

UNIVERZITET CRNE GORE
METALURŠKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET
HEMIJSKA TEHNOLOGIJA



Ivana Kasalica

**KINETIKA EKSTRAKCIJE FENOLNIH JEDINJENJA IZ
PLODA BOROVNICE (*Vaccinium myrtillus* L.)**

MASTER RAD

Podgorica, 2024.

PODACI I INFORMACIJE O STUDENTU

Ime i prezime: Ivana Kasalica

Datum i mjesto rođenja: 19.08.1997., Pljevlja, Crna Gora

Institucija: Univerzitet Crne Gore - Podgorica

Naziv završenog osnovnog studijskog programa: Hemijska tehnologija (Metalurško-tehnološki fakultet, Podgorica)

Godina završetka studija: 2020.

INFORMACIJE O MASTER RADU

Naziv master studija: Studijski program Hemijska tehnologija

Naziv rada: „Kinetika ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz ploda borovnice“

Fakultet: Metalurško-tehnološki fakultet, Podgorica

UDK, Ocjena i ODBRANA MASTER RADA

UDK:

Datum prijave master rada: 20.03.2023.

Datum sjednice Vijeća na kojoj je prihvaćena tema: 24.04.2023.

Mentor: Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, redovni profesor

Komisija za ocjenu rada

Prof. dr Slađana Krivokapić, PMF, predsjednik

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, MTF, mentor

Prof. dr Svetlana Perović, PMF, član

Komisija za odbranu rada

Prof. dr Slađana Krivokapić, PMF, predsjednik

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, MTF, mentor

Prof. dr Svetlana Perović, PMF, član

Lektor: Autolektura

Datum odbrane:

IZJAVA O AUTORSTVU

Kandidat:

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

IZJAVLJUJEM

pod punom krivičnom i materijalnom odgovornošću da je magistarski rad pod nazivom „Kinetika ekstrakcije fenolnih jedinjenja iz ploda borovnice“ rezultat sopstvenog istraživačkog rada, da nijesam kršio/kršila autorska prava i koristio/koristila intelektualnu svojinu drugih lica i da je navedeni rad moje originalno djelo.

Podgorica, 2024. godine

Potpis studenta

ZAHVALNICA

Istraživanje predstavljeno u ovom master radu sprovedeno je na Metalurško-tehnološkom fakultetu u Podgorici. Željela bih da iskoristim priliku da izrazim svoju zahvalnost profesorima, prijateljima i svojoj porodici, koji su mi pomagali, uložili neizmjeran trud i strpljenje tokom cijelog istraživačkog procesa.

Prije svega, zahvalila bih se svojoj mentorki prof. dr Biljani Damjanović-Vratnica čija stručnost, posvećenost i podrška nisu samo obogatili moje akademsko iskustvo, već su i omogućili uspješan završetak mog master rada.

Željela bih iskazati zahvalnost članovima komisije prof. dr Slađani Krivokapić i prof. dr Svetlani Perović na njihovom konstruktivnim komentarima i angažmanu tokom procesa odbrane.

S ljubavlju, želim izraziti duboku zahvalnost svojoj porodici koja je bila neiscrpna podrška tokom mog puta ka postizanju akademskog uspjeha. Hvala vam što ste bili temelj mog uspjeha i što ste dijelili svaki korak ovog puta sa mnom.

IZVOD

Divlja borovnica (*Vaccinium myrtillus* L.), član porodice Ericaceae, je nisko rastući žbun porijeklom sa sjevera Evrope i iz Sjeverne Amerike. U narodnoj medicini i farmaceutskoj industriji koriste se specifične osobine jedinjenja koja su prisutna u plodu i listu borovnice. Borovnica (*Vaccinium myrtillus* L.) je voćna vrsta, čiji je aktivan uzgoj počeo kasnije u odnosu na mnoge druge ljekovite biljke. U našim krajevima nema razvijenu tradiciju uzgoja iako sama, kao divlja, raste na većim nadmorskim visinama.

Plod borovnice je ukusno i cijenjeno voće. Sadrži visoku koncentraciju šećera, posebnu hranljivost ploda, veliki procenat ukupnih organskih kiselina, proteina, celuloze, pektina, fenola, antocijana, vitamina i dr. Utvrđeno da su plodovi borovnice jako dobri hvatači slobodnih radikala i da se antiradikalna aktivnost mijenja u zavisnosti od ekoloških i antropoloških činilaca.

Fenolna jedinjenja koja se nalaze u biljnim ekstraktima smatraju se glavnim bioaktivnim jedinjenjima sa antioksidativnim djelovanjem, te tako mogu smanjiti rizik od nekih bolesti modernog doba, u prvom redu dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti, a mogu usporiti i starenje. Sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktu direktno zavisi od više faktora, kao što su metoda ekstrakcije, rastvarač, stepen usitnjenosti biljnog materijala, dužina trajanja procesa, temperatura na kojoj se vrši ekstrakcija. Matematički modeli se sve više koriste i u procesu ekstrakcije ljekovitih biljnih vrsta, jer omogućavaju uopštavanje eksperimentalnih rezultata i mogu biti primjenjeni na nove parametre procesa ili druge materijale. Oni su veoma korisni u planiranju i prenosu procesa sa laboratorijskog na nivo pilot postrojenja ili industrijski nivo.

U ovom radu su uzorkovani plodovi borovnice sa područja planine Durmitor, teritorija opštine Žabljak, i ispitana je kinetika ukupnih fenola i flavonoida kao i efikasnosti ekstrakcije čvrsto-tečno, koja kao rezultat imala izbor optimalnih uslova ekstrakcije i mogućnost primjene odabranog matematičkog modela. Kako bi se utvrdili optimalni uslovi ekstrakcije, korišćena je jednofaktorska eksperimentalna metoda za optimizaciju postupka ekstrakcije.

Ključne riječi: borovnica (*Vaccinium myrtillus* L.), fenoli, flavonoidi, maceracija, antioksidativna aktivnost.

ABSTRACT

Wild blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.), a member of the Ericaceae family, is a low-growing shrub native to northern Europe and North America. In folk medicine and the pharmaceutical industry, the specific properties of the compounds present in the fruit and leaf of the blueberry are used. Blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) is a fruit species whose intensive cultivation began later than many other medicinal plants. In our region, there is no great tradition of cultivation, even though it grows wild on its own at higher altitudes.

Blueberry fruit is a highly valued and delicious fruit. It has a high sugar content, special fruit nutrition, a high percentage of total organic acids, proteins, cellulose, pectin, phenol, anthocyanins, vitamins, etc. It was established that blueberry fruits are very good scavengers of free radicals and that the antiradical activity changes depending on environmental and anthropological factors.

Phenolic compounds found in plant extracts are considered the main bioactive compounds with antioxidant activity, and thus can reduce the risk of some diseases of the modern age, primarily diabetes, cardiovascular diseases, and can also slow down aging. The content of phenolic compounds in the extract directly depends on several factors, e.g. extraction method, the solvent, the degree of fragmentation of the plant material, the duration of the process, the temperature at which the extraction is performed. Mathematical models are increasingly used in the process of extraction of medicinal plant species, because they enable the generalization of experimental results and can also be applied to new process parameters or other materials. They are very useful in planning and transferring processes from laboratory to pilot plant or industrial level.

In this work, blueberry fruits from the area of Mount Durmitor, territory of the municipality of Žabljak were sampled, and the kinetics and efficiency of solid-liquid extraction of total phenols and flavonoids were examined, which as a result had the choice of optimal extraction conditions and the possibility of applying the selected mathematical model. To determine the optimal extraction conditions, a one-factor experimental method was used to optimize the extraction procedure.

Keywords: blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.), phenols, flavonoids, maceration, antioxidant activity.

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	8
2. TEORIJSKI DIO.....	9
2.1. Osnovne karakteristike roda borovnice (<i>Vaccinium</i>).....	9
2.2. Hemijski sastav borovnice (<i>Vaccinium myrtillus</i>).....	12
2.2.1. Jedinjenja polifenola i fenola	12
2.3. Upotreba ploda borovnice (<i>Vaccinium myrtillus</i>).....	22
2.4. Antioksidativna aktivnost ploda borovnice (<i>Vaccinium myrtillus</i>).....	22
2.5. Ekstrakcija antioksidativnih jedinjenja iz ploda borovnice	27
2.5.1. Konvencijalna ekstrakcija čvrsto-tečno (maceracija)	28
2.6. UV/VIS spektrofotometrija.....	29
2. EKSPERIMENTALNI DIO	32
3.1. MATERIJAL I METODE	32
3.1.1. Priprema biljnog materijala	32
3.1.2. Metoda ekstrakcije bioaktivnih materijala	34
3.1.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i flavonoida iz ploda borovnice	35
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	45
4.1. Cilj rada	45
4.2. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u plodu borovnice.....	45
4.2.1. Optimizacija klasične ekstrakcije – maceracije	46
4.3. Modelovanje kinetika ekstrakcije ukupnih fenola i flavonoida iz ploda borovnice.....	57
4.3.1. Model zasnovan na teoriji filma	58
4.3.2. Ponomarjev empirijski model	59
4.3.3. Poređenje modela	61
4.4. Antioksidativna aktivnost ekstrakata poloda borovnice.....	62
5. ZAKLJUČAK	66
6. LITERATURA	68

1. UVOD

Fenolna jedinjenja koja se nalaze u biljkama su hemijski raznovrsna i klasifikovana su kao sekundarni materijali u procesu metabolizma biljaka. Fenoli pokazuju varijacije u sastavu i mogu se naći u okolini kao relativno nekomplikovani molekuli ili kao polifenoli i polimeri izvedeni iz različitih grupa. Biljni fenoli imaju mnoštvo funkcija, uključujući ali ne ograničavajući se na pružanje mehaničke podrške, privlačenje oprašivača i raspršivača sjemena, inhibiranje rasta susjednih biljaka, zaštitu biljke od biljojeda itd.

Divlja borovnica (*Vaccinium myrtillus* L.), nisko rastući žbun autohtoni u severnoj Evropi i Severnoj Americi, klasifikovan je kao član porodice Ericaceae. Farmaceutska industrija i tradicionalna medicina koriste jedinjenja čija se jedinstvena svojstva nalaze u plodovima i lišću borovnice. Trenutno je divlja borovnica (*Vaccinium myrtillus*) prepoznata kao važna komponenta u industriji praktične medicine i zdravlja.

Plod borovnice ima izuzetno povoljan hemijski sastav zbog značajnog sadržaja raznovrsnih biološki aktivnih jedinjenja. Prisustvo vitamina, fenolnih jedinjenja i minerala u borovnicama doprinosi njihovom višestrukom povoljnom uticaju na zdravlje ljudi. Dokazano je da su plodovi borovnice izuzetno efikasni hvatači slobodnih radikala i da njihova antiradikalna aktivnost varira u zavisnosti od ekoloških i ljudskih faktora

Ekstrakti biljaka sadrže fenolna jedinjenja, bioaktivna jedinjenja sa antioksidativnim svojstvima koja mogu da odlože proces starenja i smanje rizik od određenih savremenih bolesti, prije svega dijabetesa i kardiovaskularnih bolesti.

Predmet ovog master rada je ispitivanje optimalnih uslova ekstrakcije, kinetičkog modela i mehanizma ekstrakcije čvrsto-tečno praćenjem ekstrakcije ukupnih fenola i flavonoida iz ploda borovnice.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Osnovne karakteristike roda borovnice (*Vaccinium*)

Borovnica je višegodišnja, žbunasta biljka i skrivenosjemenjača iz porodice Ericaceae, roda *Vaccinium*. To je acidofilna voćka, koja najbolje uspijeva na kiselim zemljištima koja su dovoljno vlažna i bogata humusom (Stančević, 2002). Pored poznate sorte šumskih borovnica postoje i druge sorte. Prilikom razvoja odabranih vrsta predstavljeno je 19 različitih vrsta borovnica iz Sjeverne Amerike i Evrope, pri čemu su sledeće vrste imale najveći značaj (Nikolić i sar., 2010):

- Niskožbunasta borovnica (*V. angustifolium* Aiton);
- Sjeverna visokožbunasta borovnica (*V. corymbosum* L.);
- Borovnica „zečije oko“ (*V. ashei* Reade);
- Kanadska gorka niskožbunasta borovnica (*Vaccinium myrtillus* Michaux);
- Evropska borovnica (*Vaccinium myrtillus*).
- Jugoistočna visokožbunasta borovnica (*V. australe* Small);

Plod borovnice je obično sferičan i malo spljošten, tamnoplave ili ljubičaste boje i ima pomalo kiselkast ukus (slika 1). Plod sadrži mnogo sjemenki (oko 65), gdje su samo rijetke potpuno razvijene. (Nikolić i sar., 2010).



Slika 1. Borovnica (*Vaccinium myrtillus*) (Vinčić, 2017)

Berba borovnice može trajati od šest do osam nedelja, a to u najvećoj mjeri zavisi od sorte (Blagojević i sar., 2011). Ako borovnice čuvamo i koristimo svježe, beru se kada su potpuno zrele, tada su bobice jarko plave boje. Kada se plodovi prerađuju, sakupljaju se kada dostignu tehničku zrelost. Nezreli crvenkasti plodovi imaju kiselkast ukus. Način berbe i prerada plodova nakon berbe utiču na trajnost ploda. Obilje komponenti kao što su ugljeni hidrati, kiseline, vitamini, mineralne soli i polifenoli u plodovima borovnice odražava njihov nutritivni i terapijski značaj (tabela 1) (Nikolić i sar., 2010). Treba istaći da borovnica ima odličan odnos kiselina i šećera, a vitamin C je najzastupljeniji vitamin (Brašanac, 2022).

Tabela 1. Hemijski sastav i energetska vrijednost 100g ploda borovnice (Vinčić 2017)

Sastojci	Jedinice	Vrijednosti
Proteini	g	0,74
Masti	g	0,33
Voda	g	84,21
Ugljeni hidrati	g	14,49
Mono- i disaharidi	g	9,96
Energetska vrijednost	Kcal	57

Plod borovnice sadrži 0,7% pektina i 1,5% celuloze (Vračar, 2001). Takođe, sadrži značajnu količinu magnezijuma, kalijuma, kalcijuma i fosfora. Plod borovnice bogat je polifenolima, posebno flavonoidima, od kojih su najbrojniji antocijani, zatim kafeinska kiselina, p-kumarinska kiselina, klorogenska kiselina, ferulna kiselina i proantocijanidini (Castrejón i sar., 2008).

Plodovi borovnice su, kao i druge bobice, izuzetno hranljivi, što doprinosi njihovoj velikoj upotrebnoj vrijednosti. Borovnice se mogu jesti svježe, ali većinom se prerađuju ili zamrzavaju. Plodovi se mogu koristiti u proizvodnji sokova, jogurta, želea, marmelada, džemova i drugih proizvoda. Pošto borovnice ne sadrže mnogo isparljivih sastojaka, one nisu baš pogodne za proizvodnju alkoholnih pića (Šumić, 2014).

2.1.1. Ljekovita svojstva borovnice

Bobičasto voće postaje sve važnije u zdravoj ishrani, to dokazuju istraživačke laboratorije širom svijeta. Budući da plodovi borovnice imaju visok sadržaj tanina, dobri su antiseptici i omogućavaju efikasnije zatezanje tkiva, što se pokazalo posebno korisnim u slučajevima manjih krvarenja. Pored toga, jak sadržaj antioksidansa u borovnicama štiti tijelo od raznih bolesti i eliminacija slobodnih radikala koji izazivaju različite vrste raka. U suštini minerali, flavonoidi i polifenoli koji se nalaze u borovnicama imaju značajne pozitivne efekte na zdravlje. Često jedenje bobičastog voća i drugog voća i povrća povezano je sa manjim rizikom od hroničnih stanja kao što su bolesti srca i rak (Beccaro i sar., 2006.)

Komponente u borovnicama su takođe korisne za kardiovaskularni sistem. Antocijanini borovnice, prema Szajdek i sar. (2008), poboljšavaju fleksibilnost i propustljivost kapilarnih sudova u očima, poboljšavajući mikrocirkulaciju krvi i noćni vid. Zbog tih kvaliteta antocijanini borovnice se koriste u kreiranju oftalmoloških tretmana.

Zbog visokog sadržaja vitamina C, koji pomaže u apsorpciji gvožđa i jača imuni sistem, takođe podržava proizvodnju kolagena, neurotransmitera i hormona pored svojih antioksidativnih karakteristika. Pored toga, vitamin C funkcioniše kao detoksikator, neutrališući razne supstance koje izazivaju rak i modifikujući gene koji se pojavljuju u sistemu za varenje ili koji dolaze u kontakt sa hranom. (Nile i sar., 2013).

Prehrambeni sektor koristi voće borovnice kao vrijedan sirovi resurs za pravljenje sirupa, sokova i kompozicije, džemovi i dr. Sok evropske borovnice (*V. myrtillus*) ima visok sadržaj antocijana, što ga čini pogodnim za upotrebu kao bojilo u alkoholnim i bezalkoholnim pićima (Mratinić, 2015).

Dobar gubitak neuronskih i kognitivnih sposobnosti je ublažen ekstraktima borovnice, koji često kodiraju stanja poput Alchajmerove bolesti (Skupień, 2006). Štaviše, plod borovnice ima regenerativni efekat na tijelo zbog svog hemijskog sastava. Sa njim se prave i preparati za farmaceutske proizvode

2.2. Hemijski sastav borovnice (*Vaccinium myrtillus*)

Zbog svog odličnog nutritivnog sadržaja, borovnica i njeni plodovi su se od davnina koristili u prehrani. Hemijski sastav i nizak sadržaj kalorija čine borovnice savršenim obrokom za one koji brinu o svom zdravlju i ishrani (Brašanac, 2022).

Kako listovi tako i plodovi borovnice imaju mnoge hemijske supstance za koje se pokazalo da imaju ljekovita svojstva. U plodu borovnice mogu se naći tanini, kao i pektin, antocijani, zatim organske kiseline, dok se tanini, flavonoidi i tragovi arbutina nalaze se u listovima. *In vitro* eksperimenti dokazuju da neki polifenoli kao i antocijanini u borovnicama su veoma važni u liječenju srčanih problema, da utiču u regulisanju krvnog pritiska i krvne slike, kao i da sprečavaju stvaranje ugrušaka u krvi (koji mogu izazivati srčani ili u nekim slučajevima moždani udar, plućne tromboembolije i venske tromboze) i da smanjuju nivo masti u krvi (Brašanac, 2022). Dalje, celulozna vlakna borovnice stimulišu organe za varenje, dok se vitamin A i antioksidansi preporučuju u liječenju očne mrežnjače i spriječavanju početka bolesti Alchajmera. Takođe, borovnica ima sekundarne metabolite koji djeluju kao antiseptici sluzokože urinarnog trakta, sprečavajući infekciju urina. Pokazalo se da borovnice smanjuju nivo šećera u krvi kada se redovno konzumiraju (Brašanac, 2022).

