



**UNIVERZITET CRNE GORE
METALURŠKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET
ZAŠTITA ŽIVOTNE SREDINE**

KRISTINA BOŽOVIĆ

**SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE POLIFENOLA U
ETANOLNIM EKSTRAKTIMA PLODA KUPINE (*RUBUS FRUTICOSUS* L.)**

MASTER RAD

Podgorica, 2023.



**UNIVERZITET CRNE GORE
METALURŠKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET
STUDIJE ZAŠTITE ŽIVOTNE SREDINE**

KRISTINA BOŽOVIĆ

**SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE POLIFENOLA U
ETANOLNIM EKSTRAKTIMA PLODA KUPINE (*RUBUS FRUTICOSUS* L.)**

MASTER RAD

Podgorica, 2023.

PODACI I INFORMACIJE O MAGISTRANDU

Ime i prezime: Kristina Božović

Datum i mjesto rođenja: 12.07.1998. godine, Bar

Naziv zvršenog osnovnog studijskog programa i godina završetka studija: Zaštita životne sredine, Metalurško-tehnološki fakultet, Univerzitet Crne Gore, Podgorica, 2020. godina.

INFORMACIJE O MASTER RADU

Naziv studija: Zaštita životne sredine

Naslov rada: Spektrofotometrijsko određivanje polifenola u etanolnim ekstraktima ploda kupine (*Rubus Fruticosus* L.).

Fakultet: Metalurško-tehnološki fakultet

UDK, OCJENA I ODBRANA MASTER RADA

UDK:

Datum prijave rada: 26.01.2022. godine

Datum prihvatanja teme: 24.05.2022. godine

Mentor: Prof. dr Nada Blagojević, redovni professor

Komisija za ocjenu rada:

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, MTF, predsjednik

Prof. dr Nada Blagojević, MTF, mentor

Prof. dr Vesna Vukašinović-Pešić, MTF, član

Komisija za odbranu rada:

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, MTF, predsjednik

Prof. dr Nada Blagojević, MTF, mentor

Prof. dr Vesna Vukašinović-Pešić, MTF, član

Lektor: Autolektura

Datum odbrane: 25.05.2023. godine

IZJAVA O AUTORSTVU

Kandidat: Kristina Božović

Na osnovu člana 22 Zakona o akademskom integritetu, ja, dolje potpisana

IZJAVLJUJEM

pod punom krivičnom i materijalnom odgovornošću da je master rad pod nazivom „Spektrofotometrijsko određivanje polifenola u etanolnim ekstraktima ploda kupine (*Rubus fruticosus* L.)“ rezultat sopstvenog istraživačkog rada, da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica i da je navedeni rad moje originalno djelo.

U Podgorici,

Potpis studenta

Srdačna zahvalnost mom mentoru prof. dr Nadi Blagojević na predloženoj temi, pruženom znanju, pomoći prilikom izvođenja hemijskih analiza, velikoj pomoći i uloženom trudu prilikom izrade ovog master rada.

Takođe, želim da se zahvalim članovima komisije prof. dr Vesni Vukašinović Pešić i prof. dr Biljani Damjanović Vratnica na pomoći i sugestijama.

Hvala dr Snežani Vukanović i mojoj koleginici MApp Gordani Bošković na pomoći prilikom pripreme potrebnog materijala i izvođenja hemijskih analiza.

Eksperimentalni dio ove master teze rađen je u laboratorijama za Analitičku hemiju i Instrumentalne metode, na Metalurško-tehnološkom fakultetu u Podgorici.

Hvala mojoj porodici i prijateljima na pruženoj podršci i ljubavi.

SAŽETAK

U ovom master radu ispitivani su ekstrakti ploda divlje i gajene kupine (*Rubus Fruticosus* L.) sa područja Crne Gore. Vršeno je nekoliko tipova ekstrakcija: ekstrakcija vrelom vodom (infuz), maceracija, Sokslet i ultrazvučna ekstrakcija. U ekstraktima su određivani ukupni fenoli, flavonoidi, antocijani, tanini, antioksidativna aktivnost primjenom DPPH i FRAP metode, esencijalni metali kao što su cink, mangan, bakar i gvožđe, i toksični metali kao što su olovo i nikl.

Prinos ekstrakata divlje i gajene kupine kretao se od 0,9977 g do 4,033 g. U ekstraktima divlje kupine, sadržaj ukupnih fenola kretao se od 23,094 do 77,26 mg GAE/g, sadržaj ukupnih flavonoida od 1,350 do 152,93 mg Qc/g, sadržaj ukupnih antocijana od 1,12 % do 3,72 %, sadržaj ukupnih tanina od 0,17 % do 0,41 %, DPPH vrijednost od 0,186 do 13,20 IC₅₀ µg/ml, FRAP vrijednost od 1,159 do 4,178 µmol Fe²⁺/g. U ekstraktima gajene kupine, sadržaj ukupnih fenola kretao se od 21,78 do 89,17 mg GAE/g, sadržaj ukupnih flavonoida od 4,965 do 209,675 mg Qc/g, sadržaj ukupnih antocijana od 0,815 % do 2,25 %, sadržaj ukupnih tanina od 0,24 % do 1,08 %, DPPH vrijednost od 0,162 do 10,617 IC₅₀ µg/ml, FRAP vrijednost od 1,730 do 6,159 µmol Fe²⁺/g. Neke vrijednosti ispitivanih parametara su bile veće u divljoj a neke u gajenoj kupini.

Metali u divljoj i gajenoj kupini određivani su u suvom plodu i navedenim ekstraktima. Pokazalo se da je sadržaj metala u plodu divlje kupine veći od sadržaja metala u plodu gajene kupine. Koncentracija bakra kretala se od 19,37 do 94,3 µg/g suve biljke, olova od $7,5 \cdot 10^{-3}$ do 0,03 µg/g u divljoj dok u gajenoj nije detektovan, mangana 9,55 do 78,2 µg/g, cinka od 5,825 do 32,3 µg/g, gvožđa od 12,275 do 58,3 µg/g, nikla od 0,048 do 2,1 µg/g i kadmijuma koji nije detektovan. Takođe, sadržaj metala u ekstraktima divlje kupine bio je veći nego sadržaj metala u ekstraktima gajene kupine.

Najveći stepen korelacije u uzorcima divlje kupine utvrđen je između ukupnih fenola i antioksidativne vrijednosti dobijene FRAP metodom, $R^2 = 0,9905$, dok je u uzorcima gajene kupine stepen korelacije najveći između flavonoida i vrijednosti dobijene FRAP metodom, $R^2 = 0,8859$. Od ispitivanih metala u uzorcima divlje kupine najveći stepen korelacije utvrđen je između bakra i antioksidativne vrijednosti dobijene DPPH metodom, $R^2 = 0,7495$, dok je najveći stepen korelacije u uzorcima gajene kupine između mangana i antioksidativne vrijednosti dobijene DPPH metodom, $R^2 = 0,9535$.

Ključne riječi: Kupina, ekstrakcija, fenoli, flavonoidi, tanini, antocijani, antioksidativna aktivnost, metali, spektroskopske metode.

SUMMARY

In this master work, extracts of wild and cultivated blackberry fruit (*Rubus Fruticosus* L.) from the area of Montenegro were examined. Several types of extraction were performed: hot water extraction (infusion), maceration, Soxhlet and ultrasonic extraction. Total phenols, flavonoids, anthocyanins, tannins, antioxidant activity using the DPPH and FRAP methods, essential metals such as zinc, manganese, copper and iron, and toxic metals such as lead and nickel were determined in the extracts. The yield of wild and cultivated blackberry extracts ranged from 0.9977 g to 4.033 g. In wild blackberry extracts, the content of total phenols ranged from 23.094 to 77.26 mg GAE/g, the content of total flavonoids from 1.350 to 152.93 mg Qc/g, the content of total anthocyanins from 1.12 % to 3.72 %, the content total tannins from 0.17% to 0.41%, DPPH value from 0.186 to 13.20 IC₅₀ µg/ml, FRAP value from 1.159 to 4.178 µmol Fe²⁺/g. In cultivated blackberry extracts, the content of total phenols ranged from 21.78 to 89.17 mg GAE/g, the content of total flavonoids from 4.965 to 209.675 mg Qc/g, the content of total anthocyanins from 0.815 % to 2.25 %, the content of total tannins from 0.24% to 1.08%, DPPH value from 0.162 to 10.617 IC₅₀ µg/ml, FRAP value from 1.730 to 6.159 µmol Fe²⁺/g. Some values of the examined parameters were higher in wild blackberry while some in cultivated blackberry.

Metals in wild and cultivated blackberries were determined in the dry fruit and the mentioned extracts. It was shown that the metal content in wild blackberry fruit is higher than the metal content in cultivated blackberry fruit. The concentration of copper ranged from 19.37 to 94.3 µg/g of dry plant, lead from 7.5.10⁻³ to 0.03 µg/g in the wild while it was not detected in the cultivated one, manganese 9.55 to 78.2 µg/g, zinc from 5.825 to 32.3 µg/g, iron from 12.275 to 58.3 µg/g, nickel from 0.048 to 2.1 µg/g of cadmium which not detected. The metal content in wild blackberry extracts was higher than the metal content in cultivated blackberry extracts.

The highest degree of correlation in wild blackberry samples was determined between total phenols and antioxidant values obtained by FRAP method $R^2 = 0.9905$, while in cultivated blackberry samples it was between flavonoids and FRAP values $R^2 = 0.8859$. The highest degree of correlation for essential metals in wild blackberry samples was found between copper and the antioxidant value of DPPH $R^2 = 0.7495$, and in cultivated blackberry samples, between manganese and the antioxidant value of DPPH $R^2 = 0.9535$.

Keywords: Blackberry, extraction, phenols, flavonoids, tannins, anthocyanins, antioxidant activity, metals, spectroscopic methods.

SADRŽAJ

1. UVOD	8
2. TEORIJSKI DIO.....	10
2.1. Osnovne karakteristike porodice <i>Rosaceae</i>	10
2.2. Osnovne karakteristike kupine	11
2.2.1. Vrste kupine	12
2.3. Kupina kao izvor fenola, flavonoida, tanina i antocijana.....	15
2.4. Antioksidativna aktivnost.....	21
2.5. Hemijski sastav kupine.....	23
2.6. Metode ekstrakcije	25
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	30
3.1. Hemikalije i instrumenti.....	30
3.2. Priprema biljnog materijala	30
3.3. Spektrofotometrijsko određivanje fenola, flavonoida, tanina i antocijana u ekstraktima divlje i gajene kupine.....	32
3.3.1. Određivanje sadržaja fenola	32
3.3.2. Određivanje sadržaja flavonoida	33
3.3.3. Određivanje sadržaja antocijana.....	33
3.3.4. Određivanje sadržaja tanina	33
3.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti u ekstraktima divlje i gajene kupine.....	34
3.4.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti primjenom FRAP testa	34
3.4.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti primjenom DPPH testa	34
3.5. Određivanje teških metala u ekstraktima divlje i gajene kupine.....	35
4. REZULTATI I DISKUSIJA	37
4.1. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima divlje i gajene kupine.....	37
4.2. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima divlje i gajene kupine.....	40
4.3. Sadržaj ukupnih antocijana u ekstraktima divlje i gajene kupine	42
4.4. Sadržaj ukupnih tanina u ekstraktima divlje i gajene kupine	45
4.5. Antioksidativna aktivnost ekstrakata divlje i gajene kupine.....	46
4.6. Sadržaj metala u plodu i ekstraktima divlje i gajene kupine.....	50
4.7. Korelacija sadržaja fenolnih jedinjenja, antioksidativne aktivnosti i metala u divljoj i gajenoj kupini.....	52
5. ZAKLJUČAK	55
6. LITERATURA	57

1. UVOD

Biljna hrana (voće, začinsko bilje, orašasti plodovi, povrće, mahunarke i žitarice) zauzimaju važnu poziciju u ekonomskim, kulturnim i zdravstvenim sistemima, kako u zemljama u razvoju tako i u razvijenim zemljama zbog dokazanih tvrdnji o uticaju na zdravlje i jačanju imuniteta. Redovno konzumiranje voća, začina, orašastih plodova, mahunarki, povrća i žitarica je od vitalnog značaja za uravnoteženu i hranljivu ishranu i povezano je sa smanjenim rizikom od raznih bolesti kao što su upale, artritis, rak, dijabetes, kardiovaskularne bolesti, ateroskleroza, katarakta, Parkinsonova bolest, Alchajmerova bolest i starenje. Porijeklo mnogih lijekova, recepata i farmaceutskih proizvoda može biti biljna hrana, posebno voće. Informacije o nutritivnim vrijednostima voća i njihovom uticaju na zdravlje ljudi su među najčešće spominjanim i najtraženijim podacima na internetu. Voće se konzumira u različitim količinama kao koncentrisan izvor energije, ishrane, vitamina, esencijalnih minerala i antioksidanata od strane ljudi svih uzrasta i grupa sa različitim prihodima, širom svijeta. *Rubus fruticosus* L. (*Rosaceae*) je žbun poznat po svom plodu, zvanom kupina, koji se prodaje širom svijeta zbog svog prijatnog ukusa i nutritivnog sadržaja (Zia-Ul-Haq i sar., 2014).

Kupine se gaje širom svijeta, ali su za njihov rast pogodnija područja sa blagim zimama i dugim umjerenim ljetima. Glavna područja proizvodnje kupine su Sjeverna Amerika, Evropa, Azija, Južna Amerika, Centralna Amerika i Afrika. U proizvodnji kupine danas se koriste mnoge visokokvalitetne i visokoprinosne sorte. Kupine na tržištu mogu biti prisutne u svježem obliku; međutim, češće se prerađuju u sokove, džemove, piree, koncentrate i slatkiše. Kvalitet ploda je izuzetno važan za potrošače i prehrambenu industriju, kako spoljašnji izgled voća tako i kvalitet, koji je u direktnoj vezi sa sadržajem primarnih i sekundarnih metabolita. Takođe je važno znati da kvalitetno voće ima i veću tržišnu vrijednost (Lykins i sar., 2021).

Popularnost i prihvatljivost određene vrste voća među potrošačima nije samo zbog njihove visoke nutritivne vrijednosti, karakterističnog ukusa i arome, već i zbog pozitivnog uticaja na zdravlje. Kupine su dobar izvor vitamina, minerala i drugih bioaktivnih jedinjenja. Posljednjih godina primjećen je trend povećanja potražnje za hranom sa visokim sadržajem fenola, uglavnom zbog njihovih antioksidativnih svojstava. Kupine su izuzetno bogate bioaktivnim supstancama: antocijaninima, elagitanimima, flavonol glikozidima i fenolnim kiselinama, koje doprinose

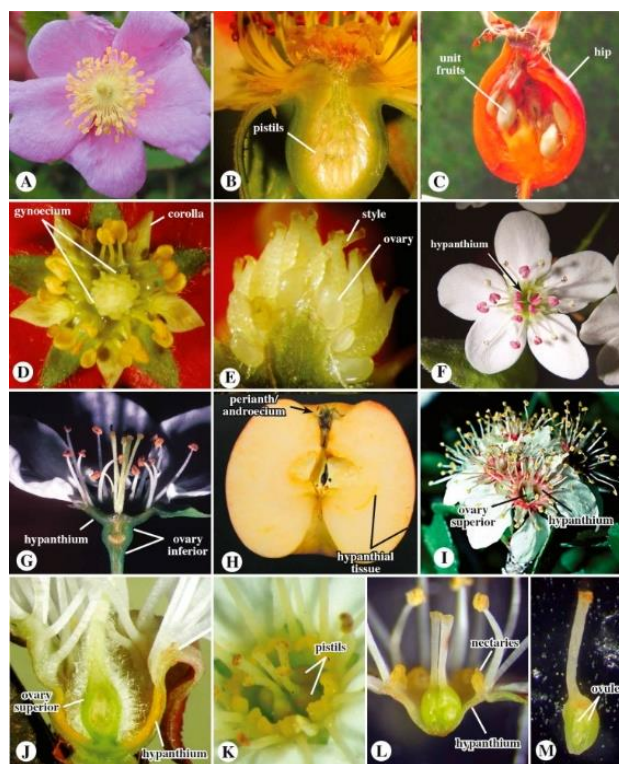
njihovom visokom antioksidativnom potencijalu. Kliničke studije su pokazale da konzumiranje voća koje sadrži visoke koncentracije antocijana, kao i nekih drugih fenolnih grupa, može smanjiti rizik od gojaznosti, kardiovaskularnih bolesti, degenerativnih bolesti i raznih oblika raka (Mikulic-Petkovsek, 2021).

Predmet ovog istraživanja je određivanje antioksidativnih komponenti, polifenola, flavonoida, antocijana i drugih komponenti iz etanolnih ekstrakata ploda divlje (samonikle) i gajene (kultivisane) kupine sa područja Crne Gore. Korišćene su različite tehnike ekstrakcije: ekstrakcija vrelom vodom (infuz, čaj), maceracija, Sokslet (Soxhlet) ekstrakcija i ultrazvučna ekstrakcija. U suvom plodu i u ekstraktima su određivani i pojedini metali. Nakon eksperimentalnog dijela istraživanja, dobijeni rezultati su poređeni sa rezultatima iz dostupne literature.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE PORODICE ROSACEAE

Pripadnici porodice *Rosaceae* imaju karakterističnu cvjetnu osobinu - prisustvo hipantijuma, cvjetnog diska ili čašice formirane od spojenih baza listova, latica i prašnika, koji je ponekad spojen sa jajnikom. Porodica obuhvata oko 90 rodova, koji zajedno čine 2000–3000 vrsta (slika 1) (Potter, 2009). Iako je njena taksonomija donekle sporna, porodica se obično dijeli na četiri podfamilije: *Amygdaloideae*, sa košticama (mesnati plodovi sa košticom); *Maloideae*, sa sjemenkama (plodovi u kojima cvjetni hipantijum postaje mesnat); *Rosoideae*, sa sjemenkama (suvi plodovi koji se ne otvaraju) ili košticama (male, skupljene koštice); i *Spiraeoideae*, sa folikulima (suvi plodovi koji se otvaraju na jednoj strani) (Petruzzello, 2022). Brojne vrste su od ekonomskog značaja za ishranu, uključujući jabuke, bademe, trešnje, kruške, kupine, maline i jagode; neke, kao što je ruža, uzgajaju se kao ukrasne biljke. Pripadnici *Rosaceae* su uglavnom drvenaste biljke, žbunje ili mala do srednja stabla, od kojih su neka sa trnjem ili bodljama kako bi odbili biljojede. Rod *Rubus* (npr. kupine i maline) uglavnom sadrži zakrivljene grmove nepravilnog, često zapletenog izgleda. Malina ima latinski naziv *Rubus idaeus* a kupina *Rubus fruticosus* (Sytsma, 2016).



Slika 1. Primjeri pripadnika porodice *Rosaceae* (Potter, 2009)

2.2. OSNOVNE KARAKTERISTIKE KUPINE

Kupine (slika 2) su plodne biljke iz roda *Rubus*, podroda *Rosaseae*. Ovaj rod se odlikuje značajnom raznovrsnošću, od sitnih, ležećih biljaka do veoma velikih grmova preko 5 m visine. Rast je obično zeljast ili poludrvenast i dvogodišnji, sa višegodišnjom krunom i korjenovim sistemom. Neke vrste imaju jednogodišnje plodove, a druge imaju drvenasti višegodišnji rast u vidu uspravnih žbunova ili penjačica. Vrste mogu biti kruto uspravljene, poluspravljene ili zaobljene, i obično formiraju žbunje sa novim štapovima u odnosu na one iz prethodnih godina. Neki članovi roda rastu iz jedne krune, a drugi proizvode korjenske izdanke da bi formirali nove krune, ili čak stvaraju nova vazdušna tkiva iz podzemnog rizoma svake godine. Vrste sa pratećim ili poluspravnim rastom obično imaju korijen na vrhovima štapića ili na čvorovima, dok one sa uspravnim rastom nemaju. Vrste iz roda su prilagođene širokom spektru okruženja, od arktičkog kruga do tropskih krajeva, od male do velike nadmorske visine, od kiselog do alkalnog zemljišta, od veoma vlažne do veoma suve klime, i od potpuno osjenčenih do potpuno osvijetljenih staništa (Yin, 2017; Clark i sar., 2007).

Plod *Rubus* sastoji se od više mesnatih bobica, od kojih svaka sadrži jedno sjeme (piren) oko torusa ili cvjetne lože. Kod kupine se torus bere zajedno sa plodom, zadržavajući integritet ploda, dok kod maline torus ostaje na biljci, a integritet ploda se održava prisustvom sitnih dlačica koja drže plod zajedno nakon uklanjanja. List kupine sadrži: tanine, mineralne materije i soli, flavonske heterozide i etarsko ulje, a plod: vitamin C, tanine, šećer, jabučnu, vinsku i limunsku kiselinu u sluzi. U ishrani i medicini se koristi i list i plod. List se bere u martu, aprilu i maju, a plod u septembru i oktobru. Kupine su u izobilju rasprostranjene u Evropi, zapadnoj Aziji, Sjevernoj i Centralnoj Americi, u Južnoj Americi u regionu Anda (Yin, 2017; Clark i sar., 2007).



Slika 2. Plod kupine (Norman, 2023)

2.2.1. Vrste kupine

Postoje različite vrste kupine, divlja i pitoma kupina. U industriji za proizvodnju sokova, sirupa, kompota i sličnih prehrambenih proizvoda pogodni su plodovi divljih (samoniklih) vrsta kupine:

- *Rubus caesius* - Raste u većem dijelu Evrope i Azije, na visinama do 1000 m.n.v., na vlažnim, zapuštenim i neobrađenim mjestima, na ivici šuma, pored rijeka i potoka. Boja ploda je crna i ima sočan ali ne previše sladak ukus (slika 3a), (Rejewska i sar., 2013).
- *Rubus laciniatus* – Poznata kao zimzelena kupina, raste u sjevernoj i centralnoj Evropi. Boja ploda je crna i slatkog je ukusa, (slika 3b), (Krivošej i sar., 2018).
- *Rubus candicans* – Raste u šumama, kamenjarima, brdskim terenima (Dujmović Purgar i sar., 2008) (slika 3c).
- *Rubus canescens* - Raste u južnoj i centralnoj Evropi i u jugozapadnoj Aziji od Portugala do Irana, na sjeveru do Njemačke, Poljske i Ukrajine (Jazić, 2019) (slika 3d).
- *Rubus Discolor* – Himalajska kupina (slika 3e), poznata i kao jermenska kupina ili samo kupina, je listopadno do zimzeleno, bodljikavo, zasvođeno drvenasto grmlje koje može dostići visinu od 4 m sa dužinom stabljike i do 10 m. Raste na goletima, zapaljenim područjima, duž rijeka, puteva, ograda i željezničkih šina. Veoma je česta u Evropi (Francis, 2014).
- *Rubus hirtus* Waldst. & Kit – Raste u centralnoj i južnoj Evropi (Gazda i sar., 2007) (slika 3f).
- *Rubus ulmifolius* Schott – Poznata kao crvenocvjetna kupina. Porijeklom je iz Evrope i Sjeverne Afrike (Sisti i sar., 2008) (slika 3g).



Slika 3. Vrste divlje kupine: a) *Rubus caesius*, b) *Rubus laciniatus*, c) *Rubus candicans*, d) *Rubus canescens*, e) *Rubus Discolor*, f) *Rubus hirtus*, g) *Rubus ulmifolius* (Savić, 2010; Dewey, 2011; Malykhina, 2018 i 2014; Brun, 2023; Grokhovska, 2019; Simon, 2007).

