



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



ANA S. MILENKOVIĆ ANĐELKOVIĆ

**EKSTRAKCIJA, KARAKTERIZACIJA, BIOLOŠKA
AKTIVNOST I POTENCIJALNA PRIMENA FENOLNIH
JEDINJENJA IZ PLODOVA I LIŠĆA
BILJNIH VRSTA FAMILIJA
*ROSACEAE, CORNACEAE I GROSSULARIACEAE***

DOKTORSKA DISERTACIJA



Niš, 2016.



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



ANA S. MILENKOVIĆ ANĐELKOVIĆ

**EXTRACTION, CHARACTERIZATION,
BIOLOGICAL ACTIVITY AND POTENTIAL
APPLICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS
FROM FRUITS AND LEAVES OF
PLANTS FAMILIES
*ROSACEAE, CORNACEAE AND GROSSULARIACEAE***

PhD thesis

Niš, 2016.

Mentor:

dr Blaga Radovanović, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu Univerziteta u Nišu

Članovi komisije:

dr Vesna Nikolić, redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Leskovcu Univerziteta u Nišu,

dr Jelena Mladenović, docent Agronomskog fakulteta u Čačku Univerziteta u Kragujevcu,

dr Vladimir Randelović, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu Univerziteta u Nišu,

dr Nedeljko Manojlović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Kragujevcu Univerziteta u Kragujevcu.

Datum odbrane:

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:

др Блага Радовановић, редовни професор Природно– математичког факултета, Универзитета у Нишу

Наслов:

Екстракција, карактеризација, биолошка активност и потенцијална примена фенолних једињења из плодова и лишћа биљних врста фамилија *Rosaceae*, *Cornaceae* i *Grossulariaceae*

Резиме:

У овој докторској дисертацији извршена је оптимизација конвенционалне и ултразвучне екстракционе технике са циљем добијања биолошки активних фенолних једињења из плодова и листова биљних врста фамилија *Rosaceae*, *Cornaceae* i *Grossulariaceae*. Фенолни садржај добијених екстраката анализиран је UV-Vis спектроскопским методама и HPLC анализом. Утврђена је антиоксидативна и антимикуробна активност код свих испитиваних екстраката. Са циљем практичне примене извршено је инклузионо комплексирање најприсутнијег фенолног једињења са циклодекстрином. Карактеризација насталих инклузионих комплекса одређена је применом FT-IC, NMR, XRD спектралним методама анализе. На основу добијених резултата може се закључити да плодови и листови биљних врста фамилија *Rosaceae*, *Cornaceae* и *Grossulariaceae* могу наћи велику примену у прехранбеној и козметичкој индустрији као и у фармацији.

Научна област:

Хемија

Научна дисциплина:

Органска хемија и биохемија

Кључне речи:

Купина, малина, рибизла, дрен, глог, трњина, шипурак, плод, листови, фенолна једињења, антиоксидативна, антимикуробна активност, комплекс рутина, HPLC, UV-Vis, GC-MS, ¹HNMR.

УДК:

547.56 : 582.711.71; 547.56 : 582.788.1; 547.56 : 582.711.31.

CERIF

класификација:

P 003, P 004 и P 390 Хемија, Биохемија, Органска хемија

Тип лиценце
Креативне
заједнице:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Blaga Radovanović, Ph.D., full professor at Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš
Title:	Extraction , characterization , biological activity and potential application of phenolic compounds from fruits and leaves of plants families <i>Rosaceae</i> , <i>Cornaceae</i> and <i>Grossulariaceae</i>
Abstract:	In this doctoral dissertation we optimization conventional and ultrasonic extraction techniques in with the aim of obtaining biologically active phenolic compounds from the berries and leaves of plants families <i>Rosaceae</i> , <i>Cornaceae</i> and <i>Grossulariaceae</i> . Phenolic content of the obtained extracts were subjected to UV-Vis and HPLC analyzes. The significant antioxidant and antimicrobial activity was confirmed. In terms of their possible practical applications performed most active inclusion complexation of phenolic compounds in extracts type cyclodextrin. Characterization of the obtained inclusion complexes were determined by the method of spectral analysis (FT-IR, NMR, XRD). Based on these results it can be concluded that fruits and leaves of plants families <i>Rosaceae</i> , <i>Cornaceae</i> and <i>Grossulariaceae</i> can find great application in the food and cosmetics industries as well as in pharmacy.
Scientific Field:	Chemistry
Scientific Discipline:	Organic chemistry and biochemistry
Key Words:	Blackberry, raspberry, currant, dogwood , hawthorn, blackthorn, phenolic compounds, antioxidant, antimicrobial activity, ciklodekstrin , HPLC, UV-Vis, GC-MS, ¹ H NMR.
UDC:	547.56 : 582.711.71; 547.56 : 582.788.1; 547.56 : 582.711.31.
CERIF Classification:	P 003, P 004 i P 390 Chemistry, Biochemistry, Organic chemistry
Creative Commons License Type:	CC BY-NC-ND




**ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Ана С. Миленковић Анђелковић
Ментор, МН:	Блага Ц. Радовановић
Наслов рада, НР:	Екстракција, карактеризација, биолошка активност и потенцијална примена фенолних једињења из плодова и лишћа биљних врста фамилија <i>Rosaceae</i> , <i>Cornaceae</i> i <i>Grossulariaceae</i>
Језик публикације, ЈП:	Српски
Језик извода, ЈИ:	Енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2016.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО:	број поглавља - 12 / број страна - 205 / број слика - 34 / број табела - 42 / број прилога - 50 / број цитата - 237
Научна област, НО:	Хемија
Научна дисциплина, НД:	Органска хемија и биохемија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	Купина, малина, рибизла, дрен, глог, трњина, шипурак, плод, листови, фенолна једињења, антиоксидативна, антимикуробна активност, комплекс рутина, HPLC, UV-Vis, GC-MS, ¹ HNMR.
УДК	547.56 : 582.711.71 547.56 : 582.788.1 547.56 : 582.711.31.
Чува се, ЧУ:	Библиотека Природно - математичког факултета у Нишу
Важна напомена, ВН:	

Извод, ИЗ:	У овој докторској дисертацији извршена је оптимизација конвенционалне и ултразвучне екстракционе технике са циљем добијања биолошки активних фенолних једињења из плодова и листова биљних врста фамилија <i>Rosaceae</i> , <i>Cornaceae</i> и <i>Grossulariaceae</i> . Фенолни садржај добијених екстраката анализиран је UV-Vis спектроскопским методама и HPLC анализом. Утврђена је антиоксидативна и антимикуробна активност код свих испитиваних екстраката. Са циљем практичне примене извршено је инклузионо комплексирање најприсутнијег фенолног једињења са циклодекстрином. Карактеризација насталих инклузионих комплекса одређена је применом FT-IC, NMR, XRD спектралним методама анализе. На основу добијених резултата може се закључити да плодови и листови биљних врста фамилија <i>Rosaceae</i> , <i>Cornaceae</i> and <i>Grossulariaceae</i> могу наћи велику примену у прехранбеној и козметичкој индустрији као и у фармацији.
Датум прихватања теме, ДП:	22.01.2014.
Датум одбране, ДО:	}
Чланови комисије, КО:	Председник: Члан: Члан: Члан: Ментор

	ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ НИШ
KEY WORDS DOCUMENTATION	
Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Ana S. Milenković Anđelković
Mentor, MN :	Blaga C. Radovanović
Title, TI :	Extraction , characterization, biological activity and potential application of phenolic compounds from fruits and leaves of plants families <i>Rosaceae</i> , <i>Cornaceae</i> and <i>Grossulariaceae</i>
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2016
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD :	chapters - 12 / pages - 205 / images - 34 / tables - 42 / attachments - 50 / citations - 237
Scientific field, SF :	Chemistry
Scientific discipline, SD :	Organic chemistry and biochemistry
Subject/Key words, S/KW :	Blackberry, raspberry, currant, dogwood , hawthorn, blackthorn, phenolic compounds, antioxidant, antimicrobial activity, ciklodekstrin , HPLC, UV-Vis, GC-MS, ¹ H NMR.
UC	547.56 : 582.711.71 547.56 : 582.788.1 547.56 : 582.711.31.
Holding data, HD :	Library of Faculty of sciences and mathematics, Nis
Note, N :	

Abstract, AB :	<p>In this doctoral dissertation we optimization conventional and ultrasonic extraction techniques in with the aim of obtaining biologically active phenolic compounds from the berries and leaves of plants families <i>Rosaceae</i>, <i>Cornaceae</i> and <i>Grossulariaceae</i>. Phenolic content of the obtained extracts were subjected to UV-Vis and HPLC analyzes. The significant antioxidant and antimicrobial activity was confirmed. In terms of their possible practical applications performed most active inclusion complexation of phenolic compounds in extracts type cyclodextrin. Characterization of the obtained inclusion complexes were determined by the method of spectral analysis (FT-IR, NMR, XRD). Based on these results it can be concluded that fruits and leaves of plants families <i>Rosaceae</i>, <i>Cornaceae</i> and <i>Grossulariaceae</i> can find great application in the food and cosmetics industries as well as in pharmacy.</p>										
Accepted by the Scientific Board on, ASB :											
Defended on, DE :											
Defended Board, DB : <table border="0" data-bbox="391 705 598 1052"> <tr> <td data-bbox="391 705 598 750">President:</td> <td data-bbox="598 705 1439 750"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="391 750 598 795">Member:</td> <td data-bbox="598 750 1439 795"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="391 795 598 840">Member:</td> <td data-bbox="598 795 1439 840"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="391 840 598 884">Member:</td> <td data-bbox="598 840 1439 884"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="391 884 598 929">Mentor:</td> <td data-bbox="598 884 1439 929"></td> </tr> </table>	President:		Member:		Member:		Member:		Mentor:		
President:											
Member:											
Member:											
Member:											
Mentor:											

SKRAĆENICE

ABTS - 2,2'- azino - bis - (3 - etilbenzotiazolin - 6 - sulfonska kiselina)

ANOVA (eng. Analysis of variance) Jednosmerna analiza varijanse

ASE (eng. accelerated solvent extraction) Ubrzana ekstrakcija rastvaračima

ATTC (eng. American Type Culture Collection) Kontrolni laboratorijski sojevi mikroorganizama

ATP - Adenozin trifosfat

CAE (eng. Caffeic acid equivalents) ekvivalent kafeine kiseline

CCD (eng. Central composite design) Centralni kompozitni dizajn

DPPH• 2,2'- difenil - 1 - pikrilhidrazil (DPPH) slobodni radikal

DSC - Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

EC₅₀ (eng. efficient concentration) Efektivna koncentracija

F (eng. flavonol content) Flavonolni sadržaj

FLD (eng. fluorescence detector) Fluorescentni detektor

FRAP (Ferric reducing antioxidant power) Antioksidativna aktivnost određena sposobnošću redukcije jona Fe^{3+} u Fe^{2+}

FTIR (eng. Fourier transform infrared spectroscopy) Infracrvena spektrometrija sa Furijeovom transformacijom

GAE (eng. Gallic acid equivalents) Ekvivalent galne kiseline

KE (eng. conventional solvent extraction) Konvencijalna ekstrakcija

MAE (eng. microwave-assisted extraction) Ekstrakcija potpomognuta mikrotalasima

MBC (eng. Minimum bactericidal concentration) Minimalna baktericidna koncentracija

ME (eng. Malvidin - 3 - O - glucoside equivalents) Malvidin - 3 - O - glukozid

MIC (eng. Minimum inhibitory concentration) Minimalna inhibitorna koncentracija

NMR (eng. Nuclear magnetic resonance) Nuklearna magnetna rezonanca

ORAC (eng. Oxygen radical absorbance capacity) Kapacitet absorbance kiseoničnog radikala

PAD (eng. Photodiode array detector) Detektor sa nizom fotodioda

PCA (eng. Principal component analysis) Analiza glavnih komponenti

QE (eng. Quercetin equivalents) Kvercetin ekvivalent

RP-HPLC (eng. Reverse-phase high performance liquid chromatography) Tečna hromatografija visokih performansi sa reverznim fazama

RSA (eng. Radical scavenging activity) Kapacitet hvatanja slobodnih radikala

RSM (eng. Response Surface Methodology) Metodologija odziva površine

bm - biljna materija

TPC (eng. Total phenolic content) Ukupni fenolni sadržaj

UE (eng. ultrasound-assisted extraction) Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

UV-Vis (eng. ultraviolet-visible spectrophotometry) Ultravioletna-vidljiva
spektrofotometrija

XRD - Difrakcija X- zraka

Ova doktorska disertacija većim delom urađena je u laboratorijama Departmana za hemiju, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, u laboratorijama Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, Univerziteta u Nišu, i u laboratorijama Departmana za fiziku i hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, Univerziteta u Novom Sadu.

Radom je rukovodila dr Blaga Radovanović, redovni profesor PMF-a u Nišu kojoj se ovim putem zahvaljujem na iskrenoj pomoći i korisnim savetima i sugestijama tokom izrade i pisanja rada.

Zahvalnost dugujem profesorima dr Vesni Nikolić, dr Jeleni Mladenović, dr Vladimiru Ranđeloviću i dr Nedeljku Manojloviću na pomoći pri izradi i korisnim sugestijama u toku sređivanja rezultata.

Takođe, zahvaljujem svojoj porodici, na podršci i razumevanju.

Autor

SADRŽAJ

SADRŽAJ.....	1
1. UVOD	5
2. OPŠTI DEO	10
2.1. Osnovne karakteristike ispitivanih biljnih vrsta familija <i>Rosaceae</i> , <i>Cornaceae</i> i <i>Grossulariaceae</i>	11
2.1.1. Familija <i>Rosaceae</i>	12
2.1.2. Familija <i>Cornaceae</i>	19
2.1.3. Familija <i>Grossulariaceae</i>	22
2.2. Fenolna jedinjenja u biljnim vrstama familija <i>Rosaceae</i> , <i>Cornaceae</i> i <i>Grossulariaceae</i>	24
2.2.1.. Hidroksibenzojeve kiseline	27
2.2.2. Hidroksicimetne kiseline	28
2.2.3. Flavonoli.....	28
2.2.4. Antocijani.....	29
2.2.5. Flavan-3-oli i proantocijanidini	29
2.2.6. Elagotanini.....	30
2.3. Inkluzioni kompleksi fenolnih kiselina sa ciklodekstranima	30
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	33
3.1. Materijali	34
3.2. Aparatura	35
3.3. Hemikalije i reagensi	36
3.4. Priprema uzoraka	36
3.4.1. Konvencijalna ekstrakcija (KE)	37
3.4.2. Ultrazvučna ekstrakcija (UE)	37
3.4.3. Priprema inkluzionih kompleksa	37
3.4.4. Priprema fizičkih smeša	38
3.5. Analiza uzoraka	38
3.5.1. Određivanje prinosa ekstrakcije	38
3.5.2. Spektrometrijsko određivanje ukupnih fenola, hidroksi-cimetnih kiselina i flavonola	38
3.5.3. Spektrometrijsko određivanje ukupnih antocijana	39
3.5.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti	39
3.5.5. HPLC analiza fenolnih jedinjenja	40
3.5.6. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti	40
3.5.7. Ispitivanje inkluzionih kompleksa.....	41
3.6. Statistička obrada podataka	44
3.6.1. Metodologije odziva površine (RSM).....	44
4. REZULTATI I DISKUSIJA	45
4.1. Optimizacija uslova ekstrakcije.....	46

4.1.1. Optimizacija klasične ekstrakcije – maceracije	46
4.1.2. Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije	56
4.1.3. Uporedna analiza klasične i ultrazvučne ekstrakcije.....	62
4.2. Fenolni sadržaj, antioksidativna i antimikrobna aktivnost odabranih biljnih vrsta familije Rosaceae.....	65
4.2.1. Fenolni sadržaj ekstrakata ploda i lista domaće i divlje kupine (<i>Rubus fruticosus</i> L.)	65
4.2.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda i lista domaće i divlje kupine (<i>Rubus fruticosus</i> L.)	71
4.2.3. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda i lista domaće i divlje kupine (<i>Rubus fruticosus</i> L.)	72
4.2.4. Fenolni sadržaj ekstrakata ploda i lista domaće maline (<i>Rubus idaeus</i> L.)	74
4.2.5. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda i lista domaće maline (<i>Rubus idaeus</i> L.)	78
4.2.6. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda i lista domaće maline (<i>Rubus idaeus</i> L.) ..	78
4.2.7. Fenolni sadržaj ekstrakata ploda i lista šipurka (<i>Rosa canina</i> L.)	80
4.2.8. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda i lista šipurka (<i>Rosa canina</i> L.)	83
4.2.9. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda i lista šipurka (<i>Rosa canina</i> L.)	84
4.2.10. Fenolni sadržaj ekstrakata ploda i lista trnjine (<i>Prunus spinosa</i> L.)	86
4.2.11. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda i lista trnjine (<i>Prunus spinosa</i> L.)	90
4.2.12. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda i lista trnjine (<i>Prunus spinosa</i> L.)	90
4.2.13. Fenolni sadržaj ekstrakata ploda i lista gloga (<i>Crataegus oxyacantha</i> L.)	92
4.2.14. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda i lista gloga (<i>Crataegus oxyacantha</i> L.)	95
4.2.15. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda i lista gloga (<i>Crataegus oxyacantha</i> L.) ...	96
4.3. Fenolni sadržaj, antioksidativna i antimikrobna aktivnost odabranih biljnih vrsta familije Grossulariaceae	98
4.3.1. Fenolni sadržaj ekstrakata ploda i lista crne ribizle (<i>Ribes nigrum</i> L.)	98
4.3.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda i lista crne ribizle (<i>Ribes nigrum</i> L.)	101
4.3.3. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda i lista crne ribizle (<i>Ribes nigrum</i> L.)	102
4.3.4. Fenolni sadržaj ekstrakata ploda i lista crvene ribizle (<i>Ribes rubrum</i> L.)	103
4.3.5. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda i lista crvene ribizle (<i>Ribes rubrum</i> L.)	107
4.3.6. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda i lista crvene ribizle (<i>Ribes rubrum</i> L.) ..	108
4.4. Fenolni sadržaj, antioksidativna i antimikrobna aktivnost odabranih biljnih vrsta familije Cornaceae	110
4.4.1. Fenolni sadržaj ekstrakata ploda i lista dreva (<i>Cornus mas</i> L.)	110
4.4.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda i lista dreva (<i>Cornus mas</i> L.)	113
4.4.3. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda i lista dreva (<i>Cornus mas</i> L.)	114
4.5. Spektralna karakterizacija inkluzionih kompleksa i fizičkih smeša rutin trihidrata sa β - ciklodekstrinom i 2 - hidroksipropil - β -ciklodekstrinom	116

4.5.1. FT-IC analiza polaznih komponenti i inkluzionih kompleksa i fizičkih smeša rutin trihidrata sa β -ciklodekstrinom i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom.....	116
4.5.2. $^1\text{H-NMR}$ analiza analiza polaznih komponenti i inkluzionih kompleksa rutin trihidrata sa β -ciklodekstrinom i 2-hidroksipropil - β -ciklodekstrinom.....	120
4.5.3. XRD analiza analiza polaznih komponenti i	123
inkluzionih kompleksa i fizičkih smeša rutrihidrata sa β -ciklodekstrinom i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom	123
4.5.4. DSC analiza polaznih komponenti i inkluzionih kompleksa rutin trihidrata sa β -ciklodekstrinom i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom	125
4.5.5. Analiza rutin trihidrata primenom UV-Vis metode	127
4.5.6. Ispitivanje fazne rastvorljivosti rutin trihidrata i inkluzionih kompleksa rutin: β -CD i rutin:HP- β -CD	128
4.5.7. Ispitivanje fotostabilnosti inkluzionih kompleksa.....	129
4.5.8. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti kompleksa	130
5. ZAKLJUČAK.....	132
6. LITERATURA	138
8. SUMMARY	152
9. PRILOG	155
10. BIOGRAFIJA	181
11. BIBLIOGRAFIJA.....	183
12. IZJAVE AUTORA.....	188

1. UVOD

Čovek je oduvek bio upućen na biljni svet koji ga okružuje i njegova povezanost sa prirodom traje od davnina. Ljudi su najpre koristili biljke samo u ishrani, ali vremenom su sve više dobijale na značaju zbog svojih aktivnih bioloških supstanci, pa su svoju primenu našle i u lečenju. Smatra se da je najstarija knjiga na svetu o lekovitim biljkama "Pen Ts'ao" (Klasični herbalizam), delo legendarnog kineskog cara Shennong-a, koje je nastalo oko 2700 godina p.n.e. (Janick, 2003).

Od oko 250000 danas poznatih vrsta vaskularnih biljaka, od kojih su većina cvetnice, u smislu lekovitosti i upotrebe u ishrani istraženo je svega oko 10%, što ukazuje da je biljni svet i dalje tajna za čoveka, odnosno nedovoljno istražen i samim tim nepresušan izvor biološki i farmakološki aktivnih jedinjenja.

Jestivi plodovi imaju svoju široku primenu u proizvodnji dijetetskih suplemenata i funkcionalne hrane, koje pored izvanrednih nutritivnih svojstava imaju i pozitivne farmakološke i fiziološke efekte na ljudsko zdravlje, što je u funkciji prevencije bolesti savremenog čoveka. Ispitivanje biološke aktivnosti i hemijskog sastava još neispitanih biljnih vrsta, od izuzetnog su naučnog i praktičnog značaja.

Mnogobrojni radovi, studije i veliki broj eksperimenata, ukazuju na činjenicu da se povećanim konzumiranjem voća i povrća smanjuje rizik od raznih bolesti, kao što su kancer, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti i dijabetes. Dokazano je da biljna hrana, pored vitamina i minerala, sadrži između 5000 i 10000 drugih organskih jedinjenja koja imaju svojstvo antioksidanata, a za koje većina stručnjaka smatra da upravo ta jedinjenja imaju pozitivno dejstvo na ljudsko zdravlje. Sve je manja upotreba sintetskih antioksidanata. U prehrambenoj industriji sve se više napušta iz toksikoloških razloga, dok interesovanje za primenu prirodnih antioksidanata izolovanih iz biljaka (fitonutrijenti), mikroorganizama, gljiva i životinjskog tkiva stalno raste iz razloga njihove veće efikasnosti i zdravstvene bezbednosti, na šta su ukazale naučno-istraživačke studije (Moyer i sar., 2002).

Fenolna jedinjenja kao sekundarni metaboliti biljnih vrsta (fenolne kiseline, flavoni, izoflavoni, flavan-3-oli, antocijani, proantocijanidini, tanini itd.) terpenoidi, tokoferoli, glukozinolati, kao i jedinjenja koja sadrže sumpor osim antioksidativnih poseduju i antimutagena, antikancerogena, antiinflamatorna i antimikrobna svojstva. Istovremeno, ova jedinjenja smanjuju rizik od pojave kardiovaskularnih oboljenja (Tumbas, 2010).

Naučne studije potvrdile su njihovo sledeće biološko delovanje: antioksidativna aktivnost, sprečavanje agregacije trombocita, modulacija enzima koji učestvuju u detoksifikaciji, promena u metabolizmu holesterola, kontrola koncentracije sporednih hormona, sniženje krvnog pritiska, antimikrobno delovanje (Henionen i sar., 1998).

Polifenolna jedinjenja rastvorna u vodi, kao što su neki derivati benzoeve i cimetine kiseline, imaju alelopatsko dejstvo (Sha-hidi i Naczk, 1995).

Sa druge strane, prisustvo flavonoida i fenolnih kiselina veoma je značajno i za samu biljku, jer se veruje da ova jedinjenja učestvuju u odbrambenom mehanizmu biljke. Dokazano je da se u uslovima stresa (prekomerno UV zračenje, oštećenje tkiva, različite infekcije) u biljkama indukuje sinteza polifenolnih jedinjenja (Hollman i sar., 1995; Halliwell i Gutteridge, 1999; Stefan i sar., 2007).

Namirnice biljnog porekla, voće, povrće, lekovito i začinsko bilje, kao i njihovi ekstrakti, sadrže prirodne antioksidante: vitamine (vitamin E, vitamin C), terpene, polifenolna jedinjenja, što je dokazano mnogobrojnim istraživanjima (Scalbert i Williamson, 2000). Pokazalo se da poseduju, antiviralna, antiinflamatorna, antialergijska i antioksidativna svojstva (Capasso i sar., 2005). Polifenolna jedinjenja imaju veliki uticaj na osnovne ćelijske funkcije kao što su rast, deoba i/ili smrt ćelije (apoptoza) (Tumbas, 2010).

Određena polifenolna jedinjenja se karakterišu antioksidativnim aktivnostima baziranim na njihovom redoks potencijalu, pa zato oni mogu delovati kao redukujući agensi, „skevendžeri“ singletnog kiseonika, da otpuštaju vodonik i helatizuju metale (Ivanova i sar., 2005). Na hiljade prirodnih polifenolnih jedinjenja identifikovano je u jestivim biljkama, a danas je poznato je da su divlje samonikle vrste biljaka daleko bogatije polifenolnim jedinjenjima od gajenih vrsta.

Mnogobrojne aktivne supstance, sadržane u plodovima različitih biljnih vrsta koji se koriste u svakodnevnoj ishrani, sadrže različite aktivne komponente koje imaju biološko delovanje. Takođe fenolna jedinjenja mogu biti ona ciljna grupa sa antioksidativnim i antimikrobnim svojstvima, koja učestvuju u inhibiciji oksidacije i vrše zaštitu organizma (Kahkonen i sar., 1999). Posmatrano sa farmakološkog aspekta, fenolna jedinjenja se karakterišu širokim spektrom farmakološke aktivnosti. Njihov potencijal u zaštiti i prevenciji od kardiovaskularnih i kancerogenih bolesti je veliki na šta ukazuju brojne epidemiološke studije (Basile i sar., 2000; Croft, 1999; Keli i sar., 1996; Lea i Leegod, 1999).

Posebna pažnja je posvećena na ekstrakciju fenolnih grupa jedinjenja. Proces ekstrakcije se može izvoditi različitim postupcima, a da pri tome hemijski sastav polaznog biljnog materijala ostane nepromenjen i da se dobije optimalni prinos. U farmaceutskoj praksi se koriste etanolni ekstrakti biljaka koji se dobijaju ekstrakcijom etanola i mogu da sadrže najviše do 70% suvog ostatka (Kumpulainen, 2001). Ekstrakti su vrlo kompleksne smeše sastavljene od različitih organskih jedinjenja, koji nastaju reakcijama sekundarnog

metabolizma biljaka. Na bazi biljnih ekstrakata, danas je izrađeno više od 70% lekova koje se koriste u tradicionalnoj medicini i više od 50% lekova koji se koriste u klasičnoj medicini. Konkretno u terapiji kancera koristi se više od 60% lekova koji su bazirani na biljnim produktima i njihovim sekundarnim metabolitima (Gharavi i sar., 2007).

Za potrebe ove doktorske disertacije, izabrali smo biljne vrste koje imaju veliki značaj kako u našoj ishrani, tako i u našoj tradicionalnoj medicini. Proučavani su plodovi i listovi sledećih biljnih vrsta familija: *Rosaceae*, *Cornaceae* i *Grossulariaceae*:

- domaća kupina (*Rubus fruticosus* L.),
- divlja kupina (*Rubus fruticosus* L.),
- domaća malina (*Rubus idaeus* L.),
- crna ribizla (*Ribes nigrum* L.),
- crvena ribizla (*Ribes rubrum* L.),
- trnjina (*Prunus spinosa* L.),
- glog (*Crataegus oxyacantha* L.),
- šipurak (*Rosa canina* L.),
- dren (*Cornus mas* L.).

Cilj ove doktorske disertacije je: da se optimizuje metoda ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz plodova i listova odabranih biljnih vrsta, da se izvrši njihova karakterizacija, da se ispita njihova antioksidativna i antimikrobna aktivnost i da se predloži njihova primena nakon inkluzionog kompleksiranja najzastupljenijih fenolnih sastojaka u ekstraktima sa tzv. „nosačima“ ili „domaćinima“ tipa ciklodekstrina u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji.

Ova doktorska disertacija sastoji se od: Opšteg dela, Eksperimentalnog dela, Rezultata i diskusije, Zaključka, Literature, Izvoda, Summary, Biografije sa Bibliografijom i Priloga.

U Opštem delu opisane su osnovne karakteristike ispitivanih biljnih vrsta familija *Rosaceae*, *Cornaceae* i *Grossulariaceae*, njihov hemijski sastav sa posebnim osvrtom na fenolni sastav. Predstavljeni su i literaturno poznati rezultati iz ove oblasti.

U Eksperimentalnom delu opisane su procedure ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz uzoraka plodova i listova, procedure određivanja antioksidativne i antimikrobne aktivnosti dobijenih ekstrakata, procedure pripreme inkluzionih kompleksa između rutina i kompleksirajućih agenasa kao i njihova karakterizacija.

U delu Rezultati i diskusija prikazani su rezultati izvršenih analiza i izvedene određene korelacije pomoću odgovarajućih statističkih softverskih paketa.

U Zaključku su dati zaključci izvedeni na osnovu dobijenih rezultata i dobijenih korelacija.

U Izvodu dat je karatak pregled korišćenih metoda i dobijenih rezultata.

U Prilogu su dati HPLC hromatogrami ispitivanih biljnih vrsta.

2. OPŠTI DEO

2.1. Osnovne karakteristike ispitivanih biljnih vrsta familija *Rosaceae*, *Cornaceae* i *Grossulariaceae*

Veliki broj biljnih vrsta koje pripadaju familijama *Rosaceae*, *Cornaceae* i *Grossulariaceae* karakterišu jestivi plodovi bogati šećerom, kiselinama, vitaminima (A i C), mineralima, biljnim vlaknima i brojnim bioflavonoidima. Konzumiraju se u svežem obliku ili prerađene, a neke od njih se koriste i u medicini.

Najveći broj vrsta čiji se plodovi koriste u ishrani pripada porodici ruža, *Rosaceae*. Danas su mnoge samonikle biljne vrste jestivih plodova iz ove familije kultivisane, a mnoge se sakupljaju u prirodi i koriste se zbog specifičnog ukusa i visokog sadržaja značajnih vitamina. Predstavnici ove familije imaju različite tipove plodova, počev od prostih, kao što je koštunica (na primer, kod roda *Prunus*), do zbirnih, kao što su zbirna orašica (na primer, jagoda kod vrsta roda *Fragaria*, i šipurak kod vrsta roda *Rosa*) i zbirna koštunica (na primer, kod vrsta roda *Rubus*) (Randelović, 2005).

Po svojoj nutritivnoj vrednosti, a posebno po sadržaju vitamina vredniji su proizvodi nego što su to prerađevine kultivisanog voća. Osušeni plodovi mogu se upotrebiti za spremanje ukusnih čajnih napitaka. Listovi ovih biljaka mogu se koristiti u svakodnevnoj ishrani i medicini (Grlić, 1986). Jetivi plodovi su izvor fitohemikalija koji svojim potencijalom i velikom biološkom aktivnošću pozitivno utiču na ljudsko zdravlje. Sadržaj fitohemikalija u plodovima zavisi od niza faktora, kao što su klimatski uslovi, stepen zrelosti, uslovi i mesto gajenja, postupka obrade i skladištenja plodova (Hakkinen i Torronen, 2000; Boyles i Wrolstad, 1993). Takođe, ovi plodovi su bogati vlaknima i esencijalnim vitaminima i mineralima. Poznato je da se konzumiranjem voća u većim količinama, smanjuje rizik od raznih bolesti, kao što su kancer, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti i dijabetes. Dnevne doze unosa voća koje se preporučuju iznose 400 g. Pozitivni efekti su dokazani tokom oksidativnih oštećenja, na enzime za detoksifikaciju, imuni sistem, krvni pritisak, a takođe imaju i antiinflamatorno, antibakterijsko i antivirusno dejstvo (Duthie i sar., 2003).

Jestive plodove karakteriše visok sadržaj antocijana, znatna količina monomera flavan-3-ola, (+)-katehina i (-)-epikatehina, kao i dimere, trimere i polimere proantocijanidina, gde je koncentracija polimera uglavnom veća od monomera i dimera. Najzastupljeniji aglikoni flavonoida u plodovima su miricetin, kvercetin i kempferol

(Hakkinen i sar., 1999). Plodovi sadrže i derivate hidroksicimetne kiseline, u manjim količinama, uključujući i kafeoil/feruloil estre (Maatta i sar., 2004).

Plodovi su bogati i folnom kiselinom, koja takođe snižava rizik od srčanih oboljenja i kancera, smanjenjem nivoa homocisteina, katalizovanjem reakcija nastajanja azot oksida i održavanjem stabilnosti DNK (Verhaar i sar., 2002; Key i sar., 2002).

Po navodima mnogih autora elaginska kiselina je zastupljena kod većine jestivih plodova (Amakura i sar., 2000). Utvrđeno je da ona zauzima više od 50% ukupnih polifenolnih jedinjenja u jagodama i malinama (Hakkinen i sar., 1999). Ipak, slobodne elaginske kiseline je jako malo, ali je njena značajna količina detektovana nakon hidrolize, zajedno sa galnom kiselinom, kao proizvoda razgradnje elagitanina.

2.1.1. Familija *Rosaceae*

Familija ruža (*Rosaceae*) je jedna od najbogatijih i geografski najrasprostranjenijih biljnih familija. Postoji oko 115 rodova i 3000-4000 biljnih vrsta koje spadaju u ovu porodicu, uglavnom su rasprostranjene u umerenim i suptropskim oblastima severne polulopte. Usled velikog ekonomskog značaja biljaka ove familije, čovek je raširio njihove areale na celu planetu. Ovu familiju čine po mnogim karakteristikama veoma raznovrsne biljke. Familija je raznovrsna i pripadaju joj većina voćaka umerenog pojasa, sa velikim brojem zeljastih, žbunastih i drvenastih vrsta, kao i žbunova i lijana. Njihovu raznolikost možemo uočiti počev od životne forme (prisutne su zeljaste jednogodišnje i višegodišnje biljke, žbunovi i drveće).

Pored velike raznolikosti, skoro je nemoguće definisati ovu familiju i njene razlike od drugih familija. Neke osnovne karakteristike koje je odvajaju su prisustvo zalistaka, često nazubljeni listovi, veliki broj prašnika, nektarije koje su dobro razvijene na hipantijumu i u osnovi tučka i prašnika, postojanje 1-2 krasinucelatna semena zametka po lokuli, prisustvo cijanogenih glikozida kod većeg broja predstavnika. Familija *Rosaceae* se pokazala kao jasno monofiletska grupa u istraživanjima varijabilnosti sekvenci DNK kod skrivenosemenica.

Rosaceae su podeljene na četiri potfamilije: *Rosoideae*, *Spiraeoideae*, *Amygdaloideae* i *Maloideae*.

Osnovni taksonomski kriterijum za ovu podelu je tip ploda. Tako, predstavnici potfamilije *Rosoideae* imaju plod orašicu (aheniju), u potfamiliji *Spiraeoideae* nalazi se mešak, u *Amygdaloideae* koštunica, a u *Maloideae* jabuka (pomum). Kod pojedinih autora nalaze se i dodatni kriterijumi za izdvajanje potfamilija (osnovni broj hromozoma, fitohemijski karakteri). Ovakva, tradicionalna podela na potfamilije je pretrpela znatne izmene posle biohemijskih i molekularnih filogenetskih i sistematičarskih istraživanja.

Karakteristični za porodicu *Rosaceae* su listovi, koji su uvek raspoređeni naizmenično i obično imaju zaliske, koji rastu bočno iz osnove lisne drške. Cvetovi su aktinomorfni, ciklični, hermafroditni (postoje i jednopolni), u cvastima ili pojedinačni. Cvetni omotač je dvojan, najčesće petočlan (ili četvoročlan). Veći broj prašnika je raspoređen po obodu cvetne loze. Na cvetnoj lozi nalazi se nektarija. Karpela ima koliko i čašičnih listića, 2-3 puta više ili samo jedna. Oprašivanje je entamofilno. Postoji sklonost ka apomiksismu i partenokarpiji.

2.1.1.1. Kupina (*Rubus fruticosus* L.)



Slika 2.1: Kupina – *Rubus fruticosus* L.

Kupina (*Rubus fruticosus* L.) je tipičan predstavnik familije *Rosaceae*. List kupine sadrži: tanin, kalijum, mineralne materije i soli, flavonski heterozid i etarsko ulje, a plod: vitamin C, tanin, šećer, jabučnu, vinsku i limunsku kiselinu u sluzi (Fedriani i Delibes, 2009). U ishrani i medicini se koristi i list i plod. List se bere u martu, aprilu i maju, a plod u septembru i oktobru.

Količina od 100 g svežih kupina sadrži 43 kalorije što predstavlja njenu nutritivnu energetska vrednost. Od minerala sadrži kalijum, kalcijum, fosfor, magnezijum, gvožđe, mangan, cink i bakar, dok od vitamina sadrži vitamin C, A, E i K. Takođe, kupine su bogate dijetnim vlakanima i beta karotenom (Halvorsen i sar., 2006).

Kupina je široko rasprostranjeno voće u svetu i kod nas, raste u obliku žbuna. Pouzdano se zna da je još u antičko doba bila poznata skoro svim narodima, a sada je ima u zemljama sa kontinentalnom klimom u Evropi, Aziji i Severnoj Americi. Postoji nekoliko stotina vrsta kupina, a neke su autohtone samo za pojedina područja.

Kupine su voće bogato antioksidansima koji učestvuju u procesima sprečavanja štetnog delovanja slobodnih radikala i tako pomažu u zaštiti od malignih bolesti, štite kardiovaskularni sistem, usporavaju starenje, pomažu u borbi protiv štetnog delovanja sunca na kožu, pomažu kod usporavanja bolesti nervnog sistema (npr. Alzheimer) (Lesca, 1983; Sellappan i sar., 2002). Redovno konzumiranje kupina blagotvorno deluje na organizam, doprinosi zaštiti vida, jačanju imuniteta, a u spoljašnjoj primeni koristi se za lečenje manjih rana. Istovremeno, osigurava visok sadržaj dijetnih vlakana koja doprinose smanjenju rizika od pojave dijabetesa, divertikuloze i stvaraju osećaj sitosti, što pomaže u regulaciji telesne težine. Mogu da očuvaju svoje lekovito dejstvo čak i nakon termičke obrade. Kupine prirodno sadrže salicilnu kiselinu (aktivni sastojak aspirina) koja ublažava bolove, snižava temperaturu i deluje protivupalno. Sprečava pojavu povraćanja i mučnine. Kontraindikacije su izražene kod gihta i kamena u bubregu i kod takvih stanja treba izbegavati konzumiranje kupina, jer oksalna kiselina može pojačavati postojeće tegobe (Jarvis, 1992).

2.1.1.2. Malina (*Rubus idaeus* L.)



Slika 2.2: Malina – *Rubus idaeus* L.

Malina (*Rubus idaeus* L.) je drugi značajan predstavnik porodice biljaka *Rosaceae*. List maline sadrži: tanin, vitamin C, organske kiseline, flavonoid, gorke materije i etarsko ulje, a plod: limunsku i jabučnu kiselinu, vitamin C, tanin, sluzi, šećer, pektin i mravlju kiselinu (Kempler i sar., 2012). Nalaze primenu u svakodnevnoj ishrani i medicini i list i plod (Holst i sar., 2009; Burton-Freeman i sar., 2016). List se bere u aprilu, maju i junu, a plod u julu i avgustu.

U 100 g svežeg ploda maline sadrže se 52 kalorije, koliko iznosi njena energetska vrednost i izvrstan su izvor dijetetskih vlakana. Od vitamina bogate su vitaminima C, B kompleksa, E i K, ali u količinama ispod preporučenog dnevnog unosa. U malim količinama sadrži gotovo sve minerale. Sadrži šećer, pektin (pomaže kod varenja), minerale gvožđa (veoma važan za izgradnju krvi), vitamin A, C, E, limunsku, jabučnu i mravlju kiselinu, tanin i sluzi (Mazur i sar., 2014). Malina raste u obliku žbuna, uz rubove puteva, na obodima šuma i sl. Poreklom je iz jugoistočne Evrope, odavno je priznata kao kultura, a u Srbiji je jedan od najpopularnijih izvoznih artikala.

Ovo voće se uglavnom koristi u svežem obliku i zbog svoje prijatne i osvežavajuće arome jedan je od omiljenih sastojaka različitih poslastica, ali može poslužiti kao osnova i u prehrambenoj industriji upotrebom svih njegovih prerađevina. Pektin koji sadrže, čini ih idealnim za pripremu džemova, želea i marmelada. Izuzetno voćno sirće se može dobiti dodavanjem svežih malina u belo vinsko sirće.

Malina ima visoku nutritivnu vrednost, posebno zbog bogatog sadržaja raznovrsnih antioksidansa, čija se aktivnost održava čak i kada je malina smrznuta ili termički obrađena. Jaku crvenu boju malini daju antocijani, koji blokiraju negativno dejstvo slobodnih radikala i time štite organizam (Burton-Freeman i sar., 2016). Poseduju izuzetna antibakterijska svojstva i sprečavaju preterani razvoj bakterija i gljivica (Burton-Freeman i sar., 2016). Malina je odlična za pravilnu funkciju creva zbog bogatog sadržaja dijetnih vlakana. Vlakna povećavaju osetljivost insulina i tako sprečavaju razvoj dijabetesa tipa 2 (Burton-Freeman i sar., 2016). Vezuju žučne soli u debelom crevu i izlučuju ih iz tela i na taj način održavaju zdravlje srca. Poseduju moć vezivanja vode, bubre, usporavaju varenje i daju osećaj sitosti, pa se preporučuju tokom redukcijskih dijeta (Burton-Freeman i sar., 2016). Plodovi se koriste za pripremu malinovog sirupa i sirćeta koji jačaju kardiokvaskularni sistem i protiv groznice. Maline se mogu uvrstiti u dijetu obolelih od dijabetesa ili bolesti bubrega, kao i za reumatičare. Delotvorne su i kod bolnih menstruacija i u menopauzi (Holst i sar., 2009; Burton-Freeman i sar., 2016).

2.1.1.3. Trnjina (*Prunus spinosa* L.)



Slika 2.3: Trnjina – *Prunus spinosa* L.

Trnjina (*Prunus spinosa* L.) je višegodišnja biljka iz porodice ruža (*Rosaceae*), rod *Prunus*. Snažan razgranati listopadni grm sa trnovitim granama, visok 1-3 m, listovi su nazubljeni i listaju posle cvetanja. Cveti u aprilu i maju. Cvetovi su beli i vrlo brojni. Plodovi su plavi, male okrugle šljive, a posle prvog mraza omekšaju i mogu se koristiti u ishrani kao sveži (Vedel i Lange, 1960; Weinberger, 1975). Ona raste u umereno kontinentalnoj klimi u severnoj hemisferi i na području Jugoistočne Srbije.

Trnjina se u fitoterapiji koristi za lečenje različitih oblika kašlja. Deluje kao blago laksativno sredstvo, diuretik, spasmolitik i anti-inflamatorni agens, deluje antiseptično (zbog sadržaja tanina), pomaže kod dijareje i zapaljenja sluzokože organa za varenje. (List, 1971; Borkowski i sar., 1994). Trnjina najviše sadrži flavonoide, kao što je rutin i tanine.

Lekovita svojstva podjednako poseduju kora, koren, cvet, list i plod trnjine. Latice cveta trnjine sadrže lekovite cijanogene glikozide, koji imaju laksativna i diuretična svojstva (List, 1971; Borkowski i sar., 1994).

2.1.1.4. Šipurak (*Rosa canina* L.)



Slika 2.4: Šipurak – *Rosa canina* L.

Šipurak (*Rosa canina* L.) je višegodišnja biljka iz porodice *Rosaceae* koja sadrži najviše vitamina C (400-1400 mg/100 g) pored crne ribizle, zatim dosta vitamina P, karotena (provitamin A), vitamina B2 i E kao i 40 bioloških jedinica vitamina K po gramu. Plod ima specifičan miris i slatko-kiseli ukus. Poluzreli plod ima najbolju koncentraciju vitamina, nego što je to slučaj sa zelenim i prezrelim plodom. Sadrži i flavonoide, tanine, limunsku i jabučnu kiselinu, pektin, šećere (saharozu i invertni), malo neutralnih lipida i vrlo malo etarskog ulja, koji daje prijatan miris čaju (Vogl i sar., 2013).

Šipurak je lekovita biljka koja raste kao bodljikavi listopadni grm visine 2-3 m. Poprilično je rasprostranjen po celoj Evropi, severnoj Africi, u severnoj i zapadnoj Aziji, a najviše uspeva po rubovima šuma, po šikarama i pored ograda (De Riek i sar., 2013).

Cvetovi šipurka imaju belu do belo-ružičastu boju, a plodovi su crveni, veličine oko 2 cm i puni su mnogobrojnim, tvrdim semenkama. Šipurak se uglavnom konzumira kao čaj za uživanje i osveženje, povoljno deluje na rad srca i bubrega, idealan je za sprečavanje stvaranja kamena u bubrezima i urinarnim kanalima (Vogl i sar., 2013). Nema štetnih posledica po zdravlje jer je prirodni adstrigent, antibakterijski agens, antioksidant, arteriosklerotik, antiskorbut, antidiroik, diuretik, depurativ, holeretik, pa se može uzimati i u većim količinama. Cvetne latice šipurka su dobre za pripremu čaja kod krvarenja iz želuca, creva, pluća i hemoroida, kao i za smirivanje želudačnih grčeva (Vogl i sar., 2013).

Lekovito vino se pravi od plodova i predstavlja odličan vitaminski napitak. Proizvodi od šipurka se koriste protiv anemije i nervoze, kao i sve ostale tegobe povezane sa smanjenim sadržajem vitamina C. Blagotvorno utiče na probavni trakt, na izlučivanje urina bez ikakvih nadražaja bubrega, koristi se kod upalnih procesa bubrega, bubrežne čašice i bešike (Vogl i sar., 2013).

2.1.1.5. Glog (*Crataegus oxyacantha* L.)



Slika 2.5: Glog – *Crataegus oxyacantha* L.

Glog (*Crataegus oxyacantha* L.) takođe pripada porodici biljaka *Rosaceae*, koja je najrasprostranjenija i najvažnija vrsta gajenog i divljeg voća (Potter i sar., 2007). Cvet i list gloga sadrže: saponozid, adenin, flavonski i antocijanski heterozid, holin, izomilamin, alkilamin, acetilholin, tanin, aromatske aminokiseline. Plod sadrži i tanin, vitamin C, masti, etarsko ulje, karoten, adenin, guanin i belančevine (Tassell i sar., 2010). Koristi se list, cvet i gloginje, a sakuplja se - list i cvet u aprilu, maju i junu, a gloginje u julu, avgustu i septembru.

Plodovi mogu biti veoma različite građe, oblika i veličine. Mnoge samonikle vrste su kultivisane, a neke se sakupljaju i cene zbog posebnog ukusa i visoke vitaminske vrednosti. Plodovi divljih vrsta biljaka iz ove familije nalaze primenu u prehrambenoj industriji za voćne sokove, kompote, marmelade, žele, voćno vino, rakiju, likere. Ti proizvodi su vitaminski daleko vredniji od prerađevina kultivisanog voća. Najviše vitamina C i provitamina A nalazi se u kori ili neposredno ispod nje. Osušeni plodovi se upotrebljavaju za čajne i druge napitke. Listovi ovih biljaka mogu se koristiti za salate i variva (Grlić, 1986).

Beli i crveni glog su trnoviti žbunovi ili nisko drveće. Više je rasprostranjen beli glog. Glog raste po suvljim hrastovim i bukovim šumama, često u šikarama, kao i uz ograde i živice (Potter i sar., 2007).

Cvet i list gloga sadrži, komplekse flavonoidnih heterozida, čiji sastav zavisi od biljne vrste i porekla. U cvetovima dominiraju hiperozid i viteksin. Pored toga, u drogama se može nalaziti i 3% oligomernih procijanidina (jedinjenja nastala međusobnom kondenzacijom 2-8 molekula katehina i/ili epikatehina). Plodovi sadrže mnogo manje flavonoida (oko 0,1%), ali u njima ima više šećera, organskih kiselina, karotenoida i vitamina C (Tassell i sar., 2010).

Glog se smatra jednom od najvrednijih i najdelotvornijih kardioprotetorskih biljaka (Tassell i sar., 2010). Potvrđeno je da procijanidini i flavonoidi gloga imaju pozitivan inotropni, dromo-tropni, negativan batmotropni efekat, da pojačavaju koronarni i protok krvi kroz miokard i da smanjuju periferni otpor u krvnim sudovima. Izvanredan je regulator krvnog pritiska. Njegova upotreba daje dobre rezultate kod oštećenog srčanog mišića, kod upale srčanog mišića, kod zakrčenja krvnih sudova srca i angine pektoris (Tassell i sar., 2010). Kod ljudi oslabljenog srca, može odlično da posluži kao regulator krvnog pritiska (povećava nizak i snižava povišen pritisak). Svež sok i galenski preparati, alkoholno-vodeni ekstrakti i fitopreparati izrađeni od gloga, koriste se kao dopunska terapija srčane insuficijencije (Tassell i sar., 2010). Preparati gloga deluju i kao blagi diuretici.

2.1.2. Familija *Cornaceae*

Dren (*Cornus mas* L.) pripada familiji *Cornaceae* i raste u južnoj Evropi i jugozapadnoj Aziji. Drugi narodni nazivi drena su: bila svibovina, drenjak, drenic, drenka, drenovina, drenj, drijen, drijenj, drinika, drin, drinovina, drnjulic, zuti drenjak, kuroslipnik, rumeni dren, tvrdi dren, crveni drenjak. Plod drena se naziva drenka, drenjka, drenjula.

2.1.2.1. Dren (*Cornus mas* L.)



Slika 2.6: Dren – *Cornus mas* L.

Dren (*Cornus mas* L.) sadrži u plodovima (*Comi fructus*) tanine, šećere, sluzi, organske kiseline, pektine i dr. materije (Nicholson i Wallis, 1963).

Dren je žbunasto drvo, dostiže visinu i do 7 m. Kora je žutosivkasta ili siva, u mladosti glatka, kasnije ispuca, i ljušti se u obliku sitnih ljuski. Mlade grančice su zelenkastosmeđe boje i dlakave. Korenov sistem je dobro razvijen, i koren duboko prodire u podlogu (Demir i Hakki, 2003).

Lišće je jajasto, na vrhu jako zaoštreno, nešto maljavno, donja strana je siva. Cveti vrlo rano, početkom marta. Cvetovi su sitni, dvopolni, zlatnožute boje, u štitastim cvastima koje pri dnu imaju četvorolisni žućkasti ovoj. Cvetovi se pojavljuju veoma rano, pre listanja. Razmnožava se semenom i korenovim izdancima (Demir i Hakki, 2003).

Plod je duguljasta, tamnocrvena voćka s koščicom unutra, dužine do 1,5 cm, i do 8 mm debljine. Raste kao divlje i kao pitomo, negovano drvo. Listovi su naspramni, oko 4-8 cm dugi, široki oko 3 cm, sa 3 do 5 srpasto povijenih nerava, u uglovima bočnih nerava na naličju lista nalaze se čuperci belih dlačica (Demir i Hakki, 2003).



Slika 2.7: List i seme



Slika 2.8: Plod i stablo drena

Koštunica zvana drenjina, oko 12 mm duga i 5 mm široka, sa elipsoidnom, na površini gotovo glatkom, do 10 mm dugom košticom. Sazreva početkom jeseni (avgust-septembar). Ima kiselkast ukus.

Entomofilna, heliofilna i termo-kserofitna vrsta. Raste sporo i doživi starost preko 200 godina. Veoma česta vrsta u području listopadnih hrastovih šuma uspeva do oko 1300m nadmorske visine. Najbolje uspeva na krečnjačkim, toplim i suvim mestima koja nisu izložena mrazovima. Rasprostranjen je u srednjoj i južnoj Evropi, Maloj Aziji, Krimu i Kavkazu (Nicholson i Wallis, 1963). Na prostorima bivše Jugoslavije raste u Srbiji, Hrvatskoj, Bosni i Hercegovini, Makedoniji.

Ima primenu u hortikulturi. Drvo drenovine je jako tvrdo, teško i žilavo, pa se upotrebljava za različite svrhe. Drenjine se koriste u ljudskoj ishrani, bilo da se konzumiraju sirove ili u vidu raznih prehrambenih preradjevina. Od zrelih plodova drena dobijaju se proizvodi (sok, čaj) koji služe za lečenje dijareje i drugih oboljenja organa za varenje. Od suvih drenjina dobija se osvežavajući čajni napitak. Drenjine ponekad služe i za pravljanje vina i rakije. Sveže i osušene drenjine u Rusiji koriste se protiv malokrvnosti, za lečenje kožnih oboljenja, nazeba. Ispržene semenke mogu poslužiti kao surogat kafe (Šilić, 2002).

2.1.3. Familija *Grossulariaceae*

Familija *Grossulariaceae* (ogrozda) je familija dikotiledonih biljaka iz reda Saxifragales, koja, obuhvata jedan rod ribizli i ogrozda (*Ribes*) sa oko 150 vrsta. Pojedini autori izdvajaju vrstu ogrozd (*Ribes uva-crispa*) u poseban rod *Grossulariaceae*. Familija je rasprostranjena u Severnoj Zemljinoj polulopti i duž Anda u Južnoj Americi.

2.1.3.1. Crvena ribizla (*Ribes rubrum* L.)



Slika 2.9: Crvena ribizla - *Ribes rubrum* L.

Crvena ribizla (*Ribes rubrum* L.) koja pripada porodici biljaka *Grossulariaceae* od vitamina sadrži beta - karoten (provitamin A), vitamine C i E, vitamine B kompleksa,

nikotinsku i pantotensku kiselinu (vitamini B3 i B5) i biotin (vitamin H). Takođe sadrži: kalijum, kalcijum, fosfor, magnezijum, gvožđe, cink, jod, bakar i fluor, selen (koji je više zastupljen u crvenim u odnosu na crne ribizle) (Mikulic-Petkovsek i sar., 2012).

Ribizla pripada grupi bobičastog voća. Postoje crvena, crna i bela ribizla. Kod nas je teško pronaći bele bobice koje su i najslađe, dok crnih i crvenih ima u izobilju. Poznato je da je crvena ribizla manje kalorična od crne jer sadrži: 36 kalorija u 100 grama, a crna 47 kalorija (Schwarz i Hofmann, 2007; Mikulic-Petkovsek i sar., 2012).

Ribizle su moćan antioksidans jer su bogate gvožđem i vitaminom C i blagotvorno deluju na jetru, kosti, srce, želudac, creva. Pomažu kod bubrežnih tegoba i u lečenju infekcija. Crveni plodovi jačaju imunitet i ubrzavaju oporavak posle hirurških intervencija. Plod ribizle i njegove preradjevine doprinose normalizaciji i stabilizovanju krvnog pritiska pa se preporučuje osobama sa visokim pritiskom (Mikulic-Petkovsek i sar., 2012).

U prirodi, ribizla se može naći kao samonikla, a može biti i kultivisana. Ranije, pre otkrića njene lekovitosti, gajena je u baštama samo kao dekorativna biljka, naročito u severnoj Evropi. Odgovaraju joj mesta izložena suncu i vetru, gde je visoka vlažnost i tu najbolje uspeva. Važi za jednu od najkiselijih voćki, ali je izuzetno sočna i ukusna.

Ribizla se konzumira sveža, kao desertno voće dodatak jelima i za razne preradjevine u prehrambenoj industriji.

Široku primenu ima i slatko vino od ribizle.

2.1.3.2. Crna ribizla (*Ribes nigrum* L.)



Slika 2.10: Crna ribizla - *Ribes nigrum* L.

Crna ribizla (*Ribes nigrum* L.) sadrži skoro četiri puta više beta-karotena (provitamina A), vitamina C i E u odnosu na crvenu ribizlu, dok vitamina B kompleksa imaju podjednako, uključujući i nikotinsku i pantotensku kiselinu (vitamini B3 i B5), kao i biotin (vitamin H) (Brickell, 1992). Crna ribizla je bogatija vitaminom C čak i od južnog voća. Što se tiče minerala, kalijuma, kalcijuma, fosfora, magnezijuma, gvožđa, cinka, joda, bakra i fluora, ima ih podjednako i u crnoj i u crvenoj ribizli, jedino hroma ima više u crnim ribizlama. Crna ribizla ima daleko više vlakana i minerala u odnosu na crvenu (Brickell, 1992).

Crni plodovi ribizle pozitivno deluju na koncentraciju, blagotvorni su kod svih upala, naročito pluća, a čaj od njih je izvrstan za rad bubrega, ublažava tegobe kod reume, a takođe i stabilizuje krvni pritisak. Pozitivno dejstvo crna ribizla ima kod proširenih vena, a sok pomaže pri lečenju krvarenja desni i blagotvorno deluje na žene u toku trudnoće i dojenja. Naročito je dobra za anemične osobe jer utiče na poboljšanje krvne slike (Jaworska i sar., 2011).

Za potrebe farmacije koriste se i plod i list ribizle, posebno crne. Generalno, ribizla ima izuzetno veliku nutritivnu vrednosti trebalo bi da je zastupljena u svakodnevnoj ishrani.

Crna ribizla veoma nalikuje na crvenu, samo što njeni listovi sa donje strane imaju uljne žlezde. Cvetovi su joj žučkasto-zeleni, a po rubovima crveno-smeđi dok su bobice u početku takođe crvenosmeđe boje, a kada sazru postaju crvenije i tamnije. Drugi nazivi su boričak, ivanovo grožđe, ribez. Pretpostavlja se da je ribizla poreklom sa područja Sredozemlja odakle se proširila po srednjoj Evropi.

Uspeva na mestima koja su izložena suncu ali neophodna joj je i vlaga. Kiselost zemljišta bi trebala da se kreće između pH 5,5-7,0.

2.2. Fenolna jedinjenja u biljnim vrstama familija *Rosaceae*, *Cornaceae* i *Grossulariaceae*

Fenolna jedinjenja su sekundarni metaboliti i sintetišu se iz fenilalanina. Mogu se definisati kao supstance koje poseduju aromatični prsten sa jednom ili više hidroksilnom grupom.

Biljke sadrže veoma različite fenolne derivate, uključujući derivate benzoeve, cimetne kiseline, flavonoide, izoflavonoide, lignane i tanine (Shahidi, 2000). U ispitivanim

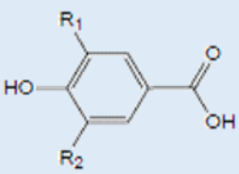
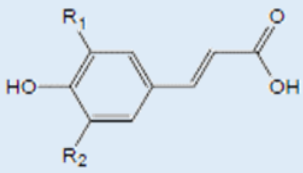
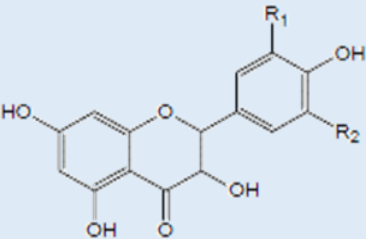
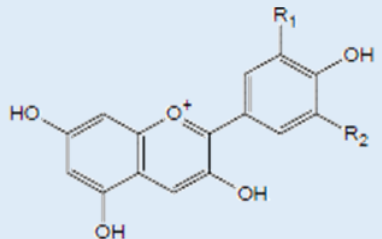
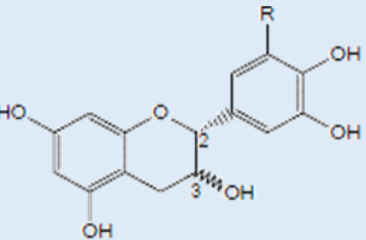
plodovima, najzastupljenije fenolne klase su hidroksibenzoeve kiseline, hidroksicimetne kiseline, flavonoli, antocijani, flavan-3-oli i proantocijanidini i elagotanini (slike 2.11a i b).

Fenolna jedinjenja se formiraju preko „shikimic acid” metaboličkog puta po kome se prvo formira amino kiselina fenilalanin. Oslobođanjem amonijaka i pomoću katalizovane fenilnilinamonijum liaze formira se *trans*-cimetna, koja predstavlja prekursor nekoliko jednostavnih fenolnih kiselina, kao što *para*-kumarna kiselina.

p-Kumarna kiselina se dalje transformiše u kafenu, ferulnu i sinapinsku kiselinu. Ova jedinjenja poseduju C6 prsten i bočni C3 lanac, i zajednički se nazivaju fenilpropanoidi (Naczk i Shahidi, 2003; Shahidi i Chandrasekara, 2010). Derivati benzoeve kiseline nastaju raskidanjem veza između dva ugljenična atoma fenilpropanoida. Slično fenolpropanoidnoj seriji, hidroksilacija i metilacija hidroksibenzoeve kiseline vodi do formiranja dihidroksibenzoeve kiseline, protokatehinske kiseline, vanilinske kiseline, siringinske i galne kiseline.

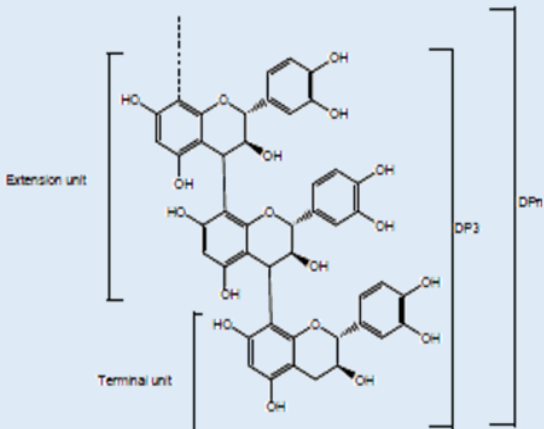
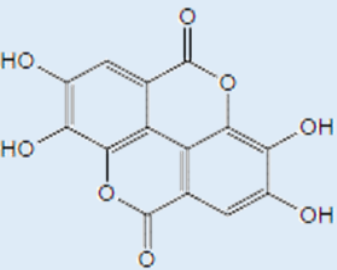
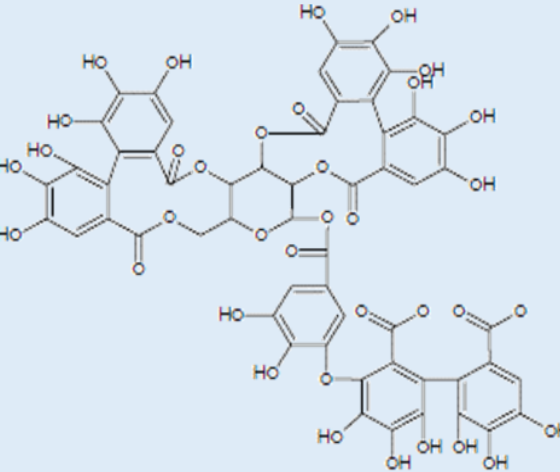
Hidroksibenzoeve kiseline su često prisutne u veznom obliku u hrani, i često su komponente kompleksnih struktura kao što su hidrofilni tanini (Naczk i Shahidi, 2003; Robert i Mike, 2006).

Strukture prisutnih fenolnih jedinjenja ispitivanih plodova prikazane su na slikama 2.11a i b.