2.2.1. Jedinjenja polifenola i fenola

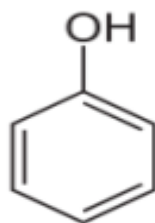
Jedinjenja fenola su raznolika i veoma rasprostranjena heterogena grupa sekundarnih metabolita biljaka. Oko 8000 jedinjenja fenola i polifenola pronađeno je u biljkama, od osnovnih molekula kao što su fenolne kiseline do složenih kondenzovanih jedinjenja kao što su tanini (Pandey i sar., 2009). Nalaze se u prirodi kao navezani ili kao glukozidi. Za biološku aktivnost odgovorne su monosaharidne jedinice i aglikonske komponente, od kojih se glikozidi sastoje. Polifenolne supstance koje se nalaze u namirnicama imaju uticaj na ukus gorčine, boje, mirise i na oksidativnu stabilnost. O ovim supstancama su sprovedena brojna istraživanja, najviše zbog njihovih antioksidativnih sposobnosti i

funkcije u sprečavanju različitih oboljenja prouzrokovanih oksidativnim stresom, (kardiovaskularne i neurološke bolesti, kao i rak) (Chu i sar., 2011).

Identifikovanje i analiza jedinjenja fenola daje važne podatke o antioksidativnim svojstvima koja posjeduju, uticaju na zdravlje kao i svojstva namirnica (Lima i sar., 2014).

Fenolna jedinjenja poboljšavaju kvalitet kako voća, tako i povrća (Lima i sar., 2014). Borovnice su bogate fenolnim komponentama kao što su fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni, tanini i katehini (Bobinaité i sar., 2012). Štaviše, mnoga jedinjenja fenola odgovorna su za organoleptičke karakteristike voća i proizvoda dobijenih od njih, (na primjer, njihova boja zavisi od koncentracije antocijana a ukus od koncentracije tanina) (Cheynier, 2005).

Fenolna jedinjenja ili polifenoli se sastoje od jedne ili više hidroksilnih grupa i aromatičnog prstena (slika 2).



Slika 2. Strukturna formula fenola

Literaturni podaci pokazuju veći broj klasifikacija fenola, pri čemu je jedna od podjela na proste fenole i polifenole. Prosti fenoli se dijele na kumarine i fenolne kiseline, dok se polifenoli dijele na flavonoide i tanine.

Druga klasifikacija fenolnih jedinjenja je prema broju atoma ugljenika vezanih za osnovni fenolni skelet (tabela 2) (Antolovich i sar., 2000).

Tabela 2. Klasifikacija fenolnih jedinjenja (Antolovich i sar, 2000)

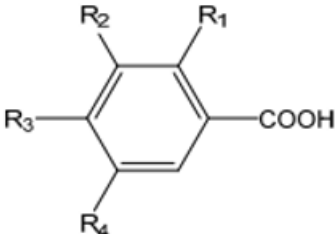
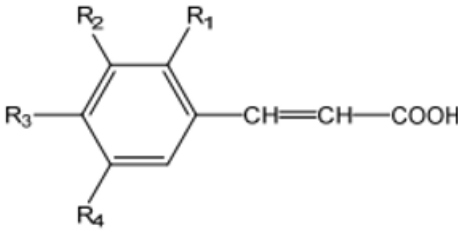
Osnovni skelet	Klasa	Primer
C ₆	Jednostavni fenoli benzohinoni	Katehol, hidrohion, rezorcinol
C6-C1	Fenolne kiseline	p-Hidroksibenzoeva kiselina, salicilna kiselina
C6-C2	Fenilsirćetna kiselina	p-Hidroksifenilsirćetna kiselina
C6-C3	Fenilpropeni	Eugenol, mirsticin
	Kumarini	Umbeliferon, eskuletin, skopolin
	Hormoni	Eugenin
C6-C4	Naftohinoni	Juglon
C6-C1-C6	Ksantoni	Mangostin, mangiferin
C6-C2-C6	Stilbeni	Razveratrol
	Antrahinoni	Emodin, hrizofanol, rein
C6-C3-C6	Flavonoidi Flavoni	Sinensetin, nobiletin, izosinensitin, tangeretin, diosmin
	Flavonoli	Kvercetin, kempferol
	Flavonol glikozidi	Rutin
	Flavanoli	
	Flavanon glikozidi	Neohesperidin, narirutin, naringin, eriocitrin
	Antocijanini	Glikozidi, peonidina, delifinidina, petunidina, cijanidina
	Flavanoli (katehini)	(+)-Katehin, (-)-epikatehin, (+)- galokatehin, (-)-epigalokatehin
Halkoni	Floridžin, arbutin, halkonaringenin	
(C6-C3) ₂	Lignini	Pinorezinol
(C6-C3-C6) ₂	Biflavonoidi	Agatisflavon

2.2.1.1. Fenolne kiseline

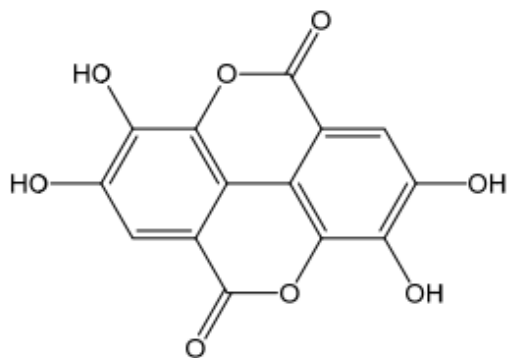
Fenolne kiseline su hidroksi i/ili funkcionalni derivati cimetine i benzojeve kiseline. Imaju fenolno jezgro i bočni lanac sa jednim atomom ugljenika (derivati benzojeve kiseline) ili tri atoma ugljenika (derivati cimetine kiseline). Stepem hidroksilacije i metilacije aromatičnog prstena se razlikuje među derivatima. Raznolikost grupe potiče od broja i položaja

hidroksilnih grupa koje se nalaze na njemu (tabela 3). Fenolne kiseline biljke koriste za različite potrebe, od kojih su najvažnije apsorpcija hrane, aktivnost enzima, sinteza proteina i fotosinteza (Orčić, 2010; Šućur 2015).

Tabela 3. Podjela fenolnih kiselina (Šućur 2015)

Derivati hidroksibenzojeve kiseline	Derivati hidroksicimetne kiseline
 <p>R1=R2=R4=H; R3=OH p-hidroksibenzojeva kiselina; R1= H; R2=R3=R4=OH galna kiselina; R1=R4=H; R2=OCH₃; R3=OH vanilinska kiselina; R1=H; R2=R4=OCH₃; R3=OH siringinska kiselina; R1=H; R2=R4=OCH₃; R3=OH protokatehinska kiselina</p>	 <p>R1=R2=R4=H; R3=OH p-kumarinska; R1=R4=H; R2=R3=OH kafena kiselina; R1=R4=H; R2=OCH₃; R3=OH ferulna kiselina; R1=H; R2=R4=OCH₃; R3=OH sinapinska kiselina</p>

Pored pomenutih, elaginska kiselina je takođe važna fenolna kiselina, prikazana na slici ispod (slika 3). Laktonizacijom heksahidroksidifenske kiseline nastaje derivat galne kiseline odnosno elaginska kiselina.



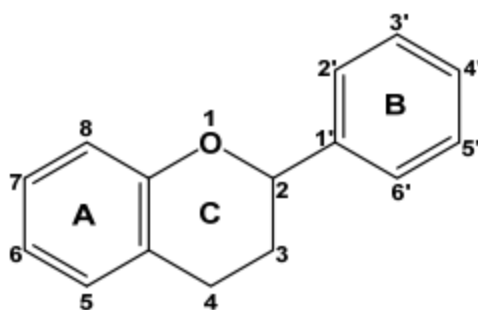
Slika 3. Strukturna formula elaginske kiseline

Kao slobodne rijetko se detektuju fenolne kiseline (ne prelaze nikada 5% od njihove ukupne koncentracije u voću), češće se nalaze kao glukozidi i estri (Manganaris i sar., 2014). Skoro sve biljke sadrže kafeinsku, ferulnu, p-kumaričnu, protokatehinsku i vanilinsku kiselinu (Liu, 2013; Liu, 2004). Bobice voća, naročito maline (roda *Rubus*) i jagode (roda *Fragaria*), imaju visok sadržaj elaginske kiseline (Aiyer i sar., 2008).

2.2.1.2. Flavonoidi

Flavonoidi predstavljaju polifenolne fitokemikalije u koje spada širok spektar biljnih sekundarnih metabolita (Häkkinen i sar., 2000). Preko 4000 različitih vrsta flavanoida ekstrahovano je iz biljnih vrsta što ukazuje da su oni prilično zastupljena jedinjenja u prirodi (Yao i sar., 2004).

Nalaze se u vodi kao rastvorljivi glukozidi ili kao rastvoreni estri sa jedinjenjima tanina, a nevezani su izuzetno rijetki. Njihova struktura (C₆-C₃-C₆) sastoji se od prstenova benzena (A i B) koji su povezani ugljeničnim lancem preko C₃ jedinice, formirajući tako piranski prsten sa atomom kiseonika. Ovi molekuli su klasifikovani u sledeće klase na osnovu različitosti u strukturi heterocikličnog C prstena: flavoni, flavonoli, flavanoni, izoflavonoidi, antocijanidini (Liu, 2004).



Slika 4. Strukturni skelet flavonoida

Mnoštvo izmjena osnovne strukture flavonoida objašnjava njihovu raznolikost i široku rasprostranjenost. Ove modifikacije uključuju, ali se ne ograničavaju se na sledeće: dimerizaciju, O-metilaciju hidroksilnih grupa (koja rezultira stvaranje O-glukozida), vezivanje neorganskog sulfata za flavonoidne grupe i glikolizaciju hidroksilnih grupa

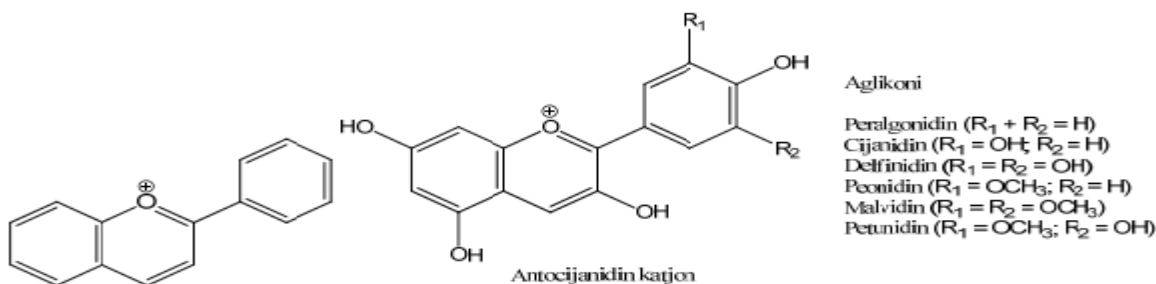
(koja vodi do nastajanja C-glukozida i stvaranja flavonoidnog jezgra) (Tumbas, 2010). Flavonoidi biočastog voća se pretežno sastoje od sledećih grupa: katehini, proantocijani, antocijanini (Oszmiaski i sar., 2005).

2.2.1.3. Antocijani

Antocijani su klasa flavonoidnih jedinjenja koja imaju karakterističnu strukturu C₆-C₃-C₆ i oko 500 jedinjenja koja su veoma poznata. Njima su zastupljeni značajni polifenolni sastojci voća, prije svega bobičastog voća (Mitić i sar. 2011). Prvi slučaj njihovog izolovanja bio je 1835. Stalno prisutni kao glukozidi, ova jedinjenja se podvrgavaju hidrolizi da bi se dobili antocijanidin (aglikon) i neki šećer. Nijanse voća - plava, ljubičasta, ružičasta i crvena – potiču zbog prisustva antocijana. Njihova struktura je ilustrovana slikom 5. Varijacije se mogu uočiti u broju i pozicioniranju šećernih grupa (uključujući alifatične i aromatične kiseline), broju i prirodi hidroksilnih i metoksilnih grupa i alifatskim ili aromatičnim kiselinama koje su vezane za molekul šećera (Tepić, 2012). Antocijani, od kojih njih šest su prisutni u prirodi variraju u pogledu stepena metilacije, broja i položaja hidroksilnih grupa (Manganaris i sar., 2014).

Intenzitet njihove plave nijanse je pretežno određen brojem hidroksilnih grupa prisutnih u B prstenu. Dakle, intenzivnija boja ukazuje na veći broj prisutnih grupa i obrnuto. (Tanaka i sar., 2008).

Pored toga, prisustvo dvostrukih veza, povećanje molekularne supstitucije, promjena pH, formiranje metalnih kompleksa i kopigmentacija mogu uticati na boju antocijana.



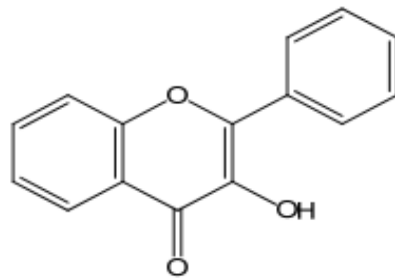
Slika 5. Strukturna formula antocijana

Antocijanini, koji su rastvorljivi u vodi i netoksični prirodni pigmenti, mogu uskoro da zamijene sintetičke boje i antioksidante zbog sumnje da promovišu karcinogenezu, odnosno da ispoljavaju toksikološke efekte. Ipak, njihova inherentna nestabilnost i neefikasnost ekstrakcije iz biljnih vrsta predstavljaju značajne prepreke njihovoj širokoj primjeni u prehrambenom, kozmetičkom i farmaceutskom sektoru (Castaneda-Ovando i sar., 2009). Na razgradnju antocijanina utiču različiti faktori uključujući temperaturu skladištenja, pH, hemijsku strukturu, kiseonik, svjetlost, rastvarač, pojava enzima, proteina, jona metala i flavonoida (Su i sar., 2012).

Tokom sazrijevanja plodova crvenog voća povećava se količina antocijana (Mitić i sar., 2012). Bobice su izuzetno bogate antocijanima, naročito plodovi borovnice i kupine. Preporučeni unos od strane Evropske agencije za bezbjednost hrane iznosi 36 mg po danu (Manach i sar., 2005; Čujić i sar., 2013).

2.2.1.4. Flavonoli

Flavonoli su najčešća vrsta flavonoida u biljkama. Najznačajniji su mircetin, kvercetin, i kempferol, a kao O-glukozidi mogu se naći u biljnim vrstama (Graefe i sar., 2001).



Slika 6. Struktura formula flavonola

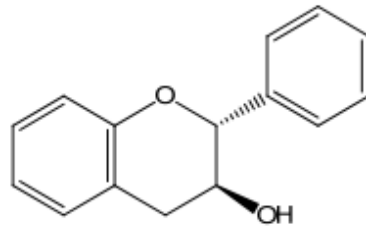
Velike razlike u koncentraciji ovih jedinjenja u voćnim vrstama povezuju se sa mnogim faktorima kao što su uslovi rasta, sorta i drugo. Borovnice, crne ribizle i crvene ribizle sadrže više od 30% flavonola (Häkkinen i sar., 2000). Määtä-Riihinen i sar. (2004) su proučavali bobice maline i jagode i otkrili da je kvercetin-3-glukuronid najčešći

glukozid flavonol identifikovan u svim bobičastim vrstama. Koncentracija mircetina u bobicama borovnice raste tokom zrenja. Flavonoli se nalaze u mezokarpu kod većine bobica, dok se u egzokarpu (kožici) nalaze kod ploda borovnice i u tragovima u ostalom dijelu ploda. Od šećerne komponente zavisi biorasploživost kvarcetina vezana sa fenolnom strukturom, i zato konjugacija sa glukozom povećava njegovu biorasploživost (Graefe i sar., 2001).

2.2.1.5. *Flavanoli*

Flavanoli (flavan-3-oli) su flavonoidi koji imaju hidroksilnu grupu i predstavljaju grupu koja je poznata kao proantocijanidini (Fraga i sar., 2010).

Na C₂ i C₃ nalaze se dva hiralna centra, pri čemu katehin ima trans konformaciju, a epikatehin cis konformaciju. Dva stereoizomera nalaze u ovim konformacijama. Neki imaju trans konfiguraciju kao što je katehin, dok epikatehin ima cis konfiguraciju.



Slika 7. Strukturna formula flavanola

Oni se nalaze kao glukozidi, uglavnom spojeni sa glukozom, kod tanina čine gradivne jedinice. Flavanolidna jedinjenja su žute boje, nalaze se u izobilju u voću kao što su: kruške, jabuke, ribizle, jagode, kupine i dr. U biljkama mogu se naći kao jednostavni monomeri, (-)-epikatehin i (+)-katehin, polimerni proantocijanidini koji predstavljaju kondenzovane tanine, kao i oligomeri (Tsao, 2010). Jedinjenja flavan-3-oli mogu se hidroksilovati (galokatehini) ili se mogu esterifikovati (pomoću galne kiseline).

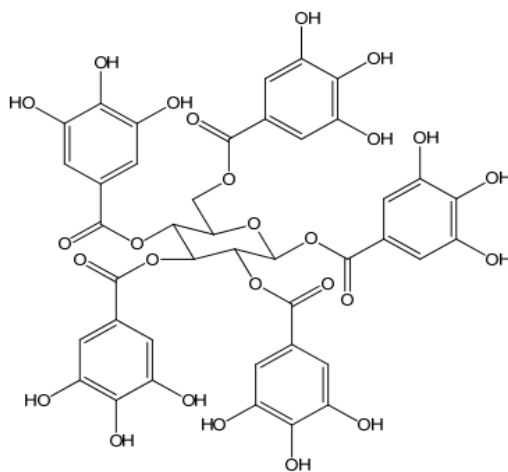
U pogledu metabolizma ovih jedinjenja kod životinja i ljudi, na njihovu stabilnost kao i stabilnost procijanidina otkriveno je da gastrična sredina ima malo uticaja, a oni kao

takvi, sa minimalnim promjenama napuštaju tanko crijevo, gdje se dalje apsorbuju (Fraga i sar., 2010).

2.2.1.6. Tanini

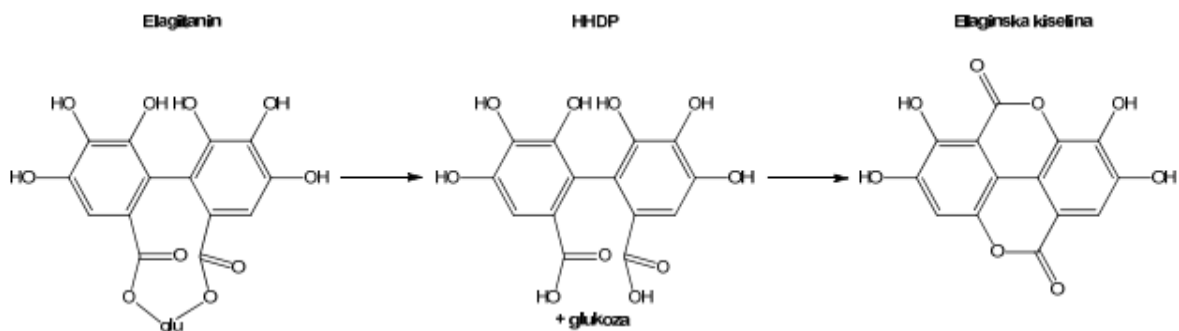
Tanini su polifenolne supstance bez azota složene strukture. Postoje dva osnovna tipa tanina na osnovu njihove hemijske prirode i gradivnih jedinica: oni koji se mogu hidrolizovati (estri elaginske i galne kiseline) i koji su mogu kondenzovati i njihovi predstavnici proantocijanidini (Dai i sar, 2010).

Poliesteri koji sadrže galnu kiselinu ili njene derivate sa centralnim molekulom šećera (najčešće D-glukoza) predstavljaju hidrolizujuće tanine. Pentagaloilglukoza i njeni oligomeri (galotanini) su najpoznatiji hidrolizujući tanini (slika 8).



