



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI
UNIVERSITY OF BANJA LUKA

PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

NEENZIMSKI ANTIOKSIDATIVNI STATUS JAGODE (*Fragaria vesca*)

MASTER RAD

Mentor:

prof.dr Zoran Kukrić

Kandidat:

Iva Martić

Banja Luka, lipanj 2019.godine



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
STUDIJSKI PROGRAM: BIOLOGIJA



Master rad

**NEENZIMSKI ANTIOKSIDATIVNI STATUS
JAGODE (*Fragaria vesca*)**

MENTOR:

Prof. dr Zoran Kukrić

KANDIDAT:

Iva Martić

Banja Luka, 2019.



UNIVERSITY OF BANJA LUKA
FACULTY OF NATURAL SCIENCES AND
MATHEMATICS
BIOLOGY DEPARTMENT



Master dissertation

NON-ENZYMATIC ANTIOXIDANT STATUS OF STRAWBERRY (*Fragaria vesca*)

MENTOR:

Prof. dr Zoran Kukrić

STUDENT:

Iva Martić

Banja Luka, 2019.

SKRAĆENICE

ABTS – 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijumova so

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal

FC – *Folin-Ciocalteu* reagens

FW – *fresh weight* – svježa materija

GAE – galna kiselina

$\text{HO}_2^\cdot$ – hidroperoksil radikal

H_2O_2 – vodikov peroksid

$\text{O}_2^{\cdot-}$ – superoksid radikal

$^1\text{O}_2$ – singletni kisik

$^\cdot\text{OH}$ – hidroksil radikal

O_3 - ozon

$-\text{OH}$ – hidroksilna grupa

PG – propilgalat

Qu – kvercetin

RBS – *reactive bromine species* - reaktivne vrste broma

RCS – *reactive chlorine species* - reaktivne vrste klora

$\text{RO}^\cdot$ – alkoksi radikal

$\text{ROO}^\cdot$ peroksil radikal

ROOH – organski peroksidi

ROS – *reactive oxygen species* - reaktivne vrste kisika

RSS – *reactive sulphur species* - reaktivne vrste sumpora

RNS - *reactive nitrogen species* – reaktivne vrste dušika

TEAC – *Trolox equivalent antioxidant activity* - Trolox ekvivalent antioksidativne aktivnosti

TROLOX – 6-hidroks-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina

USDA – *United States Department of Agriculture* - nacionalna baza podataka hrane za standardnu referencu

UV – ultraljubičasto zračenje

vitamin C – askorbinska kiselina

ZAHVALA

Zahvaljujem se profesoru Zoranu Kukriću na ukazanoj prilici, strpljenju i izdvojenom vremenu te profesorici Biljani Kukavici na pristupačnosti i pomoći prilikom izvedbe ovoga rada.

Veliko hvala mojoj obitelji koji su mi omogućili studij i kojima pripada veliki dio zasluge za ovaj uspjeh.

Mentor: dr Zoran Kukrić, redovan profesor, Univerzitet u Banjoj Luci, Tehnološki fakultet

NEENZIMSKI ANTIOKSIDATIVNI STATUS JAGODE (*Fragaria vesca*)

Sažetak

U ovom radu je analiziran neenzimski antioksidativni status jagode (*Fragaria vesca*) – sorte gajenih jagoda Albion, Senga Sengana, Elsanta i Clery i jedna divlja jagoda u tekstu označena „šumska“ sa različitih lokaliteta Bosne i Hercegovine. Nakon ekstrakcije uzoraka navedenih sorti, određen je sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, flavonola, ukupnih i monomernih antocijana, antioksidativnu aktivnost prema stabilnim ABTS i DPPH slobodnim radikalima. Sadržaj ukupnih fenola bio je u rasponu od 2,52 do 7,3 $\mu\text{molGEA/g}$ svježe materije, ukupnih flavonoida od 0,58 do 1,11 $\mu\text{molQc/g}$ svježe materije, te flavonola od 0,61 do 1,24 $\mu\text{molQc/g}$ svježe materije. Sadržaj ukupnih antocijana bio je u rasponu od 4,34 do 4,90 mg/100g svježe materije, a sadržaj monomernih antocijana od 8,47 do 23,88 mg/100g svježe materije. Indeks degradacije antocijana se kretao od 1,191 do 1,538. Uzorci sorti Šumska i Albion imali su najveći sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i flavonola. Najveći sadržaj ukupnih i monomernih antocijana imao je uzorak sorte Senga Sengana. Antioksidativna aktivnost za DPPH radikal kretala se u rasponu od 9,3 do 44,96 $\mu\text{mol Tr/g}$ svježe materije, a za ABTS radikal od 19,49 do 46,46 $\mu\text{mol Tr/g}$ svježe materije. Najveću antioksidativnu aktivnost imaju uzorci sorti Albion i Šumska. Koeficijent korelacije (r) ukazuje na međusobne odnose sekundarnih metabolita i antioksidativnih testova. Vrlo visoku vrijednost koeficijenta korelacije pokazali su fenoli i flavonoli $r=0,998$ i $r=0,936$. Također, visoka je korelacija ovih jedinjenja prema stabilnom ABTS radikalu i iznosi $r=0,943$ i $r=0,933$. Kod antocijana je uočena visoka korelacija između antioksidativne aktivnosti prema DPPH radikalu sa indeksom degradacije $r=0,844$, dok korelacija prema ABTS radikalu sa indeksom degradacije iznosila je $r=0,881$. Iz rezultata ovog rada možemo zaključiti da je antioksidativna aktivnost više povezana sa sadržajem fenola i flavonola nego sa ukupnim sadržajem flavonoida i antocijana.

KLJUČNE RIJEČI: jagoda, fenoli, antioksidativni status, DPPH, ABTS

Naučna oblast: Studijski program Biologija, smjer Biohemija

Naučno polje: prirodne nauke

Klasifikacijska oznaka: CC BY-NC-SA

Tip odbrane licence Kreativne zajednice: Autorstvo - nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima

Mentor: dr Zoran Kukrić, professor, University of Banja Luka, Faculty of Technology

NON-ENZYMATIC ANTIOXIDANT STATUS OF STRAWBERRY (*Fragaria vesca*)

Abstract

The paper analyzes with the non-enzymatic antioxidant status of strawberry (*Fragaria vesca*) - varieties of strawberry Albion, Senga Sengana, Elsanta i Clery and one wild strawberry in the text marked as Forest from the different localities Bosnia and Hercegovina. After extraction of the samples was determined the contents of total phenols, flavonoids, flavonols, total and monomeric anthocyanins and antioxidant activity of free DPPH and ABTS radicals. The content of total phenols was between 2,52 to 7,3 $\mu\text{molGAE/g FW}$, total flavonoids from 0,58 to 1,11 $\mu\text{molQc/g FW}$, and flavonols 0,61 to 1,24 $\mu\text{molQc/g FW}$. Contents od total anthocyanins was between 4,34 to 4,90 mg/100gFW , and monomeric anthocyanins was between 8,47 to 23,88 mg/100gFW . The anthocyanin degradation index ranged from 1,191 do 1,538. Sample of vareties Forest and Albion had the highest contents of total phenols, flavonoids and flavonols. The highest contents of total and monomeric anthocyanins was sample varety Senga Sengana. The antioxidant activity for the DPPH ranged from 9,3 to 44,96 $\mu\text{mol Trolox/g FW}$, and for ABTS from 19,49 to 46,46 $\mu\text{mol Tr/g FW}$. The highest anioxidative activity was shown by the varieties of Albion and Forest. Correlation coefficient (r) points to the interrelationships between secondary metabolites and antioxidative tests. High correlation coefficient values showed phenols and flavonols $r = 0.998$ and $r = 0.936$. Also, high correlation of these compounds to activity against a stable ABTS radical is $r = 0.943$ and $r = 0.933$. In the case of anthocyanin, a high correlation was found between the antioxidant activity of the DPPH radical with the degradation index $r = 0.844$, while the correlation with the ABTS radical with the degradation index was $r = 0.881$. From the results of this paper we can conclude that antioxidant activity is more related to phenol and flavonol content than to the total content of flavonoids and anthocyanins.

KEY WORDS: strawberry, phenols, antioxidant activity, DPPH, ABTS

Academic expertise: Biology department, Biochemistry

Scientific field: Natural Sciences

Classification code: CC BY-NC-SA

Type of creative community license Defence: Attribution – NonCommercial – ShareAlike

SADRŽAJ

1. UVOD	8
2. CILJ RADA	9
3. TEORIJSKI DIO.....	10
3.1. Osnovne karakteristike jagode (<i>Fragaria vesca</i>)	10
3.1.1. Porijeklo jagode (<i>Fragaria vesca</i>)	10
3.1.2. Sistematika jagode (<i>Fragaria vesca</i>)	10
3.1.3. Morfologija jagode (<i>Fragaria vesca</i>)	11
3.1.4. Hranidbena i zdravstvena vrijednost jagode.....	14
3.1.5. Uzgoj jagode.....	16
3.2. Slobodni radikali.....	16
3.3. Oksidativni stres	19
3.4. Antioksidanti	20
3.4.1. Funkcija fenolnih spojeva	22
3.4.1.1. Fenolne kiseline	23
3.4.1.2. Flavonoidi	24
3.4.1.3. Flavonoli	25
3.4.1.4. Antocijani	25
3.4.1.5. Antioksidativna aktivnost jagode.....	27
4. EKSPERIMENTALNI DIO	28
4.1. Materijal.....	28
4.2. Kemikalije i reagensi	29
4.3. Aparature i oprema	30
4.4. Pripremanje uzoraka i ekstrakcije.....	30
4.5. Metode	31
4.5.1. Određivanje ukupnih fenola.....	31
4.5.2. Određivanje ukupnih flavonoida.....	32
4.5.3. Određivanje ukupnih flavonola.....	33
4.5.4. Određivanje ukupnih i monomernih antocijana.....	34
4.5.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti.....	35
4.5.5.1. DPPH test	35
4.5.5.2. ABTS test	36
4.6. Statistička obrada podataka	38

5. REZULTATI I DISKUSIJA	39
5.1. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i flavonola	39
5.2. Sadržaj ukupnih i monomernih antocijana	42
5.3. Antioksidativna aktivnost	44
5.3.1. DPPH test.....	44
5.3.2. ABTS test.....	44
5.4. Korelaciona analiza	46
6. ZAKLJUČAK	48
7. LITERATURA	49

1. UVOD

Jagoda (*Fragaria vesca*) je grmolika, zeljasta i višegodišnja biljna vrsta, pripada porodici *Rosaceae* (Pelayo i sur., 2004). Jagoda je prilagodljiva na različite klimatske uvjete, ima širok areal rasprostranjenosti, naseljava umjerenu, mediteransku i suptropsku klimu (Hancock i sur., 1999). Plodovi jagode imaju značajne zdravstvene i nutritivne vrijednosti, antocijana i vitamina C. Zbog visokog sadržaja ukupnih fenola i antocijana u plodu ima visoku antioksidativnu aktivnost (Tulipani i sur., 2008). Ovo je jedina voćna vrsta koja ima sjemenke na vanjskoj strani ploda.

