

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

Gordana Bošković

**ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET PITOME I DIVLJE
KUPINE (*RUBUS FRUTICOSUS* L.) SA PODRUČJA
CRNE GORE**

MASTER RAD

PODGORICA, NOVEMBAR 2022.

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

Gordana Bošković

**ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET PITOME I DIVLJE
KUPINE (*RUBUS FRUTICOSUS* L.) SA PODRUČJA
CRNE GORE**

MASTER RAD

PODGORICA, NOVEMBAR 2022.

PODACI I INFORMACIJE O MAGISTRANDU

Ime i prezime: Gordana Bošković

Datum i mjesto rođenja: 06.11.1993., Cetinje

Naziv završenog osnovnog studijskog programa i godina završetka studija: Zaštita životne sredine, Metalurško-tehnološki fakultet, UCG, Podgorica, 2015. godine

INFORMACIJE O MAGISTARSKOM RADU

Naziv studija: Zaštita životne sredine

Naslov rada: Antioksidativni kapacitet pitome i divlje kupine (*Rubus Fruticosus* L.) sa područja Crne Gore

Fakultet: Metalurško-tehnološki fakultet

UDK, OCJENA I ODBRANA MASTER RADA

UDK:

Datum prijave rada: 24.01. 2022. godine

Datum prihvatanja teme: 01.04. 2022. godine

Mentor: Prof. dr Vesna Vukašinić-Pešić, vanredni profesor

Komisija za ocjenu rada:

Prof. dr Nada Blagojević, MTF, predsjednik

Prof. dr Vesna Vukašinić-Pešić, MTF, mentor

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, MTF, član

Komisija za odbranu rada:

Prof. dr Vesna Vukašinić-Pešić, MTF, mentor

Prof. dr Nada Blagojević, MTF, predsjednik

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, MTF, član

Lektor: Autolektura

Datum odbrane: 30.11.2022.

IZJAVA O AUTORSTVU

Kandidat Gordana Bošković

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

IZJAVLJUJEM

pod punom krivičnom i materijalnom odgovornošću da je master rad pod nazivom

„Antioksidativni kapacitet pitome i divlje kupine (*Rubus Fruticosus* L.) sa područja Crne Gore“

rezultat sopstvenog istraživačkog rada, da nijesam kršila autorska prava i koristila intelentualnu svojinu drugih lica i da je navedeni rad moje originalno djelo.

U Podgorici,

Potpis studenta

14. 11. 2022. godine

Veliku zahvalnost dugujem mentorki prof. dr Vesni Vukašinović Pešić i prof. dr Nadi Blagojević na ukazanom povjerenju, uloženom trudu i velikoj pomoći tokom svih faza izrade ovog rada.

Hvala dr Snežani Vukanović na stručnoj pomoći i prijateljskim savjetima, kao i prof. dr Biljani Damjanović Vratnica, na sugestijama koje su doprinijele kvalitetu rada.

Eksperimentalni dio master rada je rađen u laboratorijama za Analitičku hemiju i Instrumentalne metode, Metalurško-tehnološkog fakulteta, Univerziteta u Podgorici. Zbog kompleksnosti istraživanja u ovom master radu dio istraživanja je urađen u Institutu za proučavanje ljekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ u Beogradu. Zato želim da se zahvalim kolegama iz Instituta „Dr Josif Pančić“, a posebno naučnoj savjetnici dr Vanji Tadić na ukazanoj profesionalnoj pomoći.

Posebnu zahvalnost dugujem roditeljima, sestrama i suprugu na podršci, ljubavi, što su u svakom trenutku bili uz mene i vjerovali.

IZVOD

Predmet istraživanja ovog rada je kupina (*Rubus Fruticosus* L.) sa područja Crne Gore. Kupina je stotinama godina zastupljena na našem području i korišćena u ishrani u raznim oblicima (plod, sok, džem, vino) a poznata su i njena ljekovita dejstva. S obzirom da kupina sa teritorije Crne Gore nije dovoljno istražena cilj ovog rada je bio ispitivanje antioksidativnih svojstava i mikroelemenata ploda gajene i divlje kupine, sa područja Bioča, odnosno Bijelog Polja.

Vršeno je određivanje ukupnih fenola, flavonoida, tanina, antocijana, utvrđivana je antioksidativna sposobnost DPPH i FRAP metodom u soku i tropu, sadržaj mikroelemenata u soku, tropu i plodu gajene i divlje kupine. U ispitivanim uzorcima gajene kupine sadržaj fenola kretao se od 216 do 263 mg GAE/100 g, flavonoida od 135 do 155,77 mg QE/100 g, tanina od 0,313 do 0,576 %, ukupnih antocijana 0,306-0,380 %, dok se u uzorcima divlje kupine sadržaj fenola kretao od 216 do 254,66 mg GAE/100 g, flavonoida od 159,97 do 248,01 mg QE/100 g, tanina od 0,186 do 0,700 %, ukupnih antocijana 0,156-0,760 %. Najveći sadržaj polifenolnih jedinjenja zabilježen je u tropu divlje kupine (flavonoidi 248,01 mg QE/100 g, ukupni antocijani 0,760 %, tanini 0,700 %), osim u slučaju ukupnih fenola, koji su se u najvećoj mjeri izdvojili u soku gajene kupine (263 mg GAE/100 g). Sadržaj antocijana utvrđivan je i HPLC analizom i tom prilikom identifikovana su tri antocijana: cijanidin-3-glukozid, cijanidin hlorid, malvidin glukozid i jedan derivat cijanidina. Najzastupljeniji od antocijana, cijanidin-3-glukozid, imao je najveću koncentraciju (7,596 mg/g) u tropu divlje kupine.

Analizom mikroelemenata utvrđen je najveći sadržaj gvožđa (20 do 40 mg/kg), zatim bakra (2,45 do 28,38 mg/kg), mangana (1,75 do 17,41 mg/kg) i cinka (3,23 do 6,12 mg/kg). Kadmijum nije detektovan, a olovo i nikl detektovani su u niskim koncentracijama, ispod maksimalno dozvoljenih vrijednosti.

U ispitivanim uzorcima kupine utvrđen je znatno viši stepen korelacije između sadržaja polifenolnih jedinjenja i antioksidativne vrijednosti mjerene DPPH metodom u odnosu na stepen korelacije između sadržaja polifenolnih jedinjenja i antioksidativne vrijednosti mjerene FRAP metodom. Najveća korelacija utvrđena je između ukupnih fenola i antioksidativne vrijednosti mjerene DPPH testom ($R^2=0,961$). Od pojedinačnih antocijana najbolju korelaciju sa DPPH vrijednostima dao je cijanidin hlorid ($R^2=0,9972$). Kada su u pitanju mikroelementi, najbolja korelacija uspostavljena je između vrijednosti dobijenih za cink i DPPH vrijednosti ($R^2= 0,8595$).

Ključne riječi: kupina, *Rubus Fruticosus* L., antioksidativna aktivnost, polifenolna jedinjenja, FRAP metoda, DPPH metoda, mikroelementi

ABSTRACT

The subject of research in this work are the blackberries (*Rubus Fruticosus* L.) from the area of Montenegro. Blackberry has been present in our area for hundreds of years and used in food in various forms (fruit, juice, jam, wine) and its medicinal effects are also known to us. Given that blackberries from the territory of Montenegro have not been sufficiently researched, the goal of this work was to examine the antioxidant properties and microelements of cultivated and wild blackberries from the area of Bioče, i.e. Bijelo Polje.

The total phenols, flavonoids, tannins, anthocyanins were determined, the antioxidant capacity was determined by the DPPH and FRAP method in the juice and grains, the content of microelements in the juice, grains and fruit of cultivated and wild blackberries. In the examined samples of cultivated blackberries, the content of phenols ranged from 216 to 263 mg GAE/100 g, flavonoids from 135 to 155.77 mg QE/100 g, tannins from 0.313 to 0.576 %, total anthocyanins 0.306-0.380 %, while in the samples of wild blackberries the phenol content ranged from 216 to 254.66 mg GAE/100 g, flavonoids from 159.97 to 248.01 mg QE/100 g, tannins from 0.186 to 0.700 %, total anthocyanins 0.156-0.760 %. The highest content of polyphenolic compounds was recorded in the grains of wild blackberry (flavonoids 248.01 mg QE/100 g, total anthocyanins 0.760%, tannins 0.700%), except in the case of total phenols, which were separated to the greatest extent in the juice of cultivated blackberries (263 mg GAE/100 g). The anthocyanin content was also determined by HPLC analysis and three anthocyanins were identified: cyanidin-3-glucoside, cyanidin chloride, malvidin glucoside and one cyanidin derivative. The most abundant of the anthocyanins, cyanidin-3-glucoside, had the highest concentration (7,596 mg/g) in the grains of the wild blackberry.

The analysis of microelements revealed the highest content of iron (20 to 40 mg/kg), followed by copper (2.45 to 28.38 mg/kg), manganese (1.75 to 17.41 mg/kg) and zinc (3.23 up to 6.12 mg/kg). Cadmium was not detected, and lead and nickel were detected in low concentrations, below the maximum allowed values.

In the tested blackberry samples, a significantly higher degree of correlation was found between the content of polyphenolic compounds and the antioxidant value measured by the DPPH method compared to the degree of correlation between the content of polyphenolic compounds and the antioxidant value measured by the FRAP method. The highest correlation was found between total

phenols and the antioxidant value measured by the DPPH test ($R^2=0.961$). Among individual anthocyanins, the best correlation with DPPH values was provided by cyanidin chloride ($R^2=0.9972$). When it comes to microelements, the best correlation was established between the values obtained for zinc and DPPH values ($R^2= 0.8595$).

Key words: blackberry, *Rubus Fruticosus* L., antioxidant activity, polyphenolic compounds, FRAP method, DPPH method, microelements

SADRŽAJ

1. UVOD.....	11
2. OPŠTI DIO	12
2.1. KUPINA (<i>Rubus fruticosus</i> L).....	12
2.2. SLOBODNI RADIKALI.....	13
2.3. ANTIOKSIDANSI	15
2.3.1. Fenolna jedinjenja	15
2.3.2. Flavonoidi.....	18
2.3.3. Antocijani.....	21
2.3.4. Tanini	24
2.4. MIKROELEMENTI I MAKROELEMENTI	25
2.5. METODE ANALIZE.....	26
2.5.1. UV-VIS spektrofotometrija.....	27
2.5.1.1. DPPH metoda	29
2.5.1.2. FRAP metoda	30
2.5.2. Atomska apsorpciona spektrometrija (AAS)	31
2.5.3. Tečna hromatografija visokih performansi – HPLC	33
3. EKSPERIMENTALNI DIO	35
3.1. UZORKOVANJE KUPINE I PRIPREMA	35
3.2. HEMIJSKA ANALIZA SOKA I TROPA KUPINE.....	37
3.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola.....	37
3.2.2. Određivanje sadržaja flavonoida.....	37
3.2.3. Određivanje sadržaja tanina	38
3.2.4. Određivanje sadržaja antocijana	38
3.2.5. Određivanje antioksidativnih svojstava soka i tropa kupine.....	39
3.2.5.1. Određivanje sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala-DPPH test.....	39
3.2.5.2. Određivanje sposobnosti redukcije feri jona-FRAP test.....	40
3.3. PRIPREMA UZORAKA KUPINE ZA ODREĐIVANJE MIKROELEMENATA	40
3.3.1. Proračun dnevnog unosa elemenata (nutritivna vrijednost).....	41
3.4. STATISTIČKA ANALIZA	41
4. REZULTATI I DISKUSIJA	42

4.1. SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA U SOKU I TROPU KUPINE	42
4.2. SADRŽAJ FLAVONOIDA U SOKU I TROPU KUPINE.....	43
4.3. SADRŽAJ TANINA U SOKU I TROPU KUPINE.....	45
4.4. SADRŽAJ ANTOCIJANA U SOKU I TROPU KUPINE.....	46
4.4.1. Identifikacija antocijana HPLC metodom u soku i tropu kupine	48
4.5. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST SOKA I TROPA KUPINE.....	50
4.5.1. DPPH metoda.....	50
4.5.2. FRAP metoda.....	51
4.6. MIKROELEMENTI U ISPITIVANIM UZORCIMA KUPINE.....	52
4.6.1. Nutritivna vrijednost kupine	55
4.7 KORELACIJA SADRŽAJA FENOLNIH JEDINJENJA, MIKROELEMENTATA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI U ISPITIVANIM UZORCIMA KUPINE	56
5. ZAKLJUČAK.....	59
6. LITERATURA	61

1. UVOD

Čovjek je svakodnevno izložen stresu, lošoj i nezdravoj ishrani, raznim vrstama zagađenja i sve to utiče na njegovo zdravlje. Zbog toga se ljudi u posljednje vrijeme okreću zdravijem načinu života koji podrazumijeva bavljenje sportom i konzumiranje zdrave hrane. Voće i povrće sadrže veliku količinu vitamina, minerala, vlakana i antioksidativnih jedinjenja koja mogu pomoći organizmu da se zaštiti od oksidativnog oštećenja i uticati na smanjenje rizika od hroničnih bolesti (Volk i sar., 2007).

Kupine su dobri prirodni antioksidansi koji imaju snažno antioksidativno dejstvo, što potvrđuju dosadašnja ispitivanja. Njihova antioksidativna sposobnost ogleda se u visokom sadržaju polifenolnih jedinjenja kao što su antocijani, flavonoidi i fenolne kiseline. Kupina obiluje i vitaminom C a nije zanemarljiva ni koncentracija metala kao što su gvožđe, bakar i cink koji su esencijalni za žive organizme (Robinson i sar., 2020).

Fenolna jedinjenja prisutna u kupini mogu smanjiti nastajanje slobodnih radikala i imaju pozitivne zdravstvene koristi u vidu antikancerogenih, antiinflamatornih, antibakterijskih i antidijabetskih efekata. Sprečavaju neurodegenerativne bolesti kao što je Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest i bolesti motornih neurona, smanjuju nivo krvnog pritiska, poboljšavaju funkcije krvne plazme i endotijela (Bowen-Forbes i sar., 2010; Robinson i sar., 2020).

Predmet istraživanja ovog master rada bilo je bobičasto voće kupine (*Rubus fruticosus* L.). Vršena su ispitivanja gajene (pitome) i samonikle (divlje) kupine ubrane na teritoriji Crne Gore sa ciljem da se utvrdi njihova antioksidativna aktivnost različitim metodama, odredi sadržaj fenola, flavonoida, tanina, antocijana, metala, kao i hemijski sastav soka i tropa obje vrste kupine.

Pretragom literature nađen je veliki broj podataka o antioksidativnom potencijalu kupine gajene širom svijeta, njenom mineralološkom sastavu i značaju upotrebe kupine u ishrani, farmaciji i medicini. Međutim, takvi podaci nisu nađeni (ili postoje nepotpuni i sporadični podaci) za kupinu sa područja Crne Gore. Osim toga, malobrojna su i istraživanja koja se odnose na antioksidativna svojstva za sok i trop kupine (naročito divlje), pa se pretpostavlja da će podaci dobijeni ovim ispitivanjima imati veliki značaj i predstavljati osnov za buduća istraživanja.

2. OPŠTI DIO

2.1. KUPINA (*Rubus fruticosus* L.)

Rod *Rubus* obuhvata nekoliko vrsta bobičastog voća i najveći je rod porodice Rosaceae. Iako su vrste ovog roda kultivisane vjekovima zbog svojih plodova, postoji samo nekoliko pripitomljenih vrsta. Ovo voće se konzumira svježe ili u obliku prerađenih proizvoda kao što su džem, vino, čaj, sladoled, deserti i pekarski proizvodi (Boven-Forbes i sar., 2010; Zia-UI-Hak i sar.,2014; Schulz i sar., 2019).

Kupine su višegodišnje biljke, koje mogu da narastu do 3 m, imaju bodljikavo ili dlakavo stablo sa listovima koji su prstasto složeni sa pet listića, cvjetaju od maja do avgusta a iz svakog cvijeta razvije se plod (Jazić, 2019). Plodovi kupine su nepravilnog oblika, kiselog ukusa i crne boje na kraju sazrijevanja. Rasprostranjena je u mnogim oblastima širom svijeta, uključujući i Crnu Goru. Gaji se u najrazličitijim klimatskim uslovima od tropskih, preko umjerenih do hladnih podneblja. Pripada grupi jagodastog voća (Schulz i sar., 2019; D'Agostino i sar., 2015).



Slika 1. Gajena kupina (gore), divlja kupina (dolje)

Kupina se može klasifikovati u dvije kategorije: gajenu (pitomu) i divlju (samoniklu) (slika 1). Divlja kupina se najčešće može naći pored puteva, na zapuštenim i neuređenim površinama, u blizini rijeka i potoka. Ima dosta sitniji plod u odnosu na gajenu kupinu. Na području našeg regiona najčešće se nalaze sledeći rodovi divlje kupine: *Rubus caesius* L., *Rubuscandicans*, *Rubus canescens* Dc, *Rubus Discolor*, *Weihe et Nees*, *Rubus hirtus* Waldst. and Kit., *Rubusulmifolius* Schott (Jazić, 2019).

Gajena kupina ima značajnu komercijalnu upotrebu, i plantaže kupina se mogu naći širom svijeta. Mogu biti sa bodljama i bez bodlji. Od bestrnih sorti najpoznatije su: *Black satin*, *Čačanska bestrna*, *Chester Thornless*, *Jumbo*, *Loch ness*, *Thornfree*. Najčešće pitome sorte kupina sa bodljama su: *Darrow*, *Gazda*, *Illini Hardy*, *Himalaya* (Jazić, 2019).

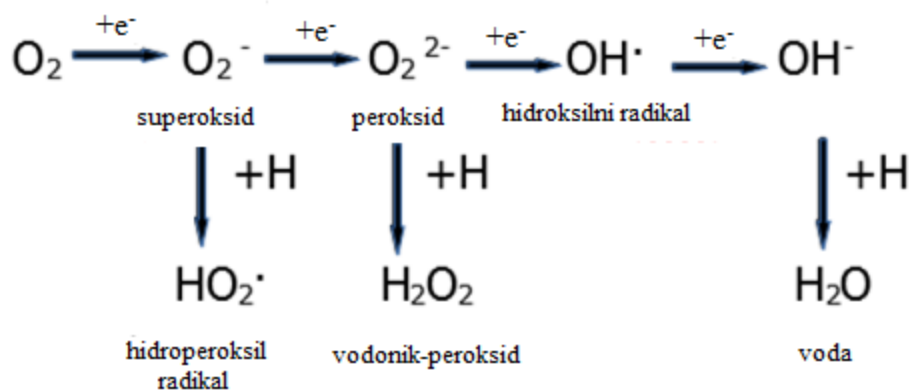
Zbog sve veće svijesti o vrijednim osobinama voća, globalna potrošnja bobičastog voća i proizvoda na bazi bobičastog voća je značajno porasla (Nile i Park, 2014; Schulz i sar., 2019). Bobičasto voće predstavlja nezamjenljive komponente zdrave ishrane, obezbjeđujući širok spektar supstanci kao što su dijetetska vlakna, minerali, vitamini, drugi esencijalni hranljivi sastojci i fitohemikalije, posebno polifenoli (de Souza i sar., 2014; Nile i Park, 2014; Schulz i sar., 2019). Uzimajući u obzir da kupine spadaju u bobičasto voće, one su bogat izvor polifenolnih jedinjenja, i prepoznate su kao vrlo korisne za ljudsko zdravlje i to, uglavnom, zbog antioksidativnih i antiinflamatornih svojstava ovih jedinjenja (Van de Velde i sar., 2016; Schulz, 2019).

