oxygen radical absorbance capacity*) i FRAP (*eng. Ferric reducing antioxidant power*), te visok stepen korelacija između antoksidativne aktivnosti i sadržaja ukupnih polifenola, antocijana i ukupne kiselosti. Monforte i saradnici (2018) su dokazali visoku antioksidativnu aktivnost uzoraka soka kupine na osnovu nekoliko antioksidativnih testova, a trend aktivnosti na osnovu potencijala je ORAC > TEAC > DPPH > FRAP. Sem navedenog, sok kupina je pokazao i snažan kapacitet inhibicije oksidacije linoleinske kiseline. Huang i saradnici (2012) su utvrdili aktivnost uzoraka kupine sa područja jugoistočnog dijela Kine prema ABTS i DPPH radikalima, a Manrique-Torres i saradnici (2016) snažan antioksidativni potencijal soka kupina sa područja Meksika. Milivojević i saradnici (2011) su

utvrdili da je veći antioksidativni potencijal plodova divljih kupine u odnosu na kultivisane sorte prema ABTS radikalima.

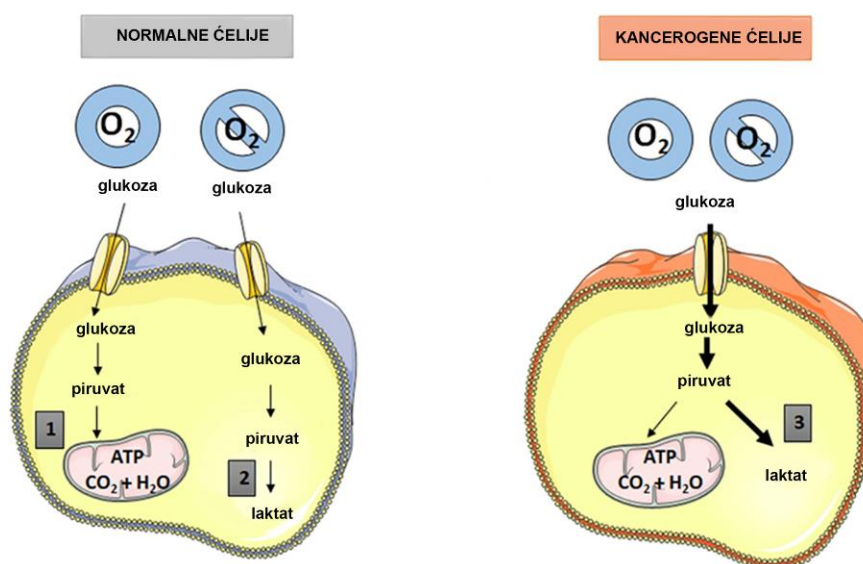
Feng i saradnici (2004) su metodom elektron spin rezonantne spektroskopije utvrdili da ekstrakti ploda kupine predstavljaju efikasno sredstvo za uklanjanje hidroksil radikala. Wang i Lin, (2000) su proučavajući uzorake soka nekoliko kultivisanih sorti kupine dokazali veći potencijal prema inhibiciji hidroksil radikala u poređenju sa ispitivanim uzorcima soka nekoliko sorti jagoda, malina, brusnica i borovnica.

Osim navedenog, veliki broj radova potvrđuje visoke korelacije između sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida i antocijana sadržanih u kupinama i antioksidativne aktivnosti utvrđene na osnovu različitih testova (Sariburun i sar., 2010; Dai i sar., 2009; Vulić i sar., 2011; Zhang i sar., 2012; Koczka i sar., 2018).

2.5.3. ANTIPROLIFERATIVNA AKTIVNOST POLIFENOLNIH JEDINJENJA

2.5.3.1. Pojam kancerogeneze

Kancerogeneza predstavlja višestepeni proces koji se sastoji od: inicijacije, promocije, progresije, invazije i metastaze. Ukoliko oštećena ćelija izbjegne reparaciju DNK, može doći do genetskih mutacija. Međutim, u slučajevima kada slobodni radikali uzrokuju štetu na molekulama kao što su lipidi, proteini i DNK, dolazi do nastajanja hroničnih bolesti kao što su kancer, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti (Maynard i sar., 2009; Liu, 2013). Ćelije raka, u poređenju sa normalnim ćelijama mnogo više zavise od unosa glukoze i za razliku od normalnih ćelija ispoljavaju naizgled energetski neefikasan metabolički put u kome odstupaju od glikolize čak i kada je kiseonik dostupan (Slika 21). Značajan dio glukoze preusmjeren je na biosintetske puteve kao energija za proliferaciju ćelija. Ovaj proces, još ranije je nazvan "aerobna glikoliza" ili Warburg efekat (Semenza, 2016; Keating i Martel, 2018).



Slika 21. Metabolizam glukoze u normalnim i ćelijama kancera, 1 - oksidativna fosforilacija, 2 - anaerobna glikoliza, 3 - aerobna glikoliza (Keating i Martel, 2018).

Ćelije kancera drže pod kontrolom metabolizam glukoze, jer produkti metabolizma utiču na inhibiciju proliferacije. Metabolizam je suštinski vezan za smrt ćelija, jer mitohondrije igraju centralnu ulogu u energetskom metabolizmu i apoptozi (Semenza, 2016). Apoptoza ili programirana smrt ćelija je jedan od mehanizama pomoću kojih ćelija aktivno, uz utrošak energije i sintezu određenih proteina pokreće vlastitu smrt kao sastavni dio fizioloških procesa ili kao odgovor na određena patološka stanja (Žlender, 2003). Apoptoza se aktivira kada broj neoplastičnih ćelija nadmaši broj normalnih ćelija zbog neispravnosti ili poremećaja u regulaciji

rasta. Prema tome, indukcija apoptoze ili hvatanje ćelija može biti odličan način za inhibiciju i napredovanja karcinogeneze, uklanjanje genetskih oštećenja i neoplastičnih ćelije iz tijela (Seeram i sar., 2006). Fagociti tokom fagocitoze brzo (jedan do dva sata) uklanjaju apoptotske ćelije (Žlender, 2003)

2.5.3.2. Antiproliferativna aktivnost kupine

Mnoga istraživanja ukazuju da polifenolna jedinjenja pokazuju antiproliferativane i anti-inflamatorne efekte, apoptozu i inhibiciju angiogeneze i metastaza u ćelijama raka (Manson, 2003; Dai i sar., 2009; Araújo i sar., 2011). Vjeruje se da su zdravstvena svojstva polifenola povezana sa njihovom sposobnosti da uklone i stabilizuju slobodne radikale - reaktivne vrste kiseonika (ROS) nastale tokom ćelijskog disanja (Middleton i sar., 2000; Ellidag i sar., 2013). Različite *in vitro* i *in vivo* studije sugerišu da se ovaj efekat može pripisati unosu visokih koncentracija flavonoida, koji su pokazali snažna hemoprotektivna svojstva modifikacijom zajedničkih signalnih puteva uključenih u karcinogenezu (Kuntz i sar., 1999; Manson, 2003; Van der Woude i sar., 2003; Barth i sar., 2005).

Osim što su potencijalni hvatači slobodnih radikala, flavonidi inhibiraju agregaciju trombocita i imaju antibakterijski, antivirusni, antiinflamatorni i antialergijski efekat (Yang i Liu, 2009; Liu, 2013). Takođe, smješe polifenola koje uključuju kvercetin na pikomolarnom ili nanomolarnom nivou smanjuju proliferaciju ćelija humanog karcinoma dojke (Cantero i sar., 2006; Vauzour i sar., 2010). Sem navedenog, kvercetin je opisan kao zaštitnik jetre od oksidativnog stresa inhibirajući proliferaciju ćelija i indukujući apoptozu (Masibo i He, 2008). Istraživanje je pokazalo da je orto-dihidroksifenilna struktura na B-prstenu aktivno mjesto pomoću koga se inhibira rast tumora i metastaza (Hou i sar., 2004). Posljednjih godina, zbog sve veće svijesti o zdravlju, ljudi su posvetili veliku pažnju ulozi antocijana u prevenciji tumora i terapiji raka zbog svojih ekstenzivnih izvora, niske citotoksičnosti i bezbjedne potrošnje (Lin i sar., 2016). Dokazano je da cijanidin-3-rutinozid indukuje akumulaciju peroksida koji su uključeni u indukciju apoptoze u HL-60 ćelijama (Feng i sar., 2004). Važno je naglasiti da prooksidativno djelovanje polifenola može biti važan mehanizam za njihova antikancerogena i apoptozna svojstva (Dai i sar., 2009).

Ekstrakti jedinjenja iz kupine posjeduju antiinflamatorna svojstva, snažno inhibiraju proizvodnju NO radikala bez citotoksičnosti, a takođe mogu da inhibiraju i rast ćelija raka debelog crijeva (Dai i Mumper, 2010). Uticaj ekstrakta kupine na efekat apoptoze je utvrđen prema ćelijskoj liniji adenokarcinoma debelog crijeva (HT-29), gdje je nakon određenog vremena uočeno smanjenje broja ćelija (Seeram i sar., 2006).

Dai i saradnici (2007, 2009) su u studiji u kojoj su koristili vodeni ekstrakt kultivisane sorte kupine u skraćenom vremenu djelovanja od 0,5 do 4 h utvrdili inhibitorno dejstvo ekstrakata prema rastu ćelijske linije adenokarcinoma debelog crijeva (HT-29). Zatim su utvrdili pozitivno dejstvo liofiliziranog ekstrakata i kaše tri različite sorte kultivisane kupine, na osnovu vrijednosti EC_{50} prema ćelijskim linijama adenokarcinoma debelog crijeva (HT-29), adenokarcinoma dojke (MCF-7) i ćelijskim linijama promijeloidne leukemije (HL-60), sa različitim intezitetom djelovanja.

Seeram i saradnici (2006) su proučavali uticaj ekstrakata kupine na inhibiciju rasta ćelijskih linija oralnog karcinoma (KB, CAL-27), adenokarcinoma dojke (MCF-7), adenokarcinoma debelog crijeva (HT-29, HCT116), humanog karcinoma prostate (LNCaP) i humanog karcinoma pluća. Feng saradnici (2004) su utvrdili značajnu inhibiciju proliferacije prema ćelijskim linijama karcinoma pluća (A549) kada su iste tretirane ekstraktom kupine. Smatra se da prisustvo antocijanina kupine ima ulogu u suzbijanju rasta ćelija raka na način da modifikuju signalizaciju ćelijskih puteva i ekspresijom aktiviranog proteina 1 (AP-1) i nuklearnog faktora κB (NF κB) koji reguliše proliferaciju ćelija i kontrolu ćelijskog ciklusa (Četojević-Simin i sar., 2015).

Hrana bogata antocijaninima može spriječiti nastajanje anti-mutagenih efekata usljed djelovanja ROS-a i slobodnih radikala, inhibiranjem tačkastih mutacija na somatskim ćelijama i na taj način pružiti zaštitu od nastajanja maligne mutacije (Lin i sar., 2016). Kvercetin ekstrahovan iz kupine pokazao je citotoksični efekat prema aktivno proliferativnoj ćelijskim linijama adenokarcinoma debelog crijeva (HT-29 i CaCo-2) (Baby i sar., 2017). Kim i saradnici (2015) su pokazali da je kvercetin smanjio broj održivih HT-29 ćelija za 81 % nakon inkubacije sa 100 mM tokom 96 sati.

2.5.4. ANTIHIPERGLIKEMIJSKA AKTIVNOST POLIFENOLNIH JEDINJENJA

U 2013. godini je procijenjeno da 382 miliona ljudi ima dijabetes i predviđa se, da će do 2035. godine taj broj iznositi 592 miliona (Guariguata i sar., 2014). Pravovremena dijagnoza dijabetesa tipa 2 je važna, jer rana intervencija može spriječiti mnoge komplikacije, uključujući neuropatiju, nefropatiju i retinopatiju. Međutim, dijagnoza je često teška jer se hiperglikemija razvija postepeno i u ranoj fazi, a pacijent ne primjećuje nikakve klasične simptome dijabetesa (Klein, 2014). Tokom vremena, dijabetes tipa 2 može dovesti do mnogih ozbiljnih problema, kao što su srčane bolesti, moždani udar, visok krvni pritisak, sljepilo, bolesti bubrega i bolesti nervnog sistema (American Diabetes Association, 2014).

Dijabetes se karakteriše relativnim ili apsolutnim nedostatkom lučenja insulina ili insulinskom rezistencijom koja uzrokuje hroničnu hiperglikemiju, uz poremećeni metabolizam ugljenih hidrata, lipida i proteina (Klein, 2014). Dijabetes tip 2 je najučestaliji oblik šećerne bolesti i čini oko 90 % svih slučajeva. Predstavlja poremećaj sa kompleksnom etiološkom pozadinom, a nastaje zbog različitih genetičkih i spoljnih faktora. Kod djece čiji roditelji su dobili dijabetes tipa 2, postoji povećan rizik za nastanak ove bolesti, a u slučajevima kada bolest imaju oba roditelja, rizik iznosi 40 % (Vrhovac i sar., 2008). β -ćelije najviše zastupljene u Langerhansovim ostrvcima (područja u pankreasu), izlučuju hormon insulin koji služi kao prenosilac glukoze iz krvi u ćeliju (Wang i sar., 2001). Dijabetes tipa 2 se javlja kada ćelije postanu rezistentne na insulin ili kada gušterača više ne proizvodi odgovarajuće količine insulina.

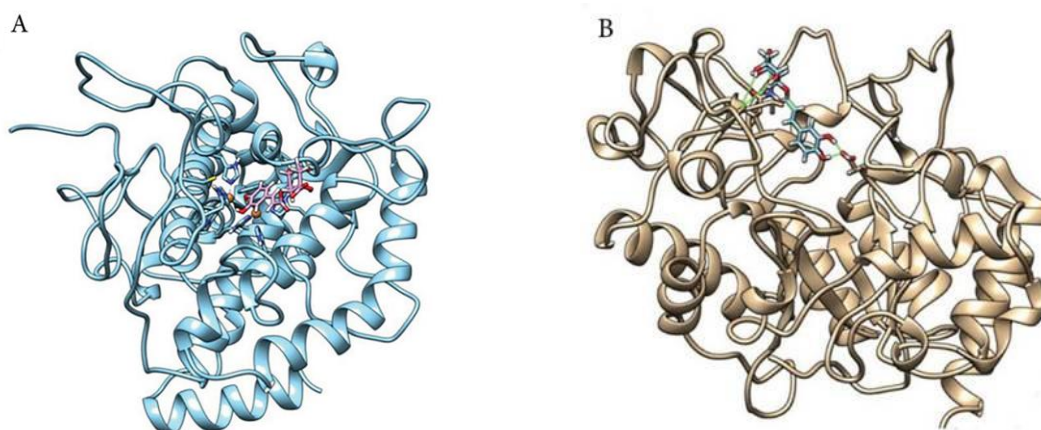
Smatra se da oksidativni stres izazvan hiperglikemijom u β -ćelijama pankreasa igra ključnu ulogu u razvoju dijabetesa (Kajimoto i Kaneto, 2004; Drews i sar., 2010). Hiperglikemija može direktno da uzrokuje povećano stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika (ROS). Glukoza može da podleže autooksidaciji i da stvara hidroksil radikale. Sem toga, glukoza neenzimski reaguje sa proteinima gradeći Amadori proizvode, što je praćeno formiranjem produkata glikolizacije. Reaktivne vrste kiseonika se generišu na više koraka tokom ovog procesa. U hiperglikemiji je pojačan metabolizam kroz poliolski put gdje je svakako jedan od rezultata pojačana produkcija $O_2^{\cdot-}$ (Turko i sar., 2001). Ovi izvori uključuju oksidativnu fosforilaciju glukoze, autooksidaciju NADPH oksidaze, lipooksigenaze, citohroma P450, monoooksigenaze i azot monoksid sintaze (NOS) (Valko i sar., 2007). Iako su dijabetes tip 1 i 2 potpuno različiti u svom nastanku i epidemiologiji, posljedice koje nastaju nakon njihovog dugog trajanja su veoma slične. Oba navedena tipa dijabetesa dovode do vaskularnih komplikacija čime se značajno narušava kvalitet života i povećava rizik od nastanka kardiovaskularnih bolesti (Garber i sar., 2002).

α -glukozidaza je enzim koji se nalazi u crijevnom traktu čovjeka i uključen je u završni korak digestije ugljenih hidrata (razgradnju skroba i disaharida do glukoze), dok je α -amilaza uključena u razgradnju dugolančanih ugljenih hidrata (Nair i sar., 2013; Čakar i sar., 2018; Wang i sar., 2012). Jedan praktični pristup smanjenja postprandijalne hiperglikemije je spriječavanje apsorpcije ugljenih hidrata nakon uzimanja hrane (Kwon i sar., 2006; Adisakwattana i sar., 2009). Inhibicijom hidrolizirajućih enzima kao što su α -amilaza i α -glukozidaza omogućava se smanjenje razgradnje ugljenih hidrata, a time se smanjuje i količina apsorbirana glukoze, što se može koristiti kao djelotvorna terapija za liječenje postprandijalne hiperglikemije (Tadera i sar., 2006; Bhosale i Hallale, 2011; Nair i sar., 2013). Prema tome, polifenoli u funkciji inhibitora enzima koji hidrolizuju ugljene hidrate (kao što su α -glukozidaza i α -amilaza) su korisni kao oralni lijekovi za kontrolu hiperglikemije, posebno kod pacijenata sa dijabetesom tipa 2.

2.5.4.1. Antihiperglikemijska aktivnost kupine

Sve veći broj epidemioloških istraživanja pokazuje, da ishrana bogata namirnicama sa visokim sadržajem fitohemikalija, visokim ukupnim antioksidativnim potencijalom i sadržajem polifenolnih jedinjenja može imati ulogu u smanjenju rizika od nastajanja dijabetesa (Bahadora i sar., 2013). Upotreba funkcionalnih namirnica i njihovih bioaktivnih komponenti se smatra novim pristupom u prevenciji i liječenju dijabetesa i njegovih komplikacija (Bahadoran i sar., 2013). Dokazano je da ishrana bogata polifenolima smanjuju nivo glukoze u krvi, povećavajući ranu sekreciju insulina i osetljivost na insulin (Williamson, 2013; Xiao i Hogger, 2015).

Rezultati su pokazali da inhibicija α -glukozidaze zavisi od položaja i broja OH grupa, i da postoji niz potencijalno efektivnih flavonoida čije djelovanje u velikoj mjeri zavisi od malih varijacija u strukturi (Proenca i sar., 2017). Takođe se pokazalo da fenolne kiseline imaju antihiperglikemijska svojstva (Kwon i sar., 2006; Adisakwattana i sar., 2009), formiraju vodonične veze sa specifičnim aminokiselinama na aktivnim mjestima enzima (Slika 22) (De Sales i sar., 2012).



Slika 22. Pozicioniranje hlorogenske kiseline: (A) α -glukozidaze, (B) α -amilaze (Mocan i sar., 2017)

Kaume i saradnici (2012) su objavili rezultate istraživanja o zaštitnom efektu antocijana na vaskularni sistem dijabetičara. Generisanje reaktivnih vrsta kiseonika i slobodnih radikala se ubrzava kao posljedica dijabetesa. Prema tome, sposobnost polifenola iz voća da inhibira slobodne radikale može biti korisno u pogledu minimiziranja posljedica izazvanih dijabetesom (Wang i sar., 2012). Veći dio potencijalno zaštitnih polifenola jagodastog voća ne mogu da uđu u cirkulaciju i utiču na ćelijske interakcije, već ostaje u gastrointestinalnom traktu (GIT) i prolaze do debelog crijeva gdje su predmet biotransformacije mikrobiotom debelog crijeva (Boath i sar., 2012). Kupine predstavljaju dobar izvor polifenolnih jedinjenja sa antihiperглиkemijskom aktivnosti, i u korelaciji su sa antioksidativnom aktivnosti i sadržajem ukupnih polifenola, te se mogu smatrati funkcionalnom hranom (Manach i sar., 2004; Gowd, 2018). Parmar i Rupasinghe (2015) su došli do zaključka da su ekstrakti divlje kupine prirodni inhibitori α -amilaze i α -glukozidaze, na način da ograničavaju probavu skroba. Tumbas Šaponjac i saradnici (2014) su utvrdili sposobnost inhibicije α -glukozidaze ekstraktima dobijenih nakon presanja tropa dve kultivisane sorte kupine (Čačanska bestrna i Thornfree), i dobru korelaciju između sadržaja ukupnih antocijana, cijanidin-3-glukozida i sposobnosti inhibicije α -glukozidaze. Navedene tvrdnje su u saglasnosti sa navodima Pojer i saradnici (2013) da antocijani stupaju u interakciju sa proteinom adiponektinom koji je opozit insulinu i jedan od najvažnijih adipocitokina. U slučaju gojaznosti i inzulinske rezistencije, lučenje ovog proteina je smanjeno, a antocijani mogu djelovati na njegovo lučenje kako bi spriječili gojaznost i nastanak dijabetesa. Isti autori dalje navode da prehrambeni antioksidanti, uključujući i antocijane štite β -ćelije pankreasa od oksidativnog stresa izazvanog glukozom. Osim toga je utvrđeno da antocijani iz bobičatog voća ulaze u β -ćelije pankreasa i stimulišu izlučivanje insulina (Jayaprakasam i sar., 2005).

2.5.5. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST POLIFENOLNIH JEDINJENJA

U literaturi postoje brojni podaci o antimikrobnoj aktivnosti polifenolnih jedinjenja, međutim, teško je utvrditi vezu između biološke aktivnosti, sadržaja polifenola i antimikrobne aktivnosti zbog korištenja različitih metoda određivanja, kao i još uvijek malog broja urađenih studija (Shan i sar., 2007). Čelijski zidovi Gram negativnih (G^-) i Gram pozitivnih (G^+) bakterijskih sojeva su različiti. Čelijski zidovi kod (G^-) bakterijski sojeva se sastoje od tankog sloja peptidoglikana i spoljne membrane, koja je sastavljena od fosfolipidnog dvosloja i proteina, a na spoljnom omotaču sadrži lipopolisaharide. Kod (G^+) bakterijskih sojeva čelijski zidovi nemaju spoljašnju membranu, sastavljeni su od debelog sloja peptidoglikana i lipotehojske kiseline (Brown i sar., 2015). Sloj peptidoglikana čelijskog zida bakterija je neophodan za vitalnost bakterija, i to je najvažnije mjesto za interakcije sa antibioticima (Nohynek i sar., 2006).

Treba napomenuti da su gljivične infekcije jedan od glavnih problema vezanih za naš svakodnevni život (Ansari i sar., 2013), a da su neke vrste kao što je *Aspergillus flavus* toksične i mogu kontaminirati prehrambene proizvode mikotoksinima (Medeiros i sar., 2011). *Candida albicans* je patogeni kvasac i čest je stanovnik crijevne flore kod ljudi. Jedna je od rijetkih vrsta iz roda *Candida* koja uzrokuje kandidiazu kod ljudi kao rezultat prekomjernog rasta gljivice (Lekshmi, 2015). Otkrivena je u gastrointestinalnom traktu i ustima kod 40 do 60 % zdravih odraslih osoba.

Utvrđeno je da polifenoli dobijeni iz biljnih ekstrakata koristeći različite rastvarače pokazuju efekat na inhibiciju rasta micelija *P. Cinnamomi* (Castillo-Reyes i sar., 2015). Većina gljivice razvija otpornost na antifungalne lijekove koji su trenutno u upotrebi, međutim neki od njih pokazuju i toksično dejstvo na ljudski organizam. Prirodna polifenolna jedinjenja su se pokazala kao veoma moćni antifungalni agensi sa manjim ili nikakvim toksičnim efektom na ljudski organizam. Mogu se koristiti kao antifungalni agensi, ali i sa lijekovima sa kojima ostvaruju sinergistički efekat (Ansari i sar., 2013).

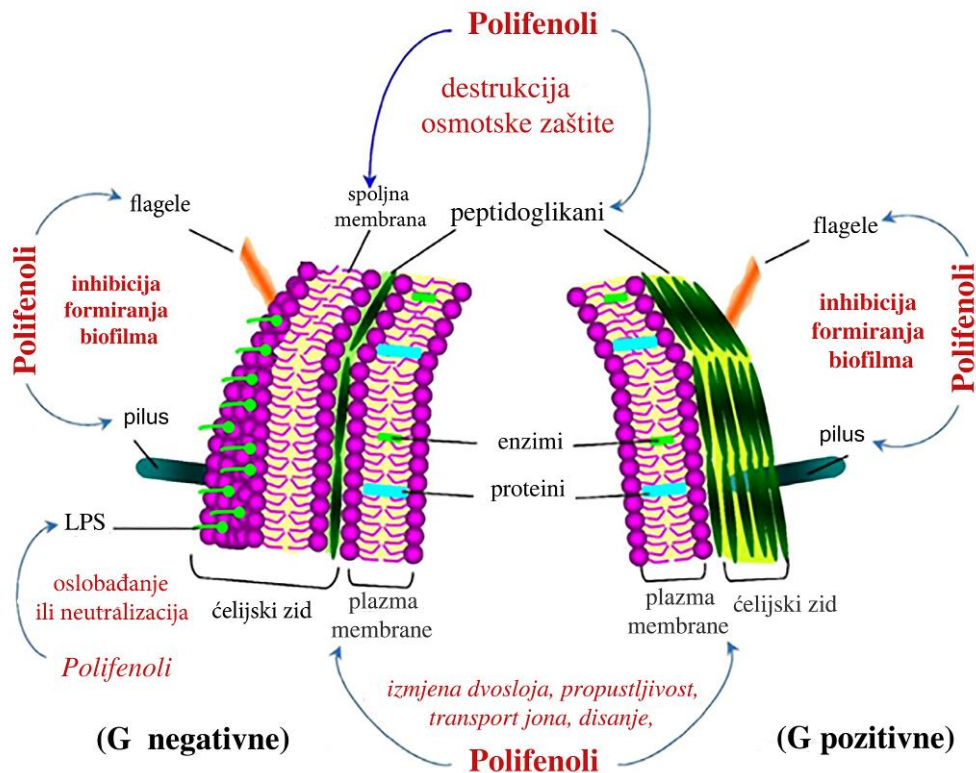
Mehanizmi antibakterijskog dejstva polifenolnih komponenti uključuju: oštećenje citoplazmatske membrane, inhibiciju sinteze nukleinskih kiselina, inhibiciju energetskog metabolizma (uzrokovanu inhibicijom NADH citohrom c-reduktaze i inhibicijom ATP sintetaze), inhibiciju sinteze čelijskog zida i inhibiciju sinteze čelijske membrane (Cushnie i Lamb, 2011; Chinnam i sar., 2010). Delehanty i saradnici (2007) su u svojoj studiji mehanizam inhibicije bakterijskog rasta pripisali vezivanju lipopolisaharida ćelija (G^-) bakterija za frakcije proantocijanidina izolovanih iz kupine. Veliki broj je istraživanja koja ukazuju na antimikrobnu aktivnost pojedinih polifenolnih komponenti rutina, kafene kiseline, vanilinske i galne kiseline, naringina, kvercetina i miricetina (Mandalari i sar., 2007; Vaquero i sar., 2007). Antibakterijska

aktivnost polifenola može biti i zbog sposobnosti ovih jedinjenja da heliraju željezo koje je neophodno za opstanak skoro svih vrsta bakterija (Field i Lettinga, 1992). Kao moguće objašnjenje još se ističe vezivanje (prijanjanje) tanina za površinu bakterijske ćelije i njihovu interakciju sa pojedinim enzimima (Scalbert i Williamson, 2000). Strukture fenolnih jedinjenja su takve da mogu difundovati kroz mikrobnu membranu i na taj način uticati na metaboličke puteve unutar ćelija; ometanjem sinteze ergosterola, glukana, hitina, proteina i glukozamina u ćelijama gljivica (Brul i sar., 1999). Zhao i saradnici (2002) su pokazali da je epigalokatehin galat sposoban da se direktno veže za peptidoglikan iz *S. aureus*, i time smanji toleranciju ćelije na spoljašnji uticaj jona i nizak osmotski pritisak. Takođe, ukazuju da se epigalokatehin galat veže za (G^+) bakterije (direktno) i (G^-) bakterije (indirektno), na peptidoglikanske zidove ćelija. Ovu teoriju su potvrdili i Cui i saradnici (2012), te su pokazali da epigalokatehin galat indukuje morfološke promjene u ćelijskim zidovima (G^-) bakterija u zavisnosti od količine oslobođenog vodonik peroksida. Terpenoidni fenoli kao što je karvakrol, prisutan u origanu i nekim drugom biljnim vrstama eteričnih ulja deluju kao moćni antifungalni agensi i deluje na širok spektar patogena kao što su *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* (Rao i sar., 2010). Polifenoli mogu da stupaju u interakciju sa mikrobiomom, kada crijevna flora transformiše mnoge polifenole modulirajući njihovu bioaktivnost, a takođe i polifenoli mogu modulirati kompoziciju mikrobioma (Marchesi i sar., 2016). Herrera i saradnici (2010) su korištenjem agar mikrodilucione metode utvrdili da su polifenoli: kvercetin, miricetin i kaempferol izolovani iz poropolisa inhibirali rast *Candida albicans*, te da ima antifungalni efekat.

2.5.5.1. Antimikrobna aktivnost kupine

Različiti tipovi i sorte kupine pokazali su *in vitro* antibakterijsku aktivnost prema širokom spektru bakterija (Radovanović i sar., 2013; González i sar., 2013; Grabek-Lejko i Wojtowicz, 2014; Oliveira i sar., 2016; Turker i sar., 2016). Intenzitet antimikrobnog efekta zavisi od vrste ekstrakta (voda, etanol, metanol, etil acetat, i dr.), kao i koncentracije ekstrakta. U većini eksperimenata je utvrđeno da su (G^+) sojevi bakterija podložniji efektu ekstrakata nego (G^-) sojevi, što je objašnjeno razlikama u strukturi ćelijskog zida (Nikaido, 2003). Antimikrobna aktivnost ekstrakta kupine je u korelaciji sa sadržajem različitih polifenolnih jedinjenja, posebno antocijana i elagitanina (González i sar., 2013; Lipińska i sar., 2014). Sadržaj antifungalnih komponenti u različitim dijelovima biljaka u velikoj mjeri zavisi od vanjskih uticaja i napada patogena (Grayer i Kokubun, 2001; Cushnie i Lamb, 2011). Savremena literatura ukazuje da polifenoli reaguju sa proteinima i/ili fosfolipidima iz lipidnog dvosloja. Kod bakterijskih sojeva (G^+) i (G^-) interakcija sa membranskim proteinima uzrokuje poremećaj lipidnog dvosloja i time

se povećava permeabilnost membrane, što utiče na fluidnost membrane, inhibiciju disanja i promjene procesa prenosa jona (slika 23) (Nazzaro i sar., 2013).



Slika 23. Moguća interakcija polifenola sa komponentama ćelijskog zida i plazma membranom G^- i G^+ bakterija (Papuc i sar., 2017)

Krstić (2018) u svom radu navodi da kupine u poređenju sa ostalim ispitivanim vrstama voća porodice *Rosaceae* (maline, trešnje, višnje i aronije) pokazuju najdjelotvorniju aktivnost prema najvećem broju ispitivanih mikroorganizama.

2.6. TEHNOLOŠKE KARAKTERISTIKE I UPOTREBA KUPINE

2.6.1. KVALITET I PROIZVODI OD KUPINE

Hemijski sastav određuje prehrambena (nutritivna) svojstva, odnosno biološku vrijednost voća i povrća (Jašić, 2007). Najvažnije komponente hemijskog sastava koje definišu kvalitet i tehnološku vrijednost sirovine su: voda, sadržaj ugljenih hidrata, kiseline, bojene, aromatične, pektinske i mineralne materije, vitamini i proteini (Niketić-Aleksić, 1988; Veličković, 2000; Zhao, 2007). Voda predstavlja oko 90 % jestivog dijela kupine, ostalo čine ugljeni hidrati, masti, proteini, organske kiseline, bojene, mirisne i pektinske materije, vitamini, enzimi i mineralne materije (Veličković, 2000; Mišić i Nikolić, 2003).

Kupina kao voće nije pogodna za duže čuvanje u svježem stanju, te se odmah nakon branja zamrzava ili prerađuje u gotove proizvode. U industrijskoj proizvodnji od kupina se dobijaju poluproizvodi (pulpa, kaša, sirovi voćni sok) i gotovi proizvodi (žele, matični sok, džem, marmelada, drugi voćni sokovi, kompot, voćne salate), a proizvode se i specijalna vina, sirće i slični proizvodi. Sve tehnološke operacije (promjene na voću) koje se vrše kako bi se formirao i očuvao željeni kvalitet tipičan za dati proizvod zajednički čine tehnološki postupak. Kao posebno važna osobina ploda kupine smatra se čvrstoća, od koje u znatnoj mjeri zavisi transport i upotreba plodova. Pri izboru sorti više se cijene kupine koje imaju čvrste plodove (Mratinić, 2015), a tvrdoća plodova zavisi od sorte kupine, kao i stepena zrelosti, klimatskih i vremenskih uslova u toku same berbe. Takođe, gledano sa ekonomske strane mnogo je isplativije izvoziti i prodavati gotove proizvode, umjesto sirovih plodova voća (Bushman i sar., 2004).

Najveće količine kupina u industriji se koristi za preradu u koncentrisane voćne sokove, džemove i marmeladu. Nažalost, boja soka je podložna degradaciji, što rezultira smeđkastom bojom (Zhao, 2007). Takođe, tokom postupka proizvodnje sokova od kupine primjećen je značajan gubitak elagitanina, u prosjeku od 70 – 82 %, u odnosu na količine koje su prisutne u svježem plodu. Razlog ovome može biti to što se tokom filtracije gube sjemenke koje su bogate elagitaninima (Hager i sar., 2008). Utvrđeno je i da tokom liofilizacije i sušenja bobičastog voća dolazi do gubitka antocijana (82 - 94 %) i vitamina C (84 - 89 %) (Sadowska, 2017).

2.6.2. SPOREDNI PROIZVODI PRERADE KUPINE

Tokom prerade kupine u neke od brojnih proizvoda u industriji zaostaju značajne količine tropa, posebno tokom proizvodnje matičnog soka i vina. Trop koji zaostaje kao otpad, sastoji se uglavnom od sjemenki, pokožice i vlakana, i kao takav predstavlja privlačan potencijalni izvor biološki aktivnih jedinjenja. U industriji ostaje najčešće neiskorišten i predstavlja kako ekonomski tako i ekološki problem, jer se radi o otpadu koji je podložan mikrobiološkoj razgradnji. Direktivom 1999/31/EZ o deponovanju otpada definisano je sljedeće: postepeno smanjivanje količine odlaganja biorazgradivog otpada na deponijama u odnosu na referentnu godinu. Jedno od načela iz direktive glasi: "Proizvođač otpada, prethodni imaoc otpada, odnosno imaoc otpada treba snositi troškove mjera upravljanja otpadom, a finansijski je odgovoran za sprovođenje mjera uklanjanja otpada zbog štete koju je prouzrokovao ili bi je mogao prouzrokovati". Iz navedenog možemo zaključiti da će se u narednom periodu prehrambena industrija suočavati sa sve većim izazovima prilikom odlaganja otpada, zbog zakonskih ograničenja.

Treba napomenuti da se trop ne može direktno koristiti kao hrana za životinje, jer je siromašan proteinima i previše kiseo, svarljivost mu je niska zbog prisustva većih količina polifenola za koje je poznato da inhibiraju enzim celulazu, proteolitičke enzime i rast nekih bakterija buraga. Uglavnom se odlaže na slobodno zemljište koje vremenom poprima novi karakter (Zhao, 2007).

2.6.2.1. ISKORIŠTENJE I UPOTREBA TROPA KUPINE

Trop kao sirovina predstavlja značajan izvor polifenolnih jedinjenja i prehrambenih vlakana, za koja je utvrđeno da imaju pozitivan efekat na ljudsko zdravlje. Da bi se ova jedinjenja izdvojila iz biljnog materijala koriste se organski rastvarači koji moraju zadovoljiti određene uslove. Izbor najprikladnijeg rastvarača zavisi od njegove selektivnosti, sposobnosti razdvajanja, cijene, toksičnosti, hemijske i termičke stabilnosti. Čvrsto-tečna ekstrakcija je jednostavna, efikasna i popularna tehnika prenosa masa, koja se koristi za izdvajanja polifenola iz voća. Prehrambena industrija, kao i mali prerađivači pokazuju u posljednje vrijeme sve veće interesovanje za iskorištenjem zaostalog biljnog materijala (tropa). Prema tome, ekstrakcijom tropa kupine bi se dobio proizvod čija bi upotreba bila moguća u obogaćivanju prehrambenih proizvoda (vino, sokovi, voćni jogurt, konditorski proizvodi). Ekstrakcijom tropa otvara se nova mogućnost izdvajanja bioaktivnih sastojaka koji zaostaju u tropu zbog slabije rastvorljivosti u vodi. Neke sorte imaju manji sadržaj šećera, te tokom zamrzavanja i prerade plodova dolazi do njihove depigmentacije. U eksperimentima *in vitro* je utvrđeno da na stabilnost antocijana kao nosioca boje utiče veći broj činilaca kao što su temperatura, pH i koncentracija šećera u

plodovima (Iora i sar., 2015; Souza i sar., 2015). Da bi se trop mogao iskoristiti potrebno je obratiti pažnju na temperature sušenja tropa, karakteristike rasvarača i temperaturu pri kojoj se vrši ekstrakcija, kako bi se očuvao kvalitet i sadržaj polifenolnih jedinjenja.

Moguća upotreba tropa u industriji kao nove sirovine povećala bi asortiman proizvoda od jagodastog voća na tržištu, a samim tim i poboljšala ekonomiju prerade ovog voća. Ekstrakcija bioaktivnih jedinjenja iz sporednih proizvoda industrijske prerade voća jedan je od načina njihovog iskorištenja. Postupkom ekstrakcije se mogu izdvojiti i sačuvati značajne količine antocijana, koji mogu poslužiti kao prirodne boje u prehrambenoj industriji. U prehrambenoj industriji najčešće se koriste ekstrakti antocijana u svojstvu aditiva – boja. Sirovine koje su najpogodnije za dobijanje pigmenata su ostaci tropa koji zaostaje nakon izdvajanje soka u prehrambenoj industriji. Različite zemlje imaju različita ograničenja u regulatornim aspektima za boje u hrani. Evropska unija dopušta korištenje antocijana kao boje i vodi ih pod E-brojem (E163) (Zhao, 2007). Takođe, moguća je i upotreba sjemenki, s obzirom da sadrže biološki vrijedne sastojke kao što su elaginska kiselina, tokoferoli, nezasićene masne kiseline i dr. (Bushman, i sar., 2004). Sjemenke jagodastih vrsta predstavljaju važan izvor esencijalnih masnih kiselina, a po sadržaju kod kupina je dominantna α -linolenska kiselina (35,2 - 35,3 %) (Parry i Yu, 2004) i malina (29,1- 32,4 %) (Oomah i sar., 2000).

U industriji prerade voća se razlikuju dva načina koji definišu iskorištenje sirovine (upotrebljivi i neupotrebljivi dio, odnosno otpad). Tokom tehnološkog procesa u industriji voća zaostaju značajne količine tropa, koji se uglavnom odbacuje ili se samo djelimično koristi kao stočna hrana. U razvijenim zemljama Evropske unije već odavno se primjenjuje industrijska simbioza, a podrazumjeva iskorištenje sporednih proizvoda jedne industrijske grane u novim proizvodnim procesima u drugoj oblasti, i jedan je od najefikasnijih načina iskorištenja potencijalno vrijednih sporednih proizvoda (Costa i sar., 2010). Polisaharidi, uključujući celulozu, pektin i škrob, uobičajeni su materijali za izradu jestivih i biorazgradivih filmova i drugih vrsta materijala za pakovanje. Ekstrakti tropova se koriste za proizvodnju jestivih filmova koji daju jedinstvene karakteristike (prirodan okus i boju voća), koje drugi materijali za izradu filma nemaju. Tropovi koji sadrže sjemenke i pokožicu se mogu koristiti direktno kao osnovne sirovine za pravljenje biorazgradivog materijala za pakovanje različitih namirnica i neprehrambene proizvode (Zhao, 2007).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimenti za potrebe ove disertacije su rađeni u laboratoriji za Biohemiju, Hemiju hrane i Mikrobiologiju hrane Tehnološkog fakulteta, Univerziteta u Banjoj Luci, laboratoriji za Organsku hemiju Tehnološkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu i laboratoriji za ćelijske kulture Instituta za onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici, u saradnji sa Medicinskim fakultetom u Novom Sadu.

3.1. HEMIKALIJE I REAGENSI

Hemikalije i reagensi korišteni u eksperimentalnom radu su bili analitičke i veće čistoće. Etanol, metanol, dimetil-sulfoksid (DMSO), natrijum-karbonat, sumporna kiselina, hlorovodonična kiselina, aluminijum (III)-hlorid, natrijum-acetat, vodonik peroksid, gvožđe (III)-hlorid, amonijum-acetat, metafosforna kiselina, mravlja kiselina, vodonik-peroksid, askorbinska kiselina, sirćetna kiselina, pufer pH 1 (KCl/HCl), korišteni su od proizvođača: Zorka, Šabac (Srbija), Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, Czech Republic) i J.T. Baker (Deventer, Netherlands). Folin-Ciocalteu reagens, kvercetin, (+) – katehin, (–) – epikatehin, galna kiselina, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kiselina (troloks), hlorogenska kiselina, gvožđe (II)-hlorid, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS), butil-hidroksitoluen (BHT) korišteni su od proizvođača: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Acros Organics (New Jersey, USA). Hranjivi bujon, Hranjivi agar, Mueller-Hinton agar i Mueller-Hinton bujon, korišteni su od proizvođača Liofilchem, S.r.l. (Italy). Diskovi osjetljivi na antibiotike (Ampicillin (10 µg), Gentamicin (10 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Erythromycin (15 µg) su korišteni od proizvođača Mast Group Ltd. (UK). Za atomsku apsorpcionu spektrofotometriju su korišteni sertifikovani rastvori vodonik peroksid 30 % (Fisher Chemical,) i azotna kiselina 69 % (J.T Baker, za analizu tragova metala, SAD). Ostale hemikalije i reagensi upotrebljeni u eksperimentalnom dijelu, a koji nisu navedeni, bile su analitičke čistoće.

3.2. BILJNI MATERIJAL

Istraživanje je sprovedeno na četiri sorte kupine sa dvije različite lokacije, od čega su dvije samonikle i dvije kultivisane sorte (Čačanska bestrna i Chester Thornles). Kupine su sakupljene u periodu avgust – septembar, na dva lokaliteta sjevero-zapadnog dijela Bosne i Hercegovine, lokacija Verići (44.9244° N, 17.0026° E) i lokacija Javorani (44.6110° N, 17.2605° E). Uzorci su ručno brani u stanju tehnološke zrelosti, a sve hemijske analize su odrađene u roku

od 48 časova od momenta branja plodova, a u međuvremenu su skladišteni u frižideru na temperaturi od +4 °C. Uzorci tropa i matičnog soka za potrebe istraživanja su dobijeni izdvajanjem iz plodova kupine pomoću komercijalnog sokovnika (Coral PJ 500, Fagor, Španija).

Uzorci u radu su označeni kao: S-sok, a uzorci ploda i tropa su označeni kao EP – ekstrakt ploda i ET – ekstrakt tropa, 1 - lokacija Javorani, 2 - lokacija Verići, p – pitoma (kultivisana) i d-divlja kupina.

3.3. DOBIJANJE EKSTRAKATA PLODA I TROPA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

Ekstrakcija uzoraka (ploda i tropa kupine) je urađena metodom po *Soxhlet-u* 80 % etanolom (v/v) uz refluks u trajanju od 6 časova. Postupak ekstrakcije je ponovljen tri puta za svaki od uzoraka. Nakon ekstrakcije, uparavanje uzoraka do suha vršeno je u rotacionom vakuum uparivaču (Rotavapor, Devarot, Slovenija) na temperaturama do 50 °C. Prinos nakon ekstrakcije je izražen kao masa (g) suvog ekstrakta na 100 g svježeg uzorka (%). Ekstrakti dobijeni na ovaj način su čuvani u tamnim bočicama, u frižideru na temperaturi od +4 °C. Dobijeni uzorci ekstrakta su bili smolaste konzistencije, dobro rastvorljivi u etanolu i metanolu.

3.4. ODREĐIVANJE OSNOVNOG HEMIJSKOG SASTAVA PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

Za osnovne hemijske analize uzoraka (ploda, soka i tropa), korištene su standardne hemijske metode Official Methods of Analysis of AOAC (AOAC 1990; AOAC 2000). Na osnovu navedenih metoda određeni su: suva materija (AOAC 925.09), sirova vlakna (AOAC 991.42), ukupna kiselost (AOAC 942.15) i ukupan pepeo (AOAC 923.03). Sadržaj ukupnih šećera je određen metodom prema *Luff-Schoorl-u*, baziranoj na jodometriskom određivanju Cu^{2+} jona (Egan i sar., 1981). Određivanje askorbinske kiseline u uzorcima je izvršeno u skladu sa metodom po *Tillmans-u*, modifikovana po *Vuilleumeir-u* za jako obojene rastvore (AOAC 967.21). Kvantitativni i kvalitativni sadržaj mineralnih materija je određen pomoću metodomatomske apsorpcione spektrometrije (AAS).

3.5. ODREĐIVANJE SADRŽAJA MINERALNIH MATERIJA U PLODU, TROPU I SOKU KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

Sadržaj mineralnih materija u ispitivanim uzorcima određen je spektrofotometrijskom analizom (Optima 8000 Optical Emission Spectrophotometer (ICP OES), Perkin Elmer, USA). Za pripremu uzoraka je korištena metoda mikrotalasne digestije.

3.6. ODREĐIVANJE HEMIJSKIH ELEMENATA U PLODU, TROPU I SOKU KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

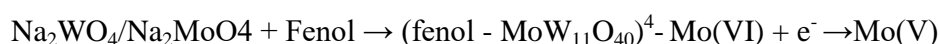
Da bi se odredili hemijski elementi u tragovima korištena je zatvorena kvarcna kiveta i mikrotalasna peć (Ethos D, Milestone S.r.l., Italija). Analitičkom vagom su odvagani uzorci u količini od $0,5 \pm 0,001$ g i preneseni u kivetu za digestiju, uz dodatak koncentrovane HNO_3 i rastvor 30 % vodonik-peroksida. Digestija je vršena primjenom temperaturnog programa u skladu sa preporukom proizvođača. Nakon završenog programa digestije, sadržaj kiveta je sa dejonizovanom vodom provodljivosti $0,056 \mu\text{S}/\text{cm}$, dobijenom pomoću sistema Tehcnosam model TCPO 200 (Subotica, Republika Srbija), kvantitativno prenesen u plastične epruvete sa čepom od 10 ml. Dobijeni rastvori su korišteni za određivanje koncentracija hemijskih elemenata (kalijuma, natrijuma, kalcijuma, magnezijuma, fosfora, gvožđa, bakra, cinka, mangana i selen).

Za kalibraciju instrumenta korišten je *CRM Instrument Calibration standard 2* (Perkin Elmer, USA, LOT CL12-111YPY 1) za koncentracije elementa 100 mg/l (Pb, Cd, As, Co, Ni, Cr, Se, Cu, Zn, Fe, Ca, Na, Mg, P, K, Mn, Mo). Koncentracije elemenata za kalibracioni pravac su bile različite, određivane su prema preliminarnim mjerenjima za određivane metale.

3.7. ODREĐIVANJE SADRŽAJA POLIFENOLNIH JEDINJENJA U PLODU, TROPU I SOKU KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

3.7.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Sadržaj ukupnih polifenola (TP – eng. *total polyphenols*) u uzorcima je određen u skladu sa spektrofotometrijskom metodom *Folin Ciocalte*-u (Wolfe i sar., 2003). Metoda je zasnovana na mjerenju redukujućeg kapaciteta polifenolnih jedinjenja tokom koga dolazi do redukcije *Folin-Ciocalte*-u reagensa, u reakciji:



Tokom reakcije nastaje intenzivno plavo obojenje, čiji je intenzitet proporcionalan količini fenolnih jedinjenja. Intenzitet plavog obojenja je mjereno spektrofotometrijski, na talasnoj dužini kod 765 nm.

Radne probe za uzorke ekstrakata ploda i tropa su pripremljene u koncentracijama od 250 mg/ml u 80 % etanolu (v/v). Uzorci matičnog soka su pripremljeni razrjeđenjem u odnosu 1:5 sa 80 % etanolom (v/v). Za izradu kalibracione krive korištena je serija rastvora galne kiseline u koncentraciji 0 – 500 µg/ml za slijepu probu. Mjerenje apsorbanca je vršeno na talasnoj dužini od 765 nm. Rezultati sadržaja ukupnih polifenola u ispitivanim uzorcima su predstavljeni kao mg ekvivalenta galne kiseline po g suve mase ploda/ekstrakta (mg GAE/g), odnosno kod soka kao mg ekvivalenta galne kiseline po ml soka (mg GAE/ml).

3.7.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida (TF – eng. *total flavonoids*) u uzorcima je određen spektrofotometrijskom metodom (Woisky i Salatino, 1998). Metoda je zasnovana na formiranju kompleksa između flavonoida i aluminijum hlorida, tako da nastaje stabilan kiseli kompleks sa keto grupom u položaju C4 i hidroksilnom grupom flavonoida u položajima C3 i C5, koji ima maksimum apsorpcije na 420 nm.

Radne probe za uzorke ekstrakata ploda i tropa su pripremljene u koncentracijama od 250 mg/ml u 80 % etanolu (v/v). Uzorci matičnog soka su pripremljeni razrjeđenjem u odnosu 1:5, sa 80 % etanolom (v/v). Za izradu kalibracione krive je korištena serija rastvora kvercetina u koncentraciji 0 - 50 µg/ml uz slijepu probu. Mjerenje apsorbanca je vršeno na talasnoj dužini od 420 nm. Rezultati sadržaja ukupnih flavonoidi u uzorcima su predstavljeni kao ekvivalenti kvercetina po g suve mase ploda/ekstrakta (mg Qc/g), odnosno kod soka kao mg ekvivalenta kvercetina po ml soka (mg Qc/ml).

3.7.3. Određivanje sadržaja ukupnih flavonola

Sadržaj ukupnih flavonola (TFI – eng. *total flavonols*) u uzorcima određen je spektrofotometrijskom metodom (Yermakov i sar., 1987). Metoda je zasnovana na principu da aluminijum hlorid sa C4 keto grupom i C3 ili C5 hidroksilnom grupom flavonola formira stabilan kiseli kompleks koji ima maksimum apsorpcije od 440 nm.

Radne probe za uzorke ekstrakata ploda i tropa su pripremljene u koncentracijama od 250 mg/ml u 80 % etanolu (v/v). Uzorci matičnog soka su pripremljeni razrjeđenjem u odnosu 1:5, sa 80 % etanolom (v/v). Za izradu kalibracione krive je korištena serija rastvora kvercetina u koncentraciji 0 - 50 µg/ml uz slijepu probu. Mjerenje apsorbananci je vršeno na talasnoj dužini od 440 nm. Rezultati sadržaja ukupnih flavonola u uzorcima su predstavljeni kao ekvivalenti kvercetina po g suve mase ploda/ekstrakta (mg Qc/g), odnosno kod soka kao mg ekvivalenta kvercetina po ml soka (mg Qc/ml).

3.7.4. Određivanje sadržaja ukupnih i monomernih antocijana

Ukupni antocijani (TAc) su određeni primjenom "pH single" metode kod rastvora pH 1.0 i monomerni antocijanin (TMAc) primjenom "pH-diferencijalne" metode kod pH 1.0 i pH 4,5 (Guisti i Wrolstad, 2001). Metoda je zasnovana na karakteristikama antocijana da podliježu reverzibilnim strukturnim promjenama sa promjenom pH rastvora, kod pH 1,0 su crveno obojeni (nalaze se u obliku oksonijum jona, dok su kod pH 4,5 bezbojni (nalaze se u poluketalnom obliku). Degradacija monomernih antocijana nastaje pod uticajem različitih faktora kao što su: temperatura, kiseonik, askorbinska kiselina i sl. Antocijani se međusobno povezuju i sa drugim prisutnim jedinjenjima i tako formiraju kondenzacione proizvode degradacije. U toku degradacije koncentracija monomernih antocijana opada, a nastaju kondenzacioni proizvodi koji su stabilniji nego monomerni (slobodni) antocijani.

Radne probe za uzorke ekstrakata ploda i tropa su pripremljene tako što su na analitičkoj vagi odmjerene količine od 500 mg uzorka. Uzorci matičnog soka su odmjereni u zapremini od 2 ml. Uzorci su nakon toga ostavljeni u normalan sud od 20 ml i ekstrahovani sa 20 ml rastvora metanol/HCl na temperaturi 20 °C, u toku 24 h. Nakon toga je smjesa filtrirana preko filter papira i uzorci su dopunjeni puferom pH 1, zatim i pH 4,5, i ostavljeni na sobnoj temperaturi 15 minuta, te su izmjerene apsorbance na 500 i 700 nm (zbog korekcije zamućenja). Kao slijepa proba je korišten metanol. Koncentracija ukupnih antocijana je izračunata prema formuli:

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

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

$$A_{uk} = (A_{510} - A_{700}) pH_1;$$

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

$F = 20$ (faktor razblaženja ekstrakta, kao i faktor razblaženja matičnog soka);

$\varepsilon = 26\ 900$ dm³mol⁻¹cm⁻¹ lcm-1mol-1 (molarni kefijent apsorpcije cijanidin-3-O-glukoziida);

$l = 1$ cm (debljina kivete).

Koncentracija nedegradiranih (monomernih) antocijana (mg/l) u ekstraktu izračunata je prema formuli:

$$C_{mon} \text{ (mg/l)} = (A_{mon} \times M \times F \times 1000) / (\varepsilon \times l);$$

gdje je A_{mon} - apsorbancija razblaženog ekstrakta, koja je izračunata prema formuli:

$$A_{mon} = (A_{500} - A_{700}) pH_1 - (A_{500} - A_{700}) pH_{4,5};$$

konstante su iste kao i u prethodnoj formuli.

Rezultati ukupnih i monomernih antocijana, sadržaj antocijana u ekstraktima predstavljeni su kao ekvivalenti cijanidin-3-glukoziida po g suve mase ploda/ekstrakta (mg Cy/ml), kod soka kao mg ekvivalenta cijanidin-3-glukoziida po ml soka (mg Cy/ml).

Izračunavanje indeksa degradacije antocijana je izvršeno je na osnovu formule:

$$ID = C_{uk} / C_{mon}$$

Indeks degradacije pokazuje stepen razgradnje antocijana. Veće vrijednosti indeksa degradacije (ID) ukazuju na veću degradaciju antocijana, dok su manje vrijednosti za (ID), pokazuju manju degradaciju i veću očuvanost monomera antocijana.