2. CILJ RADA

Za izradu ovog master rada korišteni su uzorci četiri sorte gajenih jagoda (*Fragaria vesca*) (Alibon, Senga Sengana, Elsanta i Cleary) i jedna divlja jagoda u daljem tekstu označena kao „šumska“ sa različitih lokaliteta područja Bosne i Hercegovine (srednja i zapadna Bosna i Hercegovina).

Cilj ovog rada je bio određivanje:

- o sadržaja ukupnih fenola, flavonoida i flavonola
- o sadržaja ukupnih i monomernih antocijana
- o antioksidativne aktivnost prema stabilnim ABTS i DPPH slobodnim radikalima, kod različitih sorti jagoda.

Sukladno dobijenim rezultatima, cilj rada je bio da se utvrdi koja sorta pokazuje najbolji neenzimski antioksidativni status.

Na osnovu definiranih ciljeva, postavljene su sljedeće hipoteze:

- o sadržaj ispitivanih antioksidanata će se statistički značajno razlikovati između različitih sorti jagoda.
- o kod uzoraka će se pokazati pozitivna korelacija između ispitivanih antioksidanata prema stabilnim DPPH/ABTS slobodnih radikala.

3. TEORIJSKI DIO

3.1. Osnovne karakteristike jagode (*Fragaria vesca*)

3.1.1. Porijeklo jagode (*Fragaria vesca*)

Jagoda je jedna od prvih voćnih vrsta koje je čovjek počeo konzumirati. U spisima rimskog senatora Katula između 234.-149. p.n.e. nađeni su prvi zapisi o ovoj biljnoj vrsti. Početkom prvog stoljeća opisana je kao biljka koja posjeduje mnoga ljekovita svojstva. Najveći utjecaj na početak oplemenjivanja i širenje uzgoja jagode imao je francuski kralj Luj XIV., koji je prilikom putovanja u Čile, prenio čileansku jagodu u Francusku. Engleski i francuski oplemenjivači su početkom 19. stoljeća hibridizacijom stvarali nove sorte, plodovi tih sorti su bili krupni, aromatični, lijepe boje i dobre kvalitete. Jagoda je danas nezaobilazna u čovjekovoj prehrani kao ukusna voćka. Ova biljna vrsta prilagođava se različitim klimatskim uvjetima. Uzgaja se na terenima različite nadmorske visine (u razini mora pa sve do 2500 metara nadmorske visine). Oplemenjivači jagode danas imaju cilj dobiti otporne sorte s krupnim plodovima (mase 25 i više grama), koji sadrži dosta vitamina (naročito C) i šećera, da je intenzivne boje, ugodnog mirisa i okusa (Šoškić, 2009).

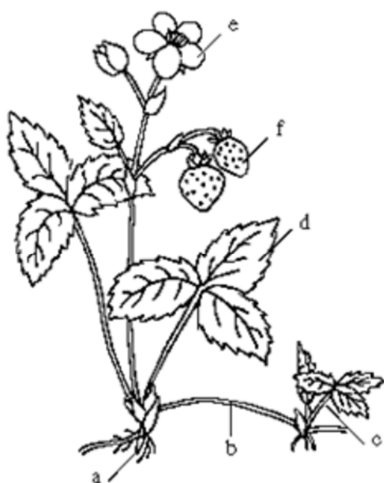
3.1.2. Sistematika jagode (*Fragaria vesca*)

Jagoda (*Fragaria vesca*) rod iz porodice *Rosaceae* (porodica ruža). Višegodišnja, zeljasta, zimzelena biljka, visine od 10 do 40 cm. Životni vijek ove biljne vrste iznosi 7 i više godina (Nikolić i Milivojević, 2010).

Tablica 1. Sistematika jagode (Domac, 1973)

ODJELJAK	<i>Spermatophyta</i> (sjemenjače)
PODODJELJAK	<i>Magnoliophyta</i> ili <i>Angiospermae</i> (kritosjemenjače)
RAZRED	<i>Magnoliatae</i> ili <i>Dicotyledoneae</i> (dvosupnice)
PODRAZRED	<i>Rosidae</i>
NADRAZRED	<i>Rosanae</i>
RED	<i>Rosales</i>
PORODICA	<i>Rosaceae</i> (ruže)
PODPORODICA	<i>Rosoideae</i>
ROD	<i>Fragaria</i>
VRSTA	<i>Fragaria vesca</i>

3.1.3. Morfologija jagode (*Fragaria vesca*)



Slika 1. Morfologija jagode

- a) korijen;
- b) vriježa;
- c) mlada biljka;
- d) trodjelni list s peteljkom;
- e) cvijet;
- d) plod

(www.inra.fr/hyppz/DESSINS/8039045.gif)

Korijen (Slika 1.) je podzemni vegetativni organ jagode, čija je uloga usvajanje vode i otopljenih mineralnih materija iz tla, nakon čega se provode u sve ostale dijelove biljke. Korijen jednim dijelom sintetizira organske materije (aminokiseline, lipide, bjelančevine...), ali ima ulogu i u skladištenju istih. Također, služi za vegetativno razmnožavanje (Miloš, 1997). Korijen raste tijekom cijelog vegetacijskog perioda, a najviše tijekom proljeća i jeseni. Ukoliko se nalazi u povoljnim uvjetima tla obrastao je apsorbtivnim korjenčićima i dosta je razgranat. Dužina čitavog korijenja iznosi 50-60 cm, zauzima širinu oko 30-40 cm, a glavnina korijena ide do dubine 15-25 cm, ukoliko se radi o rastresitim zemljištima prodire i dublje (Nikolić i Milivojević, 2010).

Stablo jagode (Slika 1.) iznosi nekoliko centimetara visine, dosta je kratko. Uloga stabla je da provodi vodu i hranjive materije iz korijena do listova putem ksilema, a vodu s otopljenim organskim materijama od listova do ostalih dijelova biljke putem floema. Ovaj vegetativni organ jagode ima značajnu ulogu u skladištenju određenih rezervnih materija (Mratinić, 2012). Svake godine stablo se deblja prilikom čega dolazi do stvaranja izraženih godova, na osnovu kojih možemo utvrditi starost biljke. Krana čini osnovu stabljike i iz nje se stvaraju novi listovi i aksilarni pupovi (Šoškić, 2009).



Slika 2. List jagode

<http://agronomija.rs/2014/jagoda/>

Ovaj vegetativni biljni organ ograničenog je rasta, prosječni vijek trajanja je oko 60 dana. Boja lista može biti od tamnozeleno do žutozelene (Nikolić i Milivojević, 2010).



Vriježa (Slika 3.) kod jagoda predstavlja nadzemni dugački, tanki izdanak, valjkastog oblika, dužine do 1,5 m, zeleno crvene boje. Uloga vriježe je u vegetativnom razmnožavanju biljke, one se razvijaju iz pupova koji su smješteni u pazuhu novog lišća (Galletti i Bringhurstu, 1990).

Slika 3. Vegetativni dijelovi jagode

<http://agronomija.rs/2014/jagoda/>

Tijekom vegetacije razvije se u prosjeku od 8 do 20 vriježa različite dužine i debljine. Njihovom razvoju pogoduju povoljni uvjeti, visoka temperatura i dugi dan (Šoškić, 2009). Jagode se mogu razmnožavati vegetativno vriježama i dijeljenjem grmova, te putem sjemena. Kada je riječ o plodonošenju, jagode mogu biti jednorodne (vrste jagoda koje donose plod jednom u godini) i stalnorađajuće (još ih nazivamo mjesečarke; vrste jagoda koje daju plod čitavo ljeto do prvih mrazova u jesen) (Dubravec i Dubravec, 1989; Miloš, 1997; Hoover i sur., 2008).



Cvijet (Slika 4.) je generativni organ jagode. Cvijet može biti jednospolan (samo sa tučkom, ili samo sa prašnicima) i dvospolan (hermafroditan). Osnovna uloga cvijeta je održavanje vrste. Cvjetovi mogu biti smješteni ispod, iznad ili u razini lišća.

Slika 4. Cvijet jagode

<http://agronomija.rs/2014/jagoda/>

Cvijet jagode ima prečnik od 2,5 do 3 cm sa 5 latica, 10-16 lapova, 20-35 prašnika i 520-580 tučkova. Na jednoj zajedničkoj dršci se nalazi 10-25 cvjetova. Cvjetovi jagode mogu biti primarni, sekundarni, tercijarni, kvartarni (Mratinić, 2012).

Plod jagode se sastoji od većeg broja pojedinačnih jednosjemenih plodova oraščića koji su povezani ispupčenom cvjetnom ložom. Na Slici 5. vidi se građa cvijeta, građen je od ploda, sjemenki, čašice i peteljke. Ovisno o uvjetima uzgoja i sorte plod može imati različitu veličinu i oblik, vrste oblika: okrugao, srcolik, valjkast, spljošten, klinast, kruškast te nepravilan. Prema veličini plodove jagode možemo podijeliti na: vrlo krupne (masa > 20 g), krupne (masa između 14-17 g), srednje krupne (masa između 11-14 g) i sitne (masa <11 g) (Mratinić, 2012).