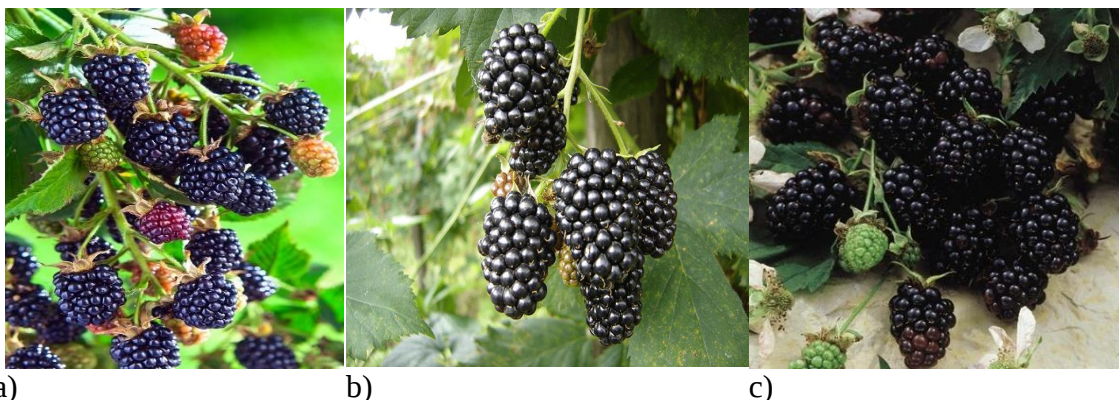
Pitoma kupina može biti bez trnja i sa trnjem:

- Kupina bez trnja:
- *Arapaho* kupina je uspravan, rano sazreo grm bez trnja koji daje krupne crvene i crne plodove. Bobice su čvrste i ukusne sa sitnim sjemenkama — dobre za pravljenje džemova i sirupa (slika 4a) (Coyner i sar., 2005).
- *Black satin* je stara polupuzeća sorta. Ima moćne dugačke štapove (do 5-7 m dužine) bez trnja. Štapovi imaju tamno braon boju. Ova sorta raste u visinu do 1,5 m, a zatim počinje da puzi. Zahtijeva stalno oblikovanje, obrezivanje i polaganje na rešetku, a ako voće ne dobija dovoljno svjetlosti i ishrane, postaje sitnije i ne može u potpunosti da sazre. Cvjetovi su ružičasti kada se otvore, nakon nekoliko dana izblijede. Plodovi su zaobljenog izduženog oblika i sjajne crne

boje. Nezrele bobice imaju kiselkast ukus, mada izgledaju zrelo. Zrele bobice su veoma meke, sočne i ne mogu se transportovati (Coyner i sar., 2005).

- *Čačanska bestrna* – Ova sorta je vrlo bujna. Daje 4-5 jakih štapova savijenih iz srednjeg dijela, sa kratkim internodijama. Štap je bez trnja. Plodne grane nastaju iz osnove trske, sa cvastima na vrhovima u kojima su cvjetovi prilično koncentrisani. Obrezivanje je obilno. Otporna je na rđu trske i lišća koju izaziva gljiva *Kuchneola uredinis*. Do sada nisu uočena oštećenja na trski izazvana niskim zimskim temperaturama. Svi plodovi sazrijevaju do početka septembra. Plod je veoma krupan, boja ploda je sjajno crna, dug, cilindričnog oblika, sladak, aromatičnog ukusa i čvrst (slika 4b). Plod je veoma pogodan za svježju potrošnju, za zamrzavanje i preradu (Stanisavljevic, 1999).
- *Loh Nes* je patentiran 1989. godine kao poluspravna sorta kupine sa velikim plodovima, zimskom otpornošću, visokim prinosom i ranom sazrijevanju. Stabljike su ugaone, obično petougaone, bez trnja i mogu biti zelene ili pigmentisane. Dio nezrelog vrha je dlakav, ali su dlačice neupadljive ili ih nema u sub-terminalnim dijelovima stabljike. Štapovi sorte Loh Nes obično postaju tamnoljubičasti u jesen, ali neki djelovi ostaju zeleni, uglavnom prema dnu trske i na neeksponiranim dijelovima. Plodovi su tupokonusne konfiguracije i krupni. Kada su potpuno zreli, oni su tamno crni i blago sjajni sa malo ili nimalo dlake. Ukus je tipičan za kupine sa blagom kiselošću. Bobice su čvrste, mogu se skladištiti, ali postoji mala tendencija da smrznuto voće postane crveno, posebno ako nije potpuno zrelo kada se ubere (MyBlackberryPlants, Coyner i sar., 2005).
- *Thornfree* je stara američka sorta kupine bez trnja. Biljke su veoma snažne, stabljike mogu dostići do 5 m dužine i do 2 m visine. Plodovi su krupni, duguljastog oblika, crne boje i sjajni. Često čak i zrele bobice imaju kiselkast ukus. Ako su takve bobice ostavljene na žbunju, posle nekoliko dana sa dobrim vremenskim uslovima dobijaju ukus šećera, ali gube sjaj. Bobice *Thornfree* su veoma sočne. Takve karakteristike definišu glavna tržišta ove sorte - preradu i proizvodnju vina (Coyner i sar., 2005).
- *Chester Thornless* je sorta kupina bez trnja iz Sjedinjenih Država, veoma bujna, produktivna, krupnorodna, kasno zrela, umjereno otporna na zimu (slika 4c). Ovo je jedna od najpopularnijih sorti kupine na svijetu. Štapovi su poluspravni nakon prve godine ležecog rasta. Dužina štapova obično dostiže 3-4 m i potrebna im je podrška rešetke. Prinosi *Chester Thornless* variraju u zavisnosti od proizvodne površine, do 31 kg po zdravoj biljci. Ukus zavisi

od lokalnih uslova uzgoja i vremena. U različitim regionima sa sličnim metodama uzgoja ukusi se dovoljno razlikuju. Bobice su veoma intenzivne crne boje i čvrste (Galletta i sar., 1998).



Slika 4. Pitome kupine bez trnja: a) *Arapaho*, b) *Čačanska bestrna*, c) *Chester Thornless* (Normann, 2023; Blagojević, 2012)

- Kupine sa trnjem:
- Kupina *Darrow* je veoma uspravna; ima čvrste, izdužene plodove dobrog, blago kiselog ukusa i rano sazrijeva. Biljke su snažne i otporne do -29°C (MyBlackberryPlants).
- '*Illini Hardi*' je kupina čiji plod kasno sazrijeva, srednje je veličine i dobrog ukusa. Biljke su snažne i tipično otporne na -26°C (Poling, 1997).
- *Brazos* je kupina čije stabljike su poluravne, snažne i trnovite. Biljke su veoma produktivne i vrlo rano sazrijevaju. Plodovi su sočni i krupni, mekani, privlačni i jedinstveni, slatkog ukusa sa intenzivnom cvjetnom aromom. Boja je tamno-crna. Grmovi kupine *Brazos* su otporni na sušu i toplotu, ali imaju nisku otpornost na hladnoću (Coyner i sar., 2005).
- *Gazda* je uspravno rastuća sorta kupine. Gazda je veoma bujna biljka sa brojnim zamjenskim štapovima. Stabljike su debele i jake, do 2,5-3 m dužine sa zakrivljenim završecima. Novi štapovi su svijetlo zelene boje i brzo postaju tvrdo drvo. Bobice sorte *Gazda* su srednje veličine, zasićene sjajne crne boje i okruglog oblika. Ukus je sladak bez kiseline. Jedna je od najotpornijih sorti na hladnoću (Vescan i sar., 2012).

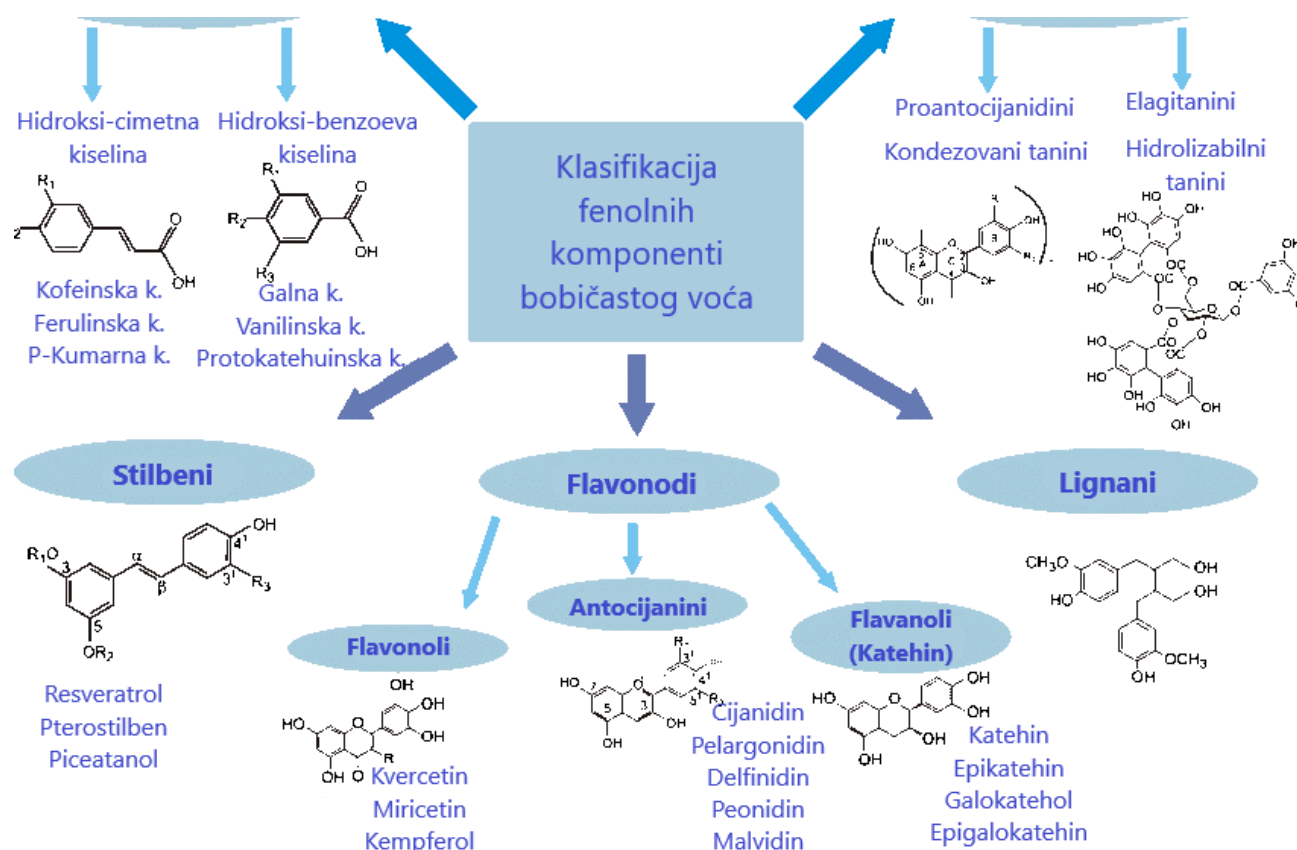
2.3. KUPINA KAO IZVOR FENOLA, FLAVONOIDA, TANINA I ANTOCIJANA

Voće je odličan izvor fenolnih jedinjenja, koji se smatraju efikasnim agensima za zaštitu od bolesti, kao što su kardiovaskularne bolesti i rak. Kupina je moćan izvor fenolnih jedinjenja. Tokom protekle decenije, brojna nezavisna istraživanja su utvrdila da je ishrana bobičastim voćem imala pozitivan uticaj na opšte ljudsko zdravlje, performanse i prevenciju bolesti. U nekoliko studija je navedeno da

kupine imaju veći antioksidativni kapacitet u poređenju sa drugim voćem. Kupina je voće koje sadrži visok nivo antocijana i elagitanina, pored drugih fenolnih jedinjenja kao što su flavan-3-oli, procijanidini i lignani koji doprinose njihovom visokom antioksidativnom kapacitetu. Ovi plodovi imaju visoka antiproliferativna i antiinflamatorna svojstva. Antocijani (antocijanin glikozid i alkil glikozid) su važni u prehrambenoj industriji jer su potencijalne zamjene za sintetičke boje za hranu, a u ishrani ljudi djeluju kao zaštitni agensi protiv bolesti (Celant i sar., 2016, Wang i Lin, 2000, Mazur i sar., 2007).

Ljekovita svojstva kupine su poznata još od 16. vijeka u Evropi, gdje su se koristile za liječenje infekcija usta i očiju (Oszmiański i sar., 2015). Sok od kupine i etanolni ekstrakti se koriste u narodnoj medicini za liječenje mnogih bolesti poput migrene, kao i digestivnih, inflamatornih i srčanih poremećaja. Voće i sok se uzimaju i kod anemije. Kao kategorija hrane, bobičasto voće je među 50 proizvoda sa najvišim nivoom antioksidanata. Listovi kupine takođe imaju visok nivo antioksidanata. Biološke aktivnosti se uglavnom pripisuju polifenolnim sastojcima kupine. Od svog bobičastog voća kupine su najviše rangirane po koncentraciji antioksidanta, prvenstveno zbog značajnog sadržaja antocijana, pretežno cijanidin-3-O-glukozida (C3G), elagitanina i elaginske kiseline i drugih derivata. C3G, izolovan iz kupina, bio je u stanju da ukloni ultraljubičaste B-indukovane $\bullet\text{OH}$ i $\text{O}_2\bullet$ – radikale u kultivisanom sistemu ćelija epiderme miša (Srivastava, 2009).

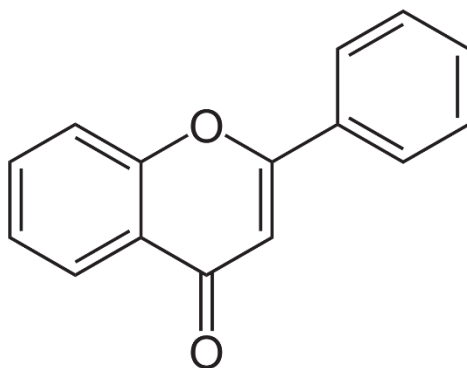
Fenolna jedinjenja su značajno zastupljena u biljkama. Fenoli su rastvorljivi u vodi i javljaju se ili kao bezbojne tečnosti ili bijele čvrste materije na sobnoj temperaturi. U zavisnosti od strukture fenolna jedinjenja su podijeljena u veliki broj klasa. U biljne fenole se ubrajaju: fenolni heterozidi, kumarini, lignani, flavonoidi, tanini i mnoga druga jedinjenja. Klasifikacija fenola u bobičastom voću prikazana je na slici 5 (Wade, 2018).



Slika 5. Klasifikacija fenolnih komponenti u bobičastom voću (Paredes-López i sar., 2010)

Ukupni fenoli ploda kupine su dugo proučavani. Prethodne studije su pokazale da nivo i sastav bioaktivnih jedinjenja (npr. flavonoida, ukupnih fenola i kiselina) u plodu kupine uglavnom zavisi od genotipa. Sirivoharn i saradnici (2004), Pantelidis i saradnici (2007), Kostecka-Gugala i saradnici (2015), Gundogdu i saradnici (2016) su dobili značajne razlike među različitim sortama kupine u pogledu askorbinske kiseline, sadržaja fenola i antioksidativnog kapaciteta. Yilmaz i saradnici (2009) i Milivojević i saradnici (2011) su ustanovili veće vrijednosti za ukupne fenole i antioksidativni kapacitet u plodovima divlje kupine nego u kultivisanim kupinama. Na biohemijski sastav kupine, takođe, utiče nekoliko drugih uslova kao što su klimatski faktori (npr. intenzitet svjetlosti, temperatura) i agrotehnički uslovi (npr. zemljište) (Koczka i sar., 2018).

Flavonoidi, koji se takođe nazivaju i flavoni, pripadaju klasi neazotnih bioloških pigmenata koji su u velikoj mjeri zastupljeni u biljkama. Osnovna struktura flavonoida prikazana je na slici 6.



Slika 6. Osnovna struktura flavonoida (Sang-aroon i sar., 2019)

Opisano je više od 3.000 različitih flavonoida. Mnogi članovi ove grupe, posebno antoksantrini, često daju žutu boju laticama cvijeća. Druga velika grupa, antocijani, su u velikoj mjeri odgovorni za crvenu boju pupoljaka i mladih izdanaka, kao i za ljubičastu i ljubičasto-crvenu boju jesenjeg lišća. Flavonoidi i flavonoli su obično žuti pigmenti ili pigmenti boje slonovače (Britannica, 2021).

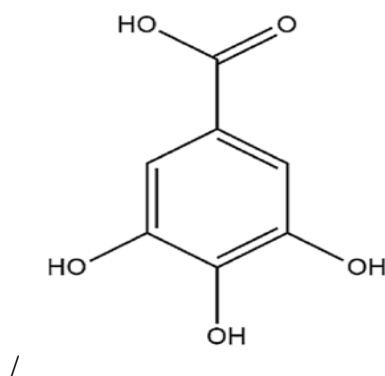
Imaju razne povoljne biohemijske i antioksidativne efekte povezane sa raznim bolestima kao što su rak, Alchajmerova bolest (AD), ateroskleroza, itd. Flavonoidi su povezani sa širokim spektrom efekata koji utiču na zdravlje i nezamjenljiva su komponenta u različitim nutraceutskim, farmaceutskim, medicinskim i kozmetičkim primjenama. To je zbog njihovih antioksidativnih, antiinflamatornih, anti-mutagenih i anti-kancerogenih svojstava zajedno sa njihovim kapacitetom da modulišu ključne funkcije ćelijskih enzima. Takođe je poznato da su moćni inhibitori nekoliko enzima, kao što su ksantin oksidaza (KSO), ciklooksigenaza (COKS), lipoksigenaza i fosfoinozimid 3-kinaza (Panche i sar., 2016).

Flavonoidi imaju nekoliko podgrupa, koje uključuju halkone, flavone, flavonole i izoflavone. Flavonoidima su pripisani pozitivni efekti na zdravlje ljudi i životinja, a trenutno je interesovanje za terapiju bolesti i hemoprevenciju. Dixon i Pasinetti (2010) su dali detaljan pregled biljnih flavonoida i izoflavonoida i detaljno komentarisali njihovu primjenu u poljoprivredi i neuronaukama kod ljudi, dok su Kumar i Pandei (2013) dali detaljan pregled zaštitnih uloga flavonoida protiv ljudskih bolesti, kao i njihove funkcije u biljkama. Nedavno su Panche i saradnici, dok su razmatrali AD i trenutne terapijske metode, detaljno komentarisali upotrebu flavonoida kao biljnih sekundarnih metabolita za liječenje AD (Panche i sar., 2015).

Sve vrste bobičastog voća sadrže flavonoide, pri čemu sadržaj varira u zavisnosti od vrste. Kupine sadrže svih šest vrsta flavonoida. Smatra se da kupine imaju visok sadržaj kvercetina, prosječno od 38,8 mg kvercetina u 100 g kupine (Croge i sar., 2019). Souza i saradnici (2014) su otkrili da su koncentracije flavonoida 1,8 puta veće u kupinama nego u borovnicama. Uključivanje kupine u

ishranu ljudi je korisno po zdravlje zbog visokog sadržaja flavonoida, a pored blagotvornog dejstva, nema štetnih ili sekundarnih efekata. Ova jedinjenja su odgovorna i za organoleptičke, nutritivne i procesne karakteristike hrane i pića (Gutierrez i sar., 2017).

Tanini su polifenoli rastvorljivi u vodi i prisutni u mnogim biljnim namirnicama. Tanini se obično nalaze i u golosjemenicama i u skrivenosjemenicama. Pronađeni su u 180 porodica dikotiledona i 44 porodice monokotiledona. Osnovna struktura tanina prikazana je na slici 7. Mogu da formiraju komplekse sa proteinima, skrobom, celulozom i mineralima. Tanini se mogu podijeliti u dvije grupe - hidrolizujuće (galotanini, tanini kompleksa eligatanina i proantocijanidini) i kondenzovane tanine. Ova klasifikacija odražava i fizičko-hemijska svojstva i biogenezu tanina. Hidrolizujući tanini obično nastaju vezivanjem za šećerne fragmente ostataka galne, metadigalne ili heksahidroksidifenske kiseline. Kondenzovani tanini nastaju oksidativnom kondenzacijom flavonoida (Zaprometov, 1988; Bhattacharya, 2019).

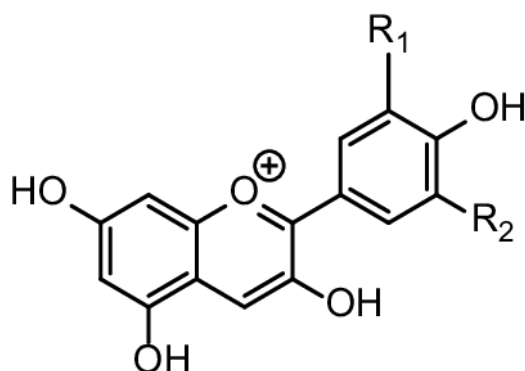


Slika 7. Osnovna struktura tanina (Kavitha i sar., 2020)

Obično se javljaju u korijenu, drvetu, kori, listovima i plodovima mnogih biljaka. Ispitivanja su pokazala da su tanini odgovorni za smanjenje unosa hrane, stope rasta, efikasnosti hrane, neto metaboljive energije i svarljivosti proteina kod eksperimentalnih životinja. Zbog toga se smatra da je hrana bogata taninima niske nutritivne vrijednosti. Smatra se da su polifenoli iz čaja i mnoge komponente tanina antikancerogene. Takođe, se pokazalo da mnogi molekuli tanina smanjuju mutagenu aktivnost brojnih mutagena. Antikarcinogeni i antimutageni potencijali tanina mogu biti povezani sa njihovim antioksidativnim svojstvima, što je važno u zaštiti ćelijskog oksidativnog oštećenja, uključujući lipidni peroksidaton. Tanini u voću predstavljaju prirodni odbrambeni mehanizam protiv mikrobnih infekcija. Antimikrobno svojstvo taninske kiseline može se koristiti u preradi za produžetak roka trajanja određenih namirnica, npr. fileta soma. Takođe, je prijavljeno da tanini ispoljavaju i druge fiziološke efekte, kao što su ubrzavanje zgrušavanja krvi, smanjenje krvnog

pritiska, smanjenje nivoa lipida u serumu, izazivanje nekroze jetre i modulaciju imunoloških odgovora. Hidrolizujući tanini su među glavnim bioaktivnim komponentama voća. Koncentracija tanina u plodovima varira u zavisnosti od sorte kao i od faze sazrijevanja. Voće i ekstrakti voća bogati taninom pokazali su antidijabetičke, antimikrobne, antiinflamatorne i imunoregulišuće aktivnosti (Chung i sar., 1998; Yang i Liu, 2014).

Antocijani, glikozidni oblik antocijanidina, pripadaju klasi flavonoida koji predstavljaju pigmente rastvorljive u vodi odgovorne za narandžastu, crvenu i plavu boju voća, povrća, listova, cvjeća i korijena. Osnovna struktura antocijana je prikazana na slici 8.



Slika 8. Osnovna struktura antocijana (Dabas, 2018).

Samo šest od 16 antocijana identifikovanih u prirodnim proizvodima javlja se često i u mnogim različitim vrstama povrća i voća: cijanidin, pelargonidin, delfinidin, peonidin, petunidin i malvidin. Antocijani su veoma proučavana jedinjenja zbog njihovog uticaja na ljudsko zdravlje kao antioksidanata, kao što je pokazano u brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama, zbog njihovog antiinflamatornog efekta modulacije enzima ciklooksigenaze 1 i 2 i njihovog inhibitornog dejstva na razvoj nekih ćelija raka (Hassimotto i sar., 2008).