2.2. SLOBODNI RADIKALI

Radikali su veoma reaktivne i nestabilne vrste. Molekul sa nesparenim elektronima se naziva slobodni radikal (Halliwell i Gutteridge, 2007; Bahorun i sar., 2006; Valko i sar., 2007; Pham-Huy i sar., 2008). Kiseonik je element neophodan za život. Kada ćelije koriste kiseonik za stvaranje energije nastaju slobodni radikali kao posledica proizvodnje adenozin trifosfata (ATP). Ovako nastali slobodni radikali su generalno reaktivne vrste kiseonika (eng. reactive oxygen species, ROS) i reaktivne vrste azota (eng. reactive nitrogen species, RNS) koji nastaju kao rezultat ćelijskog redoks procesa. Oni se proizvode ili iz normalnog ćelijskog metabolizma *in situ* ili iz spoljašnjih izvora (zagađenje, dim cigareta, zračenje, lijekovi) (Pham-Huy i sar., 2008).

ROS i RNS su termini koji zajednički opisuju slobodne radikale i druge neradikalne reaktivne derivate takođe, zvane oksidanti. Slobodni radikali nastaju od molekula raskidanjem hemijskih

veza tako da svaki fragment zadržava jedan elektron, cijepanjem radikala da se dobije drugi radikal i putem redoks reakcije. Slobodni radikali su: hidroksilni ($\text{OH}\cdot$), superoksidni ($\text{O}_2\cdot^-$), azot oksidni ($\text{NO}\cdot$), azot dioksidni ($\text{NO}_2\cdot$), peroksilni ($\text{ROO}\cdot$) i lipidni peroksilni ($\text{LOO}\cdot$). Vodonik peroksid (H_2O_2), ozon (O_3), singletni kiseonik ($^1\text{O}_2$), hipohlorasta kiselina (HOCl), nitritna kiselina (HNO_2), peroksinitrit (ONOO^-), azot trioksid (N_2O_3), lipidni peroksid (LOOH), nisu slobodni radikali ali predstavljaju oksidanse koji lako mogu dovesti do reakcija slobodnih radikala kod živih organizama (Genestra, 2007.; Pham-Huy i sar., 2008). Biološki slobodni radikali su stoga veoma nestabilni molekuli čiji su elektroni dostupni za reakciju sa raznim organskim supstancama kao što su lipidi, proteini, DNK. Mehanizam nastajanja slobodnih kiseonikovih radikala dat je na slici 2 (Galušić, 2020).



Slika 2. Mehanizam nastajanja slobodnih kiseonikovih radikala (Galušić, 2020.)

Kada se postigne preopterećenje slobodnim radikalima, kada oksidativne vrste prevazilaze antioksidativnu odbranu organizma, oni se ne mogu postepeno uništiti pa njihova akumulacija u tijelu stvara fenomen koji se naziva oksidativni stres (Pham-Huy i sar., 2008). Ovaj proces igra veliku ulogu u razvoju hroničnih i degenerativnih bolesti kao što su rak, autoimuni poremećaji, starenje, katarakta, reumatoidni artritis, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti.

2.3. ANTIOKSIDANSI

Antioksidansi su supstance koje mogu spriječiti ili usporiti oštećenje ćelija izazvano slobodnim radikalima, nestabilnim molekulima koje tijelo proizvodi kao reakcija na spoljašnje i druge uticaje (Volko i sar., 2007).

Ljudsko tijelo se suprotstavlja oksidativnom stresu proizvodnjom antioksidanasa, koji se ili prirodno proizvode *in situ* (endogeni), ili se unose putem hrane i/ili suplemenata (egzogeni). Endogeni i egzogeni antioksidansi djeluju kao „čistači slobodnih radikala” sprečavanjem i smanjenjem oštećenja uzrokovanih ROS i RNS vrstama, i stoga poboljšavaju imunološku odbranu i smanjuju rizik od raka i degenerativnih bolesti (Volko i sar., 2006; Pham-Huy i sar., 2008). Najznačajniji egzogeni antioksidansi su vitamini, karotenoidi i polifenolna jedinjenja (Galušić, 2020).

Voće i povrće sadrži veliki broj antioksidativnih jedinjenja (fitohemikalija) kao što su fenoli koji štite ćelijske sisteme od oksidativnog oštećenja i smanjuju rizik od hroničnih bolesti (Volko i sar., 2007).

Studije sprovedene sa ekstraktima kupine bogate fenolima su pokazale antiupalni, hemopreventivni i neuroprotektivni efekat. U različitim studijama koje se tiču ljudskog zdravlja konzumacija svježih kupina je povezana sa poboljšanjem kognitivnih i kardiovaskularnih funkcija, kao i usporavanjem procesa osteoporoze. Postoje istraživačke studije koje kombinuju varenje i apsorpciju fenola iz kupine *in vitro*, koje se sprovode kako bi se bolje razumjeli njihov metabolizam i bioaktivnost. Ova jedinjenja se mogu vezati za sluzokožu digestivnog trakta ili biti fermentisana u debelom crijevu, doprinoseći zdravstvenim ishodima koje pruža konzumacija kupine (Robinson i sar.,2020; Lin i sar., 2016).

2.3.1. Fenolna jedinjenja

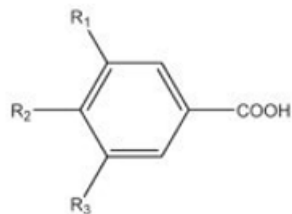
Fenolna jedinjenja su sekundarni metaboliti, sa više od 10000 različitih struktura, koja sadrže najmanje jedan aromatični prsten i jednu ili više hidroksilnih grupa (Jazić, 2019).

Postoje hiljade različitih fenolnih antioksidativnih jedinjenja koji se klasifikuju u nekoliko kategorija na osnovu strukturnih sličnosti. Npr., Craft (2012) je razdvojio fenole u sedam kategorija:

1. fenolne kiseline,
2. kumarini,
3. flavonoidi,
4. izoflavonoidi,
5. stilbeni,
6. lignani i
7. fenolni polimeri (tanini).

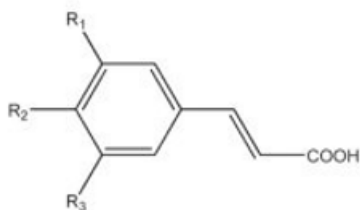
Ove grupe se razlikuju jedna od druge po položaju funkcionalnih grupa (Craft i sar., 2012; Robinson i sar, 2020).

Fenolne kiseline, za koje se zna da služe kao višenamjenska bioaktivna jedinjenja, široko su rasprostranjene u biljkama. Većina njih je sastavni dio ljudske ishrane, a konzumiraju se i kao ljekoviti preparati. Mnogi zdravstveni zaštitni efekti fenolnih jedinjenja pripisani su njihovim antioksidativnim, antimutagenim, antikancerogenim, antiinflamatornim, antimikrobnim i drugim biološkim svojstvima (Xu i sar., 2008; Shahidi i Ambigaipalam, 2015). Supstituisani derivati hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline su dominantne fenolne kiseline u biljkama, pri čemu su češće hidroksicimetne kiseline (Slika 3). Ovi derivati se razlikuju po načinu hidroksilacije i metoksilacije u svojim aromatičnim prstenovima (Mattila i Hellstrom, 2007; Shahidi i Nacz, 2004). Preciznije, derivati benzojeve kiseline su fenolne kiseline, dok su derivati cimetne kiseline fenilpropanoidi (Shahidi i Ambigaipalam, 2015).



Hidroksibenzojeva kiselina

Kiselina	R ₁	R ₂	R ₃
P-Hidroksibenzojeva	H	OH	H
Protokateninska	OH	OH	H
Vanilinska	OCH ₃	OH	H
Siringinska	OCH ₃	OH	OCH ₃
Galna	OH	OH	H



Hidroksicimetna kiselina

Kiselina	R ₁	R ₂	R ₃
P-Kumarna	H	OH	H
Kafeinska	OH	OH	H
Ferulinska	OCH ₃	OH	H
Sinapinska	OCH ₃	OH	OCH ₃

Slika 3. Hemijska struktura fenolnih kiselina (Shahidi i Ambigaipalam, 2015)

Fenolne kiseline su prisutne u nekim biljnim namirnicama uglavnom u vezanom obliku. Fenolne kiseline se ponašaju kao antioksidansi, zbog reaktivnosti njihovog fenolnog dijela (hidroksilni supstituent na aromatičnom prstenu). Iako postoji nekoliko mehanizama, vjeruje se da je dominantan način antioksidativne aktivnosti uklanjanje radikala putem doniranja atoma vodonika. Drugi utvrđeni antioksidativni mehanizmi gašenja su putem doniranja elektrona i gašenja singletnog kiseonika. Supstituenti na aromatičnom prstenu ovih fenolnih kiselina utiču na stabilizaciju i stoga utiču na sposobnost gašenja radikala. Različite kiseline stoga imaju različite antioksidativne aktivnosti. Istraživanja su pokazala antioksidativni potencijal slobodnih, esterifikovanih i glikozilovanih fenola (Robbins, 2003; Shahidi i Chandrasekara, 2015).

Zbog njihovog prisustva u biljnoj hrani, ljudi svakodnevno unose fenolne kiseline. Procijenjeni dnevni unos zavisi od ishrane koja se konzumira (voće, povrće, žitarice, čajevi, kafa, začini). Poznato je da kofeinska kiselina, jedna od najistaknutijih prirodnih cimetnih kiselina, selektivno blokira biosintezu leukotriena, komponenti koje imaju ulogu u razvoju bolesti kao što su imunoregulacija, astma i alergijske reakcije. Druge studije su pokazale da kafeinska kiselina i neki

njeni estri mogu imati antitumorsko dejstvo protiv karcinogeneze debelog crijeva (Robbins, 2003; Shahidi, 2015.).

Najzastupljenija fenolna jedinjenja prisutna u bobičastom voću su antocijanidini, proantocijanidini, kempferol, kvercetin, miricetin, p-kumarinska kiselina, kafeinska kiselina, ferulna kiselina, p-hidroksibenzojeva kiselina, galna kiselina, elaginska kiselina, elagitanin, flavonoli, fenolne kiseline i flavan-3-oli (Koli i sar., 2010; Subbiah i sar., 2020). Koncentracije fenolnih jedinjenja u biljkama, uključujući koncentracije flavonoida i fenolne kiseline, se razlikuju i zavise od klime, područja na kom biljke rastu, sorte i vremena berbe (Siracusa i Elsevier, 2019; Luís i sar., 2018; Zhong i sar., 2020).

Kupina je jedna od biljaka koja pokazuje dobra antioksidativna svojstva. Detektovano je da su elagitanini i cijanidin-3-glukozid glavna fenolna jedinjenja u kupini. Antocijanini (cijanidin-3-rutinozid i cijanidin-3-malonil glukozid), flavonoli (kvercetin i kempferol glikozidi) i flavan-3-ol (epikatehin) takođe su identifikovani u kupinama (Stajčić, 2012).

U literaturi postoji veliki broj radova gdje je ispitivan sadržaj fenolnih jedinjenja, a podaci variraju u zavisnosti sa kog su područja uzorci kupine.

Od svih prikupljenih podataka iz literature, kupina gajena u Australiji pokazala je najmanji sadržaj ukupnih fenola, 1,81 mg GAE/g (Subbiah i sar., 2020). Slični rezultati potiču iz Argentine i Turske gdje su koncentracije fenola bile u opsegu 1,40-3,05 mg GAE/g za gajenu kupinu (Velde i sar., 2016; Koca i Karadeniz, 2009). Koca i Karadinez (2009) su ispitivali i divlju (samoniklu) kupinu i dobili vrijednosti od 2,64 do 3,79 mgGAE/g. Nešto veći sadržaj fenola u divljoj kupini zabilježen je na području Čilea 6,44 mgGAE/g (Guerrero i sar., 2010.). Studije rađene u Džordžiji (SAD) (Xiaoxi Liao i sar., 2019) i Kini (Huang i sar., 2012), pokazale su slične rezultate kada je u pitanju gajena kupina. Tako je prinos fenola u uzorcima kupine iz Džordžije 4,09-4,59 mg GAE/g, u zavisnosti od sorte, dok je u Kini sadržaj fenola u kupini 5,58 mg GAE/g. Najveći sadržaj ukupnih fenola ima kupina sa područja Kostarike, 104 mg GAE/g, (Araya i sar., 2016).

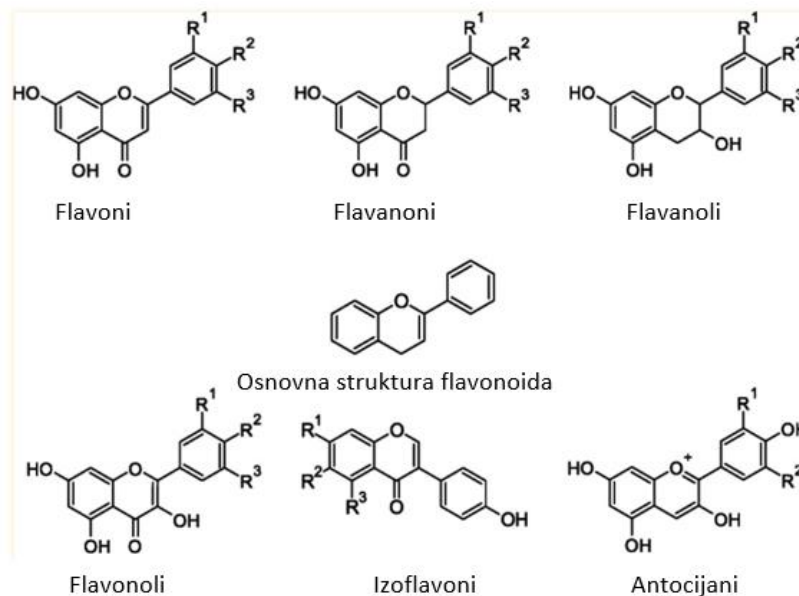
2.3.2. Flavonoidi

Flavonoidi čine najviše izolovanu i identifikovanu klasu polifenolnih jedinjenja. Flavonoidi predstavljaju sekundarne biljne metabolite. Imaju različito farmakološko dejstvo, poput antioksidativnog, antivirusnog, antibakterijskog, antiinflamatornog i antialergijskog potencijala

(Panche i sar., 2016; Batra i Sharma, 2013) i sastavni su dio mnogih kozmetičkih proizvoda. Do danas je identifikovano više od 6000 različitih flavonoida i taj broj se kontinuirano povećava (Mutha i sar., 2021). Oni se sastoje od zajedničkog ugljeničnog skeleta difenil propana zajedno sa dva benzenska prstena povezana kroz linearni lanac od tri ugljenika (C6–C3–C6). Flavonoidi se mogu klasifikovati u podklase kao što su flavoni, flavanoni, flavanoli, flavonoli (katehini i proantocijanidini), antocijanidini i izo- flavonoidi (slika 4 i tabela 1), dok je flavon klasa manje uobičajenih flavonoida (Mutha i sar., 2021).

Tabela 1. Klasifikacija flavonoida, (Mutha, 2021)

Klasa flavonoida	Primjeri
Flavoni	Hrizin Luteolin
Flavanoni	Hesperidin Naringenin
Flavonoli	Kvercetin Kaempferol
Flavanoli	Katenin Epigalokatenin
Antocijani	Cijanidin Delfinidin
Izoflavoni	Daidzein Genistein



Slika 4. Strukturne formule flavonoida, (Mutha, 2021)

Glavna uloga flavonoida i kod biljaka i kod ljudi je zaštita od oksidativnog stresa izazvanog uticajem slobodnih radikala. Pošto oksidativni stres igra glavnu ulogu u mnogim hroničnim bolestima, povećana potrošnja hrane bogate flavonoidima može smanjiti učestalost i stopu smrtnosti od hroničnih bolesti (Mi Jin Cho i sar., 2004).

Flavonoidi (Fl) djeluju kao antioksidansi mehanizmom doniranja vodonikovih atoma pri čemu se hvataju slobodni radikali zbog čega nastaje manje reaktivni flavonoidni fenoksidni radikal (reakcije 1 i 2), (Kazazić 2004; Mutha i sar., 2021).



Antioksidativni kapacitet flavonoida zavisi od vrste šećera, stepena glikozilacije kao i acilacije antocijanin glukozida. Šećerna grupa glikozida kvercetina je važan dio koji utiče na njihovu apsorpciju i biodostupnost *in vivo*. Nedostatak povezan sa kiselom hidrolizom flavonoidnih glikozida je koncentracija kiselina, pa je potrebno optimizovati vrijeme inkubacije i temperature za različite klase flavonoida. U idealnom slučaju, flavonoide treba analizirati u njihovom

prirodnom obliku kao glikozide, kako bi se identifikovali odnosi struktura–aktivnost u vezi sa antioksidativnim kapacitetom kao i druge biološke funkcije (Mi Jin Cho i sar., 2004).

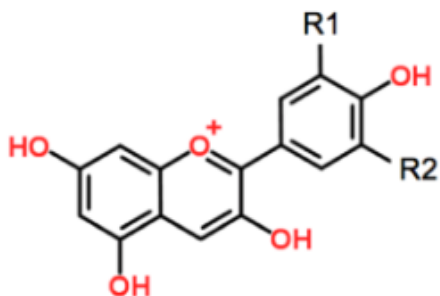
Kupina ima izražena antioksidativna svojstva. Otkriveno je da su glavna fenolna jedinjenja u kupini elagitanini i cijanidin-3-glukozid, antocijanini (cijanidin-3-rutinozid i cijanidin-3-malonil glukozid), flavonoli (kvercetin i kempferol glikozidi) i flavan-3-ol (epikatehin) (Stajčić, 2012). Koncentracije flavonoida u kupini se razikuju od klime i područja na kom se uzgaja (Siracusa i Elsevier, 2019; Luís Â. i sar., 2018; Zhong i sar., 2020). Ispitivanje kupina u Australiji dalo je vrijednost od 30,12 µg QE/g (Subbiah i sar., 2020). Višestruko veće koncentracije dobijene su za kupinu gajenu u Teksasu i to 56,7 mg QE/g, kao i u Brazilu (Basu i Maier, 2016; Croge i sar., 2019).

2.3.3. Antocijani

Antocijani su prirodni biljni pigmenti koji daju crvenu, plavu i ljubičastu boju voću, cvijeću, lišću i nekom povrću. Antocijani se zato i koriste u prehrambenoj industriji kao prirodne boje pri preradi hrane i proizvodnji pića. Kategorisani su kao flavonoidi, što je jedna od najvećih kategorija fenolnih jedinjenja. Glikozidi antocijanidina su antocijani. Pronađeno je oko 90% antocijana u glikozidnom obliku, koji u svom sastavu imaju neki od prirodno prisutnih aglikona (Ćujić i sar., 2013). Aglikoni antocijanina se nazivaju antocijanidini, do danas je identifikovano njih 19 među kojima su šest glavnih: cijanidin, peonidin, delphinidin, pelargonidin, malvidin i petunidin, tabela 2, slika 5 (Burton-Freeman, 2016).

Tabela 2. Podjela antocijanidina (Burton-Freeman, 2016).

Aglikoni	R1	R2
Cijanidin	-OH	-H
Peonidin	-OCH ₃	-H
Delphinidin	-OH	-OH
Malvidin	-OCH ₃	-OCH ₃
Pelargonidin	-H	-H
Petunidin	-OCH ₃	-OH



Slika 5. Strukturna formula antocijana (Burton-Freeman i sar., 2016)

Osnovna struktura antocijanina je sastavljena od flavilijum katjona (C6-C3-C6), koji je vezan za različite šećere ili hidroksilne ili metoksilne grupe, što rezultira sa više od 635 do sada identifikovanih antocijanina (He J. i Guisti, 2010; Burton-Freeman, 2016). Najčešći šećer vezan za antocijanine je glukoza, iako se u radovima navode i ramnoza, ksiloza, galaktoza, arabinoza i rutinoza (Horboviczi, 2008; Burton-Freeman i sar., 2016). Antocijanini mogu biti mono-, di- ili tri-glikozidi, u zavisnosti od broja prikačenih šećera. Pored toga, ostaci šećera mogu biti acilirani aromatičnim/alifatičnim kiselinama (Burton-Freeman i sar., 2016).

