

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Anita T. Smailagić

**HEMIJSKI SASTAV EKSTRAKATA DRVETA  
RAZLIČITOG BILJNOG POREKLA KAO  
POKAZATELJ NJIHOVE AUTENTIČNOSTI**

doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Anita T. Smailagić

**CHEMICAL COMPOSITION OF WOOD  
EXTRACTS OF DIFFERENT BOTANICAL  
ORIGIN AS A SIGN OF THEIR  
AUTHENTICITY**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2023

Mentor:

dr **Maja Natić**, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

Članovi komisije:

dr **Dužanka Milojković Opsenica**, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

dr **Dragan Manojlović**, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

dr **Jasmina Popović**, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu - Šumarski fakultet

dr **Dragana Dabić Zagorac**, viši naučni saradnik

Inovacioni centar Hemijskog fakulteta u Beogradu

dr **Sonja Veljović**, docent

Univerzitet u Kragujevcu - Fakultet za hotelijerstvo i turizam  
u Vrnjačkoj Banji

**Datum odbrane:**

U Beogradu, \_\_\_\_\_2023.

## Zahvalnica

*Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za analitičku hemiju Univerziteta u Beogradu-Hemijskog fakulteta, pod mentorstvom dr Maje Natić, redovnog profesora Univerziteta u Beogradu-Hemijskog fakulteta.*

*Zahvaljujem se svojoj mentorki, dr Maji Natić, što me je primila kao svog studenta na master i doktorskim studijama, što mi je omogućila da se bavim temama istraživanja koje me interesuju, na pomoći u svakoj fazi izrade ove disertacije.*

*Veliko hvala dr Dragani Dabić Zagorac na rukovođenju i aktivnom učešću prilikom eksperimentalne faze ove disertacije, kao i korisnim savetima tokom pisanja.*

*Hvala dr Dušanki Milojković-Opsenici na korisnim sugestijama prilikom izrade ove doktorske disertacije.*

*Takođe veliku zahvalnost dugujem dr Sonji Veljović, zahvaljujući kojoj su nabavljeni uzorci drveta za disertaciju, na lepoj saradnji, idejama i pomoći u izradi ove doktorske disertacije.*

*Hvala dr Jasmini Popović na pomoći u izradi ove disertacije, kao i na izdvojenom vremenu i trudu kako bih razumela stručne termine vezano za anatomiju drveta, detaljnom čitanju disertacije i korisnim savetima i sugestijama. Hvala dr Dragici Vilotić iz Laboratorije za Anatomiju drveta na Univerzitetu u Beogradu-Šumarskom fakultetu na izvršenoj taksonomskoj identifikaciji vrsta drveta.*

*Hvala dr Draganu Manojloviću na brzini i efikasnosti tokom pregledanja disertacije i na saradnji sa njegovom istraživačkom grupom. Hvala dr Daliboru Stankoviću na aktivnom učešću u i korisnim savetima vezano za elektrohemijske eksperimente.*

*Hvala dr Miri Stanković i dr Kseniji Radotić Hadži-Manić sa Instituta za multidisciplinarna istraživanja na aktivnoj pomoći prilikom spektrofotometrijske analize, interpretacije rezultata, pisanja i razumevanja ovog dela disertacije.*

*Hvala dr Ivici Dimkiću na tome što mi je omogućio da bolje razumem termine u vezi sa mikrobiološkom analizom ekstrakata drveta, kao i na aktivnom učešću u eksperimentalnoj fazi ovog dela rada.*

*Hvala dr Petru Ristivojeviću na pomoći prilikom eksperimentalnog dela rada u oblasti visokoefikasne tankoslojne hromatografije.*

*Takođe hvala svim kolegama na učešću u izradi ove doktorske disertacije koji su doprineli tome da ova disertacija ima oblik kakav sada ima.*

*Hvala mojoj porodici na podršci i razumevanju u ovom putu koji nije bio nimalo lak.*

*I, na kraju, hvala svim čitaocima ove disertacije na izdvojenom vremenu i trudu.*

## **Hemijski sastav ekstrakata drveta različitog biljnog porekla kao pokazatelj njihove autentičnosti**

Cilj ove doktorske disertacije je određivanje hemijskog sastava ekstrakata komercijalno prerađenog drveta različitog geografskog i biljnog porekla, koje se koristi za izradu buradi za odležavanje rakija u Srbiji. Analizirani su uzorci hrasta lužnjaka i kitnjaka, cera, belog duda, bagrema, džanarika i divlje trešnje.

Analizom mikroskopskih preparata uzoraka drveta izvršena je taksonomska identifikacija ispitivanih vrsta. Antioksidativni potencijal i sadržaj ukupnih polifenola vodeno-etanolnih ekstrakata drveta su određeni spektrofotometrijski. Polifenolni profili ekstrakata ispitivani su primenom tankoslojne hromatografije i tečne hromatografije spregnute sa detektorom sa nizom dioda i masenim detektorom. Spektrofluorimetrijski su dobijeni podaci o prisutnim fluoroforima, dok je *CIELab* metodom određena boja ekstrakata. Antimikrobna aktivnost je ispitana uz pomoć modifikovane difuzione metode u bunarićima i mikrodilucione metode. Gasna hromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom upotrebljena je za identifikaciju i kvantifikaciju isparljivih jedinjenja. Induktivno spregnuta plazma sa optičkom emisionom spektroskopijom korišćena je za određivanje elementalnog sastava. U drugom delu istraživanja izvršeno je simuliranje odležavanja rakija tokom različitih vremenskih intervala korišćenjem različitih ekstrakcionih sredstava (dve vrste rakije i model-rastvor etanola). Ciklična voltometrija i diferencijalno pulsna voltometrija su primenjene za ispitivanje elektrohemijskog ponašanja i antioksidativnog potencijala etanolnih ekstrakata.

Rezultati su pokazali da ispitivane vrste drveta obiluju polifenolima, te da postoji mogućnost upotrebe drvnog otpada iz procesa proizvodnje buradi za odležavanje alkoholnih pića. Pored toga, proširena su saznanja o nedovoljno ispitivanim vrstama (džanarika i cer) i pokazan je potencijal analitičkih tehnika koje do sada nisu primenjivane za analizu uzoraka drveta i njihovih ekstrakata (spektrofluorimetrija, ciklična voltometrija i diferencijalno pulsna voltometrija).

**Ključne reči:** hrast, divlja trešnja, džanarika, dud, bagrem, cer, spektrofluorimetrija, tečna hromatografija, gasna hromatografija, elektrohemijske metode

**Naučna oblast:** Hemija

**Uža naučna oblast:** Analitička hemija

**UDK broj:** 543

## **Chemical composition of wood extracts of different botanical origin as a sign of their authenticity**

The aim of this doctoral dissertation is to determine the chemical composition of extracts made from commercial wood samples of different geographical and plant origin, which is used for making barrels for ageing of fruit brandies in Serbia. The following samples were analysed: pedunculate oak, sessile oak, Turkey oak, white mulberry, black locust, Myrobalan plum and wild cherry.

Taxonomic identification of the examined plant species was performed by analysis of microscope slides of wood samples. Spectrophotometry was used for determining the radical scavenging activity and the content of total polyphenols of the aqueous-ethanolic wood extracts. Phenolic profiles of the extracts were obtained by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography coupled to diode array detector and mass spectrometry. Spectrofluorimetry was used for obtaining data about the fluorophores present, while *CIELab* method was used for measuring the colour of the extracts. Antimicrobial activity was investigated by modified well-diffusion method and microdilution method. Gas chromatography coupled to mass spectrometry was used for identifying and quantifying volatile compounds. Elemental composition was determined by inductively coupled plasma with optical emission spectroscopy. In the second part of the study, simulation of brandy ageing during different time intervals was performed by using different extraction agents (two fruit brandies and a model-ethanol solution). Cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry were used for examining electrochemical behaviour and antioxidant capacity of the ethanolic extracts.

The results have shown that the investigated wood samples are rich in polyphenols, therefore there is a potential of reusing wood waste from cooperage. In addition, the knowledge is expanded for the insufficiently tested species (Myrobalan plum and Turkey oak) while the potential for using analytical techniques not used before for the analysis of wood samples and extracts (spectrofluorometry, cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry) is shown.

**Keywords:** oak, wild cherry, Myrobalan plum, mulberry, black locust, Turkey oak, spectrofluorometry, liquid chromatography, gas chromatography, electrochemical methods

**Scientific field:** Chemistry

**Field of Academic Expertise:** Analytical Chemistry

**UDC Number:** 543

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. OPŠTI DEO</b> .....	3
2.1 Drvo .....	3
2.1.1 Hrast .....	3
2.1.2 Divlja trešnja.....	4
2.1.3 Džanarika.....	5
2.1.4 Beli dud .....	5
2.1.5 Bagrem .....	6
2.2 Građa drveta .....	7
2.3 Hemijski sastav drveta.....	8
2.3.1 Strukturne supstance drveta.....	9
2.3.2 Ekstraktivne supstance .....	11
2.3.3 Podela ekstraktivnih supstanci.....	11
2.3.4 Hemijski sastav i fitohemijski profil ispitivanih vrsta drveta .....	15
2.3.4.1 Hrast .....	15
2.3.4.2 Cer .....	16
2.3.4.3 Bagrem .....	17
2.3.4.4 Trešnja .....	17
2.3.4.5 Džanarika.....	19
2.3.4.6 Dud .....	19
2.3.5 Mineralni sastav.....	20
2.4 Antimikrobna aktivnost .....	21
2.5 Elektrohemijaska karakterizacija .....	23
2.6 Prirodno i veštačko sušenje drveta .....	23
2.7 Primena drveta za odležavanje alkoholnih pića.....	24
<b>3 EKSPERIMENTALNI DEO</b> .....	26
3.1 Hemikalije, reagensi i standardi .....	26
3.2 Uzorci drveta .....	26
3.3 Taksonomska identifikacija vrsta drveta .....	27
3.4 Priprema ekstrakata drveta .....	27
3.5 PRVI DEO - Analiza uzoraka i ekstrakata drveta .....	28
3.5.1 Određivanje sadržaja ukupnih polifenola i antioksidativnog potencijala .....	28
3.5.2 Ispitivanje sadržaja pojedinačnih polifenola primenom UHPLC–DAD MS/MS.....	29
3.5.3 Određivanje sadržaja flavanola primenom HPLC-DAD .....	30
3.5.4 Određivanje boje ekstrakata drveta .....	30
3.5.5 Određivanje sadržaja fluorofora u uzorcima drveta i njihovim ekstraktima .....	30

3.5.6	Određivanje fenolnih profila ekstrakata drveta primenom visokoefikasne hromatografije na tankom sloju (HPTLC) .....	31
3.5.6.1	Priprema uzoraka .....	31
3.5.6.2	Dobijanje fenolnih profila .....	31
3.5.6.3	Analiza slike HPTLC hromatograma .....	31
3.5.7	Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata .....	32
3.5.7.1	Priprema ekstrakata drveta .....	32
3.5.7.2	Ispitivani mikroorganizmi i uslovi rasta .....	32
3.5.7.3	Preliminarna ispitivanja antimikrobnog potencijala ekstrakata drveta .....	32
3.5.7.4	Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) .....	33
3.5.8	Određivanje sadržaja isparljivih komponenata .....	33
3.5.9	Određivanje mineralnog sastava ekstrakata drveta .....	34
3.5.9.1	Priprema uzoraka mikrotalasnom digestijom .....	34
3.5.9.2	Određivanje elementalnog sastava .....	34
3.5.10	Procena rizika .....	34
3.6	DRUGI DEO – Ispitivanje elektrohemijskih svojstava ekstrakata drveta .....	35
3.6.1	Preliminarna elektrohemijska ispitivanja .....	35
3.6.2	Priprema ekstrakcionih sredstava .....	36
3.6.3	Eksperimentalno odležavanje rakija i model-rastvora etanola u kontaktu sa drvetom .....	36
3.6.4	Praćenje elektrohemijskih svojstava ekstrakata primenom ciklične voltametrije i diferencijalne pulsne voltametrije .....	36
3.7	Statistička analiza .....	37
<b>4</b>	<b>REZULTATI I DISKUSIJA</b> .....	<b>39</b>
4.1	Rezultati taksonomske identifikacije vrsta drveta .....	39
4.2	PRVI DEO – Rezultati analiza uzoraka i ekstrakata drveta .....	42
4.2.1	Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativni potencijal .....	42
4.2.2	Sadržaj pojedinačnih polifenola određen primenom UHPLC–DAD MS/MS .....	43
4.2.2.1	Veza između fenolnog profila i biljnog porekla .....	50
4.2.3	Sadržaj flavanola primenom HPLC-DAD .....	51
4.2.4	Boja ekstrakata .....	51
4.2.5	Sadržaj fluorofora u drvetu i ekstraktima .....	53
4.2.6	Rezultati fenolnih profila i antioksidativne aktivnosti dobijeni uz pomoć visokoefikasne tankoslojne hromatografije .....	58
4.2.6.1	Rezultati analize glavnih komponenti podataka dobijenih sa HPTLC hromatograma .....	60
4.2.7	Antimikrobna aktivnost .....	61
4.2.7.1	Prinos ekstrakcije .....	61
4.2.7.2	Rezultati preliminarnih ispitivanja antimikrobnog potencijala ekstrakata drveta .....	62



4.2.7.3	Rezultati određivanja vrednosti minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidne (MBC) ekstrakata drveta .....	63
4.2.8	Sadržaj isparljivih komponenti .....	66
4.2.9	Mineralni sastav ekstrakata drveta.....	71
4.2.9.1	Sadržaj makroelemenata u ekstraktima drveta .....	72
4.2.9.2	Sadržaj mikroelemenata u ekstraktima i potencijalna toksičnost .....	73
4.2.9.3	Poređenje elementalnog sastava među ekstraktima drveta.....	75
4.2.10	Procena rizika i dnevni unos.....	77
4.2.11	Rezultati klusterske analize (CA) i analize glavnih komponenti (PCA) .....	79
4.3	DRUGI DEO - Elektrohemijska svojstva drveta.....	83
4.3.1	Rezultati preliminarnih ispitivanja elektrohemijskog ponašanja etanolnih model-ekstrakata drveta	83
4.3.2	Rezultati poređenja elektrohemijskih metoda za procenu antioksidativnog potencijala uzoraka	84
4.3.3	Elektrohemijska svojstva rakija koje su odležavale u kontaktu sa drvetom.....	85
4.3.4	Rezultati analize glavnih komponenata (PCA analiza) rezultata ciklične voltametrije.....	88
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČAK</b> .....	<b>90</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>93</b>
<b>6.</b>	<b>PRILOZI</b> .....	<b>106</b>
<b>7.</b>	<b>BIOGRAFIJA AUTORA</b> .....	<b>107</b>

## 1. UVOD

Odležavanje alkoholnih pića u kontaktu sa drvetom je važan proces koji se primenjuje u cilju proizvodnje visokokvalitetnih alkoholnih pića sa poboljšanim senzorskim svojstvima (bojom, ukusom i aromom). Fitohemijski profil, kao i fizička svojstva drveta, koji su različiti za svaku biljnu vrstu, utiču na hemijski sastav ekstrakta, kao i na kvalitet alkoholnih pića. U procesu odležavanja alkoholnih pića najčešće se upotrebljavaju drvena burad napravljena od hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) ili kitnjaka (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.), uglavnom zbog dobrih mehaničkih osobina i male propustljivosti za tečnosti. Međutim, zbog ograničene količine kvalitetnog hrasta i njegove visoke cene upotrebljavaju se i alternativne vrste drveta kao što su bagrem (*Robinia pseudoacacia* L.), trešnja (*Prunus avium* L.) i beli dud (*Morus alba* L.), koje su često podvrgnute procesu prirodnog sušenja (*Natural seasoning process*) sa ili bez termičkog tretmana. Pored drvenih buradi, za odležavanje alkoholnih pića se koriste drvene letve i komadići (dašice, kockice i iverje) (Fernández de Simón i sar. 2010; Coldea i sar., 2020).

Većina voćnih rakija se tradicionalno proizvodi i prodaje na lokalnom tržištu bez ikakve kontrole (Ivanova-Petropulos i sar., 2017). Ovakvi uslovi omogućavaju da se falsifikuje i pogrešno deklarise rakija koja se plasira na tržište, što otežava prepoznavanje kvalitetne rakije. Na primer, prilikom odležavanja rakija, umesto drveta se dodaje karamel boja kako bi dobila boju koja je karakteristična za kvalitetne rakije koje su odležavale u kontaktu sa drvetom. Prema Evropskoj regulativi (REGULATION (EU) 2019/787 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL, L 130/32 EN Official Journal of the European Union, 62, 17.5.2019), definisano je da karamel boja može da se koristi isključivo za standardizaciju boje. Voćne rakije mogu da se boje karamel bojom samo ako su odležavale najmanje godinu dana u kontaktu sa drvetom. Da bi se zaštitili proizvođači, kao i kupci, značajno je razviti metode kojima će biti moguće da se utvrdi da li je rakija odležavala u kontaktu sa drvetom, kao i vrsta drveta koja je primenjena u procesu odležavanja rakija. Do sada je u naučnoj literaturi najviše ispitivan hemijski sastav drveta hrasta lužnjaka i kitnjaka, najčešće u kontekstu odležavanja vina (Zhang i sar., 2015). Poslednjih godina, sve je veći broj radova posvećen ispitivanju alternativnih vrsta drveta, kao što su bagrem, trešnja i dud, ili alternativnih oblika drveta, kao što su iverje i granule.

Ispitivane vrste drveta (hrasta ili alternativnih vrsta drveta) najčešće su podvrgnute procesu prirodnog sušenja, sa ili bez termičkog tretmana. Ispitivan je hemijski sastav vina koje je odležavalo u kontaktu sa drvenim buradima (De Rosso i sar., 2009b; Sanz i sar., 2012b; Chinnici i sar. 2015) ili je izvršeno poređenje hemijskog sastava vina koja su odležavala u drvenim buradima sa vinima koja su odležavala u kontaktu sa iverjem drveta (Fernández de Simón i sar., 2014a). Pored toga su ispitivani ekstrakti usitnjenog drveta u rastvorima koji simuliraju alkoholna pića, kao što su vodeno-etanolni rastvor ili model-rastvor vina (vodeno-etanolni rastvor sa dodatim tartaratnim puferom) (Flamini i sar., 2007; De Rosso i sar., 2009a, Fernández de Simón i sar., 2009, 2014b; Soares i sar., 2012; Chinnici i sar., 2015; Jordão i sar., 2016). U nekim istraživanjima je korišćen ekstrakt usitnjenog drveta u drugim rastvaračima (Alañón i sar., 2011; Sanz i sar., 2010, 2011, 2012a).

Manji broj radova je posvećen odležavanju drugih proizvoda i alkoholnih pića, kao što su vinsko sirće koje je odležavalo u drvenim buradima (Cerezo i sar., 2010) i destilati tradicionalne rumunske jabukovače koji su odležavali u kontaktu sa fragmentima drveta (Coldea i sar., 2020).

Najčešće upotrebljavane metode za analizu ekstrakata drveta su visokoeffikasna tečna hromatografija i gasna hromatografija. S druge strane, elektrohemijske metode i spektrofluorimetrija su jednostavni, brzi i po ceni pristupačni analitički postupci koji ne zahtevaju prethodnu pripremu uzoraka. Prema dostupnoj naučnoj literaturi, nisu pronađeni podaci o primeni ovih postupaka za analizu drveta, međutim spektrofluorimetrija je primenjena u analizi alkoholnih pića (Sádecká i sar., 2016), dok su elektrohemijske metode primenjene za analizu fenolnih jedinjenja u vinu (Magarelli i

sar., 2013). Pošto postoji težnja ka upotrebi brzih i jednostavnih metoda uz što jednostavniju pripremu uzoraka, ovi postupci imaju potencijal da se iskoriste u proceni autentičnosti drveta i za određivanje vrste drveta koja je upotrebljena u procesu odležavanja rakija.

U okviru izrade ove doktorske disertacije, definisani su određeni koraci i postavljeni konkretni zadaci, a sve u cilju detaljne hemijske karakterizacije uzoraka drveta različitog biljnog i geografskog porekla koji se upotrebljavaju u procesu odležavanja rakija u Srbiji. U prvom delu rada, ekstrakti drveta su detaljno okarakterisani i na ovaj način je omogućeno da se prošire znanja o hemijskom sastavu nedovoljno ispitivanih vrsta drveta. Ispitana je mogućnost utvrđivanja autentičnosti drveta uz pomoć spektrofluorimetrije i elektrohemijskih metoda, brzih i jednostavnih metoda koje do sada nisu primenjivane na uzorcima drveta. Takođe je ispitana bioaktivnost ekstrakata drveta, pošto antimikrobna aktivnost ovih ekstrakata nije dovoljno ispitivana na patogene organizme. Određen je sadržaj toksičnih elemenata i izvršena procena rizika kako bi se procenila bezbednost ekstrakata drveta.

U drugom delu rada izvršeno je praćenje hemijskog sastava ekstrakta drveta koje je bilo u kontaktu sa model-rastvorom etanola, odnosno rakijom, tokom različitih vremenskih perioda u cilju utvrđivanja uticaja vrste ekstrakcionog sredstva, dužine ekstrakcije i biljnog porekla drveta na sastav ekstrakta i rakije. Razmotrena je mogućnost primene savremenih elektrohemijskih metoda za identifikaciju vrste drveta u kojem je rakija odležavala, kao i praćenju kvaliteta rakije tokom vremena.

Na eksperimentalne rezultate dobijene u ovoj disertaciji primenjene su statističke metode u cilju utvrđivanja veze između hemijskog sastava i biljnog porekla drveta. Tuki test (eng. Tukey test) primenjen je na rezultate spektrofotometrijskih testova (DPPH<sup>•</sup> testa i Folin-Čikalteu (*Folin-Ciocalteu*) testa), na sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja, kao i za rezultate analize elementalnog sastava, tako što je izračunata značajna razlika između ekstrakata drveta,  $p < 0,05$ . Jednofaktorska analiza varijanse (*One-way analysis of variance*, ANOVA) primenjena je za procenu značajnosti razlike između rezultata dobijenih cikličnom voltametrijom (CV) i diferencijalno pulsnom voltametrijom (DPV). Analiza glavnih komponenta (*Principal component analysis*, PCA analiza) je korišćena kako bi se klasifikovali uzorci drveta prema razlikama u karakterističnim emisionim spektrima, zatim prema sadržaju pojedinačnih fenolnih jedinjenja i elementarnom sastavu, kao i za identifikaciju fenolnih jedinjenja na hromatogramu dobijenom uz pomoć visokoefikasne tankoslojne hromatografije (eng. *High-Performance Thin-Layer Chromatography*, HPTLC) koja su najodgovornija za klasifikaciju ispitivanih uzoraka. PCA analiza je takođe primenjena u drugom delu rada na rezultatima eksperimentalnog odležavanja alkoholnih pića, kako bi se ustanovile razlike u elektrohemijskom ponašanju ispitivanih ekstrakata na osnovu vremena ekstrakcije, ekstrakcionog sredstva i vrsta drveta. Klasteraska analiza (*Cluster analysis*, CA) je primenjena kako bi se utvrdila potencijalna veza između najzastupljenijih polifenola karakterističnih za svaku biljnu vrstu drveta i detektovanih elemenata, kao i parametara dobijenih uz pomoć spektrofotometrijskih testova. Na osnovu svih analiza omogućeno je da se dobije uvid o razlikama u sastavu ekstrakata ispitivanih vrsta drveta i moguće parametre koji mogu da doprinesu identifikaciji određene vrste drveta.

## 2. OPŠTI DEO

### 2.1 Drvo

#### 2.1.1 Hrast

Hrast (*Quercus spp.*: Fagaceae) je, posle bukve, najrasprostranjenije listopadno drvo u Srbiji. U svetu postoji oko 600 vrsta koje pripadaju rodu *Quercus* (Zhang i sar., 2015). Najzastupljenije vrste hrasta su hrast lužnjak i hrast kitnjak, koji pripadaju podrodu *Quercus*. Među značajnim vrstama hrasta takođe se ubraja i cer, koji je reprezentativna vrsta podroda *Cerris*.

Hrast lužnjak (*Quercus robur* L.: Fagaceae) i hrast kitnjak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.: Fagaceae) predstavljaju drveće velike biomase koje najčešće dostiže visinu od 30 metara i prečnik do jednog metra, međutim ove dimenzije mogu da budu i mnogo veće (njihova visina može da pređe 40 metara a prečnik može da dostigne 3-4 metra). Hrast lužnjak i hrast kitnjak imaju veoma dug životni vek, koji može da dostigne i preko hiljadu godina (Eaton i sar., 2016).

Lužnjak i kitnjak su morfološki veoma slični i često se međusobno spontano ukrštaju. Nastale hibridizovane jedinke poseduju karakteristike obe vrste hrasta podjednako ili su izraženije karakteristike jedne vrste.

Hrast lužnjak raste u nizijskim šumama Evrope, severne Afrike i zapadne Azije. U šumama Evrope, kao i u Srbiji, najčešće dominira hrast lužnjak pošto se lakše spontano razmnožava i pogodniji je za pošumljavanje (Kovač i sar., 2000). Hrast lužnjak i hrast kitnjak retko formiraju čiste šume u prirodnim uslovima. Oni dominiraju u lišćarskim mešovitim šumama sa vlažnim i plodnim zemljištem, u kojima rastu uz prisustvo drugog listopadnog drveća (Eaton i sar., 2016).

Obe vrste su izdržljive, mogu da rastu pod različitim uslovima i da izdrže umerene suše, zahvaljujući njihovom dubokom i snažnom korenju. Međutim, ove dve vrste drveta preferiraju različite tipove staništa. Prema Eaton i sar. (2016) i Ducouso i Bordács (2003), uočene su sledeće razlike između hrasta lužnjaka i kitnjaka: hrast lužnjak ima tendenciju da raste u mestima sa kontinentalnom klimom, u vlažnim nizijama i predelima pored vode, veoma je tolerantan na različite tipove zemljišta i periodične poplave. S druge strane, hrast kitnjak ima razvijeniji koren u odnosu na hrast lužnjak, što mu omogućava veću otpornost na sušu. Ova vrsta uglavnom raste na padinama i vrhovima brda. U odnosu na hrast lužnjak, više mu odgovaraju lagana i rastresita, često kamenita zemljišta, i mnogo je tolerantniji na siromašno zemljište. Hrast kitnjak može da se prilagodi različitim tipovima zemljišta od vlažnog do izuzetno suvog, sa pH vrednošću od 3,5 do 9, međutim bolje uspeva na kiselijem zemljištu.

Hrastovina je vrsta drveta koja se najčešće upotrebljava za proizvodnju buradi za odležavanje alkoholnih pića zato što poseduje dobre mehaničke osobine (trajnost, tvrdoću i fleksibilnost) i malu propustljivost za tečnosti.

Drvo hrasta kitnjaka se u velikoj meri ne razlikuje od drveta hrasta lužnjaka. Međutim, u poređenju sa hrastom lužnjakom, drvo hrasta kitnjaka je dosta teže i tvrđe i cenjenije je kao materijal za izradu buradi (Vilotić, 2000, Kovač i sar., 2000). Drvo hrasta kitnjaka je posebno cenjeno zbog ravne (pravilne) strukture, trajnosti zahvaljujući tvrdoći, kao i visokog sadržaja tanina, što ga čini otpornim na napade insekata i gljivica (Eaton i sar., 2016).

Hrastovo drvo poseduje visoku trajnost zahvaljujući prisustvu elagitanina (Gadrat i sar., 2021). Prema De Rosso i sar. (2009a), hrast karakteriše najveći stepen ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz drveta u vodeno-alkoholni rastvor u odnosu na druge vrste drveta (bagrem, kesten, trešnja i dud). Prema istim autorima, najveći procenat stabilnih jedinjenja i praktično odsustvo jedinjenja

podložnih oksidaciji čini hrastovu burad pogodnim za dugotrajno odležavanje vina i alkoholnih pića.

Hrast lužnjak i hrast kitnjak se ubrajaju u ekonomski najvažnije listopadne šumske vrste drveta zbog visokokvalitetnog drveta, od kojih se najviše ceni drvo sa uzanim godovima (Eaton i sar., 2016). Prema prethodno navedenom izvoru i Šoškiću i Popoviću (2002), hrastovina ima vrlo široku primenu, među kojima su proizvodnja nameštaja, stolarije, furnira i parketa, kao i u građevinarstvu i brodogradnji. Pored toga, drvo hrasta predstavlja vredan izvor za proizvodnju drvenog uglja i koristi se kao ogrevno drvo. Kora hrasta se ranije koristila za štavljenje kože zbog visokog sadržaja tanina. Neke sorte, naročito hrasta lužnjaka, izvoze se po celom svetu kao ukrasne vrste drveta. Hrast ima kulturni značaj u Evropi (od vremena starih Grka do Germana, starih Slovena i Kelta) kao sveto drvo i često se koristi kao nacionalni ili regionalni simbol, kao na primer na grbu Bugarske i na nemačkim, hrvatskim i britanskim kovanicama.

Cer (*Quercus cerris* L.: Fagaceae) je veliko brzorastuće listopadno drvo visine 35–40 metara, sa stablom prečnika 1–2 metra i životnim vekom između 150 i 200 godina (de Rigo i sar., 2016; Vilotić, 2000). Cer prirodno raste u južnoj Evropi i Maloj Aziji i predstavlja dominantnu vrstu u mešovitim šumama u mediteranskoj oblasti. Cer raste na nižim i srednjobrdskim područjima.

Cer može da se prilagodi različitim tipovima zemljišta i klime. Najbolje uslove za rast nalazi na dubljim, suvim i slabo kiselim zemljištima, na krečnjačkoj ili silikatnoj podlozi, kao i na dobro navodnjenim zemljištima (Vilotić, 2000; Najib i sar., 2021). Tolerantniji je na sušu u odnosu na druge vrste hrasta u istom regionu (de Rigo i sar., 2016).

Tzvetkova i Kolarov (1996) su zapazili da listovi cera koji raste u regionu sa značajnim industrijskim zagađenjem akumuliraju velike količine toksičnih elemenata, ali u isto vreme postoje male razlike u koncentracijama šećera. Prema toj studiji, smatra se da ova osobina daje ceru veću toleranciju i otpornost na zagađenje vazduha u odnosu na druge vrste drveta koje rastu u istom regionu, zbog čega se cer preporučuje za pošumljavanje industrijskih područja.

U poređenju sa hrastom kitnjakom i hrastom lužnjakom, drvo cera je nižeg tehnološkog kvaliteta i ima tendenciju pucanja, zbog čega je njegova upotreba ograničena. Pored toga, cer poseduje manju otpornost i trajnost u odnosu na druge vrste hrasta što se može povezati sa niskim sadržajem ekstraktivnih supstanci i tanina u ovom drvetu (Barjaktari i sar., 2018; Najib i sar., 2021).

Drvo cera se upotrebljava kao građa, ogrevno drvo ili kao sirovina za proizvodnju drvenog uglja, a različiti delovi drveta, kao što su kora, drvo, lišće i kapice žira, koriste se i kao izvor tanina (Simeone i sar., 2019). Takođe, srčevina drveta različitog porekla ima crvenkastu boju koja se ceni u industriji furnira (Lavisci i Scalbert, 1991). Danas se drvo cera koristi za pravljenje buradi za odležavanje vina u Albaniji, kako bi dalo vinu ukus i boju (Najib i sar., 2021).

Cer ima korisnu upotrebu u pošumljavanju zemljišta i kontroli erozije zbog sposobnosti brzog rasta i prilagodljivosti različitim tipovima zemljišta (de Rigo i sar., 2016; Najib i sar., 2021). Takođe, cer se često sadi u gradskoj sredini kao ukrasno drvo.

### 2.1.2 Divlja trešnja

Divlja trešnja (*Prunus avium* (L.) L.: Rosaceae) je brzorastuće listopadno drvo srednjeg rasta i kratkog životnog veka (od 100 do 150 godina). Može da dostigne visinu od 15 do 32 metra i prečnik stabla od 90 cm do 120 cm (Welk i sar., 2016). Divlja trešnja je prirodno zastupljena u šumama sa umerenom klimom u Evropi, zapadnoj Aziji i severnoj Africi.

Prethodno navedeni autori i Vilotić (2000) su opisali uslove rasta divlje trešnje. Divlja trešnja uglavnom raste u polusenci, na ivici šume, u dolinama reka i na šumskim proplancima, kao retka i raštrkana vrsta. Može da raste na različitim tipovima zemljišta, međutim ona najbolje uspeva na dubokom rastresitom plodnom zemljištu sa dobrim snabdevanjem vode. Ne podnosi teška glinovita, preplavljena ili zemljišta koja zadržavaju vodu i može biti osetljiva na sušu.

Drvo trešnje ima veliku poroznost i stepen propuštanja kiseonika, a njen ekstrakt poseduje visok sadržaj jedinjenja podložnih oksidaciji (Cabrita i sar., 2012, De Rosso i sar., 2009a). Zbog ovih osobina se burad od trešnjinog drveta obično koriste za kratke periode odležavanja alkoholnih pića.

Trešnjino drvo je jedno od najcenjenijih u Evropi zbog njegove crvenobraon boje, masivnog i gustog drveta. Drvo trešnje je okarakterisano kao srednje teško, srednje tvrdo i čvrsto drvo lepe teksture, koje se lako obrađuje (Vilotić, 2000). Prema prethodno navedenoj referenci i Welk i sar., 2016, trešnjino drvo se koristi za proizvodnju furnira, dekorativno oblaganje, izradu ormara, muzičkih instrumenata i parketa, kao i za rezbarenje, izradu ukrasnih predmeta i drugo. Takođe, trešnja je veoma popularna kao ukrasno voćno drvo.

### 2.1.3 Džanarika

Džanarika (*Prunus cerasifera* Ehrh.: Rosaceae) je listopadni žbun ili malo drvo čija visina može da dostigne od 8 do 10 metara (Popescu i Caudullo, 2016). Ona prirodno raste u jugoistočnoj Evropi, zapadnoj i srednjoj Aziji. Sada je odomaćena na svim kontinentima na mestima sa umerenom klimom. Rasprostranjena je širom zemlje u svim vrstama mikro-klimatskih i uslova zemljišta.

Džanarika raste na otvorenim mestima, kao što su ivice šuma, otvorene šume i pored reka. Veoma je otporna vrsta sa minimalnim zahtevima osim za svetlošću i lako se prilagođava velikom broju staništa. Ona može da podnese mraz i sušu i otporna je na vetar. Uspeva na različitim tipovima zemljišta, između ostalog i na šljunkovitim, peskovitim ili zemljištima koja su osiromašena hranljivim sastojcima, ali ne i na zbijenom zemljištu (Popescu i Caudullo, 2016).

Džanarika se uglavnom gaji kao ukrasna biljka, zbog šarenih listova i brojnih cvetova, ili za proizvodnju plodova. Divlji crveni i ljubičasti plodovi džanarike poseduju visoku antioksidativnu aktivnost.

Džanarika ima veliki genetski značaj za hortikulturalno oplemenjivanje. Pošto je ova vrsta otporna na nekoliko bolesti šljive, neke sorte se koriste kao podloga za kalemljenje drugih voćnih vrsta i sorti roda *Prunus*, kao što su šljiva, kajsija i breskva. Pored toga, smatra se jednim od predaka gajene evropske šljive (*Prunus domestica*).

### 2.1.4 Beli dud

Beli dud (*Morus alba* L.: Moraceae) je brzorastuće listopadno drvo koje raste do visine od 20 metara i prečnikom debla do 1 metar, i može da dostigne životni vek od 250 godina (Vilotić, 2000; Radojković, 2012). Potiče iz Kine i uzgaja se skoro u celom svetu kao odomaćena vrsta. Beli dud je vrlo rasprostranjen u Srbiji, jer je Jugoslavija bila peti najveći proizvođač svile na svetu sa više od 2,5 miliona stabala belih dudova (Natić i sar., 2015). Beli dud se ranije u velikoj meri koristio za gajenje svilenih buba zbog lista kojim se one hrane, međutim danas se u većini evropskih zemalja beli dud uzgaja zbog ploda.

Dud je vrlo prilagodljiva vrsta koja može da raste u širokom opsegu klimatskih, topografskih i uslova zemljišta. Dud može da se nađe na svežem i plodnom zemljištu pored reke (Vilotić, 2000). Raste na različitim tipovima zemljišta od peskovite do glinovite ilovače ali najbolje uspeva na

dubokom, dobro dreniranom aluvijalnom ilovastom, neutralno do blago kiselom zemljištu (pH od 6 do 7,5) (<https://www.feedipedia.org/node/123>). Beli dud je tolerantan na siromašno zemljište, ali je veoma osetljiv na sušu.

Dud ima potencijal za remedijaciju zemljišta zagađenog metalima pošto je tolerantan na mnoge metale i ima sposobnost akumuliranja velike količine teških metala kao što su olovo i kadmijum sa porastom njihove koncentracije u zemljištu (Zhao i sar., 2013; Zhou i sar., 2015). Takođe, dud se koristi u te svrhe zbog svojih osobina kao što su visoka prilagodljivost, brz rast i velika biomasa iznad zemlje.

Prema jednom izvoru (Vilotić, 2000), drvo dudu je trajno, tvrdo i sjajno, dok je prema drugim izvorima (De Rosso i sar., 2009a; Cabrita i sar., 2012) drvo belog i crnog dudu (*Morus alba* i *Morus nigra*) meko i elastično koje karakteriše srednja poroznost. Navedene razlike u svojstvima drveta mogu biti posledica varijabilnosti anatomske i hemijske strukture usled genetskih faktora i uticaja životne sredine. Stepent ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz drveta dudu vodeno-alkoholnim rastvorom je veliki (De Rosso i sar., 2009a).

Beli dud se dugo koristi kao stočna hrana i različiti delovi dudu se koriste kao lek u tradicionalnoj medicini (Chen i sar., 2018; Aelenei i sar., 2019). Prema navedenim autorima, u Azijskim zemljama se kora belog dudu koristi kao antiupalno, hipoglikemijsko, antibakterijsko sredstvo i diuretik. U tradicionalnoj kineskoj medicini, listovi belog dudu se koriste protiv prehlade, groznice i hipertenzije, ali i za zaštitu jetre, poboljšavanje vida i diurezu. Grančica se koristi za lečenje reumatizma, dok se plod koristi kao okrepljujuće sredstvo i sedativ. Takođe, plodovi dudu se u Kini tradicionalno upotrebljavaju za lečenje upale grla, tonzilitisa i anemije. Plodovi dudu se koriste u ljudskoj ishrani zbog visoke nutritivne vrednosti i prijatnog ukusa.

Dud je cenjena vrsta za uređivanje zemljišta i gradskih naselja, pošto podnosi visok nivo zagađenja vazduha, kao i za stabilizaciju peščara (Natić i sar., 2015). Dud se sadi duž puteva, po parkovima, dvorištima i drugim mestima. Takođe, drvo dudu se koristi u stolarstvu, bačvarstvu, kolarstvu i za izradu furnira (Vilotić, 2000).

#### 2.1.5 Bagrem

Bagrem (*Robinia pseudoacacia* L.: Fabaceae) je brzorastuće listopadno drvo srednje veličine. Može da raste uspravno kao drvo sa jednim ili više stabala ili, u nepovoljnim uslovima, kao žbun sa više stabala. Drvo obično dostiže visinu od 20 metara kada raste kao drvo sa jednim stablom ili 30 metara kada raste u formi sa više stabala, dok na nekim mestima može da dostigne visinu čak do 35 metara. Drvo ima prečnik od preko 50 centimetara (Vilotić, 2000).

Ova vrsta drveta prirodno raste u Severnoj Americi i predstavlja jednu od najvažnijih i najrasprostranjenijih vrsta drveta koja je uvedena u Evropu. Uobičajeni životni vek bagrema je od 60 do 100 godina, dok u Evropi može da živi i preko 300 godina (Sitzia i sar., 2016). Prema ovom izvoru, bagrem uglavnom raste na mestima sa sredozemnom (submediteranskom) ili toplom kontinentalnom klimom. Takođe, bagrem ima kapacitet za rast klonova pošto proizvodi veliki broj izdanaka iz osnove drveta.

Bagrem uspeva na različitim tipovima zemljišta. Najbolje uspeva na rastresitom i plodnom peskovitom zemljištu (Vilotić, 2000). Drvo se lako oštećuje pod uticajem ekstremnih mrazeva zimi i teško se prilagođava u uslovima suše.

Koren bagrema, kao i kod ostalih vrsta porodice Fabaceae (sin. Leguminosae), ima simbiotsku vezu sa azotifikatorima, bakterijama koje poboljšavaju kvalitet zemljišta tako što pretvaraju azot iz vazduha u oblik dostupan biljkama. Bagrem može značajno da utiče na sastav zemljišta, odnosno da

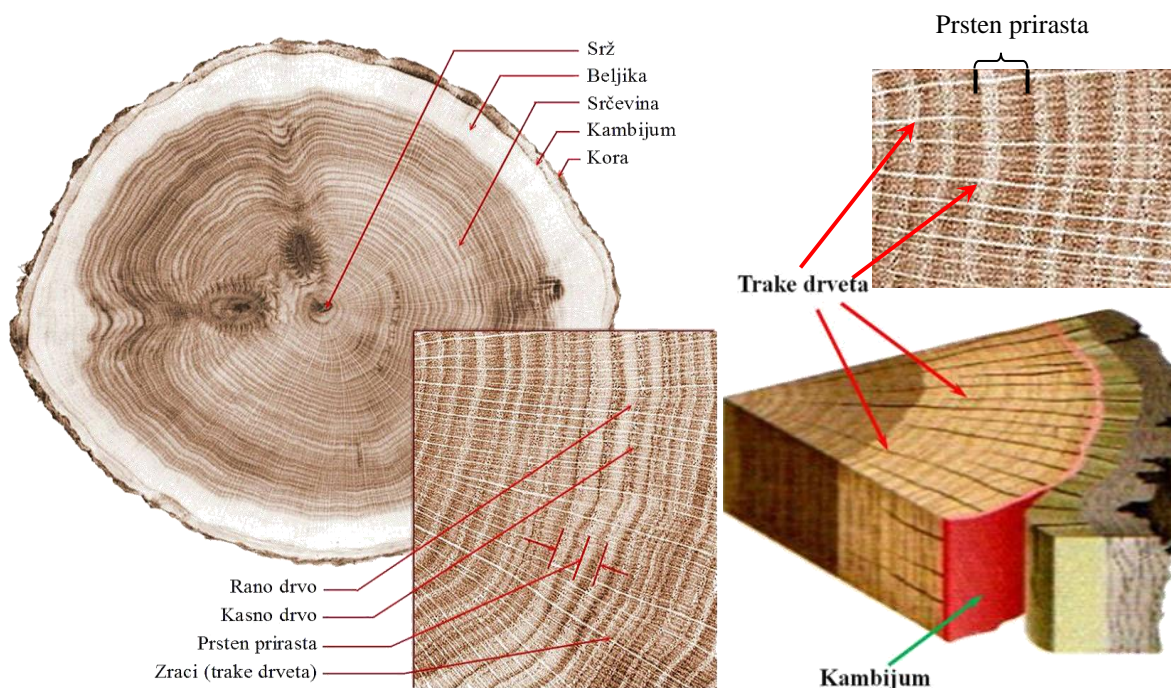
poveća sadržaj ukupnog azota u zemljištu, otpada i sadržaj organskog ugljenika, kao i da promeni pH zemljišta i da smanji sadržaj ukupnog fosfora. Zbog ove osobine i sposobnosti zaklanjanja bagrem može da utiče negativno na biodiverzitet i smatra se invanzivnom vrstom u Evropi (Sitzia i sar., 2016).

Drvo je trajno i otporno na truljenje i oštećenja izazvana insektima. Takođe, ono ima malu poroznost i mali stepen otpuštanja fenolnih jedinjenja u ekstrakt, međutim sadržaj polifenola podložnih oksidaciji je visok (De Rosso i sar., 2009a). Bagremovo drvo je tvrdo, teško, čvrsto i dugotrajno i koristi se u različite svrhe, kao građevinsko drvo, za bačve, u hemijskoj industriji, za dobijanje boja i tanina, i ogrevno drvo kao i za nameštaj i brodogradnju (Vilotić, 2000; Sitzia i sar., 2016). Pored toga, bagrem se koristi kao ukrasno drvo. Posebno se ceni kao medonosna vrsta za pčelarstvo (Mihajlović i sar., 2008).

## 2.2 Građa drveta

Glavni elementi anatomske građe lišćarskih vrsta drveta su parenhim, mehanički elementi (vlakna) i sprovodni elementi (traheje). Ovi anatomske elementi imaju specijalizovane funkcije: traheje obavljaju sprovodnu funkciju vode sa neorganskim supstancama, vlakna obavljaju mehaničku funkciju, a parenhimske ćelije obavljaju akumulacionu ulogu (Šoškić i Popović, 2002).

Kada se posmatra poprečni presek drveta, drvo se sastoji od kore, beljike, srčevine i srži. Detaljnija građa drveta prikazana je na **Slici 1**.



**Slika 1.** Građa drveta. Izvor:

<https://workshopcompanion.com/KnowHow/Design/Nature of Wood/1 Wood Grain/1 Wood Grain.htm>, <https://www.plantscience4u.com/2015/06/what-is-bark.html>

Ćelije koje čine drvo sastoje se od ćelijskih zidova, od kojih je većina izgubila žive funkcije. Beljika sadrži žive ćelije parenhima koje, kad odumru, stvaraju srčevinu. Prilikom prelaska beljike u srčevinu nastaju različite organske supstance koje impregniraju zidove ćelija, kao što su boje,



smole, eterična ulja, gumozne supstance, masne supstance, isparljiva ulja, soli organskih kiselina, tanini i drugo. Zahvaljujući prisustvu ovih supstanci, srčevina je prirodno trajnija i gušća kod većine vrsta drveta. Takođe, srčevina nekih vrsta drveta je otpornija na napade insekata i gljiva zahvaljujući prisustvu taninskih, fenolnih jedinjenja i eteričnih ulja (Šoškić i Popović, 2002).

Srčevina je manje propustljiva za toplotu i tečnosti od beljike, i njena propustljivost se razlikuje u zavisnosti od vrste drveta. Kada je ona nepropustljiva može se upotrebiti za pravljenje buradi za odležavanje alkoholnih pića.

Lišćarske vrste drveta se prema veličini traheja drveta mogu podeliti na prstenasto porozne i rastresito porozne vrste. Kod prstenasto poroznih vrsta drveta, traheje ranog drveta su značajno veće nego od poznog drveta i jasno se uočavaju golim okom, dok su kod rastresito poroznih vrsta drveta traheje ranog drveta približno iste ili malo veće u odnosu na traheje poznog drveta, jedva su uočljive ili se ne mogu uočiti golim okom (Vilotić, 2000). Hrast lužnjak, hrast kitnjak, cer, dud i bagrem su prstenasto porozne vrste drveta, dok se trešnja i džanarika svrstavaju u difuzno porozne vrste drveta (sitno prstenasto-porozne vrste drveta).

Anatomska građa hrastova je složenija u odnosu na druge lišćarske vrste, odnosno imaju veći broj elemenata koji učestvuju u njihovoj građi, velike varijacije u dimenzijama i različito procentualno učešće pojedinih tipova elemenata (Vilotić, 2000).

Kod nekih vrsta drveta može se zapaziti razlika u boji između beljike i srčevine u poprečnom preseku stabla drveta: beljika je bledo obojena, dok je srčevina tamno obojena (Yazaki, 2015). Vrste drveta ispitivane u ovoj disertaciji imaju obojenu srčevinu, što je opisano i u Vilotić (2000).

Beljika hrasta lužnjaka je svetložućkaste boje, širine do 3 cm, dok mu je srčevina tamnomrke boje. Beljika i srčevina hrasta kitnjaka su nešto svetlije boje nego kod lužnjaka. Beljika cera je bledožute ili crvenkasto-mrke boje, i znatno je šira u odnosu na beljiku hrasta lužnjaka i hrasta kitnjaka. Srčevina je tamno crvenkastomrke boje po kojoj se takođe cer razlikuje od hrasta lužnjaka i kitnjaka (Vilotić, 2000).

Lavisci i Scalbert (1991) su zapazili razliku u boji različitih delova srčevine cera, koja je posledica različitog sadržaja ekstraktivnih supstanci. Prema njima, unutrašnji deo srčevine drveta (deo koji je bliži srži drveta) sadrži manje fenolnih ekstrakta, ima crvenkast ton boje i manje je taman od spoljašnjeg dela srčevine (dela bližeg beljici). Za mnoge vrste drveta je zapaženo da sadržaj rastvorljivih polifenola opada od spoljašnjeg do unutrašnjeg dela srčevine (Lavisci i Scalbert, 1991). Pretpostavlja se da je razlog ove pojave spora oksidacija rastvorljivih fenolnih jedinjenja (fenolnih ekstraktivnih jedinjenja).

Za razliku od hrasta, dud, bagrem i trešnja imaju uzanu beljiku. Beljika dudu je žućkastobele do zelenkastožute boje, dok mu je srčevina zlatnosmeđe do tamnomrke boje. Bagrem ima beljiku žućkaste boje, i srčevinu žućkastomrke do žutozelene boje. Trešnja ima beljiku crvenkastobele boje, dok je srčevina crvenkastomrke boje (Vilotić, 2000). Razlike u boji ukazuju na različit hemijski sastav, kako unutar drveta, tako i između različitih vrsta drveta.

### 2.3 Hemijski sastav drveta

Hemijski sastojci drveta mogu se podeliti u dve grupe, osnovna organska jedinjenja (strukturne supstance) i sekundarne (ekstraktivne, nestrukturne) supstance. Osnovne (strukturne) supstance su organski makromolekuli nerastvorni u smeši alkohola i vode, i predstavljaju glavne hemijske sastojke drveta (Le Floch i sar., 2015). Strukturne supstance čine 94-98% drveta. U ove supstance se ubrajaju celuloza i hemiceluloze, koje čine osnovu i matriks ćelijskog zida drveta, i lignin,

polimer velike molekulske mase, koji je uglavnom zastupljen u ćelijskim zidovima. Nestrukturane supstance predstavljaju uglavnom jedinjenja male molekulske mase, kao što su ekstraktivne supstance, organska jedinjenja rastvorljiva u vodi, i neorganska jedinjenja.

Prema Šoškiću i Popoviću (2002), lišćarske vrste drveta sadrže 40-50% celuloze, 24-32% hemiceluloza i 20-25% lignina. Prema Sjöströmu i Alénu (1999), sastav drveta koje se koristi za pravljenje buradi je vrlo heterogen: celuloza (40-44%), hemiceluloze (15-35%), lignin (18-25%), ekstraktivne supstance (do 2%).

Sadržaj osnovnih hemijskih supstanci se ne razlikuje značajno među vrstama hrasta: celuloza (40%), hemiceluloze (25%) i lignin (20%) (Zhang i sar., 2015). Hemijski sastav hrasta lužnjaka i kitnjaka je karakterističan po značajnom sadržaju lignina, nešto nižem sadržaju celuloze, i izraženijem sadržaju ekstraktivnih supstanci (Klašnja i sar., 2006). U drvetu bagrema je sadržaj celuloze veći u odnosu na hrast, dok je sadržaj lignina niži. Drvo i grana šljive sadrže značajnu količinu lignina i celuloze.

Ekstraktivne supstance su relativno mali molekuli van ćelijskog zida koji se mogu ekstrahovati iz drveta organskim rastvaračima ili vodom (Valette i sar., 2017). One se mogu podeliti prema fiziološkoj funkciji na primarne biljne supstance (one se nalaze u svim biljkama i učestvuju u razmeni supstanci živih ćelija biljaka, odnosno održavaju njihovo funkcionisanje, na primer aminokiseline, proteini, ugljeni hidrati, fosfatidi, nukleinske kiseline), i sekundarne supstance (sekundarni ili specijalizovani metaboliti, ne pojavljuju se u svim biljkama jer ne učestvuju u razmeni supstanci) (Stevanović Janežić, 1993). Primarne supstance su zastupljene uglavnom u beljici, dok su sekundarne supstance karakteristične za srčevinu. Prema istom izvoru, prisustvo sekundarnih supstanci se vezuje za određena tkiva, zavisi od starosti drveta, položaja u stablu, geografskog porekla ispitivane vrste, brzine njenog rasta, kao i od eventualnih oštećenja drveta.

Sekundarne ekstraktivne supstance se sintetišu u drvetu kao zaštita protiv biotičkog i abiotičkog stresa (Valette i sar., 2017). Prema ovom izvoru, velika količina sekundarnih ekstraktivnih sastojaka može se naći i u čvorovima drveta, čak i više nego u srčevini, pošto orezivanje grana može da predstavlja faktor stresa pod čijim uticajem drvo proizvodi više ekstraktivnih supstanci. Sadržaj ekstraktivnih jedinjenja utiče na stepen razgradnje drveta, a time i na trajnost drveta.

Sastav ekstraktivnih supstanci u drvetu razlikuje se značajno u zavisnosti od vrste drveta i zavisi od dela stabla, geografskog porekla i doba godine kada je uzorkovano, kao i od uslova rasta drveta kao što su koncentracija ugljen-dioksida ili temperatura (Doussot i sar., 2002; Valette i sar., 2017).

Iako su prisutne u malim količinama, ekstraktivne supstance imaju uticaj na mnoga svojstva drveta, kao što su senzorska (boja, miris), mehanička i biološka svojstva (mikrobiološka zaštita), kao i na tehnološka svojstva drveta (Stevanović Janežić, 1993).

Boja drveta potiče od obojenih ekstraktivnih jedinjenja prisutnih u drvetu, kao i od nerastvorljivih polimera u drvetu koji nastaju oksidacijom i polimerizacijom nestrukturanih supstanci sa glavnim komponentama drveta (Yazaki, 2015). Prema Ugrenoviću (1950), tonovi boja drveta su sledeći: hrast lužnjak, dud i trešnja imaju žutosmeđi ton; hrast kitnjak ima svetlosmeđi ton; bagrem ima žutozeleni ton; dok šljiva i cer imaju crvenkastosmeđi ton boje.

### 2.3.1 Strukturne supstance drveta

Celuloza je polisaharid izgrađen od osnovnih jedinica  $\beta$ -D glukoze povezanih glikozidnom vezom u položaju 1-4. U ćelijskom zidu drveta veći broj molekula celuloze stvara čvrsta vlakna (mikrofibrile), i predstavlja jedini sastojak drveta potpuno nerastvorljiv u uobičajenim rastvaračima.

Sadržaj celuloze u svim vrstama drveta je približno isti ( $42 \pm 2\%$ ) i njen sadržaj zavisi od dela drveta, porekla materijala ili metoda ispitivanja (Šoškić i Popović, 2002). U literaturi se takođe navode i podaci po kojima postoje razlike u sadržaju celuloze između različitih vrsta drveta. Prema Fengelu i Wegeneru (1983), celuloza čini 41,1% drveta hrasta lužnjaka, dok je u bagremu sadržaj celuloze značajno veći u odnosu na hrast (50,1% drveta). U istom izvoru, navodi se da sadržaj celuloze u hrastu iznosi 40,5% (drvo), 39,9% (beljika), 37,6% (srčevina). Prema Stevanović Janežić i sar., 1995, sadržaj celuloze u hrastu lužnjaku iznosi 38,06% (srčevina) i 43,79% (beljika), dok je u hrastu kitnjaku 47,29% (drvo), 44,72% (srčevina), 45,30% (beljika). Sadržaj celuloze u dudu je 42,0-42,8% (Rahman i Jahan, 2014). Sadržaj celuloze u šljivi (*Prunus domestica*) je sličan kao u bagremu i iznosi 51,66% (stablo) i 53,26% (grana) (Kiaei i sar., 2014).

Hemiceluloze su organska polisaharidna jedinjenja izgrađena od heksozana i pentozana, čiji je stepen polimerizacije manji u odnosu na celulozu. One učestvuju zajedno sa celulozom u građenju ćelijskih zidova drveta. Lako se hidrolizuju i ekstrahuju iz zidova ćelija međutim, pošto se hemiceluloze nalaze duboko u slojevima zidova ćelija, njihova hidroliza i ekstrakcija zavise od položaja u zidu ćelije (Šoškić i Popović, 2002). Hemiceluloze kod listopadnog drveća čine pretežno pentozani, odnosno jedinice ksiloze. Najzastupljenije hemiceluloze hrasta su *O*-acetil-(4-*O*-metilglukurono)ksilani (oko 10%) (Kovač i sar., 2000), dok u ceru preovladavaju ksilani sa niskim sadržajem arabinoze i acetil-grupa (Barjaktari i sar., 2018).

Sadržaj hemiceluloza u drvetu se nalazi u opsegu između 15% i 35% i zavisi od faktora kao što su vrsta drveta, deo drveta i starost (Šoškić i Popović, 2002). U literaturi se navodi da je sadržaj pentozana za hrast iznosio 17,5%, za hrast lužnjak (*Q. robur*) 22,2%, a za bagrem 23,7% drveta (Fengel i Wegener, 1983). Stevanović Janežić i sar., 1995 su ispitivali sadržaj pentozana u srčevini i beljici hrasta lužnjaka i kitnjaka. Prema njima, sadržaj pentozana u srčevini iznosio je 28,16% (hrast lužnjak, *Q. robur*), odnosno 25,65% (hrast kitnjak, *Q. petraea*), dok je sadržaj u beljici iznosio 29,75% (hrast lužnjak, *Q. robur*), odnosno 30,63% (hrast kitnjak, *Q. petraea*). Sadržaj pentozana u dudu iznosi 18,3-18,8% (Rahman i Jahan, 2014).

Lignin je trodimenzionalni polimer koji se ugrađuje u ćelijski zid između vlakana celuloze i hemiceluloza. On popunjava i međućelijske prostore drveta, čini ih nepropustljivim i daje drvetu čvrstinu (Kovač i sar., 2000). Lignin se najvećim delom sastoji od fenolnih alkohola i srodnih jedinjenja (Del Río i sar., 2020). On nastaje kopolimerizacijom koniferil, kumaril i sinapil alkohola. U listopadnim vrstama drveta zastupljene su jedinice gvajacilpropana i siringilpropana (Šoškić i Popović, 2002). Sadržaj lignina je veći u srčevini nego u beljici, kao i u starijem drvetu u odnosu na mlađe drvo (Latorraca i sar., 2011).