Antocijani su bioaktivne komponente važne u nutraceutskoj i tradicionalnoj medicini. Bioraspoloživost ovih obojenih pigmenata je ključni faktor za održavanje dobrog zdravlja i za prevenciju bolesti. Antocijani sa visokom biodostupnošću efikasno smanjuju ćelijsku peroksidaciju lipida, a samim tim i rizik od mnogih bolesti. Zdravstvenim i terapijskim efektima antocijanina uglavnom doprinose njegove antioksidativne aktivnosti. U stvari, antocijanidin ima veću ORAC (Oxygen Radical Absorption Capacity) vrijednost od antocijana. Jedan od mogućih razloga je što je antocijan aglikon veoma nestabilan i visoko reaktivan. Antocijan, uz dodatak dodatnog šećera na

poziciji C-3 u heterocikličnom C-prstenu, ima nižu antioksidativnu aktivnost od antocijanidina sa jednim molekulom šećera (Khoo i sar., 2017).

Plod kupine sadrži oko 15 fenolnih supstanci, a posebno su značajni antocijanin-3-O-glukozid i hlorogenska kiselina. Antocijani su važne funkcionalne komponente u kupini (Li i sar., 2022).

Kupine sadrže izbalansiranu mješavinu pet glavnih antocijanskih aglikona vezanih za monosaharide diglukozide i acetilglukozide, kumaroil mono- i diglukozide. Antocijani mogu da smanje rizik od bolesti srca, inhibiraju agregaciju trombocita i štite endotelne ćelije arterija. Pored toga, ovi pigmenti mogu da smanje rizik od raka, smanje inflamatorne povrede i moduliraju imuni odgovor. Antimikrobna jedinjenja bobičastog voća, posebno dijetalni flavonoidi, mogu imati važnu primjenu u budućnosti kao prirodni antimikrobni agensi za prehrambenu industriju, kao i za oblast medicine (Niculescu i sar., 2013).

2.4. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST

Riječi kao što su „antioksidant“ i „oksidativni stres“ teško je definisati. Termin „antioksidant“, koji se koristi u literaturi ograničen je na antioksidativne inhibitore peroksidacije lipida koji prekidaju lanac. Istraživači često izjednačavaju antioksidante sa inhibitorima peroksidacije lipida jer se antioksidanti koriste da spriječe hranu da užegne. Slobodni radikali koji se stvaraju *in vivo* oštećuju proteine, DNK i druge molekule pored lipida. Šira definicija je: antioksidant je svaka supstanca koja kada je prisutna u niskim koncentracijama u poređenju sa koncentracijama supstrata koji se može oksidovati, odlaže ili sprječava oksidaciju tog supstrata. Mehanizmi antioksidativnog djelovanja mogu uključivati: uklanjanje O₂, uklanjanje reaktivnih vrsta kiseonika/azota ili njihovo inhibiranje, vezivanje metalnih jona potrebnih za katalizu stvaranja ROS (Reaktivna vrsta kiseonika) i povećanje regulacije endogene antioksidativne odbrane. Antioksidanti su postali naučno interesantna jedinjenja zbog svojih brojnih prednosti. Zbog toga se ubrzano nastavljaju studije za utvrđivanje antioksidativnih aktivnosti hrane iz prirode i njenih glavnih komponenti. Takođe, značaj antioksidanata se povećao zbog njihove upotrebe u farmakologiji, kozmetici i medicini (Halliwell, 1996; Zehiroglu i Ozturk Sarikaya, 2019).

Antioksidanti u hrani su interesantni iz najmanje četiri razloga. Prvo, endogeni ili dodati antioksidanti mogu zaštititi komponente same hrane od oksidativnog oštećenja. Na primjer, začini bogati antioksidantima su vjekovima korišćeni za odlaganje oksidativnog propadanja hrane tokom skladištenja ili kuvanja. Drugo, antioksidanti apsorbirani iz hrane u ljudskom organizmu imaju blagotvorno dejstvo. Ovo je najjasnije utvrđeno za α -tokoferol i vitamin C. Specifični mehanizmi

preuzimanja l-askorbata postoje u ljudskom gastrointestinalnom traktu. Treće, antioksidanti dobijeni iz hrane mogu imati blagotvorne efekte, bez apsorpcije u samom gastrointestinalnom traktu. Četvrto, postoji značajno interesovanje za biljne ekstrakte za terapijsku upotrebu (npr. kao antiinflamatorna, antiishemična i antitrombotička sredstva). Tradicionalni japanski lijekovi Kampo su ekstrakti više biljaka i sadrže složenu mješavinu fenola i drugih jedinjenja, uključujući glicirizin iz korijena biljke sladića. Ekstrakti propolisa, smolaste supstance koje sakupljaju pčele, često se koriste u biljnoj medicini i sadrže mnoga fenolna jedinjenja (Cadenas i Packer, 2002).

Antioksidanti u hrani se mogu podijeliti na pet tipova: *Primarni antioksidanti*: jedinjenja, uglavnom fenolne supstance, koja prekidaju lance slobodnih radikala u oksidaciji lipida, prirodni i sintetički tokoferoli, alkil galati, butil, hidrohinon, pripadaju ovoj grupi i funkcionišu kao donori elektrona. *Čistači kiseonika*, na primjer, askorbinska kiselina (vitamin C), askorбил palmitat, eritorbinska kiselina (d-izomer askorbinske kiseline) i njena natrijumova so i dr., koji reaguju sa kiseonikom i tako ga mogu ukloniti u zatvorenom sistemu. Regeneracija fenolnih antioksidanata askorbinskom kiselinom (prisutna u velikom broju voća i povrća) takođe je predložena da bi se objasnilo sinergističko dejstvo miješanih antioksidanata. *Sekundarni antioksidanti*, kao što su dilauril tiopropionat i tiodipropionska kiselina, koji funkcionišu razlaganjem lipidnih hidroperoksida u stabilne krajnje proizvode. *Enzimski antioksidanti* su glukoza oksidaza, superoksid dismutaza, katalaza, glutathion peroksidaza, itd. Ovi antioksidanti funkcionišu ili uklanjanjem rastvorenog/izlaznog kiseonika, npr. glukoza oksidazom, ili uklanjanjem visoko oksidativnih vrsta (iz sistema ishrane), npr. sa superoksid dismutazom. *Helatni agensi ili sekvestranti*, na primjer, limunska kiselina, aminokiseline, etilendiamintetra-sirćetna kiselina (EDTA), i dr., koji heliraju metalne jone kao što su bakar i gvožđe koji podstiču oksidaciju lipida kroz katalitičko dejstvo. Helati se ponekad nazivaju sinergistima jer u velikoj mjeri pojačavaju dejstvo fenolnih antioksidanata. Sadržaj pojedinih antioksidanata, kao što je vitamin C, u hrani se može mjeriti, ali nije izvodljivo mjeriti svaki antioksidant posebno, zato su razvijene metode za procjenu „ukupnog sadržaja antioksidanata“ u hrani. Jedna od najčešće korišćenih metoda je test redukcije gvožđa/antioksidanta (FRAP), koji je relativno jednostavan, brz, osjetljiv i jeftin za izvođenje. FRAP test je korišćen za procjenu bioraspoloživosti antioksidanata u hrani i za istraživanje efekata uslova uzgoja, skladištenja, obrade i metoda kuvanja na ukupan sadržaj antioksidanata u hrani (Hudson, 1990; Benzie i Choi, 2014).

Antioksidativna aktivnost kupine u prvom redu zavisi od sadržaja flavonoida i antocijana, dok su elagitanini odgovorni za čak 50 % antioksidativne aktivnosti kupine. Od flavonola u plodu kupine je najzastupljeniji katehin. Antocijanini u plodu kupine su od primarnog značaja (Sariburun i sar., 2010).

Plodovi kupine su proučavani od strane mnogih autora u pogledu antioksidativne moći, međutim, njihovi rezultati se ne mogu direktno porediti jedni sa drugima. Sirivoharn i saradnici (2004) i Pantelidis i saradnici (2007) istraživanjem su ustanovili da na antioksidativni kapacitet plodova kupine ne utiče ni vrijeme berbe ni mjesto gajenja. S druge strane, poređenje divljeg i gajenog voća dalo je značajne razlike: vrijednosti FRAP-a (Ferric Reducing Antioxidant Power) u gajenim uzorcima bile su veće od onih u samoniklom materijalu. Milivojević i saradnici (2011) primjetili su veći antioksidativni kapacitet u plodovima divlje kupine metodom ABTS (2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), dok Yilmaz i saradnici (2009) nisu otkrili nikakve razlike u plodovima divlje i pitome kupine metodom aktivnosti uklanjanja radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH). Korelaciona analiza za FRAP vrijednosti je rezultirala značajnim pozitivnim odnosima između divljih i kultivisanih uzoraka, kako u listovima ($r=0,6170$, $p<0,05$), tako i u plodovima ($r=0,6626$, $p<0,05$) (Koczka i sar., 2018).

Čini se da nivoi ukupne kiselosti, askorbinske kiseline, rastvorljivih čvrstih materija, antioksidativnog kapaciteta i polifenola (uključujući nivoe antocijanina) u sortama kupine više zavise od genotipa nego klime ili godišnjeg doba. Na primjer, genotipovi koji su najbolje prilagođeni klimatskim režimima na sjeverozapadu Pacifika pokazali su veći antioksidativni kapacitet od onih genotipova koji su prikladniji za topliju klimu u Meksiku. Međutim, najveći antioksidativni kapacitet je dobijen u divljoj kupini iz Patzcuara (Meksiko), što se može odnositi na visoku koncentraciju zaštitnih polifenolnih jedinjenja akumuliranih usljed veće izloženosti nezaštićenih divljih biljaka ekstremnim uslovima. Ukupni visok antioksidativni kapacitet kupine sugerise da konzumiranje ovog voća može igrati značajnu ulogu u borbi protiv slobodnih radikala (Reyes-Carmona i sar., 2005).

2.5. HEMIJSKI SASTAV KUPINE

Bezbjednost hrane je glavni problem javnog zdravlja širom svijeta. Zbog sve većeg rizika od kontaminacije hrane pesticidima, teškim metalima i toksinima, pitanja bezbjednosti hrane privlače pažnju istraživača. Kontaminacija teškim metalima je važna, posebno u sistemima poljoprivredne proizvodnje i zdravlja ljudi. Faktori koji utiču na koncentraciju teških metala u biljkama uključuju klimu, zagađenje životne sredine, prirodu zemljišta na kome se biljka uzgaja i stepen zrelosti biljke u vrijeme berbe. Svježe voće i povrće su od značaja u ishrani jer sadrže vitamine i mineralne soli. One su veoma važne i korisne komponente za održavanje boljeg zdravlja i prevenciju i liječenje raznih bolesti. Međutim, ove biljke sadrže i esencijalne i toksične metale u širokom rasponu koncentracija (Shaheen i sar., 2016).

Što je veća ukupna čvrsta materija, to je voće pogodnije i poželjnije za preradu. Generalno, najvećem udjelu u ukupnim čvrstim materijama voća doprinose ugljeni hidrati, odnosno šećeri. Organske kiseline, zajedno sa šećerima, igraju važnu ulogu u senzornim karakteristikama voća. Dominantna kiselina u bobičastom voću je limunska kiselina (Stajčić i sar., 2012).

Uprkos svim kvalitativnim promjenama koje je ljudska djelatnost doživjela tokom vremena, potreba za proizvodima koje priroda daje direktno i velikodušno nije smanjena. Raznolikost korišćenja koje nudi svaki prirodni resurs je najubjedljiviji dokaz njegove vrijednosti. Na primjer, kupina je istovremeno jestiva, ljekovita i medonosna, tako da se može klasifikovati kao veoma interesantna za nutricionizam (Vlad i sar., 2019).

U tabeli 1 prikazan je prosječan hemijski sastav ploda kupine računato na 100 g ploda (Vračar, 2001; Randelović, 2009).

Tabela 1. Prosječan hemijski sastav kupine na 100 g uzorka (Vračar, 2001).

Voda	84,5 %
Ukupni šećeri	7,3 %
Vrijednost pH	3,2
Ukupne kiseline	1,5 %
Pektin	0,4 %
Bjelančevine	1,2 %
Masti	0,9 %
Celuloza	4,1 %
Vitamin C	21 mg
Sadržaj K	180 mg
Sadržaj Mg	30 mg
Sadržaj Fe	0,9 mg
Sadržaj Ca	40 mg
Sadržaj vitamina B1 (Tiamin)	0,03 mg
Sadržaj vitamina B2 (riboflavin)	0,04 mg

Mineralne komponente su potrebne za procese u ljudskom tijelu; međutim, pošto tijelo ne može da ih sintetiše, treba ih redovno unositi ishranom. Metali kao što su bakar (Cu), cink (Zn) ili gvožđe (Fe) su neophodni za važne biohemijske i fiziološke funkcije i neophodni za održavanje dobrog zdravlja tokom života. Oni se kombinuju sa određenim proteinima da bi proizveli enzime koji djeluju kao katalizatori koji pomažu mnogim funkcijama tijela (Grembecka i Szefer, 2013).

Elementi se mogu klasifikovati u tri grupe (makrominerali, elementi u tragovima, ultra-elementi u tragovima). Makroelementi su definisani kao elementi potrebni odraslima u količinama većim od 100 mg/dan. Za odrasle, potrebe za elementima u tragovima su između 1 i 100 mg dnevno, dok su ultra

tragovi potrebni u manjim količinama od 1 mg/dan. Esencijalni elementi u tragovima su važni za vitalnu aktivnost sve dok ne prelaze preporučeni dnevni unos, inače mogu dovesti do štetnih efekata (Demir i sar., 2020).

U kupini preovlađujući minerali su kalijum (74,9–79,0 %), kalcijum (10,7–12,5 %) i magnezijum (9,3–12,8 %), dok natrijum ima nižu vrijednost (0,4–1 %). Kalijum je takođe primarni mineral drugog voća kao što su banana, urme, jagoda, malina, borovnica, brusnica, jabuka, breskva, morski trn, bor, papaja, avokado, kivi, mango. Iako su kalijum, kalcijum i magnezijum glavni minerali kupine, oni se ne smatraju njihovim primarnim izvorima s obzirom na to da se ovi minerali moraju unositi u velikim količinama (preko 100 mg/dan) da bi se obezbijedio referentni unos ishranom, sasvim drugačiji od mikrominerala (manje od 100 mg/dan) (Moraes i sar., 2021).

2.6. METODE EKSTRAKCIJE

Priprema uzoraka je najvažniji korak u analitičkom postupku pri bilo kojoj analizi (analiza hrane, bionaliza, forenzika, toksikologija, praćenje životne sredine itd.). To je ograničavajući faktor u hemijskoj analizi jer je dugotrajan i potencijalno može dovesti do grešaka. Niko ne može sumnjati da bi najbolji pristup bio direktno uvođenje uzorka u instrument, međutim to je rijetko izvodljivo. Efikasna prethodna obrada uzorka je neizbežno potrebna jer je tehnologija instrumenta proizvela veoma sofisticiranu i osjetljivu analitičku opremu. Stoga analitičari moraju da razviju i primjene odgovarajući protokol za pripremu uzorka koji obezbjeđuje da sastav uzorka ostane nepromijenjen, da se tokom rukovanja ne unosu nečistoće, da nema smetnji, da se koncentracija analita može kvantifikovati precizno i tačno i da je matrica uzorka kompatibilna sa analitičkom tehnikom. Tehnike ekstrakcije su najmoćnije oruđe u rukama analitičara i laboratorijskih praktičara (Samanidou, 2020). Ekstrakcije su način da se odvoji željena supstanca kada je pomješana sa drugim supstancama. Smješa se dovodi u kontakt sa rastvaračem u kome je supstanca od interesa (analit) rastvorljiva, ali su ostale prisutne supstance nerastvorljive. U ekstrakciji se koriste dvije faze koje se ne miješaju (poput ulja i vode) da bi se supstanca odvojila iz jedne faze u drugu. Odabirom najprikladnije metode može se smanjiti potrošnja uzorka i rastvarača (Extraction Process, Types & Techniques, 2022).

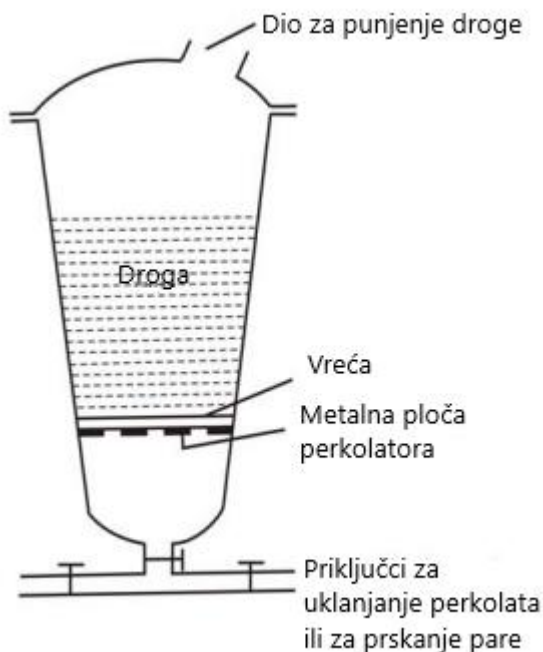
Neke od metoda ekstrakcije:

- Maceracija je tehnika koja se izvodi na sobnoj temperaturi. Koristi se u istraživanju ljekovitog bilja. Maceracija predstavlja jednokratnu ekstrakciju gdje se podrazumijeva ekstrakcija

usitnjenog biljnog materijala uz natapanje biljnog materijala (krupnog ili u prahu) u posudi sa odgovarajućim rastvaračem na sobnoj temperaturi. Materijali treba da omekšaju kako bi se oslobodile rastvorljive fitohemikalije. Ova metoda ima prednost zbog mogućnosti smanjenja razgradnje aktivnih materija (Singh, 2007; Gupta, 2012; Poljarec, 2017).

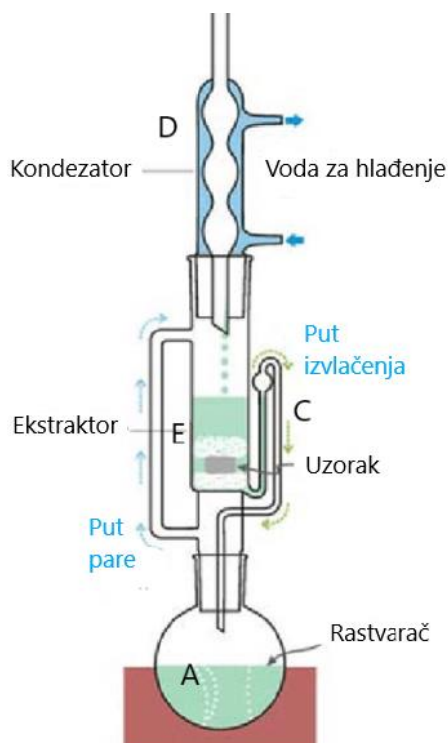
- Infuzi i dekokti koriste isti princip kao i maceracija; u oba slučaja se koristi natapanje hladnom ili vrućom vodom. Međutim, period maceracije za infuziju je kraći. Infuzi ili čajevi, pripremaju se od listova, cvjetova, cijelih nadzemnih djelova zeljaste biljke, a ponekad i od plodova, takvi su npr. infuzi od lista žalfije, medvjette, breze i koprive, cvijeta kamilice itd. Aktivne materije se iz biljaka ekstrahuju vrućom vodom, tako što se osušena i/ili usitnjena biljka prelije zagrijanom vodom do vrenja i ostavi poklopljena 5 do 15 minuta. Talog se zatim odvoji od tečnosti (Dragović-Uzelac, 2016; Poljarec, 2017). Hladni infuzi pripremaju se hladnom vodom i ostave preko noći. Kod pripreme ovakvih infuza potrebno je obratiti pažnju na čistoću i stabilnost, pogotovo ako se koriste biljke koje sadrže sluzi, a za koje se najčešće preporučuje ovaj način pripreme (Poljarec, 2017). Dekokcija je pogodna samo za ekstrakciju toplotno stabilnih jedinjenja, tvrdih biljnih materijala (npr. korijena i kore) i obično dovodi do izolovanja više jedinjenja rastvorljivih u ulju u poređenju sa maceracijom i infuzom. Zbog toga je u ovom slučaju za proces ekstrakcije aktivnih materija potrebno biljni materijal kuvati (otud i naziv dekokt), 5-15 minuta. Tako se npr. pripremaju dekokti od korijena čička, maslačka i koprive itd. (Dragović-Uzelac, 2016; Poljarec, 2017).
- Digestija je oblik maceracije u kojoj se vrši zagrijavanje do 40 °C tokom procesa ekstrakcije. Koristi se kada visoka temperatura nije nepoželjna. Time se povećava efikasnost rastvarača. U ovom procesu biljni material se tretira rastvaračima koji imaju nisku tačku ključanja npr. etanol, kako bi se povećala rastvorljivost slabo rastvorljivih materija (Handa i sar., 2008).
- Perkolacija je postupak koji se najčešće koristi za ekstrakciju aktivnih sastojaka kod pripreme tinktura i tečnih ekstrakata. Obično se koristi perkolator (slika 9). Čvrsti sastojci se navlaže odgovarajućom količinom navedenog rastvarača i ostave da odstoje oko 4 h u dobro zatvorenoj posudi, nakon čega se masa pakuje i zatvara vrh perkolatora. Doda se još rastvarača da se formira plitki sloj iznad mase i smješa se ostavi da macerira u zatvorenom perkolatoru 24 h. Izlaz iz perkolatora se zatim otvara i ostavi da tečnost iz njega polako kaplje. Dodatna količina rastvarača se dodaje po potrebi, sve dok perkolat ne izmjeri oko tri četvrtine potrebne zapremine gotovog proizvoda. Kožice voća se zatim presuju i iscjeđena tečnost se dodaje u

perkolat. Doda se dovoljno rastvarača da se dobije potrebna zapremina, a miješana tečnost se izbistri filtriranjem ili stajanjem, a zatim odvoji dekantacijom (Handa i sar., 2008).



Slika 9. Perkulator (Handa i sar., 2008)

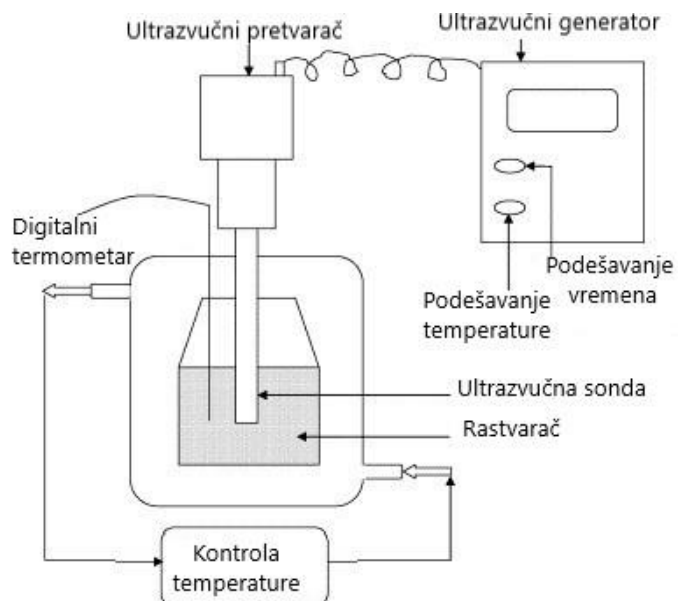
- Sokslet (Soxhlet) ekstrakcija ili vruća kontinuirana ekstrakcija je čvrsto-tečna ekstrakcija koja se izvodi pomoću Sokslet aparata (slika 10). Koristi se za izdvajanje jedne ili više komponenti iz čvrste faze rastvaranjem u tečnoj fazi. U ovoj metodi, fino mljevena droga se stavlja u poroznu vreću ili „naprstak“ od čvrstog filter papira, koji se stavlja u komoru E. Rastvarač za ekstrakciju u boci A se zagrijava, a njegove pare kondenzuju u kondenzatoru D. Kondenzovani ekstraktant kaplje u naprstak koji sadrži drogu i ekstrahuje ga kontaktom. Kada se nivo tečnosti u komori E podigne do vrha sifonske cijevi C, tečni sadržaj komore E se isprazni u posudu A. Ovaj proces je kontinuiran i izvodi se sve dok kap rastvarača iz cijevi sifona ne ostavi talog kada se ispari. Prednost ove metode u poređenju sa prethodno opisanim metodama je u tome što se velike količine droge mogu ekstrahovati sa mnogo manjom količinom rastvarača. Ovo utiče na ogromnu ekonomičnost u smislu vremena, energije i posljedično finansijskih inputa. U malom obimu, ova metoda ekstrakcije, koristi se samo kao serijski proces, ali postaje mnogo ekonomičnija i održivija kada se izvodi kontinuirano u srednjem ili velikom obimu (Handa i sar., 2008; Popsavin i sar., 2018; Zhang i sar., 2018).