Slika 5. Plod jagode

https://www.researchgate.net/figure/a-Cross-section-of-the-strawberry-fruit-Fragaria-ananassa-and-b-other-plant-parts_fig2_321779163



Sjeme (Slika 6.) jagode razvija se iz embrionalne vreće, a sastoji se od: klice (embrija), hranjivog tkiva (sekundarnog endosperma) i opne sjemenjače (teste). Glavna uloga sjemena je u održavanju vrste (Nikolić i Milivojević, 2010).

6. Sjeme jagode

https://www.jutarnji.hr/domidizajn/dd-vrt/sjeme-klijanjejpg/7280688/alternates/FREE_780/sjeme%20klijanje.jpg

3.1.4. Hranidbena i zdravstvena vrijednost jagode

Jagode predstavljaju dobar izvor polifenola (flavonoidi i elaginska kiselina) i vitamina C (Hannum, 2004). Zbog visokog sadržaja askorbinske kiseline nutritivna vrijednost ove biljne vrste je velika (Sanz i sur., 1999) (Tablica 2). Antioksidativna i antiproliferativna aktivnost *in vitro* je pokazana za ekstrakte plodova jagode (Zhang i sur., 2008). Također, istraživanjem Seerama i sur. (2006) dokazan je antikancerogen učinak ekstrakta jagoda. Ishrana bogata jagodama usporava starenje mozga (Hannum i sur., 2004). Istraživanja Seeram i sur., (2006) su pokazala da su u jagodama prisutne biološki aktivne komponente koje su uključene u modulaciju i regulaciju genske ekspresije kao i substaničnih signalnih puteva u angiogenezi, proliferaciji i apoptozi stanica.

Tablica 2. Kemijski sastav plodova jagode izražen na 100 g svježeg ploda (USDA National Nutrient Database)

Sastojak	Jedinica	
Energija	Kcal	32
Voda	G	90,95
Proteini (ukupno)	G	0,67
masti (ukupno)	G	0,39
Ugljikohidrati (ukupno)	G	7,68
Dijetalna vlakna	G	2
Vitamin E	Mg	0,29
Vitamin B1	Mg	0,024
Vitamin B2	Mg	0,022
Vitamin B3	Mg	0,386
Vitamin B6	Mg	0,047
Folna kiselina	Mg	24
Vitamin C	Mg	58,8
Vitamin E	Mg	0,29
Vitamin K	Mg	2,2
Natrij	Mg	1
Kalij	Mg	153
Kalcij	Mg	16
Fosfor	Mg	24
Magnezij	Mg	13
Željezo	Mg	0,41
Cink	Mg	0,14
Zasićene masne kiseline	Mg	15
Mononezasićene masne kisline	Mg	43
Polinezasićen masne kisline	Mg	155

3.1.5. Uzgoj jagode

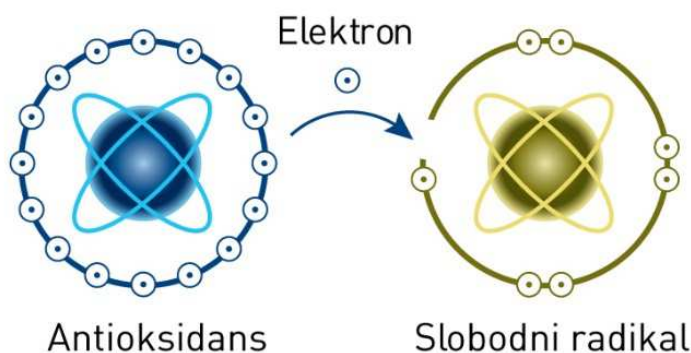
Jagoda se može uzgajati na otvorenom ili u staklenicima i plastenicima (Slika 7.). Uzgoj jagoda u zaštićenim prostorima omogućava berbu izvan sezone jagoda. Pogodnost tla, način uzgoja, klima i drugi faktori utječu na nasad i njegovo gospodarsko iskorištavanje. Jagoda se može uzgajati kao jedina kultura (monokultura) ili kao međukultura.



Slika 7. Različiti načini uzgoja jagode

<https://www.agroportal.hr/vocarstvo/17141>

3.2. Slobodni radikali



Slika 8. Slobodni radikal

<http://www.activehydrogenproducts.com/wp-content/uploads/2016/09/H2-napada-Slobodni-radikal.jpg>

Slobodni radikal je bilo koji atom, odnosno molekula koji sadrži jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskoj orbitali (Slika 8.) (Ghodbane i sur., 2013). Slobodni radikali su visokoreaktivni, energetske nestabilni te imaju nisku specifičnost za reaktante, tj. podložni su reakcijama s brojnim molekulama.

Odlika slobodnih radikala je lančana reakcija, jedan radikal potiče stvaranje drugog. Dakle mnogi novonastali spojevi također imaju svojstva radikala (Vrhovac i sur., 2003; Gamulin i sur., 2005).

Nespareni elektroni mogu se nalaziti na atomima različitih elemenata, prema tome slobodni radikali mogu se podijeliti na: reaktivne vrste kisika (ROS – *reactive oxygen species*), reaktivne vrste dušika (RNS – *reactive nitrogen species*), reaktivne vrste klora (RCS – *reactive chlorine species*), reaktivne vrste broma (RBS – *reactive bromine species*) i reaktivne vrste sumpora (RSS – *reactive sulphur species*) (Halliwell, 2006).

Slobodni radikali koji vode porijeklo od kisika predstavljaju najznačajniju klasu u živim sistemima (Valko i sur., 2006). U Tablici 3. predstavljenje su reaktivne vrste kisika značajne za oksidativni stres (Kukrić i sur., 2013).

Tablica 3. Reaktivne vrste kisika (ROS)

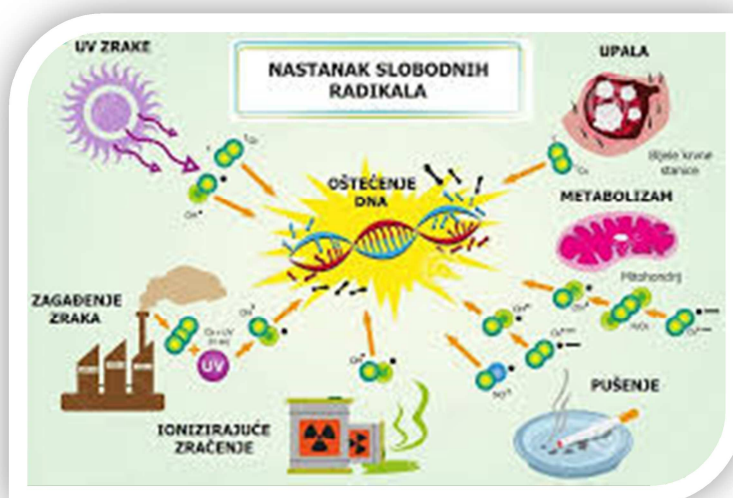
Slobodni radikali		Neradikalski oblici	
Superoksid radikal	$O_2^{\cdot-}$	Hidrogen peroksid	H_2O_2
Hidroksil radikal	$\cdot OH$	Ozon	O_3
Hidroperoksid radikal	$HO_2^{\cdot}$	Singletni kisik	$1O_2$
Peroksid radikal	$ROO^{\cdot}$	Organski peroksidi	$ROOH$
Alkoksi radikal	$RO^{\cdot}$		

Nastajanje slobodnih radikala u stanicama inducirano je fotolizom, radiolizom, termolizom, radikalskim inicijatorima i radikalskim međuproizvodima. Kemijski reaktivni inicijatori započinju sve slobodnoradikalske reakcije. Ovi kemijski inicijatori mogu biti joni prelaznih metala, slobodni radikali koji su migrirali do mjesta reakcije, slobodni radikali prisutni u supstratu itd. Prva faza nastajanja slobodnoradikalskih vrsta naziva se inicijacija. Druga faza je propagacija, u ovoj fazi dolazi do lančane reakcije slobodnoradikalske vrste, rekombinacije slobodnih radikala. Terminacija je treća završna faza prilikom koje nastaju nereaktivni neradikalski proizvodi (Kukrić i sur., 2013).

U humanoj stanici postoje dva izvora nastajanja slobodnih radikala, s to su: endogeni i egzogeni (Slika 9.). Endogeni izvori su stanice različitih tkiva. Ovi izvori nastaju u mitohondrijama, citosolu, endoplazmatskom retikulumu i endomikrozomima, također ih proizvode i lizozomi, peroksizomi, sve stanične membrane i dr. Nepotpuna redukcija kisika u mitohondrijama predstavlja glavni endogeni izvor slobodnih radikala. Enzimi su drugi po značaju endogeni izvor slobodnih radikala, oni fiziološki proizvode oksidante.

Tijekom inflamatornog odgovora dolazi do autooksidacije malih molekula oksidativnog praska što predstavlja treći endogeni izvor slobodnih radikala (Halliwell i Gutteridge, 1999).

Egzogeni izvori su: smog, ozon, jonizirajuće zračenje, metabolizam toksičnih jedinjenja i lijekova, višak jona prelaznih metala, povećana koncentracija kisika, ksenobiotici itd.



Slika 9. Načini nastanka slobodnih radikala u humanoj stanici

<https://repozitorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf:2561/preview>

Visoke koncentracije slobodnih radikala i njihovih neradikalnih derivata su štetne za organizam budući da uzrokuju oštećenja glavnih staničnih dijelova. Dok umjerene koncentracije istih imaju značajnu ulogu: u promjeni položaja i oblika stanice, u održavanju stanice, u odbrani stanice od patogena, predstavljaju regulatorne posrednike u signalnim putevima važnima za mnoge stanične funkcije, učestvuju u proizvodnji energije potrebnoj stanici, kao i u apoptozi – programiranoj smrti stanice, sintezi esencijalnih jedinjenja, pomažu u oporavku stanice od različitih oštećenja (Droge, 2002; Gamulin i sur., 2005). Ukoliko sinteza slobodnih radikala prevaziđe antioksidativnu odbranu organizma nastaje oksidativni stres (Barnes, 1990; Finkel i Halbrook, 2000; Droge, 2002).

