

UNIVERZITET CRNE GORE

METALURŠKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET

HEMIJSKA TEHNOLOGIJA

SANJA BLAGOJEVIĆ

**SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE POLIFENOLA U
PLODU I EKSTRAKTIMA PLODA ARONIJE – HEMOMETRIJSKI
PRISTUP**

MASTER RAD

Podgorica, 2025. godine

UNIVERZITET CRNE GORE

METALURŠKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET

HEMIJSKA TEHNOLOGIJA

SANJA BLAGOJEVIĆ

**SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE POLIFENOLA U
PLODU I EKSTRAKTIMA PLODA ARONIJE – HEMOMETRIJSKI
PRISTUP**

MASTER RAD

Podgorica, 2025. godine

PODACI I INFORMACIJE O MAGISTRANDU

Ime i prezime: Sanja Blagojević

Datum i mjesto rođenja: 24.10.2000. Nikšić

Institucija: Univerzitet Crne Gore - Podgorica

Naziv završenog osnovnog studijskog programa i godina završetka studija: Hemijska tehnologija, 2022. godine

INFORMACIJE O MAGISTARSKOM RADU

Naziv studija: Hemijska tehnologija

Naslov rada: Spektrofotometrijsko određivanje polifenola u plodu i ekstraktima ploda aronije –
Hemometrijski pristup

Fakultet: Metalurško-tehnološki fakultet

UDK, OCJENA I ODBRANA MASTER RADA

UDK:

Datum prijave rada: 03.04.2025. godine

Datum prihvatanja teme: 19.05.2025. godine

Mentor: Prof. dr Nada Blagojević, redovni profesor

Komisija za ocjenu rada:

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, MTF, predsjednik

Prof. dr Nada Blagojević, MTF, mentor

Prof. dr Vesna Vukašinović-Pešić, MTF, član

Komisija za odbranu rada:

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, MTF, predsjednik

Prof. dr Nada Blagojević, MTF, mentor

Prof. dr Vesna Vukašinović-Pešić, MTF, član

Lektor: Autolektura

Datum odbrane: 2025. godine

IZJAVA O AUTORSTVU

Kandidat: Sanja Blagojević

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

IZJAVLJUJEM

pod punom krivičnom i materijalnom odgovornošću da je master rad pod nazivom „Spektrofotometrijsko određivanje polifenola u plodu i ekstraktima ploda aronije – Hemometrijski pristup” rezultat sopstvenog istraživačkog rada da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica i da je navedeni rad moje originalno djelo.

U Podgorici,

Potpis studenta:

Zahvalnica

Ovaj master rad realizovan je na Metalurško-tehnološkom fakultetu Univerziteta Crne Gore u Podgorici, u okviru laboratorija za Analitičku hemiju, Instrumentalne metode i Organsku hemijsku tehnologiju.

Posebnu i najiskreniju zahvalnost dugujem svojoj mentorki, prof. dr Nadi Blagojević, koja je svojim znanjem, strpljenjem i neumornim vođenjem učinila da svaki korak izrade ovog rada bude smislen i inspirativan. Njena stručna podrška i savjeti bili su od neprocjenjive važnosti za kvalitet i uspješnu realizaciju ovog master rada.

Zahvaljujem se članovima komisije, prof. dr Vesni Vukašinović Pešić i prof. dr Biljani Damjanović Vratnici, na korisnim sugestijama i savjetima koji su doprinikli kvalitetu ovog rada.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Snežani Vukanović i kolegici MApp Gordani Bošković za pomoć pri pripremi materijala i izvođenju hemijskih analiza.

Takođe se zahvaljujem prof. dr Ani Savić sa PMF fakulteta, Univerziteta u Nišu, na pomoći oko statističke obrade podataka.

Iskreno se zahvaljujem svojoj porodici i prijateljima na podršci, razumijevanju i ohrabrenju, bez kojih realizacija ovog rada ne bi bila moguća.

Ovaj master rad posvećujem svojim sestrama, Sari i Jeleni, u znak zahvalnosti za njihovu bezuslovnu ljubav, stalnu podršku i inspiraciju koja me je pratila kroz svaki korak studija.

Sanja Blagojević

IZVOD

Cilj ovog rada bio je spektrofotometrijsko ispitivanje antioksidativnih svojstava i ukupnih fenolnih jedinjenja u svježem plodu aronije (*Aronia melanocarpa*) i u ekstraktima dobijenim različitim metodama ekstrakcije (Sokslet, maceracija, ekstrakcija vrućom vodom i ultrazvučna ekstrakcija), uz razmatranje uticaja geografskog porijekla uzorka. Kvantifikovani su ukupan sadržaj fenola, flavonoida, antocijana i tanina, dok je antioksidativna aktivnost određena DPPH i FRAP metodama. Paralelno je ispitana povezanost sa mikroelementima (Mn, Fe, Cu, Zn), a rezultati su statistički obrađeni (ANOVA, Pearsonova korelacija).

U svježem plodu sadržaj ukupnih fenola kretao se od 100,63 do 2055,217 mg GAE/100 g uzorka, flavonoida od 109,28 do 266,65 mg Qc/100 g, antocijana od 0,2361 do 0,5013%, tanina od 0,091 do 1,1462%, dok su vrijednosti antioksidativne aktivnosti određene DPPH testom, IC₅₀, iznosile 0,002182–0,0292 µg/mL, a vrijednosti određene FRAP testom 0,1369–0,4183 µmol Fe²⁺/g.

U ekstraktima aronije najviši sadržaj fenola zabilježen je kod ultrazvučne ekstrakcije u opsegu 1599,28–2056,99 mg GAE/100 g, dok su infuzioni ekstrakti imali najveće količine flavonoida (2351,3–4186,2 mg Qc/100 g) i tanina (7,895–12,011%). Najniže IC₅₀ vrijednosti dobijene DPPH metodom, koje ukazuju na najjaču antioksidativnu aktivnost, uočene su kod macerata (0,000315–0,0321 µg/mL). FRAP vrijednosti su varirale između metoda, pri čemu su najviše izmjerene kod ekstrakata dobijenih vrućom vodom sa vrijednošću od 20,0677 µmol Fe²⁺/g. Analiza sadržaja metala u svježem plodu pokazala je da su vrijednosti za Zn bile u opsegu 2,935–3,708 µg/g, Fe 2,968–5,729 µg/g, Cu 0,491–0,841 µg/g, a Mn 1,857–4,332 µg/g. U ekstraktima, koncentracije mikroelemenata su varirale: Fe 0,251–1,564 µg/g, Zn 0,759–5,704 µg/g, Cu 0,2164–3,736 µg/g i Mn 0,528–8,739 µg/g. Jednofaktorska ANOVA analiza pokazala je da lokalitet i metoda ekstrakcije značajno utiču na sadržaj svih ispitivanih parametara. Primjenom Friedmanovog testa utvrđene su statistički značajne razlike među metodama ekstrakcije za sve ispitivane parametre. Istom metodom, ekstrakcijom vrućom vodom, utvrđena je najveća vrijednost za flavonoide (3165,64) a najniža vrijednost za antocijane (0,36). Najveći sadržaj Zn, Cu, Mn zabilježen je ekstrakcijom vrućom vodom, dok je svježi uzorak imao najveći sadržaj Fe, (4,92; 1,71; 6,71; 4,47; respektivno). Spearmanova analiza je pokazala da fenoli, flavonoidi i tanini imaju snažnu pozitivnu korelaciju sa FRAP vrijednostima, dok je kod DPPH testa uočena negativna korelacija sa IC₅₀ vrijednostima, što potvrđuje da su fenoli glavni nosioci antioksidativnog potencijala ekstrakata.

Ključne riječi: Aronija, fenoli, flavonoidi, antocijani, tanini, DPPH, FRAP, metali, ekstrakt.

ABSTRACT

The aim of this study was to spectrophotometrically investigate the antioxidant properties and total phenolic compounds in fresh chokeberry fruit (*Aronia melanocarpa*) and in extracts obtained by different extraction methods (Soxhlet, maceration, hot water extraction, and ultrasonic extraction), with consideration of the influence of the geographical origin of the sample. The total content of phenols, flavonoids, anthocyanins, and tannins was quantified, while antioxidant activity was determined using the DPPH and FRAP methods. In parallel, the relationship with microelements (Mn, Fe, Cu, Zn) was examined, and the results were statistically processed (ANOVA, Pearson correlation). In fresh fruit, the total phenolic content ranged from 100.63 to 2055.22 mg GAE/100 g sample, flavonoids from 109.28 to 266.65 mg Qc/100 g, anthocyanins from 0.2361 to 0.5013%, tannins from 0.091 to 1.1462%, while antioxidant activity values determined by the DPPH test (IC_{50}) were 0.002182–0.0292 $\mu\text{g/mL}$, and for the FRAP test 0.1369–0.4183 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$.

In chokeberry extracts, the highest phenolic content was recorded in ultrasonic extracts (1599.28–2056.99 mg GAE/100 g), while infusion extracts contained the highest amounts of flavonoids (2351.3–4186.2 mg Qc/100 g) and tannins (7.895–12.011%). The lowest IC_{50} values obtained by the DPPH method, indicating the strongest antioxidant activity, were observed in macerates (0.000315–0.0321 $\mu\text{g/mL}$). FRAP values varied depending on the extraction method, with the highest values recorded in hot water extracts (20.0677 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$).

The analysis of metal content in fresh fruit showed that Zn ranged from 2.935 to 3.708 $\mu\text{g/g}$, Fe from 2.968 to 5.729 $\mu\text{g/g}$, Cu from 0.491 to 0.841 $\mu\text{g/g}$, and Mn from 1.857 to 4.332 $\mu\text{g/g}$. In extracts, microelement concentrations varied: Fe 0.251–1.564 $\mu\text{g/g}$, Zn 0.759–5.704 $\mu\text{g/g}$, Cu 0.2164–3.736 $\mu\text{g/g}$, and Mn 0.528–8.739 $\mu\text{g/g}$.

One-way ANOVA analysis showed that both the locality and the extraction method significantly influenced the content of all tested parameters. The Friedman test confirmed statistically significant differences among extraction methods for all parameters. Using the same method, hot water extraction, the highest value was determined for flavonoids (3165.64) and the lowest value for anthocyanins (0.36). The highest contents of Zn, Cu, and Mn were obtained by hot water extraction, while fresh fruit showed the highest Fe content (4.92; 1.71; 6.71; 4.47; respectively). Spearman correlation analysis revealed a strong positive correlation of phenols, flavonoids, and tannins with FRAP values, while the DPPH test showed a negative correlation with IC_{50} values, confirming that phenolic compounds are the main contributors to the antioxidant potential of chokeberry extracts.

Keywords: chokeberry, phenols, flavonoids, anthocyanins, tannins, DPPH, FRAP, metals, extract

SADRŽAJ

1. UVOD	13
2. TEORIJSKI DIO.....	15
2.1. Botaničke karakteristike i hemijski sastav aronije (Aronia melanocarpa).....	15
2.2. Aronija kao izvor fenola, flavonoida, antocijana, tanina, mikro- i makro-elemenata.....	16
2.3. Metode ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja	18
2.3.1. Maceracija	19
2.3.2. Sokslet ekstrakcija.....	19
2.3.3. Ultrazvučna ekstrakcija	20
2.3.4. Ekstrakcija vrućom vodom.....	22
2.3.5. Hemometrija-Osnovni pojmovi i mogućnost primjene	23
3. EKSPERIMENTALNI DIO	24
3.1. Hemikalije i instrumentacija.....	24
3.2. Postupak pripreme biljnog materijala za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz suvog ploda aronije	25
3.3. Spektrofotometrijska analiza antioksidativnih svojstava i fenolnih jedinjenja u svježem plodu aronije i ekstraktima suvog ploda aronije.....	26
3.3.1. Kvantifikacija fenola u svježem plodu aronije i ekstraktima suvog ploda aronije.....	26
3.3.2. Kvantitativna analiza ukupnih flavonoida u svježem plodu aronije i ekstraktima suvog ploda aronije.....	28
3.3.3. Spektrofotometrijsko određivanje antocijana u svježem plodu aronije i ekstraktima suvog ploda aronije.....	29
3.3.4. Spektrofotometrijsko određivanje tanina u svježem plodu aronije i ekstraktima suvog ploda aronije.....	31
3.3.5. Metode za procjenu antioksidativnog potencijala (DPPH i FRAP) u svježem plodu aronije i ekstraktima suvog ploda aronije.....	31
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	34
4.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u svježem plodu aronije i ekstraktima suvog ploda aronije.....	34
4.2. Sadržaj ukupnih flavonoida u svježem plodu aronije i ekstraktima suvog ploda aronije	37
4.3. Sadržaj ukupnih antocijana u svježem plodu aronije i ekstraktima suvog ploda aronije	39
4.4. Sadržaj ukupnih tanina u svježem plodu aronije i ekstraktima suvog ploda aronije	42
4.5. Antioksidativna aktivnost svježeg ploda i ekstrakata suvog ploda aronije (DPPH i FRAP metode)	44

4.6. Analiza sadržaja mikroelemenata u svježem plodu aronije i ekstraktima suvog ploda aronije	49
5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	52
5.1. Pearsonova korelacija između sadržaja fenolnih jedinjenja, mikroelemenata i antioksidativne aktivnosti u uzorcima svježeg ploda aronije i ekstrakata suvog ploda aronije	52
5.2. ANOVA, Friedmanov test i Spearmanov koeficijent korelacije	53
5.3. Friedmanov test	54
5.4. Sadržaj bioaktivnih jedinjenja i antioksidativni potencijal po lokalitetima i po metodama ekstrakcije (ANOVA analiza).....	58
5.5. Sadržaj metala po lokalitetima i po metodama ekstrakcije (ANOVA analiza)	61
5.6. Korelacija antioksidativna aktivnost – sadržaj bioaktivnih jedinjenja – metali (Spearmanov koeficijent korelacije)	63
Korelacija između sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti.....	65
6. ZAKLJUČAK.....	66
7. LITERATURA	68

1. UVOD

Savremeni način života, praćen nezdravim navikama u ishrani i stalnim izlaganjem oksidativnom stresu, sve više usmjerava pažnju naučne i stručne javnosti ka pronalaženju prirodnih izvora bioaktivnih jedinjenja koja mogu doprinijeti očuvanju zdravlja. Među brojnim biljnim vrstama koje se ističu po bogatstvu antioksidativnih komponenti, aronija (*Aronia melanocarpa*) zauzima posebno mjesto zbog visokog sadržaja polifenolnih jedinjenja, naročito flavonoida i antocijana. Ova bobičasta voćka, iako potiče iz Sjeverne Amerike, uspješno se gaji i na prostoru Crne Gore, gdje klimatski i pedološki uslovi doprinose raznolikosti njenog hemijskog sastava.

Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka sa izraženom biološkom aktivnošću, među kojima dominiraju antioksidativna, antiinflamatorna i antimikrobna svojstva. Njihovo prisustvo u ishrani povezano je sa smanjenjem rizika od hroničnih nezaraznih bolesti, uključujući kardiovaskularne poremećaje, dijabetes tipa 2 i određene vrste maligniteta. S obzirom na značaj ovih jedinjenja, neophodno je razvijati i primjenjivati pouzdane metode za njihovu kvantitativnu analizu, a spektrofotometrija se, zbog svoje jednostavnosti, brzine i ekonomičnosti, pokazala kao efikasna tehnika u procjeni ukupnog sadržaja polifenola u biljnim matricama.

U okviru ovog istraživanja, ispitivan je sadržaj ukupnih polifenola u svježem plodu aronije i u ekstraktima dobijenim različitim metodama ekstrakcije: maceracijom, Sokslet ekstrakcijom, ultrazvučnom ekstrakcijom i ekstrakcijom vrućom vodom (infuzom). Kao rastvarači korišćeni su etanol i voda. Dodatnu vrijednost ovom radu daje činjenica da su uzorci aronije prikupljeni sa četiri različita područja Crne Gore, čime je omogućena analiza uticaja geografskog porijekla na sadržaj polifenolnih jedinjenja. U okviru istraživanja, pored određivanja antioksidativnog kapaciteta, određivani su i mikroelementi svježeg ploda i dobijenih ekstrakata aronije. Osim spektrofotometrijskog određivanja polifenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti, u radu je primijenjena i hemometrijska obrada podataka, uključujući analizu glavnih komponenti (PCA), radi boljeg razumijevanja odnosa između različitih ekstrakata aronije i njihovog hemijskog sastava.

Cilj ovog rada bio je da se odredi antioksidativni kapacitet svježeg ploda aronije i njegovih ekstrakata, kao i da se ispita uticaj metode ekstrakcije i geografskog porijekla na rezultate dobijene analizom. Upoređivanjem metoda ekstrakcije i lokacija uzorkovanja, rad pruža uvid u optimalne uslove za izolaciju fenolnih komponenti iz aronije, što može biti od značaja za njenu dalju primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Takođe, cilj je bio i da se uradi statistička obrada dobijenih rezultata radi utvrđivanja značajnih razlika između metoda ekstrakcije i lokaliteta uzorkovanja, kao i

utvrđivanja korelacije između dobijenih podataka. U tu svrhu primijenjena je hemometrijska analiza, koja omogućava tumačenje kompleksnih eksperimentalnih rezultata i izdvajanje ključnih faktora koji utiču na hemijski sastav i antioksidativnu aktivnost ekstrakata.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Botaničke karakteristike i hemijski sastav aronije (*Aronia melanocarpa*)

Crna aronija (*Aronia melanocarpa*), žbunasta biljka iz porodice *Rosaceae*, prirodno je rasprostranjena u oblasti Sjeverne Amerike, posebno u Sjedinjenim Američkim Državama. Tokom ranih decenija 20. vijeka, njene sorte su prenesene u zemlje bivšeg Sovjetskog Saveza, kao i u druge evropske države, gdje je započeo organizovani uzgoj ove biljke (Zielińska i sar., 2024).

Grm aronije dostiže visinu od 2 do 3 metra i tokom proljeća, u periodu od maja do juna, formira bijele cvjetove grupisane u štitaste cvasti. Listovi su dugi 3 do 7 cm, glatki i eliptičnog oblika. Sa naličja su svijetlozeleni, dok su sa lica tamnozeleni, sjajni, i tokom jeseni poprimaju crvenkastu nijansu (Milutinović, 2020). Plodovi sazrijevaju u zavisnosti od vrste – mogu biti crveni ili tamnoljubičasti do gotovo crni. Njihov prečnik je 6 do 13 mm, a masa između 0,5 i 2 grama. Mehanička berba se obavlja krajem ljeta, najčešće od avgusta do septembra. Puni prinos se postiže nakon pet godina, kada biljka daje između 5 i 12 tona po hektaru (Kulling i Rawel, 2008). Plodovi aronije se brzo kvare, pa se moraju preraditi. Najčešće se suše ili prerađuju u sokove. Sušenjem se čuvaju bioaktivne komponente, a najefikasnijom se pokazala liofilizacija (sušenje smržavanjem). Kombinovane metode, poput sušenja mikrotalasima pod vakuumom, omogućavaju brzo sušenje uz očuvanje korisnih sastojaka (Gurčik, 2023).

Hemijski sastav zavisi od sorte, zrelosti i uslova gajenja. Suva materija u plodu iznosi 15–30%, dok sadržaj proteina dostiže 3,7 g/100 g suve mase. Najveća količina aminokiselina se nalazi u komini. U svježem plodu ima 0,09–0,17% masti, najviše u sjemenkama i pokožici. Komina sadrži oko 5,5% masti, pretežno linolnu i oleinsku kiselinu. Ugljeni hidrati su prisutni u količini od 6–21 g/100 g, a dominiraju fruktoza, glukoza i sorbitol. Plodovi sadrže vitamine B, C, K, karotenoide i tokoferole, kao i makro- i mikroelemente (K, Ca, Mg, Fe, Zn) (Sidor i Gramza-Michałowska, 2019).

Aronija uspijeva u umjerenim klimatskim uslovima. Zahvaljujući otpornosti na niske temperature, može da podnese temperature i do -35 °C. Na našim prostorima prisutna je više od pola vijeka. Širu upotrebu doživljava tek u poslednjih nekoliko godina (Ćuljić, 2017). Na slici 1 prikazan je izgled ploda aronije.



Slika 1. Plodovi biljne vrste *Aronia melanocarpa* (Foto: Blagojević Sanja)

2.2. Aronija kao izvor fenola, flavonoida, antocijana, tanina, mikro- i makro-elemenata

U posljednjih nekoliko godina, primjena prirodnih proizvoda značajno je porasla, što je povezano sa sve većim naporima u borbi protiv hroničnih bolesti. Plodovi crne aronije (*Aronia melanocarpa*), sitni i tamne boje, veličine borovnice, postali su predmet brojnih istraživanja zbog visokog sadržaja antioksidanata, sličnog onom koji se nalazi u drugim voćnim vrstama poznatim po povoljnom dejstvu na zdravlje (Jurikova i sar., 2017). Posebnu pažnju privlače bobičaste biljke koje su još uvijek nedovoljno zastupljene u ishrani, poput zove i aronije, jer predstavljaju bogat izvor bioaktivnih materija koje se koriste kao prirodne boje u hrani, ali i u svrhe unaprjeđenja zdravlja. Aronija se izdvojila kao posebno zanimljiva zbog svojih snažnih antioksidativnih svojstava, što se prvenstveno pripisuje visokom udjelu fenolnih jedinjenja, naročito antocijana, među kojima dominiraju derivati cijanidina (McGhie i Walton, 2007; Rodriguez-Mateos 2013; Lee i sar., 2014; Bolling i sar., 2014; Vagiri i Jensen, 2017; Tolić i sar., 2017).

Pored polifenola, aronija je bogata i drugim korisnim bioaktivnim komponentama kao što su vitamini C i E, minerali poput kalijuma, kalcijuma i magnezijuma, zatim karotenoidi, pektini, organske kiseline i u manjoj mjeri ugljeni hidrati. Ovakav hemijski sastav svrstava aroniju među najvrijednije vrste voća, sa širokim spektrom potencijalno korisnih dejstava u prevenciji i ublažavanju hroničnih bolesti. Zahvaljujući prisustvu ovih bioaktivnih supstanci, aronija ispoljava i druge korisne biološke efekte

potvrđene kako u *in vitro*, tako i u *in vivo* uslovima. Među njima se izdvajaju gastroprotektivno dejstvo, hepatoprotektivno, antiproliferativno, kao i doprinos prevenciji i liječenju dijabetesa (Valcheva-Kuzmanova i sar, 2005; Valcheva-Kuzmanova i Belcheva, 2006; Jurgonski i sar., 2008; Ciocoiu i sar, 2013).

Polifenoli čine najvažniju grupu antioksidanata u svakodnevnoj ishrani čoveka. Aronija se ističe kao jedan od najbogatijih izvora ovih jedinjenja među bobičastim vrstama (Jurendić i Ščetar, 2021). Gralec i sar. (2019) ukazuju da se sadržaj i sastav polifenola mijenjaju tokom sazrijevanja ploda, s tim da je najviši nivo ukupnih fenola zabilježen u ranim fazama zrelosti. Takođe je dokazano da vremenski uslovi, naročito visoke temperature i velika izloženost suncu, pozitivno utiču na povećanje ukupnog fenolnog sadržaja u soku (Tolić i sar., 2017). Komina aronije sadrži znatno više polifenola od samog soka, sa koncentracijama između 3100 i 6300 mg/100 g suvog materijala, a frakcije bez sjemenki pokazuju veću koncentraciju od onih koje ih sadrže. Osim u plodu, polifenoli su prisutni i u listovima, gdje njihove vrijednosti mogu dostići i do 9148 mg/100 g, posebno kod starijih listova (Szopa i sar., 2017). Prema istraživanjima preporučeni prosječan dnevni unos polifenola iznosi oko 1 g (Malik i sar., 2023).

Kada je riječ o flavonoidima prisutnim u plodovima aronije, dominantne podgrupe su antocijani, proantocijanidini, flavonoli i flavanoli (katehini). Flavonolni glikozidi čine približno 10% ukupnog sadržaja polifenola, pri čemu su najzastupljeniji kvercetin 3-O-galaktozid i kvercetin 3-O-glukozid (Oszmianski, 2005). Sadržaji flavonoida i proantocijanidina u ekstraktima crne aronije viši su u poređenju sa ekstraktima drugih bobičastih plodova kao što su crna ribizla, kupine, borovnice (*Vaccinium myrtillus*), crvene ribizle, maline i jagode (Jakobek, 2007).