Slika 10. Sokslet ekstrakcija (Dabbs i sar., 2006).

- Ekstrakcija uz pomoć mikrotalasne pećnice (MAE): Mikrotalasna ekstrakcija je jednostavna i ekonomična tehnika koja se koristi za ekstrakciju biološki aktivnih jedinjenja iz biljnog materijala. MAE koristi mikrotalasnu energiju da olakša razdvajanje analita iz matrice uzorka u rastvarač. Mikrotalasno zračenje u interakciji sa dipolima polarnih i polarizabilnih materijala (npr. rastvarači i uzorak) izaziva zagrijavanje blizu površine materijala i toplota se prenosi provodljivošću. Dipolna rotacija molekula je indukovana elektromagnetnim mikrotalasima. Zagrijavanje je veoma brzo i raste sa povećanjem dielektrične konstante rastvarača. U nepolarnim rastvaračima dolazi do slabog zagrijavanja. Zagrijavanjem dolazi do isparavanja i stvaranja visokog pritiska pare koja “razbija” ćelijski zid supstrata i oslobađa sadržaj u rastvarač. MAE se može smatrati selektivnom metodom koja favorizuje polarne molekule i rastvarače sa visokom dielektričnom konstantom (Gupta, 2012).
- Ultrazvučna ekstrakcija – UAE (slika 11) podrazumijeva korišćenje ultrazvuka u opsegu od 20 kHz do 2000 kHz. Mehanički efekat ultrazvučne akustične kavitacije povećava površinski kontakt između rastvarača i uzoraka i propustljivost ćelijskih zidova. Fizička i hemijska svojstva materijala podvrgnutih ultrazvuku se mijenjaju i narušava se ćelijski zid biljke; olakšano je oslobađanje jedinjenja i povećan je transport rastvarača u biljne ćelije. Procedura je jednostavna a tehnologija relativno jeftina, može se koristiti i u maloj i u većoj skali prilikom fitohemijske ekstrakcije. Prednosti UAE su smanjenje vremena ekstrakcije i smanjena

potrošnja skupih rastvarača. Međutim, upotreba ultrazvučne energije više od 20 kHz može uticati na aktivne fitohemikalije kroz stvaranje slobodnih radikala (Handa i sar., 2008; Azwanida, 2015).



Slika 11. Ultrazvučna ekstrakcija (Zhao i sar., 2007)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio ove master teze rađen je u laboratorijama za analitičku hemiju i instrumentalne metode, na Metalurško-tehnološkom fakultetu u Podgorici.

U ovom radu je korišćen suvi plod divlje (samonikle) i gajene (kultivisane) kupine sa teritorije Crne Gore. Plodovi divlje i gajene kupine su ručno ubrani 2021. godine u periodu tehničke zrelosti. Gajena kupina je sakupljena u okolini Podgorice, na plantaži kupine na Bioču, dok je divlja kupina sakupljena u okolini Bijelog Polja. Uzorci su osušeni na temperaturi od 40 °C.

3.1. HEMIKALIJE I INSTRUMENTI

Reagensi i rastvori koji su korišćeni za ovaj eksperimentalni rad su: etanol, natrijum-karbonat (Na_2CO_3), Folin–Ciocalteu reagens (FC reagens), galna kiselina, natrijum-nitrit (NaNO_2), natrijum-hidroksid (NaOH), aluminijum(III)-hlorid (AlCl_3), kvercetin, metanol, hlorovodonična kiselina (HCl), kožni prah, pirogallol, acetatni pufer, 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ), gvožđe(III)-hlorid-heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), etanol, 2,2-diphenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), azotna kiselina (HNO_3) i vodonik peroksid (H_2O_2). Sve hemikalije su analitičke čistoće. Za pravljenje rastvora korišćena je destilovana voda.

Od instrumenata korišćeni su sušnica, peć za žarenje, ultrazvučno kupatilo Sonic, Sokslet aparatura, spektrofotometar BUCK Scientific 105 UV-VIS spectrophotometer i atomski apsorpcioni spektrometar Perkin Elmer PinAAcle 900T.

3.2. PRIPREMA BILJNOG MATERIJALA

Osušeni plodovi kupine (*Rubus fruticosus*), divlje i gajene su sameljeveni i čuvani na suvom mjestu do početka eksperimenata.

- Za pripremu infuza (ekstrakcija vrelom vodom): 10 g usitnjene kupine (divlja ili gajena) je preliveno sa 150 ml proključale vode, pokriveno sahatnim staklom i ostavljeno da ključa 2 minuta. Nakon stajanja od 30 minuta ekstrakt je profiltriran u suhu tariranu času i uparen do suva na temperaturi od 40 °C. Čaša sa uparenim infuzom do suva ostavljena je u sušnicu preko noći na 30 °C, a nakon toga je određivan prinos ekstrakcije.

- Za ultrazvučnu ekstrakciju: 5 g usitnjene kupine (divlja ili gajena) preliveno je sa 30 ml etil-alkohola 75 %. U ultrazvučnom kupatilu vršna je ekstrakcija 30 minuta na 50 °C. Nakon tog vremena ekstrakt je profiltriran u suhu tariranu čašu i uparen do suva na temperaturi od 40 °C. Čaša sa uparenim ekstraktom do suva ostavljena je u sušnici preko noći na 30 °C, a nakon toga je određivan prinos ekstrakcije.
- Postupak za maceraciju bio je isti kao za ultrazvučnu ekstrakciju samo što je maceracija vršena sat vremena.
- Za ekstrakciju po Soksletu: 10 g usitnjene kupine (divlja ili gajena) preliveno je sa 300 ml 70 %-tnog etil-alkohola i izvedena ekstrakcija na temperaturi ključanja 70 % etil-alkohola. Nakon ključanja temperatura je smanjena. Postupak ekstrahovanja je ponovljen tri puta. Ekstrakt je profiltriran i uparen do suva na temperaturu od 40 °C i osušen preko noći u sušnici na 30 °C radi određivanja prinosa ekstrakcije.
- Za mineralizaciju: 2 g uzorka je žareno 3 sata na 450 °C u porcelanskom lončiću. Nakon hlađenja u lončić je dodato 5 ml HCl (0,1 mol/l). Rastvor je prenet u normalni sud od 50 ml a lončić isperan rastvorom HNO₃ (0,1 mol/l) pa je i taj dio dodat u isti normalni sud. Sud je dopunjen do crte 0,1 mol/l rastvorom HNO₃. Radni rastvori su napravljeni od osnovnog rastvora i razređeni 0,1 mol/l rastvorom HNO₃.

U tabeli 2 prikazan je prinos ekstrakata divlje i gajene kupine dobijenih različitim tehnikama ekstrakcije, izražen u % (grami ekstrakta (suva materija) po 100 g suve biljke).

Tabela 2. Prinos ekstrakta (%) divlje i gajene kupine dobijen različitim tehnikama ekstrakcije

	Divlja kupina	Gajena kupina
Infuz	40,33	37,12
Maceracija	23,21	19,94
Sokslet ekstrakcija	74,98	69,10
Ultrazvučna ekstrakcija	34,98	32,14

Prinos ekstrakata divlje i gajene kupine kretao se od 19,94 % do 74,98 %. Pokazalo se da su veće vrijednosti za prinos ekstrakata divlje kupine nego gajene kupine. Najveći prinos ekstrakta dobijen je Sokslet ekstrakcijom a najmanji maceracijom.

3.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE FENOLA, FLAVONOIDA, TANINA I ANTOCIJANA U EKSTRAKTIMA DIVLJE I GAJENE KUPINE

Spektrofotometrija je apsorpciona analitička metoda koja se zasniva na proučavanju zavisnosti apsorpcije ultravioletnog i vidljivog monohromatskog zračenja koje prolazi kroz ispitivanu supstancu od talasne dužine. Priroda ove interakcije zavisi od fizičkih svojstava materijala, stoga se spektrofotometrijska mjerenja mogu koristiti za kvantifikovanje važnih fizičkih osobina materijala. Izbori spektrofotometrijskih mjerenja uključuju spektralnu refleksiju, propusnost, apsorpciju, emisiju, rasijanje i fluorescenciju i mogu se klasifikovati kao fenomenološka optička svojstva materijala. Spektrofotometrijska mjerenja se takođe mogu koristiti za ispitivanje unutrašnje fizičke prirode materijala, kao što su njegov indeks prelamanja i koeficijent ekstinkcije. Teorijski gledano, ova metoda se može koristiti i za kvalitativnu hemijsku analizu jer izgled apsorpcionog spektra zavisi od sastava i strukture supstance, ali razvojem novih metoda strukturne analize kao što su infracrvena i nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija, upotreba spektrofotometrije je svedena gotovo isključivo na kvantitativnu analizu (Germer i sar., 2014).

3.3.1. Određivanje sadržaja fenola

Ukupni fenoli su određeni po modifikovanoj metodi Folin-Ciocalteu (FC) (Brašanac-Vukanović i sar., 2018). FC metoda je antioksidativni test zasnovan na prenosu elektrona, koji mjeri redukcionu kapacitet antioksidansa. Ima široku primjenu u određivanju ukupnog sadržaja fenola/polifenola u hrani biljnog porijekla i biološkim uzorcima (Lamuela-Raventós, 2017).

Za određivanje ukupnih fenola korišćen je osnovni i radni rastvor Folin-Ciocalteu (osnovni rastvor je razblažen vodom u odnosu 1:10), 7,5 % rastvor Na_2CO_3 , ekstrakti biljaka i standardni rastvor galne kiseline. Nakon inkubacije od 90 minuta očitane su apsorbancije pripremljenih rastvora na talasnoj dužini od 725 nm. Za kalibracionu krivu napravljena je serija standardnih rastvora galne kiseline (od 5 do 35 mg/ml). Konstruisana kalibraciona kriva je pokazala linearnu regresiju sa $R^2 > 0,99$. Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenata galne kiseline po gramu suvog ekstrakta.

3.3.2. Određivanje sadržaja flavonoida

Za određivanje flavonoida korišćena je metoda koja je opisana u Evropskoj farmakopeji Ph. Eur. 9.0 (Council of Europe, 2016). Sadržaj flavonoida određivan je spektrofotometrijskom metodom sa aluminijum-hloridom sa određenim modifikacijama (Brašanac-Vukanović i sar., 2018) a korišćeni su ekstrakti biljaka, 5 % NaNO₂, 1 % AlCl₃ i 1 mol/l NaOH. Apsorbancije pripremljenih rastvora su očitavane na talasnoj dužini od 415 nm. Za izradu kalibracione krive korišćena je serija standardnih rastvora kvercetina (početne koncentracije 1 mg/l). Srednja vrijednost rezultata tri nezavisna mjerenja je izražavana kao miligrami kvercetina po gramu suvog ekstrakta. (Council of Europe, 2016).

3.3.3. Određivanje sadržaja antocijana

Sadržaj antocijana u ekstraktima divlje i gajene kupine određen je metodom koja je opisana Evropskoj Farmakopeji Ph. Eur. 9.0. (Council of Europe, 2016) i u radu Brašanac-Vukanović i saradnici (2018). Za određivanje sadržaja antocijana korišćeni su ekstrakti divlje i gajene kupine, metanol i 0,1% rastvor hlorovodonične kiseline u metanolu. Apsorbancija je mjerena na talasnoj dužini od 528 nm. Procenat antocijana u ekstraktima divlje i gajene kupine izražen preko cijanidin-3-glukozid hlorida izračunat je po formuli:

$$\frac{A \times 5000}{718 \times m}$$

gdje je:

A – apsorbancija na 528 nm,

m – masa ispitivane supstance izražene u gramima.

3.3.4. Određivanje sadržaja tanina

Metoda koja je korišćena, u ovom radu, za određivanje tanina opisana je u Evropskoj Farmakopeji Ph. Eur. 9.0. (Council of Europe, 2016). Sadržaj tanina je izračunat na osnovu razlike u apsorbanci ukupnih polifenola (A₁) dobijenih nakon ekstrakcije uzoraka divlje i gajene kupine fosfomolibdovolfraimovim reagensom u alkalnoj sredini i polifenola koji se ne adsorbuju na kožni prah (A₂). Apsorbancije su izmjerene na talasnoj dužini od 760 nm.

Sadržaj tanina izračunat je pomoću formule i izražen kao procenat pirogalola:

$$\frac{62.5(A_1 - A_2) \times m_2}{A_3 \times m_1}$$

gdje je:

A_1 – apsorbancija ukupnih polifenola,

A_2 – apsorbancija polifenola koji ne reaguju na kožni prah,

A_3 – apsorbancija pirogalola,

m_1 – masa uzorka divlje i gajene kupine,

m_2 – masa pirogalola.

3.4. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI U EKSTRAKTIMA DIVLJE I GAJENE KUPINE

3.4.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti primjenom FRAP testa

FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) test je jednostavan, automatizovan test koji se koristi za procjenu „antioksidativne moći“. Redukcija jona Fe(III) u Fe(II) pri niskom pH dovodi do formiranja obojenog kompleksa Fe(III) -tripiridiltriazina koji dostiže apsorpcijski maksimum na 539 nm. FRAP analiza je jeftina, reagensi se jednostavno pripremaju, rezultati su veoma ponovljivi, a procedura je jednostavna i brza (Benzie i Strain, 1999).

Analiza je vršena tako što su korišćeni etanolni ekstrakti divlje i gajene kupine i svježe pripremljen FRAP reagens (25 ml 300 mmol/l acetatnog pufera, pH vrijednosti 3,6; 2,5 ml 10 mmol/l rastvora TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) u 40 mM rastvoru HCl i 2,5 ml 20 mmol/l rastvora $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Nakon inkubiranja od 30 min na temperaturi od 37 °C, mjerena je apsorbancija na talasnoj dužini od 593 nm. Za konstrukciju kalibracione krive korišćena je serija standardnih rastvora gvožđa u koncentracionom opsegu od 100 do 1000 mmol/l pravljen od $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ u FRAP reagensu. Rezultati su izraženi kao milimolovi Fe^{2+} jona po gramu suvog ekstrakta (mmol Fe^{2+} /g) (Benzie i Strain, 1999).

3.4.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti primjenom DPPH testa

Za procjenu antioksidativne aktivnosti najčešće se koristi DPPH test. Ovdje se radikal neutrališe prihvatanjem ili atoma vodonika ili elektrona iz antioksidativne vrste (ili redukcionih agenasa) tokom čega se na kraju procesa pretvara u redukovani oblik (DPPH ili DPPH-H). Rezultati se obrađuju ili

kao ekvivalent standardne reference (Trolox, galna kiselina, askorbinska kiselina) ili kao IC₅₀ (Bibi Sadeer i sar, 2020).

Molekul 1,1-difenil-2-pikril-hidrazila (α,α -difenil- β -pikrilhidrazil; DPPH) karakteriše se kao stabilan slobodni radikal zahvaljujući delokalizaciji slobodnog elektrona preko molekula u cjelini, tako da molekuli ne dimerizuju, kao što bi bio slučaj sa većinom drugih slobodnih radikala. Delokalizacija takođe dovodi do ljubičaste boje, koju karakteriše apsorpciona traka u rastvoru etanola sa maksimumom na oko 520 nm. Kada se rastvor DPPH pomješa sa rastvorom supstance koja može da donira atom vodonika, onda to dovodi do redukovanog oblika sa gubitkom ove ljubičaste boje (iako bi se očekivalo da postoji zaostala blijedo žuta boja iz još prisutne grupe pikrila) (Molyneux, 2003). U rastvor ekstrakta divlje ili gajene kupine doda se etanolni rastvor DPPH (0,002 g DPPH se rastvori u 50 ml etanola). Apsorbancija navedenih smješa je mjerena nakon 30 min inkubiranja na sobnoj temperaturi, na talasnoj dužini od 517 nm, uz etanol kao slijepu probu. Procenat inhibicije DPPH izračunat je prema sledećoj formuli (Blois, 1958):

$$\% \text{ DPPH} = 100 - \left[(A_s - A_B) \times \frac{100}{A_c} \right]$$

gdje je:

A_B – apsorbancija uzoraka bez tretiranja DPPH rastvorom,

A_s – apsorbancija uzoraka koji su tretirani sa DPPH rastvorom,

A_c – apsorbancija etanolnog rastvora DPPH.

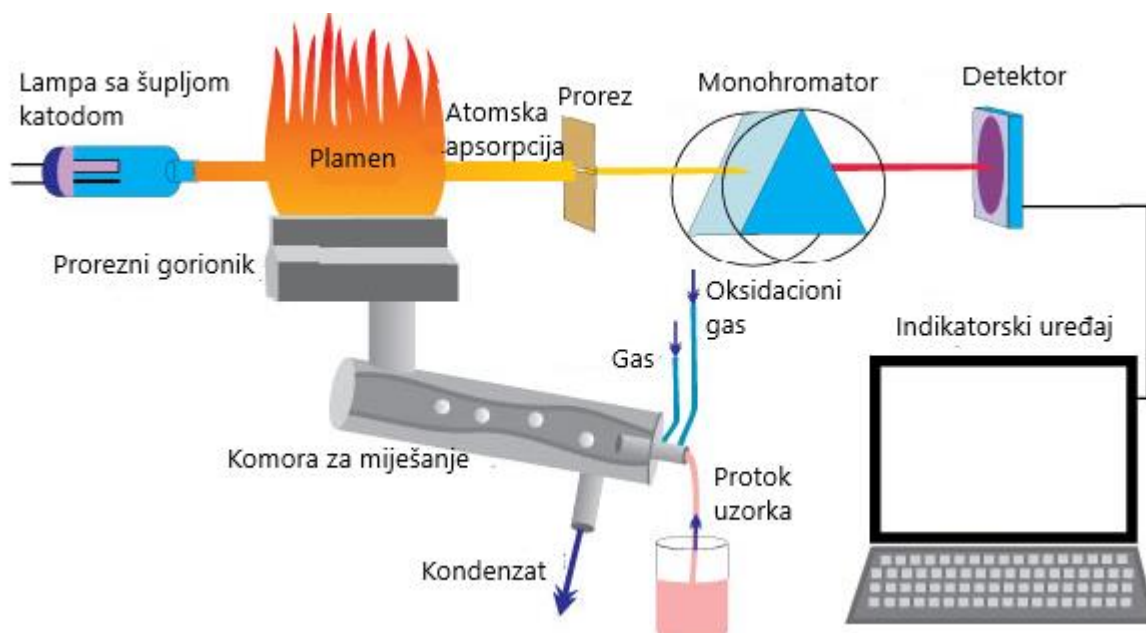
Koncentracija uzorka koja dovodi do neutralizacije 50 % DPPH radikala predstavlja IC₅₀ vrijednost (Fausto Rivero-Cruz i sar., 2020).

3.5. ODREĐIVANJE TEŠKIH METALA U EKSTRAKTIMA DIVLJE I GAJENE KUPINE

Atomska apsorpciona spektrometrija (AAS) je tehnika koja je iskorišćena za određivanje koncentracije elemenata prisutnih u uzorcima mjerenjem apsorbovanog zračenja od strane hemijskog elementa od interesa. Atomska apsorpciona spektroskopija je metoda kod koje se mjeri smanjenje intenziteta upadnog zračenja pri prolasku kroz atomsku paru. Pošto su energetske prelazi unutar atoma kvantirani i zavise isključivo od strukture odn. vrste atoma, prema talasnoj dužini apsorbovanog zračenja može se odrediti sastav ispitivanog uzorka. Atomi apsorbuju ultraljubičastu ili vidljivu svjetlost i prelaze na više energetske nivoe. Metodom atomske apsorpcije mjeri se količina energije u obliku fotona svjetlosti koju apsorbuje uzorak. Samo atomi koji su u nepobuđenom stanju, mogu da

apsorbuju karakteristično zračenje. Jedan od najpogodnijih načina za dobijanje atomske pare jeste plamen. Najveća talasna dužina svjetlosti koju atomi metala u nepobuđenom stanju mogu da apsorbuju naziva se rezonantna talasna dužina ili rezonantna linija i nalazi se u UV-VIS spektralnoj oblasti. Određivanje nepoznate koncentracije elemenata primjenom atomske apsorpcione spektroskopije zasniva se na metodi kalibracione krive. U atomskoj apsorpcionoj spektroskopiji koriste se specijalni izvori zračenja koji daju linije sa izuzetno uskim poluširinama. Najviše se koristi lampa sa šupljom katodom. Monohromator koji se koristi u atomskoj apsorpcionoj spektroskopiji mora biti velike rezolucije jer pomoću disperzionog elementa treba da propusti kroz izlazni razrez svjetlosni zrak s najužim intervalom talasnih dužina, odn. da propusti samo rezonantnu liniju. Kao detektori koriste se fotomultiplikatori. Fotostruja, čija je jačina srazmjerna intenzitetu svjetlosti, registruje se kao pik čija visina odgovara koncentraciji analiziranog elementa (Aminu i sar., 2022). Šema atomskog apsorpcionog spektrometra prikazana je na slici 12.

Atomska apsorpciona spektroskopija je poželjna analitička tehnika zbog svoje osjetljivosti, to je jedna rutinska metoda za određivanje tragova metala u raznim uzorcima, može se koristiti za analizu koncentracije preko 62 različita metala u različitim uzorcima. AAS se, takođe, može koristiti za analizu elemenata kao što su arsen, antimon, kalaj, selen, bizmut i živa tehnikama bez plamena (Salik, 2018).