3.7.5. Određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja HPLC metodom

Suvi ekstrakti plodova i tropova kupine (50 mg) ekstrahovani su u zatvorenim polipropilenskim epruvetama sa 1 ml 50 % metanola na ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 15 min. Sokovi kupine (100 µl) su pomješani sa 900 µl 50 % metanola u trajanju od 15 min, na ultrazvučnom kupatilu. Nakon ekstrakcije, dobijena ekstrakciona smjesa je profiltrirana kroz 0,2 µm špic filter sa teflonskom (PTFE) membranom (ANOTOP 10 Plus, "Whatman", Mejdston, Engleska).

3.7.5.1. Identifikacija i kvantifikacija polifenolnih kiselina i flavonoida HPLC metodom

Identifikacija i kvantifikacija polifenolnih jedinjenja u ekstraktima tropova, plodova i sokova kupine izvršena je tečnom hromatografijom visoke rezolucije (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) na uređaju Shimadzu Prominence (Shimadzu, Kioto, Japan), koji sadrži LC-20AT binarnu pumpu, CTO-20A termostat i SIL-20A automatski dozator povezan sa SPD-20AV UV/Vis detektorom.

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 korišten je sistem rastvarača: A (acetonitril) i B (1 % mnavlja kiselina) pri protoku od 1 ml/min i primjenom sljedećeg 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 rastvoreni u 50% metanolu. Hromatogrami su snimljeni pri različitim talasnim dužinama: 280 nm za derivate hidroksibenzojeve kiseline (galna, protokatehinska, vanilinska i siringinska kiselina) i za elaginsku kiselinu, katehin i epikatehin, 320 nm za derivate hidroksicimetne kiseline (kafena, sinapinska i vanilinska kiselina) i 360 nm za flavonoide (rutin, miricetin).

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

3.7.5.2. Identifikacija i kvantifikacija antocijana HPLC metodom

Identifikacija i kvantifikacija antocijana u ekstraktima tropova, plodova i sokova kupine izvršena je tečnom hromatografijom visoke rezolucije (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) na uređaju Shimadzu Prominence (Shimadzu, Kioto, Japan), koji sadrži LC-20AT binarnu pumpu, CTO-20A termostat i SIL-20A automatski dozator povezan sa SPD-20AV UV/Vis detektorom.

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 % mnavlja kiselina) i B (acetonitril) pri protoku od 1 ml/min. Primjenjen je isti linearni gradijent kao i za identifikaciju. Hromatogrami su snimljeni kod 520 nm. Kvantifikacija antocijana izvedena je primjenom jedinog dostupnog standardnog jedinjenja cijanidin-3-*O*-glukozida, a sadržaj antocijana u uzorcima je izražen kao

ekvivalent cijanidin-3-*O*-glukozida (mg CyGE/g suvog ekstrakta ploda/tropa, odnosno mg CyGE/100 ml soka).

3.7.6. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

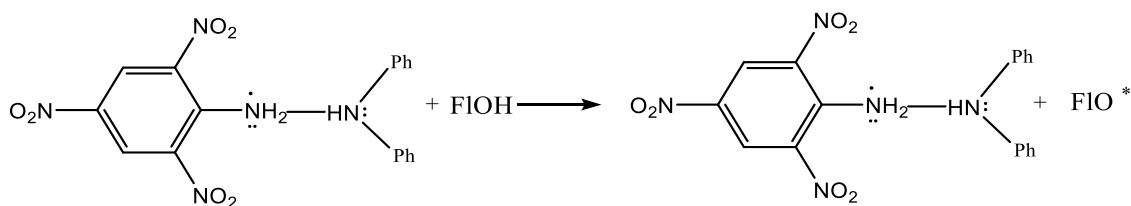
Većinu metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti karakteriše određivanje sposobnosti ispitivanog jedinjenja ili proizvoda da ukloni slobodne radikale i/ili kompleksne metalne jone koji pokreću oksidacione procese (Tirzitis i Bartosz, 2010). U stručnoj literaturi nalazimo više testova koje se koriste za ispitivanje aktivnosti antioksidanata u sastojcima hrane ili biološkim uzorcima, a temelje se na principima prenosa elektrona (Dasgupta i Klein, 2014). Najčešće korišteni testovi *in vitro* studijama koje srećemo u literaturi su DPPH•, FRAP i ABTS^{•+} test, od kojih su dva korištena u ovom radu.

ABTS^{•+} i DPPH• testovi su široko korištene metode za procijenu antioksidativne aktivnosti prirodnih proizvoda kao što su biljni ili prehrambeni ekstrakti. Predstavljaju spektrofotometrijske metode bazirane na uklanjanju stabilnih obojenih radikala kada su prisutni u složenim biološkim smješama, na osnovu promjene boje, koja je u korelaciji sa koncentracijom "antioksidanata" u uzorku (Huang i Wong, 2013; Sujarwo i Keim, 2019).

3.7.6.1. DPPH test

Antioksidativni kapacitet uzoraka da inhibiraju 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikale je određen spektrofotometrijskom metodom (Liyana-Pathiranan i Shahidi, 2005). Rezultati za antioksidativni kapacitet uzoraka prema DPPH• su predstavljeni kao IC₅₀ vrijednosti. IC₅₀ je definisan kao potrebna količina uzroka (ekstrakata ploda/tropa ili matičnog soka) da redukuje 50 % početne koncentracije DPPH radikala.

Metoda je zasnovana na mjerenju sposobnosti antioksidanata da redukuju ljubičasto obojen rastvor 2,2 – difenil - 1- pikrilhidrazil (DPPH) radikala do bezbojnog hidrazina (DPPH-H) (Slika 24). Step en obezbojavanja ukazuje na antioksidativnu sposobnost pripremljenih uzoraka (Ramalakshmi i sar, 2009). Antioksidanti u reakciji sa slobodnim radikalima prekidaju lančane reakcije oksidacije donirajući vodonik iz hidroksilne grupe polifenola (Naidu i sar., 2008).



Slika 24. DPPH-radikal u reakciji sa flavonoidima

Radne probe za uzorke ekstrakata ploda i tropa su pripremljene u koncentracijama 0 – 500 µg/ml u 80 % etanolu (v/v). Uzorci soka su pripremljeni u koncentracijama 0 - 20 mg/ml u 80 % etanolu (v/v). Kao referentni antioksidant je korišten Trolox u koncentracijama 0 – 500 µg/ml, pripremljen u 80 % etanolu (v/v). Matični rastvor za DPPH je pripremljen kao 1,5 mmol/l DPPH sa 99,96 % metanolom, od koga su za svaku analizu pripremljeni radni rastvori 0,135 mmol/l DPPH u metanolu. Kao kontrolni rastvor je korištena smjesa u kojoj je umjesto ispitivanog uzorka dodata destilovana voda. Za slijepu probu je korišten 99,96 % metanol. Nakon pripreme smjese vršena je inkubacija rastvora na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta. Mjerenje je vršeno spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 515 nm.

Na osnovu dobijenih rezultata za apsorbanca ispitivanog uzorka i apsorbanca kontrole izračunate su I_{DPPH} (%) vrijednosti za sve pripremljene uzorke, primjenom jednačine:

$$I_{DPPH} (\%) = \frac{(A_{kontrol} - A_{uzorak}) \times 100}{A_{kontrol}}$$

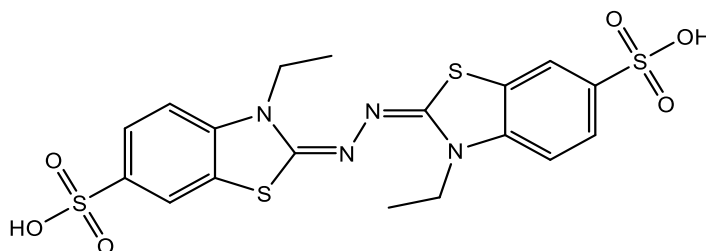
gdje su: $A_{kont.}$ - apsorbanca kontrolnog rastvora; $A_{uz.}$ - apsorbanca uzorka.

Na osnovu dobijenih vrijednosti I_{DPPH} (%) i na osnovu tačno određenih koncentracija uzoraka, konstruisan je dijagram kako bi se odredila jednačina pravca kalibracione krive: prva, apsorpcija u funkciji koncentracije uzoraka i druga, apsorpcija u funkciji koncentracije Trolox-a. Na osnovu linearnog dijela jednačina pravca, linearnom regresijom izračunate su vrijednosti IC_{50} za svaki od uzoraka.

3.7.6.2. ABTS test

Sposobnost ispitivanih uzoraka da neutrališu ABTS radikale ($ABTS^{*+}$) je određen spektrofotometrijskom metodom (Re i sar., 1999). Rezultati za antioksidativni kapacitet uzoraka prema $ABTS^{*+}$ su predstavljeni kao IC_{50} vrijednosti.

Metoda je zasnovana na mjerenju sposobnosti uzoraka da redukuju dugo živeći ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) katjon radikal (Slika 25), na način da antioksidant iz uzorka preda H atom slobodnom radikal.



Slika 25. β,β'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)

Tokom reakcije redukcije ABTS radikala se zeleno plava boja rastvora obezbojava, odnosno radikalski oblik prelazi u neradikalski (Dasgupta i Klein, 2014).

Radne probe za uzorke ekstrakte ploda i tropa su pripremljene u koncentracijama 0 – 100 µg/ml u 80 % etanolu (v/v). Uzorci soka su pripremljeni u koncentracijama 0 – 1,5 mg/ml u 80 % etanolu (v/v). Kao referentni antioksidant je korišten Trolox u koncentracijama 0 – 100 µg/ml, pripremljen u 80 % etanolu (v/v). ABTS radikal je dobijen u reakciji sa kalijum persulfatom, tako što je rastvor nakon pripreme ostavljen na temperaturi 4 °C u intervalu 12 - 16 časova. Kao kontrolni rastvor je korištena smješa u kojoj je umjesto ispitivanog uzorka dodata destilovana voda. Kao slijepa proba korišten je 99,96 % metanol. Nakon pripreme smjese izvršena je inkubacija rastvora na sobnoj temperaturi u trajanju od 7 minuta. Mjerenje je vršeno spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 734 nm.

Na osnovu dobijenih rezultata za apsorbance ispitivanog uzorka i apsorbance kontrole izračunate su I_{ABTS} (%) vrijednosti za sve pripremljene uzorke, primjenom jednačine:

$$I_{ABTS} (\%) = \frac{(A_{kontrol} - A_{uzorak}) \times 100}{A_{kontrol}}$$

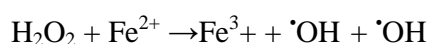
gdje su: $A_{kont.}$ - apsorbanca kontrolnog rastvora; $A_{uz.}$ - apsorbanca uzorka.

Na osnovu dobijenih vrijednosti I_{ABTS} (%) i na osnovu ispitanih koncentracija uzoraka konstruisan je dijagram kako bi se odredila jednačina pravca kalibracione krive. Na osnovu linearnog dijela jednačina pravca, linearnom regresijom izračunate su vrijednosti za IC_{50} za svaki od uzoraka. IC_{50} je definisan kao potrebna količina uzorka (ploda/tropa ili matičnog soka) da redukuje 50% početne koncentracije $ABTS^{*+}$ radikala.

3.7.6.3. Neutralizacija uticaja hidroksil radikala ($\cdot OH$)

Sposobnost ispitivanih uzoraka da neutrališu hidroksil radikale ($\cdot OH$) određena je spektrofotometrijskom metodom (Gutteridge i sar., 1987; Nađpal, 2017). Rezultati sposobnosti neutralizacije ispitivanih uzoraka prema hidroksil radikalima su predstavljeni kao IC_{50} vrijednosti.

Metoda se zasniva na mjerenju stepena degradacije 2-deoksi-D-riboze pod uticajem hidroksil radikala ($\cdot OH$) generisanog u Fentonovoj reakciji:



Ispitivanje sposobnosti hvatanja hidroksil radikala od strane ispitivanih uzoraka vršeno je nakon što je generisan $\cdot OH$ u sistemu Fe^{3+} - askorbat - EDTA - H_2O_2 . Nastali reaktivni $\cdot OH$ u prisustvu 2-deoksiriboze i kiseonika grade malonildialdehid koji se određuje u testu sa tiobarbituratnom kiselinom (TBA test). Test je zasnovan na određivanju inteziteta kompleksa

(ružičaste boje) spektrofotometrijskim putem, koji nastaje nakon reakcije MDA (malonildialdehida) sa dva molekula TBA.

Radne probe za uzorke ekstrakte ploda/tropa su pripremljene u koncentracijama 0 – 500 µg/ml u 80 % etanolu (v/v). Uzorci matičnog soka su pripremljeni u koncentracijama 0 – 10 mg/ml u 80 % etanolu (v/v). Kao referentni antioksidant je korišten BHT, pripremljen u koncentracijama 0 – 0,05 mg/ml u 80 % etanolu (v/v). Kao slijepa proba je korištena destilovana voda. Nakon pripreme rastvor je zagrijana na 37 °C i inkubiran 60 min, te nakon toga dodata smjese EDTA/TBA i rastvor zagrijan na 100 °C još 10 minuta. Za svaku analizu uzorka i kontrole rađena je paralelna korekcija. Mjerenje apsorbanci je vršeno na talasnoj dužini od 532 nm.

Iz razlike apsorbancije radne probe (A_{rp}) i korekcije (A_{kor}) izračunate su apsorbancije (A) za svaku koncentraciju ispitivanog ekstrakta kao i za kontrolu:

$$A = A_{rp} - A_{kor}$$

Sposobnost neutralizacije hidroksil radikala I_{OH} (%) pripremljenih uzoraka (ekstrakata ploda/tropa ili matičnog soka) izračunat je na osnovu formule:

$$I_{OH} (\%) = (1 - A/A_{kon}) \times 100 \%$$

gdje je A_{kon} apsorbanca kontrolne probe (razlika između apsorbance kontrole i korekcije kontrole).

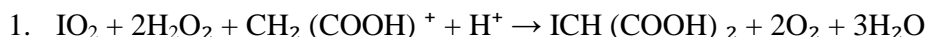
Na osnovu dobijenih vrijednosti I_{OH} (%) i tačno određenih koncentracija uzoraka, konstruisan je dijagram kako bi se odredila jednačina pravca kalibracione krive. Na osnovu linearnog dijela jednačina pravca, linearnom regresijom izračunate su vrijednosti za IC_{50} za svaki od uzoraka. IC_{50} je definisan kao potrebna količina uzroka (ekstrakata ploda/tropa ili matičnog soka) da redukuje 50 % početne koncentracije hidroksilradikala.

3.7.6.4. Metoda *Brigs-Rauscher*-ovih oscilatornih reakcija

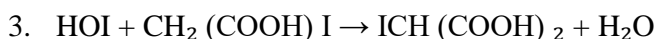
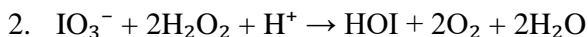
Briggs-Rauscher (BR) oscilatorne reakcije su korištene za ispitivanje antioksidativne aktivnosti (Prenesti i sar., 2005). BR oscilatorne reakcije su pogodne kao analitičke metode za mjerenje relativnog antioksidativnog kapaciteta *in vitro*, kod čistih jedinjenja i ekstrakata hrane kod niskog pH, kao što je pH u digestivnom traktu ljudi. Ova metoda ima mnoge prednosti u odnosu na druge metode (analize su povoljnije, brže, a neophodni reagensi i uređaji se najčešće koriste u svim laboratorijama) (Dacić i Gojak-Salimović, 2016).

BR oscilatorni sistem se sastoji od vodenog rastvora sa tačno određenim koncentracijama vodonikovog peroksida, jodne kiseline, manganove (II) soli i malonske kiseline, uz škrob kao indikator. Glavni intermedijeri u reakcijama su jodidni jon, oksojodne vrste HOI, HOIO i IO[•] i hidrogenperoksidni radikal HOO[•] (De la Rosa i sar., 2010).

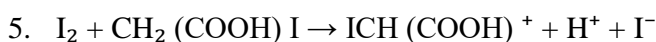
Promjena boje u oscilatornom sistemu se objašnjava promjenama u koncentracija I_2 i I^- , kao u reakciji:



Reakcija (1) je izvedena iz sledeće dvije reakcije:



Tokom ovog procesa, promjene u koncentraciji jodida mogu se primjetiti kao promjena boje u rastvoru zato što se reakcija (3) odvija u dva koraka:



Žuta boja se javlja zbog formiranja molekule joda (I_2) (Dacić i Gojak-Salimović, 2016). Metoda BR oscilatornih reakcija se zasniva na sposobnosti da analizirane komponente mjenjaju kinetičke parametre hemijskih reakcija, tokom čega uzrokuju inhibiciju i promjene boje u određenim vremenskim intervalima (bezbojno – žuto – tamno plavo), a zavisi od koncentracije ispitivanog uzorka (Pejić i sar., 2012; Marković i sar., 2015). Antioksidanti u rastvoru dovode do trenutnog prestanka oscilacija, a nakon tzv. vremena inhibicije, oscilacije se ponovo ponavljaju (De la Rosa i sar., 2010). Vrijeme inhibicije je u linearnoj zavisnosti od vrste antioksidanta i njegove koncentracije.

Radni rastvor je pripremljen u skladu sa Prenesti i saradnici, 2005. Radne probe za uzorke ekstrakata ploda i tropa su pripremljene u koncentracijama 1,5 - 5 mg/ml u 80 % etanolu (v/v). Uzorci matičnog soka su pripremljeni tako što su napravljena razblaženja (1:10, 1:12, 1:15 i 1:20) u 80 % etanolu (v/v). Kao referentni antioksidant je korišten Trolox u koncentracijama 0 – 30 μ g/ml u 80 % etanolu (v/v). Nakon pripreme rastvora, reakciona posuda je postavljena na magnetnu mješalicu (300 o/min), a zatim su predviđenim redoslijedom dodati prethodno pripremljeni rastvori. Nakon druge pojave modrog obojenja reakcione smjese dodate su različite koncentracije uzoraka, u količini od 100 μ l, te je mjereno vrijeme inhibicije, odnosno vrijeme do ponovne pojave plavog obojenja. Na osnovu izmjerenih vrijednosti inhibicije za trolox i ispitivane uzorke, izračunata su vremena inhibicije ($t_{inh.}$), primjenom jednačine:

$$t_{inh.} = (t - t_0)$$

gdje su: $t_{inh.}$ - apsorbanca kontrolnog rastvora; $t_{inh.}$ - apsorbanca uzorka.

Na osnovu izmjerenih vrijednosti t_{inh} i poznatih koncentracija trolox-a konstruisana je kalibraciona kriva iz koje su dobijene jednačine pravca: $y = ax + b$ i $y = cx + d$.

Iz dobijenih jednačina pravca očitane su vrijednosti i prikazani rezultati kao μg trolox/mg ploda ili ekstrakta i μg trolox/ml soka.

3.8. BIOLOŠKI POTENCIJAL PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

3.8.1. Određivanje antiproliferativne aktivnosti ploda, tropa i soka kultivisane i divlje kupine

Uticaj ispitivanih uzoraka na intenzitet proliferacija određen je kolorimetrijskim SRB testom (Skehan i sar., 1990), koju su modifikovali Četojević-Simin i saradnici (2015).

3.8.1.1. Kulture ćelijskih linija

Humane tumorske ćelijske linije: HeLa (epitelni karcinom cerviksa), MCF7 (adenokarcinom dojke), MRC-5 (normalni fetalni fibroblasti pluća) i HT-29 (adenokarcinom debelog crijeva) su korišteni za određivanje antiproliferativnog efekta ekstrakata ploda/tropa i matičnog soka ispitivanih uzoraka kupine. Ćelijske linije su kultivisane u *Dulbecco* modifikovanom *Eagle's* medijumu (DMEM; PAA Laboratories GmbH, Pasing, Austrija), sa dodatkom 4,5 % glukoze i dopunjeni sa 10 % temperaturno inaktiviranog fetalnog (telećeg) seruma (FCS; PAA Laboratories GmbH, Pasing, Austrija), 100 IU/ml pencilina i 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomicina (Galenika, Beograd, Srbija). Sve ispitivane ćelijske linije su uzgajane u posudama za kulture 25 cm^3 (Corning, New York, USA) na 37 °C u atmosferi od 5 % CO_2 , na visokoj relativnoj vlažnosti i subkultivisane dva puta nedeljno. Suspenzije pojedinačnih ćelija su dobijene upotrebom 0,1 % tripsina (Serva, UK) sa 0,04 % EDTA.

3.8.1.2. Priprema uzoraka

Uzorci koji su korišteni za ispitivanje antiproliferativnog efekta su rastvoreni u DMSO i dalje razblaženi u DMSO (u pet radnih koncentracija), gdje su ekstrakti pripremljeni u opsegu koncentracija: 125 - 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, a uzorci matičnog soka razblaženjem 20 – 320 puta.

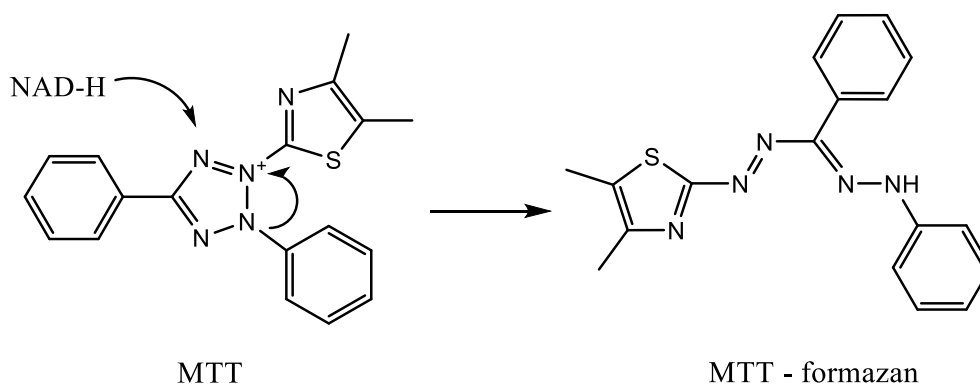
Suspenzije ćelija gustine od 4×10^3 ćelija po otvoru su postavljene u mikrotitar ploče sa 96 otvora (Sarstedt, Newton, NC, USA) u zapremini od 199 μl , i preinkubirane u kompletnom mediju sa 5 % FCS, na 37 °C tokom 24 sata. Pripremljene serije uzoraka su dodate u količini 1 μl po otvoru. Umjesto uzorka u kontrole je dodata ekvivalentna količina rastvarača. Konačna

koncentracija DMSO u uzorcima je bila < 0,5 % (v/v). Nakon toga su mikrotitar ploče inkubirane na 37 °C tokom 48 h.

3.8.1.3. Sulphorhodamine B (SRB) test

Fluorescentna anjonska boja SRB se u blago kiseloj sredini elektrostatički vezuje za pozitivno naelektrisane 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 određuje se ćelijski rast.

Ćelije su nakon inkubacije fiksirane sa 50 % TCA (1 h, + 4 °C), i isprane destilovanom vodom (Vellvash 4; Labsystems; Helsinki, Finska) i bojen sa 0,4 % SRB (30 min. na sobnoj temperaturi). Ploče su zatim isprane sa 1 % sirćetnom kiselinom da bi se uklonila nevezana boja. Boja vezana za proteine je ekstrahovana sa 10 mM Tris baze.



Slika 26. Redukcija MTT reduktazom do formazina

Absorbance rastvora su mjereni na čitaču mikroploča (Multiscan Ascent, Labsystems) kod 540 i 620 nm. Antiproliferativni efekat, odnosno efekat na rast ćelija izražen je kao procenat kontrole i izračunat kao:

$$K(\%) = (At/Ac) \times 100 (\%),$$

gdje je At apsorbancija test uzorka i Ac apsorbancija kontrole.

Antiproliferativna aktivnost je prikazana kao IC₅₀ vrijednost (koncentracija uzorka kod koga je ćelijski rast inhibiran za 50 %). Ova vrijednost je očitana iz krivih zavisnosti ćelijskog rasta, odnosno od finalne koncentracije uzorka/standarda dobijenih polinomskom regresionom analizom.

3.8.2. Antihiperглиkemijska aktivnost ploda, tropa i soka kultivisane i divlje kupine

Uticaj ekstrakata ploda/tropa i matičnog soka ispitivanih uzoraka kupine na antihiperглиkemijski efekat (inhibiciju aktivnosti α -glukozidaze) određen je modifikovanom metodom prema Chan i saradnicima (2010). Metoda je zasnovana na mjerenju porasta apsorbance od 405 nm, koja potiče od 4-nitrofenola oslobođenog iz 4-nitrofenil- α -D-glukopiranozida nakon 10 minuta inkubacije sa ispitivanim uzorkom na 37 °C.

Za ispitivanje je korišten rastvor 2mM (4-nitrofenil- α -D-glukopiranozid), odnosno (3,01 mg u 5 ml pufera, pH 7), zatim rastvor enzima α -glukozidaze (1,35 mg enzima u 1 ml fosfatnog pufera), od koga je odmjereno alikvot od 40 μ l u posudu od 10 ml koja je dopunjena do crte.

Za ovaj test je pomješano 5 mg uzorka sa 1 ml pufera na vorteksu u toku jednog minuta, a potom je napravljeno odgovarajuće razblaženje uzoraka. Reakcione smjese su pripremljene u otvorima mikrotitar ploča na sljedeći način: 100 μ l supstrata je pomješano sa 20 μ l uzorka i 100 μ l rastvora enzima. Apsorbance su izmjerena na 405 nm, prije i nakon inkubacije 10 minuta na 37 °C i upoređene sa kontrolnom apsorbancom za izračunavanje antihiperглиkemijske aktivnosti. Potencijal inhibicije (%) je izračunat na osnovu jednačine:

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

gdje su $\Delta A_{\text{kontrola}}$ i ΔA_{uzorka} razlike apsorbanci reakcione smjese kontrole i sa uzorkom prije dodatka enzima i nakon 10 minuta inkubacije sa enzimom.

Slijepa proba kontrole se sastojala od 100 μ l supstrata i 120 μ l pufera. Kontrola se sastojala od 100 μ l supstrata, 20 μ l pufera i 100 μ l enzima, slijepa proba za uzorak od 100 μ l supstrata i 100 μ l pufera. Slijepa proba kontrole i uzorka se nije pripremala u triplikatu (samo jedan otvor). Apsorbance kontrole i uzorka su mjerene u triplikatu (tri otvora), a od njih su oduzete vrijednosti za odgovarajuće slijepe probe.

3.9. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

Antibakterijska aktivnost je ispitana metodom difuzije u agaru sa bunarčićima (Balouiri i sar., 2016; Valgas i sar., 2007). Za testiranje antibakterijske aktivnosti su odabrane dvije bakterijske vrste: gram negativna *Escherichia coli* (ATCC 25922) i gram pozitivna *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Bakterijske kulture su pripravane uzgojem na hranljivom agaru (HA) 24 sata na 37°C. Nakon toga *E. coli* je precjepljena na HB, a *S. aureus* na hranljivi agar (HA) naredna 24 sata na 37°C. Kulture su za testiranje ezom prenošene na Mueller-Hinton bujon (MHB) i gustina im je, poređenjem sa 0.5 McFarland standardom i razrijeđivanjem, podešena na 10⁶ cfu/mL (Ortez, 2005). Iz MHB kulture su sterilnim vatenim štapićem nanošene na petrijeve ploče (promjera 9 cm) sa Mueller-Hinton agarom (MHA). Sterilnim borerom promjera 6 mm su u nasijanom MHA pravljene bunarići u koje je unošeno 30 µl ekstrakta ploda i tropa kupine u koncentraciji 50 mg/ml u 80% etanolu (v/v). Petrijevke su zatim u uspravnom položaju inkubirane 24 sata na 37 °C. Nakon inkubacije mjereni su promjeri sterilnih prstenovi oko bunarića (u mm) uključujući i 6 mm širine bunarića. Kao pozitivna kontrola su korišteni antibiotici: Ampicilin (10mg), Gentamicin (10mg), Erythromycin (15mg) i Ciprofloxacilin (5 mg), a kao negativna kontrola je korišten 80 % etanol (v/v).

Za testiranje antifungalne aktivnosti odabran je kvasac *Candida albicans* (ATCC 10231) i plijesan *Aspergillus niger* izolovana sa plodova jabuke, na Tehnološkom fakultetu u Banjoj Luci. Kvasac *C. albicans* je prije testiranja kultivisan 24 sata na Sabouraud dekstroznom agaru (SDA) na 37 °C. Kultura je za testiranje podešena na gustinu 10⁶ cfu/mL u fiziološkom rastvoru (0,85 % NaCl). Testovi su obavljani metodom difuzije u agaru sa bunarčićima (Balouiri i sar., 2016; Magaldi i sar., 2004).

Eksperimenti su provedeni sa ekstraktima ploda i tropa kupine u koncentraciji 50 mg/ml u 80% etanolu (v/v) i uzorcima matičnog soka. Sterilne Petrijeve posude sa SDA su inokulisane pripremljenom kulturom i sterilnim borerom su napravljene su bunarčići prečnika 6 mm. Nakon toga su dodati testirani ekstrakti u količini od 30 µl. Petrijevke su zatim u uspravnom položaju stavljene na inkubaciju 24 sata na 37 °C. Nakon inkubacije mjerena je sterilna zona oko otvora sa ekstraktom u mm. Kao pozitivna kontrola su korišteni diskovi: Nystatin (100 IU) i Fluconazole (100 µg), a kao negativna kontrola je korišten 80 % etanol (v/v).

Antifungalna aktivnost prema plijesni *A. niger* je testirana metodom razređivanja u agaru (Balouiri i sar., 2016; Marwah i sar., 2007). Podloge za testiranje su pripravane tako što je otopljenom agaru (SDA) dodavana određena količina ekstrakta (EUCAST, 2000). Finalne

koncentracije ekstrakta u podlozi su bile u rasponu od 0,625 do 2,5 mg/ml. Soj *A. niger* je pripreman za testiranje tako što je inkubiran na 25 °C u toku 72 sata kada se na petrijevka pojavio bijeli micelijum bez formiranih spora. Iz ovih petrijevki su sterilnim borerom isjecani diskovi micelijuma prečnika 5 mm i u izvrnutom položaju stavljeni na sredinu petrijevki sa ekstraktom u podlozi. Kontrolne ploče sa odgovarajućom koncentracijom etanola (4%, 2% i 1%) i bez ekstrakta su inokulisane na isti način. Prečnik kolonija je mjereno u milimetrima, nakon inkubacije u trajanju 7 dana na 25 °C. Procenti inhibicije rasta (FI%) su izračunati kao:

$$FI (\%) = (DC-DT) \times 100/DC,$$

gdje je DC - prečnik kolonije za kontrolu; DT - prečnik kolonije testiranog micelijuma

Antimikrobna aktivnost je rađena u osam ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD.

3.10. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Svi rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri ponavljanja \pm standardna greška (SD), osim ako nije naznačeno drugačije. Statistička obrada dobijenih rezultata je vršena pomoću softverskih programa Excel, Microsoft Office 2010 i IBM SPSS Statistics 20. Za analizu značajne razlike između aritmetičkih sredina ($p \leq 0,05$), korišten je test višestrukih intervala (Duncan-ov test). Kao granice za određivanje statističke značajnosti koeficijenta korelacije se uzima vrijednost ($p \leq 0,05$), a ukoliko je vrijednost veća ($p > 0,05$), smatra se da koeficijent korelacije nema značaja, i bez obzira na vrijednost ne uzima se u razmatranje (Yan i Su, 2009; Fox, 2015). Za analizu linearnih korelacija je korišten Pearson-ov test korelacija (eng. *Pearson correlation test*). Vrijednost ovog koeficijenta se kreće u intervalu (-1-1). Kod pozitivne korelacije koeficijent korelacije se kreće u intervalu (0-1) a kod negativne korelacije u interval (-1-0) (Mutavdžić i Nikolić-Đorić, 2018).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

U ovom poglavlju su predstavljene rezultati eksperimenata osnovnog hemijskog i mineralnog sastava u svježim uzorcima ploda, tropa i soka, zatim rezultati polifenolnog sastava i biološke aktivnosti ekstrakata ploda i tropa, i uzoraka soka kultivisanih i divljih sorti kupine. Rezultati su statistički analizirani kako bi se preciznije uporedili hemijski i polifenolni sastav i biološki potencijal ispitivanih uzoraka, te stekao jasniji uvid u korelacije između sadržaja polifenolnih jedinjenja i biološke aktivnosti.

4.1. HEMIJSKI SASTAV PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

Hemijski sastav kupina je promjenjiv i u mnogome zavisi od sorte, sastava zemljišta, klimatskih uslova, stadijuma zrelosti, perioda branja i uslova skladištenja (Seeram, 2008; Tosun i sar., 2008; Dai i sar., 2009). Pored visoko vrijednih polifenolnih jedinjenja po kojima su poznate, kupine sadrže ugljene hidrate, vitamine i minerale (Kaume i sar., 2012; Bobinaite i sar., 2012).

Osnovni hemijski sastav je predstavljen u Tabeli 7, kao sadržaj suve materije, ukupnog pepela, ukupnih šećera, sirove celuloze, ukupna kiselost i ukupan sadržaj askorbinske kiseline. Tokom izdvajanja tropa i soka iz plodova kupine u laboratorijskim uslovima određeni su prinosi soka (S-p1 (44.54 %), S-p2 (43.70 %), S-d1 (40.69 %) i S-d2 (39.34 %)). Navedene vrijednosti su niže od vrijednosti dobijenih u industrijskim uslovima (do 80 %) (Santos i sar, 2017).

U tabeli 7 su prikazani rezultati hemijskog sastava ploda kupine, gdje su uzorci divlje kupine P-d2 pokazali značajno veći sadržaj suve materije (15,73 g/100 g svježe materije). Takođe, veći sadržaj pepela (0,45 g/100 g svježe materije) je određen kod uzoraka ploda divlje kupine. Najveći sadržaj ukupnih šećera (6,07 g/100 g svježe materije) i askorbinske kiseline (21,36 g/100 g svježe materije) utvrđen je kod uzorka ploda kultivisane kupine Chester Thornless (P-p1). Kod uzorka kultivisane sorte Čačanska bestrna (P-p2) je utvrđena najniža vrijednost ukupnih šećera i ujedno najveća kiselost (1,55 ml/100g svježe materije), sa statistički značajnom razlikom ($p \leq 0,05$). Jedan od razloga koji je mogao uticati jeste povećana respiracija uzoraka kupine nakon branja plodova, a koja dovodi do enzimske razgradnje i mikrobiološke degradacije nutritivnih jedinjenja (Kader i Barrett 2005).

U poređenju sa rezultatima *National Nutrient Database for Standard Reference* (2016), kod ispitivanih uzoraka ploda je veći sadržaj suve materije i ukupnog pepela, dok su za ostale parametre utvrđene nešto niže vrijednosti. U poređenju sa rezultatima Stajčić i saradnici (2012), utvrđenih analizom svježih plodova dvije kultivisane sorte kupine Čačanska bestrna i Thornfree,

ispitivani uzorci kultivisane sorte su imali slične vrijednosti u sadržaju suve materije, ukupnog pepela, nešto veću kiselost i niži sadržaj ukupnih šećera i celuloze. Vrijednosti ukupnog sadržaja suve materije u plodu divlje kupine su u skladu sa rezultatima koje su dobili Dujmović-Purgar i saradnici (2012) (14,11 – 15,97 mg/g svježe materije). Dobijeni rezultati za ukupan pepeo (0,35 g/100 g svježe materije) i ukupnu kiselost (1,01 g/100 g svježe materije) su sličnih vrijednostima koje su odredili Rodrigues i saradnici (2017) u brazilskim sortama kupine.

Tabela 7. Hemijski sastav plodova kupine

Svježi uzorci	Suva materija ¹	Pepeo ¹	Ukupni šećeri ¹	Sirova celuloza ¹	Kiselost ²	L-askorbinska kiselina ³
P-p1	10,69±0,17 ^a	0,32±0,00 ^a	6,07±0,22 ^a	1,05±0,11 ^a	1,40±0,01 ^a	21,36±0,48 ^a
P-p2	11,93±0,19 ^b	0,36±0,02 ^b	2,28±0,17 ^b	1,42±0,06 ^b	1,55±0,02 ^b	6,45±0,24 ^b
P-d1	14,84±0,12 ^c	0,45±0,01 ^c	4,19±0,29 ^c	2,44±0,11 ^c	0,73±0,02 ^c	7,11±0,20 ^c
P-d2	15,73±0,31 ^d	0,45±0,00 ^c	5,38±0,18 ^d	1,36±0,10 ^b	1,20±0,02 ^d	8,53±0,34 ^d

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost ± standardna devijacija SD (n=3).

¹g/100g svježe materije, ²ml/100g svježe materije (limunska kiselina), ³mg/100g svježe materije

^{a,b,c,d} Slova iznad svake vrijednosti ukazuju na značajne razlike od najmanje 5% (Dankanov test).

Visok sadržaj askorbinske kiseline kod kultivisane sorte P-p1 (Tabela 7), je u skladu sa sa rezultatima Marjanović-Balaban i saradnici (2012) (17,45 – 21,16 mg/100 g svježe materije), i nešto je veći od vrijednosti Zia-Ul-Haq i saradnici (2014) (6,0 - 20,4 mg/100 g svježe materije). Sadržaj askorbinske kiseline kod ostalih analiziranih uzoraka ploda je oko tri puta manji (6,45 - 8,53 mg/100 g svježe materije). Za razliku od navedenih rezultata, Guedes i saradnici (2013) su utvrdili značajno veći sadržaj askorbinske kiseline kod uzoraka tropskih sorti kupina *Brazos* i *Ebano* (42,69 mg/100g i 55,78 mg/100g svježe materije).

Prema utvrđenim rezultatima, navedenim u tabeli 8, tropovi kupine sadrže oko 20 – 50 % veći procenat suve materije u odnosu na uzorke ploda. Međutim, treba napomenuti da postoji razlika u industrijskom tropu i tropu dobijenom u laboratorijskim uslovima, s obzirom da se u industrijskim uslovima koriste mehaničke prese pod visokim pritiskom, nakon čega zaostaje trop sa većim sadržajem suve materije. Kod svih uzoraka tropa dobijene su različite vrijednosti u sadržaju suve materije, sa statistički značajnom razlikom ($p \leq 0,05$). Najveće vrijednosti za sadržaj pepela i ukupnih šećera su utvrđene u uzorcima divljih kupina T-d1 i T-d2. Veće vrijednosti za kiselost, kao kod uzoraka ploda su utvrđene kod uzorka kultivisane sorte T-p2, dok je kod uzorka T-p1 utvrđen veći sadržaj askorbinske kiseline (oko 2 - 3 puta), u odnosu na ostale ispitivane uzorke tropa.

Tabela 8. Hemijski sastav tropova kupine

Svježi uzorci	Suva materija ¹	Pepeo ¹	Ukupni šećeri ¹	Sirova celuloza ¹	Kiselost ²	L-askorbinska kiselina ³
T-p1	21,19±0,54 ^a	0,41±0,00 ^a	2,83±0,07 ^a	1,66±0,09 ^a	1,15±0,02 ^a	7,11±0,22 ^a
T-p2	17,26±0,43 ^b	0,49±0,00 ^b	1,45±0,01 ^b	3,55±0,36 ^b	1,46±0,01 ^b	2,81±0,17 ^b
T-d1	17,83±0,24 ^c	0,50±0,01 ^c	3,10±0,18 ^c	3,99±0,28 ^c	0,68±0,01 ^c	3,27±0,39 ^c
T-d2	20,58±0,37 ^d	0,52±0,01 ^c	3,65±0,20 ^d	2,88±0,15 ^b	1,19±0,01 ^d	2,62±0,25 ^d

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost ± standardna devijacija SD (n=3).

¹g/100g svježe materije, ²ml/100g svježe materije (limunska kiselina), ³mg/100g svježe materije
^{a,b,c,d} Slova iznad svake vrijednosti ukazuju na značajne razlike od najmanje 5% (Dankanov test).

Kod uzoraka soka (Tabela 9) utvrđene su veće vrijednosti suve materije kod divljih sorti S-d1 i S-d2, u odnosu na kultivisane sorte kupine sa statistički značajnom razlikom ($p \leq 0,05$). Sadržaj ukupnih šećera i askorbinske kiseline u uzorcima soka je veći, u poređenju sa vrijednostima koje su utvrđene kod uzoraka ploda i tropa, a razlog je što su šećeri i askorbinska kiselina lako rastvorni u vodi i izdvajaju se zajedno sa sokom.

Tabela 9. Hemijski sastav sokova kupine

Svježi uzorci	Suva materija ¹	Pepeo ¹	Ukupni šećeri ¹	Sirova celuloza ¹	Kiselost ²	L-askorbinska kiselina ³
S-p1	7,11±0,01 ^a	0,26±0,01 ^a	7,50±0,22 ^a	/	1,35±0,01 ^a	19,10±0,24 ^a
S-p2	6,62±0,02 ^b	0,27±0,00 ^a	3,77±0,18 ^b	/	1,94±0,02 ^b	4,42±0,11 ^b
S-d1	8,35±0,11 ^c	0,30±0,00 ^b	4,89±0,08 ^c	/	0,77±0,01 ^c	4,64±0,21 ^b
S-d2	9,53±0,10 ^d	0,35±0,01 ^c	6,13±0,34 ^d	/	1,41±0,03 ^d	5,18±0,20 ^c

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost ± standardna devijacija SD (n=3).

¹g/100ml svježe materije, ²ml/100ml svježe materije (limunska kiselina), ³mg/100g svježe materije
^{a,b,c,d} Slova iznad svake vrijednosti ukazuju na značajne razlike od najmanje 5% (Dankanov test).

Kod analiziranih uzoraka soka najaveći sadržaj askorbinske kiseline je određen kod pitome sorte Chester Thornles (S-p1), i značajno je veći u odnosu na ostale analizirane uzorake soka. Slične vrijednosti u sadržaju askorbinske kiseline su utvrđene kod uzoraka S-p2 i S-d1 (kultivisane i divlje sorte), bez statistički značajne razlike ($p > 0,05$). Slične vrijednosti za sadržaj askorbinske kiseline kao kod uzoraka S-p2, S-d1 i S-d2 su prikazane u disertaciji Krstić (2018) (6,73 mg/100g soka).

Odnos organskih kiselina i sadržaja ukupnih šećera predstavlja važan indikator kvaliteta, utiče na izgled i ukus plodova i njihovih proizvoda (Zia-Ul-Haq i sar., 2014). Šećeri detektovani u plodovima kupina su: fruktoza, glukoza, saharoza, a povremeno su prisutni i niski nivoi sorbitola (Lee, 2017).

Askorbinska kiselina utiče na stabilnost antocijana kod sokova dobijenih od bobičastog voća (Stebbins i sar., 2017). Interakcija askorbinske kiseline i kiseonika se dešava posredstvom vodonik peroksida (H_2O_2), gdje mehanizmi oksidacije askorbinske kiseline proizvode vodonik peroksid koji ima uticaj na degradaciju antocijana (Horbowicz, 2008).

4.1.1. SADRŽAJ MINERALNIH MATERIJA PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

Sadržaj mineralnih materija u ispitivanim uzorcima određen je na uređaju Optima 8000 Optical Emission Spectrophotometer (ICP OES), Perkin Elmer, USA, sa limitom detekcije za elemente: olovo (Pb) (0,00648 mg/l), kadmijum (Cd) (0,00045 mg/l), arsen (As) (0,01218 mg/l), nikl (Ni) (0,00066 mg/l), selen (Se) (0,01161 mg/l) i mangan (Mn) (0,14031 mg/l).

Kod ispitivanih uzoraka je analiziran sadržaj makroelementa (K, Na, Ca i Mg), mikroelementa (Zn, Cu, Mn i Se) i teških metala (Cd, Pb i As). U tabelama 10 - 12 su prikazane vrijednosti mineralnih materija detektovanih u uzorcima kultivisanih i divljih sorti kupine. Prema utvrđenim rezultatima kalijum (K) predstavlja mineral koji je najviše zastupljen u svježem plodu kupine, zatim po opadajućem redoslijedu slijede: kalcijum (Ca) > magnezijum (Mg) > fosfor (P) > natrijum (Na) > željezo (Fe) > mangan (Mn) > cink (Zn) > bakar (Cu) > selen (Se). Najveći sadržaj kalijuma (K) je određen kod uzorka divlje kupine P-d1 (172,20 mg/100g svježe materije), U poređenju sa rezultatima Marjanović-Balaban i saradnici (2012) gdje su utvrđeni kalcijum (28,74 – 30,12 mg/100 g svježe materije), cink (0,51 – 0,62 mg/100 g svježe materije), fosfor (21,14 – 24,45 mg/100 g svježe materije) i željezo (0,60 – 3,78 mg/100 g svježe materije), kod uzoraka kultivisanih sorti (P-p1, P-p2) detektovane su veće vrijednosti u sadržaju kalcijuma (Ca) i fosfora (P), dok je sadržaj ostalih mineralnih materija u uzorcima nešto niži.

Tabela 10. Sadržaj mineralnih materija u svježim uzorcima ploda kupina

Uzorci	Makroelementi							Mikroelementi					
	K ¹	Na ¹	Ca ¹	Mg ¹	Fe ¹	P ¹	Se ²	Zn ¹	Cu ¹	Mn ¹	Cd ¹	Pb ¹	As ¹
P-p1	171,40	2,90	37,50	27,90	0,59	26,90	0,38	0,46	0,16	0,59	nd	nd	nd
P-p2	170,70	3,20	36,80	27,60	0,63	27,50	0,39	0,49	0,17	0,62	nd	nd	nd
P-d1	172,20	3,10	38,10	28,10	0,64	26,80	0,42	0,42	0,17	0,63	nd	0,01	nd
P-d2	171,90	3,50	38,20	28,20	0,58	27,80	0,35	0,46	0,17	0,65	nd	0,01	nd

Rezultati su prikazani kao ¹mg/100 g i ²µg/100 g

Guedes i saradnici (2013) su utvrdili sadržaj mikroelemenata u uzorcima kupine iz tropskih područja: bakar (Cu) 0,10 mg/100 g, mangana (Mn) 0,87 mg/100 g, cinka (Zn) 0,23 mg/100 g i željezo (Fe) 2,55 mg/100 g ploda. U poređenju sa navedenim rezultatima u uzorcima (P-p1, P-p2, P-d1 i P-d2) utvrđen je veći sadržaj bakra i cinka, dok je sadržaj mangana i željeza bio značajno niži. Najveće vrijednosti selena (Se) su određene kod uzorka divlje kupine P-d1 (0,42

µg/100 g) sa lokacije Javorani, dok je najniži sadržaj utvrđen kod uzorka divlje kupine P-d2 (0,35 µg/100 g) sa lokacije Verići. Olovo (Pb) je detektovano samo kod uzorka divljih sorti (0,01 mg/100 g), dok prisustvo teških metala, arsena (As) i kadmijuma (Cd) nije utvrđeno kod ispitivanih uzoraka.

Sadržaji mineralnih materija prema podacima objavljenim u *National Nutrient Database for Standard Reference* (2016) su: fosfor (P), 22 mg, kalijum (K) 162 mg, natrijum (N) 1 mg, cink (Zn) 0,53 mg, bakar (Cu) 0,165 mg, mangan (Mn) 0,646 mg i selen (Se) 0,4 µg u 100g svježe mase ploda. U poređenju sa navedenim vrijednostima, utvrđene količine su nešto više u sadržaju fosfora, kalijuma i natrijuma, i niže u odnosu na sadržaj ostalih elemenata u plodovima kupina.

Sadržaj mineralnih materija u uzorcima tropa prikazan je u tabeli 11, dobijene vrijednosti niže u odnosu na vrijednosti utvrđene kod uzoraka ploda i matičnog soka. Veći sadržaj mineralnih materija je takođe prisutan kod tropova divljih sorti u odnosu na tropove kultivisanih.

Tabela 11. Sadržaj mineralnih materija u svježem tropu kupina

Uzorci	Makroelementi						Mikroelementi						
	K ¹	Na ¹	Ca ¹	Mg ¹	Fe ¹	P ¹	Se ²	Zn ¹	Cu ¹	Mn ¹	Cd ¹	Pb ¹	As ¹
T-p1	172,00	2,00	33,00	24,00	0,61	24,50	0,35	0,36	0,16	0,65	nd	nd	nd
T-p2	174,00	1,00	35,00	26,00	0,57	25,30	0,37	0,43	0,15	0,60	nd	0,01	nd
T-d1	172,00	2,00	34,00	26,00	0,59	26,20	0,41	0,42	0,15	0,62	nd	nd	nd
T-d2	175,00	3,00	33,00	25,00	0,63	25,50	0,36	0,39	0,16	0,63	nd	0,01	nd

Rezultati su prikazani kao ¹mg/100 g i ²µg/100 g

Najveći sadržaj selena (Se) je detektovan u uzorcima tropa, i to kod uzorka divlje kupine T-d1 (0,41 µg/100 g) sa lokacije Javorana. U sličnim studijama je utvrđeno da nivo selena u voću varira u zavisnosti od geografskog regiona (Reilly, 2006). Takođe, sadržaj olova (Pb) je određeno u tropu kultivisane sorte T-p2 (0,01 mg/100 g).

Sadržaj mineralnih materija u uzorcima soka je prikazan u tabeli 12. U poređenju sa sadržajem mineralnih materija u plodu i tropu, dobijene su veće vrijednosti (oko 5 - 8 %). Takođe, utvrđene su veće vrijednosti kod uzoraka divljih kupina u odnosu na kultivisane. Olovo (Pb) je određeno u soku kultivisane sorte S-p1 (0,01 mg/100 g), a elementi arsen (As) i kadmijum (Cd) nisu detektovani kod uzoraka soka.

Koczka i saradnici (2018) su utvrdili već sadržaj Ca, Fe, K, Mg, P i Zn u kultivisanim plodovima, i veći sadržaj mikroelemenata Al, Cu i Mn kod uzoraka divljih sorti, u uslovima kada su kupine uzgajane na istom zemljištu. Guedes i saradnici (2013) su ispitivali sadržaj mineralnih

materija kod kupina koje se uzgajaju u tropskim klimatskim uslovima, na istoj nadmorskoj visini i pri tom je utvrđen sadržaj minerala: fosfor (10,9 – 19,9 mg), kalijum (95,0 – 185,5 mg), kalcijum (11,6 – 23,3 mg), magnezijum (10,7 – 21,4 mg), cink (0,16 – 0,25 mg), mangan (0,42 – 1,47 mg), bakar (0,05 – 0,17 mg) i željezo (1,02 – 3,66 mg) u 100 g svježeg ploda.

Tabela 12. Sadržaj mineralnih materija u sokovima kupina

Uzorci	Makroelementi							Mikroelementi					
	K ¹	Na ¹	Ca ¹	Mg ¹	Fe ¹	P ¹	Se ²	Zn ¹	Cu ¹	Mn ¹	Cd ¹	Pb ¹	As ¹
S-p1	183,60	2,60	39,50	28,50	0,61	27,40	0,30	0,49	0,16	0,59	nd	0,01	nd
S-p2	185,30	3,20	38,40	27,70	0,62	27,90	0,34	0,41	0,16	0,63	nd	nd	nd
S-d1	189,20	2,60	38,70	29,20	0,64	28,20	0,43	0,46	0,16	0,64	nd	nd	nd
S-d2	186,70	3,30	39,30	28,30	0,65	28,10	0,45	0,42	0,15	0,65	nd	nd	nd

Rezultati su prikazani kao ¹mg/100 ml i ²µg/100 ml

Prema mnogim naučnim studijama teški metali prisutni u hrani mogu imati neželjen efekt na ljudski organizam, pa su u skladu sa tim propisane maksimalne dozvoljene količine koje mogu biti sadržane u voću Pravilnikom o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama ("Sl. list SRJ", br. 5/92, 11/92 i 32/2002). Maksimalno dopuštene vrijednosti teških metala u skladu sa Pravilnikom iznose: za olovo (Pb) 0,10 mg, kadmijum (Cd) 0,005 mg, živu (Hg) 0,002 i arsena (As) 0,01 mg u 100 g odnosno 100 ml svježeg voća. U odnosu na navedene vrijednosti, ispitivani uzorci su pokazali značajno niži sadržaj od dozvoljenog.

Mineralne materije imaju mnogobrojne i značajne uloge u ljudskom organizmu, pa tako Ca i Mg predstavljaju elemente koji igraju važnu ulogu u apsorpciji i metabolizmu glukoze i proteina, uključeni su u regulaciju i dilataciju krvnih sudova i pravilan rad srca. Željezo (Fe) je vitalna komponenta hem-proteina, hemoglobina i mioglobina potrebnih za transport kiseonika, pravilan ćelijski metabolizam, metabolizam glukoze i vaskularne funkcije. Cink (Zn) je važan element i služi kao kofaktor u brojnim enzimskim reakcijama. Bakar (Cu) je koenzim i ključni kofaktor za iskorištenje željeza Fe, i potreban za redoks hemijsku citohrom oksidazu. Mangan (Mn) je potreban za dobar imunološki sistem i efikasan metabolizam hrane, služi kao kofaktor u brojnim enzimskim odgovorima i hemostazi (Alzahrana i sar., 2017). Selen (Se) je esencijalni mikroelement a njegov nizak nivo u organizmu se dovodi u vezu sa povećanim rizikom od nastanka srčanih bolesti i karcinoma (Tinggi, 2008; Bangladesm i sar., 2016).

4.2. PRINOS EKSTRAKCIJE PLODA I TROPA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

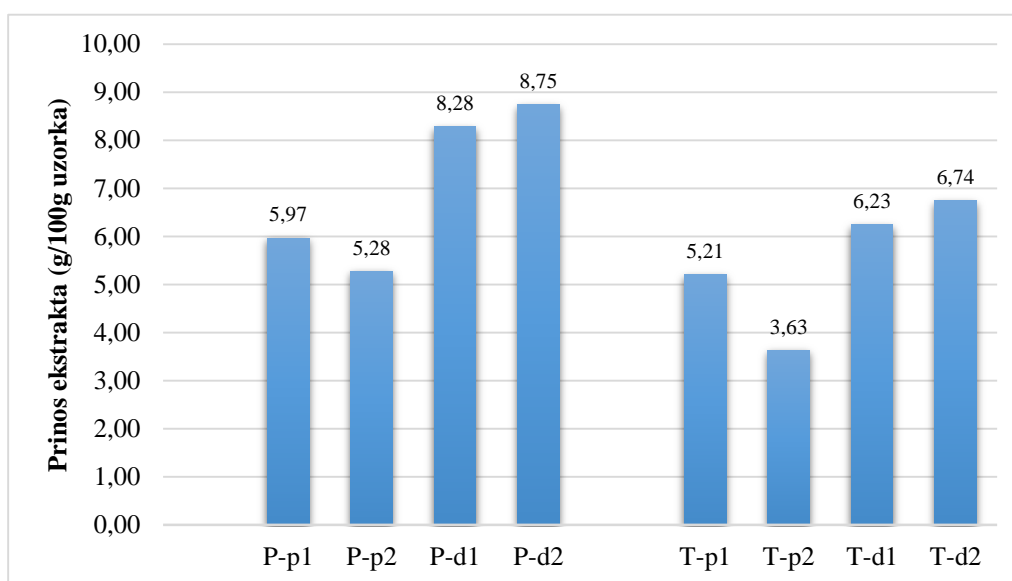
Ekstrakcija predstavlja prvi važan korak kako bi se izolovala bioaktivna jedinjenja iz biljnog materijala. Ekstrakciju u ovom slučaju možemo definisati kao fenomen prenosa masa, tokom koga čvrste materije u kontaktu sa rastvaračem prelaze u rastvor sve do uspostavljanja hemijske ravnoteže (Corrales i sar., 2008). Prenos masa zavisi od mnogo faktora, kao što su vrsta rastvarača, dužina trajanja ekstrakcije, temperatura i polarnost korišćenog rastvarača (Lee i sar., 2012; Azmir i sar., 2013).