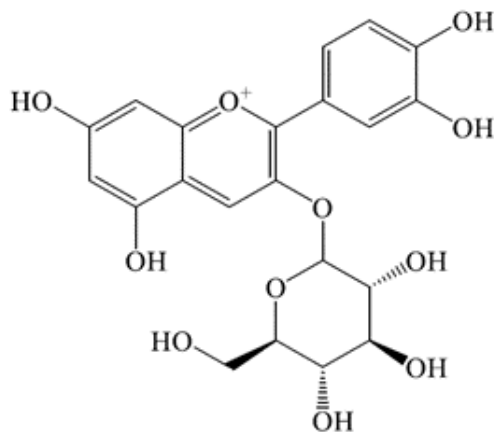
Na boju i stabilnost antocijanina utiču: njihova struktura, pH, temperatura, svjetlost, kiseonik, enzimi, inter- i intramolekularna povezanost sa drugim jedinjenjima kao što su askorbinska kiselina, joni metala, šećeri i proteini (Burton-Freeman i sar., 2016).

Antocijanini su posebno osjetljivi na pH i pokazuju reverzibilnu promjenu boje od crvene do plave kada se pH rastvora promijeni iz kiselog u bazni. Ovi oblici antocijanina, koji zavise od pH rastvora, su flavilijum katjon (crvena), karbinol baza (bezbojna), halkon (blijedožuta/bezbojna), hinonoidna baza (ljubičasta/plava) i anjonska hinonoidna baza (plava) (Oliveira i sar., 2014; Burton-Freeman i sar., 2016).

Visoka antioksidativna aktivnost antocijanina potiče od njihove sposobnosti da uklone slobodne radikale doniranjem vodonika iz hidroksilne grupe ili prihvatanjem nesparenih elektrona (Miguel, 2011; Burton-Freeman i sar., 2016). Fenoksilni radikali nastali u ovoj reakciji stabilizuju se kroz rezonanciju i/ili intramolekularno vodoničko povezivanje (Kay, 2006; Burton-Freeman i sar., 2016).

Mnogobrojna istraživanja ukazuju da je cijanidin-3-glukozid (C3G) dominantan antocijan u kupini i on se najčešće koristi kao ekvivalent za iskazivanje koncentracije antocijana. Na slici 6 je prikazana njegova strukturalna formula. Osim cijanidin-3-glukozida najčešće zastupljeni antocijani

u kupinama su: cijanidin-3-ksilozid, cijanidin-3-dioksalil-glukozid, cijanidin-3-rutinozid, cijanidin-3-soforozid, cijanidin-3-glukozilrutinozid, cijanidin-3-arabinozid, cijanidin-3-galaktozid, malvidin-3-arabinozid, perlargonidin-3-glukozid (Jazić, 2019).



Slika 6. Struktura cijanidin-3-glukozida, (Jazić, 2019)

U prosjeku kupine sadrže 82,5 – 325,9 mg antocijana na 100 g suve mase (Ćujić i sar., 2013). Za razliku od fenola i flavonoida čija je koncentracija zavisila od područja na kom se uzgajala kupina, kod antocijana literaturni podaci ne pokazuju velika odsupanja bez obzira na lokaciju sa koje su kupine prikupljene. Gajene kupine sa 5 lokacija u centralnoj Evropi sadržale su 2012. godine 1,07 - 2,30 mg C3G/g uzorka, odnosno 0,80 - 1,50 mg C3G/g 2013. godine (Kostecka-Gugata, 2015). Vrijednosti od 1,40 - 1,50 mg C3G/g u Džordžiji dobio je Liao (Liao i sar., 2019). Gotovo identični rezultati dobijeni su i u Argentini 2016 (Van de Velde i sar., 2016) ali i u Turskoj (Koca i Karadeniz, 2009).

Pregledom literature nađeno je odstupanje samo u istraživanju Araya i sar., 2017, gdje je kupina sa Kostarike imala sadržaj antocijana 0,71 do 15,4 mg C3G/g u zavisnosti od ispitivane sorte. Divlja kupina je ispitivana u Turskoj i u Čileu i vrijednosti sadržaja antocijana bile su približno iste. U Turskoj je za sedam ispitivanih vrsta koncentracija antocijana bila 1,30-1,97 mg C3G/g (Koca i Karadeniz, 2009) dok je u Čileu iznosila 1,89 mg C3G/g (Guerrero i sar., 2010).

2.3.4. Tanini

Tanini, biljnog porijekla, generalno su definisani kao rastvorljive fenolne supstance, oporog ukusa. Tanini su hemijski definisani kao fenilpropanoidna jedinjenja često kondenzovana u polimere promjenljive dužine. Tanini i fenolna jedinjenja su široko rasprostranjeni sekundarni metaboliti u biljkama i igraju važnu ulogu u odbrambenim mehanizmima biljaka. Izrazi „hidrolizujući“ i „kondenzovani“ tanini se koriste za razlikovanje dvije važne klase biljnih tanina, odnosno tanina dobijenih od galne kiseline i tanina iz flavan-3,4-diola, respektivno (Swanson, 2003).

Proantocijanidini (PAC), ili kondenzovani tanini, su polimerizovani oblik (+)-katehina i (-)-epikatehina. Nastaju kondenzacijom flavan-3-ola (katehina i epikatehina) ili flavan-3,4-diola (leukoantocijanidina). U toku procesa polimerizacije djeluju enzimi peroksidaze i oksiduju orto-hidroksilne grupe do orto-hinona. Studije su pokazale da PAC mogu biti korisni za zdravlje tako što štite probavni trakt od oksidativnog stresa i kancerogeneze (Robinson i sar., 2020).

Elagnitanin (klasa tanina koji se hidrolizuju) je definisan formiranjem estarske veze između heksahidroksidifenilne kiseline (HHDP) i monosaharida. Elagnitanini često postoje u prirodi kao polimeri visoke molekularne težine, koji su lako podložni promjenama (Tomas-Barberan i sar., 2014). Kao i elaginska kiselina, elagnitanini pokazuju antiinflamatorna i antikancerogena svojstva (Robinson i sar., 2020).

Elagnitanini kupine su prvenstveno mješavina sanguina H-6/lambertianina A i lambertianina C sa ukupnim sadržajem elagnitanina u rasponu od 23 do 343 mg/100 g što ih čini relativno bogatim u poređenju sa drugim voćem (Hager i sar., 2010; Robinson i sar., 2020). Takođe je nađeno da se većina elagnitanina nalazi u sjemenkama i da se tradicionalnim cijeđenjem soka može smanjiti sadržaj elagnitanina za 70 do 82 %, kao što je slučaj i sa elaginskom kiselinom (Hager i sar., 2010). Koncentracije tanina variraju u zavisnosti od područja na kojem se kupine uzgajaju (Siracusa, 2019; Luís i sar., 2018; Zhong i sar., 2020). U Argentini je zabilježena koncentracija tanina u kupinama u opsegu 8,9 - 10,3 mg EAE/100 g (Velde i sar., 2016). Kupina sa područja američke države Oregon imala je duplo veću koncentraciju 20,7 do 25,4 mg EAE/100 g (Siriwoharn i sar., 2004). Širi opseg koncentracija dobio je Liao sa saradnicima i to vrijednosti 10-27,8 mg EAE/100 g ispitujući tri sorte kupine sa područja države Džordžija (SAD) (Liao i sar, 2019).

2.4. MIKROELEMENTI I MAKROELEMENTI

Na osnovu sadržaja nekog elementa u uzorku hrane ili životne sredine izvršena je podjela na makroelemente i mikroelemente. Makroelementi se nalaze u većoj količini (više od 1%) u uzorku dok se mikroelementi mogu detektovati u ppm koncentraciji (Mutić, 2022).

Ljudski organizam se najviše sastoji od biogenih elemenata: kiseonika, ugljenika, vodonika, azota i sumpora. Osim njih glavne strukturne komponente tijela čine i natrijum, magnezijum, kalcijum, kalijum, fosfor i hlor (Mutić, 2022).

Određivanje sadržaja mikro i makroelemenata u hrani je važno zbog procjene unosa esencijalnih ili toksičnih elemenata koji mogu ukazati na benefite ili rizik po zdravlje. Osim toga sadržaj elemenata u biljkama je jedan od najčešćih parametara za procjenu stepena zagađenosti zemljišta, proizvodnih karakteristika određenog povrća/voća, utvrđivanje autentičnosti genotipa, kao i za zaštitu geografskog porijekla (Dramićanin i sar., 2021).

Postoji dosta podataka o ispitivanju sadržaja bakra, cinka, gvožđa, mangana, nikla, olova i kadmijuma u realnim uzorcima. Bakar je element koji se u ljudskom organizmu nalazi u tragovima i neophodan je za život jer čini esencijalnu komponentu mnogih enzima i proteina. Cink je esencijalni element koji utiče na rast i razvoj. Postoji više od 300 enzima u kojima cink ima neku od uloga: strukturnu, katalitičku ili regulatornu. Cink predstavlja antagonist olovu, niklu i kadmijumu jer njegovo prisustvo u nekim namirnicama umanjuje rizik povezan sa visokim koncentracijama toksičnih metala (WHO, 1996b). Gvožđe je takođe esencijalni element koji ima važne metaboličke funkcije koje uključuju prenos i skladištenje kiseonika kao i mnoge redoks reakcije. Količina gvožđa u hrani dosta se razlikuje čak i kod sličnih namirnica. Ona zavisi od klimatskih uslova, zemljišta i postupka prerade. Nedostatak gvožđa može izazvati ozbiljne zdravstvene probleme. Mangan ulazi u sastav enzima i umnogome doprinosi zdravlju živih organizama. Najviše se unosi putem hrane, kao što je slučaj i sa niklom. Potrebni su mikrogrami nikla kako bi on vršio svoju funkciju u organizmu. I on, kao većina spomenutih elemenata, ulazi u sastav enzima (Mutić, 2022; Hodžić, 2013).

Preporučeni dnevni unosi bakra, cinka, gvožđa, mangana i nikla su 1 mg, 10 mg, 14 mg, 2 mg i 0,196 mg, redom. Svi navedeni preporučeni dnevni unosi metala odnose se na tjelesnu težinu od 70 kg, koja se smatra prosjekom za Evropsko stanovništvo (European Economic Community – EEC, 2008).

Od toksičnih metala koji se istražuju olovo i kadmijum su višestruko opasni po ljudsko zdravlje. Olovo dovodi do oštećenja nervnog sistema, anemije, oštećenja bubrega i kostiju, ometa funkciju bioloških enzima, a kadmijum dovodi do oštećenja bubrega, kostiju, utiče na pojavu raka pluća, bešike i dojke (Mutić, 2022; Hodžić, 2013).

Maksimalno dozvoljena koncentracija olova u svježem voću iznosi 1 mg/kg dok je za sušeno voće ta granica nešto veća i iznosi 3 mg/kg. Maksimalno dozvoljena koncentracija kadmijuma je 0,05 mg/kg u svježem voću a 0,3 mg/kg u sušenom voću (Pravilnik o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama, 2011).

Evropska agencija za bezbjednost hrane EFSA smatra prihvatljivim i netoksičnim za ljude nedeljni unos olova u koncentraciji od 25 µg/kg tjelesne mase (European Food Safety Authority-EFSA, 2010). Za kadmijum je to znatno manje i iznosi 2,5 µg/kg tjelesne mase nedeljno (European Food Safety Authority-EFSA, 2012).

2.5. METODE ANALIZE

Identifikacija, kvantifikacija i karakterizacija fenolnih jedinjenja iz bobičastog voća može se postići različitim razvijenim analitičkim metodologijama. Različiti tipovi in vitro metoda kao što je 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) antioksidativni test, 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina (ABTS) i test redukcijske antioksidativne moći gvožđa (FRAP) može se koristiti za procjenu antioksidativne aktivnosti (Alam i sar., 2016; Subbiah i sar., 2020). Osim navedenih mogu se koristiti i: ORAC (eng. Oxygen radical absorbance capacity), DMDP (N,N-dimetil-p-fenilendiamin), TRAP (eng. Total peroxy radical trapping antioxidant parameter), PSC (eng. Peroxy radical scavenging capacity), PFRAP (eng. Potassium ferricyanide reducing power assay), CUPRAC (eng. Cupric ion reducing antioxidant capacity), CERAC (eng. Ce(IV)-based reducing capacity), HORAC (eng. Hydroxyl radical averting capacity), testovi za izbjeljivanje i test inhibicije lipidne peroksidacije (Galušić, 2020). Testovi korišćeni u ovom radu se zasnivaju na hemijskim reakcijama, a spektrofotometrijski se prati dostizanje ravnotežnog stanja.

2.5.1. UV-VIS spektrofotometrija

U najširem smislu, ultraljubičasto-vidljiva (UV/Vis) spektrometrija se bavi interakcijom između elektromagnetnog zračenja u ultraljubičastom/vidljivom području i materije. Elektromagnetni spektar pokriva širok spektar energija (frekvencija), odnosno talasnih dužina. Vidljivo područje, na koje naše oči reaguju, samo je mala oblast čitavog spektra (Passos i sar., 2019).

Ultraljubičasta (UV) oblast elektromagnetnog spektra se nalazi u opsegu od 10–380 nm. Obično je podijeljena u tri dijela: UVA 320–380 nm; UVB 280–320 nm i UVC 100–280 nm. Osim toga, oblast od 10–200 nm se naziva vakuum ultraljubičastom (VUV), a ispitivanja se mogu izvoditi samo u vakuumu. Vidljiva (Vis) oblast se nalazi u spektralnom dijelu od 380–780 nm (Picollo i sar., 2018).

UV-Vis spektroskopija se odnosi na ekscitaciju valentnih elektrona atoma i zbog toga se često naziva „elektronska spektroskopija“. U UV-Vis spektroskopskom mjerenju, apsorpcija svjetlosti kao funkcija talasne dužine daje informacije o elektronskim prelazima koji se dešavaju u uzorku. Lambert je dao izraz za smanjenje intenziteta zračenja pri prolasku svjetlosnog zračenja kroz providno čvrsto tijelo (Picollo i sar., 2018).

$$I_p = I_0 \cdot e^{-kb}$$

gdje je: I_p – intenzitet propuštane svjetlosti

I_0 - intenzitet upadne svjetlosti

k – konstanta srazmjere koja zavisi od talasne dužine upadne svjetlosti, prirode apsorbujuće supstance i temperature

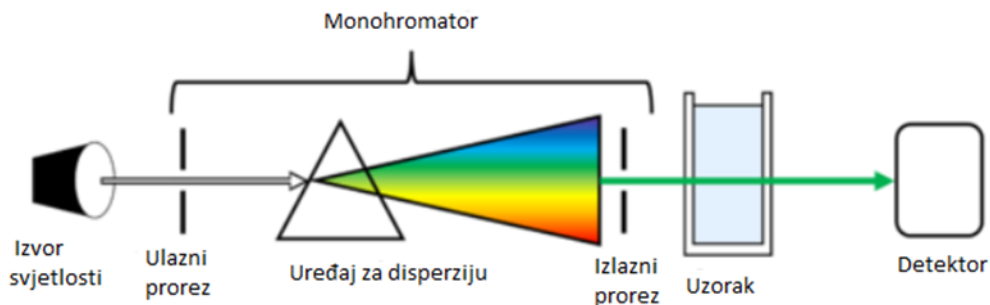
b – dužina optičkog puta

Ovo se često piše u obliku koji je dao Ber a koji se naziva jednostavno Berov zakon:

$$A = \log \frac{I_0}{I_p} = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

gdje je A apsorpcija, ε je molarni koeficijent apsorpcije materijala, c je koncentracija apsorbujućih vrsta, a b je dužina puta svjetlosti kroz uzorak (Picollo i sar., 2018).

Spektrofotometar ima jednostavan princip rada i čini ga 7 glavnih dijelova: izvor svjetlosti, kolimator, monohromator, birač talasnih dužina, kivete za uzorak, fotoelektrični detektor i digitalni ekran (Aceto i sar., 2014). Šematski prikaz UV-Vis spektrofotometra dat je na slici 7, dok je na slici 8 prikazan spektrofotometar korišćen za analize ovog rada.



Slika 7. Šematski prikaz UV-VIS spektrofotometra <https://jascoinc.com/learning-center/theory/spectroscopy/uv-vis-spectroscopy/instrumentation/>



Slika 8. Spektrofotometar korišćen za analize

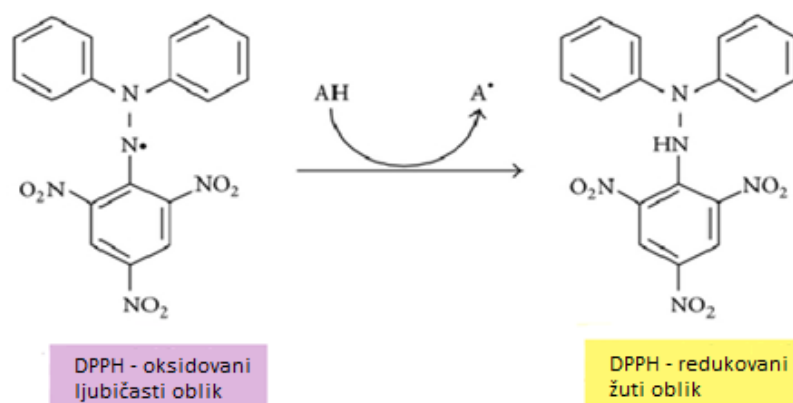
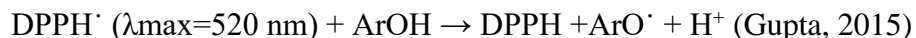
Uprkos tome što je UV-Vis spektrofotometrija široko korišćena tehnika zbog svoje brzine, raznovrsnosti, dostupnosti, preciznosti, tačnosti i cijene, na određivanje mogu uticati niske koncentracije analita ili prisustvo interferirajućih supstanci u realnim uzorcima. Zbog toga je često potreban predtretman uzorka da bi se poboljšala osjetljivost i selektivnost metode (Abad i sar., 2012; Passos i sar., 2019).

Antioksidativna aktivnost ispitivane kupine određivana je pomoću DPPH i FRAP metoda primjenom UV/Vis spektrometrije.

2.5.1.1. DPPH metoda

DPPH metoda je zasnovana na sposobnosti fenolnih jedinjenja da doniraju atome vodonika slobodnim radikalima DPPH (DPPH \cdot). Ovo je najčešći metod za određivanje antioksidativnog kapaciteta jer je brz, jednostavan, tačan, jeftin i osjetljiv (Setiawan i sar., 2022).

DPPH \cdot je stabilan radikal zahvaljujući stabilizaciji delokalizacijom na aromatičnim prstenovima. On može lako uhvatiti druge radikale, ali ne dimerizuje. Pošto je jaka apsorpciona traka centrirana na oko 515 nm, rastvor DPPH radikala je tamnoljubičaste boje i postaje bezbojan do blijedo žut kada se redukuje nakon reakcije sa donorom vodonika (slika 9). Smanjenje apsorpcije linearno zavisi od koncentracije antioksidansa (Gupta, 2015).