Klasa	Struktura	Trivijalno ime
Hidroksibenzojeve kiseline		<i>P</i> -hidroksibenzojeva kiselina $R_1 = R_2 = H$ Galna kiselina $R_1 = R_2 = OH$ Protokatehinska kiselina $R_1 = OH, R_2 = H$ Vanilinska kiselina $R_1 = OCH_3, R_2 = H$ Siringinska kiselina $R_1 = R_2 = OCH_3$
Hidroksicimetne kiseline		<i>P</i> -kumarna kiselina $R_1 = R_2 = H$ Kafena kiselina $R_1 = OH, R_2 = H$ Ferulna kiselina $R_1 = OCH_3, R_2 = H$ Sinapinska kiselina $R_1 = R_2 = OCH_3$
Flavonoli		Kemferol $R_1 = R_2 = H$ Kvercetin $R_1 = OH, R_2 = H$ Miricetin $R_1 = R_2 = OH$ Izorharmnetin $R_1 = OCH_3, R_2 = H$
Antocijani		Pelargonidin $R_1 = R_2 = H$ Cijanidin $R_1 = OH, R_2 = H$ Delfinidin $R_1 = R_2 = OH$ Peonidin $R_1 = OCH_3, R_2 = H$ Petunidin $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$ Malvidin $R_1 = R_2 = OCH_3$
Flavan-3-oli		(+)-katehin (2R, 3S) $R = H$ (-)-epikatehin (2R, 3R) $R = H$ (+)-galokatehin (2R, 3S) $R = OH$ (-)-epigalokatehin (2R, 3R) $R = OH$

Slika 2.11a: Struktura fenolnih jedinjenja u ispitivanim biljnim vrstama

Flavonoidi se formiraju kondenzacijom enolpropanoidnog jedinjenja (C6–C3) sa malonil koenzimom A, koja vodi do formiranja halkona, koji subsekventno ciklizuju u kiselj sredini. Ovi, flavonoidi imaju osnovnu strukturu difenilpropana (C6–C3–C6), i zavisno od substitucije i nezasićenosti formiraju flavonole, flavan-3-ole i slična jedinjenja. Flavanoli i flavonoli absorbuju ultraljubičastu (UV) svetlost od 280 do 365 nm, dok anthocijani absorbuju UV i vidljivu svetlost od 280 and 520 nm (Naczki i Shahidi, 2003; Robert i Mike, 2006).

Klasa	Struktura	Trivijalno ime
Proantocijanidini		Procijanodin oligomer
Elaginska kiselina		Elaginska kiselina
Elagotanini		Elagotanidni dimer

Slika 2.11b: Struktura fenolnih jedinjenja u ispitivanim biljnim vrstama

2.2.1.. Hidroksibenzoeve kiseline

Hidroksibenzoeve kiseline koje se nalaze u jestivim plodovima su: *p*-hidroksibenzoeva kiselina, galna, protokatehinska, vanilinska i siringinska kiselina. Utvrđeno je da plodovi vrsta *Vaccinium* kao što su borovnice, brusnice, i *Rubus* kao što su maline, kupine, jagode su bogate hidroksibenzoevim kiselinama (Määttä - Riihinen i sar.,

2004a; Määttä-Riihinen i sar., 2004b; Taruscio i sar., 2004; Mattila i sar., 2006; Li i sar., 2009). Galna kiselina je najprisutnija u malinama i šipurku, dok je protokatehinska kiselina dominantana u brusnici, crvenoj i crnoj ribizli (Mattila i sar., 2006; Tuberoso i sar., 2010).

2.2.2. Hidroksicimetne kiseline

Najčešće pronađene hidroksicimetne kiseline u jestivim plodovima su: *p*-kumarna, kafena i ferulna kiselina (Robbins, 2003; Shahidi i Chandrasekara, 2010). Javljaju se vezane za biljni materijal ćelijskog zida ili kao estri hininske kiseline ili glukoze (Mattila i Kumpulainen, 2002). Samo je mala frakcija hidroksicimetnih kiselina u slobodnom obliku (Robbins, 2003).

Hlorogena kiselina, koja je estar kafene i hininske kiseline (5-*O*-kafeoilhininska kiselina) i jedna je od najčešćih hidroksicimetnih kiselina nađenih u biljkama (Mattila i sar., 2006).

Ferulna i *p*-kumarna kiselina su najčešće hidroksicimetne kiseline vezane za hemicelulozu (Andreasen i sar., 2001; Niño-Medina i sar., 2010). Sinapinska kiselina je nađena u uljanoj repici (Vuorela i sar., 2003; Thiyam i sar., 2006; Khattab i sar., 2010). Jerebika je bogata hlorogenom kiselinom (Kähkönen i sar., 2001; Hukkanen i sar., 2006; Mattila i sar., 2006). Borovnica, aronija i slični plodovi, sadrže velike količine derivata kafene kiseline (Määttä-Riihinen i sar., 2004a; Määttä-Riihinen i sar., 2004b; Taruscio i sar., 2004; Hukkanen i sar., 2006; Mattila i sar., 2006). U crnim i crvenim ribizlama, malini, jagodi i dr., najzastupljenija hidroksicimetna kiselina je *p*-kumarna kiselina, (Määttä-Riihinen i sar., 2004a; Määttä-Riihinen i sar., 2004b; Taruscio i sar., 2004; Li i sar., 2009; Mattila i sar., 2006; Buendía i sar., 2010).

2.2.3. Flavonoli

Najzastupljeniji flavonoli koji su pronađeni u jestivim plodovima su: kvercetin, miricetin, kempferol i isorhamnetin. Flavonoli, naročito kvercetin su značajni za plodove kao što je borovnica, aronija i crna ribizla (Häkkinen i sar., 1999; Määttä-Riihinen i sar., 2004a; Borges i sar., 2010).

U komini američke brusnice utvrđeno je da sadrži veliku količinu flavonola (White i sar., 2010b).

U crnoj ribizli je najzastupljeniji isorhamnetin (Määttä-Riihinen i sar., 2004a; Määttä-Riihinen i sar., 2004b; Taruscio i sar., 2004; Lätti i sar., 2009; Borges i sar., 2010; Buendía i sar., 2010; Tuberoso i sar., 2010; Hager i sar., 2010).

2.2.4. Antocijani

Antocijani su pigmentna jedinjenja u pokožnom tkivu u plodovima (White i sar., 2010a). Prisutni su u obliku obojenog flavilijum katjona, ali se takođe mogu naći u neobojenom obliku zavisno od pH sredine.

Antocijani imaju flavonoidni skelet C6-C3-C6 i uglavnom su u glikozidnom obliku. Glukoza, ramnoza, galaktoza i arabinoza su šećeri koji su glikozidnim vezama vezani za antocijane kao 3-glikozidi ili 3,5-diglikozidi. Rutinozidi, soforozidi i sambubiozidi se takođe javljaju. Glikozidacija povećava stabilnost antocijana (Dao i sar., 1998).

Aglikoni antocijana uključuju cijanidin, delfinidin, malvidin, pelaronidin, peonidin i petunidin.

Crna ribizla, borovnica, brusnica i ostali jestivi plodovi bogati su antocijanima (Määttä-Riihinen i sar., 2004a; Koponen i sar., 2007; Ogawa i sar., 2008; Li i sar., 2009). Delfinidini su najčešći u crnoj ribizli (Ogawa i sar., 2008). Kod nekih autora glikozidi cijadina su zastupljeni u crvenoj ribizli, malini, kupini. Kähkönen i sar., 2003; Määttä-Riihinen i sar., 2004a; Määttä-Riihinen i sar., 2004b; Ogawa i sar., 2008).

U evropskoj brusnici najzastupljeniji antocijani su peonidini, dok u američkoj cijanidni derivati. Antocijani jagoda uglavnom sadrže pelargonidine (Määttä-Riihinen i sar., 2004a; Määttä-Riihinen i sar., 2004b; Taruscio i sar., 2004; Koponen i sar., 2007; Ogawa i sar., 2008).

2.2.5. Flavan-3-oli i proantocijanidini

Proantocijanidini se formiraju od flavan-3-olnih jedinica preko interflavanskih veza. Flavan-3-oli imaju flavonoidni skelet C6-C3-C6. Najčešći flavan-3-oli : (+)-katehin, (-)-epikatehin, galokatehin i epigalokatehin. Procijanidini se formiraju od (epi)katehin-jedinica, dok prodelfinidini se formiraju od (epi)galokatehina. Retki propelargonidini se formiraju od

(epi) afzelehina i mogu se takođe naći u plodovima kao što je jagoda (Mc Dougall i sar., 2008).

Monomerne flavan jedinice proantocijanidina su vezane sa ostalim flavan jedinicama C-C vezama. C4 pozicija spoljne jedinice (ekstenziona jedinica) je vezana za unutrašnje jedinice (terminalne jedinice) C8 ili C6. Oni se nazivaju B-tip proantocijanidina. A-tip proantocijanidina sadrži dve različite interflavanske veze. Ostalo je isto kao kod B-tipa na poziciji C4-C8 ili C4-C6. Druga veza je između C2 spoljne jedinice i bilo C5 ili C7 unutrašnje jedinice (White i sar., 2010a).

2.2.6. Elagotanini

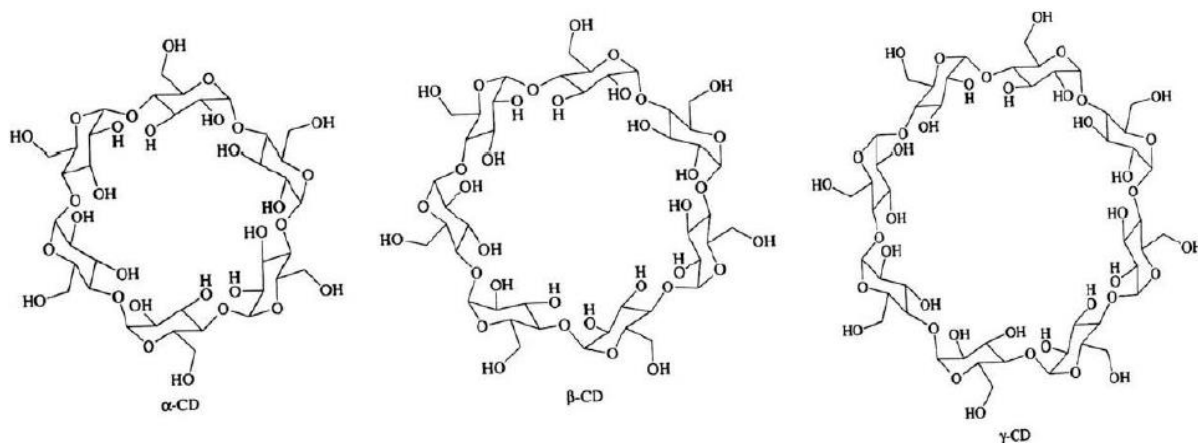
Elagotanini su tanini koji sadrže estre heksahidroksidifenolne kiseline i poliola (glukoza ili hininska kiselina). Kada su elagotanini izloženi kiselinama ili bazama, estarska veza hidrolizuje u heksahidroksifeninsku kiselinu koja spontano prelazi u elaginsku kiselinu (Buendía i sar., 2010). Monomeri elagotanina mogu dalje polimerizovati i formirati dimere, trimere i oligomere.

U kupinama i malinama najčešći elagotanini su: sanguin H-6, lambertianin D, kasuarictin, potentillin, pedunculagin (Clifford i Scalbert 2000; Borges i sar., 2010). Gasperotti i sar. (2010) su našli da u malini i kupini, lambertianin C i sanguin H-6 su najzastupljeniji elagotanini sa 81% ukupnih elagotanina u malini i 67% u kupini.

2.3. Inkluzioni kompleksi fenolnih kiselina sa ciklodekstranima

Ciklodekstrini su prirodna jedinjenja sa velikim mogućnostima primene u farmaceutskoj industriji. Mogu se primeniti kao nosači lekova ili u kompleksiranju lekovitih supstanci (slabo rastvorne, neprijatnog mirisa i lako degradibilne supstance) po tipu inkluzionih kompleksa uključujući sve forme aplikacije leka (lokalno, oralno, parenteralno). Ciklodekstrini su neredukujući oligosaharidi cilindričnog oblika koji podseća na zarubljenu kupu. U zavisnosti od broja glukopiranoznih jedinica koje su povezane α -(1→4) glukozidnom vezom mogu biti cikloheksaamiloze (sa šest glukopiranoznih jedinica, α -ciklodekstrin), cikloheptaamiloze (sa sedam glukopiranoznih jedinica, β - ciklodekstrin,) i

ciklooktaamiloze (sa osam glukopiranoznih jedinica, γ -ciklodekstrin). Struktura α -, β - i γ -ciklodekstrina prikazana je na slici 2.12:

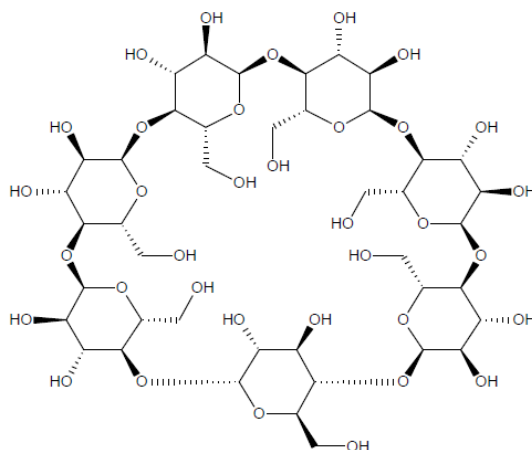


Slika 2.12: Tipovi prirodnih ciklodekstrina

Analizom pomoću X-zraka dokazano je da su kod ciklodekstrina glukozidni ostatci nalaze u termodinamički stabilnijoj konformaciji stolice, zbog toga što su svi supstituenti u ekvatorijalnom položaju. Kao posledica ovakve konformacije, sve sekundarne hidroksilne grupe (OH-2 i OH-3) su locirane na široj strani cilindričnog molekula, dok su sve primarne hidroksilne grupe (OH-6), na užoj strani torusa molekula. Ovakva pozicija hidroksilnih grupa na obe strane šupljine pokazuje da je njegova šira strana okružena sa sekundarnim hidroksilnim grupama tj. da je spoljna strana ciklodekstrina hidrofilna i dozvoljava rastvaranje u vodenoj sredini. S druge strane unutrašnja šupljina ciklodekstrina mnogo je hidrofobnija po karakteru, zbog toga što se slobodni elektronski parovi kiseonika sa glikozidnog kiseoničnog mosta nalaze u unutrašnjosti šupljina. Strukturna formula i šematski prikaz molekula ciklodekstrina dat je na primeru β -ciklodekstrina, slika 13.

Jaka vodonična veza postoji između OH-2 i OH-3 grupe, OH-3 grupa se ponaša kao donor protona. Odnos jačina vodoničnih veza kod ciklodekstrina je: α -CD < β -CD < γ -CD.

OH-6 grupe mogu da se povezuju vodoničnim vezama sa donje strane cikličnog molekula, ali su ove veze destabilizovane dipolnim efektima, lako se raspadaju u vodi i obično ih nema u kristalima ciklodekstrina. (Cannava i sar., 2010; Koontz i sar., 2009).



Slika 2.13: Molekul β -ciklodekstrina (β -CD)

Sa spoljne strane, najčešće se nalaze hidroksilne grupe, a u unutrašnjosti molekula su atomi vodonika. U vodenom rastvoru ove hidrofobne šupljine sadrže 3 (α -CD), 7 (β -CD) ili 9 (γ -CD) slabo vezanih molekula vode. Njihova gustina u šupljinama je mala, a one su dovoljno velike da prime još molekula. Ciklodekstrini mogu da vežu nepolarne alifatične i aromatične molekule aktivne komponente, odgovarajućih dimenzija. Oni se jedine u odnosu 1:1, 2:1 i 1:2, što zavisi od gostujućeg molekula. (Koontz i sar., 2009).

Osim osnovnih ciklodekstrina koriste se i njihovi derivati u farmaceutskoj industriji. Oni mogu biti pripremljeni hemijskom ili enzimskom reakcijom. Svi derivati ciklodekstrina grade "molekulska inkluziona jedinjenja". Zbog dobre rastvorljivosti u vodi, bolja je biološka raspoloživost aktivne komponente, produženi vek trajanja, smanjen neprijatan miris i ukus i smanjeni sporedni efekti farmaceutskog preparata, zbog manjih unetih količina u organizam. Zbog ovih osobina inkluzioni kompleksi sa β -ciklodekstrinom imaju veliku primenu farmaceutskoj industriji. (Fang i sar., 2010; Hsu i sar., 2008).

Svi ciklodekstrini i njihovi derivati grade kanalska inkluziona jedinjenja tj. takozvana "molekulska inkluziona jedinjenja". Kod ovih jedinjenja, jedan jedini molekul može u unutrašnjosti svog velikog prstena (šupljina kanala prečnika 0,5-0,9 nm) da primi molekul druge komponente. U kristalnom stanju su pojedini spiralno uvijeni molekuli ciklodekstrina raspoređeni jedan iznad drugog i obrazuju duži kanal u koji se mogu smestiti molekuli raznih organskih supstanci što predstavlja takozvano molekularno inkapsuliranje. Brojni su primeri molekulskih inkluzionih kompleksa ciklodekstrina i njihovih derivata naročito sa raznim vrstama aktivnih farmaceutskih jedinjenja (Nikolić, 2003).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijali

Ogledom su obuhvaćene sledeće biljne vrste: domaća kupina, domaća malina, trnjina, divlja kupina, šipurak, glog, crna ribizla, crvena ribizla, i dren iz Leskovačkog i Vlasinskog regiona.

Uzorci domaćeg ispitivanih plodova prikupljani su u Leskovačkom regionu koji se nalazi u jugoistočnoj Srbiji, na nadmorskoj visini od 210 do 240 m i predstavlja područje plodne kotline. Klima ovog područja je blaga, umereno-kontinentalna sa prosečnom godišnjom temperaturom od 11,4 °C .

Korišćena sorta domaće kupine je Čačanska kupina koja je široko rasprostranjena u Srbiji. To je nova domaća sorta stvorena u Institutu za voćarstvo u Čačku ukrštanjem sorti Dirksen i Blek Satin (Mratinić, 1998). Glavni razlog rasprostranjenosti je redovna i obilna rodnost i dobar kvalitet ove sorte kupina. Plod je krupan, do 2-3 cm, zavisno od vremenskih uslova dostigne i veličinu do 4 cm, preko 9 gr, izduženog cilindričnog oblika, sjajno crne boje, sa sitnim okruglim bobicama, raspoređenim gusto jedna uz drugu. U uslovima Leskovačkog regiona sazreva od poslednje trećine jula do kraja avgusta.

Korišćena sorta domaće maline je Vilamet, ovo je vodeća sorta maline u SAD i Kanadi, a popularna je i gajena i u Srbiji. Naša malina je američkog porekla nastala u Oregonu ukrštanjem malina Njuburg i Lojd Džordž. Plod je srednje krupnoće oko 4 g zaobljeno-kupastog oblika, tamno crvene boje. U uslovima Leskovačkog regiona sazreva od polovine juna do polovine jula.

Korišćena sorta crvene ribizle je Rolan. Plod je srednje krupnoće. Veličina bobica dostiže 1cm. Uzorci su brani u periodu komercijalne zrelosti, juna meseca 2011.

Korišćena sorta crne ribizle je Bona. Plod je takođe srednje krupnoće. Veličina bobica dostiže 0,8- 1 cm. Uzorci su brani u periodu komercijalne zrelosti, u drugoj polovini juna meseca 2011. godine. Odmah nakon berbe svi plodovi su zamrznuti i čuvani na – 20 °C do analiza.

Uzorci divljih biljnih vrsta su prikupljani u Vlasinskom regionu koji se nalazi u jugoistočnoj Srbiji. Klima ovog područja je tipično za planine sa apsolutnom maksimalnom temperaturom vazduha od 31,6 °C i minimumom -31,5 °C.

Korišćene sorte divlja kupina, dren i trnjina sakupljane su u komercijalnoj fazi zrelosti jula i avgusta 2011. Korišćene su i sorte šipurka i gloga, koje su sakupljane u Leskovačkom regionu takođe u komercijalnoj fazi zrelosti jula i avgusta 2012. i 2013. godine.

Vaučer uzoraka biljnih vrsta (divlja kupina, dren i trnjina) deponovan je u Herbarijumu Instituta za botaniku botaničke baste "Jevremovac", Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu (BEOU, 1990). Uzorci pod pristupnim brojem 16634, 16635, i 16636 identifikovani su od strane prof dr Vladimira Ranđelovića.

Odmah nakon berbe svi plodovi su zamrznuti i čuvani na – 20 °C do analiza.

3.2. Aparatura

- UV/Vis spektrofotometar Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA) sa dužinom optičkog puta 1 cm za analizu ukupnog fenolnog sadržaja i ispitivanje antioksidativne aktivnosti i UV spektrofotometar (Varian Cary-100 Conc., SAD) za analizu inkluzionih kompleksa;
- HPLC sistem Agilent Technologies 1200 Series (Agilent Technologies, USA) koji se sastoji od kvaternarne pumpe G1354A, automatskog injektora G1329A, termostatanog kolonskog dela G1316A, UV/Vis detektora G1315D, fluorescentnog detektora G1321A kontrolisanog sa HP Chemstation softverom, za određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja;
- FT-IC spektrofotometar (Bomem Hartmann & Braun MB-series, Kanada)
- H-NMR spektrometar Bruker AC 250 E NMR, za karakterizaciju kompleksa (Nemačka) i difraktometar Phillips PW1030, (Nemačka).
- Diferencijalni skenirajući kalorimetar DSC Q20 (TA Instruments, SAD)
- MicroMed high purity water system (Thermo Fisher Scientific Inc, Nemačka), TKA Wasseraufbereitungssystem GmbH za dobijanje demineralizovane vode;
- Analitička vaga AB-204-S (Mettler Toledo, Švajcarska) za odmeravanje čvrstih supstanci;
- pH metar (Hanna Instruments, USA) za merenje pH vrednosti rastvora;
- Abeov refraktometar (Carl Zeiss Jena, Nemačka) za određivanje °Birix;
- Automatske pipete Labopette (Hirschmann Laborgerate, Nemačka) za pipetiranje rastvora;
- Električni blender (Braun, Nemačka) za homogenizovanje uzoraka;
- Magnetna mešalica;
- Ultrazvučno kupatilo od 3L, 500 W i 40 Hz (EI Niš, Srbija);

- Cilindrični fotohemijski reaktor za ozračivanje uzorka i ispitivanje fotostabilnosti “Rayonnet” sa 10 simetrično postavljenih UVB lampi, (Nemačka);
- Membranski filter veličine pora 0,45 μm (Econofilters, Agilent Technologies, Nemačka).

3.3. Hemikalije i reagensi

Hemikalije korišćene u eksperimentalnom delu ovog rada su: metanol, acetonitril, HPLC čistoće, mravlja kiselina, sirćetna kiselina i kalijum bromid FT-IR čistoće nabavljeni od proizvođača Merck (Darmstadt, Nemačka), dok su galna kiselina, kafena kiselina, *t*-kutarna kiselina, *p*-kumarna kiselina, malvidin-3-monoglukozid hlorid, cijanidin-3-glukozidhlorid, (+)-katehin, procijanidin B2, (-)-epikatehin, (-)-epikatehingalat, kvercetin, rutin, kvercetin-glukozid, luteolin-glukozid, miricetin-glukozid, kaemferol-glukozid i 2,2'-difetil-1-pikrilhidrazil (DPPH) slobodni radikal, nabavljeni od Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Korišćeni reagensi su analitičke čistoće. Rastvori su pripremani sa dejonizovanom vodom specifične provodljivosti 0,05 μS/cm. (+)-Rutin trihidrat (čistoće 97%) je dobijen od Alfa Aesar, A Johnson Matthey Company (Heysham, Velika Britanija). β-CD (čistoće 98%, prosečne mase $M_r \sim 1,135$, 1,0 molarni supstituisani dekstrin), HP-β-CD (čistoće 97%, prosečne mase $M_r \sim 1,540$, 1,0 molarni supstituisani dekstrin) su nabavljeni od Taufkirhen (Nemačka). Etanol (96%, v/v) od Zorka Pharma (Šabac, Srbija) i butil hidroksitoluen (BHT) (Centrohém, Stara Pazova, Srbija). Svi korišćeni reagensi i rastvarači bili su analitičke čistoće.

3.4. Priprema uzoraka

Reprezentativni uzorci biljnih vrsta sakupljani su u vreme berbe (zavisno od vrste voća) sa područja Jablaničkog (Leskovačkog) i Pčinjskog (Vlasinskog) regiona tokom tri uzastopne sezone od 2011. do 2013. godine. Plodovi su samleveni u blender i kao takvi korišćeni za ekstrakcije.

Za analizu fizioloških svojstava plodova korišćeni su reprezentivni uzorci, deo uzoraka je iskorišćen za merenje mase ploda, a deo je iskorišćen za određivanje ostalih fizioloških svojstva. U tom cilju plodovi su homogenizovani u blender, sok je odvojen od ostatka mase mehaničkim odvajanjem i filtriranjem.

U vreme berbe sakupljani su i uzorci listova ispitivanih plodova. Svi uzorci osušeni su na 60°C i samleveni u blender i kao takvi korišćeni za ekstrakcije.

3.4.1. Konvencijalna ekstrakcija (KE)

Uzorci plodova, ekstrakovani su sledećim rastvaračima metanol, etanol, voda, ili njihovih smeša zakiseljeni sirćetnom kiselinom, u različitom međusobnom zapreminskom odnosu, konstantnim mešanjem na 200 RPM, na temperaturi (20 - 50°C), na tamnom, određenog vremea od 30 s do 96 h . Odnos mase korišćenog biljnog materijala i ukupne zapremine rastvarača (hidromodul) je takođe menjan (1:5 do 1:15) u cilju poboljšanja prinosa ekstrakcije. Nakon toga ekstrakti su centrifugirani 10 min na 2500 o/min i uparavani do suva pomoću rotacionog vakuum uparivača. Dobijen čvrsti ostatak je rastvoren u metanolu do koncentracije od 0,1 g/mL.

3.4.2. Ultrazvučna ekstrakcija (UE)

Ekstrakcije su izvođene u ultrazvučnom kupatilu pod definisanim uslovima: frekvencija (20-40 kHz), snaga (250-500 W), odnos tečno/čvrsto (40-60), temperatura (20-50°C) i vreme izvođenja ekstrakcije (1-40 min). Korišćeni su sledeći rastvarači: metanol, aceton, voda i sirćetna kiselina. Nakon tretmana, ekstrakti su centrifugirani 10 min na 2500 o/min, i uparavani do suva. Čvrsti ostatak je rastvoren u metanolu do koncentracije od 0,1 g/mL. Svi ekstrakti su filtrirani pre analiza.

3.4.3. Priprema inkluzionih kompleksa

Inkluzioni kompleksi između rutina i kompleksirajućih agenasa pripremljeni su koprecipitacionom metodom u molskom odnosu 1:1. Rutin trihidrat (0,33 mmol) i β -ciklodekstrin (0,33 mmol), rutin trihidrat (0,25 mmol) i hidroksipropil- β -ciklodekstrin (0,25 mmol) suspendovani su u 125 mL 52,4% (v/v) etanolni rastvor. U cilju homogenizacije i uspostavljanja ravnoteže, suspenzije su mešane na magnetnoj mešalici pri sobnoj temperaturi u toku 24 h. Uzorci su tokom rada bili zaštićeni od dejstva dnevne svetlosti. Rastvori inkluzionih kompleksa su potom uparavani do zapremine od 5 mL na rotacionom vakuum uparivaču na 60 °C. Tako koncentrovani rastvori inkluzionih kompleksa osušeni su

u eksikatoru do konstantne mase uzoraka. Dobijeni su žuti kristali inkluzionih kompleksa zatim su sturkturno okarakterisati primenom pogodnih metoda.

3.4.4. Priprema fizičkih smeša

Fizičke smeše pripremljene su odmeravanjem odgovarajućih količina rutin trihidrata i β -CD, odnosno rutin trihidrata i HP- β -CD u molskom odnosu 1:1, kao i direktnim homogenizovanjem u staklenom sudu.

3.5. Analiza uzoraka

3.5.1. Određivanje prinosa ekstrakcije

Prinos ekstrakcije Y , izražen u procentima, izračunat je preko suve mase uzorka i ekstrakta (m_S i m_E , respektivno) nakon odvajanja rastvarača na osnovu sledeće formule:

$$Y (\%) = (m_E / m_S) \times 100 \quad (1)$$

3.5.2. Spektrometrijsko određivanje ukupnih fenola, hidroksi-cimetnih kiselina i flavonola

Ukupni fenolni sadržaj, kao i sadržaj hidroksicimetnih kiselina i flavonola u ekstraktima određivan je primenom modifikovane Mazin-ove metode (Mazza i sar., 1999): 0,25 mL razblaženog ekstrakta meša se sa 0,25 mL 0,1% HCl u 95% etanolu i 4,55 mL 2% HCl. Absorbanca dobijenih smeša očitava se nakon 15 min na UV/VIS spektrofotometru na talasnim dužinama od 280, 320 i 360 nm. Galna kiselina iskorišćena je za konstruisanje standardne krive, na osnovu koje se određuje ukupni fenolni sadržaj ekstrakta očitavanjem absorbanci na 280 nm, izražen preko ekvivalenata galne kiseline (GAE). Sadržaj hidroksicimetnih kiselina dobijen je očitavanjem absorbanci na 320 nm, a kao standard korišćena je kafena kiselina. Rezultati su izraženi preko ekvivalenata kafene kiseline (CAE). Sadržaj flavonola procenjen je očitavanjem absorbanci na 360 nm, a kao standard je korišćen kvercetin. Rezultati su izraženi preko ekvivalenata kvercetina (QE).

3.5.3. Spektrometrijsko određivanje ukupnih antocijana

Ukupni sadržaj antocijana određen je prema Rig-ovoj metodi (Rigo i sar., 2000). Ispitivani ekstrakti razblaženi su smešom rastvarača: etanol/voda/HCl (70/29/1) i nakon 15 min očitavana je absorbanca na talasnoj dužini od 540 nm. Malvidin-3-O-glukozid iskorišćen je kao standard, a rezultati su izraženi preko ekvivalentata malvidin-3-O-glukozida (eng. malvidin-3-O-glucoside equivalents-ME).

3.5.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Antioksidativna aktivnost određena je primenom 2,2'-difetil-1-pikrilhidrazil slobodnog radikala takozvanog DPPH testa (Choi i sar., 2002; Munoz-Espada i sar., 2004) koji se zasniva na merenju gubitka boje DPPH• radikala promenom absorbance na 515 nm uzrokovane reakcijom DPPH• radikalima sa ispitivanim ekstraktima. Absorbanca na 515 nm od razblaženog ekstrakta i sveže pripremljenog 1×10^{-4} M DPPH• metanolnog rastvora snima se nakon inkubacionog perioda od 20 min na sobnoj temperaturi. Antioksidativna aktivnost, odnosno kapacitet hvatanja slobodnih radikala (RSA,%) svakog ekstrakta određen je na osnovu sledeće formule:

$$\text{RSA, \%} = (1 - A_{\text{uzorak}} - A_{\text{blank}}/A_{\text{kontrola}}) \times 100 \quad (2)$$

Gde je: A_{kontrola} absorbanca kontrolne reakcije (3×10^{-4} M DPPH• metanolnog rastvora), A_{blank} je absorbanca razblaženog ekstrakta, A_{uzorak} absorbanca smeše razblaženog ekstrakta i DPPH• metanolnog rastvora.

Srednja efektivna koncentracija (EC_{50}) dalje je izračunata sa grafika konstruisanog nanošenjem različitih koncentracija ekstrakata (mL/g) na x-osi i njima odgovarajućih kapaciteta hvatanja slobodnih radikala (%) na y-osi jednostavnim očitavanjem koncentracije ekstrakta koja odgovara kapacitetu hvatanja slobodnih radikala od 50%.

3.5.5. HPLC analiza fenolnih jedinjenja

Fenolni sastav ekstrakata ispitivanih plodova analiziran je na HPLC uređaju povezanim sa UV-VIS i fluorescentnim detektorima. Pre analize ekstrakti su dodatno filtrirani kroz membranske filtere sa porama veličine 0,45 μm . Separacija je izvođena na koloni Agilent-Eclipse XDB C-18 4,6 \times 150 mm. Kolona je kalibrirana na 30 °C. Korišćena je HPLC metoda (Radovanović i sar., 2010). Kao rastvarači su korišćeni: mravlja kiselina/voda (5:95 v/v) - rastvarač A, i acetonitril/mravlja kiselina/voda (80:5:15 v/v) - rastvarač B. Korišćen je linearni eluacioni gradijent po sledećem: od 0 do 10 min, 0,0% B, od 10 do 28 min, 10,0% B, od 28 do 35 min, 25% B, od 35 do 40 min, 50% B, od 40 do 45 min, 80% B, i poslednjih 10 min 0% B. Injekciona zapremina bila je 5 μL , a protok mobilne faze bio je 0.9 mL/min. Za detekcione talasne dužine izabrane su 280, 320, 360 i 520 nm za DAD, i 275/322 nm ($\lambda_{\text{Ex}}/\lambda_{\text{Em}}$) za fluorescentnu detekciju. Različita fenolna jedinjenja su identifikovana upoređivanjem njihovih retencionih vremena i spektralnih karakteristika sa podacima originalnih standardnih komponenti, kao i sa podacima iz literature (Revilla i Ryan, 2000; Radovanović i Radovanović, 2010). Kvantifikacija je izvršena korišćenjem eksterne kalibracije sa čistim standardnim rastvorima fenolnih jedinjenja. Kalibracione krive (pet tačaka, n=2) bile su linearne, sa koeficijentom determinacije $R^2=0,99$. Rezultati su izraženi kao mg/kg mase ekstrakta.

3.5.6. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

3.5.6.1. Mikrobiološki sojevi

Antimikrobna aktivnost uzoraka ispitivana je protiv patogenih bakterija iz grupe Gram (+) bakterija: *Clostridium perfringens* (ATCC 19404), *Bacillus cereus* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Listeria monocytogenes* (ATCC 33090), *Sarcina lutea* (ATCC 9341) i *Micrococcus flavus* (ATCC 40240), iz grupe Gram (-) bakterija: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Shiella sonnei* (ATCC 25931), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) i *Proteus vulgaris* (ATCC 8427) i u odnosu na jedan patogeni kvasac *Candida albicans* (ATCC 10231).

3.5.6.2. Mikrodiluciona metoda

Mikrodiluciona metoda (National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS, 2007) korišćena je za određivanje minimalne inhibicione koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) ispitivanih uzoraka. Inokulumi patogenih sojeva uzeti su od prekonoćnih kultura uzgajanih na odgovarajućim čvrstim podlogama (Muller-Hinton agar za bakterije i Saburodekestrozni agar za kvasce) i pripremljene su suspenzije standardne zamućenosti tj. turbiditeta 0,5 McFarland-a. Serije duplih razblaženja testiranih uzoraka pripremane su u inokulisanim hranljivim bujonima 96 bunarića mikrotitarske ploče, u opsegu od 0,25-500 µg/mL. Konačna zapremina u svakom bunariću bila je 100 µL, a konačna koncentracija mikrobnih ćelija bila je 10⁶ CFU/mL u svakom bunariću. Ploče su inkubirane 24 h na 37 °C. Svi eksperimenti izvedeni su u tri ponavljanja. Korišćene su i dve kontrole, negativna kontrola je odgovarajući hranjivi medijum sa metanolom i pozitivna kontrola je medijum sa antibioticima: hloramfenikolom, streptomycinom i tetraciklinom. Rast mikroorganizama određen je očitavanjem absorbance na 620 nm pomoću univerzalnog čitača mikroploča (ThermoLabsystems, Multiskan EX, softver za Multiskan ver.2.6.). MIC (minimalna inhibitorna koncentracija) definisana je kao najmanja koncentracija testiranih ekstrakata na kojoj mikroorganizmi ne pokazuju vidljiv rast. U cilju određivanja MBC/MFC (minimalne baktericidne/fungicidne koncentracije), uzet je bujon iz svakog bunarića bez vidljivog rasta, inokuliran na Muller Hinton agaru (bakterije) i Saburodekestroznom agaru (kvasci) i inkubiran 24 h na 37 °C. MBC je definisana kao najniža koncentracija testiranih ekstrakata na kojoj je 99,9% inokuliranih mikroorganizama ubijeno.

3.5.7. Ispitivanje inkluzionih kompleksa

3.5.7.1. Infracrvena spektrofotometrija sa Fourier-ovom transformacijom (FT-IC)

FT-IC spektri uzoraka snimljeni su tehnikom tankih transparentnih tableta (pastila). Najpre je odmereno 150 mg kalijum bromida i 1 mg uzoraka, nakon čega je smeša podvrgnuta vakumiranju i presovanju pod pritiskom 100 MPa. Snimanja su vršena u oblasti

talasnih brojeva 4000-400 cm^{-1} na FT-IC spektrofotometru Bomem Hartmann & Braun MB-series. Na ovaj način izvršena je FT-IC analiza β -CD, HP- β -CD, rutin trihidrata, inkluzionih kompleksa rutin: β -CD i rutin:HP- β -CD i odgovarajućih fizičkih smeša. Spektri su obrađeni primenom softvera Win-Bomem Easy.

3.5.7.2. Nuklearna magnetna rezonanca ($^1\text{H-NMR}$)

$^1\text{H-NMR}$ spektri inkluzionih kompleksa rutina sa ciklodekstrinima snimljeni su na Bruker AC 250 E NMR spektrometru. Snimanja su vršena u staklenoj kivetu prečnika 5 mm sa radnom frekvencijom 250 MHz pri sobnoj temperaturi primenom metode sa višestrukim ponavljanjem pulseva. Kao rastvarač korišćena je deuterisana voda.

3.5.7.3. Difrakcija X-zraka (XRD)

Kod XRD analize uzorci su ozračeni monohromatskim CuK_α zračenjem. Analizirani ugao 2θ bio je u opsegu $5-50^\circ$ sa korakom $0,05^\circ$ i vremenom zadržavanja 2 s po koraku. Tokom snimanja napon i jačina struje iznosili su 40 kV i 15 mA, respektivno.

3.5.7.4. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Termičke karakteristike rutin trihidrata, β -CD, HP- β -CD, inkluzionih kompleksa i odgovarajućih fizičkih smeša ispitane su u atmosferi azota sa protokom $50 \text{ cm}^3/\text{min}$. Temperaturni opseg bio je u granici od 50 do 300°C , dok je brzina skeniranja iznosila $10^\circ\text{C}/\text{min}$. Snimanja su izvršena na diferencijalnom skenirajućem kalorimetru DSC Q20 TA Instruments. Uzorci (oko 3 mg) su hermetički zatvoreni u aluminijumsku posudu i analizirani zajedno sa praznom aluminijumskom posudom kao referentnim uzorkom.

3.5.7.5. UV-VIS spektroskopska analiza rutin trihidrata

Od osnovnog metanolnog rastvora rutin trihidrata ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$) pripremljena je serija rastvora u opsegu koncentracija $1-40 \mu\text{g}/\text{mL}$. Kalibraciona kriva konstruisana je merenjem apsorbanace pripremljenih rastvora u kvarcnim kivetama ($1\times 1\times 4,5 \text{ cm}$) na UV

spektrofotometru (Varian Cary-100 Conc.) pri talasnoj dužini od 358 nm. ApSORBANCija uzoraka merena je na sobnoj temperaturi. Kao slepa proba korišćen je metanol.

3.5.7.6. Ispitivanje fazne rastvorljivosti inkluzionih kompleksa

Studija fazne rastvorljivosti realizovana je prema metodi koju su opisali Higuchi and Connors (1965). Postupak se zasniva na dodatku rutin trihidrata u višku (50 mg) u vodenim rastvorima rastućih koncentracija β -CD, odnosno HP- β -CD. Serija vodenih rastvora različitih koncentracija ciklodekstrina ukupne zapremine 5 mL pripremljena je u normalnim sudovima od 10 mL. Koncentracija rastvora β -CD, odnosno HP- β -CD bila je u opsegu 0-2,5 mmol/L. Uzorci su mešani na sobnoj temperaturi tokom 24 h, a potom filtrirani kroz membranski filter veličine pora 0,45 μ m (Econofilters, Agilent Technologies, Nemačka). Nakon toga, količina rastvorenog rutina određena je spektrofotometrijski na 358 nm. Kao slepa proba korišćen je metanol. Prisustvo β -CD i HP- β -CD u vodenom rastvoru ne ometa spektrofotometrijsko određivanje koncentracije rutina. Konstanta stabilnosti reaktanata u molskom odnosu 1:1 inkluzionih kompleksa izračunata je na osnovu dijagrama fazne rastvorljivosti koji predstavlja zavisnost koncentracije rastvorenog rutina od koncentracije ciklodekstrina, korišćenjem jednačine 3:

$$K_{1:1} = \frac{nagib}{S_o \cdot (1 - nagib)} \quad (3)$$

gde je S_o rastvorljivost rutina bez prisustva β -CD, odnosno HP- β -CD na 25 °C, a *nagib* – nagib prave dijagrama fazne rastvorljivosti.

3.5.7.7. Ispitivanje fotostabilnosti inkluzionih kompleksa

Tačno odmerena količina rutin trihidrata (2,5 mg), kompleksa rutin: β -CD (2,6 mg) i rutin:HP- β -CD (3,2 mg) rastvorena je u 25 mL metanola. Uzorci su sonifikovani 15 min, a zatim izloženi dejstvu UVB zračenja u različitim vremenskim intervalima (0, 10, 60, 600, 1800, 3600 i 7200 s). Ozračivanje uzoraka vršeno je u cilindričnom fotohemijском reatoru "Rayonet" sa deset simetrično postavljenih UVB lampi sa maksimalnom emisijom na 300 nm. Tokom zračenja uzorci su čuvani u kvarcnim ćelijama (1×1×4,5 cm), koje su bile postavljene na kružnom rotirajućem držaču. Ukupni fluks energije UVB zračenja bio je 14,5 W/m². Ozračeni uzorci su dalje analizirani pomoću UV-Vis metode.

Kapacitet hvatanja slobodnih radikala rutina i njegovih kompleksa određen je primenom DPPH testa. BHT- butilhidroksitoluen je korišćen kao sintetski antioksidans u odnosu na koga je definisana aktivnost ispitivanih uzoraka. Ispitivana smeša sadržala je 1 mL etanolnog rastvora DPPH radikala (3×10^{-4} mol/L) i po 2,5 mL etanolnog rastvora rutina (1,56-100 $\mu\text{g/mL}$), BHT (8-250 $\mu\text{g/mL}$) i kompleksa rutin: β -CD (0,64-163,72 $\mu\text{g/mL}$) i rutin: HP- β -CD (0,44-56,87 $\mu\text{g/mL}$). Uzorci su čuvani na sobnoj temperaturi u toku 30 min. Apsorbanca uzoraka merena je na 517 nm. Pri istim uslovima, određena je i apsorbanca razblaženog etanolnog rastvora DPPH radikala (1 mL koncentrovanog rastvora DPPH radikala razblaženog sa 2,5 mL etanola). Inhibicija slobodnih DPPH radikala određen je na osnovu jednačine 2.

3.6. Statistička obrada podataka

Svi eksperimenti su ponavljani tri puta. Vrednosti su izražene kao srednja \pm standardna devijacija. Značajne razlike u podacima određene su korišćenjem analize varijansi (ANOVA), praćene Tukey-ovim testom. Podaci su analizirani korišćenjem softverskih paketa: Origin software package, version 7.0 i SPSS 20.0 software for Windows (IBM SPSS, USA).

3.6.1. Metodologije odziva površine (RSM)

Optimizacija uslova ekstrakcije fenolnih jedinjenja vršena je pomoću Metodologije odziva površine (RSM) korišćenjem softvera Design Expert (verzija 7.1.6, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA). Statistički modeli i njihove grafičke slike su konstruisani korišćenjem centralnog kompozitnog dizajna (eng. central composite design - CCD).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Optimizacija uslova ekstrakcije

Činjenica da biljke sadrže nekoliko hiljada sekundarnih metabolita stvara potrebu za razvojem brze i precizne ekstrakcione metode. Razvijeno je dosta procedura za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz različitog biljnog materijala u zavisnosti od konkretnih zahteva istraživanja. Waterman i Mole, 1994 pronašli su 33 različite ekstrakcione procedure publikovane u različitim biohemijskim istraživanjima. Ove procedure razlikuju se u vremenima ekstrakcije (od 30 s do 96 h, pa i nekoliko dana) i odnosu zapremine rastvarača i mase uzorka (od 2 do 200) (Bohm, 1998). U ovom delu biće diskutovani rezultati analiza dobijenih praćenjem različitih parametara klasične i ultrazvučne ekstrakcije.

4.1.1. Optimizacija klasične ekstrakcije – maceracije

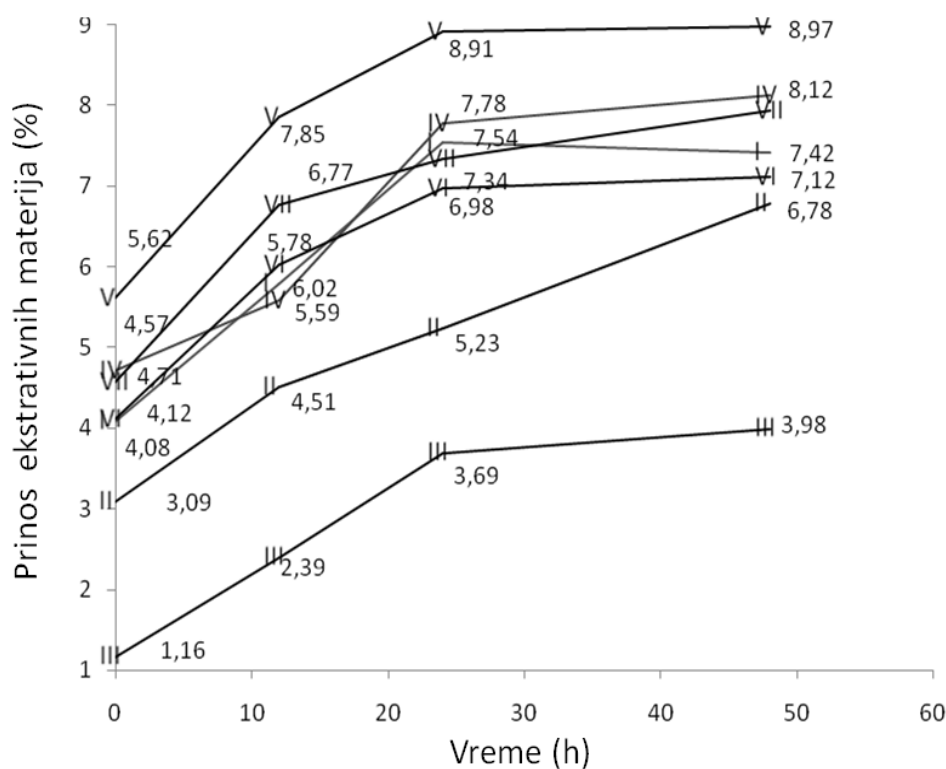
4.1.1.1. Uticaj rastvarača

Odabir rastvarača može mnogo uticati na ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz biljnog materijala. Fenolna jedinjenja iz biljnog materijala se dosta razlikuju po svojoj polarnosti, a često i kiselosti. Iz tih razloga se često pribegava primeni rastvarača različite polarnosti i različite pH vrednosti (Beekwilder i sar., 2005; Mertz i sar., 2007). U cilju izbora optimalnih uslova ekstrakcije ispitivani su sledeći rastvarači i smeše rastvarača koji su prikazani u tabeli 4.1.

U cilju ispitivanja optimalnih uslova ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz biljnih vrsta kao reprezentativni uzorak izabran je plod divlje kupine za dalja ispitivanja. Sve ekstrakcije su izvođene pod istim eksperimentalnim uslovima, kao što je opisano u eksperimentalnom delu. Ekstrakti su sakupljeni posle definisanog vremena i merena je masa ukupnih ekstraktivnih materija (masa suvog ostatka ekstrakta), a rezultati su prikazani na slici 4.1.

Tabela 4.1. Pregled rastvarača korišćenih za ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz biljnih vrsta

	Rastvarač v/v
I	Metanol/sirćetna kiselina (95/5)
II	Etanol/sirćetna kiselina (95/5)
III	Voda/sirćetna kiselina (95/5)
IV	Metanol/voda/sirćetna kiselina (50/45/5)
V	Metanol/voda/sirćetna kiselina (70/25/5)
VI	Etanol/voda/sirćetna kiselina (50/45/5)
VII	Etanol/voda/sirćetna kiselina (70/25/5)



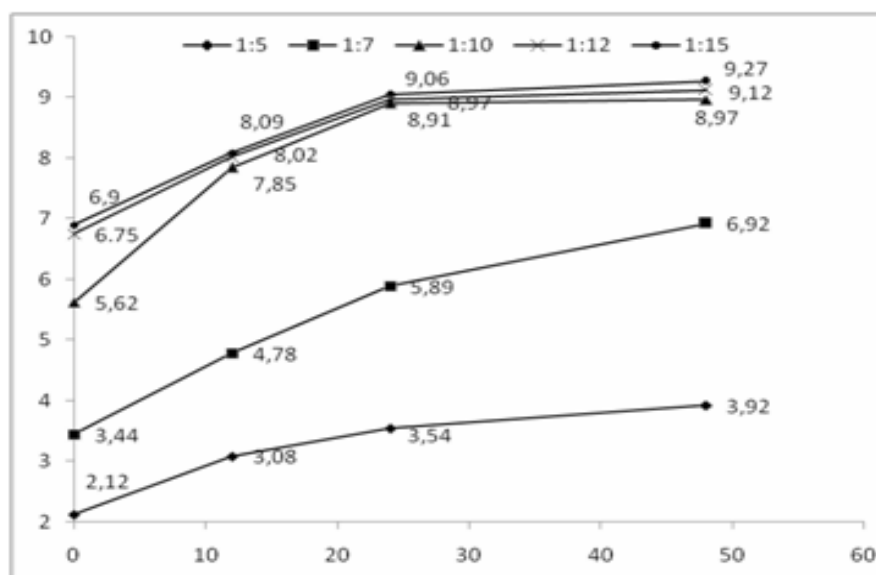
Slika 4.1. Prinos ekstraktivnih materija (%) u ekstraktima divlje kupine (*Rubus fruticosus* L.) dobijenih primenom različitih rastvarača (označenih brojevima od I do VII, Tabela 4.1)

Od dvofaznih sistema rastvarača prinos ekstraktivnih materija bio je najveći kod sistema metanol/sirćetna kiselina i to u proseku za 25% od prinosa ekstraktivnih materija upotrebom sistema rastvarača etanol/sirćetna kiselina i za 60% kad se upotrebljava sistem voda/sirćetna kiselina (slika 4.1).

Pored dvofaznih sistema za ekstrakciju ispitivani su i trofazni sistemi, kao što su sistemi rastvarača metanol/voda/sirćetna kiselina i etanol/voda/sirćetna kiselina u različitom međusobnom odnosu. Upotrebom ovakvih sistema rastvarača dobijen je veći prinos ekstraktivnih materija nego upotrebom dvofaznih sistema (slika 4.1). Rezultati pokazuju da prinos ekstraktivnih materija značajno zavisi kako od izbora rastvarača tako i od njihovog međusobnog odnosa u smeši koja se upotrebljava za ekstrakciju. Najveći prinos (8,97%) ekstraktivnih materija pokazao je ekstrakt dobijen upotrebom sistema rastvarača metanol/voda/sirćetna kiselina u odnosu 70/25/5, v/v/v dok je povećanjem udela vode u istom sistemu rastvarača njihov prinos bio manji za 20,62% (slika 4.1). Ovakva selektivna ekstrakcija fenolnih jedinjenja može se objasniti činjenicom da je u biljnim vrstama prisutan veliki broj različitih fenolnih jedinjenja koja se veoma razlikuju po svojoj kiselosti i polarnosti. Prisustvo vode povećava polarnost ekstrakcionog sredstva (dielektrična konstanta vode je 78,3 dok je za metanol 37,9 i etanol 25,2) i utiče na bubrenje biljnog materijala, što povećava kontaktnu površinu između biljnog matriksa i rastvarača (Hemwimon i sar., 2007). Međutim, eksperimentalni rezultati su pokazali da se najveći prinos fenolnih jedinjenja dobija upotrebom sistema rastvarača sa manjim procentnim sadržajem vode (slika 4.1). Ovo se može objasniti da pored polarnosti rastvarača treba uzeti u obzir i druge njihove osobine kao što su viskoznost i površinski napon. Povećanje viskoznosti proporcionalno smanjuje koeficijent difuzije, dok se smanjenje površinskog napona povoljno odražava na brzinu ekstrakcije. Ove karakteristike su znatno povoljnije kod organskih rastvarača nego kod vode. Najmanji viskozitet ima metanol, a zatim slede voda i etanol (0,6; 1 i 1,2 mPas, po redu javljanja). Površinski napon je za više od 60% manji kod organskih rastvarača (etanol-22,03 i metanol- $22,99 \times 10^{-3}$ N/m) nego kod vode ($72,5 \times 10^{-3}$ N/m). Ovakve vrednosti viskoziteta i površinskog napona imale su veliki uticaj na dobijanje visokog prinosa svih ispitivanih klasa fenolnih jedinjenja kod metanolsko-vodenih ekstrakata, što je u saglasnosti sa rezultatima ekstrakcije biljnog materijala drugih autora (Chirinos i sar., 2007; Alothman i sar., 2009). Takođe, metanol je efikasniji za ekstrakciju polifenola iz polarnih, vlaknastih matriksa (Chirinos i sar., 2007; Al Farsi i Lee, 2008).

4.1.1.2. Uticaj hidromodula na prinos ekstraktivnih materija

Pored odabira odgovarajućeg rastvarača tj. smeše rastvarača za dobijanje većeg prinosa ekstraktivnih materija bitno je i odabrati optimalni odnos mase biljne materije i ukupne zapremine rastvarača-hidromodula koji će se koristiti za ekstrakciju. Na slici 4.2 prikazani su rezultati prinosa ekstraktivnih materija iz ekstrakata dobijenih primenom različitih hidromodula.



Slika 4. Prinos ekstraktivnih materija (%) u ekstraktima divlje kupine (*Rubus fruticosus* L.) dobijenih primenom različitih hidromodula

Hidromodul u znatno manjoj mjeri utiče na prinos ekstraktivnih materija (slika 4.2) nego što je to slučaj sa uticajem rastvarača. Međutim ovo je također važan parametar pre svega sa ekonomske tačke gledišta, tj. kada je cilj dobijanje ekstrakata visokog sadržaja ciljnih jedinjenja sa što manjom količinom upotrebljenih rastvarača odnosno biljnog materijala.

Generalno, može se zaključiti da sa povećanjem zapremine rastvarača u odnosu na biljni materijal raste prinos ekstraktivnih materija. Prinos ekstraktivnih materija je u proseku veći za 62% upotrebom hidromodula 1:15 u poređenju sa prinosom kada je njihov hidromodul 1:5 (slika 4.2). Kako je razlika između hidromodula 1:10, 1:12 i 1:15 neznatna (ispod 1%), uzimajući u obzir ekonomsku stranu, korišćen je hidromodul od 1:10 kao optimalni za dalja ispitivanja.

4.1.1.3. Uticaj temperature ekstrakcije na na prinos ekstraktivnih materija

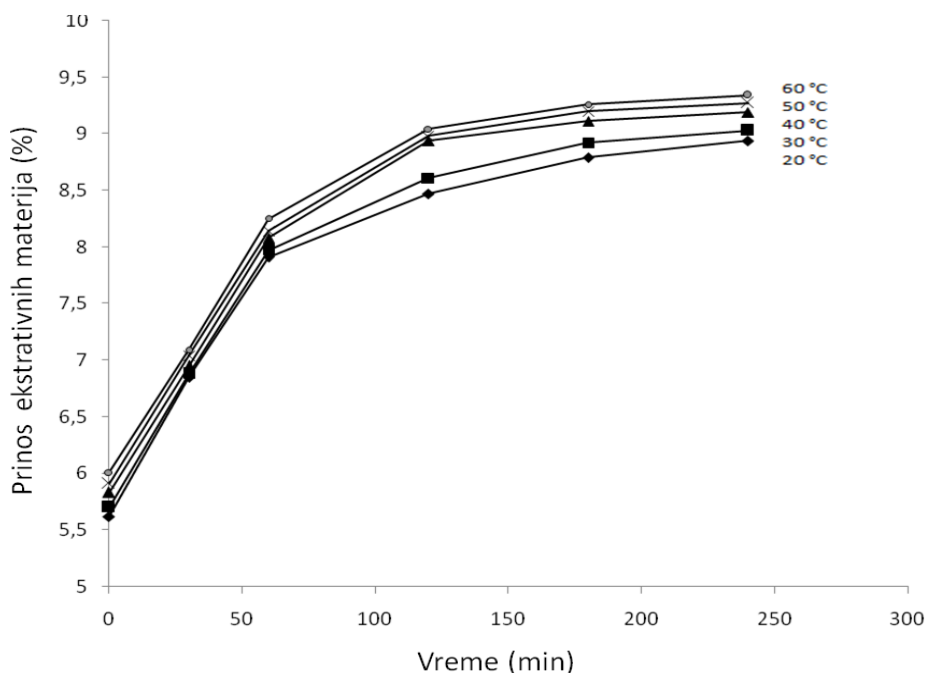
Temperatura na kojoj se izvodi ekstrakcija takođe ima uticaj na prinos ukupnih ekstraktivnih materija. Temperatura je limitirana tačkom ključanja korišćenih rastvarača, a takođe na višim temperaturama može doći do degradacije fenolnih jedinjenja. Uticaj temperature ekstrakcije na prinos ekstraktivnih materija ispitivna je u intervalu od 20 °C do 60 °C. Prinos ukupnih ekstraktivnih materija iz biljnog materijala dobijenih izvođenjem ekstrakcija na temperaturama u intervalu od 20 °C do 60 °C prikazan je u tabeli 4.2 i na slici 4.3.

Rezultati (tabela 4.2 i slika 4.3) pokazuju da postoji blago povećanje prinosa ekstraktivnih materija u svim ekstraktima sa povećanjem temperature. Povećanjem temperature od 20 °C na 60 °C prinos se povećao u proseku za 3 do 5%. U početku ekstrakcije ovo povećanje je bilo neznatno tj. temperatura je imala neznatan uticaj na ekstrahovanje da bi nakon 60 min ekstrahovanja uticaj temperature bio veći.

Sa povećanjem temperature smanjuje se viskoznost rastvarača, povećava koeficijent difuzije bioaktivnih materija kroz rastvarač, skraćuje vreme bubrenja i prodiranja rastvarača u ćelije biljnog materijala, što sve pozitivno utiče na proces ekstrakcije (Ponomarev, 1976). Daljim povećanjem temperature može doći do pada koncentracije pojedinih fenolnih jedinjenja u ekstraktu kao posledica oksidacionih i polimerizacionih procesa koji počinju na povišenim temperaturama. Kako povećanjem temperature iznad 40 °C ne dolazi do značajnijeg povećanja u prinosu ekstraktivnih materija, a i zbog smanjenja dodatnog unosa energije izabrana je temperatura ekstrakcije na 40 °C za optimalnu.

Tabela 4.2. Prinos ekstraktivnih materija (%) u ekstraktima divlje kupine dobijenih izvođenjem ekstrakcije na različitim temperaturama pri hidromodulu 1:10

Temperatura	Vreme ekstrakcije (min)	Prinos (%)
20	0	5,62 ± 0,10
	30	6,85 ± 0,09
	60	7,91 ± 0,14
	120	8,47 ± 0,15
	180	8,79 ± 0,12
	240	8,94 ± 0,13
30	0	5,7 ± 0,08
	30	6,88 ± 0,05
	60	7,97 ± 0,10
	120	8,61 ± 0,13
	180	8,92 ± 0,12
	240	9,03 ± 0,16
40	0	5,83 ± 0,07
	30	6,95 ± 0,09
	60	8,08 ± 0,10
	120	8,94 ± 0,16
	180	9,11 ± 0,15
	240	9,19 ± 0,10
50	0	5,91 ± 0,05
	30	7,04 ± 0,09
	60	8,14 ± 0,10
	120	8,98 ± 0,12
	180	9,2 ± 0,14
	240	9,27 ± 0,16
60	0	6,01 ± 0,10
	30	7,09 ± 0,09
	60	8,25 ± 0,13
	120	9,04 ± 0,14
	180	9,26 ± 0,12
	240	9,34 ± 0,15



Slika 4.3. Prinos ekstraktivnih materija (%) u ekstraktima divlje kupine (*Rubus fruticosus* L.) dobijenih izvođenjem ekstrakcije na različitim temperaturama pri hidromodulu 1:10

4.1.1.4. Kinetika klasične ekstrakcije

Za kinetička ispitivanja praćen je prinos ekstrakcije iz biljnih vrsta u vremenskom intervalu od 1 do 300 min (slike 4.4 i 4.5). Modelovanje kinetike ekstrakcije izvršeno je primenom dva modela: I - model zasnovan na empirijskoj jednačini Ponomarjev-a i II - model zasnovan na nestacionarnoj difuziji kroz biljni materijal (Ponomarjev, 1976).

Model I predstavlja matematički opis promene količine ekstraktivnih materija u biljnoj sirovini bez fizičke osnove (jednačina 4).

$$\frac{q_0 - q_i}{q_0} = b + k \cdot t \quad (4)$$

gde je:

q_0 – masa ekstraktivnih materija prisutnih u biljnoj sirovini na početku,

q_i – masa ekstraktivnih materija prisutnih u biljnoj sirovini posle određenog vremena ekstrakcije - t ,

b – koeficijent ispiranja i

k – koeficijent spore ekstrakcije (koeficijent pravca linearne zavisnosti).

Model I ukazuje da u periodu spore ekstrakcije postoji linearna zavisnost između normalizovane mase ekstraktivnih materija $\frac{q_0 - q_i}{q_0}$ i vremena t .

Koeficijent ispiranja (b) je mera mase ekstraktivnih materija koja se rastvori pošto se biljna sirovina potopi u rastvarač.

Koeficijent k je brzina rastvaranja ekstraktivnih materija u odnosu na njihovu početnu masu u toku spore ekstrakcije i smatra se specifičnom brzinom spore ekstrakcije.

Model II je fizički model zasnovan na difuziji ekstraktivnih materija kroz rastvor i može se opisati Fikovim zakonima.