Različite vrste rastvarača se koriste za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz prirodnih proizvoda. Kod ekstrakcije hidrofilnih jedinjenja se koriste polarni rastvarači kao što su metanol, etanol ili etil-acetat. Za ekstrakciju više lipofilnih spojeva koristi se dihlormetan ili smjesa dihlormetan/metanol u odnosu 1: 1. U nekim slučajevima, ekstrakcija sa heksanom se koristi za uklanjanje hlorofila (Cos i sar., 2006). Takođe, koriste se i različite tehnike ekstrakcije: konvencionalne (metoda prema Soxhlet-u, maceracija), zatim nove tehnike (ekstrakcija pod pritiskom (PLE), mikrotalasna ekstrakcija (MAE), ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka (UAE), ekstrakcija superkritičnim CO₂ (SFE-CO₂) i dr.) (Da Porto i sar., 2013; Ivanović i sar., 2014; Uribe i sar., 2015; Hidalgo i Almajano, 2017). Kao glavna ograničenje kod konvencionalne metode ekstrakcije napominju se visoke potrošnje rastvarača, dužina trajanja ekstrakcije i kvalitet ekstrakata (Da Porto i sar., 2013).

Do sada nije definisan standardni metod koji bi se koristio za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz biljnog materijala, zbog njihove složenosti i interakcije sa drugim bioaktivnim jedinjenjima (Bouterfas i sar., 2014). Svaki biljni materijal ima svoje karakteristične osobine vezane za ekstrakciju, te se prema tome definišu i različiti uslovi ekstrakcije (Chirinos i sar., 2007). Za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja najčešće su korišteni rastvarači: voda, aceton, etanol, metanol ili etil acetata, sa dodatkom različitih kiselina. Neki autori navode prednost metanola kod ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz biljnog materijala (Pérez i sar., 2007; Karimi i sar., 2010), međutim, smjesa etanol-voda je jedna od najčešće korištenih rastvarača zbog ekonomske dostupnosti. Etanol se može dobiti iz obnovljivih izvora (šćerina trska), i klasifikovan je kao GRAS (eng. *Generally Recognized As Safe*) - generalno priznat kao bezbjedan rastvarač, odnosno rastvarač zelene hemije (Rodrigues i sar., 2015). U brojnim studijama gdje je testirana efikasnost različitih rastvarača za ekstrakciju i rekuperaciju antioksidativnih jedinjenja iz biljaka, etanol se pokazao kao efikasniji rastvarač, u poređenju sa vodom, acetonom, heksanom, etil acetatom i metanolom (Hidalgo i Almajano, 2017). Utvrđeno je da ekstrakcija sa 80 % etanolom učinkovitija kod izdvajanja polifenola manje molekulske mase, i da se izdvaja veći sadržaj flavonida sa

visokim antioksidativnim kapacitetom (Hijazi i sar., 2015). Takođe sa povećanjem koncentracije etanola do 80 % povećava se i količina ekstrakta (Anwar i Przybylski, 2012; Hijazi i sar., 2015).

U ovoj doktorskoj disertaciji ekstrakcija uzoraka je izvršena konvencionalnom metodom prema Soxhlet-u, prilikom čega je za ekstrakciju korišten 80 % etanol (v/v), kao relativno polaran rastvarač. Nakon izdvajanja, ekstrakti su upareni na rotacionom vakuum uparivaču i ostavljeni u tamnim bočicama, u frižideru na 4 °C. Prinos svih dobijenih ekstrakata je prikazan grafički na slici 27, gdje su ekstrakti uzoraka ploda označeni kao (EP), a uzoraka tropa (ET). Veći stepen iskorištenja je dobijen kod uzoraka ploda u odnosu na uzorke tropa (oko 8 %), a u oba slučaja stepen iskorištenja je veći kod uzoraka divlje kupine EP-d2 (8,75 g/100g svježe materije) i ED-d2 (6,74 g/100g svježe materije). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je lakša difuzija rastvarača tokom ekstrakcije bila kroz uzorke ploda u odnosu na uzorke tropa. Prikazani rezultati su u skladu sa rezultatima Ivanović i saradnici (2014), gdje su prilikom ultrazvučne ekstrakcije uzoraka kultivisane sorte Čačanska bestrna dobijene vrijednosti iskorištenja od 5,3 do 6,34 %, i slične vrijednostima iskorištenja ekstrakta ploda.



Slika 27. Prinosi ekstrakcije uzoraka ploda i tropa

Zbog sve veće potražnje za raznovrsnim jedinjenjima sa terapijskim djelovanjem iz prirodnih proizvoda, interesovanje za izolovanjem ovih jedinjenja iz jestivih biljaka širom svijeta raste svake godine (Liu, 2008; Sasidharan i sar., 2011).

4.3. POLIFENOLNI SASTAV PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

Plod kupine je veoma interesantan kao prehrambena namirnica, jer pored izvrsnih organoleptičkih svojstva ima značajan sadržaj antocijana i elagitanina (Vizzotto, 2012; Kaume i sar., 2011). Osim navedenih polifenola, plod kupine sadrži i mnoga druga jedinjenja sa antioksidativnim svojstvima, a koja imaju brojne dobrobiti za zdravlje ljudi (Cho i sar., 2004; Vizzotto, 2012). Bioaktivna jedinjenja su uglavnom sekundarni metaboliti biljaka i prisutna su u malim količinama u hrani (Carratù i Sanzini, 2005; Costa i sar., 2013).

Uzorci u radu, za analizu polifenolnog sastava su pripremljeni i ispitani u skladu sa metodama navedenim u eksperimentalnom dijelu ovog rada, a rezultati su prikazani u tabelama 13 - 16.

4.3.1. POLIFENOLNI SASTAV EKSTRAKATA PLODA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

Rezultati dobijeni ispitivanjem ekstrakata ploda kupine ukazuju da je značajno veći sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i ukupnih antocijana u uzorcima divljih sorti kupina EP-d1 i EP-d2, u odnosu na kultivisane sorte (Tabela 13). U radu je utvrđeno da divlje sorte kupina imaju veći sadržaj polifenolnih jedinjenja, te ujedno sadrže veće količine flavonoida, flavonola i antocijana. Najveći sadržaj ukupnih polifenola je određen kod uzorka EP-d1 (40,18 mg GAE/g s.m), kao i flavonoida (6,91 mg Qc/g s.m), dok su vrijednosti utvrđene kod uzoraka kultivisanih sorti EP-p1 i EP-d2, slične i bez statistički značajne razlike ($p > 0,05$). Utvrđene vrijednosti za ukupan sadržaj antocijana ukazuju da uzorci divlje kupine sadrže oko dva puta veće količine ukupnih i monomernih antocijana u odnosu na kultivisane sorte. Sadržaj ukupnih antocijana u ekstraktima ploda se kretao između 33% i 45% u odnosu na sadržaj ukupnih polifenola.

Sadržaj ukupnih polifenola u uzorcima divlje kupine je oko osam puta veći od sadržaja prikazanog u radu Huang i saradnici (2012), dok su vrijednosti kod uzoraka kultivisane sorte EP-d1 i EP-d2 u skladu sa vrijednostima koje su objavili Dai i saradnici (2010), i nešto niže u odnosu na sadržaj ukupnih fenola i flavonoida prikazanih u radu (Basu i Maier, 2016). Slične vrijednosti u sadržaju ukupnih antocijana (8,44 mg/g s.m.) su utvrđene kod brazilskih sorti kupina (Rodrigues i sar., 2017).

Tabela 13. Ukupan sadržaj polifenola, flavonoida, flavonola i ukupnih i monomernih antocijana u ekstraktima plodova kupine

Ekstrakti	Polifenoli ¹	Flavonoidi ²	Flavonoli ²	Ukupni antocijani ³	Monomerni antocijani ³	ID ⁴
EP-p1	26,94±2,33 ^a	3,61±0,05 ^a	4,81±0,18 ^a	8,96±0,06 ^a	6,96±0,13 ^a	1,29±0,02 ^a
EP-p2	21,59±1,58 ^b	3,10±0,18 ^b	2,24±0,09 ^b	7,80±0,04 ^b	6,10±0,15 ^b	1,28±0,06 ^{ab}
EP-d1	40,18±1,26 ^c	6,91±0,18 ^c	5,24±0,09 ^c	15,32±0,06 ^c	12,59±0,17 ^c	1,22±0,01 ^{bc}
EP-d2	31,83±1,14 ^d	5,27±0,04 ^d	4,80±0,07 ^a	14,32±0,05 ^d	12,30±0,14 ^d	1,16±0,01 ^c

¹ mg GAE/g sm (suve materije), ² mg Qc/g sm, ³ mg Cy/g sm, ⁴ indeks degradacije antocijana.

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost ± standardna devijacija SD (n=3).

^{a,b,c,d} Slova iznad svake vrijednosti ukazuju na značajne razlike od najmanje 5% (Dankanov test).

Rezultati prikazani u Tabeli 13 su u skladu sa vrijednostima objavljenim u radovima Reyes-Charmon-a (2005) i Milivojević i saradnici (2011), prema kojima sorte divljih kupina imaju veći sadržaj ukupnih polifenola i antocijana u poređenju sa kultivisanim sortama. U odnosu na predstavljene rezultate značajno niži sadržaj ukupnih polifenola (12,23 mg GAE/g s.m.) su utvrdili Oancea i Falin (2016) kod uzoraka ploda svježe kupine, u odnosu na prikazane rezultate. U poređenju sa rezultatima objavljenim u radu Siriwoharn i saradnici (2004), Vulić i saradnici (2011) i Oancea i Calin (2016), kod svježih uzorka kultivisanih sorti, zatim Radovanović i saradnici (2013), kod uzoraka divljih sorti, ukupan sadržaj polifenola u ekstraktima ploda je bio veći za oko tri do četiri puta, što takođe ukazuje da se ovim načinom ekstrakcije izdvaja veći procenat polifenolnih jedinjenja. Predstavljeni rezultati potvrđuju i navode Hijazi i saradnici (2015), o visokoj efikasnosti 80 % etanola (v/v) kao rastvarača u odnosu na ostale zapreminske udjele ovog rastvarača. Pored toga brojni faktori su mogli da utiču na rezultate, pa tako Prior i saradnici (2005) navode da šećeri, askorbinska kiselina, aromatični amini, sumpor-dioksid, organske kiseline i Fe²⁺ mogu imati uticaj da konačno utvrđeni rezultati odstupaju od stvarnih.

4.3.2. POLIFENOLNI SASTAV EKSTRAKATA TROPA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

Za razliku od ekstrakata ploda, uzorci tropa divlje kupine ET-d1 i ET-d2, su pokazali veći sadržaj svih polifenolnih jedinjenja, sa statistički značajnom razlikom ($p \leq 0,05$). Utvrđeni rezultati polifenolnih jedinjenja su slični prikazanim u radu (Wu i sar., 2004; Čujjić i sar., 2011). Najveći sadržaj ukupnih flavonola je detektovana kod uzorka kultivisane sorte ET-p1 (6,63 mg Qv/g s.m.). Važno je napomenuti da se flavonoli obično akumuliraju vanjskom omotaču ploda jer je njihova biosinteza uslovljena svetlošću (Caridi i sar., 2007; Kumar i sar., 2014), a time i značajne količine tokom izdvajanja matičnog soka zaostaju u tropu. Značajno veći sadržaj ukupnih polifenola i flavonoida (1,5 - 2 puta) je utvrđen kod tropova divljih sorti u odnosu na kultivisane (Tabela 14). Zanimljivo je da su veće količine ukupnih i monomernih antocijana utvrđene kod uzoraka tropa kultivisane sorte ET-p1 (17,31 mg Cy/g sm), sa statistički značajnom razlikom u odnosu na ostale ispitivane uzorke ($p \leq 0,05$). Kod uzorka Chester Thornles su određene dvostruko veće vrijednosti u sadržaju ukupnih antocijana u odnosu na vrijednosti utvrđene kod uzorka Čačanska bestrna.

Tabela 14. Ukupan sadržaj polifenola, flavonoida, flavonola i ukupnih i monomernih antocijana u ekstraktima tropova kupine

Ekstrakti	Polifenoli ¹	Flavonoidi ²	Flavonoli ²	Ukupni antocijani ³	Monomerni antocijani ³	ID ⁴
ET-p1	35,40±1,84 ^a	5,66±0,20 ^a	6,63±0,14 ^a	20,40±0,04 ^a	17,31±0,09 ^a	1,18±1,18 ^a
ET-p2	26,30±0,89 ^b	3,32±0,05 ^b	2,55±0,0 ^b	10,01±0,53 ^b	8,43±0,49 ^b	1,19±1,19 ^a
ET-d1	48,28±4,68 ^c	7,45±0,06 ^c	6,13±0,04 ^c	16,17±0,08 ^c	13,05±0,16 ^c	1,24±1,24 ^b
ET-d2	50,16±0,93 ^c	7,73±0,02 ^d	6,39±0,06 ^d	16,49±0,23 ^c	13,40±0,33 ^c	1,23±1,23 ^b

¹ mg GAE/g sm (suve materije), ² mg Qc/g sm, ³ mg Cy/g sm, ⁴ indeks degradacije antocijana.

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost ± standardna devijacija SD (n=3).

^{a,b,c,d} Slova iznad svake vrijednosti ukazuju na značajne razlike od najmanje 5% (Dankanov test).

Ukupan sadržaj antocijana prikazan u disertaciji Krstić (2018) kod ekstrakta tropa kupine iznosio je 19,73 mg/g s.m., i veći je za oko 15 %, u odnosu na vrijednosti utvrđene kod uzoraka ET-d1 i ET-d2. Vulić i saradnici (2011) su takođe ukazali da je trop kupine dobar izvor antioksidanata i da se može koristiti kao visoko vrijedan dodatak u hrani, kozmetici i farmaceutskoj industriji.

Prisustvo ukupnih i monomernih antocijana u ekstraktima tropa je od 27 do 48 %, u odnosu na ukupan sadržaj polifenola (Tabela 14). Poredeći sa rezultatima dobijenim u istraživanjima Pantelidisa i saradnici (2007), Siriwoharn i saradnici (2004) i Sadowska i saradnici (2017) analizirani ekstrakti tropa pokazali su oko deset puta veće koncentracije antocijana. Na osnovu vrijednosti indeksa degradacije antocijana (ID) je utvrđeno da je veća degradacija nastala kod uzoraka divljih sorti, što ukazuje na različit kvalitativni sastav antocijana kultivisanih i divljih sorti kupina. Dužina vremena ekstrakcije je uticala na visok sadržaj antocijana u ekstraktima, dok su razlike u ispitivanim uzorcima bile pod uticajem više faktora kao što su: lokacija, vrsta, vremenski uslovi i faza zrelosti. Iako mnogi autori tvrde da se konvencionalnim metodama ekstrakcije gube značajne količine antocijana (Struck i sar., 2016; Gawalek i sar., 2017), prikazani rezultati ukazuju na suprotno.

4.3.3. POLIFENOLNI SASTAV SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

Kod uzoraka soka divljih sorti kupina je utvrđen veći sadržaj ukupnih polifenola, ukupnih i monomernih antocijana, dok je sadržaj ukupnih flavonoida i flavonola veći kod uzoraka kultivisanih sorti (Tabela 15). U poređenju sa sadržajem utvrđenim kod ekstrakata ploda i tropa, sadržaj polifenolnih komponenti kod uzoraka matičnog soka je manji za oko 10 do 15 puta. Za razliku od vrijednosti kod ekstrakata, između uzoraka matičnog soka nema statistički značajne razlike u indeksu degradacije antocijana ($p > 0,05$), a utvrđene su i niže vrijednosti koeficijenta degradacije, što ukazuje da su antocijani u matičnom soku bolje očuvani od antocijana detektovanih u ekstraktima ploda i tropa.

Tabela 15. Ukupan sadržaj polifenola, flavonoida, flavonola i ukupnih i monomernih antocijana u četiri uzorka soka kupine

Matični sok	Polifenoli ¹	Flavonoidi ²	Flavonoli ²	Ukupni antocijani ³	Monomerni antocijani ³	ID ⁴
S-p1	1,98±0,07 ^{ab}	0,45±0,04 ^a	0,68±0,06 ^a	0,70±0,04 ^a	0,59±0,04 ^a	1,18±0,02 ^a
S-p2	1,88±0,14 ^b	0,22±0,01 ^b	0,26±0,02 ^b	0,72±0,04 ^a	0,60±0,04 ^a	1,20±0,03 ^a
S-d1	2,16±0,09 ^{bc}	0,37±0,03 ^c	0,38±0,01 ^c	0,83±0,04 ^b	0,70±0,06 ^b	1,18±0,04 ^a
S-d2	2,25±0,10 ^c	0,39±0,02 ^c	0,42±0,01 ^c	1,34±0,06 ^c	1,14±0,06 ^c	1,18±0,01 ^a

¹ mg GAE/g sm (suve materije), ² mg Qc/g sm, ³ mg Cy/g sm, ⁴ indeks degradacije antocijana.

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost ± standardna devijacija SD (n=3).

^{a,b,c,d} Slova iznad svake vrijednosti ukazuju na značajne razlike od najmanje 5% (Dankanov test).

Sličan odnos u sadržaju ukupnih antocijana između ekstrakata tropa i matičnog soka kupine prikazan je u radu Ivanović i saradnici (2014). Uzimajući u obzir da sjemenke i pokožica ploda sadrže veće koncentracije polifenolnih jedinjenja (Sandell i sar., 2009; Schieber i sar., 2001), tako da utiče da se manji dio polifenolnih jedinjenja izdvaja u matičnom soku (Balasundram i sar., 2006). Brojni su pokušaji da se primjenom pektolitičkih enzima poveća prinos polifenola tokom industrijske prerade voća, međutim studije su pokazale da i dalje u tropu zaostaju značajne količine. Jedini način je da se polifenoli oslobode iz tropa koji zaostaje nakon presanja jeste izdvajanje u posebnom koraku, uz primjenu različitih metoda ekstrakcije (Buchert i sar., 2005; Koponen i sar., 2008).

4.3.4. HPLC ANALIZA POLIFENOLNIH JEDINJENJA PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

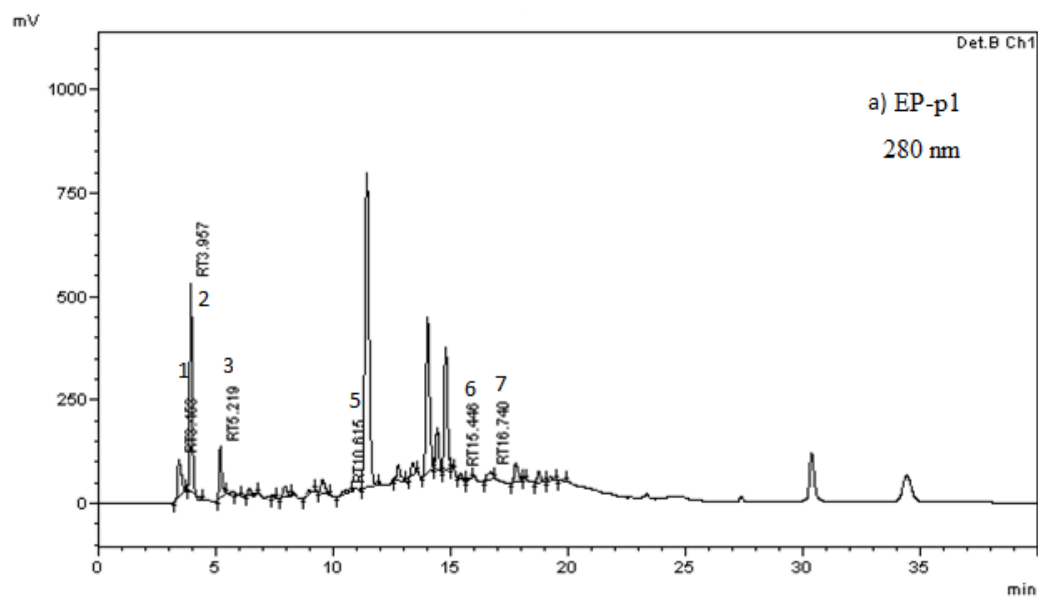
Polifenoli kao i druga jedinjenja sa antioksidativnim osobinama veoma su značajni za ljudsko zdravlje. Nalaze se u voću, povrću, i proizvodima kao što su: kafa, čaj, voćni sokovi, vina i slični proizvodi (López i sar., 2001; Minussi i sar., 2003; Sroka i sar., 2005; Kasprzyk i sar., 2012). Antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja zavisi od broja i položaja hidroksilnih grupa u molekulu (Fukumoto i Mazza, 2000; Nilsson i sar., 2005). Fenolna jedinjenja mogu djelovati kao antioksidati na više načina:

- heliranjem metala kao što su gvožđe i bakar (može se spriječiti generisanje slobodnih hidroksil radikala u Fentonovim reakcijama);
- razbijanjem lančanih reakcija izazvanih slobodnim radikalima;
- usporavanjem ili ubrzavanjem enzimske aktivnosti (Halliwell, 1990).

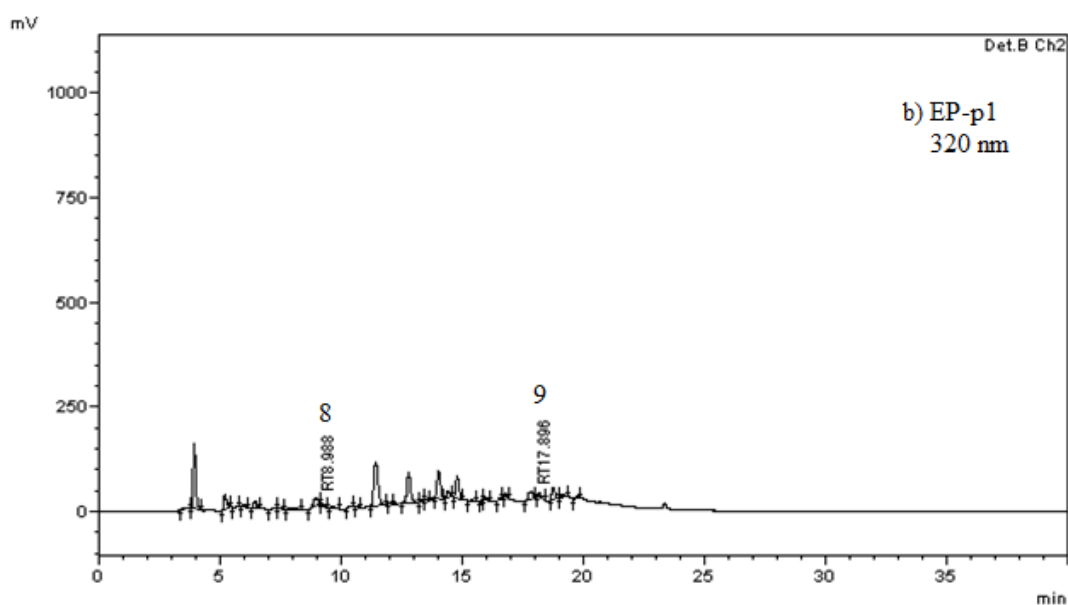
Fenolne kiseline su uključene u mehanizme organizma za popravku i adaptaciju, i mogu djelovati preventivno i ponekad terapijski kod različitih bolesti: kardiovaskularnih, respiratornih, poremećaja dermatološkog i digestivnog sistema (Kornilowicz-Kowalska i sar., 2011, Piasek i sar., 2009).

Identifikacija i kvantifikacija polifenolnih jedinjenja u pripremljenim uzorcima ekstrakata ploda, tropa i soka kupina izvršena je tehnikom tečne hromatografije HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) u kombinaciji sa UV/Vis detektorom. Razdvajanje i kvantifikacija je urađena na tri talasne dužine: 280 nm, 330 nm ili 360 nm.

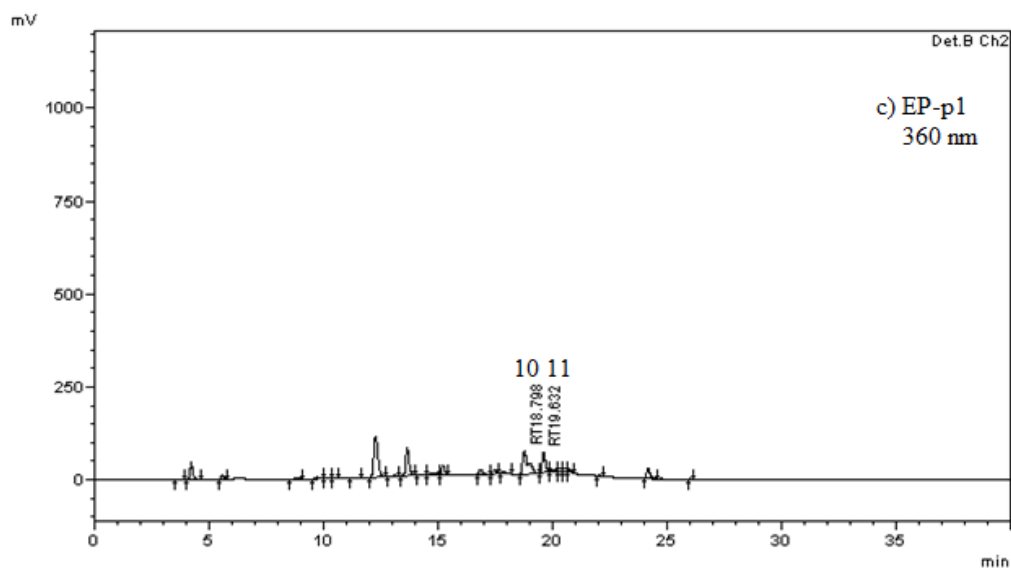
Na slikama 28 - 39 prikazani su HPLC hromatogrami fenolnih kiselina i flavonoida detektovanih u ekstraktima plodova kupine (EP-p1, EP-p2, EP-d1 i EP-d2) na talasnim dužinama 280 nm (a), 320 nm (b) i 360 nm (c), a na slikama 40 - 43 prikazani su HPLC hromatogrami antocijana u ekstraktima plodova kupine (EP-p1, EP-p2, EP-d1 i EP-d2) na 520 nm.



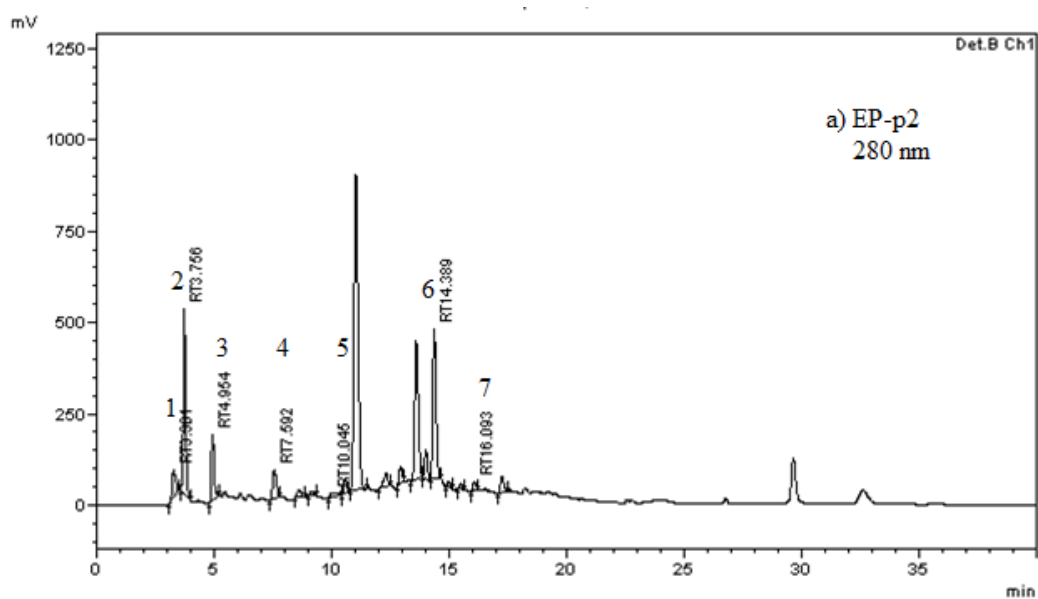
Slika 28. HPLC hromatogrami ploda kupine EP-p1: 1 - galna kiselina, 2 - protokatehinska kiselina, 3 - katehin, 4 - epikatehin 5 - vanilinska kiselina, 6 – siringinska kiselina, 7 – elaginska kiselina razdvojene komponente detektovane su na 280 nm



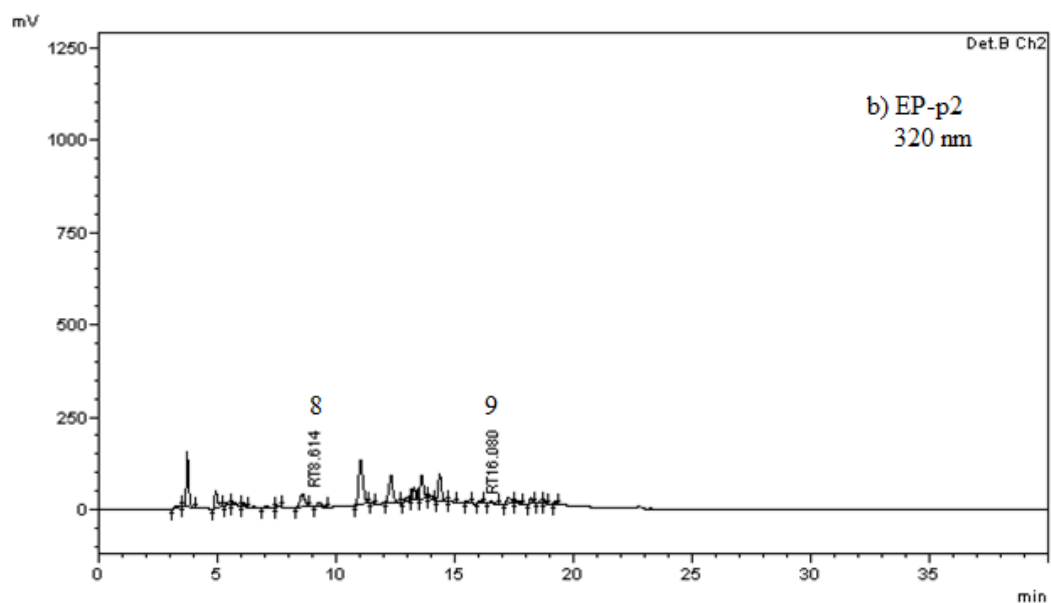
Slika 29. HPLC hromatogrami ploda kupine EP-p1: 8 - kafena kiselina i 9 - sinapinska kiselina, razdvojene komponente detektovane su na 320 nm



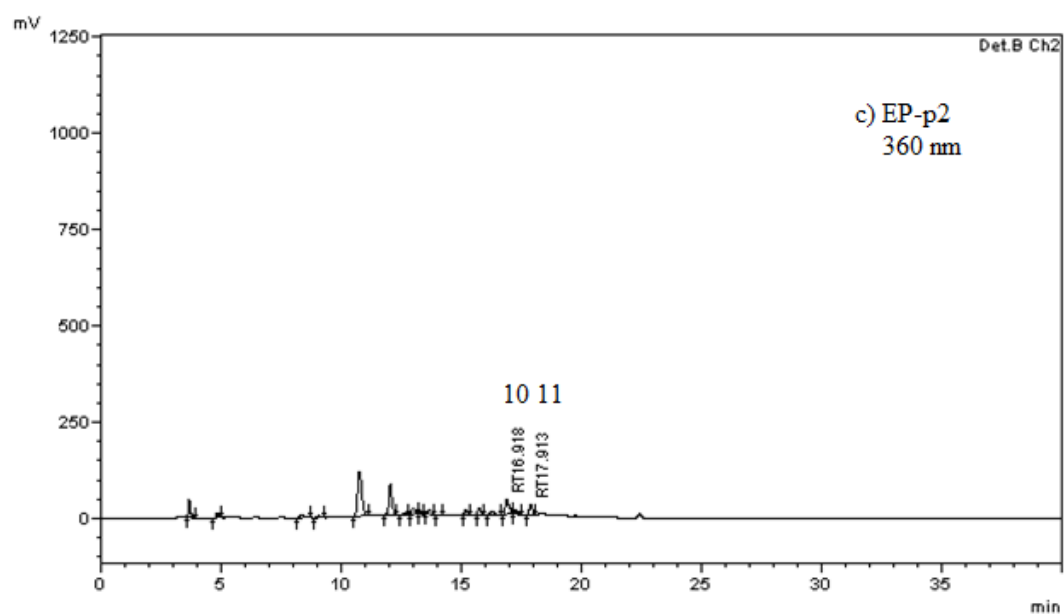
Slika 30. HPLC hromatogrami ploda kupine EP-p1: 10 – rutin i 11 - miricetin, razdvojene komponente detektovane su na 360 nm



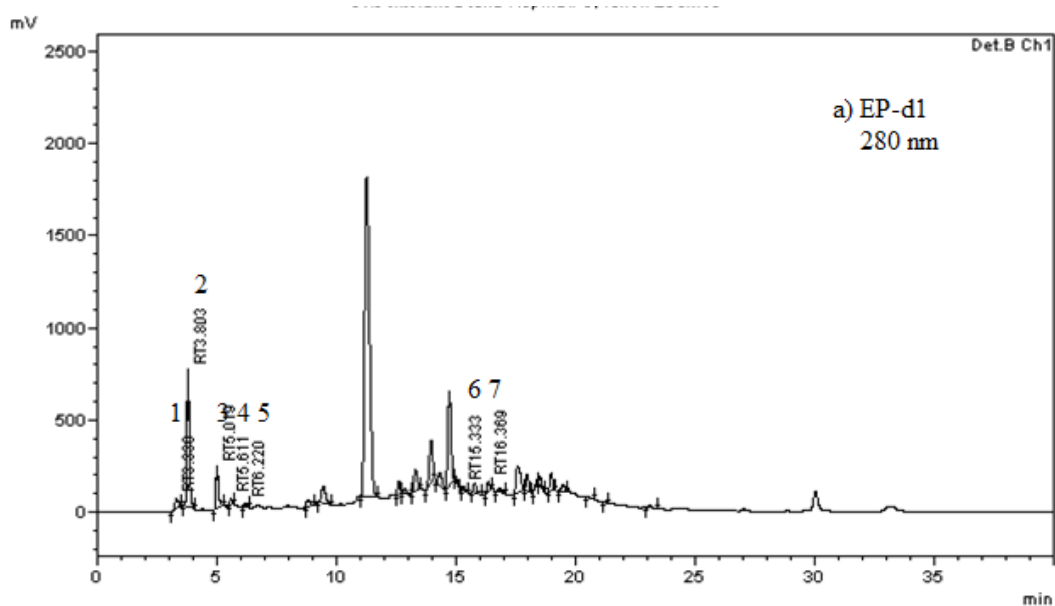
Slika 31. HPLC hromatogrami ploda kupine EP-p2: 1 - galna kiselina, 2 - protokatehinska kiselina, 3 - katehin, 4 - epikatehin 5 - vanilinska kiselina, 6 – siringinska kiselina, 7 – elaginska kiselina razdvojene komponente detektovane su na 280 nm



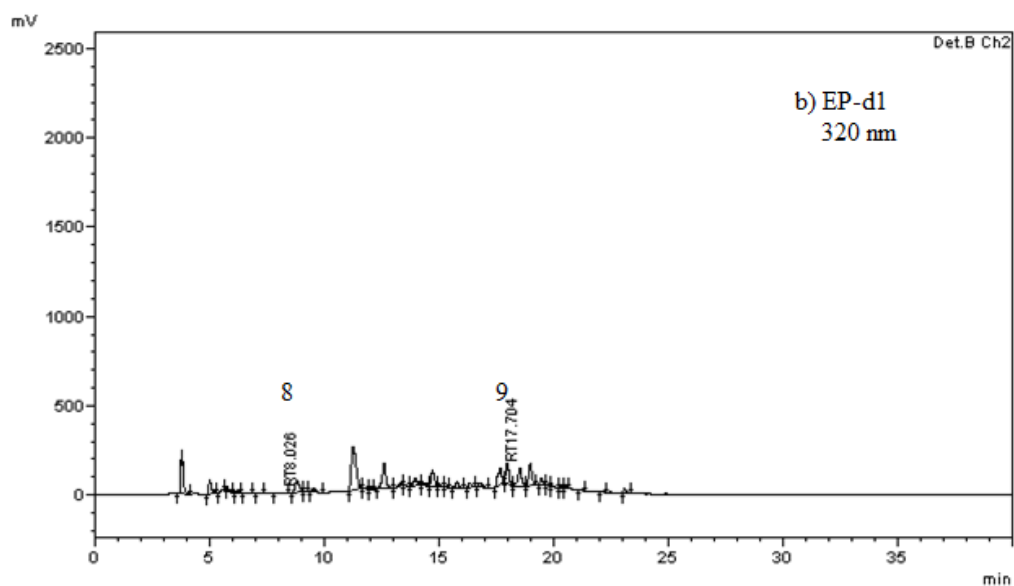
Slika 32. HPLC hromatogrami ploda kupine EP-p2: 8 - kafena kiselina i 9 - sinapinska kiselina, razdvojene komponente detektovane su na 320 nm



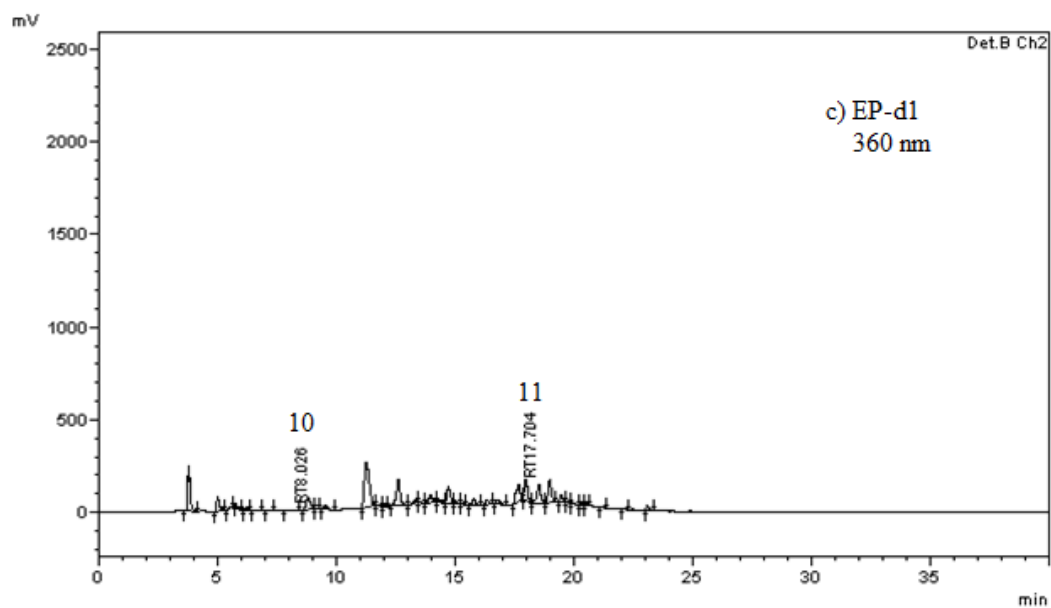
Slika 33. HPLC hromatogrami ploda kupine EP-p2: 10 – rutin i 11 - miricetin, razdvojene komponente detektovane su na 360 nm



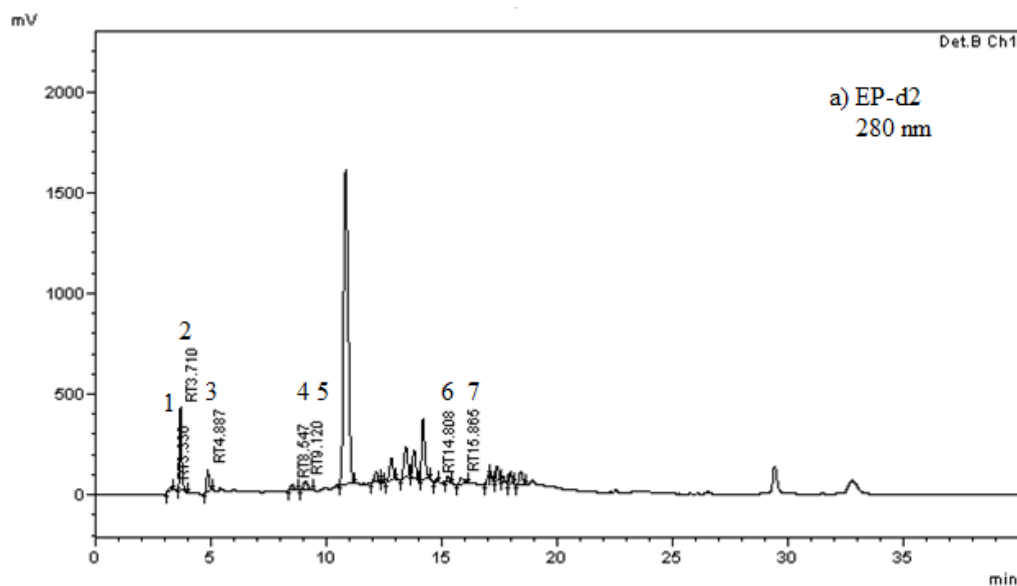
Slika 34. HPLC hromatogrami ploda kupine EP-d1: 1 - galna kiselina, 2 - protokatehinska kiselina, 3 - katehin, 4 - epikatehin 5 - vanilinska kiselina, 6 – siringinska kiselina, 7 – elaginska kiselina razdvojene komponente detektovane su na 280 nm



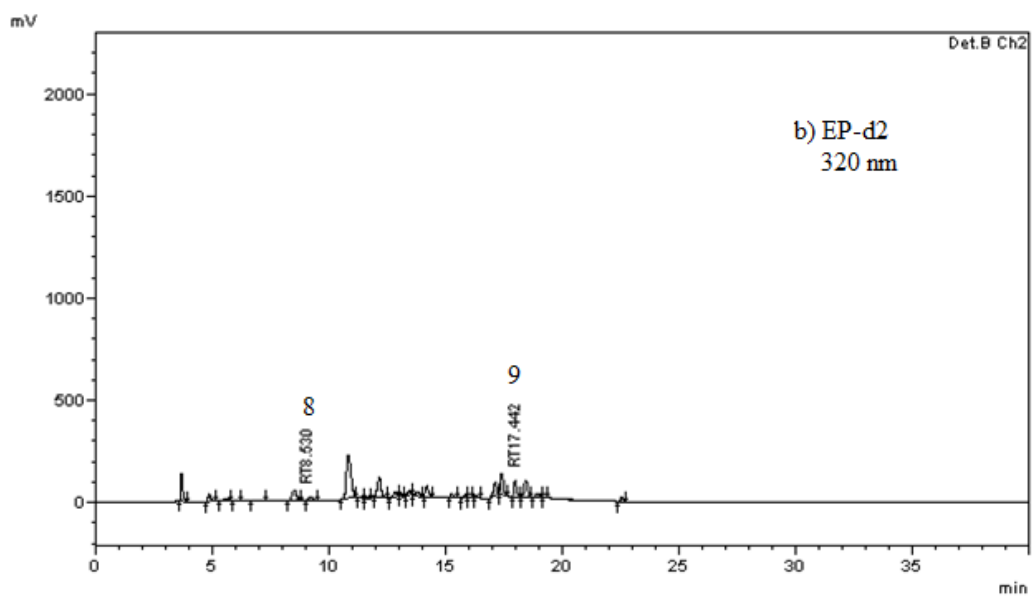
Slika 35. HPLC hromatogrami ploda kupine EP-d1: 8 - kafena kiselina i 9 - sinapinska kiselina, razdvojene komponente detektovane su na 320 nm



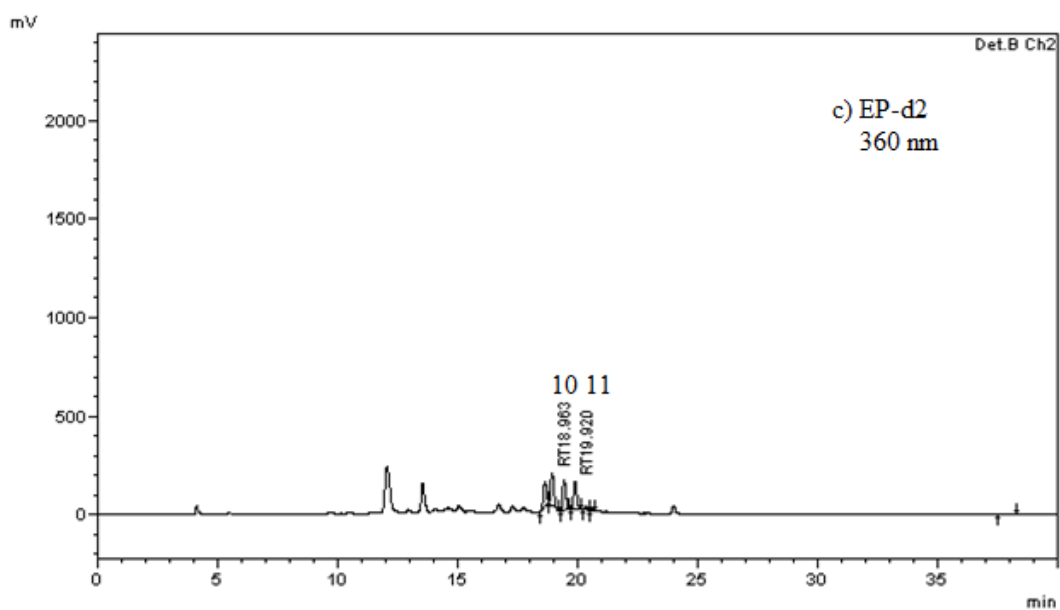
Slika 36. HPLC hromatogrami ploda kupine EP-d1: 10 – rutin i 11 - miricetin, razdvojene komponente detektovane su na 360 nm



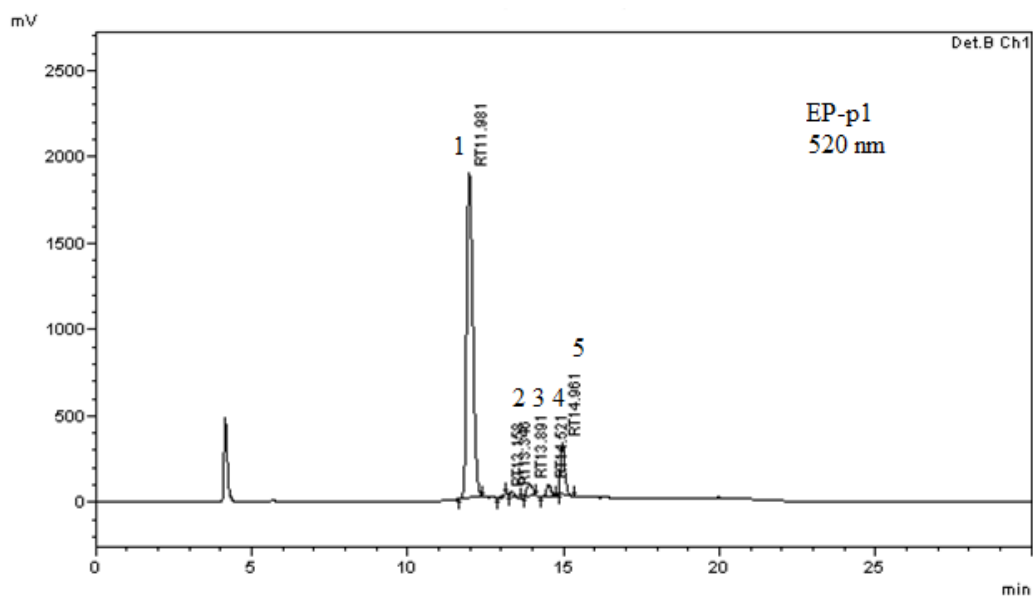
Slika 37. HPLC hromatogrami ploda kupine EP-d2: 1 - galna kiselina, 2 - protokatehinska kiselina, 3 - katehin, 4 - epikatehin 5 - vanilinska kiselina, 6 – siringinska kiselina, 7 – elaginska kiselina razdvojene komponente detektovane su na 280 nm



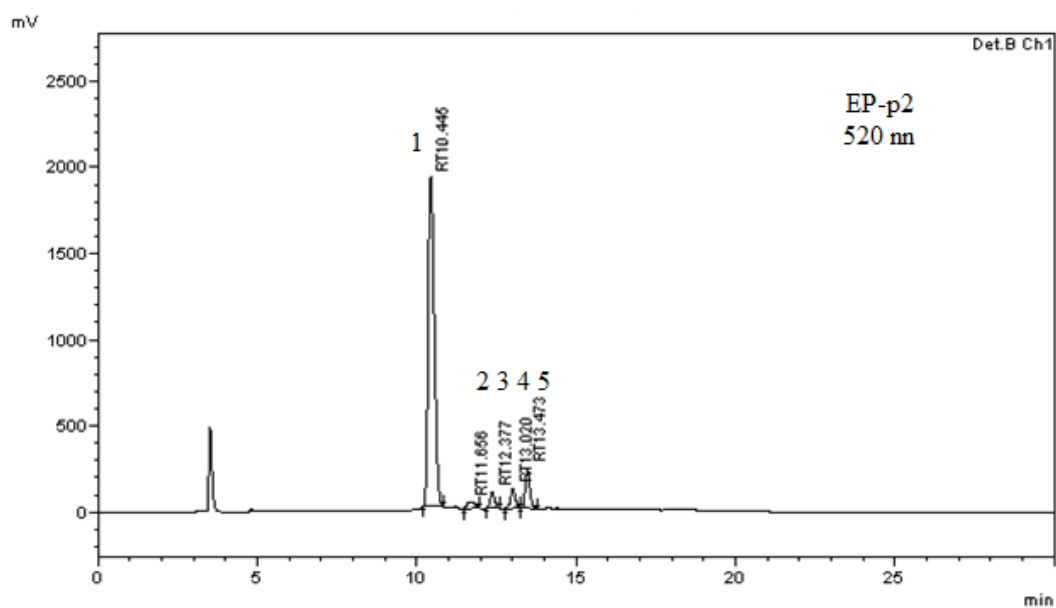
Slika 38. HPLC hromatogrami ploda kupine EP-d2: 8 - kafena kiselina i 9 - sinapinska kiselina, razdvojene komponente detektovane su na 320 nm



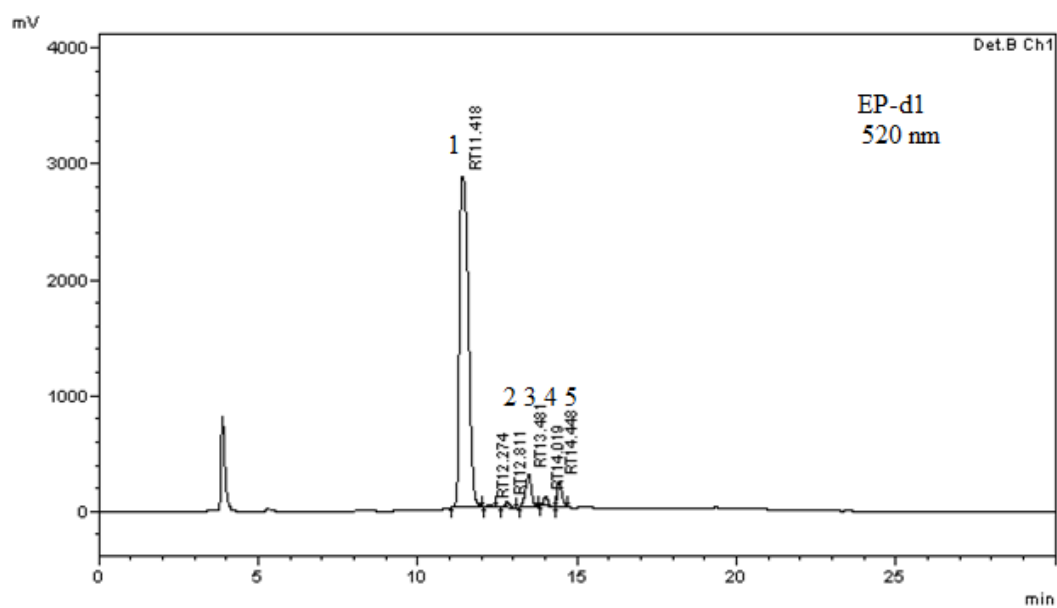
Slika 39. HPLC hromatogrami ploda kupine EP-d2: 10 – rutin i 11 - miricetin, razdvojene komponente detektovane su na 360 nm



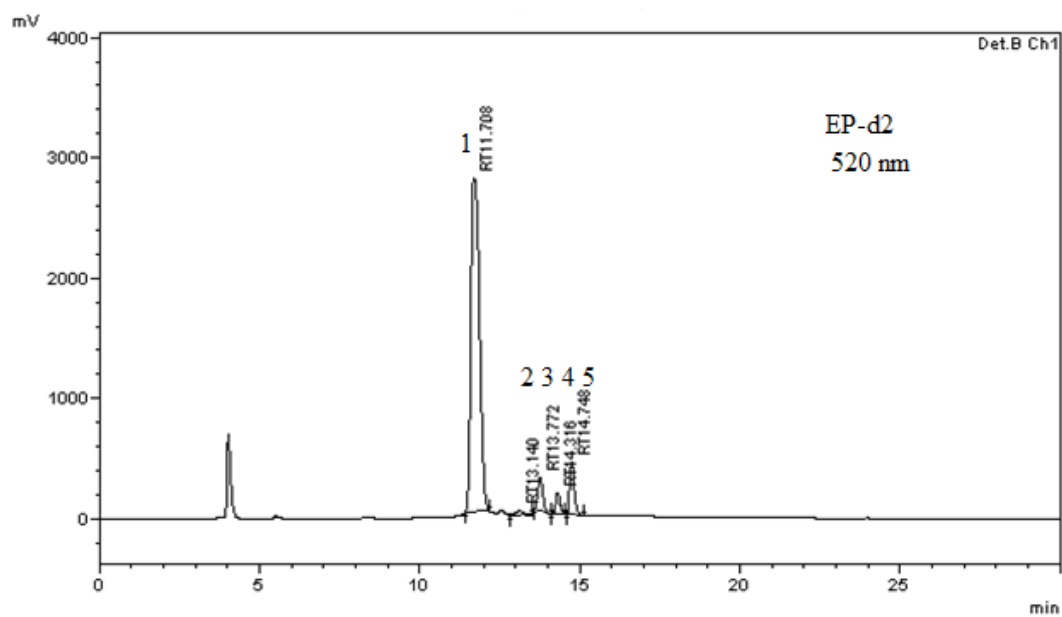
Slika 40. HPLC hromatogrami antocijana ploda kupine EP-p1, razdvojene komponente detektovane su na 520 nm



Slika 41. HPLC hromatogrami antocijana ploda kupine EP-p2, razdvojene komponente detektovane su na 520 nm

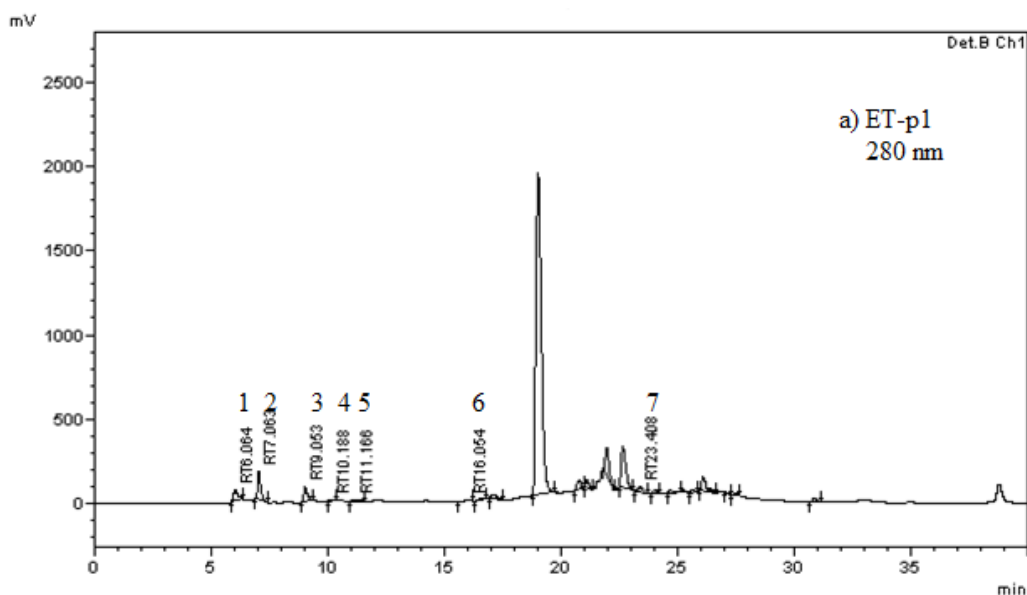


Slika 42. HPLC hromatogrami antocijana ploda kupine EP-d1, razdvojene komponente detektovane su na 520 nm

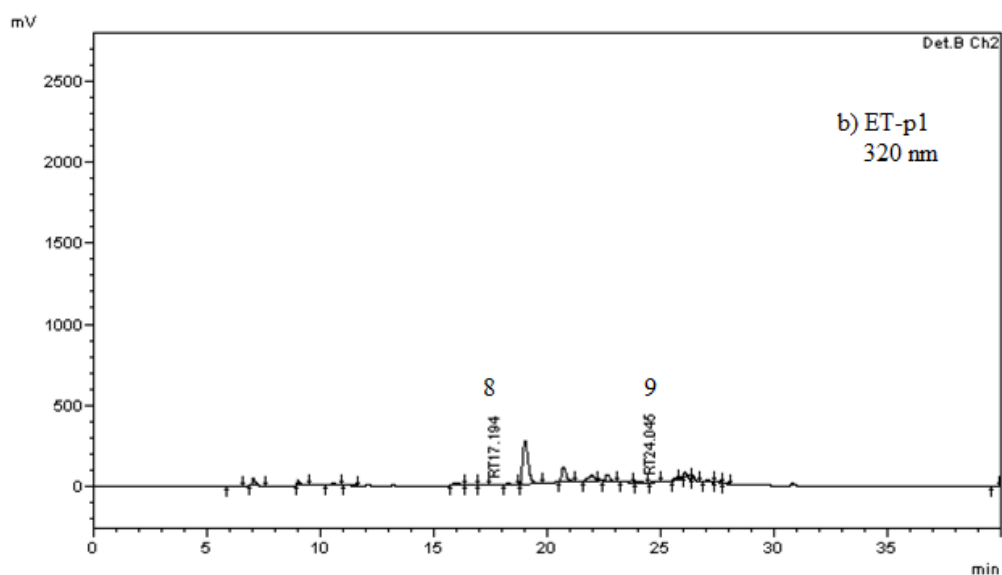


Slika 43. HPLC hromatogrami antocijana ploda kupine EP-d2, razdvojene komponente detektovane su na 520 nm

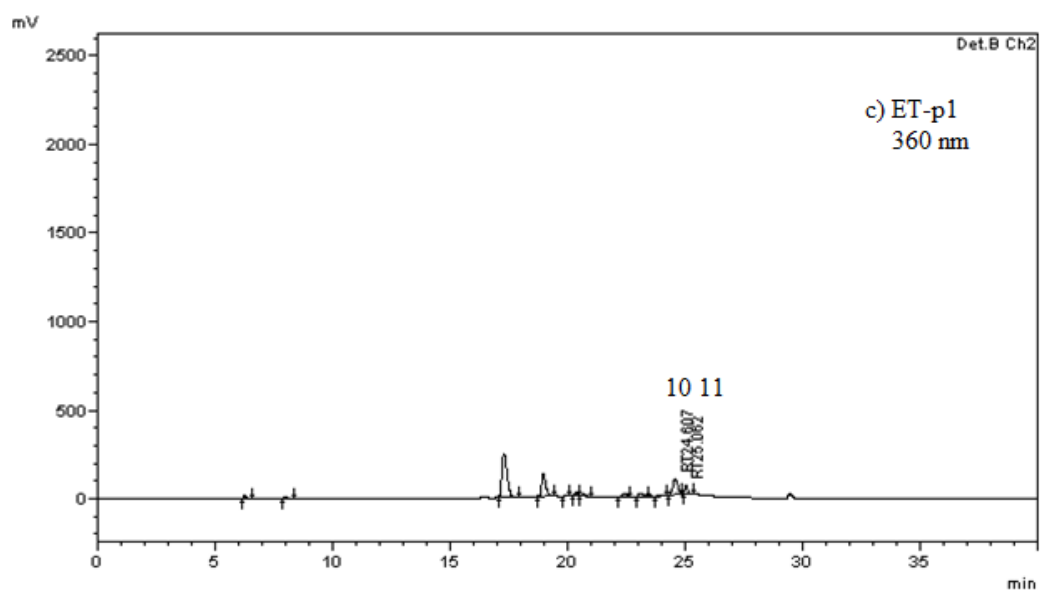
Na slikama 44 - 55 prikazani su HPLC hromatogrami fenolnih kiselina i flavonoida detektovanih u ekstraktima tropova kupine (ET-p1, ET-p2, ET-d1 i ET-d2) na talasnim dužinama 280 nm (a), 320 nm (b) i 360 nm (c), a na slikama 56 – 59 prikazani su HPLC hromatogrami antocijana u ekstraktima tropova kupine (ET-p1, ET-p2, ET-d1 i ET-d2) na 520 nm.