3.3. Oksidativni stres

Bilo koje stanje koje dovodi do promjene u homeostazi stanice uzrokuje oksidativni stres (Kawanishi i sur., 2001). Oksidativni stres je rezultat pomaka ravnoteže u staničnim oksidativno-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije. Reaktivne vrste kisika (ROS) imaju glavnu ulogu u izazivanju oksidativnog stresa u stanicama (Halliwell, 2006).

Do gubitka ravnoteže između stvaranja slobodnih radikala i mogućnosti neke stanice da ih ukloni dolazi usljed prekomjernog stvaranja slobodnih radikala kisika, što uzrokuje oštećenje stanice. Ukoliko je smanjena antioksidativna zaštita organizma ili ako je stvaranje radikala pojačano dolazi do pomaka ravnoteže. U stanjima oksidativnog stresa dolazi do porasta koncentracije ROS-a u organizmu ili tkivima, što rezultira oštećenjem nukleinskih kiselina, proteina i lipida stanične membrane (www.irb.hr).



Slika 10. Oksidativni stres

(<http://www.lviving.healthcare/wp-content/uploads/2016/04/Oxidative-Stress.jpg>)

Oksidacijski stres možemo definirati kao oštećenje tkiva uvjetovano poremećajem ravnoteže pro i anti- oksidativnoga sustava (Čakarić, 2009). Prooksidans je tvar koja inducira razna oksidativna oštećenja bioloških polimera (nukleinskih kiselina, proteina, lipida). Antioksidans je tvar koja uklanja prooksidans stvarajući produkte koji nisu toksični i ne uzrokuju oštećenja (Segundo i sur., 2007). ROS imaju važnu ulogu u staničnoj signalizaciji i održavanju homeostaze kao prirodni nusproizvodi metabolizma kisika (Dat i sur., 2000; Apel i Hirt, 2004). Kao i oksidativni stres koji se temelji na ROS (eng. *reactive oxygen species*), postoji i "nitrosative" stres kojem su uzrok RNS (eng. *reactive nitrogen species*). U praksi, pojam "oksidativni stres" se koristi općenito, i za oksidativni, i za "nitrosative" stres, tj. on uključuje i kisikove i dušikove reaktivne spojeve (ROS i RNS) (Klandorf i Van Dyke, 2012). Djelovanje različitih ekoloških faktora, abiotičkih ili biotičkih, može uzrokovati značajno povećanje ROS-a, te dovesti do oštećenja staničnih struktura (Ahmad i sur., 2009).

Oksidativni stres je prisutan i kod zdravih i kod bolesnih osoba jer je DNK svake humane ćelije svakodnevno pod uticajem oko 10000 oksidacijskih udara (Zhao i sur., 2004).

Teorija slobodnih radikala podržava hipotezu o „brzini življenja“ prema kojoj dužina životnog vijeka ovisi od brzine metabolizma, a to potvrđuje da oksidativno oštećenje DNA, lipida i proteina raste starenjem (Ku i sur., 1993).

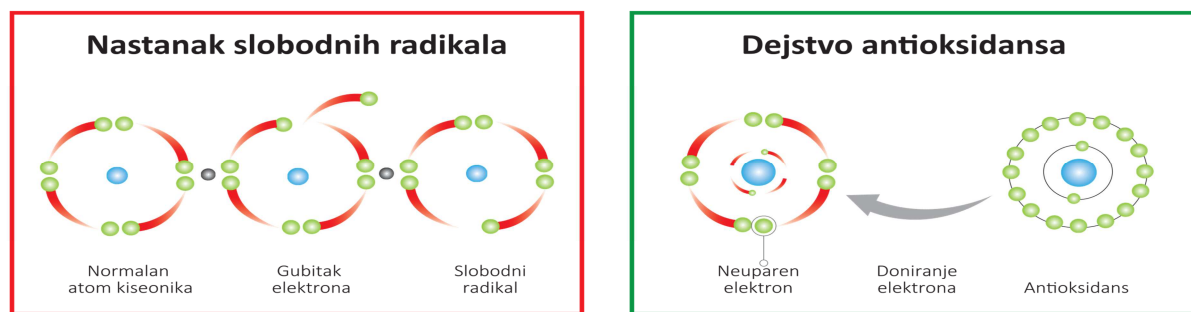
Tijekom evolucije biljke su razvile efikasne zaštitne mehanizme koje ih štite od utjecaja različitih vrsta stresa i predstavljaju prirodan izvor različitih antioksidantnih jedinjenja. Sekundarni metaboliti biljaka: fenoli, flavonoidi, fenolkarboksilne kiseline, alkaloidi, terpenoidi i dr., imaju snažno antioksidantno djelovanje (Mimica-Dukić, 1997; Wink, 2003).

3.4. Antioksidansi

Antioksidans je tvar koja uspješno može ukloniti prooksidans uz stvaranje produkata koji nisu toksični i ne oštećuju stanice. Antioksidansi štite organizam od prooksidativnog djelovanja na više načina: inhibicijom stvaranja ROS/RNS, smanjenjem oksidativne sposobnosti prooksidansa, inhibicijom oksidativnih enzima (Segundo i sur., 2007). Dakle, funkcija antioksidansa je neutralizacija slobodnih radikala i zaštita stanice od njihovog toksičnog djelovanja čime se sprječava pojava i razvoj bolesti, vezanih za oksidativni stres.

Sposobnost antioksidansa je da: spriječe ili odlože oksidaciju ciljnih molekula, tj. spriječe nastanak slobodnih radikala (prekidanjem lanca stvaranja novih radikala, vezivanjem metalnih jona, smanjenjem lokalne koncentracije kisika...), inaktiviraju reaktivne kisikove vrste (npr. razlaganjem peroksida), ili djeluju tako što omogućavaju oporavak od oksidativnih oštećenja, smanjuju efekte slobodnih radikala, uklanjanjem izmjenjenih molekula i popravljanjem oštećenja nastalih njihovim djelovanjem (Halliwell i Gutteridge, 1999). Prema načinu djelovanja, antioksidanti se u humanim stanicama dijele na: primarne (preventivne), sekundarne (čistače) i tercijarne. Primarni (preventivni) antioksidanti imaju ulogu u sprječavanju nastanka slobodnih radikala (pr. albumin, transferin i dr.). Sekundarni antioksidanti (čistači) uklanjaju nastale slobodne radikale (superoksid-dismutaze, katalaza, glutation-peroksidaza, glutation, vitamin C, vitamin E, karotenoid, flavonoidi), pri čemu su vitamin C, karotenoidi, flavonoidi egzogenog uglavnom biljnog porijekla.

Tercijarni antioksidanti popravljaju nastala oštećenja ili uklanjaju biomolekule oštećene radikalima prije nego njihovo nakupljanje uzrokuje nova oštećenja (fosfolipaze, proteaze, peptidaze, DNK polimeraza I i dr.) (Huang i sur., 2005).



Slika 11. Djelovanje antioksidansa na slobodne radikale

<https://www.innventa-pharm.com/rlipoinn/>

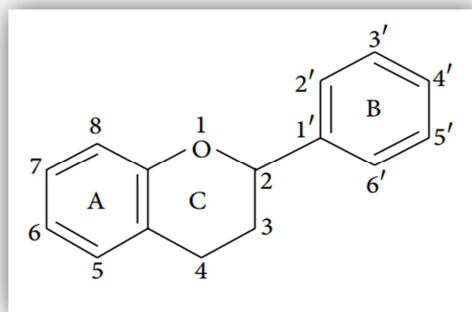
Uloga antioksidanata je da štite metabolizam od visoko reaktivnih kisikovih jedinjenja (koji mogu oštetiti stanice u ljudskom organizmu ili biti uzrok degenerativne bolesti) i sprječavanju oksidativnog stresa (Helen i sur. 2000). Voće i povrće se često koristi kao preventiva u smanjenju rizika od kroničnih bolesti i kod nekih oblika raka (Block i sur., 1992; Hertog i sur. 1995; Lampe, 1999). Poznavanje antioksidativnog djelovanja biljaka je od velike važnosti (Halliwell, 1997). Antioksidativne efekte imaju vitamin C i E, β -karoteni i polifenoli (Diplock i sur., 1998). Humani organizam s jedne strane može sam sintetizirati antioksidanse uz pomoć vitamina i minerala, dok s druge strane, vanjski izvor antioksidanata je hrana koju svakodnevno unosimo. Pokazano je da postoji povezanost između sadržaja ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti pojedinih biljnih ekstrakata (Stratil i sur, 2006). Takođe je pokazano da u odnosu na vitamin C, vitamin E i glutaciona biljni flavonoidi imaju veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na peroksidne radikale (Cao i sur., 1996).

Prirodni antioksidanti se nalaze u biljnim i životinjskim tkivima, a dijele se na:

- o enzimske antioksidante
- o neenzimske antioksidante.

U enzimске antioksidante biljaka spadaju superoksid-dismutaza, katalaza i različite peroksidaze, dok u neenzimske antioksidante spadaju: reducirani glutation, askorbinska kiselina, α -tokoferol, karotenoidi, fenoli itd (Kukrić i sur., 2013).

3.4.1. Funkcija fenolnih spojeva



Slika 12. Onovna struktura fenolnih spojeva

<https://www.freelandtime.com/micoterapia/approfondimenti/i-flavonoidi.html>

Fenolna jedinjenja prisutna u voću, povrću i žitaricama imaju važnu antioksidativnu ulogu (Lee i sur., 2002). U biljkama je do sada otkriveno oko 8000 tisuća fenolnih spojeva koji pripadaju skupini polifenola i koje karakterizira velika strukturna raznolikost (Boudet, 2007; Garcia-Salas i sur., 2010). Fenolni spojevi imaju antioksidantnu, antiinflamatornu, antikancerogenu i antimikrobnu aktivnost, a također su pokazali i pozitivan efekt u liječenju kardiovaskularnih bolesti i ateroskleroze (Hwang i sur., 2006; Madlener i sur., 2007; Zhang i sur., 2008; Mandal i Chakraborty, 2010.). Fenolna jedinjenja mogu da spriječe oksidativna oštećenja DNA i nastanak mnogih bolesti (Hung i sur., 2004). Dai i Mumper (2010) su pokazali da fenolne kiseline imaju jači antioksidativni efekt od vitamina C i E i karotenoida. Flavonoidi inhibiraju enzime kao što su lipoksigenaze i ciklooksigenaze, te enzime vezane za tumorogenezu (Laughton i sur., 1991). Pored mnogobrojnih pozitivnih uloga u organizmu fenolni spojevi mogu imati i štetne efekte: narušavanje strukture i funkcije plazma membrane, snižavanje pH vrijednosti i denaturiranje proteina u citoplazmi (Andler, 2011).