Slika 9. Reakcija DPPH radikala s antioksidansom (Gupta, 2015)

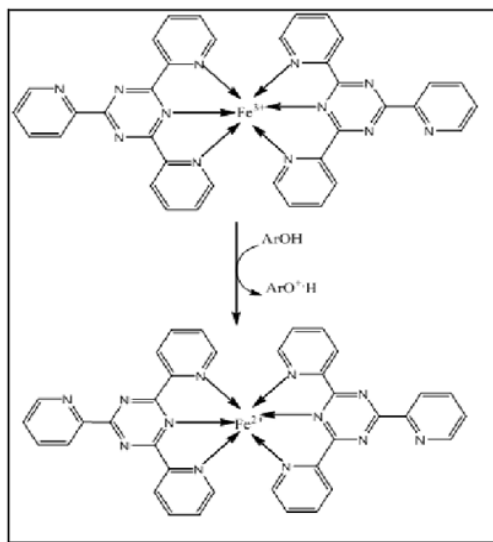
U literaturi se kupina predstavlja kao značajnija vrsta voća zbog visokog nivoa antioksidativnih jedinjenja (Moyer i sar., 2002). Otkriveno je da kupina, u poređenju sa 12 drugih vrsta sitnog voća, ima visok sadržaj polifenola i zbog toga ima veći kapacitet da inhibira degradaciju humanih lipoproteina niske gustine (LDL) (karakteristika vezana za antioksidativno djelovanje) (Heinonen i sar., 1998; Croge i sar., 2019).

Količina i distribucija antioksidativnih jedinjenja značajno variraju među različitim sortama kupine, takođe, biotički i abiotički faktori kao što su genetika, klima, dostupnost vode i upravljanje usjevima imaju važnu ulogu u nivou bioaktivnih jedinjenja i antioksidativnom kapacitetu kupine (Castrejon i sar., 2008; Reyes-Carmona i sar. 2005; Croge i sar., 2019). To potvrđuje i studija

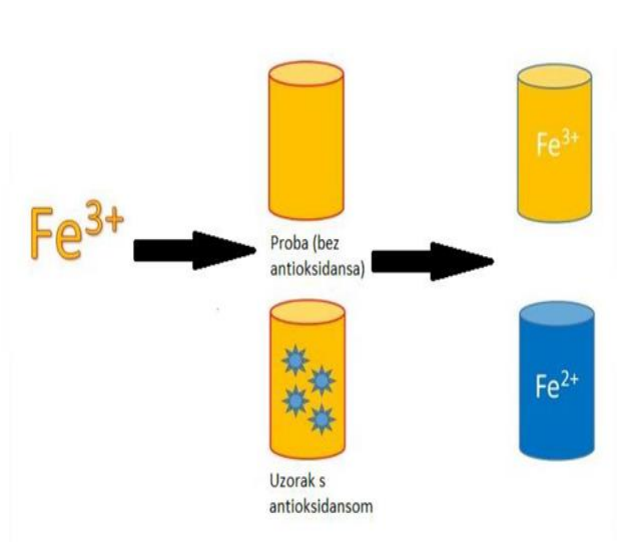
rađena na više lokacija širom Brazila (koje karakterišu različiti klimatski uslovi) gdje vrijednost DPPH testa varira od 0,86 do 3,08 mg/mg u zavisnosti od lokacije (klime), (Croge i sar., 2019). Istraživanjima u Srbiji i Kini došlo se do znatno manjih vrijednosti DPPH testa, 0,017 mg/ml i 0,44 mg/ml (Vulić i sar., 2011; Huang i sar., 2012).

2.5.1.2. FRAP metoda

Antioksidativna aktivnost se takođe može mjeriti reakcijom oksido-redukcije. Sposobnost antioksidanasa kao redukcionih sredstava iskorištena je za redukciju različitih jona metala. FRAP test je metoda koja mjeri redukciju kompleksa jona gvožđa (Fe^{3+})-liganda u intenzivno plavi kompleks gvožđa (Fe^{2+}) pomoću antioksidanasa na talasnoj dužini od 593 nm (slike 10 i 11). Ove reakcije odigravaju se u kiseloj sredini (pH oko 3,6). Originalni FRAP test koristi tripiridiltriazin (TPTZ) kao ligand za vezu sa jonom gvožđa, dok se alternativni ligandi takođe koriste za vezivanje jona gvožđa, kao što je ferozin za procjenu redukcionne moći askorbinske kiseline (Munteanu i Apetre, 2021).



Slika 10. Redukcija Fe^{3+} -TPTZ u Fe^{2+} -TPTZ (Gupta, 2015)



Slika 11. Šematski prikaz FRAP metode određivanja antioksidativnog kapaciteta (Galušić, 2020)

Antioksidativna sposobnost kupine u velikoj mjeri zavisi od klime i sorte (Castrejon i sar., 2008; Reyes-Carmona i sar, 2005; Croge i sar., 2019). Rezultati ispitivanja antioksidativne sposobnosti kupine FRAP metodom sa područja Turske pokazuju da divlja kupina posjeduje znatno veći antioksidativni kapacitet (52,88 - 70,41 $\mu\text{mol/g}$) u odnosu na gajenu kupinu sa istog područja (35,05 - 43,44 $\mu\text{mol/g}$) (Koca i Karadeniz, 2009). Ispitivanjem više različitih vrsta iz centralne Evrope dobijene su znatno manje vrijednosti antioksidativnog kapaciteta (9,40 - 19,16 $\mu\text{mol/g}$) (Kostecka-Gugala, 2015).

2.5.2. Atomska apsorpciona spektrometrija (AAS)

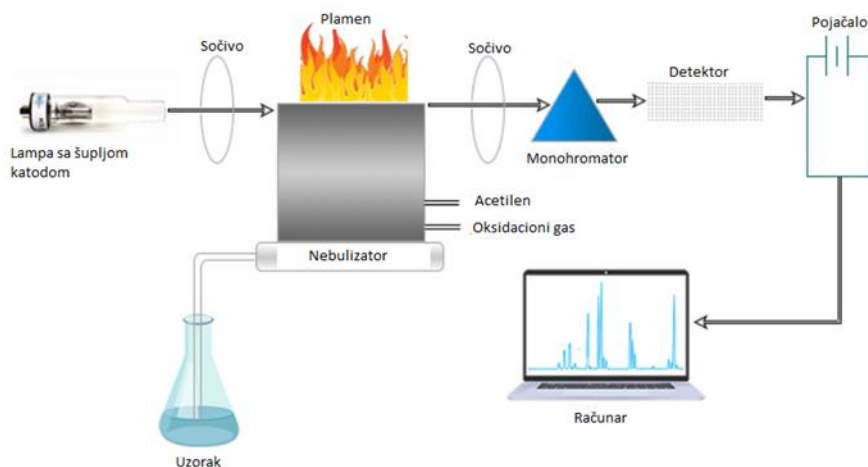
Atomska apsorpciona spektrometrija AAS je analitička tehnika koja je našla veliku primjenu u industriji hrane i pića, gdje je potrebno zadovoljiti visoke kriterijume postavljene pravilnicima za kontrolu i praćenje koncentracije metala u prehrambenim proizvodima. Visoka osjetljivost i preciznost, niska cijena i jednostavnost dovele su do toga da je AAS jedna od najčešće korišćenih metoda za određivanje velikog broja metala i metaloida. Metoda se zasniva na mjerenju smanjenja intenziteta upadnog monohromatskog zračenja pri prolasku kroz atomsku paru uzorka. U AAS se za atomizaciju najčešće koriste dva tipa atomizera: plameni i elektrotermalni. Osim njih postoji i hidridna tehnika i tehnika hladnih para. Plamena AAS (slika 12) je najčešće korišćena kada u uzorku ima dovoljna količina analita jer je granica detekcije uglavnom u mg/l i njome se najčešće određuju mikroelementi kao što su Fe, Zn, Cu, Mn itd. (Turkekul, 2004). Za razliku od plamene, granice detekcije kod elektrotermalne AAS su dosta niže i obično se izražava u $\mu\text{g/l}$. Koristi se u određivanju elemenata u tragovima (Aloupi, 2012).



Slika 12. Atomski apsorpcioni spektrofotometar korišćen za analizu

Atomski apsorpcioni spektrofotometri se sastoje od četiri osnovna dijela što je prikazano na slici 13 (Tomić, 2009):

- Emisioni dio – predstavlja pogodan izvor svjetlosti rezonantne talasne dužine,
- Apsorpcioni dio – ili dio za atomizaciju,
- Selekcioni dio – ili monohromator,
- Mjerni dio – sastoji se od detektora, sistema za pojačavanje signala i mjernog instrumenta.



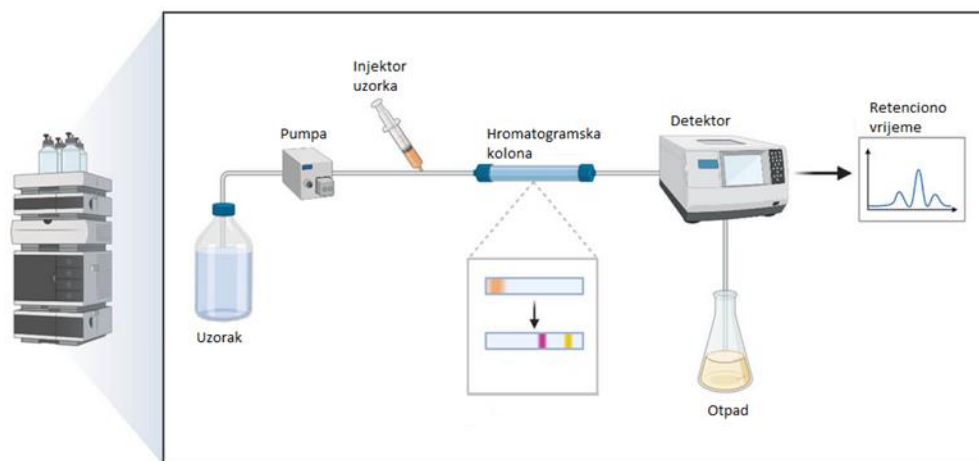
Slika 13. Šematski prikaz atomskog apsorpcionog spektrometra

<https://www.priyamstudycentre.com/2021/11/atomic-absorption-spectroscopy.html>

2.5.3. Tečna hromatografija visokih performansi – HPLC

Tečna hromatografija visokih performansi ili opšte poznata kao HPLC, je analitička metoda koja se koristi za odvajanje, identifikaciju ili kvantifikaciju svake komponente u smješi. To je posebna grana kolonske hromatografije u kojoj mobilna faza prolazi kroz kolonu pod visokim pritiskom velikom brzinom. Kao rezultat toga, vrijeme analize se smanjuje za duplo u odnosu na klasičnu hromatografiju u koloni i moguća je upotreba mnogo manjih čestica adsorbensa ili nosača, čime se značajno povećava efikasnost kolone (Sultana, 2015).

Osnovni dijelovi hromatografa su rezervoari sa uzorkom i mobilnom fazom, pumpa visokog pritiska i injektor za uvođenje uzorka, kolona koja sadrži stacionarnu fazu, detektor i računar, kao što je prikazano na slici 14 (Lakshmi, 2015). Princip metode je sledeći: proces se odvija u koloni za razdvajanje između stacionarne i mobilne faze. Stacionarna faza je granularni materijal sa veoma malim poroznim česticama smještena u koloni za odvajanje. Mobilna faza, s druge strane, je rastvarač ili smješa rastvarača koja se propušta pod visokim pritiskom kroz kolonu za odvajanje. Uzorak se ubrizgava pomoću šprica. Nakon toga, pojedinačne komponente uzorka migriraju kroz kolonu različitim brzinama jer se u različitom stepenu zadržavaju interakcijama sa stacionarnom fazom. Nakon napuštanja kolone, pojedinačne komponente se detektuju odgovarajućim detektorom i prosleđuju kao signal HPLC softveru na računaru. Na kraju ove operacije dobija se hromatogram u HPLC softveru na računaru. Hromotogram omogućava identifikaciju i kvantifikaciju različitih supstanci (Aryal, 2022).



Slika 14. Šema HPLC, <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>

Mehanizmi na kojima se zasniva razdvajanje komponentu su: adsorpcija, particija, jonska izmjena i ekskluzija (Hafez i sar., 2014).

HPLC se razvio u univerzalno primjenljiv metod tako da je našao svoju primjenu u skoro svim oblastima hemije, biohemije i farmacije: analiza lijekova, analiza sintetičkih polimera, analiza zagađujućih materija u analitici životne sredine, određivanje lijekova u biološkim matricama, čistoća proizvoda i kontrola kvaliteta industrijskih proizvoda i finih hemikalija, odvajanje i prečišćavanje biopolimera kao što su enzimi ili nukleinske kiseline, prečišćavanje vode, prethodno koncentrisanje komponenti u tragovima itd. (Aryal, 2022).

Na slici 15 prikazan je HPLC instrument korišćen za analizu u ovom radu.



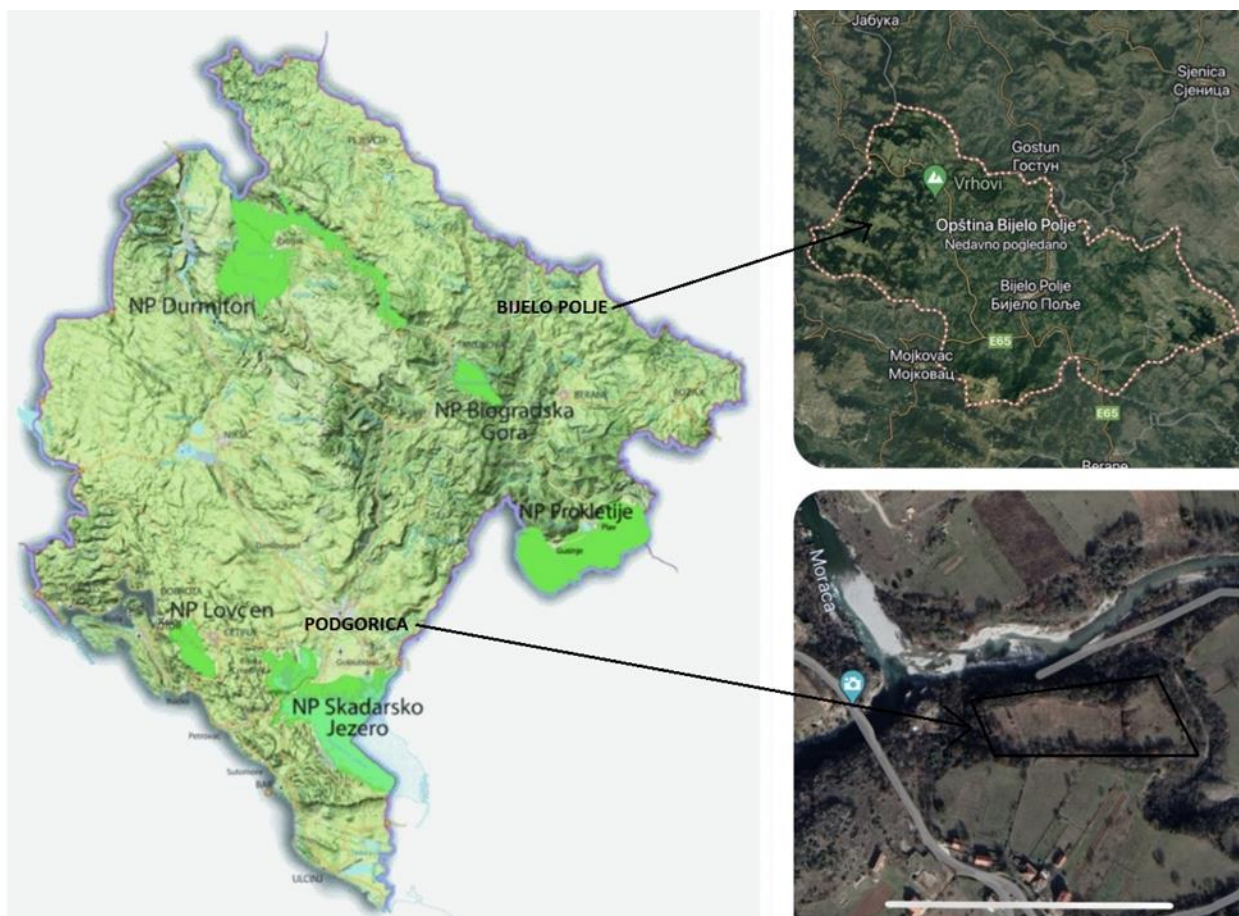
Slika 15. HPLC korišćen za analizu u ovom radu

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio potreban za ovu magistrsku tezu rađen je u laboratorijama za analitičku hemiju i instrumentalne metode, na Metalurško-tehnološkom fakultetu u Podgorici i u Institutu za proučavanje ljekovitog bilja „Dr Josif Pančić” u Beogradu.

3.1. UZORKOVANJE KUPINE I PRIPREMA

U radu su analizirane gajena i divlja kupina. Gajena kupina analizirana u radu ubrana je na plantažama kupine na Bioču, Crna Gora. Plantaža se nalazi u neposrednoj blizini ušća Male rijeke u Moraču (slika 16), na nadmorskoj visini od oko 55 m. Berba je bila u junu 2021. godine, nakon čega je kupina spakovana i zamrznuta do početka analize. Plodovi su ručno ubrani u periodu tehničke zrelosti.



Slika 16. Satelitski snimak lokacije, Bioče dolje, Bijelo Polje gore

Divlja kupina korišćena za analizu ubrana je na području opštine Bijelo Polje, koje se nalazi na nadmorskoj visini od oko 578 m. Uzorak je prikupljen u avgustu 2021. godine, spakovan i zamrznut do početka analize. Divlja kupina je takođe brana ručno u periodu tehničke zrelosti.

Reagensi i rastvori

Reagensi i rastvori potrebni za ispitivanje polifenolnog sastava u kupini su: 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, pirogalol.

Za određivanje antioksidativne aktivnosti korišćeni su: 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).

Za određivanje metala potrebna je bila azotna kiselina (HNO_3) i vodonik peroksid (H_2O_2).

Sve hemikalije su visoke čistoće. Za pravljenje rastvora korišćena je destilovana voda.

Uređaji

Za analize su korišćeni: spektrofotometar BUCK Scientific 105 UV-VIS spectrophotometer, atomski apsorpcioni spektrofotometar Perkin Elmer PinAAcle 900T i tečni hromatograf visokih performansi HPLC Agilent Tehnologija 1200.

Priprema soka i tropa

Kupina je nakon berbe bila zamrznuta do početka analize. Odmrznuta je i korišćena za dobijanje soka i tropa. Sok gajene (SGK) i divlje kupine (SDK) dobijen je hladnim cijedenjem i nije prerađivan, dok se čvrsti ostatak nakon cijedenja analizirao kao trop: trop gajene kupine (TGK) i trop divlje kupine (TDK). Analize su rađene odmah nakon cijedenja.

3.2. HEMIJSKA ANALIZA SOKA I TROPA KUPINE

3.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih polifenola određivan je spektrofotometrijski. Metoda se zasniva na redukciji Folin–Ciocalteu reagensa. Rezultat ove reakcije je rastvor plave boje čiji se intenzitet mjeri na talasnoj dužini od 740 nm, a proporcionalan je količini fenolnih jedinjenja.

Uzorci za određivanje ukupnih fenola pripremljeni su tako što je na analitičkoj vagi odvagano 1,25 g (i za sok i za trop obije vrste kupine), dodato po 0,5 ml FC reagensa prethodno razblaženog 1:10, i 2,5 ml 7,5 % Na_2CO_3 . Apsorbanca se mjerila nakon 2h, na talasnoj dužini od 740 nm uz slijepu probu dobijenu miješanjem 1 ml H_2O , 0,5 ml FC reagensa i 2,5 ml Na_2CO_3 .

Serijski standardnih rastvora galne kiseline korišćena je za dobijanje kalibracione krive. Standardi su se kretali u koncentraciji od 0 do 50 mg/l, i snimljeni su na talasnoj dužini od 740 nm. Dobijeni rezultati izraženi su kao miligrami ekvivalenta galne kiseline po gramu uzorka (soka, tropa).

3.2.2. Određivanje sadržaja flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida određivan je spektrofotometrijski. Metoda se zasniva na formiranju kompleksa između flavonoida i aluminijum hlorida.