Slika 12. Šematski prikaz atomskog apsorpcionog spektroskopa, (Chemistry, 2019)

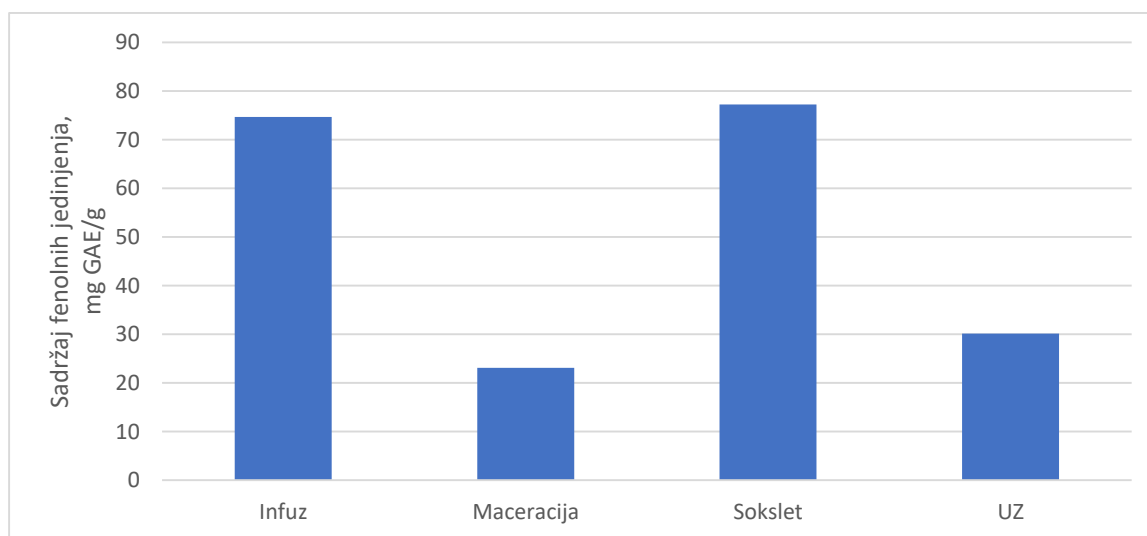
4. REZULTATI I DISKUSIJA

Brojni parametri, kao što su sorta, uslovi uzgoja, berba, faza zrelosti, uslovi transporta i rukovanja utiču na hemijski sastav voća. Pored toga, na dobijene rezultate utiču i metode pripreme uzoraka (zamrzavanje, temperatura skladištenja, vrijeme skladištenja itd.), kao i hemijske analize. Iz ovih razloga može biti prilično težak posao interpretirati i uporediti rezultate koje su dobili različiti istraživači.

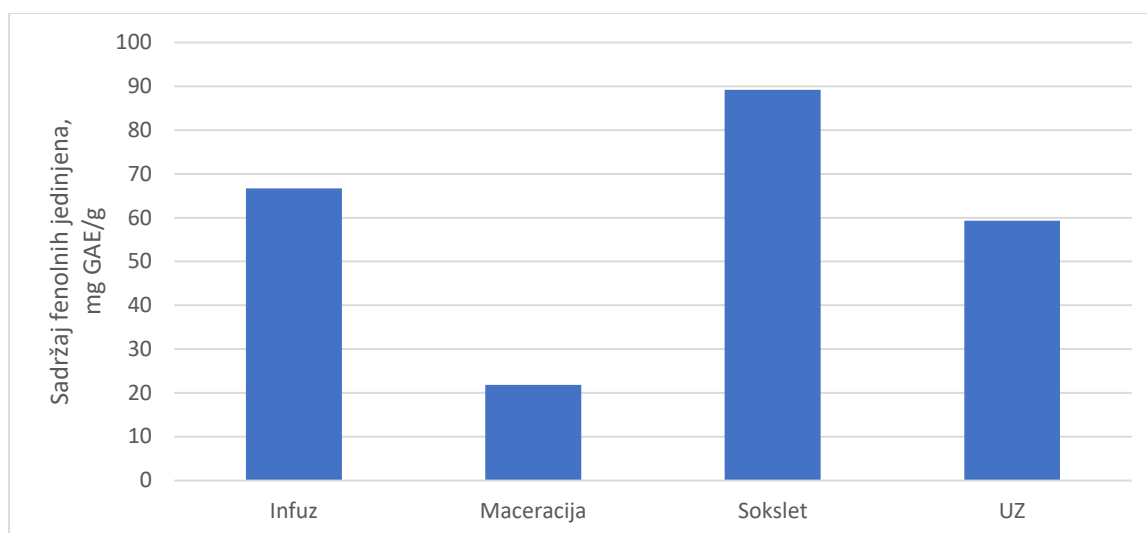
4.1. SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA U EKSTRAKTIMA DIVLJE I GAJENE KUPINE

U ekstraktima ploda divlje i gajene kupine: infuz, maceracija, Sokslet i ultrazvučna ekstrakcija određen je sadržaj ukupnih fenola. Sadržaj ukupnih fenola je izražen u mg galne kiseline na gram ekstrakta (suve materije). Kalibraciona kriva koja je korišćena za određivanje ukupnih fenola u ekstraktima divlje i gajene kupine je prikazana na slici 14.

Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima divlje kupine (grafikon 1) je iznosio: 23,094 mg GAE/g (maceracija), 30,117 mg GAE/g (UZ), 74,68 mg GAE/g (infuz) i 77,26 mg GAE/g (Sokslet), dok je sadržaj ukupnih fenola (grafikon 2) u ekstraktima gajene kupine iznosio: 21,78 mg GAE/g (maceracija), 59,31 mg GAE/g (UZ), 66,67 mg GAE/g (infuz) i 89,17 mg GAE/g (Sokslet).

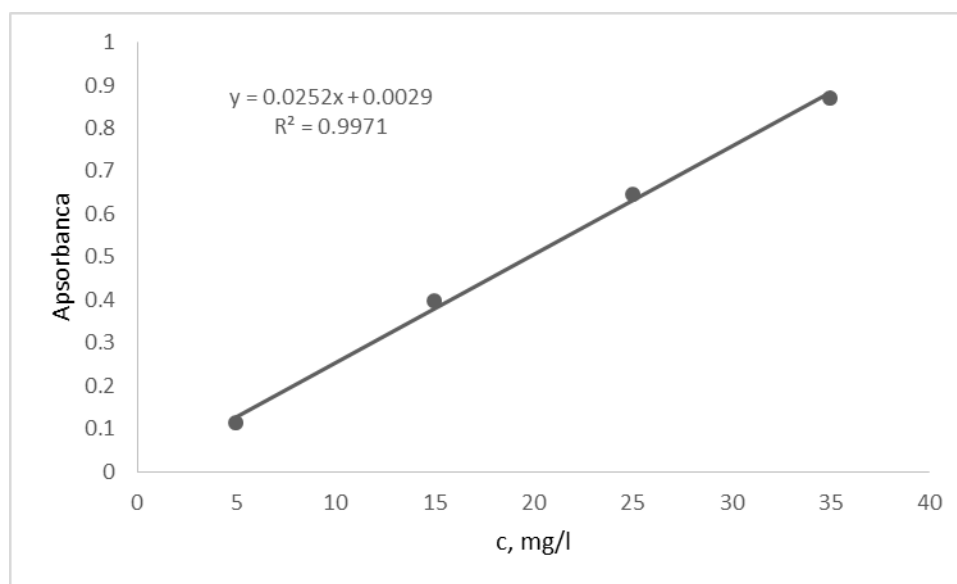


Grafikon 1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima divlje kupine.



Grafikon 2. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima gajene kupine.

Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima dobijenim po Sokslet-u i divlje i gajene kupine bio najveći, dok je sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim maceracijom bio najniži. Pokazalo se da su vrijednosti dobijene za infuz i ekstrakciju maceracijom veće kod divlje kupine, dok ekstrakti dobijeni Sokslet ekstrakcijom i ultrazvučnom ekstrakcijom pokazuju veće vrijednosti kod gajene kupine. Dobijeni rezultati mogu se porediti sa drugim istraživanjima jer su izražavani istim jedinicama i dobijeni su slični rezultati.



Slika 13. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje ukupnih fenola u divljoj i gajenoj kupini.

U ekstraktima divlje kupine sa područja Bosne i Hercegovine nađen je visok sadržaj fenolnih jedinjenja, 40,18 mg GAE/g (Jazić, 2019). Vršeno je i ispitivanje sadržaja fenola u ekstraktima različitog bobičastog voća sa područja Srbije i utvrđen visok sadržaj ukupnih fenola kod ekstrakata

kupine (oko 80 mg GAE/g). U istom istraživanju se pokazalo da pri istim uslovima ekstrakcije ekstrakti kupine sadrže više ukupnih fenola od ekstrakata maline, ali da imaju manji sadržaj fenola u poređenju sa ekstraktima borovnice (Vinčić, 2017).

U istraživanju Milenković Anđelković (2016) veći sadržaj ukupnih fenola utvrđen je u ekstraktima divlje kupine u odnosu na gajenu kupinu, i on je kod divlje iznosio 1391,52 mg GAE/kg, a kod gajene 791,87 mg GAE/kg. Ukupni fenoli kod divlje kupine bili su za 45,97 % veći u odnosu na gajenu kupinu.

Istraživanjem Čujića i saradnika utvrđeno je da divlja kupina ima veći sadržaj fenola u poređenju sa divljim jagodama i malinama koji je iznosio 2,74 mg GAE/g i da sa porastom nadmorske visine raste sadržaj fenola i antocijana u plodovima ispitivanog bobičastog voća (Čujić i sar., 2011).

Istraživanjem različitih sorti kupine, Yilmaz i saradnici utvrdili su da se ukupni sadržaj fenola svježih sorti kupine na 100 g kretao od 584,0 mg GAE u sorti Bartin do 788,0 mg GAE u sorti Chester. Prosječan ukupan sadržaj fenola kod devet sorti kupine bio je 758,0 mg GAE/100 g svježe mase. S druge strane, ukupan sadržaj fenola u divljim kupinama bio je između 610 mg i 1455 mg GAE na 100 g svježe mase. Prosječan ukupan sadržaj fenola divljih genotipova bio je 951,3 mg GAE/100 g svježe mase, što ukazuje na veću vrijednost u odnosu na gajene sorte. Rezultati dobijeni za ukupne fenole pokazali su da postoje velike varijacije u sadržaju ukupnih fenola kako između različitih sorti tako i između divljih i gajenih kupina (Yilmaz i sar., 2011).

Milivojević i saradnici su takođe identifikovali veći sadržaj ukupnih fenola u sortama divljih kupina (4,69 mg GAE/g svježe mase i 3,20 mg GAE/g svježe mase) nego u sortama gajenih kupina (1,74 mg GAE/g svježe mase i 1,97 mg GAE/g svježe mase) (Milivojević i sar., 2010).

U istraživanju Marjanović-Balaban i saradnika sadržaj ukupnih fenola u divljim kupinama se kretao 110 mg/g do 180 mg/g (Marjanovic-Balaban i sar., 2012)., dok je Okatan dobio rezultate za ukupne fenole u divljoj kupini od 518,66 mg GAE/100 g svježe mase (Okatan, 2020).

Hassimotto i saradnici su određivali fizičko-hemijske karakteristike i bioaktivna jedinjenja u pet vrsta kupina koje rastu u Brazilu. Sadržaj ukupnih fenola u ovih pet vrsta kupina iznosio je 499 mg /100 g, 341 mg/100 g, 373 mg/100 g, 427 mg/100 g, 408 mg/100 g (Hassimotto i sar., 2008).

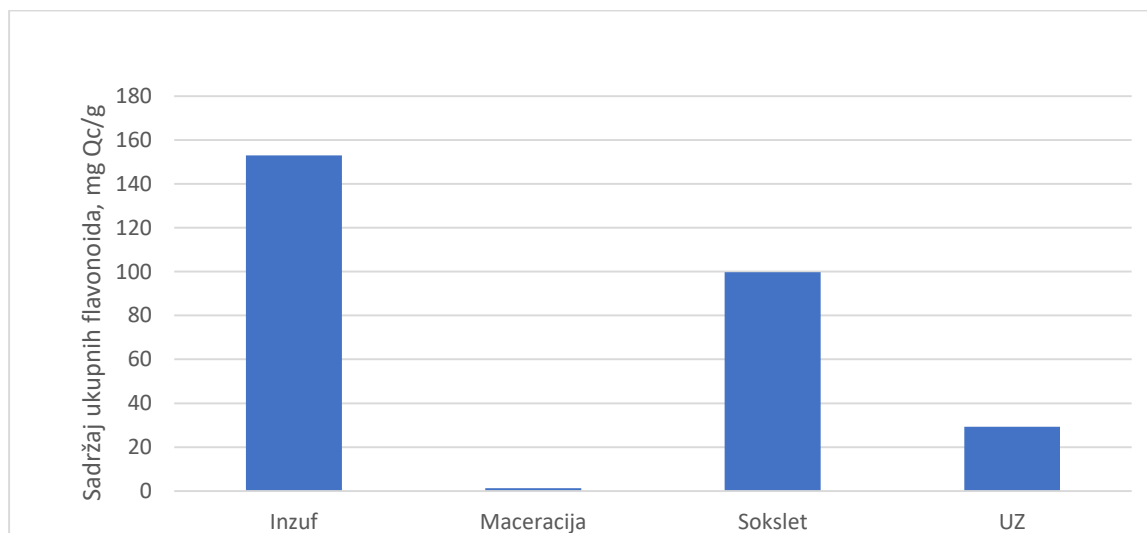
Koczka i saradnici su određivali ukupne fenole i antioksidativnu sposobnost divlje i gajene kupine za vrijeme sazrijevanja. U ovoj studiji, zreli plodovi kupine su ubrani tri puta tokom perioda zrenja, ali nisu nađene razlike u ukupnim fenolima ni za vrijeme uzorkovanja niti za tri mjesta uzgoja. Međutim, uočene su značajne razlike između divljeg i kultivisanog voća. Sorta "Thornfree" se u uzorcima sa svakog uzgajališta odlikovala značajno većim ukupnim sadržajem fenola od plodova ubranih divljih kupina. Sadržaj ukupnih fenola kretao se oko 2 000 mg GAE/100 g suve mase (Koczka i sar., 2018).

Celant i saradnici su određivali fenolna jedinjenja u vodenim i etanolnim ekstraktima kupina. Ukupna fenolna jedinjenja kretala su se od 8,47 do 11,66 mg GAE/g svježe mase u vodenom rastvaraču i od 8,23 do 14,98 mg GAE/g svježe mase u 80 %-tnom etanolu. U ovom istraživanju se pokazalo da je 80 %-tni etanol efikasniji rastvarač ukupnih fenola od vode za sorte Arapaho i Guarani, ali je vodeni rastvarač bio efikasniji za sorte Brazos i Tupi. Za sortu Choctav nije bilo značajnih razlika u rezultatima ekstrakcije dobijenim primjenom različitih rastvarača. Bez obzira na rastvarač koji je korišćen u ekstrakciji, najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja se pokazao u sorti Arapaho. Ovi rezultati pokazuju da efikasnost vode i etanola 80 %-tnog za ekstrakciju ukupnih fenola zavisi od sorte kupine (Celant i sar., 2016).

Sadržaj ukupnih fenola u Brazos i Tupi kupini u istraživanju Zafra-Rojas i saradnika iznosio je 4016,43 mg GAE/100 g suve mase (Zafra-Rojas i sar., 2020).

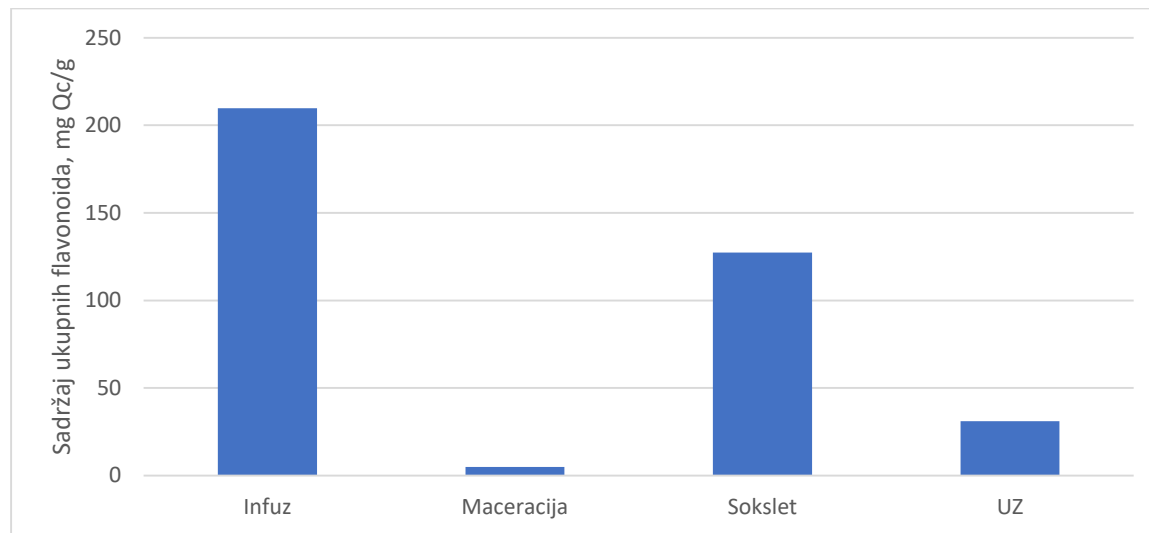
4.2. SADRŽAJ UKUPNIH FLAVONOIDA U EKSTRAKTIMA DIVLJE I GAJENE KUPINE

U ekstraktima ploda divlje i gajene kupine: ekstrakcija vrelom vodom (infuz), ekstrakcija maceracijom, Sokslet ekstrakcija i ultrazvučna ekstrakcija utvrđen je sadržaj ukupnih flavonoida. Sadržaj flavonoida je izražen u mg kvercetina na gram ekstrakta (suve materije). Na slici 14 prikazana je kalibraciona kriva koja je korišćena za određivanje ukupnih flavonoida u divljoj i gajenoj kupini. Ispitivanjem ekstrakata ploda divlje kupine nađeno je da je sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktu vrelom vodom (infuz) iznosio 152,93 mg Qc/g, u ekstraktu maceracijom 1,350 mg Qc/g, u ekstraktu po Soksletu 99,739 mg Qc/g, a u ekstraktu dobijenom ultrazvučnom ekstrakcijom 29,28 mg Qc/g (grafikon 3).



Grafikon 3. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima divlje kupine.

U ekstraktima gajene kupine (grafikon 4), sadržaj ukupnih flavonoida iznosio je 209,675 mg Qc/g (infuz), 4,965 mg Qc/g (maceracija), 127,266 mg Qc/g (ekstrakcija po Soksletu) i 31,126 mg Qc/g (ultrazvučna ekstrakcija).



Grafikon 4. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima gajene kupine.

Na osnovu dobijenih rezultata ustanovljeno je da je sadržaj flavonoida u ekstraktima gajene kupine veći nego u ekstraktima divlje kupine. Takođe je utvrđeno da ekstrakt vreloom vodom (infuz) ima najveći sadržaj flavonoida, dok je u ekstraktu dobijenom maceracijom taj sadržaj najniži i kod divlje i kod gajene kupine. Rezultati koji su dobijeni u ovom master radu se znatno razlikuju od literaturnih podataka. Pregledom literature i poređenjem literaturnih podataka drugih istraživača nađeno je da divlja kupina ima veći sadržaj flavonoida od gajene kupine. Takođe je pregledom literature nađeno da je sadržaj flavonoida u kupini visok.

U istraživanju Milenković Anđelković sadržaj flavonoida u kupini se kretao od 60 do 500 mg QE/kg. Huang i saradnici su za ukupne flavononoide u kupini sa područja Nanjina dobili vrijednosti od 11,83 izraženo kao mg rutina/g suve mase (Huang i sar., 2012).

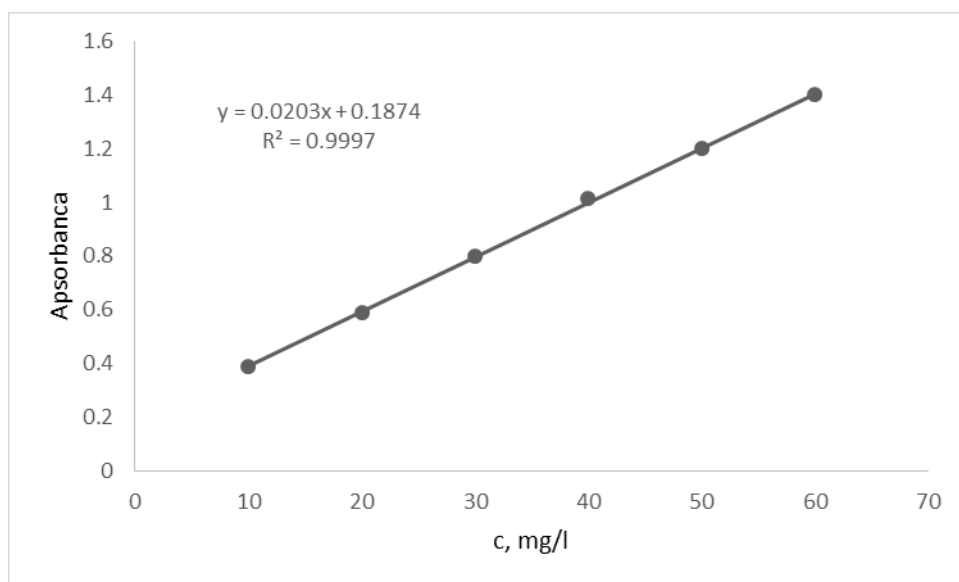
U istraživanju Schulz i saradnika (2019) nađena je visoka koncentracija flavonoida od kojih je najviše bilo kvercetina od 5509,61 do 9149,75 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ suve mase i izokvercitrina od 1526,86 do 1888,51 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ suve mase.

Celant i saradnici (2016) su u nekoliko sorti kupine određivali sadržaj ukupnih flavonoida. U sorti Guarani su ustanovili najveći sadržaj ukupnih flavonoida 1,14 mg QE/g svježe mase, a u sorti Brazos najmanji 0,46 mg QE/g svježe mase. U istom istraživanju u sortama Tupy, Arapaho i Choctaw nađen je sadržaj ukupnih flavonoida od 0,85, 0,86 i 0,62 mg QE/g svježe mase.

U istraživanju Jazića (2019) sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima dvije sorte divlje kupine iznosio je 5,27 i 6,91 mg QE/g suve mase, dok je sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima dvije sorte gajene kupine iznosio 3,10 i 3,61 mg QE/g suve mase.

Vinčić (2017) u svom istraživanju prijavljuje sadržaj ukupnih flavonoida u kupini Thornfree oko 50 mg RE/g, u Čačanskoj bestrnoj 40 mg RE/g, dok je kod Vulić i saradnika (2011) sadržaj ukupnih flavonoida u kupini iznosio 245,48 mg/100 g svježeg tropa. Za čačansku bestrnu kupinu Stajčić i saradnici (2012) prijavljuju sadržaj ukupnih flavonoida 143,33 mg RE/100 g svježe mase, a za Thornfree kupinu 172,95 mg RE/100 g svježe mase.

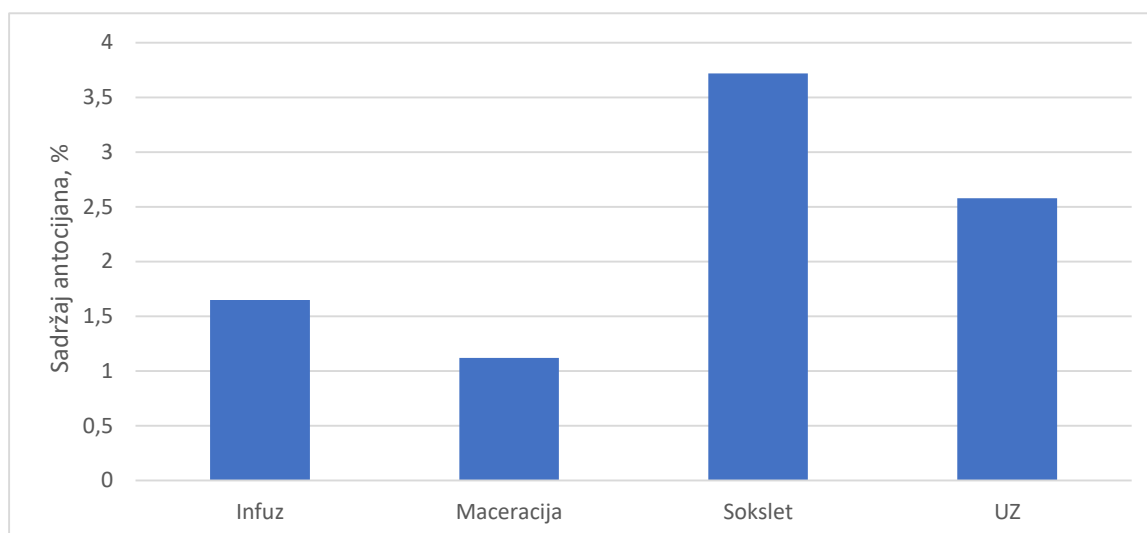
Kod Sariburun i saradnika (2010) sadržaj ukupnih flavonoida u nekoliko sorti kupina se kretao od 29,07 mg CTE /100 g do 82,21 mg CTE/100 g svježe mase.