Promena sadržaja ekstraktivnih materija opisuje se pojednostavljenom dvoparametarskom jednačinom (jednačina 5) i njenim linearizovanim oblikom (jednačina 6):

$$\frac{q_i}{q_0} = (1 + b') \cdot e^{-k' t} \quad (5)$$

$$\ln \frac{q_i}{q_0} = \ln(1 + b') - k' \cdot t \quad (6)$$

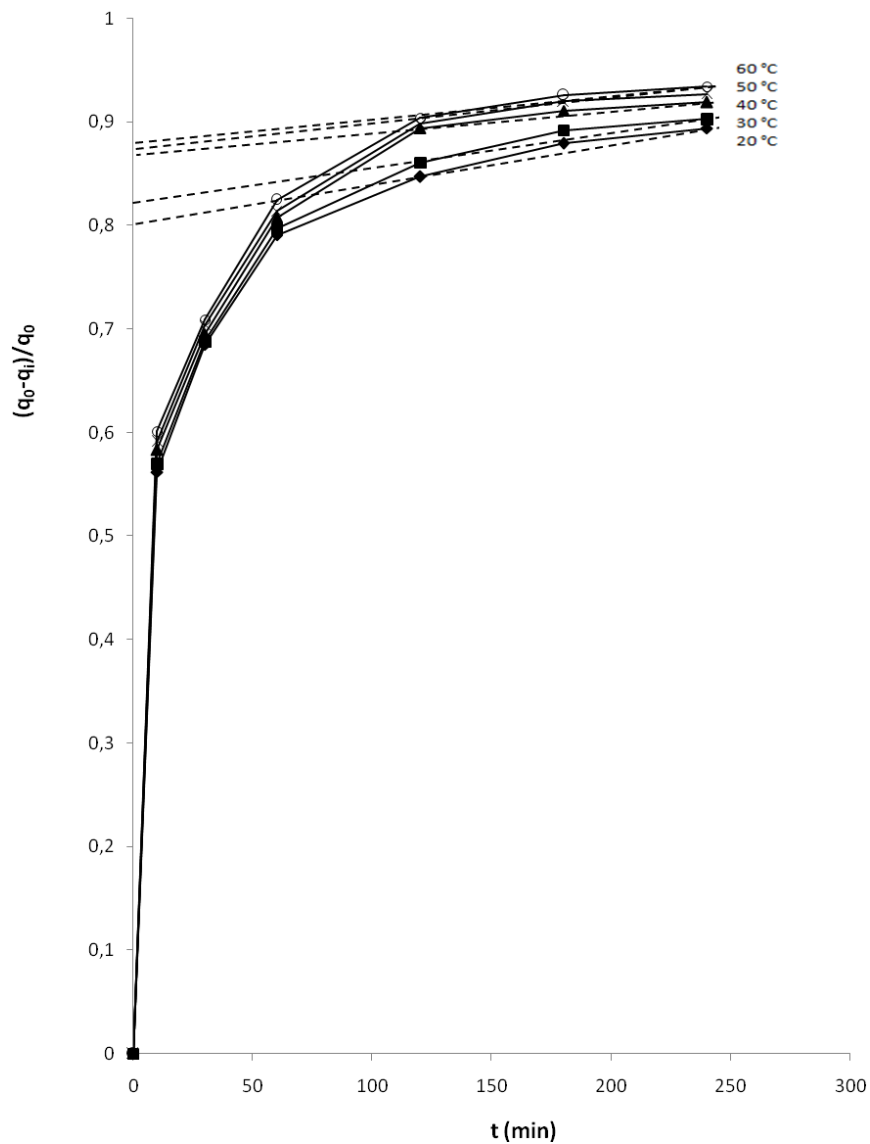
gde je:

q_0 – masa ekstraktivnih materija prisutnih u biljnoj sirovini na početku,

q_i – masa ekstraktivnih materija prisutnih u biljnoj sirovini posle određenog vremena ekstrakcije - t ,

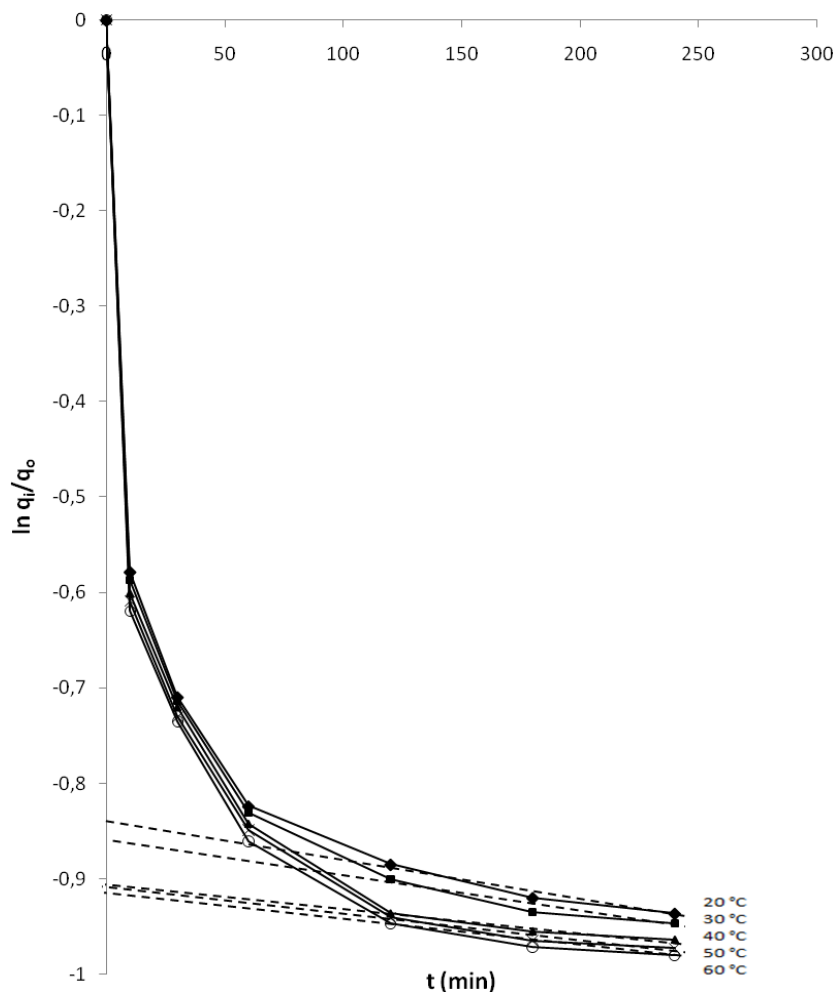
b' – koeficijent ispiranja i

k' – koeficijent spore ekstrakcije.



Slika 4.4. Zavisnost: $(q_0 - q_i) / q_0$ od vremena ekstrakovanja kod ekstrakcija izvođenih na različitim temperaturama u ekstraktima divlje kupine (*Rubus fruticosus* L.)

Na slici 4.4. prikazana je zavisnost $(q_0 - q_i) / q_0$ od vremena ekstrakcije na različitim temperaturama ekstrakcije odakle se vidi da postoji linearna zavisnost u oblasti spore ekstrakcije.



Slika 4.5. Zavisnost: $\ln q_i/q_0$ od vremena ekstrahovanja kod ekstrakcija izvođenih na različitim temperaturama u ekstraktima divlje kupine (*Rubus fruticosus* L.)

Na slici 4.5 prikazana je zavisnost $\ln q_i/q_0$ na različitim temperaturama ekstrakcije, gde se takođe uočava linerna zavisnost u oblasti spore ekstrakcije. Vrednosti koeficijenta ispiranja i spore ekstrakcije izračunate su metodom najmanjih kvadrata, uzimajući u obzir samo tačke u oblasti spore ekstrakcije (tabela 4.3).

U tabeli 4.3 su date vrednosti perioda brze ekstrakcije (PBE) i stepena ekstrakcije (SE) koji se ekstrapolacijom očitavaju sa grafika (slike 4.4 i 4.5). Period brze ekstrakcije je kod svih ekstrakcija 120 min što ukazuje da na ovaj period temperatura izvođenja ekstrakcije nema značajan uticaj. Uticaj temperature dolazi do izražaja u periodu spore ekstrakcije gde sa povećanjem temperature dolazi do smanjenja viskoznosti rastvarača, povećava se koeficijent difuzije ekstraktivnih materija kroz rastvarač, skraćuje vreme bubrenja i prodiranja rastvarača u ćelije biljnog materijala.

Koeficijenti b i k u jednačinama kinetike ekstrakcije po modelu I imaju neznatno niže vrednosti od koeficijenata b' i k' u jednačinama kinetike ekstrakcije po modelu II. Koeficijent brze ekstrakcije je kod modela I manji u proseku za 4,5%, a koeficijent spore ekstrakcije za 8% u odnosu na koeficijente u jednačinama kinetike ekstrakcije po modelu II. Analizom dobijenih rezultata se vidi da oba primenjena kinetička modela mogu biti korišćena za modelovanje procesa ekstrakcije iz biljnih vrsta.

Tabela 4.3. Period brze ekstrakcije (PBE), stepen ekstrakcije (SE) u periodu brze ekstrakcije i vrednosti koeficijenata b , k , b' i k' u jednačinama kinetike ekstrakcije (modeli I i II)

Ekstrakti	Model I				Model II	
	<i>PBE (min)</i>	<i>SE (%)</i>	<i>B</i>	<i>k * 10⁻⁴</i>	<i>b'</i>	<i>k' * 10⁻⁴</i>
20 °C	120	80	0,80	3,92	0,83	4,29
30 °C	120	82,2	0,82	3,50	0,85	3,84
40 °C	120	87,0	0,87	2,08	0,91	2,29
50 °C	120	87,2	0,87	2,42	0,91	2,66
60 °C	120	87,6	0,87	2,50	0,92	2,75

4.1.2. Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije

Optimizacija uslova ultrazvučne ekstrakcije vršena je pomoću metodologije odziva površine (RSM) korišćenjem softvera Design Expert (verzija 7.1.6, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA). Statistički modeli i njihove grafičke slike konstruisani su korišćenjem centralnog kompozitnog dizajna (CCD). Kao nezavisne promenljive, koje bi potencijalno mogle da utiču na efikasnost ekstrakcije, odabrane su: vreme ekstrakcije (A), ekstrakciona temperatura (B) i hidromodul tj. odnos biljni materijal/rastvarač (C). Jednofaktorski preliminarni eksperimenti su izvedeni kako bi se odredile vrednosti opsega i centralnih tačaka (tabela 4.4).

Sa ciljem određivanja optimalnih uslova ultrazvučne ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz biljnih vrsta, kao reprezentativni uzorak je uzet plod maline (*Rubus idaeus* L.) i izvršeno je 20 eksperimenata uključujući šest ponavljanja centralne tačke. Prinos ekstraktivnih materija, sadržaj ukupnih fenola i antocijana izabrani su kao odzivi koji se dobijaju

kombinacijom nezavisnih promenljivih (tabela 4.3). Svi eksperimenti ponovljeni su tri puta ($n = 3$), osim za one koji se odnose na centralnu tačku.

Tabela 4.4. Nezavisne promenljive i odgovarajući nivoi

Promenljive	Kodirane promenljive	Nivoi		
		-1	0	1
Vreme ekstrakcije (min)	A	1	15	30
Temperatura (°C)	B	20	40	60
Hidromodul (g/L)	C	66,7	133,35	200

Ulazni podaci za tri nezavisne promenljive i odgovarajući odzivi neophodni za CCD eksperimente prikazani su u tabeli 4.5. Prinos ukupnih ekstraktivnih materija dobijen je merenjem masa suvih ostataka nakon ekstrakcija, a sadržaj ukupnih fenola i antocijana je određen spektrometrijskom metodom opisanom u eksperimentalnom delu.

Tabela 4.5. Centralni kompozitni dizajn (CCD): tri promenljive (A-vreme, B-temperatura i C-hidromodul) i odgovarajući odzivi (prinos ekstraktivnih materija, sadržaj ukupnih fenola i ukupnih antocijana iz ekstrakta ploda maline, *Rubus idaeus* L.)

R.br. eksperimenta	A	B	C	Prinos (%)	Ukupni fenoli (mg/kg)	Ukupni antocijani (mg/kg)
1	-1	-1	-1	7,1	956,70	705,11
2	-1,682	0	0	6,5	800,12	600,56
3	0	0	0	8,5	1128,37	820,28
4	0	0	0	8,5	1128,05	820,90
5	0	1,682	0	8,7	1170,11	845,64
6	0	0	0	8,5	1128,45	820,78
7	0	0	0	8,6	1128,09	819,12
8	0	0	1,682	8	1000,45	750,37
9	-1	-1	1	6,6	820,19	620,64
10	1	1	1	7,8	960,72	740,73
11	1	-1	1	7,7	940,91	730,26
12	1	1	-1	9,2	1200,11	900,09
13	0	-1,682	0	8,4	1128,26	820,35
14	0	0	-1,682	8,3	1100,41	810,31
15	1,682	0	0	8,6	1140,28	834,96
16	-1	1	1	6,9	980,10	690,56
17	-1	1	-1	7,1	1011,90	710,85
18	1	-1	-1	8,8	1130,72	835,98
19	0	0	0	8,5	1128,45	815,23
20	0	0	0	8,6	1128,11	822,94

Nakon evaluacije svih eksperimenata fitovanjem svih odziva kao funkcije tri nezavisne promenljive, A-vreme, B-temperatura i C-hidromodul, dobijene su sledeće polinomne jednačine:

$$\text{Prinos} = 7,83 - 0,098A + 0,16B + 0,12C + 0,071AB - 0,65AC + 3,273A^2 + 0,089B^2 - 0,035C^2$$

$$\text{Ukupni fenoli} = 1044,36 - 22,86A + 18,59B - 1,59C - 99,88AC + 5,18A^2 + 8,72B^2$$

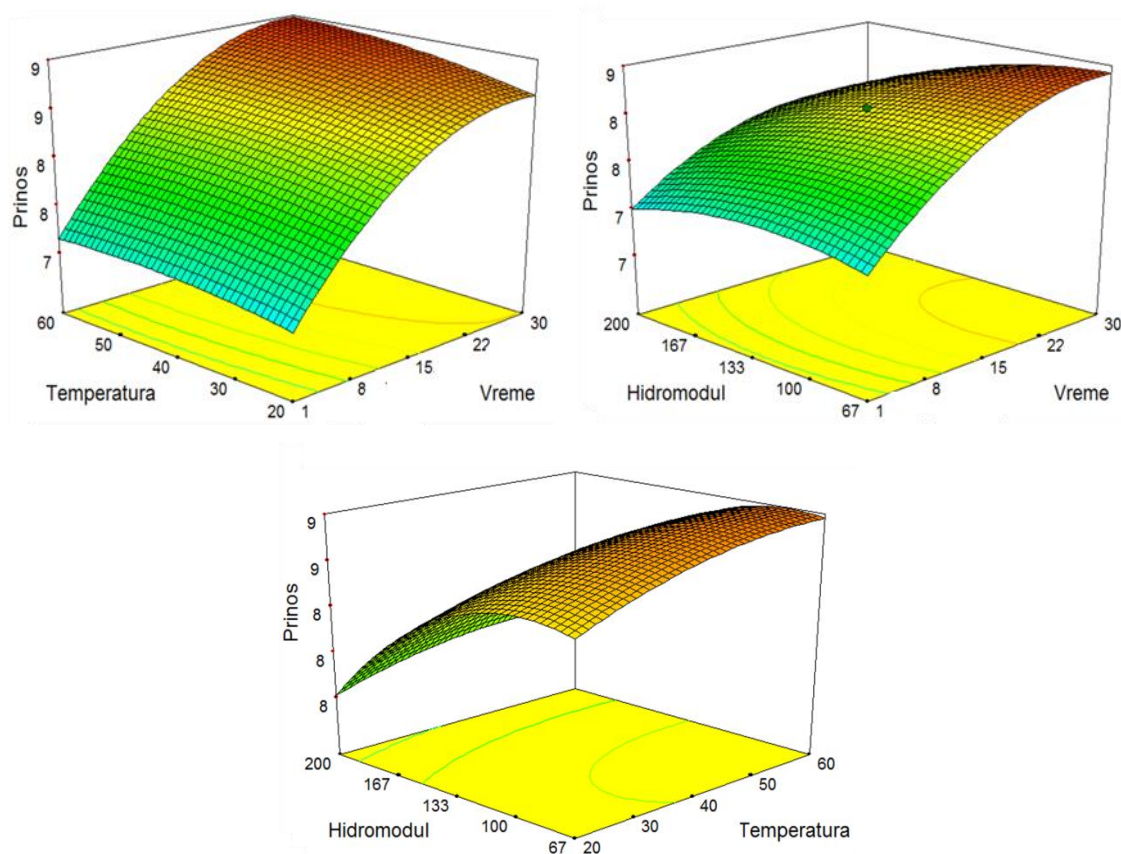
$$\text{Ukupni antocijani} = 766,13 - 25,69A + 22,53B - 6,62C - 83,13AC + 15,62BC + 3,88B^2 - 3,19C^2$$

Ovo su uprošćene jednačine, gde su koeficijenti koji nisu značajni, prema ANOVA testu, eliminisani zbog pojednostavljenja modela. Ove polinomne jednačine odgovaraju kvadratnim modelima prikazanim na slikama 4.6 - 4.8.

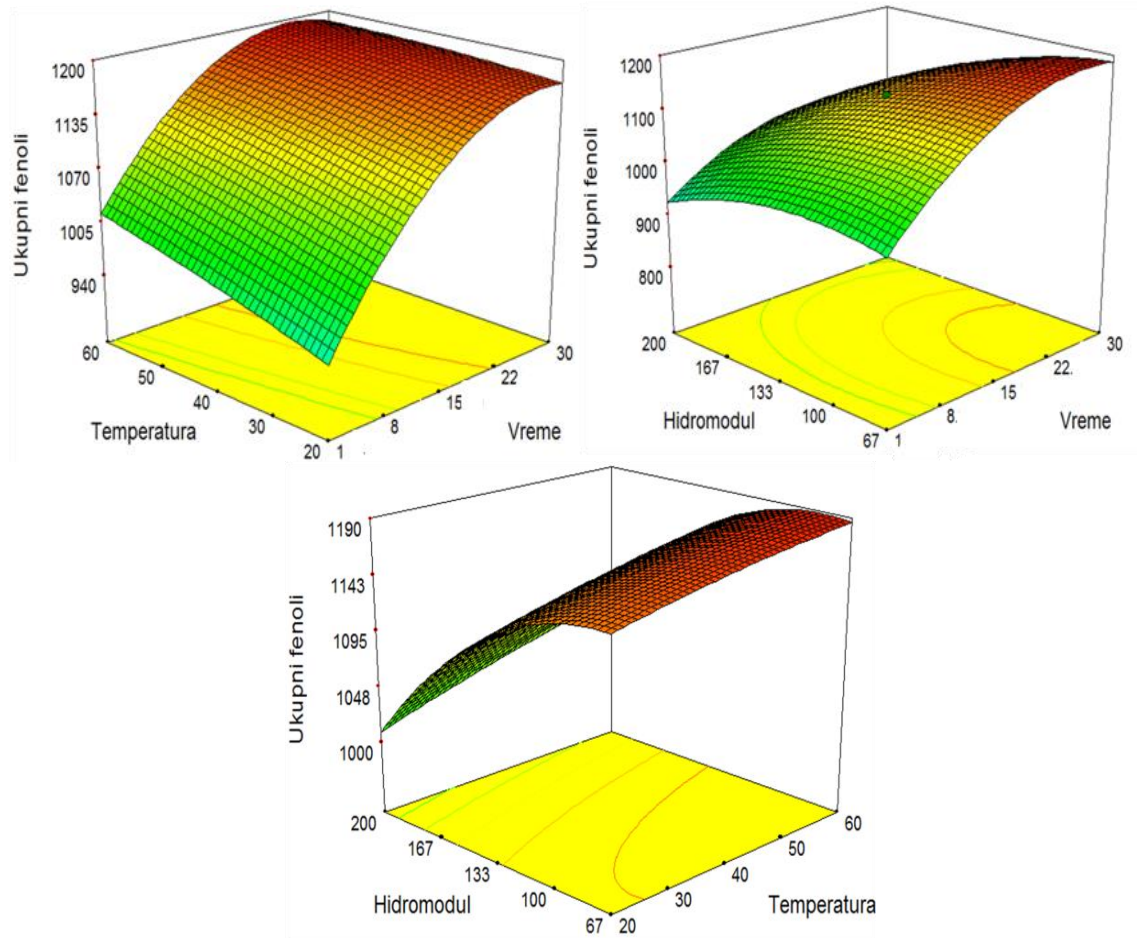
Vrednosti svih testiranih odziva povećavaju se povećanjem parametara ultrazvučne ekstrakcije, naročito ekstrakcionog vremena i hidromodula. Maksimalne vrednosti odziva

dobijene su na temperaturama izvođenja ekstrakcije između 40 °C i 60 °C. Nakon uzimanja u obzir svih parametara (promenljive i odgovarajući odzivi) za proračun optimizacije dizajna, dobijeni su sledeći optimalni uslovi ultrazvučne ekstrakcije: vreme ekstrakcije od 30 min, temperatura od 40 °C i hidromodul od 100 g/L.

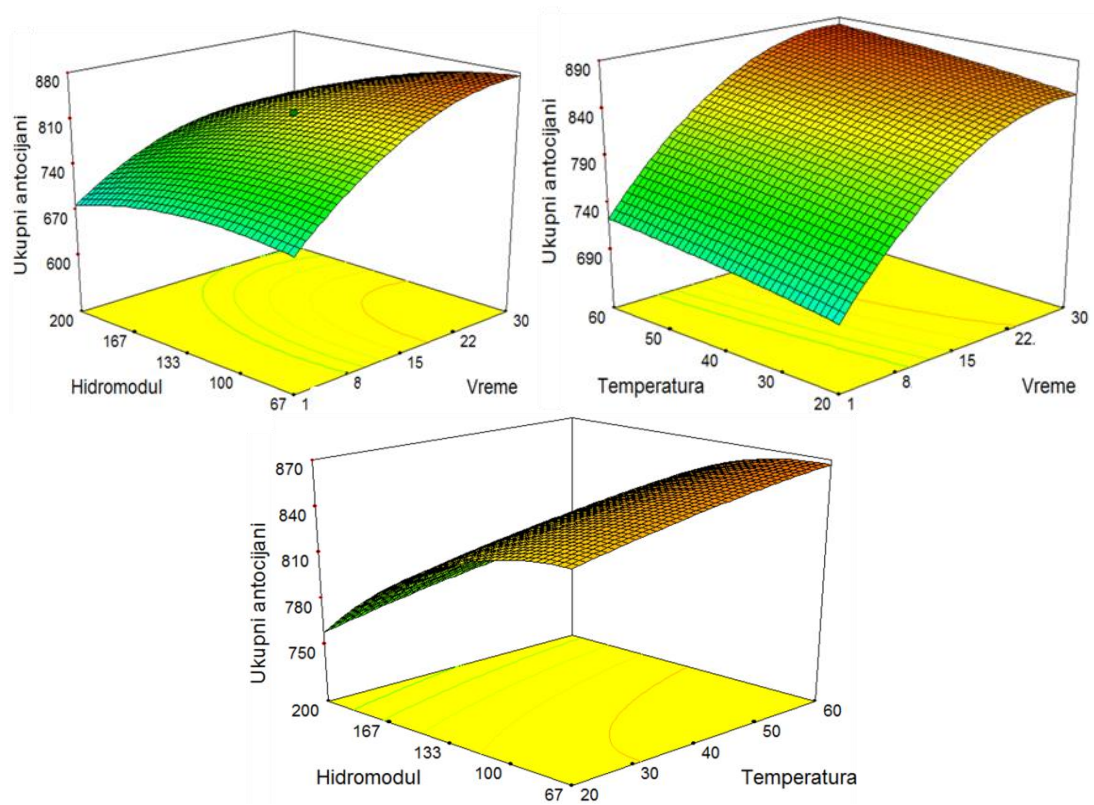
Trodimenzionalni (3-D) grafici triju odziva u funkciji od vremena ekstrakcije, temperature i hidromodula prikazani su na slikama 4.6-4.8. Oni predstavljaju grafičku zavisnost vrednosti jednog od odziva u funkciji od dve promenljive dok treća ostaje konstantna.



Slika 4.6. 3-D odziv površine kombinovanih efekata uslova ultrazvučne ekstrakcije ploda maline (*Rubus idaeus* L.): vreme, temperature i hidromodul na prinos ukupnih ekstrahovanih materija



Slika 4.7. 3-D odziv površine kombinovanih efekata uslova ultrazvučne ekstrakcije ploda maline (*Rubus idaeus* L.): vreme, temperature i hidromodul na sadržaj ukupnih fenola



Slika 4.8. 3-D odziv površine kombinovanih efekata uslova ultrazvučne ekstrakcije ploda maline (*Rubus idaeus* L.): vreme, temperature i hidromodul na sadržaj ukupnih antocijana

Korišćenjem ovih optimiziranih uslova ultrazvučne ekstrakcije dobijena su odgovarajuća predviđanja odziva površine (izračunate vrednosti pomoću modela) prikazana u tabeli 4.6.

Tabela 4.6. Prinos ekstraktivnih materija, sadržaj ukupnih fenola i antocijana iz ekstrakta ploda maline (*Rubus idaeus* L.) dobijenih izračunavanjem pomoću modela i eksperimentalno ultrazvučnom ekstrakcijom pod uslovima: vreme ekstrakcije 30 min, temperatura 40 °C i hidromodul 100 g/L.

Istraživani parametri	Izračunate vrednosti	Eksperimentalne vrednosti
Prinos ekstraktivnih materija (%)	8,70	8,67 ± 0,15
Ukupni fenoli (mg GAE/kg)	1200,41	1196,74 ± 12,42
Ukupni antocijani (mg ME/kg)	836,72	831,11 ± 9,07

Dobijeni eksperimentalni rezultati su u dosta dobroj saglasnosti sa eksperimentalnim rezultatima dobijenim izvođenjem ultrazvučne ekstrakcije pod identičnim optimalnim uslovima (tabela 4.6) pa se može zaključiti da je metodologija odziva površine (RSM) korišćenjem softvera Design Expert dobar metod za optimizaciju uslova ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz biljnih vrsta.

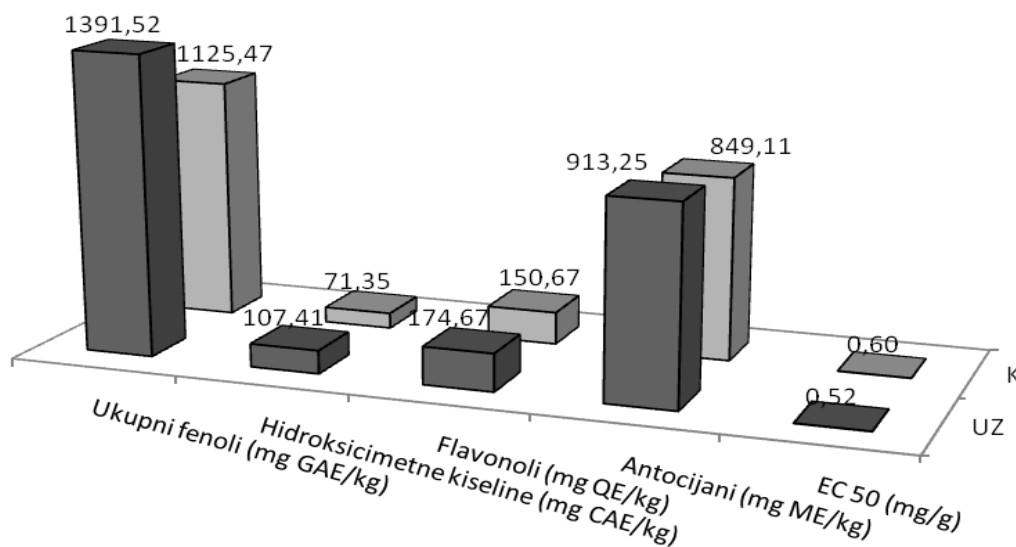
4.1.3. Uporedna analiza klasične i ultrazvučne ekstrakcije

Na osnovu prethodno izloženih rezultata izvršena je uporedna analiza dobijenih vrednosti za sadržaj ukupnih fenola, flavonola, hidroksicimetnih kiselina, antocijana, kao i antioksidativne aktivnosti ekstrakata plodova divlje kupine i domaće maline dobijenih klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom na sobnoj temperaturi i hidromodulu 1:10, dok je vreme ekstrakcije za klasičnu ekstrakciju bilo 3 h, a ultrazvučnu 30 min (tabela 4.7 i slike 4.9 i 4.10).

Tabela 4.7. Upporedna analiza ukupnog fenolnog sadržaja i sadržaja hidroksicimetnih kiselina, flavonola, antocijana i antioksidativna aktivnost (EC₅₀) ekstrakata divlje kupine i maline dobijenih klasičnom (K) i ultrazvučnom ekstrakcijom (UZ)

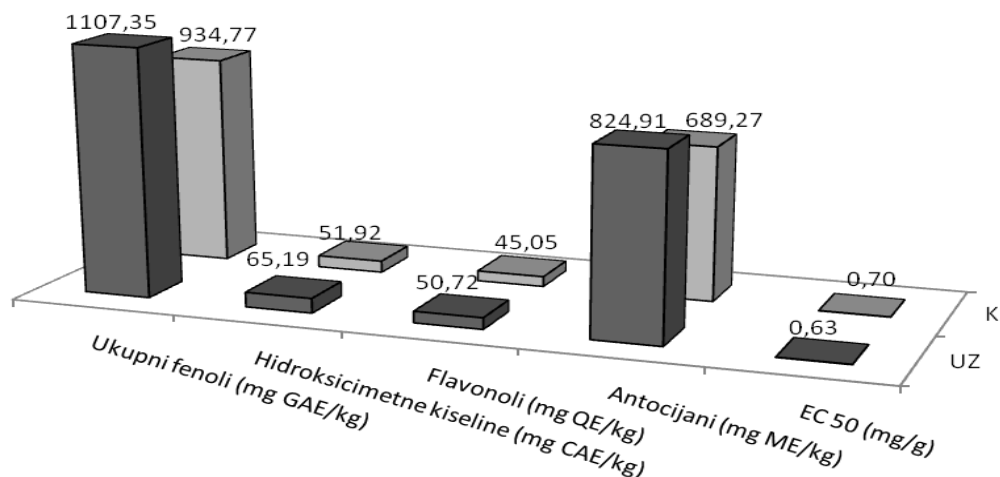
Biljni materijal	Ekstrakciona tehnika	Ukupni fenoli (mg CAE/kg)	Hidroksicimetne kiseline (mg CAE/kg)	Flavonoli (mg QE/kg)	Antocijani (mg ME/kg)	EC ₅₀ (mg/g)
Divlja kupina	UZ	1391,52 ± 13,27	107,41 ± 3,27	174,67 ± 2,29	913,25 ± 4,04	0,52 ± 0,03
	K	1125,47 ± 12,40	71,35 ± 3,25	150,67 ± 2,78	849,11 ± 2,11	0,60 ± 0,04
Malina	UZ	1107,35 ± 10,76	65,19 ± 2,45	50,72 ± 1,96	824,91 ± 3,06	0,63 ± 0,04
	K	934,77 ± 11,09	51,92 ± 1,56	45,05 ± 2,36	689,27 ± 1,67	0,70 ± 0,06

UZ – ultrazvučna ekstrakcija; K – konvenconalna ekstrakcija.



Slika 4.9. Upporedna analiza ukupnog fenolnog sadržaja i sadržaja hidroksicimetnih kiselina, flavonola, antocijana i antioksidativna aktivnost (EC₅₀) ekstrakata divlje kupine dobijenih klasičnom (K) i ultrazvučnom ekstrakcijom (UZ)

Ekstrakti plodova ispitivanih sorti dobijeni ultrazvučnom ekstrakcijom pokazali su značajno veći sadržaj ukupnih fenola, antocijana, hidroksicimetnih kiselina, flavonola u poređenju sa ekstraktima dobijenim primenom klasične ekstrakcije.



Slika 4.10. Uporedna analiza ukupnog fenolnog sadržaja i sadržaja hidrokscimetnih kiselina, flavonola, antocijana i antioksidativna aktivnost (EC_{50}) ekstrakata maline dobijenih klasičnom (K) i ultrazvučnom ekstrakcijom (UZ)

Sadržaj ukupnih fenola iz ekstrakata divlje kupine dobijenih primenom ultrazvučne ekstrakcije je veći za 19,12% u poređenju sa klasičnom, odnosno za 15,58% za ekstrakt maline.

Analiza hidrokscimetnih kiselina je pokazala značajno veću razliku, tako da je njihov sadržaj u ekstraktima dobijenim primenom ultrazvučne ekstrakcije iz divlje kupine 33,57% veći u poređenju sa klasičnom, odnosno za 20,36% iz ekstrakata maline.

Sadržaj flavonola iz ekstrakata divlje kupine dobijenih primenom ultrazvučne ekstrakcije bio je veći za 13,74% u poređenju sa klasičnom i za 11,18% iz ekstrakata maline.

Utvrđeno je da ekstrakti divlje kupine i maline dobijeni primenom ultrazvučne ekstrakcije imaju veći sadržaj antocijana za 7,02% odnosno za 16,44% u odnosu na ekstrakte dobijene primenom klasične ekstrakcije.

Na osnovu ovih rezultata može se reći da ultrazvučna ekstrakcija dovodi do većeg prinosa fenolnih jedinjenja u kraćem vremenskom periodu, čime se smanjuje utrošak energije i degradacija fenola.

Takođe, dobijeni ekstrakti ultrazvučnom ekstrakcijom pokazuju značajno jaču antioksidativnu aktivnost nego ekstrakti dobijeni klasičnom ekstrakcijom za 15,38% i 11,11% za ekstrakte divlje kupine i maline, respektivno. Ultrazvučna ekstrakcija pokazala se bolja i ekonomski isplativija tehnika od klasične za ekstrakciju antioksidanasa iz biljnih vrsta.

Uzimajući u obzir navedene prednosti ultrazvučne ekstrakcije za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz ispitivanih biljnih vrsta u daljim eksperimentima će se koristiti ultrazvučna ekstrakcija pod sledećim eksperimentalnim uslovima: temperatura 40 °C, vreme 30 min i hidromodul 1:10.

4.2. Fenolni sadržaj, antioksidativna i antimikrobna aktivnost odabranih biljnih vrsta porodice *Rosaceae*

4.2.1. Fenolni sadržaj ekstrakata ploda i lista domaće i divlje kupine (*Rubus fruticosus* L.)

Fenolni sadržaj ekstrakata ploda i lista domaće i divlje kupine određen UV-VIS metodom opisanom u eksperimentalnom delu prikazan je u tabeli 4.8 i na slici 4.11.

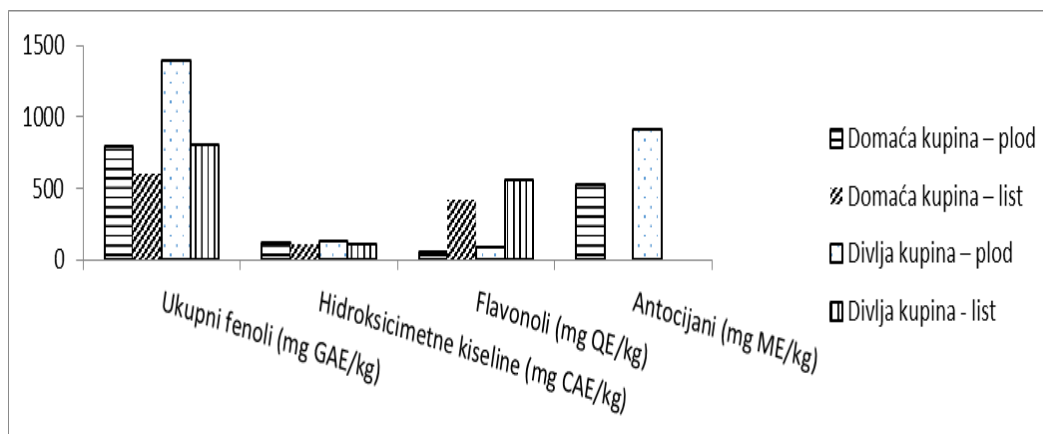
Tabela 4.8. Sadržaj ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina, flavonola i antocijana iz ekstrakata ploda i lista domaće i divlje kupine (*Rubus fruticosus* L.)

Biljni materijal	Ukupni fenoli (mg GAE/kg)	Hidroksicimetne kiseline (mg CAE/kg)	Flavonoli (mg QE/kg)	Antocijani (mg ME/kg)
Domaća kupina – plod	791,87 ± 8,11	117,15 ± 4,25	60,53 ± 23,11	525,94 ± 4,78
Domaća kupina – list	607,28 ± 7,44	108,43 ± 4,15	421,17 ± 3,94	-
Divlja kupina – plod	1391,52 ± 14,73	127,41 ± 5,34	84,67 ± 6,82	913,25 ± 6,36
Divlja kupina – list	807,35 ± 6,19	114,62 ± 6,10	560,29 ± 5,91	-

Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± SD (n = 3).

Analizom ovih rezultata utvrđeno je (tabela 4.8) da se značajno veći sadržaj ukupnih fenola nalazi u ekstraktima ploda divlje kupine u odnosu na ekstrakte iz ploda domaće kupine i ekstrakte lista domaće i divlje kupine, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima za ispitivanja nekih sorti kupina (Wang i Lin, 2000; Buricova i sar., 2011). Sadržaj ukupnih

fenola u plodu divlje kupine je za 45,97% veći od ukupnog fenolnog sadržaja ploda domaće kupine, odnosno za 41,75% u listu divlje kupine nego u listu domaće kupine (slika 4.11).



Slika 4.11. Sadržaj ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina, flavonola i antocijana iz ekstrakata ploda i lista domaće i divlje kupine (*Rubus fruticosus L.*)

Antocijani pronađeni su samo u plodu domaće i divlje kupine (tabela 4.8 i slika 4.11). Ukupni sadržaj antocijana u plodu divlje kupine je veći nego u ekstraktima ploda domaće kupine za 42,41%. Sadržaj ukupnih antocijana u plodovima divlje i domaće kupine je u dobroj saglasnosti sa literaturnim podacima publikovanim od Jakobek i sar. (2007), gde su kvantifikovani antocijani do 1055 mg/kg.

Listovi su pokazali veći sadržaj flavonola u odnosu na plod kod obe ispitivane sorte kupine (tabela 4.8 i slika 4.11). List divlje kupine je pokazao najveći sadržaj ove klase fenola i to za 25% veći u odnosu na list domaće kupine. Plod divlje kupine je takođe bio bogatiji u sadržaju flavonola u odnosu na domaću sortu i to veći za 43%.

Hidroksicimetne kiseline su bile zastupljene sa 62,51% u ekstraktima ploda i sa 65,86% u listu (tabela 4.8 i slika 4.11). Plodovi domaće i divlje kupine su imali manji sadržaj ovih kiselina u odnosu na listove, u ekstraktima ploda divlje kupine hidroksicimetne kiseline zastupljene su sa 37,5% više nego u plodu domaće kupine, a u ekstraktima lista divlje kupine njihova zastupljenost bila je za 34,14% veća u odnosu na list domaće kupine.

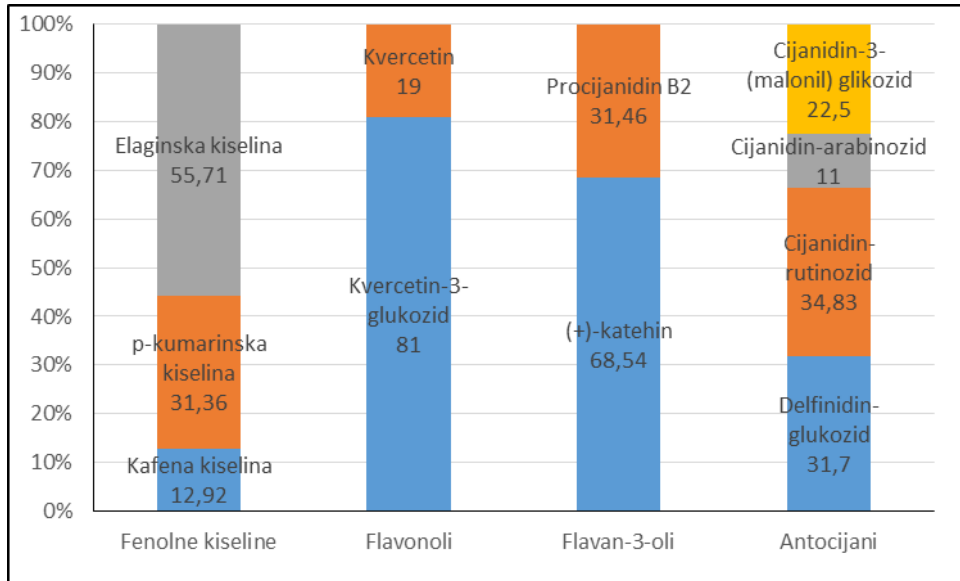
U cilju određivanja koncentracije fenolnih jedinjenja u testiranim ekstraktima ploda i lista domaće i divlje kupine korišćena je HPLC metoda. Rezultati HPLC analiza ovih ekstrakata prikazani su u tabeli 4.9. Procentna zastupljenost pojedinih fenolnih jedinjenja iz ekstrakata ploda i lista domaće i divlje kupine prikazna je na slikama 4.12-4.15.

Tabela 4.9. Fenolni sastav (mg/kg) ekstrakata ploda i lista domaće i divlje kupine

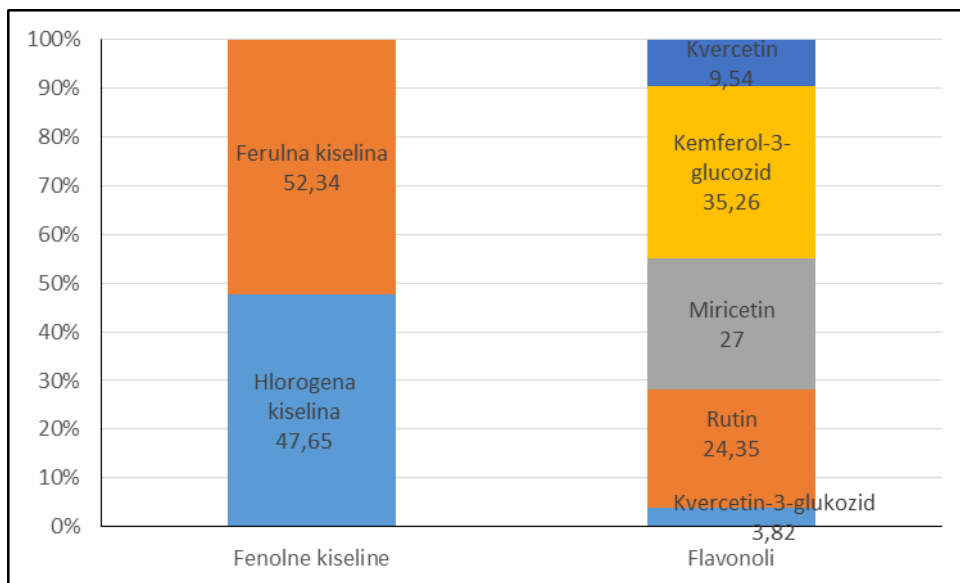
(Rubus fruticosus L.)

Fenolno jedinjenje	Domaća kupina		Divlja kupina	
	plod	list	plod	list
Kafena kiselina	11,78 ± 0,19	-	10,33 ± 0,24	-
Hlorogena kiselina	-	38,94 ± 0,74	-	65,17 ± 0,89
<i>p</i> -kumarinska kiselina	28,59 ± 0,23	-	79,27 ± 1,14	-
Ferulna kiselina	-	42,77 ± 0,68	-	57,96 ± 0,67
Elaginska kiselina	50,78 ± 1,78	-	118,16 ± 2,34	-
Kvercetin-3-glukozid	18,25 ± 1,12	8,17 ± 2,04	27,14 ± 0,68	8,54 ± 0,34
Rutin	-	52,14 ± 1,09	-	76,94 ± 1,48
Miricetin	-	57,89 ± 0,82	-	81,57 ± 2,05
Kemferol-3-glukozid	-	75,51 ± 8,17	-	120,19 ± 7,11
Kvercetin	4,28 ± 0,39	20,44 ± 0,22	7,79 ± 0,18	25,79 ± 0,45
(+)-katehin	9,76 ± 0,27	-	3,92 ± 0,09	-
Procijanidin B2	4,48 ± 0,13	-	4,49 ± 0,06	-
Delfinidin-glukozid	115,78 ± 4,09	-	412,78 ± 7,58	-
Cijanidin-rutinozid	127,25 ± 4,45	-	147,2 ± 2,04	-
Cijanidin-arabinozid	40,15 ± 1,23	-	49,78 ± 0,39	-
Cijanidin-3-(malonil) glikozid	82,14 ± 2,31	-	157,04 ± 2,79	-
∑ Fenolne kiseline	91,15 ± 2,26	81,71 ± 2,04	207,76 ± 7,43	123,13 ± 3,18
∑ Flavonoli	50,53 ± 1,43	89,88 ± 1,88	67,93 ± 1,74	131,67 ± 2,98
∑ Flavan-3-oli	14,24 ± 0,23	-	8,41 ± 0,47	-
∑ Antocijani	365,32 ± 6,78	-	766,8 ± 9,38	-
∑ Fenolnih jedinjenja	493,24 ± 8,04	295,86 ± 3,06	1017,90 ± 15,24	436,16 ± 7,66

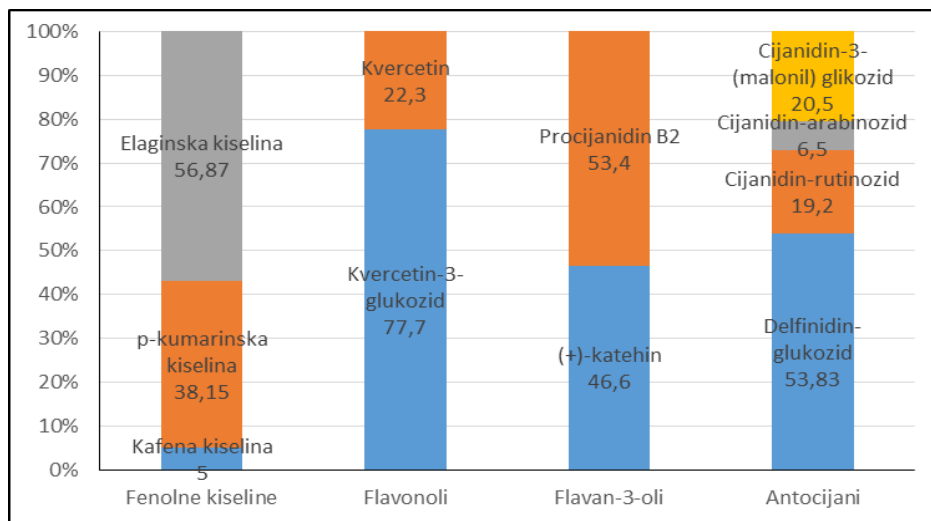
Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± SD (n = 3).



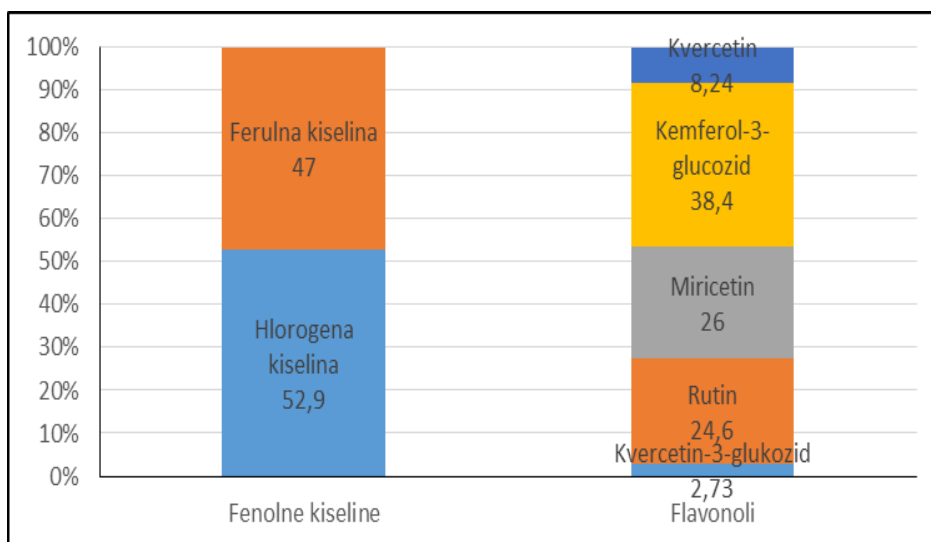
Slika 4.12. Procentni udeo fenolnih jedinjenja u ekstraktu ploda domaće kupine (*Rubus fruticosus* L.)



Slika 4.13. Procentni udeo fenolnih jedinjenja u ekstraktu lista domaće kupine (*Rubus fruticosus* L.)



Slika 4.14. Procentni udeo fenolnih jedinjenja u ekstraktu ploda divlje kupine (*Rubus fruticosus* L.)



Slika 4.15. Procentni udeo fenolnih jedinjenja u ekstraktu lista divlje kupine (*Rubus fruticosus* L.)

Elaginska kiselina bila je najzastupljenija fenolna kiselina u ispitivanim ekstraktima ploda domaće i divlje kupine i to 44,3 i 43,1% više u poređenju sa ostalim kiselinama, po redu javljanja (slike 4.12 i 4.14). Rezultati ostalih istraživača takođe potvrđuju značajno prisustvo ove kiseline u plodu kupine (Mertz i sar., 2007). Ostale identifikovane fenolne kiseline u plodu domaće i divlje kupine bile su: kafena i p-kumarinska (prilog, slike P27 i P23, po redu javljanja). U listu domaće i divlje kupine nađene su hlorogena i ferulna

kiselina (prilog, slike P11 i P10). Turkben i sar. (2010) su objavili prisustvo elaginske, ferulne, kafene i p-kumarinske kiseline u plodu kupine.

Najveći sadržaj flavonola pronađen je u listu divlje kupine, zatim u listu domaće kupine i plodu divlje kupine (slike 4.13-4.15). Kemferol-3-glukozid najviše je zastupljen u ekstraktima lista divlje i domaće kupine, ali takođe je utvrđeno prisustvo kvercetin-3-glukozida, više u plodu nego u listovima, kao i prisustvo miricetina i rutina u listu divlje i domaće kupine (prilog, slike P12 i P13, po redu javljanja).

Literaturni podaci takođe potvrđuju prisustvo značajne količine kvercetina, rutina i kemferola u ekstraktima kupina (Gudej i Tomczyk, 2004; Jakobek i sar., 2009; Turkben i sar., 2010).

U ekstraktima ploda domaće i divlje kupine identifikovan je flavan-3-olni monomer: (+)-katehin i jedan dimer, procijanidin B2 (prilog, slika P30 i P26, po redu javljanja). Jakobek i sar., (2009) su objavili prisustvo katehina i epikatehina kao predominantnih flavan-3-ola u ekstraktima kupine.

HPLC hromatogrami su pokazali prisustvo antocijana u ekstraktima ploda domaće i divlje kupine (prilog, slike P29 i P25, po redu javljanja). Ova jedinjenja su najzastupljenija u plodu divlje kupine pa zatim u plodu domaće kupine sa učešćem od 79,2% i 24,41% od ukupnog fenolnog sadržaja ekstrakata (tabela 4.9). Delfinidin-glukozid i cijanidin-rutinozid bili su najzastupljeniji u ekstraktima ploda domaće i divlje kupine (slike 4.12 i 4.14). Ostali prisutni antocijani u ekstraktima ploda domaće i divlje kupine bili su cijanidin-arabinozid i cijanidin-3-(malonil) glikozid. Prisustvo cijanidnih derivata u plodovima kupina potvrđeno je od strane mnogih istraživača (Stintzing i sar., 2002; Fan-Chiang i Wrolstad, 2005), dok su delfinidni derivati pronađeni samo kod nekih sorti kupina (Deighton i sar., 2000).

Na osnovu rezultata spektrometrijskih i HPLC analiza može se zaključiti da ekstrakti divlje kupine sadrže značajno veću koncentraciju fenolnih jedinjenja što se pored genotipskih faktora može pripisati i činjenici da biljke u uslovima stresa aktiviraju sintezu fitoaleksina (Pezet i sar., 2003). Stres izazvan bilo UV zračenjem ili raznim štetnim mikroorganizmima je prisutniji kod divljih sorti kupina nego kod kultivisanih (koje se štite raznim zaštitnim sredstvima) zbog čega biljke moraju same da se zaštite sintezom određenih fenolnih jedinjenja.

4.2.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda i lista domaće i divlje kupine (*Rubus fruticosus* L.)

Antioksidativna aktivnost ekstrakata dobijenih od ploda i lista domaće i divlje kupine određena je DPPH testom, a rezultati analiza, izraženi kao EC₅₀ (mg/mL), prikazani su u tabeli 4.10 i na slici 4.16. Manje EC₅₀ vrednosti odgovaraju jačoj antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata. Svi ekstrakti pokazali su značajnu antioksidativnu aktivnost.

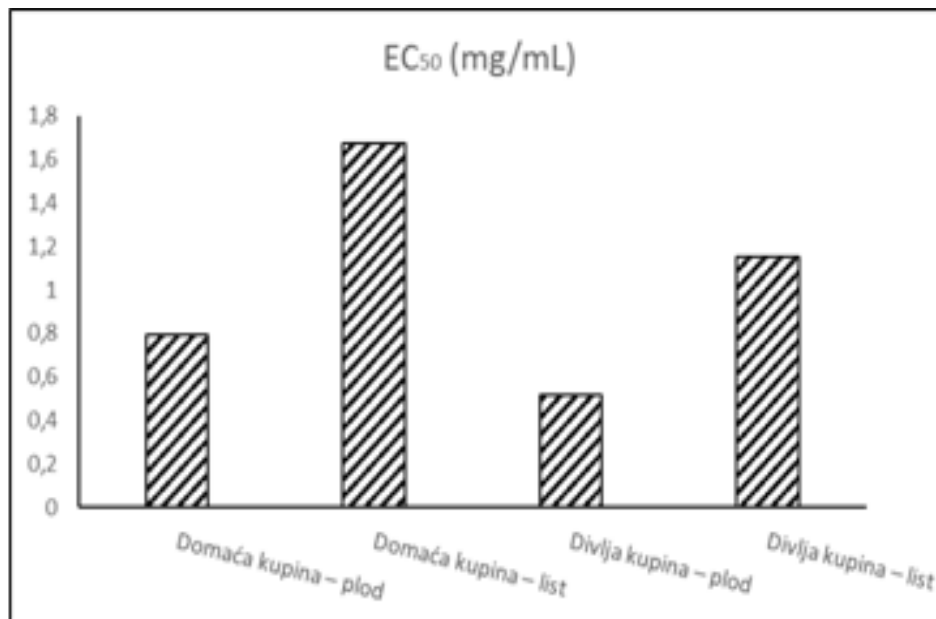
Rezultati su pokazali da najjaču antioksidativnu aktivnost imaju ekstrakti ploda divlje kupine, pa zatim ekstrakti ploda domaće kupine, lista divlje kupine i lista domaće kupine. Jaka antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda divlje kupine odgovara najvećem sadržaju fenolnih jedinjenja u njima što opet ukazuje da ova jedinjenja doprinose antioksidativnoj aktivnosti ispitivanih ekstrakata.

Upoređujući rezultate iz tabela 4.9 i 4.10 može se reći da su antocijani i flavan-3-oli najviše doprineli povećanju antioksidativne aktivnosti ekstrakata ploda u odnosu na list divlje i domaće kupine.

Literaturni podaci takođe potvrđuju jaku antioksidativnu aktivnost ekstrakata ploda kupine i njihovu visoku korelaciju sa ukupnim fenolnim sadržajem (Deighton i sar., 2000; Wang i Lin, 2000), kao i ekstrata lista kupine (Buricova i sar., 2011; Gawron-Gzella i sar., 2012).

Tabela 4.10. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda i lista domaće i divlje kupine (*Rubus fruticosus* L.) izražena preko EC₅₀ (mg/mL)

Biljni materijal	EC ₅₀ (mg/mL)
Domaća kupina – plod	0,79 ± 0,04
Domaća kupina – list	1,67 ± 0,11
Divlja kupina – plod	0,52 ± 0,03
Divlja kupina – list	1,15 ± 0,09



Slika 4.16. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda i lista domaće i divlje kupine (*Rubus fruticosus* L.) izražena preko EC₅₀ (mg/mL)

4.2.3. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda i lista domaće i divlje kupine (*Rubus fruticosus* L.)

Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda i lista domaće i divlje kupine (*Rubus fruticosus* L.) određena je mikrodilucionom metodom opisanom u eksperimentalnom delu.

Antimikrobni potencijal testiranih ekstrakata ploda i lista domaće i divlje kupine izražen preko minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), definisane kao najmanje koncentracije testiranih ekstrakata na kojoj mikroorganizmi ne pokazuju vidljiv rast i minimalne baktricialne koncentracije (MBC), definisane kao najniže koncentracije testiranih ekstrakata pri kojima je 99,9% inokuliranih mikroorganizama ubijeno, prikazan je u tabeli 4.11.

Rezultati testova (tabela 4.11) su pokazali da su ekstrakti divlje kupine pokazali značajnu antimikrobnu aktivnost na 12 bakterijskih sojeva i jedan kvasac, uporedo sa pozitivnom kontrolom tri antibiotika (streptomycin, tetraciklin i hloramfenikol), bez selektivnog dejstva na određeni soj mikroorganizma.

Tabela 4.11. Minimalna inhibitorna i minimalna baktricialna koncentracija – MIC/MBC ($\mu\text{g/mL}$) ekstrakata ploda i lista domaće i divlje kupine (*Rubus fruticosus* L.)

	Domaća kupina		Divlja kupina		Antibiotik		
	plod	list	plod	list	St	Ch	Tet
<i>Clostridium perfringens</i>	125/250	63/125	16/16	8/8	-	1/8	0,9/0,9
<i>Bacillus cereus</i>	125/125	63/125	16/63	8/31	-	8/8	0,9/0,9
<i>Staphylococcus aureus</i>	63/125	31/63	8/16	6/10	-	2/16	0,12/0,9
<i>Listeria monocytogenes</i>	31/63	20/42	8/16	6/12	-	8/18	0,46/0,9
<i>Sarcina lutea</i>	63/125	31/110	8/8	6/8	-	0,5/2	0,06/0,06
<i>Micrococcus flavus</i>	125/250	65/130	31/63	20/38	-	1/1	0,4/0,9
Gram negativne bakterije							
<i>Escherichia coli</i>	187/375	160/320	63/125	31/63	16/16	-	3,8/7,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	94/187	60/140	31/63	20/48	8/8	-	7,5/7,5
<i>Salmonella enteritidis</i>	94/187	63/120	63/63	42/63	4/4	-	0,9/1,9
<i>Shigella sonnei</i>	63/187	40/120	16/63	14/52	16/16	-	0,06/0,12
<i>Klebsiella pneumonia</i>	125/250	65/140	31/31	25/31	-	-	0,9/1,9
<i>Proteus vulgaris</i>	94/187	63/120	63/63	48/60	-	-	1,9/1,9
Kvasac							
<i>Candida albicans</i>	250/500	150/384	250/375	160/300	-	-	16/16

St – streptomycin; Ch – hloramfenikol; Tet – tetraciklin.

Testirani mikrobnji sojevi su bili rezistentniji na ekstrakte domaće kupine, tj. ekstrakti domaće kupine su pokazali osrednju antimikrobnju aktivnost u odnosu na pozitivnu kontrolu.

Ekstrakti listova i domaće i divlje kupine su pokazali nešto jaču antimikrobnju aktivnost (tabela 4.11) od odgovarajućih ekstrakata ploda što se može povezati sa značajno većim sadržajem flavonola u ekstraktima lista divlje i domaće kupine u odnosu na plod (tabela 4.9). Takođe se može uočiti da su sojevi testiranih mikroorganizama rezistentniji na ekstrakte domaće kupine u odnosu na divlju što se opet može pripisati povećanoj sintezi fitoaleksina kod divlje kupine.

Gram-pozitivni sojevi mikroba (*Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Sarcina lutea*, *Micrococcus flavus*) pokazali su veću osetljivost na testirane ekstrakte u odnosu na gram-negativne sojeve

(*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris*). Kvasac *Candida albicans* je pokazao najveću rezistenciju na oba ekstrakta (MIC vrednosti kod ekstrakata lista i ploda divlje i domaće kupine iznosile su 160 do 250 i 150/250, zatim MBC 300 do 375 i 384 do 500 µg/mL, po redu javljanja). Literaturni podaci potvrđuju naše rezultate tj. veću aktivnost ekstrakata biljnih vrsta na gram pozitivne bakterije u odnosu na gram negativne i kvasce (Puupponen-Pimiä i sar., 2001; Cavanagh i sar., 2003).

4.2.4. Fenolni sadržaj ekstrakata ploda i lista domaće maline (*Rubus idaeus* L.)

Ekstrakti ploda i lista domaće maline pokazali su fenolni sadržaj dobijen UV-VIS metodom opisanom u eksperimentalnom delu čiji su rezultati prikazani u tabeli 4.12 i na slici 4.17.

Tabela 4.12. Sadržaj ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina, flavonola i antocijana iz ekstrakata ploda i lista domaće maline (*Rubus idaeus* L.)

Biljni materijal	Ukupni fenoli (mg GAE/kg)	Hidroksicimetne kiseline (mg CAE/kg)	Flavonoli (mg QE/kg)	Antocijani (mg ME/kg)
Domaća malina – plod	1107,35 ± 11,27	65,19 ± 1,38	50,72 ± 1,08	824,91 ± 11,34
Domaća malina – list	811,75 ± 9,21	294,71 ± 3,15	354,42 ± 4,06	-

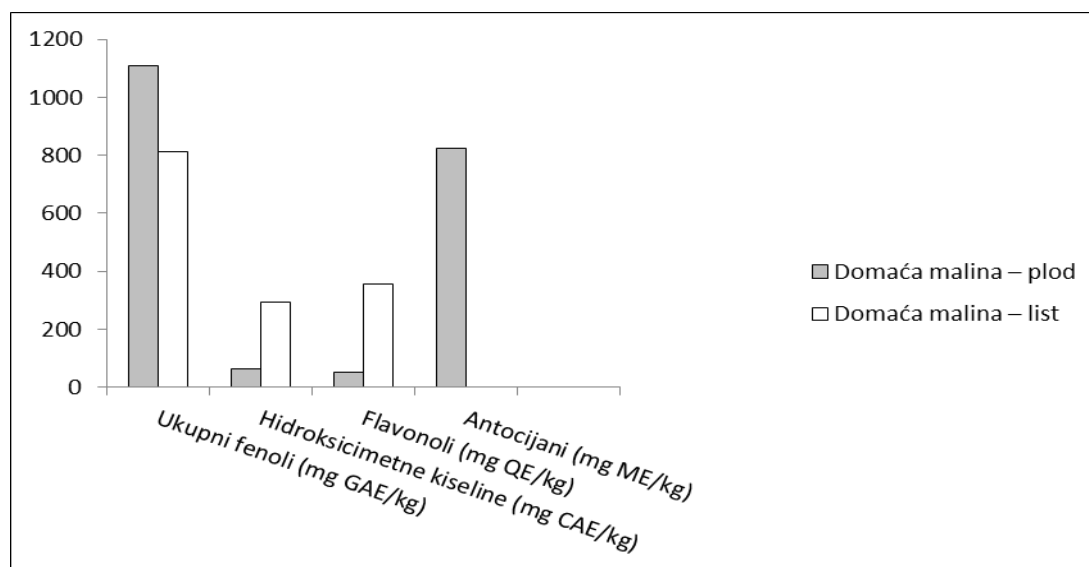
Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± SD (n = 3).

Analizom prikazanih rezultata (tabela 4.12) utvrđeno je da se značajno veći sadržaj ukupnih fenola nalazi u ekstraktima ploda maline u odnosu na ekstrakte iz lista domaće maline.