Sadržaj lignina u hrastu iznosio je 22,2% (drvo), 24,9% (beljika), 24,5% (srčevina) (Fengel i Wegener, 1983). Prema istim autorima, sadržaj lignina u hrastu lužnjaku (*Q. robur*) iznosio je 29,6%. Stevanović Janežić i saradnici (1995) su ispitivali sadržaj lignina u hrastu lužnjaku i kitnjaku. Prema njima, sadržaj lignina u hrastu lužnjaku (*Q. robur*) iznosio je 26,56% (srčevina), 22,98% (beljika), dok je za hrast kitnjak (*Q. petraea*) iznosio 26,27% (drvo), 23,71% (srčevina) i 22,31% (beljika). Prema Pettersenu (1984), sadržaj lignina u različitim vrstama hrasta nalazio se u opsegu od 20,1% do 30,1%, dok je prema Puech-u (1981) sadržaj lignina u hrastu namenjenom za proizvodnju buradi u opsegu od 25,3% do 28,5%. Sadržaj ukupnog lignina u srčevini cera iznosi 26,4% (Barjaktari i sar., 2018). Sadržaj lignina u bagremu je iznosio 20,6% (Fengel i Wegener, 1983) dok je, prema Latorraca i saradnicima (2011), sadržaj lignina u srčevini ove vrste drveta 20,9-25,8%, a u beljici 19,8-23,2%. U dudu, sadržaj lignina iznosi 21,3-23,0% (Rahman i Jahan, 2014). Sadržaj lignina u šljivi (*Prunus domestica*) je viši u odnosu na druge vrste drveta i iznosio je 32,26% (stablo) i 33,62% (grana) (Kiaei i sar., 2014).

### 2.3.2 Ekstraktivne supstance

Sadržaj ekstraktivnih supstanci je ispitivan u toploj vodi, smeši etanola i benzena, kao i smeši etanola i vode. Ekstraktivne supstance čine prosečno 2-6% suve mase drveta, dok u izuzetnim slučajevima taj procenat može da dostigne vrednost od 20% do 25% (Šoškić i Popović, 2002).

U hrastu, ova jedinjenja čine oko 10% suve mase drveta (Kovač i sar., 2000). Fengel i Wegener (1983) navode da sadržaj jedinjenja rastvornih u vodi u hrastu lužnjaku iznosi 12,2%, dok sadržaj jedinjenja rastvornih u smeši etanola i benzena iznosi samo 0,4%. Prema Barjaktari i saradnicima (2018), sadržaj ukupnih ekstraktivnih supstanci u hrastu lužnjaku može da bude između 14,8% i 15,7%, od kojih supstance rastvorne u etanolu i vodi iznose oko 93% ukupnih ekstraktivnih supstanci. Prema istom izvoru, sadržaj ekstraktivnih supstanci u srčevini cera je niži u odnosu na hrast lužnjak i kitnjak i iznosi 6,7% (ukupne ekstraktivne supstance) i 5,7% (polarna jedinjenja rastvorna u etanolu i vodi). Sadržaj ekstraktivnih supstanci u bagremovom drvetu je niži u odnosu na hrast i iznosi 4,6% (jedinjenja rastvorna u toploj vodi) i 2,8% (jedinjenja rastvorna u smeši etanola i benzena) (Fengel i Wegener, 1983). Prema Latorraca i saradnicima (2011), sadržaj ukupnih ekstraktivnih supstanci u srčevini bagremovog drveta iznosi 3,9-8,8%, dok je za ovu vrstu drveta sadržaj ekstraktivnih supstanci u acetonu 3,1-3,8% (beljika) i 0,9-2,4% (srčevina). U šljivi (*Prunus domestica*), sadržaj supstanci rastvornih u toploj vodi je sličan kao za bagrem i iznosi 4,17% (stablo) i 3,44% (grana) dok sadržaj supstanci rastvornih u smeši etanola i acetona iznosi 2,85% (stablo) i 1,53% (grana) (Kiaei i sar., 2014).

Pored ovih podataka, ispitivan je sadržaj ekstraktivnih supstanci u različitim delovima hrasta. Prema Fengelu i Wegeneru (1983), sadržaj jedinjenja rastvornih u smeši etanola i benzena iznosi 2,4% za beljiku, odnosno 4,4% za srčevinu hrasta. S druge strane, Stevanović Janežić i sar. (1995) su ispitivali sadržaj jedinjenja rastvornih u vodi u beljici i srčevini hrasta lužnjaka i kitnjaka. Prema njima, hrast lužnjak je bogatiji u ovim jedinjenjima u odnosu na hrast kitnjak. Sadržaj jedinjenja rastvornih u vodi za hrast lužnjak iznosi 9,72% (srčevina) i 2,86% (beljika), dok je za hrast kitnjak 5,09% (srčevina) i 1,72% (beljika).

### 2.3.3 Podela ekstraktivnih supstanci

Sekundarne ekstraktivne komponente drveta se mogu podeliti u dve velike grupe: (1) alifatična i aliciklična jedinjenja (terpeni i terpenoidi, estri masnih kiselina, masne kiseline i alkoholi, alkani) i (2) fenolna jedinjenja (prosti fenoli, stilbeni, lignani, izoflavoni, kondenzovani tanini, flavonoidi i hidrolizujuć tanini) (Valette i sar., 2017).

Fenolna jedinjenja su jedna od najvećih i najzastupljenijih grupa specijalizovanih metabolita u biljkama. Ova jedinjenja su zastupljena u biljkama uglavnom u vezanom obliku (obično za šećere i proteine), koji je manje toksičan ili nije toksičan u poređenju sa slobodnim oblikom. Fenolna jedinjenja su uključena u mnoge funkcije u biljkama kao što su senzorne osobine (boja, miris, ukus), zaštita od insekata i drugih životinja, kao i razvoj i razmnožavanje biljke (de Lourdes Reis Giada, 2013).

Polifenolne ekstraktivne supstance drveta se mogu klasifikovati na sledeći način (Stevanović Janežić, 1993):

1. Prosti fenoli sa C6C1 ugljeničnim skeletom i hidrolizabilni tanini
2. Stilbeni sa C6C2C6 ugljeničnim skeletom ( $2 \times C6C1$ )
3. Fenilpropani sa C6C3 skeletom
4. Lignani sa C6C3-C6C3 skeletom ( $2 \times (C6C3-C6C3)$ )
5. Flavonoidi sa C6C3C6 ugljeničnim skeletom
6. Polimerni polifenoli izvedeni iz flavonoidnih monomera – tanini.

Fenolna jedinjenja poseduju u molekularnoj strukturi barem jedan aromatičan prsten supstituisan sa hidroksilnom grupom. Glavne klase fenolnih jedinjenja prema hemijskoj strukturi predstavljaju flavonoidi, fenolne kiseline, stilbeni, lignani i tanini, dok je detaljnija klasifikacija prikazana u **Tabeli 1**. U hrastovom drvetu, najzastupljenije su sledeće klase fenolnih jedinjenja: isparljiva fenolna jedinjenja, fenolne kiseline i elagitanini (Zhang i sar., 2015).

**Tabela 1.** Klasifikacija fenolnih jedinjenja u biljkama prema strukturi ugljeničnog skeleta (Zhang i sar., 2015)

Struktura	Klasa fenolnih jedinjenja
C6	Prosti fenoli
C6-C1	Fenolne kiseline i srodna jedinjenja
C6-C2	Acetofenoni i fenilsirćetne kiseline
C6-C3	Cimetne kiseline, cimetni aldehidi/alkoholi Kumarini, izokumarini, hromoni
C6-C1-C6	Benzofenoni, ksantoni
C6-C2-C6	Stilbeni
C6-C3-C6	Halkoni, auron, dihidrohalkoni Flavonoidi (flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanonoli, flavan-3-oli, izoflavonoidi, antocijanidini/antocijani)
(C6-C3-C6) <sub>2</sub>	Biflavonoidi
C6,C10,C14	Benzohinoni, naftahinoni, antrahinoni
C18	Betacijani
Dimeri ili oligomeri	Lignani, neolignani
Polimeri	Lignin
Polimeri	Flobafeni

Fenolne kiseline i njihovi estri su jedinjenja sa visokom antioksidativnom aktivnošću (de Lourdes Reis Giada, 2013). Zapaženo je da fenolne kiseline, kao što su galna kiselina, elaginska kiselina, vanilinska kiselina, protokatehuinska kiselina i *p*-kumarinska kiselina značajno doprinose ukupnom antioksidativnom kapacitetu ekstrakata drveta, što se može uočiti na osnovu korelacije između antioksidativnog kapaciteta i sadržaja ovih jedinjenja (Alañón i sar., 2011). Međutim, prema istom izvoru, ostale fenolne kiseline i fenolni aldehidi, kao što su protokatehuinski aldehyd, vanilin i siringaldehyd ne doprinose značajno antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata drveta. Fenolne kiseline mogu se podeliti na derivate cimetne i benzojeve kiseline.

Derivati benzojeve kiseline predstavljaju najjednostavnije fenolne kiseline u prirodi. One su karakteristične po tome što sadrže karboksilnu grupu supstituisanu na fenolu, odnosno imaju sedam atoma ugljenika u strukturi (C6-C1).

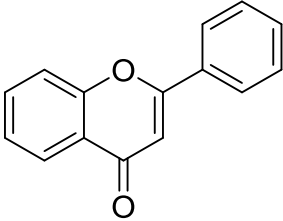
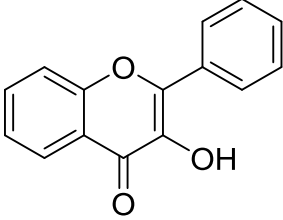
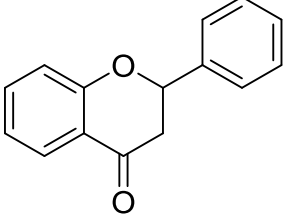
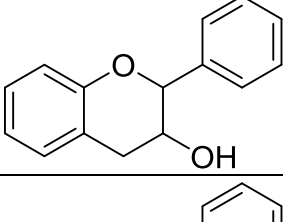
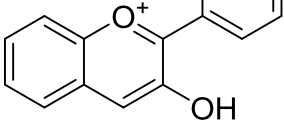
Derivati cimetine kiseline imaju devet ugljenikovih atoma u strukturi (C6-C3). Oni se obično javljaju u biljkama u obliku estara sa hininskom, šikiminskom i vinskou kiselinom (Vermerris i Nicholson, 2008). Najzastupljenija jedinjenja u prirodi iz ove klase su *p*-kumarinska, ferulinska, kofeinska i sinapinska kiselina (de Lourdes Reis Giada, 2013).

Flavonoidi su najzastupljenija i najviše ispitivana klasa fenolnih jedinjenja u hrani biljnog porekla (de Lourdes Reis Giada, 2013).

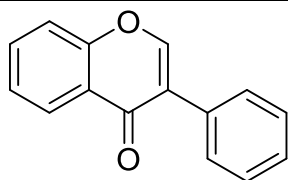
Flavonoidi su jedinjenja sa 15 ugljenikovih atoma raspoređenih u strukturi C6-C3-C6. U toj strukturi, dva benzenova jezgra (prstenovi A i B) povezana su grupom od tri ugljenikova atoma (C3 grupa), koja kod flavonoida obično grade šestočlani heterociklični prsten (prsten C). Prsten A potiče od kondenzacije tri malonil koenzim A molekula, zbog čega je u većini flavonoida ovaj prsten meta-dihidroksilovan ili meta-trihidroksilovan. B prsten potiče od *p*-kumaroil koenzima A. (Vermerris, Nicholson, 2008).

Klasifikacija flavonoida je izvršena prema opštem rasporedu C3 grupe. Glavne klase flavonoida čine flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli, antocijanidini ili antocijani i izoflavoni (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Klasifikacija flavonoida

Klasa flavonoida	Osnovna struktura
Flavoni	
Flavonoli	
Flavanoni	
Flavanoli	
Antocijanidini	

Izoflavoni



Tanini su fenolna jedinjenja čija je zajednička osobina da se vezuju sa proteinima. Oni se koriste u japanskoj i kineskoj tradicionalnoj medicini kao antiinflamatorna i antiseptička jedinjenja. Takođe, koriste se za lečenje raznih bolesti kao što su dijareja, i tumori želuca ili dvanaestopalačnog creva (Vermerris i Nicholson, 2008). Prema prethodno navedenom izvoru, tanini mogu biti zastupljeni u lišću, kori i plodovima i smatra se da mogu da zaštite biljku od infekcije i biljojeda.

Prema hemijskoj prirodi dele se na kondenzovane i hidrolizujuće tanine.

Hidrolizujući tanini se dele na galotanine i elagitanine. Hidrolizujući tanini u strukturi imaju glukozu ili polihidroksilni alkohol, delimično ili potpuno esterifikovanu sa galnom kiselinom (galotanini) ili heksahidroksidifenilnom kiselinom (elagitanini). Ksilem drvnih vrsta roda *Quercus* sadrži značajne količine ovih jedinjenja (Stevanović Janežić, 1993).

Galotanini u svojoj strukturi sadrže 10-12 ostataka galne kiseline. Za galotanine je karakteristična metadepsidna veza između ostataka galne kiseline, koja je mnogo slabija od veze u alifatičnom estru i može da se metanolizuje sa slabom kiselinom u metanolu (Vermerris i Nicholson, 2008).

Elagitanini su hidrolizujući tanini nastali iz pentagaloilglukoze koji, za razliku od galotanina, sadrže dodatne C-C veze između susednih galoil jedinica u molekulu pentagaloil glukoze. Ova C-C veza nastaje oksidativnim kuplovanjem između dve susedne galoilne jedinice i na ovaj način se gradi heksahidroksidifenilna kiselina (HHDP), koja može imati S- ili R- konfiguraciju. Intramolekulskom esterifikacijom heksahidroksidifenilne kiseline u vodenom rastvoru spontano nastaje elaginska kiselina, odakle potiče naziv elagitanini (Vermerris i Nicholson, 2008). Sadržaj elagitanina značajno utiče na antioksidativni kapacitet drveta (Alañón i sar., 2011).

Kondenzovani tanini, poznati i kao proantocijanidini, predstavljaju polimere ili kopolimere flavan-3-ola (katehina) i/ili leukoantocijanidina (flavan-3,4-diola) (de Lourdes Reis Giada, 2013). Prema istom izvoru, ova jedinjenja su polimerni flavonoidi koji su sastavni deo pigmenata antocijanidina i predstavljaju glavnu klasu fenolnih jedinjenja koja su odgovorna za oporost povrća. Oni se ne hidrolizuju lako pod uticajem kiselina, već su im potrebni rigorozniji uslovi kao što je zagrevanje u kiselini, pri čemu nastaju antocijanidini (Vermerris i Nicholson, 2008).

Stilbeni su jedinjenja koja u strukturi sadrže dva benzenova prstena povezana etenskim mostom. Veruje se da oni štite od kardiovaskularnih bolesti. Najviše proučavan stilben je resveratrol, jedinjenje zastupljeno u grožđu i vinu.

Prisustvo stilbena je karakteristično za srčevinu lišćarskih vrsta koje pripadaju familijama Leguminosae, Moraceae, Myrthaceae i Fabaceae (Stevanović Janežić, 1993). Prema istom izvoru, prisustvo stilbena značajno utiče na osobine drveta koje ga sadrži, naročito na njegova tehnološka svojstva, i može da uzrokuje tamnjenje drveta koje je izloženo svetlosti.

Lignani su sastojci alkoholnih ekstrakata srčevine različitih vrsta drveta, po strukturi jedinjenja koja sadrže dve fenilpropanske jedinice. Alkoholni ekstrakti srčevine drveta roda *Quercus*, kao i drugih rodova lišćara i četinara, sadrže lignane (Stevanović Janežić, 1993).

Kumarini su fenilpropanoidi, derivati cimetine kiseline koji su nastali ciklizacijom bočnog lanca *o*-kumarinske kiseline. Oni imaju kiseonični heterociklični prsten u C3 jedinici C6-C3 skeleta. Mnogi kumarini daju biljci otpornost na bolesti, štetočine i UV zračenje (Vermerris i Nicholson, 2008). U prirodi se češće nalaze u obliku glikozida, kao što su eskuletin i skopoletin (de Lourdes Reis Giada, 2013).

#### 2.3.4 Hemijski sastav i fitohemijski profil ispitivanih vrsta drveta

Sastav fenolnih ekstraktivnih jedinjenja i isparljivih jedinjenja do sada je praćen za ekstrakte drveta u etanolu, metanolu ili model-rastvoru vina, zatim u vinima, sirćetu ili alkoholnim pićima. Najčešće primenjivane tehnike su visokoeffikasna tečna hromatografija i gasna hromatografija. Obično je ispitivano drvo bez ikakvog tretmana, drvo podvrgnuto procesu prirodnog sušenja na otvorenom prostoru i drvo podvrgnuto termičkom tretmanu različitog intenziteta. Pošto je drvo najčešće ispitivano u kontekstu odležavanja alkoholnih pića, ispitivane vrste drveta su najčešće podvrgnute procesu prirodnog sušenja, sa ili bez termičkog tretmana.

Među vrstama drveta koje su predmet ove doktorske disertacije, postoji puno radova na temu ispitivanja sastava fenolnih ekstraktivnih jedinjenja i isparljivih jedinjenja hrasta lužnjaka i kitnjaka. U radovima starijim od deset godina često nije precizno navedena vrsta hrasta koja je ispitivana. Pored hrasta, trešnja je puno ispitivana, kao i bagrem. Za dud postoji nekoliko radova u kojima je ispitivan sadržaj isparljivih jedinjenja, dok se samo u jednom radu navodi sadržaj fenolnih jedinjenja ispitivanih uz pomoć tečne hromatografije. Cer i džanarika nisu dovoljno ispitivani. U jednom izvoru je ispitivan sadržaj isparljivih jedinjenja u različitim delovima dve sorte džanarike. Za cer nisu ispitivani sadržaj isparljivih i pojedinačnih fenolnih jedinjenja.

Tečnom hromatografijom ispitivan je hemijski sastav vina koje je odležavalo u kontaktu sa drvenim buradima (Sanz i sar., 2012b; Chinnici i sar. 2015), kao i poređenje hemijskog sastava vina koja su odležavala u drvenim buradima sa vinima koja su odležavala u kontaktu sa iverjem drveta (Fernández de Simón i sar., 2014a). Takođe je ispitivano vinsko sirće koje je odležavalo u drvenim buradima (Cerezo i sar., 2010) ili destilati tradicionalne rumunske jabukovače koji su odležavali u kontaktu sa fragmentima drveta (Coldea i sar., 2020). Pored toga su ispitivani ekstrakti usitnjenog drveta u model-rastvoru vina (vodeno-etanolni rastvor sa dodatim tartaratnim puferom) (Soares i sar., 2012; Chinnici i sar., 2015; Jordão i sar., 2016) ili u smeši metanol-voda (Alañón i sar., 2011; Sanz i sar., 2010, 2011, 2012a).

Gasna hromatografija je nešto ređe korišćena u odnosu na tečnu hromatografiju. Gasnom hromatografijom ispitivan je profil isparljivih komponenti vina koje je odležavalo u kontaktu sa drvenim buradima (De Rosso i sar., 2009b) ili ekstrakti usitnjenog drveta u rastvorima koji simuliraju alkoholna pića, kao što su vodeno-etanolni rastvor ili model-rastvor vina (vodeno-etanolni rastvor sa dodatim tartaratnim puferom) (Flamini i sar., 2007; De Rosso i sar., 2009a, Fernández de Simón i sar., 2009, 2014b; Jordão i sar., 2016). Takođe, ispitivani su destilati tradicionalne rumunske jabukovače koji su odležavali u kontaktu sa fragmentima drveta (Coldea i sar., 2020). Vanilin i eugenol se navode u literaturi kao glavna jedinjenja detektovana u drvetu koja poseduju visok intenzitet mirisa (Flamini i sar., 2007). Prema istom izvoru, navodi se da hrastovo i drvo bagrema imaju značajno veće količine vanilina i siringaldehida u odnosu na trešnju i dud.

##### 2.3.4.1 Hrast

Među vrstama drveta koje se koriste za odležavanje alkoholnih pića, drvo hrasta lužnjaka i hrasta kitnjaka je najviše ispitivano s obzirom da se najčešće koriste u te svrhe.

Iz različitih ispitivanja može se uočiti da je hrast bogat fenolnim kiselinama, isparljivim jedinjenjima, taninima, i praktično ne sadrži flavonoide (Zhang i sar., 2015).



Elaginska kiselina je karakterističan sastojak za uzorke sirćeta koji su odležavali u buradima napravljenim od kestenovog i hrastovog drveta (Cerezo i sar., 2010). Za hrast, kao i za kesten, karakteristično je prisustvo velikih količina elagitanina (Alañón i sar., 2011).

U hrastovom drvetu su elagitanini najviše zastupljeni u kori (Kovač i sar., 2000). Takođe, i beljika i srčevina hrasta sadrže elagitanine. Elagitanini čine oko 10% suve mase srčevine hrastovog drveta (Gadrat i sar., 2021). Zahvaljujući njima drvo poseduje veliku trajnost, visoku antioksidativnu aktivnost, kao i otpornost na razgradnju pod uticajem gljivica pošto su ova jedinjenja toksična za mikroorganizme i mogu da spreče brzo propadanje drveta. Takođe, prisustvo elagitanina u drvetu hrasta utiču na gorčinu i oporost ekstrakta.

Sadržaj elagitanina je veoma heterogen i zavisi od vrste hrasta i njegovog geografskog porekla, s tim da je američki hrast bogatiji njima u odnosu na evropske vrste (Kovač i sar., 2000). U vrstama hrasta koje se koriste za proizvodnju buradi dominiraju veskalagin i kastalagin, koji predstavljaju 40% - 60% ukupnih elagitanina, dok su u manjim količinama detektovani dimeri (roburin A i roburin D), kao i derivati liksoze/ksiloze (grandinin (proizvod kondenzacije veskalagina sa liksozom), roburin B, roburin C i roburin E) (Zhang i sar., 2015).

Takođe, prisustvo velikih količina isparljivih jedinjenja je karakteristično za hrastovinu, kao što su *cis* i *trans* izomeri  $\beta$ -metil- $\gamma$ -oktalakton i eugenol (Mosedale i Puech, 1998).

Prema Flamini i sar. (2007) i De Rosso i sar. (2009a), drvo hrasta ima najveću kvalitativnu i kvantitativnu zastupljenost isparljivih jedinjenja (broj isparljivih jedinjenja i njihovu količinu) u odnosu na druge vrste drveta koje se upotrebljavaju za odležavanje alkoholnih pića.

De Rosso i saradnici (2009a) navode da su glavna isparljiva jedinjenja u ekstraktu hrasta sledeća: furfural, benzaldehid, cinamaldehyd, vanilin, siringaldehid, koniferilaldehid, acetovanilon, 4-vinilgvajakol, eugenol, 4-etilgvajakol, gvajakol, 3-okso- $\alpha$ -jonol, *cis*- i *trans*- $\beta$ -metil- $\gamma$ -oktalakton. Hrastovo drvo sadrži više eugenola u odnosu na druge vrste drveta.

U ekstraktu hrasta, detektovane su značajne količine vanilina, siringaldehida, eugenola i metoksieugenola (Flamini i sar. 2007; De Rosso i sar., 2009a), kao i  $\alpha$ -terpineola i *cis*- i *trans*- $\beta$ -metil- $\gamma$ -oktalaktona (De Rosso i sar., 2009a).

Prema Díaz-Maroto i saradnicima (2008), jedinjenja sa visokim intenzitetom mirisa u hrastu koji nije podvrgnut termičkom tretmanu predstavljaju gvajakol, heksanal, *trans*-2-nonenal, *cis*- i *trans*- $\beta$ -metil- $\gamma$ -oktalakton, eugenol, vanilin i *trans*-izoeugenol, dok su, pored ovih jedinjenja, furfural, 4-metilgvajakol i *cis*-izoeugenol, važni za hrast podvrgnut termičkom tretmanu.

#### 2.3.4.2 Cer

Srčevina cera sadrži manje količine fenolnih jedinjenja i tanina u odnosu na hrast lužnjak i hrast kitnjak (Barjaktari i sar., 2018).

Prema Lavischi i Scalbertu (1991), sadržaj fenolnih jedinjenja je značajno niži u srčevini nego u beljici cera. Pored toga, ekstraktivne supstance u ceru činili su uglavnom proantocijanidini (kondenzovani tanini), koji čine oko 3% suve mase drveta. Identifikovani su tragovi elaginske kiseline u ceru, odsustvo elagitanina i prisustvo proantocijanidina (kondenzovanih tanina) u koncentraciji do 4 mg·g<sup>-1</sup> drveta.

### 2.3.4.3 Bagrem

U literaturi se može pronaći više radova u kojima su ispitivani ekstrakti drveta bagrema ili vina koja su odležavala u kontaktu sa bagremovim drvetom.

Ispitivanjem ekstrakta bagremovog drveta (Sanz i sar., 2012a), utvrđeno je da su za ovu vrstu drveta bili karakteristični galni i  $\beta$ -resorcilni aldehidi, kofeinska i  $\beta$ -resorcilna kiselina, dva neidentifikovana hidrokisicinična jedinjenja, kao i kondenzovani tanini prorobinetinskog tipa. Prema tom izvoru, za bagremovo drvo bez termičkog tretmana karakterističan je dihidrorobinetin, dok je za termički tretirano bagremovo drvo karakterističan robinetin. Prema drugoj studiji (Sanz i sar., 2012b), u kojoj je ispitivano vino koje je odležavalo u drvenim buradima, sledeća jedinjenja se izdvajaju kao potencijalni fenolni markeri autentičnosti za bagrem: velike količine dihidrorobinetina, zatim značajne količine robinetina, 2,4-dihidroksibenzaldehida, tetrahidroksidihidroflavonola, fustina, butina, trihidroksimetoksidihidroflavonola i 2,4-dihidroksibenzojeve kiseline. Prema Fernández de Simón i saradnicima (2014a), detektovano je ukupno 15 fenolnih jedinjenja kao potencijalnih markera za odležavanje crvenih, roze i belih vina u kontaktu sa bagremovim drvetom. Među ovim jedinjenjima, najzastupljeniji su bili dihidrorobinetin, zatim robinetin i za njim 2,4-dihidroksibenzaldehid, dok su ostala jedinjenja detektovana u značajnim količinama: četiri dihidroflavonola (fustin, tetrahidroksi-, trihidroksimetoksi- i pentahidroksi- dihidroflavonol), dva dihidroflavona (robtin i butin), jedan halkan (butein), jedan auron (tetrahidroksiauron), 2,4-dihidroksibenzojeva kiselina i tri neidentifikovana jedinjenja. Prema Zhang i saradnicima (2015), bagrem sadrži samo malu količinu kondenzovanih tanina i ne sadrži hidrolizujuće tanine.

Među isparljivim jedinjenjima, u literaturi se navodi da ekstrakt bagrema sadrži značajne količine siringaldehida i vanilina, ali ne sadrži eugenol (Flamini i sar., 2007; De Rosso i sar., 2009a). De Rosso i saradnici (2009a) navode da je u ekstraktu bagrema detektovana i značajna količina dihidroksibenzaldehida. Prema Flamini i saradnicima (2007), bagrem nije sadržao metoksieugenol, dok je prema De Rosso i saradnicima (2009a) detektovan metoksieugenol u malim koncentracijama.

Od isparljivih jedinjenja, navodi se da su rezorcinol i 3,4-dimetoksifenol detektovani jedino u bagremovom drvetu, i da mogu da doprinesu identifikaciji bagremovog drveta (Fernández de Simón i sar., 2014b).

### 2.3.4.4 Trešnja

Trešnjino drvo je bilo predmet velikog broja studija u cilju razmatranja njegove upotrebe za odležavanje alkoholnih pića. Ova vrsta drveta se izdvaja od ostalih vrsta po karakterističnoj boji i velikom sadržaju flavonoida, od kojih veliki broj ovih jedinjenja značajno doprinosi identifikaciji ekstrakata koji su odležavali u kontaktu sa trešnjom (Coldea i sar., 2020).

Prema Chinnici i saradnicima (2015), u trešnjinom drvetu su zastupljena fenolna jedinjenja uglavnom iz klase flavanola, flavanona, flavona i flavanonola. Među njima su najzastupljeniji flavanoli i procijanidini, dok su flavanoni činili drugu najrasprostranjeniju klasu jedinjenja. Oko 90% ukupne koncentracije flavanola u trešnjinom drvetu čine (+)-katehin i procijanidin dimer B tipa. Takođe, identifikovano je pet flavanona u ekstraktu drveta trešnje: eriodiktiol, naringenin, hesperetin, sakuranetin i pinocembrin. Ostali flavonoidi (uglavnom kvercetin i kempferol) su zastupljeni u ekstraktima u veoma malim količinama ( $<3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

Prema Sanz i saradnicima (2010), najzastupljenija jedinjenja u prirodno sušenom trešnjinom drvetu su flavan-3-oli, među kojima dominira (+)-katehin. Takođe, u prirodno sušenom trešnjinom drvetu

detektovan je veliki broj flavonoida sa koncentracijama u opsegu od  $20 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  do više od  $30\,000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  drveta, uglavnom flavan-3-ola ((+)-katehin, procijanidin dimer B tipa i procijanidin trimer B tipa, flavanoni (naringenin, izosakuranetin i eriodiktiol), i flavanonoli (aromadendrin i taksifolin), svi sa koncentracijama preko  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  drveta. Prema Alañón i saradnicima (2011), trešnja sadrži malu količinu elagitanina.

Sanz i saradnici (2012a) su detektovali sledeća jedinjenja samo u drvetu trešnje: fenolne kiseline i njihove estre kao što su benzoeva kiselina, *p*-hidroksibenzoeva kiselina, 3,4,5-trimetilfenol, *p*-kumarinska kiselina, metil-siringat i metil-vanilat, flavonoidi naringenin, aromadendrin, izosakuranetin i taksifolin, kao i velike količine kondenzovanih tanina procijanidinskog tipa. Prema Coldea i saradnicima (2020), *p*-hidroksibenzoeva kiselina nije karakteristična samo za ekstrakte koje su odležavali u kontaktu sa trešnjom, ali je zastupljena u količinama znatno većim nego kod većine drugih uzoraka ispitivanih u toj studiji. Prema njima, jedino je uzorak jabukovače koji je odležavao u kontaktu sa kestenom sadržao veće količine ovog jedinjenja.

Chinnici i saradnici (2015) su identifikovali eriodiktiol, sakuranetin, pinocembrin i hrizin kao moguće fenolne markere za vina koja su odležavala u kontaktu sa trešnjinim drvetom. Fernández de Simón i saradnici (2014a) su u crnim, roze i belim vinima tokom svih vremena odležavanja u prisustvu iverja trešnjinog drveta detektovali aromadendrin, naringenin, taksifolin i izosakuranetin u velikim količinama, a prunin i eriodiktiol u manjim količinama i pretpostavili su da bi navedena jedinjenja mogla da predstavljaju moguće fenolne markere odležavanja u kontaktu sa trešnjinim drvetom.

Prema Fernández de Simón i saradnicima (2014a), u vinima koja su odležavala u kontaktu sa trešnjinim drvetom detektovane su značajno veće koncentracije *p*-hidroksibenzoeve kiseline i (+)-katehina nego u ekstraktima koji su odležavali u kontaktu sa kestenovim, bagremovim, jasenovim i hrastovim drvetom. Coldea i saradnici (2020) su zapazili da su se destilati koji su odležavali u kontaktu sa trešnjinim drvetom izdvojili u odnosu na destilate koji su odležavali u kontaktu sa ostalim vrstama drveta koji su ispitivali prema najvećem sadržaju katehina, što je u skladu sa prethodnim zapažanjima. U suprotnosti sa ovim zapažanjima, De Rosso i saradnici (2009b) su detektovali najmanju koncentraciju (+)-katehina u vinima koja su odležavala u trešnjinom buretu, što se može objasniti najvišim stepenom oksidacije u tom buretu.

Ispitivanjem sirćeta koje je odležavalo u kontaktu sa različitim vrstama drveta, taksifolin je detektovan jedino u uzorcima koji su odležavali u kontaktu sa trešnjinim drvetom (Cerezo i sar., 2010).

Ortega-Vidal i saradnici (2021) izolovali su iz grana trešnje zaostalih nakon orezivanja sledeća jedinjenja: jednu fenolnu kiselinu (benzoevu kiselinu), kao i flavonoide iz sledećih klasa: flavanoli ((-)-katehin), flavanonoli ((-)-taksifolin, (+)-aromadendrin, i aromadendrin-7-*O*-glukozid), flavanoni ((-)-naringenin, naringenin-7-*O*-glukozid, sakuranetin, sakuranetin-5-*O*-glukozid, (+)-pinocembrin i likviritin), i flavoni (hrizin, tektohrizin, (+)-dihidrovogonin, dihidrovogonin-7-*O*-glukozid i apigenin). Vinciguerra i saradnici (2003) su uz pomoć gasne hromatografije identifikovali flavanone naringenin, sakuranetin, pinocembrin, pinostrobin i dihidrovogonin, flavone hrizin i tektohrizin, kao i dihidroflavonol aromadendrin-7-metiletar.

Među isparljivim jedinjenjima, u ekstraktu trešnje je identifikovano nekoliko derivata benzaldehida, ali ne u velikim količinama, kao i velika količina trimetoksifenola (Flamini i sar., 2007; De Rosso i sar., 2009a). Ekstrakt divlje trešnje je sadržao veoma male količine eugenola i metoksieugenola (De Rosso i sar., 2009a).

#### 2.3.4.5 Džanarika

Džanarika nije mnogo ispitivana. Postoji nekoliko istraživanja na temu sastava srčevine i otpada drveta šljive zaostalog nakon orezivanja, kao i različitih delova stabla džanarike, odakle može da se pretpostavi da je njihov sastav sličan.

Iz srčevine drveta šljive (*P. domestica*) izolovana su sledeća jedinjenja: pinocembrin, izosakuranetin, hrizin, naringenin i kvercetin, kaempferid, prudomestin, dihidrokempferid, kempferol i aromadendrin (Nagarajan i sar. 1977), kao i 5,7,4'-trihidroksi-3-metoksiflavanon, 3,5,7-trihidroksi-6,4'-dimetoksiflavanon i 3,5,7-trihidroksi-8,4'-dimetoksiflavanon (Parmar i sar., 1992).

Ispitivan je sadržaj isparljivih jedinjenja u različitim delovima dve sorte džanarike (Bandeira Reidel i sar., 2017). Prema njima, u stablu *Prunus cerasifera* 'Pissardii' su bili najzastupljeniji (E)-3-heksen-1-ol (18,6%) i limonen (20,7%), dok je u stablu *Prunus cerasifera* najzastupljeniji benzaldehid.

Song i saradnici (2018) su ispitivali lišće i grane džanarike (*Prunus cerasifera*) i zapazili su prisustvo kondenzovanih tanina koji sadrže afzelehin/epiafzelehin, katehin/epikatehin, i katehin/epikatehin kao glavne jedinice i katehin i epikatehin kao jedinice na krajevima (*terminal units*). Otpad drveta šljive zaostao nakon orezivanja imao je sličan fenolni profil kao grane džanarike. U ekstraktu drveta šljive sorte 'De la Rosa' (*Prunus domestica*) izolovano je i identifikovano devet jedinjenja (Ortega-Vidal i sar., 2022), od kojih su dva iz klase flavan-3-ola (katehin i epikatehin), zatim glukozid (anfenon) i šest dimernih proantocijanidina A tipa ((-)-*ent*-epikatehin-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-katehin, (-)-*ent*-epikatehin-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-epikatehin, (-)-*ent*-epiafzelehin-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-katehin, (+)-epiafzelehin-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-epikatehin, (+)-epiafzelehin-(2 $\beta$ →O→7,4 $\beta$ →8)-afzelehin i (-)-*ent*-epiafzelehin-(2 $\alpha$ →O→7,4 $\alpha$ →8)-epiafzelehin). Od navedenih jedinjenja, proantocijanidini su bili najzastupljeniji, sa ukupnim sadržajem od 8,51 mg·g<sup>-1</sup> suve mase drveta, zatim anfenon (2,34 mg·g<sup>-1</sup> suve mase drveta), i, na kraju, flavan-3-oli, sa ukupnim sadržajem od 1,43 mg·g<sup>-1</sup> suve mase drveta. Na osnovu ovih podataka može se primetiti da je šljiva potencijalni izvor proantocijanidina A tipa. Proantocijanidini poseduju mnoge biološke osobine kao što su antioksidativna, antikancerogena aktivnost, antimikrobna, neuroprotektivno i kardioprotektivno dejstvo, a među njima su procijanidini A tipa korisni u prevenciji infekcija urinarnog trakta (Raouf i sar., 2019).

#### 2.3.4.6 Dud

Drvo dudu je manje ispitivano u odnosu na hrast, bagrem i trešnju. Ispitivana su fenolna i isparljiva jedinjenja ekstrakata dudu ili alkoholnih pića (vina ili rumunskih jabukovača) koja su odležavala u kontaktu sa dudom.

U različitim delovima belog dudu identifikovani su terpenoidi, alkaloidi, flavonoidi (uključujući halkone i antocijane), fenolne kiseline, stilbeni i kumarini (Chan i sar., 2016).

Ispitivanjem destilata rumunske jabukovače koji su odležavali u kontaktu sa drvetom, velika količina dikafeoilhininske kiseline (94,68 ± 2,19 mg·L<sup>-1</sup> GAE), koja je kvantifikovana u odnosu na standard galne kiseline, bila je detektovana jedino u destilatima koji su odležavali u kontaktu sa dudom (Coldea i sar., 2020). Pored toga, hlorogena kiselina je takođe bila karakteristična za destilate koji su odležavali u kontaktu sa dudom ali i za kontrolni destilat bez dodatka drveta. To govori da navedene fenolne kiseline mogu da doprinesu identifikaciji drveta dudu.

Prema Zhang i saradnicima (2015), drvo dudu je karakteristično po visokom sadržaju polifenola, posebno oksiresveratrola i njegovih glikozida, kao i glikozida kumarina. Oksiresveratrol je analog

resveratrol koji sadrži dodatnu hidroksilnu grupu na aromatičnom prstenu, što poboljšava njegovu rastvorljivost u vodi. Oksiresveratrol poseduje antiinflamatornu, antioksidativnu, antiviralnu aktivnost, smanjuje sadržaj holesterola, deluje protiv gojaznosti, štiti jetru i deluje neuroprotektivno u prekliničkim studijama (Chen i sar., 2016). Takođe, poseduje fotozaštitno dejstvo i posvetljava kožu, što može da se primeni u kozmetologiji i dermatologiji.

Dud je imao najmanju kvalitativnu i kvantitativnu zastupljenost isparljivih jedinjenja u odnosu na druge ispitivane vrste drveta koje se koriste za odležavanje alkoholnih pića (Flamini i sar., 2007; De Rosso i sar., 2009a). U dudu je najzastupljeniji trimetoksifenol ( $2,07 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  drveta) a zatim siringaldehid ( $0,53 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  drveta), hidroksibenzaldehid ( $0,33 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  drveta), koniferilaldehid ( $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  drveta), vanilin ( $0,05 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  drveta) i gvajakol ( $0,04 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  drveta) Flamini i sar. (2007). Eugenol je detektovan u tragovima, dok metoksieugenol nije detektovan (De Rosso i sar., 2009a).

### 2.3.5 Mineralni sastav

Azot, fosfor, kalijum, kalcijum i magnezijum predstavljaju najvažnije makroelemente u drvetu, dok su bakar, cink, kobalt, bor, molibden, nikl, gvožđe i mangan najvažniji mikroelementi u drvetu (Ćirić, 1991). Mineralni sastav drveta zavisi od vrste drveta, uslova njegovog rasta (zemljište, klima i životna sredina), dela drveta i vremena kada je drvo posečeno (Szczepkowski i Nicewicz, 2008).

Koren drveta apsorbuje minerale i teške metale uglavnom iz zemljišta, zatim se u beljici grade kompleksna jedinjenja koja se transportuju u ostale delove drveta. Teški metali u zemljištu mogu imati geohemijsko i / ili antropogeno poreklo (industrijsko zagađenje i đubrenje zemljišta). Kiselost zemljišta povećava dostupnost teških metala zato što se grade kompleksna jedinjenja koju drveće lakše apsorbuje, dok đubrenje, uglavnom fosfatnim đubrivima, može da utiče na povećan nivo teških metala u zemljištu.

Korenje i stablo (posebno godišnji prstenovi prirasta (godovi)) predstavljaju glavna tkiva za akumulaciju teških metala u višegodišnjim biljkama (Ličina i sar., 2017). Biljke koje su tolerantne na teške metale u procesu detoksikacije skladište (gomilaju) više neesencijalnih metala u ćelijski zid i vakuole kako bi sprečile oštećenja mnogo osetljivijih puteva ćelijskog metabolizma (Weng i sar., 2012). Takođe, ove biljke imaju potencijal da koncentruju i uklanjaju teške metale iz zagađenog zemljišta i time da čiste zemljište. Zbog toga, drvenaste biljke sa umerenim kapacitetom da skladište teške metale u nadzemnim delovima mogu da se upotrebljavaju kao alternativa za uklanjanje ili stabilizaciju metala iz kontaminiranog zemljišta. Ove biljke su brzorastuće, imaju duboko i rašireno korenje i proizvode veliku biomasu (Zhou i sar., 2015).

Mineralni sadržaj drveta može da se odredi preko sadržaja pepela, odnosno ostatka posle potpunog sagorevanja drveta. Samo deo mineralnih sastojaka drveta je rastvoran u vodi ili mineralnim kiselinama. Najveći sadržaj pepela se nalazi u metabolički-fiziološki najaktivnijim delovima (lišću), a zatim, po opadajućem sadržaju supstanci mineralnog porekla, slede kora, korenčići, grančice, korenje, grane i stablo (Stevanović Janežić, 1993).

Prema prethodno navedenoj referenci, drveće umereno kontinentalne klime obično sadrži između 0,2% i 1% pepela, dok tropske vrste mogu da sadrže više od 5% pepela. Prema Fengelu i Wegeneru (1983), sadržaj pepela u beljici hrasta je 0,5%, a u srčevini je 0,3%, dok je sadržaj pepela u drvetu hrasta lužnjaka (*Q. robur*) i bagremovom drvetu isti i iznosi 0,3%. Sadržaj pepela u drvetu cera je povišen u odnosu na hrast i bagrem, i iznosi 0,93% (Barjaktari i sar., 2018). Sadržaj pepela u dudu je veći u odnosu na prethodno navedene vrste drveta i iznosi 2% (Rahman i Jahan, 2014).

Na osnovu sadržaja neorganskih supstanci izraženih po elementima, mogu da se izdvoje glavni sastojci pepela (preko 50 ppm) i elementi u tragovima (manje od 50 ppm). Neki elementi u

tragovima, kao što su gvožđe, mangan, bor, bakar, kobalt, nikl i cink, imaju izuzetan značaj u fiziologiji biljaka (Stevanović Janežić, 1993). Prema prethodno navedenim autorima, glavni katjoni koji se javljaju u pepelu drveta su katjoni kalcijuma, kalijuma i magnezijuma, dok su uobičajeni anjoni u pepelu drveta karbonatni i sulfitni anjon, kao i oni koji odgovaraju fosfor-pentoksidu i silicijum-dioksidu. Kalcijum je najrasprostranjeniji element pepela drvnih vrsta umereno kontinentalne zone koji, računat kao CaO, može da čini od polovine do tri četvrtine sadržaja ukupnog pepela. Sadržaj kalijuma, računat kao K<sub>2</sub>O, čini između 10% i 30% pepela i može da bude značajan za potencijalnu upotrebu pepela iz drveta kao đubriva. Sadržaj MgO u pepelu drveta varira između 5% i 10%. Pored ovih elemenata, u pepelu uobičajenih vrsta drveta pojavljuju se u promenljivom sastavu i katjoni Fe, Al, Mn i Na, kao i hloridni anjon. Sadržaj mangana u pepelu je obično manji od 1%, dok ga neke vrste drveta sadrže u većim količinama.

Drvo koje se koristi za odležavanje alkoholnih pića smatra se materijalom koji dolazi u kontakt sa hranom, koji je regulisan u Evropskoj Uniji Uredbom EC 1831/2003, i predstavlja jedan od izvora metala u alkoholnom piću. Prilikom odležavanja alkoholnih pića u kontaktu sa drvetom može doći do oslobađanja toksičnih metala i drugih elemenata iz drveta u rakiju, što u velikoj meri utiče na njen kvalitet i bezbednost.

Sadržaj metala u alkoholnim pićima regulišu i kontrolišu lokalne vlasti, međutim većina voćnih rakija se tradicionalno proizvodi i prodaje na lokalnom tržištu bez ikakve kontrole (Ivanova-Petropulos i sar., 2017). Takođe, ne postoji uredba o sadržaju metala u letvama i komadićima drveta koja se koristi u domaćoj proizvodnji.

Nema puno dostupnih podataka o mineralnom sastavu ekstrakata drveta. Ispitivan je sadržaj teških metala kao i elemenata u tragovima u rakijama (Bonić i sar., 2013; Ivanova-Petropulos i sar., 2017), i u vinu (Orescanin i sar., 2003). Obično se prati koncentracija teških metala u vinu, kao što su Cu i Pb, pošto je apsorpcija ovih elemenata u gastrointestinalnom traktu visoka (u opsegu od 45% do 98% za Cu i 16–75% za Pb). Dnevni unos vina i rakije sa visokim sadržajem teških metala može da izazove hronično trovanje. Kako bi se izbegao ovaj problem, utvrđena je maksimalna dozvoljena koncentracija (MDK, mg·L<sup>-1</sup>) u rakijama sa sledećim vrednostima: Pb (0,5 mg·L<sup>-1</sup>), Zn (2 mg·L<sup>-1</sup>), As (10 mg·L<sup>-1</sup>), i Cu (10 mg·L<sup>-1</sup>) (Bonić i sar., 2013).

## 2.4 Antimikrobna aktivnost

Rezistencija patogena na lekove je globalni problem. Rezistentni patogeni mogu da uzrokuju stanja opasna po život koja se ne mogu lečiti sa jednim ili više poznatih lekova koji su do sada korišćeni u te svrhe. Razvijanje alternativnih lekova izolovanih iz prirodnih izvora predstavlja atraktivnu opciju, zato što mnogi flavonoidi izolovani iz biljaka imaju različite mehanizme antibakterijske aktivnosti u odnosu na konvencionalne lekove, i pošto su neželjena dejstva jedinjenja izolovanih iz biljaka minimalna u odnosu na sintetičke lekove (Górniak i sar., 2019).

Prema prethodno navedenom izvoru, minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) i minimalna baktericidna koncentracija (MBC) predstavljaju važne parametre za ispitivanje antimikrobne aktivnosti. Određivanje MIC obično predstavlja prvi korak prilikom ocenjivanja novih antimikrobnih agenasa. MIC predstavlja minimalnu koncentraciju koja uzrokuje vidljivu inhibiciju rasta bakterija. Biljni ekstrakti sa MIC < 100 µg·mL<sup>-1</sup> kao i prečišćena jedinjenja sa MIC < 10 µg·mL<sup>-1</sup> smatraju se potencijalno korisnim. Pored vrednosti MIC, MBC takođe predstavlja važan parametar u ispitivanju antimikrobne aktivnosti. Vrednost MBC manja od četvorostruke vrednosti MIC ukazuje na baktericidnu aktivnost testiranog jedinjenja.

Pretpostavlja se da fenolna jedinjenja mogu da oštete ćelijsku membranu bakterija tako što interaguju sa proteinima ćelijske membrane ili sa ćelijskim enzimima (Alañón i sar., 2015). Na ovaj način, oni mogu direktno ili indirektno da uzrokuju metaboličku disfunkciju i, na kraju, smrt

bakterije (Hartmann i sar., 2010). Fenolna jedinjenja mogu da inhibiraju 'quorum sensing' signalne receptore bakterija, enzima, kao i izlučivanje toksina (Cushnie i Lamb, 2010). Na rast bakterija utiču soj bakterije, kao i tip, struktura i koncentracija fenolnih jedinjenja. Velike koncentracije fenolnih jedinjenja mogu biti toksični za bakterije, dok se manje koncentracije mogu koristiti kao supstrati (Alañón i sar., 2015).

Poznato je da je drvo bogat izvor fenolnih jedinjenja. Brojna ispitivanja su sprovedena kako bi se utvrdila antimikrobna aktivnost ekstrakata drveta, i došlo se do zanimljivih zaključaka. Drvo hrasta je bogato taninima, koji su toksični za mikroorganizme i štite drvo od raspadanja pod uticajem gljivica (Zhang i sar., 2015).

Metanolni ekstrakt (80%, v/v) kore hrasta (*Q. robur*) pokazao je umerenu baktericidnu, fungicidnu, bakteriostatsku i fungistatsku aktivnost na *S. aureus*, *Enterobacter aerogenes* (danas poznata kao *Klebsiella aerogenes*) i *C. albicans* (Andrenšek i sar., 2004). Kora hrasta lužnjaka (*Q. robur*) pokazala je jaku antibakterijsku aktivnost na *Pseudomonas aeruginosa*, *M. flavus* i *E. coli*, kao i umerenu aktivnost na druge vrste bakterija (Elansary i sar., 2019).

Cer se upotrebljava u tradicionalnoj mediteranskoj medicini kao terapija protiv infektivnih bolesti i u druge svrhe. Ekstrakt različitih delova cera (list, stablo, plod) ima izraženu aktivnost u inhibiciji stvaranja biofilma stafilokoka (Hobby i sar., 2012).

Ispitivanjem dejstva ekstrakta različitih vrsta hrasta (*Quercus macranthera* Fisch. & Mey. ex Hohen subsp. *sypirensis* (C. Koch.) Menitsky, *Q. cerris* L., *Q. pubescens* Willd., i *Q. coccifera* L.) na mikroorganizme (dve standardne gram pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*; dve standardne Gram negativne bakterije: *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*; i tri gljivice: *Candida albicans*, *C. krusei* i *C. parapsilosis*), ustanovljeno je da su sve ispitivane vrste imale dobru antifungalnu aktivnost, naročito prema *C. krusei* (Şöhretoğlu i sar., 2007). Takođe, za sve ispitivane vrste je antibakterijska aktivnost bila manje izražena nego antifungalna aktivnost, dok ekstrakti *Q. cerris* i *Q. pubescens* nisu pokazali antibakterijsku aktivnost.

Srčevina i smola trešnjinog drveta pokazuju antifungalnu aktivnost i imaju karakteristiku da inhibiraju citohrom (McNulty i sar., 2009), dok ekstrakti drveta trešnje pokazuju značajnu antimikrobnu aktivnost na 9 od 11 testiranih sojeva vinskih organizama, odnosno na sledeće sojeve: *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, dva soja *Oenococcus oeni*, *Gluconobacter oxydans*, tri soja *Bretanomyces bruxellensis* (Alañón i sar., 2015).

Ispitivana je antimikrobna aktivnost ekstrakta i pojedinačnih jedinjenja dobijenih od orezanih grana trešnje i šljive (Ortega-Vidal i sar., 2021, Ortega-Vidal i sar., 2022), na sledeće mikroorganizme: *Salmonella enterica*, *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus casseliflavus*, *E. faecium*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Lactobacillus casei*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella terrigena*, *Enterobacter sp.* i *Salmonella sp.* Prema ovim studijama, jedinjenja iz trešnje i šljive pokazala su značajnu antimikrobnu aktivnost jedino na multirezistentni soj bakterije *Enterobacter sp.*, za koji je karakteristična visoka tolerancija na različite biocide. Sva izolovana jedinjenja iz šljive, kao i neka jedinjenja izolovana iz trešnje (katehin, taksifolin, aromadendrin, pinocembrin i tektohrizin) pokazala su MIC vrednosti od  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  na ovu rezistentnu bakteriju. Takođe, taksifolin se izdvojio kao jedinjenje koje može da inhibira nastajanje biofilma (na koncentraciji od  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) mikroorganizma *Enterobacter sp.* ili uzrokuje oštećenje već nastalog biofilma ovog mikroorganizma (na koncentraciji od  $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Za (+)-katehin se zna da poseduje jaku antimikrobnu, antioksidativnu, antifungalnu i antitumornu aktivnost, pri čemu je uočeno da (+)-katehin poseduje antibakterijsku aktivnost na grupu Gram-negativnih biljnih patogena (Veluri i sar., 2004).

## 2.5 Elektrohemijska karakterizacija

Elektrohemijske metode su brze i osetljive metode, koje omogućavaju analizu različitih matriksa bez potrebe za komplikovanom pripremom uzoraka i po relativno niskoj ceni. Među ovim metodama, ciklična voltometrija (CV) je široko prihvaćena za ispitivanje elektrohemijskog ponašanja i antioksidativnog kapaciteta, dok se diferencijalna pulsna voltometrija (DPV) često koristi za detekciju različitih analita zbog toga što je jednostavna elektroanalitička metoda sa širokim operativnim opsegom i niskim granicama detekcije.

Do sada su mnogi autori ispitivali antioksidativna svojstva alkoholnih pića koja su odležavala u kontaktu sa drvetom uz pomoć direktnih elektrohemijskih metoda. Antioksidativna svojstva vina i polifenola vina ispitivana su uz pomoć ciklične voltetrije uz korišćenje elektrode od staklastog ugljenika (Kilmartin i sar., 2001). Alonso i saradnici (2003) su razvili elektrohemijsku metodu zasnovanu na elektrohemijskoj oksidaciji ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) radikala za određivanje antioksidativne aktivnosti proizvoda na bazi grožđa kao što su vino, rakija i sirće. Gay i saradnici (2010) su pratili odležavanje crvenih vina na tri različita načina (u drvenim buradima, korišćenjem duga i mikroksigenacijom (*micro-oxygenation*) uz pomoć elektronskog jezika (*electronic tongue*). Antioksidativni kapacitet konjaka i brendija ispitivan je uz pomoć hronoamperometrije (Ziyatdinova i sar., 2014a) i diferencijalno pulsne voltetrije (Ziyatdinova i sar., 2014b), uz korišćenje elektrode od staklastog ugljenika modifikovane višeslojnim ugljeničnim nanocevima (*multi-walled carbon nanotube (MWNT) modified glassy carbon electrode*) u oba slučaja. Pored toga, Ziyatdinova i saradnici (2015) su ispitivali potencijal kulometrijske titracije, diferencijalno pulsne voltetrije i hronoamperometrije za procenjivanje kvaliteta brendija na osnovu antioksidativnog kapaciteta. Guiberteau-Cabanillas i saradnici (2015) razvili su metodu za elektrohemijsku karakterizaciju i određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja sa niskim oksidacionim potencijalom u vrućoj vodi koja se koristi u industrijskoj proizvodnje plute, za koju se zna da je bogata fenolnim jedinjenjima, uz korišćenje štampane elektrode modifikovane grafenom. Sánchez-Guillén i saradnici (2017) su određivali antioksidativni kapacitet alkoholnih pića koja su odležavala u kontaktu sa hrastovim drvetom, kao što su brendi, staro vino i slatko vino uz pomoć elektrohemijskih i fotohemiluminescentnih metoda.

Elektrohemijske metode su takođe korišćene za određivanje antioksidativnog kapaciteta nekih vrsta drveta ili tanina izolovanih iz drveta. Ciklična voltometrija i diferencijalna pulsna voltometrija su korišćene za određivanje antioksidativnog kapaciteta ekstrakta različitih delova drveta *Bunchosia glandulifera* (Jacq.) Kunth (kora, listovi, korenje, voćna pulpa i seme) (de Menezes Peixoto i sar., 2017). Wirth i saradnici (2021) su upotrebili linearnu voltetriju (voltetriju sa linearnom promenom potencijala) za analizu fragmenata hrasta (iverje, granule, letve) podvrgnutih termičkom tretmanu. Doménech-Carbó i saradnici (2017) su ispitivali arheološke objekte napravljene od različitih vrsta drveta cikličnom voltetrijom. Takođe, ispitivani su komercijalni enološki tanini uz pomoć ciklične voltetrije (Ricci i sar., 2019).

U raspoloživoj literaturi do sada nije ispitivan sadržaj antioksidanasa u ekstraktima drveta koja se upotrebljavaju za odležavanje alkoholnih pića uz pomoć ciklične voltetrije ili diferencijalno pulsne voltetrije.

## 2.6 Prirodno i veštačko sušenje drveta

Sveže posečeno drvo sadrži 70% vlage i nije pogodno za odležavanje alkoholnih pića, pošto sadrži višak fenolnih jedinjenja koji prenose gorak ukus kao što su elagitanini i kumarini. Drvo koje se koristi za odležavanje alkoholnih pića se obično suši na otvorenom prostoru (prirodno sušenje drveta) ili u sušnici (veštačko sušenje drveta).



Prirodno sušenje drveta podrazumeva izlaganje drveta vremenskim uslovima na otvorenom prostoru i obično traje između 18 i 36 meseci (Fernández de Simón i sar., 2010). Tokom prvih 10 meseci prirodnog sušenja dolazi do intenzivne dehidracije, a nakon tog perioda drvo sazreva, odnosno poboljšava svoje fizičke i aromatične osobine (dos Santos, 2017).

Tokom procesa prirodnog sušenja, događaju se različiti fizičko-hemijski procesi, koji doprinose smanjivanju vlažnosti drveta, kao i smanjivanju gorčine i oporosti. Vlaka drveta se skupljaju i vlažnost se smanjuje dok se ne uspostavi ravnotežno stanje sa vlažnošću vazduha. Pored toga smanjuje se sadržaj fenolnih jedinjenja rastvorljivih u vodi kao što su elagitanini, pod uticajem različitih fizičkih i hemijskih procesa kao što su ispiranje pod uticajem kiše, hidroliza i oksidacija uz učestvovanje enzima ili gljivica (Fernández de Simón i sar., 2010). Ova promena je najizraženija u prvih nekoliko milimetara daske drveta (Zhang i sar., 2015).

U procesu prirodnog sušenja drveta, menja se njegov hemijski sastav i profil isparljivih jedinjenja. Procesom prirodnog sušenja, naročito u toplim klimatskim uslovima, povećava se sadržaj isparljivih fenolnih jedinjenja i fenolnih aldehida, kao što su eugenol, vanilin, siringaldehid, koniferilaldehid i sinapaldehid (Zhang i sar., 2015). Tokom prirodnog sušenja hrasta povećava se koncentracija različitih aromatičnih jedinjenja, kao što su eugenol, siringaldehid i vanilin nastali razgradnjom lignina, kao i oba izomera  $\beta$ -metil- $\gamma$ -oktalaktona, među kojima dominira *cis* oblik (dos Santos, 2017). Prema navedenom autoru, mikroorganizmi mogu u različitoj meri da utiču na smanjenje koncentracija ovih jedinjenja.

Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da proces prirodnog sušenja uglavnom pozitivno utiče na sastav isparljivih jedinjenja i senzorne osobine drveta (Fernández de Simón i sar., 2010).

Pod veštačkim sušenjem podrazumeva se držanje dasaka drveta jedan mesec u sušnici na temperaturi od 40 °C do 60 °C uz stalnu ventilaciju (Kovač i sar., 2000). Ovom tehnikom se značajno smanjuje vreme sušenja i ne menjaju se fizička svojstva drveta međutim, sveže drvo mora da se postepeno suši, kako bi se izbegle pukotine zbog skupljanja drveta tokom sušenja. Pošto se, u odnosu na veštačko sušenje, tokom prirodnog sušenja događa mnogo više reakcija koje imaju pretežno pozitivan efekat na sastav isparljivih komponenti i senzorne karakteristike drveta, prirodno sušenje se smatra boljom tehnikom u odnosu na veštačko sušenje (Fernández de Simón i sar., 2010).

## 2.7 Primena drveta za odležavanje alkoholnih pića

Proizvodnja domaće rakije je veoma zastupljena u Srbiji i procenjuje se da se godišnje proizvede više od 50 miliona litara.

Odležavanje nekih alkoholnih pića u kontaktu sa drvetom predstavlja proces koji se primenjuje u cilju poboljšanja senzorskih svojstava, kao što su boja, ukus i aroma pića.

Tokom odležavanja alkoholnih pića, događaju se različite fizičke i hemijske interakcije usled kontakta alkoholnih pića i površine drveta, kao što su ekstrakcija malih molekula iz drveta i postepena razgradnja sastojaka drveta (Cernísev, 2017; Mosedale i Puech, 1998). Pored navedenih promena, takođe dolazi do povećavanja antioksidativnog kapaciteta i sadržaja fenolnih jedinjenja u alkoholnim pićima (Alañón i sar., 2011). Prema navedenom izvoru, blaga oksidacija pojedinih fenolnih jedinjenja kiseonikom iz vazduha, koji prolazi kroz pore drveta, dovodi do smanjenja oporosti i promene boje pića.

Vrsta drveta upotrebljena u procesu odležavanja utiče na kvalitet alkoholnih pića, pošto svaka vrsta drveta poseduje različita fizička svojstva i hemijski sastav. Najčešće se upotrebljavaju drvena burad

pravljena od hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) ili kitnjaka (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.), uglavnom zbog dobrih mehaničkih svojstava i male propustljivosti. Međutim, zbog ograničene količine i kvaliteta hrasta, kao i cene procesa, upotrebljavaju se i alternativne vrste drveta, kao što su trešnja (*Prunus avium* (L.) L.), bagrem (*Robinia pseudoacacia* L.) i beli dud (*Morus alba* L.).

Odležavanje alkoholnih pića u drvenim buradima je veoma kompleksan, skup i dugotrajan proces. Fizičke i mehaničke osobine drvenog bureta, kao što je poroznost, mogu ponekad da potpomognu brzu oksidaciju polifenola i gubitke u zapremini alkoholnih pića. Ovi gubici mogu da se svedu na minimum korišćenjem jeftinijih alternativa kao što su letve i komadići (daščice, kockice, iverje) (Fernández de Simón i sar., 2014a), koji su često podvrgnuti procesu prirodnog sušenja (*Natural seasoning process*) sa ili bez termičkog tretmana. Korišćenjem jeftinijih alternativnih materijala se skraćuje i pojednostavljuje proces odležavanja i prevazilazi se nedostatak mehaničkih osobina drveta za proizvodnju buradi (Cabrita i sar., 2012).

Iako nije regulisano pravilnikom, za većinu domaćih alkoholnih pića primenjuje se odležavanje u kontaktu sa komadićima (iverjem) drveta u trajanju od nekoliko dana.

Prema Zakonu o jakim alkoholnim pićima ("Sl. glasnik RS", br. 92/2015) i Evropskoj regulativi (REGULATION (EU) 2019/787 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL, L 130/32 EN Official Journal of the European Union, 62, 17.5.2019) definisano je da se odležavanje alkoholnih pića odvija u odgovarajućim sudovima tokom određenog vremenskog perioda i da se tada događaju određene prirodne reakcije koje jakom alkoholnom piću daju specifične karakteristike koje ranije nije imalo. Prema aneksu Evropske regulative, za voćne rakije se pominje da mogu da odležavaju u kontaktu sa drvetom, međutim nije striktno definisano da moraju da odležavaju u hrastovim buradima.

Internacionalna organizacija za grožđe i vino (*International Organisation of Vine and Wine*, OIV) je odobrila upotrebu duga drveta ili letvi kao alternative drvenim buradima za ubrzavanje procesa odležavanja alkoholnih pića (Coldea i sar., 2020). Prema EEC regulativi No. 1507/2006, 11 oktobar 2006, moguće je koristiti komade hrasta i kestena za ubrzavanje procesa odležavanja vina (Jordão i sar., 2016). Pored toga, navodi se mogućnost korišćenja hrastovog iverja u procesu odležavanja žestokih alkoholnih pića (<https://www.ecfr.gov/current/title-27/chapter-I/subchapter-A/part-19/subpart-M/subject-group-ECFR925819f2bfa57ac/section-19.331>).

Tokom proizvodnje drvenih buradi za odležavanje alkoholnih pića zaostaje velika količina otpada. Procenjeno je da u Srbiji godišnje zaostaje više od 200 tona drvnog otpada iz proizvodnje buradi, koji čini više od 60% polazne zapremine drveta (Trade Map, 2018). Ovaj otpad predstavlja prema ceni dostupan materijal koji može da se koristi za dobijanje komadića drveta za odležavanje alkoholnih pića. Takođe, otpad drveta često je bogat izvor fenolnih jedinjenja koji poseduju mnoge bioaktivne osobine kao što su visoka antioksidativna i antimikrobna aktivnost, zbog čega može da se upotrebi u industriji hrane, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Do sada je ispitivana mogućnost upotrebe vodenog ekstrakta hrasta u prehrambenoj industriji kao konzervansa (Soriano i sar., 2018) ili suplementa (Robuvit<sup>®</sup>, <https://www.robuvit.com/home/>), kao i mogućnost izolovanja tanina iz drveta i upotrebe kao aditiva u hrani (Molino i sar., 2019). Takođe, uočeno je da otpad drveta iz proizvodnje buradi za odležavanje alkoholnih pića ima potencijal da se koristi za simultano uklanjanje kadmijuma i dezinfekciju otpadnih voda (Ivanovska i sar., 2021).

Pošto su u poslednjim decenijama sve rasprostranjenija istraživanja i upotreba agroindustrijskog otpada u industriji hrane, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, moguća je procena potencijalne primene drvnog otpada u tim industrijama na osnovu sadržaja fenolnih jedinjenja kao antioksidanasa.

### 3 EKSPERIMENTALNI DEO

#### 3.1 Hemikalije, reagensi i standardi

##### Rastvarači, reagensi i standardi korišćeni za određivanje sadržaja ukupnih i pojedinačnih fenolnih jedinjenja

Acetonitril i sirćetna kiselina (MS čistoće), metanol HPLC čistoće, Folin-Čikalteu reagens (eng. *Folin Ciocalteu reagens*), natrijum-acetat trihidrat, glacijalna sirćetna kiselina, i anhidrovani natrijum-karbonat nabavljeni su od firme Merck (Darmstadt, Germany). DPPH<sup>\*</sup> (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) i 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) i standardi fenolnih jedinjenja korišćeni za analizu pojedinačnih polifenola visokoeфикаsnom tečnom hromatografijom i hromatografijom na tankom sloju nabavljeni su od firme Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

Ultračista voda (Thermofisher Scientific, Bremen, Germany) je korišćena za pripremanje standardnih rastvora i slepih proba.

Membranski filteri (13 mm, PTFE membrana 0,45 µm) nabavljeni su od firme Supelco (Bellefonte, PA, USA).

##### Rastvarači korišćeni za HPTLC analizu

Etil-acetat je nabavljen od firme Merck (KGaA, Darmstadt, Nemačka); dok su mravlja kiselina, heksan i 2-aminoetil-difenilborinat (NTS) nabavljeni od firme Fluka (Steinheim, Nemačka).

##### Reagensi i standardi korišćeni za određivanje mineralnog sastava ekstrakata drveta

Azotna kiselina (HNO<sub>3</sub> 70%, ACS reagent, Sigma Aldrich, Nemačka) i vodonik-peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, ACS reagent, Sigma Aldrich, Germany) su korišćeni za totalnu mineralizaciju ekstrakata drveta.

Tri multielementna standarda su korišćena prilikom pripremanja standardnih rastvora za kalibraciju instrumenta: Multi-Element Plasma Standard Solution 4, Specpure®, 1000 µg·mL<sup>-1</sup> (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Germany), ILM 05.2 ICS Stock 1 i SS-Low Level Elements ICV Stock (VHG Labs, Inc- Part of LGC Standards, Manchester, NH 03103 USA).

#### 3.2 Uzorci drveta

Analizirano je sedam različitih vrsta drveta (**Tabela 3**), i to: po tri uzorka hrasta kitnjaka i hrasta lužnjaka različitog geografskog porekla, i po jedan uzorak cera, bagrema, džanarike, divlje trešnje i belog duda. Svi uzorci osim jednog uzorka hrasta kitnjaka (uzorak 5) i cera prirodno su sušeni u trajanju od 12 meseci na otvorenom u industriji VBX-SRL. D.O.O. u Centralnoj Srbiji u Kraljevu. Sveže isečeni uzorci hrasta kitnjaka (uzorak 5) i cera su skladišteni i sušeni na sobnoj temperaturi. Svi uzorci su potom čuvani u laboratoriji na sobnoj temperaturi 20 ± 2 °C, relativna vlažnost vazduha 65 ± 5% tokom 30 dana, a zatim čuvani u hermetički zatvorenim i obeleženim posudama.

**Tabela 3.** Latinski i uobičajeni nazivi vrsta, starost uzoraka, geografsko poreklo i tip zemljišta na kojem su rasle ispitivane biljne vrste drveta

RB uzorka	Biljna vrsta	Latinski naziv	Starost drveta	Geografsko poreklo	Tip zemljišta
1			> 60	Slavonija (Hrvatska)	Gajnjače
2	Hrast lužnjak	<i>Quercus robur</i> L.	> 60	Gornji Radan (Srbija)	Ranker
3			> 60	Olovo (Bosna i Hercegovina)	Ranker
4			> 60	Kučaj (Srbija)	Crvenica
5	Hrast kitnjak	<i>Quercus petrea</i> (Matt.) Liebl.	> 60	Kuršumljija (Srbija)	Ranker
6			> 60	Ravna Gora (Srbija)	Ranker
7	Cer	<i>Quercus cerris</i> L.	> 60	Kuršumljija (Srbija)	Ranker
8	Bagrem	<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	> 40	Kraljevo (Srbija)	Fluvisol
9	Džanarika	<i>Prunus cerasifera</i> Ehrh.	> 40	Vrnjačka Banja (Srbija)	Vertisol
10	Divlja trešnja	<i>Prunus avium</i> (L.) L.	> 40	Ravna Gora (Srbija)	Ranker
11	Beli dud	<i>Morus alba</i> L.	> 40	Vrnjačka Banja (Srbija)	Vertisol

### 3.3 Taksonomska identifikacija vrsta drveta

Osnovu za identifikaciju drveta predstavljaju određene makroskopske i mikroskopske ćelijske karakteristike svojstvene svakoj vrsti drveta. Neke od osnovnih anatomskih karakteristika koje IAWA Komisija (*IAWA Committee - International Association of Wood Anatomists*) preporučuje za identifikaciju lišćarskih vrsta (IAWA Bulletin, 1989) predstavljaju izraženost prstenova prirasta (godova), poroznost, raspored (difuzno ili prstenasto porozne), grupisanje, dimenzije traheja i njihov broj po  $1 \text{ mm}^2$  (učestalost), kao i tip jamica i prisustvo (ili odsustvo) tila, zatim raspored aksijalnog parenhima (traka drveta) i oblik ćelija koje ga grade, širina (jednoredne ili višeredne) i visina (broj ćelija) traka i njihov broj po  $1 \text{ mm}^2$ , prisustvo (ili odsustvo) traka različitih dimenzija, debljina zida, širina lumena i dužina vlakana. Većina pomenutih strukturnih karakteristika ćelija najbolje se uočavaju sa površine poprečnog preseka drveta.

Taksonomska identifikacija ispitivanih biljnih vrsta urađena je analizom prethodno pripremljenih mikroskopskih preparata uzoraka drveta u *Laboratoriji za anatomiju drveta* Šumarskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

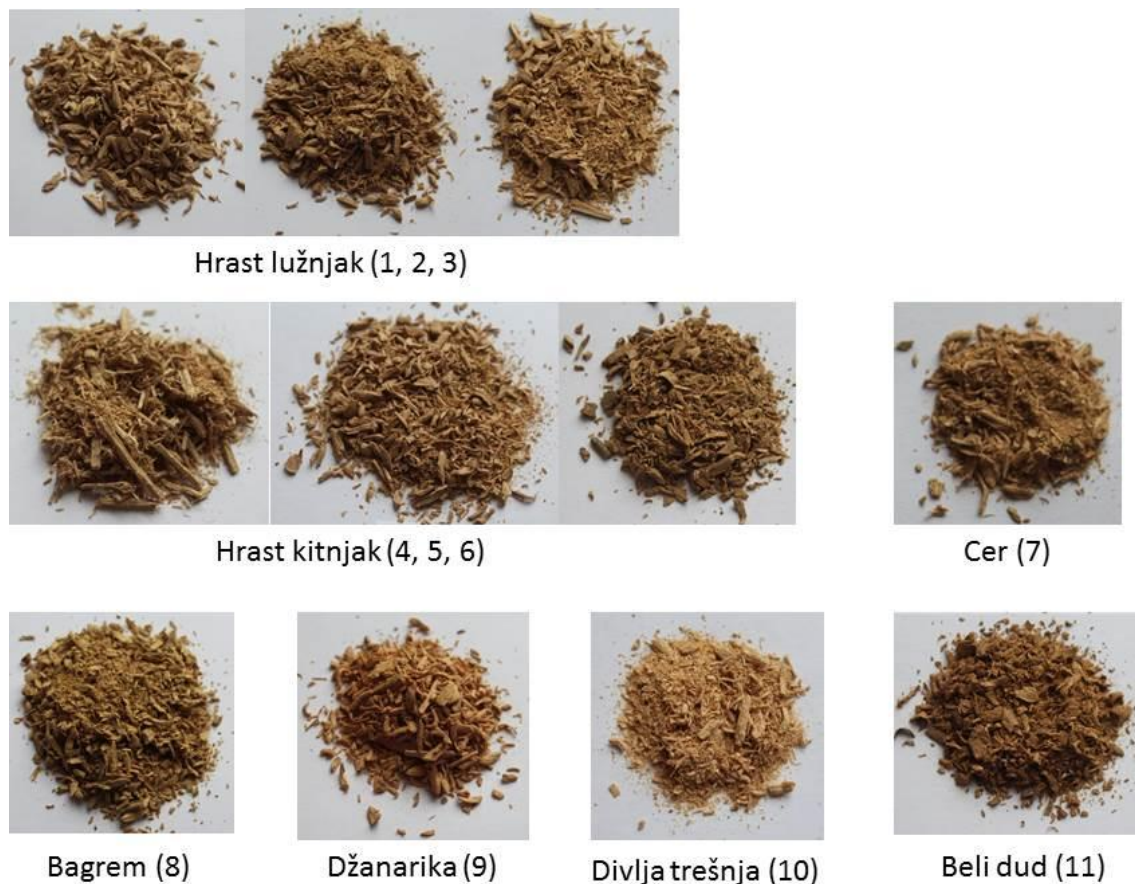
Mikroskopski preparati drveta pripremljeni su na sledeći način: upotrebom klizećeg mikrotomskog noža (*Reichert*) iz uzoraka su izrezani poprečni preseki debljine oko  $14 \mu\text{m}$ , koji su potom stavljani na predmetno staklo i pokriveni pokrovnim staklom. Ovako pripremljeni preparati posmatrani su svetlosnim mikroskopom (*Boeco, Germany*) i fotografisani sa uvećanjem  $100\times$  i  $400\times$ . Uzorci drveta identifikovani su na osnovu analize njihove anatomske strukture sa napravljenih mikrofotografija i poređenja sa poznatim vrstama.

### 3.4 Priprema ekstrakata drveta

Komadi drveta su usitnjeni u mlinu za drvo i prosejani (**Slika 2**).

Za pripremu ekstrakata korišćene su čestice drveta granulacije u opsegu od  $0,5 \text{ mm}$  do  $1,5 \text{ mm}$ . Usitnjeno drvo ( $100 \text{ g}$ ) je zatim ekstrahovano etanolom ( $1000 \text{ mL}$ ,  $60\%$ , v/v) uz konstantno mešanje na laboratorijskom šejkeru brzinom od  $100 \text{ rpm}$ . Ekstrakcija je trajala 7 dana na sobnoj temperaturi ( $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) u mraku. Ekstrakti su profiltrirani i držani u frižideru ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) do analize. Neposredno

pred analizu, uzorci su profiltrirani kroz PTFE membranski filter (0,45  $\mu\text{m}$ ). Ovako pripremljeni uzorci korišćeni su za određivanje sadržaja ukupnih polifenola i antioksidativni potencijal, identifikaciju i određivanje sadržaja pojedinačnih fenolnih jedinjenja, boju ekstrakata, određivanju sadržaja fluorofora, elementalni sastav, kao i preliminarna elektrohemijska ispitivanja.



**Slika 2.** Usitnjeni uzorci drveta pre prosejavanja

### 3.5 PRVI DEO - Analiza uzoraka i ekstrakata drveta

U ovom delu rada izvršena je hemijska karakterizacija prethodno pripremljenih ekstrakata tako što su određeni: boja ekstrakata, sadržaj fluorofora, antioksidativni potencijal, sadržaj ukupnih fenola, sadržaj pojedinačnih polifenolnih jedinjenja, sadržaj isparljivih jedinjenja, elementalni sastav i procena rizika (Risk Assessment) na osnovu sadržaja potencijalno toksičnih elemenata. Bioautografija je primenjena za procenu biološke i antimikrobne aktivnosti ekstrakata.

#### 3.5.1 Određivanje sadržaja ukupnih polifenola i antioksidativnog potencijala

Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativni potencijal su određeni spektrofotometrijski na UV-VIS spektrofotometru Thermo Scientific Evolution 600 (Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Germany).

Sadržaj ukupnih polifenola (*Total phenolic content*, TPC) ekstrakata drveta određen je Folin-Čikalteu testom (Singleton i Rossi, 1965). Analizirani ekstrakti drveta su razblaženi destilovanom vodom u različitom odnosu. U 0,5 mL uzorka dodato je 2,5 mL Folin-Čikalteu reagensa (kompleks

fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline), a zatim, 5 minuta kasnije, dodato je 2 mL rastvora  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( $75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Nakon inkubacije od 2 sata u mraku, apsorbanija je merena na 760 nm na UV-VIS spektrofotometru. Destilovana voda (0,5 mL) je korišćena za slepu probu. Standardna serija galne kiseline koncentracija  $10\text{-}80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  korišćena je za konstruisanje standardne krive za određivanje sadržaja ukupnih polifenola. Za uzorke koji su pre analize razblaženi, sadržaj ukupnih polifenola izračunat je množenjem rezultata očitnog sa standardne krive sa odgovarajućim stepenom razblaženja. Rezultati su izraženi u gramima ekvivalenta galne kiseline po kilogramu ekstrakta ( $\text{g GAE (gallic acid equivalents)}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

Antioksidativni potencijal (*Radical scavenging activity*, RSA) je određen DPPH<sup>•</sup> testom sa modifikacijama (Veljović i sar., 2017). Analizirani ekstrakti drveta su razblaženi sa 96% etanolom u različitom odnosu. U 0,2 mL uzorka dodato je 2,8 mL radnog rastvora DPPH<sup>•</sup> (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), koji je prethodno napravljen mešanjem etanolnog rastvora DPPH<sup>•</sup> ( $1,86 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) sa 0,1 M rastvorom acetatnog pufera u odnosu 2:1 (v/v). Izvršena je inkubacija u mraku na sobnoj temperaturi u trajanju od 90 minuta, a zatim je merena apsorbanija na 525 nm na UV-VIS spektrofotometru. Etanol je korišćen za slepu probu. Standardna serija troloksa koncentracije od 0,2 mM do 0,8 mM korišćena je za konstruisanje standardne krive zavisnosti procenta inhibicije DPPH<sup>•</sup> radikala u funkciji koncentracije rastvora troloksa, sa koje je očitana antioksidativni potencijal uzoraka. Rezultati su izraženi u milimolovima ekvivalenta troloksa po kilogramu ekstrakta ( $\text{mmol TE (Trolox equivalents)}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Procenat inhibicije DPPH<sup>•</sup> radikala se izračunava na osnovu sledeće formule:

$$\% \text{ DPPH}^{\bullet} \text{ inhibicije} = [(A - A_s) / A] \cdot 100\%,$$

gde su:  $A_s$  - apsorbanija slepe probe,  $A$  - apsorbanija analita.

Sva merenja (TPC i RSA) su izvršena u triplikatu i podaci su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). Značajna razlika u vrednostima TPC i RSA među ekstraktima drveta određena je Tuki testom ( $p < 0,05$ ).

### 3.5.2 Ispitivanje sadržaja pojedinačnih polifenola primenom UHPLC–DAD MS/MS

Ultra-efikasna tečna hromatografija spregnuta sa detektorom sa nizom dioda i masenom detekcijom (UHPLC–DAD MS/MS) je primenjena za identifikaciju i kvantifikaciju pojedinačnih polifenola, dok je visokoeffikasna tečna hromatografija sa detektorom sa nizom dioda (HPLC-DAD) primenjena za identifikaciju i kvantifikaciju flavanola. Detalji analize su opisani u nastavku teksta.

Razdvajanje, određivanje i kvantifikacija polifenola izvršena je na Dionex Ultimate 3000 UHPLC (*Ultra-High Performance Liquid Chromatography*) sistemu sa detektorom sa nizom dioda (*Diode Array Detector*, DAD) i TSQ Quantum Access Max masenim spektrometrom sa trostrukim kvadrupolom (ThermoFisher Scientific, Basel, Switzerland).

Eluiranje je izvršeno na temperaturi od 40 °C na Synchronis C18 koloni, mobilnom fazom u sastavu: 0,01% vodeni rastvor sirćetne kiseline (A) i acetonitril (B), u sledećem gradijentu koncentracija: 0–2,0 min 5% B; 2,0–12,0 min 5–95% B; 12,0–13,0 min 95–5% B; 13,0–20,0 min 5% B. Brzina protoka je podešena na  $0,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  i detekcija je vršena na talasnim dužinama 254 i 280 nm. Injekciona zapremina je iznosila 5  $\mu\text{L}$ .

U sastavu TSQ Quantum Access Max masenog spektrometra sa trostrukim kvadrupolom je jonski izvor tipa elektrosprej jonizacije sa zagrevanjem (HESI - Heated Electrospray Ionization). Temperatura isparivača (*vaporizer temperature*) iznosila je 250 °C, a jonski izvor je podešen na sledeće vrednosti: napon spreja jonskog izvora 4500 V, pritisak nosećeg gasa ( $\text{N}_2$ ) 27 AU, pritisak

pomoćnog gasa (*auxiliary gas*, N<sub>2</sub>) 7 AU, temperatura kapilare 275 °C. Analiza uzoraka urađena je u negativnom jonizacionom modu, u opsegu od 100 do 1000 m/z.

Za kvalitativnu analizu ispitivanih jedinjenja primenjeni su pun skenirajući mod (*full scanning mode*, FS) i mod skeniranja produkata (*product ion scanning*, PIS) na masenom spektrometru. Eksperimenti sa koliziono-indukovanom fragmentacijom izvršeni su uz pomoć argona kao kolizionog gasa, i vrednost koliziona energije zavisila je od ispitivanih jedinjenja. Za svako jedinjenje su definisana dva dominantna MS<sup>2</sup> fragmenta u PIS eksperimentima i korišćeni u eksperimentima praćenja odabranih reakcija (*time-selected reaction monitoring*, tSRM) za kvantitativnu analizu polifenola (Gašić i sar., 2015).

Xcalibur software (verzija 2.2) korišćen je za kontrolu rada instrumenta. Fenolna jedinjenja su identifikovana direktnim poređenjem sa komercijalnim standardima. Ukupna količina svakog jedinjenja procenjena je računanjem površina ispod pika i izražena u jedinicama mg·kg<sup>-1</sup>. Značajna razlika u vrednostima pojedinačnih polifenola među ekstraktima drveta određena je Tuki testom ( $p < 0,05$ ).

### 3.5.3 Određivanje sadržaja flavanola primenom HPLC-DAD

Identifikacija i kvantifikacija katehina izvršena je visokoeffikasnom tečnom hromatografijom (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) (Thermo Ultimate 3000 RS) sa DAD detektorom na Hypersil Gold aQ C18 koloni (150 mm x 3 mm, 3 μm) na 30 °C. Komponente mobilne faze su bile: 0,1% vodeni rastvor mravlje kiseline (komponenta A) i acetonitril (komponenta B). Hromatografsko eluiranje je izvršeno sa brzinom protoka od 0,6 mL·min<sup>-1</sup> u sledećem gradijentu: 0 min 2% B; 0–7,0 min 2–26% B, 7,0–8,0 min 26 % B; 8,0–11,0 min 26%–2% B. Detekcija je vršena na tri talasne dužine: 220, 254 i 280 nm. Injekciona zapremina je bila 20 μl. Analiza podataka je urađena na softveru Chromeleon, v6.8 (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany).

### 3.5.4 Određivanje boje ekstrakata drveta

Merenje boje ekstrakata drveta izvršeno je uz pomoć prenosnog kolorimetra tristimulus Chroma Meter model CR-400 (Konica Minolta, Osaka, Japan) koji meri tristimulusne vrednosti analizirane boje. Rezultati su izraženi u *CIELab* (*Commission Internationale de l'Eclairage Lab*, Laboratorija međunarodne komisije za rasvetu) parametrima L\*, a\*, i b\*, koji predstavljaju koordinate u prostoru boja. Korišćenjem D65 svetlosnog izvora i ugla posmatranja (*observer angle*) od 2°, mereni su sledeći parametri: L\* (svetlina, *lightness*), a\* (+a\* = udeo crvene boje, -a\* = udeo zelene boje), b\* (+b\* = udeo žute boje, -b\* = udeo plave boje), C\* (zasićenost boje, *chroma*) i h (ugao tona boje, *hue angle*). L\* definiše svetlinu i njene vrednosti se kreću od 0 (crna boja) do 100 (bela boja). Parametri a\* i b\* nemaju brojčana ograničenja; pozitivna vrednost parametra a\* definiše intenzitet crvene boje, dok negativna vrednost ovog parametra određuje intenzitet zelene boje. Pozitivna vrednost parametra b\* definiše intenzitet žute boje, dok negativna vrednost ovog parametra definiše intenzitet plave boje. Parametar C\* predstavlja zasićenost boje, dok parametar h (ugao) definiše ton boje. *CIELab* tristimulusne vrednosti kalibrisane su u odnosu na standardnu belu ploču (Y=84,8; x=0,3199; y=0,3377). Merenja su urađena u triplikatu i podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD). Značajna razlika među ekstraktima drveta za svaku komponentu boje određena je Tuki testom ( $p < 0,05$ ).

### 3.5.5 Određivanje sadržaja fluorofora u uzorcima drveta i njihovim ekstraktima

Fluorescentni spektri opiljaka drveta i njihovih ekstrakata snimani su na F13-221 P spektrofluorimetru (JobinYvon, Horiba, France), koji je opremljen ksenonskom lampom koja radi na 450 W i fotomultiplikatorom. Opiljci drveta su snimani tako što su ubačeni u držač za čvrste

uzorke u konfiguraciji prednje strane (engl. *front-face*) uređaja. Ekstrakti su snimani u kiveti sa optičkim putem od 10 mm i zapreminom od 1 mL, u konfiguraciji pod pravim uglom.

Fluorescentni emisioni spektar opiljaka drveta, odnosno ekstrakata drveta, može da bude suma dve ili više individualnih komponenti koje odgovaraju različitim fluoroforama. Kako bi se odredili broj i emisioni profili komponenti u integralnom spektru, izvršena su merenja serija emisionih spektara na različitim talasnim dužinama ekscitacije (*excitation wavelengths*), i na taj način su dobijene ekscitaciono-emisione matrice (*excitation-emission matrices*, EEM) koje su zatim analizirane uz pomoć analize glavnih komponenta (PCA). Opseg ekscitacionih spektara je 250–450 nm za uzorke drveta i 310–385 nm za ekstrakte drveta, dok je opseg snimljenih fluorescentnih emisionih spektara 335–595 nm za uzorke drveta, odnosno 400–600 nm za ekstrakte drveta. Vreme integracije iznosilo je 0,5 sekundi. Korak za ekscitaciju je iznosio 5 nm, a za emisiju 1 nm. Širina otvora za propuštanje pobudne i emitovane svetlosti (slitovi) je bila 2 nm.

### 3.5.6 Određivanje fenolnih profila ekstrakata drveta primenom visokoefikasne hromatografije na tankom sloju (HPTLC)

#### 3.5.6.1 Priprema uzoraka

Za HPTLC analizu ekstrakti su pravljani na sledeći način: uzorci drveta su samleveni i prosejani u cilju dobijanja čestica veličine između 0,45 mm i 2,5 mm. Zatim su opiljci svake vrste drveta (0,5 g) ekstrahovani etanolom (10 mL, 45% v/v) u trajanju od mesec dana u mraku uz povremeno mućkanje. Nakon ekstrakcije je ekstrakt odvojen od čvrstog ostatka uz pomoć automatske pipete i čuvan u zamrzivaču (na -20 °C) do analize.

#### 3.5.6.2 Dobijanje fenolnih profila

Visokoefikasna tankoslojna hromatografija (HPTLC) je primenjena u cilju dobijanja fenolnih profila, dok je DPPH<sup>\*</sup>-HPTLC analiza primenjena u cilju dobijanja podataka o fenolnim jedinjenjima koja doprinose antioksidativnom potencijalu ekstrakata drveta.

Ploče HPTLC Silica gel 60F254 (Merck, Germany) korišćene su za HPTLC i DPPH<sup>\*</sup>-HPTLC analize. Ekstrakti hrastova i divlje trešnje (5 µL), kao i bagrema, džanarike i belog duda (2 µL), zajedno sa četiri standardna jedinjenja: galna kiselina, ferulinska kiselina, kofeinska kiselina i *p*-kumarinska kiselina (2 µL, c = 1000 ppm), naneti su kao trake (8 mm) korišćenjem Linomat 5 sistema (CAMAG, Muttenz, Switzerland). Primenjena je mobilna faza u sastavu: etil-acetat:heksan:mravlja kiselina:voda (11:2:1:0,5 v/v/v/v). Ploče su razvijene na sobnoj temperaturi (20 °C) u kadici (CAMAG) prethodno zasićenoj parama mobilne faze tokom 15 minuta. Front rastvarača je iznosio 70 mm. Dobijeni HPTLC hromatogrami su derivatizovani rastvorom 2-aminoetil-difenilborinata (NTS – 0,2% u etanolu) kako bi se pojačao intenzitet fluorescencije jedinjenja. Pločica je stavljena u komoru pod UV lampom i fotografisana na 254 nm i 366 nm.

Za DPPH<sup>\*</sup>-HPTLC analizu, razvijen HPTLC hromatogram je uronjen ručno tri sekunde u metanolni rastvor DPPH<sup>\*</sup> (0,2%) i zatim fotografisan. Slike pločica su fotografisane kamerom mobilnog telefona od 13 megapiksela (Huawei P Smart) i zapamćene su kao TIF fajlovi.

#### 3.5.6.3 Analiza slike HPTLC hromatograma

Fenolni profili dobijeni su uz pomoć elektronski dostupnog ImageJ softvera (Ristivojević i sar., 2014) na sledeći način: dobijeni HPTLC hromatogrami su izdvojeni za svaki uzorak i šumovi su uklonjeni korišćenjem *median* filtera širine tri piksela. Zatim su slike izmenjene i trake su selektovane uz pomoć pravougaonog alata. Slike su rotirane za 90° (Image/Transform/Rotate 90 Degrees Right) kako bi se dobio profil pojedinih zona uzoraka. Grafici fenolnih profila su generisani korišćenjem opcije *Plot Profile* za svaki uzorak. Dobijeni profili predstavljaju 2-D grafik



zavisnosti intenziteta zona (izražen u pikselima) od rastojanja. Dobijene vrednosti su prenesene u Excel, i korišćene su za dalju analizu. Zatim je primenjena PCA analiza na matricu podataka dobijenih iz HPTLC hromatograma (11 uzoraka  $\times$  389 varijabli), u kojoj varijable predstavljaju intenzitete piksela na 389 jedinica dužine.

### 3.5.7 Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata

#### 3.5.7.1 Priprema ekstrakata drveta

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata drveta uzorci su pripremljeni na sledeći način: usitnjeno drvo granulacije 0,5–1,5 mm (2,5 g) ekstrahovano je u erlenmajeru sa 25 mL etanola (60%, v/v). Ekstrakcija je vršena sa konstantnim mešanjem na magnetnoj mešalici u trajanju od sedam dana u mraku na sobnoj temperaturi ( $20 \pm 2$  °C). Ekstrakti su centrifugirani dva puta (5 minuta na 8000 rpm), a zatim upareni na vakuum uparivaču. Odmerena je masa suvog ostatka, koji je zatim razblažen metanolom do koncentracije od  $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

Prinos ekstrakcije za svaki ekstrakt izračunat je na osnovu mase suvog ostatka dobijenog posle uparavanja ekstrakcionog sredstva i mase drveta upotrebljenog u procesu ekstrakcije.

#### 3.5.7.2 Ispitivani mikroorganizmi i uslovi rasta

Antimikrobna aktivnost je testirana na osam indikatorskih sojeva mikroorganizama. Dva soja su izolovana iz usne šupljine (*Streptococcus mutans* i *Streptococcus pyogenes*), dok su ostali sojevi referentni (meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* i *Candida albicans*). Suspenzije mikroorganizama standardne mutnoće 0,5 MckFarland (McFarland) skale (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), koja je sadržala približno  $1 \cdot 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , napravljene su u skladu sa njihovim uslovima uzgajanja (**Tabela 4**).

**Tabela 4.** Indikatorski sojevi korišćeni za testiranje antimikrobne aktivnosti ekstrakata drveta

Indikatorski sojevi	Šifra izolata*	Medijum za rast	Temperatura uzgajanja	Poreklo izolata
<i>Streptococcus mutans</i>	IBR S0001	LA		Usna šupljina**
<i>Streptococcus pyogenes</i>	IBR S0004			
Meticilin rezistentni	ATCC33591			
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	ATCC25923		37 °C	Referentni sojevi
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25922			
<i>Escherichia coli</i>	ATCC29212			
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC19111	BHA		
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC10231	TSA		
<i>Candida albicans</i>				

\*ATCC- American Type Culture Collection; \*\*sojevi su izolovani iz ljudske usne šupljine (Nikolić i sar., 2013)

#### 3.5.7.3 Preliminarna ispitivanja antimikrobnog potencijala ekstrakata drveta

Modifikovana difuziona metoda u bunarićima (Dimkić i sar., 2016) primenjena je za preliminarna ispitivanja antimikrobnog potencijala ekstrakata drveta. Bunarići su sačinjeni od sterilnih donjih delova nastavaka za pipete (200  $\mu\text{L}$ ) i postavljeni na površinu LA/BHA/TSA medijuma (**Tabela 4**).

U skladu sa uslovima gajenja korišćenih sojeva mikroorganizama, 60  $\mu\text{L}$  odgovarajućeg soja je zasejano u 6 mL LA/BHA/TSA polučvrstog "soft" agara i preliveno u Petrijevu posudu sa odgovarajućim čvrstim medijumom. Bunarići prečnika 5 mm su uklonjeni nakon učvršćivanja "soft" agara i dodato je 20  $\mu\text{L}$  (1 mg po bunariću) od svakog ekstrakta. Vankomicin (antibiotik, viz., 0,2 mg po bunariću) je korišćen kao pozitivna kontrola za bakterijske sojeve, dok je nistatin (mikotik, viz., 0,2 mg po bunariću) korišćen kao pozitivna kontrola za gljivicu *C. albicans*. Metanol (20  $\mu\text{L}$ ) je korišćen kao negativna kontrola. Petrijeve posude su inkubirane na temperaturi od 37 °C tokom 24 sata, a zatim su merene zone inhibicije i osetljivost sojeva na testirane ekstrakte. Dobijene zone inhibicije su izražene u milimetrima (mm).

#### 3.5.7.4 Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC)

Mikrodiluciona metoda je korišćena za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) ekstrakata drveta. Ekstrakti su testirani u opsegu koncentracija od 0,02  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  do 2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  tako što je primenjeno dvostruko serijsko razblaženje odgovarajućim rastvaračem u mikrotitracionim pločama sa 96 bunarića. Negativna kontrola (kontrola rasta bakterija i gljivice) i kontrola sterilnosti (blank, samo odgovarajući rastvarač) su takođe testirane. Finalna koncentracija kontrole rastvarača (metanol) u prvim bunarićima iznosila je 10%. Vankomicin, streptomycin i nistatin su testirani kao pozitivna kontrola u opsegu koncentracija od 0,001  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  do 0,4  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Pored negativne kontrole i kontrole sterilnosti, svaki bunarić je inokulisan sa 20  $\mu\text{L}$  odgovarajuće hranljive podloge (oko  $1\cdot 10^6$  CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$ ), do ukupne zapremine od 200  $\mu\text{L}$ . Takođe, 22  $\mu\text{L}$  resazurina (indikatora) je dodato u svaki bunarić. Mikrotitarske ploče su inkubirane tokom 24 h na temperaturi od 37 °C. U prisustvu živih bakterijskih ćelija, plavo obojeni resazurin se ireverzibilno redukuje u pink obojeni i fluorescentan rezorufin (Elshikh i sar., 2016). Najmanja koncentracija ekstrakta koja ne dovodi do promene boje resazurina definisana je kao MIC vrednost. Vrednosti minimalne baktericidne koncentracije (MBC) i minimalne fungicidne koncentracije (MFC), određene su prenošenjem sadržaja iz bunarića u kojima nije bilo promene boje na čvrste podloge. Ploče su inkubirane tokom 24 h na temperaturi od 37 °C i praćen je rast mikroorganizama. Najmanja koncentracija bez vidljivog rasta definisana je kao MBC/MFC vrednost. Rezultati su izraženi u  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

#### 3.5.8 Određivanje sadržaja isparljivih komponenata

Gasna hromatografija sa masenom detekcijom (GC-MS) korišćena je za identifikaciju jedinjenja u ekstraktima drveta, dok je gasna hromatografija sa plameno-jonizujućim detektorom (GC-FID) korišćena za semikvantitativnu analizu. Ekstrakti drveta su pripremljeni tečno-tečnom ekstrakcijom (liquid-liquid extraction) (Veljović i sar., 2019). Metil-10-undekanoat razblažen u dihlormetanu (0,01  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) je korišćen kao interni standard. Pripremljeni uzorci su pre analize čuvani u frižideru na 4 °C.

Gasni hromatograf Agilent 7890N sa HP5-MS kapilarnom kolonom (30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$ ) korišćen je za GC-MS analizu. Primenjen je sledeći temperaturni program: od polazne temperature od 60 °C temperatura je podizana za 3 °C/min do 280 °C, i zatim je održavana 20 min na temperaturi od 280 °C. Helijum je korišćen kao noseći gas, sa brzinom protoka 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . GC je povezan sa Hewlett-Packard 5972 MSD masenim detektorom koji radi na 70 eV i skenira mase u opsegu 40-550 m/z. Pikovi su identifikovani upoređivanjem njihovih retencionih vremena (izračunatih u odnosu na *n*-alkane) sa podacima iz literature i upoređivanjem fragmentacije njihovih masenih spektara sa masenim spektrima iz baza podataka (NIST/EPA/NIH biblioteka masenih spektara NIST2000, Wiley/NBS Registar podataka, 7. izdanje, elektronska verzija) (Adams, 2007; Flamini i Traldi, 2010).

Za GC-FID analize korišćen je gasni hromatograf Agilent 4890A sa HP5-MS kapilarnom kolonom (30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$ ). Primenjeni temperaturni program je isti kao za GC-MS analize.

Vodonik je korišćen kao noseći gas ( $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ). GC je kuplovan sa FID detektorom koji radi na  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.5.9 Određivanje mineralnog sastava ekstrakata drveta

#### 3.5.9.1 Priprema uzoraka mikrotalasnom digestijom

Mikrotalasni digester BERGHOF Speedwave Xpert (Berghof Products and Instruments GmbH, Germany) sa DAP-60 segmentnim rotorom pod visokim pritiskom korišćen je za digestiju ispitivanih ekstrakata drveta. Etanolni ekstrakt drveta ( $10,00 \text{ mL}$ ) je sipan u teflonsku kivetu i uparen do suva na temperaturi od  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  u sušnici sa ventilatorom. Zatim je izvršena totalna mineralizacija suvog ostatka dodatkom  $8 \text{ mL HNO}_3$  (70%, ACS reagent, Sigma Aldrich) i  $2 \text{ mL H}_2\text{O}_2$  (30%, ACS reagent, Sigma Aldrich). Temperatura je tokom prvih 15 minuta postepeno podizana mikrotalasnom energijom do  $210 \text{ }^\circ\text{C}$ , sledećih 20 minuta je bila konstantna ( $210 \text{ }^\circ\text{C}$ ), a zatim naglo opadala do sobne temperature. Posle hlađenja i bez filtriranja, rastvor je razblažen ultračistom vodom do crte u normalnom sudu od  $10 \text{ mL}$ . Ultračista voda čija je provodljivost iznosila  $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$  (ekvivalentno sa  $0,05 \text{ }\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) pripremljena je korišćenjem Barnstead™ GenPure™ Pro (Thermo Scientific, Germany) sistema.

#### 3.5.9.2 Određivanje elementalnog sastava

Elementalni sastav je određen primenom induktivno spregnute plazme sa optičkom emisionom spektrometrijom (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, ICP-OES*) (Thermo Scientific iCAP 6500 Duo ICP, Thermo Fisher Scientific, Cambridge, UK). Tri multielementna standarda su korišćena prilikom pripremanja standardnih rastvora za kalibraciju instrumenta: Multi-Element Plasma Standard Solution 4, Specpure®,  $1000 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Germany), ILM 05.2 ICS Stock 1 i SS-Low Level Elements ICV Stock (VHG Labs, Inc- Part of LGC Standards, Manchester, NH 03103 USA). Posle digestije uzoraka, izvršena su ICP-OES merenja u triplikatu ( $n=3$ ). Pouzdanost merenja potvrđena je relativnom standardnom devijacijom manjom od 0,5%. Kontrola kvaliteta analize izvršena je upotrebom EPA Method 200.7 LPC Solution (ULTRA Scientific, USA) sertifikovanog referentnog materijala (CRM) za 30 analita različitih koncentracija. Vrednosti testa obogaćenja su bile u opsegu 98-103%. Rezultati su izraženi u jedinicama  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (makroelementi) i  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  (mikroelementi). Značajna razlika u vrednostima za makroelemente i mikroelemente među ekstraktima drveta određena je Tuki testom ( $p < 0,05$ ). Dobijeni podaci su korišćeni za klustersku analizu i analizu glavnih komponenti kako bi se utvrdila potencijalna veza između ispitivanih elemenata, najzastupljenijih polifenola karakterističnih za svaku biljnu vrstu drveta, TPC i RSA parametara.

#### 3.5.10 Procena rizika

Indeksi zdravstvenog rizika (*Health risk indices*) kao što su indeks opasnosti (*hazard index, HI*) i koeficijenta opasnosti (*hazard quotient, HQ*) korišćeni su za praćenje prenosa zagađujućih supstanci iz hrane do ljudi (Rai i sar., 2019). Procenjen je nekancerogeni rizik za 13 elemenata (Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Ni, Se, Sr, Zn) računanjem HQ i HI indeksa.

Vrednost hroničnog dnevnog unosa (*Chronic daily intake, CDI*), u jedinicama  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{dan}^{-1}$ , izračunat je korišćenjem sledeće formule:

$$\text{CDI} = C \cdot \text{ED} \cdot \text{EF} \cdot \text{CF} \cdot \text{DI} / (\text{BW} \cdot \text{AT}),$$

gde je C koncentracija svakog elementa detektovanog u uzorku drveta ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), ED je vreme izloženosti (30 godina), EF je frekvencija izloženosti ( $365 \text{ dan} \cdot \text{godina}^{-1}$ ), CF je faktor konverzije ( $0,001 \text{ L} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), DI je prosečan dnevni unos alkoholnog pića ( $60 \text{ mL} \cdot \text{dan}^{-1}$ ), i BW je telesna težina

odraslog čoveka (80 kg), dok je AT prosečno vreme ( $365 \text{ dan} \cdot \text{godina}^{-1} \cdot 30 \text{ godina}$ ). Proizvod C i DI predstavlja dnevni unos metala ( $\text{mg} \cdot \text{dan}^{-1}$ ).

Koeficijent opasnosti (*Hazard quotient*, HQ, bezdimenziona veličina), izračunat je uz pomoć sledeće formule:

$$\text{HQ} = \text{CDI}/\text{RfD},$$

gde je CDI hroničan dnevni unos (*chronic daily intake*) ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{dan}^{-1}$ ) i RfD referentna doza svakog potencijalno toksičnog elementa.

Referentna doza (RfD) predstavlja procenu dnevnog unosa određene supstance oralnim putem od strane ljudske populacije (uključujući osetljive grupe) koji tokom života verovatno neće proizvesti značajan rizik od štetnih efekata (Tvermoes i sar., 2014). Referentne doze (RfD) za potencijalno toksične elemente, izražene u  $\text{mg} \cdot \text{dan}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ , iznose: Al = 1, Ba = 0,2, Cd = 0,0005, Co = 0,0003, Cr = 0,003, Cu = 0,04, Fe = 0,7, Li = 0,002, Mn = 0,024, Ni = 0,02, Se = 0,005, Sr = 0,6, Zn = 0,3 (RAIS, 2013), i Pb = 0,0035 (Bi i sar., 2015).

Indeks opasnosti (*Hazard Index*, HI) predstavlja kumulativni nekancerogeni rizik i izračunava se kao suma HQ vrednosti svih ispitivanih potencijalno toksičnih elemenata (Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Ni, Se, Sr, Pb i Zn):

$$\text{HI} = \sum \text{HQ}$$

$$\text{HI} = \text{HQAl} + \text{HQBa} + \text{HQCd} + \text{HQCo} + \text{HQCr} + \text{HQCu} + \text{HQFe} + \text{HQLi} + \text{HQMn} + \text{HQNi} + \text{HQSe} + \text{HQSr} + \text{HQZn}$$

Vrednosti HQ i HI veće od 1 označavaju da postoji velika verovatnoća da se razviju neželjeni efekti po zdravlje, dok se za vrednost HQ manju od 1 smatra da je takva hrana bezbedna za konzumiranje.

### 3.6 DRUGI DEO – Ispitivanje elektrohemijskih svojstava ekstrakata drveta

U ovom delu rada prvo su izvršena preliminarna elektrohemijska ispitivanja etanolnih ekstrakata (60%, v/v) drveta koji su odležavali sedam dana. Primenjene su dve elektrohemijske metode: ciklična voltometrija i diferencijalno pulsna voltometrija. Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) primenjena je za detektovanje razlika između prethodno navedenih metoda. Na osnovu rezultata preliminarnih ispitivanja, odabrana je jedna elektrohemijska metoda (ciklična voltometrija) koja će biti primenjena za analizu ekstrakata dobijenih eksperimentalnim odležavanjem domaćih rakija i model-rastvora etanola u kontaktu sa drvetom.

Zatim je izvršeno eksperimentalno odležavanje u trajanju od 1, 2, 3, 6 i 15 meseci i praćenje elektrohemijskog ponašanja dobijenih ekstrakata. ANOVA je primenjena kako bi se ustanovile razlike u elektrohemijskom ponašanju između različitih vremena odležavanja, dok je PCA primenjena kako bi se ustanovile razlike u elektrohemijskom ponašanju ispitivanih ekstrakata na osnovu vremena ekstrakcije, primenjenog ekstrakcionog sredstva i vrste drveta.

#### 3.6.1 Preliminarna elektrohemijska ispitivanja

Za preliminarna ispitivanja cikličnom voltametrijom i diferencijalnom pulsnom voltametrijom, korišćeni su etanolni ekstrakti drveta koji su odležavali sedam dana, pripremljeni po proceduri

opisanoj u **Odeljku 3.4**. ANOVA je korišćena za utvrđivanje postojanja statistički značajne razlike između rezultata dobijenih cikličnom voltametrijom i diferencijalno pulsnom voltametrijom.

Na osnovu rezultata preliminarnih elektrohemijskih ispitivanja odabrana je jedna elektrohemijska metoda (ciklična voltometrija) i primenjena za analizu ekstrakata dobijenih eksperimentalnim odležavanjem rakija i model-rastvora etanola u kontaktu sa drvetom.

### 3.6.2 Priprema ekstrakcionih sredstava

Za ispitivanje eksperimentalnog odležavanja u kontaktu sa drvetom, upotrebljena su tri različita ekstrakciona sredstva: etanol – E (96%) i dve domaće rakije: jabukovača – A (prepečenica, 46,7%) i šljivovica – P (prepečenica 46,5%). Šljivovica je spravljena u septembru 2018. godine od plodova šljive sorte 'Čačanska rodna' u selu Vrnjci, podneblje Zapadne Morave, Srbija. Domaći destilat jabuke spravljen je od plodova jabuke sorte 'Red Chief', koji su ubrani tokom septembra 2018. godine sa voćnjaka u Šidu, Sremski region Srbije. Voće je usitnjeno i dobijeni sok je podvrgnut spontanij alkoholnoj fermentaciji, a zatim dvostruko destilovan. Etanol (96%) je nabavljen od proizvođača Reahem.

Sva ekstrakciona sredstva su razblažena destilovanom vodom do koncentracije od 45% (v/v).

### 3.6.3 Eksperimentalno odležavanje rakija i model-rastvora etanola u kontaktu sa drvetom

Za eksperimentalno odležavanje rakija i model-rastvora etanola primenjen je postupak opisan u nastavku. Uzorci drveta su samleveni i prosejani, posle čega je izdvojena frakcija veličine čestica između 0,45 mm i 2,5 mm. Zatim su opiljci svih jedanaest uzoraka drveta (po 0,5 g) ekstrahovani jabukovačom (A), šljivovicom (P) ili etanolom (E) (10 mL, 45% v/v). Dobijeni ekstrakti su obeleženi na sledeći način: E1-E11 (uzorci ekstrahovani etanolom), A1-A11 (uzorci ekstrahovani jabukovačom), P1-P11 (uzorci ekstrahovani šljivovicom), gde brojevi od 1 do 11 označavaju redni broj uzorka (prema **Tabeli 3**). Za svaki dobijeni ekstrakt napravljeno je po pet replikata koji se jedino razlikuju prema dužini odležavanja (1, 2, 3, 6 i 15 meseci). Ekstrakti su odležavali u mraku tokom odgovarajućeg vremenskog perioda, a zatim je supernatant dekantovan i čuvan u zamrzivaču do analize.

Nakon merenja cikličnom voltametrijom, podaci su obrađeni uz pomoć statističkih metoda, odnosno analizom varijansi i analizom glavnih komponenti.

### 3.6.4 Praćenje elektrohemijskih svojstava ekstrakata primenom ciklične voltetrije i diferencijalne pulsne voltetrije

Za cikličnu voltetriju i diferencijalnu pulsnu voltetriju korišćena je standardna ćelija zapremine od 3 mL sa tri elektrode: radnom elektrodom od staklastog ugljenika (*Glassy Carbon Electrode*) prečnika 3 mm (Metrohm, Switzerland), srebro – srebro-hloridnom referentnom elektrodom (Ag/AgCl (3M KCl)) i platinske žice velike površine kao pomoćnom elektrodom. Pre svake serije eksperimenata radna elektroda je polirana aluminijumskim prahom, isprana destilovanom vodom i tretirana u ultrazvučnom kupatilu tri minuta. Sva merenja su izvršena na sobnoj temperaturi  $22 \pm 1$  °C, na potenciostatu Autolab (The Netherland) model 302 N, sa 2.1 Nova sistemom. Pre upotrebe elektroda od staklastog ugljenika je polirana aluminijumskim prahom 0,3  $\mu\text{M}$  i 0,05  $\mu\text{M}$ , isprana dva puta destilovanom vodom i etanolom.

Za cikličnu voltetriju primenjena je brzina skeniranja od  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . Za merenja diferencijalno-pulsnom voltametrijom korišćena je brzina skeniranja od  $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , amplituda pulsa od 40 mV, vreme modulacije (*modulation time*) od 50 ms i korak potencijala (*potential step*) od 5 mV (Đorđević i sar., 2017; Đorđević i sar., 2018).

Jedinjenja koja pokazuju antioksidativnu aktivnost su kvantifikovana kao oblast ispod krive oksidativnog talasa uz korišćenje NOVA 2.0.2 softvera.

### 3.7 Statistička analiza

U okviru ove doktorske disertacije, univarijantne i multivarijantne statističke metode kao što su analiza glavnih komponentata (PCA), klasterska analiza (CA), jednofaktorska analiza varijansi (ANOVA) i Tuki test, primenjene su za obradu podataka dobijenih tokom analiza i izvršena je klasifikacija ispitivanih uzoraka drveta prema biljnom poreklu.

Analiza glavnih komponentata je primenjena uz korišćenje PLS ToolBox, v.6.2.1 (Eigenvector Research, Inc. 196 Hyacinth Road Manson, WA 98831, USA), softverskog paketa za MATLAB (7.12.0(R2011a) ([http://www.eigenvector.com/software/pls\\_toolbox.htm](http://www.eigenvector.com/software/pls_toolbox.htm)), Eigenvector Research, Inc., Wenatchee, WA). Korišćena je za klasifikaciju uzoraka drveta prema razlikama u emisionim spektrima, klasifikaciju uzoraka prema podacima dobijenim sa HPTLC hromatograma, određivanje moguće veze između elementalnog sastava i sadržaja fenolnih jedinjenja, kao i za uočavanje razlika u elektrohemijском ponašanju ispitivanih ekstrakata na osnovu vremena ekstrakcije, ekstrakcionog sredstva i vrsta drveta.

PCA analiza je primenjena na ekscitaciono-emisione matrice fluorescentnih spektara u cilju klasifikacije uzoraka drveta. Zavisne promenljive bile su različite vrste drveta i njihovi ekstrakti, dok su nezavisne promenljive bile snimljeni fluorescentni emisioni spektri.

Prilikom klasifikacije podataka dobijenih HPTLC analizom, PCA analiza je primenjena na matricu podataka dobijenih iz HPTLC hromatograma (11 uzoraka  $\times$  389 varijabli), u kojoj varijable predstavljaju intenzitete piksela na dužini od 389 dužina linija. Podaci su prethodno obrađeni uz pomoć korelacije optimizacije savijanja (*correlated optimized warping*, COW), metoda normiranja podataka (*standard normal variate*, SNV) i srednje centriranje (*mean centering*) radi poboljšavanja multivarijantnog modela.

Klasterska analiza i analiza glavnih komponentata su primenjene kako bi se utvrdila potencijalna veza između najzastupljenijih polifenola karakterističnih za svaku biljnu vrstu drveta i ispitivanih elemenata. Klasterska analiza je izvedena na skupovima podataka uz korišćenje SPSS softvera za Windows, verzija 21. Povezivanje između grupa zasnovano je na Pirsonovim koeficijentima korelacije (engl. *Pearson coefficient*). R-mod (R-mode) klusterske analize je korišćen za određivanje međusobnih odnosa elemenata i fenolnih jedinjenja određenih u ekstraktu drveta.

PCA analiza je primenjena kako bi se utvrdile razlike među ekstraktima drveta, primenjena je analiza glavnih komponentata na ukupan set podataka korišćenih i u klusterskoj analizi. Svi podaci su pre PCA analize grupno skalirani. Primenjeni su algoritam dekompozicije singularne vrednosti (SVD) i nivo pouzdanosti 0,95 za  $Q$  i Hotellingov  $T^2$  limit za spoljne vrednosti (*outliers*).

PCA je primenjena na podatke dobijene cikličnom voltametrijom kako bi se ustanovile razlike u elektrohemijском ponašanju ispitivanih ekstrakata na osnovu vremena ekstrakcije, ekstrakcionog sredstva i vrsta drveta. Svi podaci su grupno skalirani pre PCA analize. Primenjeni su algoritam dekompozicije singularne vrednosti i nivo pouzdanosti od 0,95 za  $Q$  i Hotellingov  $T^2$  limit za spoljne vrednosti.