Slika 8. Pentagaloilglukoza

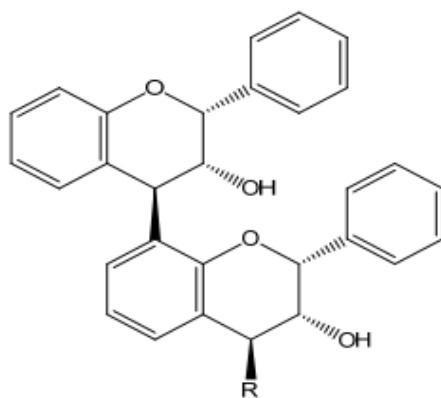
Poliol i estri heksahidroksidifenil kiseline (elagitanini) su isto hidrolizujući tanini. Kada su izložene bazama ili jakim kiselinama, estarske veze se hidrolizuju, a heksahidroksidifenska kiselina se postepeno transformiše u dimer galne kiseline, elaginsku kiselinu (dilakton, koji je u vodi nerastvoran) (slika 9).



Slika 9. Elagitaninska hidroliza

Kondenzovani tanini (proantocijanidini ili leukocijanidini) su polikondenzovana jedinjenja velike molekulske mase nastala kondenzacijom katehina i epikatehina.

Uglavnom kondenzovani tanini se povezuju sa oligomernim proantocijanidinima (dimeri, trimeri i tetrameri), ali se mogu detektovati tanini čiji je stepen polikondenzacije većim od 50 (Bravo, 1998). Osnovna struktura dimernog proantocijanidina je prikazana na slici 10.



Slika 10. Struktura formula dimernog proantocijanidina

Mogu se naći u visokim koncentracijama kako u kori tako i u plodovima raznih biljaka, često u desetinama procenata. Tanina ima u izobilju u plodovima koji nisu potpuno zreli, dok njihova koncentracija sazrijevanjem opada. Opori ukus nezrelog voća potiče upravo od pomenutih tanina (Milić i sar, 2000).

Prema visokom sadržaju proantocijanidina među bobičastim voćem izdvaja se aronija čiji je stepen kondenzacije visok, ova jedinjenja su u manjim koncentracijama prisutne u kupini i borovnici. Hidrolizujućih tanina ima u prilično velikim količinama i u jagodama, malinama i kupinama (Shahidi i sar, 2004; Nile i sar., 2014).

2.3. Upotreba ploda borovnice (*Vaccinium myrtillus*)

Borovnice su dobro poznato sezonsko voće. Često se koristi kao svježa, zbog kiselo-slatkog ukusa ali primarna primjena je u prehrambenom sektoru, gdje se koristi za pravljenje različitih proizvoda kao što su sokovi, džemovi, kompoti, sirupi, itd. Takođe se koristi u kozmetičkim i medicinskim formulacijama zbog svojih antioksidativnih svojstava.

2.4. Antioksidativna aktivnost ploda borovnice (*Vaccinium myrtillus*)

Halliwell i Gutteridge dali su najbolju i najaktuelniju definiciju antioksidansa gdje su antioksidansi supstance koje pokazuju značajno odlaganje ili inhibiciju oksidacije supstrata kada su prisutni u relativno niskim koncentracijama u odnosu na supstrat koji je podvrgnut oksidaciji (Tumbas, 2010).

Uopšteno govoreći, antioksidansi su važni jer štite namirnice od oksidativnih transformacija, dok istovremeno podržavaju i dopunjuju postojeći *in vivo* mehanizam zaštite antioksidansa koji je evoluirao u svim aerobnim organizmima. Utvrđeno je da antioksidansi pomažu u prevenciji raznih dugoročnih poremećaja, uključujući bolesti srca, rak i makularnu degeneraciju (očni poremećaj) (Wang i sar., 2012).

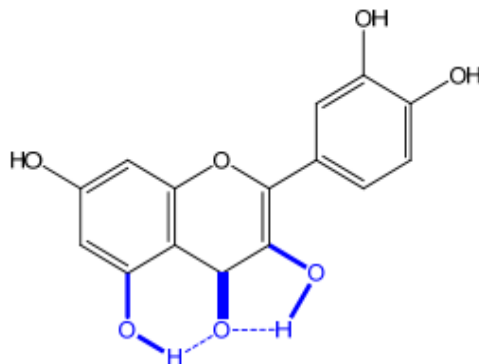
Borovnica (*Vaccinium myrtillus*) se godinama koristi kao lijek i hrana. Plod borovnice uključuje antocijanozide, koji su biljni pigmenti sa snažnim antioksidativnim dejstvom. Slobodne radikale, štetne čestice u tijelu, eliminišu antocijanozidi i pomažu u

prevenciji ili smanjenju oštećenja ćelija. Štaviše, pomažu u formiranju jakih krvnih sudova i poboljšanju cirkulacije u cijelom tijelu (Radojković i sar, 2012). Plod borovnice sadrži antocijanozide kao što su delphinidin, malvidin, petunidin i peonidin. Najzastupljeniji flavonoid je kvercetin (Manganaris i sar, 2014).

Polifenolna jedinjenja i vitamin C su glavni nosioci antioksidativne aktivnosti borovnice (Manganaris i sar., 2014). Antioksidativno dejstvo je posledica redoks kapaciteta ovih jedinjenja, a to im pruža mogućnost da budu donori vodonikovih atoma i eliminišu slobodne radikale (Stajčić, 2012).

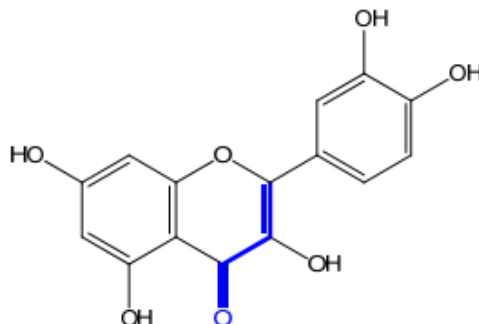
Flavonoidi su daleko najrasprostranjenija klasa fenolnih jedinjenja, čineći oko dvije trećine svih fenolnih jedinjenja. Sposobnost ovih jedinjenja da ometaju lančane reakcije slobodnih radikala (npr. suzbijanje ili sprečavanje lipidnih oksidacija) uslovljena je strukturnim svojstvima koja posjeduju (Stajčić, 2012). Prema tome, na njihovu antioksidativnu aktivnost utiču:

- U prstenu B prisustvo hidroksilnih grupa (posebno o-dihidroksil grupa), sa najboljim karakteristikama donora elektrona, doprinose povećanju stabilnosti radikala i učestvuju u delokalizaciji elektrona.



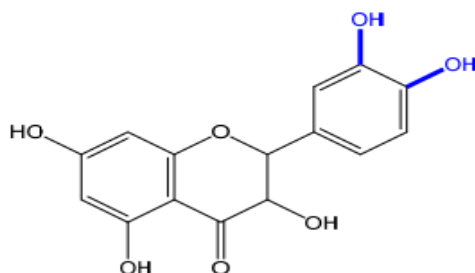
Slika 11. Prikaz o-dihidroksilne grupe

- Konjugacija 2,3-dvostruke veze kod piranskog prstena sa keto grupom vezanom na četvrtom ugljenikovom atomu (C₄)



Slika 12. Prikaz 2,3-dvostruke veze u piranskom prstenu

- Sposobnost hidroksilnih grupa na C₃ i C₅ da formiraju vodonične veze sa keto grupom i djeluju kao „hvatači“ slobodnih radikala

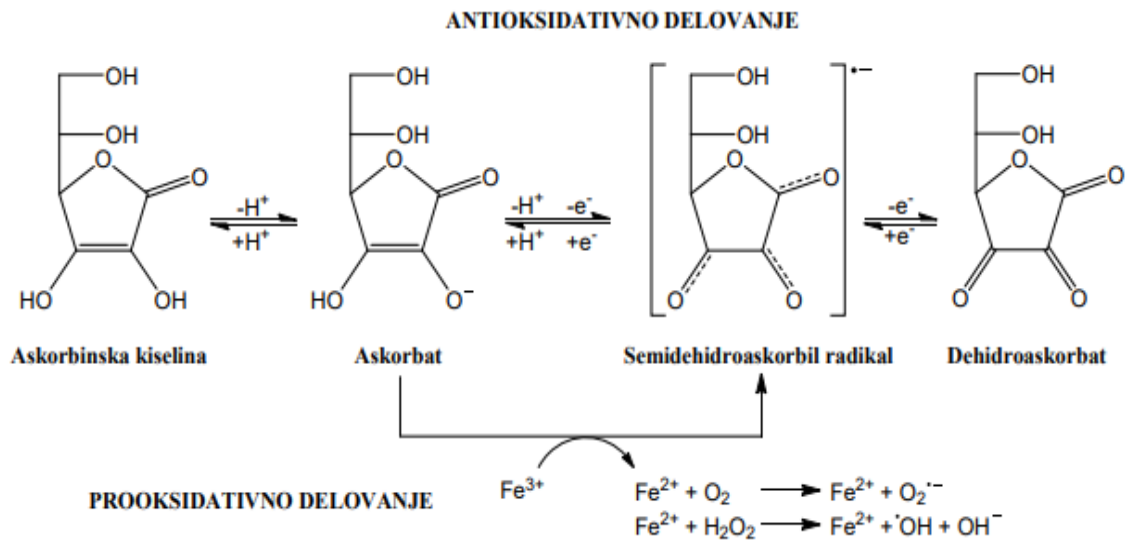


Slika 13. Prikaz hidroksilne grupe na C₃ i C₅ ugljenikovim atomima

Karakteristični antioksidativni mehanizmi flavonoida uključuju: helaciju metala (bakar, gvožđe, itd.), "hvatanje" slobodnih radikala kao i otpuštanje vodonika.

Antioksidativna aktivnost borovnica je značajno pojačana vitaminom C (askorbinska kiselina) (Rietjens i sar, 2002). To je najmoćniji antioksidans rastvorljiv u vodi koji djeluje kao hvatač sulfenil, neutrofilne oksidante inaktivira kao i forme kiseonika koje su singletne, kod hipohlorne kiseline deaktivira njeno dejstvo, potom nitrozoamine redukuje u produkte koji su neaktivni u zavisnosti od reakcionih uslova, a najveći značaj se ogleda u tome što djeluje sinergistički (Buettner, 1993).

Antioksidativna aktivnost vitamina C zasniva se na činjenici da djeluje kao akceptor odnosno donor vodonikovog atoma i elektrona, što ga čini efikasnim „hvatačem“ različitih slobodnih i neradikalnih vrsta (Poiana i sar., 2010). Kako su joni metala povezani kompleksno sa proteinima *in vivo*, vitamin C pokazuje antioksidativno dejstvo u normalnim fiziološkim okolnostima (Stajić, 2012). Međutim, u ekstremno visokim dozama pomenutog vitamina, ali i u uslovima visoke koncentracije metala, tačnije pri oslobađanju metala iz kompleksa i razgradnji tkiva, dolazi do prooksidativnog djelovanja (Tumbas, 2010). Na prikazanoj slicu, dolazi do redukcije Fe^{3+} u Fe^{2+} uz prisustvo vitamina C stvaranjem hidroksilnih radikala, to predstavlja Fentonova reakcija i može uzrokovati oštećenje tkiva.



Slika 16. Antioksidativno i prooksidativno djelovanje vitamina C (Stajić, 2012)

2.5. Ekstrakcija antioksidativnih jedinjenja iz ploda borovnice

Ekstrakcija predstavlja odvajanje i koncentrisanje određenih supstanci iz biljnih tkiva kao i životinjskih korišćenjem utvrđenih tehnika i odabranih rastvarača. Ekstrakti se mogu klasifikovati na osnovu njihove koegzistencije na čvrste, polučvrste i tečne ekstrakte.

Biljni ekstrakti dobijaju se izlaganjem biljnih komponenti, uglavnom suvih, rastvaraču za ekstrakciju u odgovarajućem aparatu koji se zove ekstraktor. Sledeća faza procesa uključuje formiranje intermedijarnog proizvoda (eluat, miscela) koji nastaje odvajanjem od preostale biljne droge. Ukoliko se koriste tečni ekstragensi u procesu ekstrakcije (etanol ili kombinacija etanola i vode itd.), tečni ekstrakt se dobija nakon filtracije. Ako se proces isparavanja u vakuumskom uparivaču nastavi od faze miscela, može se dobiti suv ekstrakt kao produkt procesa ekstrakcije. Tokom ovog koraka, dobija se polučvrsti ekstrakt iz kojeg se dodatnim sušenjem dobija odgovarajući suvi ekstrakt (Savić, 2014). Za proces ekstrakcije koriste se obično kontinuirane i diskontinuirane metode. U kontinuirane ubrajaju se: ultrazvučna ekstrakcija, perkolacija, reperkolacija i druge, dok diskontinuirane predstavljaju turboekstrakcija, dvostruka maceracija, maceracija, ekstrakcija u aparatu kao što je Ultra-Turrax i digestija.

Turboekstrakcija metoda je koja je korisna za tretiranje biljnog materijala natopljenog u rastvaraču pomoću odgovarajućih seckalica koje se rotiraju velikom brzinom (oko 1000 obrtaja u minuti) i tako dodatno usitnjavaju drogu dok se okreću. Ekstrakcija se odigrava u zatvorenoj posudi kako bi se spriječio gubitak rastvarača, ali temperatura ekstrakcije ne smije da pređe 40 °C.

Maceracija predstavlja jednokratnu ekstrakciju koja se odvija na sobnoj temperaturi iz pravilno usitnjene droge sa odgovarajućim rastvaračem. Upotreba hladnog rastvarača minimizira razlaganje termolabilnih bioaktivnih supstanci, što je prednost ovog pristupa.

Dvostruka maceracija predstavlja ekstrakciju usitnjene droge odgovarajućim rastvaračem, dva puta uzastopno pri sobnoj temperaturi, a koristi se za ekstrakciju krupnog biljnog materijala.

Digestija je vrsta maceracije koja koristi toplotu tokom procesa ekstrakcije. Predstavlja jednokratnu ekstrakciju usitnjenog biljnog materijala određenim rastvaračem na 50 °C.

Perkolacija (perkolare-koristeći kapi) kontinuirana je ekstrakcija pripremljenog biljnog materijala koja se postiže propuštanjem određenog rastvarača kroz kolonu u perkolatoru, na sobnoj temperaturi.

Ultrazvučna ekstrakcija koristi ultrazvuk pri čemu su frekvencije u opsegu od 20 do 2000 kHz da bi se poboljšala propustljivost ćelijskih zidova proizvoda kavitacije. Ova ekstrakcija se vrši pomoću ultrazvučnih kupatila ili ultrazvučnih sondi. Sinonim je za ekonomičnu, brzu i efikasnu ekstrakciju.

Reperkolacija je proces ponovne perkolacije biljnog materijala sa dobijenim perkolatom (Savić, 2014).

2.5.1. Konvencijalna ekstrakcija čvrsto-tečno (maceracija)

Ekstrakcija čvrsto-tečno je postupak difuzije u kojoj komponente prelaze iz čvrstog materijala u tečni rastvarač zbog razlika u rastvorljivosti. Ekstrakcija se dešava kada čvrsta porozna supstanca i tečni rastvarač dođu u kontakt, in a taj način rastvarač infiltrira pore čvrstog materijala. Ova operacija podrazumijeva tri različita procesa:

- 1) dolazi do promjene faznog sastava jer se rastvorna komponenta u rastvaraču rastvara;
- 2) kroz rastvarač, smješten u porama, difunduje rastvorak;
- 3) iz rastvora prenosi se rastvorak, on je sa čvrstim materijalom u kontaktu (Savić, 2014).

U složenom sistemu čvrsto-tečno, na prenos mase utiču mnogi faktori: oblik čestica, veličina čestica, od hemijskog sastava komponenti koje su prisutne u čvrstom materijalu, kao i veličine pora u materijalu, a i njihove unutrašnje strukture.

Tip rastvarača koji se koristi je jako bitan u procesu ekstrakcije. Supstance ekstrahirane iz biljnih sirovina mogu se klasifikovati u tri tipa na osnovu njihove hidrofilnosti:

- hidrofobne supstance – koje se rastvaraju u rastvaračima koji su nepolarni
 - supstance koje se rastvaraju u slabo polarnim rastvaračima
 - hidrofilne supstance – koje se rastvaraju u rastvaračima koji su polarni
- (Stojanović, 2015).

Rastvarač kojim će se vršiti ekstrakcija je određen stepenom hidrofilnosti jedinjenja. Polarna jedinjenja koja imaju visoku dielektričnu konstantu dobro se rastvaraju u polarnim rastvaračima i obrnuto. Kombinacija etanola i vode ekstrahuje polarne komponente iz polazne sirovine: šećere, glikozide, fenole, flavonoide, tanine, određene vitamin, soli i dr. Smanjena viskoznost rastvarača povećava koeficijent difuzije i ubrzava ekstrakciju, a istovremeno smanjuje površinski napon. Uslovi ekstrakcije su jako bitni, stoga povećanje temperature ekstrakcije i smanjenje viskoziteta rastvarača povećava sadržaj ekstrakta. Dužina ekstrakcije je takođe značajan faktor, jer njeno povećanje povećava prinos, ali pretjerano dugo trajanje procesa ekstrakcije može dovesti do degradacije potrebnih komponenti (Savić, 2014). Za ekstrakciju koriste se dva tipa uređaja: kontinuirani i diskontinuirani (šaržni). U kontinuirane ubrajaju se: Hildebrantova, horizontalna, Bonoto, Kenedijeva, Bolmanova i Sohletova ekstrakcija, dok diskontinuirane predstavljaju rotirajući ekstraktori i čvrsto-tečno ekstraktori (Savić, 2014).

2.6. UV/VIS spektrofotometrija

Spektrofotometrija UV/VIS je klasifikovana kao metoda apsorpcije i zasniva se na ispitivanju odnosa između apsorpcije svetlosti supstance i talasne dužine zračenja koja je prošla kroz nju. Praćenje apsorpcije je izvodljivo u nizu elektromagnetnih frekvencija, uključujući radio frekvencije (RF), infracrvene (IC), mikrotalasne (MT), i ultraljubičaste (UV) i vidljive (VIS), a opseg od 200 do 1000 nanometara je od značaja u analitičkoj praksi (Mitić, 2018).

Poređenjem sa drugim metodama strukturne karakterizacije (MS, IC, NMR), UV/VIS spektrofotometrija je mnogo manje primjenjiva pri određivanju strukture jer mnoga organska jedinjenja ne apsorbuju u ovom dijelu spektra. Umjesto toga, prvenstveno koristi se kao metoda komplementarna za potvrđivanje dijelova molekula apsorbiranih u određenom području, poznatim kao hromofori. U ovom pristupu, UV/VIS spektri nude nevjerojatno korisne detalje u vezi sa sastavom supstance koja se proučava. Na primjer, to je ključna dopunska tehnika, i često primarna, za identifikaciju konjugovanih jedinjenja koja se pojavljuju u prirodi, kao što su poliacetileni, flavonoidi, porfirini, biljni pigmenti (karotenoidi), i tako dalje. UV/VIS spektrofotometrija nije samo korisna za identifikaciju organskih supstanci, već se i danas široko primjenjuje u kvantitativnoj analizi. Njegove prednosti u odnosu na alternativne tehnike su izuzetna osjetljivost i lako rukovanje aparatom (Mitić, 2018).