Postoje različite klasifikacije fenolnih jedinjenja i većina je zasnovana na kemiskoj strukturi iako su za svaku klasu poznati i putevi njihove biosinteze. Ova jedinjenja se mogu podjeliti u slijedeće grupe (Hurtado-Fernández i sur. 2010):

1. Jednostavni fenoli
 - Fenolne kiseline (derivati benzojeve i cimetine kiseline)
 - Kumarini
2. Polifenoli
 - Flavonoidi (flavanoni, flavoni, flavonoli, katehini, antocijani)
 - Tanini (hidrolizabilni i kondenzovani)

Najčešća klasifikacija fenolnih spojeva je prema broju ugljikovih atoma vezanih za osnovni skelet fenola (Robards i sur., 1999). Najzastupljenija fenolna jedinjenja su: fenolne kiseline (derivati cimetine i benzojeve kiseline), flavonoidi i dihidrohalkoni.

3.4.1.1. Fenolne kiseline

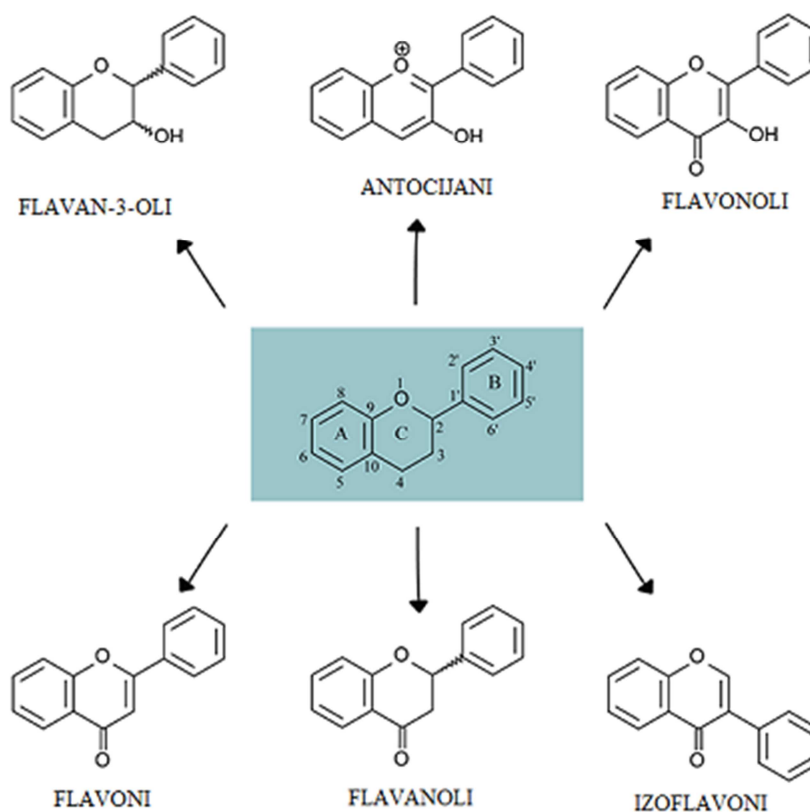
Fenolne kiseline su proizvodi sekundarnog metabolizma biljnih ćelija. Okus i aroma povrća i voća zavise od fenolnih kiselina (Tomas-Barberan i Espin, 2001). Struktura fenolnih kiselina se zasniva na fenolnom jezgru i bočnom nizu. Bočni niz fenolnih kiselina može da sadrži jedan ugljikov atom (derivati benzojeve kiseline) ili tri (derivati cimetine kiseline) ugljikova atoma. U grupu fenolnih jedinjenja su hidroksi i drugi funkcionalni derivati cimetine i benzojeve kiseline (Macheix, 1990). U velikoj količini su nađene u voću i povrću: jabuci (Dragovic-Uzelac i sur., 2005), krušci (Escarpa i González, 1999), grožđu (Gómez-Alonso i sur., 2007), malini, kupini, jagodi (Häkkinen i sur., 1999), višnji (Usenik i sur., 2008), paradajzu (Sánchez-Rodríguez i sur., 2012), zelenoj salati (Romani i sur., 2002) i drugim.

Budući da biosinteza polifenola ovisi o svjetlosti, polifenoli se akumuliraju u staničnim zidovima, najvećim dijelom na površini ploda (Guern i sur., 1987; Monties, 1989; Macheix i sur., 1990; Wollenweber, 1994). Ovisno o fiziološkom stanju biljke varira akumulacija polifenolnih jedinjenja u samoj biljci (Macheix i sur., 1990; Harborne, 1994; Bravo, 1998; Biswas i sur., 2009). Koncentracija polifenolnih jedinjenja manja je u zrelom plodu, dok se kod vrsta koje imaju crvene plodove flavonoidi i antocijani akumuliraju na kraju sazrijevanja (Britton, 1983; Macheix i sur., 1990).

3.4.1.2. Flavonoidi

Flavonoidi su niskomolekularni spojevi koji sadrže 15 ugljikovih atoma organiziranih u C6-C3-C6 konfiguraciju. Do sada je identificirano oko 4000 različitih vrsta flavonoida (Ignat i sur., 2011). Flavonoidi mogu biti: hidroksilirani, glikozidirani, metoksilirani, s monosaharidima ili oligosaharidima, a često su i esterificirani organskim kiselinama (Harborne i Baxter, 1999). Glikozilacija kod flavonoida uglavnom se događa na položaju C3, a rjeđe na položaju C7. Glukoza je šećer koji se najčešće veže na aglikonski dio, ali pored glukoze pojavljuju i drugi šećeri poput galaktoza, ksiloze, arabinose, ramnoza, kao i drugi disaharidi poput rutinoze (Miller i Ruiz-Larrea, 2002). Podskupine flavonoida razlikuju se po stupnju oksidacije središnjeg piranskog prstena (Teixeira i sur., 2014) i mogu se podijeliti na

(Slika 13.): antocijane, flavone, izoflavone, flavanone, flavonole i flavanole (Ignat i sur., 2011).



Slika 13. Osnovne strukture flavonoida

<http://zdravaprehrana.info/flavonoidi-2/>

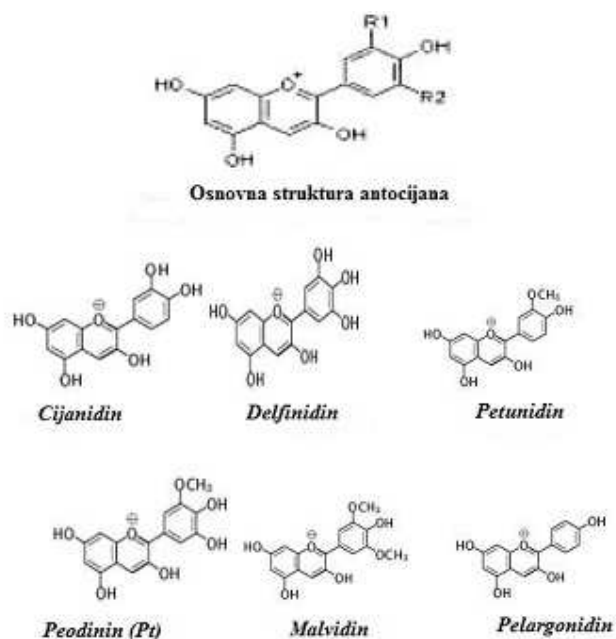
Flavonoidi su čvrste supstance, bezbojne ili žute (lat. *flavus* = žut) izuzev antocijana koji mijenja boju od crvene do plave. Nesupstituirani flavon predstavlja bezbojnu supstancu, a uvođenje 1-OH grupe u položaju 3 (flavonol) dovodi do žutog obojenja. Veći broj OH-grupa čini ih manje toksičnim. U prirodi se obično nalaze u obliku glikozida ili estara sa taninskim kiselinama. Iz biljnog materijala se ekstrahiraju vodom, a iz vodenog rastvora organskim rastvaračima (Harborne i Williams, 2000; Dashek, 2006). Kao snažni antioksidanti, fenolna jedinjenja različitim mehanizmima neutraliziraju slobodne radikale u stanicama, umanjuju lipidnu peroksidaciju stanične membrane, mogu da spriječe oksidativna oštećenja DNA i širenje tumora (Havsteen, 2002). Nutricionisti procjenjuju da je dnevni unos flavonoida putem hrane oko 1-2 grama (Havsteen, 2002).

3.4.1.3. Flavonoli

Flavonoli su grupa bljnih flavonoida, koji se u prirodi nalaze u slobodnom obliku i u obliku glikozida (Škerget i sur., 2005). Najzastupljeniji flavonoli su miricetin, kvercetin i kempferol (Manach i sur., 2008). U B prstenu hidoksilne grupe mogu se nalaziti na C-4, C-3', i C-4' i C-3', C-4' i C-5'. Metiliranjem 3'-OH kvercetina nastaje izohamnetin. Laricetin je proizvod koji nastaje usljed metiliranja miricetina na C-3'. Dimetoksi derivat miricetina sa metoksi grupama na položajima C-3' i C-5' poznat je kao siringetin (Wang i sur., 2003).