Sadržaj ukupnih fenola u plodu domaće maline je za 26,7% veći od ukupnog fenolnog sadržaja u listu domaće maline. Ovi rezultati su u dobroj saglasnosti sa literaturnim podacima za ispitivanja nekih sorti malina (Wang and Lin, 2000; Buricova i sar., 2011).

Antocijani pronađeni su samo u plodu domaće maline (tabela 4.12), (824,91 mg ME/kg). Količina ukupnih antocijana iz ekstrakta domaće maline je značajno veća od ukupnih antocijana nađenih kod drugih (Jakobek i sar., 2007), gde su kvantifikovani antocijani od 231,72 mg/kg.

Listovi su pokazali veći sadržaj flavonola u odnosu na plod (tabela 4.12). List maline je pokazao mnogo veći sadržaj ove klase fenola i to za 85,7% veći u odnosu na plod domaće maline. Koncentracija hidroksicimetnih kiselina bila je veća u ekstraktima lista maline i to za 77,65% nego u plodu (slika 4.17).



Slika 4.17. Sadržaj ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina, flavonola i antocijana iz ekstrakata ploda i lista domaće maline (*Rubus idaeus* L.)

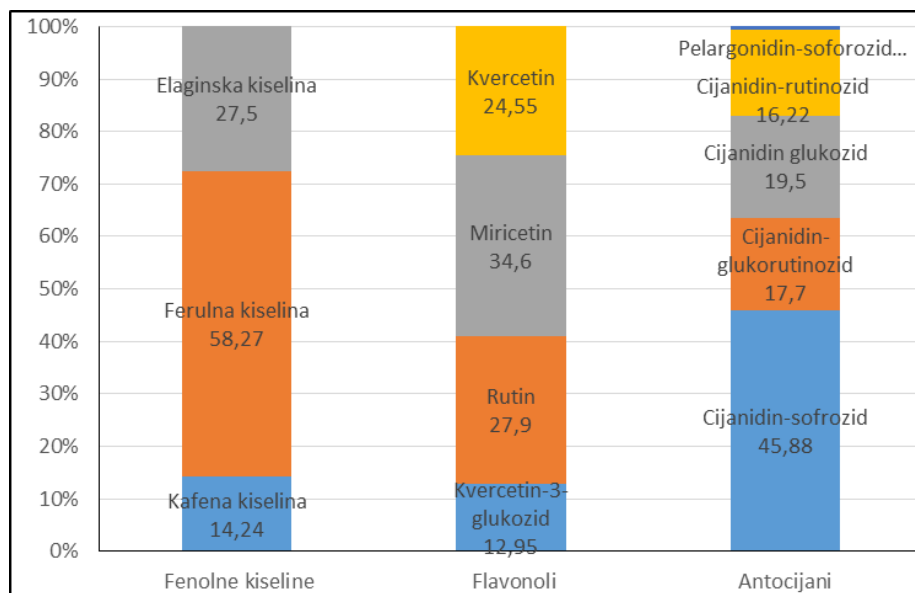
U cilju određivanja koncentracije fenolnih jedinjenja u testiranim ekstraktima ploda i lista domaće maline korišćena je HPLC metoda. Rezultati HPLC analiza ovih ekstrakata prikazani su u tabeli 4.13.

Ferulna kiselina bila je najzastupljenija fenolna kiselina u ispitivanim ekstraktima ploda i lista maline i to za 41,7 i 47,6% više u poređenju sa ostalim kiselinama, po redu javljanja (slike 4.18 i 4.19). Ostale identifikovane fenolne kiseline u plodu maline bile su: kafena, *p*-kumarinska i elaginska (prilog, slika P39), a u listu maline zastupljene su: hlorogena i ferulna (prilog, slika P17). Sličan sastav fenolnih kiselina publikovan je od strane drugih autora (Mullen i sar., 2002; Mullen i sar., 2003; Jakobek i sar., 2009; Gasperotti i sar., 2010; Remberg i sar., 2010; Turkben i sar., 2010).

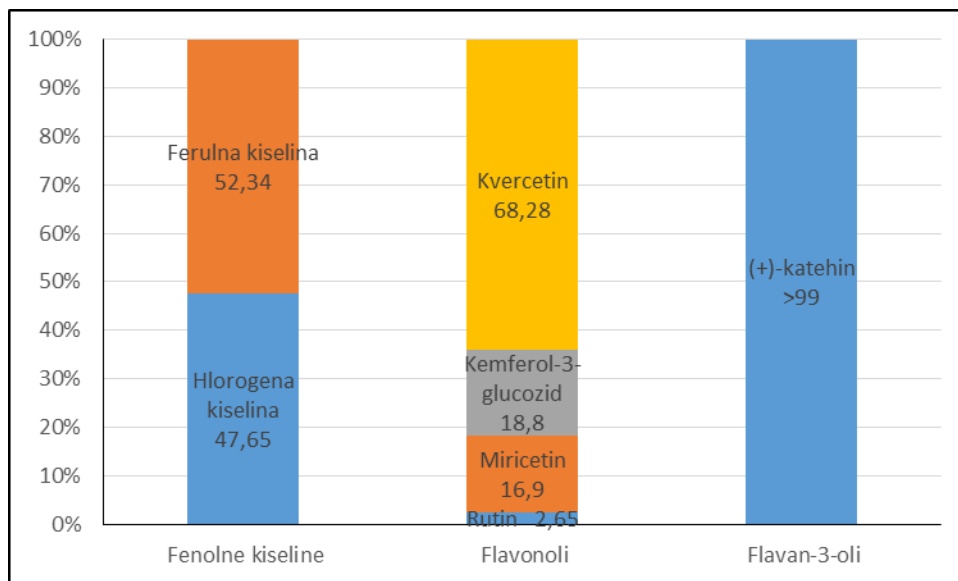
Tabela 4.13. Fenolni sastav (mg/kg) ekstrakata ploda i lista domaće maline
(*Rubus idaeus* L.)

Fenolno jedinjenje	Domaća malina	
	plod	list
Kafena kiselina	7,14 ± 0,12	
Hlorogena kiselina	-	38,94 ± 0,39
Ferulna kiselina	29,21 ± 0,28	42,77 ± 0,78
Elaginska kiselina	13,78 ± 0,19	-
Kvercetin-3-glukozid	3,81 ± 0,08	-
Rutin	8,21 ± 0,12	8,17 ± 0,17
Miricetin	10,17 ± 0,11	52,14 ± 1,03
Kemferol-3-glucozid	-	57,89 ± 1,20
Kvercetin	7,22 ± 0,20	210,51 ± 7,26
(+)-katehin	-	18,44 ± 0,47
Cijanidin-sofrozid	308,90 ± 15,69	-
Cijanidin-glukorutinozid	119,18 ± 1,24	-
Cijanidin glukozid	131,34 ± 0,89	-
Cijanidin-rutinozid	109,24 ± 0,76	-
Pelargonidin-soforozid	4,68 ± 0,16	-
Σ Fenolne kiseline	50,13 ± 1,09	81,75 ± 4,04
Σ Flavonoli	29,41 ± 0,23	308,31 ± 4,49
Σ Flavan-3-oli	-	18,44 ± 0,26
Σ Antocijani	673,34 ± 6,68	-
Σ Fenolnih jedinjenja	752,88 ± 6,92	564,3 ± 6,12

Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± SD (n = 3).



Slika 4.18. Procentni udeo fenolnih jedinjenja u ekstraktu ploda domaće maline
(*Rubus idaeus* L.)



Slika 4.19. Procentni udeo fenolnih jedinjenja u ekstraktu lista domaće maline (*Rubus idaeus* L.)

Najveći sadržaj flavonola pronađen je u listu maline, zatim u plodu. Kvercetin je najzastupljeniji u ekstraktima lista maline, ali takođe je utvrđeno prisustvo kemferol-glucozida, miricetina i rutina (prilog, slika P18). U plodu je utvrđeno prisustvo kvercetina, miricetina, rutina i kvercetin-3-glucozida (prilog, slika P40). Literaturni podaci takođe potvrđuju prisustvo kvercetina i njegovih derivata kao predominantnih flavonola u ekstraktima maline (Mullen i sar., 2002; Mullen i sar., 2003; Jakobek i sar., 2009; Turkben i sar., 2010).

U ekstraktima lista maline utvrđeno je prisustvo flavan-3-ola, (+)-katehina.

Analizom HPLC dijagrama utvrđeno je prisustvo antocijana u ekstraktima ploda maline (prilog, slika P41). Najzastupljeniji su cijanidin-sofroزيد, cijanidin-glukorutinozid, zatim cijanidin-rutinozid. Takođe je prisutan i pelargonidin-soforozid u ekstraktima ploda domaće maline (tabela 4.12 i prilog, slika P41). Predominatni antocijani, derivati cijanidina i pelargonidina, u plodovima malina publikovali su i drugi autori (Mullen i sar., 2002; Maatta-Riihinen i sar., 2004; Kassim i sar., 2009; Remberg i sar., 2010).

4.2.5. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda i lista domaće maline (*Rubus idaeus* L.)

Antioksidativna aktivnost ekstrakata dobijenih od ploda i lista maline određena je DPPH testom, a rezultati analiza, izraženi vrednošću EC_{50} (mg/ml) prikazani su u tabeli 4.14. Svi ekstrakti pokazali su značajnu antioksidativnu aktivnost. Ekstrakti ploda maline pokazali su za 26% jaču antioksidativnu aktivnost od ekstrakata lista maline. Jaka antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda maline odgovara većem sadržaju fenolnih jedinjenja u njima što ukazuje da ova jedinjenja doprinose antioksidativnoj aktivnosti ispitivanih ekstrakta. Upoređujući rezultate HPLC analize fenolnog sastava ekstrakata ploda i lista domaće maline (tabela 4.13) i odgovarajuće vrednosti EC_{50} odgovarajućih ekstrakata (tabela 4.14) uočava se da su antocijani najviše doprineli jačoj antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata ploda maline.

Literaturni podaci takođe potvrđuju jaku antioksidativnu aktivnost ekstrakata ploda maline i njihovu visoku korelaciju sa ukupnim fenolnim sadržajem (Deighton i sar., 2000; Wang i Lin, 2000), kao i ekstrakta lista maline (Wang i Lin, 2000; Buricova i sar., 2011).

Tabela 4.14. Antioksidativna aktivnost EC_{50} (mg/mL) ekstrakata ploda i lista domaće maline (*Rubus idaeus* L.)

Biljni materijal	EC_{50} (mg/mL)
Domaća malina - plod	0,63 ± 0,04
Domaća malina - list	0,75 ± 0,06

Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± SD (n = 3).

4.2.6. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda i lista domaće maline (*Rubus idaeus* L.)

Antimikrobni potencijal testiranih ekstrakata ploda i lista domaće maline (*Rubus idaeus* L.) određen preko mikrodilucione metode opisane u eksperimentalnom delu i izražen preko minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktricialne koncentracije (MBC) prikazan je u tabeli 4.15.

Iz tabele 4.15 može se zaključiti da su testirani ekstrakti lista i ploda maline pokazali značajnu antimikrobnu aktivnost na 12 bakterijskih sojeva i jedan kvasac koji je uporediv sa pozitivnom kontrolom tri antibiotika (streptomycin, tetraciklin i hloramfenikol), bez selektivnog dejstva na određeni soj mikroorganizma. Ekstrakti lista maline su pokazali jaču antimikrobnu aktivnost (i do 50% kod nekih testiranih sojeva) u odnosu na ekstrakte ploda maline (tabela 4.15) što se može povezati sa značajno većim sadržajem fenolnih kiselina i flavonola u ekstraktima lista u odnosu na plod (tabela 4.16).

Tabela 4.15. Minimalna inhibitorna i minimalna baktricialna koncentracija – MIC/MBC ($\mu\text{g/mL}$) ekstrakata ploda i lista domaće maline (*Rubus idaeus* L.)

	Domaća malina		Antibiotik		
	plod	list	St	Ch	Tet
Gram pozitivne bakterije					
<i>Clostridium perfringens</i>	108/220	50/110	-	1/8	0,9/0,9
<i>Bacillus cereus</i>	80/125	63/63	-	8/8	0,9/0,9
<i>Staphylococcus aureus</i>	48/100	20/48	-	2/16	0,12/0,9
<i>Listeria monocytogenes</i>	31/31	20/31	-	8/18	0,46/0,9
<i>Sarcina lutea</i>	63/63	31/80	-	0,5/2	0,06/0,06
<i>Micrococcus flavus</i>	110/183	50/110	-	1/1	0,4/0,9
Gram negativne bakterije					
<i>Escherichia coli</i>	150/320	140/260	16/16	-	3,8/7,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63/150	50/120	8/8	-	7,5/7,5
<i>Salmonella enteritidis</i>	65/125	55/110	4/4	-	0,9/1,9
<i>Shigella sonnei</i>	50/140	40/100	16/16	-	0,06/0,12
<i>Klebsiella pneumonia</i>	110/183	63/110	-	-	0,9/1,9
<i>Proteus vulgaris</i>	65/125	50/110	-	-	1,9/1,9
Kvasac					
<i>Candida albicans</i>	230/500	120/384	-	-	16/16

St – streptomycin; Ch – hloramfenikol; Tet – tetraciklin.

Gram-pozitivni sojevi mikroba (*Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Sarcina lutea*, *Micrococcus flavus*) pokazali su veću osetljivost na testirane ekstrakte u odnosu na gram-negativne sojeve (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris*).

Vrednosti MIC/MBC za testirane ekstrakte lista i ploda maline kod *Listeria monocytogene* bile su 20/31 i 31/31 µg/mL, dok su kod *Escherichie coli* iznosile 140/260 i 150/320 µg/mL, po redu javljanja. Kvasac kandida (*Candida albicans*) je pokazao najveću rezistenciju na oba ekstrakta (MIC vrednosti kod ekstrakata lista i ploda maline iznosile su 120 do 230, a MBC 384 do 500 µg/mL, po redu javljanja). Ovakava osetljivost mikrobnih sojeva na ekstrakte maline je u dobroj saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Puupponen-Pimiä i sar., 2001; Cavanagh i sar., 2003).

4.2.7. Fenolni sadržaj ekstrakata ploda i lista šipurka (*Rosa canina* L.)

Fenolni sadržaj ekstrakata ploda i lista šipurka dobijen UV-VIS metodom opisanom u eksperimentalnom delu prikazan je u tabeli 4.16 i na slici 4.20.

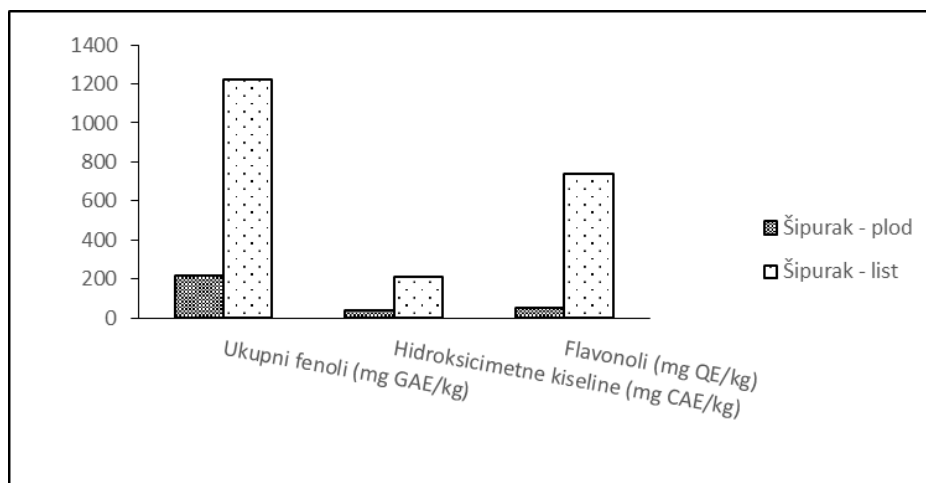
Tabela 4.16. Sadržaj ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavonola iz ekstrakata ploda i lista šipurka (*Rosa canina* L.)

Biljni materijal	Ukupni fenoli (mg GAE/kg)	Hidroksicimetne kiseline (mg CAE/kg)	Flavonoli (mg QE/kg)
Sipurak - plod	218,11 ± 5,34	39,16 ± 0,73	51,87 ± 1,38
Sipurak - list	1223,94 ± 7,69	210,07 ± 4,92	740,25 ± 5,11

Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± SD (n = 3).

Analizom rezultata prikazanih u tabeli 4.16. utvrđeno je da se značajno veći sadržaj ukupnih fenola nalazi u ekstraktima lista šipurka u odnosu na ekstrakte iz ploda šipurka. Sadržaj ukupnih fenola u listu šipurka je za 58,38% veći od ukupnog fenolnog sadržaja ploda šipurka (slika 4.20). Ovi rezultati su u dobroj saglasnosti sa literaturnim za neke *Rosa* vrste (Yi i sar., 2007). Listovi su pokazali veći sadržaj flavonola u odnosu na plod šipurka. List šipurka je pokazao veći sadržaj ove klase fenola i to za 78,4% veći u odnosu na plod

šipurka (slika 4.20). Koncentracija hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima lista šipurka bila je veća za 81,36% nego u ekstraktima ploda šipurka (slika 4.20).



Slika 4.20. Sadržaj ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavonola iz ekstrakata ploda i lista šipurka (*Rosa canina* L.)

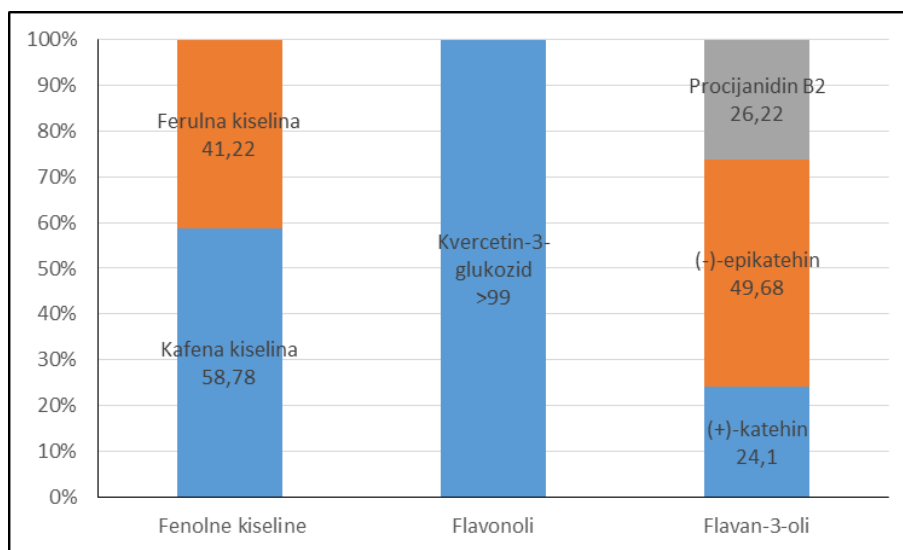
U cilju određivanja koncentracije fenolnih jedinjenja u testiranim ekstraktima ploda i lista šipurka korišćena je HPLC metoda. Rezultati HPLC analiza ovih ekstrakata prikazani su u tabeli 4.17. Procentni udeo pojedinih fenolnih jedinjenja iz ekstrakata ploda i lista šipurka prikazan je na slikama 4.21 i 4.22, po redu javljanja.

Tabela 4.17. Fenolni sastav (mg/kg) ekstrakata ploda i lista šipurka (*Rosa canina* L.)

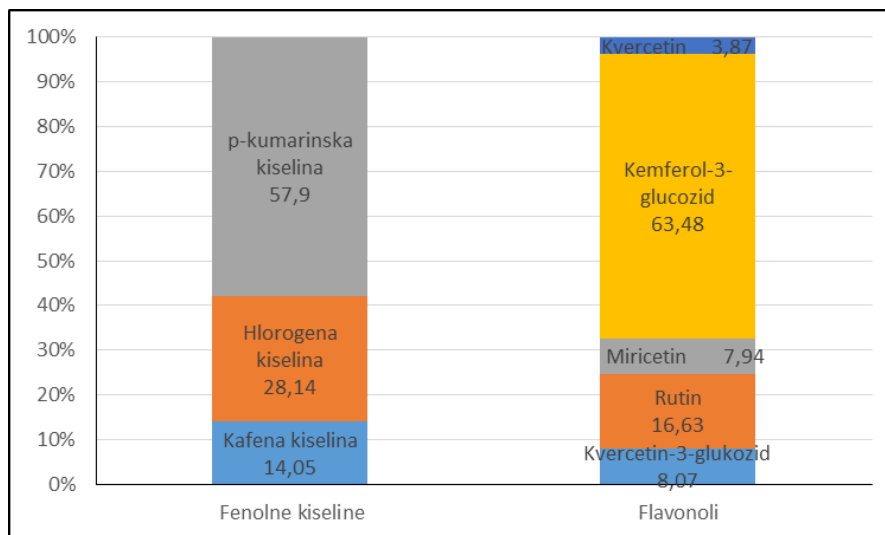
Fenolno jedinjenje	Šipurak	
	plod	list
Kafena kiselina	13,15 ± 0,11	22,14 ± 0,27
Hlorogena kiselina	-	44,36 ± 1,09
<i>p</i> -kumarinska kiselina	-	91,27 ± 1,84
Ferulna kiselina	9,22 ± 0,09	-
Kvercetin-3-glukozid	45,11 ± 1,14	52,37 ± 1,12
Rutin	-	107,84 ± 1,89
Miricetin	-	51,48 ± 1,02
Kemferol-3-glucozid	-	411,73 ± 7,09
Kvercetin	-	25,11 ± 0,35
(+)-katehin	5,23 ± 0,07	-
(-)-epikatehin	10,78 ± 0,10	-
Procijanidin B2	5,69 ± 0,07	-
∑ Fenolne kiseline	22,37 ± 0,28	157,62 ± 2,59
∑ Flavonoli	45,11 ± 0,74	648,09 ± 3,25
∑ Flavan-3-oli	21,7 ± 0,15	-
∑ Fenolnih jedinjenja	89,18 ± 1,07	806,71 ± 4,86

Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± SD (n = 3).

p-Kumarinska kiselina bila je najzastupljenija fenolna kiselina u ispitivanim ekstraktima lista šipurka, za 42,1% više u poređenju sa ostalim kiselinama (slika 4.22). Ostale identifikovane fenolne kiseline u listu šipurka bile su hlorogena i kafena (prilog, slika P19), dok su u plodu šipurka u najvećoj koncentraciji pronađene kafena i ferulna (slika 4.21 i prilog: slika P45).



Slika 4.21. Procentni udeo fenolnih jedinjenja u ekstraktu ploda šipurka (*Rosa canina* L.)



Slika 4.22. Procentni udeo fenolnih jedinjenja u ekstraktu lista šipurka (*Rosa canina* L.)

Na osnovu HPLC analize utvrđeno je da je veći sadržaj flavonola pronađen u ekstraktima lista u odnosu na plod šipurka. Kemferol-3-glucozid i rutin su najzastupljeniji u ekstraktima lista, ali takođe je utvrđeno prisustvo kvercetin-3-glucozida, miricetina i kvercetina (prilog, slika P20), dok je u ekstraktima ploda utvrđeno samo prisustvo kvercetin-3-glucozida (prilog, slika P46).

Flavan-3-oli su takođe detektovani u ekstraktima ploda šipurka. Identifikovana su dva flavan-3-olna monomera: (+) - katehin, (-) - epikatehin i jedan dimer, procijanidin B2 (prilog, slika P47).

4.2.8. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda i lista šipurka (*Rosa canina* L.)

Antioksidativna aktivnost ekstrakata dobijenih od ploda i lista šipurka određena je DPPH testom, a rezultati analiza, izraženi vrednošću EC_{50} (mg/mL) prikazani su u tabeli 4.18. Svi ekstrakti pokazali su značajnu antioksidativnu aktivnost. Jaču antioksidativnu aktivnost pokazali su ekstrakti lista šipurka, koji imaju i veći ukupni fenolni sadržaj u odnosu na ekstrakte ploda za 49,73%. Upoređujući rezultate HPLC analize fenolnog sastava ekstrakata ploda i lista šipurka (tabela 4.17) i odgovarajuće vrednosti EC_{50} odgovarajućih

ekstrakata (tabela 4.18) uočava se da su flavanoli i fenolne kiseline odgovorni za jaču antioksidativnu aktivnost, ekstrakata lista šipurka u odnosu na plod.

Značajnu korelaciju između sadržaja ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti ekstrakata šipuraka publikovali su Yi i sar., (2007).

Tabela 4.18. Antioksidativna aktivnost, EC₅₀ (mg/mL) ekstrakata ploda i lista šipurka (*Rosa canina* L.)

Biljni materijal	EC ₅₀ (mg/mL)
Sipurak - plod	1,87 ± 0,14
Sipurak - list	0,94 ± 0,09

Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± SD (n = 3).

4.2.9. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda i lista šipurka (*Rosa canina* L.)

Antimikrobni potencijal testiranih ekstrakata ploda i lista šipurka izražen preko minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktricialne koncentracije (MBC) prikazan je u tabeli 4.19.

Iz tabele 4.19 može se zaključiti da su testirani ekstrakti lista i ploda šipurka pokazali značajnu antimikrobnu aktivnost na 12 bakterijskih sojeva i jedan kvasac koji je uporediv sa pozitivnom kontrolom tri antibiotika (streptomycin, tetraciklin i hloramfenikol), i to bez ikakvog selektivnog dejstva na određeni soj mikroorganizma.

Analiza dobijenih rezultata je pokazala da ekstrakti lista šipurka pokazuju jaču antimikrobnu aktivnost u odnosu na ekstrakte ploda šipurka (tabela 4.19) što se može povezati sa značajno većim sadržajem fenolnih kiselina i flavonola u ekstraktima lista u odnosu na plod (tabela 4.16).

Gram-pozitivni sojevi mikroba (*Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Sarcina lutea*, *Micrococcus flavus*) pokazali su veću osetljivost na testirane ekstrakte u odnosu na gram-negativne sojeve (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris*).

Vrednosti MIC/MBC za testirane ekstrakte lista i ploda šipurka kod *Staphylococcus aureus* bile su 30/48 i 60/100 µg/mL, dok su kod *Escherichie coli* iznosile 140/260 i 160/320 µg/mL, po redu javljanja. Gram-pozitivne bakterije su osetljivije od gram-negativnih bakterija što je u skladu sa literaturnim podacima (Yi i sar., 2007). Kvasac *Candida albicans* je pokazao najveću rezistenciju na oba ekstrakta (MIC vrednosti kod ekstrakata lista i ploda šipurka iznosile su 125 do 250, a MBC 390 do 500 µg/mL, po redu javljanja).

Tabela 4.19. Minimalna inhibitorna i minimalna baktricialna koncentracija – MIC/MBC (µg/mL) ekstrakata ploda i lista šipurka (*Rosa canina* L.)

	Šipurak		Antibiotik		
	plod	list	St	Ch	Tet
Gram pozitivne bakterije					
<i>Clostridium perfringens</i>	110/240	53/110	-	1/8	0,9/0,9
<i>Bacillus cereus</i>	85/125	53/63	-	8/8	0,9/0,9
<i>Staphylococcus aureus</i>	60/100	30/48	-	2/16	0,12/0,9
<i>Listeria monocytogenes</i>	31/48	31/31	-	8/18	0,46/0,9
<i>Sarcina lutea</i>	63/80	48/80	-	0,5/2	0,06/0,06
<i>Micrococcus flavus</i>	120/183	63/110	-	1/1	0,4/0,9
Gram negativne bakterije					
<i>Escherichia coli</i>	160/320	140/260	16/16	-	3,8/7,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63/150	60/120	8/8	-	7,5/7,5
<i>Salmonella enteritidis</i>	80/125	63/110	4/4	-	0,9/1,9
<i>Shigella sonnei</i>	63/140	50/100	16/16	-	0,06/0,12
<i>Klebsiella pneumonia</i>	110/183	63/110	-	-	0,9/1,9
<i>Proteus vulgaris</i>	65/125	50/110	-	-	1,9/1,9
Kvasac					
<i>Candida albicans</i>	250/500	125/390	-	-	16/16

St – streptomycin; Ch – hloramfenikol; Tet – tetraciklin.

4.2.10. Fenolni sadržaj ekstrakata ploda i lista trnjine (*Prunus spinosa* L.)

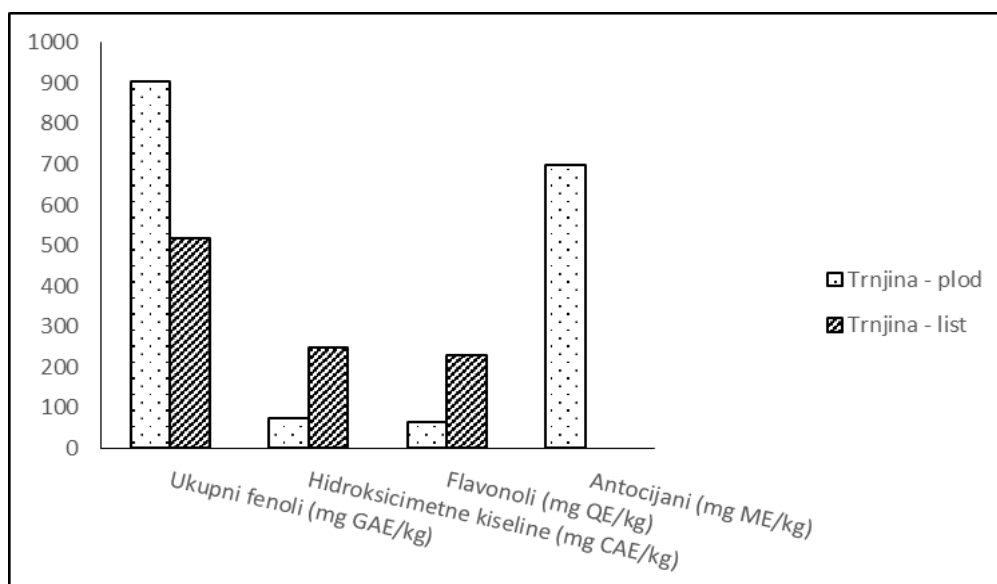
Ekstrakti ploda i lista trnjine pokazali su fenolni sadržaj dobijen UV-Vis metodom opisanom u eksperimentalnom delu čiji su rezultati prikazani u tabeli 4.20 i na slici 4.23.

Tabela 4.20. Sadržaj ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavonola iz ekstrakata ploda i lista trnjine (*Prunus spinosa* L.)

Biljni materijal	Ukupni fenoli (mg GAE/kg)	Hidroksicimetne kiseline (mg CAE/kg)	Flavonoli (mg QE/kg)	Antocijani (mg ME/kg)
Trnjina - plod	902,83 ± 11,46	72,83 ± 1,79	64,72 ± 1,18	698,14 ± 7,03
Trnjina - list	517,29 ± 6,21	247,05 ± 3,45	229,16 ± 3,51	-

Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± SD (n = 3).

Analizom ovih rezultata utvrđeno (tabela 4.20 i slika 4.23) je da se značajno veći sadržaj ukupnih fenola nalazi u ekstraktima ploda trnjine u odnosu na ekstrakte iz lista trnjine.



Slika 4.23. Sadržaj ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavonola iz ekstrakata ploda i lista trnjine (*Prunus spinosa* L.)

Sadržaj ukupnih fenola u plodu trnjine je za 42,71% veći od ukupnog fenolnog sadržaja lista trnjine. Dragović-Uzelac sar. (2007) su našli ukupne fenole u količini 546 i 858 mg/kg u ekstraktima plodova trnjine. Antocijani su pronađeni samo u plodu trnjine ($698,14 \pm 7,03$ mg ME/kg) (tabela 4.20 i slika 4.23). Ovi rezultati su u dobroj saglasnosti sa literaturnim podacima publikovanim od Sikora i sar., (2013), gde su kvantifikovani antocijani od 715 mg/kg. Veličković i sar., (2014) su našli značajno manji sadržaj ukupnih antocijana u ekstraktima trnjine dobijenih upotrebom različitih rastvarača (sadržaj antocijana bio je od 110 do 265 mg/kg). Listovi su pokazali veći sadržaj flavonola u odnosu na plod trnjine. List trnjine je pokazao najveći sadržaj ove klase fenola i to za 71,76% veći u odnosu na plod (tabela 4.20 i slika 4.23).

U cilju određivanja koncentracije fenolnih jedinjenja u testiranim ekstraktima ploda i lista trnjine korišćena je HPLC metoda. Rezultati HPLC analiza ovih ekstrakata prikazani su u tabeli 4.21. Procentni udeo pojedinih fenolnih jedinjenja iz ekstrakata ploda i lista trnjine prikazan je na slikama 4.24 i 4.25, po redu javljanja.

Hlorogena kiselina bila je najzastupljenija fenolna kiselina u ispitivanim ekstraktima lista trnjine, za 47,88% više u poredjenju sa ostalim kiselinama (slika 4.24). Ostale identifikovane fenolne kiseline u ekstraktima lista i ploda trnjine bile su: kafena i p-kumarinska (prilog, slike P21 i P35, po redu javljanja). Veličković i sar., (2014) su detektovali kafenu i neohlorogenu kiselinu u ekstraktima ploda trnjine.

Najveći sadržaj flavonola pronađen je u ekstraktima lista, a zatim u plodu trnjine. Kemferol-3-glucozid je najzastupljeniji u ekstraktima lista trnjine, ali takođe je utvrđeno prisustvo rutna, miricetina, kvercetin-3-glukozida i kvercetina (slika 4.25 i prilog: slika P36), dok je u ekstraktima ploda utvrđeno prisustvo kvercetin-3-glukozida i rutina (slika 4.24 i prilog: slika P22). Drugi autori su identifikovali miricetin i kvercetin kao najzastupljenije flavonole u ekstraktima ploda trnjine (Veličković i sar., 2014).

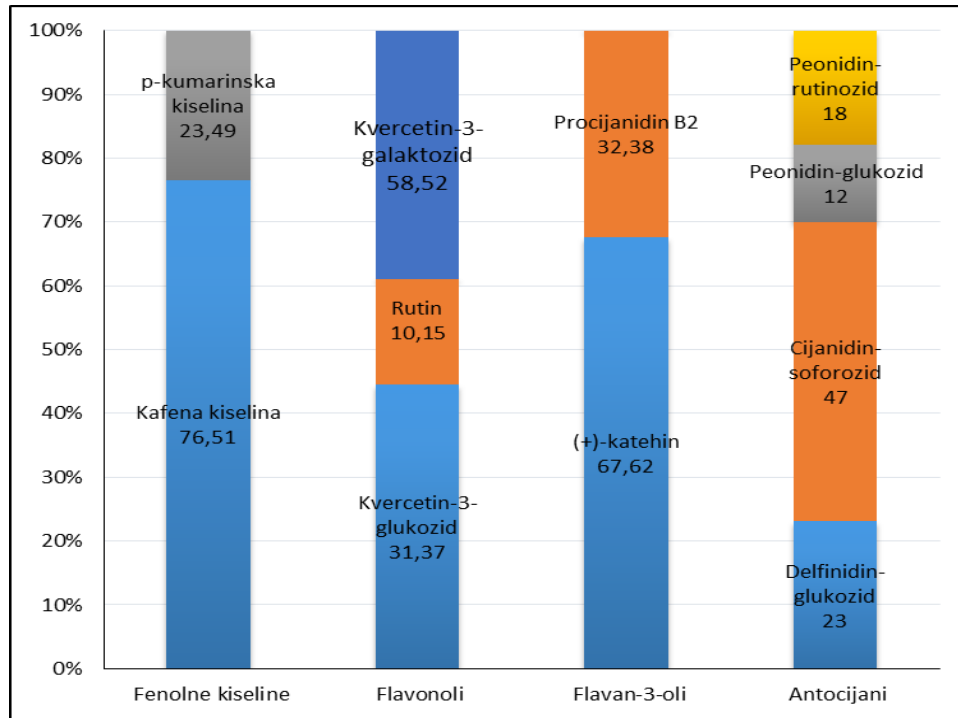
U ekstraktima ploda trnjine identifikovan je flavan-3-olni monomer, (+)-katehin, i jedan dimer, procijanidin B2 (prilog, slika P38), dok u ekstraktima lista ova jedinjenja nisu identifikovana.

Tabela 4.21. Fenolni sastav (mg/kg) ekstrakata ploda i lista trnjine (*Prunus spinosa L.*)

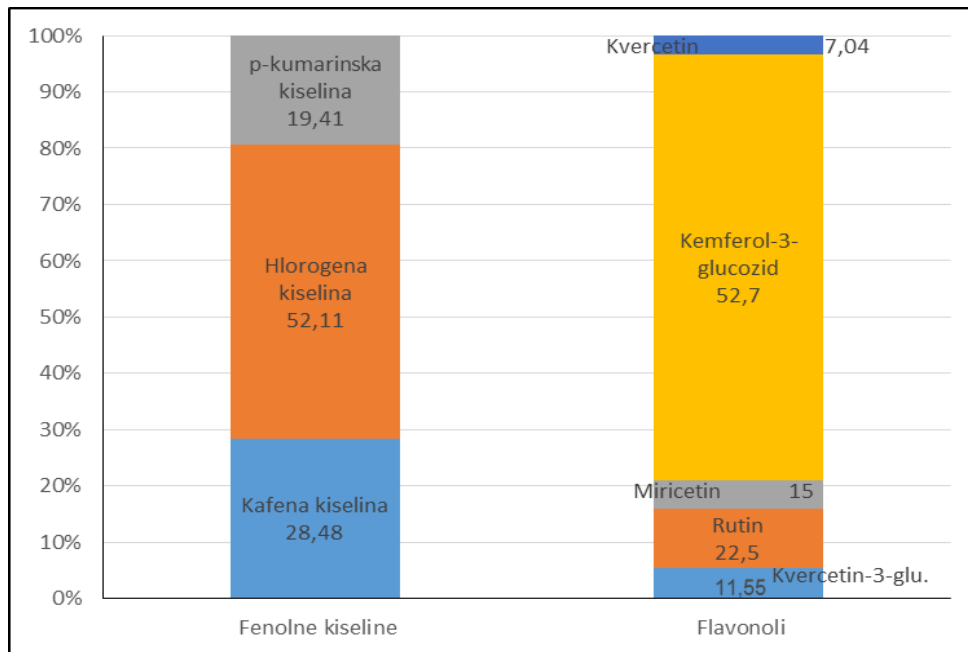
Fenolno jedinjenje	Trnjina	
	plod	list
Kafena kiselina	45,34 ± 1,08	55,98 ± 1,10
Hlorogena kiselina	-	102,45 ± 1,98
<i>p</i> -kumarinska kiselina	13,92 ± 0,23	38,16 ± 0,65
Kvercetin-3-glukozid	32,02 ± 0,64	26,69 ± 0,33
Rutin	11,86 ± 0,18	51,96 ± 0,51
Miricetin	-	24,39 ± 0,27
Kemferol-3-glucosid	-	371,77 ± 3,94
Kvercetin	-	16,27 ± 0,16
(+)-katehin	9,42 ± 0,11	-
Procijanidin B2	4,51 ± 0,07	-
Delfinidin-glukozid	117,09 ± 2,08	-
Cijanidin-soforozid	238,71 ± 3,61	-
Peonidin-glukozid	60,97 ± 1,13	-
Peonidin-rutinozid	91,14 ± 2,01	-
∑ Fenolne kiseline	59,26 ± 0,86	196,59 ± 3,09
∑ Flavonoli	43,88 ± 0,57	167,30 ± 3,12
∑ Flavan-3-oli	13,93 ± 0,25	-
∑ Antocijani	507,91 ± 4,47	-
∑ Fenolnih jedinjenja	624,98 ± 4,93	363,89 ± 4,47

Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± SD (n = 3).

Analizom HPLC hromatograma utvrđeno je prisustvo antocijana u ekstraktima ploda trnjine (prilog, slika P37). Ova jedinjenja bila su prisutna u plodu trnjine sa 23 i 47% od ukupnog fenolnog sadržaja ekstrakata ploda trnjine. Delfinidin-glukozid bio je najzastupljeniji u ekstraktima ploda trnjine, zatim utvrđeno je prisustvo cijanidin-soforozida, peonidin-glukozida i peonidin-rutinozida (slika 4.24). Sličan antocijanidni sastav publikovali su i drugi autori, gde preovladavaju derivati cijanidina i peonidina (Stefanut i sar., 2011; Veličković i sar., 2014).



Slika 4.24. Procentni udeo fenolnih jedinjenja u ekstraktu ploda trnjine (*Prunus spinosa* L.)



Slika 4.25. Procentni udeo fenolnih jedinjenja u ekstraktu lista trnjine (*Prunus spinosa* L.)

4.2.11. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda i lista trnjine (*Prunus spinosa* L.)

Antioksidativna aktivnost ekstrakata dobijenih od ploda i lista trnjine određena je DPPH testom, a rezultati analiza izraženi vrednošću EC₅₀ (mg/mL) prikazani su u tabeli 4.22. Svi ekstrakti pokazali su značajnu antioksidativnu aktivnost. Jaču antioksidativnu aktivnost pokazali su ekstrakti ploda trnjine u poređenju sa ekstraktima lista. Jaka antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda trnjine odgovara većem sadržaju fenolnih jedinjenja u njima što opet ukazuje da ova jedinjenja doprinose antioksidativnoj aktivnosti ispitivanih ekstrakta. Upoređujući rezultate HPLC analize fenolnog sastava ekstrakata ploda i lista trnjine (tabela 4.21) i odgovarajuće vrednosti EC₅₀ odgovarajućih ekstrakata (tabela 4.22) uočava se da su antocijani odgovorni za jaču antioksidativnu aktivnost ekstrakata ploda trnjine.

Jaku antioksidativnu aktivnost kao i dobru korelaciju sa ukupnim fenolnim sadržajem ekstrakta trnjine utvrdili su i drugi autori (Dragović-Uzelac sar., 2007; Stefanut i sar., 2011; Sikora i sar., 2013; Veličković i sar., 2014).

Tabela 4.22. Antioksidativna aktivnost (EC₅₀, mg/mL) ekstrakata ploda i lista trnjine (*Prunus spinosa* L.)

Biljni materijal	EC ₅₀ (mg/mL)
Trnjina - plod	0,66 ± 0,07
Trnjina - list	1,09 ± 0,11

4.2.12. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda i lista trnjine (*Prunus spinosa* L.)

Antimikrobni potencijal testiranih ekstrakata ploda i lista trnjine izražene preko minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktricialne koncentracije (MBC) prikazan je u tabeli 4.23.

Iz tabele 4.23 može se zaključiti da su testirani ekstrakti lista i ploda trnjine pokazali značajnu antimikrobnu aktivnost na 12 bakterijskih sojeva i jedan kvasac koji je uporediv sa

pozitivnom kontrolom tri antibiotika (streptomycin, tetraciklin i hloramfenikol), bez selektivnog dejstva na određeni soj mikroorganizma. Ekstrakti lista trnjine su pokazali nešto jaču antimikrobnu aktivnost u odnosu na ekstrakte ploda trnjine (tabela 4.23) što se može povezati sa značajno većim sadržajem fenolnih kiselina i flavonola u ekstraktima lista u odnosu na plod (tabela 4.21). Ovo ukazuje na postojanje korelacije između antimikrobne aktivnosti testiranih ekstrakata i sadržaja pojedinih klasa fenolnih jedinjenja u njima, o kojoj su izvestili i drugi autori (Veličković i sar., 2014).

Tabela 4.23. Minimalna inhibitorna i minimalna baktricialna koncentracija – MIC/MBC $\mu\text{g/mL}$, ekstrakata ploda i lista trnjine

	Trnjina		Antibiotik		
	plod	list	St	Ch	Tet
Gram pozitivne bakterije					
<i>Clostridium perfringens</i>	108/230	53/110	-	1/8	0,9/0,9
<i>Bacillus cereus</i>	85/125	48/60	-	8/8	0,9/0,9
<i>Staphylococcus aureus</i>	63/100	30/31	-	2/16	0,12/0,9
<i>Listeria monocytogenes</i>	31/31	31/31	-	8/18	0,46/0,9
<i>Sarcina lutea</i>	63/63	40/70	-	0,5/2	0,06/0,06
<i>Micrococcus flavus</i>	110/150	60/100	-	1/1	0,4/0,9
Gram negativne bakterije					
<i>Escherichia coli</i>	150/280	125/250	16/16	-	3,8/7,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60/125	60/110	8/8	-	7,5/7,5
<i>Salmonella enteritidis</i>	70/125	60/110	4/4	-	0,9/1,9
<i>Shigella sonnei</i>	60/120	50/85	16/16	-	0,06/0,12
<i>Klebsiella pneumonia</i>	110/150	65/100	-	-	0,9/1,9
<i>Proteus vulgaris</i>	60/120	50/100	-	-	1,9/1,9
Kvasac					
<i>Candida albicans</i>	240/500	120/380	-	-	16/16

St – streptomycin; Ch – hloramfenikol; Tet – tetraciklin.

Gram-pozitivni sojevi (*Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Sarcina lutea*, *Micrococcus flavus*) pokazali su veću osetljivost na testirane ekstrakte u odnosu na gram-negativne sojeve (*Escherichia coli*,

Pseudomonas aeruginosa, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris*). Vrednosti MIC/MBC za testirane ekstrakte lista i ploda trnjine kod *Staphylococcus aureus* bile su 30/31 i 60/100 µg/mL, dok su kod *Escherichie coli* iznosile 150/280 i 183/340 µg/mL, po redu javljanja. Kvasac kandida (*Candida albicans*) je pokazao najveću rezistenciju na oba ekstrakta (MIC vrednosti kod ekstrakata lista i ploda gloga iznosile su 250 i 500, a MBC 500 µg/mL, po redu javljanja). Literaturni podaci potvrđuju naše rezultate tj. veću aktivnost ekstrakata biljnih vrsta na gram pozitivne bakterije u odnosu na gram negativne i kvasce (Puupponen-Pimiä i sar., 2001; Cavanagh i sar., 2003).

4.2.13. Fenolni sadržaj ekstrakata ploda i lista gloga (*Crataegus oxyacantha* L.)

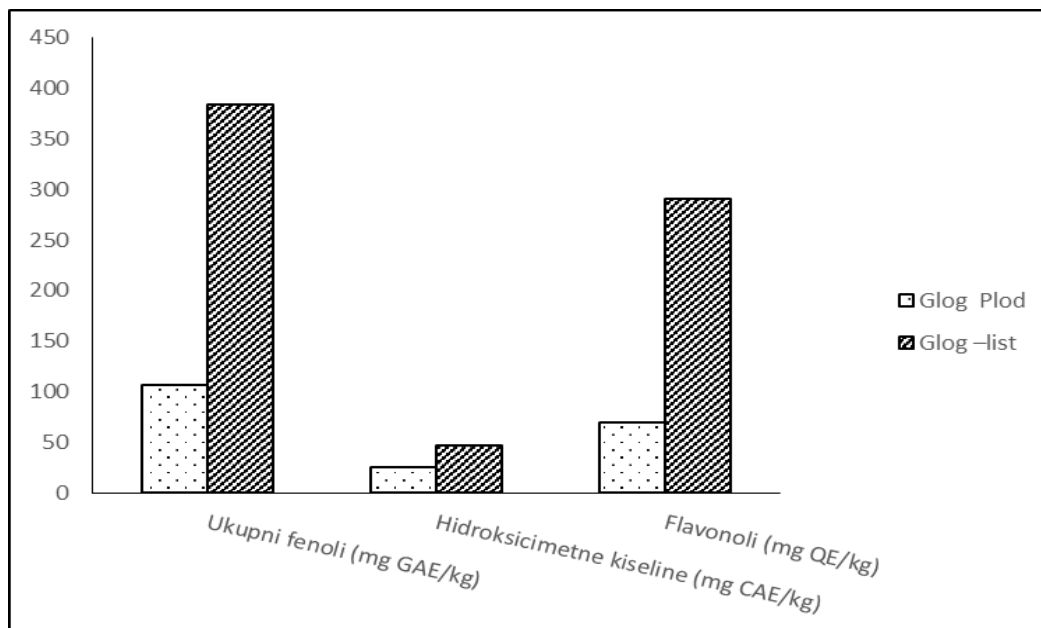
Ekstrakti ploda i lista gloga pokazali su fenolni sadržaj dobijen UV-VIS metodom opisanom u eksperimentalnom delu čiji su rezultati prikazani u tabeli 4.24 i na slici 4.26.

Tabela 4.24. Sadržaj ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavonola iz ekstrakata ploda i lista gloga (*Crataegus oxyacantha* L.)

Biljni materijal	Ukupni fenoli (mg GAE/kg)	Hidroksicimetne kiseline (mg CAE/kg)	Flavonoli (mg QE/kg)
Glog - plod	106,35 ± 2,95	25,74 ± 0,40	69,47 ± 1,02
Glog - list	384,52 ± 2,73	46,93 ± 0,71	290,21 ± 1,17

Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± SD (n = 3).

Analizom ovih rezultata utvrđeno je (tabela 4.24) da se veći sadržaj ukupnih fenola nalazi u ekstraktima lista gloga u odnosu na ekstrakte iz ploda gloga. Sadržaj ukupnih fenola u listu gloga je za 6,56% veći od sadržaja ukupnih fenola u plodu. Ekstrakt ploda gloga je pokazao 11,65% veći sadržaj flavonola u odnosu na ekstrakt lista gloga (slika 4.26).



Slika 4.26. Sadržaj ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavonola iz ekstrakata ploda i lista gloga (*Crataegus oxyacantha* L.)

Koncentracija hidroksicimetnih kiselina bila je manja u ekstraktima ploda gloga, za 55% u odnosu na koncentraciju ovih kiselina u ekstraktu lista gloga (slika 4.26). Antocijani nisu pronađeni u ekstraktima ploda i lista gloga.

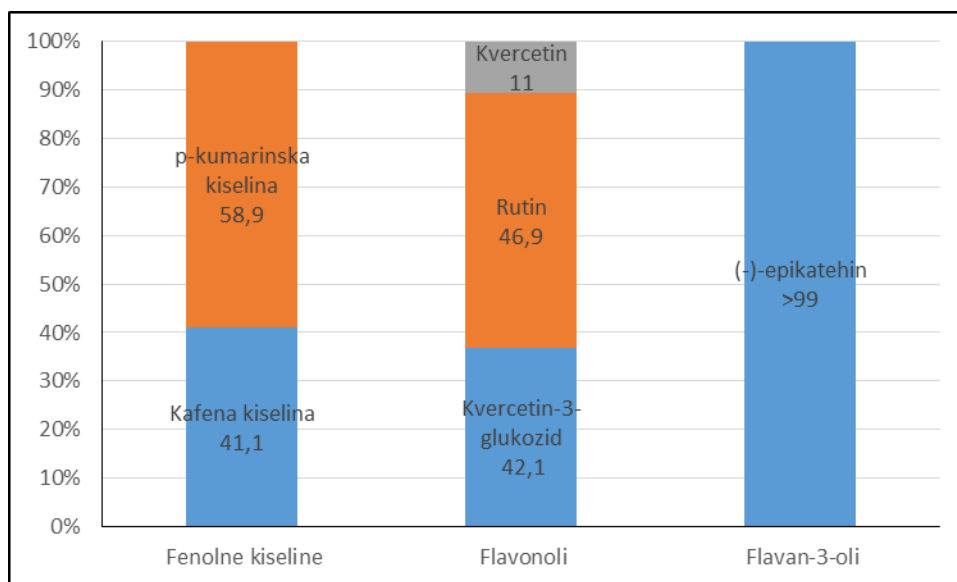
U cilju određivanja koncentracije fenolnih jedinjenja u testiranim ekstraktima ploda i lista gloga korišćena je HPLC metoda. Rezultati HPLC analiza ovih ekstrakata prikazani su u tabeli 4.25. Procentni udeo pojedinih fenolnih jedinjenja iz ekstrakata ploda i lista gloga prikazan je na slikama 4.27 i 4.28, po redu javljanja.

Hlorogena kiselina bila je najzastupljenija fenolna kiselina u ispitivanim ekstraktima lista gloga za 46,15% u odnosu na ukupne fenolne kiseline zastupljene u listu (slika 4.28). Ekstrakti lista gloga pokazali su i prisustvo p-kumarinske kiseline (prilog, slika P14). Ostale identifikovane fenolne kiseline u ekstraktima ploda gloga bile su kafena i p-kumarinska kiselina (prilog, slika P48). Salmanian i sar., (2014) su našli kafenu i hlorogenu kiselinu u ekstraktima gloga, dok su Aneta i Oszmianski (2007) identifikovali samo kafenu kiselinu, a Bahri-Sahloul i sar., (2009) samo hlorogenu kiselinu.

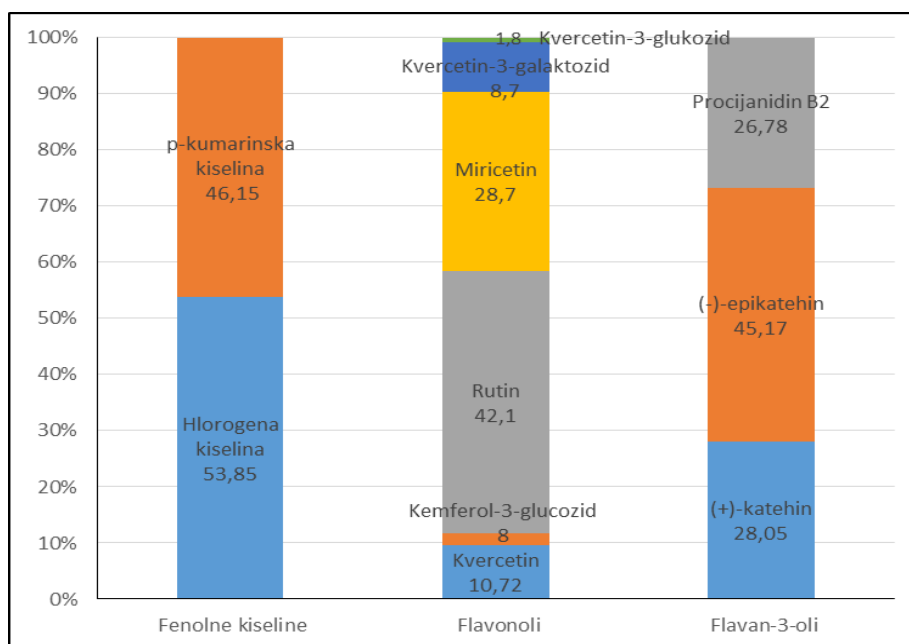
Tabela 4.25. Fenolni sastav mg/kg ekstakata ploda i lista gloga (*Crataegus oxyacantha L.*)

Fenolno jedinjenje	Glog	
	plod	list
Kafena kiselina	6,25 ± 0,11	-
Hlorogena kiselina	-	19,27 ± 0,24
<i>p</i> -kumarinska kiselina	8,96 ± 0,20	16,52 ± 0,19
Kvercetin-3-galaktozid	-	8,71 ± 0,15
Kvercetin-3-glukozid	27,41 ± 0,27	4,77 ± 0,11
Rutin	30,56 ± 0,24	60,14 ± 0,60
Miricetin	-	70,04 ± 1,16
Kemferol-3-glucozid	-	17,95 ± 0,31
Kvercetin	7,15 ± 0,10	18,06 ± 0,19
(+)-katehin	-	1,77 ± 0,05
(-)-epikatehin	3,71 ± 0,08	2,85 ± 0,04
Procijanidin B2	-	1,69 ± 0,04
∑ Fenolne kiseline	15,21 ± 0,13	35,79 ± 0,50
∑ Flavonoli	65,12 ± 0,44	49,27 ± 0,45
∑ Flavan-3-oli	3,71 ± 0,07	6,31 ± 0,09
∑ Fenolnih jedinjenja	84,04 ± 1,59	91,37 ± 1,28

Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± SD (n = 3).



Slika 4.27. Procentni udeo fenolnih jedinjenja u ekstraktu ploda gloga (*Crataegus oxyacantha L.*)



Slika 4.28. Procentni udeo fenolnih jedinjenja u ekstraktu lista gloga (*Crataegus oxyacantha L.*)

Sledeća klasa fenolnih jedinjenja koja je identifikovana u ekstraktima ploda i lista gloga su flavonoli. Miricetin i rutin su najzastupljeniji u ekstraktima lista gloga, ali takođe je utvrđeno prisustvo kvercetin-3-glucozida, kvercetin-3-galaktosida, kemferol-3-glucozida i kvercetina (prilog, slika P15), dok su u ekstraktima ploda identifikovani rutin, kvercetin-3-glucozid i kvercetin (prilog, slika P49). Drugi autori su identifikovali kvercetin, hiperozid i rutin kao predominantne flavonole u ekstraktima gloga (Bersin i sar., 1955; Rewerski i Lewak, 1967; Verma i sar., 2007; Aneta i Oszmianski, 2007; Bahri-Sahloul i sar., 2009).

U ekstraktima lista gloga pronađeni su flavan-3-olni monomeri, (+)-katehin i (-)-epikatehin, i jedan dimer, procijanidin B2, dok je plodu identifikovan samo flavan-3-olni monomer, (-)-epikatehin. HPLC hromatogrami ploda i lista gloga su prikazani u prilogu, slike P16 i P50, po redu javljanja.

4.2.14. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda i lista gloga (*Crataegus oxyacantha L.*)

Antioksidativna aktivnost ekstrakata dobijenih od ploda i lista gloga određena je DPPH testom, a rezultati analiza izraženi vrednošću EC_{50} (mg/mL) prikazani su u tabeli 4.26. Manje EC_{50} vrednosti odgovaraju jačoj antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata. Svi ekstrakti pokazali su značajnu antioksidativnu aktivnost. Ekstrakti lista gloga pokazali su

nesto jaču antioksidativnu aktivnost u odnosu na ekstrakte ploda gloga za 8,37%. Jaka antioksidativna aktivnost ovih ekstrakata je povezana sa visokim sadržajem fenolnih jedinjenja u njima što ukazuje da ova jedinjenja doprinose antioksidativnoj aktivnosti ispitivanih ekstrakata. Upoređujući rezultate HPLC analize fenolnog sastava ekstrakata ploda i lista gloga (tabela 4.25) i odgovarajuće vrednosti EC_{50} odgovarajućih ekstrakata (tabela 4.26) uočava se da su fenolne kiseline odgovorne za jaču antioksidativnu aktivnost ekstrakata lista gloga. Značajnu antioksidativnu aktivnost ekstrakata gloga publikovali su i drugi autori (Salmanian i sar., 2014).

Tabela 4.26. Antioksidativna aktivnost, EC_{50} (mg/mL) ekstrakata ploda i lista gloga (*Crataegus oxyacantha* L.)

Biljni materijal	EC_{50} (mg/mL)
Glog - plod	$2,15 \pm 0,35$
Glog - list	$1,97 \pm 0,27$

4.2.15. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda i lista gloga (*Crataegus oxyacantha* L.)

Antimikrobni potencijal testiranih ekstrakata ploda i lista gloga izražen preko minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktricialne koncentracije (MBC) prikazan je u tabeli 4.27.

Iz tabele 4.27 može se zaključiti da su testirani ekstrakti lista i ploda gloga pokazali značajnu antimikrobnu aktivnost na 12 bakterijskih sojeva i jedan kvasac koji je uporediv sa pozitivnom kontrolom tri antibiotika (streptomycin, tetraciklin i hloramfenikol), bez selektivnog dejstva na određeni soj mikroorganizma. Ekstrakti lista gloga su pokazali nešto jaču antimikrobnu aktivnost u odnosu na ekstrakte ploda gloga (tabela 4.27) što se može povezati sa značajno većim sadržajem fenolnih kiselina i flavonola u ekstraktima lista u odnosu na plod (tabela 4.25).

Gram-pozitivni sojevi (*Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphilococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Sarcina lutea*, *Micrococcus flavus*) pokazali su veću osetljivost na testirane ekstrakte u odnosu na gram-negativne sojeve (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumonia*,

Proteus vulgaris). Vrednosti MIC/MBC za testirane ekstrakte lista i ploda gloga kod *Staphylococcus aureus* bile su 50/70 i 80/120 µg/mL, dok su kod *Escherichia coli* iznosile 150/280 i 183/340 µg/mL, po redu javljanja. Salmanian i sar., (2014) izvestili su o antimikrobnoj aktivnosti ekstrakata gloga testiranih na odabrane gram-pozitivne i gram-negativne bakterijske sojeve. Kvasac kandida (*Candida albicans*) je pokazao najveću rezistenciju na oba ekstrakta (MIC vrednosti kod ekstrakata lista i ploda gloga iznosile su 250 i 500, a MBC 500 i 500 µg/mL, po redu javljanja).

Tabela 4.27. Minimalna inhibitorna minimalna baktricialna koncentracija
– MIC/MBC (µg/mL) ekstrakata ploda i lista gloga (*Crataegus oxyacantha* L.)

	Glog		Antibiotik		
	plod	list	St	Ch	Tet
Gram pozitivne bakterije					
<i>Clostridium perfringens</i>	130/320	60/130	-	1/8	0,9/0,9
<i>Bacillus cereus</i>	110/155	83/83	-	8/8	0,9/0,9
<i>Staphylococcus aureus</i>	80/120	50/70	-	2/16	0,12/0,9
<i>Listeria monocytogenes</i>	63/80	63/63	-	8/18	0,46/0,9
<i>Sarcina lutea</i>	70/90	63/95	-	0,5/2	0,06/0,06
<i>Micrococcus flavus</i>	125/220	80/150	-	1/1	0,4/0,9
Gram negativne bakterije					
<i>Escherichia coli</i>	183/340	150/280	16/16	-	3,8/7,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	80/150	83/125	8/8	-	7,5/7,5
<i>Salmonella enteritidis</i>	110/150	85/130	4/4	-	0,9/1,9
<i>Shigella sonnei</i>	83/150	63/120	16/16	-	0,06/0,12
<i>Klebsiella pneumonia</i>	120/183	70/140	-	-	0,9/1,9
<i>Proteus vulgaris</i>	70/150	60/130	-	-	1,9/1,9
Kvasac					
<i>Candida albicans</i>	500/500	250/500	-	-	16/16

St – streptomicin; Ch – hloramfenikol; Tet – tetraciklin.

4.3. Fenolni sadržaj, antioksidativna i antimikrobna aktivnost odabranih biljnih vrsta porodice *Grossulariaceae*

4.3.1. Fenolni sadržaj ekstrakata ploda i lista crne ribizle (*Ribes nigrum* L.)

Ekstrakti ploda i lista crne ribizle pokazali su fenolni sadržaj dobijen UV-Vis metodom opisanom u eksperimentalnom delu čiji su rezultati prikazani u tabeli 4.28 i na slici 4.29.