UV/VIS spektrofotometrija je kvantitativna i kvalitativna metoda. Kvalitativna analiza se zasniva na ideji da na apsorpcioni spektar supstance utiče njen sastav i struktura. Osnova kvantitativne spektrofotometrijske analize je Lambert-Beer-ov zakon: apsorbanca rastvora direktno je proporcionalna koncentraciji apsorbirajuće vrste i debljini sloja kroz koje zračenje prolazi (Mitić, 2018).

$$A = \epsilon l c$$

pri čemu je:

ϵ - molarna apsorptivnost

l - debljina sloja [cm]

c –koncentracija apsorbirajuće supstance [mol/L].

Količina apsorbirane svjetlosti, označena kao apsorpcija ili transparentnost, određuje se propuštanjem svjetlosti kroz kivetu koja sadrži uzorak koji se analizira. Ova količina svjetlosti predstavlja disparitet između intenziteta upadne svjetlosti (I_0) i propuštene svjetlosti (I_p). Transparentnost (T) se definiše kao proporcija između intenziteta upadne i propuštene svjetlosti, tada važi da je:

$$T = I_p / I_0$$

Apsorbanca se izračunava putem formule:

$$A = -\log T = -\log (I_p / I_0) = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

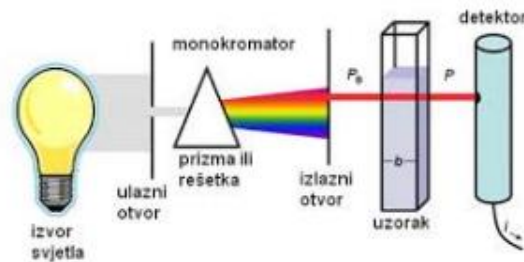
pri čemu je:

A - apsorbanca

l - debljina sloja [cm]

c - koncentracija apsorbujuće supstance [mol/l]

ε - molarna apsorptivnost.



Slika 17. Kiveta sa rastvorom kroz koju prolazi svjetlost (Stanković, 2019)

Konačni izraz ilustruje Lambert-Beer zakon, koji kaže da su koncentracija apsorbujućih vrsta i debljina sloja kroz koji zračenje prolazi direktno proporcionalni apsorbanciji rastvora. Dakle osnova kvantitativne spektrofotometrijske analize je Lambert-Beer zakon.

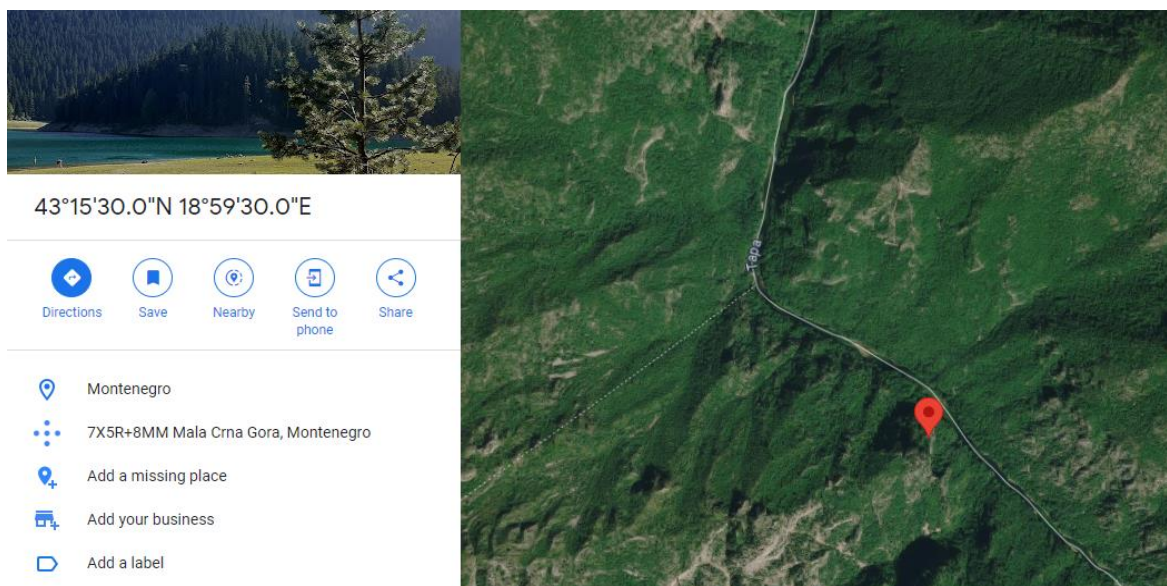
Vrijednost molarne apsorpcije (ε) ostaje konstantna pod identičnim uslovima snimanja, uključujući talasnu dužinu, rastvarač i temperaturu. Vrijednost molarne apsorpcije je dodatno zavisna od svojstava korišćenog aparata. Stoga se određena tabelarna vrijednost rijetko koristi u kvantitativnoj analizi; umjesto toga, kalibraciona kriva se dosledno snima za svaki slučaj koji koristi standardni rastvor koji sadrži supstancu koja se istražuje (Mitić, 2018).

2. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL I METODE

3.1.1. Priprema biljnog materijala

Kao polazni materijal korišćeni su suvi plodovi šumske ili divlje borovnice (*Vaccinium myrtillus* L). Borovnica je porijeklom sa područja planine Durmitor, teritorija opštine Žabljak (43°15'30" SGŠ; 18°59'30" IGD: nadmorske visine 1459 m), (slika 18). Biljni materijal je sakupljen u ljetnjem periodu (avgust – septembar) 2022. godine i osušen je na sobnoj temperaturi. Čuvan je na prozračnom mjestu u papirnim vrećama.



Slika 18. Lokacija porijekla biljnog materijala (Google maps)

Za potrebe analize, biljni materijal se mora usitniti mljevenjem. Proces usitnjavanja ima važan značaj jer narušava strukturu biljnog materijala, olakšavajući prenos aktivnih supstanci iz različitih biljnih vrsta. Proces mljevenja je proces smanjivanja veličine čestica materijala kako bi se postigle određene željene karakteristike, pomoću nekog oblika mehaničke sile. Ovdje smo koristili Delimano blender za mljevenje biljnog materijala.

Srednji prečnik čestice je određen setom sita Erweka (slika 19) srednjeg prečnika: 0,2 mm, 0,1 mm, 1 mm, 2 mm. Na taj način je određen srednji prečnik čestica.



Slika 19. Set sita Erweka (autor I. Kasalica)

Pomoću srednjeg prečnika (d) vrši se definisanje stepena usitnjenosti i ujednačenosti čestica droge. Formula za izračunavanje srednjeg prečnika čestica je:

$$100/d = \sum m_i/d_i$$

Gdje je:

m_i - maseni procenat i -te frakcije (%).

d_i - srednji prečnik i -te frakcije (mm).

d - srednji prečnik čestica (mm).

3.1.2. Metoda ekstrakcije bioaktivnih materijala

Da bi se dobio najveći mogući prinos željenih bioaktivnih komponenti, izbor odgovarajuće metode ekstrakcije je najbitniji korak u njihovoj ekstrakciji.

U ovom istraživanju korišćeni su različiti rastvarači: vodeni rastvori etanola koncentracije 30, 50 i 70% u odnosu biljni materijal/alkohol (solvomodul) 30, 40, 50 i 60 (g/100 ml), kao i voda i etanol. Ekstrakcija je vršena na različitim temperaturama: (25 °C, 35 °C i 45 °C).

Maceracija

Proces ekstrakcije ploda borovnice sproveden je metodom maceracije. To je tradicionalna procedura koja zahtijeva da se propisno pripremi materijal i da se koristi određeni rastvarač na temperaturi od 25 °C.

Biljni materijal (5 g) je samljeven, nakon mljevenja, ukupni saržaj ove biljne mase sa kojim je dalje rađeno iznosio je približno 4,86 g.

Stepen usitnjenosti i ujednačenosti čestica biljnog materijala je procijenjen korišćenjem seta sita Erveka (0,1 mm, 0,2 mm, 1 mm, 2 mm) nakon procesa mljevenja. Izmjerena masa biljnog materijala sadržana u setu sita:

- d = 2 mm masa uzorka iznosila je 2,15 g,
- d = 1 mm masa uzorka iznosila je 1,88 g,
- d = 0,1 mm masa uzorka iznosila je 0,88 g,
- d = 0,2 mm masa uzorka iznosila je 0 g.

Reagensi

- Etanol 50%
- Dejonizovana voda

Postupak

Potrebno je napraviti rastvarač sa kojim će suva, samljevena biljna supstanca biti pomiješana. U staklenom erlenmajeru sjedini se 200 ml dejonizovane vode sa 100 ml rastvora etanola (50%). Prethodno dobijene granulacije se zajedno sjedine u laboratorijskoj čaši, a zatim se pomiješaju sa 300 ml prethodno dobijenog rastvora. Kako bi se na pravi način suva biljna supstanca sjedinila sa rastvaračem, za postupak maceracije, jedna od dobijenih smješa je ostavljena 60 minuta da odstoji na sobnoj temperaturi (25 °C). Zatim, smješa se filtrira kroz filter-papir kako bi se odvojio ekstrakt od nerastvorljivog biljnog materijala (slika 20).



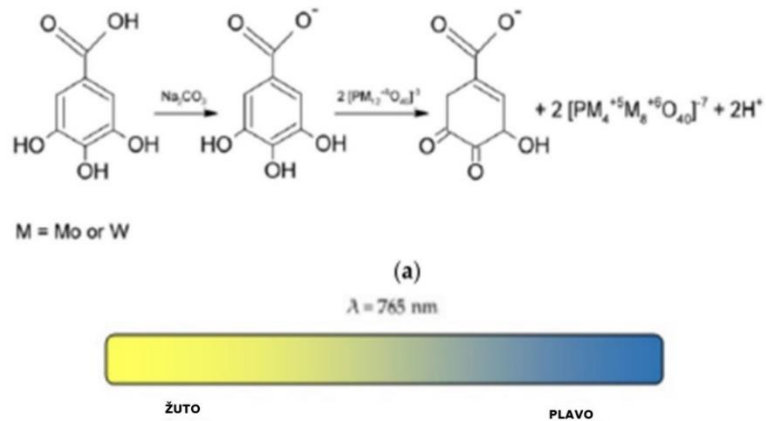
Slika 20. Filtracija macerata ploda borovnice (autor I. Kasalica)

3.1.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola i flavonoida iz ploda borovnice

3.1.3.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola metodom po Folin-Ciocalteu

Folin-Ciocalteu spektrofotometrijska metoda je korišćena za utvrđivanje ukupnih fenola. Ova metoda funkcioniše na principu oksidacije fenolnih grupa, pri čemu Folin-Ciocalteu reagens indukuje formiranje obojenih proizvoda (Slika 21). Hinox se proizvodi

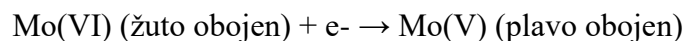
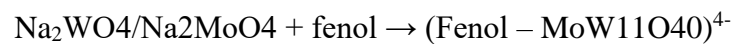
od fenolnih grupa oksidovanih u molibdfosfat i volfram fosfat anjone, koji se naknadno redukuju. Nijansa redukovanog Folin-Ciocalteu reagensa je žuta kada nije redukovana, dok je stabilno plava (Munteanu i sar., 2021).



Slika 21. Folin-Ciocalteu metoda- mehanizam nastajanja plave boje (Munteanu i sar., 2021)

Za kvantitativnu procjenu fenolnih jedinjenja u uzorku obično se koristi galna kiselina kao standard. Nedostatak je u tome što je test osjetljiv na promjenu temperature i pH vrijednosti.

Kada polifenoli disosuju nastaju fenoksidni anjon i proton koji redukuje Folin-Ciocalteu reagens u plavo bojeni jon:



Reagensi

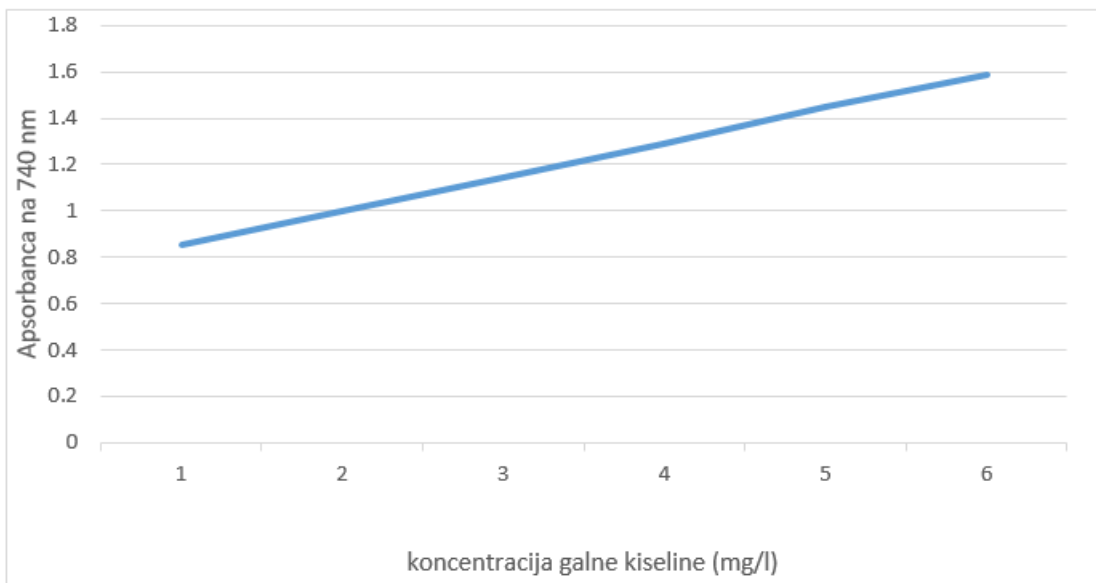
- Folin-Ciocalteu reagens (FC reagens),
- 7,5 % rastvor natrijum karbonata i
- dejonizovana voda

Postupak

Izmjeri se 1,25 g droge, premjesti se u normalni sud od 50 ml i dopuni destilovanom vodom do crte. 1 ml tog rastvora se pomješa sa 0,5 ml Folin Ciocalteu (FC) reagensa, nakon čega se u smještu doda 2,5 ml 7,5% natrijum karbonata, i tako dobijen rastvor se zagrijava do 50 °C. Nakon 2 h stajanja na tamnom mjestu, apsorbance ovako pripremljenih rastvora je očitana na talasnoj dužini koja je $\lambda=740$ nm. Slijepa proba napravljena je miješanjem 0,5 ml FC reagensa, 2,5 ml 7,5% natrijum karbonata i 1 ml dejonizovane vode. Za dobijanje kalibracione krive korišćena je serija standardnih rastvora galne kiseline. Određivanjem apsorpcije na 740 nm, boje intenzitet se mjeri u poređenju sa slijepom probom.



Slika 22. Prikaz rastvora fenola pri različitim vrijednostima apsorbance (autor I. Kasalica)



Slika 23. Određivanje sadržaja ukupnih fenola-kalibraciona prava

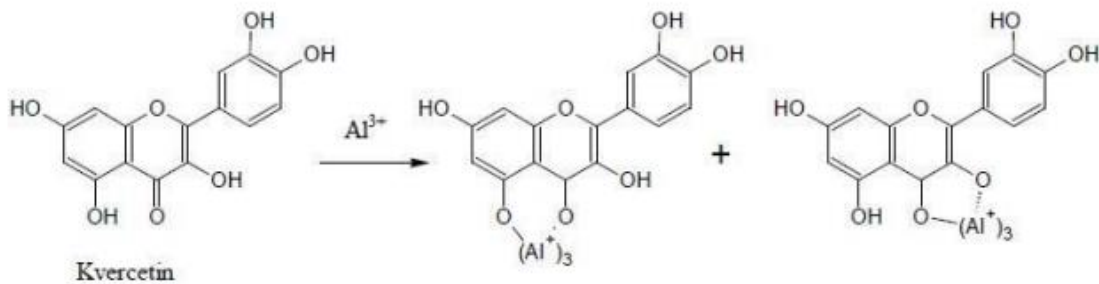
Masena koncentracija ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) polifenolnih jedinjenja se izračunava korišćenjem jednačine prave ($A = 0,0853c_{GA} + 0.0065$, $n = 5$, $r^2 = 0,9998$), i izmerene apsorbancije. Koncentracija fenola u uzorcima koji su analizirani izražava se pomoću ekvivalenta kiseline u ovom slučaju galne u miligramima po masi suvog ploda borovnice u gramima (mg GAE/g droge).



Slika 24. Spektrofotometar korišćen za određivanje ukupnih fenola (autor I. Kasalica)

3.1.3.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Ukupni sadržaj flavonoida u ekstraktima je određen modifikovanom spektrofotometrijskom metodom sa aluminijum(III) hloridom, pri čemu se između aluminijuma i flavonoida formiraju kompleksi (Ribarova i sar., 2005). Kompleks sa Al^{3+} naročito je važan (slika 22).



Slika 25. Građenje helata flavonoida sa jonom (Ribarova i sar., 2005)

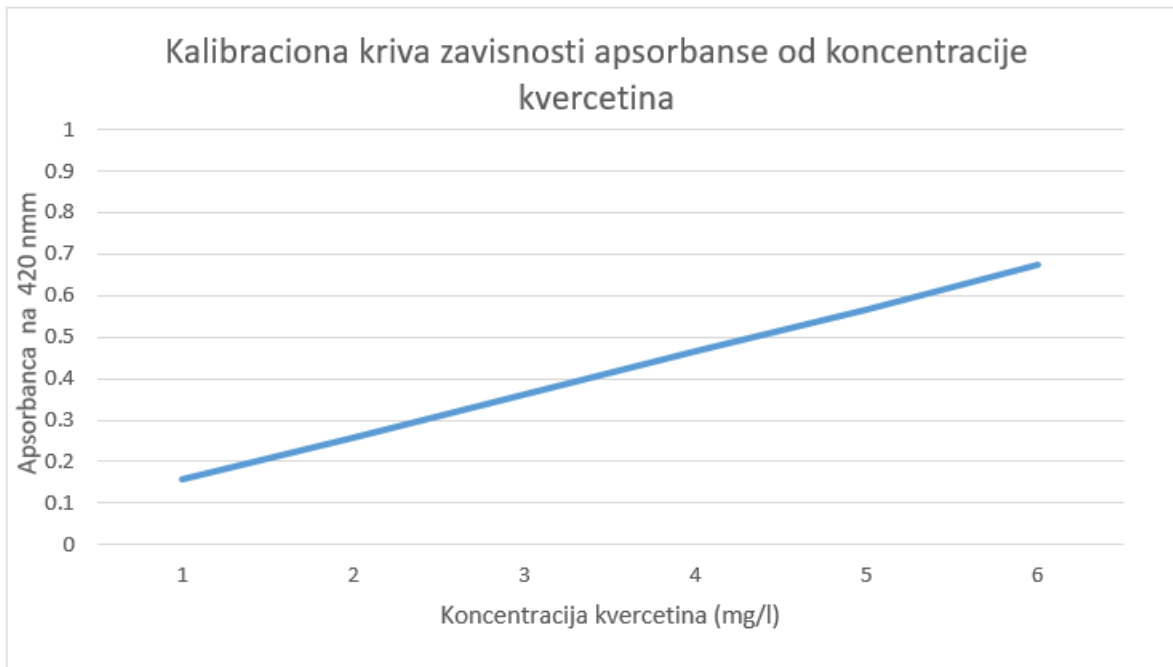
Koristeći niz standardnih rastvora kvercetina, generisana je kalibraciona kriva. Koristeći talasnu dužinu od 420 nanometara, utvrđuje se udio flavonoida u ispitivanim uzorcima u odnosu na osnovni uzorak. (Ribarova i sar., 2005).