Tuki test i korelacioni matriks urađeni su uz korišćenje NCSS softverskog paketa ([www.ncss.com](http://www.ncss.com)). Tuki test ( $p < 0,05$ ) primenjen je za određivanje značajne razlike među ekstraktima drveta u sadržaju ukupnih polifenola, antioksidativnog potencijala i sadržaju pojedinačnih fenolnih jedinjenja dobijenih uz pomoć HPLC-DAD-MS/MS. Takođe, Tuki test je korišćen za određivanje

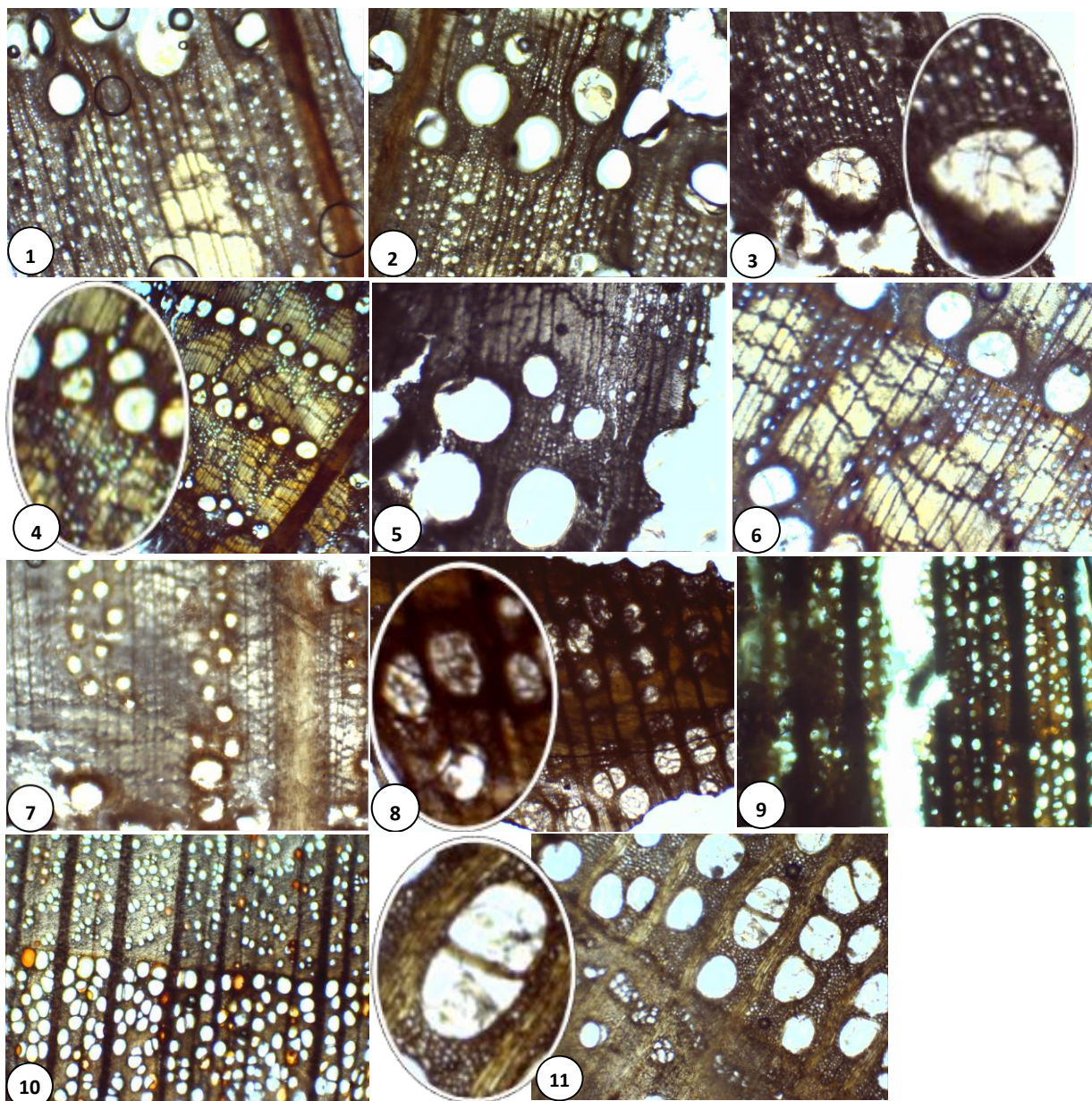
značajne razlike među ekstraktima drveta za svaku komponentu boje i za sadržaj makroelemenata i mikroelemenata u ekstraktima drveta.

ANOVA primenjena je uz korišćenje MS Excel programa (Microsoft Office 2007 Professional). Korišćena je za utvrđivanje postojanja statistički značajne razlike između rezultata dobijenih cikličnom voltametrijom i diferencijalno pulsnom voltametrijom, kao i za ispitivanje razlika u elektrohemijском ponašanju između različitih vremena ekstrakcije.

## 4 REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1 Rezultati taksonomske identifikacije vrsta drveta

Uzorci drveta su identifikovani na osnovu njihovih makroskopskih i mikroskopskih svojstava, koja su poređena sa karakteristikama poznatih vrsta. Posmatranjem mikrofotografija uzoraka (**Slika 3**) uočeni su anatomske elementi svojstveni za lišćare: traheje, vlakna i parenhim, na osnovu čega se može reći da svi uzorci (1 – 11) pripadaju lišćarskim vrstama. Pored toga, zbog razlike u boji beljike i srčevine uzorci se mogu svrstati u jedričave vrste, u koje spadaju vrste rodova: *Quercus* (hrast), *Fraxinus* (jasen), *Ulmus* (brest), *Morus* (dud), *Robinia* (bagrem), *Prunus* (koštuničavo voće), *Juglans* (orah), *Castanea* (kesten) i *Salix* (vrba) (Vilotić, 2000).



**Slika 3.** Mikrofotografije uzoraka drveta (1-11). Brojevi 1-11 odgovaraju rednom broju uzorka prema **Tabeli 3**



Na osnovu uočene veličine i rasporeda traheja ustanovljeno je da uzorci 9 i 10 spadaju u difuzno-porozne jedričave vrste, kojima pripadaju *Juglans*, *Salix* i *Prunus*. Zbog velike širine lumena traheja u ranoj zoni drveta ostali uzorci (1 – 8 i 11) mogu se klasifikovati kao krupno prstenasto-porozne jedričave vrste u koje spadaju *Castanea*, *Ulmus*, *Quercus*, *Fraxinus*, *Morus* i *Robinia* (Vilotić, 2000).

Dalja identifikacija izvršena je na osnovu makroskopskog izgleda (širina beljike, uočljivost traka lignuma) i anatomskih karakteristika uzoraka, kao što su: raspored (grupisanje), učestalost i širina lumena traheja, prisustvo ili odsustvo tila, tip (apotrahealan i paratrahealan) i distribucija aksijalnog parenhima i karakteristika radijalnog parenhima (traka lignuma) kao što su građa (homo- i/ili heterocelularne) i dimenzije: širina (jednoredne, višeredne) i visina traka (IAWA Bulletin, 1989).

Uzorci 1 – 7 imaju zonalno-difuzan apotrahealan aksijalni parenhim, sa ćelijama aksijalnog parenhima koje se nalaze između traka drveta, što je karakteristično za vrste roda *Quercus*, *Castanea* i *Juglans* (Vilotić, 2000). Uzorke 8 i 11 karakteriše paratrahealno vazicentričan aksijalni parenhim, sa parenhimatičnim ćelijama koje opkoljavaju niz traheja celom njegovom dužinom, kao što je slučaj sa vrstama roda *Fraxinus*, *Morus*, *Robinia* i *Ulmus* (Vilotić, 2000). Aksijalni parenhim uzoraka 9 i 10 je oskudan paratrahealno-vazicentričan i apotrahealno-difuzan.

Kako je prethodno ustanovljeno, na osnovu zonalno-difuznog apotrahealnog aksijalnog parenhima, uzorci 1 – 7 pripadaju vrstama *Quercus*, *Castanea* ili *Juglans*. *Juglans* su jedričave, rastresito semi-prstenasto-porozne vrste, sa trahejama ranog drveta širine 200  $\mu\text{m}$  i homocelularnim trakama lignuma koje nisu vidljive golim okom (Vilotić, 2000), što ne odgovara karakteristikama uzoraka 1 – 7 (**Slika 3**). *Castanea* su jedričave, krupno prstenasto-porozne vrste, slične vrstama *Quercus*, sa trahejama ranog drveta širine oko 500  $\mu\text{m}$  i zonalno-difuznim apotrahealnim aksijalnim parenhimom. Međutim, za razliku od vrsta roda *Quercus*, trake lignuma kestena nisu vidljive golim okom. Pored toga traheje poznog drveta su poredane u radijalne nizove koji se račvaju, što čini osnovne razlike između ove dve vrste (Vilotić, 2000). Traheje izuzetno širokih lumena, vidljive golim okom na svim presecima, isto kao i trake lignuma, kao što je slučaj sa uzorcima 1 – 7 (**Slika 3**), karakteristične su za rod *Quercus* (Vilotić, 2000). Na osnovu toga, kao i tipa aksijalnog parenhima potvrđeno je da uzorci 1 – 7 pripadaju ovom rodu.

Veći problem je determinacija vrsta podroda *Quercus*, posebno hrasta lužnjaka i kitnjaka, koji imaju veoma sličnu građu. Ipak, uprkos brojnim sličnostima i na makroskopskom i na mikroskopskom nivou, vrste roda *Quercus* se međusobno razlikuju po nekim svojstvima.

Na makroskopskom nivou, hrast kitnjak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.), lužnjak (*Quercus robur* L.) i cer (*Quercus cerris* L.) karakterišu markantni prstenovi prirasta, sa trahejama koje su krupne, raspoređene u vidu prstena i vidljive golim okom na svim presecima. Kao jedričave vrste odlikuje ih razlika u boji beljike i srčevine. Beljika hrasta kitnjaka i lužnjaka je uska, širine do oko 3 cm, dok cer odlikuje nešto veća širina beljike. Pored toga, i beljika i srčevina kitnjaka svetlije su boje nego kod lužnjaka (Vilotić, 2000). Nadalje, na mikroskopskom nivou, traheje rane zone lužnjaka su veoma široke 150–400  $\mu\text{m}$  i raspoređene u 3 – 5 tangencijalnih nizova, dok su traheje rane zone kitnjaka nešto manje širine (150 – 350  $\mu\text{m}$  i raspoređene u 1 – 3 tangencijalna niza. Najčešće su ispunjene tilama (**Slika 3**, uzorci 1 – 6). Traheje ranog drveta cera odlikuju se širinom lumena do 280  $\mu\text{m}$  i raspoređene su u grupama na početku goda (Vilotić, 2000). Pored razlika u dimenzijama, postoje i razlike u rasporedu traheja kasnog drveta između vrsta roda *Quercus*. Traheje kasnog drveta lužnjaka su uske, okružene vazicentričnim traheidama i aksijalnim parenhimom, i raspoređene pojedinačno ili u grupi. Raspored traheja je radijalan (uzorci 1, 2 i 3), što odlikuje drvo ove vrste radijalnim šarama koje su makroskopski vidljive. Traheje kasnog drveta kitnjaka manjih su prečnika, i raspoređene su u radijalnim nizovima, obrazujući trouglove sa osnovicama na granici prstena prirasta (**Slika 3**, uzorci 4, 5 i 6). Ovakav raspored traheja kasne zone je specifičan za kitnjak,

i jedna od osnovnih njegovih razlika od lužnjaka (Vilotić, 2000). Traheje kasnog drveta cera manjih su prečnika i raspoređene su u radijalnim nizovima. Drvena vlakna ovih vrsta roda *Quercus* su uskih lumena i lignifikovanih zidova (Vilotić, 2000).

Trake drveta (trake lignuma) hrasta lužnjaka, kitnjaka i cera su homocelularne, a po širini mogu biti jednoredne i višeredne, i vidljive su na svim presecima. Međutim, dimenzije traka lignuma i rastojanja između njih se razlikuju između ovih vrsta. Trake drveta lužnjaka širine su 0,5 – 1 mm i visine do 7 cm, što drvetu daje lepu teksturu. Razmak između traka koji iznosi 1 cm karakterističan za lužnjak (Vilotić, 2000). Kitnjak karakterišu ili ekstremno uske – jednoredne (visine do 20 ćelija) ili ekstremno široke – višeredne trake drveta (širine 30 – 35 ćelija, odnosno 0,7 mm i visine od nekoliko stotina ćelija (5 cm)). Rastojanje između najširih traka od oko 5 mm čini jednu od specifičnih karakteristika ove vrste. Višeredne trake drveta cera široke su do 32 ćelije, a međusobno su udaljene do 3 mm (Vilotić, 2000).

Na osnovu makroskopskog izgleda i navedenih mikroskopskih karakteristika uzoraka utvrđeno je da uzorci 1, 2 i 3 pripadaju vrsti hrast lužnjak - *Quercus robur* L., (sin. *Quercus pedunculata* Ehrh.), a uzorci 4, 5 i 6 vrsti hrast kitnjak - *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. (sin. *Quercus sessiliflora* Salisb.), dok uzorak 7, po karakteristikama koje pokazuje, pripada vrsti cer (*Quercus cerris* L.).

Jedričavo krupno prstenasto-porozne vrste koje karakteriše paratrahealno vazicentričan aksijalni parenhim (uzorci 8 i 11) pripadaju vrstama roda *Fraxinus*, *Morus*, *Robinia* ili *Ulmus* (Vilotić, 2000). S obzirom na to da uzorci 8 i 11 imaju usku beljiku i vidljive trake drveta, a traheje su ispunjene tilama (Slika 3, uzorci 8 i 11), zaključeno je da pripadaju vrstama rodova *Robinia* i/ili *Morus* (Vilotić, 2000).

Karakteristike vrste *Robinia pseudoacacia* (bagrem) kao što su: veoma uska beljika (2-5 prstenova prirasta), traheje ranog drveta vidljive golim okom u vidu rupica i raspoređene u 2-3 niza, širine lumena 200-300 µm i ispunjene tilama, traheje kasnog drveta grupisane u kose radijalne i tangencijalne nizove, trake drveta homo- i heterocelularne, širine do 7 ćelija i jedva vidljive golim okom na poprečnom preseku (Vilotić, 2000) odgovaraju uočenoj anatomskoj građi uzorka 8, te je ovaj uzorak identifikovan kao bagrem.

Vrstu beli dud (*Morus alba*) karakteriše uska beljika (do 5 prstenova prirasta), traheje ranog drveta širine lumena 250-370 µm koje su ispunjene tilama i raspoređene pojedinačno ili u grupama (2-3) u 1-3 tangencijalna niza i vidljive golim okom, dok je zona kasnog drveta sa malim brojem traheja koje su raspoređene bliže granici prstenova prirasta, pojedinačno ili u grupama (2-10), formirajući tangencijalne nizove. Trake drveta čine parenhimatične ćelije različitih dimenzija, te su heterocelularne. Trake su širine 1-9 ćelija i visine do 45 ćelija, mnogobrojne i golim okom jasno uočljive kao uzane linije na poprečnom preseku (Vilotić, 2000). Poređenjem navedenih karakteristika sa makroskopskim i mikroskopskim karakteristikama uzorka 11 utvrđeno je da ovaj uzorak pripada vrsti beli dud (*Morus alba*).

Uzorci 9 i 10 su, na osnovu veličine i rasporeda traheja, svrstani u difuzno-porozne jedričave vrste, kojima pripadaju *Juglans*, *Salix* i *Prunus* (Vilotić, 2000). Vrste roda *Juglans* i *Salix* karakteriše apotrahealan zonalno-difuzan aksijalni parenhim, dok je aksijalni parenhim uzoraka 9 i 10 oskudan paratrahealno-vazicentričan i apotrahealno-difuzan. Pored toga, *Juglans* karakteriše široka beljika, traheje širine do 200 µm koje su vidljive golim okom, dok trake drveta nisu vidljive golim okom a ni lupom (Vilotić, 2000), što ne odgovara uočenim karakteristikama uzoraka 9 i 10. Vrste roda *Salix* imaju usku beljiku, a traheje i trake lignuma nisu vidljive golim okom (Vilotić, 2000), što takođe ne odgovara karakteristikama uzoraka 9 i 10. Na osnovu uočenih karakteristika i poređenjem sa ostalim difuzno-poroznim jedričavim vrstama zaključeno je da uzorci 9 i 10 pripadaju vrstama roda *Prunus*.

Rod *Prunus* karakteriše uska beljika i trake drveta koje su uske, brojne i jedva vidljive golim okom na poprečnom preseku. Uzorak 10 karakterišu jasni prstenovi prirasta sa širokom ranom zonom. Traheje rane zone su nešto veće i brojnije od traheja kasne zone, a na poprečnom preseku se vide golim okom kao sitne rupice, što predstavlja karakteristiku sitno prstenasto-poroznih vrsta drveta (Vilotić, 2000); raspoređene su pojedinačno ili grupama (2-6). Trake drveta su homocelularne i heterocelularne, brojne i uske (širine 2-4 ćelije). Aksijalni parenhim je oskudan, apotrahealan – difuzan i paratrahealan – vazicentričan. Na osnovu opisanih karakteristika potvrđena je pripadnost uzorka 10 vrsti divlja trešnja (*Prunus avium*).

## 4.2 PRVI DEO – Rezultati analiza uzoraka i ekstrakata drveta

### 4.2.1 Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativni potencijal

U svim ekstraktima drveta određeni su sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativni potencijal, dok su uz pomoć Tuki testa određene značajne razlike među ispitivanim ekstraktima. Sadržaj ukupnih polifenola izražen je u gram ekvivalentima galne kiseline (*gallic acid equivalents*, GAE) po kilogramu drveta ( $\text{g GAE}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i nalazio se u opsegu od  $5,31 \text{ g GAE}\cdot\text{kg}^{-1}$  (cer, uzorak 7) do  $107,69 \text{ g GAE}\cdot\text{kg}^{-1}$  (beli dud, uzorak 11). Antioksidativni potencijal je izražen u mmol ekvivalenta troloksa (*trolox equivalents*, TE) po kilogramu drveta ( $\text{mmol TE}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i nalazio se u opsegu od  $28,14 \text{ mmol TE}\cdot\text{kg}^{-1}$  (cer) do  $844,93 \text{ mmol TE}\cdot\text{kg}^{-1}$  (beli dud) (**Tabela 5**).

Trend u sadržaju ukupnih polifenola je sledeći: beli dud (11) > džanarika (9) > bagrem (8) > hrast lužnjak (1–3), trešnja (10), hrast kitnjak (4–6) > cer (7). Ekstrakt belog duda (11) se izdvojio u odnosu na ostale ispitivane ekstrakte drveta prema značajno većoj količini ukupnih polifenola, što je u skladu sa rezultatima koje su dobili De Rosso i saradnici (2009a). Manji sadržaj polifenola u ceru (7) u odnosu na ostale uzorke drveta u skladu je sa rezultatima Gortzi i saradnika (2013).

Među uzorcima hrasta, najveći sadržaj ukupnih polifenola određen je u ekstraktima hrasta lužnjaka iz Slavonije ( $55,51 \text{ g GAE}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i hrasta lužnjaka iz Gornjeg Radana ( $54,21 \text{ g GAE}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Svi ostali uzorci hrasta (3–6) su sadržali manje od  $40 \text{ g GAE}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima hrasta nalazio se u sledećim opsezima:  $30,30\text{--}39,46 \text{ g GAE}\cdot\text{kg}^{-1}$  (hrast kitnjak), odnosno  $37,51\text{--}55,51 \text{ g GAE}\cdot\text{kg}^{-1}$  (hrast lužnjak) i  $5,31 \text{ g GAE}\cdot\text{kg}^{-1}$  (cer). Može se pretpostaviti da sadržaj polifenola zavisi od vrste hrasta, pošto su ekstrakti hrasta kitnjaka generalno sadržali manje polifenola nego ekstrakti hrasta lužnjaka, što je u skladu sa rezultatima koje su dobili Alañón i saradnici (2011), dok se ekstrakt cera izdvojio po najmanjem sadržaju polifenola. Sadržaj polifenola u ekstraktu divlje trešnje (10) nalazio se u okviru opsega za ekstrakte hrasta lužnjaka (1–3).

Srčevina hrasta je bogata derivatima lignina, elagitaninima, elaginskom kiselinom i galnom kiselinom, ali ne sadrži druge vrste fenolnih jedinjenja (Fernández de Simón i sar., 2014a), što može da objasni manji sadržaj polifenola u hrastu u odnosu na druge vrste drveta. Takođe, sadržaj polifenola iz hrasta značajno raste sa degradacijom lignina u procesu odležavanja alkoholnih pića u kontaktu sa drvetom (Zhang i sar., 2015).

Svi ekstrakti drveta osim ekstrakta cera (7) pokazuju značajan antioksidativni potencijal (**Tabela 5**). Antioksidativni potencijal belog duda i džanarike ( $844,93$ , odnosno  $612,95 \text{ mmol TE}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) značajno je veći nego kod ostalih uzoraka drveta. Trend u antioksidativnom potencijalu među uzorcima drveta je sličan kao za sadržaj ukupnih polifenola (**Tabela 5**). Jedinu značajnu razliku predstavlja to što je antioksidativni potencijal bagrema (8) u istom opsegu sa antioksidativnim potencijalom uzorka hrasta lužnjaka (1–3), dok je trešnja (10) pokazala niži antioksidativni potencijal u odnosu na većinu uzoraka hrasta (1, 2, 4, 6).

**Tabela 5.** Sadržaj ukupnih polifenola (TPC) i antioksidativni potencijal (RSA) ispitivanih ekstrakata drveta

Redni broj uzorka*	TPC (g GAE·kg <sup>-1</sup> )	RSA (mmol TE·kg <sup>-1</sup> )
1	55,51 ± 3,15 <sup>d</sup>	473,92 ± 13,99 <sup>c</sup>
2	54,21 ± 2,47 <sup>d</sup>	405,24 ± 10,87 <sup>e</sup>
3	37,91 ± 0,86 <sup>e</sup>	283,15 ± 12,01 <sup>g</sup>
4	39,46 ± 1,14 <sup>e</sup>	437,95 ± 13,73 <sup>de</sup>
5	30,30 ± 0,95 <sup>g</sup>	220,79 ± 6,18 <sup>h</sup>
6	37,10 ± 1,17 <sup>eg</sup>	333,73 ± 13,88 <sup>f</sup>
7	5,31 ± 0,15 <sup>h</sup>	28,14 ± 0,95 <sup>i</sup>
8	74,28 ± 1,73 <sup>c</sup>	451,47 ± 11,13 <sup>cd</sup>
9	81,71 ± 0,32 <sup>b</sup>	612,95 ± 13,43 <sup>b</sup>
10	49,69 ± 1,88 <sup>d</sup>	299,93 ± 8,41 <sup>fg</sup>
11	107,69 ± 6,05 <sup>a</sup>	844,93 ± 20,31 <sup>a</sup>

\*Brojevi 1–11 u prvoj koloni odgovaraju rednim brojevima uzoraka prema **Tabeli 3**. Različita slova u istoj koloni označavaju značajnu razliku prema Tuki testu,  $p < 0,05$ .

Na osnovu dobijenih podataka (**Tabela 5**), izračunat je koeficijent korelacije između antioksidativnog potencijala (RSA) i sadržaja ukupnih polifenola (TPC) ekstrakata drveta. Dobijena je visoka vrednost koeficijenta korelacije ( $r=0,951$ ), koja potvrđuje prethodno uočenu sličnost u trendovima za antioksidativni potencijal i sadržaj ukupnih polifenola.

#### 4.2.2 Sadržaj pojedinačnih polifenola određen primenom UHPLC–DAD MS/MS

Primenom ultravisoko-efikasne tačne hromatografije spregnute sa detektorom sa nizom dioda i masenim spektrometrom sa trostrukim kvadrupolom (UHPLC–DAD MS/MS), u ekstraktima drveta je kvantifikovano ukupno trideset sedam polifenola, među kojima je osam fenolnih kiselina (1–8), devet flavonola (9–17), šest flavona (18–23), četiri flavanona (24–27), jedan flavanonol (28), dva izoflavona (29, 30), tri stilbena (31–33), dva kumarina (34, 35), jedan dihidrohalkon (36) i jedan cinamaldehyd (37) (**Tabela 6**).

Tabela 6. Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima drveta (mg·kg<sup>-1</sup>)

R B		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Fenolne kiseline												
1	Galna kiselina	117,70 ± 6,17 <sup>a</sup>	52,25 ± 1,24 <sup>c</sup>	17,38 ± 0,99 <sup>f</sup>	27,72 ± 1,78 <sup>d</sup>	22,99 ±1,83 <sup>e</sup>	26,4 ± 0,53 <sup>d</sup>	-	58,74 ± 3,15 <sup>b</sup>	-	-	-
2	Protokatehuinska 5- <i>O</i> -	34,76 ± 1,17 <sup>d</sup>	35,86 ± 0,98 <sup>d</sup>	20,13 ± 0,66 <sup>g</sup>	30,69 ± 2,03 <sup>e</sup>	9,79 ± 0,79 <sup>i</sup>	-	22,33 ± 1,32 <sup>f</sup>	15,62 ±0,21 <sup>h</sup>	533,39 ± 14,51 <sup>a</sup>	83,16 ± 9,36 <sup>c</sup>	201,85 ± 6,98 <sup>b</sup>
3	Kafeoilhininska <i>p</i> -	-	-	-	-	-	-	0,88 ± 0,09 <sup>b</sup>	-	15,18 ± 0,84 <sup>a</sup>	-	0,66 ± 0,02 <sup>c</sup>
4	Hidroksibenzoeva <i>p</i> -Kumarinska	-	-	-	-	-	-	19,58 ± 1,12 <sup>d</sup>	164,78 ± 12,36 <sup>b</sup>	53,46 ± 3,48 <sup>c</sup>	51,70 ± 6,66 <sup>c</sup>	260,04 ± 13,03 <sup>a</sup>
5	kiselina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22,44 ± 1,29 <sup>a</sup>	5,50 ± 0,75 <sup>b</sup>
6	Ferulinska kiselina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,03 ± 0,57 <sup>a</sup>	5,39 ± 0,11 <sup>b</sup>
7	Elaginska kiselina	15958,80 ± 459,63 <sup>a</sup>	9363,86 ± 236,14 <sup>c</sup>	3039,41 ± 94,58 <sup>e</sup>	10099,32 ± 335,23 <sup>b</sup>	8892,95 ± 215,46 <sup>d</sup>	8872,05 ± 198,55 <sup>d</sup>	205,15 ± 14,11 <sup>j</sup>	1131,46 ± 58,63 <sup>f</sup>	672,54 ± 22,94 <sup>g</sup>	267,74 ± 9,59 <sup>i</sup>	375,76 ± 12,22 <sup>h</sup>
8	Kofeinska kiselina	1,32 ± 0,05 <sup>d</sup>	1,21 ± 0,07 <sup>d</sup>	1,10 ± 0,03 <sup>e</sup>	1,10 ± 0,03 <sup>e</sup>	0,88 ± 0,00 <sup>g</sup>	1,10 ± 0,04 <sup>e</sup>	-	1,43 ± 0,03 <sup>c</sup>	2,09 ± 0,23 <sup>b</sup>	2,64 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,43 ± 0,05 <sup>c</sup>
Flavonoli												
9	Rutin	-	-	-	-	-	-	0,44 ± 0,01 <sup>a</sup>	-	-	0,33 ± 0,00 <sup>b</sup>	-
10	Hiperozid	-	-	-	-	-	-	0,33 ± 0,01 <sup>c</sup>	-	-	0,55 ± 0,05 <sup>b</sup>	3,63 ± 0,13 <sup>a</sup>
11	Izorarnetin-3- <i>O</i> - glikozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,22 ± 0,00
12	Kempferol-7- <i>O</i> - glikozid	-	-	-	-	-	-	-	-	0,44 ± 0,00 <sup>b</sup>	-	3,08 ± 0,09 <sup>a</sup>
13	Kvercetin	9,46 ± 0,00 <sup>d</sup>	9,35 ± 0,05 <sup>e</sup>	-	9,46 ± 0,05 <sup>d</sup>	9,90 ± 0,08 <sup>c</sup>	9,46 ± 0,03 <sup>d</sup>	-	10,12 ± 0,06 <sup>b</sup>	10,23 ± 0,26 <sup>b</sup>	187,11 ± 7,36 <sup>a</sup>	-
14	Kempferol	0,66 ± 0,06 <sup>c</sup>	-	-	-	0,77 ± 0,06 <sup>c</sup>	-	-	-	-	140,14 ± 6,25 <sup>a</sup>	57,31 ± 3,14 <sup>b</sup>
15	Izorarnetin	-	-	-	-	-	-	5,94 ± 0,13 <sup>b</sup>	-	-	-	6,16 ± 0,17 <sup>a</sup>
16	Galangin	-	-	-	-	0,44 ± 0,01 <sup>b</sup>	-	-	-	-	54,23 ± 1,28 <sup>a</sup>	-

17	Kempferid	-	-	-	-	0,11 ± 0,00 <sup>b</sup>	-	-	-	-	8,58 ± 0,59 <sup>e</sup>	-
Flavoni												
18	Viteksin	-	-	-	-	0,22 ± 0,00 <sup>b</sup>	-	-	-	-	66,88 ± 3,20 <sup>a</sup>	-
19	Luteolin	-	-	-	0,66 ± 0,01 <sup>e</sup>	1,98 ± 0,29 <sup>c</sup>	-	-	-	0,77 ± 0,03 <sup>d</sup>	55,99 ± 2,17 <sup>a</sup>	3,96 ± 0,34 <sup>b</sup>
20	Hrizin	0,66 ± 0,02 <sup>g</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>i</sup>	-	2,75 ± 0,61 <sup>d</sup>	13,64 ± 0,97 <sup>b</sup>	1,10 ± 0,06 <sup>f</sup>	0,55 ± 0,01 <sup>h</sup>	1,32 ± 0,15 <sup>e</sup>	1,87 ± 0,42 <sup>e</sup>	716,10 ± 14,31 <sup>a</sup>	4,18 ± 0,23 <sup>c</sup>
21	Apigenin	-	-	-	-	1,21 ± 0,06 <sup>d</sup>	-	-	1,98 ± 0,21 <sup>c</sup>	0,44 ± 0,01 <sup>e</sup>	233,97 ± 8,99 <sup>a</sup>	2,97 ± 0,14 <sup>b</sup>
22	Acacetin	-	-	-	0,22 ± 0,00 <sup>d</sup>	1,21 ± 0,10 <sup>b</sup>	-	-	-	-	61,49 ± 1,52 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,02 <sup>c</sup>
23	Genkvanin	-	-	-	0,22 ± 0,01 <sup>c</sup>	1,21 ± 0,07 <sup>b</sup>	-	-	-	-	60,06 ± 0,99 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>c</sup>
Flavanoni												
24	Naringenin	-	-	-	0,33 ± 0,01 <sup>e</sup>	2,64 ± 0,21 <sup>c</sup>	0,11 ± 0,00 <sup>f</sup>	0,33 ± 0,02 <sup>e</sup>	-	1,21 ± 0,06 <sup>d</sup>	409,20 ± 4,62 <sup>a</sup>	5,39 ± 0,39 <sup>b</sup>
25	Naringin	0,11 ± 0,00 <sup>d</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>d</sup>	-	0,33 ± 0,04 <sup>b</sup>	-	0,22 ± 0,00 <sup>c</sup>	-	0,22 ± 0,02 <sup>c</sup>	-	-	1,10 ± 0,11 <sup>a</sup>
26	Eriodiktiol	-	-	0,66 ± 0,05 <sup>c</sup>	-	-	-	0,77 ± 0,04 <sup>c</sup>	-	0,99 ± 0,09 <sup>b</sup>	89,54 ± 2,96 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,07 <sup>b</sup>
27	Pinocembrin	1,1 ± 0,09 <sup>h</sup>	0,44 ± 0,01 <sup>j</sup>	0,33 ± 0,01 <sup>k</sup>	4,18 ± 0,47 <sup>d</sup>	26,73 ± 0,89 <sup>b</sup>	1,98 ± 0,11 <sup>g</sup>	0,88 ± 0,08 <sup>i</sup>	3,52 ± 0,12 <sup>e</sup>	2,86 ± 0,26 <sup>f</sup>	1851,19 ± 26,34 <sup>a</sup>	6,71 ± 0,56 <sup>c</sup>
Flavanonoli												
28	Taksifolin	5,72 ± 0,19 <sup>g</sup>	8,14 ± 0,30 <sup>f</sup>	11,44 ± 0,98 <sup>d</sup>	2,20 ± 0,15 <sup>i</sup>	4,07 ±0,21 <sup>h</sup>	0,99 ± 0,07 <sup>j</sup>	9,90 ± 0,46 <sup>e</sup>	-	136,18 ± 5,68 <sup>c</sup>	8455,70 ± 32,35 <sup>a</sup>	4034,69 ± 17,32 <sup>b</sup>
Izoflavoni												
29	Daizdein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,77 ± 0,03	-
30	Genistein	-	-	-	-	1,65 ± 0,11 <sup>b</sup>	-	-	-	-	137,17 ± 4,16 <sup>a</sup>	-
Stilbeni												
31	Resveratrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	121,55 ± 4,96
32	Oksiresveratrol	-	-	-	3,30 ± 0,10 <sup>e</sup>	3,74 ± 0,31 <sup>d</sup>	-	15,07 ± 0,58 <sup>c</sup>	44,55 ± 1,56 <sup>b</sup>	3,85 ± 0,23 <sup>d</sup>	-	1731,73 ± 62,31 <sup>a</sup>
33	Pterostilben	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,21 ± 0,56

Kumarini												
34	Eskulin	0,44 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>e</sup>	0,11 ± 0,00 <sup>f</sup>	-	-	0,44 ± 0,00 <sup>c</sup>	-	-	1,87 ± 0,09 <sup>b</sup>	-	2,31 ± 0,11 <sup>a</sup>
35	Eskuletin	-	-	-	-	-	-	12,87 ± 0,56 <sup>c</sup>	-	-	102,30 ± 3,47 <sup>a</sup>	29,15 ± 1,34 <sup>b</sup>
Dihidrochalkoni												
36	Floretin	-	-	-	-	0,44 ± 0,07 <sup>c</sup>	-	0,33 ± 0,05 <sup>c</sup>	-	1,43 ± 0,13 <sup>b</sup>	17,16 ± 1,31 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,08 <sup>c</sup>
Cinamaldehydi												
37	Koniferil aldehid	13,86 ± 1,52 <sup>b</sup>	7,26 ± 0,35 <sup>e</sup>	20,13 ± 1,15 <sup>a</sup>	8,91 ± 0,20 <sup>d</sup>	9,90 ± 0,78 <sup>c</sup>	-	-	6,05 ± 0,41 <sup>f</sup>	2,64 ± 0,11 <sup>h</sup>	3,85 ± 0,09 <sup>g</sup>	0,99 ± 0,07 <sup>i</sup>

Brojevi 1-11 u prvom redu odgovaraju rednim brojevima uzoraka prema **Tabeli 3**. Redni brojevi u kolonama označavaju redni broj ispitivanog jedinjenja. Različita slova u istom redu označavaju značajnu razliku među ekstraktima drveta prema Tuki testu,  $p < 0,05$

Elaginska kiselina je najzastupljenija fenolna kiselina u svim ekstraktima drveta. Najveća količina elaginske kiseline kvantifikovana je u ekstraktu hrasta lužnjaka iz Slavonije (uzorak 1, 15958,80 mg·kg<sup>-1</sup>), dok je najmanja količina elaginske kiseline kvantifikovana u ekstraktu cera (205,15 mg·kg<sup>-1</sup>). U poređenju sa ostalim ispitivanim uzorcima drveta, ekstrakti hrasta lužnjaka i kitnjaka (uzorci 1–6) sadržali su najveće količine elaginske kiseline, koje se nalaze u opsegu od 3039,41 mg·kg<sup>-1</sup> (uzorak 3) do 15958,80 mg·kg<sup>-1</sup> (uzorak 1).

Galna kiselina je zastupljena u hrastovima lužnjacima i kitnjacima (uzorci 1–6) u opsegu od 17,38 mg·kg<sup>-1</sup> (uzorak 3) do 117,70 mg·kg<sup>-1</sup> (uzorak 1), kao i u bagremu (58,74 mg·kg<sup>-1</sup>). Alañón i saradnici (2011) zapazili su značajno veću koncentraciju galne i elaginske kiseline u hrastu nego u divljoj trešnji, što je u skladu sa rezultatima ove disertacije. Međutim, prema Coldea i saradnicima (2020), galna kiselina je detektovana u trešnji u značajnim količinama, dok u ovoj disertaciji nije bila detektovana u ekstraktu ove vrste drveta.

Protokatehuinska kiselina je detektovana u svim uzorcima osim u hrastu kitnjaku iz Ravne Gore (uzorku 6). Najveći sadržaj protokatehuinske kiseline je detektovan u džanarici (533,39 mg·kg<sup>-1</sup>, uzorak 9), i to u količinama koje su više nego dvostruko veće u odnosu na ostale uzorke drveta. Beli dud (uzorak 11) i divlja trešnja (uzorak 10) su takođe bogate protokatehuinskom kiselinom (201,85 mg·kg<sup>-1</sup>, odnosno 83,16 mg·kg<sup>-1</sup>). Sadržaj ove kiseline u ekstraktima hrasta je kvantifikovan u opsegu od 9,79 mg·kg<sup>-1</sup> (uzorak 5) do 35,86 mg·kg<sup>-1</sup> (uzorak 2). Madrera i saradnici (2010) su detektovali protokatehuinsku kiselinu u drvetu divlje trešnje u nižoj koncentraciji (1,13 mg·L<sup>-1</sup>) u odnosu na ispitivani uzorak trešnje, dok u njihovom ekstraktu hrasta nije detektovano ovo jedinjenje, što je u skladu sa rezultatima iz ove disertacije samo za uzorak hrasta iz Ravne Gore (uzorak 6). Ove razlike mogu da se pripišu različitom geografskom poreklu i uslovima rasta drveta, ali i uticaju termičkog tretmana na uzorke koje su Madrera i saradnici (2010) ispitivali.

*p*-Hidroksibenzoeva kiselina je zastupljena u svim uzorcima osim u hrastu lužnjaku i kitnjaku (uzorci 1-6). Najveća količina ovog jedinjenja detektovana je u belom dudu (260,04 mg·kg<sup>-1</sup>, uzorak 11), dok je najmanje zastupljena u ceru (19,58 mg·kg<sup>-1</sup>, uzorak 7). U bagremu je takođe kvantifikovana velika količina ovog jedinjenja (164,78 mg·kg<sup>-1</sup>, uzorak 8). Prema Alañón i saradnicima (2011), ovo jedinjenje je detektovano u ekstraktu trešnje, što je u skladu sa rezultatima ove disertacije. Međutim, prema njima, *p*-hidroksibenzoeva kiselina nije detektovana u uzorcima hrasta kitnjaka, dok je sadržaj ovog jedinjenja u uzorcima hrasta lužnjaka bio u opsegu 0,00–17,11 µg·g<sup>-1</sup>. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije. Prisustvo ovog jedinjenja u uzorcima hrasta lužnjaka iz literature može da se objasni različitim geografskim poreklom i uslovima rasta uzoraka drveta, kao i različitim postupkom pripreme uzoraka.

*p*-Kumarinska i ferulinska kiselina detektovane su jedino u ekstraktima belog duda i divlje trešnje. Divlja trešnja je bila bogatija ovim jedinjenjima u odnosu na beli dud.

Najveća količina *p*-kumarinske kiseline kvantifikovana je u ekstraktu divlje trešnje, što je u suprotnosti sa Alañón i sar. (2011), prema kojima je hrast sadržao veće količine ovog jedinjenja nego trešnja. S druge strane, prema Coldea i saradnicima (2020), *p*-kumarinska kiselina nije detektovana u trešnji, hrastu i dudu.

Najveća količina ferulinske kiseline je detektovana u ekstraktu trešnje, što je u skladu sa rezultatima iz literature (Alañón i sar., 2011; Coldea i sar., 2020). Međutim, prema navedenim referencama iz literature ferulinska kiselina je detektovana u ekstraktima hrasta, dok u uzorcima ispitivanim u okviru ove disertacije ona nije detektovana. Sa druge strane, prema Kovaču i saradnicima (2000), ferulinska kiselina nije zastupljena u evropskim vrstama hrasta, već samo u američkom hrastu.



Divlja trešnja je, u odnosu na hrast, sadržala veće količine protokatehuinske, *p*-kumarinske, kofeinske i ferulinske kiseline, kao i manje količine koniferilaldehida, što je u suprotnosti sa rezultatima Alañón i saradnika (2011). Ovo zapažanje se može objasniti različitim procesom ekstrakcije ili različitim geografskim poreklom drveta, kao i mogućim razlikama u starosti i položaju na stablu sa kog su uzeti uzorci.

Prema Chan i saradnicima (2016), u različitim delovima belog duda identifikovana su sledeće fenolne kiseline: 3-*O*-kafeoilhininska kiselina (hlorogena kiselina), elaginska kiselina, *p*-hidroksibenzoeva kiselina (plod), 5-*O*-kafeoilhininska kiselina (neohlorogena kiselina), *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, galna kiselina, hidroksibenzoeva kiselina, protokatehuinska kiselina (list, plod). U ekstraktu drveta duda ispitivanom u okviru ove disertacije su detektovana sva jedinjenja koja navode Chan i saradnici (2016), osim galne kiseline, koja nije detektovana i 3-*O*-kafeoilhininska kiselina, koja nije ispitivana u ovoj disertaciji.

Flavonoli su detektovani u svim uzorcima osim u hrastu lužnjaku iz Olova (uzorak 3). U najvećem broju uzoraka, kvercetin je najzastupljeniji flavonol. Ovo jedinjenje nije detektovano u hrastu lužnjaku (uzorak 3), ceru i belom dudu, dok je u nekim uzorcima hrasta (2, 4, 6), bagremu i džanarici predstavljao jedini detektovan flavonol.

Divlja trešnja i beli dud su jedini sadržali flavonole u koncentraciji većoj od 50 mg·kg<sup>-1</sup>. Najzastupljeniji flavonoli u divljoj trešnji su kvercetin (187,11 mg·kg<sup>-1</sup>), kempferol (140,14 mg·kg<sup>-1</sup>) i galangin (54,23 mg·kg<sup>-1</sup>), dok je najzastupljeniji flavonol u belom dudu kempferol (57,31 mg·kg<sup>-1</sup>).

U ekstraktima hrasta u kojima je detektovan kvercetin, kvantifikovan je u opsegu od 9,35 mg·kg<sup>-1</sup> (uzorak 2) do 9,90 mg·kg<sup>-1</sup> (uzorak 5). Kada je reč o uzorcima hrasta, najveći broj flavonola je detektovan u hrastu kitnjaku iz Kuršumlije (uzorak 5), dok je cer sadržao flavonole koji nisu detektovani u uzorcima hrasta lužnjaka i kitnjaka. Navedena dva uzorka jedini nisu podvrgnuti procesu prirodnog sušenja. Najzastupljeniji flavonol u ceru je ramnetin (5,94 mg·kg<sup>-1</sup>).

Flavoni su detektovani u svim ekstraktima osim u ekstraktu hrasta lužnjaka iz Olova (uzorak 3). Hrizin je najzastupljeniji flavon u ekstraktima svih uzoraka, osim bagrema, u čijem je ekstraktu najzastupljeniji apigenin. Od svih ispitivanih uzoraka, jedino je ekstrakt divlje trešnje sadržao sve ispitivane flavone u koncentracijama iznad 50 mg·kg<sup>-1</sup>, dok koncentracija pojedinačnih flavona detektovanih u ostalim ekstraktima nije premašivala vrednost od 15 mg·kg<sup>-1</sup>. U hrastu kitnjaku iz Kuršumlije (uzorak 5) su takođe detektovani svi ispitivani flavoni, ali u značajno manjim koncentracijama nego u divljoj trešnji.

Među uzorcima hrasta, hrizin je zastupljen u hrastu kitnjaku iz Kuršumlije (uzorak 5) u značajno većim količinama u poređenju sa ostalim uzorcima (13,64 mg·kg<sup>-1</sup>), dok je u ostalim ekstraktima hrasta zastupljen u opsegu od 0,22 mg·kg<sup>-1</sup> (uzorak 2) do 2,75 mg·kg<sup>-1</sup> (uzorak 4). U većini uzoraka hrasta (uzorci 1, 2, 6, 7) hrizin je bio jedini detektovan flavon, u koncentracijama ispod 2 mg·kg<sup>-1</sup>, dok su dva uzorka hrasta kitnjaka bili jedini uzorci hrasta koji su sadržali flavone različite od hrizina, odnosno luteolin, acacetin, genkvanin (uzorci 4, 5), viteksin i apigenin (uzorak 5).

Prema našem istraživanju, pinocembrin je najzastupljeniji flavanon u ekstraktima svih vrsta osim hrasta lužnjaka iz Olova (uzorak 3), u kojem je najzastupljeniji eriodiktiol. Divlja trešnja je sadržala izrazito veće količine pinocembrina (1851,19 mg·kg<sup>-1</sup>), naringenina (409,20 mg·kg<sup>-1</sup>) i eriodiktiola (89,54 mg·kg<sup>-1</sup>) u odnosu na druge ekstrakte. Sadržaj pinocembrina je značajno veći u hrastu kitnjaku iz Kuršumlije (26,73 mg·kg<sup>-1</sup>, uzorak 5) u odnosu na druge ekstrakte hrasta, koji su sadržali pinocembrin u opsegu koncentracija od 0,33 mg·kg<sup>-1</sup> (uzorak 3) do 4,18 mg·kg<sup>-1</sup> (uzorak 4).

Taksifolin, jedini ispitivani flavanonol, zastupljen je u ekstraktima svih vrsta drveta osim bagrema. Ekstrakt divlje trešnje (uzorak 10) je sadržao najveću količinu taksifolina ( $8455,70 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), zatim ekstrakt belog duda ( $4034,69 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , uzorak 11) i džanarika ( $136,18 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , uzorak 9), dok su ekstrakti hrasta (uzorci 1-7) sadržali najmanju količinu taksifolina ( $0,99 - 11,44 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Među ekstraktima hrasta, može se zapaziti da su hrast lužnjak (uzorci 1-3) i cer (uzorak 7) sadržali veću količinu taksifolina u odnosu na hrast kitnjak (uzorci 4-6). Prema literaturi, prisustvo taksifolina je zapaženo tokom ispitivanja ekstrakta trešnje (Sanz i sar., 2010, Chinnici i sar., 2015). Pored toga, taksifolin je okarakterisan kao marker za sirće koje je odležavalo u kontaktu sa trešnjim drvetom (Cerezo i sar., 2010). Na osnovu rezultata ove disertacije, taksifolin nije karakterističan samo za trešnju, ali je njegova količina u ekstraktu divlje trešnje više nego dvostruko veća u odnosu na ekstrakte ostalih vrsta drveta.

Izoflavoni su detektovani samo u divljoj trešnji (uzorak 10) i u hrastu kitnjaku iz Kuršumlije (uzorak 5). Među ispitivanim izoflavonima, daidzein je detektovan samo u divljoj trešnji (uzorak 10), ali u maloj količini ( $0,77 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), dok je genistein zastupljen u divljoj trešnji u mnogo većoj količini ( $137,17 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) nego u hrastu kitnjaku iz Kuršumlije (uzorak 5,  $1,65 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

Stilbeni su zastupljeni u belom dudu (uzorak 11), bagremu (uzorak 8), ceru (uzorak 7), džanarici (uzorak 9) i dva uzorka hrasta kitnjaka (uzorci 4 i 5). Ekstrakt belog duda (uzorak 11) je jedini sadržao sve ispitivane stilbene i izdvojio se po najvećoj količini ovih jedinjenja. Ovo je u skladu sa literaturnim podacima, u kojima se navodi da velike količine stilbena mogu da doprinesu identifikaciji belog duda (Zhang i sar., 2015). U belom dudu, oksiresveratrol je najzastupljeniji stilben ( $1731,73 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), dok je sadržaj resveratrola ( $121,55 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i pterostilbena ( $12,21 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) značajno niži. Resveratrol i oksiresveratrol su detektovani u grančici i stablu duda (Chan i sar., 2016). Takođe, prisustvo resveratrola u različitim delovima duda potvrđeno je u različitim sortama belog duda *Morus alba* L. (Song i sar., 2009; Choi i sar., 2013; Wu i sar., 2013). Ovi podaci iz literature su u skladu sa rezultatima ove disertacije.

Ostali ispitivani ekstrakti drveta u kojima su detektovani stilbeni sadržali su samo oksiresveratrol, ali u značajno manjim količinama nego ekstrakt belog duda. Stilbeni nisu detektovani u ekstraktima divlje trešnje (uzorak 10), hrasta lužnjaka (uzorci 1-3) i jednog uzorka kitnjaka (uzorak 6).

Među ispitivanim kumarinima, eskuletin je detektovan u divljoj trešnji (uzorak 10,  $102,30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), belom dudu (uzorak 11,  $29,15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i ceru (uzorak 7,  $12,87 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), dok je eskulin detektovan u malim količinama u belom dudu (uzorak 11), džanarici (uzorak 9), svim ispitivanim hrastovima lužnjacima (uzorci 1-3) i u hrastu kitnjaku iz Ravne Gore (uzorak 6). Kumarini nisu bili zastupljeni u bagremu i uzorcima hrasta kitnjaka (uzorak 4 i 5).

Najveće količine floretina detektovane su u divljoj trešnji ( $17,16 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , uzorak 10), dok su džanarika (uzorak 9), beli dud (uzorak 11), hrast kitnjak iz Kuršumlije (uzorak 5) i cer (uzorak 7) sadržali dosta manje količine ovog jedinjenja. Ekstrakti bagrema (uzorak 8) i uzorka hrastova koji su podvrgnuti procesu prirodnog sušenja (uzorci 1 - 4, 6) nisu sadržali floretin.

Koniferilaldehid, proizvod degradacije lignina, detektovan je u svim ekstraktima osim u hrastu kitnjaku iz Ravne Gore (uzorak 6) i ceru (uzorak 7). Hrastovi u kojima je on detektovan sadržali su značajno veće količine ovog jedinjenja u odnosu na druge vrste drveta.

Poređenjem sadržaja koniferilaldehida u hrastovima u kojima je detektovano ovo jedinjenje, najveća količina ( $20,13 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) je kvantifikovana u hrastu lužnjaku iz Olova (uzorak 3), dok je najmanja količina ( $7,26 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) kvantifikovana u hrastu lužnjaku iz Gornjeg Radana (uzorak 2). Sa druge strane, posmatrajući ostale ispitivane uzorke drveta, koniferil aldehid je najzastupljeniji u bagremu ( $6,05 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , uzorak 8), zatim divljoj trešnji ( $3,85 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , uzorak 10), džanarici ( $2,64 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , uzorak 9) i, na kraju, u belom dudu ( $0,99 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , uzorak 11).

#### 4.2.2.1 Veza između fenolnog profila i biljnog porekla

Kako bi se na osnovu fenolnog profila procenilo biljno poreklo, razmatrani su i kvalitativni (jedinjenja koja su detektovana samo u jednoj biljnoj vrsti) i kvantitativni profil (razlike u količinama).

Na osnovu rezultata, samo nekoliko jedinjenja je karakteristično samo za jednu biljnu vrstu drveta: samo u divljoj trešnji su zastupljeni daizdein i izoramnetin-3-*O*-glikozid, ali u malim količinama, dok su samo u belom dudu detektovani resveratrol i pterostilben. Može se pretpostaviti da prethodno navedena jedinjenja mogu da budu potencijalni indikatori biljnog porekla drveta. U literaturi, utvrđeno je da velike količine stibenoida mogu da doprinesu identifikaciji drveta belog duda (Zhang i sar., 2015).

Divlja trešnja se izdvojila u odnosu na ostale uzorke drveta po značajnoj količini jedinjenja iz sledećih klasa: fenolne kiseline (*p*-kumarinska, ferulinska kiselina), flavonoli (kvercetin, kempferol, galangin), flavoni (viteksin, luteolin, apigenin, acacetin, genkvanin), flavanoni (naringenin, eriodiktiol, pinocembrin), izoflavoni (genistein) i kumarini (eskuletin). Najzastupljeniji polifenol u divljoj trešnji je flavanonol taksifolin ( $8455,70 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), za kojim slede flavanoni pinocembrin ( $1851,19 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) i naringenin ( $409,20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), kao i flavon hrizin ( $716,10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Ova jedinjenja su prepoznata u literaturi (Sanz i sar., 2012a; Chinnici i sar., 2015) kao supstance koje mogu da doprinesu identifikaciji ove vrste drveta. Konkretno, Sanz i saradnici (2012a) su zapazili da flavanoni prunin, naringenin, izosakuranetin, eriodiktiol, i flavanonoli aromadendrin i taksifolin mogu da se upotrebe za identifikaciju trešnjinog drveta, dok su Chinnici i saradnici (2015) zapazili da sledeća jedinjenja: eriodiktiol, sakuranetin, pinocembrin i hrizin, mogu da se koriste kao potencijalni markeri za trešnjino drvo i vino koje je odležavalo u kontaktu sa tim drvetom.

Svi ispitivani hrastovi lužnjaci i kitnjaci sadrže galnu i elaginsku kiselinu, kofeinsku kiselinu i taksifolin. Velike količine elaginske kiseline, kao i prisustvo galne kiseline u hrastovima lužnjacima i kitnjacima mogu da se upotrebe za njihovu identifikaciju, što su takođe predložili i drugi autori (Sanz i sar., 2012a). Pored toga, u svim ispitivanim uzorcima osim u hrastovima lužnjacima i kitnjacima detektovana je *p*-hidroksibenzoeva kiselina.

Hrast kitnjak iz Kuršumlije (uzorak 5) se izdvojio kao uzorak koji je imao najveći broj detektovanih jedinjenja u odnosu na druge uzorke hrastova lužnjaka i kitnjaka. Ovaj uzorak jedini nije podvrgnut procesu prirodnog sušenja. Ova pojava može da se objasni time što se u postupku prirodnog sušenja ispiraju jedinjenja rastvorna u vodi i odigravaju različiti hemijski procesi.

Bagrem je, slično uzorcima hrasta lužnjaka i kitnjaka, sadržao veće količine galne kiseline, međutim količina elaginske kiseline je značajno niža u odnosu na ove uzorke.

Cer se izdvojio po najmanjem sadržaju ukupnih i pojedinačnih fenolnih jedinjenja, kao i po najmanjem antioksidativnom potencijalu. Najzastupljenije fenolno jedinjenje u ceru bila je elaginska kiselina ( $205,15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), međutim njen sadržaj je najmanji u poređenju sa drugim ekstraktima drveta.

U belom dudu je identifikovan najveći broj ispitivanih jedinjenja, odnosno ukupno 29 od 37 analiziranih jedinjenja. Beli dud se izdvojio po najvećem sadržaju *p*-hidroksibenzoeve kiseline i oksiresveratrola. Takođe, resveratrol i pterostilben predstavljaju potencijalne markere za identifikaciju belog duda, pošto su oni identifikovani jedino u toj vrsti drveta.

Džanarika se izdvojila po najvećem sadržaju protokatehuinske i neohlorogene kiseline (5-*O*-kafeoilhininska kiselina). Takođe, identifikovane su velike količine taksifolina koji je, pored

navedenih jedinjenja, verovatno značajan sastojak drveta džanarike. U raspoloživoj literaturi nema dovoljno kvantitativnih podataka o polifenolima karakterističnim za šljivu i džanariku.

#### 4.2.3 Sadržaj flavanola primenom HPLC-DAD

Uz pomoć HPLC-DAD detektovano je ukupno 6 flavanola (**Tabela 7**), odnosno katehin (C), (-)-epikatehin (EC), (-)-epikatehin-galat (EC-G), (-)-katehin-galat (C-G), (-)-galokatehin (GC) i (-)-epigalokatehin-galat (EGC-G).

**Tabela 7.** Sadržaj flavanola u ispitivanim uzorcima drveta izraženi u jedinicama ppm

c (ppm)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
C	22,35	24,2	10,75	-	-	-	-	-	56	851,90	-
EC	-	-	-	-	-	-	8,55	2057	-	12,15	-
EC-G	44,55	61,7	64,45	80,40	57,0	75,05	29,55	374	-	46,1	-
C-G	-	-	-	-	-	-	-	527	1460	-	500
EGC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GC	-	-	-	71,55	-	-	-	-	-	-	-
EGC-G	-	27,55	-	-	29,55	-	-	404	551	-	-

Brojevi 1-11 u prvom redu odgovaraju rednom broju uzorka prema **Tabeli 3**. Ispitivana jedinjenja su navedena u prvoj koloni: C: Katehin; EC: (-)-epikatehin; EC-G: (-)-epikatehin-galat; C-G: (-)-katehin-galat; EGC: (-)-epigalokatehin; GC: (-)-galokatehin; EGC-G: (-)-epigalokatehin-galat.

Katehin je zastupljen u uzorcima hrastova lužnjaka (uzorci 1-3), džanarike (uzorak 9) i divlje trešnje (uzorak 10). Divlja trešnja se izdvojila po značajno većem sadržaju katehina u odnosu na druge uzorke drveta. Ovi rezultati su u skladu sa podacima iz literature (Coldea i sar. 2020; Sanz i sar., 2010), prema kojima je trešnja značajan izvor katehina.

Epikatehin i epikatehin-galat su bili najzastupljeniji u bagremu (uzorak 8), gde su kvantifikovani u značajno većoj količini u odnosu na ostale uzorke. Epikatehin je detektovan i u divljoj trešnji (uzorak 10) i ceru (uzorak 7), dok je epikatehin-galat kvantifikovan u svim uzorcima hrasta (uzorci 1-7), bagremu (uzorak 8) i divljoj trešnji (uzorak 10). Poređenjem sadržaja epikatehin-galata u uzorcima hrastova, zapaženo je da uzorci hrasta kitnjaka koji su podvrgnuti procesu prirodnog sušenja (uzorci 4 i 6) sadrže najveće količine, dok je cer (uzorak 7), koji nije podvrgnut procesu prirodnog sušenja, sadrži najmanje količine ovog jedinjenja.

Katehin-galat i epigalokatehin-galat su najzastupljeniji u džanarici (uzorak 9), a velike količine ovih jedinjenja su detektovane i u bagremu (uzorak 8). Katehin-galat je detektovan i u belom dudu (uzorak 11), dok je epigalokatehin-galat zastupljen u jednom hrastu lužnjaku (uzorak 2) i u hrastu kitnjaku koji nije podvrgnut procesu prirodnog sušenja (uzorak 5).

Galokatehin je zastupljen samo u hrastu kitnjaku (uzorak 4).

#### 4.2.4 Boja ekstrakata

Boja je jedan od glavnih faktora koji utiče na senzorni kvalitet odležavanih alkoholnih pića. Neka jedinjenja ekstrahovana iz drveta mogu da promene boju alkoholnih pića.

Dobijeni *CIELab* parametri boje prikazani su u **Tabeli 8**. Značajne razlike među različitim uzorcima drveta za svaku komponentu boje izražene su različitim slovima dobijenim Tuki testom.