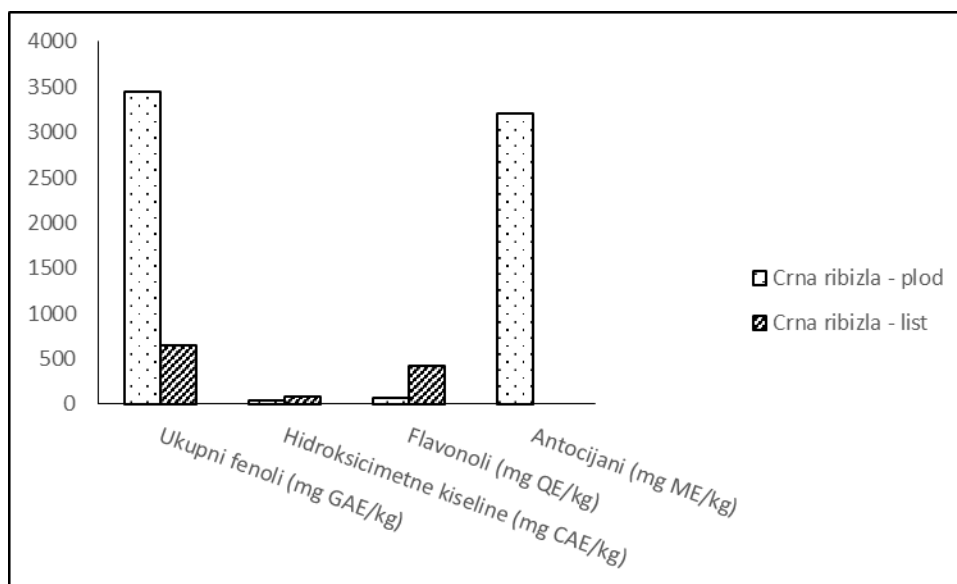
Tabela 4.28. Sadržaj ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavonola iz ekstrakata ploda i lista crne ribizle (*Ribes nigrum* L.)

Biljni material	Ukupni fenoli (mg GAE/kg)	Hidroksicimetne kiseline (mg CAE/kg)	Flavonoli (mg QE/kg)	Antocijani (mg ME/kg)
Crna ribizla - plod	3450,24 ± 50,11	40,15 ± 1,21	69,72 ± 1,93	3211,41 ± 47,03
Crna ribizla - list	641,95 ± 4,08	78,19 ± 2,11	427,65 ± 2,27	-

Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± SD (n = 3).

Analizom prikazanih rezultata utvrđeno je (tabela 4.28 i slika 4.29) da se značajno veći sadržaj ukupnih fenola nalazi u ekstraktima ploda crne ribizle u odnosu na ekstrakte iz lista crne ribizle. Sadržaj ukupnih fenola u plodu crne ribizle je za 92,98% veći od ukupnog fenolnog sadržaja u listu crne ribizle. Visok sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima crne ribizle izvestili su i drugi autori (Jakobek i sar., 2007; Vagiri i sar., 2012; Petrisor i sar., 2013). Listovi su pokazali veći sadržaj flavonola i hidroksicimetnih kiselina u odnosu na plod kod crne ribizle (slika 4.29). List crne ribizle je pokazao najveći sadržaj flavonola i to za 45,38% veći u odnosu na plod. Koncentracija hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima lista bila je veća za 48,65% nego u plodu crne ribizle. Antocijani su pronađeni samo u plodu crne ribizle (slika 4.29). Ukupni sadržaj antocijana u plodu crne ribizle je 3211,41 ± 47,03 (mg ME/kg). Ovi rezultati su u dobroj saglasnosti sa literaturnim podacima publikovanim od Jakobek i sar., (2007) i Petrisor i sar., (2013).

U cilju određivanja koncentracije fenolnih jedinjenja u testiranim ekstraktima ploda i lista crne ribizle korišćena je HPLC metoda. Rezultati HPLC analiza ovih ekstrakata prikazani su u tabeli 4.29. Procentni udeo pojedinih fenolnih jedinjenja iz ekstrakata ploda i lista crne ribizle prikazan je na slikama 4.30 i 4.31, po redu javljanja.



Slika 4.29. Sadržaj ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavonola iz ekstrakata ploda i lista crne ribizle (*Ribes nigrum* L.)

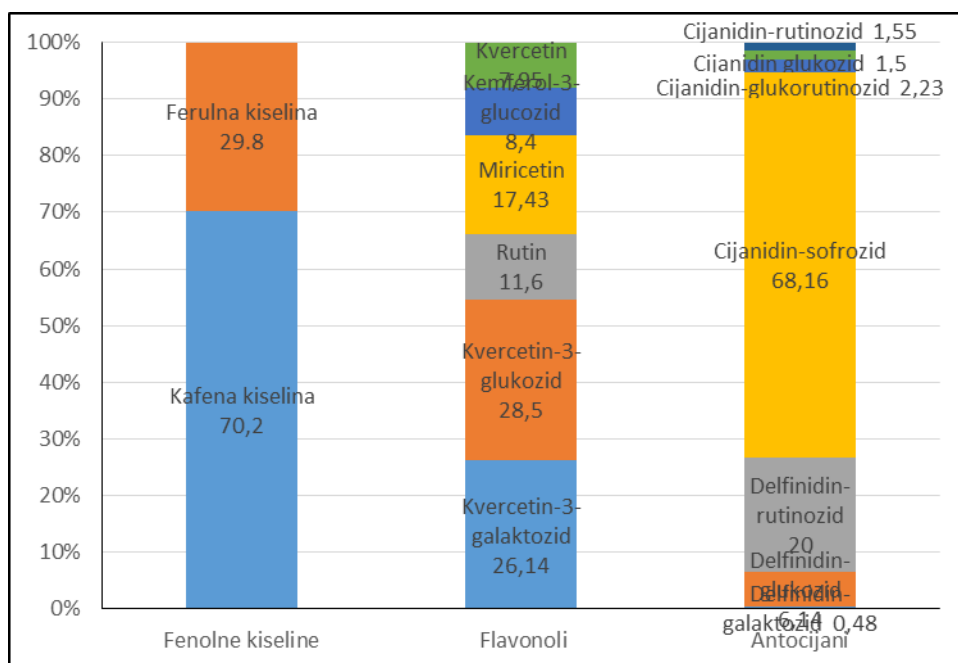
Kafena kiselina bila je najzastupljenija fenolna kiselina u ispitivanim ekstraktima ploda crne ribizle, čiji je udeo u ukupnom kiselinskom sastavu bio 70,2% (slika 4.30). U ekstraktima ploda crne ribizle takođe je identifikovna i ferulna kiselina. U listu crne ribizle zastupljene su: hlorogena, kafena, *p*-kumarinska i ferulna kiselina (prilog, slika P1). Jakobek i sar., (2007) su identifikovali kafenu, *p*-kumarinsku i ferulnu kiselinu u ekstraktima crne ribizle.

Sadržaj flavonola bio je veći u ekstraktima lista crne ribizle u odnosu na ekstrakt ploda crne ribizle. Kemferol-3-glucozid je najzastupljeniji u ekstraktima lista, ali takođe je utvrđeno i veliko prisustvo rutina, zatim kvercetin-3-glukoziida, kvercetina i miricetina (slika 4.31 i prilog: slika P2). U plodu crne ribizle pored navedenih identifikovanih flavonola utvrđeno je i prisustvo kvercetin-3-galaktoziida. Sastav flavonola u ekstraktima crne ribizle je u saglasnosti sa literaturnim podacima gde su indetifikovani kvercetin, miricetin i kemferol kao dominantni flavonoli (Jakobek i sar., 2007; Vagiri i sar., 2102).

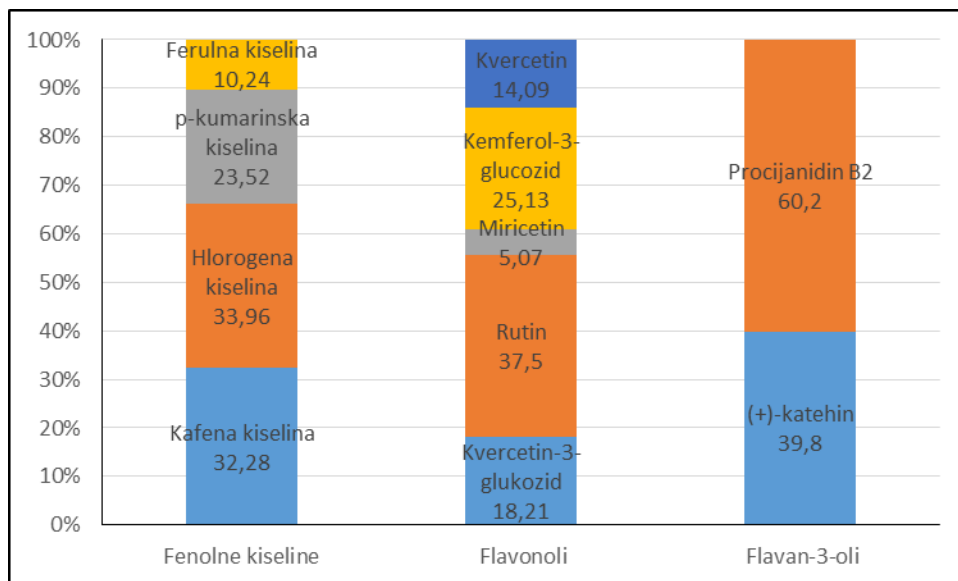
Tabela 4.29. Fenolni sastav (mg/kg) ekstrakata ploda i lista crne ribizle (*Ribes nigrum L.*)

Fenolno jedinjenje	Crna ribizla	
	plod	list
Kafena kiselina	23,81	18,22
Hlorogena kiselina	-	19,17
p-kumarinska kiselina	-	13,28
Ferulna kiselina	10,11	5,78
Kvercetin-3-galaktozid	16,09	-
Kvercetin-3-glukozid	17,54	65,21
Rutin	7,14	134,27
Miricetin	10,73	18,18
Kemferol-3-glucosid	5,17	89,98
Kvercetin	4,89	50,46
(+)-katehin	-	2,77
Procijanidin B2	-	4,19
Delfinidin-galaktozid	14,54	-
Delfinidin-glukozid	187,29	-
Delfinidin-rutinozid	609,78	-
Cijanidin-sofrozid	2079,51	-
Cijanidin-glukorutinozid	68,13	-
Cijanidin-glukozid	44,38	-
Cijanidin-rutinozid	47,16	-
Σ Fenolne kiseline	33,92	56,45
Σ Flavonoli	61,56	358,44
Σ Flavan-3-oli	-	6,96
Σ Antocijani	3050,79	-
Σ Fenolnih jedinjenja	3146,27	421,85

Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm SD (n = 3).



Slika 4.30. Procentni udeo fenolnih jedinjenja u ekstraktu ploda crne ribizle (*Ribes nigrum L.*)



Slika 4.31. Procentni udeo fenolnih jedinjenja u ekstraktu lista crne ribizle (*Ribes nigrum* L.)

U ekstraktima lista crne ribizle nađeni su jedan flavan-3-olni monomer i jedan dimer. Identifikovani su (+)-katehin i procijanidin B2 (prilog, slika P3). U plodu nisu identifikovani flavan-3-oli. Vagiri i sar., (2012) su identifikovali katehin, epikatehin i procijanidine u listovima i ostalim delovima crne ribizle.

Analizom HPLC hromatograma utvrđeno je prisustvo antocijana samo u ekstraktima ploda crne ribizle. Cijanidin-sofrozid bio je najzastupljeniji u ekstraktima ploda, zatim je utvrđeno veliko prisustvo delfinidin-rutinozida, a identifikovani su i delfinidin-glukozyd, delfinidin-galaktozyd, cijanidin-glukorutinozyd, cijanidin-glukozyd i cijanidin-rutinozyd (slika 4.30). Vagiri i sar., (2012) su identifikovali derivate delfinidina i cijanidina kao predominantne antocijane u plodu crne ribizle.

4.3.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda i lista crne ribizle (*Ribes nigrum* L.)

Antioksidativna aktivnost ekstrakata dobijenih od ploda i lista crne ribizle određena je DPPH testom, a rezultati analiza izraženi vrednošću EC_{50} (mg/mL) prikazani su u tabeli 4.30. Svi ekstrakti pokazali su značajnu antioksidativnu aktivnost. Ekstrakti ploda crne ribizle pokazali su jaču antioksidativnu aktivnost od ekstrakta lista crne ribizle za 79,4%. Glavni razlog većoj antioksidativnoj aktivnosti ekstrakta ploda može se pripisati visokoj

koncentraciji antocijana u njima (tabele 4.28 i 4.29), a koji dalje doprinose većem sadržaju ukupnih fenola u ovim ekstraktima. Jakobek i sar., (2007) su izvestili o jakoj antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata crne ribizle.

Tabela 4.30. Antioksidativna aktivnost EC₅₀ (mg/mL) ekstrakata ploda i lista crne ribizle (*Ribes nigrum* L.)

Biljni materijal	EC ₅₀ (mg/mL)
Crna ribizla - plod	0,34 ± 0,02
Crna ribizla - list	1,65 ± 0,11

4.3.3. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda i lista crne ribizle (*Ribes nigrum* L.)

Antimikrobni potencijal testiranih ekstrakata ploda i lista crne ribizle izražen preko minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktricialne koncentracije (MBC) prikazan je u tabeli 4.31.

Iz tabele 4.31 može se zaključiti da su testirani ekstrakti lista i ploda crne ribizle pokazali značajnu antimikrobnu aktivnost na 12 bakterijskih sojeva i jedan kvasac koji je uporediv sa pozitivnom kontrolom tri antibiotika (streptomycin, tetraciklin i hloramfenikol), bez selektivnog dejstva na određeni soj mikroorganizma. Ekstrakti lista crne ribizle su pokazali nešto veću antimikrobnu aktivnost u odnosu na ekstrakte ploda crne ribizle (tabela 4.31) što se može povezati sa većim sadržajem fenolnih kiselina i flavonola u ekstraktima lista u odnosu na plod (tabela 4.28). Gram-pozitivni sojevi (*Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Sarcina lutea*, *Micrococcus flavus*) su osetljiviji na testirane ekstrakte u odnosu na gram-negativne sojeve (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris*). Vrednosti MIC/MBC za testirane ekstrakte lista i ploda crne ribizle kod *Staphylococcus aureus* bile su 48/63 i 60/100 µg/mL, dok su kod *Escherichie coli* iznosile 125/250 i 150/280 µg/mL, po redu javljanja. Kvasac kandida (*Candida albicans*) je pokazao najveću rezistenciju na oba ekstrakta. MIC vrednosti kod ekstrakata lista i ploda crne ribizle iznosile su 220 i 283 µg/mL, a MBC 385 i 500 µg/mL, po redu javljanja. Literaturni podaci potvrđuju naše rezultate tj. veću aktivnost ekstrakata

biljnih vrsta na gram pozitivne bakterije u odnosu na gram negativne i kvasce (Puupponen-Pimiä i sar., 2001; Cavanagh i sar., 2003).

Tabela 4.31: Minimalna inhibitorna i minimalna baktricialna koncentracija – MIC/MBC ($\mu\text{g/mL}$) ekstrakata ploda i lista crne ribizle (*Ribes nigrum L.*)

	Crna ribizla		Antibiotik		
	plod	list	St	Ch	Tet
Gram pozitivne bakterije					
<i>Clostridium perfringens</i>	110/250	48/125	-	1/8	0,9/0,9
<i>Bacillus cereus</i>	90/125	61/70	-	8/8	0,9/0,9
<i>Staphylococcus aureus</i>	60/100	48/63	-	2/16	0,12/0,9
<i>Listeria monocytogenes</i>	48/70	50/63	-	8/18	0,46/0,9
<i>Sarcina lutea</i>	63/70	50/70	-	0,5/2	0,06/0,06
<i>Micrococcus flavus</i>	80/150	63/120	-	1/1	0,4/0,9
Gram negativne bakterije					
<i>Escherichia coli</i>	150/280	125/250	16/16	-	3,8/7,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63/125	63/110	8/8	-	7,5/7,5
<i>Salmonella enteritidis</i>	90/125	65/110	4/4	-	0,9/1,9
<i>Shigella sonnei</i>	65/125	50/85	16/16	-	0,06/0,12
<i>Klebsiella pneumonia</i>	90/150	48/120	-	-	0,9/1,9
<i>Proteus vulgaris</i>	48/125	31/125	-	-	1,9/1,9
Kvasac					
<i>Candida albicans</i>	283/500	220/385	-	-	16/16

St – streptomicin; Ch – hloramfenikol; Tet – tetraciklin.

4.3.4. Fenolni sadržaj ekstrakata ploda i lista crvene ribizle (*Ribes rubrum L.*)

Ekstrakti ploda i lista crvene ribizle pokazali su fenolni sadržaj dobijen UV-Vis metodom opisanom u eksperimentalnom delu čiji su rezultati prikazani u tabeli 4.32 i na slici 4.32.

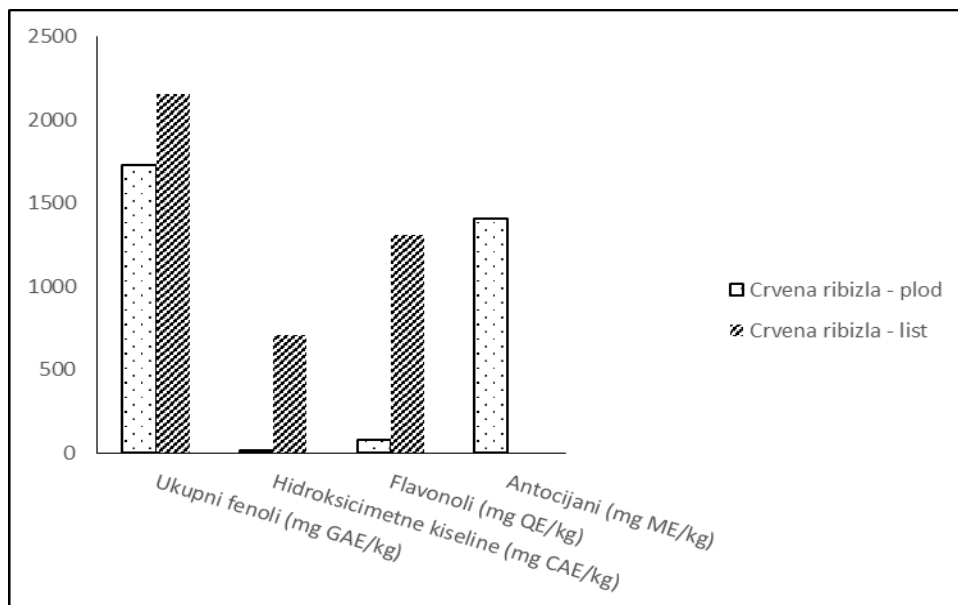
Tabela 4.32. Sadržaj ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavonola iz ekstrakata ploda i lista crvene ribizle (*Ribes rubrum L.*)

Biljni materijal	Ukupni fenoli (mg GAE/kg)	Hidroksicimetne kiseline (mg CAE/kg)	Flavonoli (mg QE/kg)	Antocijani (mg ME/kg)
Crvena ribizla - plod	1729,16	17,25	82,69	1409,53 ± 17,96
Crvena ribizla - list	2154,20	711,92	1309,70	-

Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± SD (n = 3).

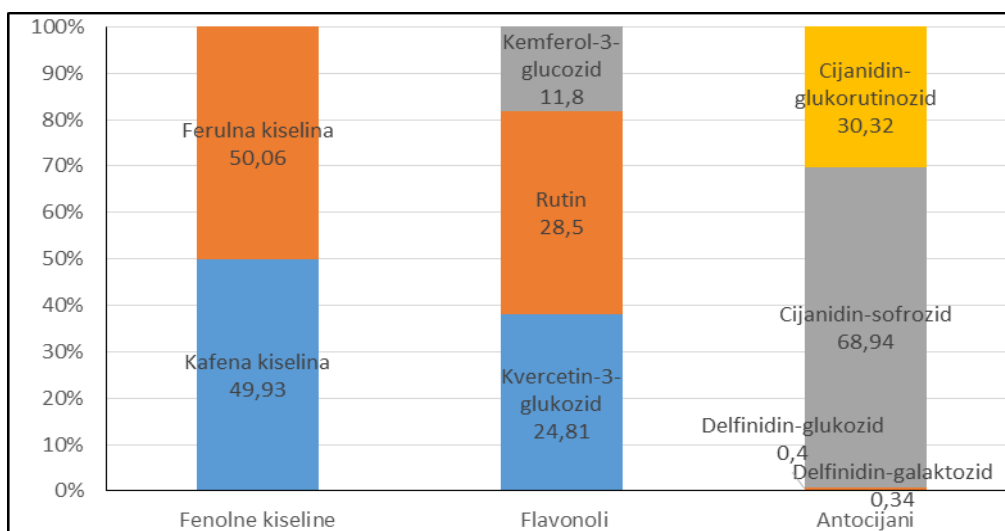
Analizom prikazanih rezultata (tabela 4.32 i slika 4.32) utvrđeno je da se značajno veći sadržaj ukupnih fenola nalazi u ekstraktima lista crvene ribizle u odnosu na ekstrakte iz ploda crvene ribizle. Sadržaj ukupnih fenola u listu crvene ribizle je za 10,12% veći od ukupnog fenolnog sadržaja u plodu crvene ribizle (slika 4.32). Sličan sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima crvene ribizle izvestili su i drugi autori (Jakobek i sar., 2007; Petrisor i sar., 2013). Listovi su pokazali veći sadržaj flavonola i hidroksicimetnih kiselina u odnosu na plod crvene ribizle. List crvene ribizle je pokazao najveći sadržaj flavonola i to za 86,43% veći u odnosu na plod. Sadržaj hidroksicimetne kiseline su u ekstraktima lista je 97,57% veći nego u plodu crvene ribizle (slika 4.32). Antocijani pronađeni su samo u plodu crvene ribizle (tabela 4.32 i slika 4.32). Ukupni sadržaj antocijana u plodu crvene ribizle je (1409,53 ± 17,96 mg ME/kg). Ovi rezultati su u dobroj saglasnosti sa literaturnim podacima publikovanim od Jakobek i sar., (2007) i Petrisor i sar., (2013).

U cilju određivanja koncentracije fenolnih jedinjenja u testiranim ekstraktima ploda i lista crvene ribizle korišćena je HPLC metoda. Rezultati HPLC analiza ovih ekstrakata prikazani su u tabeli 4.33. Procentni udeo pojedinih fenolnih jedinjenja iz ekstrakata ploda i lista crvene ribizle prikazan je na slikama 4.33 i 4.34, po redu javljanja.



Slika 4.32. Sadržaj ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavonola iz ekstrakata ploda i lista crvene ribizle (*Ribes rubrum L.*)

Hlorogena kiselina bila je najzastupljenija fenolna kiselina u ispitivanim ekstraktima lista crvene ribizle sa 47,3% u odnosu na ukupan sadržaj kiselina (4.34). Ostale identifikovane fenolne kiseline u listu crvene ribizle su: kafena, *t*-kaftarna, *p*-kumarinska, ferulna i elaginska (prilog, slika P7). U plodu crvene ribizle zastupljene su: kafena i ferulna. Määttä i sar., (2001) i Jokobek i sar., (2007) su identifikovali kafenu, *p*-kumarinsku i ferulnu kiselinu u ekstraktima crvene ribizle (prilog, slika P42).

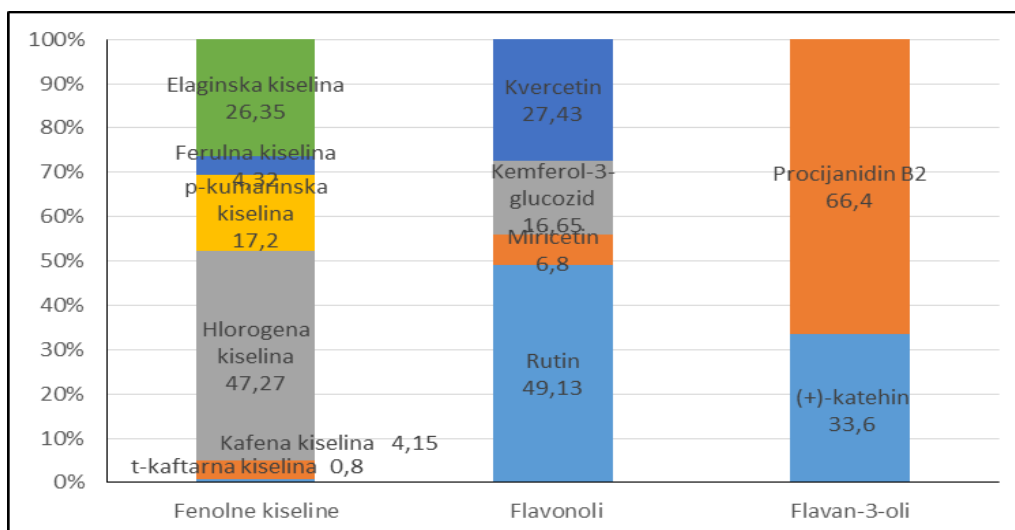


Slika 4.33. Procentni udeo fenolnih jedinjenja u ekstraktu ploda crvene ribizle (*Ribes rubrum L.*)

Tabela 4.33. Fenolni sastav (mg/kg) ekstrakata ploda i lista crvene ribizle
(*Ribes rubrum L.*)

Fenolno jedinjenje	Crvena ribizla	
	plod	List
t-kaftarna kiselina	-	4,59
Kafena kiselina	7,36	23,81
Hlorogena kiselina	-	271,14
p-kumarinska kiselina	-	98,14
Ferulna kiselina	7,38	24,77
Elaginska kiselina	-	151,14
Kvercetin-3-glukozid	19,78	-
Rutin	22,71	557,61
Miricetin	-	77,19
Kemferol-3-glucozid	9,41	188,96
Kvercetin	-	311,29
(+)-katehin	-	2,91
Procijanidin B2	-	5,75
Delfinidin-galaktozid	3,54	-
Delfinidin-glukozid	4,11	-
Cijanidin-sofrozid	709,26	-
Cijanidin-glukorutinozid	311,91	-
Σ Fenolne kiseline	14,74	573,59
Σ Flavonoli	79,71	1135,19
Σ Flavan-3-oli	-	8,66
Σ Antocijani	1028,82	-
Σ Fenolnih jedinjenja	1123,27	1717,44

Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± SD (n = 3).



Slika 4.34. Procentni udeo fenolnih jedinjenja u ekstraktu lista crvene ribizle
(*Ribes rubrum L.*)

Najveći sadržaj flavonola pronađen je u listu crvene ribizle, zatim u plodu. Rutin i kvercetin su najzastupljeniji u ovim ekstraktima, ali takođe je utvrđeno prisustvo miricetina u listu crvene ribizle i kemferol-3-glukozida (prilog, slika P8). U plodu su identifikovani rutin, kvercetin-3-glukozid i kemferol-3-glukozid (prilog, slika P43). Sastav flavonola u ekstraktima crvene ribizle je u saglasnosti sa literaturnim podacima gde su identifikovani kvercetin, miricetin i kemferol kao dominantni flavonoli (Määttä i sar., 2001; Jakobek i sar., 2007).

Identifikovan je jedan flavan-3-olni monomer, (+)-katehin, i jedan dimer, procijanidin B2 (prilog, slika P9). U ekstraktima ploda nisu identifikovani flavan-3-oli. Määttä i sar., (2001) su identifikovali katehin, epikatehin i procijanidin u ekstraktima crvene ribizle.

Analizom HPLC hromatograma utvrđeno je prisustvo antocijana u ekstraktima ploda crvene ribizle. Cijanidin sofrozid najzastupljeniji je u plodu crvene ribizle, u većim količinama identifikovan je i cijanidin-glukofrutinozid, a pronađeni su i delfinidin galaktozid i delfinidin glukozid (slika 4.33 i prilog: slika P44). Määttä i sar., (2001) su identifikovali derivate delfinidina i cijanidina kao predominantne antocijane u plodu crvene ribizle.

4.3.5. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda i lista crvene ribizle (*Ribes rubrum* L.)

Antioksidativna aktivnost ekstrakata dobijenih od ploda i lista crvene ribizle određena je DPPH testom, a rezultati analiza izraženi vrednošću EC₅₀ (mg/mL) prikazani su u tabeli 4.34. Svi ekstrakti pokazali su značajnu antioksidativnu aktivnost. Ne znatno jaču antioksidativnu aktivnost pokazali su ekstrakti ploda crvene ribizle u odnosu na ekstrakt lista crvene ribizle, za 9,43% što se može pripisati prisustvom antocijana u njima (tabele 4.32 i 4.33). Upoređujući fenolni sadržaj ovih ekstrakata sa njihovom antioksidativnom aktivnošću, može se zaključiti da različite klase fenolnih jedinjenja ne doprinose podjednako antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata (najveći doprinos su dali antocijani). Ovi rezultati su u dobroj saglasnosti sa literaturnim podacima za antioksidativnu aktivnost ekstrakata crvene ribizle (Jakobek i sar., 2007).

Tabela 4.34. Antioksidativna aktivnost EC₅₀ (mg/mL) ekstrakata ploda i lista crvene ribizle (*Ribes nigrum L.*)

Biljni materijal	EC ₅₀ (mg/mL)
Crvena ribizla – plod	0,48 ± 0,03
Crvena ribizla – list	0,53 ± 0,05

4.3.6. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda i lista crvene ribizle (*Ribes rubrum L.*)

Antimikrobni potencijal testiranih ekstrakata ploda i lista crvene ribizle izražen preko minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktricialne koncentracije (MBC) prikazan je u tabeli 4.35.

Iz tabele 4.35 može se zaključiti da su testirani ekstrakti lista i ploda crvene ribizle pokazali značajnu antimikrobnu aktivnost na 12 bakterijskih sojeva i jedan kvasac koji se može uporediti sa pozitivnom kontrolom tri antibiotika (streptomycin, tetraciklin i hloramfenikol), i to bez ikakvog selektivnog dejstva na određeni soj mikroorganizma. Ekstrakti lista crvene ribizle su pokazali nešto jaču antimikrobnu aktivnost u odnosu na ekstrakte ploda crvene ribizle (tabela 4.35) što se može povezati sa značajno većim sadržajem fenolnih kiselina i flavonola u ekstraktima lista u odnosu na plod (tabela 4.32).

Gram-pozitivni sojevi (*Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Sarcina lutea*, *Micrococcus flavus*) pokazali su veću osetljivost na testirane ekstrakte lista i ploda crvene ribizle u odnosu na gram-negativne sojeve (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris*). Vrednosti MIC/MBC kod *Staphylococcus aureus* bile su 31/63 i 50/85 µg/mL dok su kod *Escherichie coli* bile 125/125 i 125/240 µg/mL. Kvasac *Candida albicans* je pokazala najveću rezistenciju na oba ekstrakta (MIC vrednosti kod ekstrakata lista i ploda crvene ribizle iznosile su 183 i 283, a MBC 300 i 500 µg/mL, po redu javljanja). Literaturni podaci potvrđuju naše rezultate tj. veću aktivnost ekstrakata biljnih vrsta na gram pozitivne bakterije u odnosu na gram negativne i kvasce (Puupponen-Pimiä i sar., 2001; Cavanagh i sar., 2003).

Tabela 4.35. Minimalna inhibitorna i minimalna baktricialna koncentracija – MIC/MBC ($\mu\text{g/mL}$) ekstrakata ploda i lista crvene ribizle (*Ribes rubrum* L.)

	Crvena ribizla		Antibiotik		
	plod	list	St	Ch	Tet
Gram pozitivne bakterije					
<i>Clostridium perfringens</i>	83/125	35/110	-	1/8	0,9/0,9
<i>Bacillus cereus</i>	70/110	40/63	-	8/8	0,9/0,9
<i>Staphylococcus aureus</i>	50/85	31/63	-	2/16	0,12/0,9
<i>Listeria monocytogenes</i>	65/65	31/63	-	8/18	0,46/0,9
<i>Sarcina lutea</i>	50/65	40/65	-	0,5/2	0,06/0,06
<i>Micrococcus flavus</i>	70/125	60/90	-	1/1	0,4/0,9
Gram negativne bakterije					
<i>Escherichia coli</i>	125/240	125/125	16/16	-	3,8/7,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50/125	50/90	8/8	-	7,5/7,5
<i>Salmonella enteritidis</i>	80/110	50/90	4/4	-	0,9/1,9
<i>Shigella sonnei</i>	60/110	31/63	16/16	-	0,06/0,12
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	80/125	31/110	-	-	0,9/1,9
<i>Proteus vulgaris</i>	48/80	63/110	-	-	1,9/1,9
Kvasac					
<i>Candida albicans</i>	283/500	183/350	-	-	16/16

St – streptomycin; Ch – hloramfenikol; Tet – tetraciklin.

4.4. Fenolni sadržaj, antioksidativna i antimikrobna aktivnost odabranih biljnih vrsta porodice *Cornaceae*

4.4.1. Fenolni sadržaj ekstrakata ploda i lista drena (*Cornus mas L.*)

Fenolni sadržaj ekstrakata ploda i lista drena dobijen UV-VIS metodom opisanom u eksperimentalnom delu prikazan je u tabeli 4.36 i na slici 4.35.

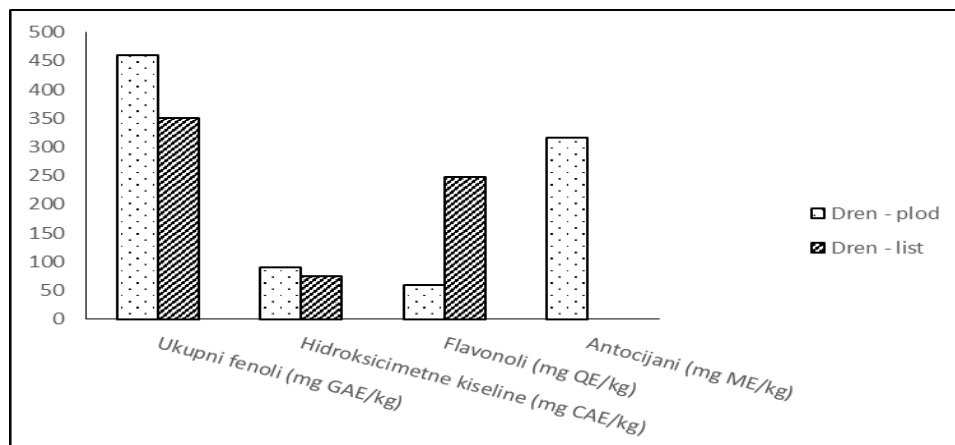
Tabela 4.36. Sadržaj ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavonola iz ekstrakata ploda i lista drena (*Cornus mas L.*)

Biljni materijal	Ukupni fenoli (mg GAE/kg)	Hidroksicimetne kiseline (mg CAE/kg)	Flavonoli (mg QE/kg)	Antocijani (mg ME/kg)
Dren - plod	459,75	90,10	59,44	315,78 ± 3,87
Dren - list	350,19	75,42	247,13	-

Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti ± SD (n = 3).

Analizom prikazanih rezultata (tabela 4.36 i slika 4.35) utvrđeno je da se značajno veći sadržaj ukupnih fenola nalazi u ekstraktima ploda drena u odnosu na ekstrakte iz lista drena. Sadržaj ukupnih fenola u plodu drena je za 67,33% veći od ukupnog fenolnog sadržaja u listu. Drugi autori su izvestili o značajnom sadržaju ukupnih fenola i antocijana u ekstraktima ploda drena (Pantelidis i sar., 2007; Pawlowska i sar., 2010). Neki autori su našli veći fenolni sadržaj (Turker i sar., 2012), a drugi manji u ekstraktima lista drena (Krisch i sar., 2008). Ovo se može objasniti različitim genotipovima, uslovima sredine, kao i ekstrakcionim procedurama.

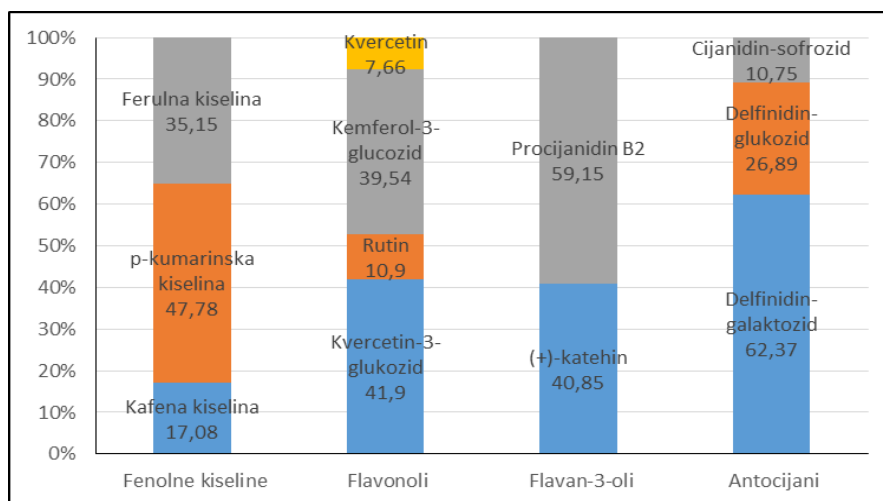
Listovi su pokazali i manji sadržaj ukupnih fenola i hidroksicimetnih kiselina u odnosu na plod kod drena (tabela 4.36 i slika 4.35). Plod drena je pokazao manji sadržaj flavonola za 20,70% manji u odnosu na list. Hidroksicimetne kiseline su manje zastupljene u ekstraktima lista drena, u ekstraktima ploda hidroksicimetna kiselina zastupljena je 16,29% više nego u listu. Antocijani pronađeni su samo u plodu drena (tabela 4.36 i slika 4.35). Ukupni sadržaj antocijana u plodu drena je (315,78 ± 3,87 mg ME/kg).



Slika 4.35. Sadržaj ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavonola iz ekstrakata ploda i lista drena (*Cornus mas L.*)

U cilju određivanja koncentracije fenolnih jedinjenja u testiranim ekstraktima ploda i lista drena korišćena je HPLC metoda. Rezultati HPLC analiza ovih ekstrakata prikazani su u tabeli 4.37. Procentni udeo pojedinih fenolnih jedinjenja iz ekstrakata ploda i lista drena prikazan je na slikama 4.36 i 4.37, po redu javljanja.

p-Kumarna kiselina je najzastupljenija fenolna kiselina u ispitivanim ekstraktima ploda drena sa 47,78% u odnosu na ukupni sadržaj kiselina (slika 4.36). Ostale identifikovane fenolne kiseline u plodu drena bile su: kafena i ferulna (prilog, slika P31). U listu drena zastupljene su: *t*-kaftarna, hlorogena i *p*-kumarinska kiselina (prilog, slika P4). Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora o fenolnim kiselinama u ekstraktima drena (Pyrkosz-Biardzka i sar., 2014).

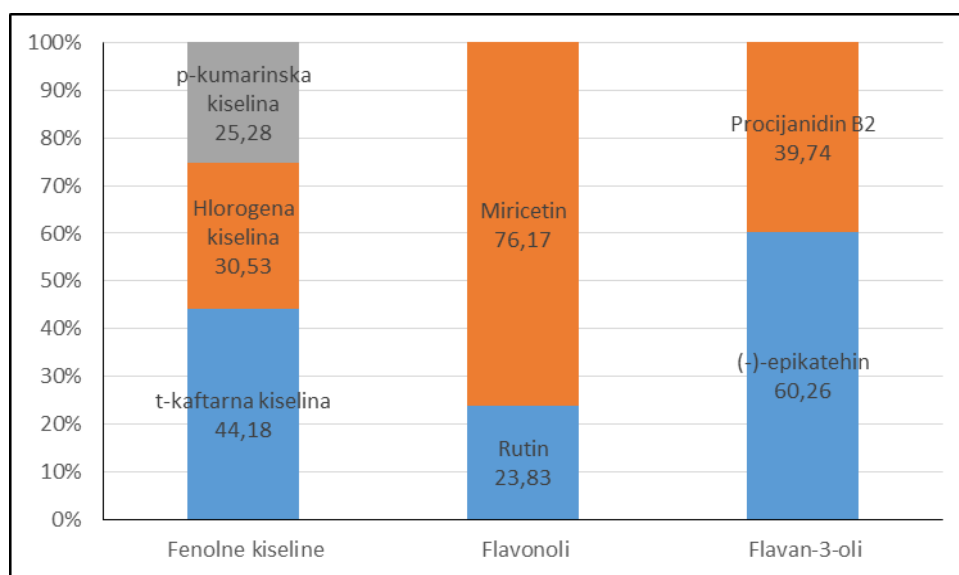


Slika 4.36. Procentni udeo fenolnih jedinjenja u ekstraktu ploda drena (*Cornus mas L.*)

Tabela 4.37. Fenolni sastav (mg/kg) ekstrakata ploda i lista drena (*Cornus mas L.*)

Fenolno jedinjenje	Dren	
	plod	list
t - kaftarna kiselina	-	27,14
Kafena kiselina	14,57	-
Hlorogena kiselina	-	18,75
p - kumarinska kiselina	40,75	15,53
Ferulna kiselina	29,98	-
Kvercetin - 3 - glukozid	22,54	-
Rutin	5,86	53,86
Miricetin	-	172,14
Kemferol - 3 - glucozid	21,27	-
Kvercetin	4,12	-
(+)-katehin	3,95	-
(-)-epikatehin	-	2,73
Procijanidin B2	5,72	1,8
Delfimidin-galaktozid	169,13	-
Delfimidin-glukozid	72,92	-
Cijanidin-sofrozid	29,14	-
Σ Fenolne kiseline	85,3	61,42
Σ Flavonoli	53,79	226,28
Σ Flavan-3-oli	9,67	4,53
Σ Antocijani	271,19	-
Σ Fenolnih jedinjenja	419,95	291,23

Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm SD (n = 3).

Slika 4.36. Procentni udeo fenolnih jedinjenja u ekstraktu lista drena (*Cornus mas L.*)

Sadržaj flavonola bio je veći u ekstraktima lista drena u poređenju sa plodom. Miricetin je najzastupljeniji u ekstraktima lista drena, a zatim rutin (prilog, slika P5). U plodu je utvrđeno prisustvo kvercetin-3-glukozida, rutin, kemferol-3-glukozida i kvercetina (prilog, slika P32). Neki autori su izvestili o prisustvu derivata kvercetina i kemferola u ekstraktima drena (Pawlowska i sar., 2010; Pyrkosz-Biardzka i sar., 2014).

Prisutna jedinjenja u ekstraktima ploda i lista drena su flavan-3-olni monomeri i jedan dimer. Identifikovan je (+)-katehin u plodu drena i (-)-epikatehin u listu, kao i jedan dimer, procijanidin B2 (prilog, slike P6 i P34), koji je zastupljen više u plodu nego u listu drena (tabela 4.37).

Analizom HPLC dijagrama utvrđeno je prisustvo antocijana samo u plodu drena. Delfinidin-galaktozid je najzastupljeniji, zatim definidin-glukozid i cijanidin-sofrozid (slika 4.35 i prilog: slika P33). Naši rezultati za kvantitativni sastav antocijana slični su sa predhodno objavljenim za ekstrakte ploda drena (Pawlowska i sar., 2010; Pyrkosz-Biardzka i sar., 2014).

4.4.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda i lista drena (*Cornus mas L.*)

Antioksidativna aktivnost ekstrakata dobijenih od ploda i lista drena određena je DPPH testom, a rezultati analiza izraženi vrednošću EC_{50} (mg/mL) prikazani su u tabeli 4.38. Svi ekstrakti pokazali su značajnu antioksidativnu aktivnost. Jaču antioksidativnu aktivnost pokazali su ekstrakti ploda drena u odnosu na ekstrakte lista za 26,7%. Jaka antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda drena odgovara većem sadržaju pojedinih klasa fenolnih jedinjenja u njima a naročito antocijana što ukazuje da ova jedinjenja doprinose antioksidativnoj aktivnosti ispitivanih ekstrakta. Literaturni podaci takođe potvrđuju prisustvo korelacije između antioksidativne aktivnosti i ukupnog fenolnog sadržaja ekstrakata ploda (Pantelidis i sar., 2007; Pyrkosz-Biardzka i sar., 2014) i lista drena (Celep i sar., 2013).

Tabela 4.38. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda i lista drena EC₅₀ (mg/mL)

Biljni materijal	EC ₅₀ (mg/mL)
Dren - plod	1,75 ± 0,29
Dren - list	2,39 ± 0,36

4.4.3. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ploda i lista drena (*Cornus mas L.*)

Antimikrobni potencijal testiranih ekstrakata ploda i lista drena izražen preko minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktricialne koncentracije (MBC) prikazan je u tabeli 4.39.

Iz tabele 4.39. može se zaključiti da su testirani ekstrakti lista i ploda drena pokazali značajnu antimikrobnu aktivnost na 12 bakterijskih sojeva i jedan kvasac koji je uporediv sa pozitivnom kontrolom tri antibiotika (streptomycin, tetraciklin i hloramfenikol), bez ikakvog selektivnog dejstva na određeni soj mikroorganizma. Ekstrakti lista drena su pokazali nešto manju antimikrobnu aktivnost u odnosu na ekstrakte ploda drena (tabela 4.39) što se može povezati sa većim sadržajem fenolnih kiselina, antocijana i flavan-3-ola u ekstraktima ploda u odnosu na list (tabela 4.36). Gram-pozitivni sojevi mikroba (*Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Sarcina lutea*, *Micrococcus flavus*) su osetljiviji na testirane ekstrakte u odnosu na gram-negativne sojeve (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris*). Vrednosti MIC/MBC za testirane ekstrakte ploda i lista drena kod *Staphylococcus aureus* bile su 30/48 i 60/100 µg/mL, dok su kod *Escherichie coli* iznosile 140/260 i 160/320 µg/mL, po redu javljanja. Kvasac *Candida albicans* je pokazao najveću rezistenciju na oba ekstrakta (MIC vrednosti kod ekstrakata ploda i lista drena iznosile su 250 i 250 µg/mL, a MBC 390 i 500 µg/mL, po redu javljanja). Ovakava osetljivost mikrobnih sojeva na ekstrakte drena je u dobroj saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Puupponen-Pimiä i sar., 2001; Cavanagh i sar., 2003).

Tabela 4.39. Minimalna inhibitorna i minimalna baktricialna koncentracija – MIC/MBC ($\mu\text{g/mL}$) ekstraktata ploda i lista drena (*Cornus mas L.*)

	Dren		Antibiotik		
	plod	list	St	Ch	Tet
Gram pozitivne bakterije					
<i>Clostridium perfringens</i>	60/110	120/240	-	1/8	0,9/0,9
<i>Bacillus cereus</i>	53/63	85/125	-	8/8	0,9/0,9
<i>Staphylococcus aureus</i>	30/48	60/100	-	2/16	0,12/0,9
<i>Listeria monocytogenes</i>	31/63	63/63	-	8/18	0,46/0,9
<i>Sarcina lutea</i>	50/80	63/80	-	0,5/2	0,06/0,06
<i>Micrococcus flavus</i>	125/110	150/183	-	1/1	0,4/0,9
Gram negativne bakterije					
<i>Escherichia coli</i>	140/260	160/320	16/16	-	3,8/7,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60/120	63/150	8/8	-	7,5/7,5
<i>Salmonella enteritidis</i>	63/110	80/125	4/4	-	0,9/1,9
<i>Shigella sonnei</i>	50/100	63/140	16/16	-	0,06/0,12
<i>Klebsiella pneumonia</i>	63/110	110/183	-	-	0,9/1,9
<i>Proteus vulgaris</i>	50/110	65/125	-	-	1,9/1,9
Kvasac					
<i>Candida albicans</i>	250/390	250/500	-	-	16/16

St – streptomycin; Ch – hloramfenikol; Tet – tetraciklin.

4.5. Spektralna karakterizacija inkluzionih kompleksa i fizičkih smeša rutin trihidrata sa β - ciklodekstrinom i 2 - hidroksipropil - β -ciklodekstrinom

4.5.1. FT-IC analiza polaznih komponenti i inkluzionih kompleksa i fizičkih smeša rutin trihidrata sa β -ciklodekstrinom i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom

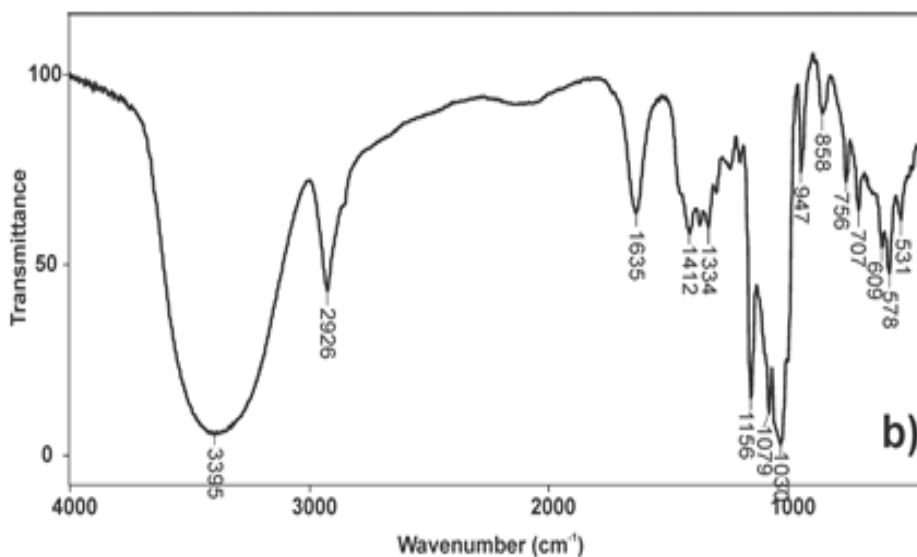
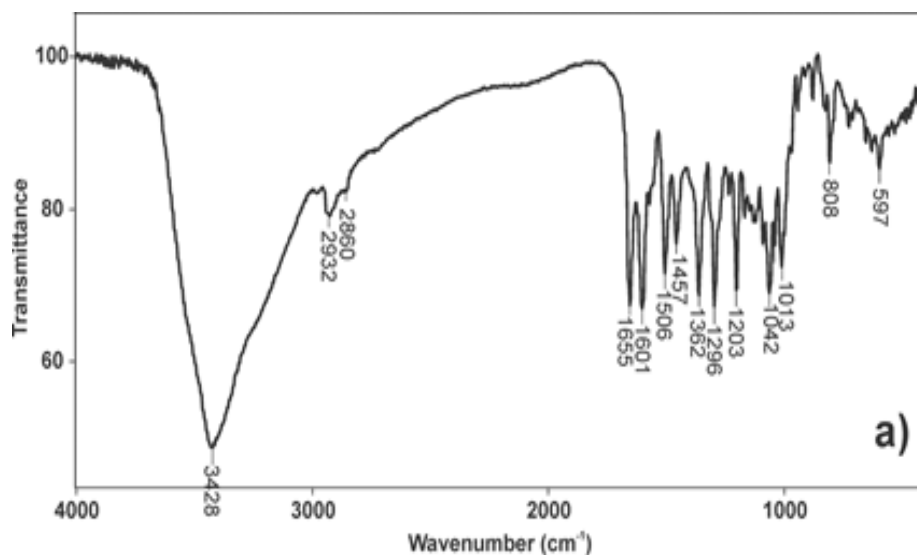
U FT-IC spektru rutin trihidrata (slike 4.11a i 4.12a), valencione vibracije O-H veze nalaze se na talasnoj dužini 3428 cm^{-1} . Trake na 2932 i 2860 cm^{-1} pripadaju valencionim vibracijama C-H veza u CH i CH_2 grupama. Jaka traka deformacionih vibracija O-H veze nalazi se na 1655 cm^{-1} . Dodatno jake trake u spektru rutin trihidrata javljaju se na 1601 i 1506 cm^{-1} od valencione vibracije C = C, trake na 1362 i 1296 cm^{-1} od valencionih vibracija C-O, dok su trake na 1203 , 1042 i 1013 cm^{-1} od valencione vibracije C-O-C veza, po redu javljanja. FT-IC spektari β -ciklodekstrina (slika 4.11b) i HP- β -CD (slika 4.12b) imaju široku traku na 3395 cm^{-1} , tj. 3411 cm^{-1} koje se mogu pripisati valencionim vibracijama OH grupe. Traka na 2926 cm^{-1} za β -CD ili 2976 i 2927 cm^{-1} za HP- β -CD pripadaju valencionim vibracijama C-H veza od CH i CH_2 grupa.

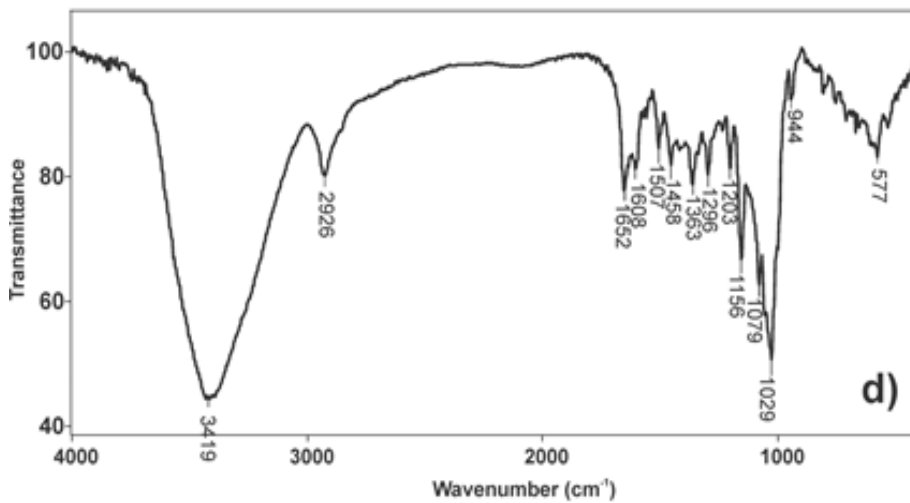
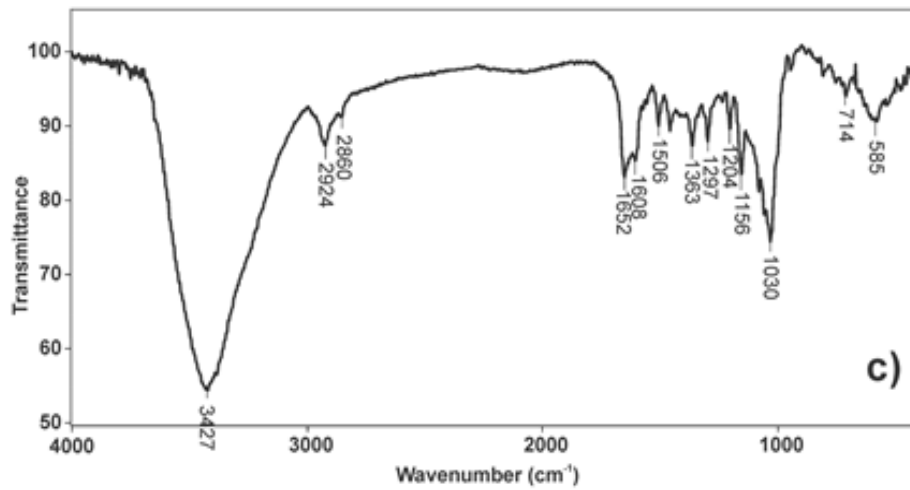
Važna traka na 1635 cm^{-1} kod oba molekula odgovara deformacionoj vibraciji O-H grupa. Karakteristične trake na 1412 i 1334 cm^{-1} ili 1414 i 1378 cm^{-1} potiču od deformacionih vibracija C-H veza β -CD i HP- β -CD, po redu javljanja. Oštra traka na 1156 cm^{-1} ukazuje na valencione vibracije C-C grupe.

Trake u opsegu od 1100 do 1030 cm^{-1} potvrđuju prisustvo valencionih vibracija C-O veza u etru i hidroksi grupama β -CD, tj. HP- β -CD. Deformacione vibracije C-H veza su u opsegu od 950 do 700 cm^{-1} .

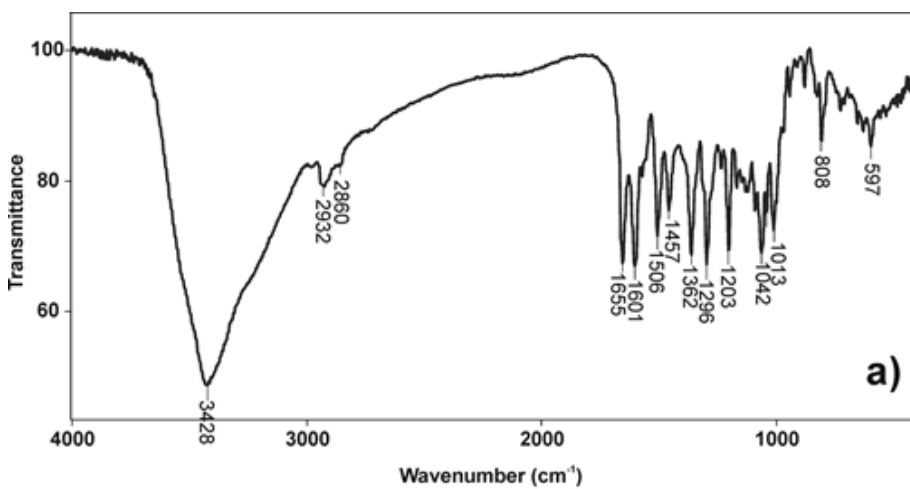
FT-IC spektri inkluzionih kompleksa rutin: β -CD (slika 4.11c) i rutin:HP- β -CD (slika 4.12c) imaju široke trake sa maksimumom na 3427 cm^{-1} i odgovaraju valencionim vibracijama OH grupa prisutnih u oba kompleksa. Ova traka je pomerena u poređenju sa istim kod rutin trihidrata za 1 jedinicu ka manjoj vrednosti, kod β -ciklodekstrina za 32 jedinice ka većoj vrednosti i kod HP- β -CD za 16 jedinica ka većoj vrednosti talasnih

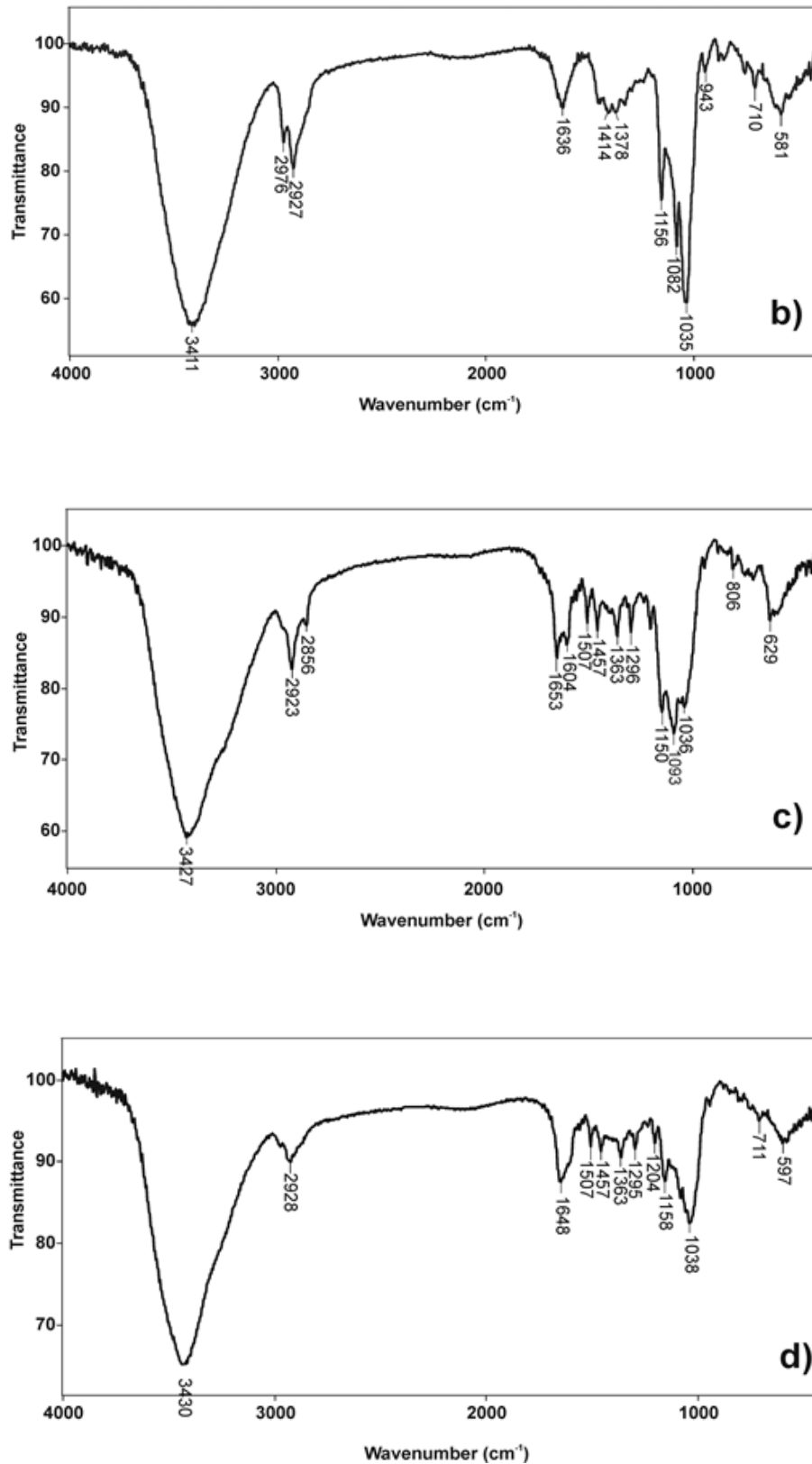
brojeva. Navedena pomeranja ukazuju na interakciju rutina sa kompleksirajućim agensima. Valencione vibracije C-H veza javljaju se na 2924 i 2860 cm^{-1} kod rutin: β -CD kompleksa, dok se ista traka javlja na 2923 i 2856 cm^{-1} kod rutin:HP- β -CD kompleksa. Ove trake su pomerene ka nižim talasnim dužinama u odnosu na iste trake u spektru rutin trihidrata.





Slika 4.11. FT-IC spektri: **a)** rutin trihidrat, **b)** β - CD, **c)** inkluzioni kompleks, **d)** fizička smeša





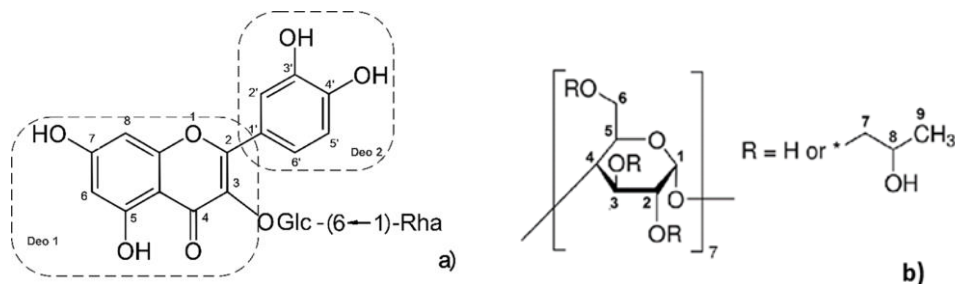
Slika 4.12. FT-IC spektri: **a)** rutin trihidrat, **b)** HP-β- CD, **c)** inkluzioni kompleks, **d)** fizička smeša

FT-IC spektar rutin trihidrata ima jaku traku deformacionih vibracija O-H veza na 1655 cm^{-1} . Trake smanjenog intenziteta od deformacionih vibracija ove grupe javljaju se na 1652 i 1653 cm^{-1} u FT-IC spektrima inkluzionih kompleksa rutin: β -CD i rutin:HP- β -CD, po redu javljanja. Ovo se smatra kao značajna spektralna promena koja takođe pokazuje da je OH grupa učestvovala u kompleksaciji rutina. Trake valencionih vibracija C=C veza na 1608 i 1604 cm^{-1} u spektrima rutin: β -CD i rutin:HP- β -CD, po redu javljanja, su pomerene ka većim talasnim dužinama. One su smanjenog intenziteta u poređenju sa istom trakom u spektru rutina. Dodatno, u spektru kompleksa se javljaju važne trake na 1363 i 1296 cm^{-1} , koje odgovaraju valencionim vibracijama C-O veze. Takođe, ove trake su prisutne u spektru rutina, ali su sa smanjenim intezitetom. U spektru rutina, prisustvo traka na 1203 , 1042 i 1013 cm^{-1} ukazuje na valencione vibracije C-O-C veza. Ipak, kod oba kompleksa intezitet traka na 1204 cm^{-1} je mnogo manji, dok su trake na 1042 i 1013 cm^{-1} nestale u spektru kompleksa. Ove promene u spektrima kompleksa ukazuju da rutin učestvuje u obrazovanju inkluzionih kompleksa preko C-O-C veze.