Slika 14. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje ukupnih flavonoida u divljoj i gajenoj kupini.

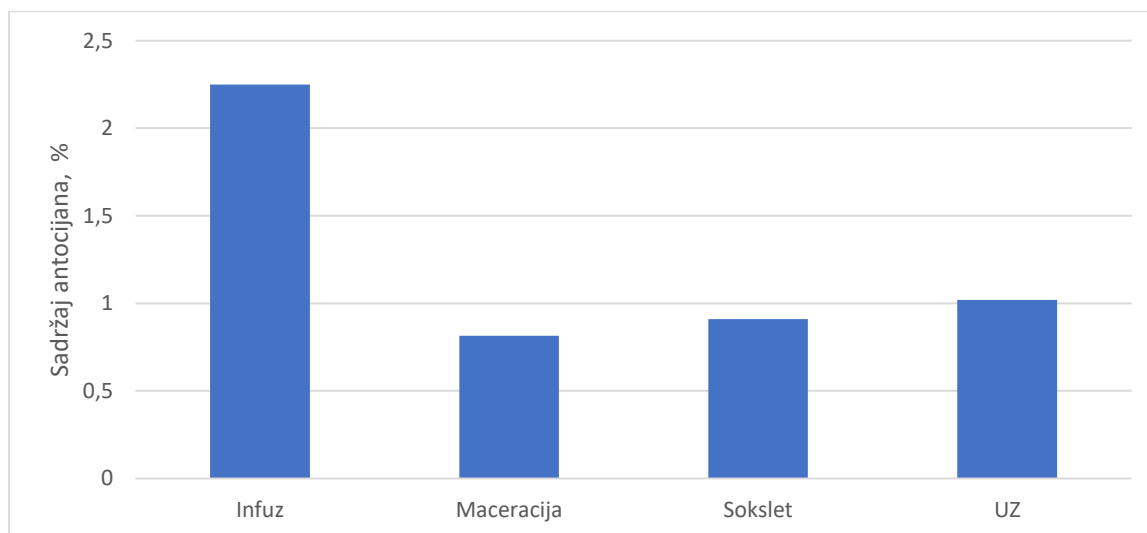
4.3. SADRŽAJ UKUPNIH ANTOCIJANA U EKSTRAKTIMA DIVLJE I GAJENE KUPINE

U ovom master radu ispitivan je i sadržaj ukupnih antocijana u ekstraktima divlje i gajene kupine koji su dobijeni ekstrakcijom vrelom vodom (infuz), maceracijom, Sokslet ekstrakcijom i ultrazvučnom ekstrakcijom. Sadržaji antocijana su izraženi u procentima. U ekstraktima divlje kupine sadržaj antocijana u infuzu je iznosio 1,65 %, u ekstraktu dobijenom maceracijom 1,12%, u ekstraktu po Soksletu 3,72%, a u ultrazvučnom ekstraktu 2,58%. Ovi rezultati prikazani su na grafikonu 5.



Grafikon 5. Sadržaj ukupnih antocijana u ekstraktima divlje kupine.

Sadržaj antocijana u ekstraktima gajene kupine iznosio je 2,25 % u infuzu, 0,815 % u ekstraktu dobijenom maceracijom, u ekstraktu po Soksletu 0,91 %, a u ekstraktu ultrazvučnom ekstrakcijom 1,02 % (grafikon 6).



Grafikon 6. Sadržaj ukupnih antocijana u ekstraktima gajene kupine.

Na osnovu ovih rezultata može se uočiti da je u ekstraktima divlje kupine veći sadržaj antocijana, osim u infuzu, nego u ekstraktima gajene kupine. Najveći sadržaj antocijana u divljoj kupini dobijen je Sokslet ekstrakcijom, a najmanji ekstrakcijom maceracijom, dok je kod gajene kupine najveći sadržaj antocijana dobijen u infuzu, a najmanji sadržaj, kao i kod divlje kupine, u ekstraktu dobijenom maceracijom. Pregledom literature o sadržaju antocijana u kupini nisu pronađeni rezultati koji bi se mogli porediti sa dobijenim rezultatima jer je sadržaj antocijana izražavan u drugim jedinicama (mg galne kiseline po gramu suve materije, mg po g, ili u mg cijanidin-3-glukozida po g materije). Bez

obzira na to, u gotovo svim istraživanjima sadržaj antocijana bio je veći u divljoj nego u gajenoj kupini i neki od njih su navedeni u daljem tekstu.

U radu Jazića, sadržaj antocijana je takođe bio veći u ekstraktima divlje nego u ekstraktima gajene kupine, gdje je sadržaj antocijana u ekstraktima divlje kupine iznosio oko 12 mg GAE/g suve materije, a u ekstraktima gajene kupine oko 6 mg GAE/g suve materije (Jazić, 2019).

Vinčić je u svom istraživanju utvrdila da je kupina bogata antocijanima, da je sadržaj antocijana veći nego u ekstraktima maline, ali je manji nego u ekstraktima borovnice (Vinčić, 2017).

Hassimotto i saradnici su ustanovili da su plodovi kupine bogatiji antocijanima u odnosu na drugo crveno voće, kao što su jagode, ljubičasta surinamska trešnja ili acerola. Ukupni sadržaj antocijana određen spektrofotometrijom bio je veći u poređenju sa sadržajem cijanidina određen HPLC metodom. Generalno, različite nijanse boje koje određuju antocijani zavise od tipa aglikona, glikozilacije, pH i ko-pigmentacije sa organskim anjonima (Hassimotto i sar., 2008). Zafra-Rojas i saradnici su u kupini za ukupne monomerne antocijane dobili vrijednost od 364,53 mg Ci-3-Gl/100 g (Zafra-Rojas i sar., 2020).

U istraživanju Milenković Anđelković utvrđeno je prisustvo antocijana u plodu divlje i gajene kupine, dok ih u listovima nije bilo. Nađeno je da je plod divlje kupine imao ukupni sadržaj antocijana veći za 42,41 % nego plod gajene kupine (Milenković Anđelković, 2016).

Za totalne monomerne antocijane u radu Schulz i saradnika nivoi su bili značajno viši u potpuno zreloj fazi nego u zreloj fazi kupine (11,72 i 2,61 mg ci-3-glu/g suve materije). Ove vrijednosti su bile veće od onih nađenih za kupinu *Rubus adenotrichus*, koje su se kretale od 0,5 do 5,2 mg ci-3-glu/g suve materije tokom zrenja. Ovaj trend povećanja ukupne koncentracije monomernog antocijana tokom sazrijevanja je takođe utvrđen za jagodu, trešnju, dud itd. Pokazalo se da su antocijani prisutni u mesnatim djelovima ploda i da se povećavaju tokom sazrijevanja, predstavljajući niz boja koje se mijenjaju od zelene do crne (Schulz i sar. 2019).

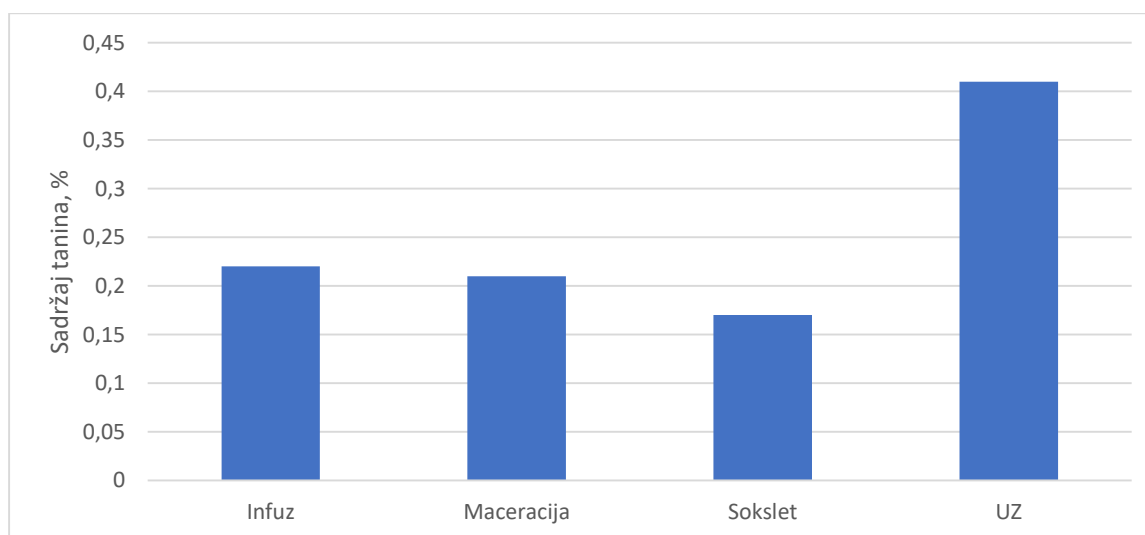
U radu Reyes-Carmona divlja kupina je imala najveće vrijednosti ukupnih antocijana (18,1 mg/g) u poređenju sa svim ispitivanim sortama u svim godišnjim dobima i regionima rasta. Očigledno je bilo malog uticaja sezone branja na sadržaj antocijana. Slično tome, razlike u nivoima antocijana su očigledne za različite regione rasta (Reyes-Carmona i sar., 2005).

Celant i saradnici (2016) su u sorti Choctav našli najveći sadržaj ukupnih antocijana (9,42 mg Ci-3-gluE/g svježe mase), a u sorti Tupi najmanji sadržaj (6,76 mg Ci-3-gluE/g svježe mase). U poređenju sa ovim rezultatima, Hassimotto i saradnici (2008) utvrdili su niži sadržaj ukupnih antocijana u kupinama Guarani, Brazos i Tupi (1,94, 1,33 i 1,16 mg Ci-3-gluE/g svježe mase). Takođe, niži sadržaj ukupnih antocijana ekstrahovanih u etanolu su utvrdili Koca i Karadeniz (2009) u kupini Arapaho

(1,15 mg Ci-3-gluE/g svježe mase) proizvedenoj u regionu Crnog mora, Turska a Pantelidis i saradnici (2007) u kupini Choctav (1,26 mg Ci-3-gluE/ g svježe mase) proizvedenoj u sjevernoj Grčkoj. U tropskim ili suptropskim klimatskim uslovima, produženi periodi suše ili previše kiše, visoki nivoi radijacije i ekstremne temperature izazivaju stresove okoline. Ovi stresovi mogu povećati proizvodnju fenolnih antioksidanata kao biljnog mehanizma za detoksikaciju ćelija od visokog nivoa slobodnih radikala (reaktivnih vrsta kiseonika) koji nastaju usled oksidativnog stresa (Celant i sar., 2016). Prisustvo cijanidin-3-glukozida, u kupini, doprinosi velikom dijelu antioksidativne sposobnosti da suzbije i hemijsku i intracelularnu oksidaciju izazvanu peroksil radikalima (Elisia i sar., 2007).

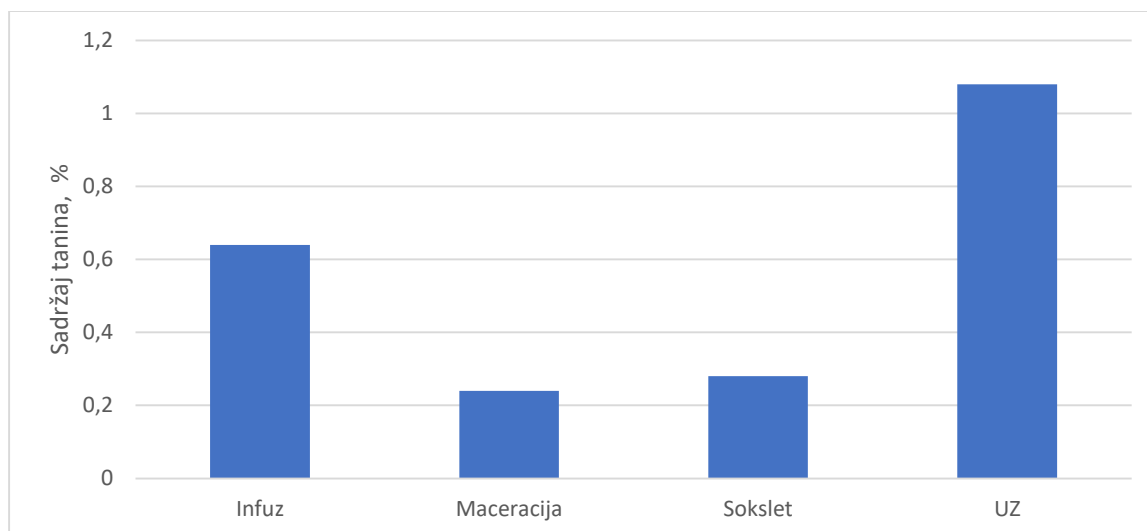
4.4. SADRŽAJ UKUPNIH TANINA U EKSTRAKTIMA DIVLJE I GAJENE KUPINE

U ekstraktima divlje i gajene kupine koji su dobijeni ekstrakcijom vrelom vodom (infuz), maceracijom, Sokslet ekstrakcijom i ultrazvučnom ekstrakcijom određen je sadržaj ukupnih tanina, njihov sadržaj je izražen u procentima. U infuzu divlje kupine sadržaj tanina je iznosio 0,22 %, u ekstraktu maceracijom 0,21 %, u ekstraktu po Soksletu 0,17 %, a u ultrazvučnom ekstraktu 0,41 % (grafikon 7).



Grafikon 7. Sadržaj ukupnih tanina u ekstraktima divlje kupine.

U infuz ekstraktu gajene kupine sadržaj tanina iznosio je 0,64 %, u ekstraktu maceracijom 0,24 %, u ekstraktu po Soksletu 0,28 %, i u ultrazvučnom ekstraktu 1,08 %. Ovi rezultati prikazani su na grafikonu 8.

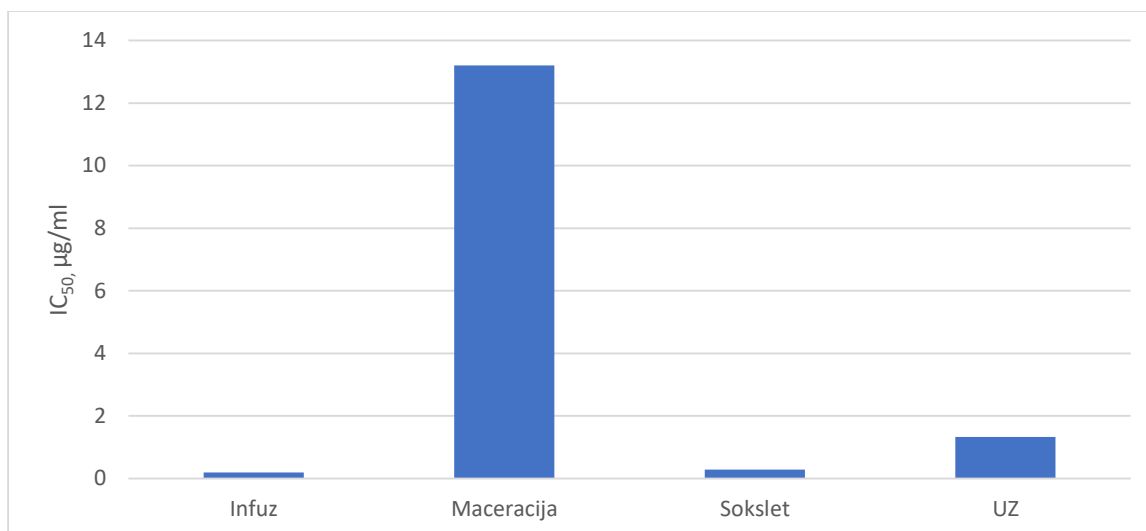


Grafikon 8. Sadržaj ukupnih tanina u ekstraktima gajene kupine.

Na osnovu dobijenih rezultata uočava se da u ekstraktima gajene kupine ima veći sadržaj tanina nego u ekstraktima divlje kupine, bez obzira na način ekstrakcije. Najveći sadržaj tanina kod gajene kupine nađen je u ekstraktu dobijenom ultrazvučnom ekstrakcijom, a najmanji sadržaj u ekstraktu dobijenom maceracijom. I kod divlje kupine nađen najveći sadržaj tanina u ekstraktu dobijenom ultrazvučnom ekstrakcijom, ali je nađen najmanji sadržaj u ekstraktu dobijenom Sokslet ekstrakcijom.

4.5. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA DIVLJE I GAJENE KUPINE

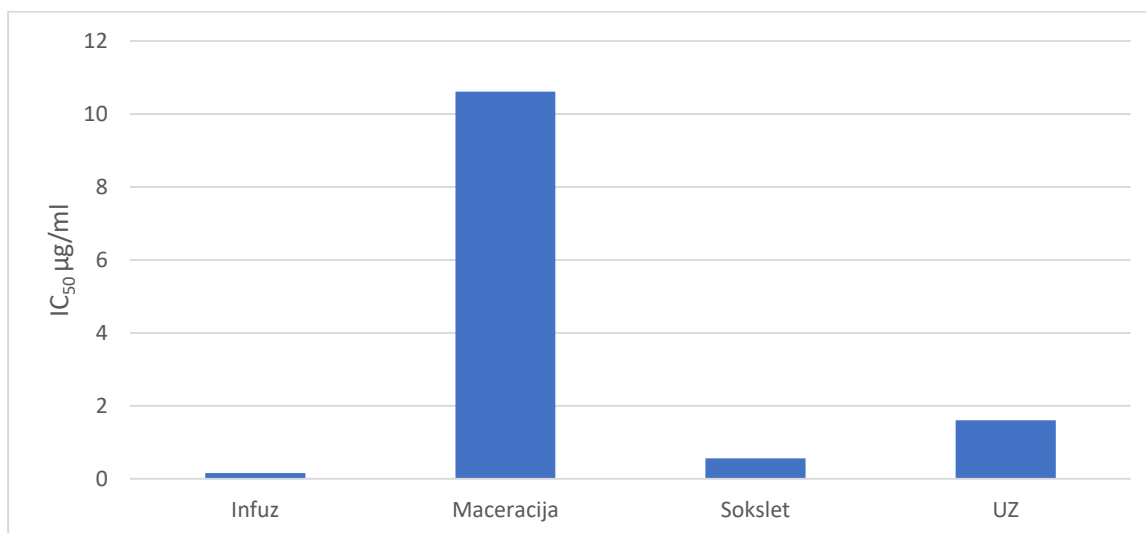
Antioksidativna aktivnost ekstrakata divlje kupine ispitivana je primjenom DPPH metode i pokazalo se da su vrijednosti IC_{50} , $\mu\text{g/ml}$ iznosile za infuz 0,186, za ekstrakt maceracijom 13,20, za ekstrakt dobijen Sokslet ekstrakcijom 0,285, a za ekstrakt ultrazvučnom ekstrakcijom 1,320. Ovi rezultati prikazani su na grafikonu 9. Manja IC_{50} znači veća antioksidativna aktivnost ekstrakata.



Grafikon 9. Antioksidativna aktivnost ekstrakata divlje kupine mjerena pomoću DPPH metode.

Najveću antioksidativnu aktivnost kod ispitivanja ekstrakata divlje kupine ima infuz, dok najmanju ima ekstrakt dobijen maceracijom.

IC₅₀, µg/ml vrijednosti u ekstraktima gajene kupine iznosile su za infuz 0,162, za ekstrakt dobijen maceracijom 10,617, za ekstrakt po Soksletu 0,562, a za ultrazvučni ekstrakt 1,612. Ovi rezultati prikazani su na grafikonu 10.

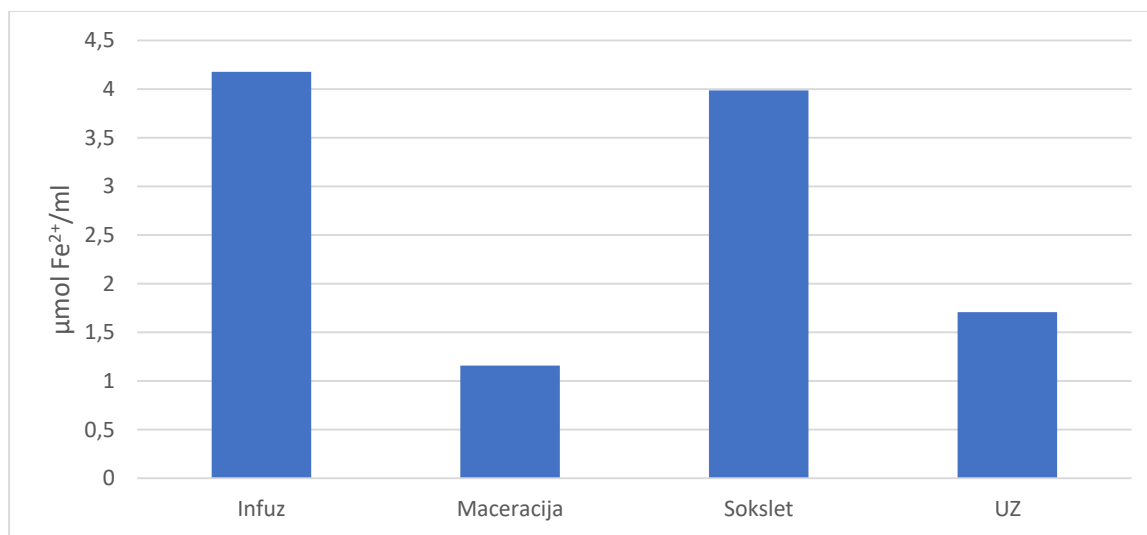


Grafikon 10. Antioksidativna aktivnost ekstrakata gajene kupine mjerena pomoću DPPH metode.

Pokazalo se, kao i kod divlje kupine, da najveću antioksidativnu aktivnost kod gajene kupine ima infuz, dok najmanju ima ekstrakt dobijen maceracijom. Međutim, poređenjem rezultata dobijenih ispitivanjem antioksidativne aktivnosti ekstrakata dobijenih različitim načinima ekstrakcije korišćenjem DPPH metode, može se uočiti da ekstrakti divlje kupine dobijeni ekstrakcijom po Soksletu i ultrazvučnom ekstrakcijom imaju veću antioksidativnu aktivnost od ekstrakata gajene kupine dobijenih na isti način, a da ekstrakti gajene kupine dobijeni ekstrakcijom vrelom vodom

(infuz) i maceracijom imaju veću antioksidativnu aktivnost od ekstrakata divlje kupine dobijenih istim tehnikama ekstrakcije.