Uzorci za analizu pripremljeni su na sledeći način: odvagano je oko 0,25 g soka i tropa (gajene i divlje kupine) i preneseno u normalni sud od 10 ml, dodato je 3 ml destilovane vode i 0,3 ml 5 % NaNO_2 , nakon 5 minuta dodato je još 3 ml 1 % AlCl_3 . Uzorak je stajao još 5 min a zatim dopunjen sa 2 ml 1M rastvora NaOH i destilovanom vodom do oznake. Apsorbanca je mjerena na talasnoj dužini od 415 nm. Kao slijepa proba korišćena je destilovana voda.

Za dobijanje kalibracione krive korišten je kvercetin. Serijski standardnih rastvora pravljena je u opsegu koncentracija od 10 do 80 mg/l. Standardi su snimljeni na 415 nm uz destilovanu vodu kao slijepu probu.

3.2.3. Određivanje sadržaja tanina

Metoda korišćena za određivanje tanina u uzorcima kupine preuzeta je iz devete Evropske Farmakopeje (European Pharmacopeia, 9th ed. Council of Europe). Metoda se zasniva na principu reakcije uzorka sa fosfomolibdovolframovim reagensom u baznoj sredini, a zatim tretmanu sa kožnim prahom. Apsorbanca se mjeri na talasnoj dužini 760 nm a sadržaj tanina se izražava kao procenat pirogalola i računa po formuli:

$$\frac{6,25 (A_1 - A_2) \cdot m_2}{A_3 \cdot m_1}$$

gdje je:

A₁- apsorbanca ukupnih polifenola

A₂- apsorbanca polifenola koji ne adsorbuju na kožni prah

A₃- apsorbanca standarda pirogalola

m₁- masa uzorka u gramima,

m₂- masu pirogalola u gramima

3.2.4. Određivanje sadržaja antocijana

Metoda korišćena za određivanje ukupnih antocijana u uzorcima soka i tropa kupine preuzeta je iz devete Evropske Farmakopeje (European Pharmacopeia, 9th ed. Council of Europe). Metoda se zasniva na hidrolizi ispitivanih uzoraka smješom metanola i hlorovodonične kiseline. Apsorbanca uzoraka mjerena je na talasnoj dužini od 528 nm a sadržaj antocijana izražava se preko procenta cijanidin-3-glukozid hlorida, po formuli:

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

gdje je:

A - apsorbanca uzorka

m - masa uzorka u gramima

Identifikacija i kvantifikacija antocijana u soku i tropu gajene i divlje kupine izvršena je HPLC metodom.

Prilikom pripreme uzoraka za HPLC analizu odvagano je po 1 g tropa divlje i gajene kupine i po 10 g soka divlje i gajene kupine, ovim masama dodato je po 10 ml 70 % etanola. Nakon filtriranja kroz filtere od politetrafluoroetilena (PTFE) u staklene HPLC viala uzorci su analizirani. Analizirano je po 4 μ L svakog uzorka. Standardni etanolni rastvori korišćeni u HPLC analizi bili su koncentracije 0,46 mg/ml za cijanidin-3-glukozid, malvidin-glukozid i cijanidin-hlorid. Zapremina standardnih rastvora je takođe bila 4 μ L. Identifikacija jedinjenja izvršena je na osnovu retencionih vremena i preklapanja spektra, a kvantifikacija eksternom kalibracijom sa standardima (Brašanac, 2022).

3.2.5. Određivanje antioksidativnih svojstava soka i tropa kupine

3.2.5.1. Određivanje sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala-DPPH test

Neutralizacioni DPPH test se zasniva na doniranju elektrona antioksidanasa kako bi se neutralisao DPPH radikal. Reakcija je praćena promjenom boje DPPH mjerene na 517 nm, a promjena boje djeluje kao indikator antioksidativne aktivnosti (Foti, 2015; Munteanu i Apetre, 2021).

Uzorci su pripremljeni tako što je 300 μ l etanolnog rastvora uzoraka pomiješano sa 2,7 ml 0,1 mM etanolnog rastvora DPPH. Apsorbanca je izmjerena nakon 30 min stajanja na sobnoj temperaturi, uz etanol kao slijepu probu. Procenat inhibicije DPPH izračunt je prema sljedećoj formuli (Brašanac, 2021; Žugić, 2016; Blois, M.S., 1958):

$$\% = 100 - \left[(A_S - A_B) \times \frac{100}{A_C} \right]$$

gdje je:

A_S - absorbanca etanolnih rastvora uzoraka kupine prethodno tretiranih DPPH rastvorom,

A_B - absorbanca etanolnih rastvora uzoraka kupine bez prethodnog tretiranja DPPH rastvorom,

A_C - absorbanca etanolnog rastvora DPPH.

Antioksidativna aktivnost metodom neutralizacije DPPH radikala često se navodi kao IC₅₀, što se definiše kao efikasna koncentracija antioksidansa neophodna za smanjenje početne koncentracije DPPH za 50% (Foti,2015; Munteanu i Apetre, 2021).

3.2.5.2. Određivanje sposobnosti redukcije feri jona-FRAP test

FRAP metoda se zasniva na redukciji kompleksa Fe³⁺-TPTZ u Fe²⁺-TPTZ s antioksidansom u kiseloj sredini. Kao rezultat te reakcije dobija se rastvor intenzivno plave boje s apsorbancom na 593 nm.

Za ovu analizu potrebno je pripremiti svjež FRAP reagens koji predstavlja smještu 25 ml 300 mM acetatnog pufera, pH vrijednosti 3,6; 2,5 ml 10 mM rastvora TPTZ u 40 mM rastvoru HCl i 2,5 ml 20 mM rastvora FeCl₃·6H₂O. 3ml ovog reagensa pomiješa se sa 100 µl etanolnih rastvora ispitivanih uzoraka kupine, inkubira se 30 min na 37 °C, nakon čega se spektrofotometrijski mjeri apsorbanca na talasnoj dužini od 593 nm. Za slijepu probu korišćena je smješta FRAP reagensa i 70 % etanola.

FRAP vrijednost je izračunata iz kalibracione krive standardnog rastvora FeSO₄·7H₂O u FRAP reagensu u koncentracionom opsegu od 100 do 1000 mmol/l, koja je pokazala linearnu regresiju sa R² > 0,99. Rezultati se izražavaju kao mikromoli Fe²⁺ jona po gramu biljne sirovine (Brašanac, 2021, Žugić, 2016).

3.3. PRIPREMA UZORAKA KUPINE ZA ODREĐIVANJE MIKROELEMENATA

Uzorci za određivanje hemijskih elemenata u soku, tropu i plodu gajene i divlje kupine pripremljeni su na sljedeći način: na analitičkoj vagi je odvagano 2 g uzorka, dodato 28 ml koncentrovane HNO₃ i 4 ml H₂O₂. Na vodenom kupatilu je upareno do 16 ml uz često miješanje, a zatim prelijeto u normalni sud od 100 ml i dopunjeno do oznake destilovanom vodom. Tako pripremljeni uzorci su snimljeni na atomskom apsorpcionom spektrofotometru. Rađena je serija od tri ponavljanja.

Kalibracione krive za sve ispitivane elemente pravljene su u različitom rasponu koncentracija. Za cink 0,05-0,7 mg/l; nikel 0,01-0,1 mg/l; bakar 0,05-0,4 mg/l; gvožđe 0,1-3 mg/l; mangan 0,01-0,6 mg/l; olovo 0,008-0,3 mg/l.

3.3.1. Proračun dnevnog unosa elemenata (nutritivna vrijednost)

Procenat dnevne vrijednosti unosa (% DV) pokazuje koliko se kroz porciju hrane unese makro ili mikroelementa dnevno i koliko taj unos može pomoći u procjeni nutritivnog benefita ili rizika (Mutić, 2022).

Doprinos dnevnom unosu (DV %) se računa po formuli:

$$DV = \frac{100 \cdot C}{RDA/PRI}$$

gdje je:

C - sadržaj elementa u porciji (100 g),

RDA/PRI su vrijednosti preporučenih dnevnih unosa prema postojećim propisima.

Postizanjem preko 15 % od RDA/PRI smatra se značajnim nutritivnim doprinosom (Mutić, 2022).

Za računanje dnevnog unosa (DI %) toksičnih elemenata u porciji hrane (100 g) vrši se poređenje sa tolerantnim dnevnim unosom (TDI) i to po formuli (Mutić, 2022):

$$DI = \frac{100 \cdot C}{TDI}$$

3.4. STATISTIČKA ANALIZA

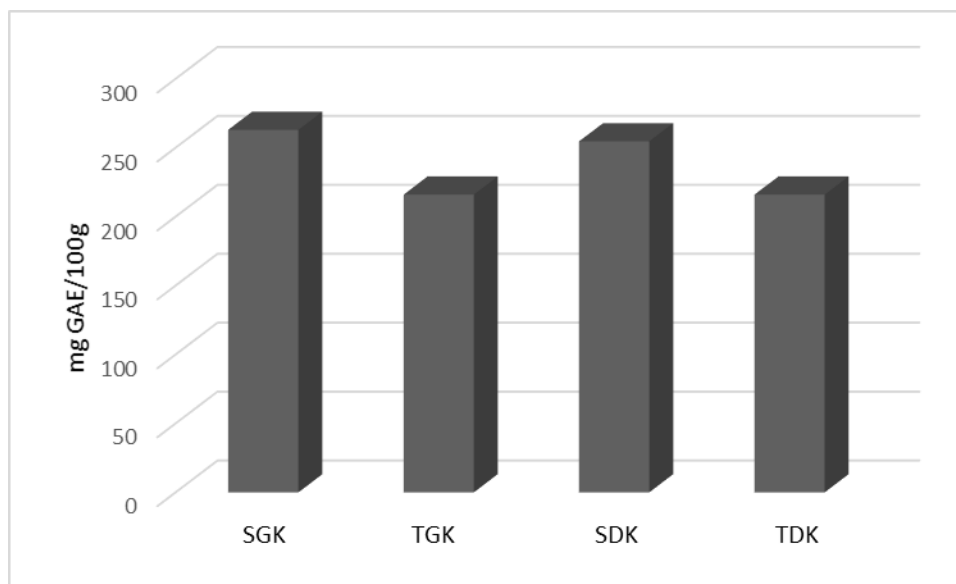
Prilikom određivanja mikroelemenata u ispitivanim uzorcima kupine, parametri deskriptivne statistike (srednja vrijednost i devijacija) su dobijeni NCSS statističkim softverom (www.ncss.com). Statistička analiza hemijskog profila i antioksidativne aktivnosti u uzorcima kupine je izvršena pomoću programa Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA U SOKU I TROPU KUPINE

Fenolna jedinjenja, prisutna u biljkama, su bitan dio ljudske ishrane i od velikog su značaja zbog svojih antioksidativnih svojstava i potencijalnih korisnih efekata na zdravlje. Ova jedinjenja se strukturno kreću od jednostavnog fenolnog molekula do složenih polimera visoke molekulske mase (Shahidi, 2015). Termin 'fenol' ili 'polifenol' može se hemijski definisati kao supstanca koja posjeduje aromatični prsten koji nosi jedan ili više hidroksi supstituenata, uključujući funkcionalne derivate (estre, metil etre, glikozide itd.). Većina fenola ima dvije ili više hidroksilnih grupa i bioaktivne su supstance koje se široko javljaju u prehrambenim biljkama koje redovno jede značajan broj ljudi (Chi-Tang Ho, 1992).

Sadržaj ukupnih fenola u soku i tropu gajene i divlje kupine dat je na slici 17, dok je na slici 18 data kalibraciona kriva galne kiseline korišćena za određivanje ukupnih fenola.

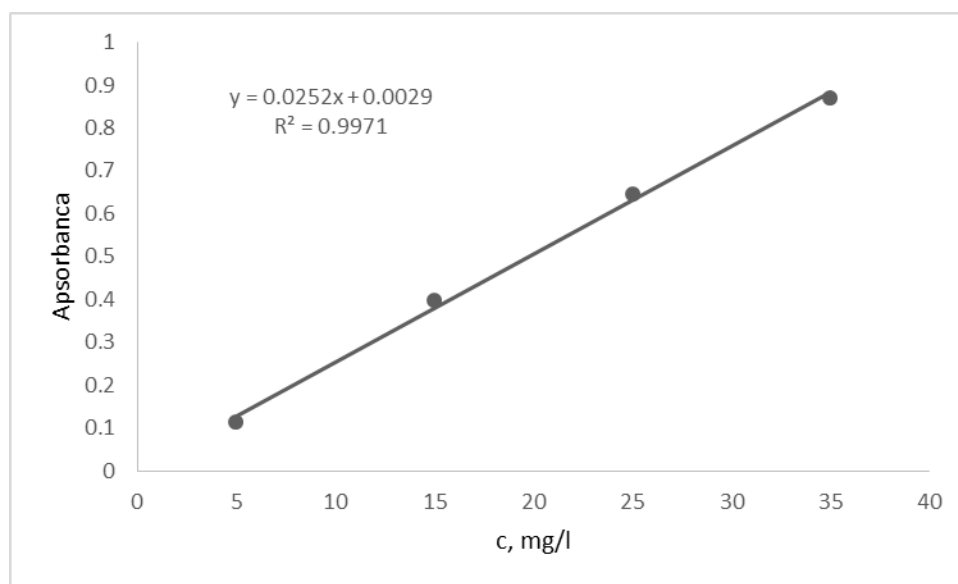


Slika 17. Sadržaj ukupnih fenola u soku i tropu gajene i divlje kupine

Dobijeni sadržaj ukupnih fenola u soku gajene kupine bio je 263 mg GAE/100 g, u soku divlje kupine 254,66 mg GAE/100 g, dok je za trop obje sorte iznosio 216 mg GAE/100 g. Slične rezultate za sok gajene i divlje kupine dobio je i Jazić za kupinu sa teritorije BiH

(198 mg GAE/100 g, 216 mg GAE/100 g) dok se za trop obje sorte rezultati značajno razlikuju (3540 mg GAE/100 g za gajenu i 4828 mg GAE/100 g za divlju), (Jazić, 2019). Vulić u Srbiji bilježi 4 puta bolje rezultate u odnosu na rezultate dobijene u ovom radu, 804,50 mg/100 g, (Vulić i sar., 2011).

Rezultati iz literature ukazuju da je značajno veći sadržaj fenola u uzorcima divljih sorti kupina u odnosu na kultivisane sorte (Jazić, 2017; Milivojević i sar. 2011; Milenković-Andelković, 2016), što se u ovom ispitivanju nije pokazalo. Međutim Čujić bilježi rezultate gotovo iste kao što su rezultati u ovom istraživanju za kupinu ubranu na Bjelasici (274 mg/100 g), (Čujić i sar., 2011). Do sličnih rezultata došla je i Rošić za kupinu iz Hrvatske (Mosor), (Rašić, 2021).

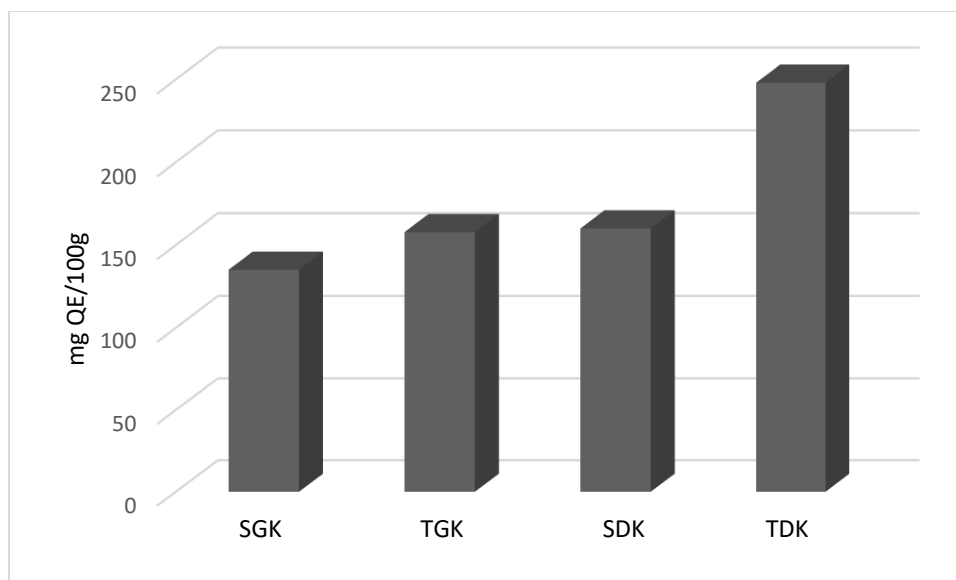


Slika 18. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje fenola

4.2. SADRŽAJ FLAVONOIDA U SOKU I TROPU KUPINE

Flavonoidi su sekundarni metaboliti široko rasprostranjeni u voću i povrću. Oni predstavljaju širok spektar jedinjenja koja imaju važnu ulogu u zaštiti bioloških sistema od štetnog djelovanja oksidativnih procesa. Igraju značajnu ulogu i u poboljšanju zdravlja ljudi (Jazić, 2019).

U radu su analizirani flavonoidi u soku i tropu gajene i divlje kupine i rezultati su prikazani na slici 19, dok je na slici 20 prikazana kalibraciona kriva korišćena za određivanje flavonoida u kupini.



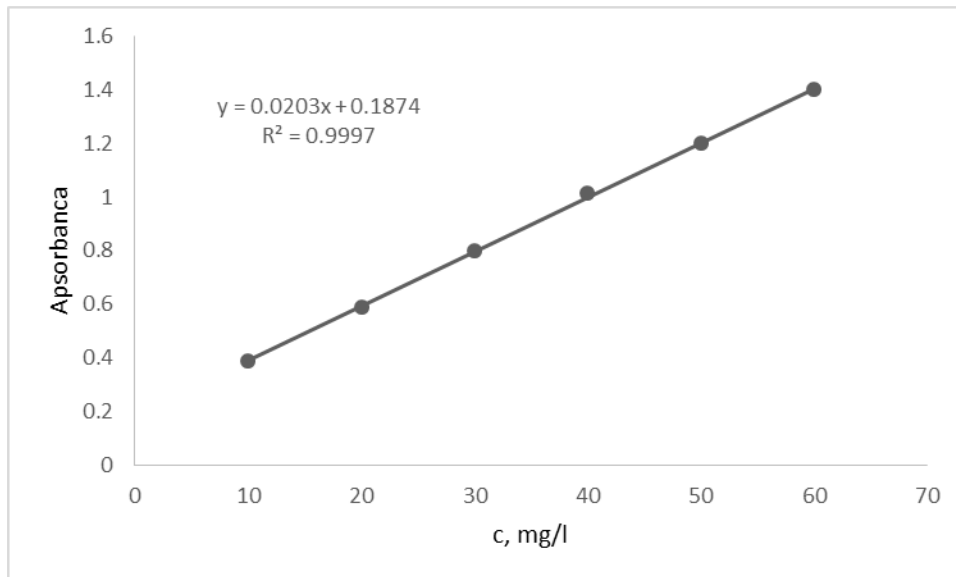
Slika 19. Sadržaj ukupnih flavonoida u soku i tropu gajene i divlje kupine

Sok gajene kupine daje vrijednosti od 135,03 mg QE/100 g dok je sok divlje kupine pokazao nešto veću vrijednost 159,97 mg QE/100 g. Tropovi obje vrste kupine su se pokazali kao veći izvori flavonoida, 155,77 mg QE/100 g (gajena kupina) i 248,01 mg QE/100 g (divlja kupina).

Značajno manje vrijednosti zabilježene su za kupine sa područja Bosne i Hercegovine (Jazić, 2019) dok u Srbiji bilježe dosta slične rezultate, 245,48 mg/100 g (Vulić i sar., 2011).