Reagensi

- 5% $NaNO_2$,
- 1% aluminijum- hlorid,
- 1M NaOH,
- destilovana voda.

Postupak

Reakciona smješa je pripremljena tako što je 0,1 g uzorka prenijeto u sud zapremine 25 ml, uz dodatak 6 ml destilovane vode i 0,6 ml 5% natrijum nitrata. Nakon što je rastvor odstojao 5 minuta na sobnoj temperaturi, dodato mu je 6 ml 1% aluminijum hlorida, a zatim, ponovo poslije 5 minuta stajanja dodato je 4 ml 1M natrijum hidroksida i dopunjeno destilovanom vodom do crte. Destilovana voda se koristila za slijepu probu, a talasna dužina je iznosila 420 nm.



Slika 26. Određivanje sadržaja ukupnih fenola-kalibraciona prava

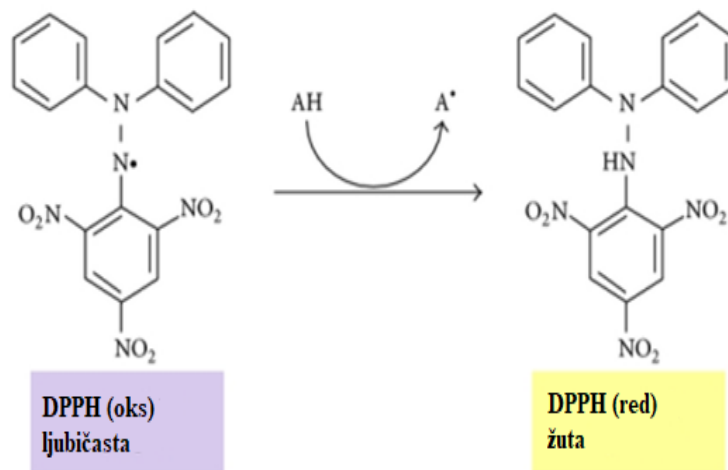


Slika 27. Prikaz rastvora flavonoida pri različitim vrijednostima apsorbance (autor I. Kasalica)

Primjenom jednačine: ($y = 0,0252x + 0,0029$, $x = 6$, $r^2 = 0,9998$) izračunata je koncentracija ($\mu\text{g/ml}$) flavonoida. U prvobitnom uzorku se sadržaj ukupnih flavonoida izražava pomoću ekvivalenta kiseline u ovom slučaju galne u miligramima na 100 grama biljnog materijala.

3.1.3.3. *Određivanje antioksidativnih svojstava DPPH metodom*

DPPH test je najrasprostranjenija tehnika korištena za procjenu aktivnosti antioksidanata (Chen i sar., 1999). Stabilnost DPPH• kao slobodnog radikala pripisuje se delokalizaciji nesparenog elektrona unutar molekula, što sprečava dimerizaciju koja bi se inače desila sa alternativnim oblicima slobodnih radikala. Tamnoljubičasta nijansa ovog molekula je određena njegovom apsorpcijom u rastvoru etanola između 515 i 517 nanometara. Redukcija radikala ide do DPPH•, tada će antioksidans reagovati u prisustvu vodonika kao elektron donora sa DPPH•, kao rezultat, apsorpcija nastaje na talasnim dužinama manjim od DPPH•. Istovremeno, dolazi do promjene boje zavisne od elektrona, veći stepen promjene boje označava povećanu sposobnost redukcije (Vitković, 2017).



Slika 28. Promjena boje DPPH radikala u prisustvu antioksidanta (Teixeira i sar., 2013)

Rastvorljivost DPPH• radikala značajno varira između polarnih i nepolarnih organskih rastvarača, slabo je rastvorljiv u nepolarnim rastvaračima dok se u različitim polarnim rastvaračima prilično dobro rastvara. Obično se ovaj test sprovodi u rastvoru etanola ili metanola da bi se olakšalo rastvaranje fitokemikalije (Foti, 2015).

DPPH test nudi nekoliko prednosti, uključujući jednostavnost implementacije, isplativost, mogućnost izvođenja testa na temperaturi okoline i potencijal za automatizaciju (Kedare i Singh, 2011; Munteanu i sar., 2021).

Reagensi

- 70% etanol i
- 0,2 mM rastvor 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)
- 0,020 g DPPH praha se rastvori u etanolu u sudu od 50 ml do crte



Slika 29. DPPH rastvoren u etanolu (autor I. Kasalica)

Postupak

Najčešće se DPPH metoda koristi za procjenu antioksidativne aktivnosti prirodnih antioksidanata. Skraćenica za DPPH je 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (Vitković, 2017). Vrijednost antioksidativnog kapaciteta određuje se posmatranjem redukcije rastvora ljubičaste boje u rastvor žute boje korišćenjem DPPH radikala (Tasić, 2017). Etanolni rastvor DPPH se priprema tako što se izmjeri na vagi 0,020 g DPPH i sjedini sa 70% etanolom do crte u normalnom sudu od 50 ml. Rastvor za radnu probu se dobio mješanjem 2,7 ml etanolnog DPPH rastvora i 0,3 ml ekstrakta. Sadržaj svake epruvete se snažno promućka i ostavi da odstoji 30 minuta na tamnom mjestu, nakon čega je izmjerena apsorbanca. Vaga koja se koristila za mjerenje količine DPPH reagensa prikazana je na slici 30.



Slika 30. Analitička vaga (autor I. Kasalica)

Talasna dužina na kojoj je izmjerena apsorbanca iznosila je 517 nm. Na taj način je izmjeren intenzitet promjene boje. Za slijepu probu se koristio rastvarač, 50% etanol.

Na osnovu prikazane jednačine određena je antioksidativna aktivnost ekstrakata na DPPH (AA_{DPPH}):

$$AA_{DPPH} (\%) = 100 - (A_{uzorka}/A_{slijepe\ probe}) \times 100$$

pri čemu su:

$A_{slijepe\ probe}$ –apsorbanca slijepe probe mjerena na 517nm,

A_{uzorka} – apsorbanca uzorka mjerena na 517nm.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Cilj rada

Cilj ove master teze je da se odredi količina flavonoida i fenola u ekstraktima ploda borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.), antioksidativne aktivnosti dobijenih ekstrakata, kao i ispitivanje optimalnih uslova ekstrakcije i procjena mogućnost primjene izabranog matematičkog modela.

U tom cilju urađeno je sljedeće:

- Plod divlje borovnice sakupljen je u periodu avgust – septembar 2022. godine na planini Durmitor, teritorija opštine Žabljak;
- Izolovanje ekstrakta rađeno je metodom maceracije pri različitim parametrima (koncentracija etanola, solvomodul, vrijeme ekstrakcije i temperatura ekstrakcij);
- Sadržaj ukupnih flavonoida i fenola određen je metodom spektrofotometrije;
- Antioksidativna aktivnost dobijenih ekstrakata ispitivana je DPPH metodom
- Dobijeni rezultati su poređeni sa dostupnim literaturnim podacima;
- Praćena je kinetika ekstrakcije i procjena primjene odabranih matematičkih modela.

4.2. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u plodu borovnice

Plod borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.) bio je predmet istraživanja u ovom master radu. Plod je mljeven do srednjeg prečnika čestica od 0,972 mm i korišćen kao takav za sve eksperimente. Za ekstrakciju se koriste voda, etanol i kombinacija etanola i vode zbog činjenice da vrsta i polaritet rastvarača imaju značajan uticaj i na količinu i na sastav polifenola u ekstraktu (Moller i sar., 1999). Folin-Ciocalteu metoda je korišćena za kvantifikaciju ukupnih fenola u ekstraktima ploda borovnice. Ova metoda funkcioniše tako što olakšava reakciju fenola sa Folin-Ciocalteu reagensom; ishod se označava u

miligramima ekvivalenta galne kiseline (GAE) po gramu droge. Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida moguće je primjenom metode sa aluminijum(III)-hlorida. Ishod se obično izražava kao ekvivalent kvercetina (Qc) na g droge, što je određeno apsorpcijom uzorka i kalibracijom (Markham, 1989).

U biljkama je prisutno nekoliko hiljada sekundarnih metabolita, što zahtijeva uspostavljanje brže i preciznije tehnike ekstrakcije. Smišljeno je mnoštvo metodologija za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz različitih biljnih materijala, u skladu sa posebnim zahtevima naučnog istraživanja. Identifikovane su 33 metode ekstrakcije koje su različite i dokumentovane u raznim biohemijским istraživanjima. Trajanje ekstrakcije (u rasponu od 30 sekundi do 96 sati, ili čak nekoliko dana) i odnos zapremine rastvarača i mase uzorka (od 2 do 200) variraju u istraživanjima ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz biljaka (Markham, 1989).

4.2.1. Optimizacija klasične ekstrakcije – maceracije

4.2.1.1. Uticaj koncentracije rastvarača

Kako bi se odredio odgovarajući ekstragens za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja, uključujući polifenole, iz ploda borovnice, korišćena je konvencionalna metoda Č/T ekstrakcije (maceracija) u kombinaciji sa etanolom i vodom u različitim koncentracijama (30%, 50%, 70%) kao ekstragenasa.

Odabrani rastvarač značajno utiče na ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz biljne droge. Često se fenolna jedinjenja razlikuju u pogledu njihove kiselosti i polariteta. Rastvarači sa različitim polaritetima i pH vrijednostima se često koriste iz prethodno navedenih razloga (Hemwimon i sar., 2007). Kako bi se utvrdili optimalne uslove ekstrakcije, korišćena je jednofaktorska eksperimentalna metoda za optimizaciju postupka ekstrakcije. Proces optimizacije uključuje cjelokupnu količinu flavonoida i fenola kao parametre.

Tabelom 4 prikazani su ispitivani parametri i njihove vrijednosti pri ekstrakciji ukupnih fenola i flavonoida iz ploda borovnice metodom maceracije.

Tabela 4. Ispitivani parametri pri ekstrakciju ukupnih flavonoida i fenola iz ploda borovnice

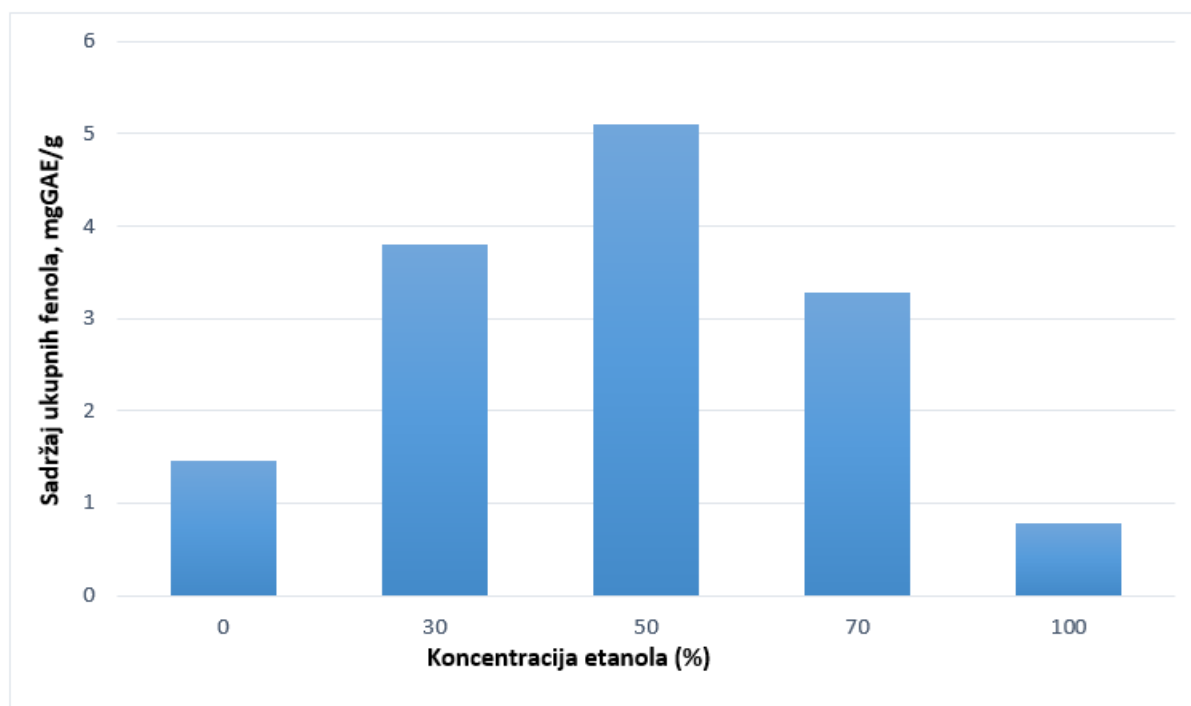
Parametri	Vrijednosti
Koncentracija etanola %	30, 50, 70, 100
Biljni materijal/etanola, g/100 ml	30, 40, 50, 60
Vrijeme ekstrakcije, min	5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 120
Temperatura ekstrakcije, °C	25, 35, 45

Podaci iz literature pokazuju da su različite vrste biljnog materijala ekstrahirane korišćenjem etanola kao ekstragens. Dobijeni ekstrakti su posjedovali povoljna svojstva odnosno pogodan koncentraciju i sastav značajnih jedinjenja za farmakologiju (Turkoglu i sar., 2007). Jedna značajna prednost etanola u poređenju sa alternativnim rastvaračima je njegova netoksična priroda, što daje mogućnost dodatnog korišćenja dobijenih ekstrakata u farmaceutskom i prehrambenom sektoru. Određene polarne komponente, kao što su antioksidansi, ekstrahuju se u većim količinama pri čemu korišćeni ekstragens ima veći polaritet. Sličan odnos se može primijetiti između polariteta ekstraktanta i proporcije vode koju sadrži; tako, za ekstrakciju jedinjenja ove prirode mogu se koristiti različite koncentracije etanola.

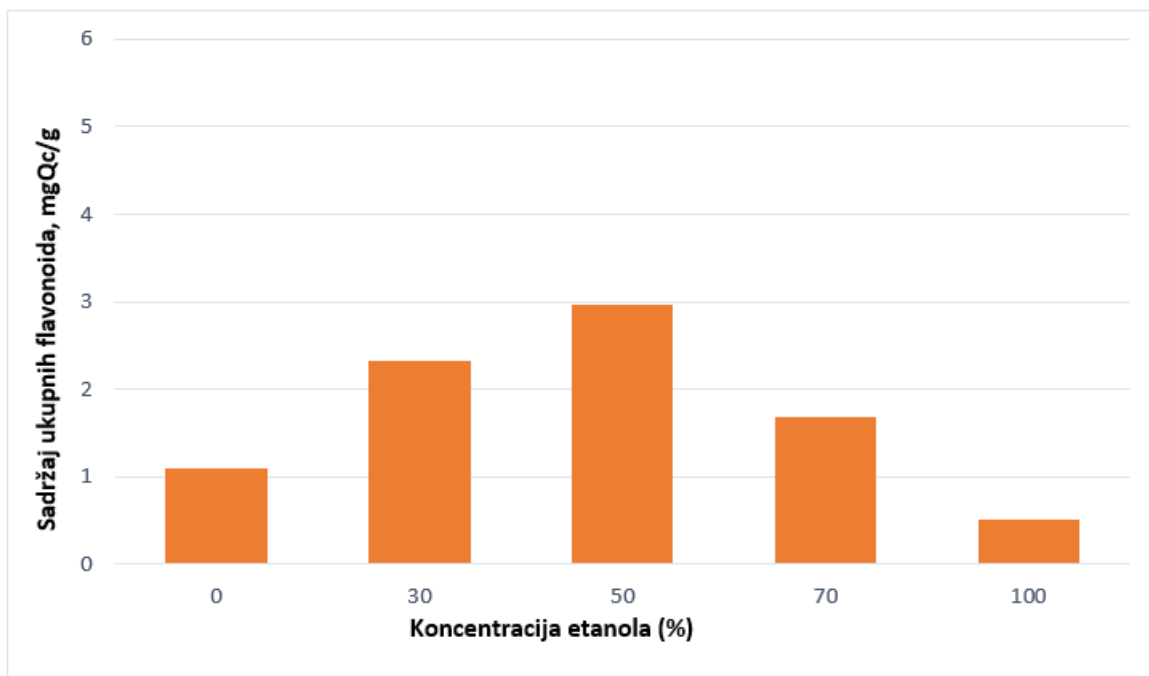
Sadržaji ukupnih fenola i flavonoida u maceratima pri različitim koncentracijama etanola dati su tabelarno i grafički (tabela 5, slika 31, slika 32).

Tabela 5. Sadržaj ukupnih fenola (mgGAE/g) i flavonoida (mgQc/g) u ekstraktima ploda borovnice u odnosu na koncentraciju etil alkohola.

Koncentracija etanola (%)	TP (mg GAE/g)	TF (mg Qc/g)
0	1,459	1,105
30	3,795	2,325
50	5,102	2,975
70	3,283	1,685
100	0,775	0,512



Slika 31. Sadržaj ukupnih fenola (mgGAE/g) u ekstraktima ploda borovnice u odnosu na koncentraciju etil alkohola (temperatura: 25 °C; vrijeme: 120 minuta; biljni materijal/etanol: 20 g/100 ml)



Slika 32. Sadržaj ukupnih flavonoida (mgQc/g) u ekstraktima ploda borovnice u odnosu na koncentraciju etil alkohola (temperatura: 25 °C; vrijeme: 120 minuta; biljni materijal/etanol: 20 g/100 ml)

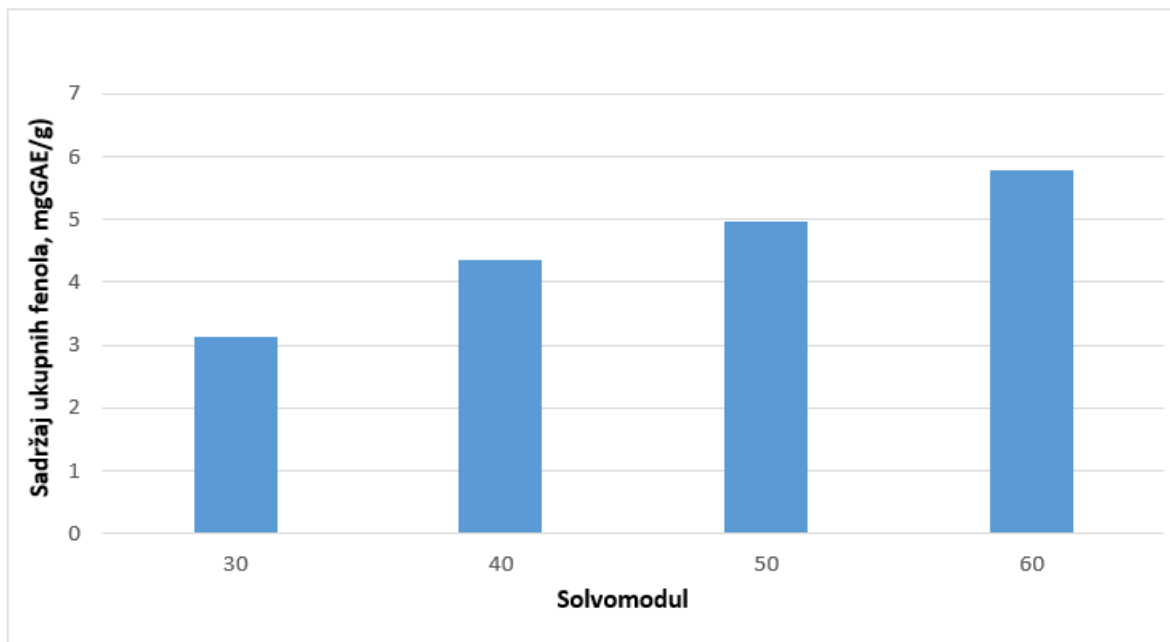
Ukupni fenoli i flavonoidi se efikasnije ekstrahuju iz plodova borovnice korišćenjem binarnog sistema rastvarača, odnosno vodenog rastvora etanola, Maksimalne koncentracije ukupnih flavonoida i fenola ekstrahovane su iz ploda borovnice korišćenjem 50%-etanola, (tabela 5). Nasuprot tome, kako raste procenat organskog rastvarača u vodenim rastvorima, gdje dolazi do odgovarajućeg smanjenja koncentracija fenola i flavonoida. Ovaj fenomen se može objasniti razmatranjem dodatnih karakteristika rastvarača, uključujući njegov viskozitet i površinski napon, pored njegovog polariteta. Koeficijent difuzije se proporcionalno smanjuje sa povećanjem viskoziteta, dok se brzina ekstrakcije povećava sa smanjenjem površinskog napona. Ova svojstva su značajno poboljšana kada se govori o organskim rastvaračima u poređenju sa vodom. Za dalje eksperimente, zbog najvećeg prinosa, izabrana je koncentracija etanola od 50%.