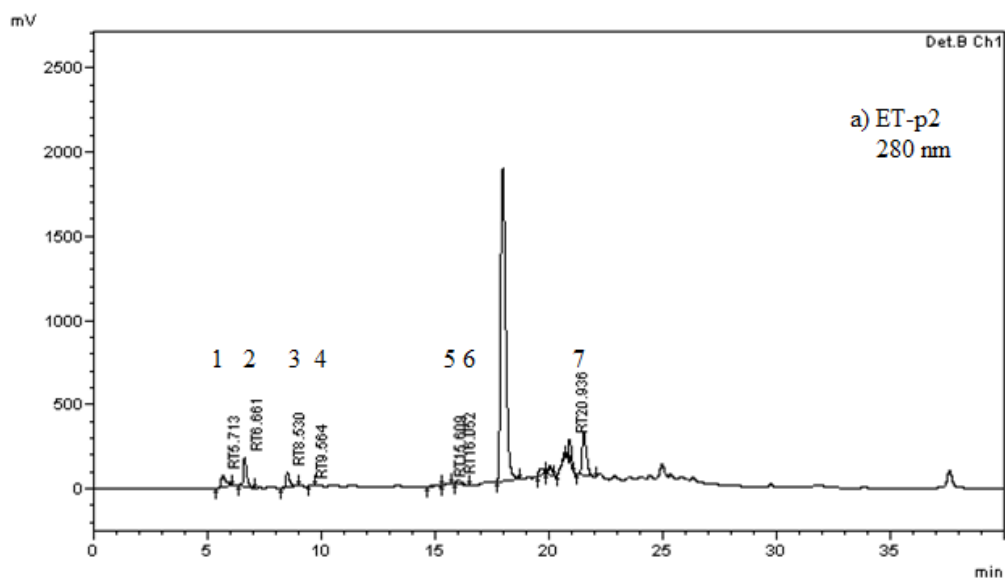
Slika 44. HPLC hromatogrami troja kupine ET-p1: 1 - galna kiselina, 2 - protokatehinska kiselina, 3 - katehin, 4 - epikatehin 5 - vanilinska kiselina, 6 – siringinska kiselina, 7 – elaginska kiselina razdvojene komponente detektovane su na 280 nm



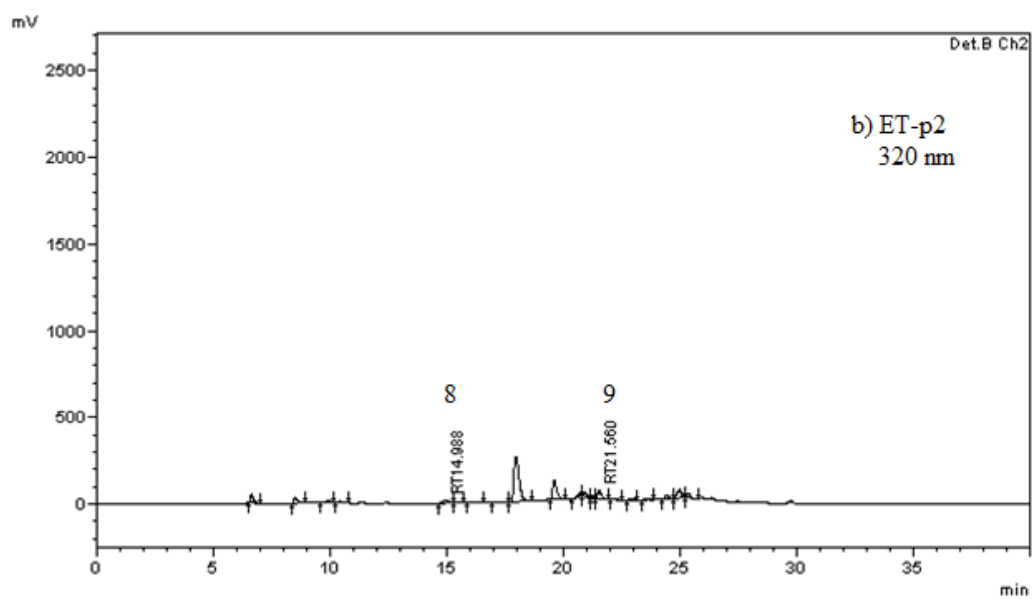
Slika 45. HPLC hromatogrami troja kupine ET-p1: 8 - kafena kiselina i 9 - sinapinska kiselina, razdvojene komponente detektovane su na 320 nm



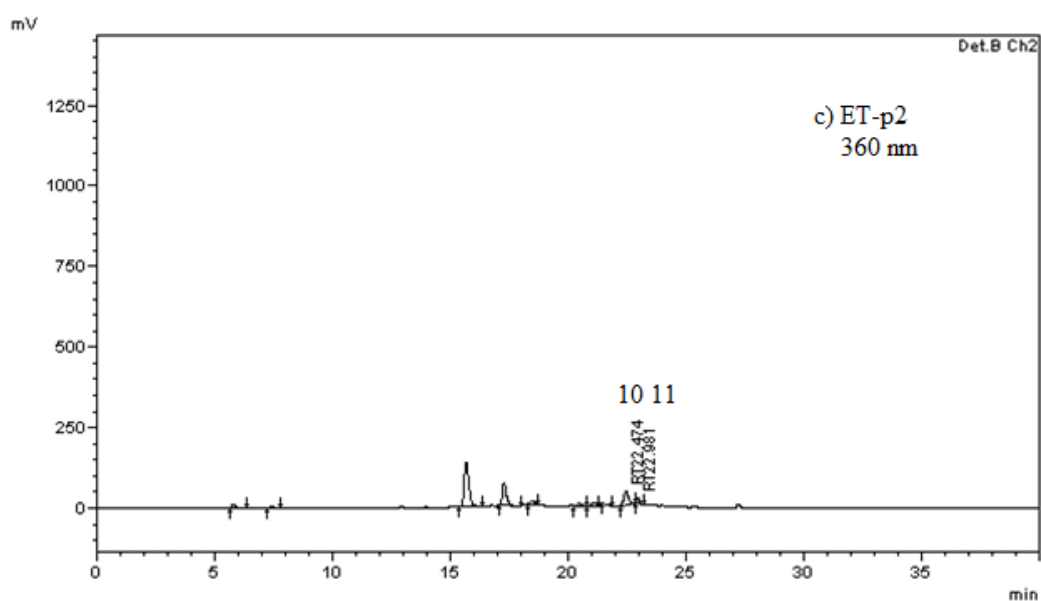
Slika 46. HPLC hromatogrami tropa kupine ET-p1: 10 – rutin i 11 - miricetin, razdvojene komponente detektovane su na 360 nm



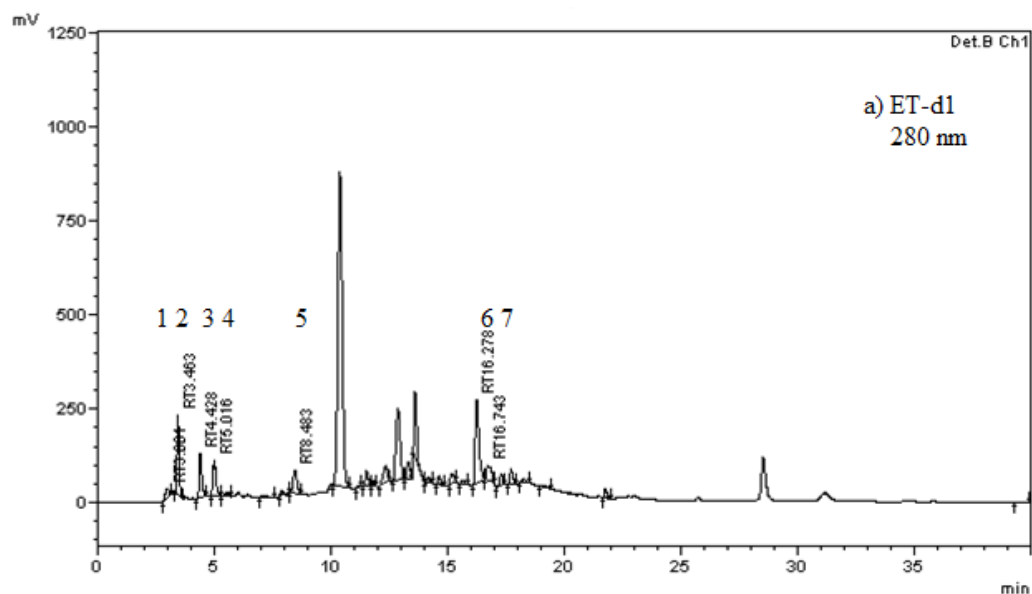
Slika 47. HPLC hromatogrami tropa kupine ET-p2: 1 - galna kiselina, 2 - protokatehinska kiselina, 3 - katehin, 4 - epikatehin 5 - vanilinska kiselina, 6 – siringinska kiselina, 7 – elaginska kiselina razdvojene komponente detektovane su na 280 nm



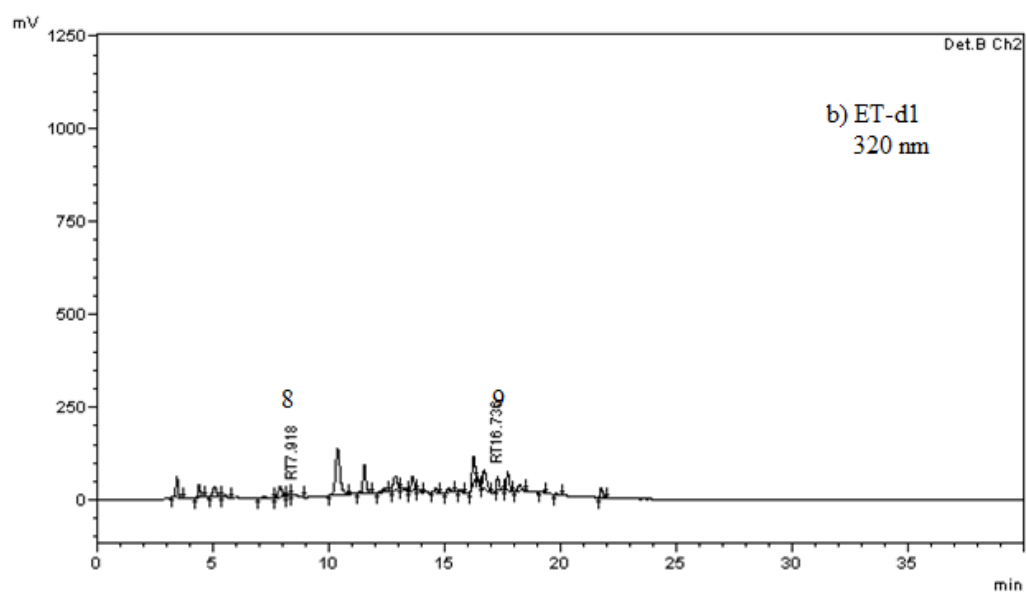
Slika 48. HPLC hromatogrami tropa kupine ET-p2: 8 - kafena kiselina i 9 - sinapinska kiselina, razdvojene komponente detektovane su na 320 nm



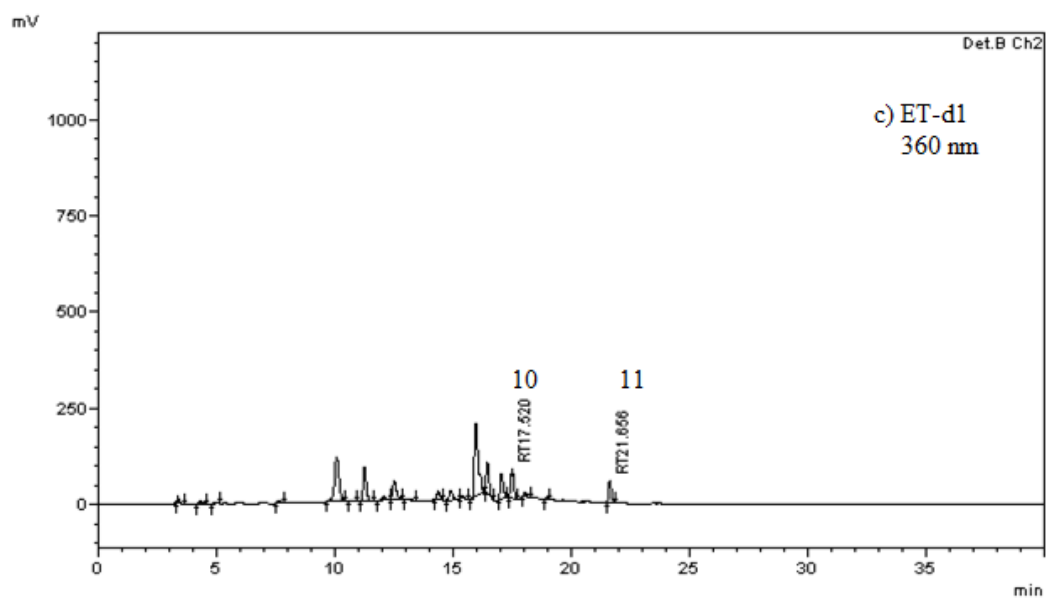
Slika 49. HPLC hromatogrami tropa kupine ET-p2: 10 – rutin i 11 - miricetin, razdvojene komponente detektovane su na 360 nm



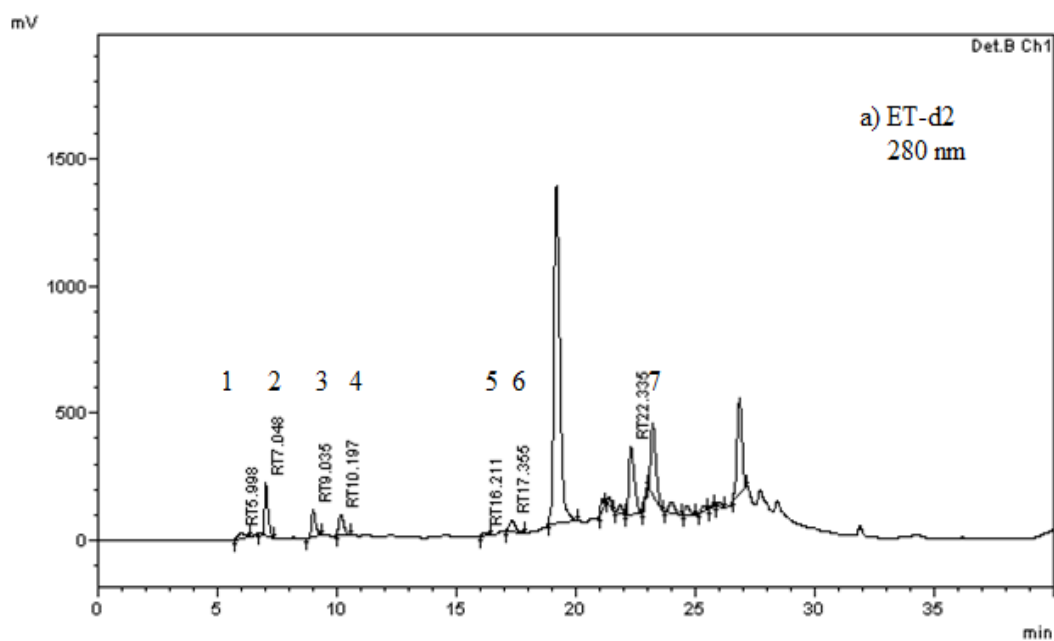
Slika 50. HPLC hromatogrami tropa kupine ET-d1: 1 - galna kiselina, 2 - protokatehinska kiselina, 3 - katehin, 4 - epikatehin 5 - vanilinska kiselina, 6 – siringinska kiselina, 7 – elaginska kiselina razdvojene komponente detektovane su na 280 nm



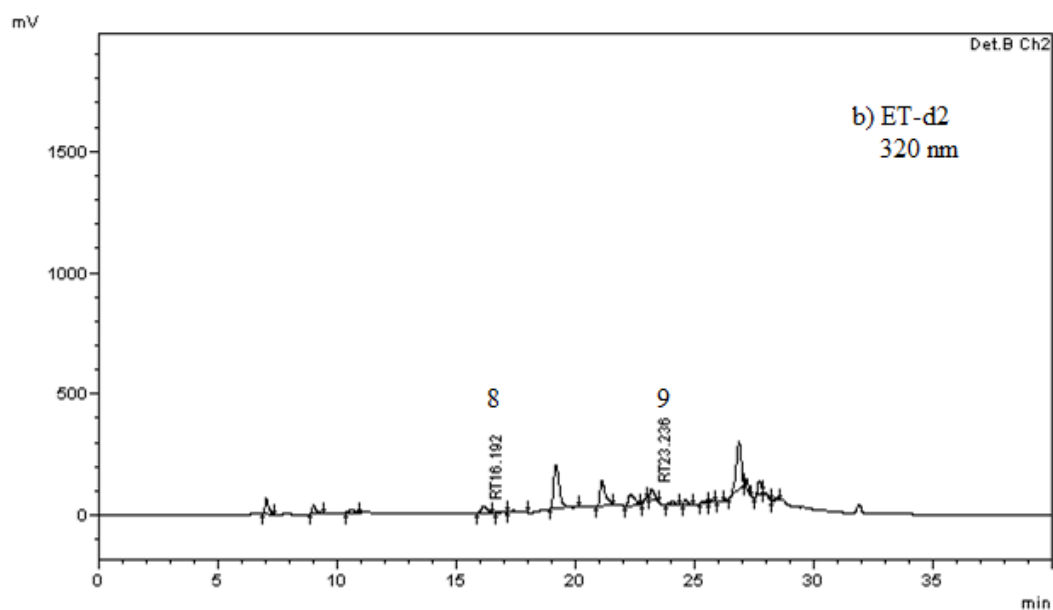
Slika 51. HPLC hromatogrami tropa kupine ET-d1: 8 - kafena kiselina i 9 - sinapinska kiselina, razdvojene komponente detektovane su na 320 nm



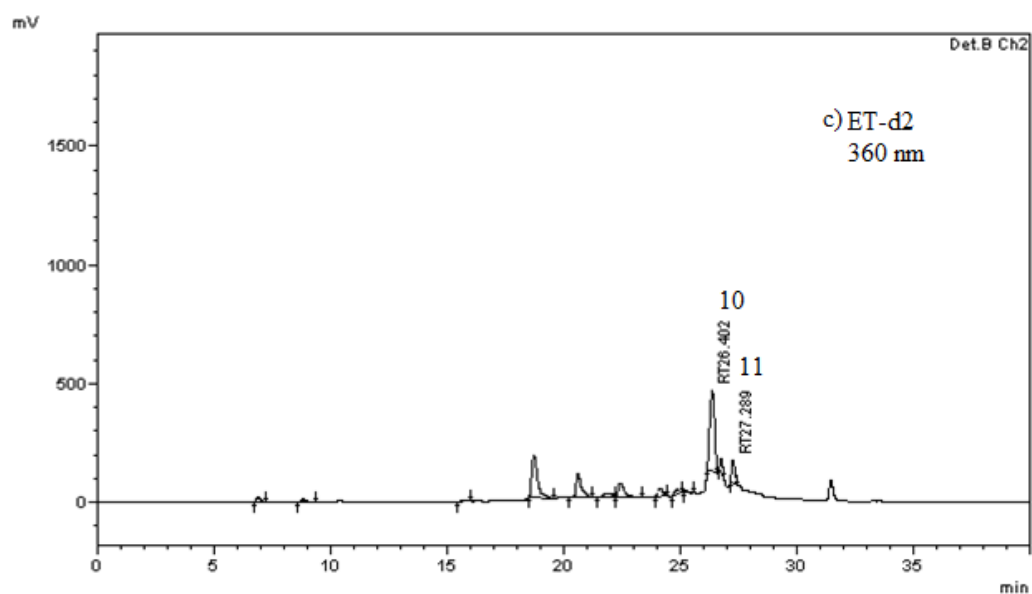
Slika 52. HPLC hromatogrami tropa kupine ET-d1: 10 – rutin i 11 - miricetin, razdvojene komponente detektovane su na 360 nm



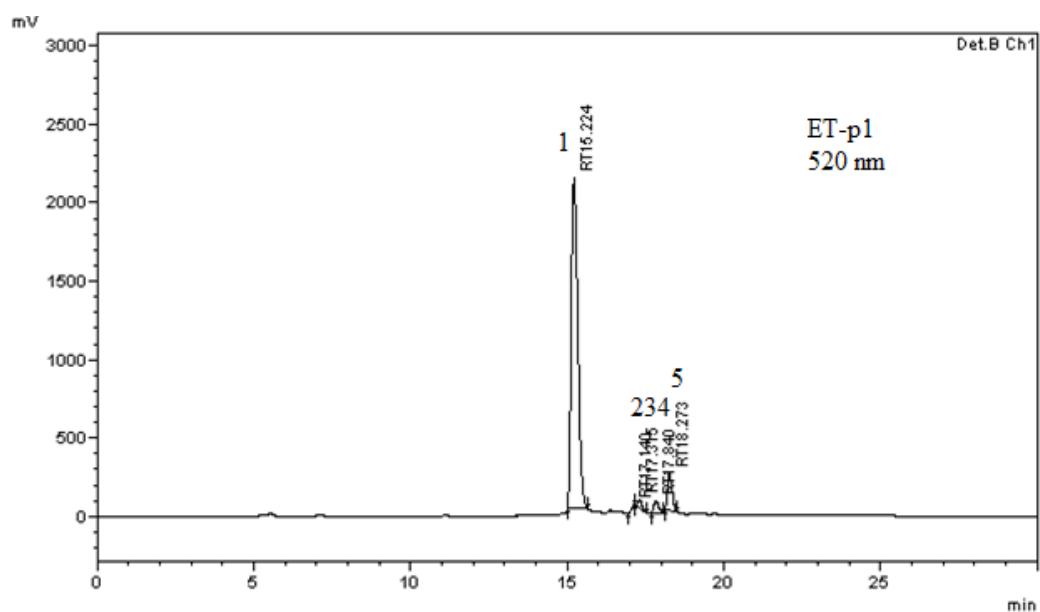
Slika 53. HPLC hromatogrami tropa kupine ET-d2: 1 - galna kiselina, 2 - protokatehinska kiselina, 3 - katehin, 4 - epikatehin 5 - vanilinska kiselina, 6 – siringinska kiselina, 7 – elaginska kiselina razdvojene komponente detektovane su na 280 nm



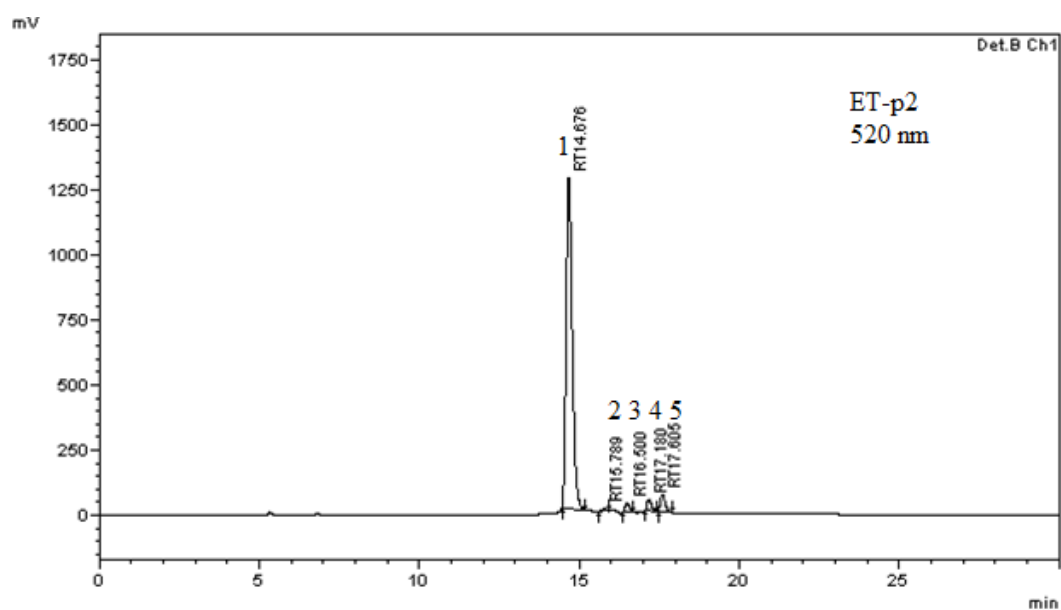
Slika 54. HPLC hromatogrami tropa kupine ET-d2: 8 - kafena kiselina i 9 - sinapinska kiselina, razdvojene komponente detektovane su na 320 nm



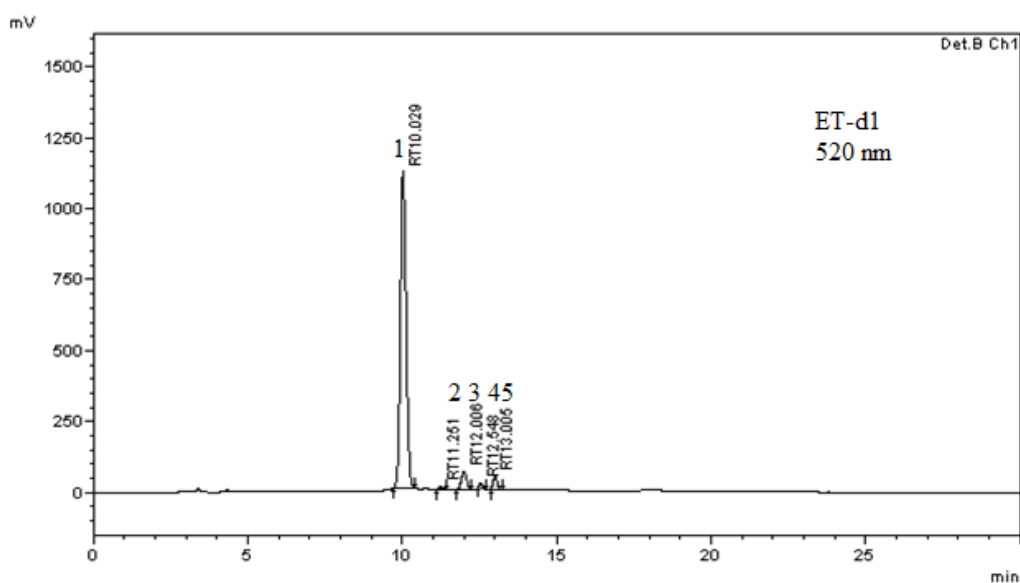
Slika 55. HPLC hromatogrami tropa kupine ET-d2: 10 – rutin i 11 - miricetin, razdvojene komponente detektovane su na 360 nm



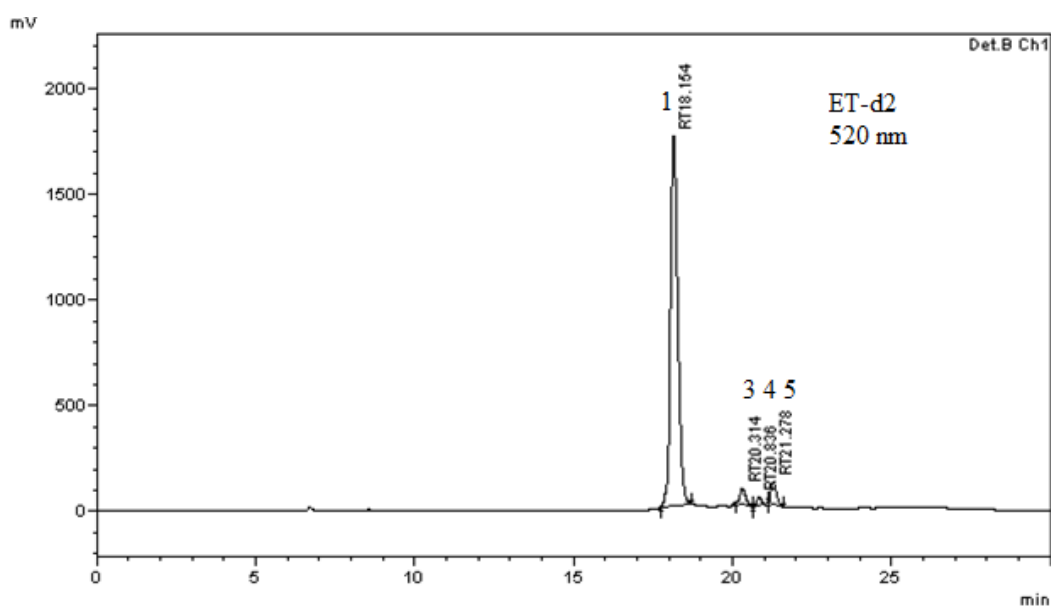
Slika 56. HPLC hromatogrami antocijana tropa kupine ET-p1 razdvojene komponente detektovane su na 520 nm



Slika 57. HPLC hromatogrami antocijana tropa kupine ET-p2 razdvojene komponente detektovane su na 520 nm



Slika 58. HPLC hromatogrami antocijana tropa kupine ET-d1 razdvojene komponente detektovane su na 520 nm



Slika 59. HPLC hromatogrami antocijana tropa kupine ET-d2 razdvojene komponente detektovane su na 520 nm

Rezultati HPLC analize uzoraka plodova kupine (EP-p1, EP-p2, EP-d1 i EP-d2) su prikazani u tabeli 16, a uzoraka tropa kupine (ET-p1, ET-p2, ET-d1 i ET-d2) u tabeli 17. Dobijeni rezultati ukazuju na bogati sadržaj i raznolikost polifenolnih jedinjenja u kultivisanim i divljim sortama kupine. U ekstraktima ploda i tropa je identifikovano šest fenolnih kiselina (galna, protokatehinska, siringinska, elaginska, vanilinska, kafena i sinapinska kiselina), flavonoidi (katehin, epikatehin, rutin i miricetin) i različiti antocijani. Kod uzoraka soka (Tabela 18) su identifikovane tri fenolne kiseline (galna, protokatehinska i kafeinska), flavonoidi (katehin) i

antocijani. Sadržaj kvercetina kod ispitivanih uzoraka nije utvrđen. Milivojević i saradnici (2011) su ispitivali sadržaj kempferola, miricetin, kvercetina i elaginske kiseline, te pritom utvrdili veći sadržaj navedenih jedinjenja kod uzoraka divlje kupine u odnosu na kultivisane sorte Thornfree i Čačanka bestrna. Kvercetin nije bio pronađen kod ispitivanih uzoraka.

Od prisutnih fenolnih kiselina u uzorcima ploda kupine detektovan je najveći sadržaj protokatehinske kiseline (1,316 - 2,606 mg/g s.m.), a od flavonola detektovan je najveći sadržaj rutina (0,277 - 1,426 mg/g s.m.) i vrlo visoke vrijednosti za katehin (1,675 - 3,131 mg/g s.m.). Kod uzorka EP-p1 nije indentifikovan epikatehin i elaginska kiselina, dok je kod uzoraka divlje sorte EP-d2 detektovano samo prisustvo elaginske kiseline. Veći sadržaj polifenolnih jedinjanja je uglavnom identifikovan u ekstraktima divljih sorti kupine, osim za sadržaj epikatehina, elaginske kiseline i rutina.

U uzorcima ploda, tropa i soka kupine identifikacija i kvantifikacija antocijana izvedena je primjenom jedinog dostupnog standardnog jedinjenja cijanidin-3-*O*-glukozida, a sadržaj antocijana u ekstraktima izražen je kao ekvivalent cijanidin-3-*O*-glukozida. Na osnovu dostupne literature i dobijenih hromatograma (Slike 40 - 43, 56 - 59, 72 - 75), može se pretpostaviti da su prisutni antocijani: cijanidin-3-glukozida, cijanidin-3-rutinozid, cijanidin-3-ksilozid, cijanidin-3-malonil-glikozid i cijanidin-3-dioksazil-glikozid (Fan-Chiang i Wrolstad, 2005; Overall i sar., 2017; Oszmiański i sar., 2015). U ekstraktima dobijenim iz ploda kupina detektovan je visok sadržaj cijanidin-3-glukozida (20,076 - 43,392 mg/g s.m.). Vrijednosti sadržaja cijanidin-3-glukozida su sličnih vrijednosti kod uzoraka ploda EP-d1 (43,392 mg/g s.m.) i EP-d2 (41,564 mg/g s.m.), bez statistički značajne razlike. U odnosu na ukupan sadržaj antocijana, cijanidin-3-glukozid u plodu kupine je prisutan sa udjelom oko 84 %, kod svih ispitivanih uzoraka. Takođe, u studiji koju su proveli Kim i saradnici, (2015), kao dominantan antocijan u plodu kupine se navodi cijanidin-3-glukozid sa udjelom od 87 do 96 % u odnosu na ukupan sadržaja antocijana, a zatim po opadajućim vrijednostima su utvrđeni: cijanidin-3-rutinozid, cijanidin-3-ksilozid i pelargonidin-3-glukozid. Takođe u radovima drugih autora cijanidin-3-glukozid se navodi kao dominantan antocijan u plodovima kupina (Wrolstad, 2006; Jakobek i sar., 2007; Huang i sar., 2012; Stefanut i sar., 2013).

Milenković-Anđelković i saradnici (2015) su odredili vrijednosti ukupnih antocijana kod uzoraka divlje kupine: cijanidin-3-glukozid (2,054 mg/g ploda), cijanidin-3-rutinozid (0,147 mg/g ploda), cijanidin-3-arabinozid (0,049 mg/g ploda) i cijanidin-3-malonil-glikozida (0,157 mg/g ploda), a ekstrakcija je vršena smješom rastvarača (mravlja kiselina/metanol/voda 0,1/70/29,9 v/v/v %). U poređenju sa navedenim rezultatima, u ovoj doktorskoj disertaciji su utvrđene 1,5 - 2 puta više vrijednosti. Takođe, Milenković-Anđelković i saradnici (2015) navode da cijanidin-3-glukozid čini 85,29 % sadržaja ukupnih antocijana, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u

ovom radu. Na oscilacije u sadržaju antocijana mogu da utiču mnogobrojni faktori, kao što je izlaganje toploti, kiseoniku, enzimima, metalima i askorbinskoj kiselini (Stebbins i sar., 2017). Visok sadržaj askorbinske kiseline utiče na razgradnju cijanidin-3-glukozida usljed čega nastaje 6-hidroksi-cijanidin-3-glukozid (Stebbins i sar., 2017; Farr i Giusti, 2018).

Tabela 16. Rezultati HPLC analize polifenolnih jedinjenja u ekstraktima ploda kupine

Fenolna jedinjenja	EP-p1 ¹	EP-p2	EP-d1	EP-d2
Galna kiselina	0,335±0,014 ^a	0,267±0,011 ^b	0,151±0,006 ^c	0,082±0,003 ^d
Protokatehinska kiselina	1,695±0,080 ^a	1,694±0,082 ^a	2,606±0,128 ^b	1,316±0,061 ^c
Epikatehin	nd	1,628±0,080 ^a	0,431±0,020 ^b	0,220±0,009 ^c
Katehin	1,675±0,084 ^a	2,428±0,187 ^b	3,131±0,148 ^c	2,962±0,142 ^c
Kafena kiselina	0,039±0,001 ^a	0,078±0,003 ^b	0,018±0,001 ^c	0,105±0,004 ^d
Siringinska kiselina	0,102±0,004 ^a	0,126±0,005 ^b	0,084±0,003 ^c	0,246±0,011 ^d
Elaginska kiselina	nd	0,212±0,009 ^a	0,012±0,001 ^b	nd
Vanilinska kiselina	0,020±0,001 ^a	0,093±0,004 ^b	0,533±0,024 ^c	0,132±0,005 ^d
Sinapinska kiselina	0,061±0,002 ^a	0,016±0,000 ^b	0,283±0,011 ^c	0,221±0,010 ^d
Rutin	1,426±0,068 ^a	0,277±0,011 ^b	1,114±0,051 ^c	0,933±0,042 ^d
Miricetin	0,363±0,012 ^a	0,173±0,007 ^b	1,118±0,051 ^c	0,831±0,038 ^d
Total 280, 320, 360 nm	5,716	6,976	9,481	7,048
Antocijan 1 (Cijanidin-3-glukozid)	20,419±1,018 ^a	20,076±1,001 ^a	43,392±2,101 ^b	41,564±2,051 ^b
Antocijan 2 (Cijanidin-3-rutinozid)	0,127±0,004 ^a	0,507±0,018 ^b	0,344±0,008 ^c	0,281±0,011 ^d
Antocijan 3 (Cijanidin-3-ksilozid)	0,793±0,031 ^a	0,714±0,028 ^a	2,786±0,220 ^b	2,450±0,117 ^c
Antocijan 4 (Cijanidin-3-malonil-glikozid)	0,586±0,023 ^a	0,952±0,044 ^b	0,561±0,022 ^a	1,353±0,066 ^c
Antocijan 5 (Cijanidin-3-dioksazil-glikozid)	2,209±0,105 ^a	1,739±0,082 ^b	1,774±0,082 ^b	3,435±0,158 ^c
Total 520 nm	24,134	23,988	48,857	49,083

¹Rezultati su predstavljeni kao mg/g ekstrakta,

²nd – nije detektovano

^{a,b,c,d} Slova iznad svake vrijednosti ukazuju na značajne razlike od najmanje 5% (Dankanov test).

Prema studiji Howard i Hager (2007) ukupan sadržaj fenolnih kiselina u plodovima kupina je od 7 do 64 mg / 100 g ploda, i nalaze se uglavnom u konjugovanim oblicima, kao estri i glikozidi, dok je veoma mali dio identifikovan kao slobodne kiseline. Prema literaturnim podacima najčešće detektovane polifenolne kiseline u kupinama su: galna kiselina, protokatehinska kiselina, siringinska kiselina, elaginska kiselina, vanilinska, kafena kiselina,

sinapinska kiselina, gentisinska kiselina, hlorogenksa kiselina, neohlorogenska kiselina i esterifikovane forme m-kumarinske, p-kumarinske, 3,4-dimetoksi cinamične i hidroksikafena kiselina, koja je ujedno i dominantna kiselina kod kupina (Kaume i sar., 2012; Oszmiański i sar., 2015). Kod ekstrakata tropa i ploda su utvrđene veće količine polifenolnih jedinjenja kod uzoraka divljih sorti, osim u slučaju sadržaja galne i vanilinske kiseline. Ekstrakti tropa sadrže oko dva puta veće količine cijanidin-3-glukozida, a utvrđene su kod uzorka kultivisane kupine ET-p1 (97,300 mg/g s.m.) i uzorka divlje sorte ET-d1 (89,277 mg/g s.m.). U poređenju sa prikazanim rezultatima daleko niže vrijednosti sadržaja protokatehinske kiseline (0,338 mg/g), i značajno veći sadržaj katehina (13,496 mg/g) je utvrđen u disertaciji Krstić (2018), kod ekstrakata tropa kupine.

Tabela 17. Rezultati HPLC analize polifenolnih jedinjenja u ekstraktima tropa

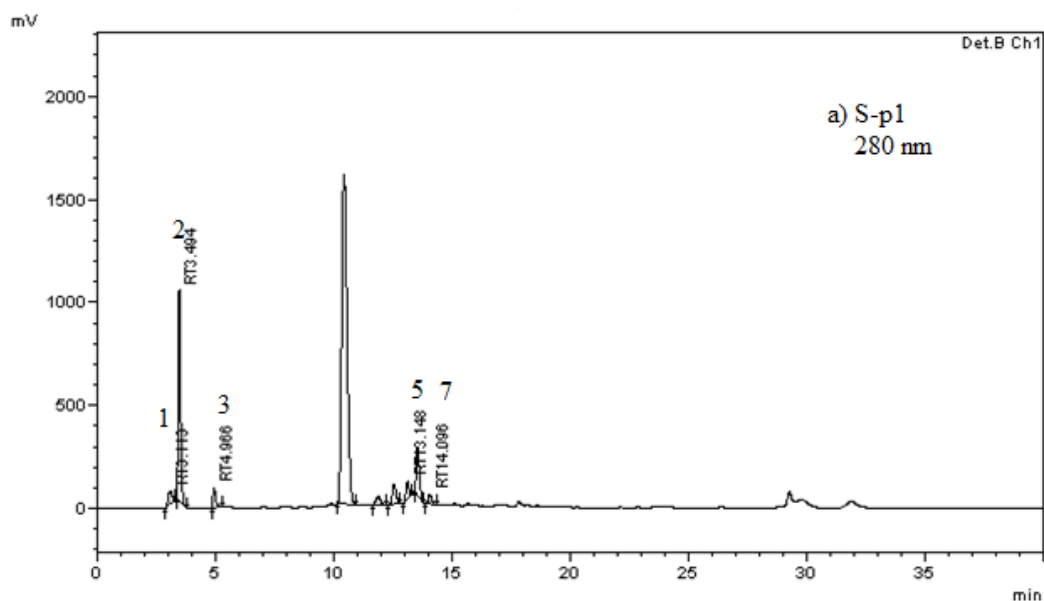
Fenolna jedinjenja	ET-p1¹	ET-p2	ET-d1	ET-d2
Galna kiselina	0,544±0,021 ^a	0,674±0,029 ^b	0,165±0,008 ^c	0,336±0,014 ^d
Protokatehinska kiselina	1,644±0,079 ^a	1,646±0,080 ^a	1,294±0,059 ^b	2,180±0,102 ^c
Epikatehin	0,100±0,048 ^a	0,062±0,002 ^a	1,560±0,071 ^b	2,056±0,101 ^c
Katehin	3,568±0,171 ^{ab}	3,636±0,174 ^b	3,245±0,158 ^a	4,569±0,223 ^c
Kafena kiselina	0,025±0,001 ^a	0,097±0,003 ^b	0,113±0,005 ^c	0,165±0,008 ^d
Siringinska kiselina	0,230±0,009 ^a	0,468±0,019 ^b	0,772±0,032 ^c	0,768±0,033 ^c
Elaginska kiselina	0,048±0,002 ^a	0,108±0,005 ^b	0,269±0,012 ^c	0,455±0,020 ^d
Vanilinska kiselina	0,201±0,010 ^a	0,101±0,004 ^b	0,022±0,001 ^c	0,084±0,003 ^d
Sinapinska kiselina	0,079±0,003 ^a	0,259±0,011 ^b	0,293±0,013 ^c	0,261±0,012 ^b
Rutin	1,783±0,082 ^a	0,667±0,031 ^b	0,904±0,043 ^b	6,408±0,301 ^c
Miricetin	0,581±0,024 ^a	0,076±0,002 ^b	0,604±0,029 ^a	1,312±0,061 ^c
Total 280, 320, 360 nm	8,805	7,794	9,241	18,594
Antocijan 1 (Cijanidin-3-glukozid)	97,300±4,801 ^a	53,675±2,674 ^b	45,215±2,251 ^c	89,277±4,458 ^d
Antocijan 2 (Cijanidin-3-rutinozid)	0,542±0,020 ^a	0,381±0,016 ^b	0,130±0,005 ^c	0,634±0,029 ^d
Antocijan 3 (Cijanidin-3-ksilozid)	1,874±0,091 ^a	2,839±0,138 ^b	0,664±0,031 ^c	4,722±0,231 ^d
Antocijan 4 (Cijanidin-3-malonil-glikozid)	2,571±0,122 ^a	0,404±0,018 ^b	1,170±0,052 ^c	0,672±0,029 ^d
Antocijan 5 (Cijanidin-3-dioksazil-glikozid)	3,736±0,180 ^a	1,710±0,078 ^b	3,434±0,168 ^c	2,844±0,138 ^d
Total 520 nm	106,023	59,009	50,613	98,149

¹Rezultati su predstavljeni kao mg/g ekstrakta,

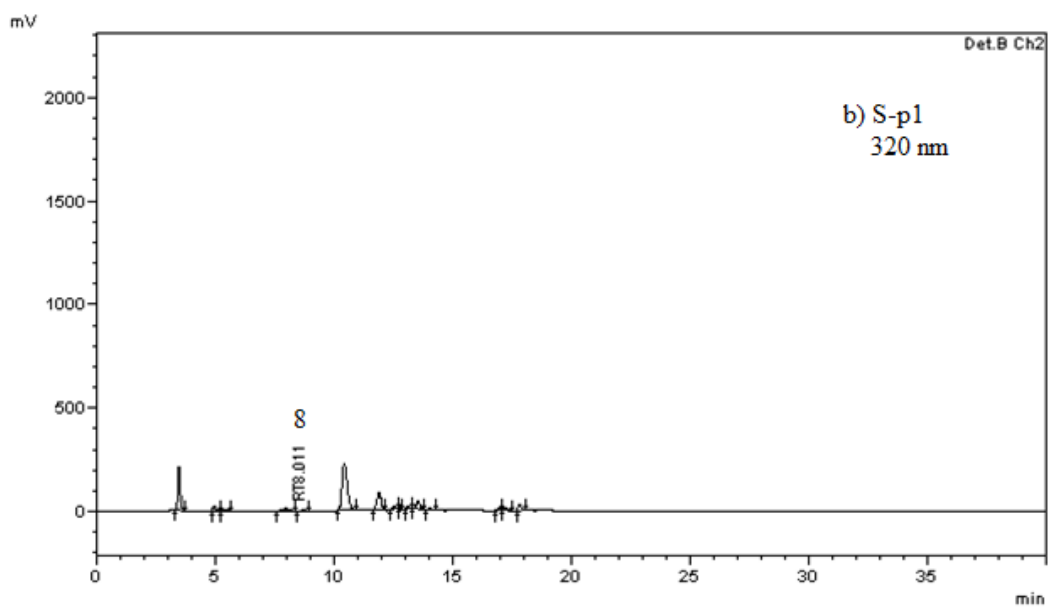
²nd – nije detektovano

^{a,b,c,d} Slova iznad svake vrijednosti ukazuju na značajne razlike od najmanje 5% (Dankanov test).

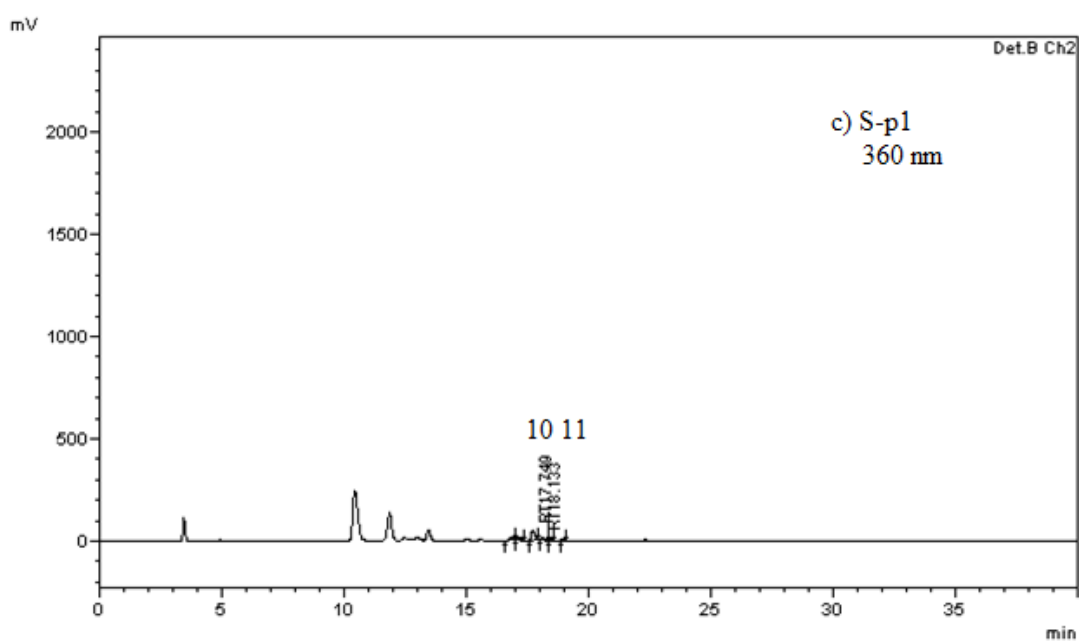
Veći sadržaj katehina (flavan-3-ola) je detektovan kod ekstrakata tropa u odnosu na ekstrakte ploda kupine, a najveći sadržaj je utvrđen kod tropa divlje kupine ET-d2 (4,569 mg/g s.m.), sa statistički značajnom razlikom ($p \leq 0,05$), u poređenju sa drugim ispitivanim ekstraktima. Kod uzorka ET-d2 je utvrđen i najveći sadržaj rutina (6,408 mg/g s.m.), te protokatehinske kiseline (2,180 mg/g s.m.). Prikazani rezultati su u skladu sa navodima Radovanović i saradnici (2013) da katehin predstavlja dominantan flavan-3-ol u plodovima divlje kupine, a rutin i kvercetin dominantne flavonole kod kultivisanih sorti.