**Tabela 8.** Vrednosti *CIELab* parametara boje ekstrakata drveta.

Redni broj uzorka	L*	a*	b*	C*	h
1	38,20 ± 0,01 <sup>f</sup>	18,01 ± 0,01 <sup>e</sup>	33,14 ± 0,03 <sup>e</sup>	37,72 ± 0,02 <sup>e</sup>	61,48 ± 0,02 <sup>f</sup>
2	41,94 ± 0,01 <sup>c</sup>	14,55 ± 0,04 <sup>h</sup>	36,95 ± 0,03 <sup>b</sup>	39,71 ± 0,01 <sup>b</sup>	68,51 ± 0,06 <sup>c</sup>
3	40,87 ± 0,03 <sup>e</sup>	16,15 ± 0,06 <sup>f</sup>	35,88 ± 0,03 <sup>d</sup>	39,35 ± 0,01 <sup>c</sup>	65,76 ± 0,11 <sup>e</sup>
4	36,47 ± 0,01 <sup>g</sup>	19,97 ± 0,01 <sup>d</sup>	30,88 ± 0,02 <sup>f</sup>	36,78 ± 0,02 <sup>g</sup>	57,11 ± 0,01 <sup>g</sup>
5	41,56 ± 0,01 <sup>d</sup>	14,99 ± 0,05 <sup>g</sup>	35,89 ± 0,03 <sup>d</sup>	38,89 ± 0,01 <sup>d</sup>	67,33 ± 0,08 <sup>d</sup>
6	31,83 ± 0,02 <sup>i</sup>	21,43 ± 0,06 <sup>c</sup>	24,10 ± 0,04 <sup>h</sup>	32,25 ± 0,01 <sup>i</sup>	48,36 ± 0,12 <sup>h</sup>
7	51,52 ± 0,01 <sup>a</sup>	5,73 ± 0,02 <sup>k</sup>	36,81 ± 0,01 <sup>c</sup>	37,26 ± 0,01 <sup>f</sup>	81,16 ± 0,04 <sup>a</sup>
8	30,77 ± 0,01 <sup>j</sup>	24,63 ± 0,02 <sup>b</sup>	22,50 ± 0,01 <sup>i</sup>	33,36 ± 0,01 <sup>h</sup>	42,41 ± 0,02 <sup>i</sup>
9	32,33 ± 0,01 <sup>h</sup>	27,43 ± 0,02 <sup>a</sup>	25,19 ± 0,03 <sup>g</sup>	37,24 ± 0,02 <sup>f</sup>	42,56 ± 0,05 <sup>i</sup>
10	46,17 ± 0,02 <sup>b</sup>	14,12 ± 0,03 <sup>i</sup>	45,70 ± 0,02 <sup>a</sup>	47,84 ± 0,02 <sup>a</sup>	72,83 ± 0,04 <sup>b</sup>
11	19,98 ± 0,01 <sup>k</sup>	11,66 ± 0,04 <sup>j</sup>	4,03 ± 0,03 <sup>j</sup>	12,34 ± 0,03 <sup>j</sup>	19,06 ± 0,17 <sup>j</sup>

Različita slova u istoj koloni ukazuju na značajnu razliku prema Tuki testu,  $p < 0,05$

Karakteristike boje ekstrakata drveta definisane su kroz tri koordinate: svetlina (L\*), crvena/zelena komponenta boje (a\*) i plava/žuta komponenta boje (b\*), kao i njihovim izračunatim magnitudama: zasićenost boje (C\*) i ugao tona boje (h).

Među ekstraktima drveta, koordinata L\* se nalazila u širokom opsegu, od tamne boje ekstrakta (19,98, beli dud) do svetle boje (51,52, cer), što najverovatnije odražava različit kvalitativni i kvantitativni sadržaj pigmenata u ispitivanim ekstraktima drveta. Ovde treba istaći nizak sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktu cera, odnosno najnižu vrednost TPC (5,31 g GAE·kg<sup>-1</sup>) uz najveću vrednost L\*. Ekstrakt divlje trešnje je imao visoku vrednost koordinate L\* (46,17), odnosno svetliji je u odnosu na većinu ekstrakata drveta, što može da se objasni ekstrakcijom jedinjenja koja ne utiču mnogo na parametar L\* ovog ekstrakta.

Ekstrakcija određenih (uglavnom fenolnih) jedinjenja iz drveta utiče na tamnoću ekstrakta tako što se smanjuje vrednost parametra L\*, što je takođe uočeno u radu koji su publikovali Pecić i saradnici (2012). Rezultati ove doktorske disertacije potvrđuju ovu pravilnost: ekstrakt belog duda (uzorak 11) koji je pokazao najveću vrednost TPC (107,69 g GAE·kg<sup>-1</sup>) bio je najtamniji i imao je najmanju vrednost parametra L\* (19,98).

Među hrastovima lužnjacima i kitnjacima, ekstrakt hrasta kitnjaka iz Ravne Gore (uzorak 6) je imao najnižu vrednost parametra L\*. Parametar L\* se nalazio u opsegu od 31,83 (uzorak 6) do 41,56 (uzorak 5) za hrastove kitnjake, odnosno od 38,20 (uzorak 1) do 41,94 (uzorak 2) za hrastove lužnjake. Prema literaturnim podacima (Pecić i sar., 2012), vrednosti parametra L\* za šljivovice koje su odležavale u hrastovim buradima bile su u opsegu od 36,41 do 46,86 za hrastove lužnjake, odnosno od 36,18 do 40,98 za hrastove kitnjake, što je u skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije.

Vrednost parametra a\* nalazila se u opsegu od 5,73 (cer) do 27,43 (džanarika), što znači da je u svim ekstraktima prisutna crvena boja različitog intenziteta. Divlja trešnja se može prepoznati po svetloj boji i mnogi proizvođači jakih alkoholnih pića preporučuju ovu vrstu drveta za odležavanje alkoholnih pića kako bi se dobila karakteristična crvena boja. Međutim, prema rezultatima ove disertacije, uočeno je da su džanarika (uzorak 9) i bagrem (uzorak 8), sa najvećim vrednostima parametra a\* (27,43, odnosno 24,63), značajni izvori crvenih pigmenata. U ekstraktima hrastova lužnjaka, vrednosti ovog parametra nalazile su se između 14,55 i 18,01, dok su se u ekstraktima hrastova kitnjaka kretale između 14,99 i 21,43. Vrednosti parametra a\* za šljivovice koje su odležavale u hrastovim buradima bile su u opsegu između 2,21 i 10,49 za hrastove lužnjake, odnosno između 6,11 i 16,94 za hrastove kitnjake (Pecić i sar., 2012). Ovi rezultati su uglavnom niži u odnosu na rezultate dobijene u ovoj disertaciji, najverovatnije zbog uticaja različitih faktora

kao što su uslovi ekstrakcije, odnosno odležavanja, kao i karakteristike korišćenog drveta. Šljivovice su odležavale mnogo duže u odnosu na uzorke drveta iz ove disertacije, primenjen je različit način odležavanja uzoraka (burad, odnosno usitnjeno drvo) i korišćeno je različito ekstrakciono sredstvo (šljivovica, odnosno smeša vode i etanola). Takođe, prema podacima iz literature, stepen ekstrakcije jedinjenja zavisi i od toga koliko puta je korišćeno bure. Uzorci drveta iz ove disertacije su ekstrahovani jednom, odnosno nisu pre korišćeni za ekstrakciju. Pored navedenog, rezultati zavise i od uslova rasta drveta (zemljište, klima), starosti drveta, kao i dela stabla sa kog je uzet uzorak (radijalno i po visini).

Vrednost parametra  $b^*$  je bila u svim uzorcima pozitivna, što znači da je u svim ekstraktima prisutna žuta boja različitog intenziteta. Vrednost parametra  $b^*$  je bila najniža za ekstrakt belog duda, što znači da ekstrahovana jedinjenja najverovatnije nisu uticala na intenzitet žute boje. Najveći intenzitet žute boje (45,70) zapažen je u ekstraktu divlje trešnje, što se najverovatnije može objasniti povećanim sadržajem flavona i flavonola u tom ekstraktu u odnosu na druge analizirane ekstrakte (**Tabela 6**). Ovi flavonoidi apsorbuju svetlost u vidljivom delu spektra zbog hemijskih modifikacija kao što su *O*-glikozilacija i *O*-metilacija, i na taj način doprinose intenzitetu žute boje ekstrakta.

Vrednost parametra  $b^*$  za ekstrakte hrastova lužnjaka nalazila se između 33,14 i 36,95, dok se za ekstrakte hrastova kitnjaka nalazila između 24,10 i 35,89. Ovi rezultati su u skladu sa vrednostima parametra  $b^*$  u starim srpskim rakijama koje su odležavale u hrastovim buradima (29,00 - 35,76 (lužnjak), 25,42 - 31,29 (kitnjak)) (Pecić i sar., 2012).

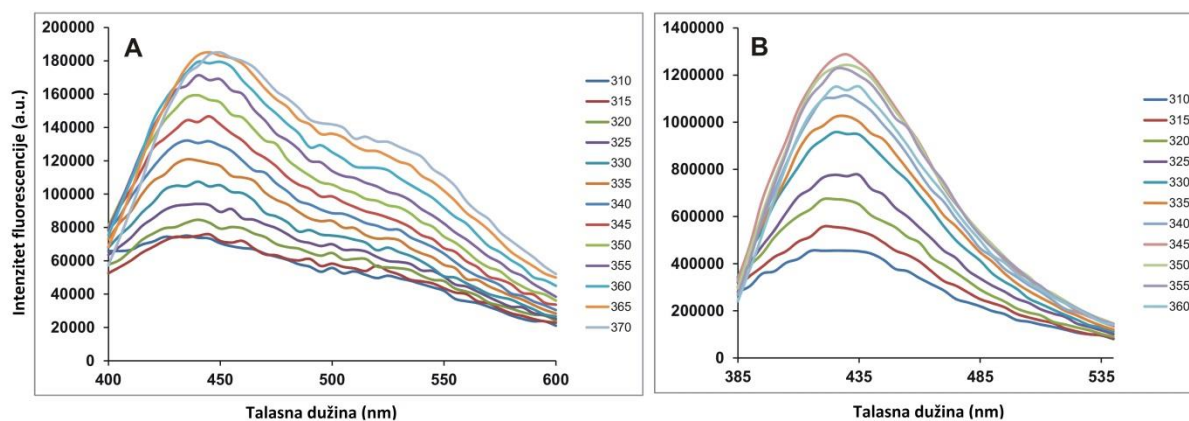
Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da biljno poreklo drveta utiče na *CIElab* parametre ekstrakata, kao i da vrsta hrastovog drveta ima uticaja na neke od parametara.

#### 4.2.5 Sadržaj fluorofora u drvetu i ekstraktima

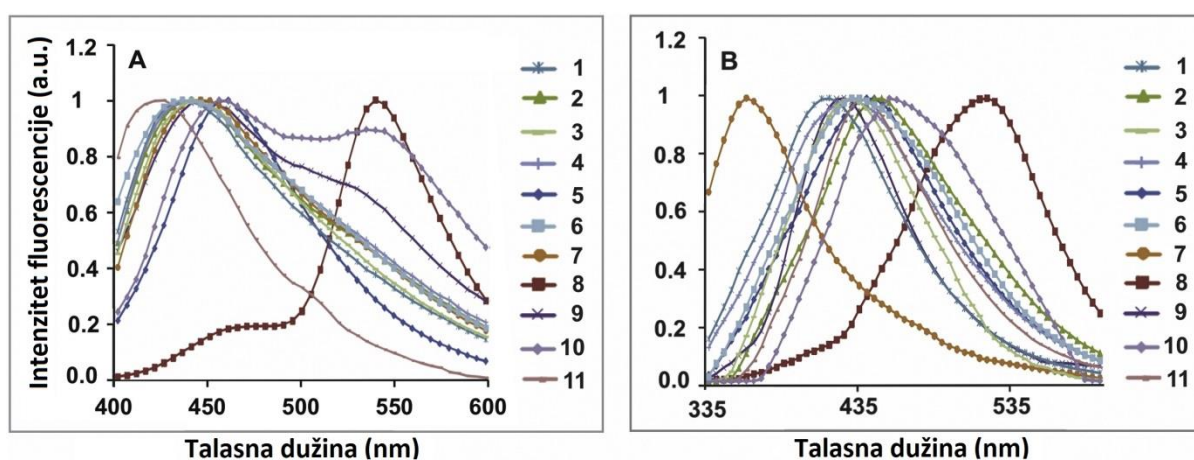
Usrednjeni spektri koji potiču od serija spektara snimanih na različitim talasnim dužinama ekscitacije omogućavaju proučavanje glavnih emitujućih supstanci u uzorcima drveta i njihovim ekstraktima, što predstavlja osnovu za procenu razlika između ispitivanih vrsta drveta. Zapažene su razlike u oblicima spektara, broju i poziciji emisijih maksimuma među ispitivanim uzorcima drveta.

U drvetu i ekstraktima drveta mogu se uočiti fluorofore koje uglavnom potiču od lignina i fenolnih jedinjenja.

Na **Slici 4** prikazana je ekscitaciono-emisiona serija spektara za drvo džanarike (A) i njen ekstrakt (B) kao primer. Na **Slici 5** prikazani su preklapljeni usrednjeni emisijni spektri ispitivanih uzoraka drveta i njihovih ekstrakata.



**Slika 4.** Ekscitaciono-emisiona serija spektara za džanariku (A) i njen ekstrakt (B)



**Slika 5.** Preklap normiranih emisionih spektara za različite uzorke drveta (A) i ekstrakte drveta (B). Spektar svakog uzorka je prosečna vrednost 10 spektara snimljenih na različitim talasnim dužinama ekscitacije. Brojevi 1-11 odgovaraju rednom broju uzorka prema **Tabeli 3**.

Uzorci hrasta (lužnjaka, kitnjaka i cera) imaju sličan oblik spektra i jedan maksimum u opsegu 435–455 nm (**Slika 5A**). Polifenoli i lignin su glavni emiteri u drvetu, sa maksimumom u opsegu 430–455 nm. Ispitivani uzorci hrasta imaju različite pozicije maksimuma, koji ukazuju na prisustvo drugih emitujućih jedinjenja kao što su hlorogena kiselina, kofeinska kiselina, kumarini, stilbeni, koji emituju na 430 nm (Izquierdo i sar., 2000; Lang i sar., 1991).

Beli dud ima maksimum pomeren ka manjim talasnim dužinama, na 420 nm. Moguće objašnjenje za pomeranje emisionog maksimuma drveta duda ka manjim talasnim dužinama u odnosu na druge vrste drveta može biti usled toga što je u ligninu drveta duda veća zastupljenost fenolnih jedinjenja koja emituju na manjim talasnim dužinama, kao što je ferulinska kiselina, u odnosu na najčešće zastupljene ligninske monomere. Ferulinska kiselina ima emisioni maksimum na 420 nm (Morales, Cerovic i Moya, 1996), odnosno na istoj vrednosti kao i beli dud. Naročito je važna zato što formira poprečne veze između lignina i drugih polimera u ćelijskom zidu i na taj način utiče na stepen umreženosti polimera i strukturne osobine ćelijskog zida (Iiyama, Lam i Stone, 1994; Lam, Iiyama i Stone, 1992). Pored toga, analizom pojedinačnih polifenola u okviru ove disertacije potvrđeno je prisustvo ferulinske kiseline u ekstraktu drveta belog duda.

Bagrem sadrži maksimum koji je značajno pomeren ka većim talasnim dužinama, na 540 nm, kao i dodatni manji maksimum na 465 nm (**Slika 5A**). Prvi (veći) maksimum može da se pripíše flavonoidima, kao što su flavanoni prisutni u drvetu (Drabent i sar., 1999). Drugi (manji) maksimum potiče od polifenola/lignina, koji je prisutan u maloj količini u toj vrsti drveta (Latorraca i sar., 2011) pa je njegov maksimum manji u odnosu na maksimum uzoraka hrasta. Derivati flavanona koji se nalaze u drvetu mogu da budu odgovorni za emisiju na većim talasnim dužinama sa manjim maksimumom na manjim talasnim dužinama (Lang i sar., 1991). Džanarika sadrži maksimum koji se poklapa sa maksimumom uzoraka hrasta, ali sadrži i manji pik na 525 nm (**Slika 5A**), koji verovatno potiče od flavonoida prisutnih u ovoj vrsti drveta. Divlja trešnja sadrži dva maksimuma, jedan na 455 nm (poklapa se sa maksimumom uzoraka hrasta) i drugi na 540 nm (poklapa se sa maksimumom od bagrema). Na osnovu ovog zapažanja može se pretpostaviti da divlja trešnja sadrži slične fluorofore kao hrast i bagrem, odnosno lignin i flavonoide.

Ekstrakti drveta sadrže jednostavnije oblike spektara (**Slika 4B**, **Slika 5B**), kao i manje razlike u oblicima spektra i položajima maksimuma nego uzorci drveta (**Slika 4A**, **Slika 5A**). To se može najverovatnije objasniti time što ekstrakti, za razliku od drveta, ne sadrže lignin, odnosno poseduju manje fluorofora.

U ekstraktima uzoraka hrasta pozicije maksimuma nalaze se u opsegu talasnih dužina 420–445 nm. Za emisione maksimume u toj oblasti odgovorna su fenolna jedinjenja koja su nastala razlaganjem lignina. Maksimum za ekstrakt divlje trešnje nalazi se na talasnoj dužini od 455 nm blizu maksimuma za ekstrakte uzoraka hrasta.

Ako se porede spektri ekstrakata drveta, spektar ekstrakta belog duda je jedini pomeren ka manjim talasnim dužinama, dok je spektar ekstrakta bagrema jedini pomeren ka većim talasnim dužinama. Ovo zapažanje se može objasniti prisustvom veće koncentracije ili visokim intenzitetom fluorescencije određenih jedinjenja. Maksimum ekstrakta bagrema na 515 nm može poticati od flavanona ili flavonola (Sudo i sar., 2009), dok maksimum za ekstrakt duda na 360 nm može poticati od prisustva stilbena (Lang i sar., 1991).

#### 4.2.5.1 Rezultati analize glavnih komponenti fluorescentnih emisionih spektara uzoraka drveta i njihovih ekstrakata

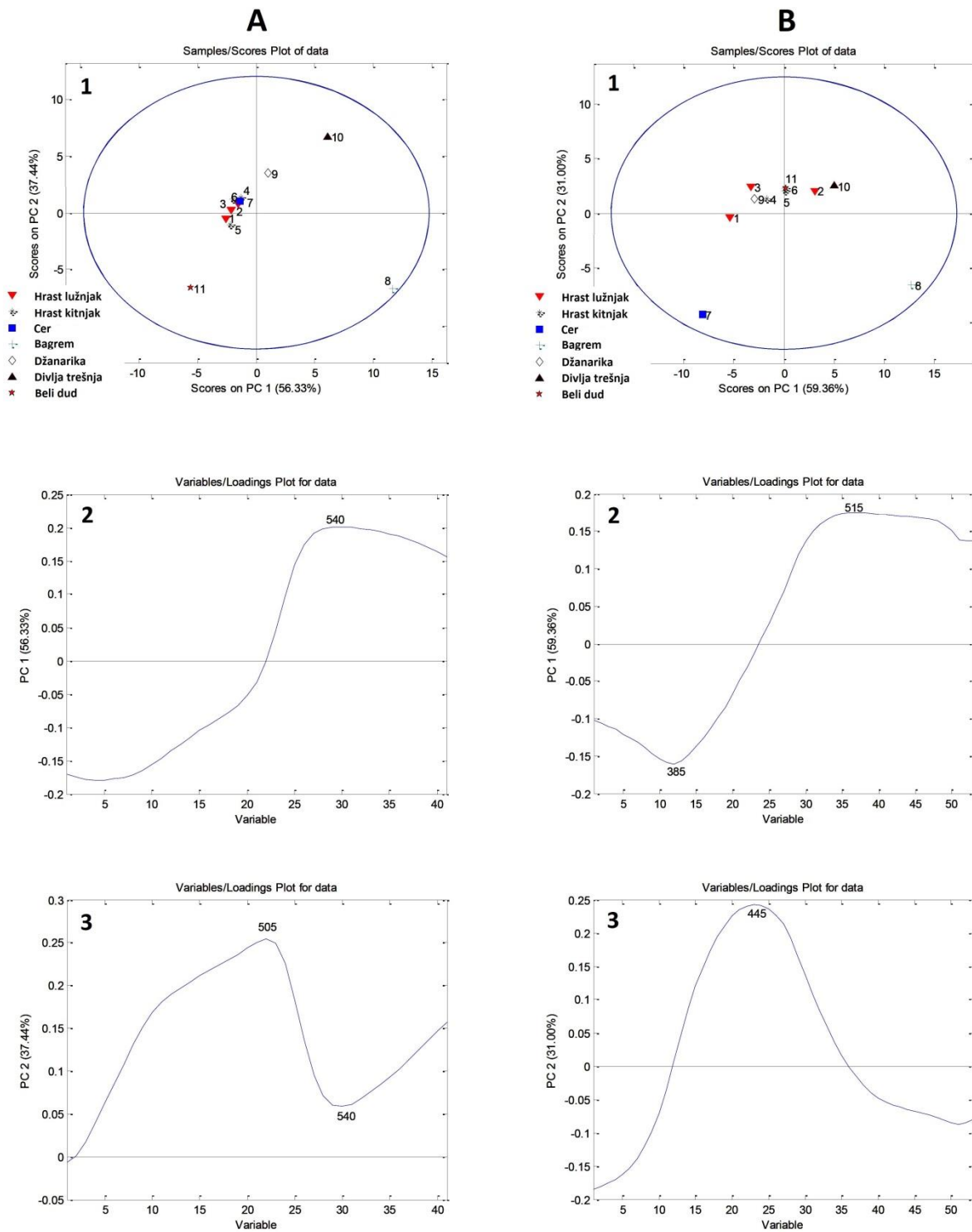
Analiza glavnih komponentata je korišćena kako bi se izvršila klasifikacija uzoraka drveta prema razlikama u emisionim spektrima. Zavisne promenljive bile su različite vrste drveta i njihovi ekstrakti (hrast, beli dud, džanarika, bagrem i divlja trešnja). Nezavisne promenljive bile su snimljeni fluorescentni emisioni spektri. Opseg snimljenih fluorescentnih emisionih spektara bio je 400–600 nm za uzorke drveta, i 335–595 nm za ekstrakte drveta. PCA analizom uzoraka drveta može se uočiti da dve glavne komponente opisuju 93,77% ukupne varijanse (prva komponenta (PC1) opisuje 56,33% ukupne varijanse dok druga komponenta (PC2) doprinosi sa 37,44%), dok za ekstrakte drveta one opisuju 90,36% ukupne varijanse (PC1 doprinosi sa 59,36% ukupne varijanse, dok PC2 doprinosi sa 31,00% ukupne varijanse). Grafici skorova i varijabli dobijeni za uzorke i ekstrakte drveta prikazani su na **Slici 6**.

Sa grafika skorova uzoraka drveta (**Slika 6A-1**) može se uočiti da se uzorci bagrema (8) i divlje trešnje (10) izdvajaju od ostalih uzoraka drveta. Iz grafika varijabli mogu se identifikovati talasne dužine koje su uticale na razdvajanje među uzorcima. Bagrem se izdvajao od ostalih ispitivanih uzoraka drveta po komponenti PC1. Sa grafika varijabli (**Slika 6A-2**) može se zapažati da je fluorescencija snimljena na talasnoj dužini od 540 nm izrazito pozitivno doprinela komponenti PC1. Bagrem je okarakterisan fluorescencijom na talasnoj dužini od 540 nm kao maksimumom emisionog spektra (**Slika 5A**). Pošto je ovo pomeranje emisionog maksimuma prema većim talasnim dužinama u poređenju sa maksimumima većine ostalih uzoraka drveta povezano sa



prisustvom flavanona i drugih flavonoida u ovoj vrsti drveta, može da se pretpostavi da su ova jedinjenja odgovorna za razdvajanje bagrema po PC1 osi. S druge strane, fluorescencija snimljena na talasnoj dužini od 540 nm je imala najnegativniji uticaj na PC2, dok je fluorescencija snimljena na talasnoj dužini od 505 nm imala najpozitivniji uticaj na PC2 (**Slika 6A-3**). Talasna dužina od 505 nm je bila najvažnija varijabla za razdvajanje divlje trešnje od ostalih uzoraka drveta po PC2 osi, pošto se na toj talasnoj dužini emisioni spektar drveta divlje trešnje značajno razlikovao od spektara ostalih uzoraka drveta (**Slika 5A**).

Na osnovu grafika skorova ekstrakata drveta može se zapaziti razdvajanje ekstrakta bagrema (8) i cera (7) od ostalih ispitivanih ekstrakata (**Slika 6B-1**). Sa grafika varijabli (**Slika 6B-2**) može se uočiti da je snimljena fluorescencija na 515 nm imala najpozitivniji uticaj na PC1, dok je snimljena fluorescencija na 385 nm imala negativan doprinos na PC1. Fluorescencija na talasnoj dužini od 515 nm, koja je maksimum emisionog spektra ekstrakta bagrema (**Slika 5B**) bila je glavni faktor za razdvajanje ekstrakta bagrema od ostalih ekstrakata drveta. Pošto je ovaj maksimum povezan sa nekim flavanonima i/ili flavonolima (verovatno kvercetin) u ekstraktu, može se pretpostaviti da su ova jedinjenja odgovorna za razdvajanje ekstrakta bagrema po PC1. Talasna dužina od 385 nm je odgovorna za razdvajanje ekstrakta cera. Fluorescencija na talasnoj dužini od 445 nm pokazala je najpozitivniji uticaj na PC2 (**Slika 6B-3**) i ovo je najbitniji faktor za razdvajanje svih ekstrakata drveta koji imaju maksimum emisije na oko 445 nm (kao što su hrast lužnjak, hrast kitnjak, džanarika, beli dud i divlja trešnja) od ekstrakata bagrema i cera. Na osnovu emisionih maksimuma, može se zaključiti da su za ovo razdvajanje odgovorna glavna fenolna jedinjenja nastala razgradnjom lignina iz drveta u ekstrakt hrasta lužnjaka, hrasta kitnjaka, džanarike, belog duda i divlje trešnje.



**Slika 6.** Rezultati analize glavnih komponenti fluorescentnih emisijskih spektara primenjene na: uzorke drveta (**A**), ekstrakte drveta (**B**): grafici skorova (**1**); grafici varijabli (**2, 3**). Brojevi na graficima **1A** i **1B** odgovaraju rednim brojevima uzoraka (**Tabela 3**)

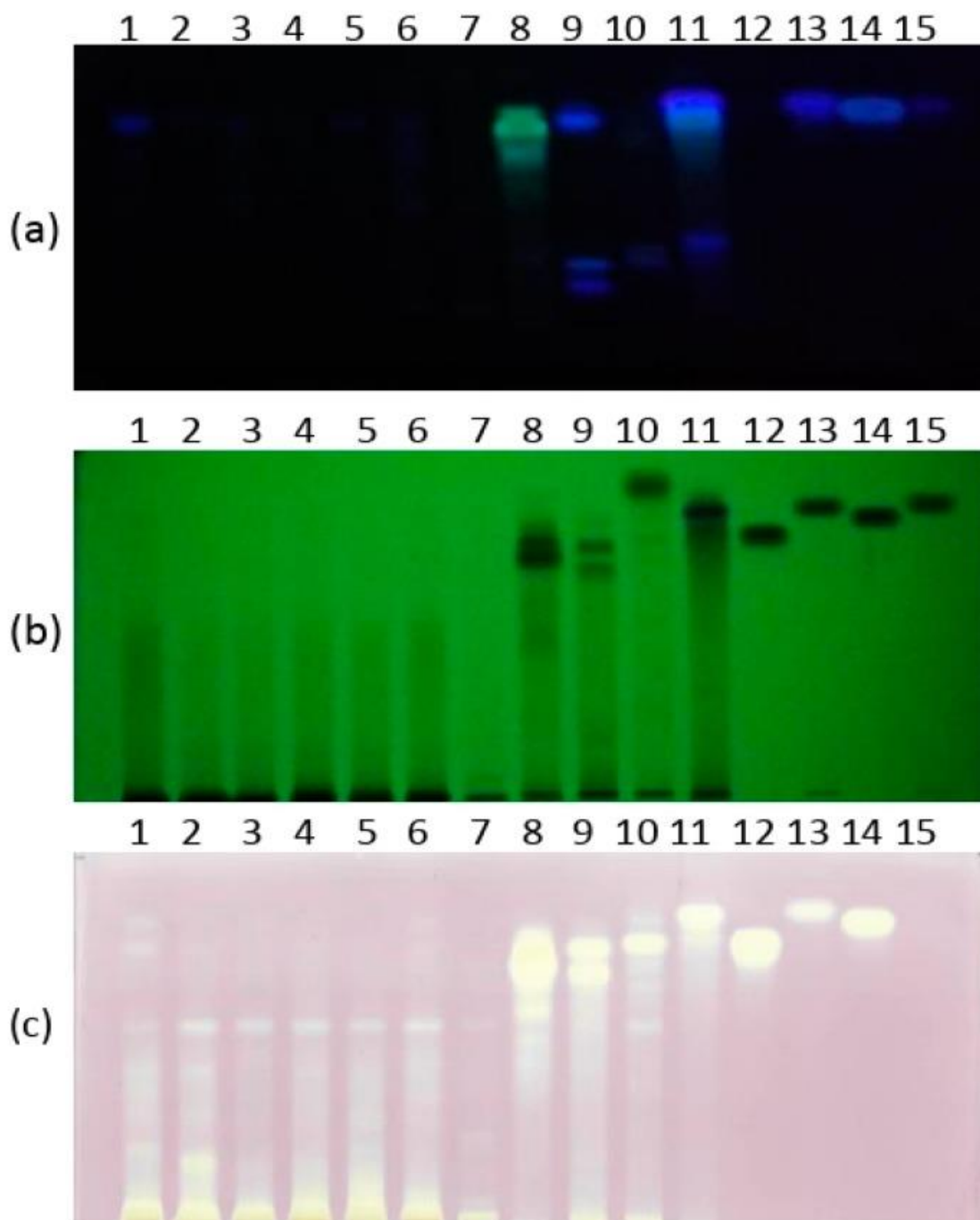
#### 4.2.6 Rezultati fenolnih profila i antioksidativne aktivnosti dobijeni uz pomoć visokoeffikasne tankoslojne hromatografije

Na **Slici 7** prikazani su HPTLC hromatogrami ekstrakata drveta i četiri standardna jedinjenja (galna kiselina, ferulinska kiselina, kofeinska kiselina i *p*-kumarinska kiselina). Na **Slici 7a** i **7b** je fotografija HPTLC ploče, prethodno derivatizovane rastvorom NTS-a, pod UV lampom na 366 nm (**a**) i 254 nm (**b**), dok je na **Slici 7c** ploča prethodno uronjena u metanolni rastvor DPPH<sup>•</sup>.

Sa **Slike 7a** može se zapaziti da je jedino bagrem sadržao zelene zone, dok su ekstrakti džanarike i belog duda, kao i dva standardna jedinjenja sadržali plave zone. Ekstrakt džanarike je imao tri zone, od kojih je jedna značajno intenzivnija, koje se ne poklapaju sa standardnim jedinjenjima. Beli dud je imao jednu izraženu zonu na istoj  $R_F$  vrednosti kao ferulinska i kofeinska kiselina.

Na **Slici 7b** mogu se videti crne zone na zelenoj pozadini. Može se uočiti više zona nego na **Slici 7a**. Ovoga puta mogu se uočiti zone kod svih uzoraka i standardnih jedinjenja. Uzorci hrasta su sadržali zone koje su se nalazile pri dnu hromatograma, što ukazuje na prisustvo polarnih jedinjenja koja se vezuju za stacionarnu fazu. Ekstrakt divlje trešnje je sadržao zonu na najvišoj  $R_F$  vrednosti, koja se ne poklapa ni sa jednim standardnim jedinjenjem, i verovatno odgovara nekom nepolarnom polifenolnom jedinjenju. Ekstrakt džanarike je imao dve izražene zone na vrednostima koje su niže u odnosu na standardna fenolna jedinjenja. Ekstrakt bagrema sadrži jednu veliku zonu na  $R_F$  vrednosti koja se poklapa sa galnom kiselinom. Ekstrakt belog duda je sadržao jednu zonu čija se  $R_F$  vrednost poklapa sa ferulinskom kiselinom i *p*-kumarinskom kiselinom.

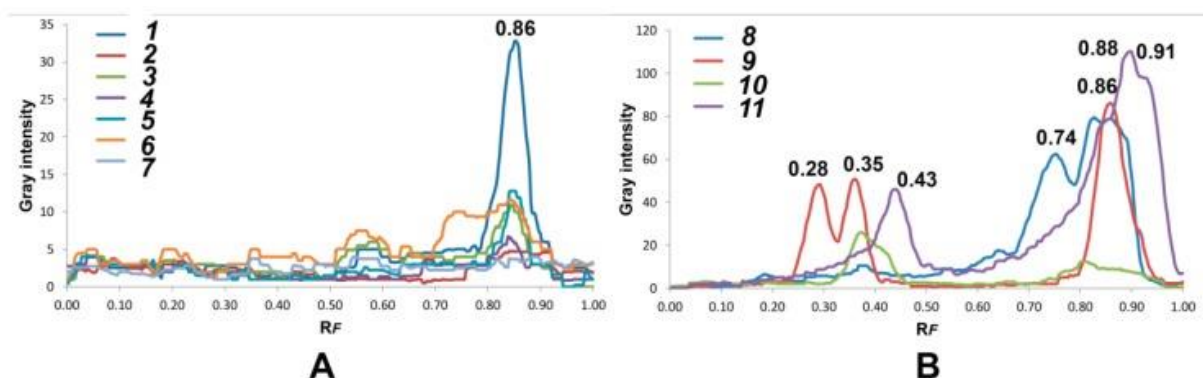
Ispitivanjem antioksidativnog potencijala primenom DPPH<sup>•</sup> testa (**Tabela 5**) uočeno je da je antioksidativni potencijal za beli dud (844,93 mmol TE·kg<sup>-1</sup>) i džanariku (612,95 mmol TE·kg<sup>-1</sup>) značajno veći u odnosu na druge uzorke. U DPPH<sup>•</sup>-HPTLC analizi ispitivana su pojedinačna jedinjenja koja pokazuju antioksidativnu aktivnost i njihov doprinos ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti. Na **Slici 7c** mogu se zapaziti žute zone na ljubičastoj pozadini, koje potiču od supstanci koje poseduju antioksidativna svojstva. Najdominantnije zone na HPTLC-DPPH<sup>•</sup> hromatogramu bila su jedinjenja sa  $R_F$  vrednostima koja se poklapaju sa galnom, kofeinskom i ferulinskom kiselinom. Ekstrakti bagrema, džanarike, divlje trešnje i belog duda pokazali su jaku antioksidativnu aktivnost, uglavnom zbog prethodno detektovanih fenolnih jedinjenja. S druge strane, za sve ekstrakte hrasta zajednička je intenzivna zona pri dnu hromatograma, kao i jedna zona slabog intenziteta koja se ne poklapa ni sa jednim standardnim jedinjenjem. Ekstrakti bagrema i divlje trešnje sadrže jednu zonu na  $R_F$  vrednosti koja se poklapa sa galnom kiselinom. Ekstrakt džanarike je sadržao dve intenzivne zone koje su prepoznate kao antioksidansi, od kojih se jedna poklapa sa galnom kiselinom. Ekstrakt belog duda sadrži jednu intenzivnu zonu koja odgovara kofeinskoj i/ili ferulinskoj kiselini i jednu zonu slabijeg intenziteta koja odgovara galnoj kiselini. Ova jedinjenja su prethodno prepoznata kao jaki antioksidansi prilikom ispitivanja antioksidativnog kapaciteta primenom HPTLC hromatografije (Ciésla i sar., 2012).



**Slika 7.** HPTLC hromatogrami ekstrakata (hrast lužnjak (1–3), hrast kitnjak (4–6), cer (7), bagrem (8), džanarika (9), divlja trešnja (10), beli dud (11)) i četiri standardna jedinjenja (galna kiselina (12), ferulinska kiselina (13), kofeinska kiselina (14) i *p*-kumarinska kiselina (15)) pod UV lampom na: (a) 366 nm; (b) 254 nm; (c) derivatizovana rastvorom DPPH<sup>•</sup>

Fenolni profili ispitivanih ekstrakata drveta dobijeni obradom HPTLC hromatograma uz pomoć ImageJ softvera prikazani su na **Slici 8A** (hrast lužnjak (uzorci 1-3), kitnjak (uzorci 4-6) i cer (uzorak 7)) i **Slici 8B** (bagrem (uzorak 8), džanarika (uzorak 9), divlja trešnja (uzorak 10) i beli dud (uzorak 11)). Ispitivani ekstrakti drveta sadržali su nekoliko karakterističnih fenolnih jedinjenja na  $R_F$  vrednostima od: 0,28; 0,35; 0,43; 0,74; 0,86 (galna kiselina); 0,88 (kofeinska kiselina) i 0,91 (ferulinska ili *p*-kumarinska kiselina) (**Slika 8A i B**). Zapaženo je pet različitih profila u ispitivanim uzorcima u zavisnosti od vrste drveta. Uzorci hrasta (uzorci 1-7) su sadržali jednu zonu slabog intenziteta na  $R_F$  vrednosti od 0,86 (galna kiselina), među kojima je hrast lužnjak iz Slavonije

(uzorak 1) imao najveći intenzitet pika za ovo jedinjenje (Slika 8A). Bagrem (uzorak 8) je sadržao tri zone na  $R_F$  vrednostima od 0,74, 0,82 i 0,86 (galna kiselina) (Slika 7a).



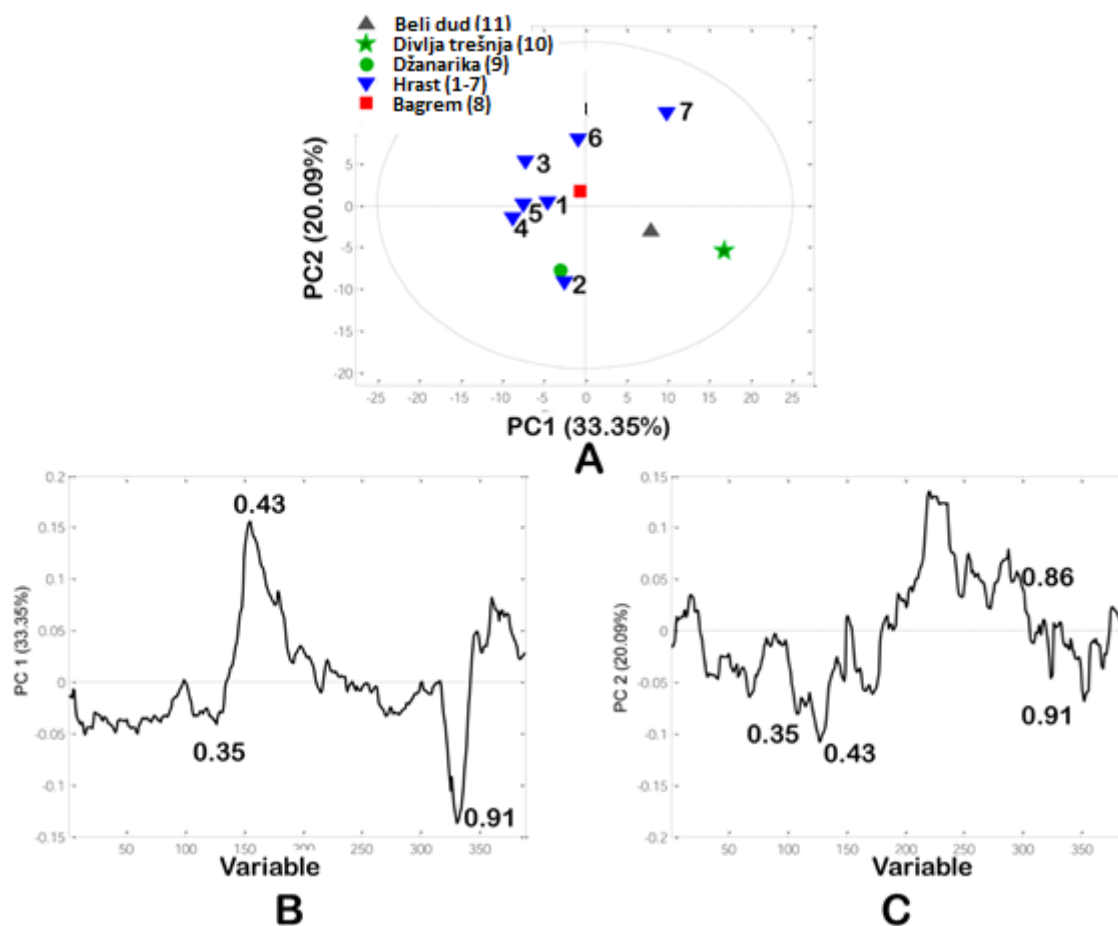
**Slika 8.** Fenolni profili ispitivanih ekstrakata drveta: (A) uzorci hrasta (hrast lužnjak (1–3), hrast kitnjak (4–6), cer (7)); (B) uzorci ostalih vrsta drveta (bagrem (8), džanarika (9), divlja trešnja (10) i beli dud (11))

Divlja trešnja je sadržala jedan karakterističan pik na 0,36, dok je džanarika imala potpuno drugačiji profil u odnosu na ostale ekstrakte drveta sa tri karakteristična pika na  $R_F$  vrednostima od 0,28, 0,35 i 0,86 (galna kiselina) (Slika 8B). Različit profil ekstrakta džanarike je takođe dobijen primenom HPLC analize u okviru ove disertacije, gde je kvantifikovana značajno veća količina protokatehuinske kiseline i 5-*O*-kafeoilhininske kiseline (neohlorogene kiseline) u odnosu na druge ekstrakte drveta. Profil ekstrakta belog duda sadržao je pikove na  $R_F$  vrednostima od 0,43, 0,86 (galnu kiselinu), 0,88 (kofeinsku kiselinu) i 0,91 (ferulinsku i/ili *p*-kumarinsku kiselinu).

#### 4.2.6.1 Rezultati analize glavnih komponenti podataka dobijenih sa HPTLC hromatograma

Vizuelni pregled HPTLC hromatograma je subjektivna metoda i uglavnom zavisi od percepcije analitičara. S druge strane, multivarijantna hemometrijska analiza primenjena na HPTLC hromatogram pruža objektivnu klasifikaciju ispitivanih uzoraka za identifikaciju fenolnih jedinjenja najodgovornijih za klasifikaciju. Dodatno, PCA analizom se utvrđuje postojanje spoljnih vrednosti (*outlier-a*), odnosno uzoraka koji se obično odstranjuju iz seta podataka pošto imaju različite karakteristike u odnosu na ostale uzorke.

PCA je primenjena na matricu podataka dobijenih iz HPTLC hromatograma primenom ImageJ softvera (11 uzoraka  $\times$  389 varijabli), u kojoj varijable predstavljaju intenzitete piksela na 389 jedinica dužine. Prva glavna komponenta opisuje 33,35% ukupne varijabilnosti, dok druga komponenta opisuje 20,09% ukupne varijabilnosti. Prvih pet glavnih komponenti opisuje 87,85% ukupne varijanse. Sa grafika skorova (Slika 9A), može se zapaziti da je šest uzoraka hrasta raspoređeno na levoj strani grafika skorova, dok su ostale četiri vrste drveta raspoređene na desnoj strani grafika skorova. Sa grafika varijabli (Slika 9B, 9C) može se uočiti značajan doprinos fenolnih jedinjenja ukupnoj varijansi. Suprotno od drugih uzoraka drveta, uzorci hrasta su sadržali male količine fenolnih jedinjenja sa  $R_F$  vrednostima na 0,35; 0,43; 0,86 i 0,91 i ta jedinjenja su najviše doprinela razdvajanju uzoraka hrasta od ostalih uzoraka. Polarna jedinjenja, sa nižim  $R_F$  vrednostima, mogla bi da budu neke fenolne kiseline i/ili glikozidi. Ova fenolna jedinjenja bi mogla biti identifikovana kao karakteristični taksonomski markeri za međusobno razlikovanje između vrsta drveta.



**Slika 9.** Rezultati analize glavnih komponenti HPTLC hromatograma: (A) Grafik skorova; (B) i (C) grafici varijabli. 1–3 hrast lužnjak, 4–6—hrast kitnjak, 7—cer. Brojevi na grafiku A predstavljaju redne brojeve uzoraka prema **Tabeli 3**.

#### 4.2.7 Antimikrobna aktivnost

U nastavku teksta biće opisan prinos ekstrakcije uzoraka pripremljenih za određivanje antimikrobne aktivnosti, kao i rezultati ispitivanja antimikrobnog potencijala dobijeni difuzionom metodom u bunarićima i mikrodilucionom metodom.

##### 4.2.7.1 Prinos ekstrakcije

Prinosi ekstrakcije za ekstrakte drveta prikazani su u **Tabeli 9**. Prinos ekstrakcije je najveći za uzorak belog duda (7,29%). U isto vreme, ovaj ekstrakt je najtamniji u odnosu na ekstrakte drugih vrsta drveta. Takođe, ekstrakti bagrema (6,37%) i džanarike (5,80%) su imali visok prinos ekstrakcije.

Prinosi ekstrakcije za uzorke hrastova bili su: hrast lužnjak: 4,12-4,44%; hrast kitnjak: 3,05-5,06%; cer: 1,63%.

**Tabela 9.** Prinosi ekstrakcije za ispitivane uzorke drveta. Redni brojevi uzoraka odgovaraju rednom broju u **Tabeli 3.**

Uzorak	Prinos
1	4,44%
2	4,40%
3	4,12%
4	5,06%
5	3,05%
6	4,58%
7	1,63%
8	6,37%
9	5,80%
10	3,15%
11	7,29%

Uzorci hrasta kitnjaka su imali veći prinos ekstrakcije u odnosu na uzorke hrasta lužnjaka. Jedini izuzetak je ekstrakt hrasta kitnjaka koji nije podvrgnut procesu prirodnog sušenja (uzorak 5), koji je imao mnogo manji prinos ekstrakcije u odnosu na ekstrakte ostalih hrastova lužnjaka i kitnjaka. Cer (uzorak 7) je imao najmanji prinos ekstrakcije i najsvetliji ekstrakt u odnosu na druge vrste drveta. Prinos ekstrakcije za trešnju (3,15%, uzorak 10) nalazio se u opsegu kao za hrastove kitnjake.

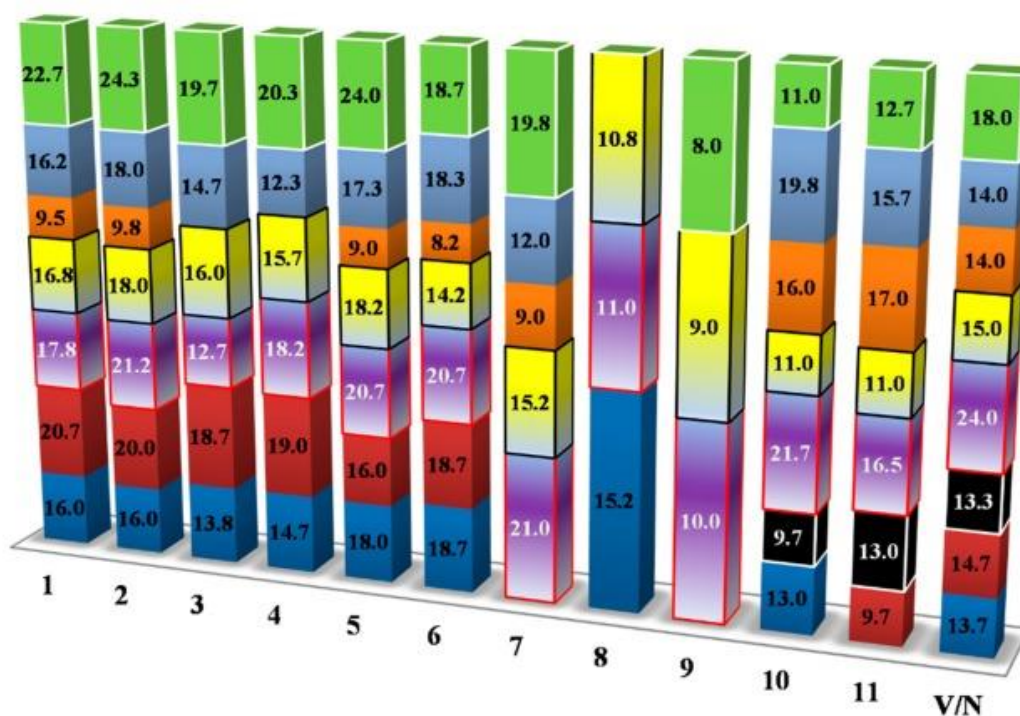
Interesantno je zapaziti da je trend u prinosu ekstrakcije sličan sa sadržajem ukupnih polifenola u ekstraktima.

#### 4.2.7.2 Rezultati preliminarnih ispitivanja antimikrobnog potencijala ekstrakata drveta

Antimikrobni potencijal ekstrakata je testiran na osam reprezentativnih humanih i oportunističkih patogena. Pored jasnih zona inhibicije, takođe je uočen i bakteriostatski/fungistatski efekat testiranih ekstrakata, odnosno da ekstrakti zaustavljaju rast bakterija/gljivica. Ekstrakti drveta su generalno pokazali najveći antimikrobni potencijal protiv *S. mutans*, *S. pyogenes* i *L. monocytogenes* sojeva u testiranoj koncentraciji od 1 mg po bunariću (**Slika 10**).

Ekstrakt divlje trešnje (uzorak 10) imao je najveće zone inhibicije rasta sojeva *S. mutans* (21,7) i *S. aureus* (19,8) u poređenju sa ostalim ispitivanim ekstraktima. Takođe, jedino ekstrakti divlje trešnje (uzorak 10) i belog duda (uzorak 11) pokazali su umerenu baktericidnu aktivnost prema *E. faecalis*, koji je isključen iz daljih MIC testiranja zbog pokazane velike rezistentnosti. Pomenuti ekstrakti su takođe pokazali visoku bakteriostatsku aktivnost prema meticilin rezistentnom *S. aureus* (MRSA). Ekstrakt divlje trešnje je pokazao jasnu baktericidnu/fungicidnu aktivnost samo protiv *L. monocytogenes* i *C. albicans*, dok su ostali ekstrakti pokazivali više bakteriostatsko dejstvo. S druge strane, drugi ekstrakti drveta pokazali su uglavnom bakteriostatski/fungistatski efekat prema skoro svim patogenima, uključujući *E. coli*. Svi patogeni mikroorganizmi bili su osetljivi na testirani vankomicin i nistatin.

■ *C. albicans* ■ *E. coli* ■ *E. faecalis* ■ *S. mutans* ■ *S. pyogenes* ■ MRSA ■ *S. aureus* ■ *L. monocytogenes*



**Slika 10.** Antimikrobna aktivnost ekstrakata drveta dobijena difuzionom metodom u bunarićima. Brojevi 1-11 u prvom redu odgovaraju rednim brojevima uzoraka prema **Tabeli 3**.

\*V/N – Vankomicin/Nistatin. Vrednosti u kolonama predstavljaju srednju vrednost zona inhibicije izraženu u milimetrima (mm).

#### 4.2.7.3 Rezultati određivanja vrednosti minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidne (MBC) ekstrakata drveta

U **Tabeli 10** su prikazane vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), dok su u **Tabeli 11** prikazane vrednosti minimalne baktericidne koncentracije (MBC) i minimalne fungicidne koncentracije (MFC) ekstrakata drveta prema ispitivanim patogenima (*S. mutans*, *S. pyogenes*, *S. aureus*, MRSA, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *C. albicans*).

Dobijene MIC vrednosti bile su u opsegu od  $0,02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  za beli dud (uzorak 11) prema MRSA do  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  u slučaju aktivnosti džanarike (uzorak 9) prema *C. albicans* (**Tabela 10**).



**Tabela 10.** Minimalne inhibitorne (MIC) ekstrakata prema određenim humanim i oportunističkim patogenima ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Indikatorski sojevi / MIC ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Str	Van	Nys
<i>S. mutans</i>	0,25	0,13	0,25	0,25	0,25	0,25	0,13	0,25	1,00	0,05	0,13	0,020	0,006	NT
<i>S. pyogenes</i>	0,03	0,13	0,03	0,05	0,03	0,13	0,08	0,05	0,03	0,03	0,03	0,002	0,001	NT
<i>S. aureus</i>	0,08	0,05	0,05	0,03	0,03	0,03	0,03	0,09	0,06	0,05	0,09	0,009	0,002	NT
MRSA	0,06	0,06	0,13	0,06	0,03	0,05	0,03	0,03	0,13	0,13	0,02	-	-	NT
<i>L. monocytogenes</i>	0,50	0,50	0,75	0,75	0,19	0,63	0,50	0,13	0,06	0,06	0,03	0,019	0,002	NT
<i>E. coli</i>	0,75	0,75	1,50	1,50	0,75	1,50	-	0,75	-	0,75	0,75	0,009	0,200	NT
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2,00	0,25	-	NT	NT	0,006

Brojevi 1-11 u prvom redu odgovaraju rednim brojevima uzoraka prema **Tabeli 3**.

\*Str – Streptomycin; Van – Vankomicin; Nys – Nistatin; NT – nije testirano; (-) – nije utvrđeno. Vrednosti su obeležene nijansama plave boje (najniža vrednost), žute boje (srednja vrednost) i crvene boje (najviša vrednost).

**Tabela 11.** Minimalne baktericidne (MBC) i minimalne fungicidne koncentracije (MFC) ekstrakata prema određenim humanim i oportunističkim patogenima ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Indikatorski sojevi /MBC ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Str	Van	Nys
<i>S. mutans</i>	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	0,50	2,00	2,00	0,06	0,50	0,050	0,150	NT
<i>S. pyogenes</i>	0,50	0,50	1,00	1,00	0,50	0,50	1,00	0,25	2,00	0,50	1,00	0,050	0,050	NT
<i>S. aureus</i>	0,25	0,13	0,25	0,25	0,13	0,25	0,50	0,13	0,25	0,13	0,13	0,025	0,003	NT
MRSA	0,50	0,50	0,50	0,50	0,25	0,50	0,63	0,25	1,00	0,25	0,03	-	-	NT
<i>L. monocytogenes</i>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,50	1,00	0,13	0,25	0,025	0,006	NT
<i>E. coli</i>	1,00	1,00	2,00	2,00	1,00	2,00	-	1,00	-	1,00	1,00	0,013	0,400	NT
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,50	-	NT	NT	0,025

Brojevi 1-11 u prvom redu odgovaraju rednim brojevima uzoraka prema **Tabeli 3**.

\*Str – Streptomycin; Van – Vankomicin; Nys – Nistatin; NT – nije testirano; (-) – nije utvrđeno. Vrednosti su obeležene nijansama plave boje (najniža vrednost), žute boje (srednja vrednost) i crvene boje (najviša vrednost).

Najniže MIC vrednosti (viz.,  $0,03 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) izmerene su prema MRSA (ekstrakti hrasta kitnjaka (uzorak 5), cera (uzorak 7) i bagrema (uzorak 8)), *S. aureus* (ekstrakti svih uzoraka hrasta kitnjaka (uzorci 4-6) i cera (uzorak 7)) i *S. pyogenes* (ekstrakti uzoraka hrasta lužnjaka (uzorci 1 i 3) i kitnjaka (uzorak 5), džanarike (uzorak 9), divlje trešnje (uzorak 10) i belog duda (uzorak 11)). *S. mutans* je takođe pokazao veliku osetljivost na neke testirane ekstrakte sa MIC vrednostima ispod  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . MIC vrednosti za *L. monocytogenes* bile su u opsegu:  $0,03\text{--}0,75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , dok su ekstrakti džanarike, divlje trešnje i belog duda značajno inhibirali rast ovog patogena. U poređenju sa Gram-pozitivnim sojevima, *E. coli* je bila manje osetljiva na testirane ekstrakte. *Candida albicans* je pokazala slabu osetljivost na aktivnost svih ekstrakata, sa izuzetkom ekstrakta divlje trešnje, čija je dobijena MIC vrednost bila  $0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Alañón i saradnici (2015) takođe su zaključili da su kvasci otporniji na antimikrobni efekat ekstrakata drveta nego bakterije, pošto su,

prema njima, samo ekstrakti drveta američkog hrasta podvrgnutog termičkom tretmanu i divlje trešnje inhibirali njihov rast. Vrednosti MIC za vankomicin, streptomycin i nistatin bile su niže u odnosu na ispitivane ekstrakte ( $0,001\text{--}0,4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Pored toga, MRSA je pokazala otpornost na sve antibiotike i pri najvišoj testiranoj koncentraciji ( $0,4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Interesantno, ekstrakt hrasta kitnjaka koji nije podvrgnut procesu prirodnog sušenja (uzorak 5) pokazao je nižu MIC prema MRSA i *L. monocytogenes* u odnosu na druge ispitivane ekstrakte hrasta lužnjaka i kitnjaka koji su podvrgnuti procesu prirodnog sušenja (uzorci 1, 2, 3, 4 i 6). Poređenjem rezultata za hrast lužnjak sa rezultatima autora Elansary i saradnika (2019) za koru hrasta lužnjaka (*Q. robur*), veće vrednosti za MIC dobijene su prema *L. monocytogenes* i *E. coli*, ali su manje vrednosti dobijene prema *S. aureus*. Pored toga, vrednosti za MIC za streptomycin bile su dosta niže nego što su dobili Elansary i saradnici (2019).

Vrednosti MBC i MFC testiranih ekstrakata nalazile su se u opsegu:  $0,03\text{--}2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Tabela 11). Najniža vrednost MBC bila je dobijena prema *S. aureus* za ekstrakte hrasta lužnjaka (uzorak 2), hrasta kitnjaka (uzorak 5), bagrema, divlje trešnje i belog dudu.