4.2.1.2. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida iz ploda borovnice u zavisnosti od solvomodula

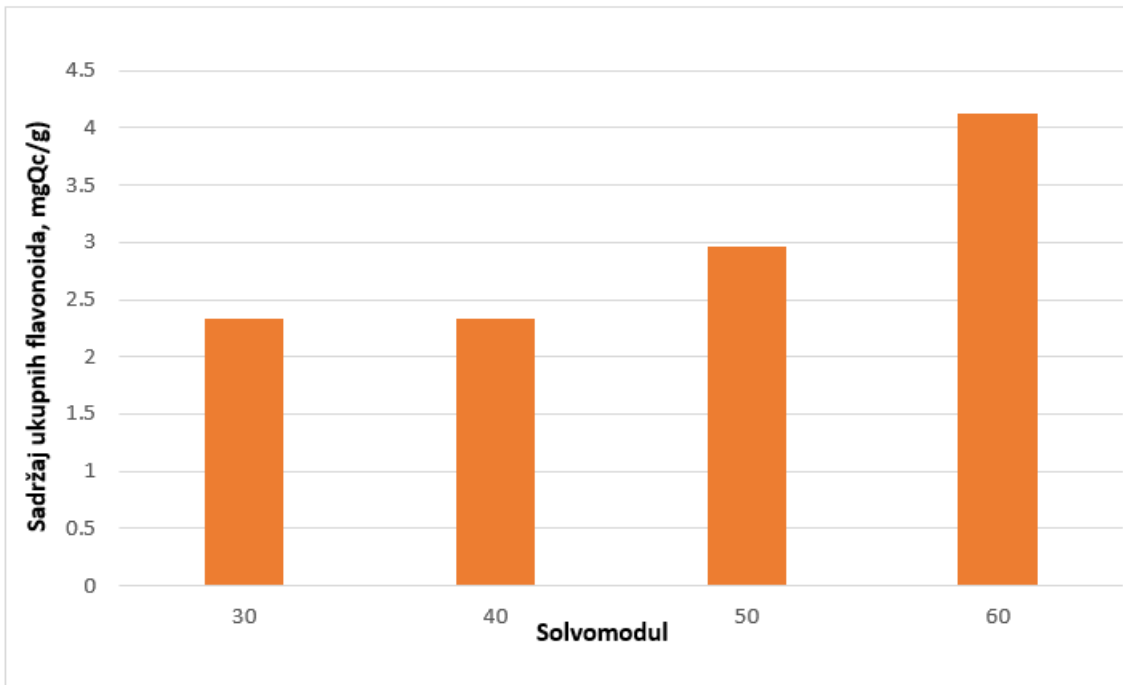
Da bi se povećao prinos ekstraktivnih materijala, važno je odabrati optimalan odnos između mase biljnog materijala i ukupne zapremine solvomodula, pored izbora odgovarajućeg rastvarača (ili mješavine rastvarača) za ekstrakciju. U tabelarnom i grafičkom obliku prikazane su koncentracije ukupnih flavonoida i fenola u ekstraktima (tabela 6, slike 33 i 34).

Tabela 6. Sadržaj ukupnih fenola (mgGAE/g) i flavonoida (mgQc/g) iz ploda borovnice u zavisnosti od solvomodula.

Solvomodul	TP (mgGAE/g)	TF (mgQc/g)
30	3,127	2,328
40	4,356	2,326
50	4,978	2,956
60	5,796	4,128



Slika 33. Sadržaj ukupnih fenola (mgGAE/g) iz ploda borovnice u zavisnosti od solvomodula (temperatura: 25 °C; vrijeme: 120 minuta; alkohol: 50%-etanol)



Slika 34. Sadržaj ukupnih flavonoida (mgQc/g) iz ploda borovnice u zavisnosti od solvomodula ((temperatura: 25 °C; vrijeme: 120 minuta; alkohol: 50%-etanol)

Ovaj model značajno manje utiče na prinos ekstraktivnih materijala u poređenju sa rastvaračem. Ipak, ovaj parametar je i ekonomski značajan, posebno kada je cilj da se dobiju ekstrakti koji sadrže značajnu koncentraciju željenih jedinjenja uz korišćenje optimalne količine rastvarača.

Može se dati zaključak da se prinos ekstraktivnih supstanci povećava kako se povećava zapremina rastvarača u odnosu na biljni materijal. Maksimalna koncentracija ukupnih flavonoida i fenola ekstrahovana je iz ploda borovnice kada je vrijednost biljnog materijala/etanol 60 g/100 ml, (tabela 6). Shodno tome, ovaj solvomodul je korišćen u narednim eksperimentima. Povećani solvomodul, ili zapremina rastvarača u odnosu na količinu biljnog materijala, rezultira efikasnijim procesom ekstrakcije.

4.2.1.3. *Ukupan sadržaj fenola i flavonoida u zavisnosti od temperature i vremena ekstrakcije*

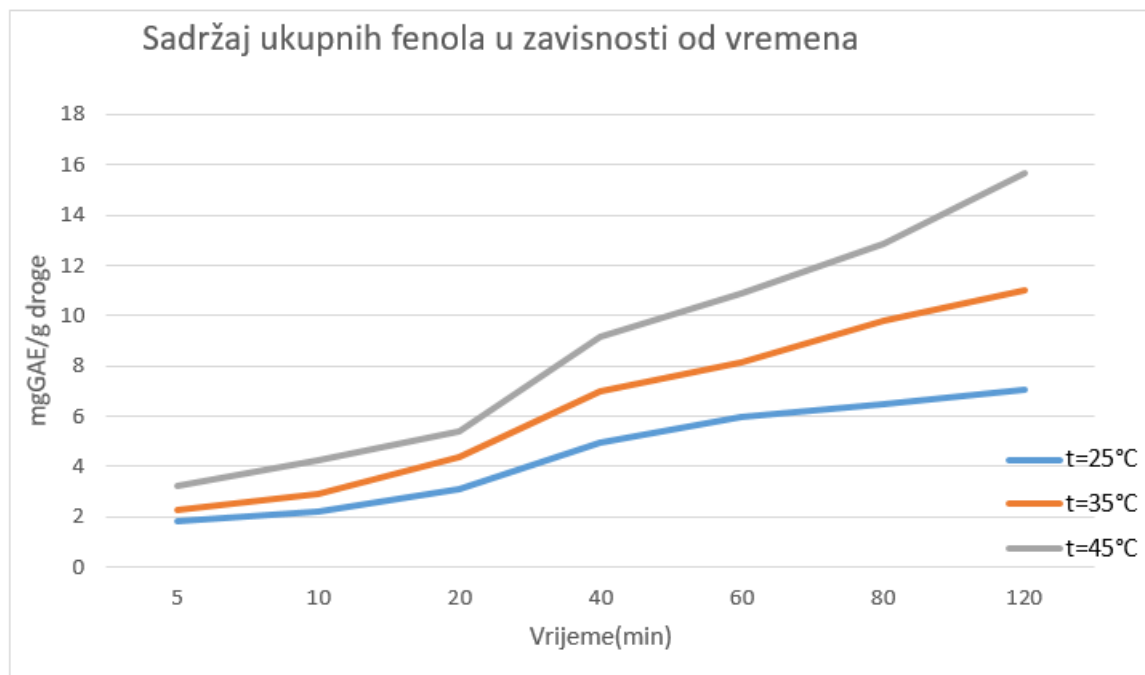
Na prinos ukupnih ekstrahovanih supstanci utiče temperatura pri kojoj se vrši ekstrakcija (Ponomarev, 1976). Temperatura je ograničena tačkama ključanja korišćenih rastvarača, isto tako, fenolna jedinjenja se mogu razgraditi na višim temperaturama. Uticaj temperature ekstrakcije na prinos ekstraktivnih supstanci ispitivana je u opsegu od 25 °C do 45 °C. Povećanje temperature rezultiralo je prosječnim povećanjem prinosa ukupnih flavonoida i fenola od 2 do 5%. Ovo povećanje je bilo zanemarljivo na početku ekstrakcije; odnosno temperatura nije imala primjetan uticaj na proces. Međutim, nakon 60 minuta uticaj temperature na proces ekstrakcije je postao izraženiji.

Povećanje temperature izaziva smanjenje viskoznosti rastvarača, povećanje koeficijenta difuzije bioaktivnih supstanci kroz rastvarač i skraćivanje vremena potrebnog da rastvarač prodre u ćelije biljnog materijala tj. skraćuje se vrijeme njegovog bubrenja. Ove promjene zajedno doprinose boljem postupku ekstrakcije (Ponomarev, 1976).

Trajanje procesa ekstrakcije je važan faktor koji utiče na prinos ekstrahovanih fenolnih jedinjenja. Zbog mogućnosti da produžena ekstrakcija izazove degradaciju fenolnih komponenti, prinos ukupnih fenola iz ploda borovnice je praćen u vremenskom trajanju od 5 do 120 minuta (tabela 7).

Tabela 7. Sadržaj ukupnih fenola u zavisnosti od vremena ekstrakcije pri čemu dolazi do promjena pri optimalnim uslovima ekstrakcije iz ploda borovnice (biljni materijal/alkohol 60 g/100 ml; alkohol: 50%-etanol)

vrijeme (minut)	Sadržaj ukupnih fenola, mg GAE/g		
	T=(25 °C)	T=(35 °C)	T=(45 °C)
5	1,825	2,297	3,202
10	2,219	2,925	4,269
20	3,110	4,398	5,395
40	4,977	7,017	9,143
60	5,595	8,109	10,854
80	6,510	9,802	12,872
120	7,054	11,989	15,671



Slika 35. Sadržaj ukupnih fenola u zavisnosti od vremena ekstrakcije pri čemu dolazi do promjena pri optimalnim uslovima ekstrakcije iz ploda borovnice (biljni materijal/alkohol 60 g/100 ml; alkohol: 50%-etanol)

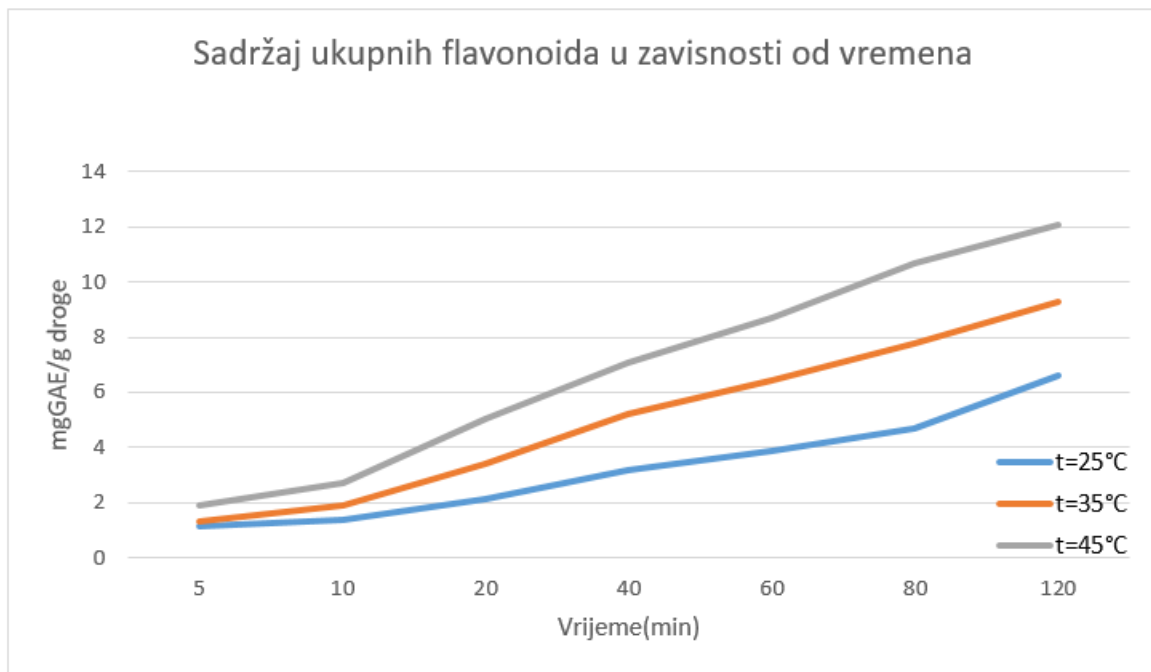
Iz slike 35 i tabele 7 vidljivo je da na prinos fenola može uticati trajanje procesa ekstrakcije. Produženo trajanje ekstrakcije generalno omogućava dobijanje većeg prinosa polifenolnih jedinjenja iz biljne droge. Ipak, svaka metoda ekstrakcije ima optimalno vrijeme trajanja, i ako se process ekstrakcija vrši suviše dugo može doći do izolovanja neželjenih jedinjenja i pada kvaliteta dobijenog ekstrakta.

Optimalan iprinos ukupnih fenola u ovom radu zabilježen je 120 minuta nakon početka ekstrakcije, na temperaturi od 45 °C. Dobijeni rezultati pokazuju da temperatura utiče i na postupak ekstrakcije i prinos ukupnih fenola iz ploda borovnice. Procesi oksidacije i polimerizacije jedinjenja, koji se intenziviraju na povišenim temperaturama, mogu izazvati smanjenje sadržaja ukupnih jedinjenja fenola u ekstraktu.

Jovančević i sar. (2011) ispitivali su divlju borovnicu (*Vaccinium myrtillus* L.) prikupljenu sa 11 različitih lokaliteta u planinskom regionu Crne Gore. Pokazano je da se ekstrakcijom sa 80% metanolom ukupan sadržaj fenola u svim analiziranim uzorcima kretao od 3,92 do 5,24 mg GAE/g. Može i sar. (2011) su ispitivali plod borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.) uzorkovane sa sedam različitih lokacija u Sloveniji. Ukupni sadržaj fenola u plodu borovnice u ovom radu se kretao od 10,27 do 16,29 mg GAE/g. U ovom master radu istraživanju, optimizovanjem metode klasične ekstrakcije, sadržaj ukupnih fenola ekstrahovan iz ploda borovnice je 15,671 mg GAE/g pri najpovoljnijim parametrima. Razlike u literaturni podacima mogu biti posledica uslova životne sredine, period berbe, varijabilnost sorte ili zrelost ploda (de Ancos, 2000).

Tabela 8. Sadržaj ukupnih flavonoida u zavisnosti od vremena ekstrakcije pri čemu dolazi do promjena pri optimalnim uslovima ekstrakcije iz ploda borovnice (biljni materijal/alkohol 60 g/100 ml; alkohol: 50%-etanol)

vrijeme (minut)	Sadržaj ukupnih flavonoida, mgQc/g		
	T=(25°C)	T=(35°C)	T=(45°C)
5	1,139	1,299	1,873
10	1,378	1,889	2,717
20	2,136	3,427	5,020
40	3,198	5,229	7,059
60	3,899	6,440	8,709
80	4,668	7,790	10,698
120	6,625	9,312	12,060



Slika 36. Sadržaj ukupnih flavonoida u zavisnosti od vremena ekstrakcije pri čemu dolazi do promjena pri optimalnim uslovima ekstrakcije iz ploda borovnice (biljni materijal/alkohol 60 g/100 ml; alkohol: 50%-etanol)

Prema istraživanjima Vučića i dr. (2013), etanol je efikasniji rastvarač za ekstrakciju flavonoida iz plodova borovnice od vode. U ekstratu ploda borovnice nađeno je najviše flavonoida pri većim temperaturama $T=(45\text{ }^{\circ}\text{C})$, a nešto manja količina je izolovana na nižim temperaturama $T=(35\text{ }^{\circ}\text{C})$ i $T=(25\text{ }^{\circ}\text{C})$, što se može vidjeti u tabeli 8.

Dvije faze su uključene u ekstrakciju fenolnih jedinjenja, kao što je ilustrovano na slikama 35 i 36. Prvo se ekstrahuju komponente fenola u malom vremenskom intervalu od približno dvadeset minuta. Tokom faze ispiranja tj. pri brznoj ekstrakciji, većina ekstrahovanih jedinjenja fenola postaje rastvorljiva. Nakon toga, stopa povećanja količine jedinjenja fenola usporava se zbog difuzije jedinjenja koja su se ekstrahovala iz čestičnih unutrašnjosti. Koncentracija jedinjenja fenola u ekstraktima je na svom vrhuncu tokom ove faze postepene ekstrakcije.

U ovom master radu određen je i količina ukupnih flavonoida koji pri optimalnim uslovima ekstrakcije iznosi $12,060\text{ mgQc/g}$. Rezultat je predstavljen u miligramima ekvivalenta kvercetina u g ploda borovnice. Istraživanjem literature nađeno je da se uglavnom ukupan sadržaj flavonoida ploda borovnice izražava kao g/mg rutina u određenoj količini droge. Uzimajući u obzir da je rutin glikozidni derivat kvercetina, biće navedeno nekoliko rezultata iz dostupne literature.

Jovančević i saradnici (2011) su pokazali da se ukupan sadržaj flavonoida u svim analiziranim uzorcima kretao $716.31 \pm 30.82\text{ mg RE/ g}$ uzorka borovnice. Ukupna količina flavonoida određena je iz jednačina rutinske kalibracione krive i izražen kao mg ekvivalenta rutina na 100 g sveže težine voća (fresh weight – FW). Ukupan sadržaj flavonoida u etanolnim ekstraktima ploda borovnice ispitivali su Vučić i saradnici (2013), i odredili da je koncentracija flavonoida izražena kao miligram ekvivalenta rutina (RUE) po gramu ekstrakta iznosila $10,06 \pm 0,11\text{ mg RUE/g}$ ekstrakta.

Analogno objašnjenju za ukupan sadržaj fenola u plodu borovnice, tako za ukupan sadržaj flavonoida razlike u prijavljenim rezultatima mogu biti posledica uslova životne sredine, period berbe, varijabilnost sorte ili zrelost ploda (de Ancos, 2000).