3.4.1.4. Antocijani

Antocijani su najveća i najvažnija grupa vodotopivih pigmenata u prirodi (Clifford i sur., 2000), s preko šest stotina različitih spojeva. Riječ antocijan svoje podrijetlo ima u dvjema grčkim riječima, *anthos* što znači cvijet i *kyanos* što znači tamno plavo. Oni su glavni sastojci crvenih, plavih i ljubičastih pigmenata u većini cvjetnih latica, voća i povrća te određenih žitarica (Anderson, 2006). Flavonoidnoj skupini polifenola pripadaju antocijani. Građeni su poput tipični flavonoida: kostur C6-C3-C6 je izgrađen od dva benzenova prstena i jednog piranskog prstena na koje se vežu hidroksilne skupine (Seeram i sur., 2001; Zhang i sur., 2008). Kemijska struktura im varira ovisno o stupnju hidroksilacije i metilacije B prstena te o glikozilaciji sa različitim šećerima (Tsao, 2009). Od polifenolnih jedinjenja u jagodama najviše ima antocijana (Tulipani i sur., 2008), koji takođe utiču na antioksidativnu aktivnost jagode (Wang i sur., 1997). Antocijanidin glikozidi, cijanidin-3-glikozid i pelargonidin-3-glikozid daju crvenu boju jagodi (Wang i Zheng, 2001).



Do sada je poznato preko 500 različitih struktura antocijana i 23 strukture antocijanidina, od čega je samo 6 antocijanidina prisutno u prirodi (Slika 14): cijanidin, delfinidin, petunidin, peonidin, malvidin i pelargonidin (Castañeda-Ovando i sur., 2009).

Slika 14. Kemijska struktura antocijana

<https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/biljni-pigmenti>

Antocijani su pigmenti koji su smješteni u sprovodnim snopićima, njihova uloga je da daju boju biljnim organima, boja ovisi od pH soka (Kong i sur., 2003). Antocijani su u staničnoj vakuoli vezani za šećer (De Pascual Sanchez, 2008). Imaju brojne značajne uloge za biljku poput: zaštite od UV zračenja, štetnih mikroorganizama, također privlače insekte (s obzirom da su zaslužni za boju same biljke) i time pomažu u oprašivanju i raznošenju sjemena (Wrolstad, 2004). Najvažnija odlika antocijana je u tome što kisik u heterocikličnom prstenu ima pozitivno naelektrisanje, zbog toga se antocijani u kiseloj sredini ponašaju kao kationi, dok se u baznoj sredini ponašaju kao anioni. Struktura antocijana, kao i boja mijenja se ovisno o pH sredine. Pri čemu crveno obojenje će prevladavati pri pH 1, plavo obojenje između pH 2 i 4, dok bezbojno između pH 5 i 6. Molekule antocijana će se raspasti ukoliko se nađu u sredini pri pH vrijednostima višim od 7. Pored pH vrijednosti na boju će utjecati i broj hidroksilnih grupa na B prstenu, dakle sa povećanjem broja hidroksilnih grupa boja će se mijenjati od crvene prema plavoj (Kukrić i sur., 2013). Antocijani su zastupljeni u familijama: *Alliaceae*, *Gentianaceae*, *Convolvulaceae*, *Labiatae*, *Geraniaceae*, *Nymphaeaceae*, *Liliaceae*, *Ranunculaceae*, *Orchidaceae*, *Solanaceae* (Belitz i sur., 2004).

3.4.1.5. Antioksidativna aktivnost jagode

Jagoda predstavlja biljnu vrstu koja je bogata antioksidantima (Heinonen i sur., 1998; Wang i sur., 1996). Raznim istraživanjima dokazano je da plod jagode ima veću antioksidativnu aktivnost od: grožđa, jabuke, breskve, rajčice, naranči, krušaka i kivija (Wang i sur., 1996; Halvorsen i sur., 2002). Ekstrakt jagoda ima kemopreventivno i kemoterapijsko djelovanje *in vitro* i *in vivo* (Meyers i sur, 2003; Wang i sur, 2005.; Zhang i sur., 2008). Također, mogu smanjiti rizik od nastajanja tumorogeneze i kardiovaskularnih bolesti. Jagode su bogate potencijalnim antioksidansima, uglavnom flavonoidima i elaginskom kiselinom (Hannum, 2004). Postoje značajne su razlike između genotipova jagoda iako se smatra da jagode imaju visoku antioksidativnu aktivnost (Wang i Lin, 2000).

4. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio ovog master rada proveden je u laboratoriji Katedre za biokemiju, Tehnološkog fakulteta u Banjoj Luci.

4.1. Materijal

U radu su korištene četiri sorte gajenih jagoda Alibon, Senga Sengana, Elsanta i Cleary (Slike 15., 16., 17., 18.) i jedna divlja jagoda - u daljem tekstu označena kao „šumska“ (Slika 19.). Sorta Alibon i šumska jagoda prikupljene su u okolini Travnika (srednja Bosna i Hercegovina), a ostale sorte iz okoline Velike Kladuše (zapadna Bosna i Hercegovina). Voće je ubrano pri punoj zrelosti na početku sezone branja jagoda – krajem svibnja mjeseca 2015 godine. Masa od 500g uzeta je slučajnim odabirom za svaku sortu, i voće je analizirano odmah nakon uzimanja uzoraka.



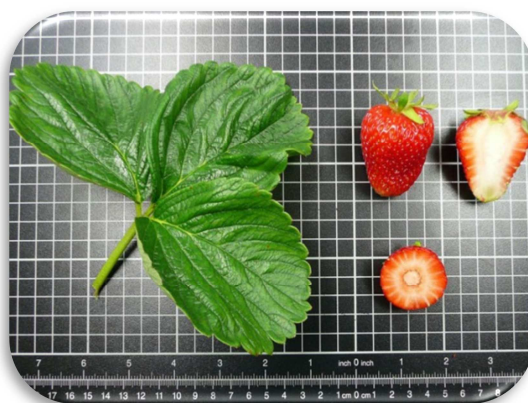
Slika 15. Sorta Elsanta



Slika 16. Senga Sengana

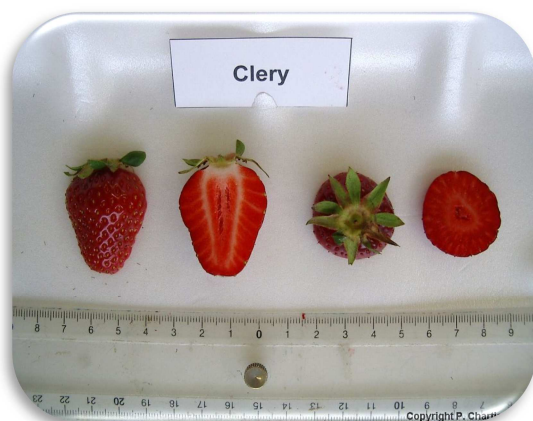
<http://www.bordeaux.inra.fr/eustrawberrydb/uploads/images/POL029/POL029-Elsanta-Fruit.jpg>

<http://www.bordeaux.inra.fr/eustrawberrydb/uploads/images/POL029/POL029-SengaSengana-Fruit.jpg>



Slika 17. Sorta Albion

<http://agronomija.rs/2014/jagoda/>



Slika 18. Sorta Clery Slika



Slika 19. Šumska jagoda

<http://agronomija.rs/2014/jagoda/>

4.2. Kemikalije i reagensi

Kemikalije i reagensi korišteni u ovom radu su *p.a.* čistoće: Folin-Ciocalteu, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), ABTS (2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijumove soli) (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA); natrij hidrogen karbonat, metanol (Lach-Ner, s.r.o., Czech Republic); galna kiselina, aluminij klorid, quercetin hidrat (Acros Organics, New Jersey, USA); 96% etanol (Vrenje a.d., Beograd, Republika Srbija); natrij acetat (Zorka Pharma a.d., Šabac, Republika Srbija); kalij persulfat (E. Merck AG, Darmstadt, Germany); TROLOX (6-hidroks-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kiselina) (Sigma-Aldrich Chemistry, Switzerland); klorovodična kiselina, kalij klorid.

4.3. Aparature i oprema

Za izradu eksperimentalnog dijela ovog rada korištene su sljedeće aparature i oprema: ručni blender, analitička vaga, tehnička vaga, aparatura za ekstrakciju, ultrazvučna kada, povratno hladilo, spektrofotometar (UV – VIS), *Buchner*-ov lijevak, vakum pumpa, vortex, laboratorijsko posuđe (staklene čaše, menzure, odmjerne tikvice, epruvete, pipete, mikropipete, lijevci, stakleni štapići, petrijeve posude, filter papir).

4.4. Pripremanje uzoraka i ekstrakcije

Kako bi odredili sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, flavonola, DPPH i ABTS uzorke smo pripremili na sljedeći način. Plodovi jagode su homogenizirani pomoću ručnog blendera. Zatim je odvagano 5 g svakog uzorka. Uzorci (5 g) preneseni su u erlenmajer tikvice sa 20 mL 80%-tnim rastvorom etanola. Tikvice sa uzorcima su stavljene u ultrazvučnu kadu (dva puta po pet minuta), a zatim su spojene na povratno hladilo i nakon ključanja ekstrakcija je trajala 10 minuta. Kada su se uzorci ohladili (do sobne temperature) filtrirani su u tikvice (50 mL) pomoću *Buchner*-ovog lijevka spojenog na vakum pumpu. Preostali talozi su zajedno sa filter papirima vraćeni nazad u erlenmajer tikvice uz dodatak 20 mL 80%-tnog rastvora etanola. Ponovo je napravljena ekstrakcija (10 minuta), a zatim i filtracija u tikvice u kojima su se nalazili prvi filtrati, te dopunjene 80%-tnim rastvorom etanola do oznake. Na ovaj način dobijen je matični rastvor koncentracije 0,1 g/mL koji se koristio za sva ostala određivanja. Za određivanje ukupnim i monomernih antocijana vršena je ekstrakcija uzoraka (20 g) sa 20 mL rastvora za ekstrakciju (85 mL 95%-nog rastvora etanola i 15 mL 1,5 M rastvora HCl) pri temperaturi 0°C u trajanju od 24 sata. Dobijenu smjesu smo filtrirali preko filter papira, a na taj način pripremljeni filtrat je korišten za dalju analizu.