U spektru fizičke smeše, nema značajnih promena u poređenju sa spektrima rutin trihidrata, β -CD i HP- β -CD kao što se vidi na slikama 4.11d i 4.12d.

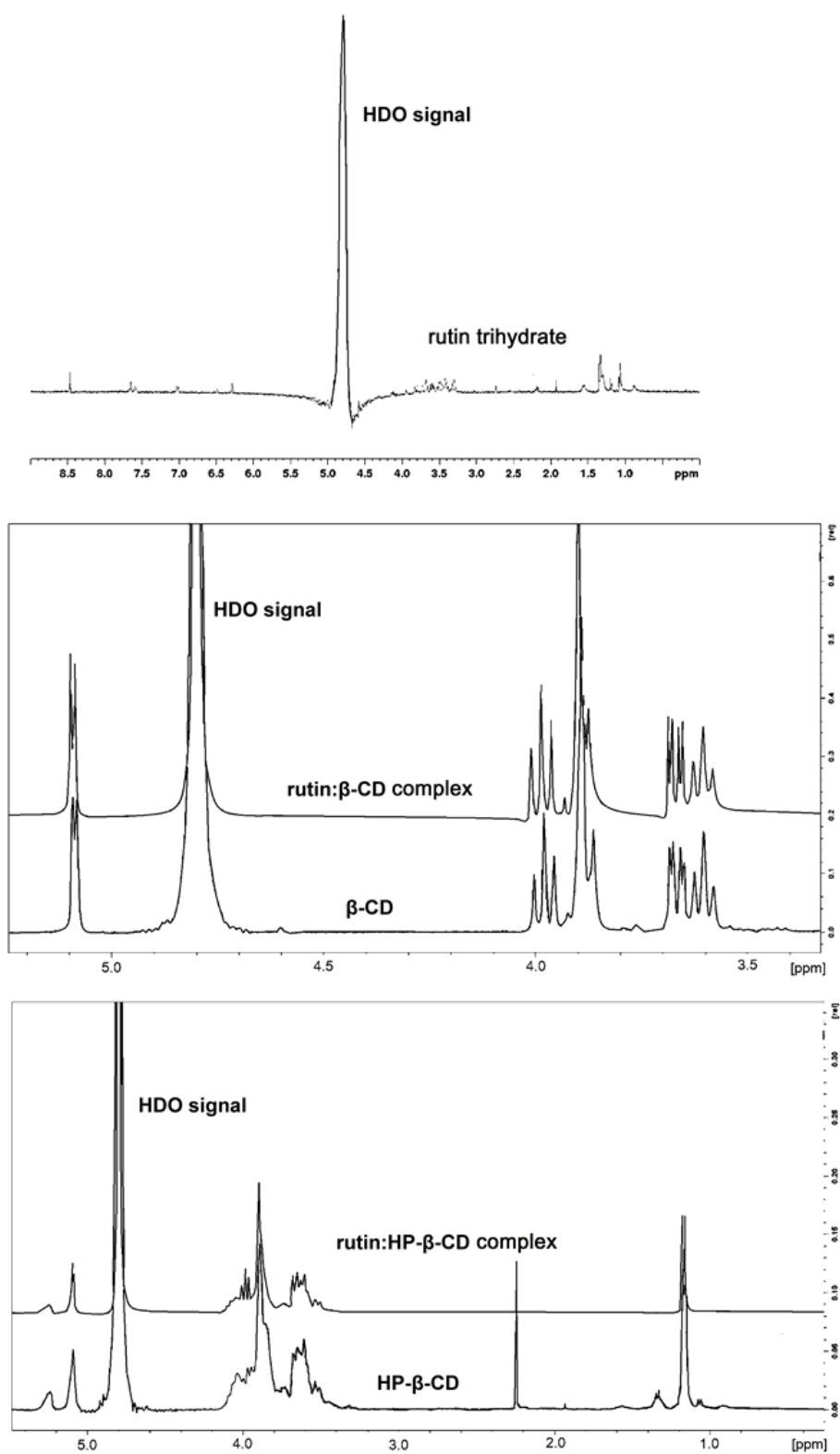
4.5.2. $^1\text{H-NMR}$ analiza analiza polaznih komponenti i inkluzionih kompleksa rutin trihidrata sa β -ciklodekstrinom i 2-hidroksipropil - β -ciklodekstrinom

Strukture rutina, β -CD i HP- β -CD sa jasno naznačenim pozicijama atoma prikazane su na slikama 4.13a i 4.13b.



Slika 4.13. Struktura rutina (a), β -CD i HP- β -CD (b) sa obeleženim pozicijama atoma

^1H NMR spektri slobodnog i kompleksiranog rutina sa β -CD i HP- β -CD su prikazani na slici 7. Protoni H6 i H8 prstena A rutina imaju hemijska pomeranja na 6,289 i 6,495 ppm, dok protoni H2', H5' i H6' B prstena imaju hemijsko pomeranje na 7,028, 7,588 i 7,657 ppm, po redu javljanja. Kao što se može videti, vrednosti hemijskog pomeranja slobodnog i kompleksiranog rutina su različite (slika 4.14; tabele 1 i 2). U spektrima rutin: β -CD i rutin:HP- β -CD kompleksa postoje značajne promene u hemijskom pomeranju Δ -0,126 i 0,200, po redu javljanja, koje odgovaraju H8 protonima u molekulu rutina. Takođe, promene istog ranga su utvrđene za protone H-3 ramnoze, H-6, H-2' i H5' u kompleksu β -CD, tj. za protone H-6 i H-2', H-5' i H-6' u kompleksu HP- β -CD. Ostale promene u hemijskom pomeranju su beznačajne. Značajne promene hemijskog pomeranja su utvrđene za H-6 protone molekula β -CD, i kod CH_3 protona hidroksipropil grupe, H-1 i H-1' protoni u molekulu HP- β -CD (tabela 1). Pretpostavlja se da je prvi deo molekula rutina (slika 4.13a) inkorporiran u šupljini β -CD sobzirom da je glavna promena u hemijskom pomeranju H-8 protona kod rutina u rutin: β -CD kompleksu. U slučaju rutin:HP- β -CD kompleksa, najveće pomeranje je utvrđeno za protone prstena A, ali značajne promene su utvrđene za protone B prstena. Ovi rezultati ukazuju da dva različita tipa kompleksa se najverovatnije obrazuju preko prvog ili drugog dela molekula rutina.



Slika 4.14. ^1H NMR spektri rutin trihidrata, β -CD, HP- β -CD i njihovih inkluzionih kompleksa

Tabela 4.40. Hemijska pomeranja (δ) signala β -CD, rutina i kompleksa rutin:
 β -CD rastvorenih u D₂O na 25°C

	β -CD	Rutin: β -CD kompleks	$\Delta\delta$	Rutin	Rutin: β -CD kompleks	$\Delta\delta$
H-1 iz β -CD	5,091	5,087	+0,004			
H-2 iz β -CD	3,669	3,665	+0,004			
H-3 iz β -CD	3,986	3,978	+0,008			
H-4 iz β -CD	3,605	3,601	+0,004			
H-5 iz β -CD	3,874	3,873	+0,001			
H-6 iz β -CD	3,900	3,889	+0,011			
CH ₃ -Rha rutina				1,076	1,054	+0,022
H-6 iz rutina				6,289	6,306	-0,017
H-8 iz rutina				6,495	6,621	-0,126
H-2' iz rutina				7,657	7,674	-0,017
H-5' iz rutina				7,028	7,050	-0,022
H-6' iz rutina				7,588	7,591	-0,003

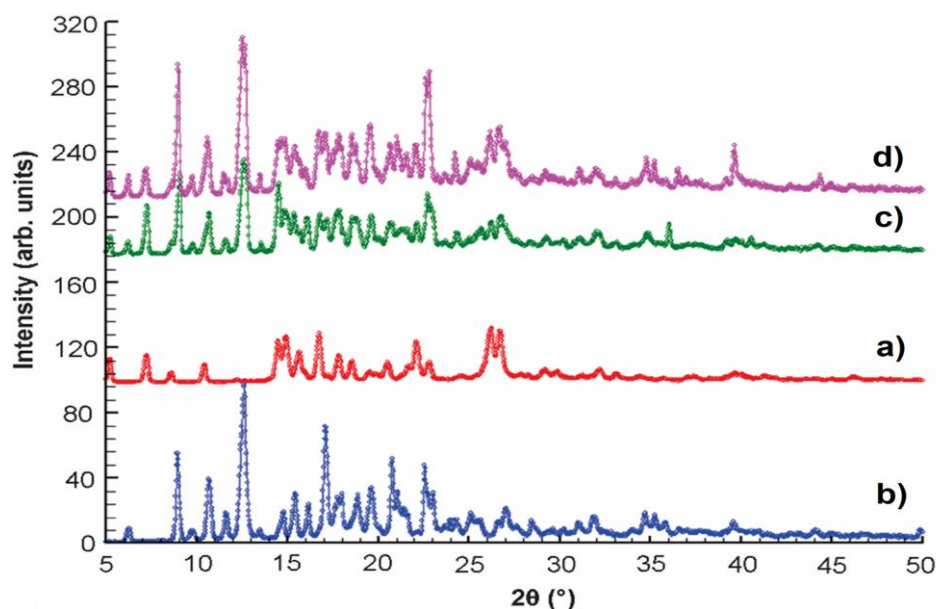
Tabela 4.41. Hemijska pomeranja (δ) signala HP- β -CD, rutina i kompleksa rutin:
 HP- β -CD rastvorenih u D₂O na 25°C

	β -CD	Rutin: β -CD kompleks	$\Delta\delta$	Rutin	Rutin: β -CD kompleks	$\Delta\delta$
H-1	5,234	5,245	-0,011			
H-1'	5,050	5,087	-0,037			
H-2	3,633	3,635	-0,002			
H-3	3,975	3,976	-0,001			
H-4	3,593	3,596	-0,003			
H-5, H-6	3,850	3,852	-0,002			
CH ₃ hidroksipropil	1,110	1,167	-0,057			
CH ₃ -Rha rutina				1,076	1,067	+0,009
H-6 iz rutina				6,289	6,329	-0,040
H-8 iz rutina				6,495	6,695	-0,200
H-2' iz rutina				7,657	7,728	-0,071
H-5' iz rutina				7,028	7,061	-0,033
H-6' iz rutina				7,588	7,608	-0,020

4.5.3. XRD analiza analiza polaznih komponenti i inkluzionih kompleksa i fizičkih smeša rutrihidrata sa β -ciklodekstrinom i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom

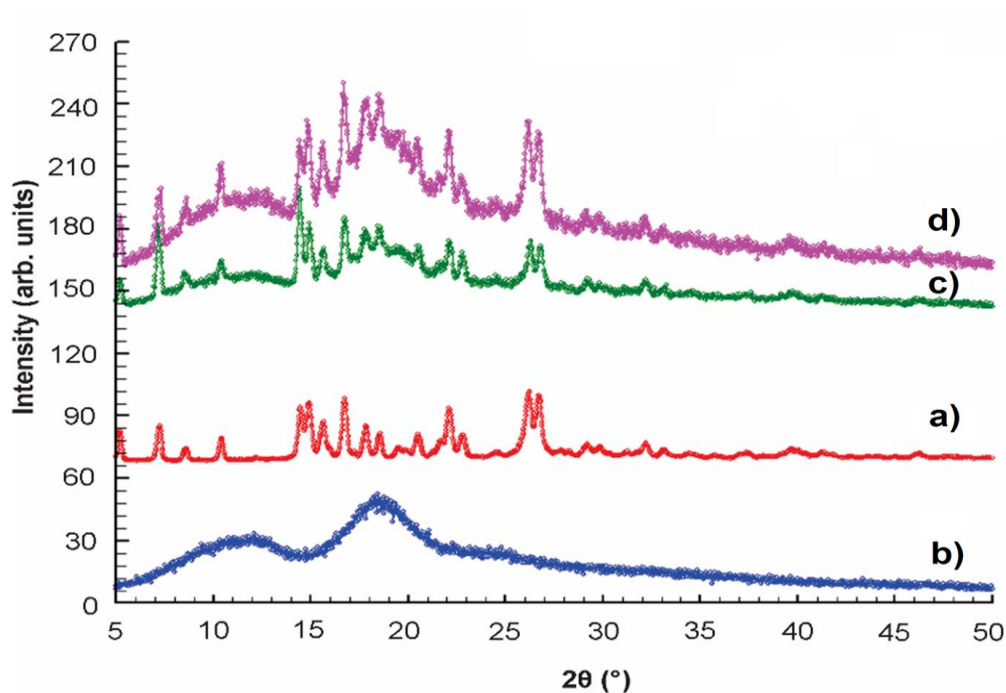
Poznato je da je XRD analiza odgovarajuća za potvrdu obrazovanja inkluzionih kompleksa. Takođe, često se koristi za određivanje obrazovanja novog jedinjenja od molekula roditelja. Na slikama 4.15 i 4.16 prikazani su difraktogrami rutin trihidrata, kompleksirajućih agenasa (β -CD, HP- β -CD), inkluzionih kompleksa i fizičkih smeša.

Difraktogram rutin trihidrata ima uske pikove na $7,4^\circ$; $11,8^\circ$; $16,9^\circ$; 22° ; $26,2^\circ$ i $26,7^\circ$, što ukazuje na kristalnu prirodu (slike 4.15a i 4.16a). U difraktogramu β -CD, pikovi se javljaju na 2θ na $6,2^\circ$; $8,9^\circ$; $10,7^\circ$; $11,8^\circ$; $12,6^\circ$; $15,5^\circ$; $17,2^\circ$; $19,6^\circ$; $20,9^\circ$ i $22,8^\circ$. Na osnovu ovih pikova može se takođe zaključiti da β -CD ima tipičnu kristalnu strukturu (slika 4.15b). XRD difraktogram kompleksa rutin: β -CD (slika 4.15c) se neznatno razlikuje od XRD difraktograma rutin trihidrata (slika 4.15a) i β -CD (slika 4.15b). Javljaju se pikovi izmenjenog položaja, oblika i inteziteta u odnosu na pikove kompleksirajućih molekula. Ovo ukazuje na delimičnu inkluziju rutin trihidrata u šupljinu β -ciklodekstrina tj. formiranja inkluzionog kompleksa. Difraktogram fizičke smeše (slika 4.15d) sadrži pikove i od rutina i od β -ciklodekstrina što ukazuje da ovi kompleksirajući agensi nisu međusobno interagovali u fizičkoj smeši, što je i očekivano.



Slika 4.15. XRD difraktogram: **a)** rutin trihidrata, **b)** β -CD, **c)** kompleksa rutin: β -CD, **d)** fizičke smeše rutin trihidrata i β -CD

U difraktogramu HP- β -CD (slika 4.16b) pikovi su razvučeni bez oštrih vrhova i ukazuju da on poseduje amorfnu strukturu. Difraktogram kompleksa rutin:HP- β -CD (slika 4.16c) sadrži oštre pikove koji su nešto izmenjenog oblika i intenziteta u odnosu na pikove u difraktogramu rutina, što ukazuje da je došlo do delimične inkluzije u šupljine HP- β -CD i da je nastala supramolekulska struktura kristalična. U difraktogramu fizičke smeše zapaža se prisustvo pikova i od molekula gosta i od molekula domaćina, jer nije došlo do njihovih interakcija.

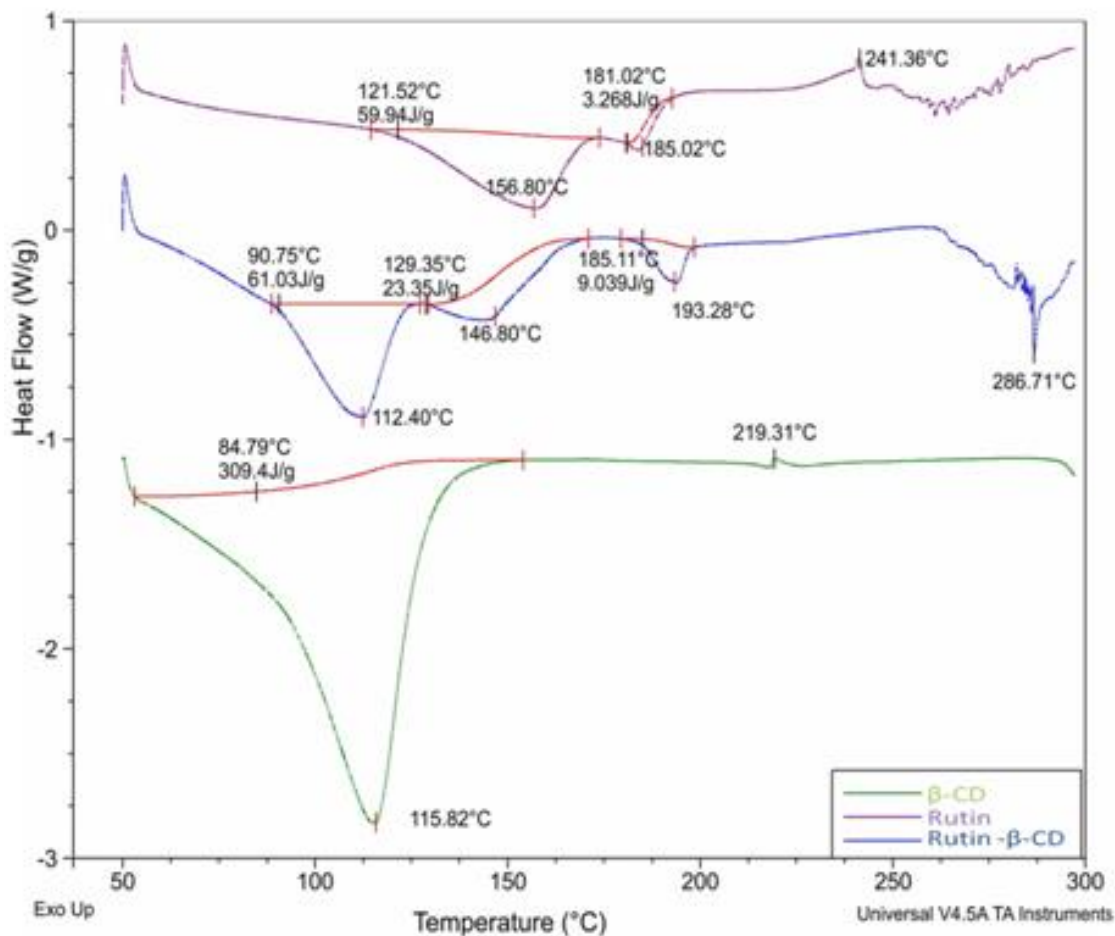


Slika 4.16. XRD difraktogram: **a)** rutin trihidrata, **b)** HP- β -CD, **c)** kompleksa rutin: HP- β -CD, **d)** fizičke smeše rutin trihidrata i HP- β -CD

4.5.4. DSC analiza polaznih komponenti i inkluzionih kompleksa rutin trihidrata sa β -ciklodekstrinom i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom

DSC termogrami rutina, β -ciklodekstrina, 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina i odgovarajućih inkluzionih kompleksa prikazani su na slikama 3 i 4. DSC termogrami oba kompleksa pokazuju temperaturne promene koje se razlikuju i od molekula domaćina i od molekula gosta.

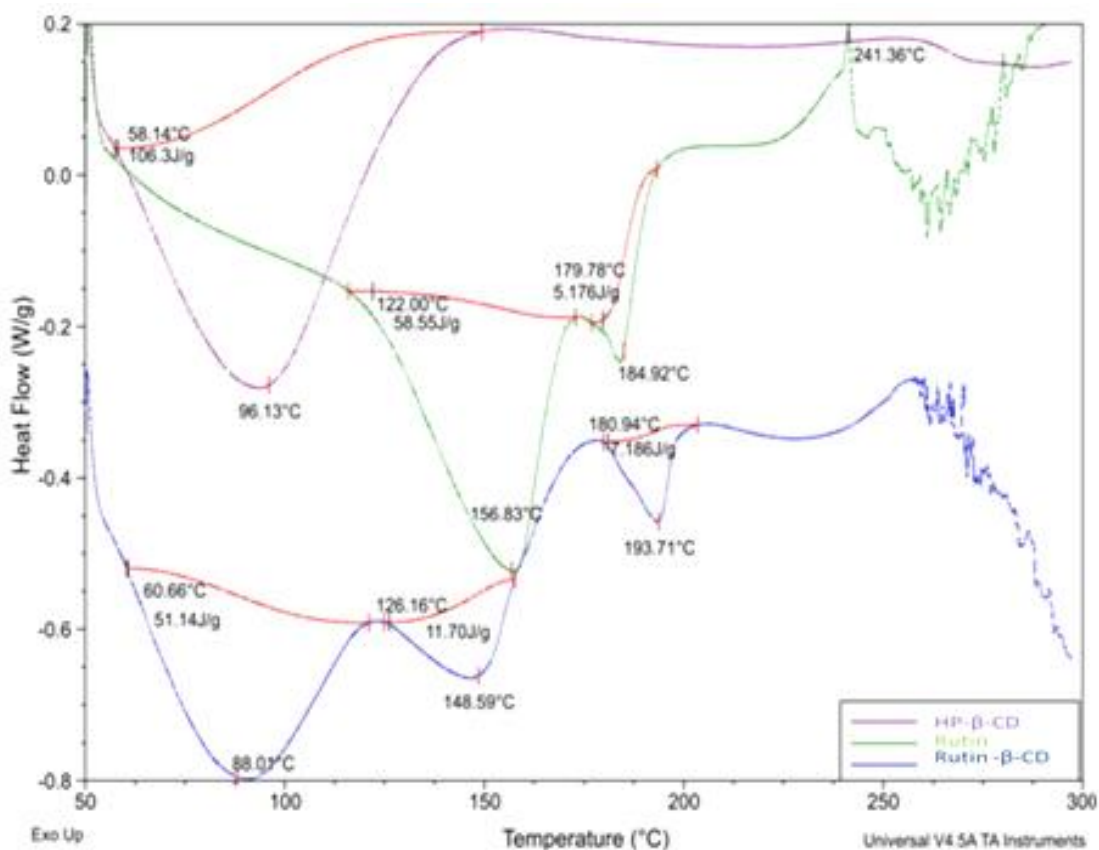
Rutin ima dva endotermna pika topljenja, prvi većeg intenziteta sa maksimumom na 156,8°C i pik manjeg intenziteta na 185,02°C. U oblasti iznad 241°C javljaju se promene usled termičke degradacije rutina. β -Ciklodekstrin ima oštar endotermni pik topljenja čiji je maksimum na 115,82°C, dok je kod 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina širi endotermni pik topljenja na 96,13°C.



Slika 4.17. DSC termogrami β -CD, rutina i inkluzionog kompleksa rutin:HP- β -CD

U DSC termogramima kod oba inkluzionog kompleksa ne postoje pikovi od temperaturnih promena rutina. U inkluzionim kompleksima usled zagrevanja nastaju pikovi koji se pojavljuju na nešto nižim temperaturama. Kod inkluzionog kompleksa rutin: β -ciklodekstrin pojavljuju se tri endotermna pika topljenja, prvi na 112,40°C (sa entalpijom 61,03 J/g), drugi pik na 146,8°C (sa entalpijom 23,35 J/g), a treći na 193,28°C (sa entalpijom 9,04 J/g), dok se termičke promene usled degradacije javljaju na nešto višoj temperaturi, u oblasti iznad 260°C, što ukazuje na povećanu termičku stabilnost.

Takođe, i kod inkluzionog kompleksa rutin:2hidroksipropil- β -ciklodekstrin pojavljuju se tri endotermna pika topljenja, prvi na 88,10°C (sa entalpijom 51,14 J/g), drugi pik na 148,59°C (sa entalpijom 11,70 J/g), a treći na 193,71°C (sa entalpijom 7,19 J/g). Termičke promene usled degradacije se takođe javljaju na nešto višoj temperaturi, u oblasti iznad 260°C.



Slika 4.18. DSC termogrami 2-hidroksipropil-β-ciklodekstrina (HP-β-CD), rutina i inkluzionog kompleksa rutin:2-hidroksipropil-β-ciklodekstrin (rutin-HP-β-CD)

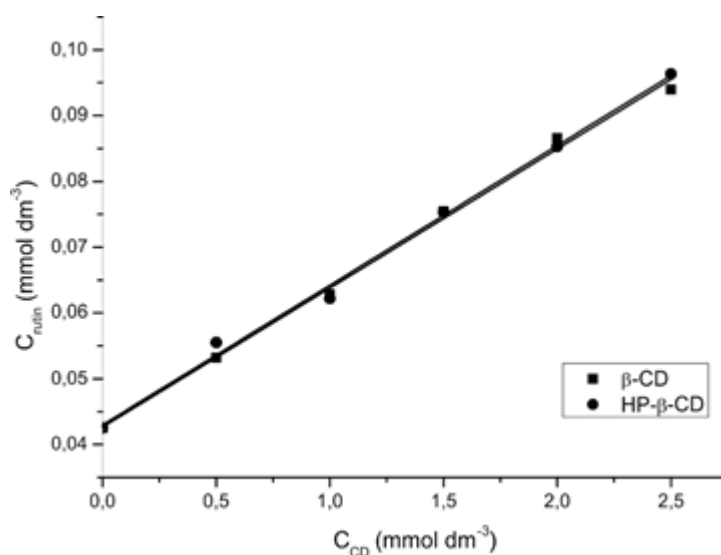
Dobijene vrednosti ne odgovaraju temperaturnim promenama niti molekula gosta niti molekulima domaćina, što ukazuje na stvaranje novih struktura, inkluzionih kompleksa, sa drugačijim režimom termičke destrukcije. Navedene promene temperatura topljenja i entalpija u DSC termogramima rezultat su formiranja novih supramolekularnih struktura u kojima su promenjena toplotna svojstva rutina inkludovanog u šupljine ciklodekstrina.

4.5.5. Analiza rutin trihidrata primenom UV-Vis metode

Kalibraciona kriva za određivanje sadržaja rutina korišćenjem UV-VIS metode može se prikazati na sledeći način: $A_{358} = 0,0307 C (\mu\text{g/mL}^3) + 0,0623$ ($R^2 = 0,9985$). Predloženom jednačinom moguće je predvideti 99,85% varijacija u apsorbanci. Linearnost kalibracione krive utvrđena je u opsegu koncentracija rutina 1-40 $\mu\text{g/mL}$. Predloženi model regresije se može koristiti za određivanje količine rastvorenog rutina kod studija fazne rastvorljivosti i ispitivanja fotostabilnosti uzoraka.

4.5.6. Ispitivanje fazne rastvorljivosti rutin trihidrata i inkluzionih kompleksa rutin: β -CD i rutin:HP- β -CD

Analiza fazne rastvorljivosti rutin trihidrata, rutin: β -CD i rutin:HP- β -CD kompleksa ispitivana je u vodenom rastvoru na 25 °C. Dijagrami fazne rastvorljivosti za oba kompleksa prikazani su na slici 1. Ovi dijagrami pokazuju zavisnost koja odgovara AL tipu, odnosno rastvorljivost rutina linearno raste sa povećanjem koncentracije ciklodekstrina. Ova činjenica ukazuje na formiranje inkluzionih kompleksa u stehiometrijskom odnosu rutina i ciklodekstrina 1:1. Isti tip dijagrama fazne rastvorljivosti kod kompleksiranja rutina sa HP- β -CD zabeležen je i u drugim studijama (Nguyen i sar., 2013).



Slika 4.19. Dijagram fazne rastvorljivosti rutina sa ciklodekstrinima na 25 °C

U tabeli 1 prikazane su vrednosti odsečka (koji predstavlja rastvorljivost čistog rutina), nagiba i konstante stabilnosti dobijene iz dijagrama fazne rastvorljivosti rutina u β -CD i HP- β -CD. Približno iste vrednosti odsečka i nagiba linearnih krivih ukazuju da rutin ima sličnu rastvorljivost u rastvore oba ciklodekstrina. Utvrđena efikasnost rastvaranja, koja predstavlja odnos rastvorljivosti rutina u prisustvu najveće koncentracije β -CD i HP- β -CD (2,5 mmol/dm³) i samog rutina iznosi 2,21 i 2,26, respektivno. Vrednost ΔG_{25} za kompleks rutin: β -CD iznosi -15,18 KJ/mol, a za kompleks rutin: HP- β -CD -15,08 KJ/mol. Negativne vrednosti ΔG_{25} ukazuju da se proces formiranja kompleksa između rutina i ciklodekstrina odigrava spontano.

Tabela 4.42. Vrednosti odsečka, nagiba i konstante stabilnosti dobijene iz dijagrama fazne rastvorljivosti za rutin: β -CD i rutin:HP- β -CD

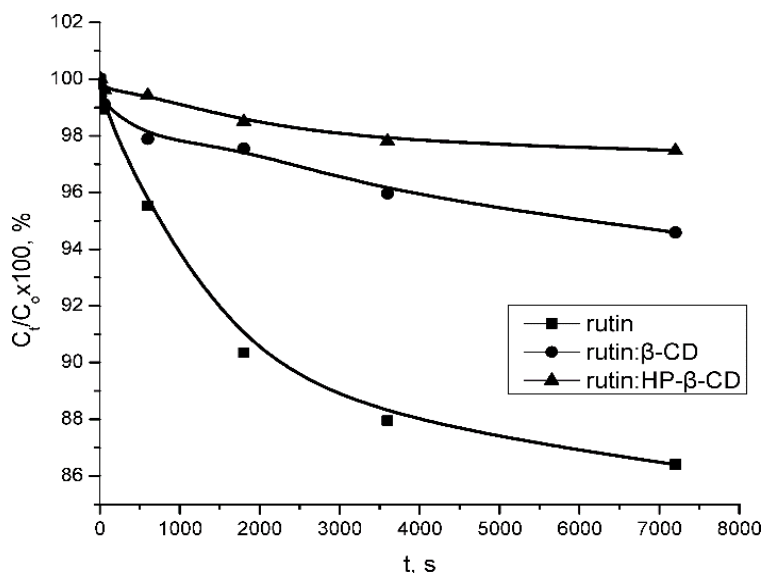
Kompleks	odsečak (mM)	Nagib	R ²	konstanta stabilnosti (K _s , M ⁻¹)
rutin: β -CD	0,04265	0,02115	0,9954	508,4
rutin:HP- β -CD	0,04298	0,02123	0,9948	488,9

U literaturi se mogu naći vrednosti konstante stabilnosti istih kompleksa, ali pripremljenih drugačijom procedurom. Calabro i sar., (2005) su za inkluzioni kompleks rutin: β -CD pripremljenog u vodi izračunali vrednost konstante stabilnosti $K_{1:1}=142 \text{ M}^{-1}$, dok je vrednost konstante stabilnosti za isti kompleks pripremljenog liofiliziranjem rastvora iznosila je 224 M^{-1} (Alvarez-Parrilla i sar., 2005). Nguyen i sar., (2013) su studijom fazne rastvorljivosti pokazali da su kompleksi rutin: β -CD i rutin:HP- β -CD pripremljeni u molskom odnosu 1:1, a vrednosti konstante stabilnosti su $250,3 \text{ M}^{-1}$ i $390,6 \text{ M}^{-1}$, respektivno. Konstanta stabilnosti $K_{1:1}$ za kompleks rutin:HP- β -CD pripremljen prema postupku koji su opisali Haiyun i sar., (2003) iznosila je 265 M^{-1} .

Upoređujući vrednosti konstante stabilnosti sa vrednostima datih u literaturi može se zaključiti da kompleksi rutina pripremljeni pocedurama opisanim u ovom radu, imaju veće vrednosti konstante stabilnosti. Dakle, ovim je potvrđeno da sama procedura pripreme kompleksa utiče na njegovu stabilnost i da se primenom etanola kao rastvarača stabilnost kompleksa značajno povećava.

4.5.7. Ispitivanje fotostabilnosti inkluzionih kompleksa

Da bi se ispitala fotostabilnost dobijenih kompleksa, metanolni rastvori kompleksa rutin: β -CD koncentracije $104 \mu\text{g/mL}$ i rutin:HP- β -CD koncentracije $128 \mu\text{g/mL}$ (ekvivalentno koncentraciji rutina od $36,4 \mu\text{g/mL}$) su izloženi zračenju u fotohemijском reaktoru na 300 nm . Fotostabilnost kompleksa praćena je u odnosu na metanolni rastvor rutina koncentracije $92 \mu\text{g/mL}$. Smanjenje koncentracije rutin trihidrata u funkciji vremena praćeno je UV-VIS metodom. Uticaj β -CD i HP- β -CD na fotostabilnost rutin trihidrata je prikazan na slici 2.



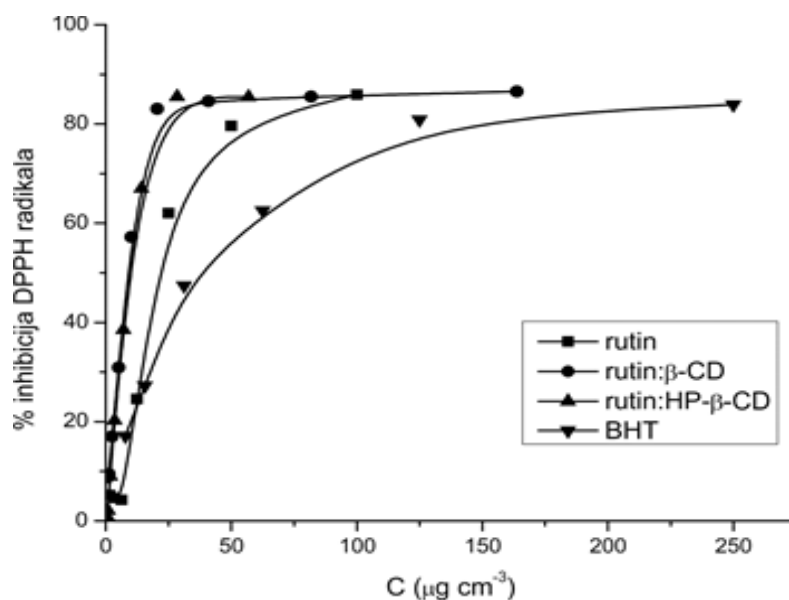
Slika 4.20. Fotodegradacija rutina i inkluzionih kompleksa sa β -CD i HP- β -CD

Poređenjem fotodegradacionih profila dobijenih za rutin i njegove komplekse može se zaključiti da ciklodekstrini imaju značajan uticaj na stepen degradacije rutin trihidrata. Nakon 7200 s ozračivanja sadržaj rutin trihidrata opao je za 13,6%, dok je sadržaj rutin trihidrata u kompleksima rutin: β -CD i rutin:HP- β -CD nakon ozračivanja opao za 5,44% i 2,52%, respektivno. Ovi rezultati pokazuju da stvaranje kompleksa rutina sa β -CD i HP- β -CD dovodi do povećanje fotostabilnosti rutina za 2,5 i 5,4 puta, respektivno, tokom 7200 s od izlaganja UVB zračenju. Dakle, rutin trihidrat uključivanjem u šupljine ciklodekstrina ima veću zaštitu od fotodegradacije. Takođe, do sličnih podataka došli su Almeida i sar., (2010), koji su nakon ispitivanja fotostabilnosti pokazali da se uključivanjem rutina u nanokapsule ili nanoemulzije povećava njegova fotostabilnost.

4.5.8. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti kompleksa

Na slici 4.21 prikazano je poređenje antioksidativne aktivnosti rutina, kompleksa rutin: β -CD, rutin:HP- β -CD i BHT. Nakon kompleksiranja rutina sa β -CD i HP- β -CD, njegova sposobnost "hvatanja" DPPH radikala značajno se povećava. Povećanje antioksidativne aktivnosti rutina u kompleksima može se pripisati promenama u kapacitetu doniranja vodonika usled kompleksiranja (Nguyen i sar., 2013). Pri konjugaciji rutina sa ciklodekstrinima dolazi do formiranja jedne ili više vodonične veze između vodonikovih atoma u hidroksilnim grupama rutina i elektronegativnih atoma ciklodekstrina. Ove

vodonične veze slabe kovalentnu vezu između vodonika i kiseonika u hidroksilnim grupama rutina, što kao posledicu imaju lakše otkidanje protona. Izračunata EC_{50} vrednost rutina iznosi 21 $\mu\text{g/mL}$, odnosno 6,9 i 10 $\mu\text{g/mL}$ za komplekse rutin: β -CD i rutin:HP- β -CD, respektivno. Nguyen i sar., (2013) su prilikom ispitivanja antioksidativne aktivnosti rutin:HP- β -CD kompleksa pripremljenog u vodi izračunali EC_{50} vrednost od 14 $\mu\text{g/mL}$. Dobijena EC_{50} vrednost ukazuje da ovako pripremljeni kompleks pokazuje manju antioksidativnu aktivnost u odnosu na isti kompleks analiziran u ovom radu, koji je pripremljen u smeši vode i etanola (2:3 v/v). BHT je pokazao nižu antioksidativnu aktivnost u odnosu na rutin i njegove komplekse, s obzirom da je njegova EC_{50} vrednost 36,6 $\mu\text{g/mL}$. Dakle, na osnovu izračunatih EC_{50} vrednosti može se reći da se antioksidativna aktivnost rutina u inkluzionim kompleksima sa β -CD i HP- β -CD skoro dvostruko, odnosno trostruko povećala.



Slika 4.21. Antioksidativna aktivnost BHT, rutina i kompleksa rutin: β -CD i rutin:HP- β -CD određena DPPH testom

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata prilikom ispitivanja plodova i listova pomenutih biljnih vrsta fenolnih jedinjenja, antioksidativne, antimikrobne aktivnosti i nakon inkluzionog kompleksiranja biljnih vrsta familija *Rosaceae*, *Cornaceae* i *Grossulariaceae*, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Prinos fenolnih jedinjenja zavisi od uslova pod kojim se odvija ekstrakcija i od tipa same ekstrakcione tehnike;
- Optimalni uslovi ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz odabranih uzoraka određeni su primenom dve ekstrakcione tehnike: konvencionalna ekstrakcija – maceracija i ultrazvučna ekstrakcija;
- Najveći prinos ekstraktivnih materija pokazao je ekstrakt dobijen upotrebom sistema rastvarača: metanol/voda/sirćetna kiselina u odnosu 70/25/5, v/v/v dok je povećanjem udela vode u istom sistemu rastvarača njihov sadržaj bio manji što je u skladu sa različitom polarnošću i kiselosti fenolnih jedinjenja prisutnih u biljnim vrstama;
- Drugi parametri koji su značajni kod obe ekstrakcione tehnike su vreme trajanja, temperatura na kojoj se odvija proces ekstrakcije i hidromodul. Utvrđeno je za obe ekstrakcione tehnike da je optimalna temperatura 40 °C i hidromodul 1:10. Najveća razlika između konvencionalne i ultrazvučne tehnike je u vremenu trajanja ekstrakcije i to, kod konvencionalne iznosi 180 min, a kod ultrazvučne 30 min, što ukazuje na prednosti primene ultrazvučne ekstrakcione tehnike;
- Najveći prinos fenolnih jedinjenja se postiže primenom ultrazvučne ekstrakcione tehnike, pri datim optimalnim uslovima, sa frekvencijom od 40 kHz i ulazna snaga ultrazvuka od 500 W;
- Ultrazvučna ekstrakcija ima prednost nad konvencionalnom ekstrakcionom tehnikom, kako zbog većeg prinosa ciljnih bioaktivnih jedinjenja (u proseku za 17%), tako i zbog smanjenja unosa energije i troškova ekstrakcije. Sa druge strane, znatno kraće vreme ekstrakcije dovodi do smanjenja degradacije fenolnih jedinjenja;
- Fenolna jedinjenja su rasprostranjena, u različitoj koncentraciji i sastavu, u plodu i u listovima ispitivanih biljnih vrsta. Identifikovne su različite klase fenolnih jedinjenja, kao što su: fenolne kiseline, flavan-3-oli, proantocijanidini, flavonoli i antocijani;
- Ekstrakti listova biljnih vrsta bogatiji su u sadržaju flavonola i fenolnih kiselina, a ekstrakte ploda biljnih vrsta karakteriše visok sadržaj antocijana;

- Kod ekstrakta ploda biljnih vrsta najveći sadržaj fenolnih jedinjenja na osnovu UV-Vis analize, bio je kod crne ribizle pa zatim kod crvene ribizle, divlje kupine, maline, trnjine, domaće kupine, drena, šipurka i gloga. Sadržaj fenolnih jedinjenja kod ekstrakta ploda crne ribizle bio je veći za 44% nego kod crvene ribizle;
- Fenolne kiseline bile su najzastupljenije kod divlje i domaće kupine pa zatim kod drena, trnjine, maline, crne ribizle, šipurka, gloga i crvene ribizle. Kod ekstrakta divlje kupine sadržaj fenolnih kiselina bio je veći za 8% nego kod domaće kupine;
- Flavonoli su imali približno istu koncentraciju u svim ekstraktima plodova biljnih vrsta;
- Najveću koncentraciju antocijana pokazala je crna i crvena ribizla, a zatim divlja kupina, malina, trnjina, domaća kupina i dren. Sadržaj antocijana kod crne ribizle bio je veći za 56% nego kod crvene ribizle. U ekstraktima ploda gloga i šipurka nisu identifikovani antocijani;
- Kod ekstrakta listova biljnih vrsta najveći sadržaj fenolnih jedinjenja bio je kod crvene ribizle, zatim kod šipurka, maline, divlje kupine, crne ribizle, domaće kupine, trnjine, gloga i drena. Sadržaj fenolnih jedinjenja kod ekstrakta lista crvene ribizle bio je veći za 43,22% nego kod šipurka;
- Fenolne kiseline bile su najzastupljenije kod crvene ribizle, zatim maline, trnjine, šipurka, divlje i domaće kupine, crne ribizle i drena. Kod ekstrakta crvene ribizle sadržaj fenolnih kiselina bio je veći za 58,65% nego kod maline;
- Flavonoli su u najvećoj koncentraciji bili prisutni u ekstraktima lista crvene ribizle, zatim kod šipurka, divlje i domaće kupine, crne ribizle, maline, gloga, drena i trnjine. Sadržaj flavonola kod ekstrakta lista crvene ribizle bio je veći za 43,49% nego kod šipurka;
- Svi testirani ekstrakti pokazali su značajnu antioksidativnu aktivnost. Kod ploda najjaču antioksidativnu aktivnost pokazali su ekstrakti crne i crvene ribizle. Ekstrakti ploda crne ribizle pokazali su za 29,17% veću antioksidativnu aktivnost od ekstrakta crvene ribizle. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda ostalog bobičastog voća opadala je sledećim redosledom: divlja kupina > malina > trnjina > domaća kupina > dren > šipurak > glog. Kod lista najjaču antioksidativnu aktivnost pokazali su ekstrakti crvene ribizle i maline. Ekstrakti lista crvene ribizle pokazali su za 29,33% veću antioksidativnu aktivnost od ekstrakta maline. Antioksidativna

aktivnost ekstrakata lista ostalih biljnih vrsta opadala je sledećim redosledom: šipurak > trnjina > divlja kupina > crna ribizla > domaća kupina > glog > dren;

- Utvrđeno je da postoji izražena korelacija između antioksidativne aktivnosti i fenolnog sadržaja ovih ekstrakata. Antioksidativnoj aktivnosti ne doprinose sva jedinjenja podjednako. Tako da je prisustvo antocijana u plodovima biljnih vrsta bilo presudno za visoku antioksidativnu aktivnost ispitivanih ekstrakata;
- Na osnovu rezultata HPLC analize može se zaključiti da je sastav fenolnih jedinjenja bio različit u zavisnosti od ispitivanih plodova. Razlikovao se i u ekstraktima ploda i u ekstraktima lista;
- U ekstraktima ploda domaće kupine najzastupljenija je elaginska kiselina, a kod lista ferulna. Od flavonola kod ploda domaće kupine potvrđeno je najveće prisustvo kvercetin-3-glukozida kao i kod lista. Najprisutniji flavon-3-ol u plodu je (+)-katehin, a od antocijana cijanidin rutinozid;
- Kod ekstrakata ploda divlje kupine najzastupljenija je elaginska kiselina, kod lista hlorogena. Od flavonola kod ploda divlje kupine potvrđeno je najveće prisustvo kvercetin-3-glukozida kao i kod lista. Najprisutniji flavon-3-oli u plodu su procijanidini, a od antocijana delphinidin glukozid;
- U ekstraktima ploda maline najzastupljenija je ferulna kiselina kao i kod lista. Od flavonola kod ploda maline potvrđeno je najveće prisustvo miricetina, dok je kod lista identifikovano najveće prisustvo kvercetina. Flavon-3-oli prisutni su samo u listu maline (+)-katehin, a od antocijana najprisutniji je cijanidin soforozid;
- U ekstraktima ploda šipurka najzastupljenija je kafena kiselina, a kod lista *p*-kumarinska. Od flavonola kod ploda šipurka potvrđeno je samo prisustvo kvercetin-3-glukozida, dok je kod lista najprisutniji je kemferol-3-glukozid. Od flavon-3-ola u plodu je identifikovan u najvećoj količini (-)-epikatehin;
- Kod ekstrakata trnjine najzastupljenija je kafena kiselina, a kod lista hlorogena. Od flavonola kod ploda trnjine potvrđeno je najveće prisustvo kvercetin-3-glukozida kao i kod lista. Najprisutniji flavon-3-ol u plodu je (+)-katehin, a od antocijana cijanidin soforozid;
- U ekstraktima ploda gloga najzastupljenija je *p*-kumarinska kiselina, a kod lista hlorogena. Od flavonola kod ploda gloga potvrđeno je najveće prisustvo rutina a kod lista miricetin. Od flavon-3-ola u plodu je identifikovan samo (-)-epikatehin, a kod lista je potvrđeno njegovo najveće prisustvo;

- U ekstraktima ploda crvene ribizle najzastupljenija je kafena kiselina, a kod lista hlorogena. Od flavonola kod ploda crvene ribizle potvrđeno je najveće prisustvo kvercetin-3-glukozida, dok je kod lista identifikovano najveće prisustvo rutina. Flavon-3-oli prisutni su samo u listu procijanidin B2, a od antocijana najprisutniji je cijanidin soforozid;
- Kod ekstrakata ploda crne ribizle najprisutnija je ferulna kiselina, dok kod lista najviše ima hlorogene kiseline. Od flavonola i u ekstraktima ploda i u ekstraktima lista crne ribizle najviše je prisutan rutin. Flavon-3-oli prisutni su samo u listu crne ribizle i to procijanidin B2, a od antocijana najprisutniji je cijanidin soforozid;
- U ekstraktima ploda drena najzastupljenija je *p*-kumarinska kiselina, a kod lista t-kaftarna. Od flavonola kod ploda drena potvrđeno je najveće prisustvo kvercetin-3-glukozida, a kod lista miricetin. Najprisutniji flavon-3-ol u plodu je procijanidin B2, a u listu (-)-epikatehin. Od antocijana najveće prisustvo pokazao je delphinidin galaktozid;
- Na osnovu datih analiza može se zaključiti da je rutin jedan od najprisutnijih fenolnih jedinjenja, kako u ekstraktima ploda tako i u ekstraktima lista u pojedinim biljnim vrstama. U cilju njegove dalje primene korišćen je za pripremu inkluzionih kompleksa. Dobijeni kompleks rutina sa ciklodekstrinima ima velikih prednosti u odnosu na čist rutin za potencijalnu primenu u farmaciji i medicini;
- Testirani ekstrakti listova i plodova biljnih vrsta pokazali su značajnu antimikrobnu aktivnost na 12 bakterijskih sojeva i jedan kvasac koji je uporediv sa pozitivnom kontrolom tri antibiotika (streptomycin, tetraciklin i hloramfenikol), i to bez ikakvog selektivnog dejstva na određeni soj mikroorganizma. Ekstrakti listova su pokazali jaču antimikrobnu aktivnost u odnosu na ekstrakte plodova što se može povezati sa većim sadržajem fenolnih kiselina i flavonola u ekstraktima listova u odnosu na plodove. Ovo ukazuje na postojanje korelacije između antimikrobne aktivnosti testiranih ekstrakata i sadržaja fenolnih jedinjenja. Gram-pozitivni sojevi mikroba (*Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Sarcina lutea*, *Micrococcus flavus*) pokazali su veću osetljivost na testirane ekstrakte u odnosu na gram-negativne sojeve (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*). Kvasac, *Candida albicans* je pokazao najveću rezistenciju kod svih ekstrakata;

- Utvrđeno je da je ekstrakti ploda domaće kupine i ekstrakti lista ispoljavju najveće antibakterijsko delovanje prema bakteriji *Listeria monocytogenes*. Kod ekstrakata ploda i lista divlje kupine najveće antibakterijsko delovanje utvrđeno je prema bakteriji *Saricina lutea*. Što se tiče ploda i lista maline najveće antibakterijsko delovanje je prema bakteriji *Listeria monocytogenes*. Kod ekstrakata šipurka, trnjine i gloga i u plodu i listu takođe najveće antibakterijsko delovanje potvrđeno je prema bakteriji *Listeria monocytogenes*. Ekstrakti ploda crne ribizle imaju najveće antibakterijsko delovanje prema bakteriji *Listeria monocytogenes* dok ekstrakti lista prema bakteriji *Staphilococcus aureus*. Kod crvene ribizle ekstrakti ploda imaju najveće antibakterijsko delovanje prema bakteriji *Sarcina lutea* dok ekstrakti lista prema bakteriji *Staphilococcus aureus*. Ekstrakti ploda drene imaju najveće antibakterijsko delovanje prema bakteriji *Staphilococcus aureus*, a ekstrakti lista prema bakteriji *Listeria monocytogenes*. Ekstrakti ploda gloga pokazali su najmanju antibakterijsku aktivnost, a najveću ekstrakti ploda divlje kupine;
- Metodom kopercipitacije moguće je uspešno dobiti inkluzione komplekse rutina sa β -CD i HP- β -CD u čvrstom stanju, što potvrđuju rezultati FT-IC, $^1\text{H-NMR}$, XRD i DSC analiza;
- Istraživanja fazne rastvorljivosti su pokazala da rutin i ciklodekstrini interaguju u molarnom odnosu 1:1. Obrazovani inkluzioni kompleksi mogu uspešno da uspore fotodegradaciju rutina od izloženosti UVB zračenju, i značajno povećati njegov antioksidativni kapacitet i faznu rastvorljivost. Dobijeni proizvod kompleksa rutina ima prednosti kao što su minimalni sporedni efekti i niski zahtevi za zaštitom od svetla tokom proizvodnje, čuvanja i rukovanja.

Na osnovu ovih zaključaka može se reći da plodovi i listovi odabranih biljnih vrsta familija *Rosaceae*, *Cornaceae* i *Grossulariaceae* mogu naći veliku primenu u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji kao i u farmaciji.

6. LITERATURA

Al-Farsi M. A., Lee C.Y. 2008. Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from dateseeds. *Food Chemistry* 108: 977-985.

Almeida J. S., Lima F., Da Ros S., Bulhoes L. O., de Carvalho L. M., Beck R. C. 2010. Nanostructured systems containing rutin: in vitro antioxidant activity and photostability studies. *Nanoscale Research Letters* 5 (10) : 1603-1610.

Allothman M., Bhat R., Karim A. A. 2009. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia extracted with different solvents. *Food Chemistry* 115: 785-788.

Alvarez-Parrilla E., De La Rosa A. L., Torresrivás F., Rodrigo-García J., González-Aguilar A. G. 2005. Complexation of apple antioxidants: chlorogenic acid, quercetin and rutin by β -Cyclodextrin (β -CD). *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 53: 121–129.

Andreasen M. F., Landbo A., Christensen L. P., Hansen A., Meyer A. S. 2001. Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins. *J Agric Food Chem.* 49: 4090-4096.

Aneta W., Oszmianski J. 2007. Influence of polyphenols isolated from *Scutellaria baicalensis* Georgi and *Crataegus oxyacantha* on the oxidative stability of cholesterol in butter stored in various conditions. *Eur Food Res Technol.* 224: 635-642.

Bahri-Sahloul R., Ammar S., Fredj R. B., Saguem S., Gree S., Trotin F., Skhiri F. H. 2009. Polyphenol contents and antioxidant activities of extracts from flowers of two *Crataegus azarolus* L. varieties. *Pakistan J Biol Sci.* 12: 660-668.

Beekwilder J., Jonker H., Meesters P., Hall R., Van Der Meer I. M., Ric De Vos C. H. 2005. Antioxidants in Raspberry: On-Line Analysis Links Antioxidant Activity to a Diversity of Individual Metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 53: 3313-3320.

BEOU, Holmgren P.K., Holmgren N.H., Barnett L.C. 1990. Index Herbariorum. Part 1. The Herbaria of the World, p 16476.

Bersin T., Muller A., Schwarz H. 1955. Ingredients of *Crataegus oxyacantha* L. III. Heptahydroxyflavan glycoside. *Arzneimittelforschung* 5: 490-491.

Bohm B. A. Introduction to flavonoids, Harwood Academic Publishers, Australia, 1998.

Borges G., Degeneve A., Mullen W., Crozier A. 2010. Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants, and cranberries. *J Agric Food Chem.* 58: 3901-9.

Brickell C. ed. 1992. The Royal Horticultural Society Encyclopedia of Gardening. Dorling Kindersley. p. 415.

Buendía B., Gil M. I., Tudela J. A., Gady A. L., Medina J. J., Soria C., López J. M., Tomás-Barberán F. A. 2010. HPLC-MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars. *J Agric Food Chem.* 58: 3916-26.

Buricova L., Andjelkovic M., Cermakova A., Reblova Z., Jurcek O., Kolehmainen E., Verhe R., Kvasnicka F. 2011. Antioxidant capacities and antioxidants of strawberry, blackberry and raspberry leaves. *Czech. J. Food Sci.* 29: 181-189.

Burton-Freeman B. M., Sandhu A. K., Edirisinghe I. 2016. Red Raspberries and Their Bioactive Polyphenols: Cardiometabolic and Neuronal Health Links. *Advances in Nutrition: an International Review Journal.* 7 (1): 44–65.

Calabro M. L., Tommasini S., Donato P., Stancanelli R., Raneri D., Catania S., Ficarra R. 2005. The rutin/ β -cyclodextrin interactions in fully aqueous solution: spectroscopic studies and biological assays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 36 (5): 1019-1027.

Cavanagh H. M. A., Hipwell M., Wilkinson J. M. 2003. Antibacterial activity of berry fruits used for culinary purposes. *J Med Food.* 6: 57-61.

Celep E., Aydın A., Kırmızıbekmez H., Yesilada E. 2013. Appraisal of in vitro and in vivo antioxidant activity potential of cornelian cherry leaves. *Food Chem Toxicol.* 62: 448–455.

Chirinos R., Rogez H., Campos D., Pedreschi R., Larondelle Y. 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Trapaeolum tuberosum* Ruiz and Pavon) tubers. *Separation and Purification Technology* 55: 217-225.

Clifford M. N., Scalbert A. 2000. Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* 80: 1118-25.

Dao L. T., Takeoka G. R., Edwards R. H., Berrios J. D. J. 1998. Improved method for the stabilization of anthocyanidins. *J Agric Food Chem.* 46: 3564-9.

De Riek J., De Cock K., Smulders M., Nybom H. 2013. AFLP-based population structure analysis as a means to validate the complex taxonomy of dogroses (*Rosa* section *Caninae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 67 (3): 547–59.

Deighton N., Brennan R., Finn C., Davies H. V. 2000. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *J Sci Food Agric.* 80: 1307-1313.

Demir F., Hakki Kalyoncu I. 2003. Some nutritional, pomological and physical properties of cornelian cherry (*Cornus mas* L.). *Journal of Food Engineering*. 60 (3): 335–341.

Dragović-Uzelac V., Levaj B., Bursać D., Pedisić S., Radojčić I., Biško A. 2007. Total Phenolics and Antioxidant Capacity Assays of Selected Fruits. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 72(4): 279-284.

Fan-Chiang, H., Wrolstad, R. 2005. Anthocyanin pigment composition of blackberries. *Journal of Food Science*. 70: C198–C202.

Fedriani J. M., Delibes M. 2009. Functional diversity in fruit-frugivore interactions: a field experiment with Mediterranean mammals. *Ecography* 32: 983 - 992.

Fournand D., Vivens A., Sidhoum L., Souquet J-M., Motounet M., Cheynier V. 2006. Accumulation and Extractability of Grape Sin Tanins and Anthocyanins at Different Advanced Physiological Stages. *Journal of agricultural and food chemistry* 54: 7331-7338.

Gasperotti M., Masuero D., Vrhovsek U., Guella G., Mattivi F. 2010. Profiling and accurate quantification of *Rubus* ellagitannins and ellagic acid conjugates using direct UPLC-Q-TOF HDMS and HPLC-DAD analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 4602–4616.

Gawron-Gzella A., Dudek-Makuch M., Matławska I. 2012. DPPH radical scavenging activity and phenolic compound content in different leaf extracts from selected blackberry species. *Acta biologica cracoviensia series botanica* 54/2: 32–38.

Gudej J., Tomczyk M. 2004. Determination of Flavonoids, Tannins and Ellagic Acid in Leaves from *Rubus* L. Species. *Arch Pharm Res*. 27 (11): 1114-1119.

Hager T. J., Howard L. R., Liyanage R., Lay J. O., Prior R. L. 2008. Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 661–669.

Hager T. J., Howard L. R., Prior R. L. 2010. Processing and storage effects on the ellagitannin composition of processed blackberry products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 11749–11754.

Haiyun D., Jianbin C., Guomei Z., Shaomin S., Jinhao P. 2003. Preparation and spectral investigation on inclusion complex of β -cyclodextrin with rutin. *Spectrochimica Acta part A* 59: 3421-3429.

Häkkinen S., Heinonen M., Kärenlampi S., Mykkänen H., Ruuskanen J., Törrönen R. 1999. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Res Int*. 32: 345-53.

Halliwell B., Gutteridge M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford University Press, Oxford, UK.

Halvorsen B. L., Carlsen M. H., Phillips K. M., et al. 2006. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 84 (1): 95–135.

Heinonen I.M., Meyer A.S., Frankel E.N. 1998. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4107- 4112.

Hemwimon S., Pavasant P., Shotipruk, A. 2007. Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Separation and Purification Technology* 54: 44-50.

Hollman P.C.H., de Vries J.H.M., van Leeuwen P.A.M., Mengelers M.J.B., Katan M.B. 1995. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 1276-82.

Holst L., Haavik S., Nordeng H. 2009. Raspberry leaf – Should it be recommended to pregnant women?. *Complementary therapies in clinical practice*. 15 (4): 204–208.

Hukkanen A. T., Pölönen S. S., Kärenlampi S. O., Kokko H. I. 2006. Antioxidant capacity and phenolic content of sweet rowanberries. *J Agric Food Chem.* 54: 112-9.

Jakobek L., Šeruga M., Novak I., Medvidović-Kosanović M. 2007. *Flavonols. 2007. Phenolic Acids and Antioxidant Activity of Some Red Fruits. Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 103. Jahrgang, Heft 8, 369-378.

Jakobek L., Seruga M., Seruga B., Novak I., Medvidovic-Kosanovic M. 2009. Phenolic compound composition and antioxidant activity of fruits of *Rubus* and *Prunus* species from Croatia. *International Journal of Food Science and Technology*. 44: 860–868.

Janick J. 2003. *Herbals: the connection between horticulture and medicine. HortTechnology*, 13 (2): 229-238.

Jarvis C.E. 1992. Seventy-Two Proposals for the Conservation of Types of Selected Linnaean Generic Names, the Report of Subcommittee 3C on the Lectotypification of Linnaean Generic Names. *Taxon*. 41 (3): 552–583.

Jaworska G., Sady M., Grega T., Bernaś E., Pogoń K. 2011. Qualitative comparison of blackcurrant and blackcurrant-whey beverages. *Food Science and Technology International*. 17 (4): 331–341.

Kähkönen M. P., Hopia A. I., Heinonen M. 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 49: 4076-82.

Kassim A., Poette, J., Paterson A., Zait D., McCallum S., Woodhead M., i sar. 2009. Environmental and seasonal influences on red raspberry anthocyanin antioxidant contents and identification of quantitative traits loci (QTL). *Molecular Nutrition and Food Research* 53: 625–634.

Kempler C., Hall H., Finn C. 2012. Raspberry. In M.L. Badenes; D.H. Byrne. *Fruit Breeding*. Springer US. pp. 263–304.

Khatab R., Eskin M., Aliani M., Thiyam U. 2010. Determination of sinapic acid derivatives in canola extracts using high-performance liquid chromatography. *J Am Oil Chem Soc.* 87: 147-55.

Koponen J. M., Happonen A. M., Mattila P. H., Törrönen A. R. 2007. Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *J Agric Food Chem.* 55: 1612-9.

Krisch J., Galgoczy L., Tolgyesi M., Papp T., Vagvolgyi C. 2008. Effect of fruit juices and pomace extracts on the growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Acta Biol. Szegediensis.* 52: 267-270.

Lätti A. K., Jaakola L., Riihinen K. R., Kainulainen P. S. 2009. Anthocyanin and flavonol variation in bog bilberries (*Vaccinium uliginosum* L.) in Finland. *J Agric Food Chem.* 58: 427-33.

Lesca P. 1983. Protective effects of ellagic acid and other plant phenols on benzo[a]pyrene-induced neoplasia in mice. *Carcinogenesis.* 4 (12): 1651–1653.

Li W., Hydamaka A. W., Lowry L., Beta T. 2009. Comparison of antioxidant capacity and phenolic compounds of berries, chokecherry and seabuckthorn. *Cent Eur J Biol.* 4: 499-506.

Määttä K., Kamal-Eldin A., Törrönen R. 2001. Phenolic Compounds in Berries of Black, Red, Green, and White Currants (*Ribes* sp.). *Antioxidants & Redox Signaling*, 3 (6).

Maatta-Riihinen K. R., Kamal-Eldin A., Torronen A. R. 2004. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (Family *Rosaceae*). *J Agric Food Chem.* 52: 6178–6187.

Määttä-Riihinen K., Kamal-Eldin A., Mattila P. H., Gonzalez-Paramas A., Törrönen A. R. 2004a. Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. *J Agric Food Chem.* 52: 4477-86.

Mattila P., Hellström J., Törrönen R. 2006. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *J Agric Food Chem.* 54: 7193-9.

Mattila P., Kumpulainen J. 2002. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *J Agric Food Chem.* 50: 3660-7.

Mazur S. P., Nes A., Wold A. B., Remberg S. F., Aaby K. 2014. Quality and chemical composition of ten red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes during three harvest seasons. *Food Chem.* 160: 233–240.

McDougall G., Martinussen I., Stewart D. 2008. Towards fruitful metabolomics: High throughput analyses of polyphenol composition in berries using direct infusion mass spectrometry. *J Chromatogr B* 871: 362-9.