Aronija je veoma bogat izvor antocijana, koji čine oko četvrtinu ukupnih polifenola u plodu. Glavni tipovi antocijana u aroniji su različiti glikozidi cijanidina, pri čemu je najzastupljeniji 3-O-galaktozid, a manje zastupljeni su 3-O-glukozid, 3-O-arabinozid i 3-O-ksilozid. Koncentracija antocijana u aroniji može da se kreće od 307 do 1480 mg na 100 g svježe mase. Jedno istraživanje je pokazalo da antocijani čine oko 41% ukupnih polifenola, što je znatno više nego kod crvene maline (19%) i jagode (23%). Kako plod sazrijeva, količina antocijana raste, što rezultuje intenzivnijom bojom i atraktivnijim izgledom. Ipak, tokom prerade plodova, sadržaj antocijana može značajno opasti. Listovi aronije imaju znatno niži nivo antocijana, sa manje od 2 mg na 100 g suve materije (Jurendić i Ščetar, 2021).

Istraživanja *in vitro* su pokazala da tanini imaju izraženu antioksidativnu aktivnost. Oni djeluju kao inhibitori lipidne peroksidacije i enzima lipoksigenaze, čime sprečavaju oštećenje ćelijskih membrana

izazvanih oksidativnim stresom. Osim toga, tanini efikasno neutrališu slobodne radikale, uključujući hidroksilne, superoksidne i peroksidne radikale, koji su poznati po svom prooksidativnom potencijalu. Takođe, ispoljavaju antimikrobna svojstva inhibirajući rast štetnih bakterijskih sojeva, što može doprinijeti održavanju zdrave crijevne mikroflore. Zapaženo je da određeni tanini posjeduju sposobnost inhibicije citopatogenih efekata HIV virusa, što ih čini potencijalno korisnim u antivirusnim strategijama. Pored toga, ispitivanja su pokazala antiproliferativno dejstvo tanina na različite ćelijske linije karcinoma, uključujući tumore dojke, prostate, debelog crijeva i melanom, što dodatno potvrđuje njihov terapijski potencijal (Simić, 2018). U jednom od istraživanja (Rosca i sar, 2024), koje je obuhvatilo različite sorte aronije, utvrđeno je da sorta *Alecsandrina* sadrži najmanju količinu tanina (2,079%), što predstavlja više od 33% nižu vrijednost u odnosu na maksimalno izmjeren sadržaj kod sorte *Nero* (3,11%). Sorta *Viking* imala je umjerenu koncentraciju tanina (2,494%).

Listovi aronije predstavljaju značajan izvor makro- i mikroelemenata, što je posebno važno kada se koriste za pripremu infuza, jer se mineralne materije lako prenose u vodenu fazu. Prema istraživanju Cvetkovića i sar. (2018), fosfor je identifikovan kao najzastupljeniji makroelement u ekstraktu listova aronije, dok su sledeći po zastupljenosti magnezijum, kalijum, natrijum i kalcijum. Kada je riječ o mikroelementima, najviše je prisutno gvožđe, a zatim slijede cink, mangan i bakar. Međutim, druga istraživanja (Staszowska-Karkut, 2020) su pokazala niži sadržaj tih makroelemenata. Takođe, prema rezultatima Pavlovića i sar. (2015), listovi aronije generalno sadrže veću količinu mineralnih materija u odnosu na plodove, osim kada je u pitanju kalijum, koji je bio više zastupljen u plodovima.

2.3. Metode ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja

Ekstrakcija je postupak prenosa rastvorljivih supstanci iz jedne faze u drugu. Predstavlja ključni korak u istraživanju ljekovitih biljaka, jer omogućava izdvajanje ciljanih jedinjenja za dalju analizu (Fonmbohi sar., 2020). Aktivne komponente mogu se izdvojiti različitim metodama, a uslovi ekstrakcije zavise od više faktora: stepena usitnjenosti sirovine, odnosa sirovine i rastvarača, temperature, pritiska i vrste korišćenog rastvarača odn. ekstragensa (Radojković, 2012).

Efikasnost ekstrakcije zavisi od više faktora, među kojima je posebno važna priprema biljnog materijala, kao i izbor odgovarajućeg rastvarača. Usitnjavanje biljne droge poboljšava kontakt između materijala i rastvarača, čime se omogućava efikasnije izdvajanje aktivnih supstanci. Rastvarač, odnosno ekstragens, mora biti pažljivo odabran kako bi se postigao što veći prinos ekstrakcije i

istovremeno izbjeglo izdvajanje neželjenih komponenti. Pri tome je važna i selektivnost rastvarača, odnosno njegova sposobnost da izdvoji željene komponente. U praksi se često koriste različiti organski rastvarači poput etilmeta, hloroforma, metilen-hlorida i benzola, koji mogu efikasno ekstrahovati bioaktivne supstance. Ipak, zbog njihove toksičnosti za ljudski organizam, ovakvi ekstrakti najčešće predstavljaju samo međufazu u proizvodnji farmaceutskih preparata. Značajnu prednost predstavlja primjena smjese etanola i vode, koja je bezbjedna i često se koristi za izdvajanje jedinjenja kao što su fenoli, flavonoidi, tanini, šećeri i određeni vitamini. (Vidović, 2011).

2.3.1. Maceracija

Maceracija predstavlja jednu od konvencionalnih metoda ekstrakcije koja podrazumijeva potapanje biljnog materijala u odgovarajući rastvarač tokom dužeg vremenskog perioda. Iako je vremenski zahtjevana, zbog svoje praktičnosti često se koristi, naročito u ekstrakciji bioaktivnih jedinjenja iz biljaka. Efikasnost maceracije zavisi od količine sirovine, izbora rastvarača i trajanja procesa. Uobičajeni rastvarači uključuju metanol, etanol, etil-acetat i destilovanu vodu, dok se alternativno mogu koristiti i rastvarači poput heksana, hloroforma ili propanola, uz pažljivo razmatranje njihove toksičnosti i cijene (Tambun i sar., 2021). Maceracija je metoda koja je naročito pogodna za izdvajanje termolabilnih jedinjenja. Sam proces se zasniva na molekularnoj difuziji, pri čemu dolazi do prelaska rastvorljivih supstanci iz biljnog materijala u izabrani rastvarač tokom određenog vremena. Sprovodi se u zatvorenim sistemima kako bi se izbjeglo isparavanje rastvarača i očuvala efikasnost ekstrakcije (Patel i sar., 2019).

2.3.2. Sokslet ekstrakcija

Ekstrakciju koju je razvio von Sokslet još 1879. godine dugo je bila jedna od najrasprostranjenijih i najvažnijih metoda za izdvajanje aktivnih supstanci iz čvrstih uzoraka. Ova tehnika se decenijama smatra standardom i često se koristi kao referenca prilikom upoređivanja novih metoda ekstrakcije. Kako bi se otklonili nedostaci originalnog Sokslet postupka, kao što su duga ekstrakcija i velika potrošnja rastvarača, tokom vremena su razvijene brojne modifikacije. One su uključivale primjenu dodatnih izvora energije i automatizaciju procesa, čime je vrijeme ekstrakcije znatno skraćeno, a efikasnost povećana. I pored pojave savremenih tehnika, Sokslet metoda i dalje ostaje model za procjenu i unaprjeđenje ekstrakcije čvrstih materijala (Castro i Priego-Capote, 2010).

Ključna prednost metode je to što uzorak neprekidno dolazi u kontakt sa „svježim“ rastvaračem koji se kontinuirano destiluje i kondenzuje unutar aparature. Rastvarač isparava iz destilacionog balona, kondenzuje se u kondenzatoru, kaplje na biljni materijal u čauri i kada dostigne određeni nivo, vraća se sifonom u balon, čime se zatvara ciklus. Proces se automatski ponavlja dok se ekstrakcija ne završi. Metoda je posebno pogodna za ekstrakciju jedinjenja koja su termički stabilna, jer se koristi temperatura ključanja rastvarača. Prednosti uključuju visoku efikasnost ekstrakcije i minimalnu potrošnju rastvarača, ali su ograničenja u primjeni vezana za nemogućnost ekstrakcije termolabilnih supstanci i neprilagođenost za industrijski obim. (Naviglio i sar., 2019). Kao rastvarači najčešće se koriste metanol i voda, a mogu se primijeniti i drugi poput heksana, hloroforma, butanola i propanola (Tambun i sar., 2021). Na slici 2, prikazana je aparatura za izvođenje Sokslet ekstrakcije koja je korišćena prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela u ovom radu.



Slika 2. Aparatura za izvođenje Sokslet ekstrakcije (Foto: Blagojević Sanja)

2.3.3. Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvuk se definiše kao zvučni talas frekvencije iznad 20 kHz. Izvor ultrazvučne energije najčešće je tijelo koje osciluje, prenoseći vibracije na okolni medijum i na taj način omogućava prostiranje talasa kroz tečnost, gas ili čvrstu materiju. U kontekstu ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja, ključni parametri ultrazvuka su snaga, frekvencija i amplituda. Ultrazvučna ekstrakcija je metoda koja

kombinuje ultrazvučnu energiju i rastvarače za efikasno izdvajanje ciljanih komponenti iz biljnog matriksa. Efektivni opseg frekvencije za ekstrakciju obično je između 20 i 50 kHz. Primjena ultrazvuka u tečnom medijumu dovodi do pojave kavitacije, vibracija, miješanja i lokalizovanog razaranja biljnog tkiva, što značajno olakšava oslobađanje bioaktivnih jedinjenja iz ćelijske strukture. Kavitacija, kao dominantni mehanizam, nastaje kada negativni pritisak izazvan prolaskom ultrazvučnih talasa premaši kohezione sile unutar tečnosti, što dovodi do formiranja mjehurića. Ovi mjehurići rastu sve dok ne postanu nestabilni, nakon čega se naglo urušavaju – proces koji se naziva kolaps mjehurića. Kolaps, odnosno naglo urušavanje mjehurića, oslobađa velike količine energije u vrlo kratkom vremenskom intervalu, pri čemu se u lokalizovanom području generišu ekstremne temperature i pritisci. Ovi uslovi dovode do stvaranja jakih sila smicanja i mikro-turbulencija, koje mehanički oštećuju ćelijske zidove biljnih tkiva, omogućavajući time lakše oslobađanje i rastvaranje bioaktivnih jedinjenja u izabranom rastvaraču. Upravo ovaj mehanizam – formiranje i kolaps kavitacionih mjehurića – predstavlja osnovu djelovanja ultrazvuka u procesu ekstrakcije i jedan je od glavnih razloga povećane efikasnosti u odnosu na konvencionalne metode (Kumar i sar., 2019, Wen i sar., 2018).

Prednost ove metode ogleda se i u njenoj svestranosti – može se kombinovati sa različitim rastvaračima (polarni i nepolarni), pri različitim temperaturama, čime se povećava ekstrakcioni prinos, a vrijeme procesa se značajno skraćuje (Anaya-Esparza, 2023).

Na slici 3 prikazana je aparatura korišćena za izvođenje ultrazvučne ekstrakcija (UZ) aronije.



Slika 3. Aparatura za ultrazvučnu ekstrakciju korišćena u istraživanju (Foto: Blagojević Sanja)

2.3.4. Ekstrakcija vrućom vodom

Ovo je metoda koja podrazumijeva usitnjavanje biljnog materijala u fini prah. Nakon toga, materijal se potapa u hladan ili topao rastvarač na kratko vrijeme. Efikasna je za brzo izdvajanje lako rastvorljivih bioaktivnih jedinjenja. Često se koristi za dobijanje svježih ekstrakata za neposrednu upotrebu. Ova metoda se uglavnom primjenjuje na djelove biljaka kao što su listovi, cvjetovi i nadzemni dijelovi zeljastih biljaka (Rudraswamy, 2021). Na slici 4 prikazane su četiri staklene laboratorijske čaše sa uzorcima aronije sa različitih lokaliteta, korišćene za izvođenje ekstrakcije vrućom vodom.

Hladna infuzija podrazumijeva potapanje biljnog materijala u hladnu vodu, uz stajanje tokom noći. Ova varijanta zahtijeva posebnu pažnju kada se koriste biljke bogate sluzavim supstancama, jer su osjetljivije i zahtijevaju visoke higijenske standarde i stabilne uslove (Poljarec, 2017).



Slika 4. Staklene posude sa uzorcima aronije tokom izvođenja ekstrakcije vrućom vodom (Foto: Blagojević Sanja)

2.3.5. Hemometrija-Osnovni pojmovi i mogućnost primjene

Hemometrija je interdisciplinarna oblast koja koristi matematičke i statističke modele kako bi unaprijedila planiranje eksperimenata i analizu podataka u hemijskim istraživanjima. Za razliku od tradicionalnih pristupa, koji često pokušavaju da objasne ponašanje supstanci na molekulskom nivou, hemometrijski modeli se fokusiraju na kvantitativne relacije između eksperimentalno posmatranih varijabli. Takvi modeli omogućavaju procjenu i predviđanje rezultata bez detaljnog razmatranja unutrašnjih hemijskih mehanizama. Poseban značaj hemometrija ima u obradi spektralnih podataka, gdje transformacije signala pomažu u identifikaciji informacija od fizičkog značaja. Time se omogućava efikasnija interpretacija složenih mjerenja, što je od ključne važnosti u primjenama kao što su medicinska dijagnostika i mikrobiološke analize. U praksi su razvijeni brojni alati, uključujući metode digitalne obrade signala i različite strategije za kalibraciju, koje povezuju izmjerene vrijednosti sa koncentracijama analita. Savremeni hemometrijski pristupi često uključuju upotrebu naprednih algoritama, kao što su neuronske mreže i genetski algoritmi, kako bi se unaprijedila preciznost predviđanja. Hemometrija je naučna disciplina koja ima posebnu primjenu u analitičkoj hemiji, čiji je cilj da se iz određenog skupa podataka, izdvoje korisne informacije. Takođe, hemometrija ima veliku primjenu, kako u naučnim istraživanjima, tako i u proizvodnim procesima (Schlager, 1995; Perić-Grujić, 2012).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio istraživanja ovog master rada, realizovan je u okviru Laboratorije za instrumentalne metode hemijske analize, Laboratorije za analitičku hemiju i Laboratorije za organsku hemijsku tehnologiju, na Metalurško-tehnološkom fakultetu, Univerziteta Crne Gore, u Podgorici.

Kao uzorak biljnog materijala korišćeni su plodovi gajene aronije (*Aronia melanocarpa*), prikupljeni tokom avgusta 2024. godine sa četiri različite lokacije na teritoriji Crne Gore: Pavino Polje, Berane, Plav i Plužine. Nakon branja, dio uzoraka je podvrgnut sušenju, a zatim mehanički usitnjen do fine granulacije, dok je drugi dio ostavljen u zamrzivaču u svježem stanju radi daljeg istraživanja. Oba oblika, suvi i svježi plodovi, korišćeni su za dalje postupke i hemijske analize.

Prikupljeni uzorci predstavljaju osnovu za ispitivanje uticaja različitih ekstrakcionih metoda na sadržaj bioaktivnih komponenti, kao i za analizu antioksidativne aktivnosti aronije, u zavisnosti od njenog geografskog porijekla i stanja uzorka (svjež ili suv plod).

3.1. Hemikalije i instrumentacija

Tokom eksperimentalnog rada korišćene su hemikalije analitičke čistoće, a rastvori su pripremani pomoću destilovane vode. Od osnovnih rastvarača i reagensa upotrijebljeni su etanol (96%), metanol, hlorovodonična kiselina (HCl, 35%), azotna kiselina (HNO₃, 65%), vodonik-peroksid (H₂O₂, 30%), kao i natrijum-hidroksid (NaOH), natrijum-karbonat (Na₂CO₃) i natrijum-nitrit (NaNO₂).

Za određivanje ukupnog sadržaja fenola primijenjen je Folin–Ciocalteu reagens, dok je galna kiselina korišćena kao standard. Sadržaj flavonoida određen je pomoću aluminijum(III)-hlorida (AlCl₃), uz upotrebu kvercetina kao referentnog jedinjenja. Antioksidativna aktivnost analizirana je DPPH metodom (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), kao i FRAP metodom, u kojoj su korišćeni acetatni pufer, gvožđe(III)-hlorid heksahidrat (FeCl₃·6H₂O) i 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ). Pored toga, u analizama tanina primijenjeni su kožni prah i pirogallol visoke čistoće.

Od laboratorijske opreme i instrumenata korišćeni su: sušnica BIOBASE, BOV-D53 za prethodnu pripremu biljnih uzoraka, ultrazvučno kupatilo SONIC ViMS 4GT za ekstrakcione procedure, standardna Sokslet aparatura, kao i spektrofotometar BUCK Scientific 105 UV-VIS za spektrofotometrijska mjerenja. Kvantitativna analiza metala vršena je uz pomoć atomskog apsorpcionog spektrometra Perkin Elmer PinAAcle 900T.

3.2. Postupak pripreme biljnog materijala za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz suvog ploda aronije

Jedan dio svježih plodova čuvan je zamrznut, dok je drugi dio osušen, usitnjen do odgovarajuće granulacije i čuvan na sobnoj temperaturi. Za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz suvog ploda aronije primijenjene su četiri metode ekstrakcije:

- 1) Maceracija: Za ekstrakciju je korišćeno 10 grama osušenih i samljevenih plodova, koji su potopljeni u 200 mL etanola (96,4%) i ostavljeni da stoje pet dana na sobnoj temperaturi. Uzorak je čuvan u zatvorenoj posudi, zaštićen od svjetlosti, uz povremeno miješanje jednom do dva puta dnevno. Nakon završetka procesa, smješa je filtrirana, a dobijeni ekstrakt koncentrisan uklanjanjem rastvarača i dalje sušen do postizanja konstantne mase.
- 2) Sokslet ekstrakcija: Deset grama prethodno pripremljenog biljnog materijala usitnjenog do odgovarajuće granulacije stavljeno je u čauru od filter papira, koja je zatim postavljena u ekstrakcionu komoru Sokslet aparata. Aparat je povezan sa balonom, koji je sadržao 200 mL etanola (96,4%), i kondenzatorom. Ekstrakcija je sprovedena na temperaturi ključanja rastvarača, uz pet ciklusa sifoniranja. Nakon završetka procesa, rastvarač je uklonjen uparavanjem, a ekstrakt osušen do postizanja konstantne mase.
- 3) Ultrazvučna ekstrakcija: 10 g usitnjenog uzorka preliveno je sa 200 mL etanola (96,4%) i tretirano u ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 30 minuta, pri sobnoj temperaturi i frekvenciji od 50 Hz. Po završetku ekstrakcije, smješa je filtrirana, a rastvarač uklonjen uparavanjem. Dobijeni ekstrakt je zatim sušen do konstantne mase.
- 4) Ekstrakcija vrućom vodom: Deset grama prethodno osušenog i samljevenog biljnog materijala preliveno je sa 200 mL vode zagrijane do ključanja. Ekstrakcija je sprovedena tako što je smješa ostavljena da odstoji 90 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, ekstrakt je filtriran, rastvarač uklonjen uparavanjem, a preostali ekstrakt sušen do konstantne mase.

U tabeli 1 su prikazani prinosi ekstrakata dobijenih iz suvih plodova aronije sa četiri lokaliteta: Berane, Bijelo Polje, Plužine i Plav.

Tabela 1. Prinosi ekstrakata (%) suvog ploda aronije sa četiri različita lokaliteta

Metode ekstrakcije	Lokalitet			
	Pavino Polje	Berane	Plav	Plužine
Maceracija	31%	32%	47%	35%
Ekstrakcija vrućom vodom	41,5%	30,9%	38,7%	38,3%
Ultrazvučna ekstrakcija	35,7%	36,9%	42,7%	32,2%
Sokslet ekstrakcija	51,7%	65%	63,4%	74,1%

Najveći prinos ekstrakata je dobijen Sokslet ekstrakcijom suvog ploda aronije iz Plužina (74,1%), dok je najmanji prinos zabilježen metodom maceracije, sa najnižom vrijednošću od 31% iz suvog ploda aronije iz Pavinog Polja. Ekstrakcija vrućom vodom i ultrazvučna ekstrakcija pokazuju srednje vrijednosti prinosa, sa relativno ujednačenim rezultatima između lokaliteta. Ovi podaci ukazuju na značajan uticaj metode ekstrakcije i geografskog porijekla ploda na dobijene prinose, što je važno za optimizaciju procesa dobijanja bioaktivnih supstanci iz aronije. U istraživanju Medvedova i sar. (2023), Sokslet ekstrakcijom je dobijen najveći prinos, a zatim maceracijom, što je u saglasnosti sa prethodnim navodima da metoda ekstrakcije utiče na prinos ekstrakta. U studiji D'Alessandro i sar. (2014), navodi se da ultrazvuk značajno ubrzava proces ekstrakcije, ali da sam prinos više zavisi od temperature i izbora rastvarača.

3.3. Spektrofotometrijska analiza antioksidativnih svojstava i fenolnih jedinjenja u svježem plodu aronije i ekstraktima suvog ploda aronije

3.3.1. Kvantifikacija fenola u svježem plodu aronije i ekstraktima suvog ploda aronije

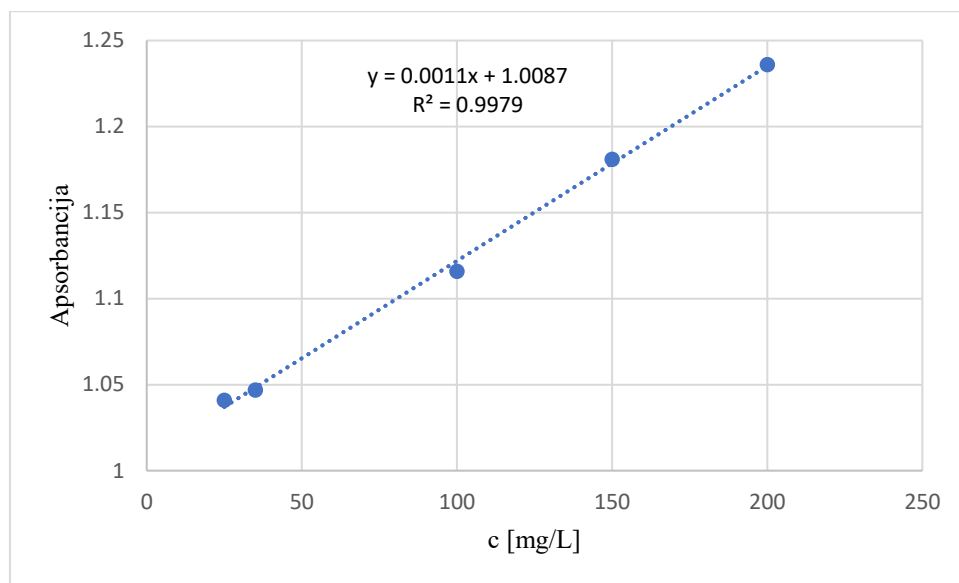
Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima određen je primjenom kolorimetrijske metode zasnovane na reakciji sa Folin–Ciocalteu reagensom (slika 5). Folin–Ciocalteu (F–C) test se obično koristi za mjerenje antioksidativnog kapaciteta i zasniva se na procesu u kojem se prenosi jedan elektron. Pretpostavlja se da fenolna jedinjenja predaju jedan elektron molibdenu u hemijskom rastvoru reagensa, pri čemu se molibden mijenja iz oblika Mo(VI) u Mo(V), što rezultuje plavim obojenjem (Everette i sar., 2010). Fenoli su glavne supstance koje doprinose antioksidativnim svojstvima plodova crne aronije (Catana i sar., 2017). Fenolna jedinjenja, poznata i kao polifenoli, čine jednu od najzastupljenijih grupa prirodnih materija biljnog porijekla, sa više od 8000 identifikovanih jedinjenja. Tokom poslednjih decenija izazvala su veliko interesovanje kako naučnika,

tako i potrošača, zahvaljujući svojim snažnim antioksidativnim svojstvima i povoljnim efektima na zdravlje. Blagotvorni efekti polifenola na zdravlje ostvaruju se kroz više različitih mehanizama. Oni djeluju tako što neutrališu slobodne radikale, štite i obnavljaju druge antioksidanse prisutne u ishrani, poput vitamina E, kao i vezivanjem (heliranjem) metala koji mogu podstaći oksidativne procese (Simić, 2018).