Uzimajući u obzir da sjemenke i pokožica ploda sadrže veće koncentracije polifenolnih jedinjenja (Sandell i sar., 2009; Schieber i sar., 2001), za očekivati je da će se manji dio polifenolnih jedinjenja izdvajati u matičnom soku, što se potvrdilo i u istraživanju u ovom master radu. U uzorcima tropa divlje i gajene kupine dobijene su veće vrijednosti u odnosu na sok obje vrste.

Divlja kupina ima veći sadržaj flavonoida i u soku i u tropu u odnosu na gajenu kupinu što se podudara sa rezultatima nađenim pregledom literature (Jazić, 2019; Milivojević i sar. 2011).

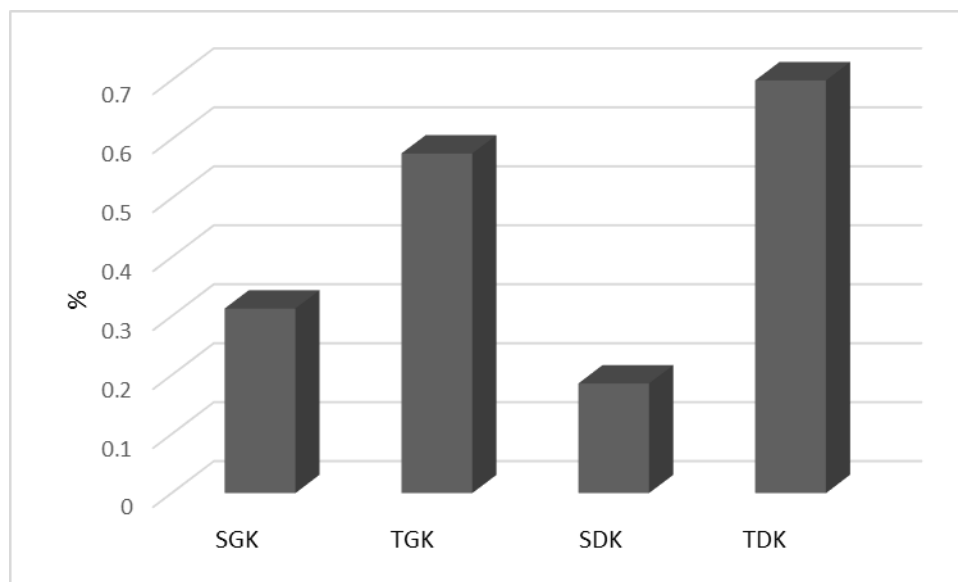


Slika 20. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje flavonoida

4.3. SADRŽAJ TANINA U SOKU I TROPU KUPINE

Tanini su složena polifenolna jedinjenja i spadaju u sekundarne metabolite prisutne u biljkama. Zbog svojih pozitivnih efekata, kao što su antibakterijski i antioksidativni efekti, oni se smatraju bitnim sastojcima hrane. Antioksidativna aktivnost ovih jedinjenja zavisi od stepena njihove polimerizacije tako da imaju petnaest do trideset puta intenzivniji antioksidativni potencijal u odnosu na proste fenole (Sánchez-Velázquez i sar., 2019).

U radu su analizirani tanini u soku i tropu gajene i divlje kupine a rezultati su prikazani na slici 21.



Slika 21. Sadržaj tanina u procentima u soku i tropu gajene i divlje kupine

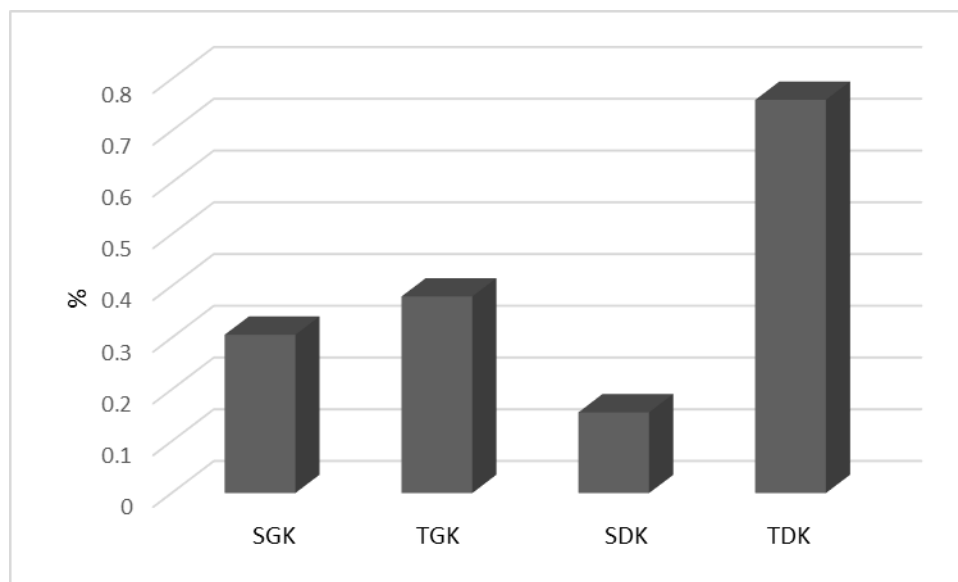
Sok gajene kupine sadrži 0,313 % tanina, dok sok divlje kupine sadrži nešto manje 0,186 %. U tropu gajene kupine pronađeno je 0,576 % a u tropu divlje 0,700 %. Tropovi gajene i divlje kupine daju veće vrijednosti što je u skladu sa istraživanjima koja kažu da se u tropu zadržava veća količina tanina u odnosu na sok (Sandell i sar., 2009; Schieber i sar., 2001). Ovi rezultati saglasni su i sa činjenicom da divlja kupina sadrži veću količinu polifenolnih jedinjenja u odnosu na gajenu kupinu (Jazić, 2017; Milivojević i sar., 2011; Milenković-Andelković, 2016).

Pretragom literature nisu nađeni podaci o sadržaju tanina u kupini sa područja Balkana sa kojima bi se rezultati dobijeni u ovom radu mogli porediti.

4.4. SADRŽAJ ANTOCIJANA U SOKU I TROPU KUPINE

Antocijani su dominantni polifenoli u kupini. Oni doprinose tamnoplavoj boji kupina, i oni su klasa antioksidansa koja se najviše povezuje sa crvenim bobicama i voćem (Robinson i sar, 2020). Njihova osnovna strukturna jedinica je jon 2-fenilhromenilijum(flavilijum), a u zavisnosti od pH vrijednosti mogu biti u različitim oblicima, (Jazić, 2019).

Procentni sadržaj ukupnih antocijana dobijen u ovom istraživanju predstavljen je na slici 22.



Slika 22. Procentni sadržaj ukupnih antocijana u soku i tropu gajene i divlje kupine

U soku gajene kupine nađena je duplo veća vrijednost ukupnih antocijana (0,306 %) u odnosu na sok divlje kupine (0,156 %), dok je u tropu divlje kupine zabilježena duplo veća vrijednost ukupnih antocijana 0,760 %, u odnosu na trop gajene kupine 0,380 %. Dobijeni rezultati usaglašeni su sa podacima iz literature gdje se navodi da sjemenke i pokožica ploda (trop) sadrže veće koncentracije polifenolnih jedinjenja pa je samim tim koncentracija u soku niža (Sandell i sar. 2009; Schieber i sar. 2001).

U kupini sa područja Bjelasice zabilježene su niže vrijednosti sadržaja ukupnih antocijana 0,119 % (Ćujić i sar., 2011). Osim ovog rezultata, pregledom literature sa područja Balkana, nisu nađeni drugi podaci o koncentraciji antocijana, izraženi u procentima, sa kojima bi mogli porediti podatke dobijene u ovom master radu.

Gajena kupina sa područja Leskovca pokazala je veću antioksidativnu moć u odnosu na divlju kupinu, što je suprotno rezultatu koji je dobijen ovim istraživanjem. U slučaju divlje kupine zabilježeni su rezultati od 52,594 mg/100 g dok su za gajenu značajno veći, 91,325 mg/100 g (Milenković-Andelković, 2016). U istraživanju Vulića i saradnika (2011) u uzorcima kupina iz Srbije su zabilježeni rezultati od 149,12 mg/100 g antocijana.

4.4.1. Identifikacija antocijana HPLC metodom u soku i tropu kupine

Dok obojenost antocijanina omogućava laku spektrofotometrijsku detekciju na talasnoj dužini od 520 nm, raznolikost antocijanina i njihovih derivata čini izolovanje pojedinačnih molekula izuzetno izazovnim. Razdvajanje se često postiže HPLC metodom (Robinson i sar., 2020).

HPLC metodom u ispitivanim uzorcima kupine identifikovane su 3 vrste antocijana i jedan neidentifikovani derivat: cijanidin-3-glukozid, malvidin-glukozid, cijanidin-hlorid i derivat cijanidina (tabela 3).

Tabela 3. Sadržaj antocijana dobijen HPLC metodom

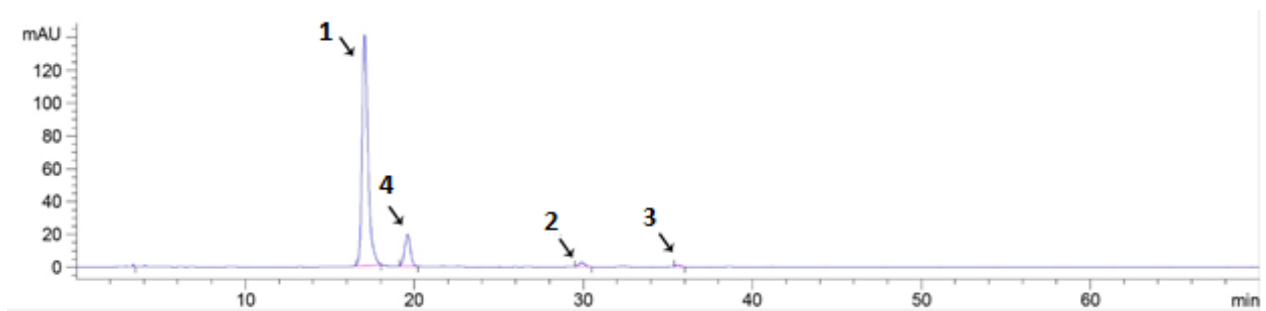
		SGK [mg/g]	TGK [mg/g]	SDK [mg/g]	TDK [mg/g]
cijanidin-3-glukozid	1	0,6433	2,727	0,1294	7,596
malvidin-3-glukozid	2	0,0184	0,102	ND	ND
cijanidin-hlorid	3	0,0027	ND	0,00871	0,272
derivat cijanidina	4	0,0857	0,173	ND	ND

ND – nije detektovan

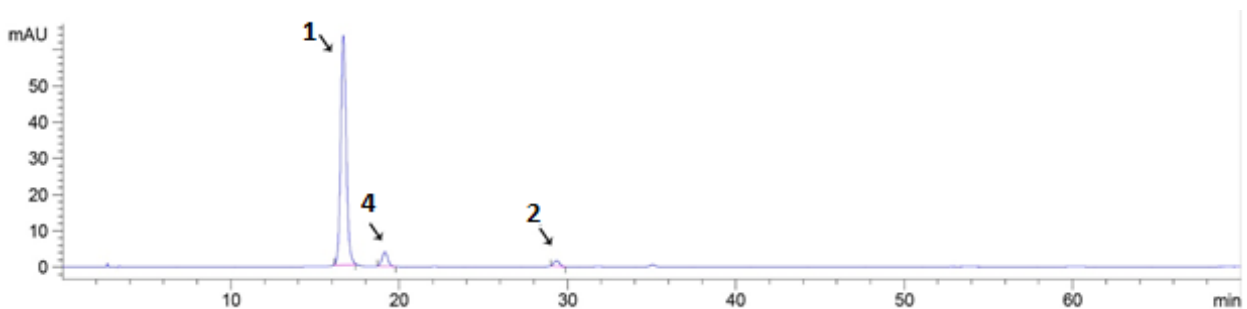
Cijanidin-3-O-glukozid (C3G) je konstantno najzastupljeniji polifenol koji se nalazi u kupini (Robinson i sar., 2020), što potvrđuje i ovo ispitivanje. U ispitivanim uzorcima kupine dominantno je prisutan cijanidin-3-glukozid i to sa najvećom koncentracijom u tropu divlje kupine (7,596 mg/g). Trop gajene kupine takođe ima značajan sadržaj cijanidin-glukozida (2,727 mg/g) dok je u sokovima sadžaj znatno manji. Milenković-Anđelković sa saradnicima u divljoj kupini iz Srbije takođe bilježe najveći sadržaj ovog antocijana u ispitivanim uzorcima s tim što je u njihovom radu ta vrijednost četiri puta manja (2,054 mg/g), (Milenković-Anđelković i sar., 2015). U ispitivanjima uzoraka sa teritorije BiH detektovan je značajno veći sadržaj cijanidin-3-glukozida (20,076 - 43,392 mg/g), (Jazić, 2019).

Malvidin-3-glukozid i derivat cijanidina nisu detektovani u divljoj kupini, a koncentracija oba je veća u tropu nego u soku gajene kupine. I cijanidin hlorid se pojavljuje u tragovima.

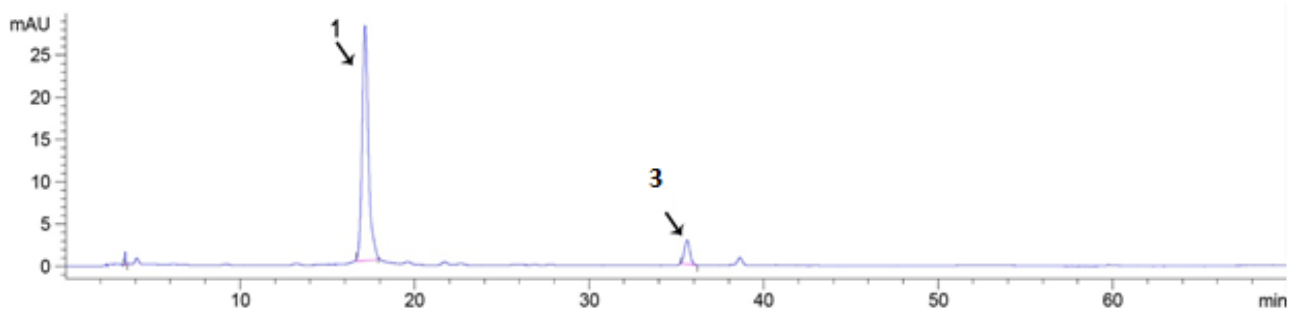
Na slikama 23-26 prikazani su HPLC hromatogrami antocijana identifikovanih na 520 nm.



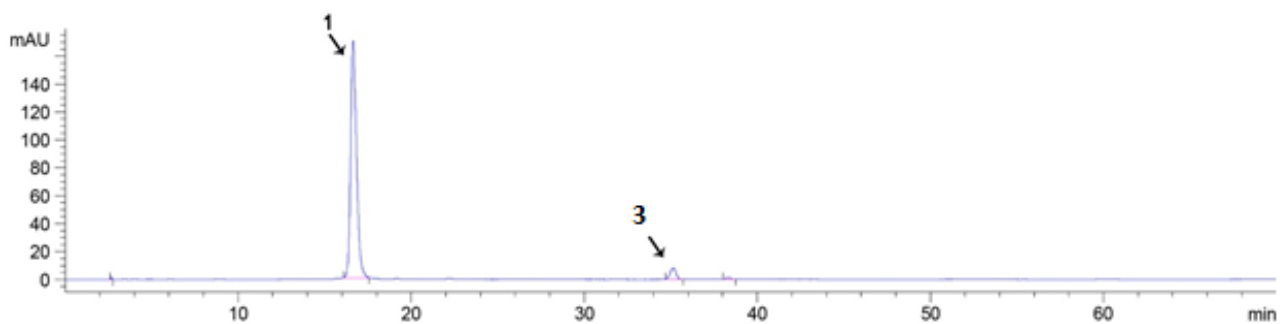
Slika 23. HPLC hromatogrami antocijana identifikovanih na 520 nm, sok gajena kupina



Slika 24. HPLC hromatogrami antocijana identifikovanih na 520 nm , trop gajena kupina



Slika 25. HPLC hromatogrami antocijana identifikovanih na 520 nm, sok divlja kupina



Slika 26. HPLC hromatogrami antocijana identifikovanih na 520 nm, trop divlja kupina

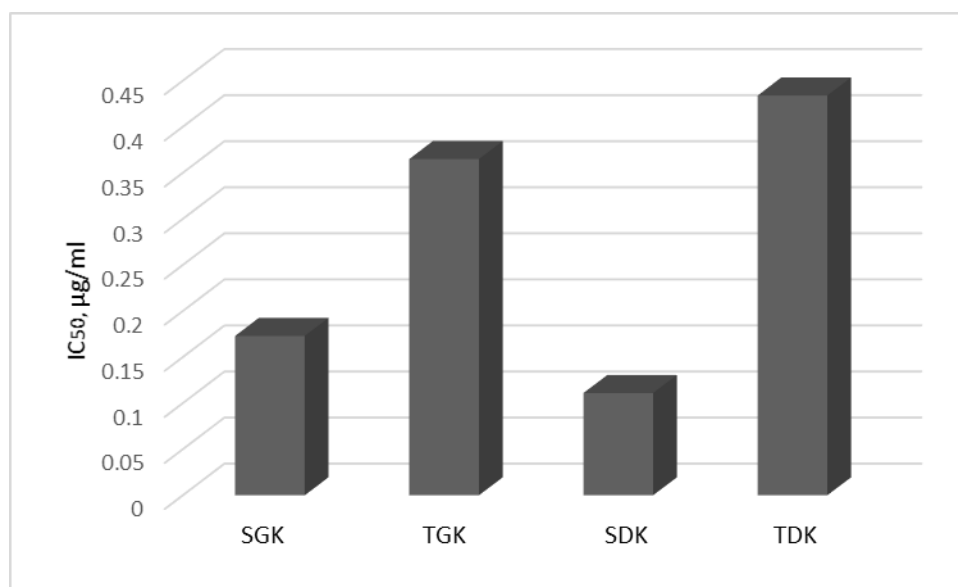
4.5. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST SOKA I TROPA KUPINE

4.5.1. DPPH metoda

DPPH je jedan od najstabilnijih slobodnih radikala. Metoda DPPH analize je veoma jednostavna i takođe je brza za analizu sadržaja antioksidansa. DPPH metoda koja se može koristiti za čvrste ili tečne uzorke nije specifična samo za bilo koji određeni antioksidans, već se primjenjuje i na ukupni antioksidativni kapacitet uzorka (Moniruzzaman i sar., 2012).

DPPH test se zasniva na sposobnosti stabilnog slobodnog radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil da reaguje sa donorima vodonika (Inoue i sar., 2005; Fahey i Stephenson, 2002). DPPH radikal apsorbuje u UV-Vis oblasti spektara (Moniruzzaman i sar., 2012).

Na slici 27 prikazana je antioksidativna aktivnost kupine dobijena primjenom DPPH metode.



Slika 27. Antioksidativna aktivnost kupine dobijena primjenom DPPH metode

Ispitivanjem kupine dobijena IC₅₀ vrijednost u soku gajene kupine je 0,173 µg/ml, a u soku divlje kupine 0,110 µg/ml. U tropu gajene kupine je zabilježena vrijednost IC₅₀ 0,356 µg/ml a u tropu divlje kupine 0,434 µg/ml.