Prema izloženim rezultatima (Slika 10; Tabele 10 i 11), ekstrakt drveta divlje trešnje je pokazao jaku aktivnost protiv svih testiranih patogena. Ovo zapažanje se može objasniti time što je ekstrakt divlje trešnje bogat fenolnim jedinjenjima, što se može videti na osnovu sadržaja pojedinačnih polifenola u okviru ove disertacije. Na primer, kempferol je potencijalni kandidat protiv različitih patogenih mikroba, uključujući flukonazol rezistentnu *C. albicans* i MRSA (Shao i sar., 2016). Pored toga, galangin pokazuje selektivnu anti-citohromnu i antifungalnu aktivnost (McNulty i sar., 2009) i pokazao je antimikrobnu aktivnost prema *S. aureus* (McNulty i sar., 2009; Cushnie i Lamb, 2005), kao i na *S. aureus* osetljiv na meticilin (MSSA) i MRSA, *Enterococcus* spp. i *P. aeruginosa* (Pepeljnjak i Kosalec, 2004). Flavon apigenin pokazao je jaku aktivnost na Gram-negativne bakterije (Metsämuuronen i Sirén, 2019), dok su derivati kvercetina i apigenina pokazali jaku antibakterijsku aktivnost prema različitim Gram-negativnim i Gram-pozitivnim bakterijama (Osonga, i sar., 2019). Neke fenolne kiseline (galna, kofeinska i ferulinska kiselina) pokazale su veću efikasnost antibakterijske aktivnosti prema Gram-pozitivnim (*S. aureus* i *L. monocytogenes*) i Gram-negativnim bakterijama (*E. coli* i *P. aeruginosa*) nego konvencionalni antibiotici poput gentamicina i streptomicina (Daglia, 2012). Interesantno je uočiti da je ranije primećena značajna antimikrobna aktivnost trešnjinog drveta prema sledećim vinskih organizmima: *L. hilgardii*, *L. casei*, *P. pentosaceus*, *O. oeni*, *G. oxydans*, *B. bruxellensis* (Alañón i sar., 2015) međutim, koliko je poznato, njena antimikrobna aktivnost prema oportunističkim i humanim patogenima nije ispitivana do sada.

Taksifolin je pokazao antibakterijsku aktivnost na kliničke patogene poznate do sada: *E. coli*, *Listeria* sp., *P. aeruginosa*, *Bacillus* sp. i *S. aureus* (Asmi i sar., 2017). Za oksiresveratrol, najzastupljeniji stilben u dudu, dokazana je aktivnost prema MRSA (Joung i sar., 2016). Među flavonoidima prisutnim u drvetu divlje trešnje, flavonoli se izdvajaju po efikasnoj antimikrobnoj aktivnosti na rezistentne bakterije (Shao i sar., 2016).

U Tabeli 12 prikazane su MIC vrednosti dobijene iz literaturnih podataka za ekstrakte različitih vrsta drveta prema različitim patogenima (*S. aureus*, MRSA, *L. monocytogenes*, *S. mutans*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *C. albicans*). MIC vrednosti za ispitivane ekstrakte drveta hrastova (uzorci 1–7) prema *S. aureus*, *L. monocytogenes* i *E. coli* bile su slične sa MIC vrednostima dobijenih za ekstrakte kore *Quercus* spp. prikazane u literaturi (Tabela 12), međutim MIC vrednosti prema *C. albicans* bile su niže u poređenju sa rezultatima ove studije.

**Tabela 12.** MIC vrednosti za ekstrakte različitih vrsta drveta dobijene iz literaturnih podataka

Biljno poreklo ekstrakta kore / MIC (mg·mL <sup>-1</sup> )	Sa	Mr	Lm	Sm	Sp	Ec	Ca	Referenca
<i>Picea abies</i>	0,13	-	0,16	-	-	0,08	0,97	Salem i sar., 2016
<i>Larix decidua</i>	0,21	-	0,15	-	-	0,33	0,60	
<i>Quercus acutissima</i>	0,23	-	0,27	-	-	0,17	0,40	
<i>Quercus macrocarpa</i>	0,22	-	0,29	-	-	0,13	0,34	Elansary i sar., 2019
<i>Quercus robur</i>	0,23	-	0,25	-	-	0,10	0,31	
<i>Quercus robur</i>	0,08	-	-	-	-	0,08	-	Brantner i Grein, 1994
<i>Quercus ilex</i>	0,13	-	-	-	0,51	0,26	-	Berahou i sar., 2007
<i>Quercus infectoria</i>	-	1,25	-	-	-	-	-	Khouzami i sar., 2009
<i>Maclura tinctoria</i>	-	-	-	0,08	-	-	-	Lamounier i sar., 2012
<i>Prunus africana</i>	0,07	0,16	-	-	-	-	-	Bii i sar., 2010
<i>Prunus avium</i>	6,25	-	-	-	-	12,50	-	Oyetayo i Bada, 2017
<i>Prunus cerasoides</i>	5,00	1,00	-	-	-	-	1,00	Arora i Mahajan, 2018
<i>Morus mesozygia</i>	0,16	-	-	-	-	0,04	0,16	Kuete i sar., 2009

Sa — *S. aureus*; Mr — MRSA; Lm — *L. monocytogenes*; Sm — *S. mutans*; Sp — *S. pyogenes*; Ec — *E. coli*; Ca — *C. albicans*; (-) — nije testirano.

Sa druge strane, ekstrakti kore trešnje iz Nigerije pokazali su nižu antimikrobnu aktivnost prema *S. aureus* (MIC = 6,25 mg·mL<sup>-1</sup>) i *E. coli* (MIC = 12,5 mg·mL<sup>-1</sup>) (Oyetayo i Bada, 2017). U poređenju sa ekstraktima drveta džanarike i divlje trešnje, koji su ispitivani u ovoj disertaciji, *Prunus cerasoides* je pokazala sličnu antibakterijsku aktivnost prema MRSA (Arora i Mahajan, 2018).

Za razliku od ekstrakta belog duda ispitivanog u okviru ove disertacije, koji je dobijen od drveta *M. alba*, ekstrakti kore drveta *Morus mesozygia* pokazali su značajnu antimikrobnu aktivnost prema *C. albicans*, sa dobijenom MIC vrednosti od 0,16 mg·mL<sup>-1</sup> (Kuete i sar., 2009). Interesantno, uočena je veća osetljivost *C. albicans* na ekstrakte kore vrsta *Picea abies* i *Larix decidua* (Salem i sar., 2016), koje nisu istraživane u ovoj disertaciji.

U literaturi nije uočena značajna korelacija između antimikrobne aktivnosti i sadržaja ukupnih polifenola (Alañón i sar., 2015; Fattouch i sar., 2007), kao i između antimikrobne aktivnosti i antioksidativnog potencijala. Odnos između strukture i funkcije fenolnih ekstrakata ima više uticaja na antimikrobnu aktivnost nego ukupan sadržaj polifenola (Alañón i sar., 2015). Takođe, prema Cowan-u (1999), mnogi specijalizovani metaboliti koji se mogu naći u drvetu, kao što su tanini, terpenoidi i alkaloidi, pokazali su dobru antimikrobnu aktivnost *in vitro*.

#### 4.2.8 Sadržaj isparljivih komponenti

Uz pomoć gasne hromatografije, kvantifikovano je ukupno 42 jedinjenja, među kojima je pet flavonoida (**Tabela 13**). Rezultati nisu prikazani za uzorke koji nisu prirodno sušeni (hrast kitnjak (uzorak 5) i cer (uzorak 7)) zato što je sadržaj isparljivih jedinjenja u njima bio zanemarljiv u odnosu na uzorke koji su prirodno sušeni.

Tabela 13. Sadržaj isparljivih jedinjenja u ekstraktima drveta ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  drveta)

Jedinjenje	1	2	3	4	6	8	9	10	11
Limonen	n.d.	n.d.	n.d.	0,34	n.d.	n.d.	0,49	0,72	n.d.
Acetofenon	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,01	n.d.
Benzoeva kiselina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,30	n.d.	n.d.
Kumaran	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,48
Vinilgvajakol	0,08	0,19	0,17	n.d.	0,26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>o</i> -Acetil- <i>p</i> -krezol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,26	n.d.	n.d.	n.d.
Eugenol	0,08	0,54	0,48	n.d.	0,03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Siringol	0,16	0,34	0,34	n.d.	0,27	1,48	n.d.	n.d.	1,59
Metilrezorcinol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,33
Rezorcinol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10,07	n.d.	n.d.	62,00
$\beta$ -Rezorcinaldehid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,46	n.d.	n.d.	13,76
Rezacetofenon	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,08	n.d.	n.d.	n.d.
<i>trans</i> - $\beta$ -Metil- $\gamma$ -oktalakton	0,17	0,25	0,24	n.d.	0,72	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>cis</i> - $\beta$ -Metil- $\gamma$ -oktalakton	0,34	1,65	1,59	0,83	0,05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Vanilin	0,30	0,78	0,76	n.d.	0,64	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Izoeugenol ( <i>cis</i> - ili <i>trans</i> -)	n.d.	0,16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Homovanilil alkohol	0,28	0,38	0,35	n.d.	0,43	0,20	n.d.	n.d.	n.d.
Vanililpropan-2-on	0,69	1,00	0,72	n.d.	0,12	0,95	n.d.	n.d.	n.d.
Vanilinska kiselina	n.d.	0,05	0,19	n.d.	0,88	n.d.	n.d.	0,09	n.d.
Propiovanilon	0,32	0,36	0,32	n.d.	0,09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3,4,5-Trimetoksi-fenol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,09	7,64	n.d.
Metoksieugenol	0,32	0,56	0,26	n.d.	0,79	0,67	n.d.	n.d.	n.d.
Homovanilinska kiselina	0,50	0,50	0,38	0,17	0,44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Metil-homovanilat	0,33	0,32	0,27	n.d.	0,44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Siringaldehid	1,85	2,17	2,04	n.d.	1,71	0,94	0,20	n.d.	n.d.
Siringinska kiselina	0,25	0,92	0,32	n.d.	1,02	n.d.	n.d.	0,12	n.d.
Siringilpropan-2-on	0,73	0,73	0,50	n.d.	0,86	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Butirosiringon	0,52	0,57	0,47	n.d.	0,54	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Koniferil-alkohol	26,6	25,73	24,47	3,33	23,14	9,75	n.d.	n.d.	0,36
Koniferil-aldehid	2,47	2,21	2,19	1,19	3,51	2,14	n.d.	n.d.	1,55
4-Hidroksi-3,5-dimetoksibenzoeva kiselina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,18	n.d.	n.d.
Skopoletin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,03	n.d.	n.d.
Sinap-aldehid	5,40	4,89	4,49	n.d.	7,95	4,88	n.d.	0,1	n.d.

<i>Anita Smilagić</i>	<i>Doktorska disertacija</i>					<i>Rezultati i diskusija</i>			
Sinapil-alkohol	23,56	24,84	24,71	n.d.	25,82	1,53	0,03	n.d.	n.d.
Dihidrosinapil-alkohol	0,09	0,53	0,58	n.d.	0,51	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pinocembrin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,80	n.d.
Tektohrizin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	220,15	n.d.
2,6-Dimetoksibenzohinon	n.d.	n.d.	n.d.	0,17	n.d.	n.d.	n.d.	0,30	n.d.
Hrizin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	467,22	n.d.
Sakuranin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	896,65	n.d.
Naringenin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	75,91	n.d.
3-Hidroksi-4-metoksibenzojeva kiselina	n.d.	n.d.	n.d.	0,22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4-Hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehid	n.d.	n.d.	n.d.	1,74	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Furfural	n.d.	n.d.	n.d.	0,12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Ukupna isparljiva jedinjenja</b>	<b>65,04</b>	<b>69,67</b>	<b>65,84</b>	<b>8,11</b>	<b>70,22</b>	<b>38,41</b>	<b>1,32</b>	<b>1669,71</b>	<b>81,07</b>

Brojevi 1-11 u prvom redu odgovaraju rednim brojevima uzoraka prema **Tabeli 3**. n.d. – nije detektovano.

Najzastupljenija isparljiva jedinjenja u hrastu lužnjaku i kitnjaku su koniferil- (uzorci 1, 2 i 4) i sinapil-alkohol (uzorci 3 i 6). U uzorcima hrasta lužnjaka (uzorci 1-3), koniferil-alkohol je detektovan u opsegu od 24,47  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  do 26,60  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , dok je sinapil-alkohol detektovan u opsegu od 23,56  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  do 24,84  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . U uzorcima hrasta kitnjaka, koniferil-alkohol je detektovan u količinama 3,33  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (uzorak 4), odnosno 23,14  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (uzorak 6), dok je sinapil-alkohol detektovan samo u uzorku 6 (25,82  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Najzastupljenije isparljivo jedinjenje u bagremu (uzorak 8) i belom dudu (uzorak 11) je rezorcinol (10,07  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , odnosno 62,00  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), u džanarici (uzorak 9) limonen (0,49  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), dok su u divljoj trešnji (uzorak 10) najzastupljeniji flavonoidi, kao što su sakuranin (896,65  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), hrizin (467,22  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) i tektohrizin (220,15  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

Profil isparljivih jedinjenja u divljoj trešnji (uzorak 10) izdvojio se od profila drugih biljnih vrsta drveta, pre svega po prisustvu primetno veće količine flavonoida, čija je ukupna koncentracija iznosila 1585,12  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Ovi podaci su u skladu sa ranijim istraživanjima, gde je utvrđeno da srčevina trešnje sadrži značajno veće količine flavonoida u odnosu na hrastovinu (Martínez-Gil i sar., 2018). Velika količina flavonoida u ekstraktu divlje trešnje takođe je potvrđena analizom pojedinačnih fenolnih jedinjenja u uzorcima drveta u okviru ove disertacije. Uz pomoć gasne hromatografije, jedino u drvetu divlje trešnje detektovano je pet flavonoida, od kojih su tri flavanona (pinocembrin, naringenin i sakuranin) i dva flavona (hrizin i tektohrizin). Sakuranin je najzastupljenije jedinjenje u divljoj trešnji (uzorak 10), kojeg je kvantifikovano u značajno većim količinama (896,65  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) u odnosu na ostala jedinjenja. Prema literaturi, u trešnjinoj srčevini su, uz pomoć gasne hromatografije, pored pomenutih flavonoida (pinocembrin, naringenin, hrizin i tektohrizin), identifikovana još tri flavanona (sakuranetin, pinostrobin i dihidrovogonin) i jedan dihidroflavonol (aromadendrin-7-metiletar) (Vinciguerra i sar., 2003). Smatra se da flavonoidi kao što su eriodiktiol, sakuranetin, pinocembrin i hrizin mogu poslužiti kao markeri za identifikaciju trešnjinog drveta i vina koja su odležavala u kontaktu sa trešnjinim drvetom (Chinnici i sar., 2015).

U ekstraktu divlje trešnje (uzorak 10) kvantifikovana je i velika količina 3,4,5-trimetoksifenola (7,64  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), kao i male količine aromatičnih jedinjenja, što je u skladu sa rezultatima iz literature (Flamini i sar., 2007; De Rosso i sar., 2009a). Vanilin i siringaldehid nisu detektovani u drvetu trešnje, što je u skladu sa podacima iz literature (Coldea i sar., 2020) u kojoj se navodi da ova

jedinjenja nisu detektovana u drvetu trešnje koje nije bilo izloženo termičkom tretmanu. Međutim, u našem istraživanju utvrđeno je i prisustvo limonena, koji do sad, prema dostupnim podacima iz literature, nije detektovan u drvetu divlje trešnje.

Najzastupljenija jedinjenja u bagremu (uzorak 8) su rezorcinol ( $10,07 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) i koniferil-alkohol ( $9,75 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), za kojima sledi sinap-aldehid ( $4,88 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), dok je sadržaj koniferil-aldehida ( $2,14 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) i siringaldehida ( $0,94 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) bio značajno niži. Detektovane su velike količine  $\beta$ -rezorcinaldehida ( $3,46 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) i odsustvo eugenola u ispitivanom ekstraktu bagremovog drveta, što je u skladu sa rezultatima De Rosso i saradnika (2009a), kao i Flamini i saradnika (2007). Takođe, detektovan je metoksieugenol, čije prisustvo su potvrdili i De Rosso i sar. (2009).

Postojale su izvesne razlike u koncentracijama dominantnih jedinjenja u bagremu (uzorak 8) (**Tabela 13**) u odnosu na literaturne podatke. Dok su Fernández de Simón i saradnici (2009) takođe detektovali koniferil-alkohol i sinap-aldehid kao dominantna jedinjenja, oni nisu detektovali rezorcinol u ekstraktu bagremovog drveta koje je prirodno sušeno. U drugom istraživanju (Fernández de Simón i sar., 2014b), rezorcinol nije detektovan kao najzastupljenije jedinjenje u bagremu. Pored toga, De Rosso i saradnici (2009a) i Flamini i saradnici (2007) detektovali su siringaldehid kao najzastupljenije jedinjenje u bagremu, koji u ispitivanom uzorku bagrema (uzorak 8) iz našeg istraživanja nije dominantan, kao i velike količine vanilina, koji nije detektovan u našem uzorku bagrema (**Tabela 13**).

U literaturi postoje izvesna neslaganja povodom predloženih jedinjenja koja se mogu koristiti za identifikaciju bagremovog drveta. Dok je rezoacetofenon već ranije predložen kao potencijalni marker za bagrem (Fernández de Simón i sar., 2014b), što je u skladu sa rezultatima ove disertacije, rezorcinol i 2,4-dihidroksibenzaldehid ( $\beta$ -rezorcinaldehid), koji su ranije takođe predloženi kao potencijalni markeri za bagrem, u ovoj disertaciji nisu bili karakteristični samo za bagrem. Ova dva jedinjenja su detektovana u belom dudu (uzorak 11) u većim količinama nego u bagremu (uzorak 8), što se može videti u **Tabeli 13**.

Najzastupljenija jedinjenja u belom dudu (uzorak 11) su bili rezorcinol ( $62,00 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) i  $\beta$ -rezorcinaldehid ( $13,76 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Venkataraman (1972) je takođe detektovao oba ova jedinjenja u belom dudu, dok su De Rosso i saradnici (2009a) detektovali samo  $\beta$ -rezorcinaldehid. Prema Flamini i saradnicima (2007), najzastupljenije jedinjenje u dudu je trimetoksifenol koji u okviru ove disertacije nije detektovan u dudu.

Prema rezultatima ove disertacije (**Tabela 13**), metilrezorcinol ( $1,33 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) i kumaran ( $0,48 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) su detektovani jedino u ekstraktu dudu (uzorak 11). U raspoloživoj literaturi se ne pominje prisustvo ova dva jedinjenja u dudu.

U ekstraktu drveta džanarike (uzorak 9) kvantifikovana je značajno manja količina isparljivih jedinjenja u odnosu na druge ispitivane uzorke. Najzastupljenije isparljivo jedinjenje u džanarici je limonen ( $0,49 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). U istraživanju Reidel i Pistelli (2017), limonen je najzastupljenije jedinjenje u stablu džanarike sorte *P. cerasifera* 'Pissardii', dok ovo jedinjenje nije detektovano u stablu obične džanarike (*P. cerasifera*). U ovoj disertaciji, pored limonena, kao dominantno jedinjenje u džanarici detektovana je i benzoeva kiselina ( $0,30 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Jedino u džanarici je detektovan skopoletin, što je u suprotnosti sa podacima iz literature, u kojoj je prvo smatran markerom za hrastovo drvo, ali je kasnije detektovan i u kestenovom i u drvetu divlje trešnje (Coldea i sar., 2020).

Prema rezultatima iz ove disertacije, limonen je detektovan u hrastu kitnjaku (uzorak 4), džanarici (uzorak 9) i divljoj trešnji (uzorak 10). Coldea i saradnici (2020) su detektovali limonen u jabukovačama koje su odležavale u kontaktu sa hrastom kitnjakom, što je u skladu sa rezultatima

ove disertacije, ali i u destilatima koji su odležavali u kontaktu sa dudom, što je u suprotnosti sa rezultatima ove disertacije.

U uzorcima hrasta (1-3 i 6) je detektovan najveći broj isparljivih jedinjenja u odnosu na ostale ispitivane vrste drveta, sa izuzetkom hrasta kitnjaka iz Kučaja (uzorak 4), koji je sadržao značajno manji broj isparljivih jedinjenja u odnosu na većinu uzoraka. Međusobnim poređenjem profila isparljivih jedinjenja uzoraka hrasta, može se zapaziti da su sastav i količine isparljivih jedinjenja u hrastu kitnjaku iz Kučaja (uzorak 4) znatno drugačiji u odnosu na ostale uzorke hrasta lužnjaka i kitnjaka (uzorci 1-3 i 6), koji su među sobom imali relativno sličan sastav. U hrastu kitnjaku iz Kučaja (uzorak 4), detektovani su limonen, 2,6-dimetoksibenzohinon, 3-hidroksi-4-metoksibenzoeva kiselina i 4-hidroksi-3,5 dimetoksibenzaldehid, koji nisu detektovani u drugim ispitivanim uzorcima hrasta, kao i odsustvo mnogih jedinjenja koja su detektovana u ostalim uzorcima hrasta (uzorci 1-3 i 6).

U ispitivanim uzorcima hrasta, detektovani su *cis*- $\beta$ -metil- $\gamma$ -oktalakton (svi uzorci), kao i *trans*- $\beta$ -metil- $\gamma$ -oktalakton, eugenol, metoksieugenol, vanillin i siringaldehid (svi uzorci osim hrasta kitnjaka iz Kučaja), što je u skladu sa rezultatima prikazanim u literaturi (De Rosso i sar., 2009a; Flamini i sar., 2007). Eugenol je aromatični terpen koji se smatra karakterističnim za alkoholna pića koja su odležavala u kontaktu sa hrastovim drvetom (Mosedale i Puech 1998). De Rosso i saradnici (2009a) su detektovali i  $\alpha$ -terpineol, koji nije detektovan u ekstraktima drveta ispitivanih u okviru ove disertacije.

Među izomerima  $\beta$ -metil- $\gamma$ -oktalaktona, *cis*-isomer poseduje 2 do 12 puta jači intenzitet mirisa (sa drvenastom mirisnom notom i mirisom na kokos) u odnosu na *trans*-izomer. Izomer  $\beta$ -metil- $\gamma$ -oktalaktona u *cis* obliku je zastupljeniji u uzorcima hrasta lužnjaka (uzorci 1-3) ( $0,34 - 1,65 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) i hrasta kitnjaka iz Kučaja ( $0,83 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , uzorak 4), dok je *trans*-izomer zastupljeniji u uzorku hrasta kitnjaka iz Ravne Gore ( $0,72 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , uzorak 6). Ova dva izomera, zajedno sa vanilinom, predstavljaju glavna aromatična jedinjenja hrastovog drveta koja imaju veliki uticaj na aromu vina (Câmara i sar., 2006).

Postoje određene razlike u sadržaju isparljivih jedinjenja u odnosu na podatke iz literature. Koniferil-alkohol je dominantno jedinjenje u ispitivanim ekstraktima hrasta (uzorci 1-4 i 6), dok je prema De Rosso i saradnicima (2009a) i Flamini i saradnicima (2007) koniferil-alkohol zastupljen u maloj količini u 50% vodeno-etanolnom ekstraktu hrasta. Prema istim autorima, sinapil-alkohol nije kvantifikovan, što je u skladu samo sa rezultatima za ispitivani hrast kitnjak iz Kučaja (uzorak 4), dok je u ostalim ispitivanim uzorcima hrasta (uzorci 1-3 i 6) predstavljao dominantno jedinjenje. Koniferil- i sinapil-alkohol su glavne komponente lignina koji se oslobađaju tokom odležavanja alkoholnih pića i oksiduju se relativno brzo u aromatične aldehide (koniferil-aldehid i sinapaldehyd) ili u odgovarajuće kiseline (Cernîsev, 2017). Razlika između rezultata za ispitivane vrste drveta i literaturnih podataka nastaje kao posledica vremena ekstrakcije, pošto se smanjivanje sadržaja koniferil- i sinapil-alkohola, a time i porast koncentracija aromatičnih aldehida i kiselina događa prilikom dužeg vremena ekstrakcije, odnosno odležavanja. Iz istog razloga, u ispitivanim uzorcima hrasta sadržaj vanilina (n.d. –  $0,78 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) i siringaldehida (n.d. –  $2,17 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) je manji, pošto nastajanje ovih aromatičnih aldehida takođe zavisi od vremena odležavanja hrastovog drveta.

Najveći sadržaj vanilina ( $0,78 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) detektovan je u hrastu lužnjaku iz Gornjeg Radana (uzorak 2), dok je najmanji sadržaj ( $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) detektovan u hrastu lužnjaku iz Slavonije (uzorak 1). Vanilin i siringaldehid nisu detektovani u hrastu kitnjaku iz Kučaja (uzorak 4). Prema autorima Canas (2017) i Cernîsev (2017), odnos između vanilina i siringaldehida nalazio se u opsegu između 1,80 i 2,21 za skoro sve destilate, dok je u ovoj disertaciji taj odnos bio mnogo veći ( $2,67 - 2,78$ ), osim u slučaju hrasta lužnjaka iz Slavonije (uzorak 1) i hrasta kitnjaka iz Kučaja (uzorak 4). Ovaj odnos može biti potencijalno značajan za odležavanje alkoholnih pića, prilikom procene dodatka

različitih komada drveta, posebno dugi (letvi), kao i razlikovanja tehnologije odležavanja (drvena burad ili komadi drveta).

Sadržaj koniferil- i sinap-aldehida bio je najveći u hrastu kitnjaku iz Ravne Gore (uzorak 6) ( $3,51 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , odnosno  $7,95 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Prema Alañón i saradnicima (2011), sadržaj ovih jedinjenja je veći u hrastu kitnjaku nego u hrastu lužnjaku, što se prema rezultatima ove disertacije ne može tvrditi pošto je u jednom uzorku kitnjaka (4) sadržaj koniferil-aldehida niži u odnosu na ostale uzorke hrasta, a sinap-aldehid uopšte nije detektovan. Pored toga, prema podacima iz literature, sadržaj koniferil-aldehida (Coldea i sar., 2020; Alañón i sar., 2011) i sinap-aldehida (Coldea i sar., 2020) je veći u trešnji nego u hrastu, dok u ovoj disertaciji trešnja (uzorak 10) nije sadržala koniferil-aldehid, dok je sadržaj sinap-aldehida u trešnji veći jedino u odnosu na hrast kitnjak iz Kučaja (uzorak 4), u kojem ovo jedinjenje nije detektovano.

Kad se sumiraju rezultati, može da se uoči da su neka isparljiva jedinjenja karakteristična samo za jednu vrstu drveta. Kumaran i metil-rezorcinol su detektovani samo u belom dudu (uzorak 11), dok su *o*-acetil-*p*-krezol i 2,4-dihidroksiacetofenon (rezoacetofenon) detektovani samo u bagremu (uzorak 8). Benzoeva kiselina, skopoletin i 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzoeva kiselina su detektovani jedino u džanarici (uzorak 9). Flavonoidi i tragovi acetofenona su detektovani samo u divljoj trešnji (uzorak 10). Samo u hrastovima bili su zastupljeni homovanilinska kiselina, *cis*- $\beta$ -metil- $\gamma$ -oktalakton (svi uzorci), kao i *trans*- $\beta$ -metil- $\gamma$ -oktalakton, vinilgvajakol, eugenol, vanilin, propiovanilon, metil-homovanilat, siringilpropan-2-on, butirosiringon i dihidrosinapil-alkohol (svi uzorci osim hrasta kitnjaka iz Kučaja, uzorak 4). Izoegenol je karakterističan samo za hrast iz Gornjeg Radana (uzorak 2).

#### 4.2.9 Mineralni sastav ekstrakata drveta

Sadržaj dvadeset jednog elementa u ekstraktima drveta prikazan je u **Tabeli 14**. Među ispitivanim elementima, šesnaest elemenata je detektovano u svim uzorcima, dok su Al, Co, Cr, i Li detektovani u nekim ekstraktima. As nije uopšte detektovan u uzorcima drveta. Koncentracije teških metala u ekstraktima drveta bile su mnogo niže u odnosu na maksimalne dozvoljene vrednosti u voćnim rakijama (Bonić i sar., 2013).

Kalijum je najzastupljeniji element u svim ispitivanim ekstraktima drveta osim u divljoj trešnji (uzorak 10). U uzorcima drveta, makroelementi kao što su Ca, Mg, P, S i Na detektovani su u količinama koje prelaze  $0,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Ostali elementi su detektovani u malim koncentracijama, sa izuzetkom mangana, čiji sadržaj u ceru je iznosio  $3,81 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Pored toga, cer se izdvojio od ostalih ekstrakata po značajno većoj količini tri makroelementa (K, Na i Mg) i nekih mikroelemenata (Mn, Zn, Co, Ni, Ba, Sr i Li). Interesantno je uočiti da je vrednost sadržaja pepela (mineralnog sastava) cera, koju su dobili Barjaktari i sar. (2018), značajno veći u odnosu na sadržaj pepela iz literature za hrast i bagrem (Fengel i Wegener, 1983), što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji.



**Tabela 14.** Sadržaj makroelemenata ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) i mikroelemenata ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) u ekstraktima drveta

	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Makroelementi (<math>\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>											
<b>K</b>	10,88 <sup>g</sup>	18,81 <sup>d</sup>	15,15 <sup>e</sup>	14,13 <sup>f</sup>	10,74 <sup>g</sup>	15,24 <sup>e</sup>	80,19 <sup>a</sup>	18,40 <sup>d</sup>	32,29 <sup>c</sup>	5,06 <sup>h</sup>	51,70 <sup>b</sup>
<b>Ca</b>	5,13 <sup>g</sup>	3,44 <sup>h</sup>	3,40 <sup>hi</sup>	3,06 <sup>j</sup>	3,22 <sup>i</sup>	6,95 <sup>e</sup>	10,99 <sup>b</sup>	11,48 <sup>a</sup>	7,60 <sup>d</sup>	6,07 <sup>f</sup>	8,01 <sup>c</sup>
<b>Mg</b>	1,15 <sup>g</sup>	0,49 <sup>j</sup>	0,41 <sup>k</sup>	0,55 <sup>i</sup>	0,62 <sup>h</sup>	2,85 <sup>e</sup>	40,73 <sup>a</sup>	5,67 <sup>b</sup>	3,32 <sup>c</sup>	1,45 <sup>f</sup>	3,17 <sup>d</sup>
<b>P</b>	0,60 <sup>e</sup>	0,35 <sup>g</sup>	0,67 <sup>d</sup>	0,59 <sup>ef</sup>	0,35 <sup>g</sup>	1,07 <sup>b</sup>	0,35 <sup>g</sup>	0,58 <sup>f</sup>	8,81 <sup>a</sup>	0,32 <sup>h</sup>	0,73 <sup>c</sup>
<b>S</b>	2,20 <sup>e</sup>	1,58 <sup>g</sup>	1,58 <sup>g</sup>	1,82 <sup>f</sup>	1,04 <sup>h</sup>	2,24 <sup>de</sup>	2,90 <sup>b</sup>	2,44 <sup>c</sup>	3,18 <sup>a</sup>	0,74 <sup>i</sup>	2,27 <sup>d</sup>
<b>Na</b>	0,70 <sup>i</sup>	0,83 <sup>f</sup>	0,69 <sup>i</sup>	0,79 <sup>g</sup>	1,53 <sup>b</sup>	0,83 <sup>f</sup>	9,46 <sup>a</sup>	0,96 <sup>e</sup>	1,08 <sup>d</sup>	0,63 <sup>h</sup>	1,28 <sup>c</sup>
<b>Mikroelementi (<math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>											
<b>Fe</b>	178,90 <sup>b</sup>	97,58 <sup>f</sup>	72,33 <sup>g</sup>	142,60 <sup>d</sup>	24,41 <sup>l</sup>	223,10 <sup>a</sup>	28,16 <sup>k</sup>	122,60 <sup>e</sup>	45,49 <sup>i</sup>	31,40 <sup>j</sup>	153,10 <sup>c</sup>
<b>Mn</b>	87,50 <sup>d</sup>	30,24 <sup>g</sup>	4,18 <sup>j</sup>	14,31 <sup>h</sup>	209,40 <sup>b</sup>	156,80 <sup>c</sup>	3813,00 <sup>a</sup>	31,31 <sup>e</sup>	30,90 <sup>f</sup>	6,24 <sup>i</sup>	30,89 <sup>f</sup>
<b>Cu</b>	105,40 <sup>h</sup>	110,90 <sup>g</sup>	121,90 <sup>e</sup>	122,90 <sup>e</sup>	92,12 <sup>i</sup>	115,00 <sup>f</sup>	125,90 <sup>d</sup>	268,00 <sup>b</sup>	306,50 <sup>a</sup>	52,48 <sup>j</sup>	134,40 <sup>c</sup>
<b>Zn</b>	34,04 <sup>f</sup>	20,69 <sup>j</sup>	22,57 <sup>i</sup>	16,17 <sup>k</sup>	40,98 <sup>e</sup>	29,87 <sup>h</sup>	224,40 <sup>a</sup>	125,40 <sup>c</sup>	93,02 <sup>d</sup>	31,78 <sup>g</sup>	189,70 <sup>b</sup>
<b>Co</b>	0,59 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	0,57 <sup>c</sup>	n.d.	2,71 <sup>a</sup>	0,15 <sup>e</sup>	0,35 <sup>d</sup>	0,10 <sup>f</sup>	n.d.
<b>Ni</b>	2,70 <sup>h</sup>	1,47 <sup>j</sup>	1,88 <sup>i</sup>	1,43 <sup>j</sup>	7,20 <sup>f</sup>	20,16 <sup>d</sup>	77,62 <sup>a</sup>	7,68 <sup>e</sup>	23,85 <sup>b</sup>	3,32 <sup>g</sup>	21,64 <sup>c</sup>
<b>Al</b>	53,44 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	21,38 <sup>c</sup>	5,66 <sup>g</sup>	66,42 <sup>a</sup>	10,53 <sup>e</sup>	8,16 <sup>f</sup>	n.d.	n.d.	14,16 <sup>d</sup>
<b>As</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Ba</b>	27,71 <sup>c</sup>	11,02 <sup>i</sup>	14,96 <sup>f</sup>	10,59 <sup>j</sup>	14,45 <sup>g</sup>	28,82 <sup>b</sup>	46,58 <sup>a</sup>	10,38 <sup>k</sup>	15,33 <sup>e</sup>	26,75 <sup>d</sup>	12,88 <sup>h</sup>
<b>Cd</b>	0,39 <sup>b</sup>	0,34 <sup>f</sup>	0,35 <sup>e</sup>	0,33 <sup>g</sup>	0,32 <sup>h</sup>	0,37 <sup>c</sup>	0,41 <sup>a</sup>	0,40 <sup>ab</sup>	0,41 <sup>a</sup>	0,36 <sup>d</sup>	0,32 <sup>h</sup>
<b>Cr</b>	0,27 <sup>c</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	0,25 <sup>d</sup>	0,77 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	0,64 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.
<b>Li</b>	0,13 <sup>g</sup>	1,21 <sup>b</sup>	n.d.	0,73 <sup>d</sup>	0,67 <sup>e</sup>	1,14 <sup>c</sup>	85,98 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	0,26 <sup>f</sup>
<b>Pb</b>	2,58 <sup>f</sup>	1,48 <sup>h</sup>	1,68 <sup>g</sup>	1,22 <sup>i</sup>	0,99 <sup>j</sup>	3,47 <sup>c</sup>	3,24 <sup>d</sup>	5,29 <sup>b</sup>	3,44 <sup>c</sup>	3,07 <sup>e</sup>	8,40 <sup>a</sup>
<b>Se</b>	6,35 <sup>h</sup>	6,34 <sup>h</sup>	7,01 <sup>g</sup>	7,11 <sup>f</sup>	5,32 <sup>i</sup>	7,74 <sup>e</sup>	8,97 <sup>a</sup>	8,93 <sup>cd</sup>	9,56 <sup>a</sup>	9,15 <sup>b</sup>	8,91 <sup>d</sup>
<b>Sr</b>	26,63 <sup>f</sup>	21,76 <sup>h</sup>	19,34 <sup>i</sup>	24,54 <sup>g</sup>	18,25 <sup>j</sup>	34,71 <sup>c</sup>	47,93 <sup>a</sup>	40,57 <sup>b</sup>	32,96 <sup>d</sup>	19,32 <sup>i</sup>	28,12 <sup>e</sup>

\*Brojevi 1-11 u prvom redu odgovaraju rednim brojevima uzoraka prema **Tabeli 3**. Različita slova u istom redu označavaju značajnu razliku između ekstrakata drveta prema Tuki testu,  $p < 0,05$ .

#### 4.2.9.1 Sadržaj makroelemenata u ekstraktima drveta

U svim ispitivanim ekstraktima drveta osim u divljoj trešnji kalijum je najzastupljeniji element, sa opsegom koncentracija između  $10,74 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (hrast kitnjak iz Kuršumlje, uzorak 5) i  $80,19 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (cer, uzorak 7). U divljoj trešnji (uzorak 10) kalcijum je najzastupljeniji element ( $6,07 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

U većini ekstrakata fosfor je najmanje zastupljen makroelement. Izuzetak predstavlja ekstrakt džanarike (uzorak 9), u kojem je sadržaj P značajno viši u odnosu na sadržaj većine makroelemenata. Visok sadržaj fosfora u ovom ekstraktu može se objasniti pretpostavkom da je stablo verovatno raslo na zemljištu na kojem su upotrebljavana đubriva na bazi fosfora. Mg je najmanje zastupljen makroelement u hrastu lužnjaku iz Olova (uzorak 3) i hrastu kitnjaku iz Kučaja (uzorak 4), dok je natrijum najmanje zastupljen element u hrastu kitnjaku iz Ravne Gore (uzorak 6). Džanarika i beli dud imaju povećan sadržaj magnezijuma i kalcijuma u odnosu na većinu ostalih

ekstrakata, što može da se objasni time što su rasli na vertisolu, tipu zemljišta koje je bogato ovim elementima (Duchaufour, 1982).

Poređenjem sadržaja makroelemenata među ekstraktima drveta, može se zapaziti da je najveći sadržaj fosfora i sumpora detektovan u ekstraktu džanarike ( $8,81 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , odnosno  $3,18 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , uzorak 4), dok je najveći sadržaj kalcijuma detektovan u ekstraktu bagrema ( $11,48 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , uzorak 8). Sa druge strane, najmanja koncentracija makroelemenata je detektovana u ekstraktima hrastova lužnjaka i kitnjaka (Ca u hrastu kitnjaku iz Kučaja, uzorak 4, i Mg u hrastu lužnjaku iz Olova, uzorak 3), kao i u ekstraktu divlje trešnje (uzorak 10), koji je sadržao najmanje količine K, S, P i Na. Prema Ćiriću (1991), šumsko drveće unosi značajno veće količine kalijuma nego fosfora, što je u skladu sa rezultatima ove disertacije.

#### 4.2.9.2 Sadržaj mikroelemenata u ekstraktima i potencijalna toksičnost

Svi detektovani mikroelementi u ekstraktima drveta mogu se smatrati potencijalno toksičnim elementima ukoliko se nađu u većim koncentracijama. Među njima, Cr, Co, Cu, Fe, Mo, Se, Zn, Mn i I su klasifikovani kao elementi u tragovima koji su neophodni za ljudsko zdravlje (WHO, 1996). Ovi elementi su obično neophodni za ljude u količinama koje se kreću u opsegu između  $50 \mu\text{g}\cdot\text{dan}^{-1}$  i  $18 \text{ mg}\cdot\text{dan}^{-1}$ , i moraju se unositi hranom u malim količinama kako bi se održale normalne fiziološke funkcije ljudskog organizma (Koller i Saleh, 2018). Međutim, prekomerna izloženost njima može da dovede do toksičnog efekta (Nordberg i Nordberg, 2016).

Ljudi apsorbuju esencijalne i toksične mikroelemente putem hrane i kože i, u slučaju zagađenja vazduha, inhalacijom. Prekomerni unos, kao i nedovoljan unos esencijalnih elemenata u tragovima, može da uzrokuje zdravstvene probleme (Nordberg i Nordberg, 2016). Takođe, neki elementi, kao što je Cr, esencijalni su u jednom obliku, dok su toksični u drugom. Oblik hroma koji se nalazi u hrani,  $\text{Cr}^{3+}$ , esencijalan je za održavanje normalnog metabolizma glukoze i može biti toksičan samo ako se unese u višku (u tom slučaju može da prouzrokuje probleme sa jetrom i bubrezima). S druge strane,  $\text{Cr}^{6+}$  je toksičan i hroničnim izlaganjem prahu hromata povećan je rizik od raka pluća (Goldhaber, 2003).

Najzastupljeniji mikroelementi u uzorcima bili su Fe, Mn, Cu i Zn. Za njima slede Ba i Sr. Fe i Mn su među najzastupljenijim metalima u Zemljinoj kori (WHO, 2004) i njihovo prisustvo u ekstraktima drveta kao dominantnih mikroelemenata je očekivano. Poređenjem sadržaja mikroelemenata među ekstraktima drveta, može se uočiti da su najveće količine Mn i Zn detektovane u ceru (uzorak 7), što može da se dogodi ako je drvo raslo na zemljištu na kojem je primenjeno stajsko đubrivo (Mottaghian i sar., 2008). Pored toga, najveće količine Fe detektovane su u hrastu kitnjaku iz Ravne Gore (uzorku 6), dok su najveće količine Cu detektovane u džanarici (uzorak 9).

Fe je najzastupljeniji mikroelement u hrastu lužnjaku iz Slavonije (uzorak 1) i hrastu kitnjaku iz Kučaja i Ravne Gore (uzorci 4 i 6), Mn je najzastupljeniji u hrastu kitnjaku iz Kuršumlje (uzorak 5) i ceru (uzorak 7), Zn u dudu (uzorak 11), dok je Cu najzastupljeniji u ostalim ekstraktima.

Kao što je već pomenuto (**Tabela 14**), ekstrakt cera (uzorak 7) je sadržao najveće količine Mn, Zn, Co, Ni, Ba, Li i Sr ( $3813,00 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $224,40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $2,71 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $77,62 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $46,58 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $85,98 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  i  $47,93 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respektivno). Poređenjem sadržaja ostalih mikroelemenata u ekstraktima drveta (**Tabela 14**), najveća količina Fe, Al i Cr detektovana je u hrastu kitnjaku iz Ravne Gore (uzorak 6), Cu i Se u džanarici (uzorak 9), dok je najveća količina Pb detektovana u ekstraktu belog dudu (uzorak 11). S druge strane, hrast kitnjak iz Kuršumlje (uzorak 5) se izdvojio po najmanjoj količini Fe, Pb, Se i Sr. Najmanje količine ostalih mikroelemenata bile su sledeće: Ba u bagremu ( $10,38 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , uzorak 8), Cu u divljoj trešnji ( $52,48 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , uzorak 10), Mn u hrastu lužnjaku iz

Olova, ( $4,18 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , uzorak 3), dok su Zn i Ni bili najmanje zastupljeni u hrastu kitnjaku iz Kučaja, ( $16,17 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  i  $1,43 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respektivno, uzorak 4). Neki mikroelementi (Al, Cr, Li, Co) nisu bili zastupljeni u svim uzorcima. Konkretno, Al nije detektovan u uzorcima hrasta lužnjaka (uzorci 2 i 3), džanarici (uzorak 9) i divljoj trešnji (uzorak 10), dok je Cr detektovan samo u četiri ekstrakta, odnosno u uzorcima hrasta kitnjaka (uzorci 5 i 6), hrastu lužnjaku (uzorak 1) i džanarici (uzorak 9). Li je detektovan u svim uzorcima hrasta kitnjaka (uzorci 4-6), dva uzorka hrasta lužnjaka (uzorci 1 i 2), ceru (uzorak 7) i belom dudu (uzorak 11). Co je detektovan u hrastu lužnjaku iz Slavonije (uzorak 1), hrastu kitnjaku iz Kuršumlje (uzorak 5), ceru (uzorak 7), bagremu (uzorak 8), džanarici (uzorak 9) i divljoj trešnji (uzorak 10).

Sadržaj Fe u ispitivanim ekstraktima drveta se nalazio u opsegu ili ispod opsega koji su Szczepkowski i Nicewicz (2008) dobili u drvetu hrasta. Ova pojava je očekivana, s obzirom da mineralne supstance nisu u potpunosti rastvorljive i da je njihov sadržaj u drvetu veći nego u ekstraktu. Sadržaj Cu u ispitivanim ekstraktima je bio uglavnom u opsegu koji su dobili Szczepkowski i Nicewicz (2008), što predstavlja prirodan nivo ovog elementa u zemljištu (Kabata-Pendias i Pendias, 2001). Međutim, sadržaj Mn u svim ispitivanim ekstraktima osim cera (uzorak 7) je bio niži u poređenju sa vrednošću koju su dobili Szczepkowski i Nicewicz (2008), verovatno zbog toga što je mineralni sastav veći u drvetu nego u ekstraktu, ali i zbog različitog geografskog porekla i klime. Iako su Zn i Cu sastavni delovi mnogih enzima u organizmu, velika količina ovih elemenata može biti toksična, pošto višak unetog cinka može da inhibira apsorpciju Cu i obrnuto (Hague i sar., 2008). Ova pojava može da objasni suprotni trend sadržaja Zn i Cu u ispitivanim ekstraktima drveta.

Analizirani ekstrakti drveta su sadržali relativno veliku količinu Ba i Sr. Nema dokaza da je Ba kancerogen ili mutagen, međutim može da uzrokuje hipertenziju (WHO, 2004). Sr je prisutan skoro svuda u malim količinama, što može da objasni njegovu relativno veliku zastupljenost u ekstraktima drveta. Takođe, unos Sr je specifičan za biljne vrste i veoma zavisi od osobina zemljišta kao što su pH, sadržaj organske supstance i jonski sastav (Pavlović i sar., 2017), što može da objasni različitu distribuciju Sr među ispitivanim ekstraktima drveta. Sr može da bude prirodno prisutan u zemljištu kao smeša stabilnih izotopa, koji su nastali razgradnjom minerala koji sadrže Sr, ili radioaktivnih izotopa koji su nastali kao rezultat nuklearnih eksplozija.

Sadržaj Al, Cr, Pb i Cd je mnogo niži nego što su Szczepkowski i Nicewicz (2008) dobili za drvo hrasta, verovatno zbog toga što je mineralni sastav veći u drvetu nego u ekstraktu, kao i zbog različitog geografskog porekla, različite klime, karakteristika zemljišta, uticaja zagađivača i prirodnih sastojaka iz životne sredine. Elementi kao što su Pb, Hg, Cd i As, nemaju nikakvu poznatu esencijalnu ulogu za fiziološke funkcije ljudskog organizma i izloženost njima, čak i u tragovima, može biti toksična (Nordberg i Nordberg, 2016). Olovo nije esencijalni element i njegovo prisustvo može negativno da utiče na ljudsko zdravlje. Količina olova u ekstraktima drveta je značajno ispod maksimalne dozvoljene vrednosti u rakijama koja iznosi  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Bonić i sar., 2013), tako da se ekstrakti mogu smatrati bezbednim.

Cd je visoko toksičan i odgovoran za različite slučajeve trovanja hranom, posebno kroz kontaminiran pirinač (Rai i sar., 2019). Cd biohemijski zamenjuje Zn i može da uzrokuje stanja kao što su povišen krvni pritisak i oštećenje bubrega (Dehelean i Magdas, 2013). U ekstraktima drveta ispitivanih u okviru ove disertacije sadržaj Cd je detektovan u opsegu od  $0,32 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  do  $0,41 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , što je ispod maksimalne dozvoljene vrednosti u vodi za piće prema Pravilniku o higijenskoj ispravnosti vode za piće.

Unos Se u malim količinama je neophodan za normalno funkcionisanje životinjskog i ljudskog organizma pošto može da spreči veliki broj bolesti, kao što su kancer i trovanje teškim metalima (Combs i Gray, 1998). Studije geološkog i biološkog materijala koji potiče iz Srbije ukazali su na

manjak Se u njima (Čuvarđić, 2003). Međutim, prekomeran unos Se dovodi do selenoze, stanja karakterističnog po gubitku kose, lomljivim noktima, osipu na koži, gastrointestinalnim problemima, zadahu na beli luk i problemima nervnog sistema (Goldhaber, 2003). Selen je detektovan u ispitivanim ekstraktima drveta u koncentracijama između  $5,32 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (hrast kitnjak, uzorak 5) i  $9,56 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (džanarika), koje se nalaze ispod maksimalne dozvoljene vrednosti koju je odredila Svetska zdravstvena organizacija (SZO,  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Ricci i saradnici (2017) ispitivali su elementalni sastav, kao i sadržaj potencijalno toksičnih elemenata u komercijalnom taninu za hranu dobijenom iz hrasta lužnjaka (*Q. robur*). Poređenjem ovih rezultata sa elementalnim sastavom ispitivanih ekstrakata drveta, utvrđeno je da je sadržaj Cu mnogo veći nego što su Ricci i saradnici (2017) dobili, dok je sadržaj Zn, As, Pb, Cr i Ba bio niži. Sadržaj Sr i Co u ispitivanim ekstraktima drveta nalazio se u opsegu vrednosti kao što su Ricci i saradnici (2017) dobili. Teški metali, kao što su Cr, Cu i Zn, mogu da uzrokuju nekancerogenu opasnost po ljudsko zdravlje (Rai i sar., 2019), dok je toksičnost Co niska u odnosu na druge esencijalne elemente u tragovima (Dehelean i Magdas, 2013).

Sadržaj Ni u ispitivanim ekstraktima drveta je generalno relativno mali (u opsegu:  $1,43\text{--}77,62 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), verovatno zbog male biodostupnosti za biljke, koja je prouzrokovana stvaranjem slabo rastvornih soli fosfora u zemljištu (Ličina i sar., 2017).

Poređenjem elementalnog sastava ispitivanih vrsta drveta sa vrednostima koje su određene direktivom koju je propisala SZO za pijaću vodu (WHO, 2004) i Pravilnikom o higijenskoj ispravnosti vode za piće ("Sl. list SRJ", br. 42/98 i 44/99 i "Sl. glasnik RS", br. 28/2019), sadržaj Mn i Ni u ekstraktu cera (uzorak 7) je značajno prešao propisane vrednosti. Sadržaj Ni u ekstraktima hrasta kitnjaka iz Ravne Gore (uzorak 6), džanarike (uzorak 9) i belog duda (uzorak 11) je malo prelazio vrednost koju je SZO propisala kao maksimalno dozvoljenu za pijaću vodu, kao i vrednost propisanu u vodi za piće za vreme redovnih prilika prema Pravilniku o higijenskoj ispravnosti vode za piće. S druge strane, prema Pravilniku o higijenskoj ispravnosti vode za piće, sadržaj Ni u ovim uzorcima nije prelazio maksimalno dopuštenu vrednost propisanu u vodi za piće za vreme vanrednog stanja.

#### 4.2.9.3 Poređenje elementalnog sastava među ekstraktima drveta

Posmatranjem i poređenjem elementalnog sastava među uzorcima drveta, mogu se uočiti izvesne pravilnosti.

Prema sadržaju makroelemenata, ekstrakt cera (uzorak 7) se izdvojio od ostalih ekstrakata drveta po najvećoj količini K, Na i Mg. Bagrem (uzorak 8) se izdvojio prema najvećem sadržaju Ca. Džanarika (uzorak 9) je sadržala najveću količinu S i P. S druge strane, ekstrakt divlje trešnje (uzorak 10) se izdvojio prema najmanjem sadržaju četiri makroelementa (K, S, P i Na). Hrast kitnjak iz Kučaja (uzorak 4) je sadržao najmanju koncentraciju Ca, dok je hrast lužnjak iz Olova (uzorak 3) sadržao najmanju koncentraciju Mg.

Sadržaj makroelemenata u ekstraktima hrasta lužnjaka i kitnjaka je bio relativno ujednačen. Poređenjem sadržaja makroelemenata među ovim ekstraktima, može se uočiti da je hrast kitnjak iz Ravne Gore (uzorak 6) sadržao veću koncentraciju Ca, Mg, P i S u odnosu na druge ekstrakte lužnjaka i kitnjaka. Među ovim elementima, interesantno je zapaziti da je najveći sadržaj Ca, Mg i S zapažen u ekstraktu hrasta kitnjaka iz Ravne Gore (uzorak 6), za kojim sledi hrast lužnjak iz Slavonije (uzorak 1), dok je sadržaj ovih elemenata značajno niži u ostalim ekstraktima hrastova lužnjaka i kitnjaka. Hrast kitnjak iz Kuršumlije (uzorak 5) sadržao je veću količinu Na, kao i manje količine K, S i P. Ekstrakt hrasta lužnjaka iz Gornjeg Radana (uzorak 2) je takođe sadržao najmanje P međutim, za razliku od hrasta kitnjaka iz Kuršumlije, sadržao je najviše K u odnosu na ostale ekstrakte hrasta lužnjaka i kitnjaka. Hrast lužnjak iz Olova (uzorak 3) je sadržao manju količinu Mg

i Na, dok je hrast kitnjak iz Kučaja (uzorak 4) sadržao manju koncentraciju Ca u odnosu na ostale ekstrakte lužnjaka i kitnjaka.

Poređenjem sadržaja mikroelemenata, može se uočiti da se ekstrakt cera (uzorak 7) izdvojio od ostalih ekstrakata drveta prema najvećoj količini sedam mikroelemenata (Mn, Zn, Co, Ni, Ba, Li i Sr). Hrast kitnjak iz Ravne Gore (uzorak 6) je sadržao najveću količinu tri mikroelementa (Fe, Al i Cr). Ekstrakt belog duda (uzorak 11) je sadržao najveću količinu Pb. Džanarika (uzorak 9) je sadržala najveću količinu Cu i Se. S druge strane, hrast kitnjak iz Kuršumlje (uzorak 5) se izdvojio po najmanjoj količini četiri mikroelemenata (Fe, Pb, Se i Sr). Hrast kitnjak iz Kučaja (uzorak 4) je sadržao najmanju količinu dva mikroelementa (Zn i Ni), dok je hrast lužnjak iz Olova (uzorak 3) sadržao najmanju količinu Mn. Ekstrakt divlje trešnje (uzorak 10) se izdvojio prema najmanjem sadržaju Cu, dok se bagrem (uzorak 8) izdvojio prema najmanjem sadržaju Ba. Sadržaj Cd je ujednačen u svim analiziranim ekstraktima drveta.

Sadržaj mikroelemenata u ekstraktima hrasta lužnjaka i kitnjaka je mnogo manje ujednačen u odnosu na sadržaj makroelemenata u ovim ekstraktima. Razlike u količinama pojedinih mikroelemenata u ovim ekstraktima su mnogo veće (u nekim slučajevima čak i preko deset puta veće). Hrast kitnjak iz Ravne Gore (uzorak 6) sadržao je značajno veće količine Fe, Ni, Al, Cr, Pb, Sr, Se i Ba, u poređenju sa ostalim ekstraktima lužnjaka i kitnjaka. Među ovim elementima, najveći sadržaj Fe, Ba i Pb zapažen je u ekstraktu hrasta kitnjaka iz Ravne Gore (uzorak 6), za kojim sledi hrast lužnjak iz Slavonije (uzorak 1), dok je sadržaj ovih elemenata značajno niži u ostalim ekstraktima hrastova lužnjaka i kitnjaka. Hrast kitnjak iz Kuršumlje (uzorak 5) izdvaja se po većem sadržaju Mn i Zn, kao i manjim sadržajem Fe, Cu, Pb, Se i Sr u odnosu na navedene uzorke. Uzorak hrasta lužnjaka iz Olova (uzorak 3) sadržao je manju količinu Mn, dok je hrast kitnjak iz Kučaja (uzorak 4) imao manji sadržaj Zn, Ni i Ba u odnosu na ostale ispitivane lužnjake i kitnjake.

Neki mikroelementi (Al, Cr, Li, Co) nisu bili zastupljeni u svim ekstraktima drveta. Među različitim vrstama drveta zapažena je različita zastupljenost ovih elemenata. Konkretno, u ekstraktu bagrema su bili zastupljeni Al i Co, u ekstraktu džanarike Co i Cr, u ekstraktu divlje trešnje Co, dok su u ekstraktu belog duda bili zastupljeni Al i Li. U ekstraktu cera su bili zastupljeni Al, Co i Li.

Zastupljenost navedena četiri elementa je takođe bila različita među ekstraktima hrasta lužnjaka i kitnjaka: u hrastu lužnjaku iz Slavonije (uzorak 1) i hrastu kitnjaku iz Kuršumlje (uzorak 5) su detektovana sva četiri elementa, u hrastu kitnjaku iz Ravne Gore (uzorak 6) Al, Cr i Li, u hrastu kitnjaku iz Kučaja (uzorak 4) detektovani su Al i Li, u hrastu lužnjaku iz Gornjeg Radana (uzorak 2) je detektovan Li, dok hrast lužnjak iz Olova (uzorak 3) nije sadržao ova četiri elementa. Interesantno je zapaziti da Co nije kvantifikovan u većini ekstrakata hrastova lužnjaka i kitnjaka, dok su količine u ekstraktima hrasta lužnjaka iz Slavonije (uzorak 1) i hrasta kitnjaka iz Kuršumlje (uzorak 5) približno iste ( $0,59 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  i  $0,57 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respektivno).

Uočene razlike među ekstraktima drveta u sadržaju navedena četiri elementa mogu da se objasne činjenicom da elementalni sastav zavisi od mnogih faktora kao što su vrsta drveta, geografsko poreklo, tip zemljišta na kojem je drvo raslo, klimatski uslovi kojima je drvo bilo izloženo i način sušenja drveta.

Na osnovu svega navedenog, može se zapaziti da se cer (uzorak 7) izdvojio prema najvećoj količini mnogih makro- i mikroelemenata. Divlja trešnja (uzorak 10) se izdvojila od drugih ekstrakata prema najmanjoj količini makroelemenata, dok se hrast kitnjak iz Kuršumlje (uzorak 5) izdvojio prema najmanjoj količini većeg broja mikroelemenata. Ostali ekstrakti drveta su se izdvojili prema količini znatno manjeg broja makro- i mikroelemenata u odnosu na druge ekstrakte drveta. Sadržaj Cd je ujednačen među ekstraktima drveta.

Među hrastovima lužnjacima i kitnjacima, hrast kitnjak iz Ravne Gore (uzorak 6) se izdvojio po najvećoj količini većine kvantifikovanih elemenata, za kojim često sledi hrast lužnjak iz Slavonije (uzorak 1), dok je ekstrakt hrasta kitnjaka iz Kuršumlje (uzorak 5) sadržao najmanje količine

većine elemenata. Interesantno je zapaziti da je hrast kitnjak iz Kuršumlje (uzorak 5) jedini uzorak među njima koji nije podvrgnut procesu prirodnog sušenja.

Može se zaključiti da među ekstraktima drveta postoje razlike u elementarnom sastavu najverovatnije zbog faktora kao što su biljna vrsta drveta, geografsko poreklo, faktori sredine i uticaj zagađujućih supstanci i prirodnih sastojaka iz okoline.