Za određivanje ukupne koncentracije fenolnih jedinjenja izrađena je kalibraciona kriva na osnovu standardnih rastvora galne kiseline u koncentracionom opsegu od 2,5 mg/L do 40 mg/L, dok je apsorbancija mjerena na talasnoj dužini od 740 nm. Na osnovu dobijenih vrijednosti konstruisana je kalibraciona prava koja je prikazana na slici 6.



Slika 5. Plava boja u sudovima kao rezultat određivanja ukupnog sadržaja fenola korišćenjem Folin-Ciocalteu (FC) reagensa (Foto: Blagojević Sanja)



Slika 6. Kalibraciona kriva za određivanje ukupnih fenola

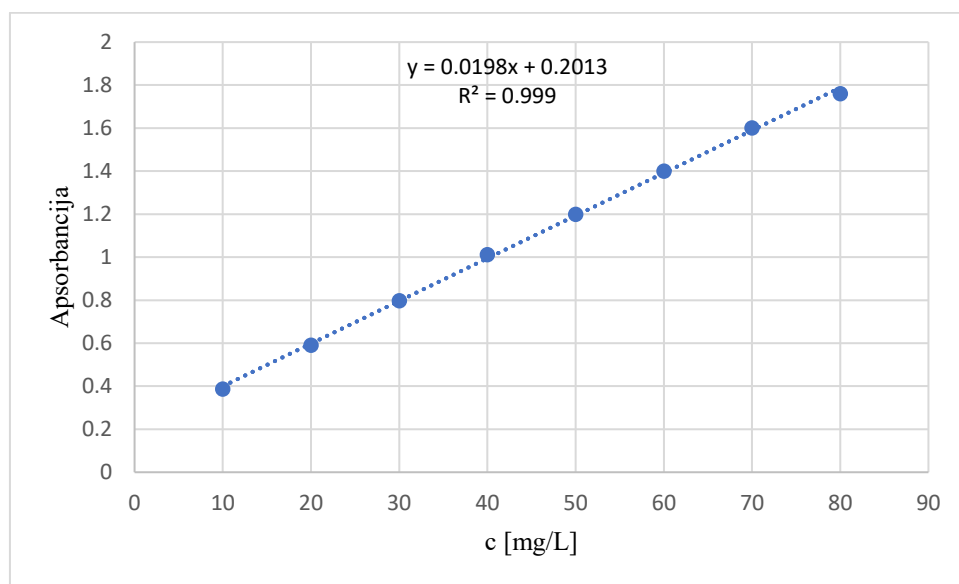
Kalibraciona kriva dobijena za određivanje ukupnog sadržaja fenola pokazala je visoku linearnost u posmatranom koncentracionom opsegu, sa koeficijentom determinacije $R^2=0,9979$. Linearna regresiona jednačina kojom je izražena zavisnost apsorbanije od koncentracije galne kiseline je: $y=0,0011x+1,0087$. Ova jednačina je korišćena za izračunavanje koncentracije fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima, a rezultati su izraženi kao mg GAE/100 g svježeg biljnog materijala/suvog ekstrakta (mg GAE/100 g $\pm$ standardna devijacija).

3.3.2. Kvantitativna analiza ukupnih flavonoida u svježem plodu aronije i ekstraktima suvog ploda aronije

Flavonoidi čine najbrojniju podgrupu biljnih polifenolnih jedinjenja. To su vodorastvorljivi biljni pigmenti koji su prisutni pretežno u ćelijskom soku, odnosno vakuolama ćelija i epidermisu. U biljci imaju značajnu zaštitnu ulogu, djeluju kao antioksidanti i štite biljku od patogenih mikroorganizama i štetnog UV zračenja. Kada je riječ o aroniji, među najzastupljenijim flavonoidima identifikovani su glikozidi kvercetina (Beecher, 2003; Kokotkiewicz sr. 2010).

Za određivanje sadržaja flavonoida primijenjena je metoda navedena u Evropskoj farmakopeji (Ph. Eur. 9.0) (Council of Europe, 2016), uz određene modifikacije prema radovima Brašanac-Vukanović i saradnika (2018) i Blagolević i sar. (2023). Analiza je sprovedena spektrofotometrijski, koristeći aluminijum-hlorid kao reagens. U ispitivanje su uključeni svježi plodovi, biljni ekstrakti, 5% rastvor

natrijum-nitrita (NaNO_2), 1% rastvor aluminijum-hlorida (AlCl_3) i 1 mol/L rastvor natrijum-hidroksida (NaOH). Apsorbancija uzoraka je mjerena na talasnoj dužini od 415 nm. Za potrebe kvantifikacije korišćena je kalibraciona kriva (slika 7) dobijena iz serije standardnih rastvora kvercetina, sa koeficijentom determinacije $R^2=0,999$, a rezultati su izraženi u miligramima ekvivalenta kvercetina na 100 grama svježeg biljnog materijala/suvog ekstrakta ($\text{mg Qc}/100 \text{ g} \pm$ standardna devijacija). Jednačina $y=0,0198x+0,2013$ je korišćena za izračunavanje flavonoida u ispitivanim uzorcima.



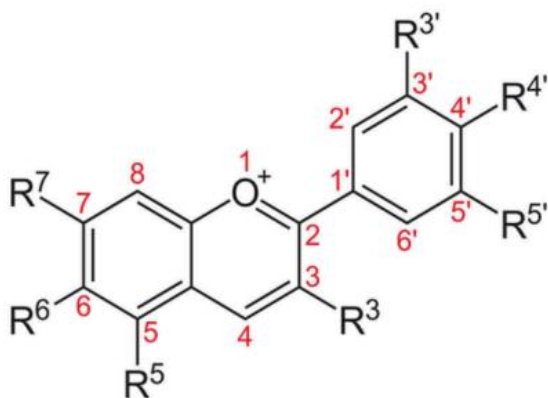
Slika 7. Kalibraciona kriva za kvantifikaciju ukupnih flavonoida

3.3.3. Spektrofotometrijsko određivanje antocijana u svježem plodu aronije i ekstraktima suvog ploda aronije

Antocijani su pigmenti koji biljkama daju plavu, crvenu ili ljubičastu boju, a najčešće se nalaze u cvjetovima, plodovima i krtolama. Njihova boja zavisi od pH sredine — u kiselim uslovima prisutna je crvena boja (slika 8), dok u baznim uslovima dominira plava nijansa. Iako se svrstavaju u flavonoide, antocijani se razlikuju po prisustvu pozitivnog naelektrisanja na atomu kiseonika u C-prstenu osnovne flavonoidne strukture, zbog čega se nazivaju i flavilijum jon (2-fenilchromenilijum jon). Njihova stabilnost zavisi od više faktora, uključujući pH vrijednost, prisustvo svjetlosti, temperaturu i strukturne karakteristike. Na slici 9, prikazana je osnovna molekulska struktura antocijana (Khoo i sar., 2017).



Slika 8. Crveno obojenje kao rezultat pristustva antocijana u kiseloj pH sredini (Foto: Blagojević Sanja)



Slika 9. Ilustracija osnovne strukture antocijaninskog molekula (Khoo i sar., 2017)

Antocijanini predstavljaju drugu najzastupljeniju grupu fenolnih jedinjenja u plodu crne aronije. U plodu je identifikovana smješa glikozida cijanidina, uključujući 3-galaktozid, 3-glukozid, 3-arabinozid i 3-ksilozid, pri čemu se cijanidin-3-O-galaktozid ističe kao dominantna komponenta. Do sada je identifikovano više od 500 različitih antocijaninskih jedinjenja (Zafra-Stone i sar., 2007; Zhang i sar. 2021).

U ovom master radu, ukupan sadržaj antocijana određen je metodom opisanom u Evropskoj farmakopeji Ph. Eur. 9.0, prema radu Brašanac i sar. (2018). Apsorbancija uzorka je snimljena na talasnoj dužini od 528 nm. Sadržaj antocijana izražen je kao procenat cijanidin-3-O-glukozid hlorida.

3.3.4. Spektrofotometrijsko određivanje tanina u svježem plodu aronije i ekstraktima suvog ploda aronije

U plodu crne aronije prisutne su i druge fenolne supstance, kao što su tanini. Ova jedinjenja su karakteristična za biljni svijet i javljaju se i kod drugih sorti aronije. S obzirom na njihovu funkciju, svrstavaju se u grupu sekundarnih metabolita biljaka (Zhang i sar., 2021). Strukturno pripadaju grupi fenilpropanoida i često se javljaju u obliku kondenzovanih polimera različitih dužina. Do danas je identifikovano i opisano više od 8000 taninskih jedinjenja. Ova jedinjenja su nestabilna i podložna hemijskim promjenama koje nastaju usljed oštećenja biljnih ćelija, naročito tokom tehnološke obrade biljnih sirovina (Bernjak i Kristil, 2021).

Tanini su široko rasprostranjeni u biljnom svijetu, pri čemu su posebno zastupljeni u korijenu, stablu, kori, listovima, pupoljcima i sjemenkama. U tim dijelovima mogu činiti i do 5–10% suve mase vaskularnih biljaka (Barbehenn i Constabel, 2011). U ljudskoj ishrani, tanini su odgovorni za opor i gorak ukus određenih namirnica, ali istovremeno mogu doprinijeti zdravlju zahvaljujući svojim antioksidativnim i zaštitnim svojstvima (Lamy i sar., 2016).

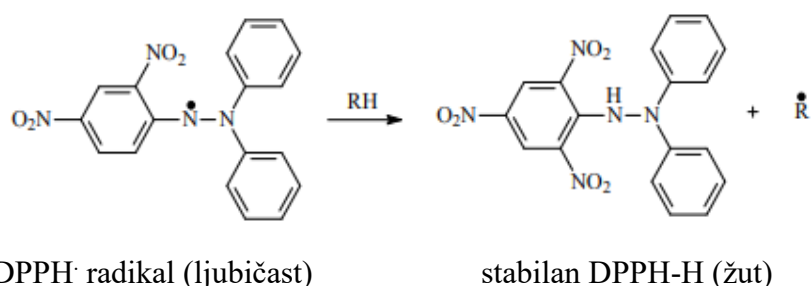
Količina tanina u ovom radu, određena je prema metodi opisanoj u Evropskoj farmakopeji 9.0 (Ph. Eur. 9.0). Princip metode zasniva se na reakciji ispitivanih uzoraka sa fosfomolibdovolframovim reagensom u alkalnoj sredini, pri čemu dolazi do formiranja obojenih kompleksa. Nakon toga, uzorci se tretiraju kožnim prahom koji adsorbuje taninska jedinjenja. Spektrofotometrijska mjerenja izvršena su pomoću UV-VIS spektrofotometra, na talasnoj dužini od 760 nm, a rezultati su izraženi u procentima.

3.3.5. Metode za procjenu antioksidativnog potencijala (DPPH i FRAP) u svježem plodu aronije i ekstraktima suvog ploda aronije

Antioksidativna aktivnost se definiše kao sposobnost pojedinačnih jedinjenja ili njihovih mješavina da uspore ili spriječe oksidaciju različitih biomolekula, čime se smanjuje štetno djelovanje slobodnih radikala. *Aronia melanocarpa* se poslednjih godina ističe kao izuzetno bogat izvor prirodnih

antioksidanata. Antioksidativna aktivnost ekstrakta aronije može se procijeniti pomoću različitih *in vitro* metoda. Najčešće korišćene su metode zasnovane na sposobnosti neutralisanja slobodnih radikala, kao što je DPPH test, koji koristi stabilni radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, kao i FRAP metoda (Ferric Reducing Antioxidant Power), koja se zasniva na redukciji kompleksa 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) sa gvožđe(III)-hlorid hekshidratom ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Sochor i sar., 2010).

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) je stabilan slobodni radikal koji ima karakterističnu ljubičastu boju zbog intenzivne apsorpcije u UV-VIS spektru. Ova metoda mjeri sposobnost antioksidanata da doniraju atom vodonika ili elektrone i na taj način neutrališu DPPH radikal (slika 10). Kada antioksidant reaguje sa DPPH radikalom, dolazi do smanjenja njegove boje, što se može pratiti smanjenjem apsorpcije na talasnoj dužini od oko 517 nm (slika 11) (Parejo i sar., 2000).



Slika 10. Mehanizam neutralizacije DPPH radikala putem reakcije sa antioksidantom (Parejo i sar., 2000)



Slika 11. Vizuelna promjena DPPH rastvora usled reakcije sa antioksidantom i UV/VIS spektrofotometar (Foto: Blagojević Sanja)

Rezultati dobijeni DPPH metodom izraženi su kao IC_{50} vrijednosti, koje označavaju koncentraciju uzorka potrebnu da se eliminiše 50% prisutnih DPPH[•] radikala. Na osnovu ovih vrijednosti može se procijeniti antioksidativna aktivnost ispitivanog ekstrakta – niža IC_{50} vrijednost ukazuje na veću sposobnost neutralizacije slobodnih radikala (Pavlović, 2012).

FRAP metoda (Ferric Reducing Antioxidant Power) zasniva se na redukciji kompleksa 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) sa gvožđe(III)-hlorid heksahidratom ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$). Ovi kompleksi su u početku gotovo bezbojni ili blago braon boje. Kada antioksidanti prisutni u uzorku redukuju Fe^{3+} jon u Fe^{2+} jon, dolazi do formiranja plavih kompleksa (slika 12), čija intenzivna boja može da se mjeri spektrofotometrijski (Jerković i Marijanović, 2010).

Tokom FRAP testa, u 100 μ l ekstrakta (ili rastvora svježeg biljnog materijala) dodaje se 3000 μ l FRAP reagensa. Nakon inkubacije u trajanju od 5 minuta, mjeri se apsorbanacija pri talasnoj dužini od 593 nm, a kao slijepa proba koristi se mješavina rastvarača u kojem je ekstrakt rastvoren i FRAP reagensa. Ukupni antioksidativni kapacitet uzorka određuje se pomoću kalibracione krive (Pavlović, 2012).

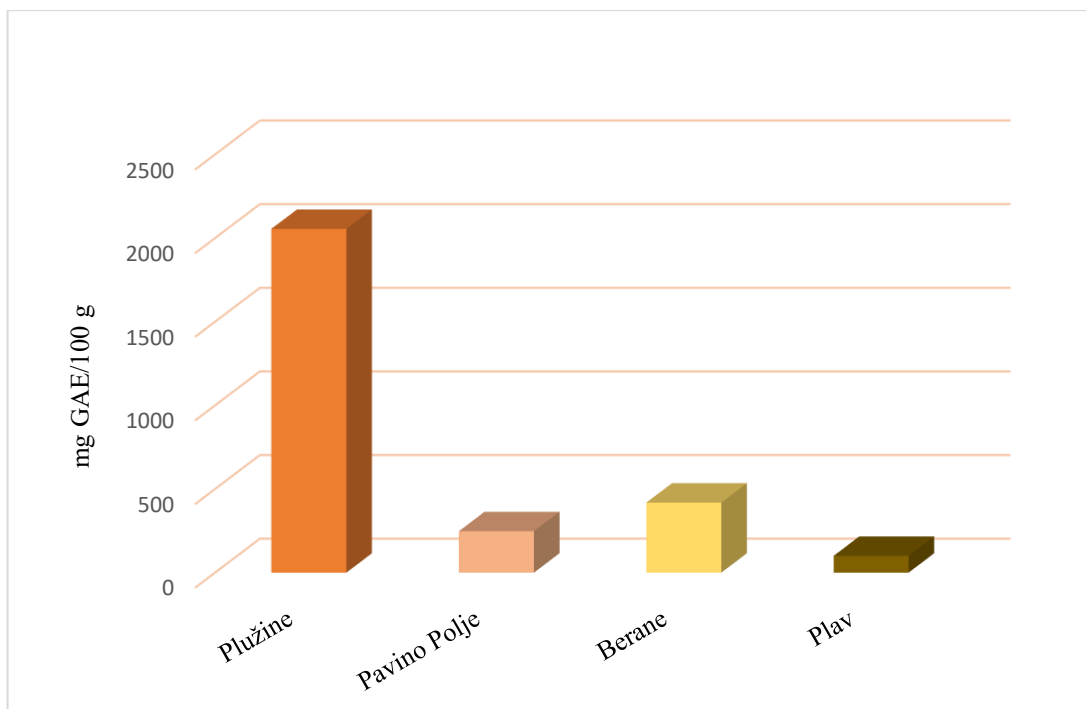


Slika 12. Formiranje plave boje usljed reakcije antioksidanata sa FRAP reagensom, što ukazuje na redukciju Fe^{3+} jona i prisustvo antioksidativne aktivnosti (Foto: Blagojević Sanja)

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u svježem plodu aronije i ekstraktima suvog ploda aronije

U ovom istraživanju određivan je sadržaj ukupnih fenola u svježem plodu aronije, kao i u ekstraktima dobijenim različitim metodama ekstrakcije iz suvog ploda aronije: ultrazvučnom ekstrakcijom, ekstrakcijom vrućom vodom, maceracijom i Sokslet ekstrakcijom. Rezultati su izraženi kao miligrami galne kiseline na 100 grama svježeg ploda, odnosno na 100 grama suvog ekstrakta. Sva mjerenja su sprovedena deset puta, a vrijednosti su prikazane kao aritmetičke sredine sa odgovarajućom standardnom devijacijom. Rezultati su prikazani na grafikonima 1 i 2.



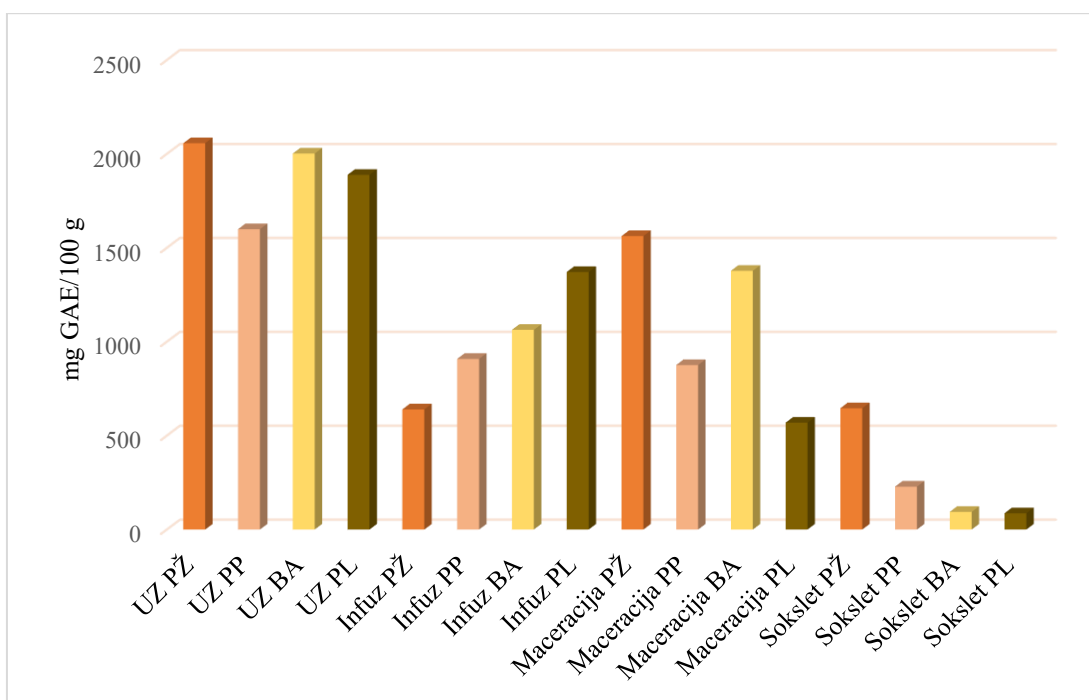
Grafikon 1. Sadržaj ukupnih fenola u svježem plodu aronije sa lokacija: Plužine, Pavino Polje, Berane i Plav (mg GAE/100 g)

Na osnovu prikazanih rezultata (Grafikon 1), uočene su značajne razlike u sadržaju ukupnih fenola među analiziranim uzorcima svježeg ploda aronije. Najveći sadržaj ukupnih fenola zabilježen je u uzorku svježeg ploda iz Plužina ($2055,17 \pm 36,28$ mg GAE/100 g), dok su znatno niže vrijednosti registrovane u uzorcima svježeg ploda iz Berana, zatim Pavinog Polja, dok je najmanji sadržaj bio u

uzorku sa lokaliteta Plava ($418,82 \pm 9,09$ mg GAE/100 g; $247,728 \pm 8,63$ mg GAE/100 g; $100,63 \pm 6,93$ mg GAE/100 g).

Visoke vrijednosti dobijene iz uzorka iz Plužina, ukazuju na to da određeni dio ploda sadrži visoko koncentrisane fenolne komponente, što može biti povezano sa strukturom tkiva, prisustvom pokožice i lokalizacijom bioaktivnih jedinjenja, što je vjerovatno povezano sa geografskim porijeklom, klimatskim faktorima, sastavom zemljišta. Niže vrijednosti u ostalim uzorcima mogu biti rezultat manje koncentracije fenola u tim dijelovima ploda ili njihove različite raspodjele u biljnom tkivu, što je takođe povezano sa geografskim porijeklom, klimatskim faktorima i sastavom zemljišta.

Prema istraživanju Denev i sar. (2018), vrijednosti ukupnih fenola varirale su između 1022 mg GAE/100 g svježeg ploda i 1795 mg GAE/100 g svježeg ploda aronije, što je približno vrijednosti koja je dobijena za uzorak iz Plužina. Ove vrijednosti su u skladu sa podacima iz drugih istraživanja (Kulling i sar. 2008), u kojima se navodi da ukupni fenoli u svježim bobičastim plodovima aronije mogu dostići raspon od 690 do 2556 mg GAE/100 g svježeg ploda. U jednom istraživanju koje je obuhvatilo pet različitih sorti aronije (Gerasimov i sar., 2023), ukupni sadržaj polifenola varirao je u rasponu od 747,2 do 1667,8 mg GAE/100 g svježeg ploda, u zavisnosti od kulture. Prema istom radu, ranije objavljeni rezultati ukazuju na još širi raspon od 603 do 2377,1 mg GAE/100 g svježeg uzorka, što potvrđuje izraženu varijabilnost između različitih genotipova, kao i uticaj faktora poput klimatskih uslova, mjesta uzgoja, primenjene metode ekstrakcije i analitičkog postupka. U poređenju sa ovim rezultatima, u ovom master radu su dobijene nešto niže vrijednosti.



Grafikon 2. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima suvog ploda aronije sa lokacija: Plužine, Pavino Polje, Berane i Plav (mg GAE/100 g)

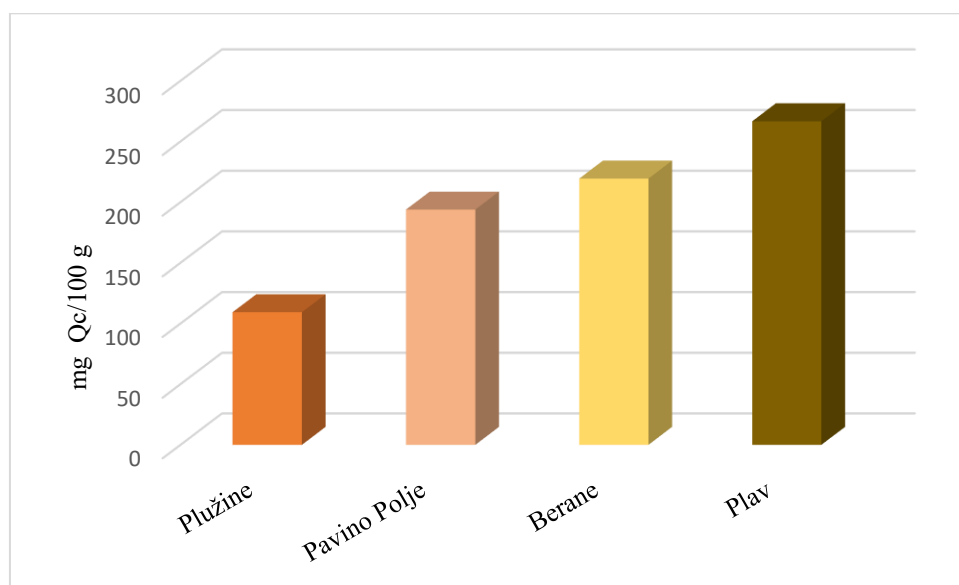
Na grafikonu 2 su prikazani rezultati sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima suvog ploda aronije dobijenim ultrazvučnom ekstrakcijom (UZ), ekstrakcijom vrućom vodom, maceracijom i Sokslet ekstrakcijom. Najveći sadržaj ukupnih fenola je zabilježen u uzorcima dobijenim ultrazvučnom metodom u uzorku iz Plužina, zatim slijede uzorci iz Berana, Plava i Pavinog Polja ($2056,99 \pm 7,94$ mg GAE/100 g; $2002,13 \pm 8,94$ mg GAE/100 g; $1888,74 \pm 14,91$ mg GAE/100 g; $1599,28 \pm 11,66$ mg GAE/100 g). Kod ekstrakata dobijenih ekstrakcijom vrućom vodom (infuz), najveći sadržaj fenola uočen je u uzorku iz Plava, dok je u uzorcima iz Berana, Pavinog Polja i Plužina taj sadržaj nešto niži ($1371,33 \pm 15,23$ mg GAE/100 g; $1063,29 \pm 17,16$ mg GAE/100 g; $908,65 \pm 21,27$ mg GAE/100 g; $639,72 \pm 22,36$ mg GAE/100 g). Ekstrakti dobijeni maceracijom pokazali su relativno visoke vrijednosti (Plužine - $1562,68 \pm 176,10$ mg GAE/100 g; Berane - $1377,69 \pm 60,80$ mg GAE/100 g; Pavino Polje - $875,88 \pm 21,72$ mg GAE/100 g; Plav - $569,19 \pm 23,89$ mg GAE/100 g), dok su kod ekstrakata dobijenih Sokslet ekstrakcijom zabilježeni najniži rezultati (Plužine - $645,87 \pm 34,59$ mg GAE/100 g; Pavino Polje - $228,5 \pm 3,69$ mg GAE/100 g; Berane - $94,09 \pm 5,05$ mg GAE/100 g; Plav - $86,56 \pm 6,21$ mg GAE/100 g).