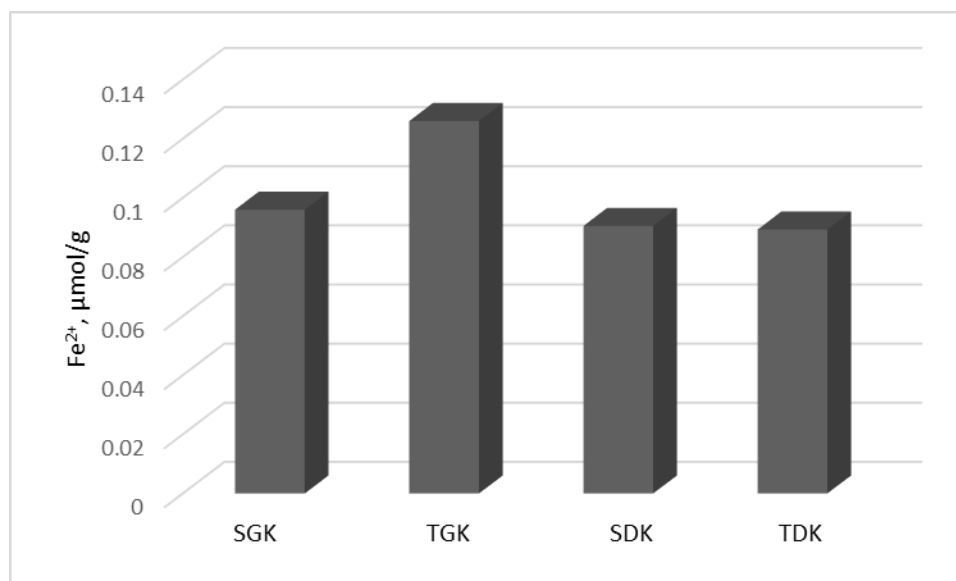
Rezultati pokazuju da bez obzira što divlja i gajena kupina nisu rasle u istim klimatskim uslovima manja antioksidativna aktivnost zabilježena je u tropovima nego u soku obje vrste kupine.

Dobijeni rezultati, u ovom radu, ukazuju na veću antioksidativnu sposobnost ispitivanih uzoraka u poređenju sa DPPH vrijednostima kupine sa teritorije BiH, gdje je zabilježena vrijednost IC_{50} 150-250 $\mu\text{g/ml}$ za trop i 3,53-5,10 $\mu\text{g/ml}$ za sok (Jazić, 2019). Takođe, i u radu Vulića i saradnika (2011) u ispitivanjima uzoraka sa područja Srbije zabilježena je DPPH vrijednost od 80 $\mu\text{g/ml}$, što ukazuje na manju antioksidativnu aktivnost u odnosu na vrijednosti dobijene u ovom radu. Manje IC_{50} vrednosti odgovaraju jačoj antioksidativnoj aktivnosti.

4.5.2. FRAP metoda

FRAP metoda je još jedna metoda koja se može koristiti za određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti kupine. FRAP test je široko korišćen za direktno testiranje ukupnog antioksidativnog potencijala na osnovu redukcije Fe^{3+} jona u Fe^{2+} jone (Benzie i Strain, 1999; M Moniruzzaman i sar., 2012).

Na slici 28 prikazana je antioksidativna aktivnost kupine dobijena primjenom FRAP metode.



Slika 28. Antioksidativna aktivnost kupine dobijena primjenom FRAP metode

Analizom antioksidativne sposobnosti gajene i divlje kupine FRAP metodom utvrđeno je da sok i trop gajene kupine pokazuju veću antioksidativnu aktivnost u poređenju sa sokom i tropom divlje kupine. U tropu gajene kupine zabilježen je sadržaj od 0,126 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$, a soku gajene kupine 0,096 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$. Trop divlje kupine sadržao je 0,0893 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ a sok 0,0905 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$.

Antioksidativne vrijednosti dobijene FRAP testom značajno se razlikuju od onih dobijenih DPPH testom. FRAP testom dobijena je veća antioksidativna sposobnost gajene kupine dok je DPPH test dao bolje rezultate za sok divlje kupine, što potvrđuje da antioksidansi mogu dati različite odgovore kada se tretiraju različitim testovima (Schlesier i sar., 2002). Ovo je razlog zbog kog se preporučuje kombinacija testova koji se zasnivaju na različitim mehanizmima djelovanja.

4.6. MIKROELEMENTI U ISPITIVANIM UZORCIMA KUPINE

Mineralne materije su veoma bitan segment ljudskog zdravlja i potrebno ih je ishranom unositi u organizam. Mikroelementi kao što su gvožđe, bakar, cink, jod, mangan, bor i dr. prirodno su prisutni u ljudskom organizmu i svaki od njih ima jednu ili više važnih funkcija, često kao dio enzimskih sistema ili hormona. Njihov sadržaj se mora pratiti jer nedostatak ovih elemenata može dovesti do ozbiljnih zdravstvenih problema dok prekomjeren unos dovodi do toksičnog efekta (Vasilišin i Grubačić, 2009).

Metali kao što su olovo i kadmijum ne bi smjeli da se nađu u hrani zbog izuzetne toksičnosti koja čak i u veoma malim količinama može dovesti do oštećenja vitalnih funkcija organizma. Dovode do smetnji u funkcionisanju enzima, oštećenja mozga i nervnog sistema, i mnogih drugih problema. Oni spadaju u klasične neorganske kontaminante (Vasilišin i Grubačić, 2009).

U ovom radu ispitivan je sadžaj Zn, Ni, Cu, Fe, Mn, Pb, Cd u plodu, tropu i soku divlje i gajene kupine a rezultati su predstavljeni u tabelama 4 i 5.

Tabela 4. Sadržaj metala u soku, tropu i plodu gajene kupine

	SGK [mg/kg]	TGK [mg/kg]	Plod GK [mg/kg]
Zn	3,2375 ±0,005	5,3375±0,000	4,812±0,017
Ni	0,5775±0,0005	0,4375±0,001	0,577±0,0005
Cu	3,4125±0,007	3,4125±0,001	2,975±0,010
Fe	20,3875±0,078	40,5125±0,159	29,3125±0,021
Mn	1,75±0,010	6,2125±0,009	4,200±0,005
Pb	0,3412±0,005	0,385±0,001	0,385±0,013
Cd	ND	ND	ND

ND – nije detektovan

Tabela 5. Sadržaj metala u soku, tropu i plodu divlje kupine

	SDK [mg/kg]	TDK [mg/kg]	Plod DK [mg/kg]
Zn	3,85±0,007	6,125±0,006	4,287±0,0009
Ni	0,5775±0,0005	0,6125±0,001	0,577±0,001
Cu	28,875±0,005	2,625±0,005	2,450±0,004
Fe	29,575±0,035	37,0125±0,061	26,600±0,064
Mn	9,45±0,042	17,4125±0,007	13,387±0,004
Pb	0,3237±0,003	0,2887±0,013	0,236±0,027
Cd	ND	ND	ND

ND – nije detektovan

Najzastupljeniji mikroelement ispitivan u ovom radu bilo je gvožđe (tabele 4 i 5). Najveća koncentracija zabilježena je u tropu gajene kupine 40,5125 mg/kg, nešto malo manja u tropu divlje kupine, 37,0125 mg/kg. U soku gajene kupine zabilježena je duplo manja koncentracija u odnosu na trop, 20,3875 mg/kg, dok je u soku divlje kupine bilo 29,575 mg/kg. Približno iste vrijednosti dao je plod obje ispitivane vrste, gajena kupina 29,3125 mg/kg, divlja kupina 26,600 mg/kg.

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju značajno su veći od rezultata koje predstavlja Jazić u svom radu za kupinu sa teritorije BiH, za sve ispitivane uzorke. Njegove vrijednosti za sok, trop i plod obje vrste kupine kreću se od 5,8 do 6,5 mg/kg (Jazić, 2019). Veće vrijednosti dobijene su i u poređenju sa kupinom sa područja Banja Luke, u kojoj je za gajenu kupinu dobijeno 12,69 mg/kg, a za divlju 8,98 mg/kg (Vasilišin i Grubačić, 2009).

Na drugom mjestu po zastupljenosti u gajenoj kupini bio je cink, čija je koncentracija u soku bila 3,2375 mg/kg, u tropu 5,3375 mg/kg a u plodu 4,812 mg/kg, dok je na trećem mjestu mangan sa vrijednostima od 1,75 mg/kg za sok, 6,2125 mg/kg za trop i 4,200 mg/kg za plod gajene kupine. Za divlju kupinu rezultati su obrnuti. U njoj je zabilježen veći sadržaj mangana (9,45 mg/kg sok, 17,4125 mg/kg trop, 13,387 mg/kg plod) u odnosu na cink (3,85 mg/kg sok, 6,125 mg/kg trop, 4,287 mg/kg plod).

Ispitujući mikroelemente divlje i gajene kupine Vasilišin i Grubačić (2009) dobijaju slične rezultate za cink i mangan. Oni bilježe sadržaj mangana u divljoj kupini 11,83 mg/kg, u gajenoj 5,54 mg/kg, dok se sadržaj cinka kreće od 1,23 mg/kg za gajenu do 3,74 mg/kg za divlju kupinu.

Jazić (2019) takođe bilježi slične rezultate kada su u pitanju oba elementa u gajenoj kupini kao i cink u divljoj, dok za mangan divlje kupine bilježi duplo manje vrijednosti (6,2-6,5 mg/kg).

Kada je u pitanju bakar, u svim ispitivanim uzorcima njegov sadržaj je sličan osim u soku divlje kupine gdje se javlja u koncentraciji od 28,875 mg/kg. U soku i tropu gajene kupine koncentracija je osam puta manja (3,4125 mg/kg), u plodu skoro deset puta manja (2,975 mg/kg). U tropu divlje kupine zabilježeno je 2,625 mg/kg a u plodu 2,450 mg/kg bakra. Sadržaj bakra u kupini sa teritorije Banja Luke kreće se od 1,23 mg/kg za gajenu kupinu do 3,74 mg/kg za divlju, a sa područja Javorana 1,5-1,7 mg/kg za obje vrste kupine (Vasilišin i Grubačić, 2009; Jazić, 2019).

U radu je ispitivan i sadržaj nikla, olova i kadmijuma. Koncentracije kadmijuma bile su ispod granica detekcije instrumenta. U soku i plodu gajene i divlje kupine zabilježena je ista vrijednost od 0,5775 mg/kg nikla, u tropu gajene 0,4375 mg/kg dok je u tropu divlje 0,6125 mg/kg. Sadržaj olova bio je niži. U soku gajene kupine 0,3412 mg/kg, u soku divlje gotovo isto 0,3237 mg/kg. U tropu i plodu gajene kupine dobijene su slične vrijednosti oko 0,385 mg/kg, dok je u tropu divlje kupine 0,2887 mg/kg a u plodu 0,236 mg/kg olova. U kupini sa područja BiH utvrđeno je prisustvo olova u koncentraciji od 0,001 mg/kg (Jazić, 2019).

Posmatrajući tabele 4 i 5 može se zaključiti da su koncentracije svih ispitivanih mikroelemenata veće u uzorcima soka gajene kupine nego u soku divlje kupine. U slučaju ploda koncentracije su takođe veće kod gajene kupine osim za mangan koji ima veću koncentraciju u divljoj kupini. Kada je u pitanju trop, u gajenoj kupini zabilježen je veći sadržaj gvožđa i bakra a u divljoj cinka i mangana.

4.6.1. Nutritivna vrijednost kupine

U tabeli 6 su predstavljeni rezultati procentualnog dnevnog unosa ispitivanih elemenata (Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, Pb i Cd) u porciji od 300 g kupina.

Tabela 6. Unos [%] a) esencijalnih mikroelemenata i b) toksičnih elemenata, na dnevnom nivou iz jedne porcije kupine

a)		DV %	
Elementi	RDA (mg/dan)	Gajena kupina	Divlja kupina
Zn	10	2,307	2,055
Cu	1	14,256	11,760
Fe	14	10,044	9,120
Mn	2	10,080	32,112

b)		DI %	
Toksični elementi	TDI (mg/kg)	Gajena kupina	Divlja kupina
Ni	0,196	14,130	14,130
Pb	1	1,848	1,132
Cd	0,05	-----	-----

Preporučene dnevne potrebe Mn iznose 2 mg (European Economic Community-EEC, 2008). Konzumiranjem 300 g divljih kupina u organizam se unese čak 32 % preporučenog dnevnog unosa ovog elementa, dok konzumacijom iste količine gajene kupine unesemo 10 %. Ovi procenti u velikoj mjeri ukazuju na značaj upotrebe kupine u ishrani s obzirom na to da mangan učestvuje u formiranju kostiju, imunološkim funkcijama, antioksidativnim aktivnostima i metabolizmu ugljenih hidrata i masti (Pereira i sar., 2018).

Preporučene dnevne potrebe Fe iznose 14 mg a Cu 1 mg (European Economic Community-EEC, 2008). Konzumiranjem 300 g gajene kupine u organizam se unese 10 % od ukupne potrebe za

gvoždem i 14 % za bakrom, dok je u slučaju divlje kupine taj procenat malo manji, 11 % za bakar i 9 % za gvožđe. Ovi procenti nisu zanemarljivi znajući da su gvožđe i bakar esencijalni mikroelementi. Bakar pomaže u metabolizmu gvožđa, formiranju crvenih krvnih zrnaca, kao i proizvodnji energije za ćelije, a gvožđe vrši transport kiseonika kroz organizam, i njegov nedostatak može dovesti do anemije, smanjenja rezistencije na infekcije, depresije itd. (Pereira i sar., 2018).

Dnevna potreba Zn je 10 mg (European Economic Community-EEC, 2008), što se u malom procentu može postići upotrebom kupine u ishrani. Svega 2 % od ukupnih potreba zadovoljava porcija od 300 g i u slučaju divlje i u slučaju gajene kupine.

Kada su u pitanju toksični elementi, koncentracija kadmijuma bila je ispod granica detekcije instrumenta. Maksimalno dozvoljena koncentracija olova je 1 mg i 1,8 % ove količine unijelo bi se u organizam porcijom od 300 g gajene kupine, odnosno 1,1 % istom količinom divlje kupine.

Nešto veći procenat dobijen je kada je u pitanju nikl, u organizam se unosi 14 % od ukupne dozvoljene koncentracije koja iznosi 0,196 mg. S obzirom da ove koncentracije nisu ni približne maksimalno dozvoljenim, može se smatrati da je kupina bezbjedna za upotrebu i konzumiranje i ne može dovesti do toksičnih efekata.

4.7 KORELACIJA SADRŽAJA FENOLNIH JEDINJENJA, MIKROELEMENTATA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI U ISPITIVANIM UZORCIMA KUPINE

U radu je analiziran stepen korelacije polifenolnih jedinjenja i antioksidativnih vrijednosti dobijenih DPPH i FRAP metodom (tabele 7 i 8), gajene i divlje kupine sa područja Crne Gore. Vršena je i analiza korelacije mikroelementata i antioksidativnih vrijednosti dobijenih pomenutim metodama (tabela 9).

Najveći stepen korelacije u ispitivanim uzorcima kupine utvrđen je između ukupnih fenola i antioksidativnih vrijednosti dobijenih DPPH metodom, $R^2=0,961$, tabela 7. I ostala ispitivana polifenolna jedinjenja dala su bolji stepen korelacije sa vrijednostima dobijenim DPPH metodom u odnosu na one dobijene FRAP metodom. U slučaju tanina stepen korelacije iznosio je $R^2=0,8256$, što daje velik doprinos antioksidativnoj sposobnosti kupine.

Kada su u pitanju ukupni antocijani, stepen korelacije nije bio visok, međutim pojedinačno identifikovan cijanidin hlorid daje izuzetan stepen korelacije sa antioksidativnom vrijednošću dobijenom DPPH metodom, čak $R^2=0,997$ (tabela 8).

Antioksidativne vrijednosti dobijene FRAP metodom ni u jednoj analizi nisu pokazale dobar stepen korelacije, odnosno $R^2<0,5$.

Određivan je i nivo korelacije ispitivanih mikroelemenata i antioksidativne aktivnosti. Najveći stepen korelacije uspostavljen je između cinka i vrijednosti dobijene DPPH metodom, $R^2=0,8595$ (tabela 9). Gvožđe pokazuje stepen korelacije od $R^2=0,597$, bakar $R^2=0,5201$ sa antioksidativnim vrijednostima takođe dobijenim DPPH metodom. Stepen korelacije ispitivanih elemenata sa vrijednostima dobijenim FRAP metodom bio je znatno niži, $R^2<0,5$.

Tabela 7. Stepen korelacije ukupnih fenola, flavonoida, tanina i antocijana i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim uzorcima kupine

	DPPH	FRAP
Fenoli	$y=-0,0068x + 1,8596$ $R^2=0,961$	$y=-0,0003x + 0,1759$ $R^2=0,2106$
Flavonoidi	$y=0,0018x - 0,0552$ $R^2=0,2575$	$y=-0,0001x + 0,1222$ $R^2=0,1286$
Tanini	$y=0,6645x - 0,0426$ $R^2=0,8256$	$y=0,022x + 0,0907$ $R^2=0,0901$
Antocijani	$y=0,441x + 0,0756$ $R^2=0,4326$	$y=-0,0085x + 0,1038$ $R^2=0,0159$

Tabela 8. Stepen korelacije identifikovanih pojedinačnih antocijana i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim uzorcima kupine

	DPPH	FRAP
Cijanidin-3-glukozid	$y=0,0357x + 0,1533$ $R^2=0,4964$	$y=-0,0006x + 0,102$ $R^2=0,0118$
Cijanidin hlorid	$y=0,975x + 0,0995$ $R^2=0,9972$	$y=-0,0152x + 0,0934$ $R^2=0,4268$

Tabela 9. Stepen korelacije identifikovanih pojedinačnih elemenata i antioksidativne aktivnosti u ispitivanim uzorcima kupine

	DPPH	FRAP
Fe	$y=1,5466x - 0,3358$ $R^2=0,597$	$y=0,0872x + 0,0687$ $R^2=0,264$
Zn	$y=12,462x - 0,433$ $R^2=0,8595$	$y=0,2545x + 0,087$ $R^2=0,0499$
Mn	$y=1,4571x + 0,0825$ $R^2=0,2913$	$y=-0,0917x + 0,1096$ $R^2=0,1605$
Cu	$y=-0,9997x + 0,337$ $R^2=0,5201$	$y=-0,0431x + 0,1052$ $R^2=0,1344$

5. ZAKLJUČAK

U radu su analizirani ukupni fenoli, flavonoidi, tanini, ukupni i pojedinačni antocijani, antioksidativna aktivnost DPPH i FRAP metodama u soku i tropu gajene i divlje kupine i mikroelementi u tropu, soku i plodu gajene i divlje kupine sa područja Crne Gore. Dobijeni rezultati ukazuju na to da veću antioksidativnu sposobnost ima divlja kupina što je i bila pretpostavka (hipoteza) od koje je istraživanje počelo.

Najveći sadržaj polifenolnih jedinjenja zabilježen je u tropu divlje kupine (flavonoidi 248,01 mg QE/100 g, ukupni antocijani 0,760 %, tanini 0,700 %), osim u slučaju ukupnih fenola, koji su se u najvećoj mjeri izdvojili u soku gajene kupine (263 mg GAE/100 g). Nađeno je da je najzastupljeniji, pojedinačni antocijan cijanidin-3-glukozid, u tropu divlje kupine (7,596 mg/g). Malvidin-3-glukozid i derivat cijanidina nisu detektovani u divljoj kupini, a koncentracija oba je veća u tropu nego u soku gajene kupine. Utvrđeno je i to da se u tropu gajene i divlje kupine zadržalo više ispitivanih polifenolnih jedinjenja (izuzev ukupnih fenola) u odnosu na sok obje vrste kupine. Dobijeni rezultati usaglašeni su sa podacima iz literature (Sandell i sar. 2009, Schieber i sar. 2001, Jazić 2019) koji pokazuju da trop sadrži veće koncentracije polifenolnih jedinjenja u odnosu na sok.