4.3. Modelovanje kinetika ekstrakcije ukupnih fenola i flavonoida iz ploda borovnice

Da bi se simulirala kinetika ekstrakcije ukupnih flavonoida i fenola korišćenjem 50%-etanola, implementirani su kinetički modeli: jedan izveden iz teorije filma, a drugi iz empirijske teorije Ponomarjeva. Korišćeni modeli kinetičke ekstrakcije su detaljno prikazani u tabeli 9 (Veljković, 2002).

Tabela 9. Prikaz različitih kinetičkih modela ekstrakcije

	Kinetička jednačina	Linearna transformacija
Model zasnovan na teoriji filma	$\left(1 - \frac{c}{c_s}\right) = (1 - b')e^{-k't}$	$\ln\left(1 - \frac{c}{c_s}\right) = \ln(1 - b') - k't$
Empirijski model Ponomarjeva		$\frac{q_0 - q}{q_0} = b'' + k''t$

Promjenljive u jednačinama za kinetičke modele ekstrakcije:

q_0 - masa ekstrahovanih supstanci na početku

q - masa ekstrahovanih supstanci posle određenog vremena ekstrakcije

b - koeficijent ispiranja

k - koeficijent spore ekstrakcije

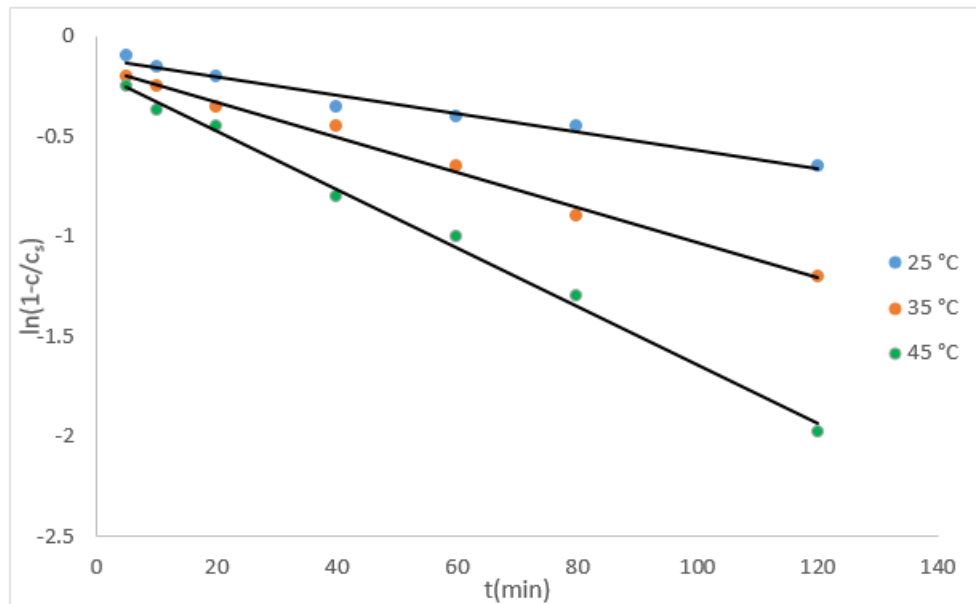
c - koncentracija rastvora

c_s - koncentracija rastvora koji je zasićen

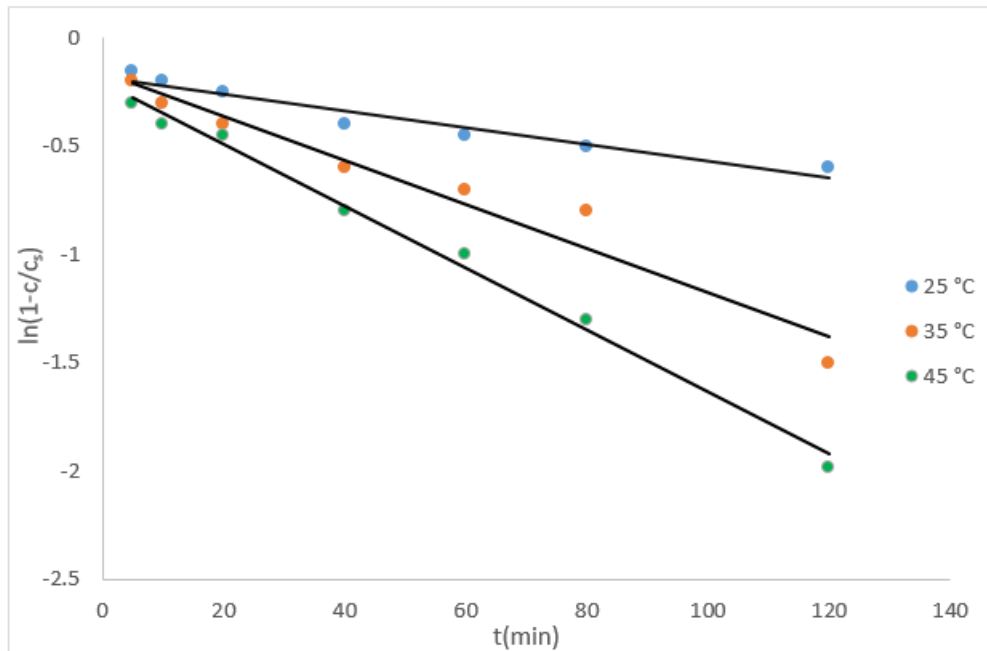
t – vrijeme

4.3.1. Model zasnovan na teoriji filma

Eksperimentalni podaci tokom perioda ekstrakcije su u skladu sa linearnom jednačinom modela zasnovanog na teoriji filma (5), kao što je ilustrovano na slikama 37 i 38, koje prikazuju zavisnost $\ln(1-c/c_s)$ od vremenska. Valjanost modela zasnovanog na teoriji filma potvrđuje linearni odnos između $\ln(1-c/c_s)$ i vremena, koji obuhvata cijeli proces ekstrakcije, uključujući faze ispiranja i faze ekstrakcije u ovom slučaju spora. Odsjek i nagib linearnog odnosa $\ln(1-c/c_s)$ i vremena korišćeni su za izračunavanje koeficijenta ispiranja (b') i koeficijenta spore ekstrakcije (k'). Proračun je sproveden korišćenjem eksperimentalnih podataka koji obuhvataju cijeli period ekstrakcije od 120 minuta, sa vremenskim intervalima od 5, 10, 20, 40, 80 i 120 minuta. Metodom najmanjih kvadrata izračunate su vrijednosti koeficijenta za procese ekstrakcije ukupnih fenola i ukupnih flavonoida, prikazani u tabelama 7 i 8.



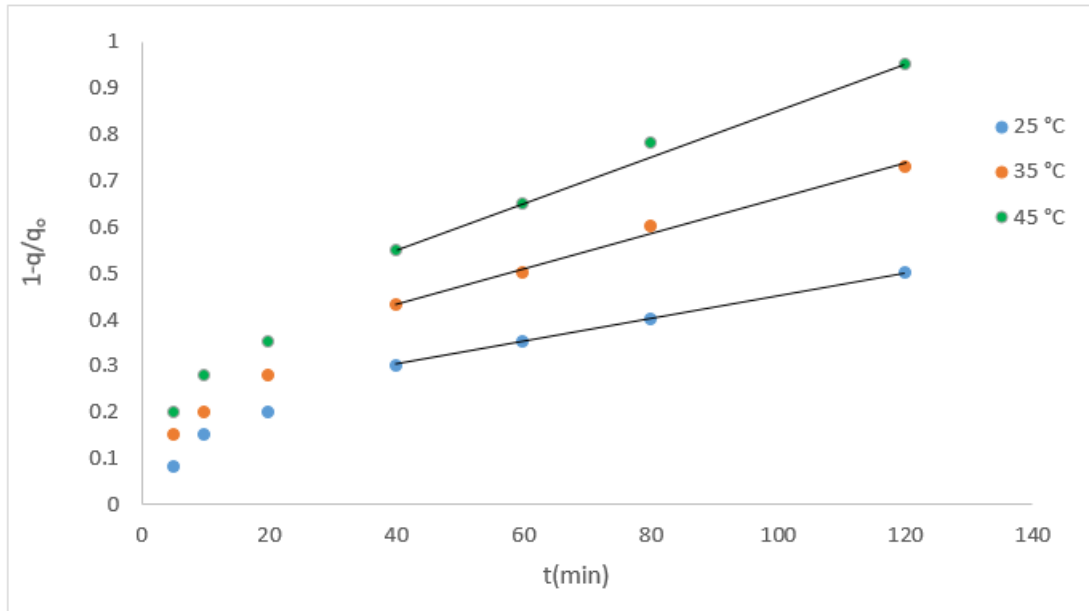
Slika 37. Vremenska zavisnost $\ln(1-c/c_s)$ tokom ekstrakcije ukupnih fenola iz ploda borovnice pri optimalnim uslovima (biljni materijal/alkohol 60 g/100 ml; alkohol: 50%-etanol)



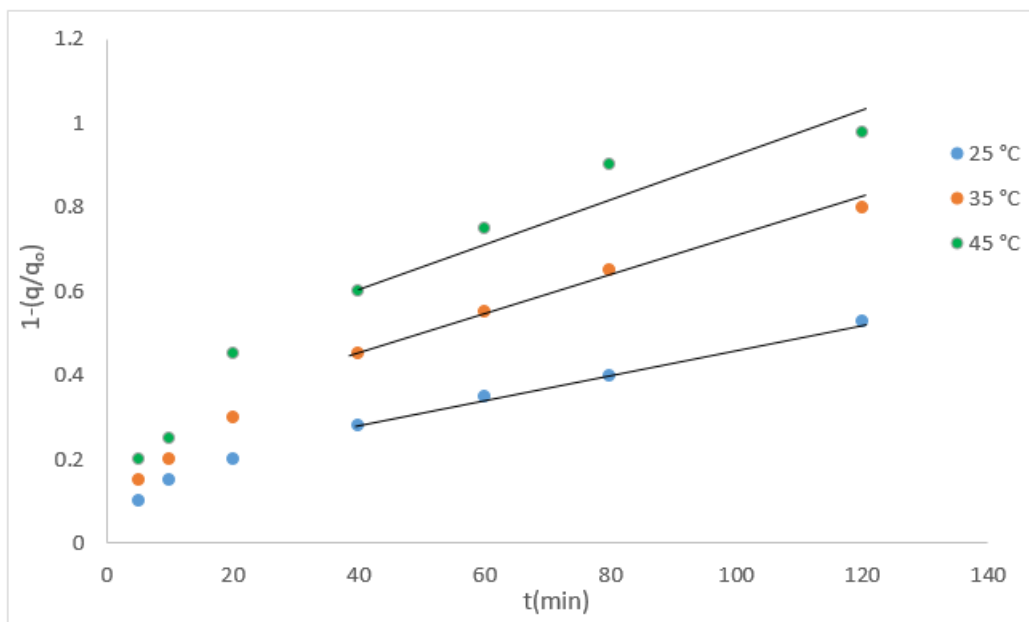
Slika 38. Vremenska zavisnost $\ln(1-c/c_s)$ tokom ekstrakcije ukupnih flavonoida iz ploda borovnice pri optimalnim uslovima (biljni materijal/alkohol 60 g/100 ml; alkohol: 50%-etanol)

4.3.2. Ponomarjev empirijski model

Zavisnosti $1-(q/q_0)$ od vremena su ilustrovane na slici 39 i slici 40. Ove brojke koriste Ponomarjev empirijski model i razmatraju optimalne uslove za ekstrakciju ukupnih flavonoida i fenola iz ploda borovnice. Metodom najmanjih kvadrata izračunate su vrijednosti koeficijenata kako pravca jednačine tako i koeficijenata ispiranja (6), samo iz oblasti spore ekstrakcije uzete su tačke. Koeficijenti pri temperaturi od 45 °C su pokazali svoje maksimalne vrijednosti kada je plod borovnice ekstrahovan (tabele 7 i 8).



Slika 39. Vremenska zavisnost $1-(q/q_0)$ tokom ekstrakcije ukupnih fenola iz ploda borovnice pri optimalnim uslovima (biljni materijal/alkohol 60 g/100 ml; alkohol: 50%-etanol)



Slika 40. Vremenska zavisnost $1-(q/q_0)$ tokom ekstrakcije ukupnih flavonoida iz ploda borovnice pri optimalnim uslovima (biljni materijal/alkohol 60 g/100 ml; alkohol: 50%-etanol)

4.3.3. Poređenje modela

Vrijednosti spore ekstrakcije i ispiranja tj. njihovi koeficijenti pri temperaturama koje su različite, određivane različitim modelima, prikazane su u tabeli 10. Koeficijenti konzistentno pokazuju rastući trend kako temperatura raste, prvenstveno zbog povećane rastvorljivosti ekstraktivnih supstanci i ekspanzije koeficijenta difuzije. Primijećeno je da su koeficijenti ispiranja (b) za model koji se zasniva na teoriji filma dosledno manji od onih za model Ponomarjeva na svim temperaturama. Što se tiče drugog parametra, koeficijenta spore ekstrakcije (k), vrijednosti dobijene iz modela zasnovanog na teoriji filma su dosledno veće od onih dobijenih iz modela Ponomarjevog , pri svim temperaturama.

Tabela 10. Vrijednosti spore ekstrakcije i ispiranja tj. njihovi koeficijenti tokom procesa kada je vršena ekstrakcija sadržaja fenola iz plodova borovnice.

	Temperatura, K	Koeficijent ispiranja	Koeficijent spore Ekstrakcije
Empirijski model	300	0,260	$2,73 \cdot 10^{-3}$
Ponomarjeva, b, k	310	0,342	$4,01 \cdot 10^{-3}$
	320	0,374	$5,06 \cdot 10^{-3}$
Model zasnovan na teoriji filma, b', k'	300	0,119	$4,48 \cdot 10^{-3}$
	310	0,078	$7,23 \cdot 10^{-3}$
	320	0,138	$14,05 \cdot 10^{-3}$

Tabela 11. Vrijednosti spore ekstrakcije i ispiranja tj. njihovi koeficijenti tokom procesa kada je vršena ekstrakcija sadržaja flavonoida iz plodova borovnice.

	Temperatura, K	Koeficijent ispiranja	Koeficijent spore Ekstrakcije
Empirijski model Ponomarjeva, <i>b, k</i>	300	0,201	$3,02 \cdot 10^{-3}$
	310	0,342	$4,96 \cdot 10^{-3}$
	320	0,385	$8,13 \cdot 10^{-3}$
Model zasnovan na teoriji filma, <i>b', k'</i>	300	0,087	$4,87 \cdot 10^{-3}$
	310	0,104	$10,02 \cdot 10^{-3}$
	320	0,355	$16,56 \cdot 10^{-3}$

Evidentno je da iz modela zasnovanog na teoriji filma (*b'*) koeficijenti ispiranja uglavnom su niži po vrijednosti od koeficijenata ispiranja izvedenih iz Ponomarjevog empirijskog modela (*b*). Proračun koji je dobijen korišćenjem modela zasnovanog na teoriji filma (*k'*) je dao bolje vrijednosti u poređenju sa koeficijenata spore ekstrakcije koja je izračunata korišćenjem empirijskog modela Ponomarjeva (*k*).

Tabela 12. Izračunati koeficijenti korelacije koeficijenata ispiranja pomoću različitih modela

	(<i>b</i>)	(<i>b'</i>)
(<i>b</i>)	1	0,8697
(<i>b'</i>)		1

Može se uočiti dobra korelacija među koeficijentima ispiranja određenih različitim modelima, što se može vidjeti u datoj tabeli.

4.4. Antioksidativna aktivnost ekstrakata poloda borovnice

Fenoli i flavonoidi, koji su suštinska komponenta ishrane ljudi i životinja i poseduju različite biološke aktivnosti, uključujući antioksidativna svojstva, čine jednu od najbrojnijih i najzastupljenijih klasa sekundarnih biljnih metabolita. Dakle, primarni izvor

antioksidativne aktivnosti su fenolna jedinjenja. Fenolna jedinjenja, odnosno flavonoidi, imaju sposobnost da ispolje svoje antioksidativno djelovanje direktnom reakcijom sa slobodnim radikalima i tako da proizvode manje reaktivne radikalne vrste (Venkatesa i sar., 2019).

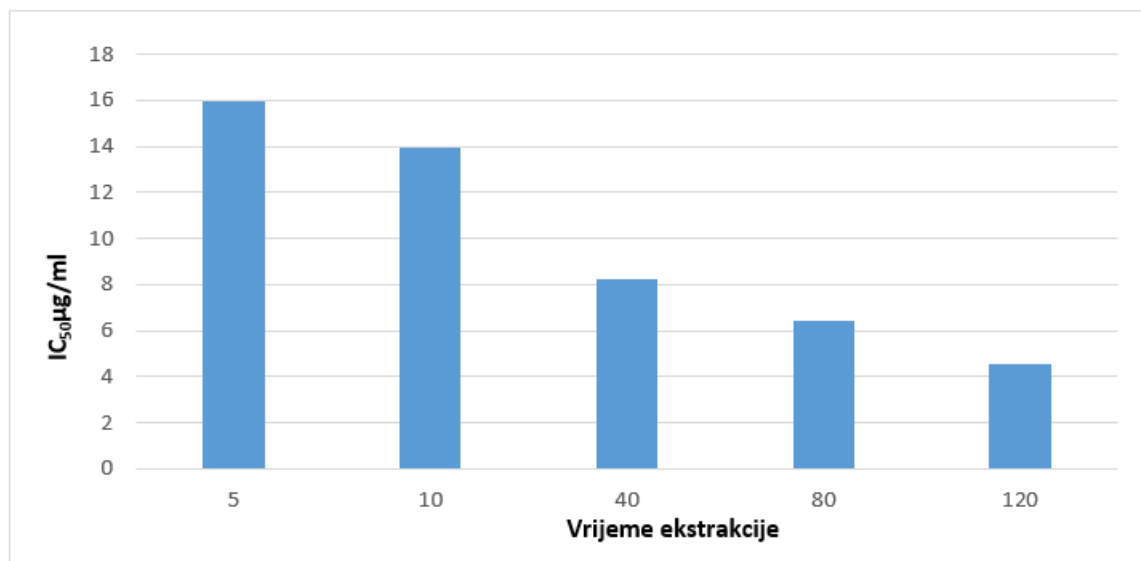
Neravnoteža između reaktivnih vrsta kiseonika i antioksidativnih odbrambenih sistema stvara oksidativni stres, koji je široko priznat kao primarni uzrok brojnih bolesti. Antioksidansi se razmatraju za liječenje ćelijske degeneracije jer blokiranjem oksidativne lančane reakcije inhibiraju ili odlažu oksidativni proces. Kada je ljudski organizam izložen stresu, reaktivne vrste kiseonika preovlađuju nad antioksidativnim vrstama. Ova neravnoteža rezultira degradacijom ćelije, što na kraju dovodi do toga da fiziološki sistemi izgube cijelu ili dio svoje funkcionalnosti (Shah i sar., 2015).

DPPH metoda je korišćena za utvrđivanje antioksidativne aktivnosti uzoraka koji su ispitivani u ovoj studiji. DPPH radikali su u početku obojeni ljubičasto; pri interakciji sa antioksidansom, transformišu se u žuti rastvor. Rezultati DPPH testa su označeni količinom antioksidanata koja je potrebna da se koncentracija radikala smanji za 50%. Antioksidativna aktivnost ekstrakta ploda borovnice prikazana je u tabeli 13, prema dobijenim rezultatima.