U poređenju sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju kada je riječ o maceraciji, u literaturi su navedene više vrijednosti. Tako u istraživanju (Ćujić i sar., 2016), dobijeni ekstrakt aronije sadržao je

22,83 mg GAE/g suve mase ukupnih fenolnih jedinjenja što je značajno veća vrijednost u poređenju sa uzorcima iz Plava i Pavinog Polja. Najbliža vrednost u ovom istraživanju vrijednosti iz literature zabilježena je kod uzorka iz Plužina (1562,68 mg GAE/100 g suvog ekstrakta). Prema istraživanju Medvedeva i saradnika (2023), primjenom Sokslet ekstrakcije uz 96% etanol, sadržaj ukupnih fenola iznosio je $46,4 \pm 1,4$ GAE/g suve mase. U poređenju sa rezultatima dobijenim u ovom radu, jasno je uočljivo da su izmjerene koncentracije značajno niže. Prema radu Vázquez-Espinosa i sar. (2019), primjenom ultrazvučne ekstrakcije dobijena je koncentracija ukupnih fenola od 38,057 mg GAE/g. Ove vrijednosti su približne vrijednostima koje su dobijene u ovom master radu.

4.2. Sadržaj ukupnih flavonoida u svježem plodu aronije i ekstraktima suvog ploda aronije

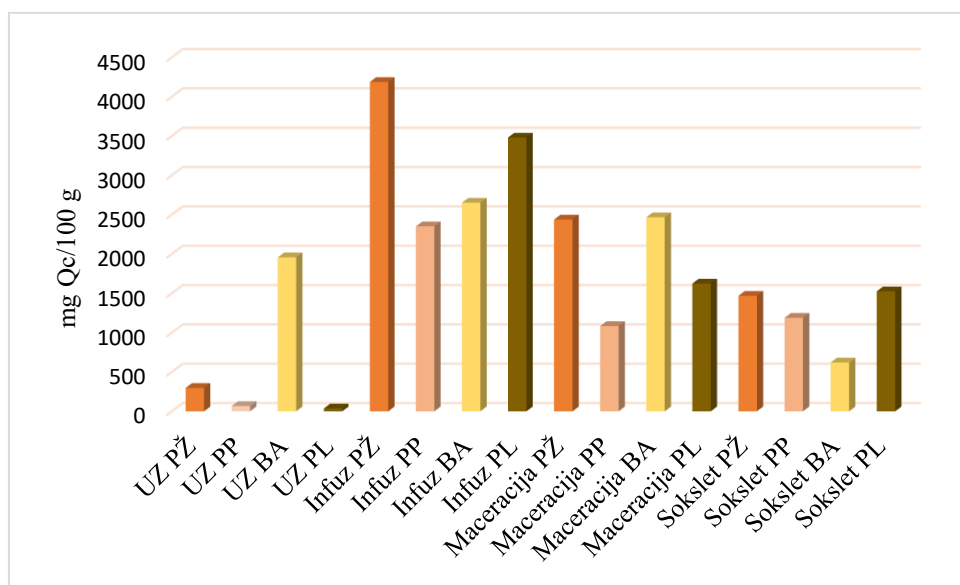
Na osnovu prikazanog dijagrama (Grafikon 3) sadržaj flavonoida u svježem plodu aronije značajno varira u zavisnosti od lokacije sakupljanja. Najniže vrijednosti zabilježene su u uzorku iz Plužina, gdje je sadržaj flavonoida iznosio oko $109,28 \pm 6,71$ mg Qc/100 g. Uzorak iz Pavinog Polja imao je viši sadržaj flavonoida, približno $193,85 \pm 10,09$ mg Qc/100 g, dok je u uzorku iz Berana određena vrijednost od oko $219,408 \pm 9,57$ mg Qc/100 g. Najviši sadržaj flavonoida određena je u uzorku iz Plava $266,65 \pm 9,60$ mg Qc/100 g.



Grafikon 3. Sadržaj ukupnih flavonoida u svježem plodu aronije sa lokacija: Plužine, Pavino Polje, Berane i Plav (mg Qc/100g)

Prema istraživanju Najda i sar (2013), sadržaj flavonoida u svježem plodu aronije iznosi oko 18,31 mg QE/100 g svježe mase. U drugom istraživanju, prijavljena je vrijednost od $13,16 \pm 0,15$ mg Qc/100g (Vinogradova i sar., 2020). Takođe, Rugina i sar. (2012) su naveli da sadržaj flavonoida kod dvije sorte aronije iznosi $64,04 \pm 5,4$ i $60,0 \pm 4,6$ mg QE/100 g. U poređenju sa ovim rezultatima, u istraživanju u ovom master radu su zabilježene znatno veće koncentracije flavonoida u svježem plodu aronije, u rasponu od $109,28 \pm 6,71$ do $266,65 \pm 9,60$ mg Qc/100 g (Grafikon 3). Nasuprot tome, u radu Saracila i sar. (2024), sadržaj flavonoida u svježem plodu aronije iznosio je 523 mg QE/100 g, što je viša vrijednost u odnosu na rezultate ovog istraživanja.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da ekološki uslovi karakteristični za svaku lokaciju mogu imati značajan uticaj na akumulaciju flavonoida u plodu aronije. Faktori poput nadmorske visine, mikroklimatskih uslova, tipa zemljišta i intenziteta sunčevog zračenja potencijalno doprinose razlikama u sadržaju ovih bioaktivnih jedinjenja (Dobros i sar., 2024; Tolić i sar., 2017).



Grafikon 4. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima suvog ploda aronije sa lokacija: Plužine, Pavino Polje, Berane i Plav (mg Qc/100g)

Prema grafikonu 4, koji prikazuje sadržaj flavonoida u ekstraktima aronije koji su dobijeni ultrazvučnom ekstrakcijom (UZ), ekstrakcijom vrućom vodom (infuz), maceracijom i Soksljet ekstrakcijom, uočavaju se značajne razlike u zavisnosti od primijenjene metode ekstrakcije, kao i od lokacije sakupljanja biljke. Kod ultrazvučne ekstrakcije, u uzorku iz Berana nađen je najviši sadržaj flavonoida ($1956,8 \pm 8,93$ mg Qc/100 g), dok su vrijednosti za uzorke iz Plužina ($297,3 \pm 23,07$ mg Qc/100 g), Pavinog Polja ($66,75 \pm 8,85$ mg Qc/100 g) i Plava ($35,85 \pm 8,93$ mg Qc/100 g) bile znatno

niže. Ovakav rezultat ukazuje na značajan uticaj lokalnih faktora, ali i mogućih razlika u stepenu efikasnosti ekstrakcije flavonoida ultrazvukom.

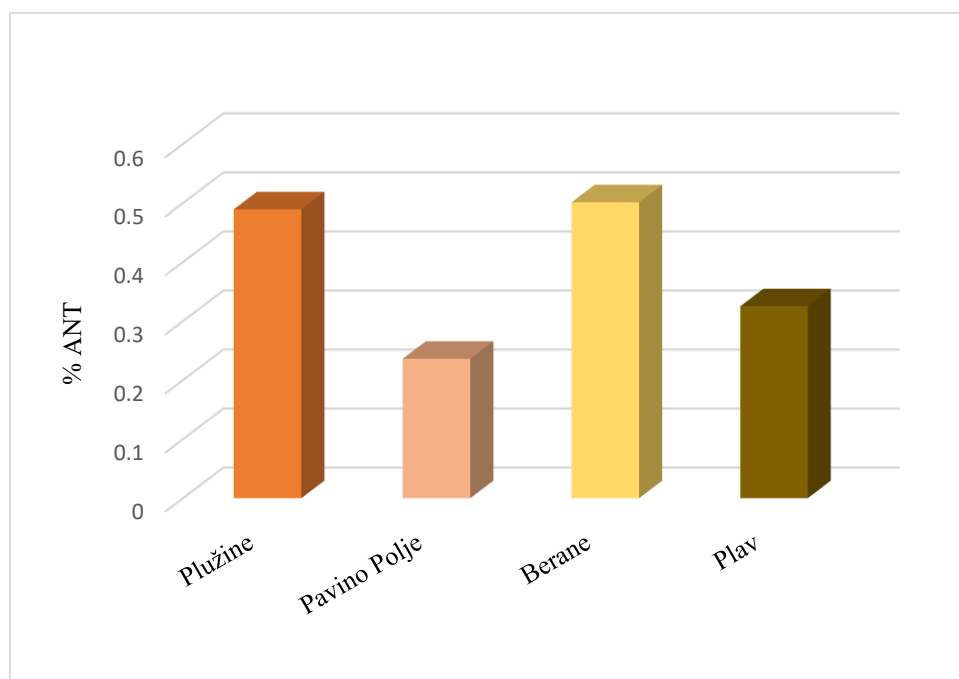
Kod ekstrakata dobijenih ekstrakcijom vrućom vodom, najviši sadržaj flavonoida utvrđen je u uzorku iz Plužina ($4186,2 \pm 13,15$ mg Qc/100 g), dok su visoke vrijednosti takođe, zabilježene za uzorke iz Plava ($3479,78 \pm 10,21$ mg Qc/100 g), Berana ($2651,75 \pm 5,82$ mg Qc/100 g) i Pavinog Polja ($2351,3 \pm 32,56$ mg Qc/100 g). Ovi rezultati ukazuju na to da ekstrakcija vrućom vodom predstavlja veoma efikasnu metodu za ekstrakciju flavonoida iz suvog ploda aronije. U slučaju maceracije, najviši sadržaj flavonoida zabilježen je u uzorku iz Berana ($2466,35 \pm 12,42$ mg Qc/100 g), vrlo blizu su vrednosti za uzorak iz Plužina ($2438,03 \pm 11,08$ mg Qc/100 g), dok su uzorci iz Plava ($1623,95 \pm 14,79$ mg Qc/100 g) i Pavinog Polja ($1083,8 \pm 14,75$ mg Qc/100 g) pokazali nešto niže vrijednosti. Ovi rezultati pokazuju da maceracija može biti vrlo efikasan metod ekstrakcije, ali sa većim varijacijama u zavisnosti od lokacije. Kod Sokslet ekstrakcije, najviši sadržaj flavonoida utvrđen je u uzorku iz Plava ($1524,95 \pm 8,19$ mg Qc/100 g), zatim Plužina ($1467,9 \pm 9,13$ mg Qc/100 g), Pavinog Polja ($1188,4 \pm 12,15$ mg Qc/100 g), dok je najniža vrednost registrovana u uzorku iz Berana ($619,7 \pm 11,37$ mg Qc/100 g).

Analiza podataka prikazanih na grafikonima pokazuje da na sadržaj flavonoida u ekstraktima aronije utiču kako metoda ekstrakcije, tako i geografsko porijeklo uzoraka. Ekstrakcija vrućom vodom i maceracija pokazale su se kao posebno efikasne metode za izdvajanje flavonoida, dok je ultrazvučna ekstrakcija dala veoma promjenljive rezultate. Najviši pojedinačni sadržaj flavonoida zabilježen je u ekstraktu vrućom vodom uzorka iz Plužina, dok je najniži sadržaj dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom uzorka iz Plava. Ovi podaci ukazuju na potrebu pažljivog izbora metode ekstrakcije u zavisnosti od ciljanih bioaktivnih komponenti i svojstava sirovine. Takođe su u skladu sa prethodnim istraživanjima koja pokazuju da metoda ekstrakcije i geografsko porijeklo značajno utiču na sadržaj flavonoida u biljnim ekstraktima (Dai i Mumper, 2010; Tolić i sar., 2015; Vázquez-Espinosa i sar., 2015).

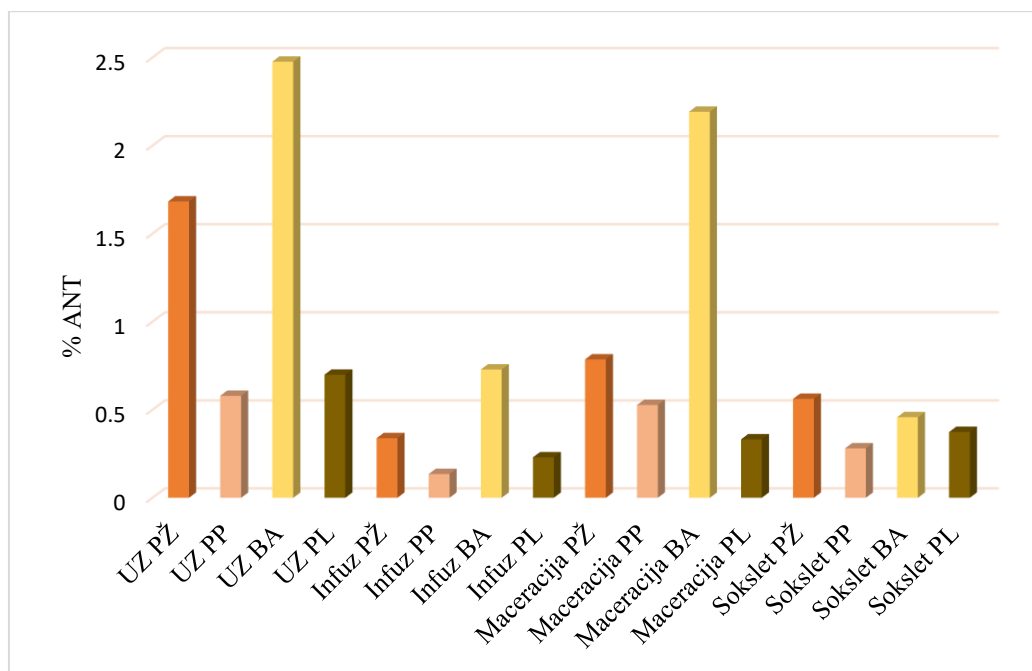
4.3. Sadržaj ukupnih antocijana u svježem plodu aronije i ekstraktima suvog ploda aronije

Na grafikonu 5 prikazan je sadržaj ukupnih antocijana (%) u svježim plodovima aronije sa četiri različita lokaliteta: Plužine, Pavino Polje, Berane i Plav. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost deset mjerenja $\pm$ standardna devijacija. Uočava se da uzorak iz Berana pokazuje najviši procenat ukupnih antocijana ($0,501 \pm 0,087\%$), dok je najniža vrijednost registrovana u uzorku iz Pavinog Polja ($0,236 \pm 0,052\%$). U uzorcima iz Plužina i Plava nađene su vrijednosti: $0,489 \pm 0,056\%$ i $0,325 \pm 0,069\%$,

respektivno. Dobijeni rezultati mogu se objasniti vremenskim uslovima berbe, s obzirom na to da, prema Gralec i sar. (2019), sadržaj antocijana u plodu aronije zavisi od vremenskih uslova. Ovi autori navode da je viši sadržaj ovih jedinjenja zabilježen u godinama sa toplim i suvim ljetom, dok su niže vrijednosti dobijene u hladnijim i vlažnijim sezonama. King i Bolling (2020) navode da se sadržaj ukupnih antocijana u plodu aronije kreće od 0,85% do 1,22%, dok su Trenka i saradnici (2020) za svježe plodove utvrdili vrijednosti između 0,93% i 1,29%, što su veće vrijednosti od dobijenih u ovom istraživanju.



Grafikon 5. Sadržaj ukupnih antocijana u svježem plodu aronije sa lokacija: Plužine, Pavino Polje, Berane i Plav (%)



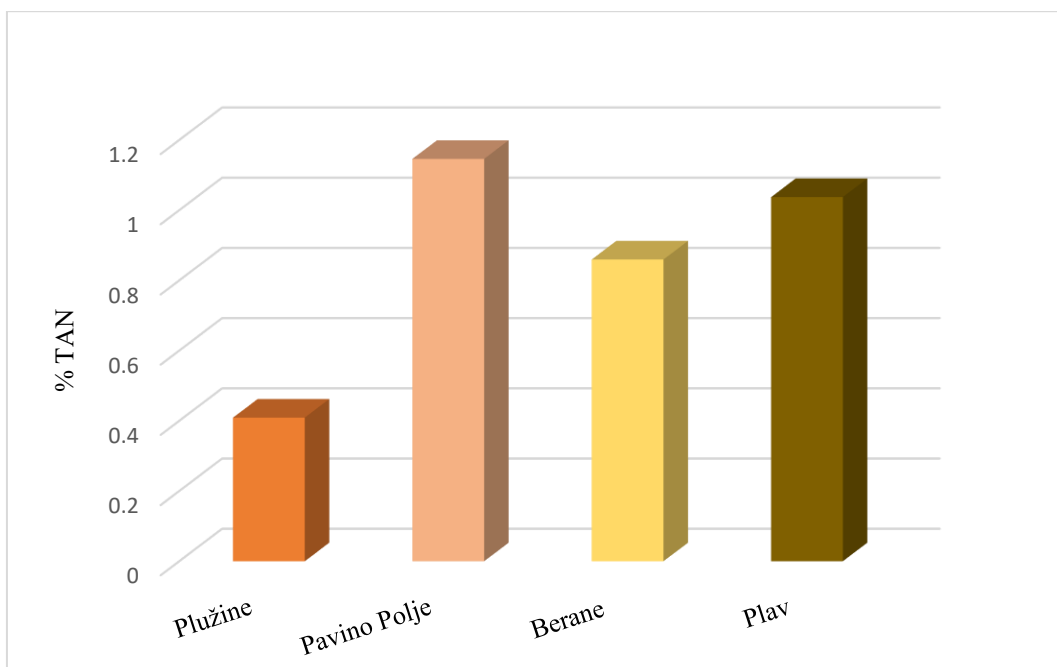
Grafikon 6. Sadržaj ukupnih antocijana u ekstraktima suvog ploda aronije sa lokacija: Plužine, Pavino Polje, Berane i Plav

Analiza sadržaja ukupnih antocijana u ekstraktima suvog ploda aronije, dobijenim različitim metodama ekstrakcije, pokazuje izražene razlike koje zavise kako od primijenjene metode ekstrakcije, tako i od lokaliteta sakupljanja uzoraka (Grafikon 6). Kod ultrazvučne ekstrakcije, najviši sadržaj antocijana zabilježen je u uzorku iz Berana ($2,476 \pm 0,061\%$), dok su nešto niže vrijednosti registrovane za uzorke iz Plužina ($1,683 \pm 0,027\%$), Plava ($0,699 \pm 0,035\%$) i Pavinog Polja ($0,579 \pm 0,019\%$). Ovi rezultati ukazuju na visoku efikasnost ultrazvuka u ekstrakciji antocijana, posebno iz uzoraka sa lokaliteta bogatih ovim jedinjenjima. Korišćenjem ekstrakcije vrućom vodom dobijene su znatno niže koncentracije antocijana. Uzorak iz Pavinog Polja imao je najmanju vrijednost ($0,135 \pm 0,055\%$), dok su viši sadržaji utvrđeni za uzorke iz Berana ($0,729 \pm 0,066\%$), Plužina ($0,339 \pm 0,071\%$) i Plava ($0,230 \pm 0,072\%$). Ovo ukazuje na ograničenu sposobnost vruće vode da ekstrahuje antocijane iz biljnog materijala. Rezultati maceracije ukazuju na bolju ekstrakcionu moć u poređenju sa vrućom vodom. Najviši sadržaj antocijana dobijen je iz uzorka iz Berana ($2,192 \pm 0,166\%$), dok su niže vrijednosti registrovane kod uzoraka iz Plužina ($0,786 \pm 0,051\%$), Pavinog Polja ($0,527 \pm 0,081\%$) i Plava ($0,332 \pm 0,042\%$). Kod Sokslet ekstrakcije, vrijednosti su bile umjerene. Uzorak iz Plužina pokazao je najveću vrijednost ($0,562 \pm 0,102\%$), dok su nešto niži sadržaji utvrđeni za uzorke iz Berana ($0,457 \pm 0,095\%$), Plava ($0,374 \pm 0,091\%$) i Pavinog Polja ($0,281 \pm 0,110\%$). U istraživanju Banach i sar. (2020), se navodi da se sadržaj antocijana u ekstraktima aronije kretao od $0,61\%$ - $1,02\%$, što se

podudara sa vrijednostima dobijenim u ovom master radu. Pljevljakušić (2016), primjenom optimizovane metode maceracije osušenog ploda *Aronia melanocarpa* navodi vrijednost od 0,27% kao ukupni sadržaj antocijana u ekstraktu, što je nešto niža vrijednost od vrijednosti dobijene za Plav (macerat).

4.4. Sadržaj ukupnih tanina u svježem plodu aronije i ekstraktima suvog ploda aronije

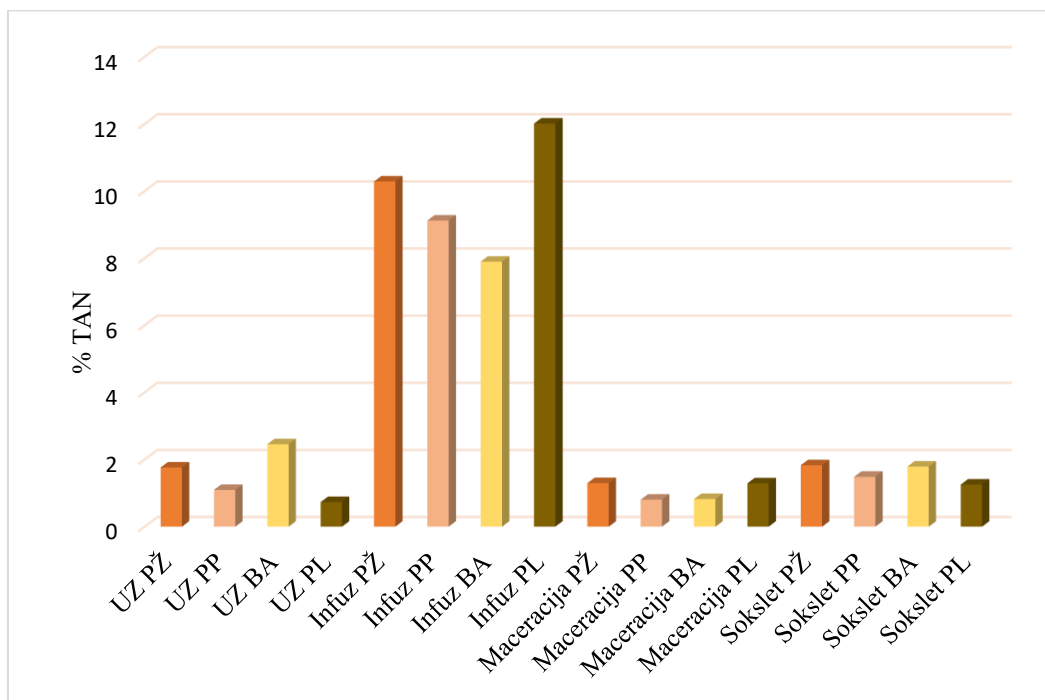
Kvantitativna analiza ukupnih tanina u svježem plodu aronije sa četiri lokaliteta ukazuje na umjerene razlike u sadržaju ovih jedinjenja, što je prikazano na grafikonu 7. Najviša vrijednost zabilježena je kod uzorka iz Pavinog Polja, gdje je sadržaj ukupnih tanina iznosio $1,146 \pm 0,065\%$. Slična vrijednost registrovana je i u uzorku iz Plava ($1,037 \pm 0,117\%$). Ovi rezultati ukazuju da plodovi sa ovih lokaliteta posjeduju izraženiji potencijal u pogledu sadržaja ovih bioaktivnih jedinjenja. Uzorak iz Berana pokazao je nešto niži sadržaj tanina ($0,860 \pm 0,066\%$), dok je najniža vrijednost registrovana kod uzorka iz Plužina ($0,409 \pm 0,048\%$). Ovakve razlike mogu biti posljedica agroekoloških faktora ali i nadmorske visine, klimatskih uslova, tipa zemljišta i zrelosti ploda u trenutku berbe. U radu Wangenstein i sar. (2014), navodi se sadržaj tanina do 4,79% svježe mase, što je veća vrijednost od vrijednosti u ovom istraživanju. Mladin i sar. (2012) u svom radu ističu slične vrijednosti sadržaja tanina u aroniji 0,610%-0,990%, što potvrđuje uporedivost i pouzdanost rezultata dobijenih u ovom istraživanju.