Ispitivanjem mikroelemenata u soku, tropu i plodu gajene i divlje kupine, utvrđen je najviši sadržaj gvožđa i to za gajenu kupinu u opsegu 20,3875 - 40,5125 mg/g, a za divlju kupinu u opsegu 26,600 - 37,0125 mg/g. Osim u slučaju bakra, koji se dominantno našao u soku divlje kupine, ostali ispitivani elementi u velikoj mjeri zadržali su se u tropu kupine. Konzumiranjem 300 g gajenih odnosno divljih kupina u organizam se unese oko: 10 % Fe iz gajene odn. 9 % Fe iz divlje kupine, 10 % Mn iz gajene odn. 32 % Mn iz divlje kupine, 14 % Cu iz gajene odn. 11 % Cu iz divlje kupine i 2 % Zn u slučaju obje vrste kupine.

U ispitivanim uzorcima kupine utvrđen je visok stepen korelacije između sadržaja ukupnih fenola i tanina sa vrijednostima antioksidativne aktivnosti mjerene DPPH testom ($R^2=0,961$, $R^2=0,8256$, respektivno), kao i pojedinačnog antocijana cijanidin hlorida sa vrijednostima antioksidativne aktivnosti mjerene DPPH testom ($R^2=0,9972$) što značajno doprinosi antioksidativnoj aktivnosti kupine. Kada su u pitanju mikroelementi, najbolja korelacija dobijena je između vrijednosti dobijenih za cink i DPPH vrijedosti ($R^2= 0,8595$).

Na osnovu navedenih podataka može se zaključiti da ispitivana kupina sa područja Crne Gore ima značajnu antioksidativnu sposobnost pa se shodno tome njenim konzumiranjem može smanjiti učestalost određenih hroničnih bolesti. Takođe, na osnovu dobijenih rezultata nutritivne vrijednosti može se zaključiti da ispitivana kupina sa područja Crne Gore predstavlja značajan izvor mikroelemenata.

6. LITERATURA

1. Abadi M. D. M., Ashraf N., Chamsaz M. i sar., An Overview of Liquid Phase Microextraction Approaches Combined With UV–Vis Spectrophotometry. *Talanta* 99, 1–12 (2012).
2. Aceto M., Agostino A., Fenoglio G. i sar., Characterisation of colourants on illuminated manuscripts by portable fibre optic UV-visible –NIR reflectance spectrophotometry, *Analytical Methods*, issue 6(5) (2014).
3. Alam M.N., Bristi N.J., Rafiqzaman M., Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity, *Saudi Pharmaceutical Journal*, Volume 21, Issue 2, 143-152 (2013).
4. Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E. i sar., Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183–198 (2002).
5. Arayaa M., Carvajala Y., Alvarez V. i sar., Polyphenol characterization of three varieties of Blackberry fruits (*Rubus adenotrichos*), cultivated in Costa Rica. *Journal of Berry Research*, vol. 7, no. 2, 97-107 (2017).
6. Aryal S., HPLC- Definition, Principle, Parts, Types, Uses, Diagram, (2022). <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>
7. Bahorun T, Soobrattee MA, Luximon-Ramma V. i sar., Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. *Internet J. of Medical Update*, Vol. 1 No. 2, (2006).
8. Basu P., Maier C., In vitro Antioxidant Activities and Polyphenol Contents of Seven Commercially Available Fruits. *Pharmacognosy Res.* 8(4):258-264 (2016).
9. Batra P, Sharma A.K., Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives., *3 Biotech.*, 3(6): 439–459 (2013).
10. Benzie I.F.F, Strain J.J., Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Meth Enzymol*, 299:15–27 (1999).
11. Blois M.S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199–1200. (1958).

12. Bowen-Forbes C. S., Zhang, Y., Nair, M. G., Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6):554-560, (2010).
13. Brašanac S., Određivanje antioksidativne moći i kapaciteta usvajanja metala divlje borovnice (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) na području Crne Gore, doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet, Beograd (2022).
14. Burton-Freeman B., Amandeep Sandhu and Indika Edirisinghe, Anthocyanins, *Nutraceuticals*, 489-500 (2016).
15. Castrejon A.D.R., Eichholz I., Rohn S. i sar., Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chem.* 109:564–572 (2008).
16. Cho M.J., Howard L.R., Prior R.L. i sar., Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Sci Food Agric* 84:1771–1782 (2004).
17. Council of Europe. *European Pharmacopeia*, 9th ed. Council of Europe, Strasbourg, France (2016).
18. Craft B.D., Kerrihard A.L., Amarowicz, R. i sar., Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol.11 148-173 (2012).
19. Croge C.P., Cuquel F.L., Pintro P.T.M. i sar., Antioxidant Capacity and Polyphenolic Compounds of Blackberries Produced in Different Climates. *HortScience*, Volume 54: Issue 12 (2019).
20. Ćujić N., Kundaković T., Šavikin K., Antocijani-hemijska analiza i biološka aktivnost, *Broj 33 Str. 19 – 37 Beograd* (2013).
21. D'Agostino M.F., Sanz, J., Sanz, M. L. i sar., Optimization of a Solid-phase Microextraction method for the Gas Chromatography- Mass Spectrometry analysis of blackberry (*Rubus ulmifolius* Schott) fruit volatiles. *Food Chemistry*, 1;178:10-7 (2015).
22. de Souza V. R., Pereira P.A.P., da Silva T.L.T. i sar., Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, 1;156:362-8 (2014).

23. Dramićanin A., Andrić F., Mutić J. i sar., Content and distribution of major and trace elements as a tool to assess the genotypes, harvesting time, and cultivation systems of potato, *Food Chemistry*, Volume 354, 129507, (2021).
24. European Economic Community-EEC. (2008, 2010, 2012.)
25. European Economic Community-EEC. Commission Directive 2008/100/EC. Amending Council Directive 90/496/EEC on nutrition labelling for food stuffs as regards recommended daily allowances, energy conversion factors and definitions. *Off. J. Eur. Commun.*, L285, 9-12 (2008).
26. Fahey J.W, Stephenson K.K., Pinostrobin from honey and Thai ginger (*Boesenbergia pandurata*): A potent flavonoid inducer of mammalian phase 2 chemoprotective and antioxidant enzymes. *Journal of Agricultural Food Chem.* 50:7472–7476 (2002).
27. Foti M.C., Use and Abuse of the DPPH• Radical., *J. Agric. Food Chem.*, 63, 8765–8776 (2015).
28. Galušić S., Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb (2020).
29. Genestra M., Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Review. Cell Signal.* 19(9):1807-19 (2007).
30. Guerrero J.C., Ciampi L.P., Castilla A. C., i sar., Antioxidant capacity, anthocyanins, and total phenols of wild and cultivated berries in Chile, *Chil. J. Arg. Res.* vol. 70, N 4 (2010).
31. Gupta D., Methods for determination of antioxidant capacity: a review, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(6 2):546-566 (2015).
32. Hafez H.M., Elshanawany A.A., Abdelaziz L.M. i sar., Development of a Stability-Indicating, HPLC Method for Simultaneous Determination of Amlodipine Besylate and Atorvastatin Calcium in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form. *Pharm Anal Acta*, 5:9 (2014).
33. Hager T.J., Howard L.R., Prior R.L., Processing and storage effects on the ellagitannin composition of processed blackberry products. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 22, 11749–11754 (2010).
34. Halliwell B, Gutteridge J.M.C., *Free radicals in biology and medicine*. 4th. Oxford, UK: Clarendon Press (2007).

35. He J., Giusti M.M., Anthocyanins: natural colorants with healthpromoting properties. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 1:163-87 (2010).
36. Heinonen M., Lehtonen P.J., Hopia A.I., Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. *J. Sci. Food Agr.* 46:25–31 (1998).
37. Ho C.T., Phenolic Compounds in Food An Overview, ACS Symposium Series American Chemical Society Shahidi and Ho; Phenolic Compounds in Foods and Natural Health Products (2005).
38. Hodžić A., Minerali u ishrani, Publisher: Buybook; Sarajevo, BiH, 2013.
39. Horbowicz M., Kosson R., Grzesiuk A. i sar., Anthocyanins of fruits and vegetables – their occurrence, analysis and role in human nutrition. *Veg. Crops Res. Bull.* 68, 5 (2008).
40. Huang W., Zhang H., Liu W. i sar., Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing, *Journal of Zhejiang Univ Sci B* v.13(2); PMC3274736 (2012).
41. Inoue K, Murayarna S, Seshimo F. i sar., Identification of phenolic compound in manuka honey as specific superoxide anion radical scavenger using electron spin resonance (ESR) and liquid chromatography with coulometric array detection. *J Sci Food Agric.* 85:872–878 (2005).
42. Jazić M., Hemijski sastav i biološki potencijal ploda, soka i tropa kultivisane i divlje kupine (*Rubus fruticosus* L.), doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Prehrambeno inženjerstvo, Novi Sad (2019).
43. John B., Sulaiman C.T., George S. i sar., Total phenolics and flavonoids in selected medicinal plants from Kerala. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2 (4): 72-73 (2014).
44. Kay C.D., Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans. *Nutr. Res. Rev.* 19(1):137-46 (2006).
45. Kazazić S., Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida, *Arh Hig Rada Toksikol* 55:279-290 (2004).
46. Koca I., Karadeniz B., Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. *Scientia Horticulturae* 121(4):447-450 (2009).
47. Koli R., Erlund I., Jula A. i sar., Bioavailability of various polyphenols from a diet containing moderate amounts of berries. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 7, 3927–3932 (2010).

48. Kostecka-Gugala A., Antioxidant properties of fruits of raspberry and blackberry grown in central Europe, *Open Chemistry*, 13: 1313–1325 (2015).
49. Lakshmi S.R.P., A Review on Chromatography with High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and its Function., *Journal of Pharmaceutical Analysis*, Vol.4, Issue 1. (2015).
50. Liao X., Greenspan P., Srivastava A. i sar., Characterizing the phenolic constituents of U.S. Southeastern blackberry cultivars. *Molecules* 26, 4001 (2019).
51. Lin D., Xiao M., Zhao J. i sar., An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes, *Molecules*. 15;21(10):1374 (2016).
52. Luís Â., Duarte A.P., Pereira L. i sar., Interactions between the major bioactive polyphenols of berries: Effects on antioxidant properties. *Eur. Food Res. Technol*, Vol.244, No.1, 175-185 ref.28, (2018).
53. Martins A., Barros L., Carvalho A. M. i sar., Phenolic extracts of *Rubus ulmifolius* Schott flowers: Characterization, microencapsulation and incorporation into yogurts as nutraceutical sources. *Food & Function* 5(6):1091-100 (2014).
54. Mattila P., Hellström J., Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products, *Journal of Food Composition and Analysis*, 20 152-160 (2007).
55. Miguel M.G., 2011. Anthocyanins: antioxidant and/or anti-inflammatory activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 01 (06); 07-15 (2011).
56. Milenković-Andelković A., Radovanović, B., Andelković M. i sar., The anthocyanin content and bioactivity of cornelian cherry (*Cornus mas*) and wild blackberry (*Rubus fruticosus*): Fruit extracts from the Vlasina region. *Advanced technologies*, 4(2), 26-31 (2015).
57. Milivojević J., Maksimović V., Nikolić M. i sar., Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild *Fragaria* and *Rubus* berries. *Journal of Food Quality*, 34(1), 1–9.4 (2011).
58. Moniruzzaman M., Khalil M.I., Sulaiman S.A. i sar., Advances in the Analytical Methods for Determining the Antioxidant Properties of Honey: A Review, *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 9(1):36-42 (2011).

59. Moyer R.A., Hummer K.E., Finn C.E. i sar., Anthocyanins, phenolics, and Antioxidants capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *J. Agr. Food Chem.* 50:519–525 (2002).
60. Munteanu I.G., Apetre C., Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity, *Int. J. Mol. Sci.* 22, 3380 (2021).
61. Mutha R.E., Tatiya A.U., Surana S.J., Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. *Futur J Pharm Sci.* 7(1): 25 (2021).
62. Mutić J., Analiza makroelemenata i mikroelemenata u hrani, Beograd, (2022).
63. Nile S. H., Park, S. W., Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30(2):134-44 (2014).
64. Oliveira J., Bras N.F., da Silva M.A. i sar., Grape anthocyanin oligomerization: a putative mechanism for red color stabilization? *Phytochemistry.* 105:178-85 (2014).
65. Panche A.N., Diwan A.D., Chandra S.R., Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*, 5 e47. (2016).
66. Passos M.L.C., Sarraguc ,M.C. Saraiva M.L., Spectrophotometry j Organic Compounds, Porto University, Porto, Portugal T Prasada Rao and VM Biju, Regional Research Laboratory, Trivandrum, India, (2019).
67. Patel P. R., Rao T. V. R., Growth and ripening in black plum [*Syzygium cumini*(L.). *International Journal of Fruit Science*, 14, 147–156 (2014).
68. Pereira C.C., do Nascimento d.S., Emanuelli d.S., Evaluation of the bioaccessibility of minerals from blackberries, raspberries, blueberries and strawberries, *Journal of Food Composition and Analysis Volume 68*, 73-78 (2018).
69. Pham-Huy L.A., He H., Pham-Huy C., Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health, *Int J Biomed Sci.* 4(2): 89–96., (2008).
70. Picollo M., Aceto M., Vitorino T., UV-Vis spectroscop, *Physical Sciences Reviews.* 20180008 (2018).
71. Pravilnik o količinama pesticide, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemioterapeutika, antibiotika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u ("Sl. list SRJ", br. 5/92, 11/92 - ispr. i 32/2002 i "Sl. glasnik RS", br. 25/2010 - dr. pravilnik i 28/2011 - dr. pravilnik)

72. Randhir R., Lin Y.T., Shetty K., Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochem.* 39, 637–646 (2004).
73. Rašić T.M., Antioksidacijski potencijal kupine, Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split (2021).
74. Reyes-Carmona J., Yousef G.G., Martinez-Peniche R.A. i sar., Antioxidant capacity of fruit extracts of Blackberry (*Rubus* sp.) produced in different climatic regions. *J. Food Sci.* 70:497–503 8 (2005).
75. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956 (1996).
76. Robbins R.J., Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2866-2887 (2003).
77. Robinson J.A., Bierwirth J.E., Greenspan P. i sar., Blackberry polyphenols: review of composition, quantity, and health impacts from in vitro and in vivo studies. *Journal of Food Bioactives*, Vol. 9 (2020).
78. Sánchez-Velázquez O.A. Montes-Ávila J., Milán-Carrillo J. i sar., Characterization of tannins from two wild blackberries (*Rubus* spp) by LC–ESI–MS/MS, NMR and antioxidant capacity,. *Journal of Food Measurement and Characterization* v.13 no.3 pp. 2265-2274 (2019).
79. Sandell M., Laaksonen O., Järvinen R. i sar., Orosensory profiles and chemical composition of black currant (*Ribes nigrum*) juice and fractions of press residue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3718-3728 (2009).
80. Schieber A., Stintzing F. C., Carle R., By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 401-413 (2001).
81. Schlesier K., Harwat M., Böhm V. i sar., Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods, *Free Radical Research*, 36(2), 177-87 (2002).
82. Schulz M., Borges G. D. S. C., Gonzaga L. V. i sar., Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. *Food Research International*, 77(2). 125-131 (2015).

83. Schulz M., Tischer Seraglio S.K., Betta F. D., Nehring P. i sar., Blackberry (*Rubus ulmifolius* Schott): Chemical composition, phenolic compounds and antioxidant capacity in two edible stages. *Food Research International*, Volume 122, 627-634 (2019).
84. Setiawan V., Phangestu S., Soetikno A.G. i sar., Rapid Screening Analysis of Antioxidant Activities in Green Tea Products Using DPPH and FRAP. *Pharmaceutical Journal of Indonesia*, Vol. 7 No. 1 (2021).
85. Shahidi F. (Ed.), *Antioxidants: Principles and applications, Handbook of antioxidants for food preservation*, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK 1-14 (2015).
86. Shahidi F., Ambigaipalan P., Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects –A review, *Journal off unctional foods* 18 820–897 (2015).
87. Shahidi F., Chandrasekara A., Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities, *Phytochemistry Review*, 9 147-170 (2010).
88. Shahidi F., M. Nacz, *Phenolics in food and nutraceuticals F.*, CRC Press., Boca Raton, FL 1-558 (2004).
89. Shahidi F., McDonald J., Chandrasekara A. i sar., Phytochemicals of foods, beverages and fruit vinegars: Chemistry and health effects, *Asia Pac J Clin Nutr.*; 17 1:380-2 (2008).
90. Siracusa L. i Ruberto G., Not only what is food is good—Polyphenols from edible and nonedible vegetable waste; *Polyphenols in Plants* 3-21 (2019).
91. Siriwoharn T., Wrolstad R.E., Finn C.E. i sar., Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus L. hybrids*) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. *J. Agric. Food Chem.* 52(26):8021-30 (2004).
92. Stajčić S., Tepić A.N., Djilas S.M. i sar., Chemical composition and antioxidant activity of barry. *Acta Periodica Technologica Issue* 43, 93-105 (2012).
93. Subbiah V., Zhong B., Nawaz M.A. i sar., Screening of Phenolic Compounds in Australian Grown Berries by LC-ESI-QTOF-MS/MS and Determination of Their Antioxidant Potential., *Antioxidants (Basel)* 29;10(1):26 (2020).
94. Sultana N., Development and Validation for the Simultaneous Quantification of Prazosin, Amlodipine, Diltiazem and Verapamil in API, Dosage Formulation and Human Serum by RP-HPLC: Application to in vitro interaction studies, *Med chem*, 4:12 (2014).

95. Swanson B. G., Tannins and polyphenols, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 5729-5733 (2003).
96. Tomás-Barberán F.A., García-Villalba R., González-Sarrías A. i sar., Ellagic acid metabolism by human gut microbiota: Consistent observation of three urolithin phenotypes in intervention trials, independent of food source, age, and health status. *J. Agric. Food Chem.* 62(28):6535-8 (2014).
97. Tomović V., *Osnovni principi atomske apsorpcione spektrofotometrije*, 2009. <https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/osnovni-principi-atomske-apsorpcione-spektrofotometrije>
98. Valko M, Leibfritz D, Moncola J. i sar., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39(1):44-84 (2007).
99. Valko M., Rhodes C.J., Moncol J. i sar., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Mini-review. *Chem. Biol. Interact.* 160(1):1-40 (2006).
100. Van de Velde F., Grace M.H., Esposito D. i sar., Quantitative comparison of phytochemical profile, antioxidant, and anti-inflammatory properties of blackberry fruits adapted to Argentina. *Journal of Food Composition and Analysis* S0889-1575(16)30007-2, (2016).
101. Vasilisin L., Grubačić M., Sadržaj mikroelemenata u jagodastom voću, *Glasnik hemičara, tehnologa i ekologa Republike*, ISSN-1840-054X, naučni rad UDK 634.75 (2009).
102. Vatter D.A., Randhir R., Shetty K., Cranberry phenolics-mediated antioxidant enzyme response in oxidatively stressed porcine muscle. *Process. Biochem.* 40 2225-2238 (2005).
103. Vulić J.J., Tumbas V. T., Savatović S. M., i sar., Polyphenolic content and antioxidant activity of the four berry fruits pomace extracts, *APTEFF*, 42, 1-288 (2011).
104. Xu G., Ye X., Liu D. i sar., Composition and distribution of phenolic acids in Ponkan (*Citrus poonensis* Hort. ex Tanaka) and Huyou (*Citrus paradisi* Macf. Changshanhuyou) during maturity, *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 382-389 (2008).
105. Zia-Ul-Haq M., Riaz M., De Feo V. i sar., *Rubus fruticosus* L.: Constituents, biological activities and health related uses. *Molecules* 19(8): 10998–11029 (2014).
106. Žugić A.R., Ekstrakt talusa *Usnea barbata* (L.) Weber ex F. H. Wigg., *Parameliaceae* u emulzionim nosačima stabilizovanim biorazgradivim emulgatorima: Preformulaciona i formulaciona istraživanja, *Doktorska disertacija*, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Beograd (2016).