4.5. Metode

Za izradu ovog rada korištene su sljedeće metode:

- o modificirana metoda *Folin-Ciocalteu* za određivanje ukupnih fenola (Wolfe i sur., 2003)
- o metoda po *Ordon*-u za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida (Ordoñez, 2006)
- o metoda po *Kumaran*-u i *Karunakaran*-u za određivanje sadržaja flavonola (Kumaran i Karunakaran, 2007)
- o modificirana „single,, pH i pH diferencijalna metoda za određivanje ukupnih i monomernih antocijana (Giusti i Wrolstad, 2001)
- o DPPH test za određivanje antioksidativne aktivnosti metodom *Liyana-Pathiranan* i *Shahidi* (Liyana-Pathiranan i Shahidi, 2005)
- o ABTS test za određivanje antioksidativne aktivnosti modificiranom metodom *Re* i suradnika (Re i sur., 1999)

4.5.1. Određivanje ukupnih fenola

Ukupni fenoli određeni su modificiranom metodom *Folin-Ciocalteu* (Wolfe i sur., 2003). Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji *Folin-Ciocalteu* reagensa s nekim reducirajućim reagensom (fenoli). *Folin-Ciocalteu* reagens (FC) je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdne kiseline, a pri oksidaciji fenolnih jedinjenja ove kiseline se reduciraju u volframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni i čija se promjena apsorpcije prati na 765 nm. Intenzitet obojenja je direktno proporcionalan udjelu fenolnih spojeva u ispitivanom uzorku.

Za određivanje sadržaja ukupnih fenola korišteni su: osnovni rastvor *Folin-Ciocalteu* reagensa 2 M, radni rastvor *Folin-Ciocalteu* (osnovni rastvor *Folin-Ciocalteu* razrijeđen vodom u omjeru 1:10), 7,5% rastvor NaHCO₃ u vodi, standardni rastvori galne kiseline u smjesi metanol:voda (50:50 v/v) koncentracija: 50, 100, 150, 200, 250 µg/mL, 70% metanol i rastvori uzoraka u odgovarajućem rastvaraču.

Alikvot (0,2 mL) rastvora uzorka se pomiješao sa 1,5 mL radnog rastvora *Folin-Ciocalteu* i 1,5 mL natrij hidrogen karbonata. Dobijena smjesa se snažno promješala vorteksom i ostavila da stoji 30 minuta u tami na sobnoj temperaturi. Apsorpcija je očitana spektrofotometrom na 765 nm uz slijepu probu. Za slijepu probu se pomiješao 1,5 mL natrij hidrogen karbonata, 0,2 mL smjese metanol:voda (50:50 v/v) i 1,5 mL radnog rastvora *Folin-Ciocalteu*.

Standardni dijagram se napravio na isti način, samo što se umjesto rastvora uzorka uzeo alikvot (0,2 mL) rastvora galne kiseline (50-250 µg/mL) u smjesi metanol:voda (50:50 v/v). Rezultati su predstavljeni grafički tako što se standardni dijagram nacrtao iz izmjerenih vrijednosti apsorbanca pripadajućih koncentracija rastvora galne kiseline. Na apscisu su nanese koncentracije galne kiseline (µg/mL), a na ordinatu vrijednost apsorbanije kod 765 nm.

Iz nacrtanog dijagrama se dobila jednažba pravca koja je služila za dalje računanje ukupnih fenola. U našem radu korištena je sljedeća jednažba pravca:

$$y = 0,003x - 0,0226 \quad (R^2 = 0,9975)$$

gdje je: y – apsorbanca na 765 nm, a x – koncentracija galne kiseline (µg/mL).

Rezultati su izraženi kao fenoli ekvivalentni galnoj kiselinu (GAE), tj. kao µmol GAE/g svježe materije.

4.5.2. Određivanje ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida je određen metodom po *Ordon-u* (Ordoñez, 2006). To je spektrofotometrijska metoda sa aluminij kloridom (AlCl₃). Žuta boja koja se razvija tijekom reakcije, a čiji se intenzitet mjeri na 420 nm, pokazuje prisustvo flavonoida.

Za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida korišteni su: 2% rastvor aluminij klorida (AlCl₃) u etanolu, 96% etanol, rastvor kvercetin hidrata u metanolu (C₁₅H₁₀O₇ x H₂O) i rastvori uzoraka.

1 mL rastvora uzorka i 1 mL 2% AlCl₃ su pomiješani u etanolu. Dobijena smjesa je ostavljena da stoji sat vremena na sobnoj temperaturi i apsorbanca je mjerena na 420 nm uz slijepu probu. Za slijepu probu se pomiješao 1 mL 2% AlCl₃ i 1 mL metanola. Standardni dijagram se napravio na isti način, samo što se umjesto rastvora uzorka uzeo alikvot (1 mL) rastvora kvercetin hidrata (10–100 µg/mL). Dobijeni rezultati su predstavljeni grafički tako što se standardni dijagram nacrtao iz izmjerenih vrijednosti apsorbanca i pripadajućih koncentracija rastvora kvercetina. Na apscisu su nanese koncentracije kvercetina (µg/mL), a na ordinatu vrijednost apsorbanca od 420 nm

Iz nacrtanog dijagrama se dobila jednađba pravca koja je služila za dalje računanje ukupnih flavonoida. U našem radu korištena je sljedeća jednađba pravca:

$$y = 0,0368x - 0,135 \quad (R^2 = 0,9996)$$

gdje je: y – apsorbanca na 420 nm, a x – koncentracija kvercetina ($\mu\text{g/mL}$).

Rezultati su izraženi kao flavonoidi ekvivalentni kvercetin (Qu), tj. kao $\mu\text{mol Qu/g}$ svježe materije.

4.5.3. Određivanje ukupnih flavonola

Za određivanje ukupnih flavonola korištena je metoda po *Kumaran-u* i *Karunakaran-u* (Kumaran i Karunakaran, 2007). To je spektrofotometrijska metoda sa AlCl_3 pri kojoj se boja razvija tokom reakcije, a njen intenzitet se mjeri na 440 nm.

Za određivanje sadržaja ukupnih flavonola korišteni su: 2% rastvor aluminij klorida (AlCl_3) u etanolu, 96% etanol, 5% rastvor natrij acetata ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) u vodi, rastvor kvercetin hidrata u metanolu ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$) i rastvori uzoraka.

Alikvot (1 mL) rastvora uzorka se pomiješao sa 1 mL 2%-tnog rastvora AlCl_3 u etanolu i 1,5 mL 5%-tnog rastvora natrij acetata u vodi. Dobijena smjesa je ostavljena da stoji 2 sata i 30 minuta na sobnoj temperaturi i apsorbanca je mjerena na 440 nm uz slijepu probu. Za slijepu probu se pomiješao 1 mL 2% AlCl_3 , 1 mL destilirane vode i 1,5 mL 5% natrij acetata.

Standardni dijagram se napravio na isti način, samo što se umjesto rastvora uzorka uzeo alikvot (1 mL) rastvora kvercetin hidrata (10–100 $\mu\text{g/mL}$). Dobijeni rezultati su predstavljeni grafički kao i kod određivanja ukupnih flavonoida.

Iz nacrtanog dijagrama se dobila jednađba pravca koja je služila za dalje računanje ukupnih flavonola. U našem radu korištena je sljedeća jednađba pravca:

$$y = 0,0214x + 0,004 \quad (R^2 = 0,9993)$$

gdje je: y – apsorbanca na 440 nm, a x – koncentracija quercetina ($\mu\text{g/mL}$).

Rezultati su izraženi kao flavonoli ekvivalentni kvercetin (Qu), tj. kao $\mu\text{mol Qu/g}$ svježe materije.

4.5.4. Određivanje ukupnih i monomernih antocijana

Sadržaj ukupnih i monomernih antocijana je određen modificiranom „single,, pH i pH diferencijalnom metodom (Giusti i Wrolstad, 2001). Kvantitativno određivanje ukupnih i monomernih antocijana se zasniva na osobini antocijana da pri promjeni pH vrijednosti sredine, reverzibilno mijenjaju svoju strukturu, pri čemu dolazi i do promjene apsorpcionog spektra. Sadržaj ukupnih antocijana je određen „single,, pH metodom, jer je izmjerena apsorbanca rastvora antocijana pri pH 1 proporcionalna sadržaju ukupnih antocijana. Za određivanje sadržaja monomera antocijana koristila se pH diferencijalna metoda, koja se zasniva na osobini monomera antocijana da su pri pH 1 u obliku oksonijum jona (crveno obojeni), dok su pri pH 4,5 antocijani u poluketalnom stanju (bezbojni).

Nakon ekstrakcije, po 0,5 mL dobijenog ekstrakta dodano je u 9,5 mL pufera pH 1 (125 mL 0,2 mol/L KCl + 375 mL 0,2 mol/L HCl) i 9,5 mL pufera pH 4,5 (400 mL 1 mol/L CH₃COONa + 240 mL 1 mol/L HCl + 360 mL dejonizirane H₂O). Poslije 15 minuta, spektrofotometrijski su očitane apsorbanca na 500 nm i 700 nm za oba pufera.

Koncentracije ukupnih i monomernih antocijana u ekstraktima su izračunate prema formulama:

$$C_{uk} \left[\frac{mg}{L} \right] = \frac{A_{uk} \times M \times R \times 1000}{\epsilon \times l}$$

$$C_{mon} \left[\frac{mg}{L} \right] = \frac{A_{mon} \times M \times R \times 1000}{\epsilon \times l}$$

gdje su:

A_{uk} = apsorbanca razblaženog ekstrakta, a izračunala se prema formuli:

$$A_{uk} = (A_{500} - A_{700})_{pH_1}$$

A_{mon} = apsorbanca razblaženog ekstrakta, a izračunala se prema formuli:

$$A_{mon} = (A_{500} - A_{700})_{pH_1} - (A_{500} - A_{700})_{4,5}$$

$M = 449,2$ g/mol (molekulska masa cijanidin-3-glukozida); $R = 20$ (faktor razblaženja ekstrakta); $\epsilon = 26\,900$ L cm⁻¹mol⁻¹ (molarni koeficijent apsorpcije cijanidin-3-glukozida); $l = 1$ cm (debljina kivete).

Na osnovu izračunatih koncentracija ukupnih i monomernih antocijana, sadržaj antocijana u jagodi se izrazio kao ekvivalent cijanidin-3-glukozida, tj. kao mg cijanidin-3-glukozida/L svježe materije.