Grafikon 7. Sadržaj ukupnih tanina u svježem plodu aronije sa lokacija: Plužine, Pavino Polje, Berane i Plav (%)

Na osnovu podataka navedenih na grafikonu 8, kod ultrazvučne ekstrakcije, najviši sadržaj tanina zabilježen je u uzorku iz Berana ($2,456 \pm 0,046\%$), dok su nešto niže vrijednosti utvrđene za uzorke iz Plužina ($1,763 \pm 0,238\%$), Pavinog Polja ($1,096 \pm 0,105\%$) i Plava ($0,734 \pm 0,144\%$). Ovi rezultati potvrđuju efikasnost ultrazvuka u ekstrakciji taninskih jedinjenja, naročito iz uzoraka bogatijih polifenolima. Za razliku od prethodnih metoda ekstrakcije antocijana, ekstrakcija vrućom vodom je dala značajno više vrijednosti ukupnih tanina, pri čemu se posebno ističe uzorak iz Plava ($12,011 \pm 0,948\%$), a zatim slijede uzorci iz Plužina ($10,284 \pm 0,790\%$), Pavinog Polja ($9,121 \pm 0,855\%$) i Berana ($7,895 \pm 1,211\%$). Visoke vrijednosti tanina kod ekstrakcije vrućom vodom mogu se objasniti dužim kontaktom biljnih materijala sa vrućom vodom, što pogoduje ekstrakciji hidrofilnih jedinjenja poput tanina. Rezultati analize ekstrakata dobijenih maceracijom pokazali su ujednačenije i znatno niže vrijednosti u poređenju sa infuzom. Najviši sadržaj tanina u ovoj grupi zabilježen je kod macerata dobijenog iz suvih plodova aronije iz Plužina ($1,298 \pm 0,498\%$) i Plava ($1,292 \pm 0,311\%$), dok su uzorci iz Berana ($0,822 \pm 0,238\%$) i Pavinog Polja ($0,805 \pm 0,111\%$) imali slične, ali niže vrijednosti. Ovi rezultati, koji su prikazani na grafikonu 8, ukazuju da je maceracija manje efikasna u oslobađanju tanina iz biljne matrice. Kod Sokslet ekstrakcije, svi uzorci pokazali su relativno ujednačen i stabilan sadržaj tanina. Najviša vrijednost registrovana je u uzorku iz Plužina ($1,831 \pm 0,631\%$), zatim Berana ($1,793 \pm 0,334\%$), Pavinog Polja ($1,486 \pm 0,573\%$) i Plava ($1,254 \pm 0,383\%$). Ova metoda pokazuje

zadovoljavajuću efikasnost, uz manja odstupanja među lokalitetima. Kada je riječ o ekstraktima, istraživanje Shi i saradnika (2024) navodi da je sadržaj tanina 3,32%, što je najpribližnija vrijednost uzorku iz Berana koji je dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom. U radu Andresona i sar. (2023), ekstrakti su sadržali oko 12% tanina, što je u skladu sa vrijednošću koja je dobijena za ekstrakt dobijen ekstrakcijom vrućom vodom, što potvrđuje efikasnost vodene ekstrakcije.



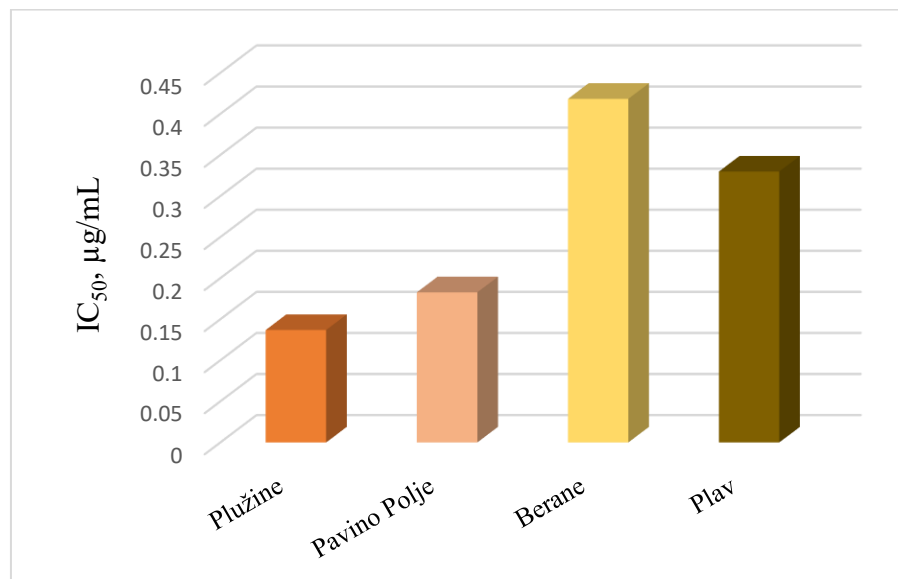
Grafikon 8. Sadržaj ukupnih tanina u ekstraktima suvog ploda aronije sa lokacija: Plužine, Pavino Polje, Berane i Plav (%)

4.5. Antioksidativna aktivnost svježeg ploda i ekstrakata suvog ploda aronije (DPPH i FRAP metode)

1) DPPH metoda

Na osnovu prikazanih rezultata na grafikonu 9, jasno se uočavaju razlike u antioksidativnoj aktivnosti među ispitivanim uzorcima svježeg ploda aronije. Najnižu IC_{50} vrijednost pokazao je uzorak označen kao PŽ ($0,137 \pm 0,0001 \mu\text{g/mL}$), što ukazuje na najvišu antioksidativnu aktivnost u poređenju sa ostalim analiziranim uzorcima. Slijede uzorci iz Pavinog polja - PP ($0,182 \pm 0,00015 \mu\text{g/mL}$) i Plava - PL ($0,329 \pm 0,00098 \mu\text{g/mL}$), dok je najmanju antioksidativnu aktivnost pokazao uzorak iz Berana -

BA sa najvišom IC_{50} vrednošću ($0,418 \pm 0,00012 \mu\text{g/mL}$). Niske standardne devijacije ukazuju na visoku preciznost mjerenja. Uočen trend sugerise da različite frakcije i komponente unutar svježeg ploda značajno variraju u svom kapacitetu neutralizacije slobodnih radikala, što može biti posljedica razlika u sadržaju i strukturi fenolnih jedinjenja prisutnih u tim uzorcima. Rezultati potvrđuju da je uzorak iz Plužina potencijalno najbogatiji antioksidativnim komponentama, što ga čini značajnim za dalje fitohemijske i farmakološke analize.

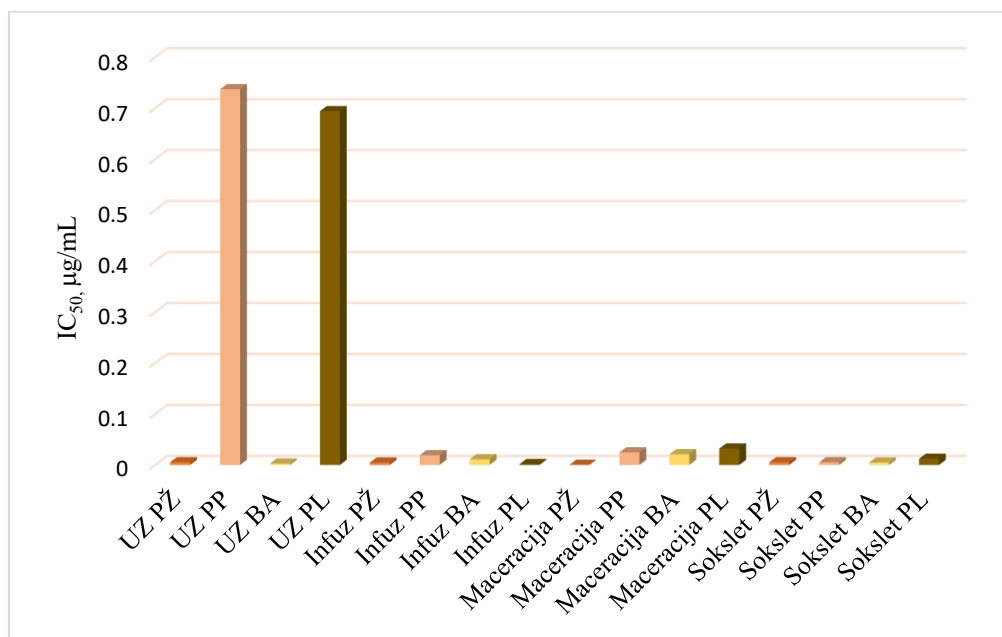


Grafikon 9. Antioksidativna aktivnost (DPPH) svježeg ploda aronije sa četiri lokacije: Plužine, Pavino Polje, Berane i Plav

Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti, ekstrakata suvog ploda aronije, DPPH metodom prikazani su na grafikonu 10, a izraženi su kao IC_{50} vrijednosti ($\mu\text{g/mL}$) – koncentracija uzorka potrebna da neutrališe 50% DPPH radikala. Niža IC_{50} vrijednost ukazuje na jaču antioksidativnu aktivnost uzorka. Najnižu IC_{50} vrijednost, a time i najjaču antioksidativnu aktivnost, pokazao je ekstrakt dobijen maceracijom suvog ploda aronije iz Plužina ($0,0003 \pm 0,00001 \mu\text{g/mL}$), zatim ultrazvučni ekstrakt iz Berana ($0,00284 \pm 0,00011 \mu\text{g/mL}$) i Sokslet ekstrakt iz Plužina ($0,00539 \pm 0,00008 \mu\text{g/mL}$). Slične niske vrijednosti uočene su i kod ultrazvučnog ekstrakta i ekstrakta dobijenog ekstrakcijom vrućom vodom iz Plužina ($0,00537 \pm 0,00012 \mu\text{g/mL}$ i $0,00475 \pm 0,00009 \mu\text{g/mL}$), kao i kod Sokslet ekstrakta iz Pavinog Polja ($0,00532 \pm 0,00013 \mu\text{g/mL}$), što ukazuje na izraženu antioksidativnu sposobnost uzoraka sa tog lokaliteta, nezavisno od metode ekstrakcije. S druge strane, najviše IC_{50} vrijednosti, koje ukazuju na slabiju antioksidativnu aktivnost, registrovane su kod ultrazvučnog ekstrakta iz Pavinog Polja ($0,737 \pm 0,01345 \mu\text{g/mL}$) i Plava

($0,6939 \pm 0,0017 \mu\text{g/mL}$). Među infuzima, vrijednosti su varirale u rasponu od $0,001777 \pm 0,000011 \mu\text{g/mL}$ (Plav) do $0,0190 \pm 0,00048 \mu\text{g/mL}$ (Pavino Polje), dok su ostali ekstrakti dobijeni Sokslet metodom pokazali ujednačene IC_{50} vrijednosti: Berane ($0,00477 \pm 0,0009 \mu\text{g/mL}$), Plav ($0,0121 \pm 0,00008 \mu\text{g/mL}$) i Plužine ($0,00539 \pm 0,00008 \mu\text{g/mL}$). U radu (Kim i sar. 2021) u kom su ispitivani etanolni ekstrakti, DPPH test je pokazao IC_{50} vrijednost od $718,13 \mu\text{g/mL}$, a autori Jin i sar. (2016) navode u studijama da su etanolni ekstrakti aronije imali niže IC_{50} vrijednosti, odnosno $397,50 \mu\text{g/mL}$ i $129 \mu\text{g/mL}$.

Ekstrakt ploda aronije dobijen ultrazvučnom ekstrakcijom u radu d'Alessandro i sar. (2012), pokazao je antioksidativnu aktivnost prema DPPH testu, sa IC_{50} vrijednošću od $0,250 \text{ mg/mL}$. U radu Milutinovića (2020), ekstrakt dobijen postupkom maceracije imao je vrijednost IC_{50} $0,53 \pm 0,02 \text{ mg/mL}$, što je veća vrijednost u odnosu na vrijednost dobijenu u ovom radu.

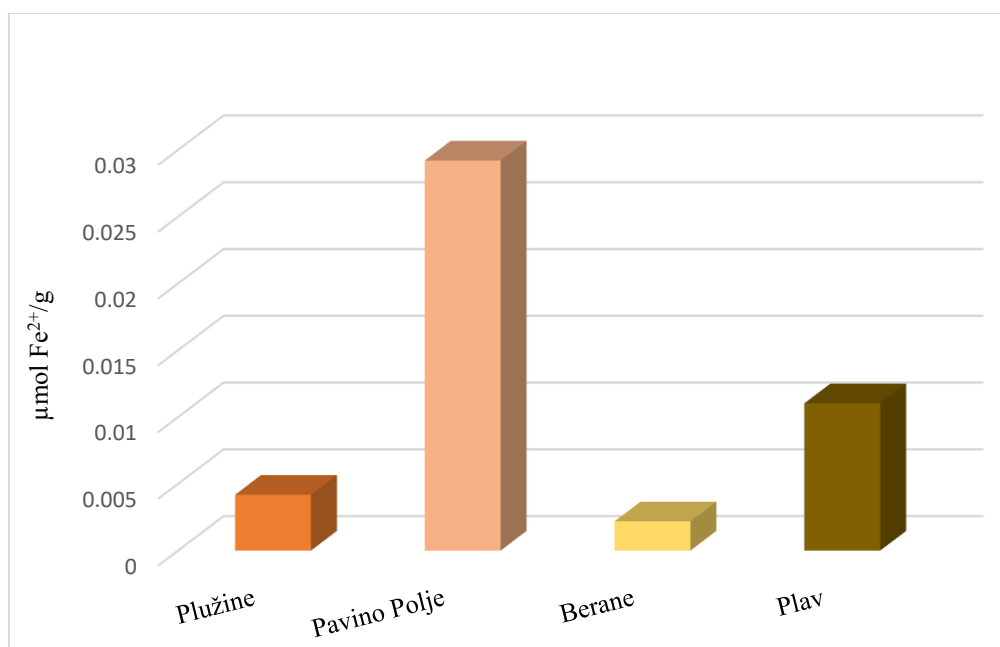


Grafikon 10. Antioksidativna aktivnost (DPPH) ekstrakata suvog ploda aronije sa četiri lokacije: Plužine, Pavino Polje, Berane i Plav

2) FRAP metoda

Na grafikonu 11 prikazana je antioksidativna aktivnost svježeg ploda aronije sa četiri različite lokacije, određena FRAP metodom i izražena u $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ svježeg ploda. Najvišu vrijednost pokazuje uzorak iz Pavinog Polja ($0,029 \pm 0,010 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$), što ukazuje na najizraženiji kapacitet redukcije Fe^{3+} jona. Uz to, umjerena standardna devijacija ukazuje na prihvatljivu konzistentnost

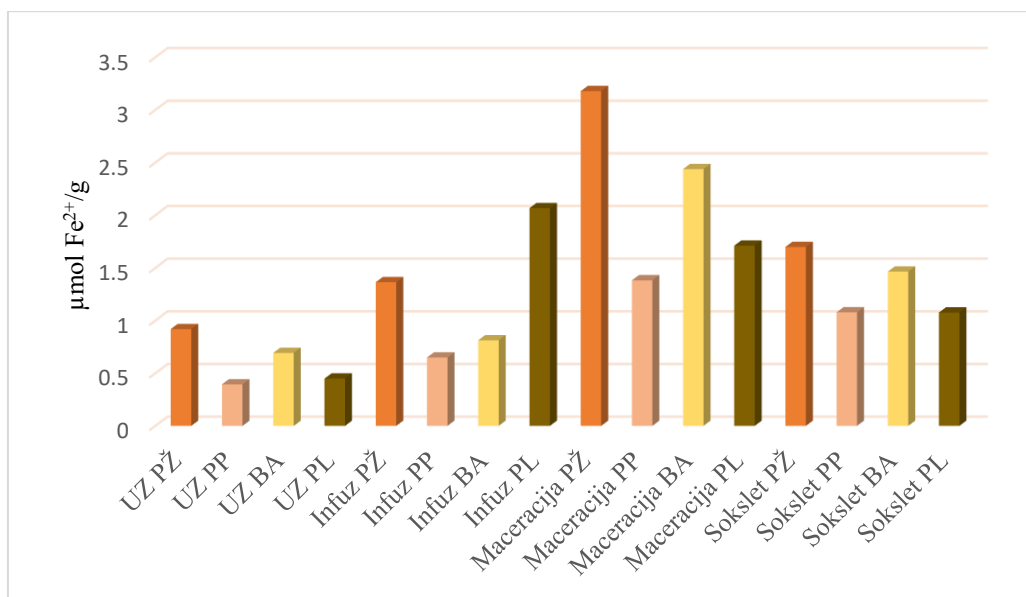
rezultata. Uzorak iz Plava pokazuje nižu vrijednost ($0,011 \pm 0,010 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$), uz sličnu varijabilnost, dok se za uzorak iz Plužina bilježe još niže vrijednosti ($0,004 \pm 0,008 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$), što takođe ukazuje na slabu antioksidativnu aktivnost, ali i relativno stabilne rezultate unutar uzorka. Najnižu vrijednost ima uzorak iz Berana ($0,002 \pm 0,013 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$), uz najveću standardnu devijaciju među analiziranim lokacijama. Ovo može ukazivati na heterogenost uzorka, različit stepen zrelosti plodova ili uticaj mikroklimatskih faktora. Vrijednosti FRAP kapaciteta iz literature (Rugina i sar. 2012) pokazuju znatno veće antioksidativne aktivnosti ploda aronije gdje vrijednost doseže $300,2 \pm 10,6 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$. U poređenju sa rezultatima u ovom master radu za svježe plodove, ove vrijednosti su znatno veće.



Grafikon 11. Antioksidativna aktivnost (FRAP) svježeg ploda aronije sa četiri lokacije: Plužine, Pavino Polje, Berane i Plav

Antioksidativni kapacitet ekstrakata suvog ploda aronije sa četiri različita lokaliteta (Plužine, Pavino Polje, Berane i Plav) procijenjen je metodom FRAP-a (Grafikon 12). Ultrazvučna ekstrakcija (UZ) pokazala je varijabilne rezultate u zavisnosti od lokaliteta, gdje je u ekstraktu iz Plužina dobijena vrijednost od $0,919 \pm 0,009 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$, dok je iz Pavinog Polja zabilježena značajno niža vrijednost od $0,394 \pm 0,013 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$. UZ ekstrakti iz Berana ($0,693 \pm 0,020 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$) i Plava ($0,449 \pm 0,008 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$) pokazuju vrijednost antioksidativnog kapaciteta između vrijednosti antioksidativnog kapaciteta UZ ekstrakata iz Plužina i Pavinog polja. Ekstrakti dobijeni ekstrakcijom vrućom vodom

(infuz) generalno su pokazali veće vrijednosti FRAP aktivnosti u poređenju sa ultrazvučnim ekstraktima, pri čemu za ekstrakt iz Plužina iznosi $1,364 \pm 0,028 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$, dok ekstrakt iz Plava ima najvišu zabeleženu vrednost od $2,068 \pm 0,014 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$. Manje varijacije unutar ove grupe primijećene su na lokalitetima Pavino Polje i Berane, sa vrijednostima od $0,649 \pm 0,021 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ i $0,813 \pm 0,013 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$, redom. Ekstrakti dobijeni maceracijom imaju najviše vrijednosti antioksidativnog kapaciteta, što ukazuje na efikasnost ove metode ekstrakcije u očuvanju i izdvajaju fenolnih jedinjenja. Najizraženiji rezultat zabilježen je na lokalitetu Plužine ($3,179 \pm 0,033 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$), dok su ekstrakti iz Berana ($2,438 \pm 0,069 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$), Plava ($1,712 \pm 0,022 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$) i Pavinog Polja ($1,382 \pm 0,037 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$) takođe pokazali visok antioksidativni kapacitet. Sokslet ekstrakti pokazuju umjeren antioksidativni kapacitet sa vrijednostima od $1,699 \pm 0,012 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ u Plužinama, do $1,078 \pm 0,009 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ u ekstraktima iz Pavinog Polja, dok je ekstrakt iz Berana u sredini sa vrijednošću $1,465 \pm 0,015 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$. U radu Najda i Labuda (2013), etanolni ekstrakt ploda aronije pokazuje FRAP vrijednost od $112,5 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ ekstrakta, dok Mitić i saradnici (2014) navode znatno višu vrijednost od $612 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ ekstrakta. Analiza podataka ukazuje da metoda ekstrakcije ima značajan uticaj na vrijednosti FRAP antioksidativnog kapaciteta, pri čemu maceracija pokazuje prednost u očuvanju antioksidativnih jedinjenja u ekstraktima suvog ploda aronije. Takođe, lokalitet prikupljanja materijala utiče na nivo aktivnosti, što može biti posljedica različitih uslova gajenja i klimatskih faktora. Ova istraživanja naglašavaju važnost optimizacije procesa ekstrakcije i selekcije sirovinskog materijala za dobijanje ekstrakata sa maksimalnim antioksidativnim potencijalom, što je od velikog značaja za njihovu primjenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji (Puzović i sar. 2024; Dobros i sar. 2024).



Grafikon 12. Antioksidativna aktivnost (FRAP) ekstrakta suvog ploda aronije sa četiri lokacije: Plužine, Pavino Polje, Berane i Plav

4.6. Analiza sadržaja mikroelemenata u svježem plodu aronije i ekstraktima suvog ploda aronije

U okviru ovog istraživanja određivan je sadržaj mikroelemenata Fe, Zn, Mn i Cu primjenom atomske apsorpcione spektrofotometrije (AAS). Sva mjerenja su izvedena u deset ponavljanja, a dobijeni rezultati izraženi su u mikrogramima po gramu uzorka (μg/g). Analize su sprovedene na uzorcima aronije prikupljenim sa četiri različita područja Crne Gore. Za svako područje pripremljeni su ekstrakti suvog ploda aronije, korišćenjem četiri metode ekstrakcije: ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija vrućom vodom (infuz), macercija i Sokslet ekstrakcija, a dodatno su ispitani i svježi plodovi aronije.