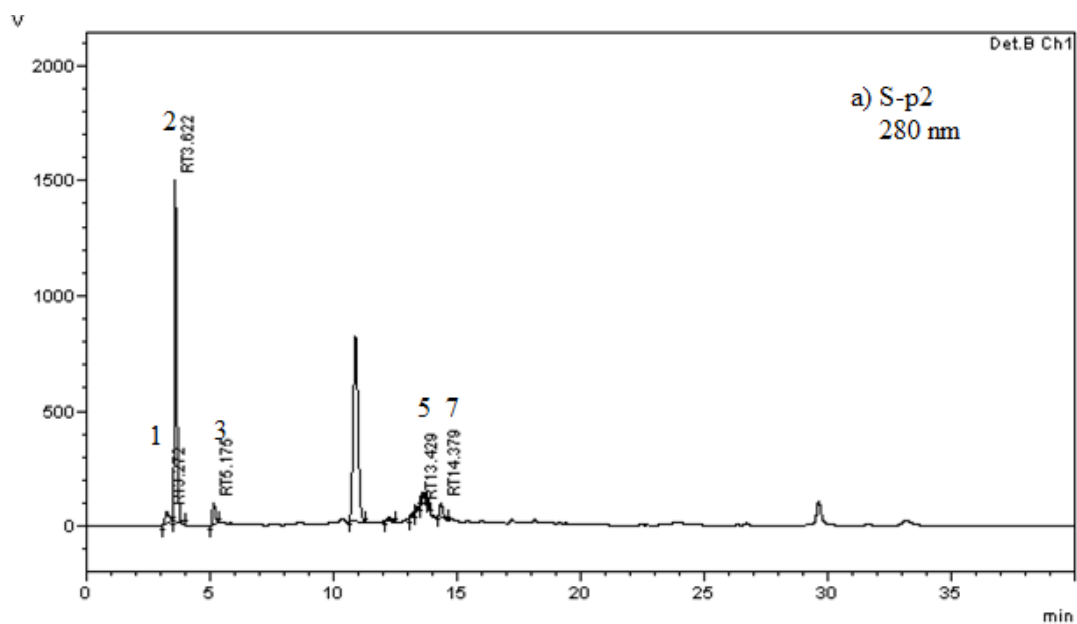
Slika 60. HPLC hromatogrami soka kupine S-p1: 1 - galna kiselina, 2 - protokatehinska kiselina, 3 - katehin, 4 - epikatehin 5 - vanilinska kiselina, 6 – siringinska kiselina, 7 – elaginska kiselina razdvojene komponente detektovane su na 280 nm



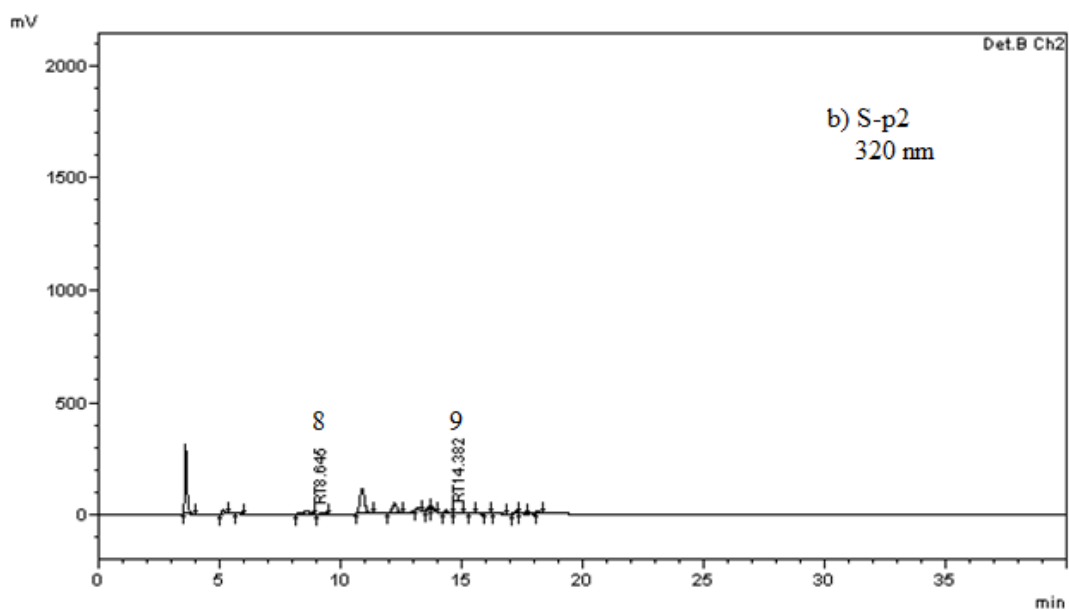
Slika 61. HPLC hromatogrami soka kupine S-p1: 8 - kafena kiselina i 9 - sinapinska kiselina, razdvojene komponente detektovane su na 320 nm



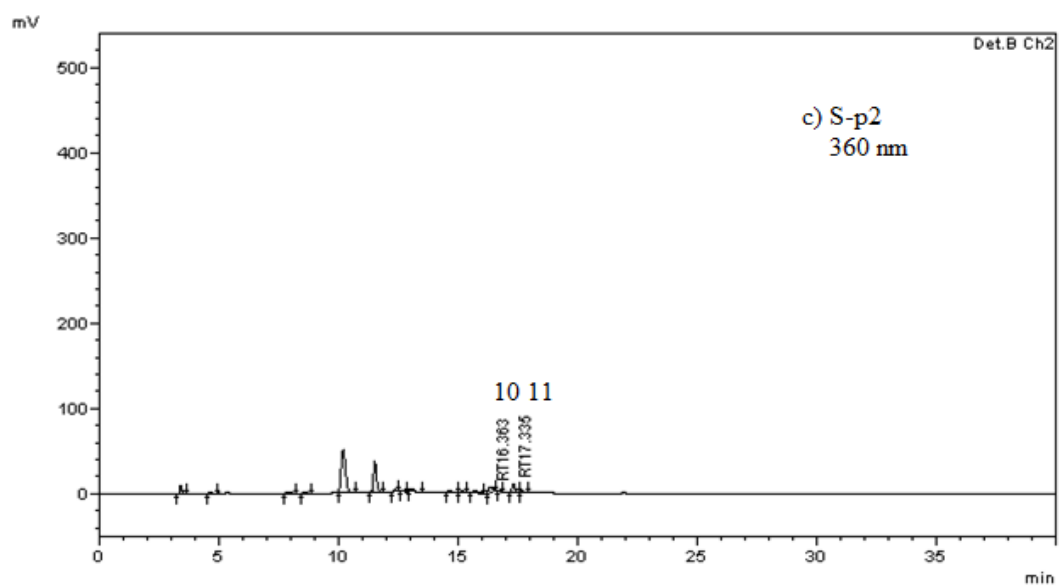
Slika 62. HPLC hromatogrami soka kupine S-p1: 10 – rutin i 11 - miricetin, razdvojene komponente detektovane su na 360 nm



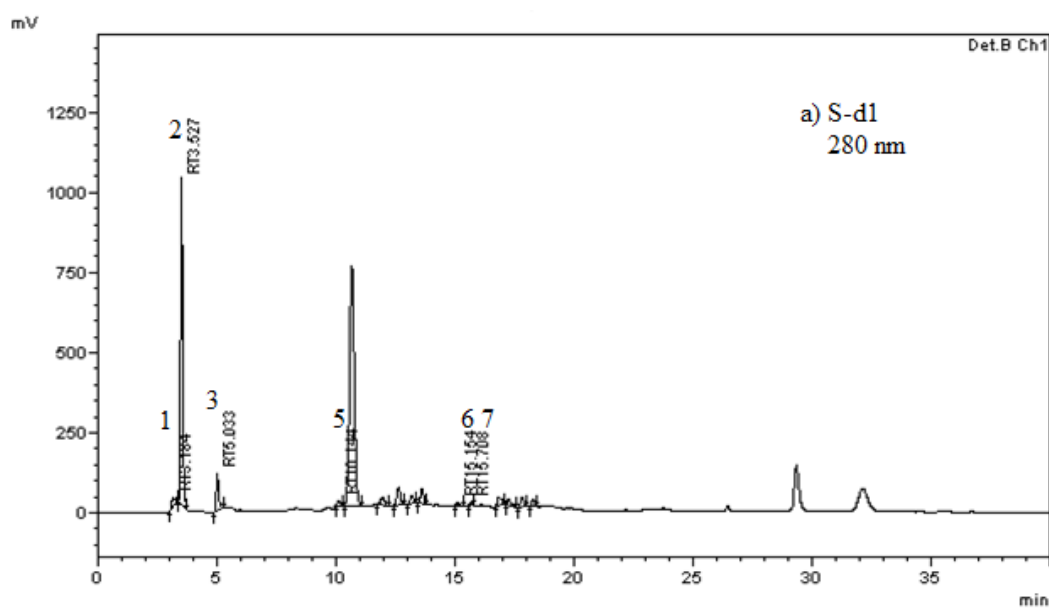
Slika 63. HPLC hromatogrami soka kupine S-p2: 1 - galna kiselina, 2 - protokatehinska kiselina, 3 - katehin, 4 - epikatehin 5 - vanilinska kiselina, 6 – siringinska kiselina, 7 – elaginska kiselina razdvojene komponente detektovane su na 280 nm



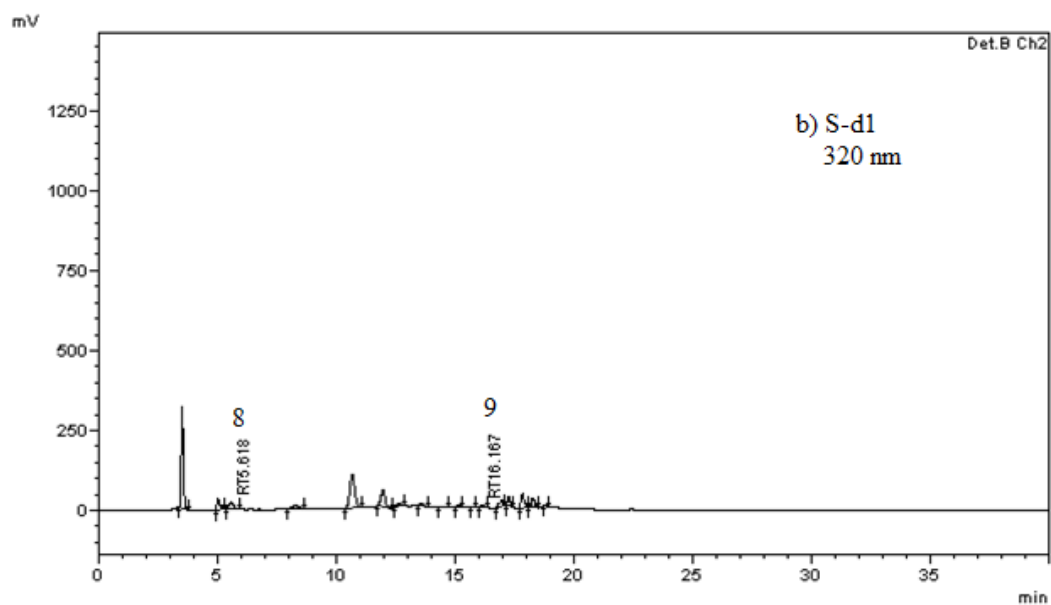
Slika 64. HPLC hromatogrami soka kupine S-p2: 8 - kafena kiselina i 9 - sinapinska kiselina, razdvojene komponente detektovane su na 320 nm



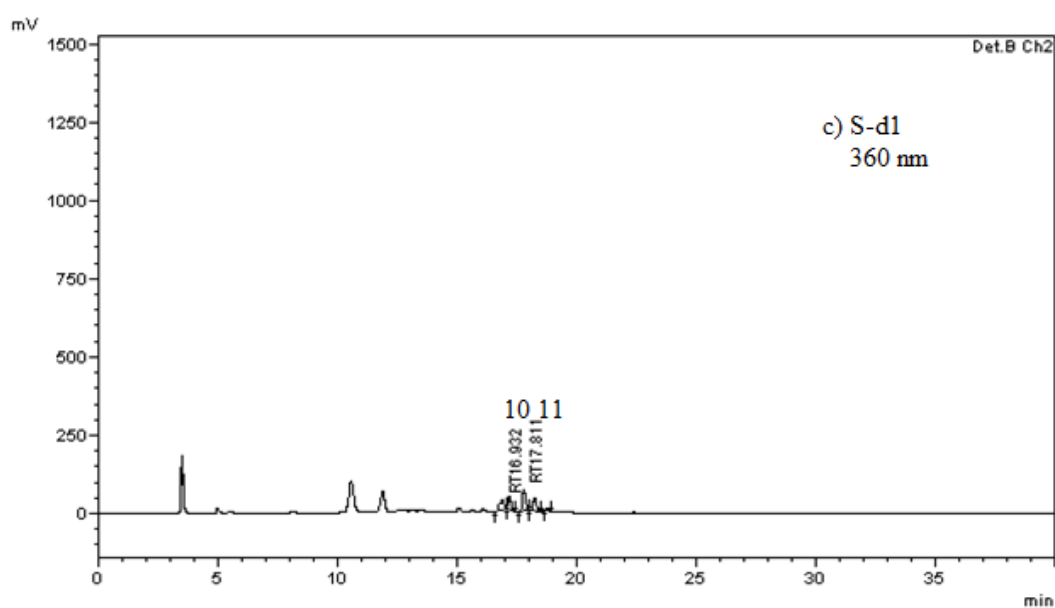
Slika 65. HPLC hromatogrami soka kupine S-p2: 10 – rutin i 11 - miricetin, razdvojene komponente detektovane su na 360 nm



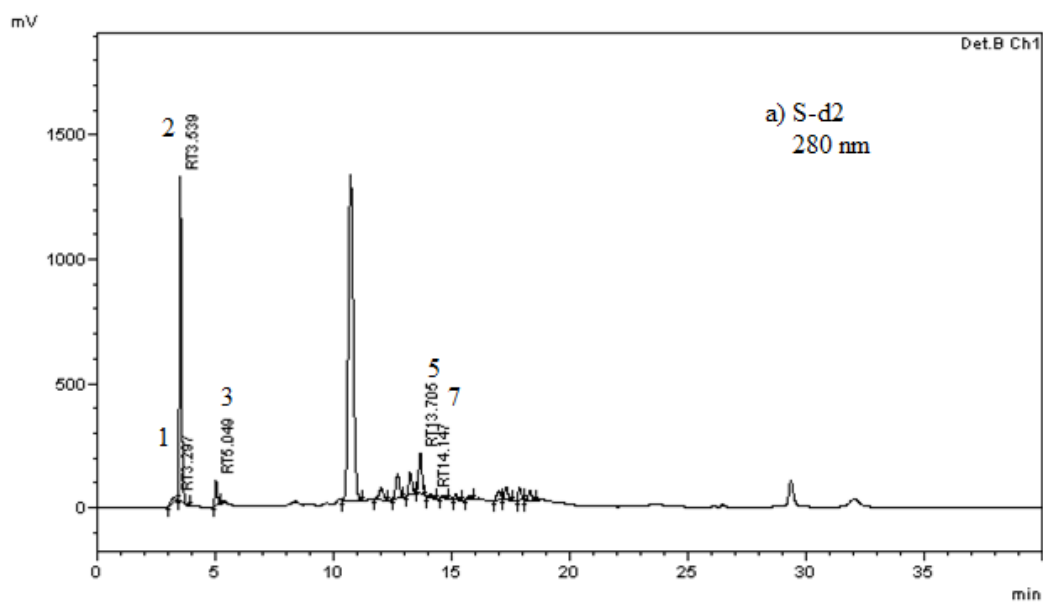
Slika 66. HPLC hromatogrami soka kupine S-d1: 1 - galna kiselina, 2 - protokatehinska kiselina, 3 - katehin, 4 - epikatehin 5 - vanilinska kiselina, 6 – siringinska kiselina, 7 – elaginska kiselina razdvojene komponente detektovane su na 280 nm



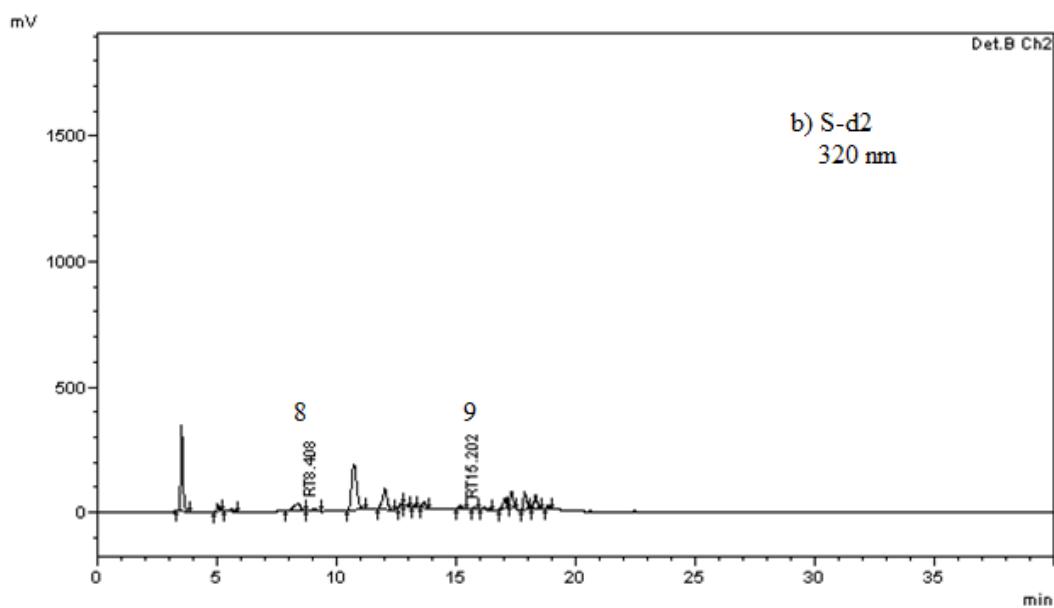
Slika 67. HPLC hromatogrami soka kupine S-d1: 8 - kafena kiselina i 9 - sinapinska kiselina, razdvojene komponente detektovane su na 320 nm



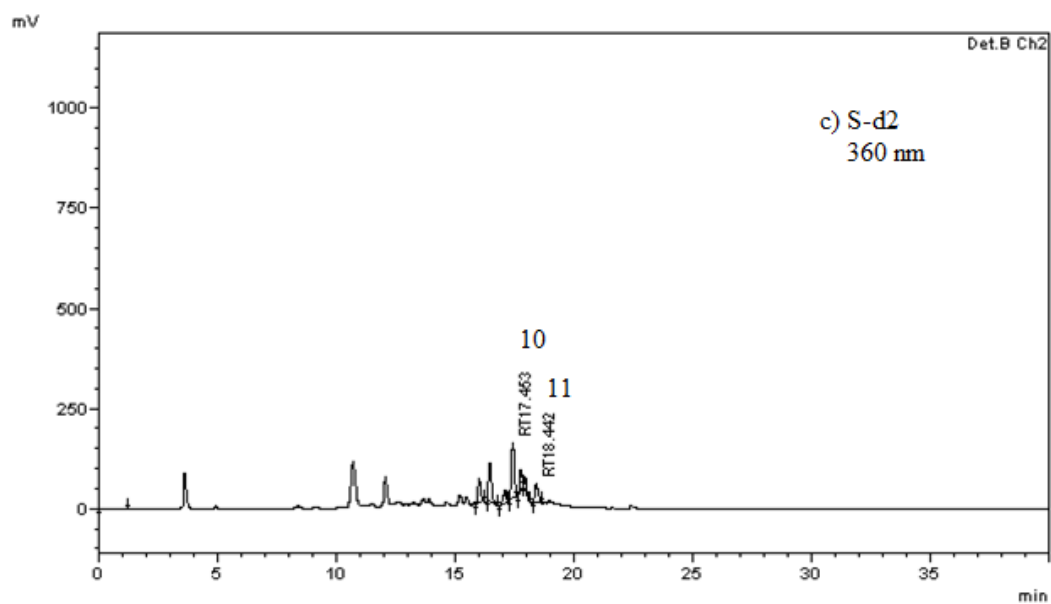
Slika 68. HPLC hromatogrami soka kupine S-d1: 10 – rutin i 11 - miricetin, razdvojene komponente detektovane su na 360 nm



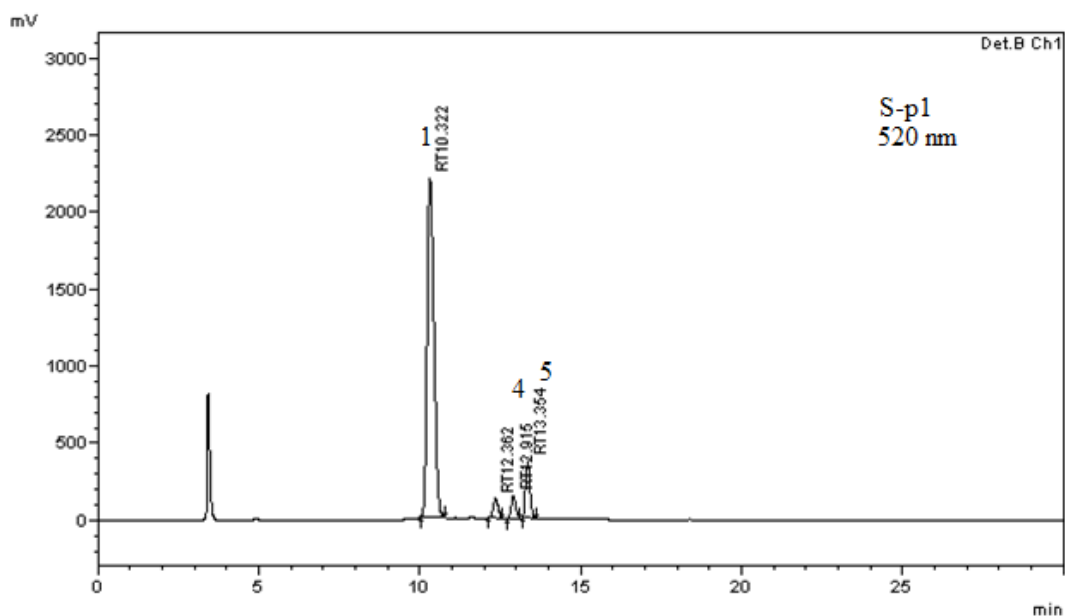
Slika 69. HPLC hromatogrami soka kupine S-d2: 1 - galna kiselina, 2 - protokatehinska kiselina, 3 - katehin, 4 - epikatehin 5 - vanilinska kiselina, 6 – siringinska kiselina, 7 – elaginska kiselina razdvojene komponente detektovane su na 280 nm



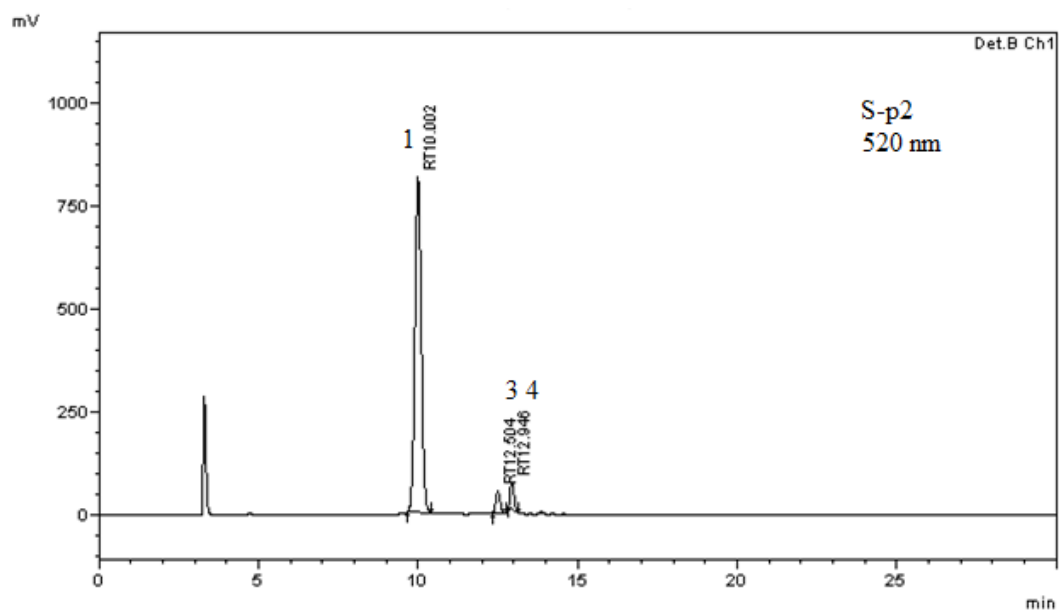
Slika 70. HPLC hromatogrami soka kupine S-d2: 8 - kafena kiselina i 9 - sinapinska kiselina, razdvojene komponente detektovane su na 320 nm



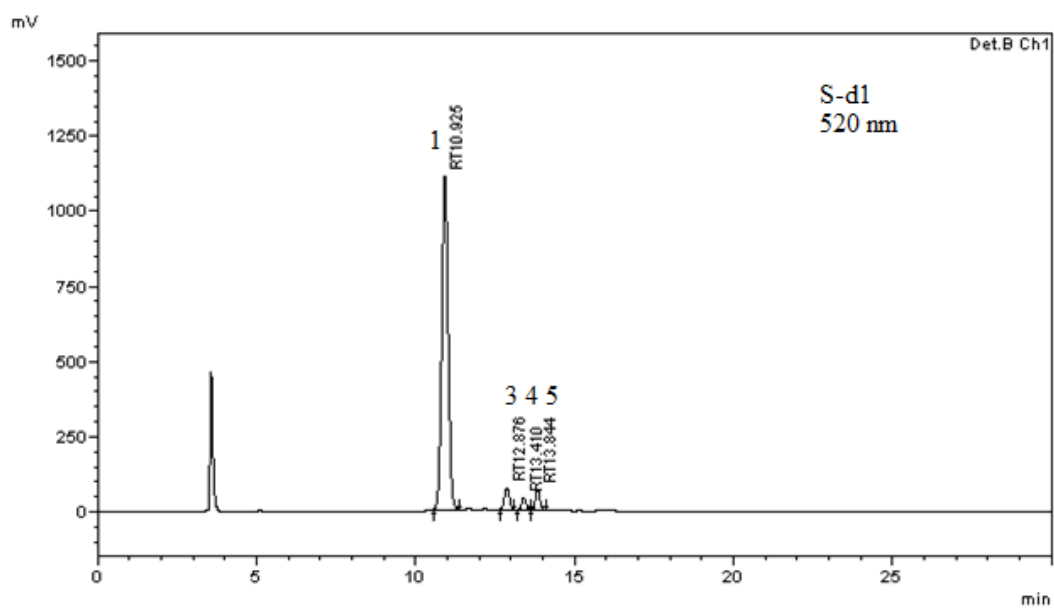
Slika 71. HPLC hromatogrami soka kupine S-d2: 10 – rutin i 11 - miricetin, razdvojene komponente detektovane su na 360 nm



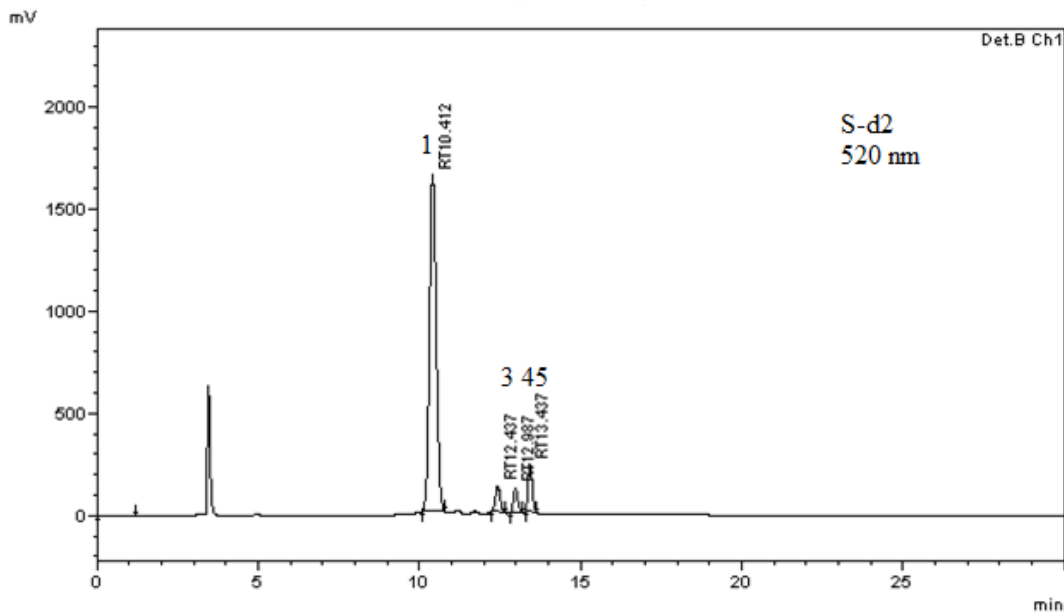
Slika 72. HPLC hromatogrami antocijana soka kupine S-p1, razdvojene komponente detektovane su na 520 nm



Slika 73. HPLC hromatogrami antocijana soka kupine S-p2, razdvojene komponente detektovane su na 520 nm



Slika 74. HPLC hromatogrami antocijana soka kupine S-d1, razdvojene komponente detektovane su na 520 nm



Slika 75. HPLC hromatogrami antocijana soka kupine S-d2, razdvojene komponente detektovane su na 520 nm

Interesantno je navesti da kod uzoraka soka nisu detektovane sve komponente kao u ekstraktima, što ukazuje da tokom izdvajanja soka većina polifenolnih komponenti zaostaje u tropu (Laroze i sar., 2010). Kod uzoraka soka kupine su određene visoke vrijednosti u sadržaju ukupnih antocijana (2,352 – 6,85 mg/100 ml), međutim, mnogo manje u odnosu na vrijednosti utvrđene kod ekstrakata ploda i tropa. Takođe, veće vrijednosti polifenolnih jedinjenja kod uzoraka ekstrakta tropa u odnosu uzorke soka kupine su utvrđene i u disertaciji Krstić (2018). Netzel i saradnici (2002) ukazali su da sok od kupine, kao i sokovi ostalih vrsta jagodastog voća doprinose povećanju sadržaja nivoa antioksidanata u ćelijskoj plazmi, što utiče na bolji antioksidativni status i smanjenje oksidacije lipida unutar plazme.

Tabela 18. Rezultati HPLC analize polifenolnih jedinjenja u uzorcima soka kupine

Fenolna jedinjenja	S-p1 ¹	S-p2	S-d1	S-d2
Galna kiselina	0,030±0,001 ^a	0,022±0,001 ^b	nd	nd
Protokatehinska kiselina	0,455±0,020 ^a	0,608±0,021 ^b	0,396±0,011 ^c	0,524±0,018 ^d
Epikatehin	nd ²	nd	nd	nd
Katehin	0,160±0,007 ^{ab}	0,147±0,005 ^a	0,180±0,008 ^c	0,167±0,007 ^{bc}
Kafena kiselina	0,038±0,001 ^a	0,049±0,002 ^b	0,045±0,002 ^b	nd
Total 280, 320, 360 nm	0,683	0,826	0,621	0,691
Antocijan 1 (Cijanidin-3-glukozid)	6,459±0,320 ^a	2,210±0,009 ^b	3,064±0,144 ^c	4,705±0,230 ^d
Antocijan 2 (Cijanidin-3-rutinozid)	nd	nd	nd	nd
Antocijan 3 (Cijanidin-3-ksilozid)	nd	0,083±0,003 ^a	0,371±0,015 ^b	0,115±0,004 ^c
Antocijan 4 (Cijanidin-3-malonil-glikozid)	0,284±0,011 ^a	0,059±0,002 ^b	0,129±0,005 ^c	0,127±0,006 ^c
Antocijan 5 (Cijanidin-3-dioksazil-glikozid)	0,107±0,004 ^a	nd	0,681±0,030 ^b	0,134±0,005 ^c
Total 520 nm	6,85	2,352	4,245	5,081

¹Rezultati su predstavljeni u mg/ml matičnog soka,

²nd – nije detektovano

^{a,b,c,d} Slova iznad svake vrijednosti ukazuju na značajne razlike od najmanje 5% (Dankanov test).

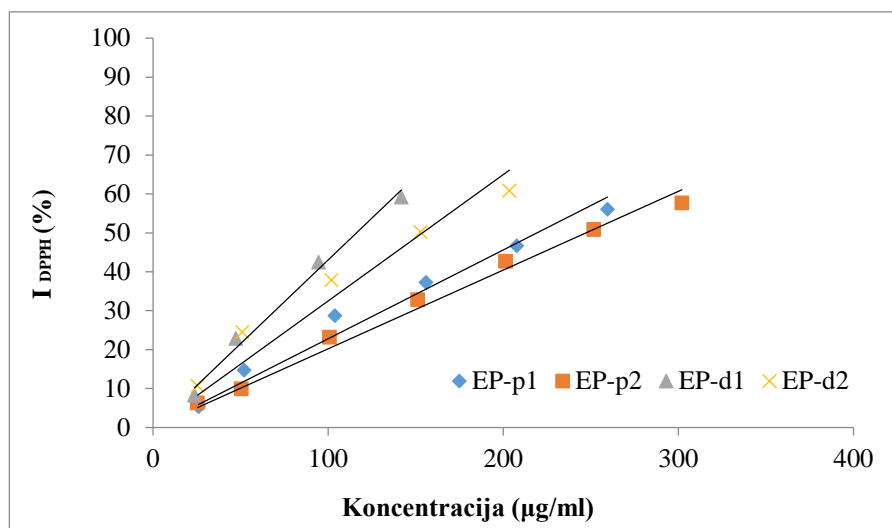
4.4. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

Antioksidativna aktivnost uzoraka divljih i kultivisanih sorti je utvrđena na osnovu četiri metode: DPPH test, ABTS test, sposobnost neutralizacije hidroksil radikala (Slika 76 – 83) i metodom inhibicije *Briggs Rauscher*-ovih oscilatornih reakcija (Slika 84 - 85). Rezultati su predstavljani kao IC_{50} vrijednosti (potrebna količinu antioksidanta da redukuje početnu koncentraciju slobodnog radikala za 50 %), i kao mmol Trolox-a/g ekstrakta ploda ili tropa, odnosno mmol Trolox-a/ml soka za gašenje *Briggs Rauscher*-ovih oscilatornih reakcija.

4.4.1. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA PLODA, TROPA I SOKA KUPINA NA DPPH RADIKALE

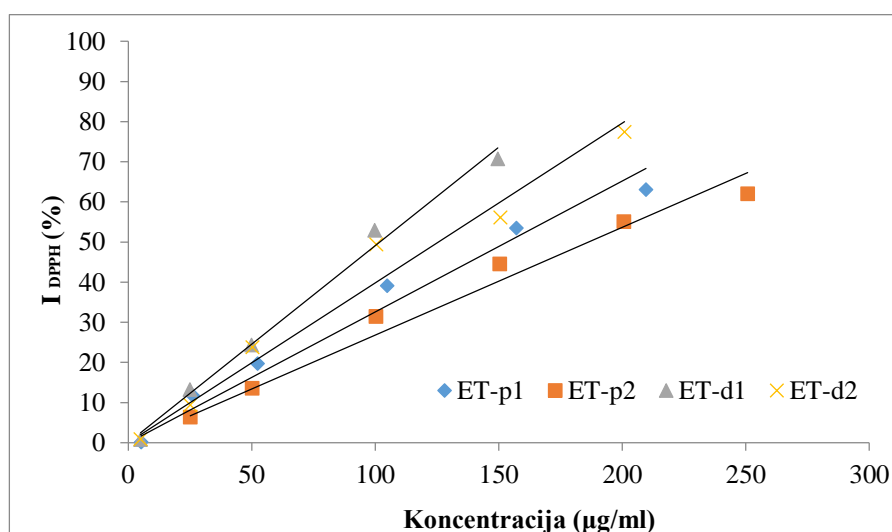
DPPH test predstavlja prvi i najčešće korišten metod za dokazivanje antioksidativne aktivnosti uzoraka biološkog porijekla. Predstavlja jednostavan postupak tokom koga se ispitivano jedinjenje ili ekstrakt pomiješa sa rastvorom DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala i poslije definisanog perioda spektrofotometrijski odredi apsorbance (Kedare i Singh, 2011). Na osnovu dobijenih vrijednosti apsorbance računa se antiradikalska sposobnost redukcije ispitivanog jedinjenja na DPPH[•]. Prednost ove metode je u tome što DPPH reaguje sa cijelim uzorkom, čak i sa slabim antioksidantima (Prakash, 2001). DPPH test se može koristiti u vodenim i nepolarnim organskim rastvaračima, te za ispitivanje sposobnosti hidrofilnih i lipofilnih antioksidanata (Prior i sar., 2005). Rezultati dobijeni na osnovu ovog testa su ponovljivi i usporedivi sa drugim metodama za uklanjanje slobodnih radikala (Gil i sar., 2000). Antioksidativna aktivnost ekstrakata na DPPH radikale nastaje prvenstveno zbog sposobnosti fenolnih jedinjenja da reaguju kao donori vodonikovog atoma prema DPPH radikalu. Tokom reakcije sa antioksidantom DPPH[•] se redukuje, a njegova boja u rastvoru se mijenja od ljubičaste prema žutoj (Thaipong i sar., 2006).

Na slici 76 je prikazana antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda (EP-p1, EP-p2, EP-d1, i EP-d2) na DPPH radikale u zavisnosti od koncentracije ispitivanog uzorka.



Slika 76. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda na DPPH radikale

Na slici 77 je prikazana antioksidativna aktivnost ekstrakata tropa (ET-p1, ET-p2, ET-d1, i ET-d2) na DPPH radikale u zavisnosti od koncentracije ispitivanog uzorka.

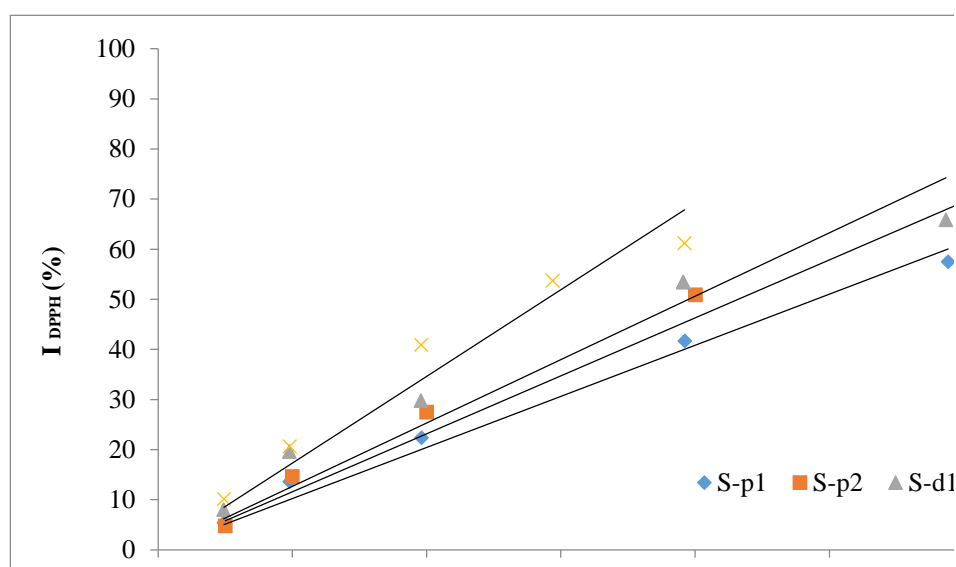


Slika 77. Antioksidativna aktivnost ekstrakata tropa na DPPH radikale

Rezultati antoksidativne aktivnosti ekstrakata ploda i tropa utvrđenih na osnovu DPPH testa ukazuju da su niže IC_{50} vrijednosti (snažniju antioksidativnu aktivnost) imali ekstrakti divljih sorti (EP-d1 i ET-d1) u odnosu na kultivisane. Kod ispitivanih uzoraka kultivisanih sorti snažniju aktivnost je pokazao ekstrakt sorte Chester Thornles u odnosu na sortu Čačanska bestrna, dok je kod divljih sorti snažnija aktivnost određena kod ekstrakta sa lokacije Javorani u odnosu na ekstrakte sa lokacije Verići.

Međusobnim poređenjem antioksidativne aktivnosti između ekstrakata ploda i tropa na DPPH radikale, utvrđena je snažnija aktivnost ekstrakata tropa. Ova činjenica potvrđuje da značajne količine aktivnih polifenolnih jedinjenja zaostaju u tropu kupine, a sastoji od veće količine pokožice, vlakana i sjemenki, i predstavljaju potencijalni izvor jedinjenja sa biološkom aktivnosti.

Na slici 78 je prikazana antioksidativna aktivnost uzoraka matičnog soka (S-p1, S-p2, S-d1, i S-d2) na DPPH radikale u zavisnosti od koncentracije ispitivanog uzorka.



Slika 78. Antioksidativna aktivnost uzoraka soka na DPPH radikale

U odnosu na ispitivane ekstrakte, uzorci soka su pokazali značajno slabiju aktivnost na DPPH radikale ($IC_{50} = 3,53 - 5,10$ mg/ml). Kod uzoraka soka je utvrđen sličan trend aktivnosti kao i kod ekstrakata, gdje su veću aktivnost na DPPH radikale imali uzorci divljih odnosno na kultivisane kupine, za razliku od ekstrakata gdje je uzorak divlje sorte sa lokacije Javorani pokazao najveću aktivnost. Kod uzoraka soka je najveću aktivnost imao uzorak sa lokacije Verići (Tabela 19), sa statistički značajnom razlikom ($p \leq 0,05$).

Tabela 19. Antioksidativni kapacitet ekstrakata ploda, tropa i soka na DPPH radikale

	IC_{50}^{DPPH} ($\mu\text{g/ml}$)		IC_{50}^{DPPH} (mg/ml)		
EP-p1	225,22±3,70 ^a	ET-p1	178.77 ±11. 47 ^b	S-p1	5,10±0,21 ^a
EP-p2	245,89±4,93 ^b	ET-p2	206.20±10.65 ^c	S-p2	4,34±0,16 ^b
EP-d1	119,53±4,93 ^c	ET-d1	105.68±5.23 ^a	S-d1	4,07±0,15 ^b
EP-d2	153,67±2,06 ^d	ET-d2	127.26±3.30 ^a	S-d2	3,53±0,09 ^c
Trolox	6.02±0.34				

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija SD (n=3).

^{a,b,c,d} Slova iznad svake vrijednosti ukazuju na značajne razlike od najmanje 5% (Dankanov test).

U poređenju sa IC_{50} vrijednostima za sintetski antioksidant Trolox, uzorci su pokazali slabiji antioksidativni potencijal (20 do 40 puta), dok u disertaciji Vinčić (2017), nalazimo da su ispitivani metanolski ekstrakti kultivisanih sorti kupina pokazali veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na Trolox. Mogući razlog za veći potencijal prema Trolox-u je metoda ekstrakcije, kao i razlika u rastvaraču koji je korišten prilikom ekstrakcije.

U radu Stajčić i saradnici (2012) utvrđene su niže IC_{50} vrijednosti za antioksidativni potencijal metanolskih ekstrakata kultivisanih sorti Čačanska bestrna i Thornfree na DPPH radikale (61,6 do 64,6 $\mu\text{g/ml}$) u odnosu na rezultate prikazane u tabeli 19. Značajna aktivnost ekstrakta tropa kultivisane sorte kupine na DPPH radikale (10,9 $\mu\text{molTrolox/g}$) je utvrđena u radu Kalušević i saradnici (2016). Prema studiji Huang i saradnici (2012) ekstrakti kupine u koncentraciji 2,0 mg/ml mogu inhibirati gotovo sve prisutne DPPH radikale (96,96% i 95,37%).

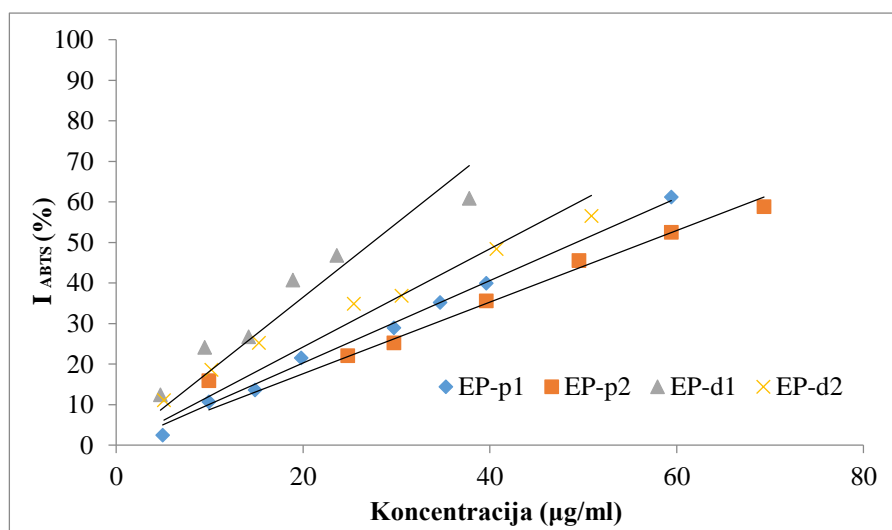
Razlike u navedenoj literaturi mogu biti posljedica brojnih faktora, kao što je ispitivana sorta i lokacija na kojoj su sakupljani plodovi, dužina skladištenja plodova, razgradnja antioksidanata tokom zamrzavanja, razlike u koroštenim metodama i vrsti rastvarača.

4.4.2. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA PLODA, TROPA I SOKA KUPINA NA ABTS RADIKALE

Ova spektrofotometrijska metoda se zasniva na mjerenju relativne sposobnosti uzoraka da redukuju dugo živeći $ABTS^{•+}$ (radikal-katjon 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)), na način da antioksidant iz uzorka preda H atom slobodnom radikal. Tokom reakcije plavo-zeleni $ABTS^{•+}$ radikalski katjon pokazuje maksimalnu apsorbanciju na 734 nm, te se ponovo redukuje u svoju bezbojnu neutralnu formu. Reakcija sa $ABTS$ radikalom se odvija u kratkom vremenu od 0,25 do 0,5 minuta (Re i sar., 1999; Nilsson i sar., 2005; Matos i sar., 2009; Huyut i sar., 2017).

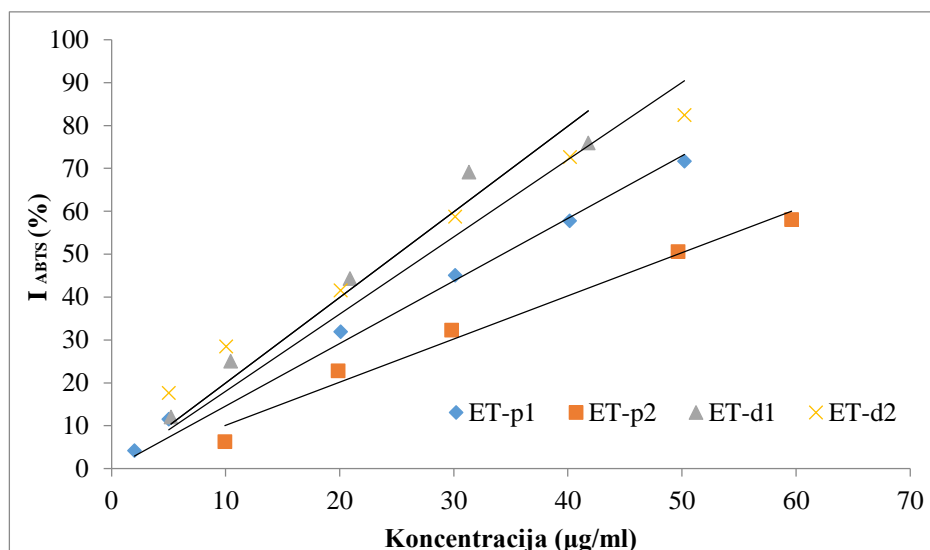
$ABTS$ test predstavlja jednostavnu i široko korištenu metodu za skrining i rutinsko određivanje antoksidativnog potencijala u širokom opsegu pH vrijednosti. $ABTS^{•+}$ je topiv u vodi i organskim rastvaračima, što omogućava da se antoksidativni kapacitet odredi istom metodologijom i u hidrofilnim i lipofilnim jedinjenjima. Kada se koriste hidrofobni antioksidanti, osetljivost i reproduktivnost testa dramatično opada (Opitz i sar., 2014; Huyut i sar., 2017). Takođe, Floegel i saradnici (2011) navode da obojena jedinjenja i hidrofilni antioksidanti daju bolje rezultate primjenom $ABTS$ metode u odnosu na DPPH metodu.

Na slici 79 je prikazana antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda (EP-p1, EP-p2, EP-d1, i EP-d2) na $ABTS$ radikale u zavisnosti od koncentracije ispitivanog uzorka.



Slika 79. Antioksidativna aktivnost ekstrakta ploda na $ABTS$ radikale

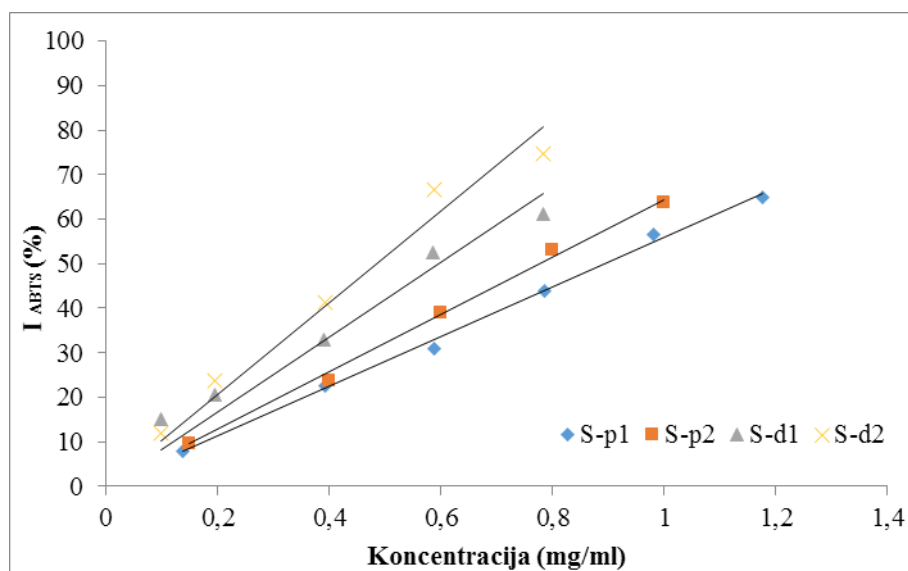
Na slici 80 je prikazana antioksidativna aktivnost ekstrakata tropa (ET-p1, ET-p2, ET-d1, i ET-d2) na $ABTS$ radikale u zavisnosti od koncentracije ispitivanog uzorka.



Slika 80. Antioksidativna aktivnost ekstrakata tropa na ABTS radikale

Rezultati antoksidativne aktivnosti ekstrakata ploda i tropa na ABTS radikale takođe ukazuju na veću aktivnost uzoraka divljih sorti u odnosu na kultivisane (Tabela 20), sa statistički značajnom razlikom ($p \leq 0,05$). Utvrđen je sličan trend inhibicije na ABTS radikale kao i na DPPH radikale $EP-d1 > EP-d2 > EP-p1 > EP-p2$.

Na slici 81 je prikazana antioksidativna aktivnost uzoraka matičnog soka (S-p1, S-p2, S-d1, i S-d2) na ABTS radikale u zavisnosti od koncentracije ispitivanog uzorka.



Slika 81. Antioksidativna aktivnost uzoraka matičnog soka na ABTS radikale

Prema prikazanim rezultatima, može se zaključiti da veći antioksidativni potencijal na ABTS radikale imaju ekstrakti tropa u poređenju sa ekstraktima ploda.

Za razliku od aktivnosti ekstrakata, trend uzoraka matičnog soka na ABTS radikale ukazuje na snažniju antioksidativnu aktivnost uzorak divlje sorte sa lokacije Verići (S-d2) i slabiju aktivnost uzoraka kultivisane sorte Chester Thornles (S-p1) u odnosu na trend kod ekstrakata.

Tabela 20. Antioksidativni kapacitet ekstrakata ploda, tropa i matičnog soka kultivisane i divlje kupine na ABTS radikale

	IC_{50}^{ABTS} ($\mu\text{g/ml}$)		IC_{50}^{ABTS} (mg/ml)		
EP-p1	50,80±2,89 ^a	ET-p1	34.66±0.78 ^b	S-p1	0,91±0,02 ^a
EP-p2	56,45±1,00 ^b	ET-p2	47.01±3.77 ^c	S-p2	0,80±0,03 ^b
EP-d1	27,61±0,77 ^c	ET-d1	23.74±1.39 ^a	S-d1	0,61±0,01 ^c
EP-d2	41,53±0,59 ^d	ET-d2	26.53±1.09 ^a	S-d2	0,50±0,02 ^d
Trolox	2.76±0.13				

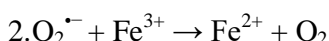
Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija SD (n=3).

^{a,b,c,d} Slova iznad svake vrijednosti ukazuju na značajne razlike od najmanje 5% (Dankanov test).

Ispitivani uzorci soka su takođe pokazali daleko veći potencijal prema ABTS radikalima u odnosu na DPPH radikale. Na osnovu studije Sariburun i saradnici (2010) ustanovljen je veći potencijal vodenih i metanolskih ekstrakta prema ABTS radikalima kod četiri kultivisane sorte kupine, a slične rezultate su zabilježili i Basu i Maier (2016) u svom radu u kome su analizirani ekstrakti kupina izdvojeni pomoću 95 % etanola.