Iz rezultata prikazanih u tabeli 13, generisan je histogram (Slika 41) da vizuelno prikaže vremensku zavisnost antioksidativne aktivnosti ekstrakta ploda borovnice.

Tabela 13. Antioksidativna aktivnost ekstrakta ploda borovnice u zavisnosti od ekstrakcionog vremena

Vrijeme, min	Antioksidativna aktivnost ekstrakta ploda borovnice, IC ₅₀ µg/ml
5	15,96
10	13,90
40	8,22
80	6,45
120	4,55



Slika 41. Antioksidativna aktivnost ekstrakata ploda borovnice u zavisnosti od ekstrakcionog vremena

U ovom istraživanju, ekstrakti ploda borovnice su dobijeni postupkom maceracije i odrađena je antioksidativna aktivnost DPPH metodom: Nakon 120 minuta ekstrakcije ploda borovnice IC₅₀ vrijednost ekstrakta je 4,55 µg/mL. Pri DPPH metodi mjerenja antioksidativnog kapaciteta niže IC₅₀ vrijednosti ukazuju na viši antioksidativni potencijal (Rivero-Cruz, 2020). Iz dobijenih rezultata (tabela 12) se uočava da je na početku

mjerenja, poslije 5 minuta ekstrakcije, IC_{50} vrijednost iznosi 15,96 $\mu\text{g/ml}$. Rezultati pokazuju (slika 41) da manji antioksidativni potencijal ima uzorak na početku mjerenja, te da njegov potencijal sa vremenom raste. U studiji (Brašanac, 2022) potvrđeno je da je od ispitivanih ekstrakata ploda borovnice najbolji antioksidativni potencijal imao ekstrakt gdje je ekstrahovanje vršeno postupkom maceracije (vrijednost IC_{50} je 50.82 $\mu\text{g/mL}$), a za mjerenje antioksidativnog potencijala je korišćen DPPH test, u poređenju sa Soxhlet ekstrakcijom (IC_{50} 93.99 $\mu\text{g/mL}$) i vodenim maceratom (IC_{50} 105.46 $\mu\text{g/mL}$).

Najzastupljenija su istraživanja fenola u vinu i grožđu, ali je sve više studija o prisustvu fenolnih jedinjenja u drugom voću (Amarowicz i sar, 2009). Šavikin i sar. (2009) prijavili su da je IC_{50} vrijednost ekstrakta ploda borovnice bila 8,82 $\mu\text{g/mL}$, ova studija ukazuje na bolje poklapanje sa vrijednostima antioksidativnog potencijala ekstrakta ploda borovnice u ovom master radu. U tabeli 13 se može vidjeti da je antioksidativna aktivnost etanolnog ekstrakta ploda borovnice poslije 40 minuta ekstrakcije 8,22 $\mu\text{g/ml}$, što je približna vrijednost istraživanju Šavikin i saradnika (2009).

Takođe, Vulić i sar. (2012) su dokazali da ispitivana antioksidativna aktivnost ploda borovnice izražena u IC_{50} vrijednosti, iznosi 0,040 $\mu\text{g/mL}$ i taj uzorak je okarakterisan kao uzorak koji posjeduje prilično dobru aktivnost. (Vulić, 2012). U poređenju sa našim rezultatima dobijena najpribližnija vrijednost u ekstraktu ploda borovnice nakon 120 minuta, tabela 12, te da je u tom momentu antioksidativni potencijal najveći.

Okan i saradnici (2018) su u svom istraživanju poredili antioksidacijski kapacitet različitih sorti borovnice. Vrijednosti istraživanja su se razlikovale zbog primjene različitih uslova reakcije, najbolje vrijednosti iznosile su 1,10 – 5,65 $\mu\text{g/mL}$. Dakle, najveću antioksidacijsku aktivnost su pokazali plodovi divlje borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.) (Okan i sar., 2018).

5. ZAKLJUČAK

Borovnica (*Vaccinium myrtillus*) je voće koje se često ističe zbog visokog sadržaja antioksidanasa, uključujući fenole, flavonoide i druga jedinjenja. Antioksidanti pomažu u neutralizaciji slobodnih radikala u tijelu, čime se smanjuje oksidativni stres i potencijalni rizik od bolesti.

Na osnovu određenih optimalnih uslova ekstrakcije ukupnih flavonoida i fenola iz ploda borovnice, rezultata ispitivanja kinetike ekstrakcije, kao određivanja antioksidativne aktivnosti ekstrakata ploda borovnice, može se zaključiti:

- Za ekstrakciju ukupnih flavonoida i fenola iz ploda borovnice kao rastvarači koristili su se voda i (30, 50, 70 i 100%) etanol, čiji je odnos biljna sirovina/rastvarač (solvomodul) 30, 40, 50 i 60 (g/100 ml). Vršena je ekstrakcija pri različitim temperaturama rastvarača: 25, 35 i 45 °C.
- Uslovi pri kojima je vršena ekstrakcija sadržaja flavonoida i fenola iz ploda borovnice: rastvarač-alkohol 50%-etanol, (solvomodul) biljni materijal/etanol 60 (g/100 ml), i temperatura rastvarača 45 °C.
- U ekstraktu ploda borovnice dobijenom poslije 120 minuta ekstrakcije nađeno je najviše ukupnih fenola i iznosi 15,671 mg GAE/g.
- U ekstraktu ploda borovnice dobijenom poslije 120 minuta ekstrakcije nađeno je najviše ukupnih flavonoida i iznosi 12,060 mgQc/g
- Na osnovu rezultata dobijenih DPPH metodom, antioksidativni potencijal ekstrakata ploda borovnice raste sa vremenom jer $IC_{50}\mu\text{g/ml}$ sa vremenom opada. Poslije 5 minuta ekstrakcije vrijednost iznosi $IC_{50} 15,96 \mu\text{g/ml}$, sa vremenom ekstrakcije vrijednost opada i na kraju mjerenja, nakon 120 minuta, IC_{50} iznosi 4,55 $\mu\text{g/ml}$. Dobijeni rezultat je u skladu sa povećanjem sadržaja ukupnih flavonoida i fenola sa vremenom ekstrakcije u ispitivanim ekstraktima ploda borovnice.
- U kinetičkoj ekstrakciji ukupnih flavonoida i fenola iz plodova borovnice korišćena su dva modela: jedan je Ponomarjev empirijski model, a drugi model je

konstruisan korišćenjem teorije filma. Ponomarjev empirijski model u toku perioda ispiranja pokazuje dobre rezultate, a nasuprot njemu za period spore ekstrakcije model koji se zasniva na teoriji filma pokazuje bolje rezultate.

6. LITERATURA

1. Aiyer H. S., Vadhanam M. V., Stoyanova R., Caprio G. D., Clapper M. L., Gupta, R. C. Dietary berries and ellagic acid prevent oxidative DNA damage and modulate expression of DNA repair genes. *International journal of molecular sciences*, 9(3), 327–341 (2008).
2. Amarowicz R., Carle R., Dongowski G., Durazzo A., Galensa R., Kammerer D., Maiani G. and Piskula M.K., Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. *Molecular nutrition & food research*, 53(S2), 151-183 (2009).
3. Antolovich M., Prenzler P., Robards K., Ryan D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125(5), 989–1009, (2000).
4. Beccaro G. Mellano M.G., Botta R., Chiabrando V., Bounous G. Phenolic and anthocyanin content and antioxidant activity in fruits of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and of highbush blueberry (*V. corymbosum*) cultivars in North Western Italy. *Acta Horticulturae*, 715, 553–558 (2006).
5. Blagojević R., Božić V. Tehnologija proizvodnje kupine. Kancelarija za program podrške u privatnom sektoru za podršku sektoru voćarstva i bobičastog voća u Južnoj Srbiji, Niš, Srbija (2012).
6. Bobinaitė R., Viškelis P., Venskutonis P. R. Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars. *Food Chemistry*, 132(3), 1495–1501 (2012).
7. Brašanac S., Određivanje antioksidativne moći i kapaciteta usvajanja metala divlje borovnice (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) na području Crne Gore, Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija (2022).
8. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317–333 (1998).
9. Buettner G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Archives of biochemistry and biophysics*. 300(2), 535–543, (1993).
10. Castaneda-Ovando A., de Lourdes Pacheco-Hernández M., Páez-Hernández M. E., Rodríguez J. A., Galán-Vidal C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food chemistry*. 113(4), 859–871 (2009).
11. Castrejón A.D.R., Eichholz I., Rohn S., Kroh L.W. and Huyskens-Keil S., Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry*, 109(3), 564-572 (2008).
12. Cheynier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 223–229, (2005).
13. Chu W. K., Cheung S. C., Lau R. A., Benzie I. F. Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). *Lester Packer Ph. D.*, 55 (2011).
14. Čujić N., Kundaković T., Šavikin T. Antocijani-Kemijska analiza i biološka aktivnost. *Lekovite sirovine*. 33 (19) 37 (2013).

15. Dai J., Mumper R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313–7352, (2010).
16. de Ancos B., González E.M., Cano M.P. Ellagic Acid, Vitamin C, and Total Phenolic Contents and Radical Scavenging Capacity Affected by Freezing and Frozen Storage in Raspberry Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4565–4570 (2000).
17. Foti M.C. Use and abuse of the DPPH• radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63, 8765–8776 (2015).
18. Fraga C. G., Litterio M. C., Prince P. D., Calabró V., Piotrkowski B., Galleano M. Cocoa flavanols: effects on vascular nitric oxide and blood pressure. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 48(1), 63–67 (2010).
19. Graefe E. U., Wittig J., Mueller S., Riethling A. K., Uehleke B., Drewelow B., Pforte, H., Jacobasch G., Derendorf H., Veit M. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 41(5), 492–499 (2001).
20. Häkkinen S. H., Törrönen A. R. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food research international*, 33(6), 517–524 (2000).
21. Hemwimon S., Pavasant P., Shotipruk, A. Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Separation and Purification Technology*. 54, 44–50. (2007).
22. Jovančević M., J. Balijagić N., Menković K., Šavikin G., Zdunić T., Janković and M. Dekić-Ivanković. Analysis of phenolic compounds in wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) from Montenegro. *Journal of Medicinal Plants Research*, (6), 910–914 (2011).
23. Kähkönen M. P., & Heinonen M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(3), 628–633 (2003).
24. Kedare S.B., Singh R.P., Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*. 48(4), 412–422 (2011).
25. Lima G. P. P., Vianello F., Corrêa C. R., da Silva Campos R. A., Borguini M. G. Polyphenols in fruits and vegetables and its effect on human health, *Food and Nutrition sciences* (2014).
26. Liu R. H. Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 4(3), 384–392 (2013).
27. Liu R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of nutrition*, 134(12), 3479–3485 (2004).
28. Määttä-Riihinen K., Kähkönen M., Törrönen R., Heinonen M. Catechins and procyanidins in berries of *Vaccinium* species and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(22), 8485–849 (2005).
29. Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 230–242 (2005).
30. Manganaris G. A., Goulas V., Vicente A. R., Terry L. A. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(5), 825–833 (2014).

31. Markham K.R. Flavones, flavonols and their glycosides. U: Harborne, J.B., Dey, P.M. (Eds.), *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, London, 193-237 (1989).
32. Milić B., Đilas S., & Čanadanović-Brunet J. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata žalfije (*Salvia officinalis* L.) ESR spektroskopijom. *Acta periodica technologica*, 31, 635–644 (2000).
33. Mitić V.Z., Usporedna spektroskopska analiza jona prelaznih metala. Master rad, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija (2018).
34. Mladěnka P., Macáková K., Filipický T., Zatloukalová L., Jahodář L., Bovicelli P., Proietti Silvestri I., Hrdina R., Saso L. In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *Journal of inorganic biochemistry*, 105(5), 693–701 (2011).
35. Moller J. K. S., Madsen H. L., Altonen T., Skibsted L. H. Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. *Food Chemistry*, 64, 215–219 (1999).
36. Može Š., Polak T., Gašperlin L., Koron D., Vanzo A., Ulrih N.P., Abram V. Phenolics in Slovenian bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (59) 6998-7004 (2011).
37. Mratinić E.: *Borovnica i brusnica*, Partenon, Beograd, Srbija (2015).
38. Munteanu I.G., Apetrei C., Analytical methods used in determining antioxidant activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(7), 3380 (2021).
39. Nikolić M., Milivojević J., *Jagodaste voćke: tehnologija gajenja*. Naučno voćarsko društvo Srbije, Čačak, Srbija (2010).
40. Nile S. H., Park S. W. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30(2), 134–144 (2014).
41. Okan O.T., Deniz I., Yayli N., Sat I.G., Oz M., Hatipoglu Serdar G., Antioxidant activity, sugar content and phenolic profiling of blueberries cultivars: A comprehensive comparison. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(2), 639–652 (2018).
42. Orčić D. Vrste tribusa Scandiceae (Apiaceae Lindley 1836, subfam. Apioideae) potencijalni izvor biološki i farmakološki aktivnih sekundarnih biomolekula. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu, Novi Sad, Srbija (2010).
43. Oszmiański J., Wojdylo A. *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 221(6), 809–813, (2005).
44. Pandey K. B., Rizvi S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(5), 270–278 (2009).
45. Ponomarev V. D.. *Ekstragirovanje lekarstvennogo syr'ya*. Medicina. Moscow (1976).
46. Radojković M. M., Zeković Z. P., Vidović S. S., Kočar D. D., & Mašković P. Z. Free radical scavenging activity and total phenolic and flavonoid contents of mulberry (*Morus* spp. L., Moraceae) extracts. *Hemijska industrija*, 66(4), 547–552 (2012).

47. Ribarova F., Atanassova M., Marinova D. Total phenolics and flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University Chemical Technology and Metallurgy*, 40 (3), 255-260 (2005)
48. Rietjens I. M., Boersma M. G., de Haan L., Spenkelink B., Awad H. M., Cnubben N. H., van Zande J. J., van der Woude H., Alink G. M., & Koeman J. H. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environmental toxicology and pharmacology*, 11(3), 321–333 (2002).
49. Rivero-Cruz J. F., Granados-Pineda J., Pedraza-Chaverri J., Pérez-Rojas J. M., Kumar-Passari A., Diaz-Ruiz G., Rivero-Cruz B. E., Phytochemical constituents, antioxidant, cytotoxic, and antimicrobial activities of the ethanolic extract of Mexican brown propolis. *Antioxidants*, 9(1), 70 (2020).
50. Savić Lj., Metode ekstrakcije biljnih materijala: usporedna analiza cirkulatorne ekstrakcije i ekstrakcije primenom superkritičnog ugljen-dioksida. Institut za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić", Beograd (2014).
51. Šavikin K., Zduniš G., Jankoviš T., Tasiš S., Menkoviš N., Steviš T., Đorđević B.: Phenolic content and radical scavenging capacity of berries and related jams from certificated area in Serbia. *Plant foods for human nutrition*. 64, 212-217 (2009).
52. Shah P., Modi H.A., Comparative study of DPPH, ABTS and FRAP assays for determination of antioxidant activity. *International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology*. 3(6), 636-641 (2015).
53. Shahidi F., & Naczk M. Phenolic compounds in fruits and vegetables. In: *Phenolics in food and nutraceuticals*. Boca Raton, FL: CRC Press, 131–156 (2004).
54. Skupień K. Chemical composition of blueberry fruit chemical composition of selected cultivars of highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.), *Folia Horticulturae*, 47–56 (2006).
55. Stajčić S. M., Tepić A. N., Đilas S. M., Šumić Z. M., Čanadanović-Brunet J. M., Četković G. S., Vulić J. J., & Tumbas V. T. Chemical composition and antioxidant activity of berry fruits. *Acta Periodica Technologica*, (43), 93–105 (2012).
56. Stančević A. *Praktično voćarstvo*. Neven, Zemun, Srbija (2002).
57. Stojanović B. T., Hemijski sastav i antioksidativna aktivnost metanolnih i acetonskih ekstrakata pulpe i kore odabranih vrsta voća sa područja Jugoistočne Srbije, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija (2015).
58. Su, Z. Anthocyanins and flavonoids of *Vaccinium* L. *Pharmaceutical Crops*, 3, 7–37 (2012).
59. Šućur J. Biopesticidna aktivnost ekstrakata odabranih biljnih vrsta familije Lamiaceae. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu, Novi Sad, Srbija (2015).
60. Šumić Z., Optimizacija sušenja voća u vakuumu, Doktorska disertacija, УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ, Srbija (2014).
61. Szajdek A., Borowska E. J., Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: A review, *Plant foods for human nutrition*, 63 (4), 147–156 (2008).
62. Tanaka Y., Sasaki N., Ohmiya A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, 54(4), 733–749 (2008).

63. Tasić M., Ispitivanje fenolnog sastava i antioksidativne aktivnosti ekstrakata biljne vrste *Forsythia europaea*. Master rad, Prirodno-matematički fakultet - Departman za hemiju, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija (2017).
64. Teixeira J., Gaspar A., Garrido E.M., Garrido J., Borges F., Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. *BioMed Research International* (2013).
65. Tepić A. Bojene materije voća i povrća. Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija (2012).
66. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246 (2010).
67. Tumbas V. Antiradikalska i antiproliferativna aktivnost ekstrakata odabranih biljaka iz familija Rosaceae i Ericaceae. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija (2010).
68. Turkoglu A., Duru M.E., Mercan N., Kivrak I., Gezer K. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bill.) Murrill. *Food Chemistry*, 101, 267-273 (2007).
69. Veljković V., Dragan M. Milenković. Analiza ekstrakcije rezinoida kantariona (*Hypericum perforatum* L.): II. poređenje modela kinetike ekstrakcije (2002).
70. Venkatesan T., Choi Y.W., Kim Y.K., Impact of different extraction solvents on phenolic content and antioxidant potential of *Pinus densiflora* bark extract. *BioMed Research International* (2019).
71. Vinčić M., Antioxidative, Antiproliferative and Antimicrobial Activity of Selected Berry Pomace Extracts, Doctoral dissertation, University of Novi Sad, Serbia (2017).
72. Vitković A. Određivanje antioksidativnih karakteristika odabranih gljiva roda *Lactarius*, Master rad, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija (2017).
73. Vračar Lj. Priručnik za kontrolu kvaliteta svežeg i prerađenog voća, povrća i pečurki i osvežavajućih bezalkoholnih pića. Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija (2001).
74. Vučić D.M., Petković M.R., Rodić-Grabovac B.B., Stefanović O.D., Vasić S.M., Čomić L.R. Antibacterial and antioxidant activities of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in vitro. *African Journal of Microbiology Research*, 7, 5130–5136 (2013).
75. Vulić J. J., Tumbas V. T., Savatović S. M., Đilas S. M., Četković G. S., Čanadanović-Brunet J. M. Polyphenolic content and antioxidant activity of the four berry fruits pomace extracts. *Acta periodica technologica*, 42, 271-279 (2011).
76. Wang S. Y., Camp M. J., & Ehlenfeldt M. K. Antioxidant capacity and α glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (*Vaccinium* spp.) cultivars. *Food Chemistry*, 132(4), 1759–1768 (2012).
77. Yao L. H., Jiang Y. M., Shi J., Tomas-Barberan F. A., Datta N., Singanusong R., Chen S. S. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualities Plantarum)*, 59(3), 113–122 (2004).