Tabela 2. Srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija koncentracija ispitivanih elemenata

Uzorak Element	Fe ($\mu\text{g/g}$)	Zn ($\mu\text{g/g}$)	Mn ($\mu\text{g/g}$)	Cu ($\mu\text{g/g}$)
Svj. plod PŽ	4,61 $\pm$ 0,72	2,93 $\pm$ 0,08	0,84 $\pm$ 0,54	2,21 $\pm$ 0,42
Svj. plod PP	4,58 $\pm$ 0,12	3,44 $\pm$ 0,10	0,74 $\pm$ 0,09	4,33 $\pm$ 0,06
Svj. plod BA	5,73 $\pm$ 0,09	3,71 $\pm$ 0,05	0,49 $\pm$ 0,07	2,75 $\pm$ 0,02
Svj. plod PL	2,97 $\pm$ 0,06	3,46 $\pm$ 0,06	0,54 $\pm$ 0,06	1,86 $\pm$ 2,63
UZ PŽ	1,26 $\pm$ 0,16	1,73 $\pm$ 0,03	2,82 $\pm$ 0,14	0,4 $\pm$ 0,07
UZ PP	1,42 $\pm$ 0,32	1,14 $\pm$ 0,04	1,62 $\pm$ 0,06	0,04 $\pm$ 0,06
UZ BA	1,56 $\pm$ 0,08	1,57 $\pm$ 0,01	1,63 $\pm$ 0,06	0,36 $\pm$ 0,09
UZ PL	0,8 $\pm$ 0,09	3,63 $\pm$ 0,02	0,87 $\pm$ 0,04	1,05 $\pm$ 0,05
Infuz PŽ	2,5 $\pm$ 10,11	5,70 $\pm$ 0,04	8,17 $\pm$ 0,06	1,30 $\pm$ 0,11
Infuz PP	2,97 $\pm$ 0,05	4,84 $\pm$ 0,03	8,74 $\pm$ 0,08	1,04 $\pm$ 0,09
Infuz BA	2,61 $\pm$ 0,07	4,80 $\pm$ 0,02	5,96 $\pm$ 0,07	3,74 $\pm$ 0,04
Infuz PL	2,56 $\pm$ 0,09	4,32 $\pm$ 0,02	3,96 $\pm$ 0,07	0,75 $\pm$ 0,08
Maceracija PŽ	0,42 $\pm$ 0,05	1,06 $\pm$ 0,03	0,87 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,29
Maceracija PP	0,73 $\pm$ 0,09	2,47 $\pm$ 0,02	1,38 $\pm$ 0,03	0,58 $\pm$ 0,07
Maceracija BA	0,74 $\pm$ 0,14	0,96 $\pm$ 0,01	0,96 $\pm$ 0,03	0,28 $\pm$ 0,07
Maceracija PL	0,85 $\pm$ 0,03	0,81 $\pm$ 0,03	0,81 $\pm$ 0,04	1,97 $\pm$ 1,21
Sokslet PŽ	0,25 $\pm$ 0,07	0,76 $\pm$ 0,03	0,610,02	0,59 $\pm$ 0,78
Sokslet PP	0,35 $\pm$ 0,10	0,9 $\pm$ 0,003	0,57 $\pm$ 0,03	0,07 $\pm$ 0,06
Sokslet BA	0,28 $\pm$ 0,07	1,42 $\pm$ 0,006	0,63 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,02
Sokslet PL	0,35 $\pm$ 0,06	1,01 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,02	1,42 $\pm$ 0,66

Prikazani podaci u tabeli 2 predstavljaju srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija koncentracija ispitivanih elemenata u svježem plodu aronije i u ekstraktima suvog ploda aronije u zavisnosti od metode ekstrakcije i područja porijekla uzorka.

Analizom sadržaja mikroelemenata Fe, Zn, Mn i Cu u svježem plodu aronije i njenim ekstraktima, uočen je značajan uticaj kako geografskog porijekla uzoraka (Plužine – PŽ, Pavino Polje – PP, Berane – BA i Plav – PL), tako i metode ekstrakcije, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Staszowska-Karkut, 2020). Najveći sadržaj gvožđa (Fe) zabilježen je u svježem plodu iz Berana (5,73 $\pm$ 0,09 $\mu\text{g/g}$), što je nešto niža vrijednost od vrijednosti koju su naveli u istraživanju Juranović-Cindrić i sar. (2017), u uzorku sa područja Hrvatske (9,3 $\mu\text{g/g}$). Najmanje vrijednosti registrovane su u Sokslet ekstraktu iz Plužina (0,25 $\pm$ 0,07 $\mu\text{g/g}$). Cink (Zn) je bio najzastupljeniji u infuzu iz Plužina (5,70 $\pm$ 0,04 $\mu\text{g/g}$), dok je najmanja koncentracija zabilježena u Sokslet ekstraktu takođe iz Plužina

($0,76 \pm 0,03 \mu\text{g/g}$). Sadržaj mangana (Mn) bio je posebno izražen u infuzu iz Plužina ($8,17 \pm 0,06 \mu\text{g/g}$), što ukazuje na efikasnost ove metode za ekstrakciju ovog elementa. Što se tiče bakra (Cu), najviša koncentracija utvrđena je u svježem plodu iz Pavinog Polja ($4,33 \pm 0,06 \mu\text{g/g}$), dok su najniže vrijednosti bile prisutne u ultrazvučnom ekstraktu iz Pavinog Polja, kao i Sokslet ekstraktu sa istog područja ($0,04 \pm 0,06$). Niže vrijednosti dobijene u Sokslet ekstraktima mogu se pripisati ograničenom sposobnošću organskih rastvarača da ekstrahuju neorganske jone, što potvrđuje i istraživanje Zhang i sar. (2023). Visok sadržaj Mn u infuzu iz Plužina ($8,17 \mu\text{g/g}$) ukazuje i na metod (infuz) i na moguću kiseliju reakciju zemljišta, koja prema literaturi Radanović i sar. (2012) povećava unos Mn u plod. Kada je riječ o bakru, njegov sadržaj u radu Pavlović i sar. (2015) se kretao u vrijednosti od $0,82 \pm 0,01$ do $2,11 \pm 0,01$, što se podudara sa vrijednostima ovog master rada.

5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

5.1. Pearsonova korelacija između sadržaja fenolnih jedinjenja, mikroelemenata i antioksidativne aktivnosti u uzorcima svježeg ploda aronije i ekstrakata suvog ploda aronije

U cilju ispitivanja povezanosti između sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti, sprovedena je Pearsonova korelaciona analiza. U tabeli 3 su prikazane vrijednosti koeficijenata korelacije (r) između ukupnog sadržaja fenola, flavonoida, antocijana i tanina s jedne strane, i antioksidativnih aktivnosti mjerenih DPPH i FRAP metodama s druge strane. Analiza je urađena za ukupno 20 uzoraka aronije, uključujući svjež plod i ekstrakte dobijene metodama ultrazvučne ekstrakcije, ekstrakcije vrućom vodom, maceracije i Sokslet ekstrakcije.

Tabela 3. Koeficijenti korelacije između sadržaja fenola, flavonoida, antocijana i tanina i antioksidativne aktivnosti (DPPH i FRAP metode).

Bioaktivna komponenta	DPPH	FRAP
Fenoli	$r = 0,35$	$r = 0,03$
Flavonoidi	$r = -0,38$	$r = 0,6$
Antocijani	$r = -0,04$	$r = 0,17$
Tanini	$r = -0,20$	$r = 0,14$

Dobijeni rezultati ukazuju na različite stepene povezanosti ispitivanih parametara. U odnosu na DPPH aktivnost, uočena je slaba pozitivna korelacija sa ukupnim fenolima ($r = 0,35$), dok su flavonoidi, antocijani i tanini pokazali slabu negativnu korelaciju ($r = -0,38$; $r = -0,04$; $r = -0,20$, redom), što ukazuje na moguće kompleksne međusobne uticaje jedinjenja prisutnih u ekstraktima na slobodne radikale. S druge strane, u slučaju FRAP metode, najvišu pozitivnu korelaciju pokazali su flavonoidi ($r = 0,60$), što sugerise da oni značajnije doprinose redukcijom potencijalu uzoraka. Fenoli, antocijanini i tanini imali su nisku pozitivnu korelaciju ($r = 0,03$; $r = 0,17$; $r = 0,14$), što ukazuje na slabiji doprinos tih parametrima u okviru ukupne antioksidativne moći mjerene ovom metodom.

Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da flavonoidi imaju veći uticaj na FRAP vrijednosti, dok je povezanost ostalih komponenti sa antioksidativnom aktivnošću slabija ili negativna, naročito kod DPPH metode.

U cilju procjene potencijalne uloge mikroelemenata u antioksidativnoj aktivnosti uzoraka aronije, određena je Pearsonova korelacija između sadržaja mangana (Mn), gvožđa (Fe), bakra (Cu) i cinka (Zn) i vrijednosti DPPH i FRAP metoda. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 4.

Tabela 4. Pearsonova korelacija između sadržaja mikroelemenata (Mn, Fe, Cu, Zn) i antioksidativne aktivnosti (DPPH i FRAP metode).

Mikroelement	DPPH	FRAP
Mn	-0,17	-0,22
Fe	-0,10	-0,61
Cu	-0,11	-0,11
Zn	-0,04	-0,35

Sve ispitivane korelacije pokazale su slab do umjeren negativan koeficijent, što ukazuje da prisustvo ovih mikroelemenata u većim koncentracijama nije direktno povezano sa većom antioksidativnom aktivnošću, bar ne u mjerenom opsegu. Najizraženija negativna korelacija zabilježena je između sadržaja Fe i FRAP vrijednosti ($r = -0,61$), što ukazuje na potencijalni inhibitorski efekat viših koncentracija gvožđa na redukcionu sposobnost uzoraka. Takođe, umjeren negativan odnos uočen je i za Zn i FRAP ($r = -0,35$), dok su ostali metali pokazali slabije korelacije sa obje metode. Ovakvi rezultati sugeriraju da ovi mikroelementi vjerovatno ne doprinose direktno antioksidativnoj aktivnosti, već da njihova uloga može biti indirektna ili u sinergiji sa drugim komponentama prisutnim u ekstraktima. Pored Pearsonove korelacije, izračunat je i Spearmanov koeficijent korelacije, s obzirom na to da rezultati prethodne analize ukazuju na odstupanje podataka od normalne raspodjele.

5.2. ANOVA, Friedmanov test i Spearmanov koeficijent korelacije

ANOVA (analiza varijanse) je statistička metoda koja se koristi da se utvrdi koliko različiti izvori varijabilnosti doprinose ukupnoj razlici u podacima. U praksi, npr. kod ispitivanja biljaka i polifenola, ANOVA se može koristiti da se odvoji greška koja nastaje tokom uzorkovanja od greške u samoj analizi. Na taj način se dobija ukupna „tehnička varijansa” i može se uporediti sa stvarnom varijabilnošću u uzorku, što omogućava precizniju interpretaciju rezultata (Ramsey i sar. 1992).

Friedmanov test spada u neparametarske metode analize varijanse zasnovane na rangovima i koristi se kada podaci ne ispunjavaju pretpostavke parametarskih testova, kao što je normalna distribucija. Posebno je pogodan za poređenje više od dva tretmana ili uslova kod zavisnih uzoraka, a primjenjuje

se na podatke mjerenja na ordinalnoj ili ne-normiranoj skali. Nulta hipoteza testa podrazumijeva da ne postoje razlike između ispitivanih tretmana, dok alternativna pretpostavlja postojanje razlika. Zbog toga se često koristi u istraživanjima u kojima se želi utvrditi da li različite metode ili uslovi daju statistički značajno različite rezultate (Gabor, 2018). Rezultati Friedman testa izražavaju se preko χ^2 statistike (hi-kvadrat), koja pokazuje koliko se raspodjela dobijenih rangova razlikuje od očekivane slučajne raspodjele. Statistička značajnost (sig.) ukazuje na vjerovatnoću da su uočene razlike nastale slučajno. Ako je sig. manja od 0,05, razlike među uslovima ili tretmanima smatraju se statistički značajnim (Chatfield i Mander, 2009).

U ovom istraživanju Friedmanov test je primijenjen za poređenje sadržaja polifenolnih jedinjenja u ekstraktima ploda aronije dobijenih različitim metodama ekstrakcije, jer podaci nisu ispunjavali pretpostavke normalne raspodjele. Na taj način omogućeno je da se utvrde razlike između metoda i da se dobiju pouzdaniji zaključci u odnosu na parametarske pristupe.

Spearmanov koeficijent korelacije predstavlja neparametarsku mjeru povezanosti između dvije promjenljive. Za razliku od Pearsonovog koeficijenta, ne zahtijeva pretpostavku o normalnoj raspodjeli podataka i koristi se kada su podaci rangirani ili kada odnos između varijabli nije linearan već monoton. Vrijednost koeficijenta kreće se u intervalu od -1 do +1. Vrijednosti bliske +1 ukazuju na jaku pozitivnu korelaciju (povećanje jedne promjenljive prati povećanje druge), dok vrijednosti bliske -1 označavaju jaku negativnu korelaciju (povećanje jedne promjenljive prati smanjenje druge). Vrijednost bliska nuli ukazuje na slabu ili nepostojeću povezanost (Ali Abd Al-Hameed, 2022).

5.3. Friedmanov test

Tabela 5. Poređenje vrijednosti za bioaktivne komponente, dobijenih analizom svježeg ploda aronije i ekstrakata suvog ploda aronije, različitim metodama ekstrakcije - Friedmanov test.

	Svježi uzorak	Ultrazvučna ekstrakcija	Ekstrakcija vrućom vodom	Maceracija	Soksljet ekstrakcija	χ^2	sig
Antocijani	0,39±0,13	1,36±0,79	0,36±0,24	0,96±0,75	0,42±0,15	113,285	,000
Tanini	0,86±0,3	1,51±0,68	9,83±1,82	1,05±0,41	1,59±0,56	93,980	,000
Flavonoidi	197,3±58,59	589,18±806,31	3165,64±727,69	1903,03±589,07	1200,24±363,27	134,000	,000
Fenoli	756,07±885,26	1886,79±179,34	995,75±268,63	1096,36±411,03	263,77±231,33	105,920	,000
FRAP	0,27±0,11	0,61±0,21	1,22±0,56	2,18±0,7	1,33±0,27	142,000	,000
DPPH-IC ₅₀	0,01±0,01	0,36±0,36	0,01±0,01	0,02±0,01	0,01±0	33,641	,000

Najviše vrijednosti su boldirane, dok su najniže označene crvenom bojom.

Poređenje vrijednosti dobijenih različitim metodama ekstrakcije je izvršeno Friedmanovim testom, jer raspodjela vrijednosti značajno odstupa od normalne raspodjele (tabela 5). U cilju procjene efikasnosti različitih metoda ekstrakcije (svježi uzorak, Sokslet ekstrakcija, maceracija, ekstrakcija vrućom vodom i ultrazvučna ekstrakcija), ispitana je koncentracija nekoliko klasa bioaktivnih jedinjenja (antocijani, tanini, flavonoidi, fenoli) i antioksidativna aktivnost putem FRAP i DPPH metoda. Rezultati su prikazani u tabeli 5, a statistički obrađeni pomoću Friedmanovog testa, koji je u svim slučajevima pokazao statistički značajne razlike među primijenjenim metodama ($p < 0,001$).

Antocijani

Najveći sadržaj antocijana dobijen je ultrazvučnom ekstrakcijom ($1,36 \pm 0,79$), što potvrđuju i podaci iz literature jer mehanička energija olakšava oslobađanje pigmentnih jedinjenja (Azwanida, 2015). S druge strane, ekstrakcija vrućom vodom ($0,36 \pm 0,24$) i svježi uzorak ($0,39 \pm 0,13$) pokazali su najmanji sadržaj antocijana. Razlike među metodama bile su značajne ($\chi^2 = 113,285$; $p < 0,001$), ali bez obzira na to, metoda ekstrakcije ima veliku ulogu pri izdvajanju antocijana iz biljnih uzoraka (Sultana i sar., 2009).

Tanini

Ekstrakcija vrućom vodom je pokazala izuzetno visok sadržaj tanina ($9,83 \pm 1,82$), dok se ostalim metodama, uključujući ultrazvuk ($1,51 \pm 0,68$) i Sokslet ekstrakciju ($1,59 \pm 0,56$), dobijaju znatno niže vrijednosti. Svježi uzorak imao je gotovo desetostruko manji sadržaj ($0,86 \pm 0,30$). Ovi rezultati ukazuju da su tanini izrazito rastvorljivi u toplim vodenim rastvorima, posebno tokom ekstrakcije vrućom vodom, što potvrđuju i podaci u radu Wang i Weller (2006). Statistička razlika potvrđena je Friedmanovim testom ($\chi^2 = 93,980$; $p < 0,001$).

Flavonoidi

Ekstrakt dobijen vrućom vodom sadrži najvišu koncentraciju flavonoida ($3165,64 \pm 727,69$), što je u skladu sa literaturom koja ukazuje da toplotna obrada (kao kod ove ekstrakcije) povećava pristupačnost ovih jedinjenja (Hossain i sar., 2011). Maceracijom i Sokslet ekstrakcijom se dobijaju niže vrijednosti, dok su svježi uzorak i ultrazvuk bili znatno ispod prosjeka. Statistička analiza potvrdila je jasnu razliku ($\chi^2 = 134,000$; $p < 0,001$).

Fenoli

Najviši sadržaj fenola zabilježen je kod ultrazvučne ekstrakcije ($1886,79 \pm 179,34$), što potvrđuje da ultrazvuk omogućava razbijanje ćelijskih zidova i efikasnije oslobađanje fenolnih jedinjenja (Khan i sar., 2013). U Sokslet ekstraktu dobijena je najniža vrijednost ($263,77 \pm 231,33$), što ukazuje na moguće

razlaganje fenola tokom dužeg zagrijavanja. Statistička razlika potvrđena je Friedmanovim testom ($\chi^2 = 105,920$; $p < 0,001$).

FRAP

Najviša antioksidativna aktivnost prema FRAP testu registrovana je kod maceracije ($2,18 \pm 0,70$), a zatim kod Sokslet ekstrakcije ($1,33 \pm 0,27$) i ekstrakcije vrućom vodom ($1,22 \pm 0,56$). Svježi uzorak ($0,27 \pm 0,11$) pokazao je značajno nižu aktivnost. Ovi rezultati ukazuju na to da se antioksidanti značajno oslobađaju tokom ekstrakcije, a posebno kod metoda koje omogućavaju duži kontakt sa rastvaračem (Sultana i sar., 2009). Razlika među metodama bila je statistički značajna ($\chi^2 = 142,000$; $p < 0,001$).

DPPH-IC₅₀

Zanimljivo, Svježi uzorak, ekstrakt dobijen vrućom vodom i Sokslet ekstrakt pokazali su jednaku i najjaču antioksidativnu aktivnost ($0,01 \pm 0,01$). Ultrazvučna ekstrakcija ($0,36 \pm 0,36$) i maceracija ($0,02 \pm 0,01$) bile su manje efikasne. Ovi podaci ukazuju da neki antioksidansi mogu biti termolabilni i razgradivi tokom agresivnijih tretmana, te da prirodno prisutna jedinjenja u sirovom uzorku igraju ključnu ulogu u DPPH odgovoru (Wang & Weller, 2006). Razlika među tretmanima je potvrđena i Friedmanovim testom ($\chi^2 = 33,641$; $p < 0,001$).

Dakle, može se uočiti da rezultati jasno pokazuju da izbor metode ekstrakcije ima presudan uticaj na izdvajanje bioaktivnih jedinjenja i antioksidativnu aktivnost. Ekstrakcija vrućom vodom se pokazala kao najefikasnija metoda za tanine i flavonoide, dok je ultrazvuk najefikasniji za fenole i antocijane. Maceracija je bila posebno uspješna u FRAP testu, dok je svježi uzorak zadržao visoku DPPH aktivnost.

Statistička analiza (Friedmanov test) je potvrdila da su razlike među metodama značajne za svaki parametar ($p < 0,001$), što je u saglasnosti sa prethodnim studijama koje ukazuju da metoda ekstrakcije direktno utiče na sastav i biološku aktivnost ekstrakta (Wang i Weller, 2006; Sultana i sar., 2009; Hossain i sar., 2010; Khan i sar., 2013; Azwanida, 2015).

U tabeli 6, dato je poređenje vrijednosti dobijenih različitim metodama ekstrakcije, za metale iz svježeg ploda aronije i ekstrakata suvog ploda aronije - Friedmanov test.

Tabela 6. Poređenje vrijednosti dobijenih za metale iz svježeg ploda aronije i ekstrakata suvog ploda aronije - Friedmanov test

	Svježi uzorak	Sokslet ekstrakcija	Ultrazvučna ekstrakcija	Ekstrakcija vrućom vodom	Maceracija	χ^2	Sig
Zn	3,39±0,3	1,03±0,25	2,02±0,97	4,92±0,5	1,33±0,68	134,000	,000
Fe	4,47±1,06	0,31±0,1	1,26±0,35	2,67±0,2	0,69±0,18	154,880	,000
Cu	0,65±0,32	0,56±0,75	0,47±0,38	1,71±1,21	0,76±0,96	43,620	,000
Mn	2,77±1,66	0,58±0,05	1,74±0,71	6,71±1,92	1,01±0,23	152,500	,000

Boldirane su najviše vrijednosti a najniže vrijednosti su označene crvenom bojom.

Cink (Zn)

Najveća koncentracija cinka zabilježena je kod ekstrakta dobijenog vrućom vodom (4,92±0,50 mg/g), što ovu metodu svrstava među najefikasnije za izdvajanje Zn iz aronije. Slični podaci su zabilježeni u radu autora Hossain i saradnici (2010), gdje je ekstrakcija vrućom vodom pokazala veću sposobnost ekstrakcije mikroelemenata u poređenju sa drugim metodama. Svježi uzorak (3,93±0,30) takođe sadrži značajnu količinu cinka, dok se maceracijom (1,33±0,68) i Sokslet ekstrakcijom (1,03±0,25) dobijaju znatno niže vrijednosti. Statistički značajna razlika potvrđena je Friedmanovim testom ($\chi^2 = 134,000$; $p < 0,001$), što je u skladu sa podacima drugih autora koji su ispitivali značaj metode u efikasnosti izdvajanja elemenata (Azwanida, 2015).

Gvožđe (Fe)

Svježi uzorak aronije imao je najvišu koncentraciju Fe (4,47±1,06), što ukazuje da ekstrakcioni postupci, u ovom slučaju, ne potpomažu znatnije izdvajanje gvožđa u ekstrakt. Najefikasnija ekstrakcija bila je ekstrakcija vrućom vodom (2,67±0,20), dok je Sokslet ekstrakcijom dobijena najmanja vrednost (0,31±0,10). Ovi podaci su u skladu sa istraživanjima u kojima je pokazano da prisustvo vezanih oblika Fe u biljnoj matrici otežava njegovo izdvajanje (Khan i sar., 2013). Statistički značajna razlika potvrđena je Friedmanovim testom ($\chi^2 = 154,880$; $p < 0,001$).

Bakar (Cu)

Ekstrakcija vrućom vodom je rezultirala najvećom koncentracijom Cu (1,71±1,21), dok je ultrazvučna ekstrakcija pokazala najniži efekat (0,47±0,38). Svježi uzorak, Sokslet ekstrakcija i maceracija pokazale su približno jednake rezultate. Ovi rezultati ukazuju na to da termički uslovi ekstrakcije

(poput onih kod ekstrakcije vrućom vodom) mogu značajno povećati rastvorljivost i pristupačnost Cu iz biljnog materijala (Wang i sar., 2006). Friedmanov test ($\chi^2 = 43,620$; $p < 0,001$) je potvrdio da pri različitim ekstrakcijama postoji statistički značajna razlika.

Mangan (Mn)

Najviša koncentracija Mn ($6,71 \pm 1,92$) nađena je u ekstraktu dobijenom ekstrakcijom vrućom vodom, što je u skladu sa studijama koje su pokazale da topla voda kao rastvarač omogućava efikasno oslobađanje rastvorljivih minerala iz biljaka (Sultana i sar., 2009). U svježem plodu aronije nađeno je prirodno prisustvo Mn ($2,77 \pm 1,66$), dok su vrijednosti dobijene u ekstraktima ostalih metoda ekstrakcije bile znatno niže. Najnižu koncentraciju imao je Sokslet ekstrakt ($0,58 \pm 0,05$). Statistička razlika među metodama potvrđena je Friedmanovim testom ($\chi^2 = 152,500$; $p < 0,001$).

Rezultati prikazani u tabeli 6 jasno pokazuju da izbor metode ekstrakcije ima veliki uticaj na efikasnost izdvajanja metala iz biljnih uzoraka, što potvrđuju i brojna istraživanja iz fitohemije i analitičke hemije (Sultana i sar., 2009; Khan i sar., 2013; Azwanida, 2015). Ekstrakcija vrućom vodom se pokazala kao najefikasnija metoda u svim slučajevima, dok su Sokslet i ultrazvučna ekstrakcija bile značajno slabije, naročito kad su u pitanju Fe i Mn. Može se reći, da ovi podaci mogu imati primjenu u razvoju ekstrakcionih protokola za analizu elemenata u biljnim matricama. Na osnovu rezultata Friedmanovog testa (tabela 6) uočava se da za svaki metal između različitih metoda ekstrakcije postoji statistički značajna razlika.