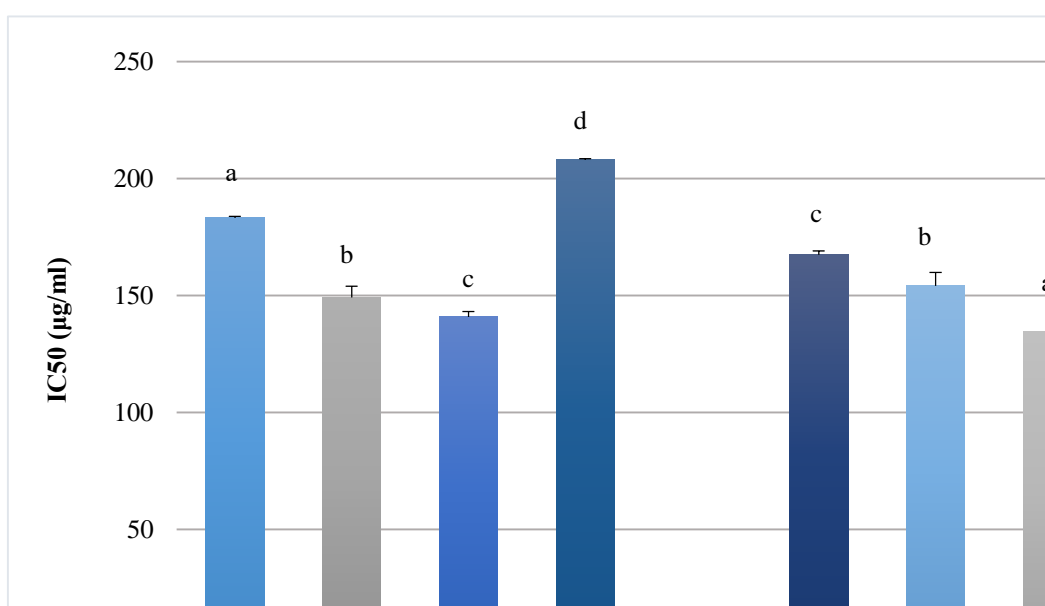
4.4.3. ODREĐIVANJE SPOSOBNOSTI NEUTRALIZACIJE EKSTRAKATA PLODA, TROPA I MATIČNOG SOKA KUPINA NA HIDROKSIL RADIKALE

Glavni izvor hidroksilnih radikala *in vivo* su produkti *Haber-Weiss* reakcija, gdje $O_2^{\cdot-}$ redukuje ćelijski feri Fe^{3+} jon do fero Fe^{2+} oblika, i na taj način inicira Fentonovu reakciju između Fe^{2+} jona i vodonik peroksida:



Oksidativne reakcije OH radikala generisanog Fentonovom reakcijom u prisustvu 2-deoksiriboze i kiseonika grade malondialdehid (MDA) koji se kolorimetrijski (ili fluorometrijski) određuje u testu sa tiobarbituratnom kiselinom (TBA test) na osnovu formiranja obojenog TBA – MDA produkta (Halliwell i sar., 1987).

Na slici 82 prikazane su IC_{50} vrijednosti dobijene mjerenjem sposobnosti ekstrakata da inhibiraju hidroksil radikale generisane u Fentonovoj reakciji.

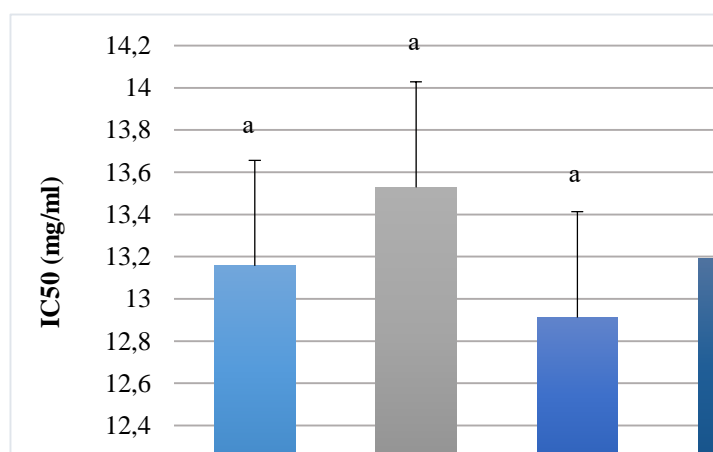


Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija SD (n=3).

^{a,b,c,d} Slova iznad svake vrijednosti ukazuju na značajne razlike od najmanje 5% (Dankanov test).

Slika 82. IC_{50} vrijednosti za antioksidativnu aktivnost ekstrakata ploda i tropa na hidroksil radikale

Na slici 83 prikazane su IC_{50} vrijednosti dobijene mjerenjem sposobnosti uzoraka matičnog soka da inhibiraju hidroksil radikale generisane u Fentonovoj reakciji.



Rezultati su predstavljani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija SD (n=3).

^{a,b,c,d} Slova iznad svake vrijednosti ukazuju na značajne razlike od najmanje 5% (Duncanov test).

Slika 83. IC_{50} vrijednosti za antioksidativnu aktivnost matičnog soka na hidroksil radikale

Iz navedenih rezultata nalazimo da su slične inhibitorne aktivnosti na hidroksil radikale imali ekstrakti tropa i ploda. Najveću inhibitornu aktivnost na hidroksil radikale je pokazao uzorak tropa divlje kupine ET-d1, kao i prema ABTS i DPPH radikalima.

Tabela 21. Antioksidativni kapacitet ekstrakata ploda i tropa kultivisane i divlje kupine na hidroksil radikale

	$IC_{50}^{\cdot OH}$ $\mu g/ml$		$IC_{50}^{\cdot OH}$ mg/ml		
EP-p1	183,14 \pm 0,78 ^a	ET-p1	167.39 \pm 1.71 ^c	S-p1	13,16 \pm 0,25 ^a
EP-p2	149,25 \pm 4,70 ^b	ET-p2	154.12 \pm 5.83 ^b	S-p2	13,53 \pm 0,19 ^a
EP-d1	140,84 \pm 2,40 ^c	ET-d1	134.61 \pm 4.16 ^a	S-d1	12,91 \pm 0,73 ^a
EP-d2	207,94 \pm 0,55 ^d	ET-d2	168.62 \pm 0.81 ^c	S-d2	13,19 \pm 0,14 ^a
BHT	28.66 \pm 0.9				

Rezultati su predstavljani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija SD (n=3).

^{a,b,c,d} Slova iznad svake vrijednosti ukazuju na značajne razlike od najmanje 5% (Duncanov test).

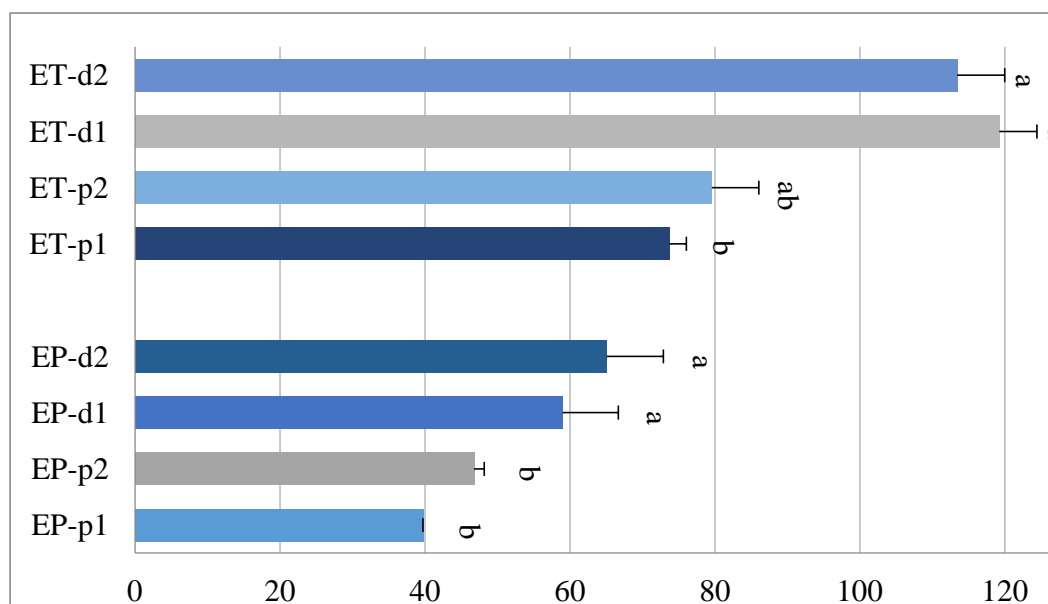
Kod ispitivanih ekstrakata prema hidroksil radikalima najslabiju aktivnost pokazali su ekstrakti divlje kupine sa lokacije Verići (EP-d2 i ET-d2), koji su na osnovu prethodna dva testa pokazali značajno veću antioksidativnu aktivnost.

U odnosu na komercijalni antioksidant BHT, ekstrakata su pokazali slabije inhibitorno dejstvo (5 do 10 puta). Kod uzoraka soka nije utvrđena statistički značajna razlika inhibicije hidroksil radikala među ispitivanim uzorcima. U poređenju sa rezultatima prikazanim u disertaciji Vinčić (2017) u kojoj su ispitani ekstrakti kultivisanih sorti kupina (Čačanka bestrna i Thotnfree) na inhibiciju hidroksil radikala, utvrđen je veći potencijal inhibicije u odnosu na ispitivane ekstrakte i niži potencijal u odnosu na uzorke soka.

4.4.4. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST UZORAKA ODREĐENA NA OSNOVU SPOSOBNOSTI INHIBICIJE BRIGGS RAUSCHER-OVIH OSCILATORNIH REAKCIJA

Briggs Rauscher-ov oscilatorni sistem za ispitivanje antioksidativne aktivnosti je pripremljen u skladu sa procedurom Prenesti i saradnici (2005). Nakon pripreme BR sistema, u reakcijama koje nastaju nakon dodavanja definisane koncentracije uzoraka, dolazi do privremenog prekida u oscilacijama. Prema objavljenim rezultatima Dacić i Gojak-Salimović (2016), period inhibicije oscilacija sistema je u linearnoj vezi sa vrstom antioksidanta i njegovom koncentracijom (Cervellati i sar., 2002). Isti autori su takođe utvrdili postojanje linearne veze između sadržaja ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti (DPPH metodom i metodom BR oscilatornih reakcija).

Na slici 84 prikazane su vrijednosti dobijene mjerenjem dužine prekida oscilatornih reakcija nakon dodavanja ekstrakata ploda i tropa u *Briggs Rauscher-ov* oscilatorni sistem.



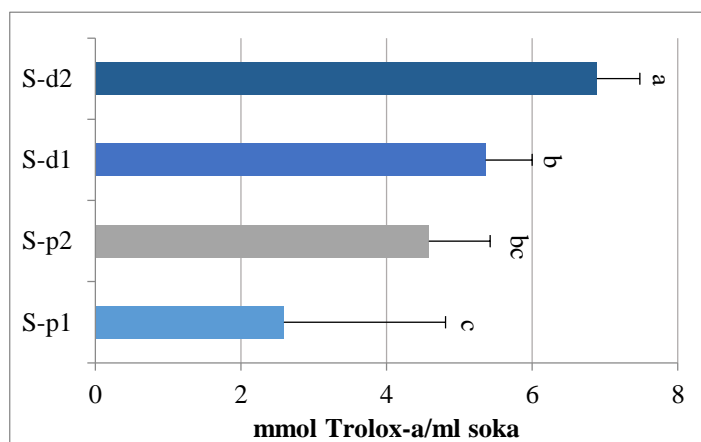
Rezultati su predstavljani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija SD (n=3).

^{a,b,c,d} Slova iznad svake vrijednosti ukazuju na značajne razlike od najmanje 5% (Duncanov test).

Slika 84. Uticaj ekstrakata ploda i tropa na inhibiciju BR oscilatornih reakcija

Na osnovu prikazanih rezultata možemo konstatovati da su veće vrijednosti inhibicije BR oscilatornih reakcija pokazali ekstrakti divljih u odnosu na kultivisane sorte kupine, sa statistički značajnom razlikom ($p \leq 0,05$). Takođe nalazimo skoro dvostruko veće inhibitorne sposobnosti za gašenje oscilatornih reakcija kod ekstrakata tropa u odnosu na ekstrakte ploda.

Na slici 85 prikazane su vrijednosti dobijene mjerenjem dužine prekida oscilatornih reakcija nakon dodavanja uzoraka matičnog soka u Briggs Rauscherov oscilatorni sistem.



Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija SD ($n=3$).
^{a,b,c,d} Slova iznad svake vrijednosti ukazuju na značajne razlike od najmanje 5% (Dankanov test).

Slika 85. Uticaj uzoraka soka na inhibiciju BR oscilatornih reakcija

Prema rezultatima sposobnost inhibicije BR reakcija, u odnosu na sposobnost inhibicije ispitivanih ekstrakata, uzorci soka su pokazali oko 5 do 20 puta slabiju aktivnost (Tabela 22).

Tabela 22. Sposobnost inhibicije BR reakcija ekstrakata ploda i tropa kultivisane i divlje kupine

Ekstrakti ploda		Ekstrakti tropa		Matični sok	
(mmol Trolox/g)		(mmol Trolox/g)		(mmol Trolox/ml)	
EP-p1	39,68 \pm 0,00 ^a	ET-p1	73,71 \pm 2,36 ^a	S-p1	2,59 \pm 2,22 ^a
EP-p2	46,76 \pm 1,39 ^a	ET-p2	79,57 \pm 6,48 ^a	S-p2	4,58 \pm 0,84 ^b
EP-d1	58,99 \pm 7,66 ^{ab}	ET-d1	119,23 \pm 5,18 ^b	S-d1	5,36 \pm 0,64 ^{bc}
EP-d2	65,03 \pm 7,86 ^b	ET-d2	113,43 \pm 6,53 ^b	S-d2	6,89 \pm 0,59 ^c

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija SD ($n=3$).
^{a,b,c,d} Slova iznad svake vrijednosti ukazuju na značajne razlike od najmanje 5% (Dankanov test).

Na osnovu svih utvrđenih testova za antioksidativnu aktivnost može se konstatovati da su uzorci divljih kupina pokazali snažniju aktivnost u odnosu na uzorke kultivisanih sorti, a da ekstrakti tropa imaju snažniji potencijal u odnosu na ekstrakte ploda. Navedeni rezultati su očekivani s obzirom da je kod divljih sorti kupina utvrđen veći sadržaj polifenolnih jedinjenja u odnosu na kultivisane sorte.

Odnos između antioksidativnog kapaciteta ekstrakata divljih i kultivisanih sorti kupina je u skladu sa rezultatima prikazanim u studiji Reyes-Charmona i saradnici (2005). Takođe, i drugi autori ukazuju na činjenicu da veći antioksidativni potencijal imaju uzorci divljih sorti voća u odnosu na kultivisane sorte (Gajdoš Kljusić i sar., 2016; Milenković-Anđelković i sar., 2015). Iako su sintetski antioksidanti pokazali veći potencijal za uklanjanje slobodnih radikala, može se konstatovati da su i ispitivani ekstrakti imali značajan potencijal inhibicije prema slobodnim radikalima.

4.4.5. KORELACIONA ANALIZA SADRŽAJA POLIFENOLNIH JEDINJENJA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

Za analizu linearne zavisnosti korišten je Pearson-ov koeficijent korelacija, baziran na poređenju stvarnog uticaja posmatranih varijabli jedne prema drugoj u odnosu na maksimalan mogući uticaj. Apsolutna vrijednost korelacija je u radu predstavljena kao ($|r| = 1$ potpuna korelacija), ($0,8 \leq |r| < 1$ jaka korelacija), ($0,5 \leq |r| < 0,8$ srednje jaka korelacija), ($0,2 \leq |r| < 0,5$ slaba korelacija), ($0 < |r| < 0,2$ neznatna korelacija) i ($|r| = 0$ odsustvo korelacije) (Yan i Su, 2009; Fox, 2015; Montgomery i sar., 2012).

Parametri Pirsonovog koeficijenta korelacija $|r|$ između sadržaja ukupnih polifenola, flavonida, flavonola, ukupnih i monomernih antocijana, te identifikovanih polifenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti (IC_{50}^{DPPH} , IC_{50}^{ABTS} , IC_{50}^{OH} i BR-oscilatorne reakcije) ploda i tropa kupine je prikazan u tabeli 23. Za analizu korelacija su korištene recipročne vrijednosti ($1/IC_{50}^{DPPH}$, $1/IC_{50}^{ABTS}$ i $1/IC_{50}^{OH}$).

Kod ekstrakata ploda i tropa jaka korelacija sa statistički značajnom razlikom ($p \leq 0,01$), je utvrđena između sadržaja ukupnih polifenola, ukupnih flavonida i sposobnosti inhibicije DPPH i ABTS radikala, sadržaj sinapinske kiseline i inhibicije DPPH radikala, te ukupnih antocijana i sposobnosti inhibicije ABTS radikala. Srednje jaka korelacija je utvrđena između sadržaja flavonola, monomernih antocijana i miricetina prema oba radikala, te između sadržaja katehina i inhibicije DPPH radikala, cijanidin-3-glukozida i inhibicije ABTS radikala, sa statistički značajnom razlikom ($p \leq 0,05$). Jaka korelacija je utvrđena između sadržaja ukupnih polifenola i inhibicije BR oscilatornih reakcija, te srednje jaka korelacija u odnosu na sadržaj flavonida,

momernih antocijana, epikatehina, katehina, kafene kiseline, siringinske kiseline, sinapinske kiseline, elaginske kiseline, rutina i cijanidin-3-glukozida. Prema navedenim rezultatima se može konstatovati da su polifenolne komponente sadržane u ekstraktima kupina imale veći uticaj na inhibiciju DPPH i ABTS radikala, u odnosu na OH radikale i inhibiciju BR reakcija. Korelacije između sadržaja detektovanih polifenolnih jedinjenja i dobijenih vrijednosti inhibicije $\cdot\text{OH}$ nisu utvrđeni.

Tabela 23. Pearson-ovi koeficijenti korelacije između sadržaja polifenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti¹

	$1/\text{IC}_{50}^{\text{DPPH}}$	$1/\text{IC}_{50}^{\text{ABTS}}$	$1/\text{IC}_{50}^{\cdot\text{OH}}$	BR-reakcije
Ukupni polifenoli	0,903**	0,929**	0,272	0,813**
Ukupni flavonoidi	0,925**	0,956**	0,263	0,713**
Ukupni flavonoli	0,638**	0,730**	-0,080	0,482*
Ukupni antocijani	0,632**	0,721**	0,031	0,503*
Monomerni antocijani	0,596*	0,677**	-0,002	0,463*
Galna kiselina	-0,524*	-0,340	-0,004	-0,013
Protokatehinska kiselina	0,228	0,279	0,240	-0,033
Epikatehin	0,400	0,458	0,381	0,622**
Katehin	0,497*	0,605*	0,110	0,742**
Kafena kiselina	0,297	0,278	-0,090	0,689**
Siringinska kiselina	0,301	0,433	-0,013	0,796**
Elaginska kiselina	0,359	0,467	0,307	0,752**
Sinapinska kiselina	0,789**	0,699**	0,291	0,668**
Vanilinska kiselina	0,294	0,258	0,269	-0,299
Miricetin	0,715**	0,703**	-0,088	0,393
Rutin	0,315	0,446	-0,204	0,510*
Antocijan 1 (Cijanidin-3-glukozid)	0,279	0,462	-0,086	0,505*
Antocijan 2 (Cijanidin-3-rutinozid)	-0,156	-0,001	-0,044	0,115
Antocijan 3 (Cijanidin-3-ksilozid)	0,282	0,317	-0,219	0,340
Antocijan 4 (Cijanidin-3-malonilglikozid)	-0,016	0,082	-0,202	0,007
Antocijan 5 (Cijanidin-3-dioksazilglikozid)	0,380	0,415	-0,314	0,426

¹Jaka korelacija ($|r| \geq 0,8$), srednje jaka korelacija ($0,8 > |r| \geq 0,5$), slaba korelacija ($0,5 > |r| \geq 0,2$) i neznatna korelacija ($0,2 > |r| > 0,0$)

²stepen značaja korelacija * ($p \leq 0,05$) i ** ($p \leq 0,01$)

Navedeni rezultati sugerišu da su polifenolna jedinjenja, kao što su flavonoidi, flavonoli i antocijani u velikoj meri nosioci antioksidativne aktivnosti u kupinama. Veliki broj istraživača je

takođe potvrdio dobru korelaciju između sadržaja polifenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti (Floegel i sar., 2011; Hwang i sar., 2014; Souza i sar., 2015).

Slične rezultate nalazimo u radu Pantelidis i saradnici (2007) gdje je utvrđena jaka korelacija između antioksidativne aktivnosti i sadržaja polifenolnih jedinjenja iz soka kupine ($r = 0,965$), a srednje jaka prema sadržaju ukupnih antocijana ($r = 0,588$). Ignat (2011) navodi da su flavonoidi posebno važni kao antioksidanti zbog visokog redoks potencijala, koji omogućava da doniraju vodonikov atom i pri tom gase singletni kiseonik i heliraju određene metale.

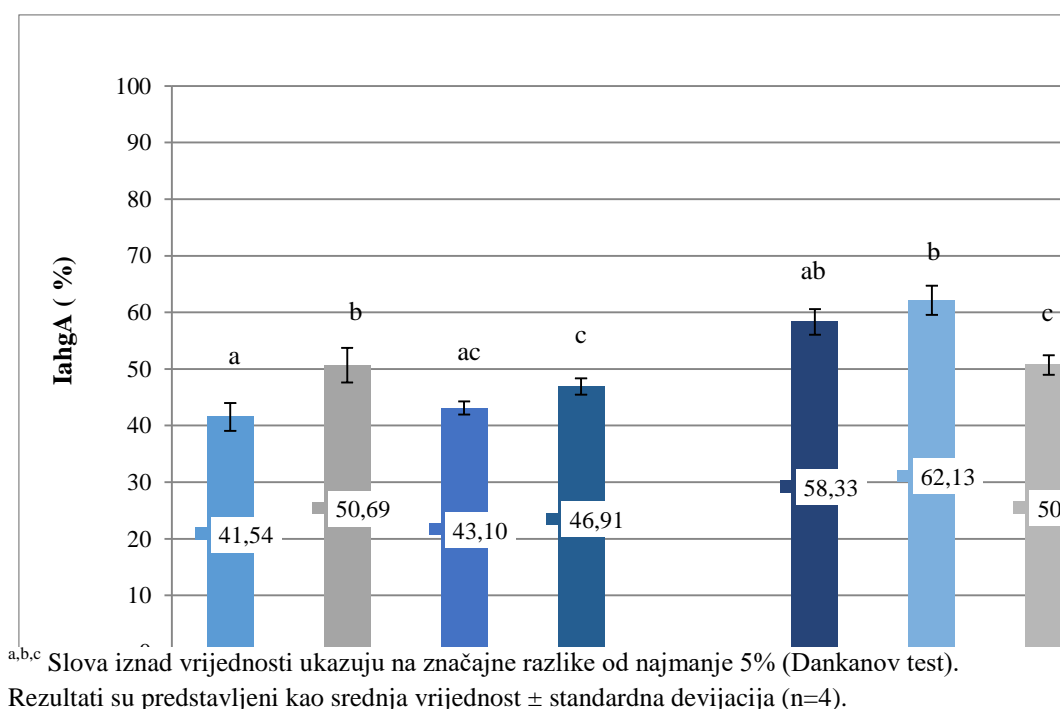
4.5. ANTIHIPERGLIKEMJSKA AKTIVNOST PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

Prema brojnim studijama, ishrana bogata voćem i povrćem smanjuje učestalost dijabetesa tipa 2 (Carter i sar., 2010; Xiao i sar., 2011). U prethodnom periodu su vršeni mnogi eksperimenti i vođene brojne rasprave, kako bi se utvrdilo koja su jedinjenja iz biljaka zaslužna za antihiperглиkemijsku aktivnost. Manach i saradnici (2005) navode da tanini (elagitanini i proantocianidini), bez obzira na unos imaju lošu biodostupnost u serumu, te da veliki procenat potencijalno aktivnih polifenola bobičastog voća ne može da uđe u cirkulaciju i utiče na ćelijske interakcije. Kay i saradnici (2009) navode da antocijani imaju nizak nivo biološke raspoloživosti u serumu, a da su za sistemsku bioaktivnost antocijana odgovorni njihovi degradacioni proizvodi. Međutim, prema Williamson i Clifford (2010), većina polifenola iz voća ostaje u gastrointestinalnom traktu (GIT) i prolazi do debelog crijeva, gdje dolazi do biotransformacije mikrobiotom debelog crijeva. U proteklom periodu vršeni su i mnogi drugi eksperimenti *in vitro* i *in vivo* vezani za ovu temu, te je utvrđena značajna uloga polifenolnih jedinjenja iz jagodastog i bobičastog voća na antihiperглиkemijsku aktivnost (Boath i sar., 2012).

Ključni enzim koji hidrolizuje alfa (1 → 4) veze kod ugljenih hidrata je α -glukozidaza, koja se nalazi u digestivnom traktu tankog crijeva čovjeka, i uključena je u završni korak digestije - razgradnja skroba i disaharida do glukoze (Čakar i sar., 2018; Wang i sar., 2012). Kada se inhibira enzim α -glukozidaza, neposredno se smanjuje količina glukoze u krvi što dovodi smanjenja postprandijalne hiperglikemije (Rubilar i sar., 2011), odnosno dovodi do toga da se uspori varenje ugljenih hidrata (Podsędek i sar., 2014). S obzirom na navedena istraživanja potrebno je dalje proučavati jedinjenja koja inhibitorno djeluju na α -glukozidazu, jer djelovanjem prirodnih inhibitora na ovaj enzim mogu se smanjiti štetne posljedice povećanog unosa ugljenih hidrata kod dijabetičara.

4.5.1. ANTIHIPERGLIKEMJSKA AKTIVNOST EKSTRAKATA PLODA I TROPA KUPINE

Ispitivanje antihiperглиkemijske aktivnosti ekstrakata ploda i tropa vršeno je na osnovu inhibicije enzima α -glukozidaze u *in vitro* eksperimentalnim uslovima, a rezultati su prikazani grafički (Slika 86). Rezultati ukazuju da su svi ekstrakti inhibirali oko polovine aktivnosti α -glukozidaze kod ispitivane koncentracije uzoraka (0,054 mg/ml s.m.). Kod ekstrakata ploda, uzorak kultivisane sorte EP-p2 je pokazao najveću aktivnost inhibicije prema α -glukozidazi ($I_{\text{AhgE}} = 50,69\%$), zatim, prema opadajućim vrijednostima slijede uzorci divlje kupine EP-d2 ($I_{\text{AhgE}} = 46,91\%$), EP-d1 ($I_{\text{AhgE}} = 43,10\%$) i EP-p1 ($I_{\text{AhgE}} = 41,54\%$).

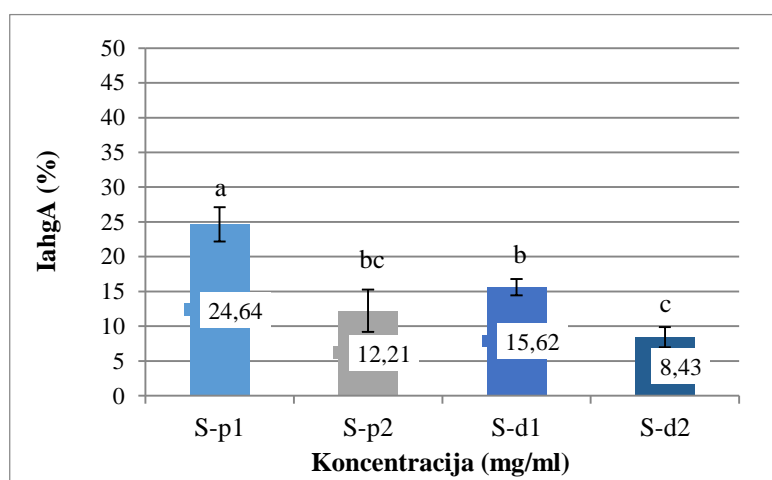


Slika 86. Antihiperглиkemijska aktivnost ekstrakata ploda (EP) i ekstrakata tropa (ET).

Rezultati ukazuju da su ekstrakti tropa pokazali značajno veću antihiperглиkemijsku aktivnost (oko 20 %), u odnosu na ekstrakte ploda, sa statistički značajnom razlikom ($p \leq 0,05$). Rezultati istraživanja Tumbas Šaponjac i saradnika (2015) inhibitornog potencijala dva varijeteta jagode "Clery" i "Marmolada" na enzim α -glukozidazu ukazuju da je 50 % enzima inhibirano kod koncentracije uzorka 1,90 i 0,60 mg/ml. Girones-Vilaplana i saradnici (2014) su utvrdili da su IC_{50} vrijednosti ekstrakata *acai* i *makui* bobica u opsegu od 0,33 - 2,14 mg/ml, dok su Podsędek i saradnici (2014) objavili da je IC_{50} vrijednost inhibicije α -glukozidaze ekstrakta kupine 219,73 mg/ml. Stefanut i saradnici (2013) ukazuju da ekstrakti kupina imaju hipoglikemijsko dejstvo u eksperimentima *in vivo* kod pacova sa indukovanim dijabetesom. Takođe, Grace i saradnici (2009) su utvrdili da antocijani iz borovnice imaju sposobnost da ublaže simptome hiperglikemije kod dijabetičnih miševa u eksperimentima *in vivo*.

4.5.2. ANTIHIPERGLIKEMJSKA AKTIVNOST SOKA KUPINE

Antihiperglikemijska aktivnost uzoraka soka određena je na osnovu sposobnosti inhibicije enzima α -glukozidaze u *in vitro* eksperimentu, a rezultati su prikazani grafički (Slika 87). Uzorci matičnog soka pokazali značajno niže vrijednosti inhibicije α -glukozidaze I_{AhgA} (8,43 – 24,64 %), u odnosu na ekstrakte tropa i ploda. U poređenju sa rezultatima dobijenim kod ekstrakata, kod uzoraka soka je najveću sposobnost inhibicije α -glukozidaze imao uzorak kultivisane sorte S-p1, sa statistički značajnom razlikom ($p \leq 0,05$).



^{a,b,c} Slova iznad vrijednosti ukazuju na značajne razlike od najmanje 5% (Dankanov test). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n=4$).

Slika 87. Antihiperglikemijska aktivnost uzoraka soka (S)

Abidov i saradnici (2006) su sproveli studiju, gdje su odrasli sa dijabetesom tipa 2 konzumirali ekstrakt borovnice, a rezultati su pokazali da dodatak borovnice u ishrani utiče na smanjenje nivoa glukoze u krvnoj plazmi. Takođe, utvrđeno je da konzumiranjem voća bogatog antocijanima ujedno povezano sa nižim rizikom od nastanka dijabetesa tipa 2 (Wedick i sar., 2012).

4.5.3. KORELACIONA ANALIZA SADRŽAJA POLIFENOLNIH JEDINJENJA I ANTIHIPERGLIKEMIJSKE AKTIVNOSTI PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

Rezultati Pearson-ovog koeficijenta korelacija (r) između sadržaja polifenolnih jedinjenja i antihiperglikemijske aktivnosti ($I \%_{\text{AhgA}}$) je prikazan u tabeli 24.

Tabela 24. Pearson-ov koeficijent korelacije (r) između sadržaja polifenolnih jedinjenja i sposobnosti inhibicije enzima α -glukozidaze

	($I \%_{\text{AhgE}}$)
Ukupni polifenoli	0,824^{**}
Ukupni flavonoidi	0,783 ^{**}
Ukupni flavonoli	0,779 ^{**}
Ukupni antocijani	0,843^{**}
Monomerni antocijani	0,837^{**}
Galna kiselina	0,808^{**}
Protokatehinska kiselina	0,772 ^{**}
Epikatehin	0,082
Katehin	0,925^{**}
Kafena kiselina	0,557 ^{**}
Siringinska kiselina	0,504 [*]
Elaginska kiselina	0,352
Sinapinska kiselina	0,106
Vanilinska kiselina	0,236
Miricetin	0,263
Rutin	0,167
Antocijan 1 (Cijanidin-3-glukozid)	0,803^{**}
Antocijan 2 (Cijanidin-3-rutinozid)	0,827^{**}
Antocijan 3 (Cijanidin-3-ksilozid)	0,678 ^{**}
Antocijan 4 (Cijanidin-3-malonilglikozid)	0,647 ^{**}
Antocijan 5 (Cijanidin-3-dioksazilglikozid)	0,822^{**}

¹Jaka korelacija ($|r| \geq 0,8$), srednje jaka korelacija ($0,8 > |r| \geq 0,5$), slaba korelacija ($0,5 > |r| \geq 0,2$) i nezatna korelacija ($0,2 > |r| > 0,0$)

²stepen značaja korelacija * ($p \leq 0,05$) i ** ($p \leq 0,01$)

Jaka korelacija je utvrđene između sadržaja ukupnih polifenola, ukupnih i monomernih antocijana, galne kiseline, katehina, cijanidin-3-glukozida, cijanidin-3-rutinozida i cijanidin-3-dioksazilglikozida i antihiperglikemijska aktivnost, sa stepenom značaja ($p \leq 0,01$). Srednje jaka

korelacije je utvrđena između sadržaja ukupnih flavonoida, ukupnih flavonola, protokatehinske kiseline, kafene kiseline, siringinske kiseline, cijanidin-3-kislozida i cijanidin-3-dioksazilglikozida i antihiperglikemijska aktivnost. Rezultati korelacija su u vezi sa pretpostavkom da ekstrakti kupina pokazuju biološku aktivnost *in vitro*, što je u skladu sa tvrdnjom Boath i saradnici (2012), da polifenoli sadržani u jagodastom voću djeluju kao inhibitori α -glukozidaze. Podsedeć i saradnici (2014) su takođe pokazali dobre korelacije između sadržaja polifenolnih jedinjenja u voću i sposobnosti inhibicije α -glukozidaze. U radu nisu primjećene značajne korelacije između sadržaja elaginske kiseline i sposobnosti inhibicije α -glukozidaze, a slične rezultate su pokazali You i saradnika (2011). Takođe, rezultati Vinčić (2016), ukazuju na inhibitornu aktivnost ekstrakata kupine na α -glukozidazu, kao i dobru korelaciju između antihiperglikemijske aktivnosti ekstrakata i sadržaja galne i ferulne kiseline. Osim sposobnosti inhibicije α -glukozidaze Wang i saradnici (2012), ukazuju da polifenolna jedinjenja inhibiraju aktivnosti digestivnih enzima zbog svoje sposobnosti da se vežu sa proteinima. Generalno, utvrđene su zadovoljavajuće korelacije između sadržaja polifenolnih jedinjenja i sposobnosti inhibicije enzima α -glukozidaze, pa možemo zaključiti da utvrđeni rezultati opravdavaju upotrebu kupine u svakodnevnoj ishrani i korišćenje u tradicionalnoj medicini.

ANTIPROLIFERATIVNI EFEKAT PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

Kupine su bogate antioksidantima koji inhibiraju slobodne radikale i sprječavaju oštećenja ćelija i nastanak proliferacija. Takođe pomažu u zaštiti i jačanju imuniteta čime se indirektno smanjuje rizik od nastanka karcinoma. U literaturi postoje podaci koji ukazuju na antikarcinogeno djelovanje ekstrakata kupine (smanjenje rizika od nastanka raka jednjaka, raka grlića materice i raka dojke) (Verma i sar., 2014). Zvanična medicina koristi hemioterapiju protiv širenja kancera, međutim, pokazalo se da ovakav vid terapije izaziva brojne neželjene efekte na zdravlje. U posljednje vrijeme dosta je raširena i tema "komplementarna i alternativna medicina" (CAM eng. *complementary and alternative medicine*) kao alternativa hemioterapiji. Tokom tretmana liječenja komplementarnom medicinom (CAM) najčešće je u upotrebi fitoterapija. Takođe, nekoliko studija se fokusiralo i na veći unos antioksidanata iz prirodnih izvora, jer je oksidacija usko povezana sa razvojem kancera (Mellado i sar., 2019). Do sada su najčešće ispitivana svojstva biološki aktivnih jedinjenja sa antioksidativnim djelovanjem prema sposobnosti inhibicije rasta tumorskih ćelija. Veliki broj različitih jedinjenja izolovanih iz biljnih vrsta je pokazalo u eksperimentima *in vitro* antitumorsku aktivnost i inhibitorno dejstvo na nastanak i širenje proliferacija.

Zbog visokog antioksidativnog potencijala još se istražuje antimutageno, antiproliferativno i antioksidativno djelovanje fitohemikalija na ćelijskom nivou, te njihovo djelovanje na gastrointestinalni, kardiovaskularni, endokrini, nervni i imunološki sistem. Kako novode mnogi autori, mehanizmi djelovanja ne zavise samo od sadržaja polifenolnih jedinjenja, već od velikog broja drugih jedinjenja prisutnih u biljkama, te su prema tome interesantni testovi koji se rade *in vitro* primjenom različitih modela ćelijskih kultura (Četojević-Simin i sar., 2015; Altemimi i sar., 2017).

Antiproliferativni efekat uzoraka rađen je *in vitro*, u cilju utvrđivanja potencijalnog inhibitornog dejstva prema humanim ćelijskim linijama HeLa (epitelni karcinom cerviksa), MCF7 (adenokarcinom dojke), HT-29 (adenokarcinom debelog crijeva) i MRC-5 (humani fetalni fibroblasti pluća). Analize su vršene pomoću kolorimetrijske metode (MTT testa), mjerenjem apsorbanci na 540 nm i 620 nm. Analize su rađene u osam ponavljanja, a rezultati su predstavljeni u tabelama 25 i 26 kao IC₅₀ vrijednost (koncentracija ekstrakata i soka koje inhibiraju 50 % ćelijskog rasta).

4.5.4. ANTIPROLIFERATIVNI EFEKAT EKSTRAKATA PLODA I TROPA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

Rezultati eksperimenta ukazuju da je ekstrakt divlje sorte kupine EP-d1 pokazao najveće inhibitorno dejstvo prema ćelijskim linijama epitelnog karcinoma cerviksa ($IC_{50}^{HeLa} = 422,42$), adenokarcinomu debelog crijeva ($IC_{50}^{HT-29} = 656,84$) i zdravim ćelijama fibroblasti pluća ($IC_{50}^{MRC-5} = 387,46$). Najveće inhibitorno dejstvo prema liniji adenokarcinoma dojke ($IC_{50}^{MCF7} = 402,03$) je imao ekstrakt ploda kultivisane sorte EP-p2 (Tabela 25). Četojević-Simin i saradnici (2017) su utvrdili vrlo visoka inhibitorna svojstva liofiliziranih uzoraka kultivisanih sorti kupina prema ispitivanim ćelijskim linijama. U ovoj doktorskoj disertaciji, zanimljivo je naglasiti da je najveće antiproliferativni efekat prema ćelijskoj liniji MCF7 (adenokarcinom dojke) pokazao uzorak kultivisane sorte EP-p2, kod koga je utvrđen najmanji sadržaj polifenolnih jedinjenja. Ovakvi rezultati idu u prilog tvrdnjama autora koji navode da značajan inhibitorni efekat na rast ćelijskih linija kancera imaju nefenolne komponente sadržane u biljkama.

Tabela 25. Uticaj ekstrakata ploda i tropa na rast humanih ćelijskih linija

Ekstrakti	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)*			
	HeLa	MCF7	HT-29	MRC-5
EP-p1	453,84±58,60 ^a	421,82±27,77 ^a	1267,31±32,66 ^a	534,79±70,43 ^a
EP-p2	770,85±89,64 ^a	402,03±12,92 ^a	1283,72±90,68 ^a	483,47±98,63 ^a
EP-d1	422,42±95,17 ^b	420,26±55,36 ^a	656,84±32,64 ^b	387,46±101,82 ^a
EP-d2	1025,65±102,36 ^c	1266,48±71,65 ^b	1713,30±8,96 ^c	1187,29±116,79 ^b
ET-p1	397,40±100,44 ^{ab}	246,88±14,06 ^a	930,60±53,66 ^a	428,98±98,79 ^a
ET-p2	476,04±20,43 ^b	231,72±23,10 ^a	785,84±58,06 ^b	338,47±11,97 ^b
ET-d1	232,10±49,00 ^c	352,74±31,56 ^b	505,57±12,25 ^c	267,76±46,42 ^b
ET-d2	315,49±45,96 ^b	306,68±27,80 ^c	590,08±45,44 ^d	329,10±27,91 ^b

*Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti \pm SD (n=8) u intervalima koncentracija 125 - 2000 $\mu\text{g/ml}$.

^{a,b,c,d} Slova iznad svake vrijednosti ukazuju na značajne razlike od najmanje 5% (Dankanov test).

U odnosu na antiproliferativni efekat prema ćelijskoj liniji MRC-5, uzorci EP-p1, EP-p2 i EP-d1 su pokazali slično dejstvo, bez statistički značajne razlike ($p > 0,05$), dok je ekstrakt ploda EP-d2 pokazao oko dva puta slabije dejstvo prema ćelijskoj liniji MRC-5. Treba napomenuti da je

ekstrakt ploda EP-d2 pokazao srednje dejstvo prema DPPH i ABTS radikalima, najslabije dejstvo prema $\cdot\text{OH}$ i najjače dejstvo na inhibiciju BR oscilatornih reakcija.

Ekstrakti tropa su pokazali snažniji antiproliferativni efekat prema ćelijskim linijama u odnosu na ekstrakte ploda i soka. Sličan trend prema inhibiciji ispitanih ćelijskih linija kod ekstrakata tropa je i kod ekstrakata ploda. Prema rezultatima u ovoj studiji najjači inhibitorni efekat ispitivani ekstrakti su imali prema ćelijskoj liniji MCF7. U literaturnim podacima se mogu naći i rezultate drugih autora koji ukazuju na antiproliferativni efekat ekstrakata kupine i drugog jagodastog voća prema istim linijama tumorskih ćelija (Seeram i sar., 2006; Vinčić, 2017).

U poređenju sa rezultatima studije Seeram i saradnici (2006) utvrđene su niže IC_{50} vrijednosti prema ćelijskim linijama HT-29 (64,60 $\mu\text{g/ml}$) i MFC-7 (122,00 $\mu\text{g/ml}$) za metanolske ekstrakte kupina u odnosu na prikazane rezultate.

Rezultati su u skladu sa vrijednostima koje su ustanovili Četojević-Simin i saradnici (2015) gdje su najjače dejstvo na osnovu EC_{50} vrijednosti pokazali ekstrakti tropa kultivisanih sorti kupina (Villamet i Meeker) prema MCF7, zatim HeLa, umjeren prema MRC-5 i najslabiji prema HT-29 ćelijskim linijama.

4.5.5. ANTIPROLIFERATIVNI EFEKAT SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

Iako su svi ekstrakti pokazali značajno antiproliferativno djelovanje prema ispitivanim ćelijskim linijama, a posebno prema MCF7 (adenokarcinomu dojke), uzorci soka u ispitivanom opsegu koncentracija nisu imali uticaj na inhibiciju prema navedenoj ćelijskoj liniji. Uzorci matičnog soka takođe nisu imali uticaj na rast ćelijskih linija HT-29 i MRC-5, u ispitivanom opsegu koncentracija. Uzorci soka su antiproliferativno djestvo pokazali prema HeLa ćelijskim linijama, a najjače inhibitorno dejstvo je imao uzorak S-p1 ($IC_{50}^{HeLa} = 34,62$).

Tabela 26. Uticaj soka na rast humanih ćelijskih linija

Sok	IC ₅₀ (µg/ml)*			
	HeLa	MCF7	HT-29	MRC-5
S-p1	71.28±14,84 ^a	<20	<20	<20
S-p2	34,62±2,98 ^b	<20	<20	<20
S-d1	<20	<20	<20	<20
S-d2	53,49±11,20 ^c	<20	<20	<20

*Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti ± SD (n=4) u intervalima razblaženja 20 - 320.

^{a,b,c,d} Slova iznad svake vrijednosti ukazuju na značajne razlike od najmanje 5% (Dankanov test).

Na osnovu utvrđenih vrijednosti, prikazanim u tabelama 25 – 26, može se zaključiti da su ispitivani uzorci pokazali najslabiji antiproliferativni efekat prema ćelijskim linijama HT-29, a najjači inhibitorni efekat prema rastu ćelijske linije MCF7 (adenokarcinom dojke). Uzorci soka su pokazali inhibitorni efekat samo prema HeLa ćelijskim linijama, a najjače dejstvo je pokazao uzorak kod koga je u radu utvrđena najslabija antioksidativna aktivnost.

Prema rezultatima u disertaciji Vinčić (2017), gdje je prikazan efekat ekstrakata maline, kupine i borovnice na rast četiri histološki različite humane ćelije, utvrđeno je da je najveću inhibitornu aktivnost prema rastu ćelijske linije HT-29 (adenokarcinom debelog crijeva) i MRC-5 (humani fetalni fibroblasti pluća) imao liofilizirani metanolski ekstrakt kupine, sorte Čačanska bestrna, dok je uzorak sorte Thornfree najveći inhibitorni efekat ispoljio prema ćelijskoj liniji MCF7 (adenokarcinom dojke). U ovom radu su utvrđene slične aktivnosti ekstrakata ploda pitomih sorti Čačanska bestrna i Chester Thornles.

4.5.6. KORELACIONA ANALIZA SADRŽAJA POLIFENOLNIH JEDINJENJA I ANTIPROLIFERATIVNOG EFEKTA PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

U tabeli 27. prikazani su korelacije između sadržaja ukupnih i pojedinačnih polifenolnih jedinjenja i recipročne vrijednosti vrijednosti ($1/IC_{50}$) za antiproliferativni efekat ispitivanih uzoraka ($p > 0,05$).

U radu je utvrđena srednje jaka korelacija sa stepenom značaja ($p \leq 0,01$), između sadržaja ukupnih polifenola i vrijednosti $1/IC_{50}^{HeLa}$, te srednje jaka korelacija u odnosu na sadržaj flavonoida i flavonola. Slabe korelacije su utvrđene između sadržaja ukupnih antocijana, sinapisne kiseline, elaginske kiseline i vrijednosti $1/IC_{50}^{HeLa}$, sa stepenom značaja ($p \leq 0,05$). Jake korelacije su utvrđene između vrijednosti $1/IC_{50}^{MFC7}$ i sadržaja galne kiseline ($p \leq 0,01$), dok su korelacije između ostalih polifenolnih jedinjenja i vrijednosti $1/IC_{50}^{MFC7}$ slabe ili neznatene i bez statističkog značaja ($p > 0,05$).

Vrijednosti korelacija između IC_{50}^{HT29} i sadržaja ukupnih fenola su visoke, te srednje visoke u odnosu na sadržaj flavonoida, epikatehina, katehina, elaginske, siringinske i sinapisne kiseline, sa stepenom značaja ($p \leq 0,01$). Dalje, u tabeli 27 vidimo slabe korelacije između vrijednosti $1/IC_{50}^{HT29}$ i sadržaj ukupnih flavonola, ukupnih i monomernih antocijana, miricetina i rutina, sa stepenom značaja ($p \leq 0,05$).

Srednje jake korelacije su utvrđene između vrijednosti IC_{50}^{MRC5} dobijene i sadržaja ukupnih fenola i flavonoida ($p \leq 0,01$).

Izostanak korelacija između polifenolnog sadržaja i vrijednosti za antiproliferativni efekat $1/IC_{50}^{MFC7}$, ukazuje da su druge komponente zastupljene u ekstraktima i matičnom soku imale značajan uticaj na antiproliferativni efekat.

Korelacije utvrđene između sadržaja ukupnih i monomernih antocijana i antiproliferativnog efekta prema MFC7 i MRC5 ćelijskim linijama su slabe ili neznatne.

Tabela 27. Pearson-ovi koeficijenti korelacije između sadržaja polifenolnih jedinjenja i antiproliferativnog efekta

	$1/IC_{50}^{HELA}$	$1/IC_{50}^{MFC7}$	$1/IC_{50}^{HT29}$	$1/IC_{50}^{MRC5}$
Ukupni polifenoli	0,759**	0,050	0,815**	0,589**
Ukupni flavonoidi	0,665**	-0,064	0,752**	0,522**
Ukupni flavonoli	0,525**	0,021	0,474*	0,313
Ukupni antocijani	0,408*	0,169	0,462*	0,356
Monomerni antocijani	0,354	0,163	0,407*	0,309
Galna kiselina	-0,063	0,868**	-0,025	0,201
Protokatehinska kiselina	0,066	0,092	0,300	0,218
Epikatehin	0,429*	-0,002	0,523**	0,393
Katehin	0,376	0,448*	0,600**	0,473*
Kafena kiselina	0,254	-0,026	0,343	0,169
Siringinska kiselina	0,398	0,334	0,605**	0,541**
Elaginska kiselina	0,496*	0,269	0,606**	0,501*
Sinapinska kiselina	0,507*	-0,038	0,676**	0,495*
Vanilinska kiselina	-0,079	-0,106	0,122	0,074
Miricetin	0,278	-0,295	0,428*	0,141
Rutin	0,297	0,203	0,409*	0,206
Antocijan 1 (Cijanidin-3-glukozid)	0,266	0,551**	0,397	0,353
Antocijan 2 (Cijanidin-3-rutinozid)	-0,189	0,412*	0,036	0,037
Antocijan 3 (Cijanidin-3-ksilozid)	0,028	0,158	0,291	0,101
Antocijan 4 (Cijanidin-3-malonilglikozid)	-0,075	0,135	-0,159	-0,088
Antocijan 5 (Cijanidin-3-dioksazilglikozid)	0,227	-0,085	0,126	0,039

¹Jaka korelacija ($|r| \geq 0,8$), srednje jaka korelacija ($0,8 > |r| \geq 0,5$), slaba korelacija ($0,5 > |r| \geq 0,2$) i neznatna korelacija ($0,2 > |r| > 0,0$).

²stepen značaja korelacija * ($p \leq 0,05$) i ** ($p \leq 0,01$).

4.6. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

Antimikrobno dejstvo ekstrakata i matičnog soka je ispitano prema sojevima gram negativnih bakterija (G^-) *Escherichia coli* (ATCC 25923), gram pozitivnih bakterija (G^+) *Staphylococcus Aureus* (WDCM 00013), gljivicama *Aspergillus niger* i soju kvasca *Candida albicans* (ATCC 10231).

4.6.1. ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

Ispitano je djelovanje ekstrakata ploda, tropa i uzoraka matičnog soka kupine u koncentraciji 50 mg/ml u 80% etanolu (v/v). Ekstrakti ploda divlje kupine (EP-d1 i EP-d2) su pokazali jači inhibitorski uticaj na rast testiranih bakterijskih kultura u odnosu na ekstrakte kultivisanih sorti (EP-p1 i EP-p2) (Tabela 28).

Tabela 28. Efekat ekstrakata i referentnih antibiotika na inhibiciju rasta bakterijskih kultura *E. Coli* (G^+) i *S. Aureus* (G^-)

Ekstrakti	* <i>E. coli</i>	* <i>S. aureus</i>
EP-p1	6,65±0,34 ^a	8,10±0,32 ^a
EP-p2	8,30±0,67 ^b	8,60±0,57 ^b
EP-d1	9,40±0,81 ^c	8,35±0,47 ^{ab}
EP-d2	8,25±1,25 ^b	8,75±0,47 ^b
ET-p1	6,90±0,74 ^a	8,00±0,25 ^a
ET-p2	7,80±0,27 ^b	8,65±0,58 ^b
ET-d1	nd	8,06±0,42 ^a
ET-d2	7,70±0,27 ^b	9,55±0,44 ^c
Etanol 80% (v/v)	-	-
Ampicillin 10 mg	16,00±4,39	3,00±2,16
Ciprofloxacin 5 mg	37,00±3,37	29,25±2,99
Erytromycin 15 mg	10,75±1,50	27,75±2,99
Gentamicin 10 mg	25,50±1,29	29,75±1,90

*Dijametar zona inhibicije u mm

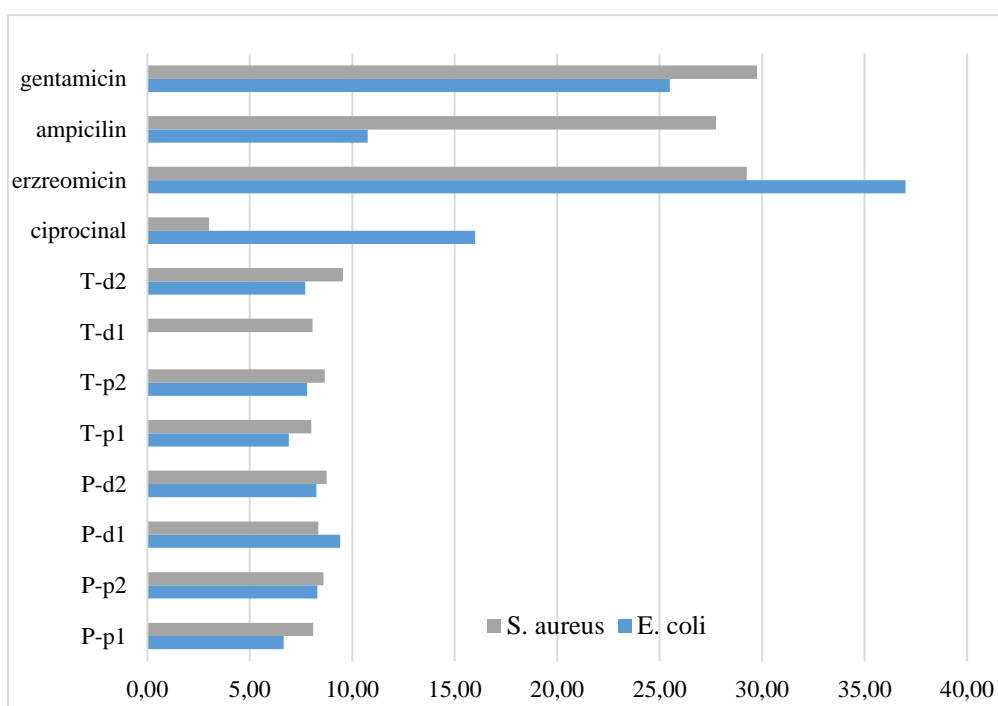
^{a,b,c,d} Slova iznad svake vrijednosti ukazuju na značajne razlike od najmanje 5% (Duncanov test).

Najjači inhibitorski efekat prema soju *Escherichia coli*, pokazao je ekstrakt divlje sorte EP-d1 (9,40 mm) sa lokacije Verići, dok je najjači inhibitorski efekat prema soju *Staphylococcus*

Aureus pokazao uzorak divlje sorte EP-d2 (8,35 mm) sa lokacije Javorani. Najslabije uticaj na rast *Escherichia coli* (6,65 mm) i *Staphylococcus Aureus* (8,10 mm), je imao ekstrakt ploda sorte Čačanska bestrna.