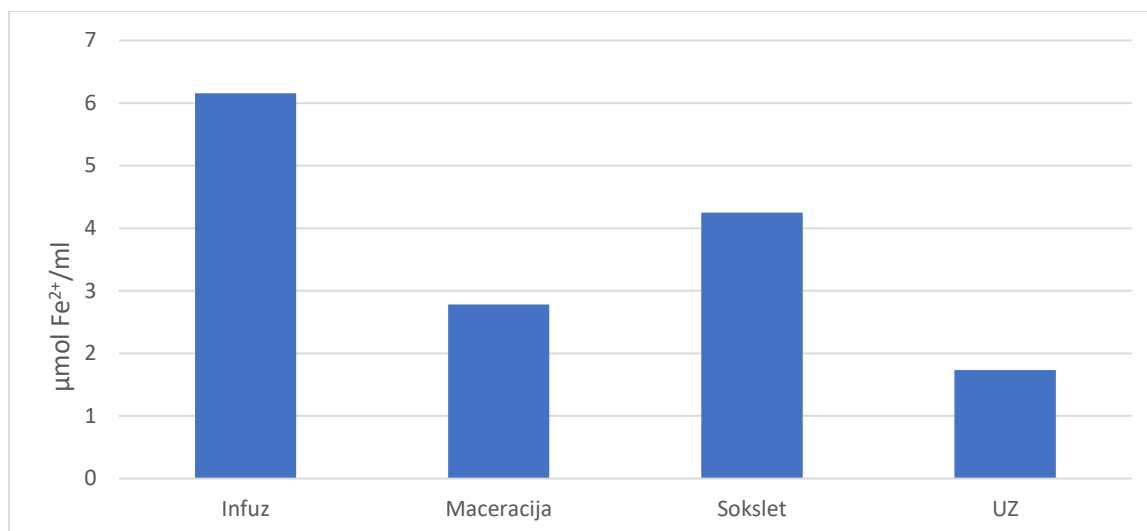
U ovom master radu je određivana i antioksidativna aktivnost u ekstraktima divlje i gajene kupine pomoću FRAP metode, gdje su vrijednosti izražene kao $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{ml}$ (grafikoni 11 i 12). Dobijene vrijednosti su iznosile za infuz 4,178, za ekstrakt maceracijom 1,159, za ekstrakt po Soksletu 3,988 i za ekstrakt dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom 1,707.



Grafikon 11. Antioksidativna aktivnost ekstrakata divlje kupine mjerena pomoću FRAP metode.

Najveću antioksidativnu aktivnost pokazuje ekstrakt divlje kupine dobijen ekstrakcijom vrelom vodom (infuz), dok najmanju vrijednost pokazuje ekstrakt dobijen maceracijom.

Vrijednosti antioksidativne aktivnosti dobijene FRAP metodom u ekstraktima gajene kupine su iznosile za infuz 6,159, za ekstrakt maceracijom 2,78, za ekstrakt po Soksletu 4,247, i za ekstrakt dobije ultrazvučnom ekstrakcijom 1,730.



Grafikon 12. Antioksidativna aktivnost ekstrakata gajene kupine mjerena pomoću FRAP metode.

Kod gajene kupine najveću antioksidativnu aktivnost ima infuz, a najmanju ima ekstrakt dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom.

Ako se uporede vrijednosti dobijene za ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata, dobijenih različitim tehnikama ekstrakcije, divlje i gajene kupine pomoću FRAP metode, uočava se da svi ekstrakti gajene kupine imaju veću antioksidativnu aktivnost od ekstrakata divlje kupine.

U istraživanju Milenković Anđelković, antioksidativna aktivnost divlje i gajene kupine izražena je kao EC₅₀ mg/ml (koncentracija antioksidanta koja uzrokuje smanjenje početne koncentracije DPPH za 50% u uslovima koje definiše metoda) i iznosila je za divlju kupinu 0,52, a za gajenu kupinu 0,79 iz čega se može zaključiti da je divlja kupina pokazala veću antioksidativnu aktivnost od gajene (Milenković Anđelković, 2016).

Antioksidativna aktivnost određena u kupini, malini i borovnici pomoću DPPH metode kod Vinčić iznosila je za dvije sorte kupine 0,0085 mg/ml i 0,0175 mg/ml i pokazala veću vrijednost u odnosu na malinu i borovnicu (Vinčić, 2017).

Koczka i saradnici su dobili vrijednosti za antioksidativni kapacitet pomoću FRAP metode od 120 do 180 μmol AA/g suve mase i te vrijednosti za plod kupine su bile veće od vrijednosti dobijenih za listove kupine (Koczka i sar., 2018).

Kod Yilmaz i saradnika vrijednosti DPPH testa za različite sorte kupine i divlje genotipove značajno su se razlikovale. Vrijednost dobijena DPPH testom bila je najniža u sorti Arapaho (8,7 mg) dok je dobijena najveća vrijednost u sorti Chester (5,8 mg). Prosječne vrijednosti EC₅₀ za sorte kupine i divlje genotipove bile su između 3,8 i 8,2 mg svježe mase (Yilmaz i sar., 2011).

Reyes-Carmona i saradnici (2005), dobili su vrijednosti FRAP testom od 139,9 mol CE/g do 285,2 mol CE/g.

Vrijednosti dobijene FRAP testom za kupine kod Schulz i saradnika su se kretale od 201,05 $\mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{g}$ suve mase do 241,06 $\mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{g}$ suve mase (Schulz i sar., 2019).

U istraživanju Denardin i saradnika vrijednost dobijena DPPH testom za dvije sorte kupine kretala se od 44,70 do 78,25 IC_{50} mg/l, dok su se vrijednosti dobijene FRAP testom kretale od 52,51 do 66,60 $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{g}$ svježe mase (Denardin i sar., 2015).

Oszmiański i saradnici ispitivali su antioksidativnu aktivnost ekstrakata divlje kupine za različite ekstrakcije i dobili vrijednosti od oko 5 do 65 $\mu\text{mol Trolox}/\text{g}$ suve mase (Oszmiański i sar., 2015).

Vulić i saradnici (2011), su u ekstraktu kupine dobili IC_{50} vrijednost kupine od 0,017 mg/ml.

U određivanju aktivnosti vezivanja DPPH radikala, uočeno je da na antioksidativni kapacitet utiču i rastvarači, pri čemu ekstrakt pripremljen sa acetonitrilom pokazuje najveći antioksidativni kapacitet i FRAP i DPPH metodama. Ovo bi moglo objasniti da su komponente ekstrahovane rastvaračima većeg polariteta manje efikasne u vezivanju DPPH radikala od rastvarača nižeg polariteta. Međutim, promene polariteta rastvarača mijenjaju njihovu sposobnost da izluže određene antioksidante, što utiče na mjerenja. Ova tendencija je takođe očigledna u ovom slučaju, pošto acetonitril ima relativno nizak polaritet (0,460) i utvrđeno je da je najbolji rastvarač. Nasuprot tome, etanol ima veći polaritet (0,654) i, samim tim, manju efikasnost (Albert i sar., 2022).

Antioksidativna aktivnost, mjerena DPPH testom kod Sariburun i saradnika kretala se od 90,95 $\mu\text{mol TE}/\text{g}$ do 177,11 $\mu\text{mol TE}/\text{g}$ kod različitih sorti kupine (Sariburun i sar., 2010).

4.6. SADRŽAJ METALA U PLODU I EKSTRAKTIMA DIVLJE I GAJENE KUPINE

Sadržaj esencijalnih i toksičnih metala u uzorcima suvog ploda i u ekstraktima, koji su dobijeni različitim tehnikama ekstrakcije, divlje i gajene kupine sa područja Crne Gore, u ovom master radu je određivan metodom atomske apsorpcione spektrometrije. Određen je sadržaj bakra, cinka, mangana, gvožđa, olova, nikla i kadmijuma u suvom plodu i u ekstraktima dobijenim ekstrakcijom suvog ploda vrelom vodom (infuz), maceracijom, Sokslet ekstrakcijom i ultrazvučnom ekstrakcijom. Sadržaj metala je izražen u $\mu\text{g}/\text{g}$ suve biljke kod ispitivanja suvog ploda i u $\mu\text{g}/\text{g}$ suvog ekstrakta u navedenim ekstrakcijama. Ovim ispitivanjem je utvrđen veći sadržaj svih metala u suvom plodu u odnosu na sadržaj metala određenih u svim ekstraktima, divlje i gajene kupine.

Tabela 3. Sadržaj metala u suvom plodu divlje i gajene kupine

Metali	Divlja, µg/g	Gajena, µg/g
Cu	94,3	77,5
Pb	0,03	n.d
Mn	78,2	38,2
Zn	32,3	23,3
Fe	58,3	49,1
Ni	2,1	1,95
Cd	n.d	n.d

Na osnovu dobijenih rezultata prikazanih u tabeli 3, uočeno je da je sadržaj svih ispitivanih elemenata veći u suvom plodu divlje kupine. U plodu i divlje i gajene kupine najzastupljeniji element je bakar. Kadmijum nije detektovan ni u plodu divlje ni u plodu gajene kupine, a olovo nije detektovano u plodu gajene kupine.

Sadržaj bakra u ekstraktima divlje kupine iznosio je u infuzu 39,91 µg/g, 23,575 µg/g (maceracija), 51,86 µg/g (Sokslet) i 37,72 µg/g (ultrazvučna), dok je u ekstraktima gajene kupine sadržaj bakra u infuzu iznosio 28,29 µg/g, 19,37 µg/g (maceracija), 41,63 µg/g (Sokslet) i 31,00 µg/g (ultrazvučna). U radu Jazića (2019) sadržaj bakra u uzorcima ploda i tropa divlje i gajene kupine sa teritorije Bosne i Hercegovine kretao se od 0,15 do 0,17 mg/100 g. U radu Koczka i saradnika (2018) sadržaj bakra u uzorcima divlje kupine sa teritorije Mađarske kretao se od 6 do 8,5 mg/kg suve mase, a gajene kupine od 4,5 do 5,5 mg/kg suve mase, dok se u radu Vlada i saradnika (2019) sadržaj bakra sa teritorije Rumunije kretao se od 1,23–34,08 mg/kg suve mase. Poređenjem ovih literaturnih podataka sa rezultatima dobijenim u ovom radu ispitivanjem bakra u kupinama sa teritorije Crne Gore uočava se da ispitivani uzorci kupine u ovom radu imaju veći sadržaj ovog metala.

Sadržaj cinka u ekstraktima divlje kupine iznosio je za infuz 9,69 µg/g, 8,075 µg/g (maceracija), 17,865 µg/g (Sokslet), 12,92 µg/g (ultrazvučna), dok je u ekstraktima gajene kupine sadržaj cinka iznosio 8,77 µg/g (infuz), 5,825 µg/g (maceracija), 15,815 µg/g (Sokslet) i 9,32 µg/g (ultrazvučna). U istraživanju Marjanović-Balaban i saradnika (2012) ustanovljeno je da su kupine sa teritorije Bosne i Hercegovine bogate cinkom i njihov sadržaj kretao se od 0,51 do 0,62 mg/100 g. U radu Jazića (2019) sadržaj cinka u plodu i tropu divlje i gajene kupine kretao se od 0,36 do 0,49 mg/100 g. U radu Koczka i saradnika (2018) sadržaj cinka kretao se od 10 do 12 mg/kg suve mase, kao i kod Vlada i saradnika (2019) gdje je sadržaj iznosio 10 mg/kg suve mase. U poređenju sa ovim literaturnim podacima sadržaj cinka u suvom plodu ispitivanih kupina je veći.

Sadržaj mangana u ekstraktima divlje kupine iznosio je 23,46 µg/g, 19,55 µg/g, 43,01 µg/g, 31,28 µg/g, infuz, maceracija, Sokslet, ultrazvučna, respektivno, dok je u ekstraktima gajene kupine

sadržaj mangana iznosio 18,8 µg/g, 9,55 µg/g, 21,01 µg/g i 19,28 µg/g, infuz, maceracija, Sokslet, ultrazvučna, respektivno. Rezultati dobijeni analizom ploda kupina sa područja Crne Gore (tabela 3) su viši u poređenju sa rezultatima istraživanja Koczke i saradnika (2018) u kojima se sadržaj mangana u divljoj kupini kretao od 30 do 35 mg/kg suve mase, a u gajenoj kupini od 20 do 25 mg/kg.

Sadržaj gvožđa u ekstraktima divlje kupine iznosio je (infuz) 26,4 µg/g, (maceracija) 39,07 µg/g, (Sokslet) 32,065 µg/g i (ultrazvučna) 23,32 µg/g, dok je u ekstraktima gajene kupine sadržaj gvožđa iznio (infuz) 24,2 µg/g, (maceracija), 12,275 µg/g, (Sokslet) 27,01 µg/g i (ultrazvučna) 19,64 µg/g. U radu Jazića (2019) sadržaj gvožđa u kupinama kretao se od 57 do 64 mg/100 g, u radu Marjanović-Balaban i saradnika (2012) od 0,60 do 3,78 mg/100 g, dok u radu Koczka i saadnika (2018) sadržaj gvožđa kretao se od 25 do 35 mg/kg.

Sadržaj olova u ekstraktima divlje kupine iznosio je za infuz $9 \cdot 10^{-3}$ µg/g, u ekstraktu od maceracije $7,5 \cdot 10^{-3}$ µg/g, u ekstraktu po Soksletu 0,0165 µg/g i u ekstraktu dobijenom ultrazvučnom ekstrakcijom 0,011 µg/g, dok u ekstraktima gajene kupine sadržaj olova nije detektovan.

Sadržaj nikla u ekstraktima divlje kupine iznosio je za infuz ekstrakcije 0,26 µg/g, ekstrakt od maceracije 0,0525 µg/g, ekstrakt po Soksletu 0,294 µg/g i za ultrazvučni ekstrakt 0,111 µg/g, a u ekstraktima gajene kupine sadržaj nikla za infuz iznosio 0,28 µg/g, ekstrakt maceracijom 0,048 µg/g, ekstrakt po Soksletu 0,256 µg/g i kod ultrazvučnog ekstrakta 0,151 µg/g.

Sadržaj kadmijuma nije detektovan ni u jednom od ekstrakata.

Rezultati dobijeni ovim istraživanjem dokazuju da je kupina sa teritorije Crne Gore bogata esencijalnim metalima kao što su cink, bakar, mangan i gvožđe.

4.7. KORELACIJA SADRŽAJA FENOLNIH JEDINJENJA, ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI I METALA U DIVLJOJ I GAJENOJ KUPINI

Određen je stepen korelacije sadržaja polifenolnih jedinjenja u uzorcima divlje i gajene kupine i antioksidativnih vrijednosti dobijenih FRAP i DPPH metodom. Takođe je određen stepen korelacije sadržaja identifikovanih metala i antioksidativnih vrijednosti dobijenih FRAP i DPPH metodom.

Najveći stepen korelacije u uzorcima divlje kupine (tabela 4) utvrđen je između ukupnih fenola i antioksidativne vrijednosti dobijene FRAP metodom $R^2 = 0,9905$, i flavonoida i antioksidativne vrijednosti dobijene FRAP metodom $R^2 = 0,927$. Korelacija između ukupnih fenola i flavonoida i antioksidativne vrijednosti dobijene DPPH metodom bile su nešto više od $R^2 = 0,5$, dok antocijani i vrijednosti dobijene FRAP metodom, $R^2 = 0,6406$, i gvožđa i antioksidativne vrijednosti dobijene

DPPH metodom, $R^2 = 0,6711$. Cink i mangan nisu pokazali dobru korelaciju sa vrijednostima antioksidativne aktivnosti dobijenim ni DPPH ni FRAP metodom, $R^2 < 0,5$.

Tabela 4. Stepen korelacije ukupnih fenola, flavonoida, tanina i antocijana i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim uzorcima divlje i gajene kupine.

Divlja kupina		
	DPPH	FRAP
Ukupni fenoli	$y = -0,1578x + 11,842$ $R^2 = 0,5112$	$y = 0,0538x - 0,0013$ $R^2 = 0,9905$
Flavonoidi	$y = -0,0671x + 8,5014$ $R^2 = 0,5308$	$y = 0,0217x + 1,2197$ $R^2 = 0,927$
Antocijani	$y = -3,6962x + 12,129$ $R^2 = 0,4449$	$y = 0,6187x + 1,3552$ $R^2 = 0,2079$
Tanini	$y = -11,1x + 6,5504$ $R^2 = 0,0354$	$y = -7,1124x + 4,5539$ $R^2 = 0,2425$

Gajena kupina		
	DPPH	FRAP
Ukupni fenoli	$y = -0,1612x + 12,786$ $R^2 = 0,8298$	$y = 0,0293x + 1,9938$ $R^2 = 0,1825$
Flavonoidi	$y = -0,0379x + 6,7739$ $R^2 = 0,5141$	$y = 0,0193x + 1,9304$ $R^2 = 0,8859$
Antocijani	$y = -3,6842x + 7,8388$ $R^2 = 0,25$	$y = 2,3027x + 0,8535$ $R^2 = 0,6504$
Tanini	$y = -5,9082x + 6,5469$ $R^2 = 0,2167$	$y = -1,5001x + 4,569$ $R^2 = 0,093$

Najveći stepen korelacije u uzorcima gajene kupine (tabela 4) utvrđen je između flavonoida i antioksidativne vrijednosti dobijene FRAP metodom $R^2 = 0,8859$, i ukupnih fenola i antioksidativne vrijednosti dobijene DPPH metodom $R^2 = 0,8298$. Ostale vrijednosti stepena korelacije bile su znatno niže.

Od ispitivanih metala u uzorcima divlje kupine (tabela 5), najveći stepen korelacije utvrđen je između bakra i antioksidativne vrijednosti dobijene DPPH metodom, $R^2 = 0,7495$, bakra i antioksidativne vrijednosti dobijene FRAP metodom, $R^2 = 0,6406$, i gvožđa i antioksidativne vrijednosti dobijene DPPH metodom, $R^2 = 0,6711$. Cink i mangan nisu pokazali dobru korelaciju sa vrijednostima antioksidativne aktivnosti dobijenim ni DPPH ni FRAP metodom, $R^2 < 0,5$.

U uzorcima gajene kupine (tabela 5), najveći stepen korelacije utvrđen je između mangana i antioksidativne vrijednosti dobijene DPPH metodom, $R^2 = 0,9535$, i gvožđa i antioksidativne

vrijednosti dobijene DPPH metodom, $R^2 = 0,8481$. Ostale vrijednosti stepena korelacije bile su znatno niže.

Tabela 5. Stepen korelacije identifikovanih pojedinačnih metala i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim uzorcima divlje i gajene kupine.

Divlja kupina		
	DPPH	FRAP
Cu	$y = -0,4719x + 21,805$ $R^2 = 0,7495$	$y = 0,1068x - 1,3301$ $R^2 = 0,6406$
Zn	$y = -0,9196x + 14,909$ $R^2 = 0,3943$	$y = 0,1653x + 0,7515$ $R^2 = 0,2125$
Mn	$y = -0,3851x + 15,041$ $R^2 = 0,3971$	$y = 0,0688x + 0,7412$ $R^2 = 0,2112$
Fe	$y = 0,7477x - 18,844$ $R^2 = 0,6711$	$y = -0,0699x + 4,8686$ $R^2 = 0,0977$

Gajena kupina		
	DPPH	FRAP
Cu	$y = -0,4201x + 15,871$ $R^2 = 0,6036$	$y = 0,0395x + 2,5414$ $R^2 = 0,0355$
Zn	$y = -0,7797x + 10,982$ $R^2 = 0,4387$	$y = 0,1005x + 2,7312$ $R^2 = 0,0485$
Mn	$y = -0,9378x + 19,331$ $R^2 = 0,9535$	$y = 0,1122x + 1,8044$ $R^2 = 0,0908$
Fe	$y = -0,7096x + 17,985$ $R^2 = 0,8481$	$y = 0,1763x + 0,0651$ $R^2 = 0,3486$

5. ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju vršene su ekstrakcije suvog ploda divlje i gajene kupine, sa teritorije Crne Gore, različitim tehnikama sa ciljem spektrofotometrijskog određivanja fenola, flavonoida, tanina, antocijana, antioksidativne aktivnosti kao i određivanja esencijalnih i toksičnih metala metodom AAS. Ekstrakcije koje su korišćene su ekstrakcija vrelom vodom (infuz), maceracija, Sokslet ekstrakcija i ultrazvučna ekstrakcija.

Analizom ekstrakata divlje i gajene kupine zapažene su razlike u pogledu sadržaja antioksidativnih materija i ispitivanih metala koje su prouzrokovane i vrstom kupine i tehnikom ekstrakcije. Na osnovu dobijenih rezultata ustanovljeno je da je sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima dobijenim po Sokslet-u i divlje i gajene kupine bio najveći, dok je sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim maceracijom bio najniži. Pokazalo se da su vrijednosti dobijene za fenolna jedinjenja veće u ekstraktima dobijenim ekstrakcijom vrelom vodom (infuz) i maceracijom kod divlje kupine, dok ekstrakti dobijeni Sokslet ekstrakcijom i ultrazvučnom ekstrakcijom pokazuju veće vrijednosti kod gajene kupine. Sadržaj flavonoida u ekstraktima gajene kupine je veći nego u ekstraktima divlje kupine. Nađeno je da i kod divlje i kod gajene kupine ekstrakt vrelom vodom (infuz) ima najveći, a ekstrakt dobijen maceracijom najniži sadržaj flavonoida. Na osnovnu rezultata prikazanih u ovom radu može se uočiti da je u ekstraktima gajene kupine veći sadržaj antocijana, osim u infuzu, nego u ekstraktima divlje kupine. Najveći sadržaj antocijana u divljoj kupini dobijen je Sokslet ekstrakcijom, a najmanji ekstrakcijom maceracijom, dok je kod gajene kupine najveći sadržaj antocijana dobijen u infuzu, a najmanji sadržaj, kao i kod divlje kupine, ekstrakcijom maceracijom. Uočeno je da u ekstraktima gajene kupine ima veći sadržaj tanina nego u ekstraktima divlje kupine, bez obzira na način ekstrakcije. Najveći sadržaj tanina kod gajene kupine nađen je u ekstraktu dobijenom ultrazvučnom ekstrakcijom, a najmanji sadržaj u ekstraktu dobijenom maceracijom, isto tako je kod divlje kupine nađen najveći sadržaj tanina u ekstraktu dobijenom ultrazvučnom ekstrakcijom, ali je nađen najmanji sadržaj u ekstraktu dobijenom Sokslet ekstrakcijom.

Najveću antioksidativnu aktivnost IC_{50} , $\mu\text{g/ml}$, određenu DPPH metodom pokazuje ekstrakt divlje kupine dobijen ekstrakcijom vrelom vodom, infuz (0,186), dok najmanju vrijednost (13,20) pokazuje ekstrakt dobijen maceracijom.

Vrijednosti antioksidativne aktivnosti dobijene FRAP metodom u ekstraktima divlje i gajene kupine pokazuju da najveću antioksidativnu aktivnost ima ekstrakt dobijen ekstrakcijom vrelom vodom

(infuz), dok najmanju vrijednost kod divlje kupine pokazuje ekstrakt dobijen maceracijom, a kod gajene kupine ekstrakt dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom.

Mineralni sadržaj u suvom plodu i u ekstraktima dobijenim različitim tehnikama ekstrakcije divlje i gajene kupine određivani su primjenom AAS metode, pri čemu je uočeno da je sadržaj ispitivanih metala u suvom plodu i u svim ekstraktima divlje kupine veći od sadržaja ispitivanih metala u suvom plodu i u svim ekstraktima gajene kupine. U plodu i divlje i gajene kupine najzastupljeniji element je bakar. Kadmijum nije detektovan ni u plodu divlje ni u plodu gajene kupine, a olovo nije detektovano u plodu gajene kupine. Rezultati dobijeni ovim istraživanjem pokazuju da je kupina sa teritorije Crne Gore bogata esencijalnim metalima kao što su cink, bakar, mangan i gvožđe.