5.4. Sadržaj bioaktivnih jedinjenja i antioksidativni potencijal po lokalitetima i po metodama ekstrakcije (ANOVA analiza)

U tabeli 7 prikazani su rezultati jednofaktorske ANOVA analize, koja je korišćena kako bi se procijenila statistička značajnost razlika u sadržaju bioaktivnih jedinjenja (anocijana, fenola, flavonoida, tanina) i parametara antioksidativne aktivnosti (FRAP, DPPH-IC₅₀), analiziranih nakon primjene četiri metode ekstrakcije i čisti svježi uzorak: svježi uzorak (SU), Sokslet ekstrakcija (SO), ultrazvučna ekstrakcija (UZ), ekstrakcija vrućom vodom (VV) i maceracija (MA), u zavisnosti od geografskog porijekla biljnih uzoraka – konkretno sa lokaliteta Plužine, Pavino Polje, Berane i Plav. S obzirom na to da su vrijednosti u okviru svakog od lokaliteta raspodijeljene po zakonu normalne raspodjele, za poređenje vrijednosti sa različitih lokaliteta je korišćena jednofaktorska ANOVA.

Tabela 7. Uticaj lokaliteta na sadržaj bioaktivnih jedinjenja i antioksidativni potencijal
(ANOVA analiza)

	Plužine	Pavino Polje	Berane	Plav	F	Sig
Antocijani_VV	0,34±0,07	0,13±0,06	0,73±0,07	0,23±0,08	139,561	0,000
Antocijani_MA	0,79±0,05	0,53±0,09	2,19±0,17	0,33±0,04	667,455	0,000
Antocijani_SO	0,56±0,11	0,28±0,12	0,46±0,1	0,37±0,1	12,977	0,000
Antocijani_SU	0,49±0,06	0,24±0,05	0,5±0,09	0,33±0,07	36,140	0,000
Antocijani_UE	1,68±0,03	0,58±0,02	2,48±0,06	0,7±0,04	4752,696	0,000
DPPH_IC50_VV	0,0048±0,0001	0,019±0,0005	0,0111±0,0011	0,0018±0	1571,753	0,000
DPPH_IC50_MA	0,0003±0	0,0246±0,0011	0,021±0,0008	0,0321±0,0012	2273,270	0,000
DPPH_IC50_SO	0,0054±0,0001	0,0053±0,0001	0,0048±0,0001	0,0121±0,0001	11919,115	0,000
DPPH_IC50_SU	0,0042±0,0001	0,0292±0,0002	0,0022±0,0001	0,011±0,001	5370,312	0,000
DPPH_IC50_UE	0,0054±0,0001	0,737±0,0142	0,0028±0,0001	0,6939±0,0018	33076,557	0,000
Fenoli_IN	639,73±23,58	908,66±22,43	1063,3±18,09	1371,33±16,06	2270,549	0,000
Fenoli_MA	1562,69±185,63	875,88±22,9	1377,69±64,1	569,19±25,19	209,146	0,000
Fenoli_SO	645,87±36,47	228,54±3,89	94,1±5,33	86,57±6,56	1952,187	0,000
Fenoli_SU	2257,11±38,25	247,73±9,1	418,82±9,59	100,63±7,31	24083,008	0,000
Fenoli_UE	2056,99±8,37	1599,28±12,29	2002,13±9,43	1888,74±15,71	2991,080	0,000
Flavonoidi_VV	4186,2±13,86	2351,3±34,33	2651,75±6,13	3473,3±22,89	14241,253	0,000
Flavonoidi_MA	2438,03±11,69	1083,8±15,55	2466,35±13,09	1623,95±15,59	22739,627	0,000
Flavonoidi_SO	1467,9±9,62	1188,4±12,81	619,7±11,98	1524,95±8,63	14437,912	0,000
Flavonoidi_SU	109,28±7,08	193,85±10,65	219,41±10,09	266,65±10,12	473,341	0,000
Flavonoidi_UE	297,3±24,33	66,75±9,33	1956,8±9,41	35,85±12,19	36891,183	0,000
FRAP_VV	1,36±0,03	0,65±0,02	0,81±0,01	2,07±0,01	9519,675	0,000
FRAP_MA	3,18±0,03	1,38±0,04	2,44±0,07	1,71±0,02	3016,420	0,000
FRAP_SO	1,7±0,01	1,08±0,01	1,46±0,02	1,08±0,01	5527,327	0,000
FRAP_SU	0,14±0,01	0,18±0,01	0,42±0,01	0,33±0,01	1400,794	0,000
FRAP_UE	0,92±0,01	0,39±0,01	0,69±0,02	0,45±0,01	2968,850	0,000
Tanini_VV	10,28±0,83	9,12±0,9	7,9±1,28	12,01±1	29,706	0,000
Tanini_MA	1,3±0,52	0,81±0,12	0,82±0,25	1,29±0,33	6,727	0,001
Tanini_SO	1,83±0,67	1,49±0,6	1,79±0,35	1,25±0,4	2,716	0,059
Tanini_SU	0,41±0,05	1,15±0,07	0,86±0,07	1,04±0,12	155,294	0,000
Tanini_UE	1,76±0,25	1,1±0,11	2,46±0,05	0,73±0,15	230,247	0,000

Boldirane su najviše vrijednosti, a najniže vrijednosti su označene crvenom bojom.

Rezultati iz tabele 7 ukazuju da za sve analizirane komponente postoji statistički značajna razlika između lokaliteta ($p < 0,05$), što potvrđuje jak uticaj ekoloških faktora na fitohemijski sastav biljaka.

Visoke vrijednosti F-statistike (npr. za antocijane u ultrazvučnom ekstraktu: $F = 4752,696$; za DPPH- IC_{50} u ultrazvučnom ekstraktu: $F = 33076,557$) dodatno potvrđuju snagu ovog uticaja.

Dakle, na osnovu rezultata jednofaktorske ANOVA-e se uočava da između različitih lokaliteta pri različitim metodama ekstrakcije kao i za svako posmatrano jedinjenje postoji statistički značajna razlika.

Sadržaj antocijana

Sadržaj antocijana bio je značajno veći u uzorcima iz Berana i Plužina, što može biti rezultat većeg UV zračenja ili temperaturnih oscilacija, koji su poznati stimulansi za biosintezu antocijana (Mohr, 2018). Antocijani kao fenolna jedinjenja reaguju na stresne uslove u okolini, pa biljke iz visinskih ili osunčanih predjela često pokazuju povećan nivo ovih jedinjenja (Gould, 2004).

Antioksidativna aktivnost (DPPH i FRAP)

Uzorci iz Berana i Plužina pokazuju izrazito niske DPPH- IC_{50} vrijednosti, što ukazuje na jaku antioksidativnu aktivnost. Suprotno tome, Pavino Polje i Plav imaju znatno viši IC_{50} , što ukazuje na slabiji kapacitet neutralizacije slobodnih radikala. Ovi rezultati su u skladu sa sadržajem ukupnih fenola i flavonoida, koji su glavni nosioci antioksidativne aktivnosti (Prior i sar., 2005; Dai i Mumper, 2010).

Ukupni fenoli i flavonoidi

Najviši sadržaji ukupnih fenola i flavonoida zabilježeni su u Plužinama, dok su Pavino Polje i Plav generalno imali niže vrijednosti. Poznato je da fenolni metaboliti značajno variraju u zavisnosti od mikroklimatskih uslova, tipa zemljišta i dostupnosti nutrijenata (Cowan, 1999). Prisustvo flavonoida u višim koncentracijama u Plužinama takođe može biti povezano sa povećanom sunčevom ekspozicijom, koja indukuje njihovu sintezu kao dio mehanizama zaštite od UV zračenja (Treutter, 2005).

Tanini

Tanini pokazuju manje izražene razlike po lokalitetima, ali su i dalje statistički značajne (npr. tanini u ekstraktu vrućom vodom: $F = 29,706$; $p < 0,001$). Njihova koncentracija je najviša u Plužinama i Beranama, što je u skladu sa rezultatima za fenole i flavonoide, imajući u vidu da svi pripadaju istoj grupi fenolnih jedinjenja.

Na osnovu ove analize može se uočiti da lokalitet značajno utiče na hemijski sastav biljnih ekstrakata, što je u skladu sa literaturom koja ukazuje da su fitohemijski profili biljaka visoko zavisni od uslova sredine – uključujući nadmorsku visinu, sunčevu ekspoziciju, temperaturu, vlagu i sastav zemljišta (Lattanzio i sar., 2006; Pant i sar., 2021). Ovi rezultati imaju praktičan značaj u kontekstu

standardizacije sirovina za farmaceutske ili prehrambene potrebe – jer ista biljna vrsta može imati različitu bioaktivnost u zavisnosti od mjesta sakupljanja.

5.5. Sadržaj metala po lokalitetima i po metodama ekstrakcije (ANOVA analiza)

Tabela 8. Uticaj lokaliteteta na sadržaj metala (ANOVA analiza)

	Plužine	Pavino Polje	Berane	Plav	F	Sig
Zn_SU	2,94±0,09	3,44±0,11	3,71±0,06	3,46±0,07	153,760	,000
Zn_SO	0,76±0,03	0,9±0	1,43±0,01	1,02±0,03	1856,075	,000
Zn_UZ	1,73±0,03	1,14±0,04	1,57±0,01	3,63±0,02	15863,073	,000
Zn_VV	5,7±0,05	4,84±0,04	4,81±0,03	4,33±0,03	2641,870	,000
Zn_MA	1,06±0,03	2,47±0,03	0±0,02	0,81±0,03	7122,141	,000
Fe_SU	4,61±0,76	4,58±0,13	5,73±0,1	2,97±0,07	85,875	,000
Fe_SO	0,25±0,08	0,36±0,11	0,29±0,08	0,36±0,07	3,779	,019
Fe_UZ	1,26±0,17	1,42±0,34	1,56±0,09	0,8±0,1	26,460	,000
Fe_VV	2,51±0,12	2,97±0,06	2,62±0,08	2,56±0,1	52,020	,000
Fe_MA	0,42±0,05	0,73±0,1	0,74±0,15	0,85±0,03	39,497	,000
Cu_SU	0,84±0,57	0,74±0,1	0,49±0,07	0,54±0,06	3,133	,037
Cu_SO	0,6±0,83	0,07±0,07	0,14±0,02	1,42±0,7	13,062	,000
Cu_UZ	0,4±0,08	0,05±0,07	0,36±0,1	1,05±0,06	300,197	,000
Cu_VV	1,3±0,11	1,05±0,1	3,74±0,05	0,75±0,09	2254,191	,000
Cu_MA	0,22±0,31	0,59±0,08	0,28±0,08	1,97±1,28	15,344	,000
Mn_SU	2,13±0,45	4,33±0,06	2,75±0,02	1,86±2,77	6,231	,002
Mn_SO	0,61±0,03	0,57±0,03	0,63±0,02	0,53±0,02	33,582	,000
Mn_UZ	2,83±0,14	1,63±0,06	1,63±0,07	0,88±0,05	816,311	,000
Mn_VV	8,18±0,07	8,74±0,08	5,96±0,08	3,96±0,08	7959,592	,000
Mn_MA	0,88±0,02	1,38±0,03	0,97±0,04	0,82±0,05	476,913	,000

U tabeli 8 prikazan je sadržaj četiri esencijalna metala (Zn, Fe, Cu, Mn) u plodovima aronije prikupljenim sa četiri različita lokaliteta (Plužine, Pavino Polje, Berane i Plav), analiziranih nakon primjene četiri metode ekstrakcije i čisti svježi uzorak: svježi uzorak (SU), Sokslet ekstrakcija (SO), ultrazvučna ekstrakcija (UZ), ekstrakcija vrućom vodom (VV) i maceracija (MA). Statistička analiza varijanse (jednofaktorska ANOVA) pokazala je značajne razlike u sadržaju metala u zavisnosti od lokaliteta i primijenjene metode ($p < 0,05$, a u većini slučajeva $p < 0,001$).

Cink (Zn)

Najveća vrijednost za Zn zabilježena je u uzorku iz Plužina kod ekstrakcije suvog ploda aronije vrućom vodom ($5,70 \pm 0,05$), dok je najniža detektovana u ultrazvučnom ekstraktu uzorka iz Pavinog Polja ($1,14 \pm 0,04$). Primjetan je trend da ekstrakcija vrućom vodom i ultrazvučna ekstrakcija obezbjeđuju veće koncentracije Zn, što je u skladu sa literaturom koja ukazuje da termička i mehanička obrada olakšavaju oslobađanje metala vezanih za organske matrice (Kabata-Pendias i Pendias, 2000; Yudaev i Chistyakov, 2022).

Geografske razlike ukazuju da aronija sa lokaliteta Plužine generalno ima veći sadržaj Zn, što se može povezati sa geohemijskim sastavom tla i potencijalnim antropogenim uticajem, kao što je dokumentovano u radovima Vinogradove i sar. (2023).

Gvožđe (Fe)

Najviša vrijednost Fe zabilježena je u Beranama kod svježeg uzorka aronije ($5,73 \pm 0,10$), dok je najniža vrijednost izmjerena u Plužinama kod Sokslet ekstrakcije suvog ploda aronije ($0,25 \pm 0,08$). Ove razlike ukazuju da je Fe jače vezan u biljnim tkivima, te metode poput Sokslet ekstrakcije, koje primarno oslobađaju rastvorljive komponente, mogu pokazivati niže vrijednosti (Luo i sar., 2021).

Bakar (Cu)

Ekstremno visoka koncentracija Cu određena je u ekstraktu suvog ploda aronije iz Berana ekstrakcijom vrućom vodom ($3,74 \pm 0,05$), što je najviša pojedinačna vrijednost bakra u cijeloj tabeli. Kod maceracije, sa istog lokaliteta je izmjereno 0,28, što dodatno potvrđuje selektivnost metoda.

Bakar kao mikroelement pokazuje izrazitu varijabilnost između lokaliteta i metoda, što je potvrđeno i u istraživanjima Wairich i sar., (2022), gdje je istaknut antropogeni uticaj i potencijal za bioakumulaciju u biljkama.

Mangan (Mn)

Najviša ukupna vrijednost za Mn registrovana je u ekstraktu vrućom vodom aronije iz Pavinog polja ($8,74 \pm 0,08$ mg/g), dok je najniža vrijednost zabilježena u Sokslet ekstraktu aronije iz Plava ($0,53 \pm 0,02$ mg/g). Ove razlike ukazuju da ekstrakcija vrućom vodom uspješno oslobađa Mn, naročito iz ćelijskih komponenti gdje je vezan za pektine i enzimske kofaktore (Kabata-Pendias i Pendias, 2000). Značajne razlike potvrđene su i statistički, pri čemu ANOVA test za Mn daje p-vrijednosti $< 0,001$ za sve metode, ukazujući na snažan uticaj lokaliteta i metode na koncentracije ovog mikroelementa.

Rezultati jasno pokazuju da lokalitet ima presudan uticaj na koncentraciju metala u biljnim tkivima, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima o uticaju geološke podloge i antropogenih faktora na prisustvo metala (Vinogradova i sar., 2023; Wan i sar., 2024).

Metoda ekstrakcije značajno utiče na dobijene koncentracije. Ekstrakcija suvog ploda aronije vrućom vodom i ultrazvučna ekstrakcija su se pokazale kao najefikasnije u oslobađanju metala, naročito Zn i Mn, što je i očekivano s obzirom na njihove fizičko-hemijske karakteristike i ekstrakcione mehanizme.

Na osnovu rezultata jednofaktorske ANOVAe se uočava da između različitih lokaliteta prilikom različitih metoda ekstrakcije i za svaki posmatrani metal postoji statistički značajna razlika.

Visoke F-vrijednosti i niske p-vrijednosti ukazuju na statistički značajne razlike, što potvrđuje pouzdanost i relevantnost upotrebljenih metoda i potvrđuje da se metali u biljkama ne distribuiraju ravnomjerno ni lokalno ni hemijski.

5.6. Korelacija antioksidativna aktivnost – sadržaj bioaktivnih jedinjenja – metali (Spearmanov koeficijent korelacije)

S obzirom na to da raspodjela na cijelom uzorku nije normalna, za ispitivanje povezanosti antioksidativnih aktivnosti i koncentracija metala i bioaktivnih jedinjenja korišćen je Spearmanov koeficijent korelacije. U tabeli 9 su dati rezultati ovih korelacionih analiza za svaki vid ekstrakcije posebno. Boldirani su oni metali i jedinjenja koja su u statistički značajnoj korelaciji sa antioksidativnim aktivnostima.

Tabela 9. Korelacija antioksidativna aktivnost-sadržaj bioaktivnih jedinjenja-metali

		Antocijani SU	Tanini SU	Flavonoidi SU	Fenoli SU	Zn SU	Fe SU	Cu SU	Mn SU
FRAP SU	Rs	,075	,278	,742**	-,381*	,870**	,226	-,550**	-,048
	Sig	,644	,083	,000	,015	,000	,162	,000	,770
DPPH-IC ₅₀ SU	Rs	-,774**	,690**	,020	-,552**	-,301	-,543**	,453**	,215
	Sig	,000	,000	,905	,000	,059	,000	,003	,183

		Antocijani UE	Tanini UE	Flavonoidi UE	Fenoli UE	Zn UZ	Fe UZ	Cu UZ	Mn UZ
FRAP UE	Rs	,728**	,562**	,559**	,924**	,358*	,127	,288	,574**
	sig	,000	,000	,000	,000	,023	,433	,071	,000
DPPH-IC ₅₀ UE	Rs	-,937**	-,759**	-,773**	-,746**	-,185	-,354*	-,237	-,304
	sig	,000	,000	,000	,000	,254	,025	,140	,057

		Antocijani VV	Tanini VV	Flavonoidi VV	Fenoli VV	Zn VV	Fe VV	Cu VV	Mn VV
FRAP VV	Rs	,174	,712**	,743**	,387*	-,339*	-,627**	-,359*	-,752**
	sig	,283	,000	,000	,014	,032	,000	,023	,000
DPPH-IC ₅₀ VV	Rs	-,111	-,703**	-,762**	-,374*	,336*	,641**	,395*	,759**
	sig	,494	,000	,000	,018	,034	,000	,012	,000

		Antocijani MA	Tanini MA	Flavonoidi MA	Fenoli MA	Zn MA	Fe MA	Cu MA	Mn MA
FRAP MA	Rs	,567**	,251	,747**	,736**	-,202	- ,495**	- ,607**	-,393*
	sig	,000	,118	,000	,000	,210	,001	,000	,012
DPPH-IC ₅₀ MA	Rs	-,743**	,035	-,580**	-,910**	-,387*	,747**	,684**	-,112
	sig	,000	,830	,000	,000	,014	,000	,000	,492

Analiza korelacije između sadržaja bioaktivnih jedinjenja (antocijana, tanina, flavonoida i ukupnih fenola) i antioksidativne aktivnosti (FRAP i DPPH test) ukazuje na značajnu povezanost kod gotovo svih ekstrakata.

Korelacija između sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti

U svim ekstraktima uočena je pozitivna korelacija između ukupnih fenola, flavonoida i tanina sa antioksidativnim kapacitetom prema FRAP metodi. Najizraženiji efekat zabilježen je kod ekstrakta dobijenog ultrazvučnom ekstrakcijom (UE), gdje je koeficijent korelacije između fenola i FRAP iznosio $R_s = 0,924$ ($p < 0,001$). Slične snažne korelacije su zabilježene i za flavonoide ($R_s = 0,559$) i antocijane ($R_s = 0,728$).

Rezultati potvrđuju da su fenolna jedinjenja najvažniji nosioci antioksidativnog potencijala biljnih ekstrakata. Ovakvi rezultati su u skladu sa prethodnim studijama koje pokazuju direktnu povezanost između ukupnog fenolnog sadržaja i antioksidativne aktivnosti, bez obzira na korišćenu metodu mjerenja (Sulaiman i sar., 2011; Cai i sar., 2004).

Kod DPPH metode, prisutna je snažna negativna korelacija između sadržaja fenola i IC_{50} vrijednosti, što je očekivano, jer niže IC_{50} vrijednosti označavaju veću sposobnost neutralizacije slobodnih radikala. Najjača negativna korelacija uočena je za anocijane u UE ekstraktu ($R_s = -0,937$, $p < 0,001$), kao i za fenole ($R_s = -0,746$).

Uloga metala u antioksidativnom odgovoru

Korelacije sa sadržajem metala pokazuju kompleksnije obrasce. Kod nekih metala, kao što je Zn u svježem uzorku SU, uočena je pozitivna korelacija sa FRAP vrijednostima ($R_s = 0,870$), što može ukazivati na potencijalnu ulogu cinka kao kofaktora antioksidativnih enzima. Nasuprot tome, Cu i Fe pokazuju negativnu korelaciju sa antioksidativnom aktivnošću, naročito izraženu u DPPH testu (npr. Cu u SU: $R_s = 0,453$, $p = 0,003$).

Ovi rezultati su u skladu sa literaturom koja ukazuje da višak prelaznih metala kao što su Fe i Cu može imati prooksidativni efekat putem Fentonove reakcije, čime dolazi do povećane proizvodnje reaktivnih kiseoničnih jedinjenja (Valko i sar., 2005; Halliwell i Gutteridge, 2007).

Analizirani rezultati potvrđuju da je antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakata u značajnoj mjeri determinisana sadržajem fenolnih jedinjenja, pri čemu metoda ekstrakcije značajno utiče na njihov prinos i aktivnost. Prisustvo metala može dodatno modulirati antioksidativni odgovor, bilo putem katalitičkih reakcija, bilo vezivanjem za fenolne grupe.

6. ZAKLJUČAK

Analizom bioaktivnih jedinjenja, antioksidativne aktivnosti i sadržaja mikroelemenata u svježem plodu aronije i ekstraktima suvog ploda aronije, dobijenim različitim metodama ekstrakcije, utvrđeno je da lokalitet i način ekstrakcije značajno utiču na hemijski sastav i antioksidativni potencijal uzoraka. Rezultati pokazuju izražene razlike između lokaliteta i metoda ekstrakcije. Uzorci iz Plužina bili su dominantni po ukupnom sadržaju fenola i u svježem plodu i u ekstraktima. Najveći sadržaj flavonoida zabilježen je u svježem plodu iz Plava, dok su ekstrakti suvog ploda aronije vrućom vodom iz Plužina imali najviše flavonoida među ekstraktima. Antocijani su u svježem plodu bili ujednačeni između uzoraka iz Plužina i Berana; u ekstraktima su najviše vrijednosti dobijene takođe za uzorke iz Plužina i Berana, posebno u ultrazvučnim ekstraktima i maceratima. Sadržaj tanina u svježem plodu bio je najveći u uzorcima iz Pavinog Polja, dok su ekstrakti vrućom vodom pokazali približno slične vrijednosti tanina na sve četiri lokacije.

DPPH i FRAP testovi dali su djelimično nepodudarne ishode, što je očekivano jer mjere različite mehanizme antioksidativne aktivnosti: DPPH procjenjuje sposobnost „hvatanja“ slobodnih radikala dok FRAP procjenjuje redukcionu moć (niže DPPH vrijednosti odražavaju jaču aktivnost). U tom smislu, uzorci iz Plužina pokazali su najizraženiji antioksidativni potencijal. Nasuprot tome, u ekstraktima su povišene DPPH vrijednosti (slabija aktivnost) uočene kod dva uzorka iz Pavinog Polja i Plava. FRAP vrijednosti su bile najveće u uzorcima iz Pavinog Polja, zatim iz Plužina i Berana; među ekstraktima, macerat je imao najviše FRAP vrijednosti. Ovakva divergencija između DPPH i FRAP rezultata upućuje na to da različite grupe fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima različito doprinose „hvatanju“ radikala i redukcionoj moći.

Analiza mikroelemenata pokazala je da svježi plod sadrži najveće količine Fe i Cu, dok su Zn i Mn bili najizraženiji u vodenom ekstraktu. Korelacione analize ukazale su na statistički značajne veze između ukupnih fenola, flavonoida i antocijana i antioksidativne aktivnosti, pri čemu su obrasci korelacije zavisili i od lokaliteta i od primijenjene metode ekstrakcije. Sveukupno, i porijeklo i tehnika ekstrakcije presudno utiču na profil bioaktivnih komponenti i antioksidativni odgovor ekstrakata aronije.