Mertz C., Cheynier V., Günata Z., Brat P. 2007. Analysis of Phenolic Compounds in Two Blackberry Species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 55: 8616–8624.

Mikulic-Petkovsek M., Schmitzer V., Slatnar A., Stampar F., Veberic R. 2012. Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. *J. Food Sci.* 77 (10): C1064–1070.

Moyer R. A., Hummer K. E., Finn C. E., Frei B., Wrolstad R. E. 2002. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(3): 519-525.

Moyer R.A., Hummer K.E., Finn C.E., Frei B., Wrolstad R.E. 2002. Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: *Vaccinium*, *Rubus* and *Ribes*, *J. Agric. Food Chem.* 50: 519-525.

Mratinić, E.: Kupina, Novi Beograd, 1998.

Mullen A., McGinn J., Lean M. E. J., MacLean M. R., Gardner P., Duthie G. G., i sar. 2002. Ellagitannins, flavonoids, and other phenolic in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 5191–5196.

Mullen W., Lean M. E. J., Crozier A. 2002. Rapid characterization of anthocyanins in red raspberry fruit by high-performance liquid chromatography coupled to single quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 966: 63–70.

Mullen W., Yokota T., Lean M. E. J., Crozier A. 2003. Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MSn. *Phytochemistry* 64: 617–624.

Naczek M, Shahidi F. 2003. Biosynthesis, classification, and nomenclature of phenolics. In: *Food and nutraceuticals*. Boca Raton p. CRC Press. 558 s.

Nguyen T. A., Liu B., Zhao J., Thomas D. S., Hook J. M. 2013. An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. *Food Chemistry* 136(1): 1

Nicholson B.E., Wallis M. 1963. *The Oxford Book of Garden Flowers*. London: Oxford University Press.

Nikolić G., Nikolić S., Milić B., Čanadanović-Brunet J. 1998. Primena metode elektronske spinske rezonance za proučavanje antioksidantnih svojstava prirodnih fenolnih jedinjenja. *Acta Fac. Med. Naiss.* 15 (4): 183-188.

Niño-Medina G., Carvajal-Millán E., Rascon-Chu A., Marquez-Escalante J., Guerrero V., Salas-Muñoz E. 2010. Feruloylated arabinoxylans and arabinoxylan gels: Structure, sources and applications. *Phytochem Rev.* 9:111-20.

Ogawa K., Sakakibara H., Iwata R., Ishii T., Sato T., Goda T., Shimoi K., Kumazawa S. 2008. Anthocyanin composition and antioxidant activity of the crowberry (*Empetrum nigrum*) and other berries. *J Agric Food Chem.* 56: 4457-62.

Pantelidis G. E., Vasilakakis M., Manganaris G. A., Diamantidis G. 2007. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chem.* 102: 777–783.

Pawlowska A. M., Camangi F., Braca A. 2010. Quali-quantitative analysis of flavonoids of *Cornus mas* L. (*Cornaceae*) fruits, *Food Chem.* 119: 1257–1261.

Petrisor C., Ilie A., Moale C. 2013. Production and quality potential of different black and red currant cultivars in Baneasa Research Station condition. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology* 17 (4): 76- 79.

Pezet R., Perret C., Jean-Denis J. B., Tabacchi R., Gindro K., Viret O. 2003. δ -Viniferin, a Resveratrol Dehydrodimer: One of the Major Stilbenes Synthesized by Stressed Grapevine Leaves. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5488-5492.

Ponomarev V. D. 1976. *Ekstragirovanje lekarstvennogo syr'ya*. Medicina. Moscow.

Potter D., et al. 2007. Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution.* 266 (1–2): 5–43.

Puupponen-Pimiä R., Nohynek L., Meier C., Kahkonen M., Heinonen M., Hopia A., Oksman-Caldentey K-M. 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J Appl Microbiol.* 90: 494-507.

Pyrkosz-Biardzka K., Kucharska A. Z., Sokół-Łętowska A., Strugała P., Gabrielska J. 2014. A Comprehensive Study on Antioxidant Properties of Crude Extracts from Fruits of

Berberis vulgaris L., *Cornus mas* L. and *Mahonia aquifolium* Nutt. Pol. J. Food Nutr. Sci. 64 (2): 0-0, DOI: 10.2478/v10222-012-0097-x, In Press.

Randelović V., 2005. Botanika. Biološko društvo "Dr Sava Petrović". Niš. 144 str.

Remberg S. F., Sonstebly A., Aaby K., Heide O. M. 2010. Influence of postflowering temperature on fruit size and chemical composition of Glen Ample raspberry (*Rubus idaeus* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 58: 9120–9128.

Rewerski W., Lewak S. 1967. Some pharmacological properties of flavan polymers isolated from hawthorn (*Crataegus oxyacantha*). Arzneimittelforschung 17: 490-491.

Robbins R. J. 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. J Agric Food Chem. 51: 2866-87.

Robert W., Mike K. 2006. Nutraceuticals and functional foods. In: Robert E. C. Wildman, Ed. Handbook of nutraceuticals and functional foods, second edition. 2nd Edition p. Boca Raton: CRC Press. s1-21.

Salmanian S., Sadeghi Mahoonak A. R., Alami M., Ghorbani M. 2014. Phenolic Content, Antiradical, Antioxidant, and Antibacterial Properties of Hawthorn (*Crataegus elbursensis*) Seed and Pulp Extract. J. Agr. Sci. Tech. 16: 343-354.

Schwarz B., Hofmann T. 2007. Sensory-guided decomposition of red currant juice (*Ribes rubrum*) and structure determination of key astringent compounds. J. Agric. Food Chem. 55 (4): 1394–1404.

Sellappan, S.; Akoh, C. C.; Krewer, G. (2002). "Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries". Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50 (8): 2432–2438.

Shahidi F. 2000. Antioxidants in food and food antioxidants. Food / Nahrung 44: 158-63.

Shahidi F., Chandrasekara A. 2010. Hydroxycinnamates and their *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities. Phytochem Rev. 9: 147-70.

Shahidi F., Naczk M. 1995. Food phenolics: an overview, U: Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications. Technomic Publishing Co, Pennsylvania, USA, 1-4.

Sikora E., Bieniek M. I., Borczak B. 2013. Composition and antioxidant properties of fresh and frozen stored blackthorn fruits (*Prunus Spinosa* L.). Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. 12(4): 365-372.

Stefanut M. N., Cata A., Pop R., Mosoarca C., Zamfir A. D. 2011. Anthocyanins HPLC-DAD and MS characterization, total phenolics, and antioxidant activity of some berries extracts. *Analytical Letters*. 44: 2843–2855.

Stintzing., F. C., Stintzing., A. S., Carle., R., . Wrolstad., R. E. 2002. A novel zitterionic anthocyanin from evergreen blackberry (*Rubus laciniatus* Willd.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.. 50: 396–399.

Taruscio T. G, Barney D. L, Exon J. 2004. Content and profile of flavanoid and phenolic acid compounds in conjunction with the antioxidant capacity for a variety of northwest *Vaccinium* berries. *J Agric Food Chem*. 52: 3169-76.

Taruscio T. G., Barney D. L., Exon J. 2004. Content and profile of flavanoid and phenolic acid compounds in conjunction with the antioxidant capacity for a variety of northwest *Vaccinium* berries. *J Agric Food Chem*. 52: 3169-76.

Tassell M., Kingston R., Gilroy D., Lehane M., Furey A. 2010. Hawthorn (*Crataegus* spp.) in the treatment of cardiovascular disease. *Pharmacognosy Review*. 4(7): 32–41.

Thiyam U., Stöckmann H., Schwarz K. 2006. Antioxidant activity of rapeseed phenolics and their interactions with tocopherols during lipid oxidation. *JAOCS* 83:523-8.

Tuberoso C. I. G., Rosa A., Bifulco E., Melis M. P., Atzeri A., Pirisi F. M., Dessi M. A. 2010. Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L. berries extracts. *Food Chem*. 123: 1242-51.

Tuberoso C. I. G., Rosa A., Bifulco E., Melis M. P., Atzeri A., Pirisi F. M., Dessi M. A. 2010. Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L. berries extracts. *Food Chem*. 123: 1242-51.

Tumbas V. T. 2010. Antiradikalska i anti-proliferativna aktivnosr ekstrakata izabranih biljka familija *Rosaceae* i *Eridaceae*. Doktorska disertacija, Tehnoloski fakultet, Nivi Sad.

Turkben C., Saiburun E., Demir C., Uylaser V. 2010. Effect of freezing and frozen storage on phenolic compounds of raspberry and blackberry cultivars. *Food Analytical Methods* 3: 144–153.

Turker A.U., Yildirim A.B., Karakas F.P. 2012. Antibacterial and antitumor activities of some wild fruits grown in Turkey. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 26: 2765-2772.

Vagiri M., Ekholm A., Andersson S. C., Johansson E., Rumpunen K. 2012. An Optimized Method for Analysis of Phenolic Compounds in Buds, Leaves, and Fruits of Black Currant (*Ribes nigrum* L.). *J. Agric. Food Chem*. 60: 10501–10510.

Vedel H., Lange J. 1960. Trees and Bushes in Wood and Hedgerow. Methuen & Co. Ltd., London.

Veličković J. M., Kostić D. A., Stojanović G. S., Mitić S. S., Mitić M. N., Randelović S. S., Đorđević A. S. 2014. Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit. Hem. Ind. 68 (3): 297–303.

Verma S. K., Jain V., Verma D., Khamesra R. 2007. *Crataegus oxyacantha*- A cardioprotective herb. J Herbal Med Toxicol. 1: 65-71.

Vogl S., Picker P., Mihaly-Bison J., Fakhrudin N., Atanasov A. G., Heiss E. H., Wawrosch C., Reznicek G., Dirsch V. M., Saukel J., Kopp B. 2013. Ethnopharmacological in vitro studies on Austria's folk medicine—An unexplored lore in vitro anti-inflammatory activities of 71 Austrian traditional herbal drugs. Journal of Ethnopharmacology. 149 (3): 750–71.

Vuorela S., Meyer A., Heinonen M. E. 2003. Quantitative analysis of the main phenolics in rapeseed meal and oils processed differently using enzymatic hydrolysis and HPLC. Eur Food Res Technol. 217: 517-23.

Wang S. Y., Lin H.S. 2000. Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. J. Agric. Food Chem. 48: 140-146.

Waterman P., Mole S. 1994. Analysis of Phenolic Plant Metabolites, Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Weinberger J. H. 1975. Plums. Pp. 336–347 in Advances in fruit breeding, eds. J. Janick and J. N. Moore. West Lafayette: Purdue University Press.

White B. L., Howard L. R., Prior R. L. 2010a. Polyphenolic composition and antioxidant capacity of extruded cranberry pomace. J Agric Food Chem. 58: 4037-42.

White B. L., Howard L. R., Prior R. L. 2010b. Proximate and polyphenolic characterization of cranberry pomace. J Agric Food Chem. 58: 4030-6.

Xia E-Q., Deng G-F., Guo Y-J., Li H-B. 2010. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. Int. J. Mol. Sci. 11: 622-646.

Yi O., Jovel E. M., Towers G. H. N., Wahbe T. R., Cho D. 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of native Rosa sp. from British Columbia, Canada. International Journal of Food Sciences and Nutrition 58(3): 178-189.

7. IZVOD

U ovoj doktorskoj disertaciji za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz plodova i listova biljnih vrsta (*Rubus fruticosus* L., *Rubus idaeus* L., *Ribes nigrum* L., *Ribes rubrum* L., *Prunus spinosa* L., *Crataegus oxyacantha* L., *Rosa canina* L., *Cornus mas* L.) korišćene su dve ekstrakcione tehnike – klasična i ultrazvučna ekstrakcija (sistem rastvarača metanol/voda/sirćetna kiselina u odnosu 70/25/5 na sobnoj temperaturi; hidromodul 1:10; vreme trajanja ekstrakcije 180 min kod konvencionalne i 30 min kod ultrazvučne) i uspostavljena je korelacija gde je utvrđena prednost primene ultrazvučne ekstrakcije.

Kvalitativno i kvantitativno određivanje grupa fenolnih jedinjenja i pojedinačnih fenolnih sastojaka u ispitivanim ekstraktima na bazi ovog voća izvršeno je primenom UV-Vis spektrofotometrije i HPLC metodom sa DAD i fluorescentnim detektorima i izvršeno je određivanje 23 fenolnih jedinjenja koja pripadaju: fenolnim kiselinama, flavonolima, flavan 3-olima, antocijanima i proantocijanidima. Plodovi biljnih vrsta pokazali su veoma visok sadržaj antocijana, dok su listovi bili bogatiji flavonolima i fenolnim kiselinama.

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata uzoraka odabranih biljnih vrsta izvršeno je primenom DPPH metode. Dobijeni rezultati upoređivani su pomoću odgovarajućih statističkih softverskih paketa. Svi ekstrakti su pokazali određenu antioksidativnu aktivnost kao posledica fenolnih jedinjenja u njima. Antioksidativnoj aktivnosti ne doprinose sva jedinjenja podjednako. Tako da je prisustvo antocijana u plodovima bilo presudno za visoku antioksidativnu aktivnost ispitivanih ekstrakata.

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata uzoraka odabranih biljnih vrsta određeno je primenom mikrodilucione metode. Ustanovljena je i značajna aktivnost prema 12 patogenih bakterija i jednog patogenog kvasca. Generalno, ekstrakti listova pokazali su jaču antimikrobnu aktivnost u odnosu na ekstrakte plodova, što ukazuje da neka fenolna jedinjenja (flavonoli i fenolne kiseline) imaju jače dejstvo na ove patogene sojeve. Gram (-) bakterije i kvasac pokazale su veću rezistenciju na ove ekstrakte od gram (+) bakterijskih sojeva.

U cilju moguće praktične primene fenolnih jedinjenja iz biljnih vrsta izvršeno je inkluziono kompleksiranje najprisutnijih fenolnih sastojaka u ekstraktima sa tzv. „nosačima“ ili „domaćinima“ tipa ciklodekstrina. Karakterizacija nastalih inkluzionih kompleksa određena je primenom spektralnih metoda analize (FT-IC, NMR, XRD), kojima je potvrđeno formiranje odgovarajućih kompleksa. Fotostabilnost nastalih inkluzionih kompleksa ispitivana je korišćenjem fotohemijskog reaktora sa UV lampama. Ova ispitivanja su potvrdila značajno povećanje stabilnosti kompleksa u odnosu na čisto fenolno jedinjenje.

Plodovi i listovi ispitivanih biljnih vrsta familija *Rosaceae*, *Cornaceae* i *Grossulariaceae* mogu se iskoristiti za dobijanje ekstrakata bogatih fenolima i mogu naći veliku primenu u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji.

8. SUMMARY

In this doctoral thesis, the two extraction techniques - classical and ultrasound (solvent system methanol / water / acetic acid 70/25/5 than at room temperature; the hydro 1:10; the duration of the extraction at 180 min and 30 min of the conventional code ultrasound) for extraction of phenolic compounds from the berry fruit and leaf (*Rubus fruticosus* L., *Rubus idaeus* L., *Ribes nigrum* L., *Ribes rubrum* L., *Prunus spinosa* L., *Crataegus oxyacantha* L., *Rosa canina* L., *Cornus mas* L.) are used, and established the correlation among them where is determined the advantage of applying ultrasonic extraction.

Qualitative and quantitative determination of a group of phenolic compounds and individual phenolic compounds in the fruit and leaf extracts was carried out by using UV-VIS spectrophotometry and HPLC method with DAD and fluorescence detectors and confirmed the presence of 23 phenolic compounds which belonging to: phenolic acids, flavonols, flavan-3-ols, anthocyanins and proanthocyanidins. Berries showed a high content of anthocyanins, while the leaves were richer in flavonols and phenolic acids.

Investigation of antioxidant activity of berry fruit and leaf extracts was performed using the DPPH method. The results were compared using appropriate statistical software packages. All extracts exhibited antioxidant activity as a result of the presence of phenolic compounds in them. Not all phenolic compounds contribute equally to antioxidant activity of extracts. So, the presence of anthocyanins in the fruits of berries was crucial for the high antioxidant activity of these extracts.

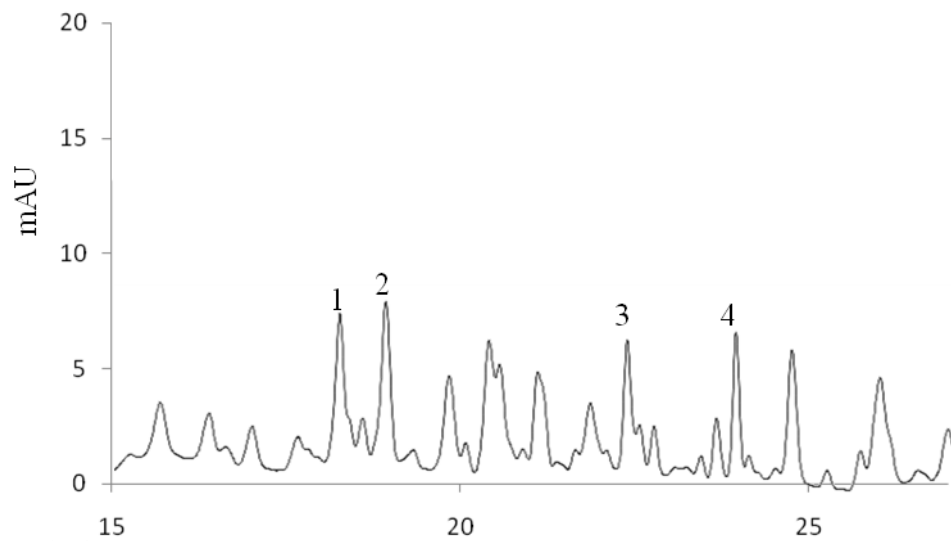
Investigation of antimicrobial activity of berry fruit and leaf extracts is determined using the microdilution method, which also showed a significant activity against pathogenic bacteria and 12 hours of the pathogenic yeast. Generally, leaf extracts showed a stronger antimicrobial activity in relation to the fruit extracts, which indicates that some of the phenol compounds (flavonols and phenolic acids) have a stronger effect on the pathogenic strains. Gram (-) bacteria and yeast showed better resistance to these extracts in relation to gram (+) bacterial strains.

In order to get practical application of phenolic compounds from berries, the inclusion complexation of most active phenolic compounds in the extracts and the so-called. "Carriers" or "host" type of cyclodextrin was made. The characterization of the obtained inclusion complex was determined using methods of spectral analysis (FT-IR, NMR, XRD), which confirmed the formation of the corresponding complex. Photostability of obtained inclusion complexes were investigated using photochemical reactor with UV lamps. These

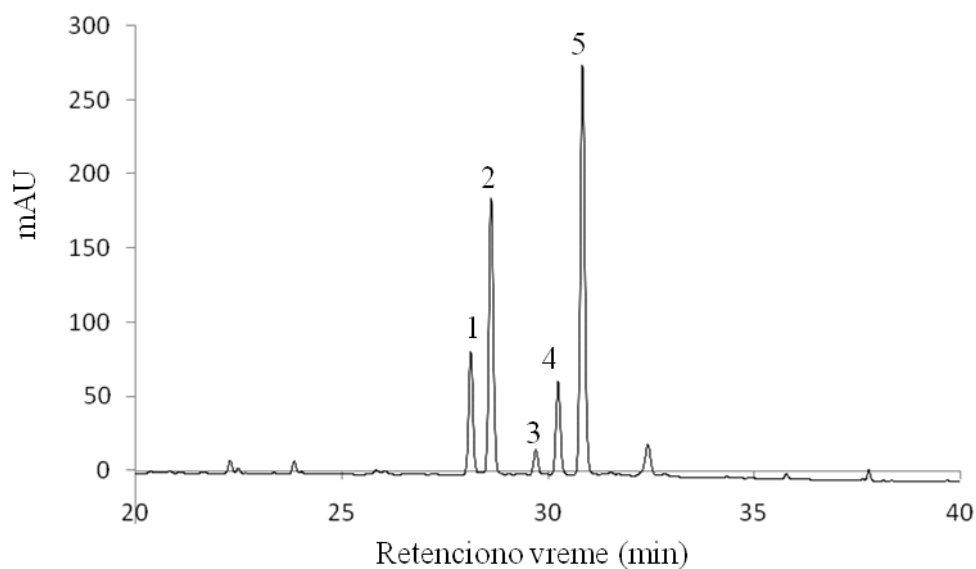
studies confirmed the significant increase of complex stability compared to pure phenolic compound.

The berry fruits and leaves which belong to family of *Rosaceae*, *Cornaceae* and *Grossulariaceae* can be used for obtaining extracts rich in phenols which can find great application in the food, cosmetic and pharmaceutical industries.

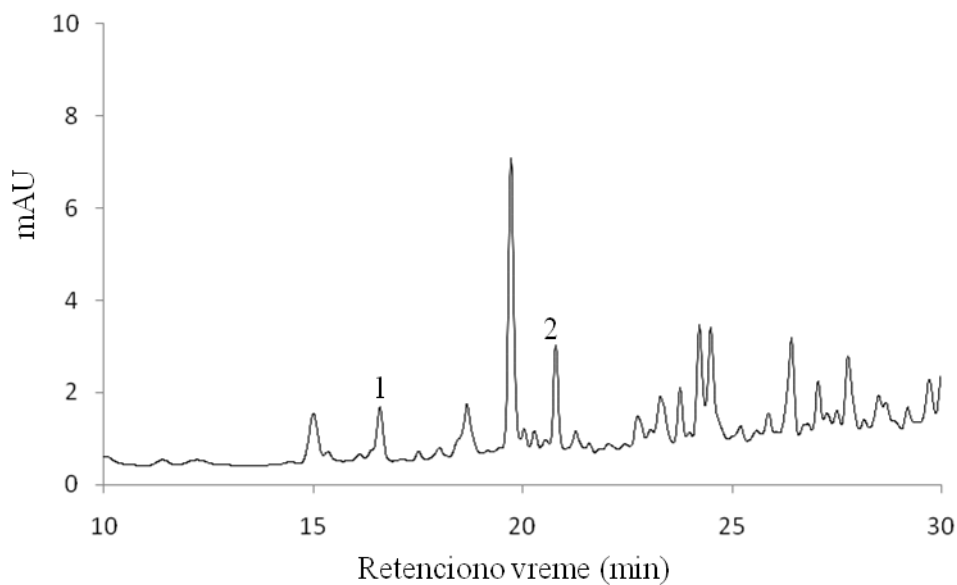
9. PRILOG



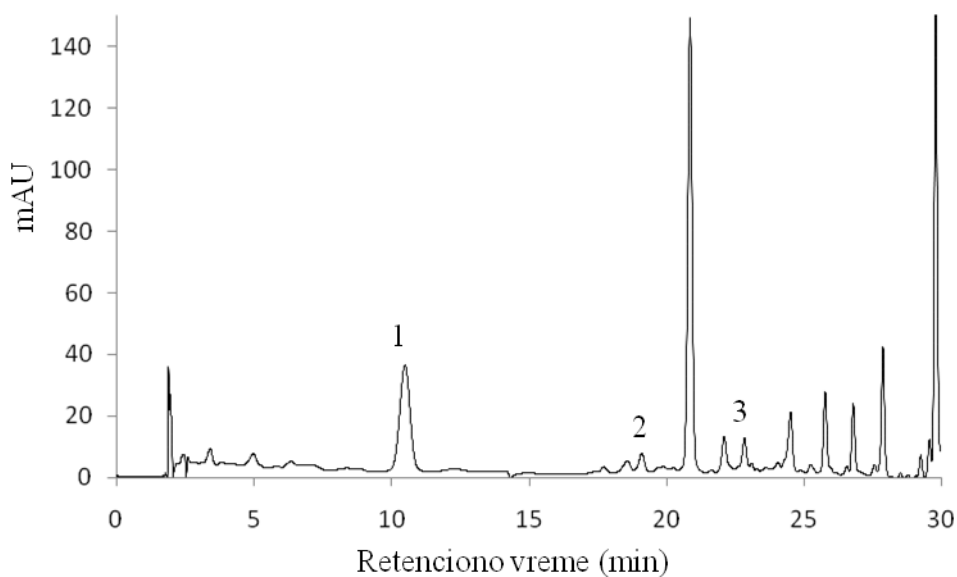
Slika P1: HPLC hromatogram ekstrakta lista crne ribizle (*Ribes nigrum L.*), snimljen na 320 nm: **1** kafena kiselina; **2** hlorogena kiselina; **3** p-kumarinska kiselina; **4** ferulna kiselina



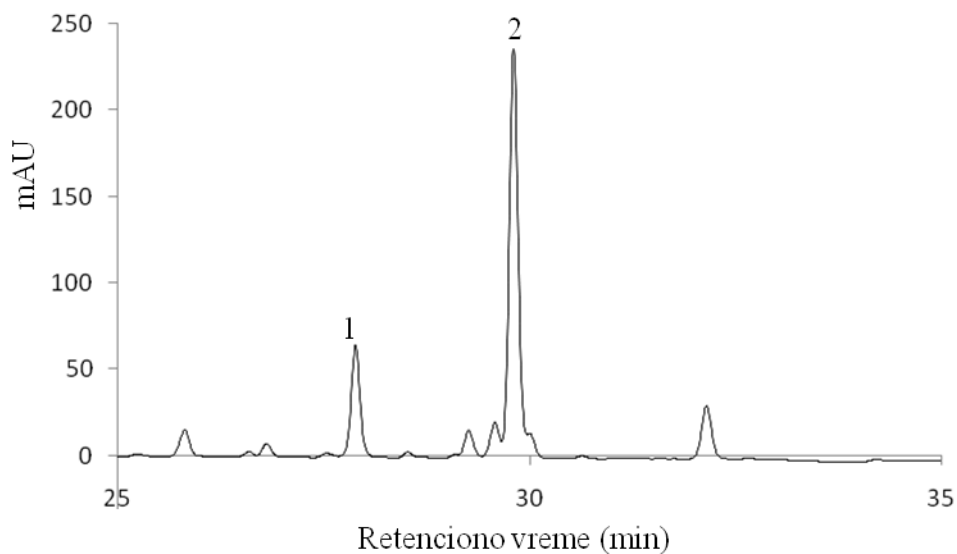
Slika P2: HPLC hromatogram ekstrakta lista crne ribizle (*Ribes nigrum L.*), snimljen na 360nm: **1** kvercetin-3-glukozid; **2** rutin; **3** miricetin; **4** kvercetin; **5** kemferol-3-glukozid



Slika P3: HPLC hromatogram ekstrakta lista crne ribizle (*Ribes nigrum L.*), snimljen fluorescentnim detektorom na 275/322 nm ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$): **1** (+)-katehin; **2** proantocijanin B2

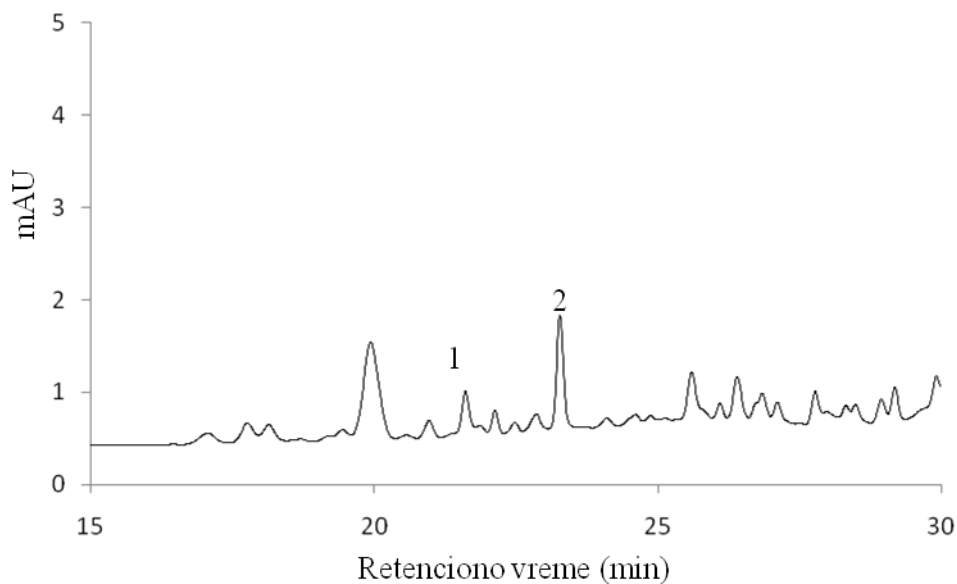


Slika P4: HPLC hromatogram ekstrakta lista drenea (*Cornus mas L.*), snimljen na 320 nm:
1 t-kaftarna kiselina; **2** hlorogena kiselina; **3** p-kumarinska kiselina

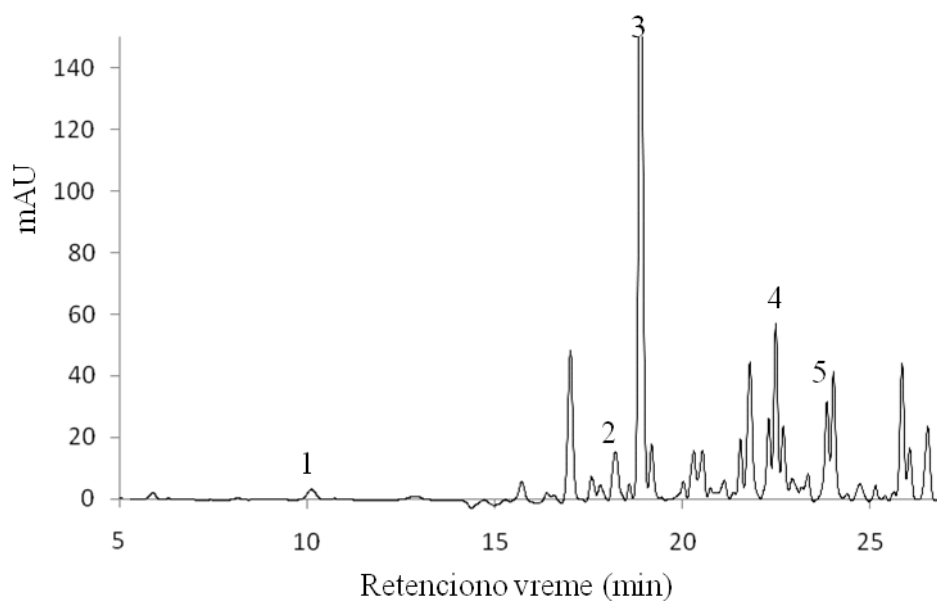


Slika P5: HPLC hromatogram ekstrakta lista drena (*Cornus mas L.*), snimljen na 360 nm:

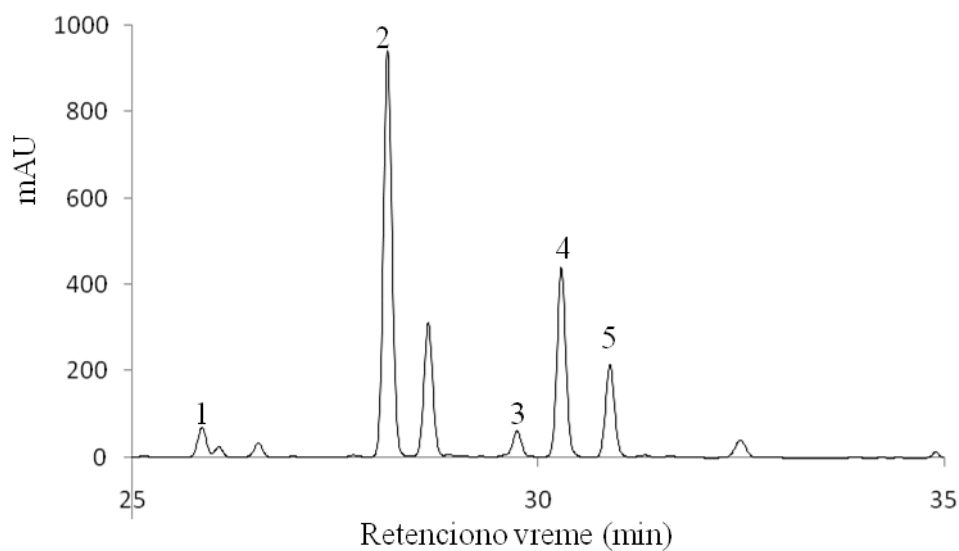
1 rutin; **2** miricetin



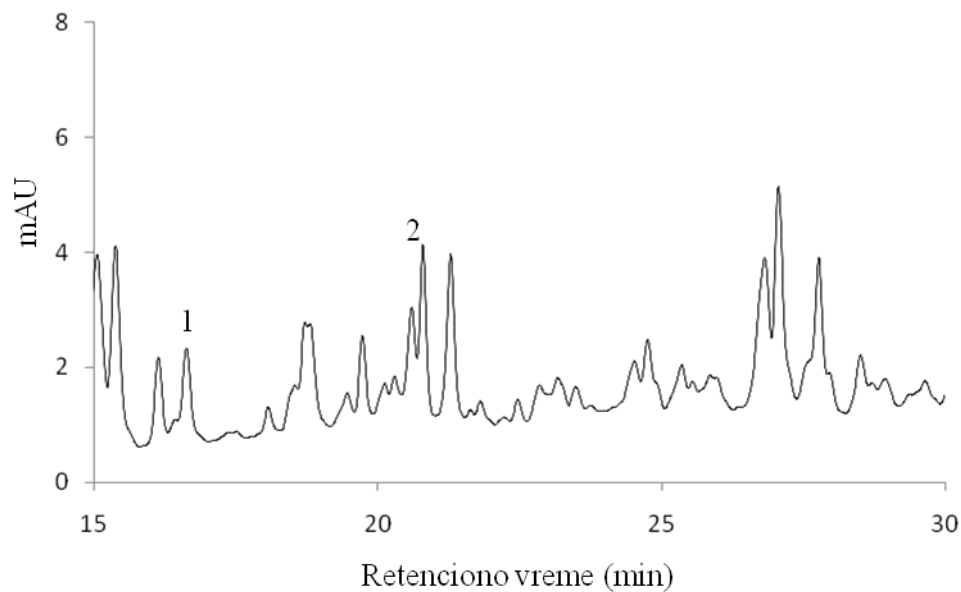
Slika P6: HPLC hromatogram ekstrakta lista drena (*Cornus mas L.*), snimljen fluorescentnim detektorom na 275/322 nm ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$): **1** proantocijanin B2; **2** (-)-epikatehin



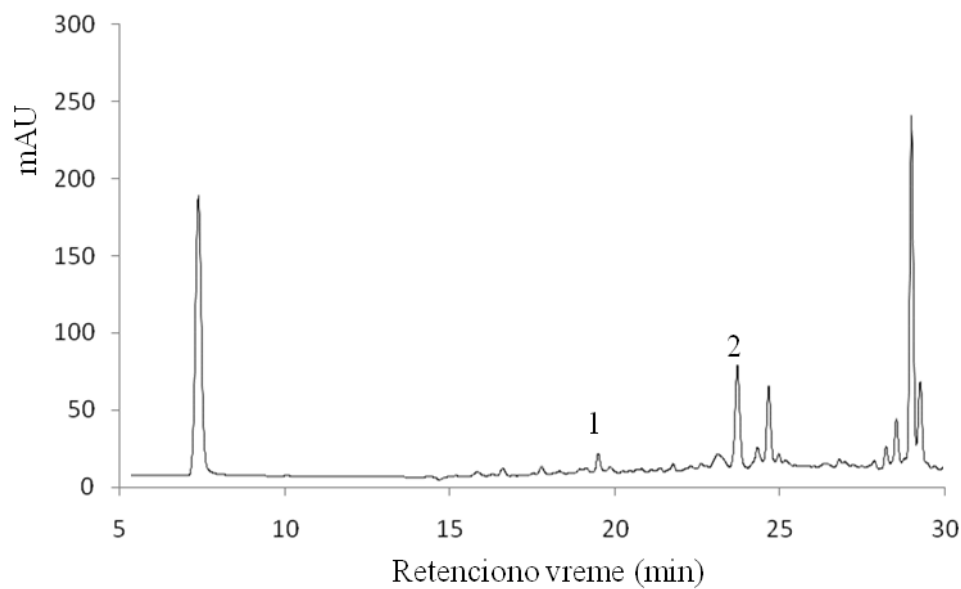
Slika P7: HPLC hromatogram ekstrakta lista crvene ribizle (*Ribes rubrum* L.), snimljen na 320nm: **1** t-kaftarna kiselina; **2** kafena kiselina; **3** hlorogena kiselina; **4** p-kumarinska kiselina; **5** ferulna kiselina



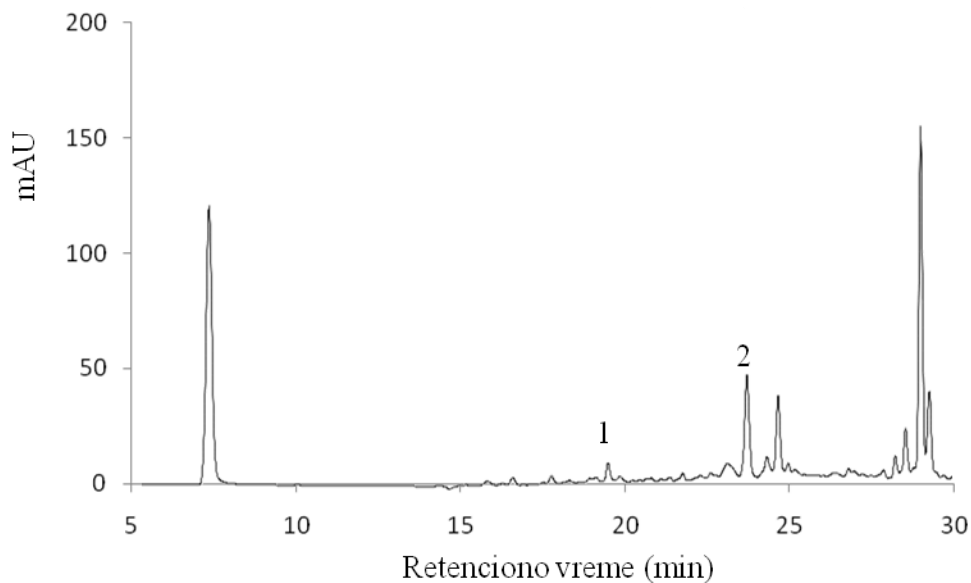
Slika P8: HPLC hromatogram ekstrakta lista crvene ribizle (*Ribes rubrum* L.), snimljen na 360 nm: **1** elaginska kiselina; **2** rutin; **3** miricetin; **4** kvercetin; **5** kemferol-3-glukozid



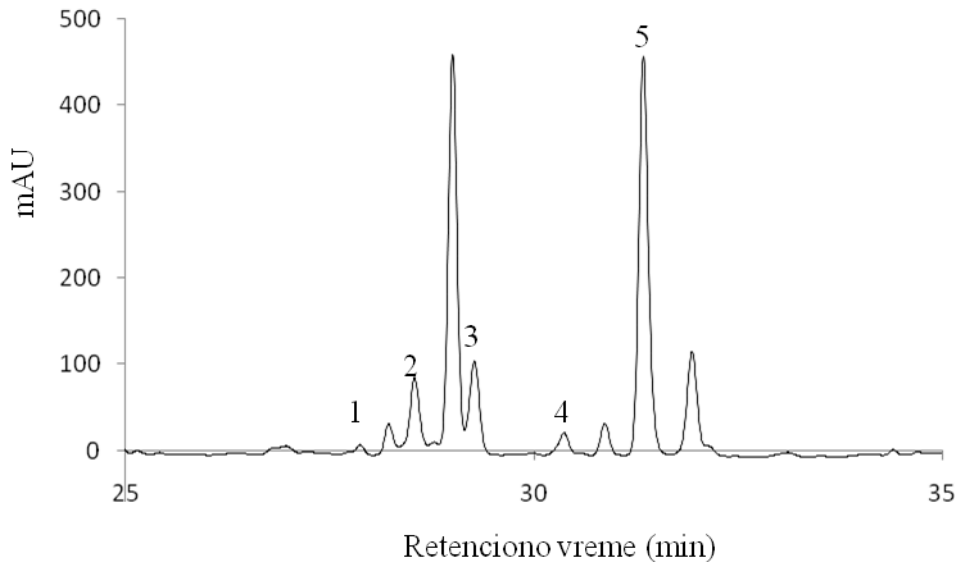
Slika P9: HPLC hromatogram ekstrakta lista crvene ribizle (*Ribes rubrum* L.), snimljen fluorescentnim detektorom na 275/322 nm ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$): **1**(+)-katehin; **2** proantocijanin B2



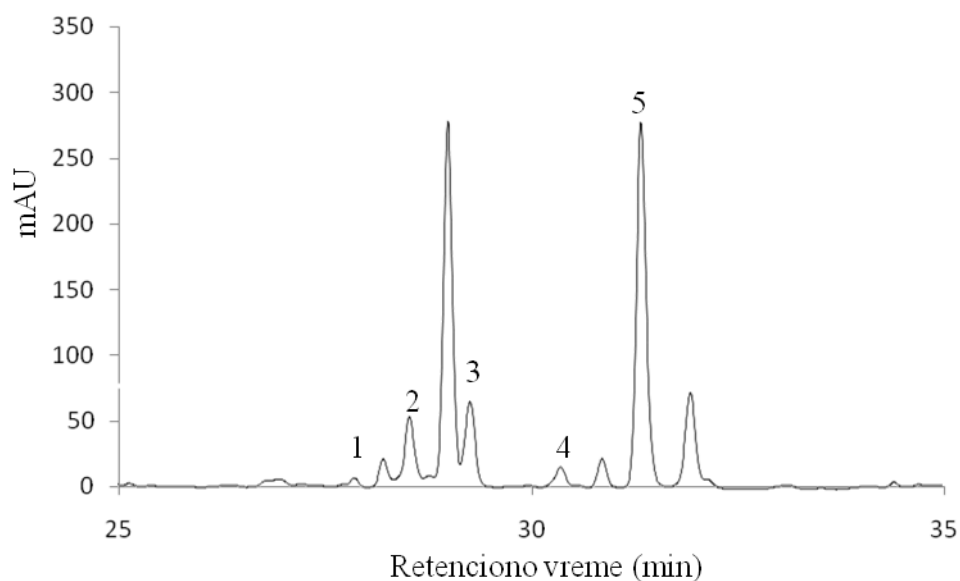
Slika P10: HPLC hromatogram ekstrakta lista divlje kupine (*Rubus fruticosus* L.), snimljen na 320 nm: **1** hlorogena kiselina; **2** ferulna kiselina



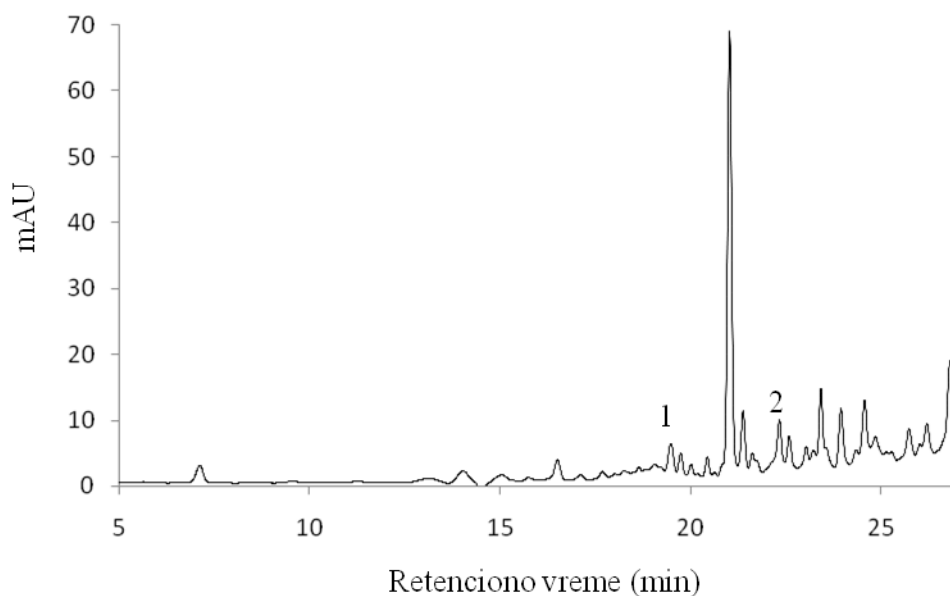
Slika P11: HPLC hromatogram ekstrakta lista domaće kupine (*Rubus fruticosus L.*), snimljen na 320 nm: **1** hlorogena kiselina; **2** ferulna kiselina



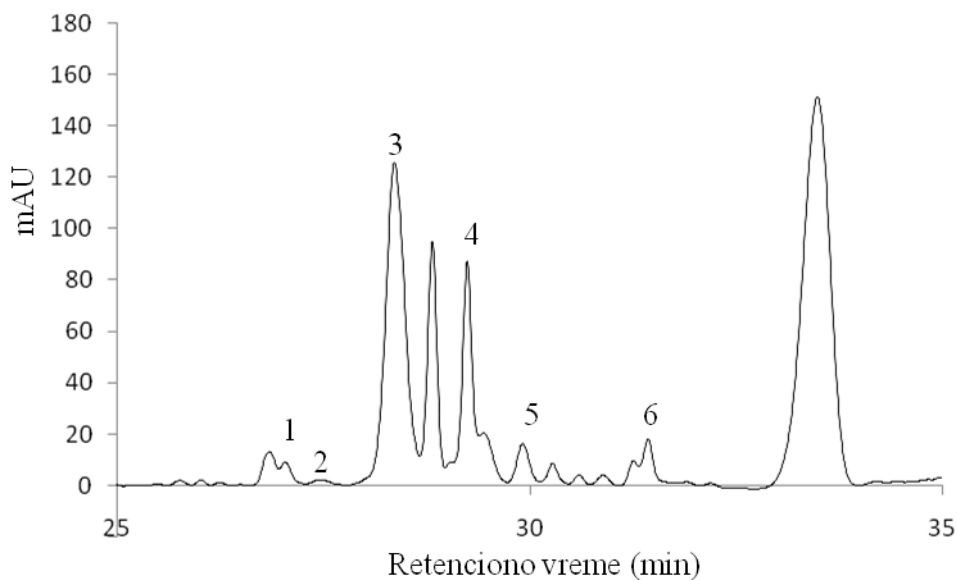
Slika P12: HPLC hromatogram ekstrakta lista divlje kupine (*Rubus fruticosus L.*), snimljen na 360 nm: **1** kvercetin-3-glukozid; **2** rutin; **3** miricetin; **4** kvercetin; **5** kemferol-3-glukozid



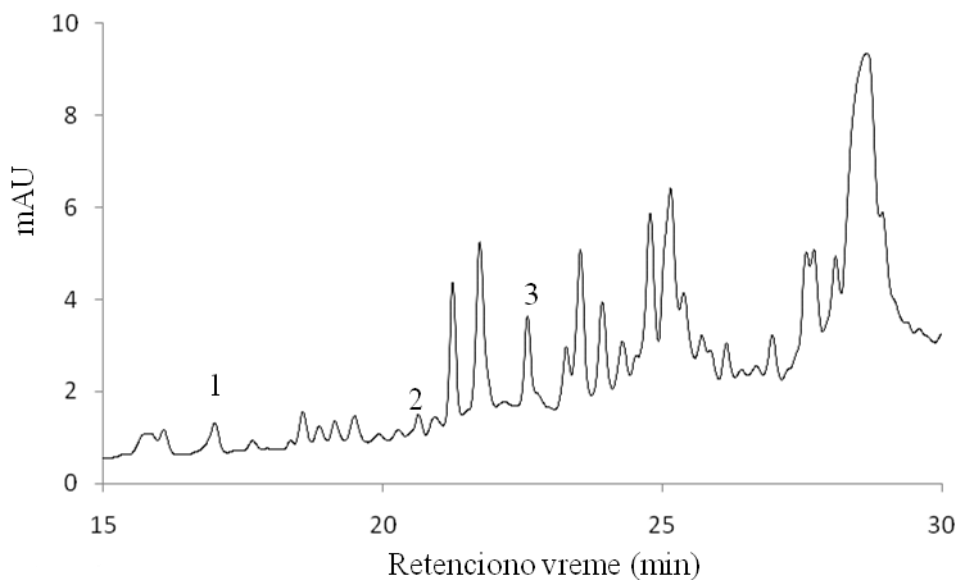
Slika P13: HPLC hromatogram ekstrakta lista domaće kupine (*Rubus fruticosus L.*), snimljen na 360 nm: **1** kvercetin-3-glukozid; **2** rutin; **3** miricetin; **4** kvercetin; **5** kemferol-3-glukozid



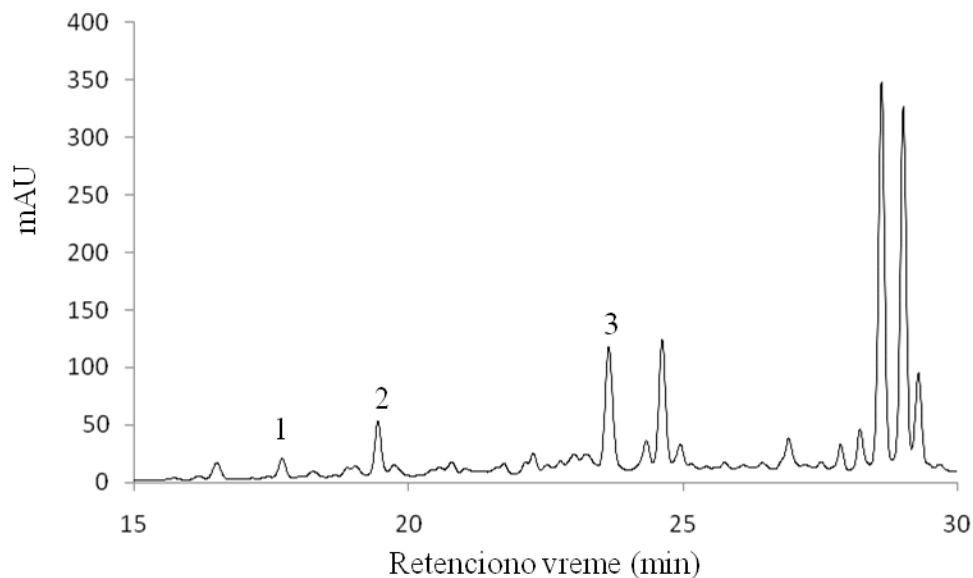
Slika P14: HPLC hromatogram ekstrakta lista gloga (*Crataegus oxyacantha L.*), snimljen na 320 nm: **1** hlorogena kiselina; **2** p-kumarinska kiselina



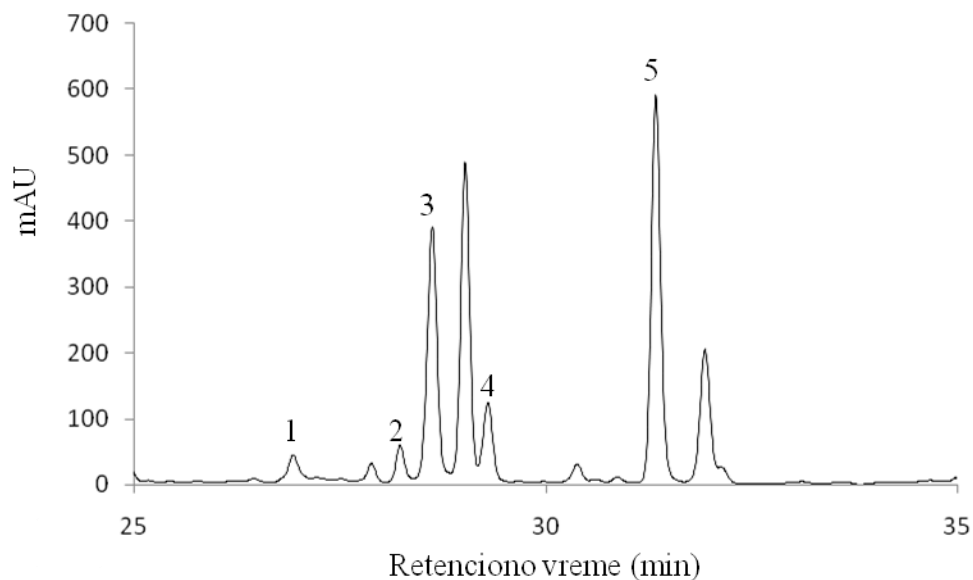
Slika P15: HPLC hromatogram ekstrakta lista gloga (*Crataegus oxyacantha L.*), snimljen na 360 nm: **1** kvercetin-3-glalakozid; **2** kvercetin-3-glukozyd; **3** rutin; **4** miricetin; **5** kvercetin; **6** kemferol-3-glukozyd



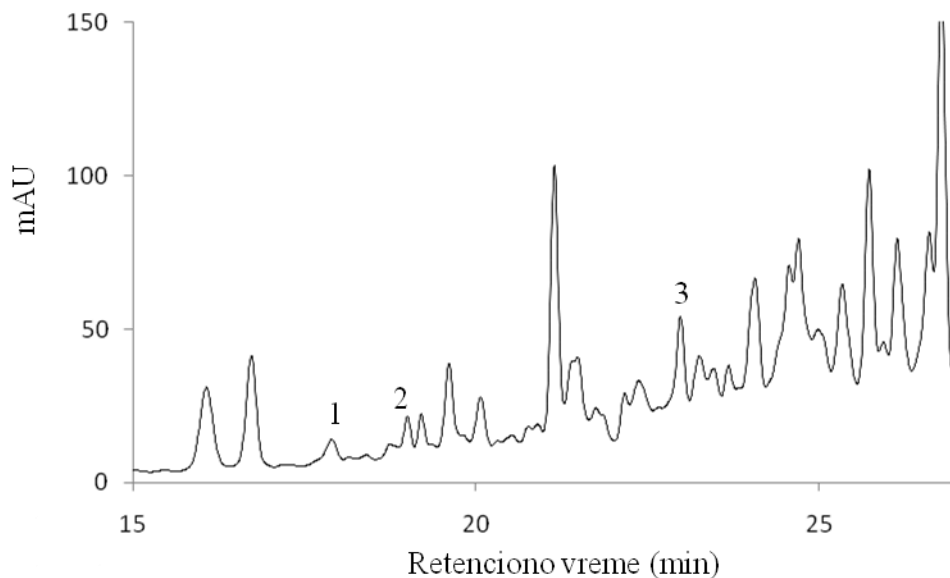
Slika P16: HPLC hromatogram ekstrakta lista gloga (*Crataegus oxyacantha L.*), snimljen fluorescentnim detektorom na 275/322 nm ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$): **1**(+)-katehin; **2** proantocijanin B2; **3** (-)-epikatehin



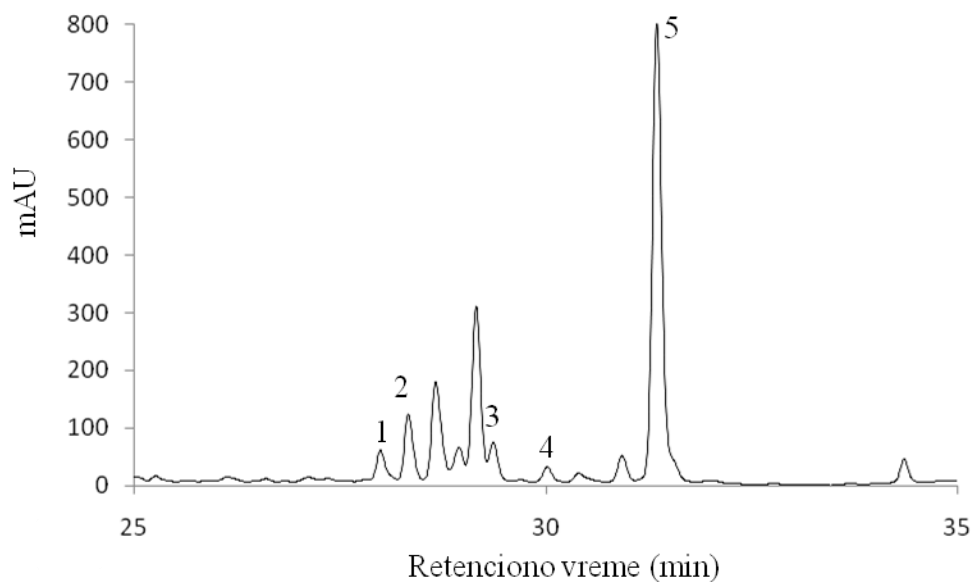
Slika P17: HPLC hromatogram ekstrakta lista maline (*Rubus idaeus L.*), snimljen na 320 nm: **1** kafena kiselina; **2** hlorogena kiselina; **3** ferulna kiselina



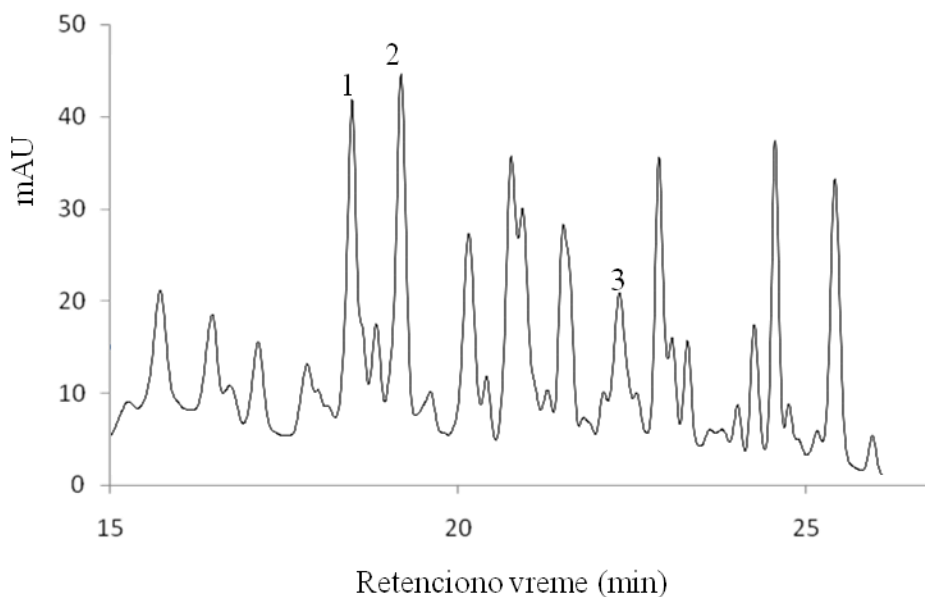
Slika P18: HPLC hromatogram ekstrakta lista maline (*Rubus idaeus L.*), snimljen na 360 nm: **1** kvercetin-3-galalakozid; **2** kvercetin-3-glukozid; **3** rutin; **4** miricetin; **5** kemferol-3-glukozid



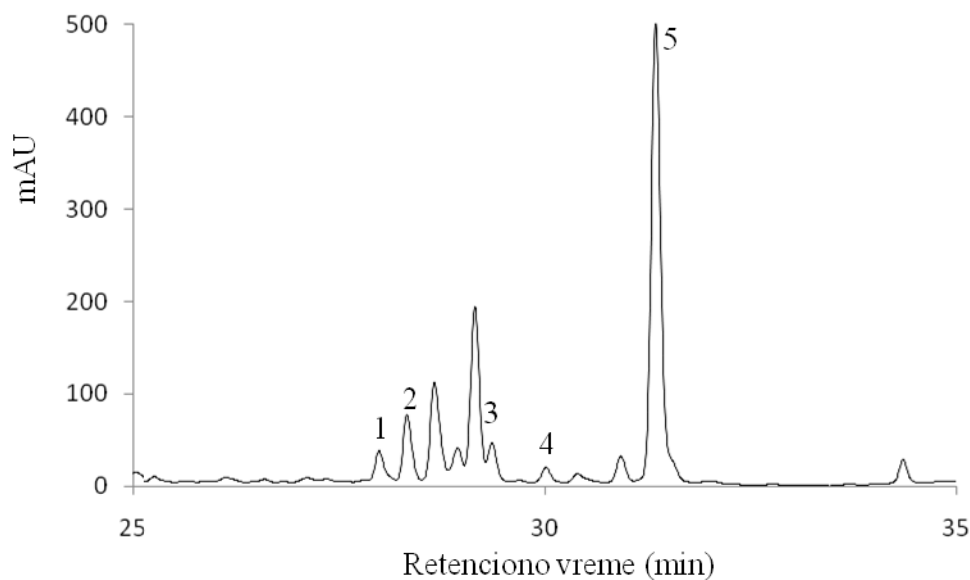
Slika P19: HPLC hromatogram ekstrakta lista šipurka (*Rosa canina L.*), snimljen na 320 nm: **1** kafena kiselina; **2** hlorogena kiselina; **3** p-kumarinska kiselina



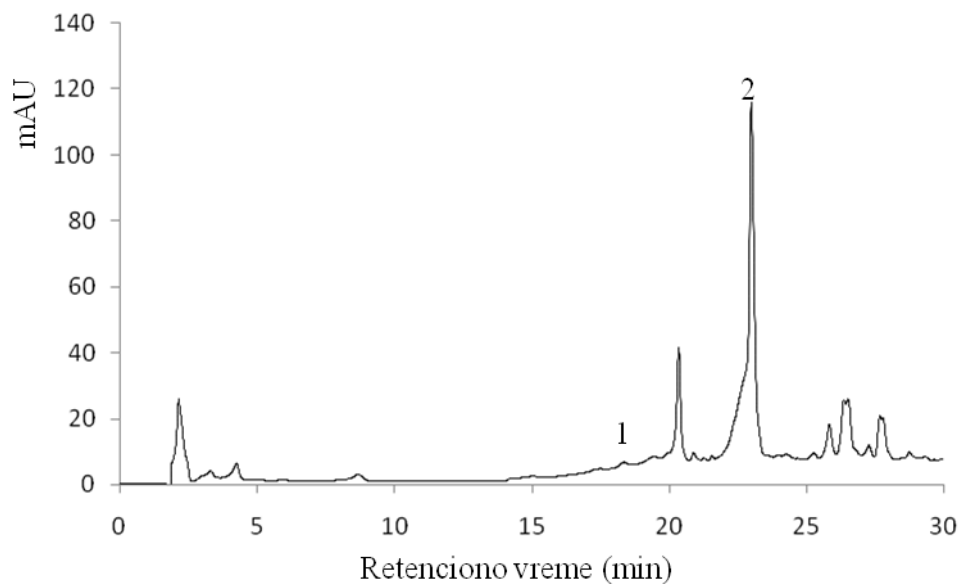
Slika P20: HPLC hromatogram ekstrakta lista šipurka (*Rosa canina L.*), snimljen na 360 nm: **1** kvercetin-3-glukozid; **2** rutin; **3** miricetin; **4** kvercetin; **5** kemferol-3-glukozid