Etanol 80% (v/v) nije uticao na rast bakterija, s obzirom da isparava odmah nakon postavljanja uzoraka na inkubaciju.

Radi lakše interpretacije rezultata, na slici 88 je prikazan trend antimikrobne aktivnosti ekstrakata prema bakterijskom soju *Escherichia coli* i bakterijskom soju *Staphylococcus Aureus* u odnosu na aktivnost komercijalnih antibiotika poznate koncentracije.



Slika 88. Grafički prikaz antimikrobne aktivnosti komercijalnih antibiotika i ispitivanih uzoraka u odnosu na rast sojeva *Escherichia coli* i *Staphylococcus Aureus*.

Kod uzoraka tropa najjače dejstvo na inhibiciju rasta *Escherichia coli* (7,80 mm) je imao ekstrakt kultivisane kupine ET- p2, bez statistički značajne razlike ($p > 0,05$) u odnosu na uzorak EP-d2 (7,70 mm). Ekstrakt divlje kupine EP-d1 u eksperimentu nije pokazao dejstvo prema inhibiciji rasta *Escherichia coli*. Najjači inhibitorni efekat na rast *Staphylococcus Aureus* (9,55 mm) je pokazao ekstrakt tropa divlje kupine ET- d2, sa statistički značajnom razlikom ($p \leq 0,05$). Takođe, rezultati eksperimenta ukazuju da su ekstrakti ploda imali jači inhibitorni efekat prema soju *Escherichia coli*, za razliku od uzoraka tropa koji su pokazali snažniji inhibitorni efekat prema *Staphylococcus Aureus*, što se može dovesti u vezu sa sadržajem polifenolnih jedinjenja. Kod drugih autora takođe je zabilježeno inhibitorno dejstvo ekstrakta kupine prema velikom broju sojeva G^+ i G^- bakterija, a između ostalog i prema sojevima *Escherichia coli* i *Staphylococcus*

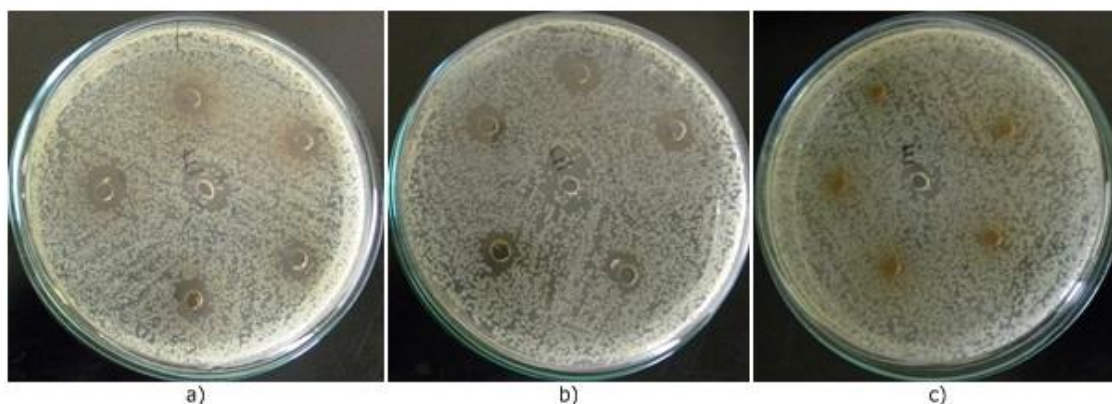
Aureus (Radovanović i sar., 2013; Krstić, 2018). Krisch i saradnici (2008) su utvrdili da sok od kupina inhibira rast *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus marcescens* i *Escherichia coli*. Radovanović i saradnici 2013 su takođe utvrdili jače inhibitorno dejstvo ekstrakata divljih sorti u odnosu na kultivisane sorte, prema ispitivanim bakterijskim sojevima.

Na slici 89 prikazane su zone inhibicije nastale usljed djelovanja komercijalnih antibiotika poznate koncentracije prema soju *Escherichia coli*, na kojima se mogu uočiti veće zone inhibicije nastale uticajem standardnih antibiotika *Ciprofloxacina* i *Gentamicina* u odnosu na *Ampicilin* i *Erytromycin*.



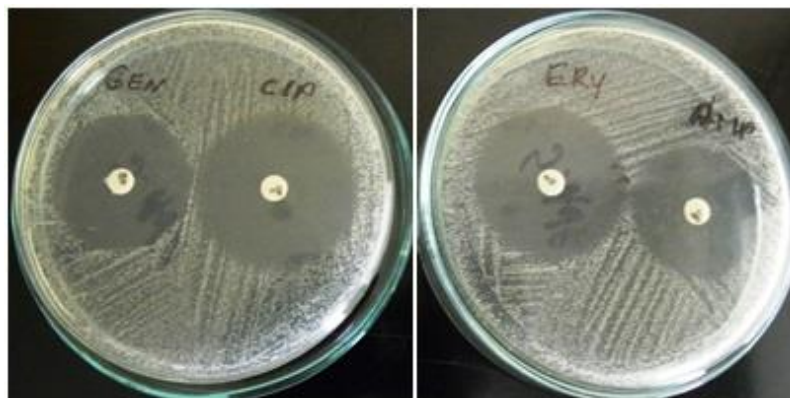
Slika 89. Inhibitorno djelovanje antibiotika (*Ampicillin*, *Ciprofloxacina*, *Erytromycin* i *Gentamicin*) prema *Escherichia coli* ATCC 25923

Na slici 90 su prikazane zone inhibicije nastale djelovanjem određene koncentracije ekstrakata ploda i tropa i uzoraka matičnog soka prema soju *Escherichia coli*. Na slici se mogu jasno uočiti manje zone inhibicije u poređenju sa zonama inhibicije koje su nastale usljed dejstva standardnog antibiotika (Slika 89), te izostanak dejstva matičnog soka na inhibiciju rasta navednog soja.



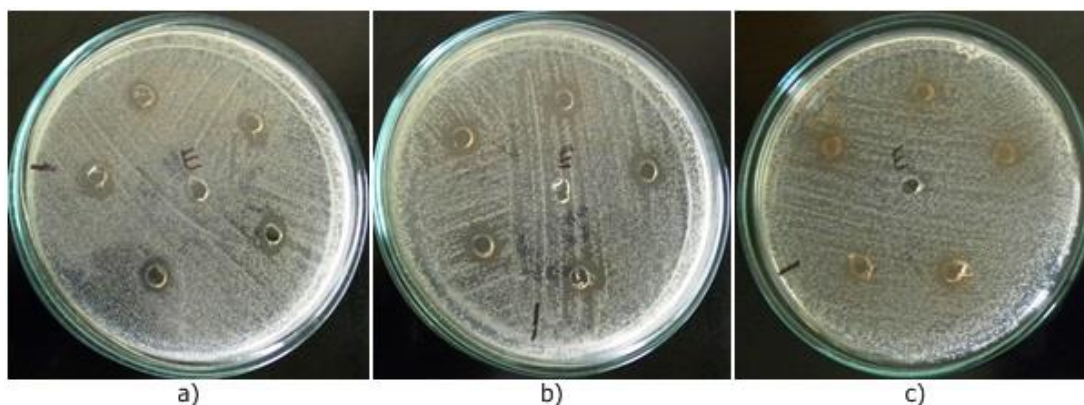
Slika 90. Antimikrobno dejstvo a) ekstrakta ploda, b) ekstrakta tropa i c) matičnog soka prema *Escherichia coli* ATCC 25923

Na slici 91 prikazane su zone inhibicije nastale usljed djelovanja komercijalnih antibiotika poznate koncentracije prema soju *Staphylococcus Aureus*, na kojima se mogu uočiti veoma slične zone inhibicije.



Slika 91. Antimikrobno dejstvo antibiotika (*Ampicillin*, *Ciprofloxacin*, *Erytromycin* i *Gentamicin*) prema *Staphylococcus Aureus*

Na slici 92 su prikazane zone inhibicije nastale usljed djelovanja određene koncentracije ekstrakata ploda i tropa i uzoraka matičnog soka prema soju *Staphylococcus Aureus*, na kojima se može uočiti slabije dejstvo ekstrakata u poređenju sa standardnim antibioticima, i izostanak dejstva matičnog soka prema navedenom soju.



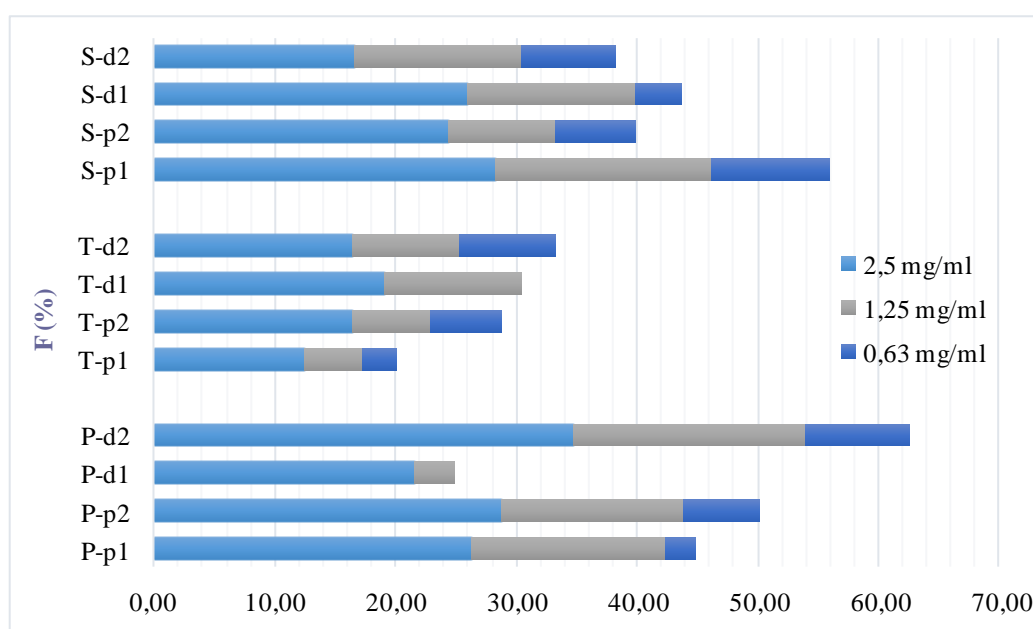
Slika 92. Antimikrobno dejstvo a) ekstrakta ploda, b) ekstrakta tropa i c) matičnog soka prema *Staphylococcus Aureus*

U poređenju sa rezultatima u disertacijama Vinčić (2017) i Krstić (2018), u okviru ovog rada nije dokazano antimikrobno dejstvo matičnog soka u primjenjenim koncentracijama na rast ispitivanih bakterijskih sojeva.

4.6.2. ANTIFUGALNA AKTIVNOST PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

4.6.2.1. Aktivnost prema soju gljivice *Aspergillus niger*

Ekstrakti plodova kupine pokazali su inhibitorno dejstvo na rast micelija *Aspergillus niger* u zavisnosti od koncentracije (Slika 93). Najveći procenat inhibicije ekstrakti su pokazali u koncentraciji od 2,5 mg/ml, zatim na 1,25 mg/ml, dok je najniža koncentracija ekstrakta (0,63 mg/ml) samo neznatno inhibirala rast micelija *Aspergillus niger*. Etanol u koncentracijama od 4%, 2% i 1%, nije inhibirao micelarni rast (rezultati nisu prikazani). Ekstrakti kultivisane sorte kupine (EP-p1 i EP-p2) su pokazali sličan, dok su uzorci divljih sorti kupina (EP-d1 i EP-d1) pokazali različit antifungalni efekat, što se vidi na slici 93.



F % - inhibicija ćelijskog rasta

Slika 93. Antifungalna aktivnost ekstrakata i soka prema *Aspergillus niger*

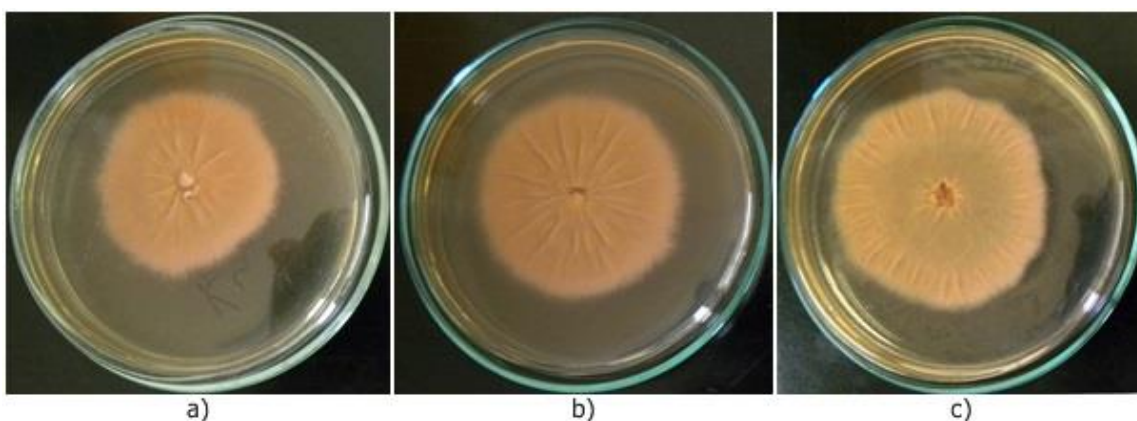
Ekstrakti ploda kultivisane kupine EP-p1, EP-p2 i divlje sorte EP-d2 u koncentraciji od 2,5 mg/ml inhibirali su rast micelija *Aspergillus niger* za više od 25 %. Trend ekstrakata ploda na osnovu sposobnosti inhibicije prema rastu micelija *A. niger* je EP-d2 > EP-p2 > EP-p2 > EP-d2.

Na slici 94 je prikazana Petrijeva ploča sa izrastom kolonije *Aspergillus niger* izolovane sa plodova jabuke u laboratorijskim uslovima.



Slika 94. Kolonije gljivice *Aspergillus niger*

Na slici 95 je prikazana inhibitorna aktivnost ekstrakata ploda i tropa i uzoraka soka kod koncentracije 2,5 mg/ml, na rast micelija *Aspergillus niger*.



Slika 95. Antifungalna aktivnost a) ekstrakta ploda, b) ekstrakta tropa i c) matičnog soka prema soju *Aspergillus niger*

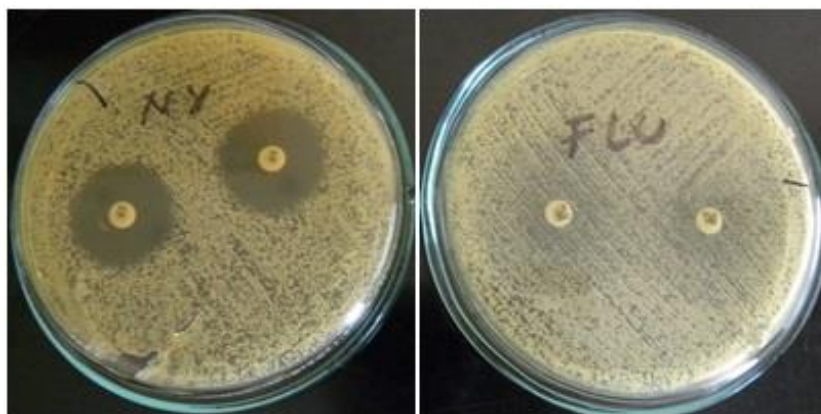
Za razliku od prikazanih rezultata u studiji Riaz i saradnici (2011) nije utvrđena značajna antifungalna aktivnost ekstrakata ploda kupine prema soju *Aspergillus niger*.

4.6.2.2. Aktivnost prema soju kvasca *Candida albicans*

Prema dosadašnjim istraživanjima *Candida albicans* predstavlja invazivnu gljivicu koja je u najvećem broju kliničkih slučajeva izolovana kao uzročnik oralne kandidijaze (Liu i sar., 2013). U posljednje vrijeme je sve veća pojava sojeva rezistentnih na standardne antimikotike usljed sve

veće upotrebe lijekova, pa je tako nepraktično oslanjati se samo na jedan terapijski režim (Seleem i sar., 2017).

Inhibitorno dejstvo ekstrakata ploda, tropa i uzoraka matičnog soka u koncentraciji 50 mg/ml u 80% etanolu (v/v) nije utvrđeno prema soju kvasca *Candida albicans*. Na slici 96 prikazane su Petrijeve ploče na kojima su vidljive zone inhibicije na mjestima gdje su postavljeni diskovi komercijalnih antimikotika *Nystatin* (100 IU) i *Fluconazole* (100 µg) prema soju *Candida albicans* (ATCC 10231). Na slici se može uočiti inhibitorno djelovanje *Nystatin*-a (100 µg), kao i zanemarljivo djelovanje antimikotika *Fluconazole*-a (100 µg) prema soju *Candida albicans*.

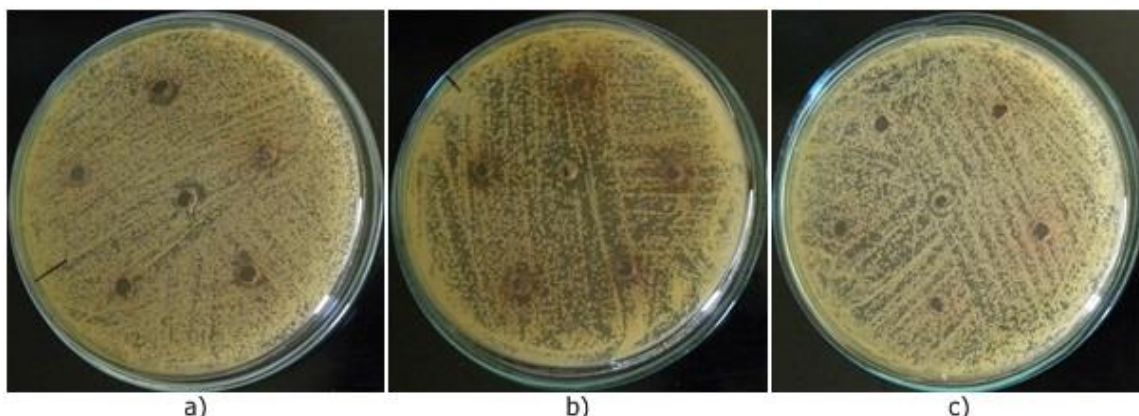


Slika 96. Antimikotično dejstvo standardnog antimikotika *Nystatin* (100 IU) i *Fluconazole* (100 µg) prema soju gljivice *Candida albicans*

Rezultati potvrđuju tvrdnje Sanguinetti i saradnika (2015) da je soj *Candida albicans* u posljednje vrijeme povećao rezistenciju prema azolima kao što je flukonazol (*Fluconazole*) - standardni antimikotički lijek za liječenje infekcija izazvanih gljivicom *Candida albicans*.

Odsustvo dejstva ekstrakata i matičnog soka prema gljivici *Candida albicans* nalazimo i u radovima kod drugih autora (Veličković, 2013; Vinčić, 2017; Milenković-Anđelković, 2016). Rezultati u radu Vinčić (2017), ukazuju da liofilizirani ekstrakti kupine djeluju inhibitorno na većinu testiranih sojeva (G^+) i (G^-) bakterija, izuzev na gljivicu *Candida albicans*.

Na slici 97 prikazane su Petrijeve ploče na kojima se može uočiti izostanak inhibitornog djelovanja ekstrakata i uzoraka matičnog soka prema gljivici *Candida albicans*.



Slika 97. Aktivnosti a) ekstrakta ploda, b) ekstrakta tropa i c) matičnog soka prema gljivici *Candida albicans*

U studiji Veličković (2013), se navodi da je ispitan uticaj etanolnih ekstrakata bulke, gloga i trnjine na nekoliko sojeva (G^+) i (G^-) bakterija, te gljivicama *Aspergillus niger* i *Candida albicans*. Etanolni ekstrakti svježeg ploda gloga i trnjine su pokazali dobru antimikrobnu aktivnost skoro na sve ispitivane bakterije, kao i fungicidno dejstvo prema gljivici *Aspergillus niger*, međutim, nisu imali uticaj na rast kvasca *Candida albicans*. Slični rezultati su predstavljeni i u radu Milenković-Andelković (2016), gdje su prikazani rezultati ispitivanja aktivnosti ekstrakta ploda i lista kultivisane kupine prema 12 bakterijskih sojeva i jednom soju kvasca.

U disertaciji Krstić (2018) ekstrakt tropa i sok kupine su pokazali antifungalno dejstvo prema autohtonom soju *Candida-u albicans* tokom eksperimenta izvedenog dilucionom metodom. S obzirom na različite izvještaje o dejstvu ekstrakata, u obzir treba uzeti činjenicu da antifungalni mehanizam polifenolnih jedinjenja na rast gljivica ili gljivičnih kolonija još uvijek nije razjašnjen (Seleema i sar., 2017).

Antioksidativna i antimikrobna aktivnost polifenolnih jedinjenja čini ih pogodnim za upotrebu u mesnoj industriji kao prirodne konzervanse (Papuc i sar., 2017).

4.6.3. KORELACIONA ANALIZA SADRŽAJA POLIFENOLNIH JEDINJENJA I ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI PLODA, TROPA I SOKA KULTIVISANE I DIVLJE KUPINE

Rezultati prikazani u tabeli 29 pokazuju korelacione veze između sadržaja polifenola, flavonoida, flavanola, ukupnih i monomernih antocijana i antimikrobne aktivnosti.

Tabela 29. Pearson-ovi koeficijenti korelacije između sadržaja polifenolnih jedinjenja i antimikrobne aktivnosti

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>A. niger</i>
Ukupni polifenoli	-0,179	0,246	0,121
Ukupni flavonoidi	-0,042	0,295	0,140
Ukupni flavonoli	-0,329	0,000	0,136
Ukupni antocijani	-0,135	0,058	0,175
Monomerni antocijani	-0,104	0,049	0,167
Galna kiselina	-0,228	-0,226	0,186
Protokatehinska kiselina	0,572**	0,676**	0,242
Epikatehin	-0,073	0,139	-0,078
Katehin	0,074	0,301	0,152
Kafena kiselina	-0,147	0,057	-0,109
Siringinska kiselina	-0,300	-0,009	0,086
Elaginska kiselina	-0,196	0,099	-0,036
Sinapinska kiselina	0,130	0,388	0,073
Vanilinska kiselina	0,672**	0,573**	0,280
Miricetin	0,293	0,525**	0,088
Rutin	-0,048	0,286	0,048
Antocijan 1 (Cijanidin-3-glukozid)	-0,126	0,078	0,228
Antocijan 2 (Cijanidin-3-rutinozid)	0,331	0,274	0,181
Antocijan 3 (Cijanidin-3-ksilozid)	0,407*	0,576**	0,185
Antocijan 4 (Cijanidin-3-malonilglikozid)	-0,295	-0,389	0,108
Antocijan 5 (Cijanidin-3-dioksazilglikozid)	-0,479*	-0,329	0,108

¹Jaka korelacija ($|r| \geq 0,8$), srednje jaka korelacija ($0,8 > |r| \geq 0,5$), slaba korelacija ($0,5 > |r| \geq 0,2$) i neznatna korelacija ($0,2 > |r| > 0,0$)

²stepen značaja korelacija * ($p \leq 0,05$) i ** ($p \leq 0,01$)

Srednje jaka korelacija je utvrđena između sadržaja protokatehinske kiseline, vanilinske kiseline, cijanidin-3-ksilozida i sposobnosti inhibicije rasta sojeva *E. coli* i *S. Aureus*, sa stepenom

značaja ($p \leq 0,01$). Slaba korelacija je utvrđena između sadržaja polifenolnih jedinjenja, askorbinske kiseline i inhibicije rasta soja gljivice *A. niger*, bez statističkog značaja ($p > 0,05$), pa se rezultati ne uzimaju u razmatranje.

Na osnovu prikazanih rezultat može se zaključiti da su inhibitorni uticaj na rast ispitivanih sojeva imala druga jedinjenja (nefenolna) ili sinergizam prisutnih polifenolnih jedinjenja u ekstraktima, a slične rezultate nalazimo i kod drugih autora (Nohynek i sar., 2006; Cisowska i sar., 2011; González i sar., 2013).

5. ZAKLJUČAK

U radu su analizirana četiri uzorka kupine sa dva različita lokaliteta sjeverozapadnog dijela Bosne i Hercegovine, sa lokaliteta Verići (divlja kupina i kultivisana sorta Čačanska bestrna) i sa lokaliteta Javorani (divlja kuina i kultivisana sorta Chester Thornless). Ispitani su hemijski sastav, antioksidativna, antihiperглиkemijska, antiproliferativna i antimikrobna aktivnost ploda, tropa i soka kultivisane i divlje kupine.

U uzorcima ploda, tropa i soka kultivisane i divlje kupine ispitan je osnovni hemijski sastav: suva materija, ukupan pepeo, ukupni šećeri, sirova vlakna, ukupna kiselost, sadržaj askorbinske kiseline i sadržaj mineralnih materija. Na osnovu utvrđenih rezultata, najveći sadržaj suve materije (21,19 g/100g svježe materije) bio je kod uzorka tropa pitome kupine sa lokacije Verići, a sirove celuloze (2,88 g/100g svježe materije) kod uzorka divlje kupine sa iste lokacije. Sadržaj pepela (0,52 g/100g svježe materije) bio je najveći kod tropa divlje kupine sa lokacije Javorani. Najveći ukupni šećeri (7,50 g/100g svježe materije) su određeni kod soka pitome kupine sa lokacije Verići, a ukupna kiselost (1,94 ml/100g svježe materije) kod uzorka soka pitome kupine sa lokacije Javorani. Najveći sadržaj askorbinske kiseline je utvrđen kod ploda Chester Thornless (21,36 mg/100g svježe materije) sa lokacije Verići.

Sadržaj mineralnih materija detektovan je metodom optičke emisije spektrometrije (ICP-OES). U uzorcima soka sorti divlje kupine sa lokacije Javorani, određen je najveći sadržaj minerala kalijuma (K) 189,2 mg/100 g, magnezijuma (Mg) 29,20 mg/100 g i fosfora (P) 28,10 mg/100 g, a sa lokacije Verići željeza (Fe) 0,65 mg/100 g i selena (Se) 0,45 µg/100 g, dok je u soku pitome sorte kupine sa lokacije Verići sadržaj kalcijuma (Ca) 39,50 mg/100 g i cinka (Zn) 0,49 mg/100 g. Kod uzoraka ploda divljih sorti sa lokacije Verići određen je najveći sadržaj natrijuma (Na) 3,50 mg/100 g i mangana (Mn) 0,65 mg/100g. Najviši sadržaj bakra (Cu) od 0,17 mg/100 g određen je u uzorcima ploda pitome i divlje kupine sa lokacije Verići, kao i pitome kupine sa lokacije Javorani. Sadržaj olova (Pb) u količinama od 0,01 mg/100 g je određen kod obe divlje sorte ploda, i tropa sa lokacije Javorani i u soku pitome sorte sa lokacije Javorani i oba tropa sa lokacije Verići. Prisustvo kadmijuma (Cd) i arsena (As) nije utvrđeno u ispitivanim uzorcima. Prikazane vrijednosti ukazuju da je najveći sadržaj mineralnih materija određen u soku, čime je potvrđena dobra rastvorljivost minerala.

Metodom po *Soxhlet*-u uz upotrebu 80 % v/v etanola izvršena je ekstrakcija ploda i tropa kako bi se dobio ekstrakt čija je primjena prihvatljiva u prehrambenoj industriji. Na osnovu prinosa ekstrakcije utvrđen je veći procenat iskorištenja dobijen ekstrakcijom uzoraka ploda u odnosu na uzorke tropa, te veći prinos ekstrakta kod uzoraka sorti divljih kupina u odnosu na

kultivisane. Kod uzoraka ploda kupine najveći prinos je utvrđen kod divlje sorte sa lokacije Verići EP-d2 (8,75 g/100g svježe materije), kao i kod ekstrakata tropa ET-d2 (6,74 g/100g svježe materije).

Spektrofotometrijskim metodama određen je sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida, flavonola, ukupnih i monomernih antocijana u ekstraktima ploda i tropa, i soku. Najveći sadržaj ukupnih polifenola (50,16 mg GAE/g s.m.) i flavonida (7,73 mg Qv/g s.m.) utvrđen je u ekstraktu tropa divlje kupine sa lokacije Verići. Najveći sadržaj ukupnih flavonola (6,63 mg Qv/g s.m.), ukupnih antocijana (20,40 mg Cy/g s.m.) i monomernih antocijana (17,30 mg Cy/g s.m.) je utvrđen kod tropa kultivisane sorte Chester Thornless. Kod ispitivanih uzoraka soka najveći sadržaj ukupnih polifenola (2,25 mg GAE/g s.m.), ukupnih antocijana (1,34 mg Cy/g s.m.) i monomernih antocijana (1,14 mg Cy/g s.m.) je utvrđen kod uzorka divlje kupine sa lokacije Verići, dok je najveći sadržaj flavonida (0,45 mg Qv/g s.m.) i flavonola (0,68 mg Qv/g s.m.) detektovan kod uzorka sorte Chester Thornless.

HPLC metodom je analiziran kvalitativni i kvantitativni sastav polifenolnih jedinjenja u ekstraktima ploda i tropa, i soku divlje i kultivisane kupine. HPLC analizom je utvrđeno da je katehin dominantan flavonoid u svim ispitivanim uzorcima. U ekstraktima ploda je detektovan u intervalu od 1,675 do 3,131 mg/100g ekstrakta, kod ekstrakata tropa, od 3,245 do 4,569 mg/100g ekstrakta, i kod uzoraka soka, od 0,147 do 0,180 mg/100ml soka. Najviše zastupljena fenolna kiselina u uzorcima bila je protokatehinska kiselina, kod ekstrakata ploda je prisutna u intervalu od 1,316 do 2,606 mg/100g ekstrakta, kod ekstrakata tropa, od 1,294 do 2,180 mg/100g ekstrakta, i u uzorcima soka kupine, od 0,396 do 0,608 mg/100ml soka. Sadržaj antocijana bio je značajno viši u uzorcima tropa u odnosu na uzorke ploda i soka divlje i kultivisane kupine.

Biološki potencijal uzoraka je utvrđen *in vitro*, gdje je određena: antioksidativna i antihiperглиkemijska aktivnost, antiproliferativni efekat i antimikrobna aktivnost. Antioksidativna aktivnost uzoraka je ispitana na osnovu četiri metode: DPPH test, ABTS test, sposobnost neutralizacije hidroksil radikala ($\cdot\text{OH}$) i metodom inhibicije *Briggs Rauscher*-ovih oscilatornih reakcija. Ekstrakti divljih i pitomih kupina su pokazali inhibitornu aktivnost prema svim ispitivanim slobodnim radikalima, kao i sposobnost inhibicije *Briggs Rauscher*-ovih oscilatornih reakcija. Prema rezultatima najsnažniju antiradikalnu aktivnost su pokazali ekstrakti tropa divlje sorte sa lokacije Javorani ($\text{IC}_{50}^{\text{DPPH}} = 105,68 \mu\text{g/ml}$, $\text{IC}_{50}^{\text{ABTS}} = 23,74 \mu\text{g/ml}$, $\text{IC}_{50}^{\text{OH}} = 134,61 \mu\text{g/ml}$ i inhibicija *Briggs Rauscher*-ovih oscilatornih reakcija $\text{IC}_{50} = 119,23 \text{ mmol Trolox/g.}$). Kod uzoraka soka najsnažniju aktivnost prema inhibiciji slobodnih radikala je pokazao uzorak divlje sorte sa lokacije Verići, osim prema $\cdot\text{OH}$, gdje je najsnažniju inhibitornu aktivnost imao uzorak divlje kupine sa lokacije Javorani. Međusobnim poređenjem dobijenih rezultata, je utvrđeno da su snažniju aktivnost prema slobodnim radikalima pokazali ekstrakti tropa u odnosu na ekstrakte

ploda i soka, a da su divlje kupine imale snažniju antiradikalnu aktivnost u odnosu na kultivisane sorte kupine. Na osnovu Pirsonovog koeficijenta korelacija su utvrđene jake korelacije između vrijednosti $1/IC_{50}^{DPPH}$ i sadržaja ukupnih polifenola ($r = 0,903$) i ukupnih flavonoida ($r = 0,925$), zatim između vrijednosti $1/IC_{50}^{ABTS}$ i sadržaja ukupnih polifenola ($r = 0,929$) i ukupnih flavonoida ($r = 0,956$), sa statistički značajnom razlikom ($p \leq 0,01$). Srednje jake korelacije su utvrđene između sadržaja ukupnih flavonoida, ukupnih antocijana, monomernih antocijana, sinapinske kiseline, te miricetina i sposobnosti inhibicije DPPH i ABTS radikala, sa statistički značajnom razlikom ($p \leq 0,01$). Korelacije između vrijednosti $1/IC_{50}^{OH}$ i sadržaja polifenolnih jedinjenja su slabe ili neznatne, bez statističkog značaja, te nisu uzete u razmatranje. Jaka korelacija je utvrđena između sposobnosti inhibicije BR oscilatornih reakcija i sadržaja ukupnih polifenola ($r = 0,813$), te srednje jake korelacije između sadržaja flavonoida, epikatehina, katehina, kafene kiseline, siringinske kiseline, elaginske kiseline, rutina, cijanidin-3-glukozida i inhibicije BR oscilatornih reakcija.

Antihiperглиkemijska aktivnost ispitivanih uzoraka kupine je dokazana na osnovu sposobnosti inhibicije enzima α -glukozidaze u *in vitro* eksperimentima. Svi ekstrakti ploda i tropa su inhibirali oko polovine aktivnosti α -glukozidaze ($I \%^{A_{hgE}} = 41,54 - 62,13 \%$), dok su uzorci soka pri istim koncentracijama pokazali značajno niže vrijednosti inhibicije ($I \%^{A_{hgE}} = 8,43 - 24,64 \%$). Utvrđen je jak stepen korelacije između antihiperглиkemijske aktivnosti ekstrakata i sadržaj ukupnih polifenola ($r = 0,824$), ukupnih antocijana ($r = 0,843$), monomernih antocijana ($r = 0,837$), galne kiseline ($r = 0,808$), katehina ($r = 0,925$), cijanidin-3-glukozida ($r = 0,803$), cijanidin-3-rutinozida ($r = 0,827$) i cijanidin-3-dioksazilglikozida ($r = 0,822$), sa statistički značajnom razlikom ($p \leq 0,01$). Rezultati korelacija su u vezi sa pretpostavkom da ekstrakti tropa i ploda kupine pokazuju biološku aktivnost *in vitro* zahvaljujući sadržaju polifenolnih jedinjenja.

Antiproliferativni efekat uzoraka je određen prema inhibiciji rasta ćelijskih linija epitelnog karcinoma cerviksa (HeLa), adenokarcinomu debelog crijeva (HT-29), zdravim ćelijama fibroblasti pluća (MRC-5) i prema ćelijskoj liniji adenokarcinoma dojke (MCF7). Ekstrakti su pokazali najveće inhibitorno dejstvo prema ćelijskoj liniji adenokarcinoma dojke (MCF-7), i to ekstrakt ploda ($IC_{50}^{MCF7} = 402,03 \mu\text{g/ml}$), kao i ekstrakt tropa ($IC_{50}^{MCF7} = 231,72 \mu\text{g/ml}$) kultivisane sorte Čačanska bestrna. Najslabiji efekat ekstrakti su pokazali na rast ćelijske linije adenokarcinoma debelog crijeva ($IC_{50}^{HT-29} = 505,57 - 1713,30 \mu\text{g/ml}$). Uzorci soka su pokazali inhibitorno dejstvo samo prema rastu ćelijskih linija HeLa, a najsnažniji efekat je imao uzorak soka Chester Thornless ($IC_{50}^{HeLa} = 34,62 \mu\text{g/ml}$). Zanimljivo je naglasiti da je najveći antiproliferativni efekat prema ćelijskoj liniji MCF7, pokazao ekstrakt tropa kultivisane sorte Čačanska bestrna, kod koje je utvrđen najmanji sadržaj polifenolnih jedinjenja i najslabija aktivnost prema DPPH i ABTS radikalima. Međusobnim poređenjem antiproliferativnog efekta

ispitivanih uzoraka, utvrđeno je da su snažniji inhibitorni efekat imali ekstrakti tropa u odnosu na ekstrakte ploda i soka kupine. Utvrđena je srednje jaka korelacija između sadržaja ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida, ukupnih flavonola, sinapinske kiseline i vrijednosti $1/IC_{50}^{HeLa}$, sa statistički značajnom razlikom ($p \leq 0,01$). Jaka korelacija je utvrđena između vrijednosti $1/IC_{50}^{MFC7}$ i sadržaja galne kiseline ($r = 0,868$) sa statistički značajnom razlikom ($p \leq 0,01$). Takođe, jaka korelacija je utvrđena između vrijednosti $1/IC_{50}^{HT29}$ i sadržaja ukupnih fenola ($r = 0,815$), te srednje jaka korelacija između sadržaja ukupnih flavonoida, epikatehina, katehina, elaginske kiseline, siringske kiseline i sinapinske kiseline sa statistički značajnom razlikom ($p \leq 0,01$). Srednje jake korelacije su utvrđene između sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i siringske kiseline i vrijednosti $1/IC_{50}^{MRC5}$, kao i srednje jake korelacije između sadržaja elaginske kiseline, sa statistički značajnom razlikom ($p \leq 0,05$). Ostale vrijednosti korelacija koje su utvrđene su slabe ili neznatene i bez statističkog značaja ($p > 0,05$).

Ekstrakti ploda i tropa ispitivanih sorti kupina su pokazali inhibitornu aktivnost prema rastu (G^-) soja bakterija *E. coli* i (G^+) soja *S. Aureus*. Najjači inhibitorni efekat prema rastu *E. coli* je pokazao ekstrakt divlje sorte kupine sa lokacije Javorani (9,55 mm), dok je prema rastu *S. Aureus* najjači inhibitorni efekat imao ekstrakt ploda divlje sorte sa lokacije Verići (8,35 mm). Uzorci soka nisu pokazali inhibitorno dejstvo prema navedenim sojevima u ispitivanoj koncentraciji (50 mg/ml). Svi ekstrakti kupine, kao i svi uzorci soka su pokazali inhibitorno dejstvo na rast micelija *Aspergillus niger*, za više od 25 % kod ispitivane koncentracije 2,5 mg/ml. Najjači inhibitorni efekat prema gljivici *Aspergillus niger* je pokazao ekstrakt tropa kultivisane sorte Chester Thornless, dok je kod uzoraka soka najjači inhibitorni efekat utvrđen kod uzorka divlje sorte sa lokacije Verići. Sposobnost inhibitornog djelovanja ekstrakata, kao i soka je izostao prema gljivici *Candida albicans* u ispitivanom intervalu koncentracija. Na osnovu rezultata može se zaključiti da su ekstrakti ploda imali snažniji inhibitorni efekat prema (G^-) soju *E. coli*, a ekstrakti tropa prema (G^+) soju *S. Aureus* i prema gljivici *Aspergillus niger*. Srednje jaka korelacija je utvrđena između inhibicije rasta sojeva *E. coli* i *S. Aureus* i sadržaja protokatehinske kiseline, vanilinske kiseline i cijanidin-3-ksilozida sa statistički značajnom razlikom ($p \leq 0,01$). Slaba korelacija i bez statističkog značaja ($p > 0,05$), je utvrđena između sadržaja protokatehinske kiseline, vanilinske kiseline i cijanidin-3-ksilozida i sposobnosti inhibicije rasta gljivice *A. niger*. Izostanak korelacija između sadržaja polifenolnih jedinjenja i antifugalne aktivnosti ukazuje da su druge komponente (nefenolna jedinjenja) ili sinergizam prisutnih polifenolnih jedinjenja u ekstraktima i matičnom soku imali značajan uticaj na antifungalnu aktivnost.

U ekstraktima tropa je određen veći sadržaj polifenolnih jedinjenja u odnosu na uzorke ploda i značajno veći u odnosu na sok kupine, s tim da ne treba zanemariti veći prinos ekstrakata

iz uzoraka ploda, u odnosu na uzorke tropa. Biološki potencijali uzoraka divljih sorti je snažniji za razliku od potencijala utvrđenog kod uzoraka kultivisanih sorti. Razlike između biološkog potencijala ekstrakata ploda i tropa kupine, i soka kupine, prikazanih u radovima drugih autora mogu se pripisati različitim sortama kupine, sastavu zemljišta, klimatskim uslovima, kao i načinu prikupljanja i skladištenja plodova. Takođe, veliki uticaj na razlike u rezultatima koje nalazimo u literaturi je to što su korištene različite metode ekstrakcije, koncentracije uzoraka i rastvarača, te način prezentovanja rezultata.

Rezultati ove disertacije ukazuju na neke od mogućnosti korišćenja ekstrakata ploda, a naročito tropa kultivisane i divlje kupine, s obzirom na prikazani bogati polifenolni sastav i utvrđenu biološku (antioksidativna, antihiperглиkemijska i antiroliferativna) aktivnost. Dobijeni ekstrakti mogli bi se koristiti kao potencijalni dodatak proizvodima u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, čime bi se osim poboljšanog zdravstvenog kvaliteta, produžio rok trajanja i izgled namirnica. Iskorištenjem tropa kao sirovine, umanjila bi se količina čvrstog biootpada koji predstavlja sve veći ekološki problem i stvara dodatne troškove u prehrambenoj industriji. Takođe, dobijeni ekstrakti kupine su odlična zdravstveno benefitna zamjena za sintetičke aditive, sa dokazanim antimikrobnim djelovanjem.

6. LITERATURA

- Abidov, M., Ramazanov, A., Jimenez, D. R. M., & Chkhikvishvili, I. (2006). Effect of Blueberin on fasting glucose, C-reactive protein and plasma aminotransferases, in female volunteers with diabetes type 2: double-blind, placebo controlled clinical study. *Georgian Medical News*, 141, 66-72.
- Adisakwattana, S., Chantarasinlapin, P., Thammarat, H., & YibchokAnun S. (2009). A series of cinnamic acid derivatives and their inhibitory activity on intestinal α -glucosidase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24(5), 1194–200.
- Alov, P., Tsakovska, I., & Pajeva, I. (2015). Computational studies of free radical-scavenging properties of phenolic compounds. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15(2), 85-104.
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D., & Lightfoot, D. (2017). Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*, 6(4), 42.
- Alzahrani, H. R., Kumakli, H., Ampiah, E., Mehari, T., Thornton, A. J., Babyak, C. M., & Fakayode, S. O. (2017). Determination of macro, essential trace elements, toxic heavy metal concentrations, crude oil extracts and ash composition from Saudi Arabian fruits and vegetables having medicinal values. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(7), 906–913.
- American Diabetes Association, (2014). Standards of Medical Care in Diabetesd, S14-S80. *Diabetes Care*, 37, 1.
- Amidžić Klarić, D., Klarić, I., & Mornar, A. (2011). Polyphenol content and antioxidant activity of commercial blackberry wines from Croatia: Application of multivariate analysis for geographic origin differentiation. *Journal of Food and Nutrition Research*, 4(50), 199–209.
- Amić, D., Davidović-Amić, D., Beslo, D., Rastija, V., Lucić, B., & Trinajstić, N. (2007). SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14(7), 827-45.
- Ansari, A. M., Amiya, A., Zeeshan, F., & Saif, H. (2013). Natural Phenolic Compounds: A Potential Antifungal Agent. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education (A. Méndez-Vilas, Ed.), 1189-1195.

- Anwar, F., & Przybylski, R., 2012. Effect of solvents extraction on total phenolics and antioxidant activity of extracts from flaxseed (*Linum usitatissimum L.*). *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 11(3), 293-301.
- AOAC 1990. Vitamin C (ascorbic acid) in vitamin preparations and juices. In Helrich, K. (ed.). *Official Methods of Analysis*. 15th edn. AOAC, Inc., Arlington, VA, 1058 p.
- A.O.A.C. (2000). *Official methods of analysis of AOAC international* (17th ed.). Gaithersburg, MD: AOAC International.
- Araújo, J. R., Gonçalves, P., & Martel, F. (2011). Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research*, 31(2), 77–87.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436.
- Baby, B., Antony, P., & Vijayan, R. (2017). Antioxidant and anticancer properties of berries. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–17.
- Bahadoran, Z., Mirmiran, P., & Azizi, F. (2013). Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 2(1), 43.
- Bakkalbasi, E., Menten, O., & Artik, N. (2009). Food ellagitannins – occurrence, effects of processing and storage. *Food Science and Nutrition*, 49(3), 283–298.
- 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.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79.
- Bangladesm, M. H., Moghal, M.R., Sarwar, S., Anonna, S. N., Akter, M., Karmakar, P., Ahmed, S., Sattar, M. A., & Islam, M. S. (2016). Low serum selenium concentration is associated with preeclampsia in pregnant women. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 33, 21–25.
- Barcia, M. T., Jacques, A. C., Pertuzatti, P. B., & Zambiasi, R. C. (2010). "Determination of Ascorbic Acid and Tocopherols in Fruits by HPLC" *Semina: Ciências Agrárias*, 31(2), 381-390.

- Barth, S. W., Fähndrich, C., Bub, A., Dietrich, H., Watzl, B., Will, F., Briviba, K., & Rechkemmer, G. (2005). Cloudy apple juice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats. *Carcinogenesis*, 26(8), 1414–1421.
- Basu, P., & Maier, C. (2016). *In vitro* Antioxidant Activities and Polyphenol Contents of Seven Commercially Available Fruits, *Pharmacognosy Research*, 8, 258-264.
- Bhosale, U. P., & Hallale, B. V. (2011). Gamma Radiation Induced Mutations in Black gram (*Vigna mungo (L.) Hepper*). *Asian Journal of Plant Science and Research*, 1(2), 96-100.
- Bilyk, A., & Sapers, G. M. (1986). Varietal differences in the quercetin, kaempferol, and myricetin contents of highbush blueberry, cranberry, and thornless blackberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24(4), 585–588.
- 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, 929–936.
- Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Benmansour, D., Khaled, M. B., Bouterfas, M., & Latreche, A. (2014). Optimization of extraction conditions of some phenolic compounds from white horehound (*Marrubium vulgare L.*) leaves. *International Journal of Organic Chemistry*, 4, 292-308.
- Bobinaite, 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.
- Brigelius-Flohe, R., & Traber, M. G. (1999). Vitamin E: function and metabolism, *The FASEB Journal*, 13(10), 1145-55.
- Blagojević, R., & Božić, R. (2012). Tehnologija proizvodnje kupine. Kancelarija za program podršku u privatnom sektoru za podršku sektoru voćarstva i bobičastog voća u Južnoj Srbiji, Niš.
- Braidwood, L., Breuer, C., & Sugimoto, K. (2013). "My body is a cage: mechanisms and modulation of plant cell growth". *New Phytologist*, 201(2), 388–402.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333.
- Bray, M. M., Rom, C. R., & Clark, J. R. (2003). Propagation of thornless Arkansas blackberries by hardwood cuttings. *Discovery (University of Arkansas)*, 4(1), 9-13.

- Brouillet, L. (2015). "Rosaceae Jussieu (subfam. Rosoideae) tribe Rubeae Dumortier, Anal. Fam. Pl. 39. 1829", Flora of North America North of Mexico, Magnoliophyta: Picramniaceae to Rosaceae, New York, Oxford: Oxford University Press, 9, 27-28.
- Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., & Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 13(10), 620–630.
- Brul, S., & Klis, FM. (1999). Mechanistic and Mathematical inactivation studies of food spoilage fungi. *Fungal genetics and biology*, Orlando, 27, 199-208.
- Buchert, J., Koponen, J. M., Suutarinen, M., Mustranta, A., Lille, M., Törrönen, R., & Poutanen, K. (2005). Effect of enzyme-aided pressing on anthocyanin yield and profiles in bilberry and blackcurrant juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(15), 2548–2556.
- Bushman, B. S., Phillips, B., Isbell, T., Ou, B., Crane, J. M., & Knapp, S. J. (2004). Chemical Composition of Caneberry (*Rubus spp.*) Seeds and Oils and Their Antioxidant Potential. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7982–7987.
- Cantero, G., Campanella, C., Mateos, S., & Cortes, F. (2006). Topoisomerase II inhibition and high yield of endoreduplication induced by the flavonoids luteolin and quercetin. *Mutagenesis*, 21, 321–325.
- Caridi, D., Trenerry, V. C., Rochfort, S., Duong, S., Laughler D., & Jones R. (2007). Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 105(2), 691–699.
- Carratù, B., & Sanzini, E. (2005). Biologically-active phytochemicals in vegetable food. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 41(1), 7-16.
- Carter, P., Gray, L. J., Troughton, J., Khunti, K., & Davies, M. J. (2010). Fruit and vegetable intake and incidence of type 2 diabetes mellitus: Systematic review and meta analysis. *British Medical Journal*, 341, c4229-c4233.
- Castillo-Reyes, F., Hernández-Castillo, F. D., Gallegos-Morales, G., Flores-Olivas, A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2015). Efectividad in vitro de Bacillus y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia-Solani*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(3), 549-562.

- Cervellati, R., Renzulli, C., Guerra, M. C., & Speroni, E. (2002). Evaluation of Antioxidant Activity of Some Natural Polyphenolic Compounds Using the Briggs–Rauscher Reaction Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(26), 7504–7509.
- Chan, H.-H., Sun, H.-D., Reddy, M. V. B., & Wu, T.-S. (2010). Potent α -glucosidase inhibitors from the roots of *Panax japonicus* C. A. Meyer var. *major*. *Phytochemistry*, 71(11-12), 1360–1364.
- Charlotte, L., Deuel, P., & Anne, P. (2005). Strawberries and Raspberries. In: Barrett, M. D., Somogyi, L., Ramaswamy, H. (Eds.): *Processing Fruits – Science and Technology*, Second Edition. CRC Press LLC, Boca Raton, 531-562.
- Chinnam, N., Dadi, P. K., Sabri, S. A., Ahmad, M., Kabir, M. A., & Ahmad, Z. (2010). Dietary bioflavonoids inhibit *Escherichia coli* ATP synthase in a differential manner. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(5), 478-486.
- Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., & Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Trapeolum tuberosum* Ruiz and Pavon) tubers. *Separation and Purification Technology*, 55, 217-225.
- Cho, M.J., Howard, L. R., Prior, R. L., & Clark, J. R. (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(13), 1771–1782.
- Christenhusz, M., & Byng J. W. (2016). The number of known plant species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261(3), 201-217.
- Cisowska, A., Wojnicz, D., & Hendrich, A. (2011). Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin. *Natural product communications*, 6(1), 149–56.
- Clark, J. R., Stafne, E. T., Hall, H. K., & Finn, C. E. (2007). Blackberry breeding and Genetics. In: J. Janick (ed.). *Plant breeding reviews*. John Wiley and Sons Inc., New York, 19-53.
- Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., & Mattei, J. (2018). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition*, 5(87).
- Corrales, M. Toepfl, S. Butz, P. Knorr, D., & Tauscher, B. (2008). “Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: a comparison,” *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(1), 85–91.

- Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V., & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro “proof-of-concept.” *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3), 290–302.
- Costa, I., Massard, G., & Agarwal, A. (2010). Waste management policies for industrial symbiosis development: case studies in European countries. *Journal of Cleaner Production*, 18(8), 815-822.
- Costa, A. G. V., Garcia-Diaz, D. F., Jimenez, P., & Silva, P. I. (2013). Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-black berries. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 539-549.
- Cui, Y., Oh, Y. J., Lim, J., Youn, M., Lee, I., Pak, H. K., Parke, W. J., & Park, S. (2012). AFM study of the differential inhibitory effects of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Food Microbiology*, 29(1), 80–87.
- Cushnie, T., & Lamb, A. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38, 99–107.
- Čakar, U., Grozdanić, N., Pejin, B., Vasić, V., Čakar, M., Petrović, A., & Đorđević, B. (2018). Impact of vinification procedure on fruit wine inhibitory activity against α -glucosidase. *Food Bioscience*, 25, 1-7.
- Četojević-Simin, D. D., Velićanski, A. S., Cvetković, D. D., Markov, S. L., Četković, G. S., Tumbas Šaponjac, V. T., Vulić, J. J., Čanadanović-Brunet, J. M., & Djilas, S. M. (2015). Bioactivity of Meeker and Willamette raspberry (*Rubus idaeus* L.) pomace extracts. *Food Chemistry*, 166, 407–413.
- Četojević-Simin, D., Ranitović, A., Cvetković, D., Markov, S., Vinčić, M., & Djilas, S. (2017). Bioactivity of blackberry (*Rubus fruticosus* L.) pomace: Polyphenol content, radical scavenging, antimicrobial and antitumor activity. *Acta periodica technologica*, 48, 63-76.
- Ćujić, N., Menković, N., Šavikin, K., Tasić, S., Zdunić, G., Janković, T., & Jovančević, M. (2011). Sadržaj polifenolnih jedinjenja u plodovima divlje maline, kupine i jagode sa područja Bjelasice, Crna Gora. *Lekovite sirovine*, 31, 39-46.
- Ćujić, N., Kundaković, T., & Šavikin, K. (2013). Antocijani – hemijska analiza i biološka aktivnost. *Lekovite sirovine*, 33(33), 19–37.

- Da Porto, C., Porretto, E., & Decorti D. (2013). "Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds," *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(4),1076–1080.
- Dacić, M., & Gojak-Salimović, S. (2016). The effect of chlorogenic acid on the Briggs-Rauscher oscillating reaction. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*, 46, 51 – 54.
- Dai, J., Patel, J., & Mumper, R. J. (2007). Characterization of blackberry extract and its antiproliferative and anti-inflammatory properties. *Journal of Medicinal Food*, 10 (2), 258–265.
- Dai, J., Gupte, A., Gates, L., & Mumper, R. J. (2009). A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 47(4), 837-847.
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- Das Sarma, A., Rahaman M., Anisur, K., & Ghosh, A. (2010). Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions, *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 1(3), 185-192.
- Dasgupta, A., & Klein, K. (2014). Methods for Measuring Oxidative Stress in the Laboratory, Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements. Prevention and Treatment of Disease, 1st Edition, San Diego (CA): Elsevier, 19–40.
- De la Rosa, L. A., Alvarez-Parrilla, E., & González-Aguilar, G. A. (2009). Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability. 1st Edition. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- De Marino, S., Festa, C., Zollo, F., Incollingo, F., Raimo, G., Evangelista, G., & Iorizzi, M. (2012). Antioxidant activity of phenolic and phenylethanoid glycosides from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*, 133(1), 21–28.
- De Sales, P. M., De Souza, P. M., Simeoni, L.A., De Oliveira, M. P., & Silveira, D. (2012). α -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 141–83.
- Delehanty, J. B., Johnson, B. J., Hickey, T. E., Pons, T., & Ligler, F.S. (2007). Binding and neutralization of lipopolysaccharides by plant proanthocyanidins. *Journal of Natural Products*, 70(11), 1718-1724.