Primjena hemometrijskog pristupa, posebno PSA analize, omogućila je jasniju interpretaciju rezultata kroz izdvajanje grupa i obrazaca među uzorcima. Ovaj pristup je potvrdio da se uzorci aronije razlikuju i po hemijskom sastavu i po antioksidativnom odgovoru, što dodatno naglašava značaj kombinovanja klasičnih analitičkih metoda sa multivarijantnim statističkim analizama.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da porijeklo i metoda ekstrakcije presudno utiču na profil bioaktivnih komponenti i antioksidativni potencijal aronije. Ova saznanja su od značaja za optimizaciju procesa ekstrakcije i standardizaciju biljne sirovine namijenjene farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

7. LITERATURA

1. Ali Abd Al-Hameed, K. (2022). Spearman's correlation coefficient in statistical analysis. *International Journal of Nonlinear Analysis and Applications*, 13(1), 3249-3255.
2. Anaya-Esparza, L. M., Aurora-Vigo, E. F., Villagrán, Z., Rodríguez-Lafitte, E., Ruvalcaba-Gómez, et al. (2023). Design of Experiments for Optimizing Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Plant-Based Sources. *Molecules*, 28(23), 7752.
<https://doi.org/10.3390/molecules28237752>
3. Andersone, A., Janceva, S., Lauberte, L., Skadins, I., Nikolajeva, V., Logviss, K., et al. (2023). A comparative analysis of the proanthocyanidins from fruit and non-fruit trees and shrubs of Northern Europe: Chemical characteristics and biological activity. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 36, 101266.
4. Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 4(3), 196. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>
5. Banach, M., Wiloch, M., Zawada, K., Cyplik, W., & Kujawski, W. (2020). Evaluation of Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of Anthocyanin-Rich Water-Soluble Aronia Dry Extracts. *Molecules*, 25(18), 4055. <https://doi.org/10.3390/molecules25184055>
6. Barbehenn, R. V., & Constabel, C. P. (2011). Tannins in plant–herbivore interactions. *Phytochemistry*, 72(13), 1551-1565.
7. Bernjak, B., & Kristl, J. (2020). A review of tannins in berries. *Agricultura Scientia*, 17(1-2), 27-36.
8. Beecher, G. R. (2003). Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *The Journal of nutrition*, 133(10), 3248S-3254S.
9. Blagojević, N., Kandić, M., Vukašinović-Pešić, V., Brašanac-Vukanović S., Tadić V. M. & Bojović, D. (2023). Antioxidant Potential of Cornelian Cherry (*Cornus mas* L) from Montenegro. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 80(4).
10. Bolling, B. W., Taheri, R., Pei, R., Kranz, S., Yu, M., Durocher, S. N., & Brand, M. H. (2015). Harvest date affects aronia juice polyphenols, sugars, and antioxidant activity, but not anthocyanin stability. *Food chemistry*, 187, 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.106>

11. Brašanac-Vukanović S., Mutić J., Stanković D.M., Arsić I., Blagojević N., Vukašinović-Pešić V., Tadić V. (2018). Wild Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L., *Ericaceae*) from Montenegro as a Source of Antioxidants for Use in the Production of Nutraceuticals, *Molecules*, 23(8), 1864
12. Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74(17), 2157–2184.
13. Catană, L., Catană, M., Iorga, E., Asănică, A. C., Lazăr, A. G., Lazăr, M. A., & Belic, N. (2017). Vitamin C and total polyphenol content and antioxidant capacity of fresh and processed fruits of *Aronia melanocarpa*. *Scientific Papers. Series B. Horticulture*, Vol. LXI, 433-440.
14. Chatfield, M., & Mander, A. (2009). The Skillings–Mack test (Friedman test when there are missing data). *The Stata Journal*, 9(2), 299-305.
15. Ciocoiu, M., Badescu, M., Badulescu, O., Tutunaru, D., & Badescu, L. (2013). Polyphenolic extract association with renin inhibitors in experimental arterial hypertension. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 6(6), 493–497.
16. Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564–582.
17. Ćujić, N. (2017). Optimizacija ekstrakcije ploda aronije, *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott, mikroinkapsulacija ekstrakta metodama elektrostatičke ekstruzije i sušenjem raspršivanjem (Doktorska disertacija). Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
18. Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., & Ibrić, S. (2016). Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food chemistry*, 194, 135-142
19. Cvetković, D., Stanojević, L., Zvezdanović, J., Savić, S., Ilić, D., & Karabegović, I. (2018). Aronia leaves at the end of harvest season—Promising source of phenolic compounds, macro-and microelements. *Scientia Horticulturae*, 239, 17-25.
20. D'Alessandro, L. G., Dimitrov, K., Vauchel, P., & Nikov, I. (2014). Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(10), 1818-1826.
21. d'Alessandro, L. G., Kriaa, K., Nikov, I., & Dimitrov, K. (2012). Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and purification technology*, 93, 42-47.

22. Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
<https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
23. Denev, P., Kratchanova, M., Petrova, I., Klisurova, D., Georgiev, Y., et al. (2018). Black chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) fruits and functional drinks differ significantly in their chemical composition and antioxidant activity. *Journal of Chemistry*, 2018(1), 9574587.
24. Dobros, N., Zielińska, A., Siudem, P., Zawada, K. D., & Paradowska, K. (2024). Profile of Bioactive Components and Antioxidant Activity of *Aronia melanocarpa* Fruits at Various Stages of Their Growth, Using Chemometric Methods. *Antioxidants*, 13(4), 462.
<https://doi.org/10.3390/antiox13040462>
25. Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin– Ciocalteu reagent. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(14), 8139-8144.
26. Fonmboh D. J., Abah E.R., Fokunang T.E., Herve B., Teke G. N., et al. (2020). An Overview of Methods of Extraction, Isolation and Characterization of Natural Medicinal Plant Products in Improved Traditional Medicine Research, *Asian Journal of Research in Medical and Pharmaceutical Sciences*, 9(2), 31-57
27. Gabor, M. R. & Oltean F. D. (2018). Is the old communist brand preferred by the young consumers? A country of origin study case with multimethod analysis, *International Conference “Risk in Contemporary Economy”* 193-201. <https://doi.org/10.26397/RCE2067053243>
28. Gerasimov, M. A., Perova, I. B., Eller, K. I., Akimov, M. Y., Sukhanova, et al. (2023). Investigation of Polyphenolic Compounds in Different Varieties of Black Chokeberry *Aronia melanocarpa*. *Molecules*, 28(10), 4101. <https://doi.org/10.3390/molecules28104101>
29. Gould, K. S. (2004). Nature’s Swiss army knife: The diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004(5), 314–320.
30. Gralec, I. W. M. (2019). *Aronia melanocarpa* berries: Phenolics composition and antioxidant properties changes during fruit development and ripening. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 31(3), 214–221.
31. Gurčík, Ľ., Bajusová, Z., Ladvenicová, J., Palkovič, J., & Novotná, K. (2023). Cultivation and Processing of Modern Superfood—*Aronia melanocarpa* (Black Chokeberry) in Slovak Republic. *Agriculture*, 13(3), 604. <https://doi.org/10.3390/agriculture13030604>

32. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine* (4th ed.). Oxford University Press.
33. Hossain, M. B., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A. B., & Brunton, N. P. (2010). Effect of drying method on the antioxidant capacity of six Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*, 126(1), 64–71.
34. Yudaev, P., & Chistyakov, E. (2022). Chelating Extractants for Metals. *Metals*, 12(8), 1275. <https://doi.org/10.3390/met12081275>
35. Jakobek, L., Šeruga, M., Medvidović-Kosanović, M. i Novak, I. (2007). Antioxidant Activity and Polyphenols of Aronia in Comparison to other Berry Species. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 72 (4), 301-306.
36. Jerković, I., & Marijanović, Z. (2010). Oak (*Quercus frainetto* Ten.) honeydew honey—approach to screening of volatile organic composition and antioxidant capacity (DPPH and FRAP assay). *Molecules*, 15(5), 3744-3756.
37. Jin, D. H., Shin, J. M., Seong, J. H., Lee, Y. G., Kim, D. S., et al. (2016). Comparison of the antioxidant activities and nitrite scavenging activity of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) extracts. *Journal of Environmental Science International*, 25(4), 567-577.
38. Juranović Cindrić, I., Zeiner, M., Mihajlov-Konanov, D., & Stinger, G. (2017). Inorganic Macro- and Micronutrients in "Superberries" Black Chokeberries (*Aronia melanocarpa*) and Related Teas. *International journal of environmental research and public health*, 14(5), 539. <https://doi.org/10.3390/ijerph14050539>
39. Jurendić, T., & Ščetar, M. (2021). *Aronia melanocarpa* Products and By-Products for Health and Nutrition: A Review. *Antioxidants*, 10(7), 1052. <https://doi.org/10.3390/antiox10071052>
40. Jurgoński, A., Juśkiewicz, J., & Zduńczyk, Z. (2008). Ingestion of black chokeberry fruit extract leads to intestinal and systemic changes in a rat model of prediabetes and hyperlipidemia. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 63(4), 176–182. <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0087-7>
41. Jurikova, T., Mlcek, J., Skrovankova, S., Sumczynski, D., Sochor, J., et al. (2017). Fruits of Black Chokeberry *Aronia melanocarpa* in the Prevention of Chronic Diseases. *Molecules*, 22(6), 944. <https://doi.org/10.3390/molecules22060944>
42. Kabata-Pendias, A., & Pendias, H. (2000). *Trace Elements in Soils and Plants*. CRC Press.
43. Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., & Chemat, F. (2013). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols and minerals from *Moringa oleifera* leaves: A comparison with maceration. *Food Chemistry*, 139(1-4), 873–880.

44. Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & nutrition research*, 61(1), 1361779.
45. Kim, H., Kim, Y., Zhang, Y., Lee, M. C., & Om, A. S. (2021). In vitro Evidence that Ethanol Extract of Aronia (*Aronia melanocarpa*) Fruits Inhibits the Inflammatory Response of Macrophages Stimulated by Particulate Matter². *5. Food Supplements and Biomaterials for Health*, 1(4).
46. King, E. S., & Bolling, B. W. (2020). Composition, polyphenol bioavailability, and health benefits of aronia berry: a review. *Journal of Food Bioactives*, 11.
47. Kokotkiewicz, A., Jaremicz, Z., & Luczkiewicz, M. (2010). Aronia plants: a review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine. *Journal of medicinal food*, 13(2), 255–269. <https://doi.org/10.1089/jmf.2009.0062>
48. Kulling, S. E., & Rawel, H. M. (2008). Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) - A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta medica*, 74(13), 1625–1634. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1088306>
49. Kumar, K., Srivastav, S., & Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics sonochemistry*, 70, 105325.
50. Lamy, E., Pinheiro, C., Rodrigues, L., Capela-Silva, F., Lopes, O., et al. (2016). Determinants of tannin-rich food and beverage consumption: oral perception vs. psychosocial aspects.
51. Lattanzio, V., et al. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research*, 23–67.
52. Lee, J. E., Kim, G. S., Park, S., Kim, Y. H., Kim, M. B., et al. (2014). Determination of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenol components using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Overall contribution to antioxidant activity. *Food chemistry*, 146, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.029>
53. Luo, L., Wang, B., Jiang, J., Fitzgerald, M. et al. (2021). Heavy Metal Contaminations in Herbal Medicines: Determination, Comprehensive Risk Assessments, and Solutions. *Frontiers in pharmacology*, 11, 595335. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.595335>
54. Luque de Castro, M. D., & Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of chromatography. A*, 1217(16), 2383–2389. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.02>

55. Malik, M., Zhao, C., Schoene, N., Guisti, M. M., Moyer, M. P., & Magnuson, B. A. (2003). Anthocyanin-rich extract from *Aronia melanocarpa* E induces a cell cycle block in colon cancer but not normal colonic cells. *Nutrition and cancer*, 46(2), 186–196. https://doi.org/10.1207/S15327914NC4602_12
56. McGhie, T. K., & Walton, M. C. (2007). The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Molecular nutrition & food research*, 51(6), 702–713. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700092>
57. Medved'ová, K., Nahliková, L., Stržincová, P., Dubaj, T., & Kreps, F. (2023). Extraction of biologically active compounds from *Aronia melanocarpa*: Comparison of techniques and multiple response optimization. *Acta Chimica Slovaca*, 16(1), 92-98.
58. Milutinović, M. (2020). Chemical analysis and pharmacological effects of chokeberry fruit extracts and juice, *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott
59. Mitic, V., Jovanovic, V. S., Dimitrijevic, M., Cvetkovic, J., Simonovic, S., & Mandic, S. N. (2014). Chemometric analysis of antioxidant activity and anthocyanin content of selected wild and cultivated small fruit from Serbia. *Fruits*, 69(5), 413-422.
60. Mladin, P., Mladin, G., Oprea, E., Rahacek~dulescu, M., & Nicola, C. (2011). Variability of the anthocyanins and tannins in berries of some *Lonicera caerulea* var. *kamchatica*, *Aronia melanocarpa* and *Berberis thunbergii* var. *atropurpurea* genotypes.
61. Mohr, T. (2018). Characterization of Anthocyanins in Aronia, South Dakota State University, Electronic Theses and Dissertations. 2441. <https://openprairie.sdstate.edu/etd/2441>
62. Najda, A., & Łabuda, H. (2013). Content of phenolic compounds and antioxidant properties of fruits of selected orchard shrub species. *Modern Phytomorphology*, 3, 105-109.
63. Naviglio, D., Scarano, P., Ciaravolo, M., & Gallo, M. (2019). Rapid Solid-Liquid Dynamic Extraction (RSLDE): A Powerful and Greener Alternative to the Latest Solid-Liquid Extraction Techniques. *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(7), 245. <https://doi.org/10.3390/foods8070245>
64. Oszmiański, J., & Wojdyło, A. (2005). *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 221(6), 809-813.
65. Parejo, I., Codina, C., Petrakis, C., & Kefalas, P. (2000). Evaluation of scavenging activity assessed by Co (II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH·(2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay. *Journal of Pharmacological and toxicological Methods*, 44(3), 507-512.

66. Patel K., Panchal N. and Ingle P. (2019). Techniques Adopted for Extraction of Natural Products
Extraction Methods: Maceration, Percolation, Soxhlet Extraction, Turbo distillation, Supercritical
Fluid Extraction Int. J. Adv. Res. Chem. Sci. 6
67. Pavlović, A. N., Brčanović, J. M., Veljković, J. N., Mitić, S. S., Tošić, et al. (2015).
Characterization of commercially available products of aronia according to their metal content. Fruits,
70(6), 385-393. <https://revues.cirad.fr/index.php/fruits/article/view/32110>
68. Pavlović, D. R. (2012). Morfološka, hemijska i farmakološka karakterizacija odabranih biljnih
vrsta rodova *Arbutus* L., *Bruckenthalia* Rchb., *Calluna* Salisb. i *Erica* L. (*Ericaceae*) (Doctoral
dissertation, University of Belgrade (Serbia)).
69. Pant, P., Pandey, S., & Dall'Acqua, S. (2021). The influence of environmental conditions on
secondary metabolites in medicinal plants: A literature review. Chemistry & Biodiversity, 18(11),
e2100345. doi.org/10.1002/cbdv.202100345
70. Pljevljakusic, D. (2016). Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using
maceration as traditional technique. Food Chemistry.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.08.008>
71. Poljarec K., (2017). Proizvodnja biljnih ekstrakata, Prehrambeno-bioteknički fakultet Sveučilište
u Zagrebu, Zagreb
72. Prior, R. L., et al. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and
phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(10),
4290–4302.
73. Puzovic, A., & Mikulic-Petkovsek, M. (2024). Comparative Evaluation of Conventional and
Emerging Maceration Techniques for Enhancing Bioactive Compounds in Aronia Juice. Foods,
13(20), 3255. <https://doi.org/10.3390/foods13203255>
74. Radanović, S. D., Antić-Mladenović, B. S., Sekulić, Đ. P., Ninkov, M. J., & Radanović, D. B.
(2012). Initial growth and yield of the black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) grown on the dystic
cambisol and calcareous chernozem soils and mineral composition of its fruits.
75. Radojković, M. (2012). Ekstrakti duda (*Morus* spp., *Morasceae*), sastav, delovanje i primena.
Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
76. Ramsey, Michael H., Michael Thompson, and Martin Hale. (1992). "Objective evaluation of
precision requirements for geochemical analysis using robust analysis of variance." Journal of
geochemical exploration 44.1-3, 23-36.

77. Rodriguez-Mateos, A., Heiss, C., Borges, G., & Crozier, A. (2014). Berry (poly)phenols and cardiovascular health. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(18), 3842–3851. <https://doi.org/10.1021/jf403757g>
78. Rosca, I., Glijin, A., Chiorchina, N., Onika, E., Tabăra, G. M., et al. (2024). Phytochemical analysis of several cultivars of *Aronia melanocarpa* from the collection of the "Alexandru Ciubotaru" National Botanical Garden (institute). *Agricultura*, (1-2), 119-133.
79. Rudraswamy S., Godhi B.S., Shankar H.P.J., Kenganora M., Sumana M.N. (2021). Detailed Understanding of Different Extraction Methods for the Research on Medicinal Plants, *Indian Journal of Oral Health and Research*, 7(1), 14-20
80. Rugină, D., Sconța, Z., Leopold, L., Pinte, A., Bunea, A., & Socaciu, C. (2012). Antioxidant activities of chokeberry extracts and the cytotoxic action of their anthocyanin fraction on HeLa human cervical tumor cells. *Journal of medicinal food*, 15(8), 700–706. <https://doi.org/10.1089/jmf.2011.0246>
81. Saracila, M., Untea, A. E., Oancea, A. G., Varzaru, I., & Vlaicu, P. A. (2024). Comparative Analysis of Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) Fruit, Leaves, and Pomace for Their Phytochemical Composition, Antioxidant Potential, and Polyphenol Bioaccessibility. *Foods*, 13(12), 1856. <https://doi.org/10.3390/foods13121856>
82. Schlager, K. J., & Ruchti, T. L. (1999). Overview of chemometrics. In *Ultrasensitive Instrumentation for DNA Sequencing and Biochemical Diagnostics* (Vol. 2386, pp. 208-221). SPIE.
83. Shi, D., Xu, J., Sheng, L., & Song, K. (2024). Comprehensive Utilization Technology of *Aronia melanocarpa*. *Molecules*, 29(6), 1388. <https://doi.org/10.3390/molecules29061388>
84. Sidor, A., & Gramza-Michałowska, A. (2019). Black Chokeberry *Aronia Melanocarpa* L.—A Qualitative Composition, Phenolic Profile and Antioxidant Potential. *Molecules*, 24(20), 3710. <https://doi.org/10.3390/molecules24203710>
85. Simić, V. M. (2018). Optimizacija mikrotalasne ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz ploda aronije (*Aronia melanocarpa* L.) (Doctoral dissertation, University of Nis (Serbia)).
86. Sochor, J., Rývolová, M., Krystofova, O., Salas, P., Hubalek, J., et al. (2010). Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: Advantages and disadvantages. *Molecules*, 15(12), 8618-8640.
87. Staszowska-Karkut, M., & Materska, M. (2020). Phenolic Composition, Mineral Content, and Beneficial Bioactivities of Leaf Extracts from Black Currant (*Ribes nigrum* L.), Raspberry (*Rubus*

- idaeus*), and Aronia (*Aronia melanocarpa*). *Nutrients*, 12(2), 463. <https://doi.org/10.3390/nu12020463>
88. Sulaiman, S. F., Yusoff, N. A. M., Eldeen, I. M., Seow, E. M., Sajak, A. A. B. and Ooi, K. L. (2011). Correlation between Total Phenolic and Mineral Contents with Antioxidant Activity of Eight Malaysian Bananas (*Musa* sp.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.04.005>
89. Sultana, B., Anwar, F., & Ashraf, M. (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, 14(6), 2167–2180.
90. Szopa, A., Kokotkiewicz, A., Kubica, P., Banaszcak, P., Wojtanowska-Krośniak, A., et al. (2017). Comparative analysis of different groups of phenolic compounds in fruit and leaf extracts of Aronia sp.: *A. melanocarpa*, *A. arbutifolia*, and *A. prunifolia* and their antioxidant activities. *European Food Research and Technology*, 243, 1645-1657.
91. Tambun, R., Alexander, V., & Ginting, Y. (2021). Performance comparison of maceration method, soxhletation method, and microwave-assisted extraction in extracting active compounds from soursop leaves (*Annona muricata*): A review. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 1122, No. 1, p. 012095). IOP Publishing.
92. Tolic, M. T., Krbavcic, I. P., Vujevic, P., Milinovic, B., Jurcevic, I. L., & Vahcic, N. (2017). Effects of weather conditions on phenolic content and antioxidant capacity in juice of chokeberries (*Aronia melanocarpa* L.). *Polish journal of food and nutrition sciences*, 67(1).
93. Trenka, M., Nawirska-Olszańska, A., & Oziembłowski, M. (2020). Analysis of Selected Properties of Fruits of Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) from Organic and Conventional Cultivation. *Applied Sciences*, 10(24), 9096. <https://doi.org/10.3390/app10249096>
94. Treutter, D. (2005). Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology*, 7(6), 581–591.
95. Vagiri, M., & Jensen, M. (2017). Influence of juice processing factors on quality of black chokeberry pomace as a future resource for colour extraction. *Food chemistry*, 217, 409–417. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.121>
96. Valcheva-Kuzmanova, S. V., & Belcheva, A. (2006). Current knowledge of *Aronia melanocarpa* as a medicinal plant. *Folia medica*, 48(2), 11–17.
97. Valcheva-Kuzmanova, S., Marazova, K., Krasnaliev, I., Galunska, B., Borisova, P., & Belcheva, A. (2005). Effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice on indomethacin-induced gastric mucosal damage

- and oxidative stress in rats. *Experimental and toxicologic pathology: official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, 56(6), 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2005.01.009>
98. Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161–1208.
99. Vázquez-Espinosa, M., V. González-de-Peredo, A., Espada-Bellido, E., Ferreiro-González, M., Toledo-Domínguez, J. J., et al. (2019). Ultrasound-Assisted Extraction of Two Types of Antioxidant Compounds (TPC and TA) from Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.): Optimization of the Individual and Simultaneous Extraction Methods. *Agronomy*, 9(8), 456. <https://doi.org/10.3390/agronomy9080456>
100. Vidović, S. (2011). Ekstrakcija, sastav, delovanje i moguće primene odabranih vrsta pečuraka. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
101. Vinogradova, Y., Vergun, O., Grygorieva, O., Ivanišová, E., & Brindza, J. (2020). Comparative analysis of antioxidant activity and phenolic compounds in the fruits of *Aronia* spp. *Slovak Journal of Food Sciences*, 14.
102. Vinogradova, N., Glukhov, A., Chaplygin, V., Kumar, P., Mandzhieva, S., et al. (2023). The Content of Heavy Metals in Medicinal Plants in Various Environmental Conditions: A Review. *Horticulturae*, 9(2), 239. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9020239>
103. Wairich, A., De Conti, L., Lamb, T. I., Keil, R., Neves, L. O., et al. (2022). Throwing Copper Around: How Plants Control Uptake, Distribution, and Accumulation of Copper. *Agronomy*, 12(5), 994. <https://doi.org/10.3390/agronomy12050994>
104. Wan, Y., Liu, J., Zhuang, Z., Wang, Q., & Li, H. (2024). Heavy Metals in Agricultural Soils: Sources, Influencing Factors, and Remediation Strategies. *Toxics*, 12(1), 63. <https://doi.org/10.3390/toxics12010063>
105. Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300–312.
106. Wangenstein, H., Bräunlich, M., Nikolic, V., Malterud, K. E., Slimestad, R., & Barsett, H. (2014). Anthocyanins, proanthocyanidins and total phenolics in four cultivars of aronia: Antioxidant and enzyme inhibitory effects. *Journal of Functional Foods*, 7, 746–752.
107. Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C. S., Zandile, M., et al. (2018). Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops—A review. *Ultrasonics sonochemistry*, 48, 538–549.

108. Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J. A., & Bagchi, D. (2007). Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular nutrition & food research*, 51(6), 675-683.
109. Zhang, M., Zhao, J., Dai, X., & Li, X. (2023). Extraction and Analysis of Chemical Compositions of Natural Products and Plants. *Separations*, 10(12), 598. <https://doi.org/10.3390/separations10120598>
110. Zhang, Y., Zhao, Y., Liu, X., Chen, X., Ding, C., et al. (2021). Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) as a new functional food relationship with health: An overview. *Journal of Future Foods*, 1(2), 168-178.
111. Zielińska, A., Bryk, D., Paradowska, K., Siudem, P., Wawer, I., & Wrzosek, M. (2024). Anti-Atherosclerotic Properties of *Aronia melanocarpa* Extracts Influenced by Their Chemical Composition Associated with the Ripening Stage of the Berries. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(8), 4145. <https://doi.org/10.3390/ijms25084145>