#### 4.2.10 Procena rizika i dnevni unos

Rezultati dobijeni računanjem zdravstvenog rizika za elemente sa toksikološkom referentnom vrednošću (RfD – referentna doza) prikazani su u **Tabeli 15**. Iz ovih podataka može se zapaziti da je HQ vrednost za Mn u ekstraktu cera (uzorak 7) najveća. Mn je sastavni deo različitih enzima u ljudskom telu, kao što je superoksid-dizmutaza, i unosi se u relativno velikim količinama normalnom ishranom, konzumiranjem namirnica kao što su hleb, čaj i voda, ili preko suplemenata. Međutim, Mn može da ispolji toksičnost kao kumulativan neurotoksin (Hague i sar., 2008). Dijetalni referentni unos (DRI) za Mn preporučen za dečake i devojčice starosti od 14 do 18 godina je 2,2 i 1,6 mg·dan<sup>-1</sup>, respektivno (Institute of Medicine, 2001). Posebno je značajno proceniti rizik za ovaj uzrast, pošto deca tada počinju da piju alkoholna pića (uključujući rakiju), i pošto su deca osetljiva kategorija. Iako je vrednost za Mn u ekstraktu cera (uzorak 7) veća nego DRI, potencijalni negativni efekti Mn iz cera na ljudsko zdravlje su minimalni zato što bi bio neophodan unos jako velikih količina ovog ekstrakta (više od 1L ekstrakta po danu), kako bi se ispoljili znaci toksičnosti. Najveća vrednost za HI je takođe izračunata za ekstrakt cera, dok je najmanja vrednost za HI izračunata za ekstrakt bagrema (uzorak 8). Iako je u ovoj studiji primenjen najgori scenario za procenu zdravstvenog rizika (koncentracija ukupnog Cr je računata kao Cr<sup>6+</sup> i računato je da su ekstrakti konzumirani svaki dan), nekancerogeni rizik za ljudski unos (HI) je bio manji od 1 u svim ispitivanim ekstraktima. Na osnovu koncentracija devet elemenata (Ca, Fe, Zn, Mn, P, K, Se, Cu i Mg) u ekstraktima drveta, izračunat je dnevni unos tih elemenata i, kao najgori scenario, maksimalna detektovana koncentracija je pomnožena sa prosečnim dnevnim unosom rakija (60 mL·dan<sup>-1</sup>) kako bi se dobio dnevni unos (**Tabela 16**). Poređenjem dnevnog unosa elemenata sa njihovim populacionim referentnim i adekvatnim unosom za muškarce koje je definisala EFSA (2017) (**Tabela 16**), može se zapaziti da su dobijene vrednosti bile niže od referentnih vrednosti, što je bilo očekivano, pošto je ovde razmatrana mala količina alkoholnih pića i nisu uzeti u obzir drugi izvori hrane. Najmanja razlika između ove dve vrednosti dobijena je za maksimalnu detektovanu koncentraciju Mn (u ceru), gde je dnevni unos ovog metala oko 10 puta manji nego populacioni referentni unos (PRI) i adekvatni unos (AI). Za ostale metale, dobijena razlika je 80 ili više puta veća.

**Tabela 15.** Koeficijent opasnosti (HQ) i indeks opasnosti (HI) izračunat na osnovu sadržaja potencijalno toksičnih elemenata u ekstraktima drveta

	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Al	4,01E-05	0	0	1,60E-05	4,25E-06	4,98E-05	7,90E-06	6,12E-06	0	0	1,06E-05
Ba	1,04E-04	4,13E-05	5,61E-05	3,97E-05	5,42E-05	1,08E-04	1,75E-04	3,89E-05	5,75E-05	1,00E-04	4,83E-05
Cd	5,86E-04	5,17E-04	5,26E-04	5,02E-04	4,76E-04	5,61E-04	6,15E-04	6,02E-04	6,14E-04	5,38E-04	4,79E-04
Co	1,48E-03	0	0	0	1,43E-03	0	6,79E-03	3,80E-04	8,81E-04	2,61E-04	0
Cr	6,84E-05	0	0	0	6,26E-05	1,93E-04	0,00E+00	0	1,61E-04	0	0,00E+00
Cu	1,98E-03	2,08E-03	2,29E-03	2,30E-03	1,73E-03	2,16E-03	2,36E-03	5,03E-03	5,75E-03	9,84E-04	2,52E-03
Fe	1,92E-04	1,05E-04	7,75E-05	1,53E-04	2,62E-05	2,39E-04	3,02E-05	1,31E-04	4,87E-05	3,36E-05	1,64E-04
Li	4,72E-05	4,53E-04	0	2,72E-04	2,50E-04	4,28E-04	3,22E-02	0	0	0	9,81E-05
Mn	2,73E-03	9,45E-04	1,31E-04	4,47E-04	6,54E-03	4,90E-03	1,19E-01	9,78E-04	9,66E-04	1,95E-04	9,65E-04
Ni	1,01E-04	5,49E-05	7,07E-05	5,36E-05	2,70E-04	7,56E-04	2,91E-03	2,88E-04	8,94E-04	1,24E-04	8,12E-04
Se	9,52E-04	9,51E-04	1,05E-03	1,07E-03	7,98E-04	1,16E-03	1,35E-03	1,34E-03	1,43E-03	1,37E-03	1,34E-03
Sr	3,33E-05	2,72E-05	2,42E-05	3,07E-05	2,28E-05	4,34E-05	5,99E-05	5,07E-05	4,12E-05	2,42E-05	3,52E-05
Zn	8,51E-05	5,17E-05	5,64E-05	4,04E-05	1,02E-04	7,47E-05	5,61E-04	3,14E-04	2,33E-04	7,95E-05	4,74E-04
Pb	2,13E-04	1,13E-03	3,17E-04	7,37E-04	5,53E-04	6,95E-04	2,61E-04	1,80E-03	3,61E-04	6,57E-04	7,44E-04
<b>HI</b>	1,20E-02	1,03E-02	5,54E-03	1,18E-02	8,96E-03	1,67E-01	5,19E-03	8,74E-03	4,64E-03	4,37E-03	1,14E-02

\*Brojevi u prvom redu predstavljaju oznake uzoraka drveta u skladu sa **Tabelom 3**

**Tabela 16.** Maksimalne detektovane koncentracije elemenata (iz **Tabele 14**), dnevni unos elemenata izračunat na osnovu njihovih maksimalno detektovanih koncentracija, kao i podaci o populacionom referentnom unosu (*population reference intake*, PRI), odnosno adekvatnom unosu (*adequate intake*, AI) elemenata za muškarce koje je propisala EFSA (2017)

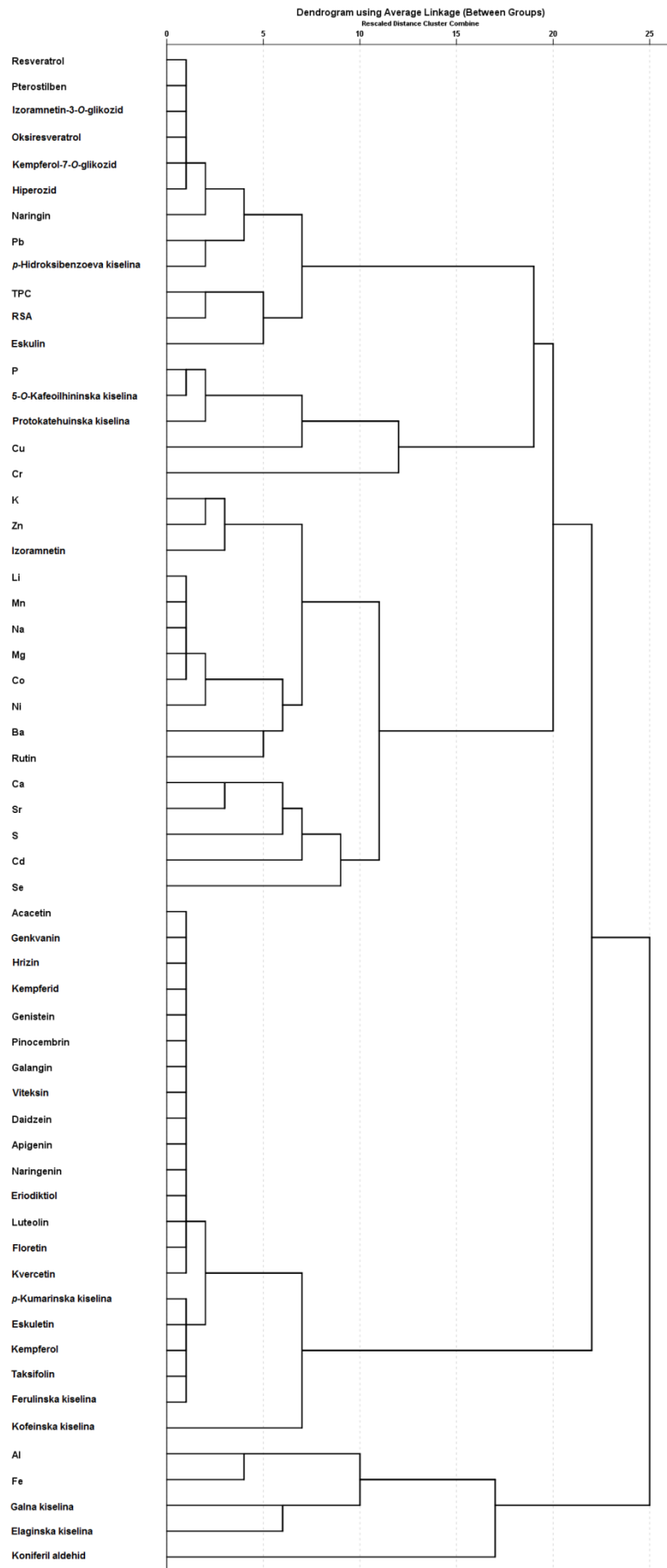
Element	Maksimalna detektovana koncentracija	Dnevni unos	PRI i AI (EFSA, 2017)
Ca	11,48 mg·L <sup>-1</sup>	0,68 mg·dan <sup>-1</sup>	950 mg·dan <sup>-1</sup>
P	8,81 mg·L <sup>-1</sup>	0,53 mg·dan <sup>-1</sup>	550 mg·dan <sup>-1</sup>
Mg	40,73 mg·L <sup>-1</sup>	2,44 mg·dan <sup>-1</sup>	350 mg·dan <sup>-1</sup>
K	80,19 mg·L <sup>-1</sup>	4,81 mg·dan <sup>-1</sup>	3500 mg·dan <sup>-1</sup>
Cu	306,50 µg·L <sup>-1</sup>	0,02 mg·dan <sup>-1</sup>	1,6 mg·dan <sup>-1</sup>
Fe	223,10 µg·L <sup>-1</sup>	0,01 mg·dan <sup>-1</sup>	11 mg·dan <sup>-1</sup>
Zn	224,40 µg·L <sup>-1</sup>	0,01 mg·dan <sup>-1</sup>	9,4 mg·dan <sup>-1</sup>
Mn	3813,00 µg·L <sup>-1</sup>	0,23 mg·dan <sup>-1</sup>	3 mg·dan <sup>-1</sup>
Se	9,56 µg·L <sup>-1</sup>	0,57 µg·dan <sup>-1</sup>	70 µg·dan <sup>-1</sup>

#### 4.2.11 Rezultati klusterske analize (CA) i analize glavnih komponenti (PCA)

Kako bi se utvrdila potencijalna veza između najzastupljenijih polifenola karakterističnih za svaku biljnu vrstu drveta i ispitivanih elemenata, primenjene su hemometrijske tehnike (CA i PCA). Klusterska analiza (CA) je primenjena kako bi se ispitala veza (korelacija) između elemenata (**Tabela 14**) i polifenola (**Tabela 6**), kao i TPC i RSA parametara (**Tabela 5**). Za analizu su korišćene količine elemenata i fenolnih jedinjenja u ekstraktima drveta.

Elementi i polifenoli određeni u ekstraktima drveta podeljeni su u četiri klastera (**Slika 11**).





Slika 11. Rezultati klusterske analize primenjene na koncentracije elemenata i fenolnih jedinjenja.

U prvom klasteru, Al, Fe, galna kiselina, elaginska kiselina i koniferil-aldehid su razdvojeni od ostalih varijabli. Korelacija između Fe i Al ( $r = 0,83$ ,  $p < 0,005$ ) može da ukazuje na slično geografsko poreklo. S druge strane, Fe i Al su obično u korelaciji sa organskom supstancom u zemljištu što pokazuje da koncentracija metala u zemljištu ne zavisi striktno od porekla (Ličina i sar., 2017). Prisustvo fenolnih kiselina u ovom klasteru može da ukazuje na isti zaključak do kojeg su došli Kabata-Pendias i Pendias (2001), odnosno da organske kiseline kao što su galna i/ili elaginska kiselina, mogu da podstiču mobilnost slaborastvornih oblika elemenata u tragovima iz zemljišta do biljaka, kao i mobilnost u samoj biljci.

U drugom klasteru su se nalazili samo polifenoli, što ukazuje na odsustvo uticaja sadržaja elemenata na sadržaj ovih polifenola u ekstraktima drveta. Takođe, prema rezultatima korelacione analize kofeinska kiselina je bila jedina komponenta bez značajnih korelacija u ovom podklasteru.

Treći klaster se sastoji od elemenata koji su međusobno korelisani. Najznačajnije korelacije su dobijene između K, Ni, Li, Mn, Na i Mg, sa regresionim koeficijentima u opsegu od 0,81 do 0,99 ( $p < 0,005$ ). Kalijum je pokazao značajnu korelaciju sa Zn ( $r = 0,91$ ,  $p < 0,0001$ ). U okviru ovog klastera, Ca, Sr, S, Se i Cd su se grupisali na osnovu korelacija među njima, u kojima u se regresioni koeficijenti nalazili u opsegu od 0,74 do 0,89 ( $p < 0,01$ ). Biljke mogu da unose stroncijum zajedno sa kalcijumom, pošto ovi elementi imaju slične hemijske osobine.

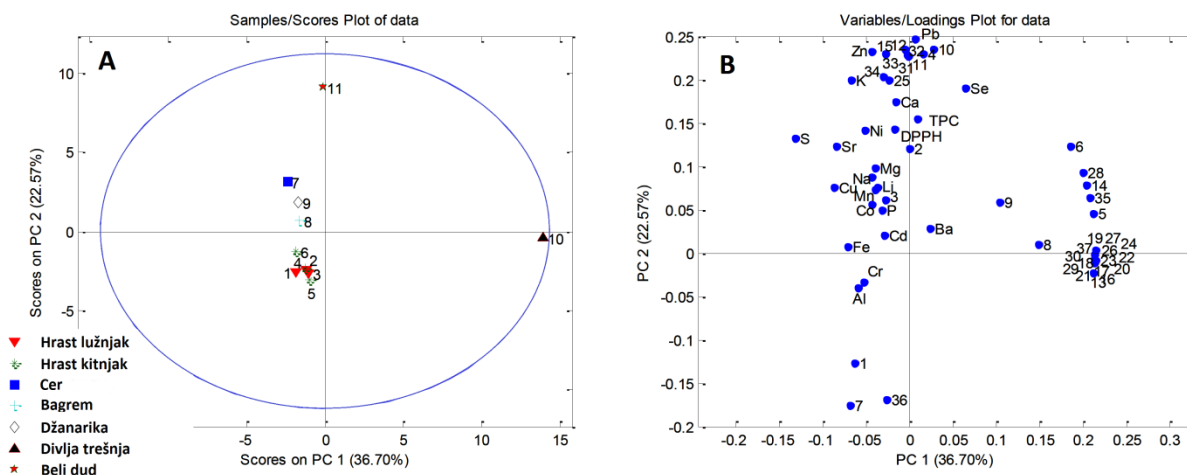
U fiziološkim procesima u biljkama, unos i delovanje stabilnog  $Sr^{2+}$  na rast biljaka zavise od koncentracije  $Ca^{2+}$  (Burger i Lichtscheidl, 2019). Pored toga, Sr može da se taloži zajedno sa Ca u obliku oksalata i sulfata u različitim tkivima biljaka. Formiranje kristala koji sadrže Ca i Sr mogu da igraju ulogu u regulaciji i detoksikaciji ovih elemenata u biljkama kao i u zaštiti biljaka od herbivora (He i sar., 2012). S druge strane, korelacija između Se i S može se objasniti činjenicom da selen ublažava stres u biljkama zbog njegovog kapaciteta da podstiče sintezu sumpornih jedinjenja (Schiavon i sar., 2017).

Četvrti klaster čine TPC, RSA, Pb, P, Cu, Cr, zajedno sa nekim polifenolima. Ovaj klaster je podeljen na dva podklastera: jedan se sastoji od P, Cu, Cr i protokatehuinske kiseline i neohlorogene kiseline (5-*O*-kafeoilhininske kiseline). Korelacija između P i protokatehuinske kiseline ( $r = 0,93$ ,  $p < 0,0001$ ) ukazuje na povećanu biodostupnost fosfora uz pomoć ove kiseline, kao i na redukciju u adsorpciji fosfora uz pomoć minerala koji vezuju fosfor (Hu i sar., 2005). Povećavanjem sadržaja protokatehuinske kiseline, povećava se mobilnost fosfora u zemljištu i na taj način poboljšava njegova biodostupnost (Hu i sar., 2005).

Drugi podklaster čine parametri koji ukazuju na antioksidativni potencijal ekstrakata, kao što su TPC i RSA, kao i neki polifenoli i Pb. Na osnovu ekstrahovanih koncentracija Pb, može se uočiti da je ekstrakt belog duda bio najviše obogaćen ovim elementom. Takođe, u ekstraktu belog duda su uočene i najveće vrednosti za TPC i RSA, kao i sadržaj oksiresveratrola, naringina, hiperozida, eskulina, kempferol-7-*O*-glikozida, kao i *p*-hidroksibenzojeve kiseline. Ovaj uzorak je takođe jedini koji sadrži resveratrol, pterostilben i izoramnetin-3-*O*-glikozid.

Kako bi se utvrdile razlike među ekstraktima drveta, primenjena je analiza glavnih komponenata na ukupan set podataka korišćenih za klustersku analizu. Rezultati su prikazani na **Slici 12**. Na osnovu PCA, prvih pet glavnih komponenti objašnjavaju 93,83% varijabilnosti seta podataka. Prva glavna komponenta opisuje 36,70%, druga 22,57%, treća 19,58%, četvrta 10,04%, i peta komponenta 4,94% od ukupne varijanse (varijabiliteta). Divlja trešnja (uzorak 10) se izdvojila od ostalih ekstrakata (**Slike 12A i 12B**) po najvećem sadržaju većine fenolnih jedinjenja. Ovo pokazuje da je divlja trešnja kao biljka generalno bogat izvor fenolnih jedinjenja koji mogu da se koriste kao hemotaksonomski markeri. Ovo zapažanje je očekivano pošto crveno-braon boja drveta divlje trešnje potiče od fenolnih jedinjenja. Pored toga, plodovi divlje trešnje predstavljaju bogat izvor

fenolnih jedinjenja i antocijana (Mratinić i sar., 2012). Na osnovu PCA grafika skorova (Slika 12A) može se zapaziti grupisanje ekstrakata hrastova lužnjaka i kitnjaka (uzorci 1-6) oko PC2. Fenolna jedinjenja koja izdvajaju ekstrakte hrasta od ostalih uzoraka su galna kiselina (1), elaginska kiselina (7) i koniferil-aldehid (37) (Slika 12B). Velike količine Pb, Zn, i različitih polifenola (oksiresveratrol (32), naringin (25), hiperozid (10), eskulin (34), kempferol-7-*O*-glikozid (12), *p*-hidroksibenzoeva kiselina (4), resveratrol (31), pterostilben (33), izoramnetin (15) i izoramnetin-3-*O*-glikozid (11)) izdvojili su ekstrakt belog duda u odnosu na ostale uzorke. Bilo je očekivano da se džanarika (uzorak 9) i divlja trešnja (uzorak 10) grupišu zajedno pošto obe pripadaju familiji Rosaceae, međutim njihovo razdvajanje verovatno potiče od različitog kvaliteta drveta, kao i činjenice da je divlja trešnja uglavnom šumska biljka dok se džanarika često sadi u voćnjacima.

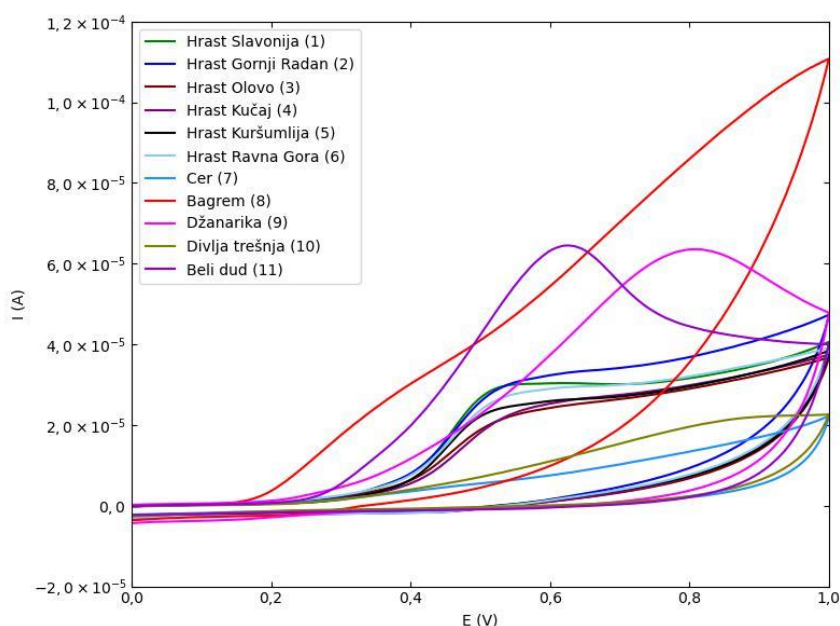


**Slika 12.** PCA grafik skorova (A) i grafik varijabli (B). Redni brojevi na grafiku 12A odgovaraju rednim brojevima uzoraka prema **Tabeli 3**, dok redni brojevi na grafiku 12B odgovaraju rednim brojevima fenolnih jedinjenja prema **Tabeli 6**.

### 4.3 DRUGI DEO - Elektrohemijska svojstva drveta

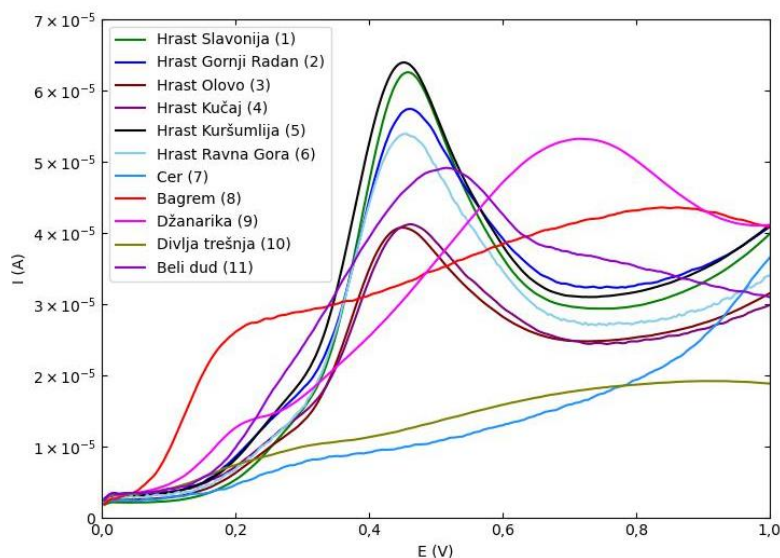
#### 4.3.1 Rezultati preliminarnih ispitivanja elektrohemijskog ponašanja etanolnih model-ekstrakata drveta

Dve elektrohemijske metode su primenjene za ispitivanje elektrohemijskog ponašanja i procenu antioksidativne aktivnosti različitih etanolnih model-ekstrakata. Odgovarajući voltamogrami su prikazani na **Slici 13** (ciklični voltamogrami) i **Slici 14** (diferencijalno pulsni voltamogrami). Kalijum-hlorid (0,1 M) upotrebljen je kao pomoćni elektrolit. Iz cikličnih voltamograma (**Slika 13**) može se zapaziti da ispitivani uzorci sadrže anodne oksidacione pikove, uglavnom jedan anodni pik, dok u suprotnom smeru nisu zapaženi katodni pikovi. Dva ireverzibilna oksidaciona pika su zapažena u ekstraktima bagrema i divlje trešnje. Uzorci hrasta pokazuju skoro isto elektrohemijsko ponašanje, sa jednim dominantnim oksidacionim pikom na oko 0,5 – 0,6 V.



**Slika 13.** Ciklični voltamogrami etanolnih ekstrakata drveta. Brojevi u zagradama pored vrste drveta odgovaraju rednom broju uzorka prema **Tabeli 3**.

U ispitivanim ekstraktima drveta uz pomoć tečne hromatografije detektovane su fenolne kiseline za koje Alañón i saradnici (2011) navode da najviše doprinose antioksidativnom potencijalu, odnosno galna, protokatehuinska, *p*-kumarinska i elaginska kiselina. Takođe, pri ispitivanju antioksidativnih svojstava ekstrakata drveta primenom visokoeffikasne tankoslojne hromatografije u okviru ove disertacije, zapaženo je da galna kiselina, ferulinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina i kofeinska kiselina značajno doprinose antioksidativnoj aktivnosti. Simić i saradnici (2007) su ispitivali elektrohemijsko ponašanje fenolnih kiselina i može se zapaziti da je slično u odnosu na ispitivane ekstrakte drveta, u smislu odsustva katodnih pikova i sa oksidacionim pikovima na sličnim potencijalima. Sa **Slike 13** zapaženo je da ekstrakt bagrema pokazuje različito ponašanje u odnosu na druge uzorke, odnosno prisustvo dva oksidaciona pika praćena višom oksidacionom strujom, što je u skladu sa HPTLC fenolnim profilima tog uzorka dobijenim u okviru ove disertacije. Takođe, sa iste slike se može zapaziti da su divlja trešnja, beli dud i džanarika sadržali dva definisana oksidaciona pika, međutim vrednost dobijene struje je bila značajno niža u odnosu na ostale uzorke.



**Slika 14.** Diferencijalno pulsni voltamogrami etanolnih ekstrakata drveća. Brojevi u zagradama pored vrste drveta odgovaraju rednom broju uzorka prema **Tabeli 3**.

U ovoj disertaciji je testirana potencijalna upotreba diferencijalno pulsne voltametrije (DPV) kroz ispitivanje elektrohemijškog ponašanja i antioksidativnog potencijala ekstrakata i upoređivanjem rezultata sa cikličnom voltametrijom, kao metodom koja je široko prihvaćena u te svrhe. Ista grupa uzoraka je ispitivana DPV metodom, u istom opsegu potencijala. Rezultati su prikazani na **Slici 14**. Samo oksidacioni pikovi su korišćeni, pošto redukcionni pikovi nisu bili prisutni u CV eksperimentima. U DPV metodi su, slično kao kod CV metode, svi uzorci posedovali oksidacione pikove. Voltamogram uzorka hrasta je sadržao jedan oksidacioni pik na sličnom potencijalu kao kod CV, dok su voltamogrami divlje trešnje, belog duda i džanarike sadržali dva dobro definisana i dobro razdvojena pika. Na osnovu dobijenih rezultata, može se uočiti da je DPV metoda takođe pouzdana i efektivna metoda za razdvajanje pikova i moguću procenu tipa polifenolnih jedinjenja.

#### 4.3.2 Rezultati poređenja elektrohemijških metoda za procenu antioksidativnog potencijala uzoraka

Elektrohemijške metode se široko upotrebljavaju za kvantifikaciju antioksidanasa (jedinjenja koja pokazuju antioksidativnu aktivnost) u različitim uzorcima. Ove metode se zasnivaju na kvantifikaciji oblasti ispod oksidacionih/redukcionih pikova. U ispitivanim uzorcima, gde su samo oksidacioni pikovi prisutni, antioksidativna aktivnost je procenjena kao površina ispod oksidacionog talasa uzorka, u opsegu od 0 V do 1 V. U uzorcima hrasta, najintenzivniji pik je detektovan na potencijalu od oko 450 mV, i oblast ispod ovog pika obeležena je kao  $Q_{450}$ . Najveća vrednost je prikazana kao 100%, dok su ostale vrednosti prikazane u odnosu na ovu vrednost. Rezultati obe metode su sumirani u **Tabeli 17**.

Na osnovu rezultata, može se utvrditi da se obe metode mogu upotrebiti za kvantitativno određivanje antioksidanasa u ispitivanim uzorcima. Jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) pokazalo se da ne postoji statistički značajna razlika između DPV i CV metoda ( $F(0,00066) < F_{crit}(4,35124)$ ). Glavne prednosti elektrohemijškog pristupa predstavlja to što su metode brze, nema potrebe za pripremom uzoraka, nije neophodno razblaživanje uzoraka i ne koriste se dodatne hemikalije. Glavna razlika u primenjenim metodama je brzina skeniranja. U serijama eksperimenata CV je nešto poželjnija metoda pošto je brža u odnosu na DPV. Na osnovu toga, ciklična voltametrija je odabrana za dalje eksperimente.

**Tabela 17.** Poređenje rezultata antioksidativnog kapaciteta dobijenih cikličnom voltametrijom (CV) i diferencijalnom pulsnom voltametrijom (DPV) etanolnih model-ekstrakata drveta

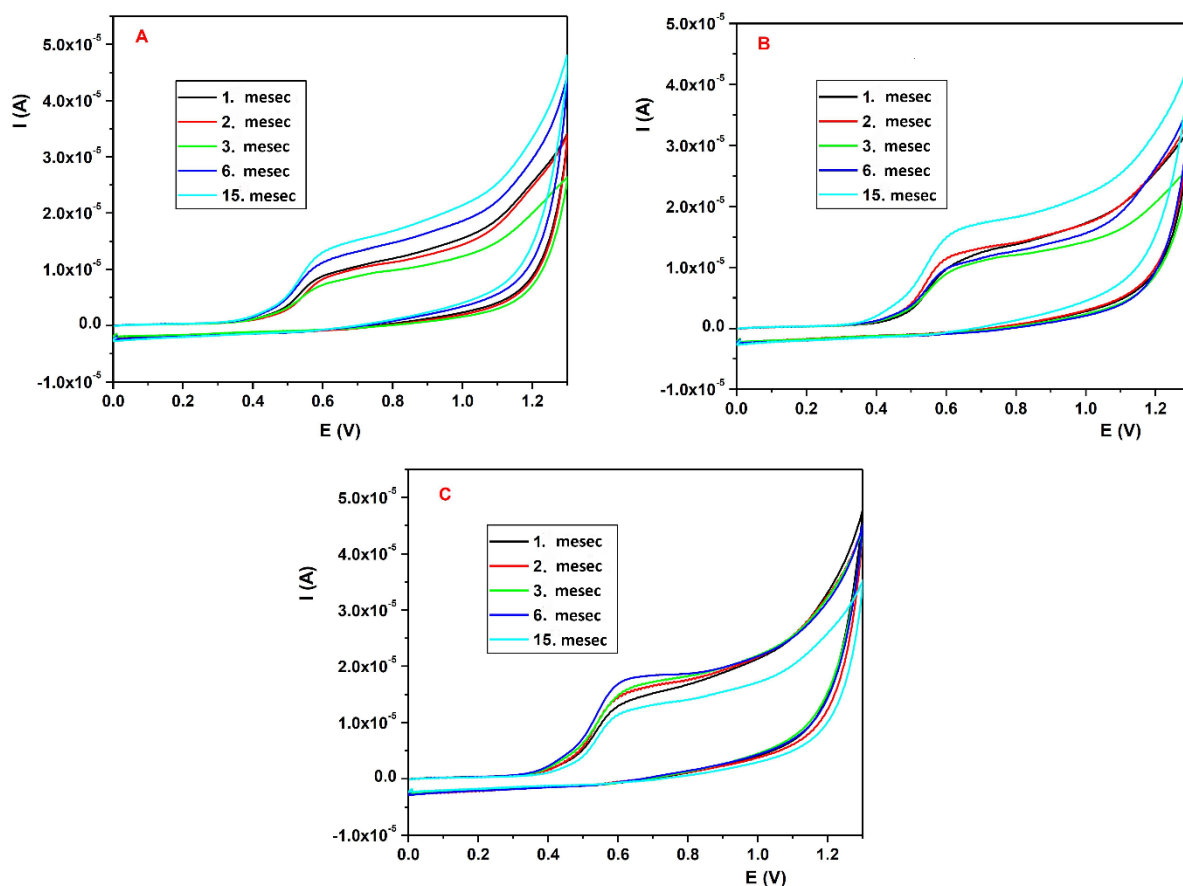
Broj uzorka	CV	DPV
1	26,60	27,52
2	25,89	26,28
3	13,95	14,13
4	19,03	20,27
5	31,04	29,65
6	31,85	31,49
7	0,04	0,06
8	91,00	92,24
9	85,99	85,78
10	19,22	21,35
11	100,00	100,00

\* Brojevi 1-11 u prvoj koloni odgovaraju rednom broju uzorka prema **Tabeli 3**

#### 4.3.3 Elektrohemijaska svojstva rakija koje su odležavale u kontaktu sa drvetom

Nakon uspešnih preliminarnih elektrohemijaskih ispitivanja ekstrakata drveta, praćen je uticaj različitih ekstrakcionih sredstava (etanola i dve domaće rakije), vrste drveta i vremena odležavanja na ekstrakte. Na osnovu dobijenih rezultata, ciklična voltometrija je odabrana za dalje eksperimente kao analitička tehnika za brzo praćenje antioksidativnog kapaciteta različitih vrsta uzoraka.

Uzorci drveta su ekstrahovani domaćim rakijama (jabukovačom i šljivovicom) i etanolom (45%), koji je korišćen kao kontrola. Za vreme trajanja eksperimenta (15 meseci) praćeno je elektrohemijasko ponašanje svih ekstrakata posle 1, 2, 3, 6 i 15 meseci ekstrakcije, kao što je opisano u **odeljku 3.4**, i snimljeni su CV voltamogrami. Reprezentativni voltamogrami dobijeni za hrast lužnjak ekstrahovan različitim rastvaračima (jabukovačom (A), šljivovicom (P) i 45% etanolom (E)) tokom 1, 2, 3, 6 i 15 meseci prikazani su na **Slici 15**, dok su rezultati uticaja vremena ekstrakcije na koncentraciju jedinjenja koja pokazuju antioksidativnu aktivnost prikazani u **Tabeli 18**.



**Slika 15.** Reprezentativni ciklični voltamogrami dobijeni nakon različitih vremena ekstrakcije za hrast lužnjak ekstrahovan: (A) jabukovačom; (B) šljivovicom; (C) 45% etanolom

**Tabela 18.** Uticaj vremena ekstrakcije uzoraka drveta na koncentraciju jedinjenja koja pokazuju antioksidativnu aktivnost u ekstraktima (A1-A11 uzorci ekstrahovani jabukovačom; P1-P11 uzorci ekstrahovani šljivovicom; E1-E11 uzorci ekstrahovani etanolom (45%))

Period → Uzorak ↓	1 mesec ( $\times 10^{-6}$ C)	2 meseca ( $\times 10^{-6}$ C)	3 meseci ( $\times 10^{-6}$ C)	6 meseci ( $\times 10^{-6}$ C)	15 meseci ( $\times 10^{-6}$ C*)
A1	1,80	1,85	1,82	1,85	1,84
A2	1,30	1,33	1,28	1,33	1,36
A3	0,97	0,97	1,10	0,93	1,07
A4	1,36	1,41	1,41	1,47	1,51
A5	1,48	1,58	1,53	1,56	1,51
A6	1,78	1,68	1,44	1,67	1,59
A7	0,05	0,04	0,06	0,06	0,06
A8	7,96	7,81	7,46	7,72	7,83
A9	5,90	5,47	5,68	5,93	5,90
A10	1,37	1,43	1,41	1,45	1,44
A11	7,52	8,22	7,87	7,65	7,95
P1	1,74	1,68	1,72	1,80	1,78
P2	1,90	1,97	1,76	1,85	1,82
P3	1,00	0,88	1,15	0,94	1,06
P4	1,33	1,43	1,45	1,37	1,39

P5	2,17	2,31	2,29	2,39	2,29
P6	2,28	2,30	2,42	2,26	2,38
P7	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
P8	6,48	6,75	6,41	6,56	6,54
P9	6,17	6,10	6,15	6,23	6,21
P10	1,36	1,22	1,34	1,30	1,31
P11	7,13	7,04	6,90	7,10	7,00
E1	1,67	1,60	1,75	1,67	1,70
E2	1,70	1,58	1,70	1,60	1,77
E3	1,27	1,24	1,23	1,29	1,24
E4	1,50	1,56	1,56	1,54	1,53
E5	2,12	2,08	2,12	2,29	2,19
E6	1,85	2,17	2,26	2,23	2,31
E7	0,08	0,08	0,07	0,08	0,08
E8	4,68	4,62	4,87	4,73	4,70
E9	6,57	6,86	6,48	6,66	6,76
E10	1,58	1,52	1,53	1,57	1,62
E11	7,40	7,38	7,34	7,58	7,54

\* Vrednosti u tabeli predstavljaju količinu naelektrisanja koja je prošla tokom oksidacije polifenola iz ekstrakata, i izražene su u kulonima (C)

Na osnovu rezultata može se zapaziti da je najveća količina fenolnih jedinjenja, koji najviše utiču na antioksidativni kapacitet uzoraka, ekstrahovana za vreme prvog meseca ekstrakcije. Sa dužim vremenom ekstrakcije, primećen je samo blagi rast, a u nekim slučajevima čak i blagi pad u koncentraciji ovih jedinjenja. Primenom jednofaktorske analize varijanse (ANOVA), dobijeno je da ne postoji statistički značajna razlika između različitih vremena ekstrakcije ( $F(0,003) < F_{crit}(2,428)$ ). Slično tome, Delia i saradnici (2017) su zapazili da je 20 dana odležavanja bilo dovoljno za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz iverja francuskog hrasta u crveno vino, što je u skladu sa rezultatima ove disertacije. Moguće objašnjenje za nepostojanje razlika u koncentraciji ukupnih fenolnih jedinjenja sa vremenom ekstrakcije je u procesu difuzije i postizanju ravnotežnog stanja. Ispitujući sadržaj pojedinačnih jedinjenja tokom 12 meseci odležavanja crvenog vina u kontaktu sa hrastovim drvetom (burad, iverje i duge), Del Alamo Sanza i saradnici (2004) zapazili su značajan porast u koncentraciji *p*-kumarinske kiseline, ferulinske kiseline, galne kiseline, protokatehuinske kiseline, kofeinske kiseline i protokatehuinskog aldehida, blagi porast u koncentraciji siringinske kiseline, sinapinske kiseline i vanilina, i jasan pad u koncentraciji gentizinske kiseline, *p*-hidroksibenzaldehida i vanilinske kiseline tokom vremena. Međutim, oni nisu ispitivali sadržaj ukupnih antioksidanasa. Moguće je da se u uzorcima ispitivanim u ovoj disertaciji sadržaj pojedinačnih polifenola menja sa vremenom ekstrakcije, ali da se ukupna koncentracija antioksidanasa vrlo malo menja. Međutim, bile bi potrebne obimne dodatne studije kako bi se ova pretpostavka potvrdila. Ove male promene koje su ustanovljene nisu statistički značajne, te mogu da se pripišu greškama softvera ili eksperimentalnim greškama, tako da svi rezultati mogu da se prikažu kao rezultati prvog meseca ekstrakcije, u kojem je efikasnost ekstrakcije najveća.

U **Tabeli 19** predstavljeno je poređenje efikasnosti ekstrakcije dobijene posle prvog meseca ekstrakcije uzoraka drveta u zavisnosti od primenjenog ekstrakcionog sredstva. Zapaženo je da jabukovača poseduje najmanju efikasnost ekstrakcije za sve vrste drveta osim za bagrem (uzorak 8), u kojem je kvantifikovana najveća količina jedinjenja sa antioksidativnim kapacitetom.

Najveći antioksidativni kapacitet kvantifikovan je u ekstraktima bagrema (uzorak 8), džanarike (uzorak 9) i belog duda (uzorak 11), čije su vrednosti mnogo veće u odnosu na ostale uzorke. To je potvrđeno za sva tri ekstrakciona sredstva. Ova zapažanja su u skladu sa sadržajem polifenola u



ekstraktima ispitivanih uzoraka drveta (**Tabela 6**). S druge strane, najmanji antioksidativni kapacitet je detektovan u ekstraktu cera, što je takođe u skladu sa zapažanjima o antioksidativnoj aktivnosti standardnim spektrofotometrijskim metodama. Ovo se takođe može zapaziti na **Slici 14** kao mali i slabo definisan pik na potencijalu od oko 0,3 V (DPV voltamogram).

**Tabela 19.** Poređenje efikasnosti ekstrakcije ekstrakata drveta posle prvog meseca eksperimenta

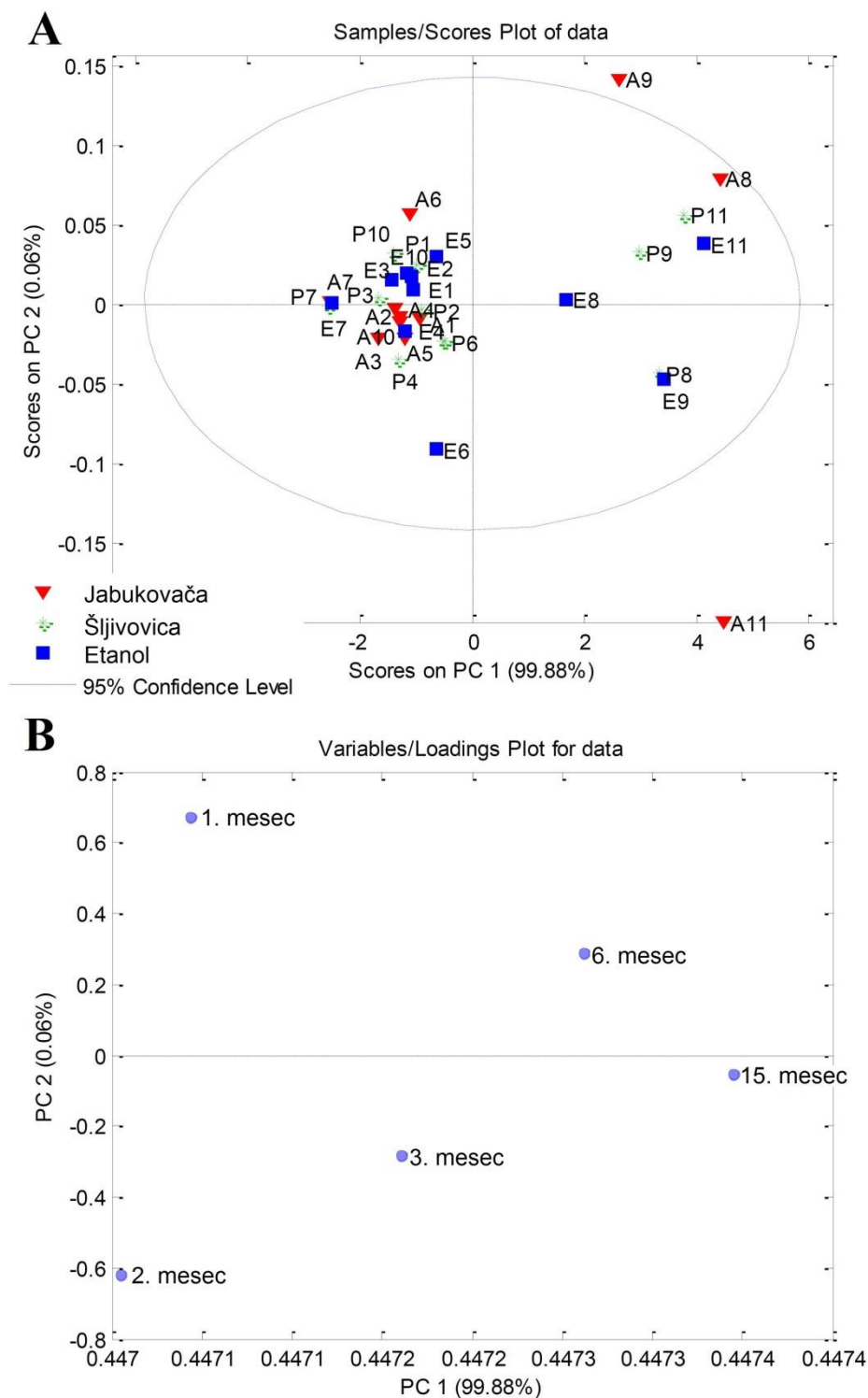
Redni broj uzorka*	45% Etanol	Šljivovica	Jabukovača
1	22,57	24,40	22,61
2	22,97	26,65	16,33
3	17,16	14,03	12,19
4	20,27	18,65	17,09
5	28,65	30,43	18,59
6	25,00	31,98	22,36
7	1,08	0,42	0,63
8	63,24	90,88	100,00
9	88,78	86,54	74,12
10	21,35	19,07	17,21
11	100,00	100,00	94,47

\* Brojevi 1-11 u prvoj koloni odgovaraju rednom broju uzorka prema **Tabeli 3**.

#### 4.3.4 Rezultati analize glavnih komponenata (PCA analiza) rezultata ciklične voltametrije

Analiza glavnih komponenata je primenjena kako bi se ustanovile razlike u elektrohemijском ponašanju ispitivanih ekstrakata na osnovu vremena ekstrakcije, ekstrakcionog sredstva i vrsta drveta.

PCA analizom rezultata dobijenih cikličnom voltametrijom (**Slika 16**) dobijeno je da dve glavne komponente opisuju 99,94% varijanse seta podataka. Prva glavna komponenta objašnjava 99,88 %, dok druga objašnjava samo 0,06 % seta podataka. Iako PCA grafik skorova (**Slika 16A**) nije pokazao dobro razdvajanje i većina ekstrakata je grupisana u jedan klaster, ekstrakti bagrema (A8, P8, E8), džanarike (A9, P9, E9) i belog duda (A11, P11, E11) su se izdvojili po PC1 osi od svih ostalih ekstrakata. Na osnovu PCA analize može se videti da ne postoji uticaj vremena ekstrakcije (1, 2, 3, 6 i 15 meseci), kao ni ekstrakcionih sredstava (jabukovača, šljivovica, 45% etanol) na koncentraciju antioksidanasa. S druge strane, pokazalo se da vrsta drveta ima uticaja na sadržaj antioksidanasa i na osnovu grafika varijabli (**Slika 16B**) može se zapaziti da su se ekstrakti bagrema (uzorak 8), džanarike (uzorak 9) i belog duda (uzorak 11) izdvojili zbog njihovog povećanog sadržaja antioksidanasa tokom svih perioda ekstrakcije.



**Slika 16.** Grafik skorova (**A**) i grafik varijabli (**B**) dobijeni PCA analizom rezultata dobijenih cikličnom voltametrijom. Oznake na grafiku **A** odgovaraju oznakama uzoraka sa **Tabele 18**. Oznake na grafiku **B** odgovaraju vremenima ekstrakcije izraženom u mesecima

## 5. ZAKLJUČAK

Ispitivanja u okviru ove doktorske disertacije bila su podeljena u dva dela. U prvom delu je urađena detaljna analiza hemijskog sastava ekstrakata drveta koji se upotrebljavaju u procesu odležavanja alkoholnih pića u Srbiji. U drugom delu rada izvršeno je praćenje hemijskog sastava ekstrakta drveta koje je bilo u kontaktu sa model-rastvorom etanola, odnosno rakijom, tokom različitih vremenskih perioda u cilju utvrđivanja uticaja vrste ekstrakcionog sredstva, dužine ekstrakcije i biljnog porekla drveta na sastav ekstrakta i rakije.

Na osnovu ispitivanja sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativnog kapaciteta može se zapaziti da svi ekstrakti drveta, osim cera, pokazuju značajnu antioksidativnu aktivnost. Beli dud i džanarika su se izdvojili od ostalih uzoraka drveta po značajno većoj antioksidativnoj aktivnosti. Suprotno tome, cer je sadržao najmanju količinu polifenola i najniži antioksidativni kapacitet, što se može uočiti i na osnovu analize sadržaja pojedinačnih fenolnih jedinjenja uz pomoć visokoeffikasne tačne hromatografije.

Ispitivanjem sadržaja pojedinačnih fenolnih jedinjenja uz pomoć visokoeffikasne tačne hromatografije, zapaženo je da su se biljne vrste drveta među sobom mnogo više razlikovale prema kvantitativnom sastavu, i da je samo nekoliko jedinjenja bilo karakteristično samo za jednu vrstu drveta. Daizdein je detektovan samo u divljoj trešnji, dok su resveratrol, pterostilben i izoramnetin-3-*O*-glikozid detektovani jedino u dudu.

Elaginska kiselina je bila najzastupljenija fenolna kiselina u svim ekstraktima drveta.

Ekstrakt divlje trešnje se izdvojio od ostalih uzoraka drveta prema tome što je bio najbogatiji flavonoidima, i jedini je sadržao velike količine flavanona i flavona. Najzastupljenija jedinjenja u ekstraktu divlje trešnje bila su flavanonol (taksifolin), zatim flavanoni (pinocembrin i naringenin), flavon (hrizin), kao i fenolna kiselina (elaginska kiselina). Drvo trešnje je bilo karakteristično po prisustvu izoflavona kao što su genistein i daidzein. Prema rezultatima ove doktorske disertacije, pored jedinjenja navedenih u naučnoj literaturi, sledeća jedinjenja takođe doprinose identifikaciji divlje trešnje: kvercetin, kempferol, galangin, viteksin, luteolin, apigenin, acacetin, genkvanin, genistein i eskuletin.

Jedino uzorci hrasta lužnjaka i kitnjaka nisu sadržali *p*-hidroksibenzojevu kiselinu.

Za identifikaciju hrasta lužnjaka i hrasta kitnjaka može se koristiti prisustvo galne i velike količine elaginske kiseline, što je u skladu sa raspoloživom naučnom literaturom. Međutim, prema rezultatima ove disertacije, u bagremu su takođe detektovana ova jedinjenja, ali je sadržaj elaginske kiseline u bagremu dosta niži u odnosu na uzorke hrasta. Najzastupljenije jedinjenje u ceru je, kao i u slučaju hrasta lužnjaka i kitnjaka, elaginska kiselina, međutim, njen sadržaj je značajno niži u odnosu na ostale uzorke.

Najzastupljenija jedinjenja u bagremu su fenolne kiseline (elaginska i *p*-hidroksibenzojeva kiselina), dok su takođe zastupljeni i galna kiselina i oksiresveratrol.

U belom dudu je detektovan najveći broj ispitivanih fenolnih jedinjenja. U ekstraktu belog duda je zapaženo prisustvo stilbena. Najzastupljenija jedinjenja u dudu su flavanonol (taksifolin), stilbeni (oksiresveratrol i resveratrol), kao i fenolne kiseline (elaginska, *p*-hidroksibenzojeva i protokatehuinska kiselina). U odnosu na ostale uzorke drveta, beli dud je sadržao najveće količine *p*-hidroksibenzojeve kiseline i oksiresveratrola, dok su resveratrol i pterostilben detektovani samo u belom dudu.

Najzastupljenija jedinjenja u džanarici su fenolne kiseline (elaginska i protokatehuinska kiselina) i flavanonol (taksifolin). Džanarika je sadržala najveću količinu protokatehuinske kiseline i neohlorogene kiseline. Takođe sadrži velike količine taksifolina, što može da doprinese identifikaciji ove biljne vrste. U naučnoj literaturi postoji vrlo malo podataka o fenolnom profilu šljive i džanarike.

Na osnovu položaja maksimuma na normiranim fluorescentnim emisionim spektrima uzoraka drveta i ekstrakata može se pretpostaviti sledeće:

Lignin drveta belog duda sadrži veću količinu ferulinske kiseline i druga fenolna jedinjenja koja emituju na manjim talasnim dužinama, u odnosu na najčešće zastupljene ligninske monomere. Divlja trešnja sadrži slične fluorofore kao hrast i bagrem, odnosno lignin i flavonoide, pošto se njena dva maksimuma poklapaju sa maksimumom uzoraka hrasta i maksimumom od bagrema. Džanarika sadrži slične fluorofore kao hrast, odnosno lignin, ali i manju količinu flavonoida.

Oblici fluorescentnih spektara za ekstrakte drveta su mnogo jednostavniji, sa mnogo manjim razlikama u oblicima spektara i položajima njihovih maksimuma nego za uzorke drveta, zato što ekstrakti, za razliku od drveta, ne sadrže lignin i poseduju manje fluorofora. Ekstrakti belog duda i bagrema su se izdvojili od ostalih ekstrakata drveta prema položajima maksimuma njihovih fluorescentnih spektara. Maksimum za ekstrakt duda je jedini pomenen ka manjim talasnim dužinama, najverovatnije zbog prisustva stilbena, dok je maksimum za ekstrakt bagrema jedini pomenen ka većim talasnim dužinama, najverovatnije zbog prisustva flavanona ili flavonola.

Ispitivanjem antimikrobne aktivnosti ekstrakata drveta, utvrđeno je da su ekstrakti drveta bili najaktivniji na MRSA, *S. aureus* i *S. pyogenes*. Najniže vrednosti MIC i MBC detektovane su za ekstrakt duda na MRSA. Pored duda, ekstrakti hrasta kitnjaka koji nije podvrgnut procesu prirodnog sušenja (uzorak 5), cera (uzorak 7) i bagrema (uzorak 8) su se izdvojili prema visokoj aktivnosti na MRSA, dok su se ekstrakti cera i svih hrastova kitnjaka izdvojili prema visokoj aktivnosti na *S. aureus*. Najveće zone inhibicije rasta *S. mutans* i *S. aureus* uočene su za ekstrakt divlje trešnje. Ekstrakti džanarike, divlje trešnje i duda značajno su inhibirale rast *L. monocytogenes*. Ekstrakt hrasta kitnjaka koji nije podvrgnut procesu prirodnog sušenja (uzorak 5) imao je nižu MIC vrednost prema navedenom mikroorganizmu u odnosu na druge ekstrakte hrasta lužnjaka i kitnjaka. *E. coli* je bila manje osetljiva na testirane ekstrakte. *C. albicans* je pokazala osetljivost samo na ekstrakt divlje trešnje, dok je na ostale ekstrakte pokazala slabu osetljivost.

Prema rezultatima određivanja antimikrobne aktivnosti, ekstrakt divlje trešnje se izdvojio u odnosu na ostale ekstrakte po jakoj aktivnosti prema svim ispitivanim patogenim organizmima.

Ispitivanjem sadržaja mikroelemenata i makroelemenata u uzorcima drveta, zapaženo je da se ekstrakt cera izdvojio u odnosu na ostale uzorke prema najvećim količinama mnogih elemenata, odnosno Mn, Zn, Co, Ni, Ba, Li i Sr.

Poređenjem elementalnog sastava uzoraka hrasta lužnjaka i kitnjaka, hrast kitnjak iz Ravne Gore (uzorak 6) se izdvojio po najvećoj količini većine elemenata, dok je ekstrakt hrasta kitnjaka iz Kuršumlije (uzorak 5), jedini uzorak među njima koji nije podvrgnut procesu prirodnog sušenja, sadržao najmanje količine većine elemenata. Koncentracije teških metala u ekstraktima drveta bile su mnogo niže u odnosu na maksimalne dozvoljene vrednosti u voćnim rakijama.

Koncentracije elemenata su uglavnom bile u skladu sa vrednostima koje su određene direktivom koju je propisala Svetska zdravstvena organizacija (SZO) za pijaću vodu i Pravilnikom o higijenskoj ispravnosti vode za piće. Jedino su postojala odstupanja u sadržaju Mn i Ni za neke uzorke. Konkretno, sadržaj Mn i Ni u ekstraktu cera je značajno prešao propisane vrednosti, dok je sadržaj Ni u ekstraktima hrasta kitnjaka iz Ravne Gore (uzorak 6), džanarike i belog duda malo prelazio vrednost koju je SZO propisala kao maksimalno dozvoljenu za pijaću vodu, i vrednost

propisanu u vodi za piće za vreme redovnih prilika prema Pravilniku o higijenskoj ispravnosti vode za piće. S druge strane, prema Pravilniku o higijenskoj ispravnosti vode za piće, sadržaj Ni u uzorcima hrasta kitnjaka iz Ravne Gore, džanarike i belog duda nije prelazio maksimalno dopuštenu vrednost propisanu u vodi za piće za vreme vanrednog stanja.

Računanjem procene rizika, dobijeno je da je HQ vrednost za Mn u ekstraktu cera najveća. Iako je vrednost za Mn u ekstraktu cera veća u odnosu na dijetalni referentni unos (DRI) preporučen za dečake i devojčice starosti od 14 do 18 godina, potencijalni negativni efekti Mn iz cera na ljudsko zdravlje su minimalni zato što bi bio neophodan unos jako velikih količina ovog ekstrakta (više od 1L ekstrakta po danu), kako bi se ispoljili znaci toksičnosti. Najveća vrednost za HI je takođe izračunata za ekstrakt cera, dok je najmanja vrednost za HI izračunata za ekstrakt bagrema. Nekancerogeni rizik (HI) je za sve ispitivane ekstrakte bio manji od 1, na osnovu čega je zaključeno da su svi ekstrakti bezbedni.

U drugom delu doktorske disertacije, praćenjem elektrohemijskog ponašanja rakija, odnosno model-rastvora etanola, koje su eksperimentalno odležavale u kontaktu sa drvetom i uticaja vremena ekstrakcije, ekstrakcionog sredstva i vrsta drveta, može se zaključiti da ne postoji uticaj različitih vremena ekstrakcije, kao ni različitih ekstrakcionih sredstava (jabukovača, šljivovica, 45% etanol) na koncentraciju antioksidanasa. S druge strane, pokazalo se da vrsta drveta ima uticaja na sadržaj antioksidanasa i da su se ekstrakti bagrema, džanarike i belog duda izdvojili zbog povećanog sadržaja antioksidanasa tokom svih perioda ekstrakcije.