- Dietrich, L. E. P., Price-Whelan, A., Petersen, A., Whiteley, M., & Newman, D. K. (2006). The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 61(5), 1308–1321.
- Di Meo, F., Lemaur, V., Cornil, J., Lazzaroni, R., Duroux, J.-L., Olivier, Y., & Trouillas, P. (2013). Free Radical Scavenging by Natural Polyphenols: Atom versus Electron Transfer. *Journal of Physical Chemistry A*, 117(10), 2082–2092.
- Drews, G., Krippeit-Drews, P., & Düfer, M. (2010). Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 460(4), 703–718.
- Dujmović-Purgar, D., Duralija, B., Voća, S., Vokurka, A., & Ercisli S. (2012). A Comparison of Fruit Chemical Characteristics of Two Wild Grown Rubus Species from Different Locations of Croatia. *Molecules*, 17, 10390-10398.
- Dorđević, V. B., Zvezdanovic, L., & Cosic, V. (2008). Oxidative stress in human diseases (Review). *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo*, 136(2), 158-165.
- Egan, H., Kirk R., & Sawyer, R. (1981). Pearson's chemical analysis of foods. 8th ed. London, U.K: Longman, Harlow.
- El Gharras, H., (2009). Original article Polyphenols: food sources, properties and applications– a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 44, 2512–2518.
- Ellidag, H. Y., Eren, E., Aydin, O., Akgol, E., Yalcinkaya, S., Sezer, C., & Yilmaz, N. (2013). Ischemia modified albumin levels and oxidative stress in patients with bladder cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(5), 2759-63.
- Englyst, H. N., Bingham, S. A. Runswick, S. A., Collinson, E., & Cummings, J. H. (2008). Dietary fibre (non-starch polysaccharides) in fruit, vegetables and nuts. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 1(4), 247 – 286.
- European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), (2000). Determination of minimum inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 6(9), 509-515.
- Fang, L., Wu, W. L., Zhao, H. F., Lv, L. F., & Li, W. L. (2011). Characteristics of Seed Oils from Four Blackberries Varieties (*Rubus L.*). *Applied Mechanics and Materials*, 140, 273–277.
- Fan-Chiang, H. J., & Wrolstad, R. E. (2005). Anthocyanin pigment composition of blackberries. *Journal of Food Science*, 70, C198–C202.

- Fan-Chiang, H., & Wrolstad, R. E. (2010). Sugar and nonvolatile acid composition of blackberries. *Journal of AOAC International*, 93(3), 956–965.
- Farr, J. E., & Giusti, M. M. (2018). Investigating the Interaction of Ascorbic Acid with Anthocyanins and Pyranoanthocyanins, *Molecules*, 23(4), 744.
- Farrukh, A., Gupta, A., Munagala, R., Jeyabalan, J., Kausar, H., Sharma, R. J., Singh, I. P., & Gupta, R.C. (2012). Antioxidant and Antiproliferative Activities of Anthocyanin/Ellagitannin-Enriched Extracts From *Syzygium cumini* L. (Jamun, the Indian Blackberry), *Nutrition and Cancer*, 64(3), 428-438.
- Feng, R., Bowman, L. L., Lu, Y., Leonard, S. S., Shi, X., Jiang, B. H., Castranova, V., Vallyathan, V., & Ding, M. (2004). Blackberry extracts inhibit activating protein 1 activation and cell transformation by perturbing the mitogenic signaling pathway. *Nutrition and Cancer*, 50(1), 80–89.
- Field, J. A., & Lettinga, G. (1992). Toxicity of Tannic Compounds to Microorganisms. *Plant Polyphenols*, 673–692.
- Floegel, A., Kim, D.-O., Chung, S.-J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043–1048.
- Folta, K. M., & Gardiner, S. E. (2008). *Genetics and Genomics of Rosaceae* (1. ed.). New York: Springer. (Vol. 6).
- Fox, J. (2015). *Applied Regression Analysis and Generalized Linear Models*, Sage Publications, New 5. Jersey.
- Frei, B. (1997). *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Vitamins*. Oregon State University: Linus Pauling Institute.
- Fukumoto, L. R., & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3597-3604.
- Gajdoš Kljusurić, J., Mihalev, K., Bečić, I., Polović, I., Georgieva M., Djaković, S., & Georgieva, M. (2016). Near-infrared spectroscopic analysis of total phenolic content and antioxidant activity of berry fruits. *Food Technology and Biotechnology*, 54(2), 236-242.
- Gancel, A.-L., Feneuil, A., Acosta, O., Pérez, A. M., & Vaillant, F. (2011). Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*). *Food Research International*, 44(7), 2243–2251.

- Garber, A. J. (2002). Attenuating CV risk factors in patients with diabetes: clinical evidence to clinical practice. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 4(s1), 5–12.
- Gawalek, J., Domian, E., Ryniecki, A., & Bakier, S. (2017). Effects of the spray drying conditions of chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) juice concentrate on the physicochemical properties of powders. *International Journal of Food Science and Technology*, 52, 1933–1941.
- Gil, M. I., Tomas-Barberan, F. A., Hess-Pierce, B., Hplcroft, D. M., & Kader A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4581–4589.
- Girones-Vilaplana, A., Baenas, N., Villano, D., Speisky, H., Garcia-Viguera, C., & Moreno, D. A. (2014). Evaluation of Latin American fruits rich in phytochemicals with biological effects. *Journal of Functional Foods*, 7, 599–608.
- González, O. A., Escamilla, C., Danaher, R. J., Dai, J., Ebersole, J. L., Mumper, R. J., & Miller, C. S. (2013). Antibacterial effects of blackberry extract target periodontopathogens. *Journal of Periodontal Research*, 48(1), 80-86.
- Gowd, V., Bao, T., Wang, L., Huang, Y., Chen, S., Zheng, X., Cui, S., Chen, W. (2018). Antioxidant and antidiabetic activity of blackberry after gastrointestinal digestion and human gut microbiota fermentation. *Food Chemistry*, 269, 618–627.
- Grabek-Lejko, D., & Wojtowicz, K., (2014). Comparison of antibacterial and antioxidant properties of fruits and leaves of blackberry (*Rubus plicatus*) and raspberry (*Rubus idaeus*). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 3(6), 514-518.
- Grace, M. H., Ribnicky, D. M., Kuhn, P., Pouley, A., Logendra, S., Yousef, G. G. , Raskin, I., & Lila, M. A. (2009). Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton. *Phytomedicine*. 16(5), 406–415.
- Grayer, R. J., & Kokubun, T. (2001). Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*, 56(3), 253-263.
- Guariguata, L., Whiting, D. R., Hambleton, I., Beagley, J., Linnenkamp, U., & Shaw, J. E. (2014). Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 103(2), 137–149.
- Guedes, M. N. S., Abreu, C. M. P., Maro, L. A. C., Pio, R., Abreu, J. R., & Oliveira, J. O. (2013). Chemical characterization and mineral levels in the fruits of blackberry cultivars grown in a tropical climate at an elevation. *Acta Scientiarum Agronomy*, 35(2), 191-196.

- Guisti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In: *Currents Protocols in Food Analytical Chemistry*, Wrolstad RE (ed.), John Wiley & Sons, New York, 1–13.
- Gutteridge, J. M. C. (1987). Ferrous-salt-promoted damage to deoxyribose and benzoate. The increased effectiveness of hydroxyl-radical scavengers in the presence of EDTA. *Biochemical Journal*, 243(3), 709-714.
- 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.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., & Aruoma, O. I. (1987). The deoxyribose method: A simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry*, 165(1), 215–219.
- Halliwell, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communications*, 9(1), 1-32.
- Halliwell, B., & Gutteridge, M.C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford University Press, Oxford, UK.
- Halliwell, B., & Rafter, J. (2005). Jenner, A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: Direct or indirect effects? Antioxidant or not? *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 268–276.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2), 312–322.
- Halliwell, B. (2012). *Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life* Department of Biochemistry, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore.
- Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. V., & Peralta, R. M. (2012). Phenolic compounds in fruits an overview. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 2023–2044.
- Hawkesford, M., Horst, W., Kichey, T., Lambers, H., Schjoerring, J., Møller, I. S., & White, P. (2002). Functions of Macronutrients. In: Marschner, P. (Ed.). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 135-189.

- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584.
- Herrera, C. L., Alvear, M., Barrientos, L., Montenegro, G., & Salazar, L. A. (2010). The antifungal effect of six commercial extracts of Chilean propolis on *Candida* spp. *Ciencia E Investigacion Agraria*, 37(1), 75–84.
- Hidalgo, G.-I., & Almajano, M. (2017). Red Fruits: Extraction of Antioxidants, Phenolic Content, and Radical Scavenging Determination: A Review. *Antioxidants*, 6(1), 7.
- Hijazi, A., Al Masri, D. S., Farhan, H., Nasser, M., Rammal, H., & Annan H. (2015). Effect of Different Ethanol Concentrations, Using Different Extraction Techniques, on the Antioxidant Capacity of Lebanese *Eryngium creticum*. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 3(2), 262-271.
- Horbowicz, M., Kosson, R., Grzesiuk, A., & Dębski, H. (2008). Anthocyanins of Fruits and Vegetables - Their Occurrence, Analysis and Role in Human Nutrition. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 68(1), 5-22.
- Hou, D. X., Kai, K., Li, J. J., Lin, S., Terahara, N., Wakamatsu, M., Fujii, M., Young, M. R., & Colburn, N. (2004). Anthocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: structure-activity relationship and molecular mechanisms. *Carcinogenesis*, 25(1), 29–36.
- Howard, L. R., & Hager, T. J. (2007). Berry fruit phytochemicals. In *Berry Fruit Value-Added Products for Health Promotion*, 1st ed.; Zhao, Y., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1, 73104.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Huang, W., Zhang, H., Liu, W., & Li, C. (2012). Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 13(2), 94–102.
- Huang, D., & Wong, I. C. (2013). Antioxidant Evaluation and Antioxidant Activity Mechanisms. *Lipid Oxidation*, 323–343.
- Hui, Y. H. (2006). *Handbook of Fruits and Fruit Processing*. Blackwell Publishing, Iowa, USA.

- Hummer, K. E., & Janick, J. (2009). Rosaceae: Taxonomy, economic importance, genomics. In: Folta KM, Gardiner SE, editors. *Genetics and Genomics of Rosaceae*. New York, USA: Springer. 1-17.
- Hwang, S. J., Yoon, W. B., Lee, O.-H., Cha, S. J., & Kim, J. D. (2014). Radical-scavenging-linked antioxidant activities of extracts from black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. *Food Chemistry*, 146, 71–77.
- Huyut, Z., Beydemir, S., & Gulcin, I. (2017). Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. *Biochemistry Research International*, 1–10.
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 1821-35.
- Iora, S. R. F., Maciel, G. M., Zielinski, A. A. F., da Silva, M. V., Pontes, P. V. de A., Haminiuk, C. W. I., & Granato, D. (2014). Evaluation of the bioactive compounds and the antioxidant capacity of grape pomace. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(1), 62–69.
- Isler, O., Brubacher, G., & Kiss J. (1988). Skorbut, vitamin C and bioflavonoide. In: ‘Vitamine II: Wasserlösliche Vitamine’. Isler O., Brubacher G., Ghisla S., Krautler B. (eds.), Thieme, Stuttgart, 390–395.
- Ivanović, J., Tadić, V., Dimitrijević, S., Stamenić, M., Petrović, S., & Zizović, I. (2014). Antioxidant properties of the anthocyanin-containing ultrasonic extract from blackberry cultivar “Čačanska Bestrna”. *Industrial Crops and Products*, 53, 274-281.
- IUPAC, Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford (1997).
- Jakobek, L., Šeruga, M., Novak, I., & Medvidović-Kosanović, M. (2007). Flavonols, Phenolic Acids and Antioxidant Activity of Some Red Fruits. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 103. Jahrgang, 8, 369-378.
- Jašić, M. (2007). Tehnologija voća i povrća I dio, Univerzitet u Tuzli, Tehnološki fakultet Tuzla, u saradnji sa konzorcijumom Tempus projekta UM_JEP 18084-2003.
- Jašić, M. (2010). Biološki aktivni sastojci hrane, Univerzitet u Tuzli, Tehnološki fakultet.
- Javanmardi, J. (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*, 83(4), 547–550.

- Jayaprakasam, B., Vareed, S.K., Olson, L.K., & Nair, M.G. (2005). Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 28–31.
- Kader, A. A., & Barrett, D. M. (2005). Classification, composition of fruits, and postharvest maintenance of quality. In: DM Barrett, PS Laszlo, HS Ramaswamy (eds) *Processing Fruits: Science and Technology*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, FL, 3–22.
- Kader, A. A. (2008). Flavor quality of fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(11), 1863–1868.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., & Heinonen, M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 4076–4082.
- Kay, C. D., Kroon, P. A., & Cassidy, A. (2009). The bioactivity of dietary anthocyanins is likely to be mediated by their degradation products. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(S1), S92–S101.
- Kajimoto, Y., & Kaneto, H. (2004). Role of Oxidative Stress in Pancreatic β -Cell Dysfunction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1011(1), 168–176.
- Kalušević, A., Salević, A., Đorđević, R., Veljović, M., & Nedović, V. (2016). Raspberry and blackberry pomaces as potential sources of bioactive compounds. *Ukrainian Food Journal*, 5(3), 485–492.
- Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., & Jaafar, H. Z. E. (2010) Evaluation of *Crocus sativus* L. Stigma Phenolic and Flavonoid Compounds and Its Antioxidant Activity. *Molecules*, 15, 6244–6256.
- Kasprzyk, A., Żbikowska, B., Sroka, Z., & Gamian, A. (2012). The antiradical activity of some plant raw materials and extracts obtained from these raw materials. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 66, 146–152.
- Katalinić, V. (2006). *Kemija mediteranskog voća i tehnologija prerade*. Kemijsko-tehnološki fakultet, Split.
- Kaume, L., Howard, L. R., & Devareddy, L. (2011). The Blackberry Fruit: A Review on Its Composition and Chemistry, Metabolism and Bioavailability, and Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 5716–5727.
- Kaume, L., Howard, L. R., & Devareddy, L. (2012). The Blackberry Fruit: A Review on Its Composition and Chemistry, Metabolism and Bioavailability, and Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 5716–5727.

- Keating, E., & Martel, F. (2018). Antimetabolic Effects of Polyphenols in Breast Cancer Cells: Focus on Glucose Uptake and Metabolism. *Frontiers in Nutrition*, 5.
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422.
- Kim, M. J., Perkins-Veazie, P., Ma, G., & Fernandez, G. (2015). Shelf life and changes in phenolic compounds of organically grown blackberries during refrigerated storage. *Postharvest Biology and Technology*, 110, 257–263.
- Klein, R. A., Ratliff, K. A., Vianello, M., Adams, R. B., Jr., Bahník, Š., Bernstein, M. J., & Nosek, B. A. (2014). Investigating variation in replicability: A “many labs” replication project. *Social Psychology*, 45(3), 142-152.
- Koca, I., & Karadeniz, B. (2009). Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey, *Scientia Horticulturae*, 121(4), 447-450.
- Koczka, N., Stefanovits-Bányai, É., & Prokaj, E. (2018). Element Composition, Total Phenolics and Antioxidant Activity of Wild and Cultivated Blackberry (*Rubus fruticosus* L.) Fruits and Leaves during the Harvest Time. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(2), 538.
- Kopjar, M., Jakšić, K., & Piližota, V. (2012). Influence of sugars and chlorogenic acid addition on anthocyanin content, antioxidant activity and color of Blackberry juice during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36(6), 545–552.
- Koponen, J. M., Happonen, A. M., Auriola, S., Kontkanen, H., Buchert, J., Poutanen, K. S., & Törrönen, A. R. (2008). Characterization and Fate of Black Currant and Bilberry Flavonols in Enzyme-Aided Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3136–3144.
- Kornilowicz-Kowalska, T., Kitowski, I., & Iglík, H. (2011). Geophilic dermatophytes and other keratinophilic fungi in the nests of wetland birds. *Acta Mycologica*, 46, 83–107.
- Krewer, G., Fonseca, M., Brannen, P., & Horton, D. (2004). Home Garden: Raspberries, Blackberries Cooperative Extension Service/The University of Georgia College of Agricultural and Environmental Sciences.
- 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.

- Krishnamurthy, P., & Wadhvani, A. (2012). Antioxidant Enzymes and Human Health. Antioxidant Enzyme.
- Krstić, T., (2018). Antimikrobno dejstvo ceđenih sokova i ekstrakata plodova odabranog voća porodice *Rosaceae*. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu: Medicinski fakultet.
- Kumar, S., & Pandey, A. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 162750.
- Kumar, S., Grefenstette, J. J., Galloway, D., Albert, S. M., & Burke, D. S. (2014). Kumar et al. Respond. *American Journal of Public Health*, 104(1), e1–e2.
- Kuntz, S., Wenzel, U., & Daniel, H. (1999). Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European Journal of Nutrition*, 38(3), 133–142.
- Kwon, Y.I., Jang, H.D., & Shetty, K. (2006). Evaluation of *Rhodiola crenulata* and *Rhodiola rosea* for management of type II diabetes and hypertension. *Asian Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 15(3), 425–432.
- Laroze, L. E., Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Zúñiga, M. E., & Domínguez, H. (2010). Extraction of antioxidants from several berries pressing wastes using conventional and supercritical solvents. *European Food Research and Technology*, 231(5), 669–677.
- Lattanzio, V., Di Venere, D., Linsalata, V., Bertolini, P., Ippolito, A., & Salerno, M. (2001). Low temperature metabolism of apple phenolics and quiescence of *Phlyctaena vagabunda*. *Journal of Agricultural of Food Chemistry*, 49, 5817–5821.
- Lee, J., Dossett, M., & Finn, C. E. (2012). Rubus fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing. *Food Chemistry*, 130(4), 785–796.
- Lee, J. (2017). Blackberry fruit quality components, composition, and potential health benefits. In book: *Blackberries and Their Hybrids*, Chapter: 4, Publisher: CABI, Editors: Harvey Hall, Richard Funt, 49–62.
- Lekshmi, L., Anithalekshmi, Abraham, L., Mohana, M. N., Neema, A., Nikhila, M. N., Rinu, V., & Shajan, A. (2015). Oral candidiasis - Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Nano Sciences*, 4(6), 409 - 417.
- Limberaki, E., Eleftheriou, P., Vagdatli, E., Kostoglou, V., & Petrou, C. (2012). Serum antioxidant status among young, middle-aged and elderly people before and after antioxidant rich diet. *Hippokratia*, 16(2), 118–123.

- Lin, B.-W., Gong, C.-C., Song, H.-F., & Cui, Y.-Y. (2016). Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1226–1243.
- Lipińska, L., Klewicka, E., & Sójka, M. (2014). The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 13(3), 289–99.
- Liu, J. K., Hu, L., Dong, Z. J., & Hu, Q. (2004). DPPH Radical Scavenging Activity of Ten Natural p-Terphenyl Derivatives Obtained from Three Edible Mushrooms Indigenous to China. *Chemistry & biodiversity*, 1(4), 601-605.
- Liu, R. H. (2013). Dietary bioactive compounds and their health implications. *Journal of Food Science*, 78(S1), A18–25.
- Liu, X., Zhao, M., Wang, J., Yang, B., & Jiang, Y. (2008). Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica L.*) from six regions in China, *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(3), 219-228.
- Liyana-Pathiranan, C. M., & Shahidi, F. (2005). Antioxidant Activity of Commercial Soft and Hard Wheat (*Triticum aestivum L.*) as Affected by Gastric pH Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2433-2440.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacological Reviews*, 4(8), 118–126.
- López, M., Martínez, F., Del Valle, C., Orte, C., & Miró, M. (2001). Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 922: 359-363.
- Losso, J. N., Shahidi, F., & Bagchi, D. (2007). Anti-angiogenic functional and medicinal foods. London: CRC Press.
- Magaldi, S., Mata-Essayag, S., Hartung de Capriles, C., Perez, C., Colella, M., Olaizola, C., & Ontiveros, Y. (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases*, 8(1), 39–45.
- Malavolta, E., Gomes, F.P., & Alcarde, J.C. (2002). Adubos e Adubações. São Paulo: Nobel, 200p.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 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.
- Mandalari, G., Bennett, R. N., Bisignano, G., Trombetta, D., Saija, A., Faulds, C. B., Gasson, M. J., & Narbad, A. (2007). Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2056–2064.
- Manríquez-Torres, J., Sánchez-Franco, J., Ramírez-Moreno, E., Cruz-Cansino, N., Ariza-Ortega, J., & Torres-Valencia, J. (2016). Effect of Thermoultrasound on the Antioxidant Compounds and Fatty Acid Profile of Blackberry (*Rubus fruticosus* spp.) Juice. *Molecules*, 21(12), 1624.
- Manson, M. M. (2003). Cancer prevention – the potential for diet to modulate molecular signalling. *Trends in Molecular Medicine*, 9(1), 11–18.
- Marchesi, J. R., Adams, D. H., Fava, F., Hermes, G. D. A., Hirschfield, G. M., Hold, G., Quraishi, M. N., Kinross, J., Smidt, H., Tuohy, K. M., Thomas, L.V., Zoetendal, E. G., & Hart, A. (2015). The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*, 65(2), 330–339.
- Marjanović-Balaban, Ž., Grujić, S., Jašić, M., & Vujadinović, D. (2012). Testing of chemical composition of wild berries. Third International Scientific Symposium "Agrosym Jahorina 2012", Sarajevo, BiH, 154-160.
- Marković, M., Martinović Bevanda, A., & Talić, S. (2015). Antioxidant activity and total phenol content of white wine Žilavka. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*, 44, 1-4.
- Marwah, R. G., Fatope, M. O., Deadman, M. L., Ochei, J. E., & Al-Saidi, S. H. (2007). Antimicrobial activity and the major components of the essential oil of *Plectranthus cylindraceus*. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), 1220–1226.
- Masibo, M., & He, Q. (2008). Major Mango Polyphenols and Their Potential Significance to Human Health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(4), 309–319.
- Matos, C., Moutinho, C., Balcão, V., Almeida, C., Ribeiro, M., Marques, A. F., & Guerra A. (2009). Total antioxidant activity and trace elements in human milk: the first 4 months of breast-feeding. *European Food Research Technology*, 230(2), 201-208.

- Maynard, J. A., Johnson, J. E., Marshall, P. A., Eakin, C. M., Goby, G., Schuttenberg, H., & Spillma, C. M. (2009). A strategic framework for responding to coral bleaching events in a changing climate. *Environmental Management*, 44(1), 1-11.
- Medeiros, R. T. S., Gonçalez, E., & Feliciom, R. C. (2011). Evaluation of antifungal activity of *Pittosporum undulatum* L. Essential oil against *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(1), 71-76.
- Mellado, M., Soto, M., Madrid, A., Montenegro, I., Jara-Gutiérrez, C., Villena, J., Werner, E., Godoy, P., & Aguilar, L. F. (2019). *In vitro* antioxidant and antiproliferative effect of the extracts of *Ephedra chilensis* K Presl aerial parts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 53.
- Mene-Saffrane, L., & DellaPenna, D. (2010). Biosynthesis, regulation and functions of tocochromanols in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(5), 301–309.
- Micić, D. (2016). Hemijska i termalna analiza semena jagodastog voća, Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd.
- Middleton E. Jr., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacological Reviews*, 52(4), 673-751.
- Milackova, I., Kovacicova, L., Veverka, M., Gallovic, J., & Stefek, M. (2013). Screening for antiradical efficiency of 21 semisynthetic derivatives of quercetin in a DPPH assay. *Interdisciplinary Toxicology*, 6(1), 13-17.
- Milenković-Anđelković, A., Radovanović, B., Anđelković, M., Radovanović, A., Nikolić, V., & Randelović, V. (2015). The anthocyanin content and bioactivity of cornelian cherry (*Cornus mas*) and wild blackberry (*Rubus fruticosus*): Fruit extracts from the Vlasina region. *Advanced technologies*, 4(2), 26-31.
- Milenković-Anđelković, A. (2016). Ekstrakcija, karakterizacija, biološka aktivnost i potencijalna primena fenolnih jedinjenja iz plodova i lišća biljnih vrsta familija Rosaceae, Cornaceae i Grossulariaceae. Doktorska disertacija. Univerzitet u Nišu, Prirodno-Matematički Fakultet.
- Milić, Lj. B., Đilas, M. S., Čanadanović-Brunet, M. J., & Sakač, B. M. (2000). Biljni polifenoli. Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Milivojević, J., Nikolić, M., Bogdanović-Pristov, J. (2010) Fizičko-hemijska i antioksidativna svojstva sorti i samoniklih vrsta rodova *Fragaria* i *Rubus*. *Voćarstvo*, 44(169-170), 55-64.

- Milivojević J., Maksimović V., Nikolić M., Bogdanović J., Maletić R., & Milatović D. (2011). Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild *Fragaria* and *Rubus* berries. *Journal of Food Quality*, 34(1), 1–9.
- Miljković, I. (2005). Sorte kupina. *Glasnik zaštite bilja* 4. Zagreb. 45 – 49.
- Minussi, R.C., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G. M., & Durán N. (2003). Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chemistry*, 82(3), 409-416.
- Mišić, P. (1989). Nove sorte voćaka. Nolit, Beograd.
- Mišić, P. D., Nikolić, M. D. (2003). Jagodaste voćke. Beograd: Institut za istraživanja u poljoprivredi 'Srbija'.
- Mladenović, K. (2014). Specijski diverzitet fitofagnih i predatorskih grinja samoniklih vrsta voćaka u šumskim ekosistemima Srbije. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu. Poljoprivredni fakultet.
- Mocan, A., Zengin, G., Simirgiotis, M., Schafberg, M., Mollica, A., Vodnar, D. C., Crişan, G., & Rohn, S. (2017). Functional constituents of wild and cultivated Goji (*L. barbarum* L.) leaves: phytochemical characterization, biological profile, and computational studies. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 153–168.
- Monforte, M. T., Smeriglio, A., Germanò, M. P., Pergolizzi, S., Circosta, C., & Galati, E. M. (2018). Evaluation of antioxidant, antiinflammatory, and gastroprotective properties of *Rubus fruticosus* L. fruit juice. *Phytotherapy Research*, 32(7), 1404–1414.
- Montgomery, D. C., Peck, E. A., & Vining, G. G. (2012). Introduction to Linear Regression Analysis, 5-th Edition, Wiley, 672.
- Mratinić, E. (2015). Kupina, Partenon, Beograd.
- Mullen, W., Yokota, T., Lean, M. E., & Crozier, A. (2003). Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC–MS n. *Phytochemistry*, 64(2), 617-624.
- Murphy, K. J., Chronopoulos, A. K., Singh, I., Francis, M. A., Moriarty, H., Pike, M. J., Turner, A. H, Mann, N. J., & Sinclair, A. J. (2003). Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(6), 1466–1473.

- Mutavdžić, B., & Nikolić-Đorić, E. (2018). Statistika. Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu.
- Nađpal, J. (2017). Fitohemijski skrining i biološka aktivnost ekstrakata i tradicionalnih proizvoda od plodova divljih ruža (*Rosa L.; Rosaceae*). Doktorska disertacija. Novi Sad: Tehnološki fakultet.
- Naidu, M. M., Sulochanamma, G., Sampathu, S. R., & Srinivas, P. (2008). Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. *Food Chemistry*, 107(1), 377–384.
- 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.
- National Nutrient Database for Standard Reference. (2016). United States Department of Agriculture (USDA), <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-74.
- Netzel, M., Strass, G., Kaul, C., Bitsch, I., Dietrich, H., & Bitsch, R. (2002). In vivo antioxidative capacity of a composite berry juice. *Food Research International*, 35(2), 213-216.
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593-656.
- Niketić-Aleksić, G. (1988). Tehnologija voća i povrća. RO „Naučna knjiga“ Beograd, Beograd.
- Nikolić M., Milivojević J. (2010): Jagodaste voćke, Tehnologija gajenja. Naučno voćarsko društvo Srbije, Čačak: 1-592.
- Nikolić, T. (2013). Praktikum sistematske botanike - raznolikost i evolucija biljnog svijeta. Alfa d.d., Zagreb, 1-256.
- Nilsson, J., Pillai, D., Önning, G., Persson, C., Nilsson, Å., & Åkesson, B. (2005). Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzotiazole-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 239-246.
- 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.

- Nour, V., Trandafir, I., & Ionica, M. E. (2011). Ascorbic acid, anthocyanins, organic acids and mineral content of some black and red currant cultivars. *Fruits*, 66(5), 353-362.
- Oancea, S., & Calin, F. (2016). Changes in Total Phenolics and Anthocyanins during Blackberry, Raspberry and Cherry Jam Processing and Storage. *Romanian Biotechnological Letters*, 21(1), 11232 – 11237.
- Oliveira, B. D. A., Rodrigues, A. C., Cardoso, B. M. I., Ramos, A. L. C. C., Bertoldi, M.C., Taylor, J. G., Cunha, L. R., & Pinto, U. M. (2016). Antioxidant, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of *Rubus rosaefolius* phenolic extract. *Industrial Crops and Products*, 84, 59–66.
- Oomah, D., & Mazza, G. (2000). Bioactive components of flaxseed: Occurrence and health benefits. In: *Phytochemicals and Phytopharmaceuticals*, Eds. Shahidi F., Ho C.-T., AOCS Press USA, 106 – 121.
- Opitz, S.E. W., Smrke, S., Goodman, B. A., & Yeretjian, C. (2014). Methodology for the Measurement of Antioxidant Capacity of Coffee. *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*, 253–264.
- Ortez, J. H. (2005). Disc diffusion testing. In: *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. Coyle, M. B., ed. Washington, DC: *American Society for Microbiology*, 39.
- Oszmianski, J., Nowicka, P., Teleszko, M., Wojdyło, A., Cebulak, T., & Oklejewicz, K. (2015). Analysis of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Wild Blackberry Fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 14540-14553.
- Overall, J., Bonney, S.A., Wilson, M., Beermann, A., Grace, M. H., Esposito, D., Lila, M. A., & Komarnytsky, S. (2017). Metabolic effects of berries with structurally diverse anthocyanins. *International Journal of Molecular Science*, 18(2), 422.
- Ozyurek, M., Bektasoglu, B., Guclu, K., & Apak, R. (2008). Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method using catalase for hydrogen peroxide degradation. *Analytica Chimica Acta*, 616(2), 196-206.
- Pala, F. S., & Tabakçioğlu, K. (2007). Free radicals: Our enemies or friends? *Advances in Molecular Biology*, Trakya University, Faculty of Medicine, 1, 63-69.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5(e47), 1-15.

- 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, Gr. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*, 102(3), 777 - 783.
- Papuc, C., Goran, G. V., Corina, D., Nicorescu, V., & Stefan, G. (2017). Plant Polyphenols as Antioxidant and Antibacterial Agents for Shelf-Life Extension of Meat and Meat Products: Classification, Structures, Sources, and Action Mechanisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(6), 1243–1268.
- Parmar, I., & Rupasinghe, H. V. (2015). Antioxidant Capacity and Anti-diabetic Activity of Wild Berry Stem Infusions. *European Journal of Medicinal Plants*, 8(1), 11-28.
- Parry, J., & Yu, L. (2004). Fatty acid content and antioxidant properties of cold-pressed black raspberry seed oil and meal. *Journal of Food Science*, 69(3), FCT189-FCT193.
- Paur, I., Austenaa, L. M., & Blomhoff, R. (2008). Extracts of dietary plants are efficient modulators of nuclear factor kappa B. *Food and Chemical Toxicology*, 46(4), 1288-1297.
- Pejić, N. D., Anić, S. R., & Kolar-Anić, Lj. (2012). Analitičke primene oscilatornih hemijskih reakcija: određivanje nekih farmaceutskih i biološki važnih jedinjenja. *Hemijska industrija*, 66(2), 153-164.
- Pérez, M. B., Calderón, N. L., & Croci, C. A. (2007). Radiation-Induced Enhancement of Antioxidant Activity in Extracts of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Chemistry*, 104(2), 585-592.
- Pereira, R. P., Fachinetto, R., de Souza Prestes, A., Puntel, R. L., Santos da Silva, G. N., Heinzmann, B. M., Boschetti, T. K., Athayde, M. L., Bürger, M. E., Morel A. F., Morsch, V. M., & Rocha, J. B. T. (2008). Antioxidant Effects of Different Extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochemical Research*, 34(5), 973–983.
- Perkins, P., Ma, G., & Fernandez, E. G. (2012). Carotenoid Content of Raspberry and Blackberry Fruit, Poster Board Conference: ASHS Annual Conference.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2014). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26.

- Piasek, A., Bartoszek, A., & Namieśnik, J. (2009). Phytochemicals that counteract the cardiotoxic side effects of cancer chemotherapy. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 63, 142-158.
- Podsędek, A., Majewska, I., Redzyna, M., Sosnowska, D., & Koziółkiewicz, M. (2014). In vitro inhibitory effect on digestive enzymes and antioxidant potential of commonly consumed fruits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 62(20), 4610-4617.
- Pojer, E., Mattivi, F., Johnson, D., & Stockley, C.S. (2013) The case for anthocyanin consumption to promote human health: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(5), 483–508.
- Prakash, A., (2001). Antioxidant activity. *Medallion Laboratories Analytical Progress*, 19(2), 1–6.
- Pravilnik o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama ("Sl. list SRJ", br. 5/92, 11/92 i 32/2002).
- Prenci, E., Toso, S., & Berto, S. (2005). Redox chemistry of red wine. Quantification by an oscillating reaction of the overall antioxidant power as a function of the temperature. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53(10), 4220–4227.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K., (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Prior, R. L., & Wu, X. (2006). Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research*, 40(10), 1014-1028.
- Proença, C., Freitas, M., Ribeiro, D., Oliveira, E. F. T., Sousa, J. L. C., Tomé, S. M., Ramos, M. J., Silva, A. M. S., Fernandes, P. A., & Fernandes, E. (2017). α -Glucosidase inhibition by flavonoids: an in vitro and in silico structure–activity relationship study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 1216–1228.
- Radovanović, B. C., Anđelković, S. M., Radovanović, A. B., & Anđelković, M. Z. (2013). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Polyphenol Extracts from Wild Berry Fruits Grown in Southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(5), 813-819.

- Ramalakshmi, K., Rao, L. J. M., Takano-Ishikawa, Y., & Goto, M. (2009). Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different in vitro model systems. *Food Chemistry*, 115(1), 79–85.
- Ramírez, J. A., Rodríguez, N. R., Uresti, R. M., Velazquez, G., & Vázquez, M. (2007). Fiber-rich functional fish food from striped mullet (*Mugil cephalus*) using amidated low methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids*, 21(4), 527–536.
- Rao, A., Zhang, Y., Muend, S., & Rajini, R. (2010). Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(12), 5062–5069.
- Rao, P., & Sudershan, R. V. (2008). Risk assessment of synthetic food colours: a case study in Hyderabad, India. *International Journal of Food Safety, Nutrition and Public Health*, 1(1), 68.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Reilly, C. (2006). Selenium in food and health. New York: Springer US.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., & Zhang, L. (2003). Flavonoids: Promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*, 23(4), 519–534.
- Reyes-Carmona, J., Yousef G. G., Martinez-Peniche, R. A., & Lila, M. A. (2005). Antioxidant capacity of fruit extracts of blackberry (*Rubus sp.*) produced in different climatic regions. *Journal of Food Science*, 70, 497–503.
- Riaz, M., Ahmad, M., & Rahman, N., (2011). Antimicrobial screening of fruit, leaves, root and stem of *Rubus fruticosus* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(24), 5920–5924.
- Rice-Evans, C., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., & Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22(4), 375-383.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
- Rispail, N., Morris, P., & Webb, K. J. (2005). Phenolic Compounds: extraction and analysis. *Lotus Japonicus Handbook*, 349–354.

- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chemistry*, 66, 401-436.
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (10), 2866-2887.
- Rodrigues, S., Fernandes, F. A. N., de Brito, E. S., Sousa, A.D., & Narain, N. (2015). Ultrasound extraction of phenolics and anthocyanins from jaboticaba peel. *Industrial Crops and Products*, 69, 400–407.
- Rodrigues, L. M., de Souza, D. F., da Silva, E. A., de Oliveira, T. O., & de Lima, J. P. (2017). Physical and chemical characterization and quantification of bioactive compounds in berries and berry jams. *Semina: Ciências Agrárias*, 38(4), 1853.
- Rojano, B., Saez, J., Schinella, G., Quijano, J., Vélez, E., Gil, A., & Notario, R. (2008). Experimental and theoretical determination of the antioxidant properties of isoespintanol (2-isopropyl-3,6-dimethoxy-5-methylphenol). *Journal of molecular Structure*, 877(1-3), 1-6.
- Roy, B., Popay, I., Champion, P., James, T., & Rahman, A. (1998). *An Illustrated Guide to Common Weeds of New Zealand*. Canterbury, New Zealand: New Zealand Plant Protection Society.
- Rubilar, M., Jara, C., Poo, Y., Acevedo, F., Gutierrez, C., Sineiro, J., & Shene, C. (2011). Extracts of Maqui (*Aristotelia chilensis*) and Murta (*Ugni molinae* Turcz.): sources of antioxidant compounds and α -Glucosidase/ α -Amylase inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(5), 1630-1637.
- Ryu, J., Ha, B. K., Kim, D. S., Kim, J. B., Kim, S. H., & Ahn, J. W. (2014). Genetic diversity and relationship assessment based on AFLP analysis in blackberry (*Rubus fruticosus* L.) mutant lines. *Plant Breeding and Biotechnology*, 2, 386-395.
- Sadowska, K., Andrzejewska, J., & Klóska, Ł. (2017). Influence of freezing, lyophilisation and air-drying on the total monomeric anthocyanins, vitamin C and antioxidant capacity of selected berries. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(5), 1246–1251.
- Sandell, M., Laaksonen, O., Järvinen, R., Rostiala, N., Pohjanheimo, T., Tiitinen, K., & Kallio, H. (2009). Orosensory profiles and chemical composition of black currant (*Ribes nigrum*) juice and fractions of press residue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3718-3728.

- Sangiovanni, E., Vrhovsek, U., Rossoni, G., Colombo, E., Brunelli, C., Brembati, L., Trivulzio, S., Gasperotti, M., Mattivi, F., Bosisio, E., & Dell'Agli, M., (2013). Ellagitannins from Rubus Berries for the Control of Gastric Inflammation: In Vitro and In Vivo Studies. *PLoS one*, 8(8), e71762.
- Sanguinetti, M., Posteraro, B., & Lass-Flörl, C. (2015). Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*, 58, 2–13.
- Santos, S. S., Rodrigues, L. M., Da Costa, S. C., Bergamasco, R. D. C., & Madrona, G. (2017). Microcapsules of blackberry pomace (*Rubus Fruticosus*): light and temperature stability, *Chemical Engineering Transactions*, 57, 1837-1842.
- 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.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Yoga Latha, L. (2011). Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants' Extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1), 1–10.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130(8), 2073S–2085S.
- Schieber, A., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 401-413.
- Seeram, N. P. (2006). Berries. In: Heber D, Blackburn G, Go VLW, Milner J, editors. *Nutritional oncology*. 2nd edition. London, UK: Academic Press, 615–625.
- Seeram, N. P. (2008). Berry Fruits: Compositional Elements, Biochemical Activities, and the Impact of Their Intake on *Human Health, Performance, and Disease*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 627–629.
- Seleema, D., Pardia, V., & Mendonça Murata, R. (2017). Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with antiCandida albicans activity in vitro, *Archives of Oral Biology*, 76, 76-83.
- Sellappan, S., Akoh, C. C., & Krewer, G. (2002). "Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2432–2438.

- Semenza, G. L. (2016). Hypoxia-inducible factors: coupling glucose metabolism and redox regulation with induction of the breast cancer stem cell phenotype. *The EMBO Journal*, 36(3), 252–259.
- Serraino, I., Dugo, L., Dugo, P., Mondello, L., Mazzon, E., Dugo, G., Caputi, A. P., & Cuzzocrea, S. (2003). Protective effects of cyanidin-3-O-glucoside from blackberry extract against peroxynitrite-induced endothelial dysfunction and vascular failure. *Life Sciences*, 73(9), 1097–1114.
- Shahidi, F. (2015). Handbook of Antioxidants for Food Preservation. A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. *Woodhead Publishing*, 1-487.
- 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.
- Shulaev, V., Korban, S. S., Sosinski, B., Abbott, A. G., Aldwinckle, H. S., Folta, K. M., Iezzoni, A., Main, D., Arús, P., Daniela, A. M., Lewers, K., Brown, S. K., Davis, T. M., Gardiner, S. E., Potter, D., & Veilleux, R. E. (2008). Multiple Models for Rosaceae Genomics, *Physiologie végétale*, 147(3), 985-1003.
- Sies, H. (1985). Introductory Remarks. In: Sies, H., Ed., *Oxidative Stress*, Academic Press, London, 1-8.
- Sies, H., Stahl, W., & Sundquist, A. R. (1992). Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 669, 7-20.
- Sila, D. N., Duvetter, T., De Roeck, A., Verlent, I., Smout, C., Moates, G. K., B. Hills, B.P., Waldron, K. K., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2008). Texture changes of processed fruits and vegetables: potential use of high-pressure processing. *Trends in Food Science & Technology*, 19(6), 309–319.
- Siriwoharn, T., & Wrolstad, R. E. (2004). Polyphenolic Composition of Marion and Evergreen Blackberries. *Journal of Food Science*, 69(4), FCT233–FCT240.
- Siriwoharn, T., Wrolstad, R. E., Finn, C. E., & Pereira, C. B. (2004). Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus L. hybrids*) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8021–8030.

- Siriwoharn, T., Wrolstad, R. E., & Durst, R. W. (2006). Identification of Ellagic Acid in Blackberry Juice Sediment. *Journal of Food Science*, 70(3), C189–C197.
- Siti Azima, A. M., Noriham, A., & Manshoor, N. (2014). Anthocyanin content in relation to the antioxidant activity and colour properties of *Garcinia mangostana* peel, *Syzygium cumini* and *Clitoria ternatea* extracts. *International Food Research Journal*, 21(6), 2369-2375.
- 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(13), 1107–1112.
- Slinkard, K., & Singleton, V. L., (1977). Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55.
- Souza, V. R., Pereira, P. A. P., Teixeira, T. R., Silva, T. L. T., Pio, R., & Queiroz, F. (2015). Influence of processing on the antioxidant capacity and bioactive compounds in jellies from different blackberry cultivars. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(7), 1658-1665.
- Sroka, Z., Gamian A., & Cisowski, W. (2005). Low-molecular antioxidant compounds of natural origin. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej(Online)*, 59, 34-41.
- Stajčić, S., Tepić, A., Đilas, S., Šumić, Z., Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., Vulić, J., & Tumbas Šaponjac, V. (2012). Chemical composition and antioxidant activity of berry fruits, *Acta periodica technologica*, 43, 93-105.
- Stanisavljević, M. (1999). New small fruit cultivars from Čačak: 1. The new blackberry (*Rubus* sp.) cultivar 'Čačanska Bestrna'. *Acta Horticulturae*, 505, 291–296.
- Stebbins, N., Howard, L., Ronald, P., Brownmiller, C., & Mauromoustakos, A. (2017). Stabilization of Anthocyanins in Blackberry Juice by Glutathione Fortification. *Food & Function*, 8(10), 3459-3468.
- Stefanut, M. N., Cata, A., Pop, R., Tanasie, C., Boc, D., Ienascu, I., & Ordodi, V. (2013). Anti-hyperglycemic effect of bilberry, blackberry and mulberry ultrasonic extracts on diabetic rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(4), 378–384.
- Struck, S., Plaza, M., Turner, C., & Rohm, H. (2016). Berry pomace – a review of processing and chemical analysis of its polyphenols. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(6), 1305–1318.

- Sujarwo, W., & Keim, A. P. (2019). Chapter 27: *Spondias pinnata* (L. f.) Kurz. (*Anacardiaceae*): Profiles and Applications to Diabetes, Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes (Second Edition), 395-405.
- Surh, Y.-J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 768–780.
- Šoškić, A. (1984). Kupina. Glas. Banja Luka. 7 – 13.
- Šoškić, A. (1998). Kupina. Nolit, Beograd.
- Šoškić, M. (2008). Savremeno voćarstvo, Partenon, Beograd, 2, 264.
- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., & Matsuoka, T. (2006). Inhibition of α -Glucosidase and α -Amylase by Flavonoids. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 52(2), 149–153.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology*, Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Takeda, F. (2017). Climatic requirements. In: Hall, H. and Funt, R., editors. *Blackberry and their Hybrids*. Boston, MA:CABI, 35-48.
- Talcott, S. T. (2007). Chemical components of berry fruits. In: ‘Berry fruit, value-added products for health promotion’. Zhao Y. (ed.), *Taylor & Francis Group*, 51–73.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 669-675.
- Tinggi, U. (2008). Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 13(2), 102–108.
- Tirzitis, G., & Bartosz, G. (2010). Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights *Acta biochimica Polonica*, 57(2), 139-42.
- Tosun, I., Ustun, N. S., & Tekguler, B. (2008). Physical and chemical changes during ripening of blackberry fruits. *Scientia Agricola*, 65(1), 87–90.
- Traber, M. G., & Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(1), 4–15.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246.

- Tumbas Šaponjac, V., Gironés-Vilaplana, A., Djilas, S., Mena, P., Četković, G., Moreno, D. A., Čanadanović-Brunet, J., Vulić, J., Stajčić, S., & Krunić, M. (2014). Anthocyanin profiles and biological properties of caneberry (*Rubus* spp.) press residues. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(12), 2393–2400.
- Tumbas Šaponjac, V., Gironés-Vilaplana, A., Djilas, S., Mena, P., Četković, G., Moreno, D. A., Čanadanović-Brunet, J., Vulić, J., Stajčić, S., & Vinčić, M. (2015). Chemical composition and potential bioactivity of strawberry pomace. *RSC Advances*, 5(7), 5397–5405.
- Turker, A. U., Yildirim, A. B., & Karakas, F. P. (2016). Antibacterial and antitumor activities of some wild fruits grown in Turkey. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 26(1), 2765-2772.
- Turko, I. V., Marcondes, S., & Murad, F. (2001). Diabetes-associated nitration of tyrosine and inactivation of succinyl-CoA:3-oxoacid CoA-transferase. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 281(6), H2289–H2294.
- Uribe, E., Delgadillo, A., Giovagnoli-Vicuña, C., Quispe-Fuentes, I., & Zura-Bravo, L. (2015). Extraction Techniques for Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity Determination of Chilean Papaya (*Vasconcellea pubescens*) Fruit. *Journal of Chemistry*, 2015, 1–8.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M., Mazura, M., & Telser, I. (2007). Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84.
- 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 der Woude, H., Gliszczynska-Świgło, A., Struijs, K., Smeets, A., Alink, G. M., & Rietjens, I. M. C. M. (2003). Biphasic modulation of cell proliferation by quercetin at concentrations physiologically relevant in humans. *Cancer Letters*, 200(1), 41–47.
- Vasco, C. (2009). Phenolic compounds in Ecuadorian fruits. Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala.
- Vasilišin, L., & Grubačić, M. (2009). Sadržaj mikroelemenata u jagodastom voću, Glasnik hemičara, tehnologa i ekologa Republike Srpske 1. Univerzitet u Banjoj Luci, Tehnološki fakultet, Banja Luka.

- Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M. J., & Spencer, J. P. E. (2010). Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action A Review. *Nutrients*, 2(11), 1106-1131.
- Vaquero, A., Sternglanz, R., & Reinberg, D. (2007). NAD⁺-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. *Oncogene*, 26(37), 5505–5520.
- Veberic, R., Jurhar, J., Mikulic-Petkovsek, M., Stampar, F., & Schmitzer, V. (2010). Comparative study of primary and secondary metabolites in 11 cultivars of persimmon fruit (*Diospyros kaki* L.). *Food Chemistry*, 119(2), 477-483.
- Veberic, R., Stampar, F., Schmitzer, V., Cunja, V., Zupan, A., Koron, D., & Mikulic-Petkovsek, M. (2014). Changes in the contents of anthocyanins and other compounds in blackberry fruits due to freezing and long-term frozen storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(29), 6926–6935.
- Velagić-Habul, E. (2010). Hemija hrane. Univerzitet u Sarajevu, Poljoprivredno-prehrambeni fakultet, Sarajevo, 2010.
- Valgas, C., De Souza, S. M., Smânia, E. F. A., & Smânia, A. Jr. (2007): Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 369-380.
- Veličković, M. (2000). Jagodasto voće, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Veličković, J.M. (2013). Hemijska analiza i antioksidativna aktivnost ekstrakata odabranih biljnih vrsta bogatih fenolnim jedinjenjima, Doktorska disertacija, Univerzitet u Nišu: Prirodno-matematički fakultet, Department za hemiju, Niš.
- Verma, R., Gangrade, T., Punasiya, R., & Ghulaxe C. (2014). *Rubus fruticosus* (blackberry) use as an herbal medicine. *Pharmacognosy Reviews*, 8(16), 101–104.
- Vinčić, M. (2017). Antioksidativna, antiproliferativna i antimikrobna aktivnost odabranih ekstrakata tropova bobičastog voća. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu: Tehnološki fakultet.
- Vizzotto, M., Raseira, M. do C. B., Pereira, M. C., & Fetter, M. da R. (2012). Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em diferentes genótipos de amoreira-preta (*Rubus* sp.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34(3), 853–858.
- Voća, S., Duralija, B., Družić, J., Skenderović-Babojelić, M., Dobričević, N., & Čmelik, Z. (2006). Influence of cultivation systems on physical and chemical composition of strawberry fruits cv. Elsanta. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 71, 171–174.

- Vračar, Lj. (2001). Priručnik za kontrolu kvaliteta svežeg i prerađenog voća, povrća i pečurki i osvežavajućih bezalkoholnih pića. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet.
- Vrhovac, B., Jakšić, B., Reiner, Ž., & Vucelić, B. (2008). Interna medicina. Interna medicina, IV izdanje, Zagreb: Naklada Ljevak.
- Vulić, J. J., Tumbas, V. T., Savatović, S. M., Đilas, S. M., Četković, G. S., & Čanadanović-Brunet, J. M. (2011). Sadržaj polifenola i antioksidativna aktivnost ekstrakata tropa bobičastog voća. *Acta periodica technologica*, 42, 271-279.
- Wang, X., & Quinn, P.J. (1999). Vitamin E and its function in membranes. *Progress in Lipid Research*, 38(4), 309-36.
- Wang, S. Y., & Lin, H. S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 140–146.
- Wang, J., Obici, S., Morgan, K., Barzilai, N., Feng, Z., & Rossetti, L. (2001). Overfeeding Rapidly Induces Leptin and Insulin Resistance. *Diabetes*, 50(12), 2786–2791.
- 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.
- Wang, Z., Wille, U. & Juaristi, E. (2017). Encyclopedia of Physical Organic Chemistry, 6 Volume Set. John Wiley & Sons Inc.
- Watson, L., & Dallwitz, M. J. (1992 onwards). The Families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval. Version: 14th December 2000. <http://biodiversity.uno.edu/delta/>.
- Wedick, N. M., Pan, A., Cassidy, A., Rimm, E. B., Sampson, L., Rosner, B., Willett, W., Hu, F. B., Sun, Q., & van Dam, R. M. (2012). Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 95(4), 925-33.
- Williamson, G., & Clifford, M. N. (2010). Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *British Journal of Nutrition*, 104(S3), S48–S66.
- Williamson, G. (2013). Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Molecular nutrition & food research*, 57, 48–57.
- Winkel-Shirley, B. (2001). Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant physiology*, 126(2), 485–493.

- Woisky, R. G., & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apiculture Research*, 37, 99–105.
- Wolfe, K., Wu, X., & Liu, R. H. (2003). Antioxidant Activity of Apple Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 609-614.
- Wrolstad, R. E. (2006). Anthocyanin Pigments-Bioactivity and Coloring Properties. *Journal of Food Science*, 69(5), C419–C425.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Agricultural Food Chemistry*, 12, 4026-4037.
- Yan, X., & Su, X. G. (2009). *Linear Regression Analysis: Theory and Computing*, World Scientific Publishing, 4. New Jersey.
- Yang, J. & Liu, R. H. (2009). Synergistic effect of apple extracts and quercetin 3-beta-d-glucoside combination on antiproliferative activity in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 8581–8586.
- Yermakov, A. I., Arasimov, V. V., & Yarosh, N. P. (1987). *Methods of biochemical analysis of plants*. Leningrad: Agropromizdat (in Russian).
- Yilmaz, U. K., Zengin, Y., Ercisli, S., Serce, S., Gunduz, K., Sengul, M., & Asma, B. M., (2009). Some selected physico-chemical characteristics of wild and cultivated blackberry fruits (*Rubus fruticosus* L.) from Turkey. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(1), 4152-4163.
- You, Q., Chen, F., Wang, X., Luo, P. G., & Jiang, Y. (2011). Inhibitory effects of muscadine anthocyanins on α -glucosidase and pancreatic lipase activities. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 59(17), 9506–9511.
- Younes, M. (1999). *Free Radicals and Reactive Oxygen Species*, International Programme on Chemical Safety, *Switzerland Academic Press*, World Health Organization, Geneva.
- Xiao, J., Kai, G., Ni, X., Yang, F., & Chen, X. (2011). Interaction of natural polyphenols with α -amylase in vitro: molecular property–affinity relationship aspect. *Molecular BioSystems*, 7(6), 1883.
- Xiao, J. B., & Högger, P. (2015). Dietary polyphenols and type 2 diabetes: current insights and future perspectives. *Current medicinal chemistry*, 22(1), 23–38.

- Zafrilla, P., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A. (2001). Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3651–3655.
- Zhang, L., Zhou, J., Liu, H., Khan, M. A., Huang, K., & Gu, Z. (2012). Compositions of anthocyanins in blackberry juice and their thermal degradation in relation to antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 235, 637-645.
- Zhao, R. (2002). Relative Value Relevance of R&D Reporting: An International Comparison. *Journal of International Financial Management and Accounting*, 13(2), 153–174.
- Zhao, Y. (2007). *Berry A Review of: "Berry Fruit: Value-Added Products for Health Promotion"*, Boca Raton, FL: CRC Press, 448.
- Zia-Ul-Haq, M., Riaz, De Feo, M., V., Jaafar, Z. E. H., & Moga, M. (2014). *Rubus fruticosus* L.: Constituents, biological activities and health related uses. *Molecules*, 19(8), 10998–11029.
- Zlatković, B. (2003). *Prerada i čuvanje voća*, Univerzitetski udžbenik, Beograd.
- Žlender, V. (2003). Apoptosis – programmed cell death. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 54(4), 267-274.
- <http://www.lizzieharper.co.uk>
- <http://www.biohemija.in.rs/PDF/BB.3.1.pdf>