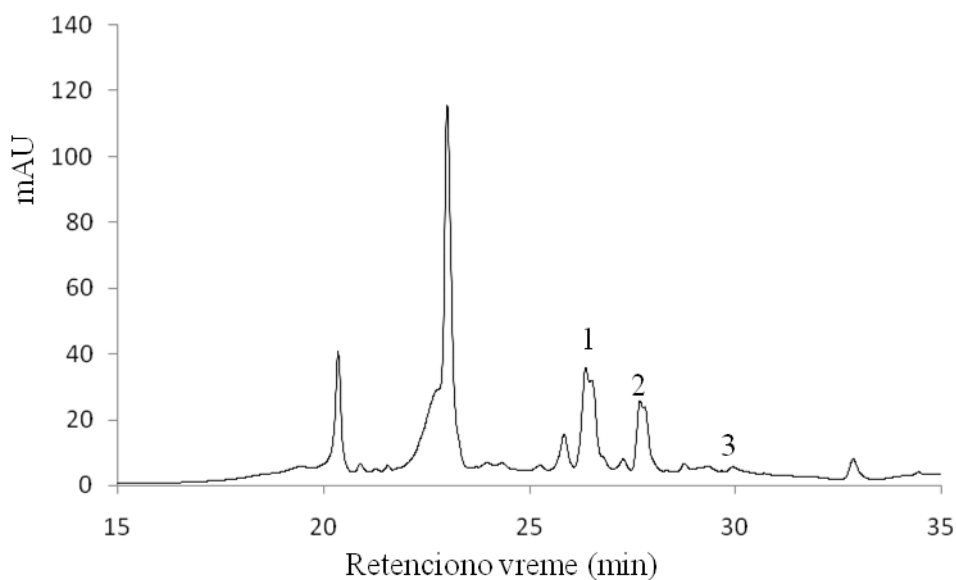
Slika P21: HPLC hromatogram ekstrakta lista trnjine (*Prunus spinosa L.*), snimljen na 320 nm: **1** kafena kiselina; **2** hlorogena kiselina; **3** p-kumarinska kiselina



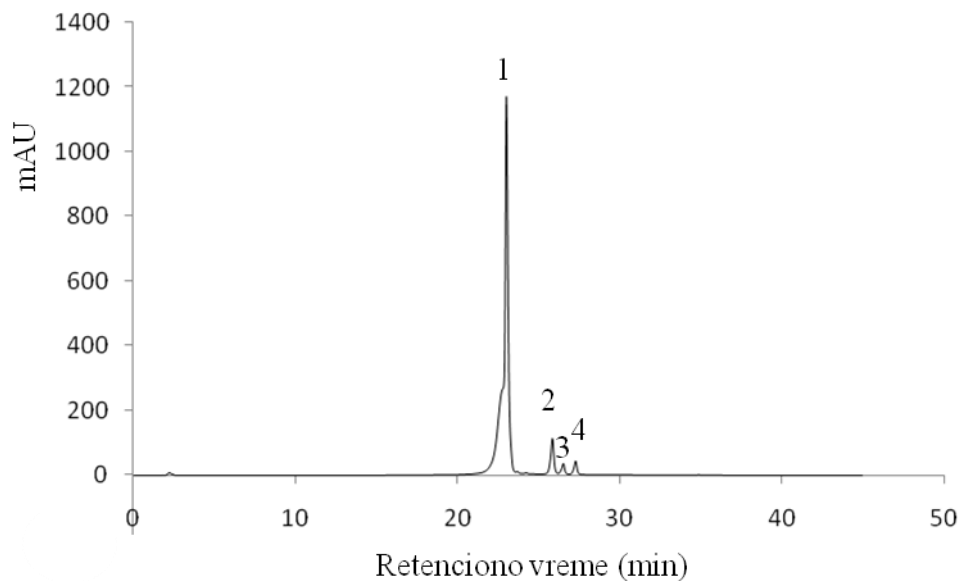
Slika P22: HPLC hromatogram ekstrakta lista trnjine (*Prunus spinosa L.*), snimljen na 360 nm: **1** kvercetin-3-glukozid; **2** rutin; **3** miricetin; **4** kvercetin; **5** kemferol-3-glukozid



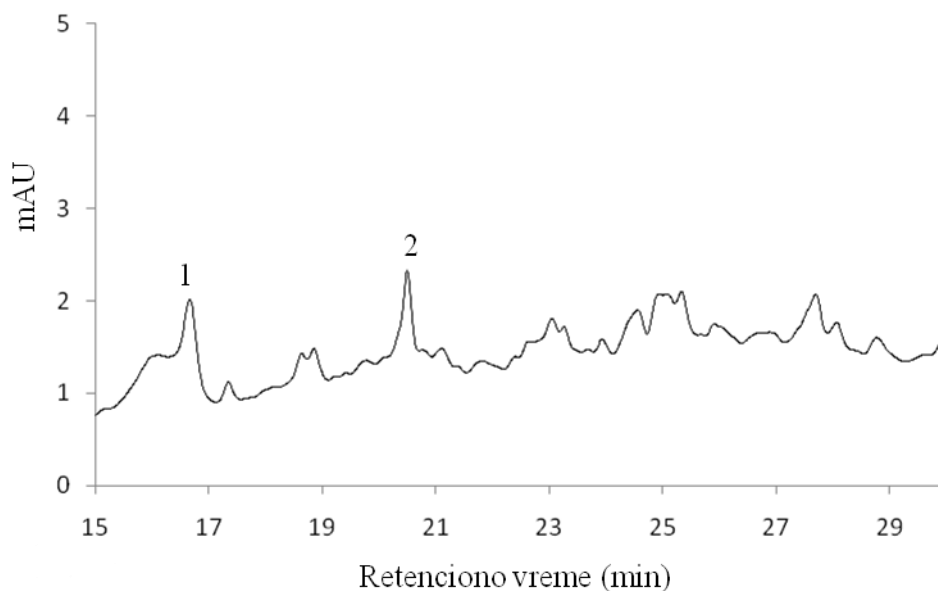
Slika P23: HPLC hromatogram ekstrakta divlje kupine (*Rubus fruticosus L.*), snimljen na 320 nm: **1** kafena; **2** p-kumarna kiselina



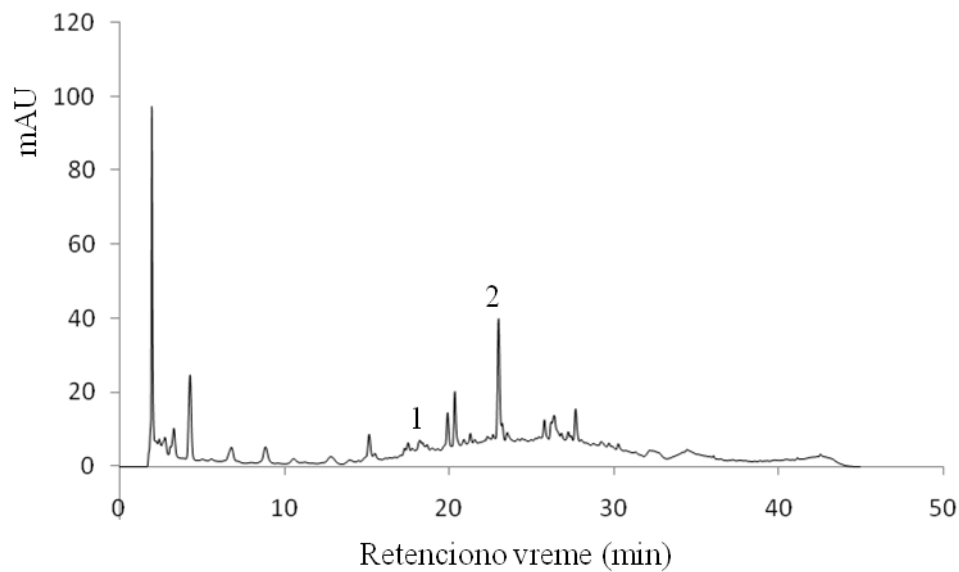
Slika P24: HPLC hromatogram ekstrakta divlje kupine (*Rubus fruticosus L.*), snimljen na 360 nm: **1** elaginska kiselina; **2** kvercetin-3-glukozid; **3** kvercetin



Slika P25: HPLC hromatogram ekstrakta divlje kupine (*Rubus fruticosus L.*), snimljen na 520 nm: **1** delfinidin-3-glukozid, **2** cijanidin-3-rutinozid, **3** cijanidin-3-arabinozid, **4** cijanidin-3-(6-o-malonil) glukozid

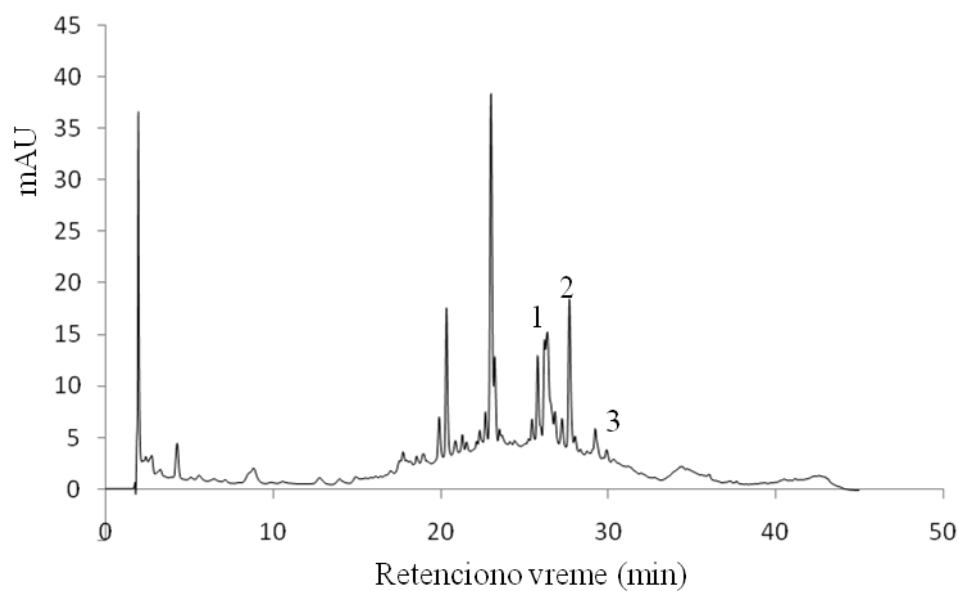


Slika P26: HPLC hromatogram ekstrakta divlje kupine (*Rubus fruticosus*), snimljen fluorescentnim detektorom na 275/322 nm ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$): **1** (+)-katehin; **2** proantocijanin B2



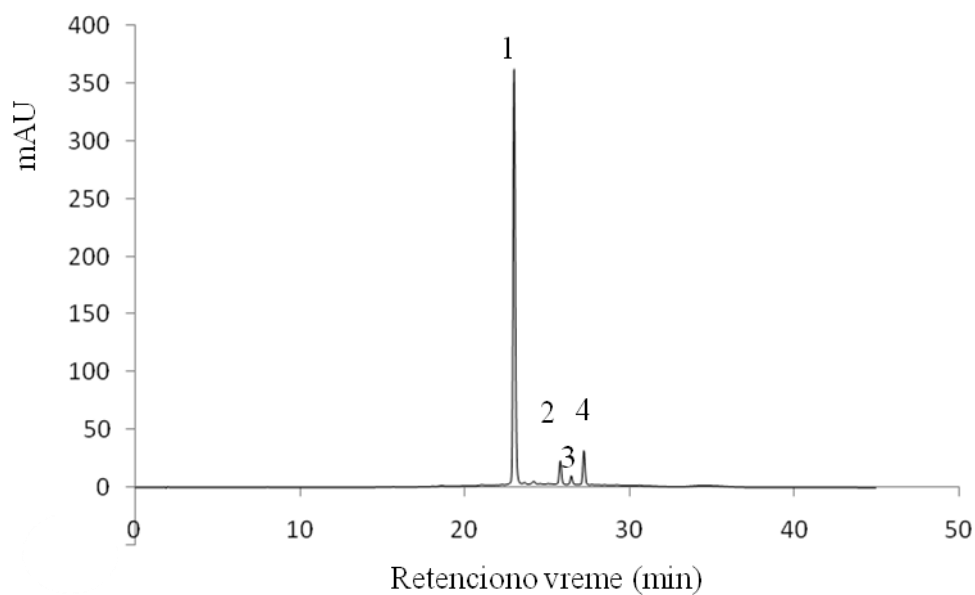
Slika P27: HPLC hromatogram ekstrakta kupine (*Rubus fruticosus L.*), snimljen na 320 nm:

1 kafena; **2** p-kumarna kiselina



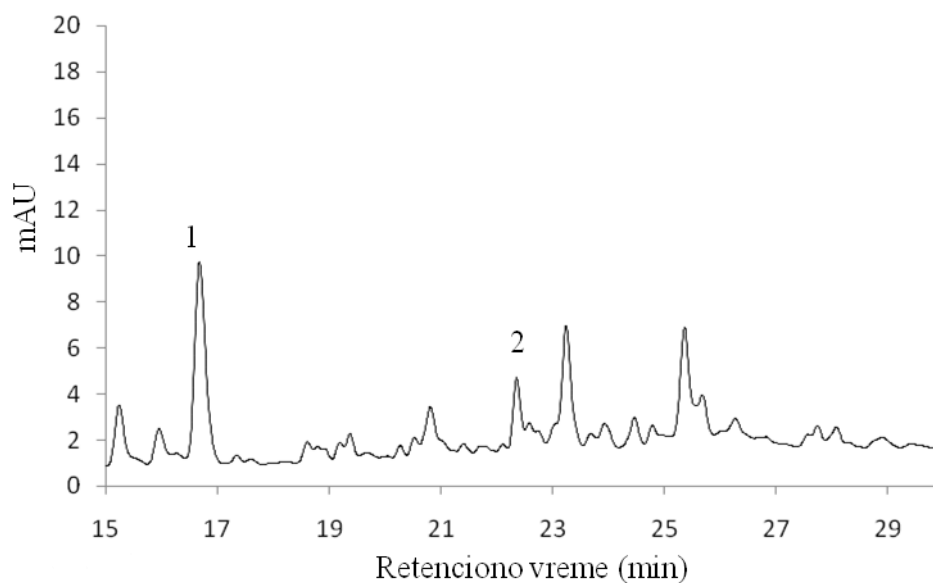
Slika P28: HPLC hromatogram ekstrakta kupine (*Rubus fruticosus L.*), snimljen na 360 nm:

1 elaginska kiselina; **2** kvercetin-3-glukozid; **3** kvercetin

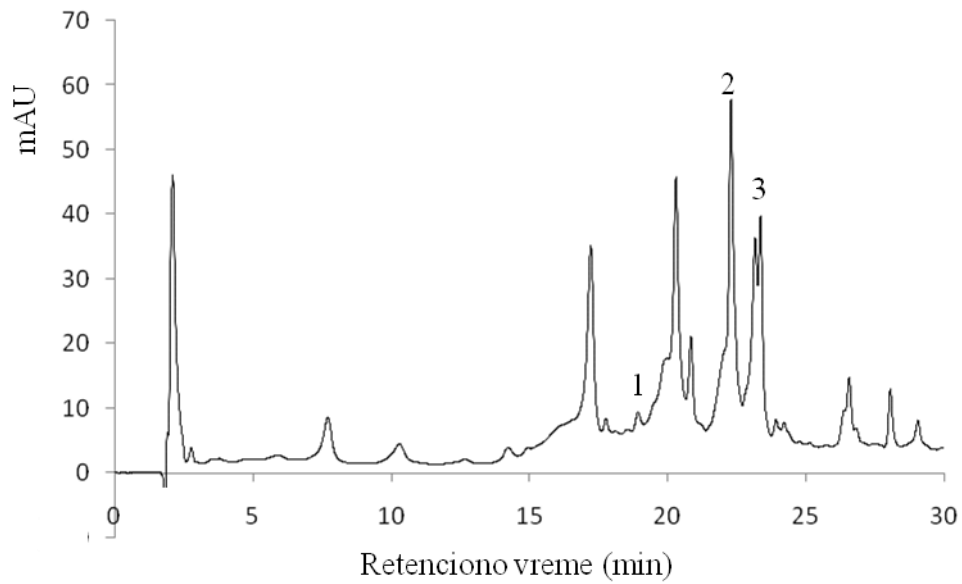


Slika P29: HPLC hromatogram ekstrakta kupine (*Rubus fruticosus L.*), snimljen na 520 nm:

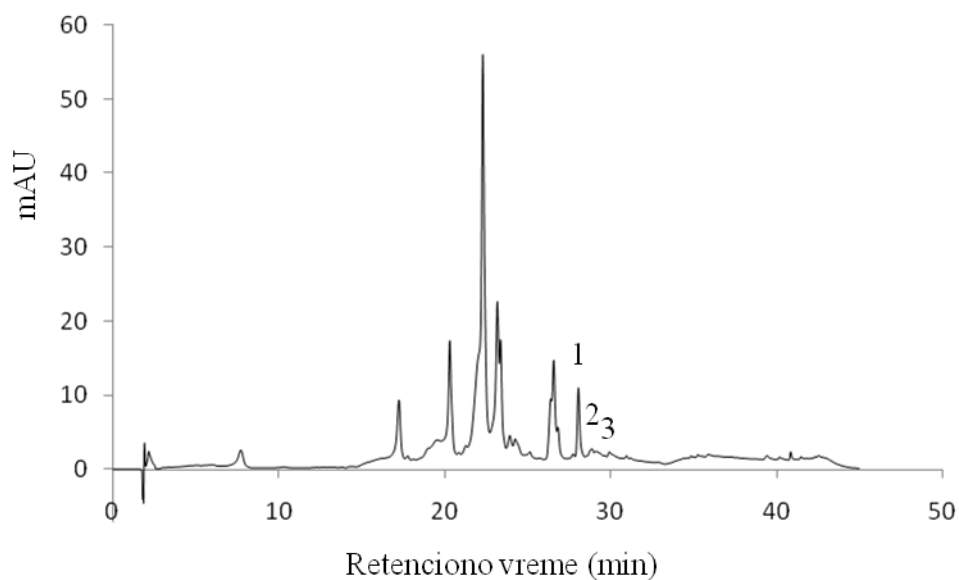
1 delfinidin-3-glukozid, **2** cijanidin-3-rutinozid, **3** cijanidin-3-arabinozid,
4 cijanidin-3-(6-o-malonil) glukozid



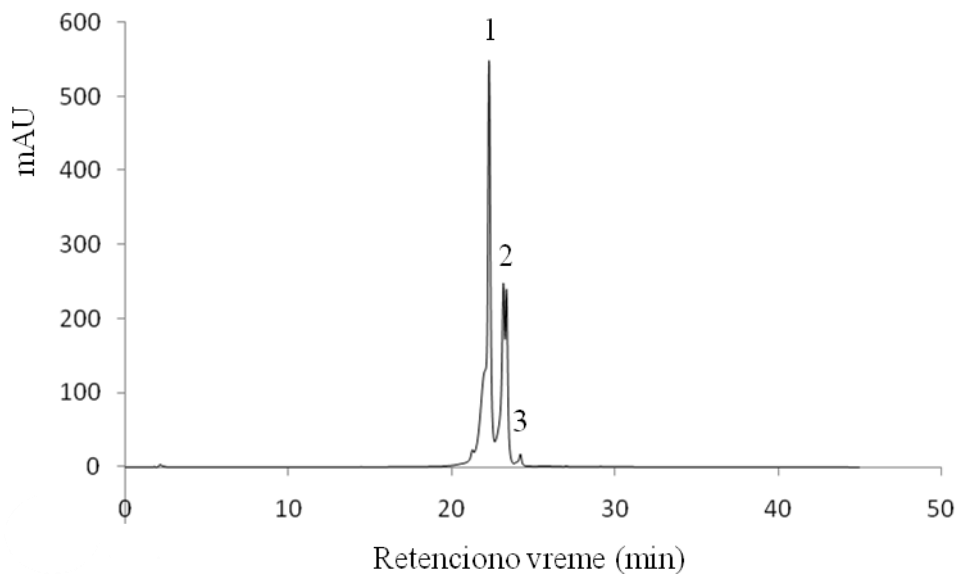
Slika P29: HPLC hromatogram ekstrakta kupine (*Rubus fruticosus L.*), snimljen fluorescentnim detektorom na 275/322 nm ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$): **1** (+)-katehin; **2** (-)-epikatehin



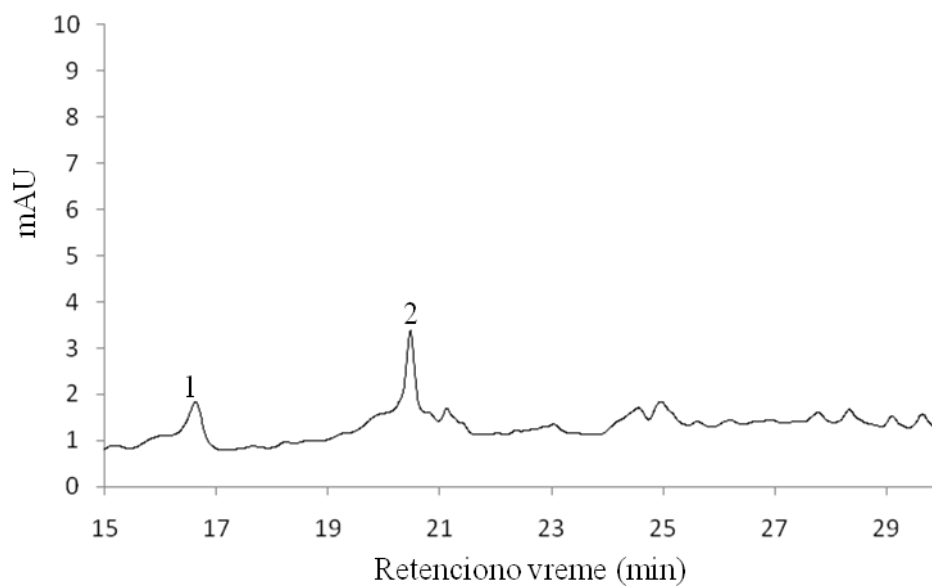
Slika P31: HPLC hromatogram ekstrakta drena (*Cornus mas L.*), snimljen na 320 nm:
1 kafena; 2 p-kumarna kiselina; 3 ferulna kiselina



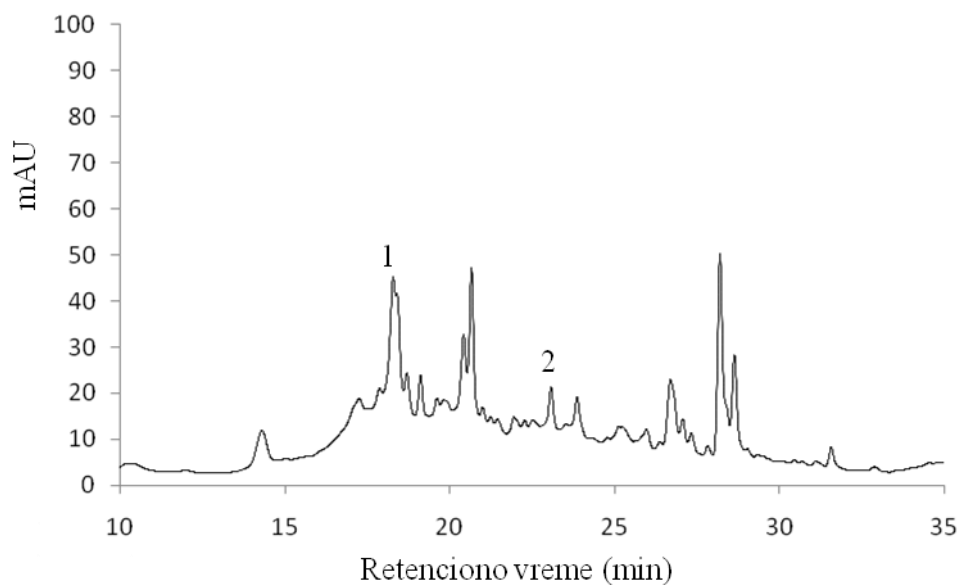
Slika P32: HPLC hromatogram ekstrakta drena (*Cornus mas L.*), snimljen na 360 nm:
1 kvercetin-3-glukozid; 2 rutin; 3 kvercetin



Slika P33: HPLC hromatogram ekstrakta drenea (*Cornus mas L.*), snimljen na 520 nm:
1 delfinidin-3-galaktozid, 2 delfinidin-3-glukozyd, 3 cijanidin-3-soforozid

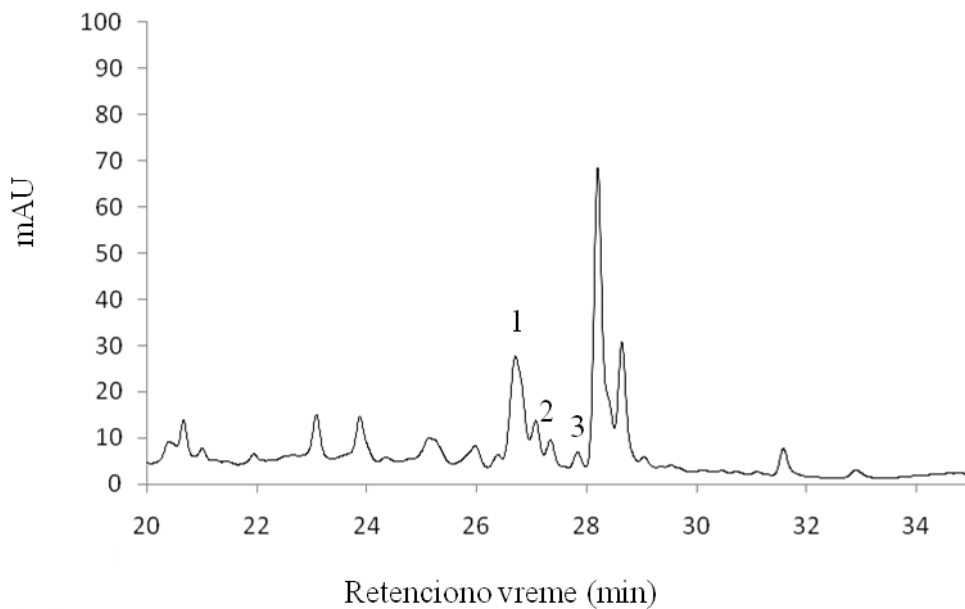


Slika P34: HPLC hromatogram ekstrakta drenea (*Cornus mas L.*), snimljen fluorescentnim detektorom na 275/322 nm ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$): 1 (+)-katehin; 2 proantocijanidin B2



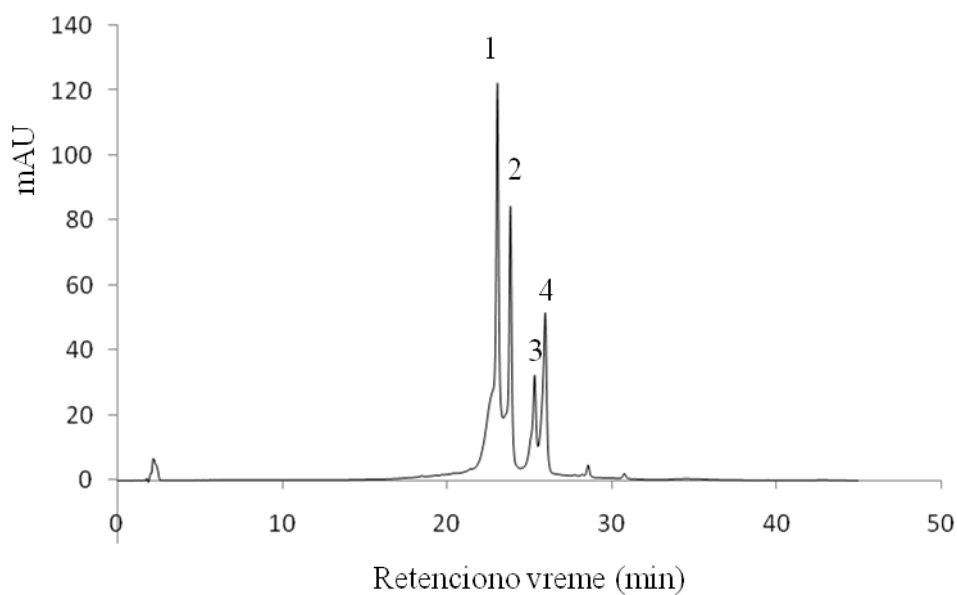
Slika P35: HPLC hromatogram ekstrakta trnjine (*Prunus spinosa L.*) snimljen na 320 nm:

1 kafena; **2** p-kumarna kiselina

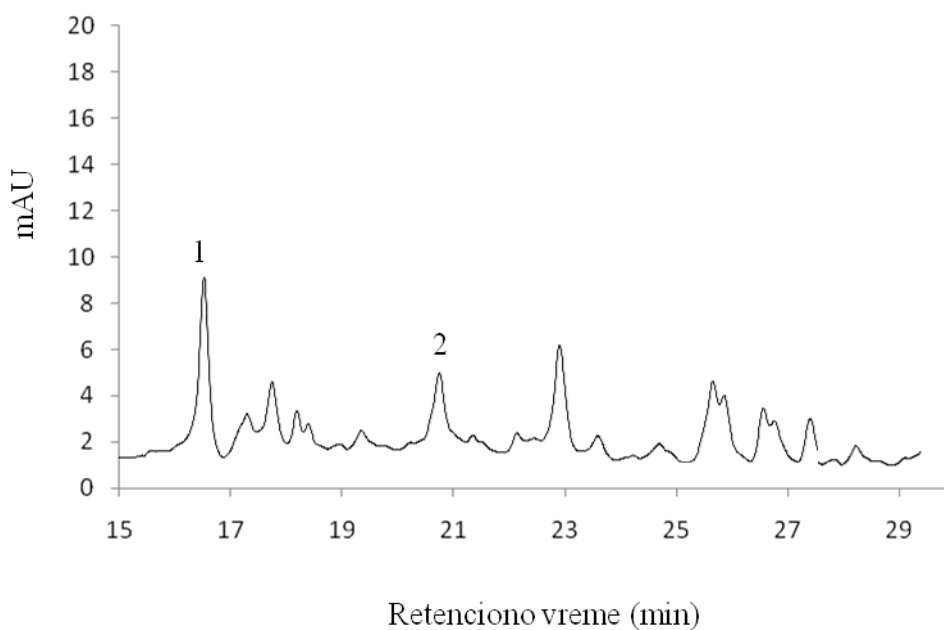


Slika P36: HPLC hromatogram ekstrakta trnjine (*Prunus spinosa L.*), snimljen na 360 nm:

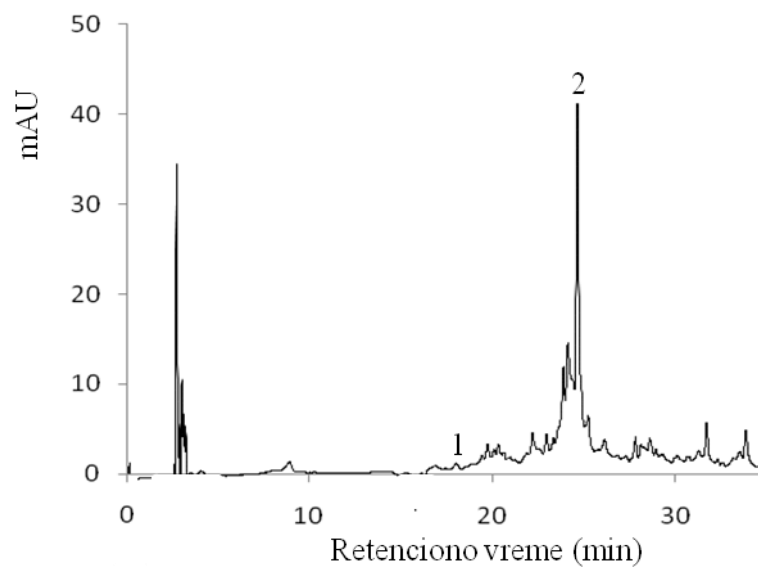
1 kvercetin-3-galaktozid; **2** kvercetin-3-glukozid; **3** rutin



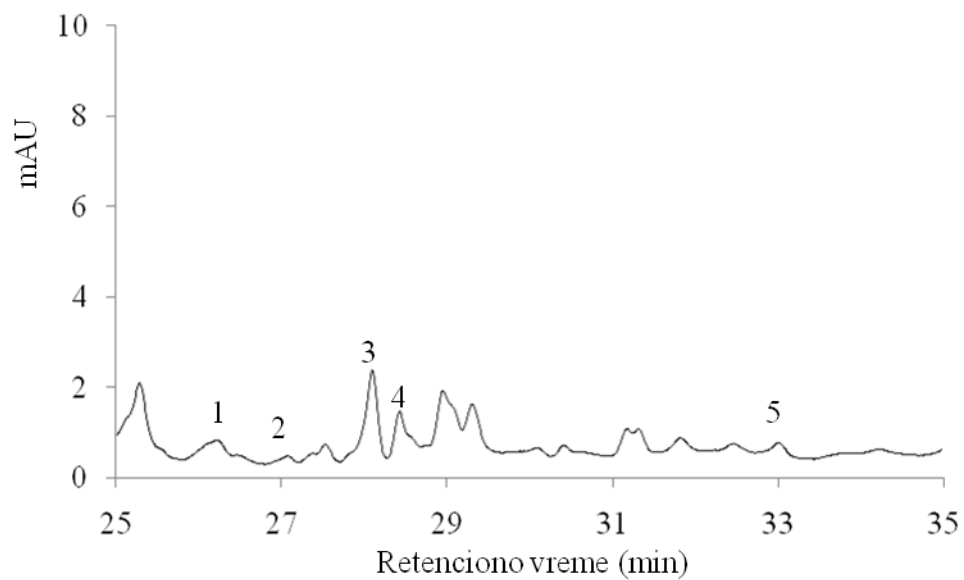
Slika P37: HPLC hromatogram ekstrakta trnjine (*Prunus spinosa L.*), snimljen na 520 nm:
1 delphinidin-3-glikozid, **2** cijanidin -3-soforizid, **3** peonidin-3-glukozid,
4 peonidin-3-rutinozid



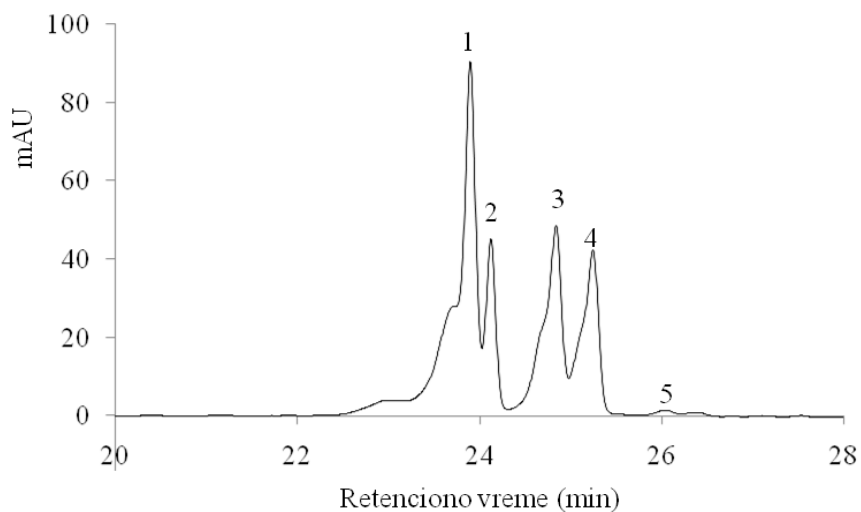
Slika P38: HPLC hromatogram ekstrakta trnjine (*Prunus spinosa L.*), snimljen fluorescentnim detektorom na 275/322 nm ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$): **1** (+)-katehin; **2** proantocijanidin B2



Slika P39: HPLC hromatogram ekstrakta maline (*Rubus idaeus L.*), snimljen na 320 nm:
1 kafena; 2 ferulna kiselina



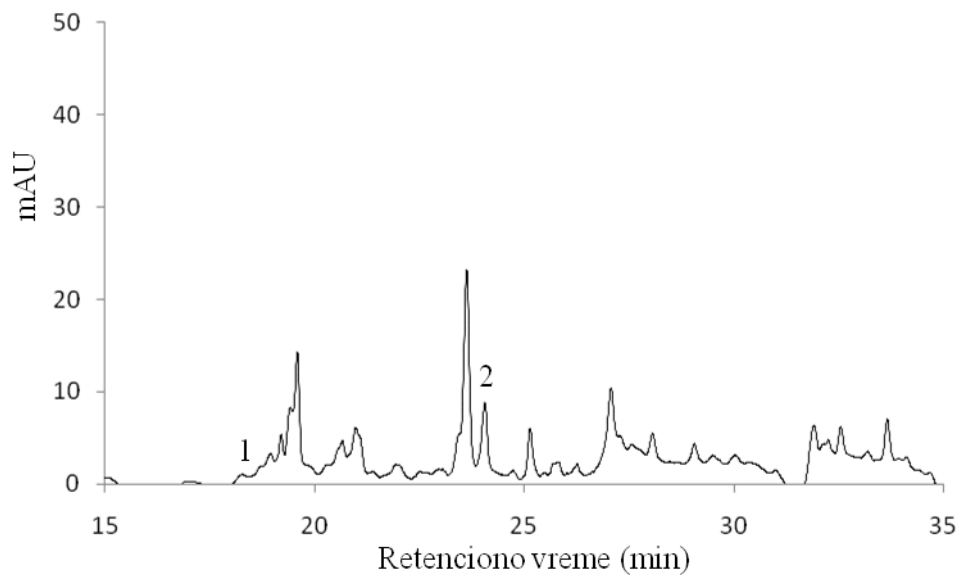
Slika P40: HPLC hromatogram ekstrakta maline (*Rubus idaeus L.*), snimljen na 360 nm: 1 galinska kiselina; 2 kvercetin-3-galaktozid; 3 kvercetin-3-glukozid; 4 rutin; 5 kemferol-3-glukozid



Slika P41: HPLC hromatogram ekstrakta maline (*Rubus idaeus L.*), snimljen na 520 nm

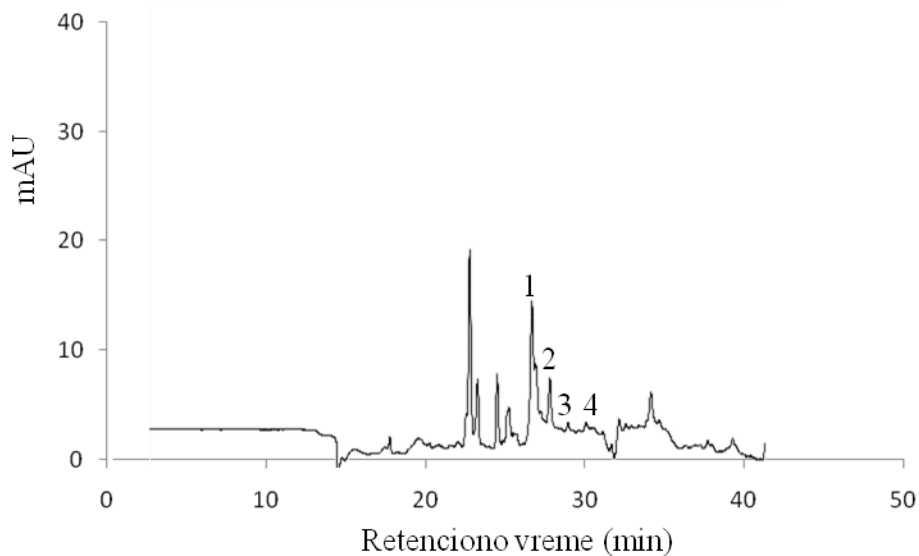
1 cijanidin-3-soforozid; **2** cijanidin -3-glukorutinozid; **3** cijanidin -3-glukozyd;

4 cijanidin -3-rutinozid; **5** pelargonidin-3- soforozid

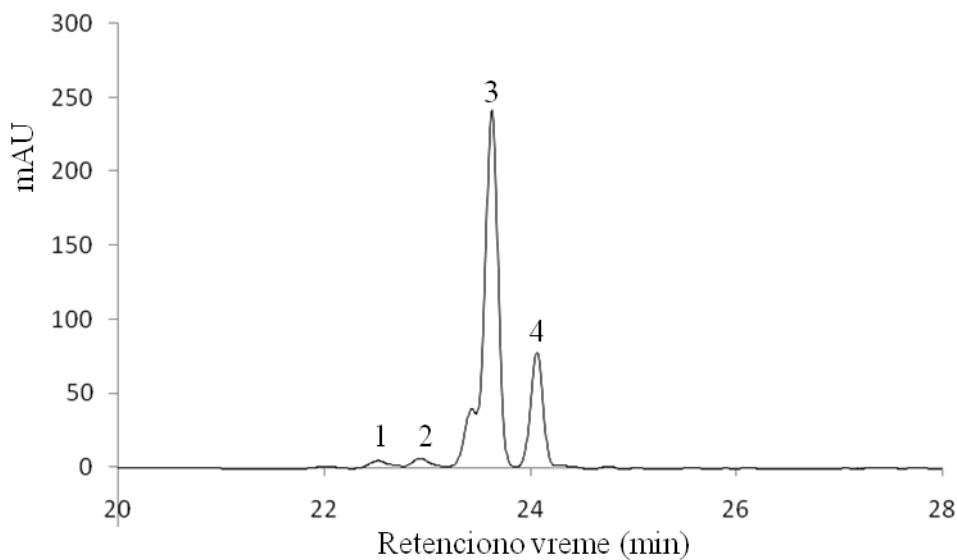


Slika P42: HPLC hromatogram ekstrakta crvene ribizle (*Ribes rubrum L.*), snimljen na 320

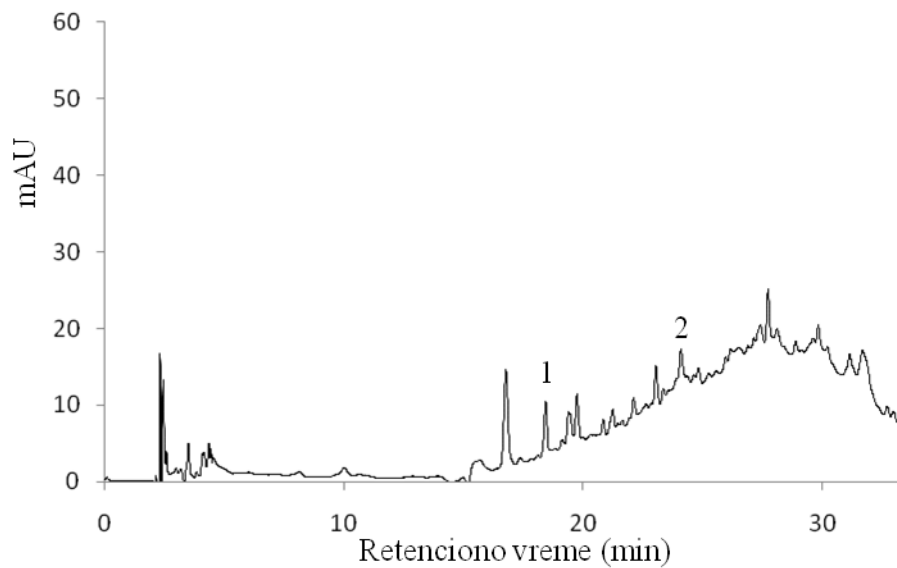
nm: **1** kafena; **2** ferulna kiselina



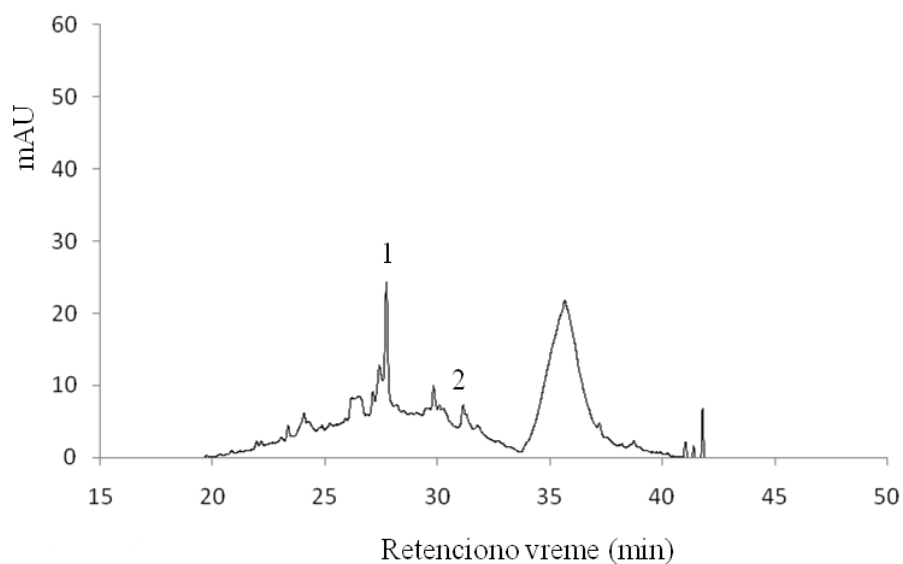
Slika P43: HPLC hromatogram ekstrakta crvene ribizle (*Ribes rubrum L.*), snimljen na 360 nm: **1** kvercetin-3-galaktozid; **2** kvercetin-3-glukozid; **3** rutin; **4** kemferol-3-glukozid



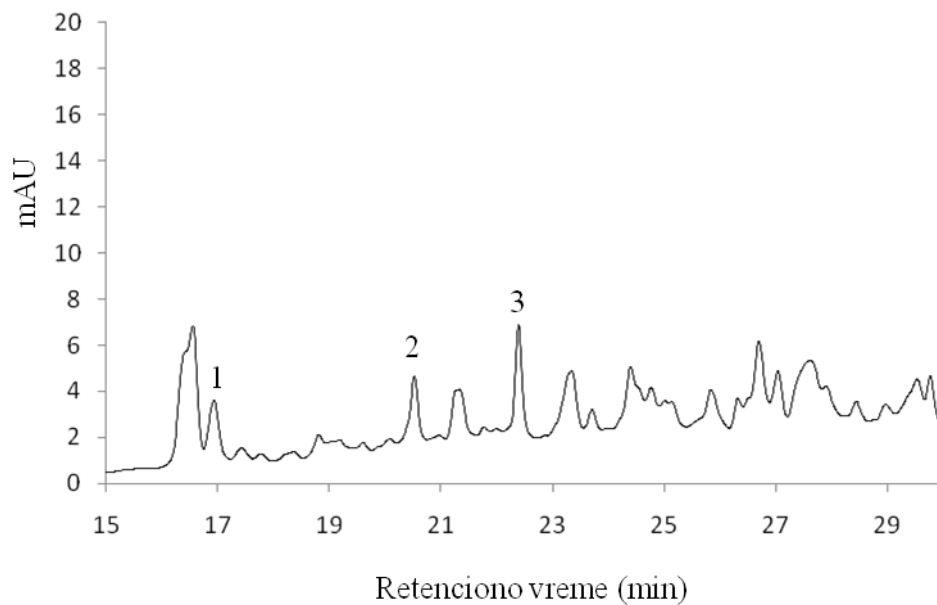
Slika P44: HPLC hromatogram ekstrakta crvene ribizle (*Ribes rubrum L.*), snimljen na 520 nm: **1** delphinidin-3-galaktozid; **2** delphinidin-3-glukozid; **3** cijanidin-3-soforozid; **4** cijanidni-3-glukorutinozid



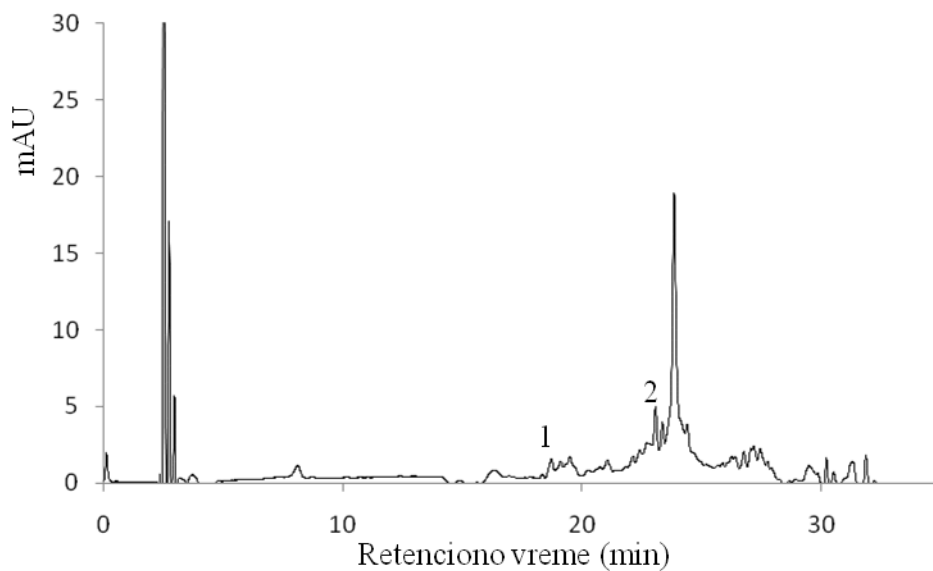
Slika P45: HPLC hromatogram ekstrakta šipurka (*Rosa canina L.*), snimljen na 320 nm: **1** kafena; **2** ferulna kiselina



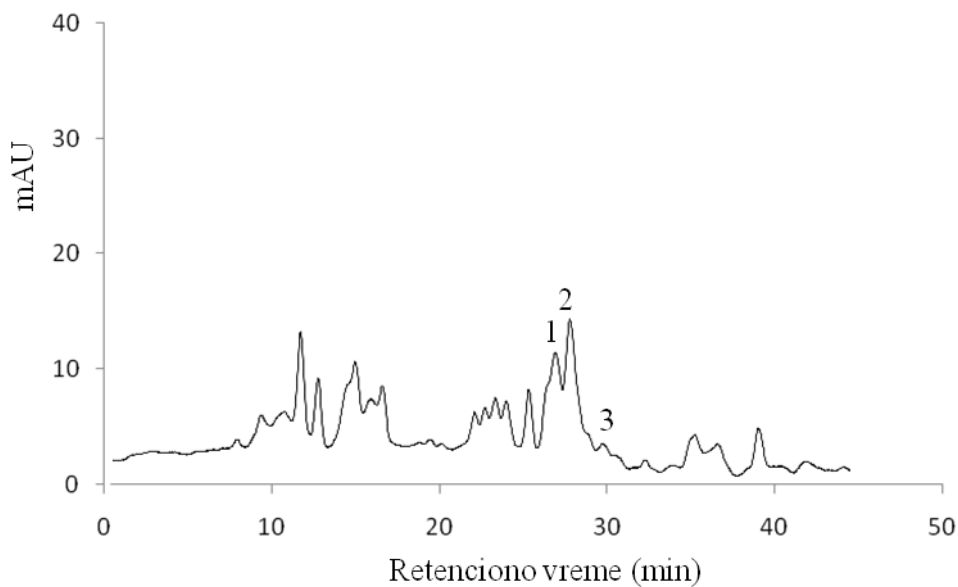
Slika P46: HPLC hromatogram ekstrakta šipurka (*Rosa canina L.*), snimljen na 360 nm: **1** kvercetin-3-glukozid; **2** kemferol-3-glukozid



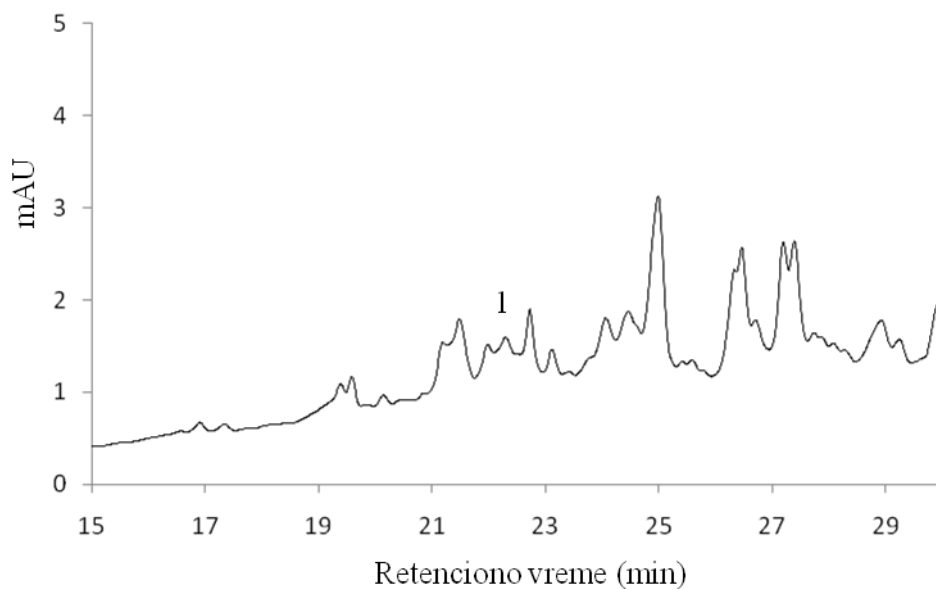
Slika P47: HPLC hromatogram ekstrakta šipurka (*Rosa canina L.*) snimljen fluorescentnim detektorom na 275/322 nm ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$): **1** (+)-katehin; **2** proantocijanidin B2; **3** (-)-epikatehin



Slika P48: HPLC hromatogram ekstrakta gloga (*Crataegus oxyacantha L.*), snimljen na 320 nm: **1** kafena; **2** p-kumarna kiselina



Slika P49: HPLC hromatogram ekstrakta gloga (*Crataegus oxyacantha L.*), snimljen na 360 nm: **1** kvercetin-3-glukozid; **2** rutin; **3** kvercetin



Slika P50: HPLC hromatogram ekstrakta gloga (*Crataegus oxyacantha L.*), snimljen fluorescentnim detektorom na 275/322 nm ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$): **1** (-)-epikatehin

10. BIOGRAFIJA

Ana Milenković Anđelković rođena je 16 jula 1978. godine u Leskovcu. Završila je osnovnu školu „Radovan Kovačević-Maksim” i gimnaziju „Stojan Ljubić” u Lebanu sa odličnim uspehom. Diplomске akademske studije na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu, Univerziteta u Nišu, završila je 2005. godine i odbranom diplomskog rada pod nazivom „Praćenje produkcije antibiotika pomoću bakterije *Streptomyces hygrosopicus*“, stekla zvanje diplomirani inženjer tehnologije - hemijskog i biohemijskog inženjerstva.

Specijalističke akademske studije na Departmanu za hemiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu upisala je 2007/08. godine. Specijalistički rad na temu „Monitoring fizičko- hemijskih karakteristika vode po dubinama vodozahvata jezera Čelije“, odbranila je 2009. godine i stekla zvanje diplomirani hemičar - specijalista.

Doktorske studije upisala je 2010/11. godine na Departmanu za hemiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, Univerziteta u Nišu. Položila je sve ispite predviđene studijskim programom za doktorske studije.

Bila je angažovana 2008. i 2009. godine kao pripravnik volonter u laboratoriji za analizu pitke vode u fabrici vode u Majdevu.

Od 2011. godine radi u OŠ „Radovan Kovačević-Maksim” kao nastavnik predmetne nastave.

11. BIBLIOGRAFIJA

Рад у врхунском међународном часопису са SCI листе (M₂₁):

1. M. Anđelković, B. Radovanović, **A. Milenković Anđelković**, V Radovanović, Phenolic Compounds and Bioactivity of Healthy and Infected Grapevine Leaf Extracts from Red Varieties Merlot and Vranac (*Vitis vinifera* L). *Plant Foods for Human Nutrition* 70 (3): 317-323 (2015).

Рад у међународном часопису са SCI листе (M₂₃):

2. I. M. Savić, I. M. Savić Gajić, V. D. Nikolić, B. C. Radovanović, **A. S. Milenković Anđelković**, Enhancemnet of solubility and photostability of rutin by complexation with β -cyclodextrin and (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin, *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 86 (1): 33 – 43 (2016).
3. **A. S. Milenkovic Anđelković**, M. Z. Anđelković, A. N. Radovanović, B. C. Radovanović, V. Randjelović, Phenol composition, radical scavenging activity and antimicrobial activity of berry leaf extracts, *Bulgarian Chemical Communications*, 48 (1): 27– 32 (2016).
4. **A. S. Milenković Anđelković**, M. Z. Anđelković, A. N. Radovanović, B. C. Radovanović, V. Nikolić, Phenol composition, DPPH radical scavenging and antimicrobial activity of cornelian cherry (*Cornus mas*) fruit and leaf extracts. *Hemijska industrija* 69 (4): 331–337 (2015).
5. M. Z. Anđelkovic, **A. S. Milenkovic Anđelkovic**, B. C. Radovanovic, A. N. Radovanovic, Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenols From Seeds of Grape Pomace. *Acta Chimica. Slovenica*. 61: 858–865 (2014).
6. B. C. Radovanović, **A. S. Milenković Anđelković**, A. B. Radovanović, M. Z. Anđelković, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Polyphenol Extracts from Wild Berry Fruits grown in Southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 12 (5): 813-819 (2013).

7. M. Andjelkovic, B. Radovanovic, A. Radovanovic, **A. Milenković Andjelković**, Changes in Polyphenolic Content and Antioxidant Activity of Grapes cv Vranac During Ripening. *South African Journal of Enology and Viticulture* 34(2): 147-155 (2013).
8. N. T. Manojlović, P. Vasiljević, S. Najman, S. Janković, M. Jusković, **A. Milenković Anđelković**, HPLC analysis and cytotoxic potential from the lichen, *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis*". *Journal of Medicinal Plants Research* 4 (9): 817-823 (2010).

Рад саопштен на скуповима међународног значаја штампан у целини (M33):

9. **A. Milenković Anđelković**, G. Bogdanović Dušanović, N. Manojlović, Monitoring vertical distribution of physico-chemical parameters of water and its impact on phytoplankton in the lake Čelije, *XV Savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem*, Zbornik radova: 969-974 (2010), Čačak (ISBN 978-86-87611-13-9).
10. D. Nikolić, **A. Milenković Anđelković**, Determination of physico-chemical parameters and total microorganism in depth Vlasina Lake. 1st International scientific conference on economic and regional development "EUROBRAND", 292-298 (2010), Veliko Gradište - Srebrno jezero (ISBN 978-86-88065-05-4)
11. D. Nikolić, **A. Milenković Anđelković**, M. Anđelković, Preparation for cooling and freezing of food raw materials in the cold storage Poljoproduct, 1st International scientific conference on economic and regional development "EUROBRAND", 475-483, (2010), Veliko Gradište - Srebrno jezero (ISBN 978-86-88065-05-4).

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M34):

12. **A. Milenković Anđelković**, B. Radovanović, Optimization of extraction method of phenolic compounds and free radical scavenging potential of blackberry (*Rubus fruticosus*) fruit extract", Workshop "From Molecules to Functionalised Materials", 15 (2011) Skopje (Republic of Macedonia).

13. B. Radovanovic, **A. Milenković Andjelković**, A. Radovanovic, M. Andjelkovic, V. Randjelovic. Phenolic composition and antioxidant and antimicrobial activity of *Comus mas* Land *Rosa canina* L. berry fruit leaves grown in southeast Serbia. XXIII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, 8-11 October 2014, Metropol Lake Resort, Ohrid, Republic of Macedonia.
14. B. Radovanović, M. Andjelković, **A. Milenković Andjelković**, V. Radovanović, S. Dekić. Effect of ultrasound assisted extraction of the seed phenol content from Vranac (*Vitis Vinifera* L.) grape marc grown in southeast Serbia. XXIII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, 8-11 October 2014, Metropol Lake Resort, Ohrid, Republic of Macedonia.

Рад у научном часопису(M52):

15. **A. Milenkovic Andjelković**, B. Radovanovic, M. Andjelkovic, A. Radovanovic, V.Nikolić. The anthocyanin content and bioactivity of cornelian cherry (*Cornus mas*) and wild blackberry (*Rubus fruticosus*) fruit extracts from the vlasina region. *Advanced technologies* 4 (2): 26-31 (2015).
16. M. Andjelkovic, B. Radovanovic, **A. Milenkovic Andjelković**, V. Radovanović , A. Zarubica, N. Stojković, V.Nikolić. The determination of bioactive ingredients of grape pomace (vranac variety) for potential use in food and pharmaceutical industries. *Advanced technologies* (2): 32-36 (2015).

Рад у научном часопису(M53):

17. **A. Milenković Anđelković**, D. Nikolić, Reconstruction procedures and preparations cold store Nectar for strong food raw materials, International Journal of Technical-Technological and Biotechnical Sciences - MULTISCIENCE (Veliko Gradište - Srebrno jezero), UDC 62 ISSN 2217-2459, 1 (1): 75-81 (2010).
18. **A. Milenković Anđelković**, D. Nikolić, M. Anđelković, Investigation ecological condition and water quality of lake Čelije, EUROINVENT (Veliko Gradište - Srebrno jezero) UDC 62 ISSN 2217-2424, 1 (1): 88-93 (2010).

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M₆₄)

- 19.** B. Radovanović, **A. Milenković Anđelković**, Optimization of extraction methods for determination the polyphenol content and antioxidant activity in raspberry (*Rubus idaeus*), IX symposium “Novel technologies and economic developmen, Leskovac, 21-22.10 (2011). Leskovac, Serbia.
- 20.** V. Radovanović, M. Anđelković, A. Radovanović, **A. Milenković Anđelković**, B. Sivčev, D. Ilić, Monitoring the antioxidants of the Vranac variety during graperipening, 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kopaonik Mt. 16th-19th June, (2016).

12. IZJAVE AUTORA



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

**ЕКСТРАКЦИЈА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА, БИОЛОШКА АКТИВНОСТ
И ПОТЕНЦИЈАЛНА ПРИМЕНА ФЕНОЛНИХ ЈЕДИЊЕЊА ИЗ
ПЛОДОВА И ЛИШЋА БИЉНИХ ВРСТА ФАМИЛИЈА
*ROSACEAE, CORNACEAE И GROSSULARIACEAE***

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни у целини, ни у деловима, није била предложена за добијање било које дипломе, према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Нишу, 04. 11. 2016

Аутор дисертације:

Ана Миленковић Анђелковић

Потпис докторанта:

Ана М.



Прилог 2.

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Име и презиме аутора:

Ана Миленковић Анђелковић

Студијски програм:

Хемија

Наслов рада:

**ЕКСТРАКЦИЈА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА, БИОЛОШКА АКТИВНОСТ
И ПОТЕНЦИЈАЛНА ПРИМЕНА ФЕНОЛНИХ ЈЕДИЊЕЊА ИЗ
ПЛОДОВА И ЛИШЋА БИЉНИХ ВРСТА ФАМИЛИЈА
*ROSACEAE, CORNACEAE И GROSSULARIACEAE***

Ментор:

др Злата Радовановић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 04.11.2016.

Аутор дисертације:

Ана Миленковић Анђелковић

Потпис докторанта:

АНА



Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

**ЕКСТРАКЦИЈА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА, БИОЛОШКА АКТИВНОСТ
И ПОТЕНЦИЈАЛНА ПРИМЕНА ФЕНОЛНИХ ЈЕДИЊЕЊА ИЗ
ПЛОДОВА И ЛИШЋА БИЉНИХ ВРСТА ФАМИЛИЈА
*ROSACEAE, CORNACEAE И GROSSULARIACEAE***

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, 04. 11. 2016.

Аутор дисертације:

Ана Миленковић Анђелковић

Потпис докторанта:

АНА

ТИПОВИ ЛИЦЕНЦИ

1. Ауторство. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци (CC BY 3.0).

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела (CC BY-NC 3.0).

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе вашег дела у делима других аутора, ако се наведе име аутора, на начин одређен од 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 (CC BY-NC-ND 3.0).

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прераде (CC BY-NC-SA 3.0).

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе вашег дела у делима других аутора, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела (CC BY-ND 3.0).

6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од 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 (CC BY-SA 3.0).