Na osnovu svih prikazanih rezultata može se zapaziti sledeće: ekstrakti su generalno bogati fenolnim jedinjenjima i imaju visoku antioksidativnu aktivnost. Cer je jedini imao značajno niži antioksidativni kapacitet i sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja, ali je imao veći sadržaj potencijalno toksičnih jedinjenja. Divlja trešnja je imala visok sadržaj flavonoida, dok je beli dud bio karakterističan po prisustvu stilbena. Takođe, ove dve vrste drveta su se izdvojile prema značajnoj antimikrobnoj aktivnosti, zahvaljujući kojoj imaju potencijal da se upotrebe kao konzervansi za zaštitu hrane sa kratkim rokom trajanja.

Uz pomoć spektrofluorimetrije, beli dud i bagrem su se razdvojili prema tome što su pomereni prema manjim, odnosno većim talasnim dužinama. Uz pomoć elektrohemijskih metoda, ekstrakti bagrema, džanarike i belog duda izdvojili su se prema većem sadržaju antioksidanasa u odnosu na druge uzorke.

Na kraju, može se zaključiti da su spektrofluorimetrija, ciklična voltometrija i diferencijalna pulsna voltometrija, metode koje do sad nisu primenjivane na uzorcima drveta prema raspoloživoj literaturi, pogodne za analizu ekstrakata drveta kao jednostavne, brze i pristupačne tehnike koje ne zahtevaju prethodnu pripremu uzoraka.

## 6. LITERATURA

1. Adams, R.P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, Allured Publishing Corporation.
2. Aelenei, P., Luca, S. V., Horhoge, C. E., Rimbu, C. M., Dimitriu, G., Macovei, I., Silion, M., Aprotosoie, A. C., Miron, A. (2019). *Morus alba* leaf extract: Metabolite profiling and interactions with antibiotics against *Staphylococcus* spp. including MRSA. *Phytochemistry Letters*, 31, 217–224.
3. Alañón, M. E., Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., Hermosín-Gutiérrez, I., Gordon, M. H., Pérez-Coello, M. S. (2011). Antioxidant capacity and phenolic composition of different woods used in cooperage. *Food Chemistry*, 129, 1584–1590. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.013>.
4. Alañón, M. E., Díaz-Maroto, M. C., Pérez-Coello, M. S. (2012). Analysis of volatile composition of toasted and non-toasted commercial chips by GC-MS after an accelerated solvent extraction method. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 816–826.
5. Alañón, M. E., García-Ruíz, A., Díaz-Maroto, M. C., Pérez-Coello, M. S., Moreno-Arribas, M. V. (2015). Antimicrobial and antioxidant activity of pressurized liquid extracts from oenological woods. *Food Control*, 50, 581–588.
6. Aliaño-González, M. J., Gabaston J., Ortiz-Somovilla, V., Cantos-Villar, E. (2022). Wood Waste from Fruit Trees: Biomolecules and Their Applications in Agri-Food Industry. *Biomolecules*, 12, 238. <https://doi.org/10.3390/biom12020238>.
7. Alonso, Á. M., Guillén, D. A., Barroso, C. G. (2003). Development of an electrochemical method for the determination of antioxidant activity. Application to grape-derived products. *European Food Research and Technology*, 216, 445–448. <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0671-x>.
8. Andrenšek, S., Simonovska, B., Vovk, I., Fyhrquist, P., Vuorela, H., Vuorela, P. (2004). Antimicrobial and antioxidative enrichment of oak (*Quercus robur*) bark by rotation planar extraction using ExtraChrom R. *International Journal of Food Microbiology*, 92, 181–187.
9. Arora, D. S., Mahajan, H. (2018). In vitro evaluation and statistical optimization of antimicrobial activity of *Prunus cerasoides* stem bark. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184, 821–837.
10. Asmi, K. S., Lakshmi, T. S., Balusamy, R., Parameswari, R. (2017). Therapeutic aspects of taxifolin—An update. *Journal of Advanced Pharmacy Education and Research*, 187–189.
11. Bajraktari, A., Nunes, L., Knapic, S., Pimenta, R., Pinto, T., Duarte, S., Miranda, I., Pereira, H. (2018). Chemical characterization, hardness and termite resistance of *Quercus cerris* heartwood from Kosovo. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 20 (3), 305–314.
12. Bandeira Reidel, R. V., Cioni, P. L., Pistelli, L. (2017). Volatile emission of different plant parts and fruit development from Italian cherry plums (*Prunus cerasifera* and *P. cerasifera* ‘Pissardii’). *Biochemical Systematics and Ecology*, 75, 10–17.
13. Berahou, A., Auhmani, A., Fdil, N., Benharref, A., Jana, M., Gadhi, C. A. (2007). Antibacterial activity of *Quercus ilex* bark’s extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 426–429.
14. Bi, X., Li, Z., Sun, G., Liu, J., Han, Z. (2015). In vitro bioaccessibility of lead in surface dust and implications for human exposure: A comparative study between industrial area and urban district. *Journal of Hazardous Materials*, 297, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.04.074>.

15. Bii, C., Korir, K. R., Rugutt, J., Mutai, C. (2010). The potential use of *Prunus africana* for the control, treatment and management of common fungal and bacterial infections. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 995–998.
16. Bonić, M., Tešević, V., Nikićević, N., Cvejić, J., Milosavljević, S., Vajs, V., Mandić, B., Urošević, I., Veličković, M., Jovanić, S. (2013). The contents of heavy metals in Serbian old plum brandies. *Journal of Serbian Chemical Society*, 78 (7), 933–945. <http://dx.doi.org/10.2298/JSC121106016B>.
17. Brantner, A., Grein, E. (1994). Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 44, 35–40.
18. Burger, A., Lichtscheidl, I. (2019). Strontium in the environment: Review about reactions of plants towards stable and radioactive strontium isotopes. *Science of the Total Environment*, 653, 1485–1512. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.312>.
19. Cabrita, M. J. B., Garcia, R., Martins, N., Gomes da Silva, M. D. R., Costa Freitas, A. M. (2012). In: Gas Chromatography in the Analysis of Compounds Released from Wood into Wine. *Advanced Gas Chromatography – Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*. Ali Mohd, M. (ed.), IntechOpen, London, United Kingdom, 185–208.
20. Câmara, J. S., Alves, M. A., Marques, J. C. (2006). Changes in volatile composition of Madeira wines during their oxidative ageing. *Analytica Chimica Acta*, 563, 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.031>.
21. Canas, S., Casanova, V., Belchior, A. P. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of Portuguese wine aged brandies. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 626–633.
22. Canas, S. (2017). Phenolic composition and related properties of aged wine spirits: influence of barrel characteristics. A Review. *Beverages*, 3, 55–76. <https://doi.org/10.3390/beverages3040055>.
23. Cerezo, A. B., Tesfaye, W., Torija, M. J., Mateo, E., García-Parrilla, C., Troncoso, A. M. (2008). The phenolic composition of red wine vinegar produced in barrels made from different woods. *Food Chemistry*, 109, 606–615. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.013>.
24. Cerezo, A. B., Tesfaye, W., Soria-Díaz, M. E., Torija, M. J., Mateo, E., García-Parrilla, C. M., Troncoso, A. M. (2010). Effect of wood on the phenolic profile and sensory properties of wine vinegars during ageing. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.08.008>.
25. Cernîsev, S. (2017). Analysis of lignin-derived phenolic compounds and their transformations in aged wine distillates. *Food Control*, 73, 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.08.015>.
26. Chan E. W.-C., Lye P.-Y., Wong S.-K. (2016). Phytochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 14 (1), 0017–0030. doi: 10.3724/SP.J.1009.2016.00017.
27. Chen, W., Yeo, S. C. M., Elhennawy, M. G. A. A., Lin, H.-S. (2016). Oxyresveratrol: a bioavailable dietary polyphenol. *Journal of Functional Foods*, 22, 122–131.
28. Chen, Z., Du, X., Yang, Y., Cui, X., Zhang, Z., Li, Y. (2018). Comparative study of chemical composition and active components against  $\alpha$ -glucosidase of various medicinal parts of *Morus alba* L. *Biomedical Chromatography*, 32, e4328. <https://doi.org/10.1002/bmc.4328>.
29. Chinnici, F., Natali, N., Bellachioma, A., Versari, A., Riponi, C. (2015). Changes in phenolic composition of red wines aged in cherry wood. *LWT – Food Science and Technology*, 60, 977–984. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.029>.

30. Choi, S. W., Jang, Y. J., Lee, Y. J., Leem, H. H., Kim, E. O. (2013). Analysis of functional constituents in mulberry (*Morus alba* L.) twigs by different cultivars, producing areas, and heat processings. *Preventive Nutrition and Food Science*, 18 (4), 256–262.
31. Ciésła, Ł., Kryszén, J., Stochmal, A., Oleszek, W., Waksmundzka-Hajnos, M. (2012). Approach to develop a standardized TLC- DPPH<sup>\*</sup> test for assessing free radical scavenging properties of selected phenolic compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 70, 126–135.
32. Coldea, T. E., Socaciu, C., Mudura, E., Socaci, S. A., Ranga, F., Pop, C. R., Vriesekoop, F., Pasqualone, A. (2020). Volatile and phenolic profiles of traditional Romanian apple brandy after rapid ageing with different wood chips. *Food Chemistry*, 320, 126643. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126643>.
33. Combs, G. F., Gray, W. P. (1998). Chemopreventive agents: Selenium. *Pharmacology & Therapeutics*, 79 (3), 179–192. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(98\)00014-x](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(98)00014-x).
34. Cowan, M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564–582.
35. Cushnie, T. P., Lamb, A. J. (2005). Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *Journal of Ethnopharmacology*, 101, 243–248.
36. Cushnie, T. P. T., Lamb, A. J. (2010). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38, 99–107.
37. Čuvarđić, M. (2003). Selenium in soil. *Proceedings for Natural Sciences*, Matica Srpska, Novi Sad, 104, 23–37.
38. Ćirić, M. (1991). Pedologija. (3<sup>rd</sup> ed.). Svjetlost, Sarajevo.
39. Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 174–181.
40. Del Alamo Sanza, M., Nevares Domínguez, I., Cárcel Cárcel, L. M., Navas Gracia, L. (2004). Analysis for low molecular weight phenolic compounds in a red wine aged in oak chips. *Analytica Chimica Acta*, 513, 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.11.041>.
41. de Lourdes Reis Giada, M. (2013). Food phenolic compounds: Main classes, sources and their antioxidant power. In: Oxidative stress and chronic degenerative diseases - A role for antioxidants. Morales-González, J.A. (ed.). IntechOpen, London, United Kingdom. <https://www.intechopen.com/chapters/38573>
42. Dehelean, A., Magdas, D. A. (2013). Analysis of mineral and heavy metal content of some commercial fruit juices by inductively coupled plasma mass spectrometry. *The Scientific World Journal*, 215423. <https://doi.org/10.1155/2013/215423>.
43. Delia, L., Jordão, A. M., Ricardo-da-Silva, J. M. (2017). Influence of different wood chips species (oak, acacia and cherry) used in a short period of aging on the quality of 'encruzado' white wines. *Mitt Eilungen Klosterneuburg*, 67, 84–96.
44. Del Río, J.C., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Elder, T., Kim, H., Ralph, J. (2020). Lignin Monomers from beyond the Canonical Monolignol Biosynthetic Pathway: Another Brick in the Wall, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8, 4997–5012.
45. de Menezes Peixoto, C. R., Fraga, S., da Rosa Justim, J., Silva Gomes, M., Gonçalves Carvalho, D., Jarenkow, J. A., Fernandes de Moura, N. (2017). Voltammetric determination of total antioxidant capacity of *Bunchosia glandulifera* tree extracts. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 799, 519–524.
46. de Rigo, D., Enescu, C. M., Houston Durrant, T., Caudullo, G. (2016). *Quercus cerris* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: *European Atlas of Forest Tree Species*. San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (eds.), Publications Office of the European Union, Luxembourg, 148–149.



47. De Rosso, M., Cancian, D., Panighel, A., Dalla Vedova, A., Flamini, R. (2009a). Chemical compounds released from five different woods used to make barrels for aging wines and spirits: volatile compounds and polyphenols. *Wood Science and Technology*, 43, 375–385.
48. De Rosso, M., Panighel, A., Dalla Vedova, A., Stella, L., Flamini, R. (2009b). Changes in chemical composition of a red wine aged in acacia, cherry, chestnut, mulberry, and oak wood barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1915–1920.
49. Díaz-Maroto, M. C., Guchu, E., Castro-Vázquez, L., de Torres, C., Pérez-Coello, M. S. (2008). Aroma-active compounds of American, French, Hungarian and Russian oak woods, studied by GC–MS and GC–O. *Flavour and Fragrance Journal*, 23, 93–98.
50. Dimkić, I., Ristivojević, P., Janakiev, T., Berić, T., Trifković, J., Milojković-Opsenica, D., Stanković, S. (2016). Phenolic profiles and antimicrobial activity of various plant resins as potential botanical sources of Serbian propolis. *Industrial Crops and Products*, 94, 856–871.
51. Doménech-Carbó, A., Doménech-Carbó, M. T., Ferragud-Adam, X., Ortiz-Miranda, A. S., Montoya, N., Pasíes-Oviedo, T., Peiró-Ronda, M. A., Vives-Ferrándiz, J., Marco, Y. C. (2017). Identification of vegetal species in wooden objects using in situ microextraction-assisted voltammetry of microparticles. *Analytical Methods*, 9, 2041–2048.
52. dos Santos, F. F. R. C. (2017). Use of alternative wood chips from new botanical species. Their impact on phenolic composition and sensory properties of a rose wine from Touriga Nacional grape variety. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Viticultura e Enologia (Disertacija za sticanje magistarske studije u oblasti Vinogradarstvo i enologija). Lisabon.
53. Doussot, F., De Jeso, B., Quideau, S., Pardon, P. (2002). Extractives content in cooperage oak wood during natural seasoning and toasting: Influence of tree species, geographic location, and single-tree effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5955–5961.
54. Drabent, R., Pliszka, B., Olszewska, T. (1999). Fluorescence properties of plant anthocyanin pigments. I. Fluorescence of anthocyanins in *Brassica oleracea* L. extracts. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 50, 53–58.
55. Duchaufour, R. (1982). *Pedology. Pedogenesis and classification*. (1<sup>st</sup> ed.). George Allen & Unwin Ltd., London, UK.
56. Ducouso, A., Bordács, S. (2003). EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for pedunculate and sessile oaks (*Quercus robur/Quercus petraea*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
57. Đorđević, N. O., Pejin, B., Novaković, M. M., Stanković, D. M., Mutić, J. J., Pajović, S. B., Tešević, V. V. (2017). Some chemical characteristics and antioxidant capacity of novel Merlot wine clones developed in Montenegro. *Scientia Horticulturae*, 225, 505–511. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.07.045>.
58. Đorđević, N. O., Pejin, B., Novaković, M. M., Stanković, D. M., Mutić, J. J., Pajović, S. B., Tešević, V. V. (2018). Multielement analysis and antioxidant capacity of Merlot wine clones developed in Montenegro. *Natural Product Research*, 32 (3), 247–251. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1347171>.
59. Eaton, E., Caudullo, G., Oliveira, S., de Rigo, D. (2016). *Quercus robur* and *Quercus petraea* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: *European Atlas of Forest Tree Species*. San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (eds.). Publications Office of the European Union, Luxembourg, 160-163.
60. European Food Safety Authority (EFSA) (2017). Dietary reference values for nutrients: Summary report. *EFSA supporting publications*, 14 (12), e15121. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.e15121>.

61. Elansary, H. O., Szopa, A., Kubica, P., Ekiert, H., Mattar, M. A., Al-Yafrasi, M. A., El-Ansary, D. O., El-Abedin, T. K. Z., Yessoufou, K. (2019). Polyphenol Profile and Pharmaceutical Potential of *Quercus* spp. Bark Extracts. *Plants*, 8, 486.
62. Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., Banat, I. M. (2016). Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology Letters*, 38, 1015–1019.
63. Fattouch, S., Caboni, P., Coroneo, V., Tuberoso, C. I. G., Angioni, A., Dessi, S., Marzouki, N., Cabras, P. (2007). Antimicrobial Activity of Tunisian Quince (*Cydonia oblonga* Miller) Pulp and Peel Polyphenolic Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 963–969.
64. Fengel, D., Wegener, G. (1983). Wood chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
65. Fernández de Simón, B., Esteruelas, E., Muñoz, A. M., Cadahía, E., Sanz, M. (2009). Volatile compounds in acacia, chestnut, cherry, ash, and oak woods, with a view to their use in cooperage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3217–3227. <https://doi.org/10.1021/jf803463h>.
66. Fernández de Simón, B., Cadahía, E., del Álamo, M., Nevares, I. (2010). Effect of size, seasoning and toasting in the volatile compounds in toasted oak wood and in a red wine treated with them. *Analytica Chimica Acta*, 660, 211–220.
67. Fernanedz de Simón, B., Sanz, M., Cadahía, E., Martínez, J., Esteruelas, E., Muñoz, A. M. (2014a). Polyphenolic compounds as chemical markers of wine ageing in contact with cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood. *Food Chemistry*, 143, 66–76.
68. Fernández de Simón B., Sanz M., Cadahía E., Esteruelas E., Muñoz A. M. (2014b) – Nontargeted GC-MS approach for volatile profile of toasting in cherry, chestnut, false acacia, and ash wood – *Journal of Mass Spectrometry*, 49, 353–370. <https://doi.org/10.1002/jms.3347>.
69. Flamini, R., Dalla Vedova, A., Cancian, D., Panighel, A., De Rosso, M. (2007). GC/MS positive ion chemical ionisation and MS/MS study of volatile benzene compounds in five different woods used in barrel making. *Journal of Mass Spectrometry*, 42, 641–646.
70. Flamini, R., Traldi, P. (2010). Mass spectrometry in grape and wine chemistry. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc.
71. Gadrat, M., Lavergne, J., Emo, C., Teissedre, P.-L., Chira, K. (2021). Validation of a mass spectrometry method to identify and quantify ellagitannins in oak wood and cognac during aging in oak barrels. *Food Chemistry*, 342, 128223.
72. Gašić, U., Natić, M., Mišić, D., Lušić, D., Milojković-Opsenica, D., Tešić, Ž., Lušić, D. (2015). Chemical markers for the authentication of unifloral *Salvia officinalis* L. honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 44, 128–138.
73. Gay, M., Apetrei, C., Nevares, I., del Alamo, M., Zurro, J., Prieto, N., De Saja, J. A., Rodríguez-Méndez, M. L. (2010). Application of an electronic tongue to study the effect of the use of pieces of wood and micro-oxygenation in the aging of red wine. *Electrochimica Acta*, 55 (22), 6782–6788. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.05.090>.
74. Goldhaber, S. B. (2003). Trace element risk assessment: Essentiality vs. toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 38 (2), 232–242. [https://doi.org/10.1016/S0273-2300\(02\)00020-X](https://doi.org/10.1016/S0273-2300(02)00020-X).
75. Górniak, I., Bartoszewski, R., Króliczewski, J. (2019). Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews*, 18, 241–272.
76. Gortzi, O., Metaxa, X., Mantanis, G., Lalas, S. (2013). Effect of artificial ageing using different wood chips on the antioxidant activity, resveratrol and catechin concentration, sensory properties and colour of two Greek red wines. *Food Chemistry*, 141, 2887–2895.

77. Guiberteau-Cabanillas, A., Godoy-Cancho, B., Bernalte, E., Tena-Villares, M., Guiberteau Cabanillas, C., Martínez-Cãnas, M. A. (2015). Electroanalytical Behavior of Gallic and Ellagic Acid Using Graphene Modified Screen-Printed Electrodes. Method for the Determination of Total Low Oxidation Potential Phenolic Compounds Content in Cork Boiling Waters. *Electroanalysis*, 27, 177–184. <https://doi.org/10.1002/elan.201400418>.
78. Hague, T., Petroczi, A., Andrews, P. L., Barker, J., Naughton, D. P. (2008). Determination of metal ion content of beverages and estimation of target hazard quotients: A comparative study. *Chemistry Central Journal*, 2, 13. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-2-13>.
79. Hartmann, M., Berditsch, M., Hawecker, J., Ardakani, M. F., Gerthsen, D., Ulrich, A. S. (2010). Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 3132–3142.
80. He, H., Bleby, T. M., Veneklaas, E. J., Lambers, H., Kuo, J. (2012). Precipitation of calcium, magnesium, strontium and barium in tissues of four Acacia species (Leguminosae: Mimosoideae). *PLoS One*, 7 (7), Article e41563. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041563>.
81. Hobby, G. H., Quave, C. L., Nelson, K., Compadre, C. M., Beenken, K. E., Smeltzer, M. S. (2012). *Quercus cerris* extracts limit *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Journal of Ethnopharmacology*, 144, 812–815.
82. Hu, H., Tang, C., Rengel, Z. (2005). Influence of phenolic acids on phosphorus mobilisation in acidic and calcareous soils. *Plant and Soil*, 268, 173-180. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-0280-x>.
83. IAWA list of microscopic features for hardwood identification (1989), edited by E. A. Wheeler, P. Baas and P.E. Gasson, IAWA Bulletin n.s., Vol. 10 (3).
84. Iiyama, K., Lam, T. B. T., Stone, B. A. (1994). Covalent Cross-Links in the Cell Wall. *Plant Physiology*, 104, 315-320.
85. Institute of Medicine (2001). Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington, DC: The National Academies Press, US. <https://doi.org/10.17226/10026>.
86. Ivanova-Petropulos, V., Balabanova, B., Bogeva, E., Frentiu, T., Ponta, M., Senila, M., Gulaboski, R., Irimie, F. D. (2017). Rapid determination of trace elements in Macedonian grape brandies for their characterization and safety evaluation. *Food Analytical Methods*, 10, 459–468. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0604-5>.
87. Ivanovska, A., Veljović, S., Dojčinović, B., Tadić, N., Mihajlovski, K., Natić, M., Kostić, M. (2021). A Strategy to Revalue a Wood Waste for Simultaneous Cadmium Removal and Wastewater Disinfection. *Adsorption Science & Technology*, 2021, Article ID 3552300, 14 pages. <https://doi.org/10.1155/2021/3552300>.
88. Izquierdo, M. E. F., Granados, J. Q., Mir, V. M., Martinez, M. C. L. (2000). Comparison of methods for determining coumarins in distilled beverages. *Food Chemistry*, 70, 251–258.
89. Jordão, A. M., Lozano, V., Correia, A. C., Ortega-Heras, M., González-San José, M. L. (2016). Comparative analysis of volatile and phenolic composition of alternative wood chips from cherry, acacia and oak for potential use in enology. In: Proceedings of the 39th World Congress of Vine and Wine. BIOWeb of Conferences, Bento Gonçalves, Brazil, 24–28 October 2016, 7, p. 02012. DOI: 10.1051/bioconf/20160702012.
90. Joung, D.-K., Mun, S.-H., Choi, S.-H., Kang, O.-H., Kim, S.-B., Lee, Y.-S., Zhou, T., Kong, R., Choi, J.-G., Shin, D.-W., Kim, Y.-C., Lee, D.-S., Kwon, D.-Y. (2016). Antibacterial activity of oxyresveratrol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its mechanism. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12, 1579–1584.

91. Kabata-Pendias, A., Pendias, H. (2001). Trace elements in soils and plants. (3rd ed.). CRC press LLC.
92. Khouzami, L., Mroueh, M., Daher, C. F. (2009). The role of methanolic extract of *Quercus infectoria* bark in lipemia, glycemia, gastric ulcer and bacterial growth. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2, 224–230.
93. Kiaei, M., Tajik, M., Vaysi, R. (2014). Chemical and biometrical properties of plum wood and its application in pulp and paper production. *Maderas. Ciencia y tecnología* 16 (3), 313-322. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2014005000024>.
94. Kilmartin, P. A., Zou, H., Waterhouse, A. L. (2001). A Cyclic Voltammetry Method Suitable for Characterizing Antioxidant Properties of Wine and Wine Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1957–1965. <https://doi.org/10.1021/jf001044u>.
95. Klačnja, B., Galić, Z., Orlović, S., Pap, P. (2006). Neke osobine drveta hrasta lužnjaka u šumama Ravnog Srema. *Topola* No 177/178, 80-87.
96. Koller, M., Saleh, H. M. (2018). Introductory Chapter: An Introduction to Trace Elements. In: Saleh, H. E. M., El-Adham, E. (eds.), Trace Elements - Human Health and Environment. IntechOpen, London, United Kingdom. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75010>. Dostupno na: <https://www.intechopen.com/chapters/59819>.
97. Kovač, V. M., Ružić, N. E., Puškaš, V. S. (2000). Fizičko-hemijske osobine hrastovog drveta i njegov uticaj na hemijski sastav i senzorna svojstva vina. *APTEFF*, 31, 1-748, 53-69.
98. Kuete, V., Fozing, D. C., Kapche, W. F. G. D., Mbaveng, A. T., Kuate, J. R., Ngadjui, B. T., Abegaz, B. M. (2009). Antimicrobial activity of the methanolic extract and compounds from *Morus mesozygia* stem bark. *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 551–555.
99. Lam, T. B. T., Iiyama, K., Stone, B. A. (1992). Cinnamic acid bridges between cell wall polymers in wheat and *Phalaris* internodes. *Phytochemistry*, 31, 1179–1183.
100. Lamounier, K. C., Cunha, L. C. S., de Moraes, S. A. L., de Aquino, F. J. T., Chang, R., do Nascimento, E. A., de Souza, M. G. M., Martins, C. H. G., Cunha, W. R. (2012). Chemical analysis and study of phenolics, antioxidant activity, and antibacterial effect of the wood and bark of *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 451039. <https://doi.org/10.1155/2012/451039>.
101. Lang, M., Stober, F., Lichtenthaler, H. K. (1991). Fluorescence emission spectra of plant leaves and plant constituents. *Radiation and Environmental Biophysics*. 30, 333–347.
102. Latorraca, J. V. F., Dünisch, O., Koch, G. (2011). Chemical composition and natural durability of juvenile and mature heartwood of *Robinia pseudoacacia* L. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 83, 1059–1068.
103. Lavisci, P., Scalbert, A. (1991). Quality of Turkey Oak (*Quercus cerris* L.) Wood I. Soluble and Insoluble Proanthocyanidins. *Holzforschung*, 45, 291-296.
104. Le Floch, A., Jourdes, M., Teissedre, P. L. (2015). Polysaccharides and lignin from oak wood used in cooperage: composition, interest, assays: a review. *Carbohydrate Research*, 417, 94–102.
105. Ličina, V., Fotirić Akšić, M., Tomić, Z., Trajković, I., Antić Mladenović, S., Marjanović, M., Rinklebe, J. (2017). Bioassessment of heavy metals in the surface soil layer of an opencast mine aimed for its rehabilitation. *Journal of Environmental Management*, 186, 240–252. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.06.050>.
106. Madrera, R. R., Valles, B. S., Garcia, Y. D., Arguelles, P. V., Lobo, A. P. (2010). Alternative woods for aging distillates - an insight into their phenolic profiles and antioxidant activities. *Food Science and Biotechnology*, 19 (4), 1129–1134.

107. Magarelli, G., da Silva, J. G., de Sousa Filho, I. A., Dourado Lopes, I. S., Souza De, J. R., Hoffmann, L. V., Pires de Castro, C. S. (2013). Development and validation of a voltammetric method for determination of total phenolic acids in cotton cultivars. *Microchemical Journal*, 109, 23–28.
108. Martínez-Gil, A., del Alamo-Sanza, M., Sánchez-Gómez, R., Nevares, I. (2018). Different woods in cooperage for oenology: A Review. *Beverages*, 4, 94-118. <https://doi.org/10.3390/beverages4040094>.
109. McNulty, J., Nair, J. J., Bollareddy, E., Keskar, K., Thorat, A., Crankshaw, D. J., Holloway, A. C., Khan, G., Wright, G. D., Ejim, L. (2009). Isolation of flavonoids from the heartwood and resin of *Prunus avium* and some preliminary biological investigations. *Phytochemistry*, 70, 2040–2046.
110. Metsämuuronen, S., Sirén, H. (2019). Bioactive phenolic compounds, metabolism and properties: A review on valuable chemical compounds in Scots pine and Norway spruce. *Phytochemistry Reviews*, 18, 623–664.
111. Mihajlović, L., Glavendekić, M., Jakovljević, I., Marjanović, S. (2008). *Obolodiplosis robiniae* (haldeman) (diptera: Cecidomyiidae) a new invasive insect pest on black locust in Serbia. *Glasnik Šumarskog fakulteta*, 97, 197–208.
112. Molino, S., Casanova, N. A., Rufián-Henares, J. A., Fernandez Miyakawa, M. E. (2019). Natural tannins wood extracts as potential ingredient in food industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, A-M.
113. Morales, F., Cerovic, Z. G., Moya, I. (1996). Time-resolved blue-green fluorescence of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. Spectroscopic evidence for the presence of ferulic acid as the main fluorophore of the epidermis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1273, 251-262.
114. Mosedale, J. R., Puech, J. L. (1998). Wood maturation of distilled beverages. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 95-101. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00024-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00024-7).
115. Mottaghian, A., Pirdashti, H., Bahmanyar, M. A., Abbasian, A. (2008). Leaf and seed micronutrient accumulation in soybean cultivars in response to integrated organic and chemical fertilizers application. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11, 1227–1233.
116. Mratinić, E., Fotirić-Akšić, M., Jovković, R. (2012). Analysis of wild sweet cherry (*Prunus avium* L.) germplasm diversity in South-East Serbia. *Genetika*, 44 (2), 259–268.
117. Nagarajan, G. R., Parmar, V. S. (1977). Chemical examination of the heartwood of *Prunus domestica*. *Planta medica*, 31, 146-150.
118. Najib, R., Hour, T., Khairallah, Y., Khalil, M. (2021). *Quercus cerris* L.: An Overview. *Forestry Studies / Metsanduslikud Uurimused*, 74, 1–9. <https://doi.org/10.2478/fsmu-2021-0001>.
119. Natić, M. M., Dabić, D. Č., Papetti, A., Fotirić Akšić, M. M., Ognjanov, V., Ljubojević, M., Tešić, Ž. L. (2015). Analysis and characterisation of phytochemicals in mulberry (*Morus alba* L.) fruits grown in Vojvodina, North Serbia. *Food Chemistry*, 171, 128–136.
120. Nikolić, M., Marković, T., Mojović, M., Pejin, B., Savić, A., Perić, T., Marković, D., Stević, T., Soković, M. (2013). Chemical composition and biological activity of *Gaultheria procumbens* L. essential oil. *Industrial Crops and Products*, 49, 561–567.
121. Nordberg, M., Nordberg, G. F. (2016). Trace element research-historical and future aspects. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 38, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.04.006>.
122. Oak Ridge National Laboratory. Risk Assessment Information System (RAIS). (2013). <http://rais.ornl.gov/> (datum pristupa: 15.9.2019.)
123. Orescanin, V., Katunar, A., Kutle, A., Valkovic, V. (2003). Heavy metals in soil, grape, and wine. *Journal of Trace and Microprobe Techniques*, 21, 171–180. <https://doi.org/10.1081/TMA-120017912>.

124. Ortega-Vidal, J., Cobo, A., Ortega-Morente, E., Gálvez, A., Alejo-Armijo, A., Salido, S., Altarejos, J. (2021). Antimicrobial and Antioxidant Activities of Flavonoids Isolated from Wood of Sweet Cherry Tree (*Prunus avium* L.). *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 41, 104–117.
125. Ortega-Vidal, J., Cobo, A., Ortega-Morente, E., Gálvez, A., Martínez-Bailén, M., Salido, S., Altarejos, J. (2022). Antimicrobial Activity of Phenolics Isolated from the Pruning Wood Residue of European Plum (*Prunus domestica* L.). *Industrial Crops and Products*, 176, 114296.
126. Osonga, F. J., Akgul, A., Miller, R. M., Eshun, G. B., Yazgan, I., Akgul, A., Sadik, O. A. (2019). Antimicrobial Activity of a New Class of Phosphorylated and Modified Flavonoids. *ACS Omega*, 4, 12865–12871.
127. Oyetayo, A. M., Bada, S. O. (2017). Phytochemical screening and antibacterial activity of *Prunus avium* extracts against selected human pathogens. *Journal of Complementary and Alternative Medical Research*, 4, 1–8.
128. Parmar, V. S., Vardhan, A., Nagarajan, G. R., Jain, R. (1992). Dihydroflavonols From *Prunus domestica*. *Phytochemistry*, 31 (6), 2185-2186.
129. Pavlović, M., Rakić, T., Pavlović, D., Kostić, O., Jarić, S., Mataruga, Z., Pavlović, P., Mitrović, M. (2017). Seasonal variations of trace element contents in leaves and bark of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) in urban and industrial regions in Serbia. *Archives of Biological Sciences*, 69 (2), 201-214. <https://doi.org/10.2298/ABS161202005P>.
130. Pecić, S., Veljović, M., Despotović, S., Leskošek-Čukalović, I., Jadranin, M., Tešević, V., Nikšić, M., Nikićević, N. (2012). Effect of maturation conditions on sensory and antioxidant properties of old Serbian plum. *European Food Research and Technology*, 235 (3), 479–487.
131. Pepeljnjak, S., Kosalec, I. (2004). Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, Enterococcus spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 240, 111–116.
132. Pettersen, R. (1984). The chemical composition of wood. In: *The Chemistry of Solid Wood*. Rowell, R. (ed), ACS, Washington, 57-126.
133. Popescu, I., Caudullo, G. (2016). *Prunus cerasifera* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. U: *European Atlas of Forest Tree Species*. San-Miguel-Ayaz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (eds.), Publications Office of the European Union, Luxembourg, 142.
134. Pravilnik o higijenskoj ispravnosti vode za piće. "Sl. list SRJ", br. 42/98 i 44/99 i "Sl. glasnik RS", br. 28/2019.
135. Puech, J. L. (1981). Extraction and evolution of lignin products in Armagnac matured in oak. *American Journal of Enology and Viticulture*, 32, 111-114.
136. Radojković, M. (2012). Ekstrakti duda (*Morus* spp., *Morasceae*), sastav, delovanje i primena. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu - Tehnološki fakultet. Novi Sad.
137. Rahman, M. M., Jahan, M. S. (2014). Evaluation of mulberry plant as a pulping raw material. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 4 (1), 53–58.
138. Rai, P. K., Lee, S. S., Zhang, M., Tsang, Y. F., Kim, K.-H. (2019). Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. *Environment International*, 125, 365–385. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.067>.
139. Rauf, A., Imran, M., Abu-Izneid, T., Lahtisham-Ul-Haq, Patel, S., Pan, X., Naz, S., Sanches-Silva, A., Saeed, F., Suleria, H. A. R. (2019). Proanthocyanidins: a comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 116, 108999 <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108999>.
140. REGULATION (EU) 2019/787 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL, L 130/32 EN Official Journal of the European Union, 62, 17.5.2019.

141. Ricci, A., Parpinello, G. P., Palma, A. S., Teslić, N., Brillì, C., Pizzi, A., Versari, A. (2017). Analytical profiling of food-grade extracts from grape (*Vitis vinifera* sp.) seeds and skins, green tea (*Camellia sinensis*) leaves and Limousin oak (*Quercus robur*) heartwood using MALDI-TOF-MS, ICP-MS and spectrophotometric methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 59, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.014>.
142. Ricci, A., Parpinello, G. P., Teslić, N., Kilmartin, P. A., Versari, A. (2019). Suitability of the Cyclic Voltammetry Measurements and DPPH<sup>•</sup> Spectrophotometric Assay to Determine the Antioxidant Capacity of Food-Grade Oenological Tannins. *Molecules*, 24, 2925; doi:10.3390/molecules24162925.
143. Ristivojević, P., Andrić, F. L., Trifković, J. Đ., Vovk, I., Stanisavljević, L. Ž., Tešić, Ž. L., Milojković-Opsenica, D. M. (2014). Pattern recognition methods and multivariate image analysis in HPTLC fingerprinting of propolis extracts. *Journal of Chemometrics*, 28, 302–310.
144. Sádecká, J., Uríčková, V., Jakubíková, M. (2016). Fluorescence spectroscopy for the analysis of spirit drinks. In: Applications of Molecular Spectroscopy to Current Research in the Chemical and Biological Sciences. Stauffer, M. (ed.), Intech Open Limited, London, United Kingdom, 339–362.
145. Salem, M. Z. M., Elansary, H. O., Elkelish, A. A., Zeidler, A., Ali, H. M., Mervat, E. H., Yessoufou, K. (2016). In vitro bioactivity and antimicrobial activity of *Picea abies* and *Larix decidua* wood and bark extracts. *Bioresources*, 11, 9421–9437.
146. Sánchez-Guillén, M. M., García-Moreno, M. V., Guillén-Sánchez, D. A., García-Barroso, C. (2017). Determination of Antioxidant Activity of Brandy and Other Aged Beverages by Electrochemical and Photochemiluminescence Methods. *Food Analytical Methods*, 10 (4), 1045–1053. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0667-3>.
147. Sanz, M., Cadahía, E., Esteruelas, E., Muñoz, A. M., Fernández de Simón, B., Hernández, T., Estrella, I. (2010). Phenolic compounds in cherry (*Prunus avium*) heartwood with a view to their use in cooperage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4907–4914. <https://doi.org/10.1021/jf100236v>.
148. Sanz, M., Fernández de Simón, B., Esteruelas, E., Muñoz, A. M., Cadahía, E., Hernández, T., Estrella, I., Pinto, E. (2011). Effect of Toasting Intensity at Cooperage on Phenolic Compounds in Acacia (*Robinia pseudoacacia*) Heartwood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (7), 3135–3145.
149. Sanz, M., Fernández de Simón, B., Cadahía, E., Esteruelas, E., Muñoz, A. M., Hernández, M. T., Estrella, I. (2012a). Polyphenolic profile as a useful tool to identify the wood used in wine aging. *Analytica Chimica Acta*, 732, 33–45.
150. Sanz, M., Fernández De Simón, B., Esteruelas, E., Muñoz, A. M., Cadahía, E., Hernández, T., Estrella, I., Martínez, J. (2012b). Polyphenols in red wine aged in acacia (*Pseudoacacia robinia*) and oak (*Quercus petraea*) wood barrels. *Analytica Chimica Acta*, 732, 83–90.
151. Schiavon, M., Lima, L. W., Jiang, Y., Hawkesford, M. J. (2017). Effects of Selenium on Plant Metabolism and Implications for Crops and Consumers. In: Selenium in plants. Plant Ecophysiology, vol 11. Pilon-Smits, E., Winkel, L., Lin, Z. Q. (eds), Springer, Cham. 257–275. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-56249-0\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-56249-0_15)
152. Shao, J., Zhang, M. X., Wang, T. M., Li, Y., Wang, C. Z. (2016). The roles of CDR1, CDR2, and MDR1 in kaempferol-induced suppression with fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Pharmaceutical Biology*, 54, 984–992.
153. Simeone, M. C., Zhelev, P., Kandemir, G. (2019). EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use of Turkey oak (*Quercus cerris*), European Forest Genetic Resources Programme (EUFORGEN), European Forest Institute. 6 pages.

154. Simić, A., Manojlović, D., Šegan, D., Todorović, M. (2007). Electrochemical Behavior and Antioxidant and Prooxidant Activity of Natural Phenolics. *Molecules*, 12 (10), 2327–2340. <https://doi.org/10.3390/12102327>.
155. Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
156. Sitzia, T., Cierjacks, A., de Rigo, D., Caudullo, G. (2016). *Robinia pseudoacacia* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: *European Atlas of Forest Tree Species*. San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (eds.), Publications Office of the European Union, Luxembourg, 166-167.
157. Sjöström, E., Alén, R. (1999). Analytical methods in wood chemistry, pulping, and papermaking. Verlag, Berlin, Heidelberg: Springer.
158. Soares, B., Garcia, R., Costa Freitas, A. M., João Cabrita, M. (2012). Phenolic compounds released from oak, cherry, chestnut and robinia chips into a synthetic wine: influence of toasting level. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 27 (1), 17-26.
159. Şöhretoğlu, D., Ekizoğlu, M., Kılıç, E., Koray Sakar, M. (2007). Antibacterial and Antifungal Activities of Some Quercus Species Growing in Turkey. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32, 127-130.
160. Song, W., Wang, H. J., Bucheli, P., Zhang, P. F., Wei, D. Z., Lu, Y. H. (2009). Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus* sp.) species from China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 9133–9140.
161. Song, W., Qin, S.-T., Fang, F.-X., Gao, Z.-J. Liang, D.-D., Liu, L.-L., Tian, H.-T. & Yang, H.-B. (2018). Isolation and Purification of Condensed Tannin from the Leaves and Branches of *Prunus cerasifera* and Its Structure and Bioactivities. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 185, 464–475.
162. Soriano, A., Alañón, M. E., Alarcón, M., García-Ruíz, A., Díaz-Maroto, M. C., Pérez-Coello, M. S. (2018). Oak wood extracts as natural antioxidants to increase shelf life of raw pork patties in modified atmosphere packaging. *Food Research International*, 111, 524-533.
163. Stevanović Janežić, T. (1993). Hemija drveta sa hemijskom preradom. Prvi deo: Hemija drveta. Jugoslavijapublik.
164. Stevanović Janežić, T., Kolin, B., Jaić, M., Danon, G. (1995). Unapređenje tehnologija drveta u korelaciji sa svojstvima hemijskih konstituenata drveta. Monografija. Univerzitet u Beogradu-Šumarski fakultet, Beograd.
165. Sudo, E., Teranishi, M., Hidema, J., Taniuchi, T. (2009). Visualization of flavonol distribution in the abaxial epidermis of onion scales via detection of its autofluorescence in the absence of chemical processes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73 (9), 2107–2109.
166. Szczepkowski, A., Nicewicz, D. (2008). The content of heavy metals in the wood of healthy and dying oak trees (*Quercus robur* L., *Q. petraea* (Matt.) Liebl.). *Acta Scientiarum Polonorum Silvarum Colendarum Ratio et Industria Lignaria*, 7 (4), 55–65.
167. Šoškić, B. M., Popović, Z. D. (2002). Svojstva drveta. Šumarski fakultet, Beograd.
168. Trade Map, 2018. Trade Statistics for International Business Development. [https://www.trademap.org/Country\\_SelProductCountry.aspx](https://www.trademap.org/Country_SelProductCountry.aspx). (datum pristupa: 15.12.2018).
169. Tvermoes, B. E., Banducci, A. M., Devlin, K. D., Kerger, B. D., Abramson, M. M., Bebenek, I. G., Monnot, A. D. (2014). Screening level health risk assessment of selected metals in apple juice sold in the United States. *Food and Chemical Toxicology*, 71, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.05.015>.
170. Tzvetkova, N., Kolarov, D. (1996). Effect of air pollution on carbohydrate and nutrients concentrations in some deciduous tree species. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 22 (1–2), 53–63.



171. Ugrenović, A. (1950). Tehnologija drveta. Nakladni Zavod Hrvatske, Zagreb.
172. Valette, N., Perrot, T., Sormani, R., Gelhaye, E., Morel-Rouhier, M. (2017). Antifungal activities of wood extractives. *Fungal Biology Reviews*, 31, 113–123.
173. Veljović, S., Veljović, M., Nikićević, N., Despotović, S., Radulović, S., Nikšić, M., Filipović, L. (2017). Chemical composition, antiproliferative and antioxidant activity of differently processed *Ganoderma lucidum* ethanol extracts. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 1312–1320.
174. Veluri, R., Weir, T. L., Bais, H. P., Stermitz, F. R., Vivanco, J. M. (2004). Phytotoxic and Antimicrobial Activities of Catechin Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1077–1082. DOI: 10.1021/jf030653.
175. Venkataraman, K. (1972). Wood phenolics in the chemotaxonomy of the Moraceae. *Phytochemistry*, 11, 1571-1586.
176. Vermerris W., Nicholson R. (2008). Families of Phenolic Compounds and Means of Classification. In: Phenolic Compound Biochemistry. Springer, Dordrecht, 1-34. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5164-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5164-7_1)
177. Vilotić, D. M. (2000). Uparedna anatomija drveta. Šumarski fakultet, Beograd.
178. Vinciguerra, V., Luna, M., Bistoni, A., Zollo, F. (2003). Variation in the composition of the heartwood flavonoids of *Prunus avium* by on-column capillary gas chromatography. *Phytochemical Analysis*, 14, 371-377. <https://doi.org/10.1002/pca.730>.
179. Welk, E., de Rigo, D., Caudullo, G. (2016). *Prunus avium* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: *European Atlas of Forest Tree Species*. San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (eds.), Publications Office of the European Union, Luxembourg, 140-141.
180. Weng, B., Xie, X., Weiss, D. J., Liu, J., Lu, H., Yan, C. (2012). *Kandelia obovata* (S., L.) Yong tolerance mechanisms to cadmium: subcellular distribution, chemical forms and thiol pools. *Marine Pollution Bulletin*, 64 (11), 2453–2460.
181. Wirth, J., Slaghenaufi, D., Vidal, S., Ugliano, M. (2021). Electrochemical Approaches for Rapid Characterization of Oxidizable Compounds in Different Oak Alternatives. *Beverages*, 7 (1), 1. <https://doi.org/10.3390/beverages7010001>
182. WHO (1996). Trace elements in human nutrition and health. World Health Organization, Geneva.
183. WHO (2004). Guidelines for drinking-water quality. Vol. 1, Recommendations. (3rd ed.). World Health Organization, Geneva.
184. Wu, C. F., Yang, J. Y., Wang, F., Wang, X. X. (2013). Resveratrol: botanical origin, pharmacological activity and applications. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 11 (1), 1–15.
185. Yazaki, Y. (2015). Wood Colors and their Coloring Matters: A Review. *Natural Product Communications*, 10 (3), 505-512.
186. Zhang, B., Cai, J., Duan, C. Q., Reeves, M. J., He, F. (2015). A review of polyphenolics in oak woods. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 6978–7014. <https://doi.org/10.3390/ijms16046978>.
187. Zhao, S., Shang, X., Duo, L. (2013). Accumulation and spatial distribution of Cd, Cr, and Pb in mulberry from municipal solid waste compost following application of EDTA and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. *Environmental Science and Pollution Research*, 20 (2), 967–975.
188. Zhou, L., Zhao, Y., Wang, S., Han, S., Liu, J. (2015). Lead in the soil–mulberry (*Morus alba* L.)–silkworm (*Bombyx mori*) food chain: Translocation and detoxification. *Chemosphere*, 128, 171–177.
189. Ziyatdinova, G., Salikhova, I., Budnikov, H. (2014a). Chronoamperometric estimation of cognac and brandy antioxidant capacity using MWNT modified glassy carbon electrode. *Talanta*, 125, 378–384. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.03.039>.

190. Ziyatdinova, G. K., Salikhova, I. R., Budnikov, H. C. (2014b). Evaluation of the antioxidant capacity of cognacs and brandies by differential pulse voltammetry. *Journal of Analytical Chemistry*, 69 (12), 1165–1170. <https://doi.org/10.1134/S1061934814120168>.
191. Ziyatdinova, G., Salikhova, I., Skorobogatova, N., Chibisova, M., Budnikov, H. (2015). New Electrochemistry-Based Approaches to Brandy Quality Evaluation Using Antioxidant Parameters. *Food Analytical Methods*, 8 (7), 1794–1803. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-0059-5>.
192. <https://www.feedipedia.org/node/123> (datum pristupa: 10.9.2021).
193. Robuvit<sup>®</sup>, <https://www.robuvit.com/home/>
194. <https://www.ecfr.gov/current/title-27/chapter-I/subchapter-A/part-19/subpart-M/subject-group-ECFR925819f2bfa57ac/section-19.331> (datum pristupa: 3.11.2022.).
195. <https://www.plantscience4u.com/2015/06/what-is-bark.html> (datum pristupa: 2.11.2022.)
196. [https://workshopcompanion.com/KnowHow/Design/Nature\\_of\\_Wood/1\\_Wood\\_Grain/1\\_Wood\\_Grain.htm](https://workshopcompanion.com/KnowHow/Design/Nature_of_Wood/1_Wood_Grain/1_Wood_Grain.htm), (datum pristupa: 2.11.2022.)

## 6. PRILOZI

### Prilog 1. Izveštaj o anatomskim uzorcima drveta

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
**ШУМАРСКИ ФАКУЛТЕТ**  
11030 Београд, Кнеза Вишеслава 1  
tel: +381 (0) 11 3053-800, fax: +381 (0) 11 2545-485



UNIVERSITY OF BELGRADE  
**FACULTY OF FORESTRY**  
RS-11030 Belgrade, Kneza Visaslava 1

E-mail: office@sfb.rs Internet: http://www.sfb.rs

**Предмет:** Извештај о анатомским узорцима дрвета

На основу узорака дрвета који су донети у лабораторију за Анатомију дрвета на Шумарски факултет подносим следећи извештај.

Из 11 узорака направљени су привремени анатомски препарати дебљине 14  $\mu\text{m}$  ( $\mu\text{m} = 1000$ -ти део  $\text{mm}$ ) помоћу клизећег микротома "Reichert". За лакшу детерминацију врсте прављен је попречан пресек, управан на анатомску осу узорка-дебла. Пресеци су стављени на предметно стакло и преко њих је стављено покровно стакло како би препарат био исправљен и спреман за микроскопирање.

Препарати су послужили за детерминацију врсте и прављење микрофотографија на микроскопу "Воесо". Пресеци су снимљени на увећању 100x, 400x.

Сваки препарат је сликан и означена је врста испод сваке слике. Узорак под редним бр.9 није могао најбоље да се уради због чега је детерминисан само род *Prunus*.

Београд, јуни 2021.

Подносилац извештаја  
Проф. др Драгица Вилотић

## 7. BIOGRAFIJA AUTORA

Anita Smailagić je rođena 28. oktobra 1992. godine u Beogradu, Srbija. Završila je Matematičku gimnaziju u Beogradu. Godine 2011. upisala je osnovne akademske studije na Univerzitetu u Beogradu – Hemijski fakultet, studijski program Hemičar, bez polaganja prijemnog ispita, pošto je postigla značajne rezultate na Republičkom takmičenju iz hemije održanom u Nišu iste godine. Tokom školske 2012/13. i 2013/14. godine bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Obavljala je stručnu praksu tokom 2016. godine u Gradskom zavodu za javno zdravlje u laboratoriji za humanu ekologiju i ekotoksikologiju u trajanju od mesec dana, i u Agenciji za zaštitu životne sredine u Beogradu u trajanju od 2 meseca.



Diplomirala je 2016. godine sa prosečnom ocenom 9,06 i odbranila je završni rad "Ispitivanje isparljivih jedinjenja u rakijama jabukovačama" sa ocenom 10, pod mentorstvom dr Velea Teševića, redovnog profesora. Godine 2017. završila je master studije na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu, na studijskom programu Hemija, sa prosečnom ocenom 9,75 i odbranila je master rad "Određivanje antioksidativnog potencijala i elaginske kiseline u preparatima na bazi grožđa" sa ocenom 10, pod mentorstvom dr Maje Natić, redovnog profesora. Godine 2017. upisala je doktorske studije na Univerzitetu u Beogradu – Hemijskom fakultetu, na studijskom programu Hemija, takođe pod mentorstvom dr Maje Natić, redovnog profesora.

Od juna 2018. godine zaposlena je kao istraživač-pripravnik na Inovacionom centru Hemijskog fakulteta u Beogradu na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja "Korelacija strukture i osobina prirodnih i sintetičkih molekula i njihovih kompleksa sa metalima" (broj projekta: 172017), dok je od maja 2021. godine izabrana u zvanje istraživač-saradnik. Učestvovala je kao saradnik na bilateralnom projektu između Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (Beograd, Srbija) i Government of the Slovak Republic (Bratislava, Slovačka) "Stanje zagađenosti zemljišta i uzoraka hrane u Srbiji i Slovačkoj – biorasploživa frakcija elemenata i procena rizika po zdravlje" (broj projekta: 337-00-107/2019-09/17).

Volontirala je na različitim manifestacijama u okviru Hemijskog fakulteta kao kustos ("Noć Muzeja" (2015), "Noć istraživača" (2015), "Tamo gde nauka počinje 2" (2016)) ili demonstrator ogleđa ("Tamo gde nauka počinje 3" (2017)). Od 2017. godine angažovana je kao naučni demonstrator u Centru za promociju nauke na različitim događajima u kojima učestvuje Centar za promociju nauke, kao što su "Festival nauke" (2017, 2019), "Noć istraživača" (2019) i druge. Takođe je vodila radionice za decu u prostorijama Centra za promociju nauke u okviru događaja "Inteligencija biljaka" (2017) ili u okviru njihovog programa aktivnosti (2019). Član je Srpskog hemijskog društva od 2017. godine.

Anita Smailagić je prezentovala rezultate istraživanja kroz publikacije u međunarodnim časopisima i putem saopštenja na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu. Koautor je pet naučnih radova objavljenih u časopisima sa SCI liste, od kojih su tri rada u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (M21a) i dva rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), kao i devet saopštenja, od kojih su šest saopštenja na skupovima od međunarodnog značaja štampanih u izvodu (M34) i tri saopštenja na skupovima od nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64). Prvi je autor na svim radovima iz doktorske teze, kojih je ukupno četiri. Tri rada štampana su u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (M21a), dok je jedan rad publikovan u časopisu vrhunskih vrednosti (M21).

**Radovi i saopštenja koji su sastavni deo ove disertacije:****Radovi u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (M21a)**

1. **Anita Smailagić**, Dalibor M. Stanković, Sanja Vranješ Đurić, Sonja Veljović, Dragana Dabić Zagorac, Dragan Manojlović, Maja Natić (2021). Influence of extraction time, solvent and wood specie on experimentally aged spirits – A simple tool to differentiate wood species used in cooperage. *Food Chemistry*, 346, 128896. (M21a, IF<sub>2021</sub>=9,231; *Chemistry, Applied*, 6/73; *Food Science & Technology*, 8/144) DOI 10.1016/j.foodchem.2020.128896.
2. **Anita Smailagić**, Dragana Dabić Zagorac, Sonja Veljović, Milica Sredojević, Dubravka Relić, Milica Fotirić Akšić, Goran Roglić, Maja Natić (2021). Release of wood extractable elements in experimental spirit model: Health risk assessment of the wood species generated in Balkan cooperage. *Food Chemistry*, 338 (2021) 127804. (M21a, IF<sub>2021</sub>=9,231; *Chemistry, Applied*, 6/73; *Food Science & Technology*, 8/144) DOI 10.1016/j.foodchem.2020.127804.
3. **Anita Smailagić**, Sonja Veljović, Uroš Gašić, Dragana Dabić Zagorac, Mira Stanković, Ksenija Radotić, Maja Natić (2019). Phenolic profile, chromatic parameters and fluorescence of different woods used in Balkan cooperage. *Industrial Crops and Products*, 132, 156-167. (M21a, IF<sub>2019</sub>=4,244; *Agronomy*, 8/91) DOI 10.1016/j.indcrop.2019.02.017.

**Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21)**

1. **Anita Smailagić**, Petar Ristivojević, Ivica Dimkić, Tamara Pavlović, Dragana Dabić Zagorac, Sonja Veljović, Milica Fotirić Akšić, Mekjell Meland, Maja Natić (2020). Radical Scavenging and Antimicrobial Properties of Polyphenol Rich Waste Wood Extracts. *Radical Scavenging and Antimicrobial Properties of Polyphenol Rich Waste Wood Extracts. Foods*, 9, 319. (M21, IF<sub>2020</sub>= 4,350; *Food Science & Technology*, 37/144) DOI 10.3390/foods9030319.

**Saopštenja sa skupova međunarodnog značaja štampana u izvodu (M34)**

1. **Anita T. Smailagić**, Sonja P. Veljović, Tatjana Šolević Knudsen, Maja M. Natić. Volatile profiles of seasoned staves used in Balkan cooperage. *FoodenTwin Symposium: Novel analytical approaches in food and environmental sciences*, Belgrade, June 16-18, 2021, 39.
2. **Anita Smailagić**, Sonja Veljović, Dalibor Stanković, Maja Natić, Rapid Method for Differentiation of Extracts of Wood Used in Balkan Cooperage. *Chemistry Conference for Young Scientists*, Blankenberge, Belgium, February 19-21, 2020, 52.
3. Dragana Dabić Zagorac, **Anita Smailagić**, Sonja Veljović, Maja Natić, Phenolic profiles and chromatic parameters of different woods used in Balkan cooperage. *XII conference of chemists, technologists and environmentalists of the Republic of Srpska*, Teslić, Bosnia and Herzegovina, November 2-3, 2018, 28.
4. **Anita Smailagić**, Dragana Dabić Zagorac, Sonja Veljović, Uroš Gašić, Marija Pergal, Mira Stanković, Ksenija Radotić, Maja Natić, Phenolic profile of *Morus alba* L. (mulberry) barrel staves. *AGH International Student Conference: Knowledge, Technology and Society*, Krakow, Poland, October 10-12, 2018, 71.

5. **Anita Smailagić**, Sonja Veljović, Mira Stanković, Ksenija Radotić, Maja Natić, Dragana Dabić Zagorac, Phenolic profile of seasoned cherry heartwood staves. UNIFood Conference, Belgrade, Serbia, September 5-6, 2018, OHP4/FCHP4.

**Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)**

1. **Anita T. Smailagić**, Sonja P. Veljović, Biljana P. Dojčinović, Maja M. Natić, Elemental composition of non-oak wood extracts commonly used in Balkan cooperage. 7th Conference of the Young Chemists of Serbia, Belgrade, Serbia, November 2, 2019, 58.
2. **Anita Smailagić**, Vladimir Pavlović, Goran Roglić, Maja Natić, Turkey oak wood characterization. 6<sup>th</sup> Conference of the Young Chemists of Serbia, Belgrade, Serbia, October 27, 2018, 40.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Анита Смаилагић**  
Број индекса ДХ08/2017

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**"Хемијски састав екстраката дрвета различитог биљног порекла као показатељ њихове аутентичности"**

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

У Београду, 14. 9. 2023.

Потпис аутора

Анита Смаилагић

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора	<b>Анита Смаилагић</b>
Број индекса	<b>ДХ08/2017</b>
Студијски програм	<b>хемија</b>
Наслов рада	<b>Хемијски састав екстраката дрвета различитог биљног порекла као показатељ њихове аутентичности</b>
Ментор	<b>др Маја Натић</b>

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

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

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

У Београду, 14.9.2023.

Потпис аутора

Анита Смаилагић



## Изјава о коришћењу

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

**"Хемијски састав екстраката дрвета различитог биљног порекла као показатељ њихове аутентичности"**

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
  2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
  3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
  4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
  5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
  6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)
- (Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 14.9.2023.

Потпис аутора

Anita Smailagić

1. **Ауторство.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.