U ispitivanim uzorcima kupine utvrđen je visok stepen korelacije u uzorcima gajene kupine između sadržaja flavonoida i antioksidativne vrijednosti dobijene FRAP metodom $R^2 = 0,8859$ i sadržaja ukupnih fenola i antioksidativne vrijednosti dobijene DPPH metodom $R^2 = 0,8298$. Ostale vrijednosti stepena korelacije bile su znatno niže.

Od ispitivanih metala u uzorcima divlje kupine najveći stepen korelacije utvrđen je između sadržaja bakra i antioksidativne vrijednosti dobijene DPPH metodom, $R^2 = 0,7495$, sadržaja bakra i antioksidativne vrijednosti dobijene FRAP metodom, $R^2 = 0,6406$, i sadržaja gvožđa i antioksidativne vrijednosti dobijene DPPH metodom, $R^2 = 0,6711$. Cink i mangan nisu pokazali dobru korelaciju sa vrijednostima antioksidativne aktivnosti dobijenim ni DPPH ni FRAP metodom, $R^2 < 0,5$. U uzorcima gajene kupine, visok stepen korelacije utvrđen je između sadržaja mangana i antioksidativne vrijednosti dobijene DPPH metodom, $R^2 = 0,9535$, i sadržaja gvožđa i antioksidativne vrijednosti dobijene DPPH metodom, $R^2 = 0,8481$. Ostale vrijednosti stepena korelacije bile su znatno niže.

Ovim istraživanjem je uočeno da ispitivani ekstrakti divlje i gajene kupine sa teritorije Crne Gore imaju značajan sadržaj polifenolnih jedinjenja i visoku antioksidativnu aktivnost i da i plod i ekstrakti mogu biti značajan izvor esencijalnih elemenata.

6. LITERATURA

1. Albert C., Codină G.G., Héjja M., András C.D., Chetrariu A., & Dabija A. (2022). Study of Antioxidant Activity of Garden Blackberries (*Rubus fruticosus* L.) Extracts Obtained with Different Extraction Solvents. *Applied Sciences*, 12(8), 4004.
2. Aminu N.A., Nuhu Aliyu, A., Miftahu G.I. (2022). Atomic Absorption Spectroscopy Analysis of heavy metals in water at Daura Gypsum mining site, Yobe state, Nigeria.
3. Azwanida N.N. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal and Aromatic plants*, 4(3), 1-6.
4. Benzie I.F. & Strain J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-6.
5. Benzie I.F. & Choi S.W. (2014). Antioxidants in food: content, measurement, significance, action, cautions, caveats, and research needs. *Advances in food and nutrition research*, 71, 1–53.
6. Bhattacharya A. (2019). High-Temperature Stress and Metabolism of Secondary Metabolites in Plants, Effect of High Temperature on Crop Productivity and Metabolism of Macro Molecules, 391-484.
7. Bibi Sadeer N., Montesano D., Albrizio S., Zengin G., Mahomoodally M.F. (2020). The Versatility of Antioxidant Assays in Food science and Safety-Chemistry. *Antioxidants*, 9(8), 709
8. Blagojević R., Božić V., (2012). Tehnologija proizvodnje kupine, Kancelarija za program podrške u privatnom sektoru za podršku sektoru voćarstva i bobičastog voća u Južnoj Srbiji, Niš.
9. Blois M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
10. Brašanac-Vukanović S., Mutić J., Stanković D.M., Arsić I., Blagojević N., Vukašinović-Pešić V., Tadić V. (2018). Wild Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L., *Ericaceae*) from Montenegro as a Source of Antioxidants for Use in the Production of Nutraceuticals. *Molekuls*, 23(8), 1864.
11. Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2021). Flavonoid. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/flavonoid>
12. Brun C. (2023), *Rubus discolor*, Native Plant Trust. <https://gobotany.nativeplanttrust.org/species/rubus/dicolor/>
13. Cadenas E. and Packer L. (2002). *Handbook of Antioxidants*. 2nd Edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

14. Celant V.M., Braga G.C., Vorpagel J.A. & Salibe A.B. (2016). Phenolic composition and antioxidant capacity of aqueous and ethanolic extracts of blackberries. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 38(2).
15. Chemistry. Stack Exchange. (2019). Why should AAS use element lamps? <https://chemistry.stackexchange.com/q/115895>
16. Chung K.T., Wong T.Y., Wei C.I., Huang Y.W., Lin Y. (1998). Tannins and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(6), 421-464.
17. Clark J.R., Stafne E.T., Hall H.K., Finn C.E. (2007). *Blackberry Breeding and Genetics*, Plant Breeding Reviews, John Wiley & Sons, 29, 19-144.
18. Council of Europe. (2016). *Evropska farmakopeja*, Eur. 9th ed. Council of Europe, Strasbourg, France.
19. Coyner M.A., Skirvin R.M, Norton M.A, Otterbacher A.G. (2005). Thornlessness in Blackberries. *Small Fruits Review*, 4(2), 83-106.
20. Croge C. P., Cuquel F. L., Pintro P. T., Biasi L. A. & De Bona C. M. (2019). Antioxidant Capacity and Polyphenolic Compounds of Blackberries Produced in Different Climates, *HortScience horts*, 54(12), 2209-2213.
21. Ćujić N., Menković N., Šavikin K., Tasić S., Zdunić G., Janković T. & Jovančević, M. (2011). Sadržaj polifenolnih jedinjenja u plodovima divlje maline, kupine i jagode sa područja Bjelasice, Crna Gora. *Lekovite sirovine*, 31, 39-46.
22. Dabas D. (2018). Polyphenols as Colorants. *Advances in Food Technology and Nutritional Sciences - Open Journal*. SE, S1-S6.
23. Dabbs D.M., Mulders N., Aksay I.A. (2006). Solvothermal removal of the organic template from L₃ (“sponge”) templated silica monoliths. *Journal Nanoparticle Research*. 8(5), 603–614.
24. Demir F., Kipcak A. S., Dere Ozdemir O. & Moroydor Derun E. (2020). Determination of essential and non-essential element concentrations and health risk assessment of some commercial fruit juices in Turkey. *Journal of food science and technology*, 57(12), 4432–4442.
25. Denardin C.C., Hirsch G.E., da Rocha R.F., Vizzotto M., Henriques A. T., Moreira J.C.F., Guma F.T.C.R. & Emanuelli T. (2015). Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. *Journal of food and drug analysis*, 23(3), 387–398.
26. Dewey S. (2011). Utah State University, Bugwood.org <https://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=1459071>
27. Dixon R. & Pasinetti G. (2010). Flavonoids and isoflavonoids: from plant biology to agriculture and neuroscience. *Plant Physiology*, 154(2), 453–457.

28. Dragović-Uzelac V. (2016). Začinsko i aromatsko bilje, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
29. Dujmović Purgar D., Surać M., Šindrak Z., Voća S., Duralija B. (2008). Wild Edible Species of *Rubus* at Nature Park Medvednica (NW Croatia), Bulletin UASVM, Agriculture, 65(1), 88-93.
30. Elisia I., Hu J., Popovich D.G., Kitts D.D. (2007). Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract. Food Chemistry, 101(3), 1052-1058.
31. Extraction Process, Types & Techniques. (2022). Study.com.
<https://study.com/academy/lesson/extraction-process-types-techniques-chemistry.html>
32. Fausto Rivero-Cruz J., Granados-Pineda J., Pedraza-Chaverri J., Pérez-Rojas J.M., Kumar-Passari A., Diaz-Ruiz G., Rivero-Cruz B.E. (2020). Phytochemical Constituents, Antioxidant, Cytotoxic, and Antimicrobial Activities of the Ethanolic Extract of Mexican Brown Propolis. Antioxidants, 9(1), 70.
33. Francis J.K. (2014). Himalayan blackberry. US Department of Agriculture.
34. Galletta G.J., Draper A.D., Maas J.L., Skirvin R.M., Otterbacher A.G., Swartz H.J., and Chandler C.K. (1998). 'Chester Thornless' blackberry. Fruit Varieties Journal. 52(3), 118-122.
35. Gazda A., Jerzy Szwagrzyk J., Nybom H., Werlemark G. (2007). Morphological and genetical variability of *Rubus hirtus* (Waldst. & Kitt) plants under partly open forest canopy, Polish Journal of Ecology, 55(1), 49-55.
36. Germer T., Zwinkels J. and Tsai B. (2014). Theoretical Concepts in Spectrophotometric Measurements, Spectrophotometry: Accurate Measurements of the Optical Properties of Materials, Elsevier B.V., Amsterdam.
37. Grembecka M., Szefer P. (2013). Comparative assessment of essential and heavy metals in fruits from different geographical origins. Environmental monitoring and assessment. 185, 9139-9160.
38. Grokhovska Y. (2019), *Rubus hirtus*. Ukranianian Biodiversity Information Network.
39. Gündogdu M., Kan T., Canan I. (2016). Bioactive and antioxidant characteristics of blackberry cultivars from East Anatolia. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 40(3), 344-351.
40. Gupta A., Naraniwal M. & Kothari V. (2012). Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. International Journal of Applied and Natural Science, 1(1), 8-26.
41. Gutierrez E., Velasco A.G., Lucas J.A., Gutierrez-Mañero F.J., Ramos-Solano B. (2017). The Flavonol-Anthocyanin Pathway in Blackberry and Arabidopsis: State of the Art. Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health.
42. Halliwell B. (1997). Antioxidants: the basics--what they are and how to evaluate them. Advances in pharmacology (San Diego, Calif.), 38, 3–20.

43. Handa S., Khanuja S.P., Longo G. and Rakesh D.D. (2008). Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology.
44. Hassimotto N.M., Pinto M. da S., & Lajolo F.M. (2008). Antioxidant status in humans after consumption of blackberry (*Rubus fruticosus* L.) juices with and without defatted milk. Journal of agricultural and food chemistry, 56(24), 11727–11733.
45. Hassimotto N., Mota R., Cordenunsi B., Lajolo F. (2008). Physicochemical characterization and bioactive compounds of blackberry fruits (*Rubus sp.*) grown in Brazil. Ciencia E Tecnologia De Alimentos, 28(3), 702-708.
46. Huang Wy., Zhang Hc., Liu Wx. & Li Cy. (2012). Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. J. Zhejiang Univ. Sci. B 13, 94–102.
47. Hudson B. J. F. (1990). Food Antioxidants, Elsevier Applied Food Science Series.
48. Jazić M. (2019). Hemijski sastav i biološki potencijal ploda, soka i tropa kultivisane i divlje kupine (*Rubus fruticosus* L.). Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Pehrambeno inženjerstvo, Novi Sad.
49. Kavitha V.U., Kandasubramanian B. (2020). Tannins for wastewater treatment. SN Applied Sciences, 2, 1081.
50. Kew Names and Taxonomic Backbone, The International Plant Names Index and World Checklist of Vascular Plants 2022. Published on the Internet at <http://www.ipni.org> and <https://powo.science.kew.org/>
51. Khoo H. E., Azlan A., Tang S. T. & Lim S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. Food nutrition research, 61(1), 1361779.
52. Koca I., Karadeniz B. (2009). Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. Scientia Horticulturae, Amsterdam, v.121, n.4, p.447-450.
53. Koczka N., Stefanovits-Bányai Éva, & Prokaj E. (2018). Element Composition, Total Phenolics and Antioxidant Activity of Wild and Cultivated Blackberry (*Rubus fruticosus* L.) Fruits and Leaves during the Harvest Time. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 46(2), 563–569.
54. Kostecka-Gugała A., Ledwozyw-Smolen I., Augustynowicz J., Wyzgolik G., Krucze M., Kaszycki P. (2015). Antioxidant properties of fruits of raspberry and blackberry grown in central Europe. Open Chemistry, 13, 1313-1325.

55. Krivošej Z., Prodanovic D., Preljević N., Veljković B. (2018). *Rubus laciniatus* Willd. (*Rosaceae*), an introduced species new in the flora of Serbia and the Balkans, *Botanica Serbica*, 42(2), 255–258.
56. Kumar S. & Pandey A.K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorld Journal*, 2013, 162750.
57. Lahanas M., *Biology Encyclopedia*, Hellenica World.
58. Lamuela-Raventós R.M. (2017). Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity: Recent Trends and Applications. *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity*, 107-115.
59. Li J., Shi C., Shen D., Han T., Wu W., Lyu L. & Li W. (2022). Composition and Antioxidant Activity of Anthocyanins and Non-Anthocyanin Flavonoids in Blackberry from Different Growth Stages. *Foods*, 11(18), 2902.
60. Lykins S., Scammon K., Lawrence B.T., Melgar J.C. (2021). Photosynthetic Light Response of Floricane Leaves of Erect Blackberry Cultivars from Fruit Development into the Postharvest Period. *Hortscience*, 56, 347–351.
61. Malykhina A. (2018). Image of *Rubus candicans* Weihe // Plantarium. Plants and lichens of Russia and neighboring countries: open online galleries and plant identification guide.
62. Malykhina A. (2014). Image of *Rubus canescens* Weihe // Plantarium. Plants and lichens of Russia and neighboring countries: open online galleries and plant identification guide
63. Marjanović-Balaban Ž., Grujić S., Jasic M., Vujadinović D. (2012). Testing of chemical composition of wild berries. Third International Scientific Symposium "Agrosym Jahorina 2012", 154-160.
64. Mazur W., Uehara M., Wahala K., Adlercreutz H. (2007). Phytoestrogen content of berries, and plasma concentrations and urinary excretion of enterolactone after a single strawberry meal in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 83(4), 381-387.
65. Mikulic-Petkovsek M., Veberic R., Hudina M., Zorenc Z., Koron D., & Senica M. (2021). Fruit Quality Characteristics and Biochemical Composition of Fully Ripe Blackberries Harvested at Different Times. *Foods*, 10(7), 1581.
66. Milenković-Andelković A. (2016). Ekstrakcija, karakterizacija, biološka aktivnost i potencijalna primena fenolnih jedinjenja iz plodova i lišća biljnih vrsta familija *Rosaceae*, *Cornaceae* i *Grossulariaceae*. Doktorska disertacija, Prirodno-matematički Fakultet, Univerzitet u Nišu.

67. Milivojević J., Maksimović V., Nikolić M., Bogdanović J., Maletić R., Milatović D. (2011). Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild *Fragaria* and *Rubus* berries. *Journal of Food Quality*, 34(1), 1-9.
68. Molyneux P. (2003). The use of the stable radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.
69. Moraes D.P., Chim J.F., Barin J.S., Vizzotto M., Farias C.A.A., et al. (2021). Influence of the cultivar on the composition of blackberry (*Rubus* spp.) minerals. *Journal of food composition and analysis*, 100, 103913.
70. MyBlackBerryPlants <https://myblackberryplants.com/>
71. Niculescu V., Paun N., Silion M. & Popa M.I. (2013). Anthocyanin profile of blackberries and grapes. *Progress of Cryogenics and Isotopes Separation*, 16(1), 119-124.
72. Normann I. (2023). *Plants that bring your garden to life*, DeGroot, Spring.
73. Normann I. (2023). Britannica, T. Editors of Encyclopaedia. Blackberry. Encyclopedia. <https://www.britannica.com/plant/blackberry-fruit>.
74. Nuhu Aliyu A., Gambo Idris M. (2022). Atomic Absorption Spectroscopy Analysis of heavy metals in water at Daura Gypsum mining site, Yobe state, Nigeria.
75. Okatan V. (2020). Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated berry species: A comparative study. *Folia Horticulturae*, 32(1), 79-85.
76. Oszmiański J., Nowicka P., Teleszko M., Wojdyło A., Cebulak T. & Oklejewicz K. (2015). Analysis of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Wild Blackberry Fruits. *International journal of molecular sciences*, 16(7), 14540–14553.
77. Panche A., Chandra S., Diwan A., Harke S. (2015). Alzheimer's and current therapeutics: a review. *Asian Journal Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(3), 14–19.
78. Panche A.N., Diwan A.D. & Chandra S.R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5, e47.
79. 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 Chemistry*, 102, 777-783.
80. Paredes-López O., Cervantes-Ceja M. L., Vigna-Pérez M. & Hernández-Pérez T. (2010). Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life--a review. *Plant foods for human nutrition*, 65(3), 299–308.
81. Petruzzello M. (2022). List of plants in the family *Rosaceae*. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/topic/list-of-plants-in-the-family-Rosaceae-2001612>

82. Poling E.B. (1997). Blackberries. *Journal of Small Fruit & Viticulture*, 4(1-2), 33-69.
83. Poljarec K. (2017). Proizvodnja biljnih ekstrakata. Prehrambeno-biotehnički fakultet Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
84. Popsavin M., Vukojević N., Hranisavljević J. i sar. (2018). Praktikum iz hemije prirodnih proizvoda. Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
85. Potter D. (2009). *Rosaceae* (rose family). AccessScience, McGraw Hill.
86. Ranđelović D. (2009). Tehnologija voća i povrća, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
87. Rejewska A.M., Sikora A., Tomczykowa M., Tomczyk M. (2013). Dewberry (*Rubus caesius* L., *Rosaceae*), *Pharmacognosy Communications*, 3(1), 55-57.
88. Reyes-Carmona J., Yousef G.G., Martínez-Peniche R.Á. & Lila M.A. (2005). Antioxidant Capacity of Fruit Extracts of Blackberry (*Rubus* sp.) Produced in Different Climatic Regions. *Journal of Food Science*, 70(7), 479-503.
89. Salik M.A. (2018). Analytical Techniques for Analysis of Heavy Metals. *Chemistry, Natural Sciences*.
90. Samanidou V. (2020). Extraction Techniques in Sample Preparation. In *Encyclopedia*.
91. Sang-aroon W., Tontapha S., Amornkitbamrung V. (2019). Photovoltaic Performance of Natural Dyes for Dye-Sensitized Solar Cells: A Combined Experimental and Theoretical Study. *Dye-Sensitized Solar Cells*, 203-229.
92. Sariburun E., Sahin S., Demir C., Türkben C. & Uylaşer V. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. *Journal of food science*, 75(4), C328–C335.
93. Savić D. (2010), Nature photography, Fruška gora.
94. Schulz M., Seraglio S.K.T., Della Betta F., Nehring P., Valese A.C., Daguer H., Gonzaga L.V., Costa A.C.O. & Fett R. (2019). Blackberry (*Rubus ulmifolius* Schott): Chemical composition, phenolic compounds and antioxidant capacity in two edible stages. *Food research international*, 122, 627–634.
95. Shaheen N., Irfan N., Khan I. N., Islam S., Islam M., Ahmed M. K. (2016). Presence of heavy metals in fruits and vegetables: Health risk implications in Bangladesh. *Chemosphere*. 152, 431-438.
96. Simon J. (2007). <https://www.flickr.com/photos/simonjoan/2483246875>

97. Singh J.P. (2007). Maceration, Percolation and Infusion Techniques of Extraction of Medicinal and Aromatic Plants (MAPs).
98. Siriwoharn T., Wrolstad R.E., Finn C.E., Pereira C.B. (2004). Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus* L. hybrids) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (52), 8021-8030.
99. Sisti M., Santi M.D, Fraternali D., Ninfali P., Scoccianti V., Brandi G. (2008). Antifungal activity of *Rubus ulmifolius* Schott standardized in vitro culture, *LWT - Food Science and Technology*, 41(5), 946-950.
100. Souza V.R., Pereira P.A.P., Silva T.L.T., Lima L.C.O., Pio R., Queiroz F. (2014). Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, 156, 362-368.
101. Srivastava A. (2009). Phenolic constituents of Georgia-grown blackberry cultivars: fractionation and characterization of their antioxidant, radical scavenging, and anti-inflammatory capacities. A Dissertation Submitted to the Graduate Faculty of the University of Georgia in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree. The University of Georgia.
102. Stajčić S.M., Tepić A.N., Đilas S.M., Šumić Z.M., Čanadanović-Brunet, et al. (2012). Hemijski sastav i antioksidativna aktivnost bobičastog voća. *Acta periodica technologica*, 43, 93-105.
103. Stanisavljević M. (1999). New small fruit cultivars from Cacak [Serbia, Yugoslavia], 1: the new blackberry (*Rubus* sp.) cultivar "Cacanska bestrna". *Acta Horticulturae*, 505, 291-296.
104. Sytsma K.J. (2016). Rosaceae. *Encyclopedia Britannica*.
<https://www.britannica.com/plant/Rosaceae>
105. Vescan L., Clapa D., Fira A., Pamfil D. (2012). Micropropagation of Cold Resistant Blackberry Cultivar 'Gazda'. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture*, 69, 282-289.
106. Vinčić M. (2017). Antioksidativna, antiproliferativna i antimikrobna aktivnost odabranih ekstrakata tropova bobičastog voća. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu.
107. Vlad I., Goji G., Dinulică F., Bartha S., Vasilescu M. & Mihăiescu T. (2019). Consuming Blackberry as a Traditional Nutraceutical Resource from an Area with High Anthropogenic Impact. *Forests*, 10(3), 246.
108. Vračar Lj. (2001). Priručnik za kontrolu kvaliteta svežeg i prerađenog voća, povrća i pečurki i osvežavajućih bezalkoholnih pića, Tehnološki fakultet, Novi Sad.

109. Vulić J., Tumbas Šaponjac V., Savatović S.M. & Dilas S.M., Četković G.S., Čanadanović-Brunet J.M. (2011). Polyphenolic content and antioxidant activity of the four berry fruits pomace extracts. *Acta Periodica Technologica*, 42, 271-279.
110. Wade L.G. (2018). Phenol. *Encyclopedia Britannica*.
<https://www.britannica.com/science/phenol>
111. Wang S.Y., Lin H.S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(22), 140-146.
112. Yang B. & Liu P. (2014). Composition and biological activities of hydrolyzable tannins of fruits of *Phyllanthus emblica*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(3), 529–541.
113. Yilmaz K.U., Zengin Y., Ercisli S., Serce S., Gunduz K., Sengul M., Asma B.M. (2009). Some selected physico-chemical characteristics of wild and cultivated blackberry fruits (*Rubus fruticosus* L.) from Turkey. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(1), 4152-4163.
114. Yin M. (2017). Studies in Blackberry: Development and Implementation of a Phenotyping Protocol for Blackberry Seedling Populations and Impact of Time of Day on the Impact of Time of Day of Harvest on Red Drupelet Reversion for University of Arkansas Blackberry Genotypes. Graduate Theses and Dissertations, University of Arkansas, Fayetteville.
115. Zafra-Rojas Q.Y., González-Martínez B.E., Cruz-Cansino N.D.S., López-Cabanillas M., Suárez-Jacobo Á., Cervantes-Elizarrarás A., & Ramírez-Moreno E. (2020). Effect of Ultrasound on In Vitro Bioaccessibility of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Blackberry (*Rubus fruticosus*) Residues cv. Tupy. *Plant foods for human nutrition*, 75(4), 608–613.
116. Zaprometov M.N. (1988). Tannins, Lignans and Lignins. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants - Phytochemicals in Plant Cell Cultures*, 5, 89-97.
117. Zehiroglu C. & Ozturk Sarikaya S.B. (2019). The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. *Journal of food science and technology*, 56(11), 4757–4774.
118. Zhang Q.W., Lin L.G. & Ye W.C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13(1), 20.
119. Zhao S., Kwok K.C., Liang H. (2007). Investigation on ultrasound assisted extraction of saikosaponins from *Radix Bupleuri*. *Separation and Purification Technology*, 55(3), 307-312.
120. Zia-Ul-Haq M., Riaz M., De Feo V., Jaafar H. Z., & Moga M. (2014). *Rubus fruticosus* L.: constituents, biological activities and health related uses. *Molecules*, 19(8), 10998–11029.