Indeks degradacije pokazuje stupanj razgradnje pigmenta, a izračunao se prema formuli:

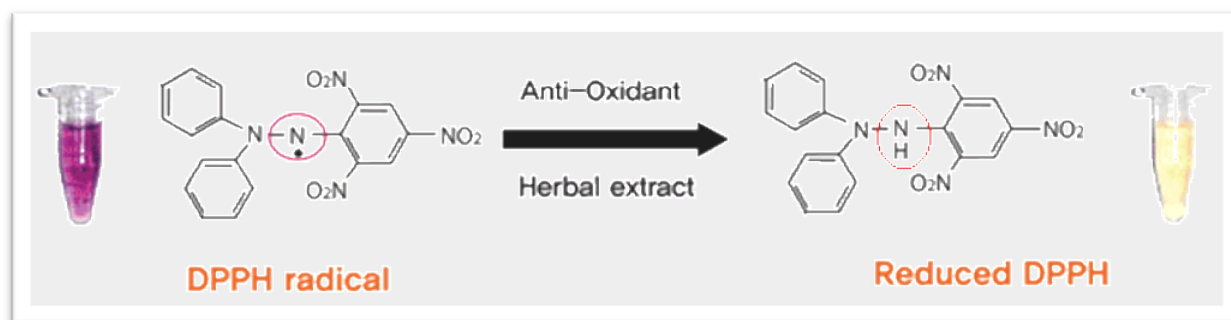
$$ID = \frac{C_{uk}}{C_{mon}}$$

Veće vrijednosti indeksa degradacije ukazuju da je veća degradiranost antocijana, dok su manje vrijednosti indeksa degradacije, pokazatelji manje degradacije i veće očuvanosti monomernih antocijana (Kukrić i sur., 2013).

4.5.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti

4.5.5.1. DPPH test

Efekt uzorka na DPPH radikal određen je metodom *Liyana-Pathiranan* i *Shahidi* (Liyana-Pathiranan i Shahidi, 2005). 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) je stabilan slobodni radikal koji ima jedan nespareni valentni elektron na jednom atomu dušikovog mosta. „Gašenje,, DPPH radikala je osnova antioksidativne DPPH metode koja se zasniva na ispitivanju sposobnosti antioksidanta (obično biljnih ekstrakta) da neutraliziraju DPPH[•] radikale. Pri tom se prati transformacija ljubičasto obojenog, stabilnog, dušik-centriranog DPPH[•] radikala u reduciranu, žuto obojenu formu DPPH-H (Brand-Williams, 1995).



Slika 20. Antioksidativna aktivnost u odnosu na DPPH radikal

<http://radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Antioxid.html>

Za DPPH test korišteni su: DPPH (C₁₈H₁₂N₅O₆) - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, metanol i rastvori uzoraka. 1,5 mM matičnog rastvora DPPH u metanolu se pripremio, a od njega se napravio radni rastvor DPPH od 0,135 mM (u metanolu). Radni rastvor je morao biti svježe pripremljen i apsorbancu mu se trebala kretati u granicama od 1,2 do 1,8.

Kako bi se dobila vrijednost A kontrol, pomiješao se 1 mL 0,135 mM radnog rastvora DPPH sa 1 mL metanola. Apsorbanca je mjerena na 515 nm uz slijepu probu (2 mL metanola). Zatim se u kivetu pomiješao 1 mL 0,135 mM radnog rastvora DPPH sa 1 mL rastvora uzorka, odnosno 1 mL metanolnog rastvora *Trolox*-a koncentracije u rasponu od 1-10 µg/mL (za izradu baždarene krive). Nakon stajanja smjese 30 minuta u tami na sobnoj temperaturi apsorbanca uzorka, odnosno rastvora *Trolox*-a je mjerena na 515 nm, a kao slijepa proba je korišten metanol.

Antioksidativna aktivnost, iskazana kao postotak inhibicije, izračunavana je na sljedeći način:

$$I \% = \frac{A_{kontrol} - A_{uzorak}}{A_{kontrol}} \times 100$$

gdje je:

I% = postotak inhibicije DPPH[•] radikala

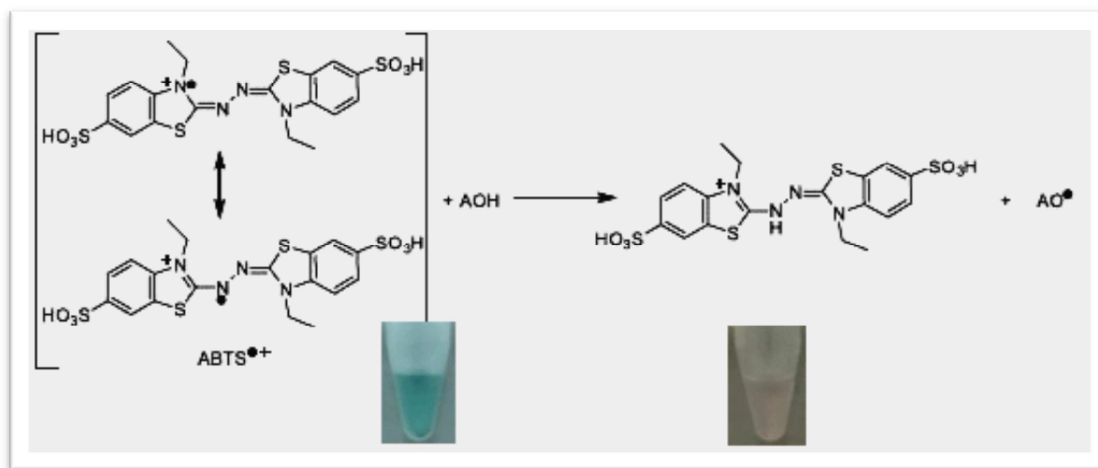
A_{kontrol} = apsorbanca smjese rastvora DPPH radikala i metanola

A_{uzorak} = apsorbanca smjese rastvora DPPH radikala i uzorka

Antioksidativna aktivnost u odnosu na DPPH radikal je izražena kao vrijednost *Trolox* ekvivalent antioksidativne aktivnosti (*TEAC* od eng. *Trolox equivalent antioxidant activity*). Ona je definirana kao koncentracija rastvora *Trolox*-a izražena u µg *Trolox*-a/g svježe materije ili µmol *Trolox*-a/g svježe materije, koja ima ekvivalentnu antioksidativnu aktivnost kao rastvor ispitivanog antioksidanta odgovarajuće koncentracije. Koristeći baždareni pravac očitala se koncentracija *Trolox*-a koja je odgovarala apsorpciji (procentu inhibicije, I%) ispitivanog antioksidanta (uzorka).

4.5.5.2. ABTS test

Za ABTS određivanje je korištena modificirana metoda (Re i sur., 1999). Ova metoda se zasniva na oksidaciji ABTS-a (2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonil) diamonijumove so) pomoću kalij persulfata pri čemu nastaje zeleno-plavi ABTS radikal katjon (ABTS^{•+}). Ovaj radikal katjon će se reducirati pomoću antioksidanata koji će dati H atom ABTS^{•+} katjon radikal. Redukcijom ABTS^{•+} vratiće se u bezbojni ABTS oblik (Slika 21.)



Slika 21. Redukcija zeleno-plavog ABTS radikala u bezbojni ABTS oblik

<http://radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Antioxid.html>

Za ABTS test korišteni su: ABTS reagens, 7 mM rastvor ABTS-a ($C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$) u vodi, 2,4 mM rastvor kalij persulfata ($K_2S_2O_8$) u vodi i rastvori uzoraka.

Prethodno pripremljeni 7 mM rastvor ABTS reagensa i 2,4 mM rastvor kalij persulfata su pomiješani u jednakim omjerima (1:1, v/v) i ostavljeni da reagiraju u tami na sobnoj temperaturi u toku 12 sati. 1 mL izreagirane smjese (rastvor ABTS^{•+} radikala) se razblažio sa 60 mL metanola i spektrofotometrijski se očitala apsorbanca na 734 nm, koja je morala da iznosi 0,706 ($\pm 0,001$). Rastvor koji je imao apsorbancu 0,706 ($\pm 0,001$) u nastavku smo zvali radnim rastvorom ABTS^{•+} radikala. Zatim se alikvot (1 mL) rastvora uzorka pomiješao sa 1 mL radnog rastvora ABTS^{•+} radikala i nakon 7 minuta se očitala apsorbanca na 734 nm. Za izradu baždarene krive se umjesto rastvora uzorka koristi *Trolox*.

Moć gašenja ABTS^{•+} radikala se izračunala prema sljedećoj formuli:

$$I \% = \frac{A_{kontrol} - A_{uzorak}}{A_{kontrol}} \times 100$$

gdje je:

$I\%$ = postotak inhibicije ABTS^{•+} radikala

$A_{kontrol}$ = apsorbanca smjese radnog rastvora ABTS^{•+} radikala i metanola

A_{uzorak} = apsorbanca smjese radnog rastvora ABTS^{•+} radikala i uzorka

Dobijeni rezultati su prikazani grafički, zavisnost postotka inhibicije ABTS^{•+} radikala u funkciji od koncentracije rastvora uzorka. Rezultati su izraženi TEAC vrijednošću (*Trolox* ekvivalent antioksidativne aktivnosti), tj. kao $\mu\text{mol Trolox-a/g}$ svježe materije.

4.6. Statistička obrada podataka

Svi eksperimenti su izvršeni u najmanje tri ponavljanja, a rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija. Statistički značajna razlika je određena jednosmjernom analizom varijanse (*eng. analysis of variance* - ANOVA) za kojom je slijedio post hoc test (*Tukey*). Stupanj povezanosti ispitivanih parametara je utvrđen primjenom *Pearson*-ovog koeficijenta korelacije. U svim statističkim analizama interval provjeravanja je bio 95% ($p < 0,05$). Podaci su obrađeni primjenom softverskog paketa *Microsoft Excel* i računarskog programa *Origin Pro 8*.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

U ovom radu je analiziran neenzimski antioksidativni status pet različitih sorti jagode (*Fragaria vesca*). Nakon urađenih analiza i statističke obrade podataka, svi rezultati su predstavljeni tabelarno i grafički.

5.1. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i flavonola

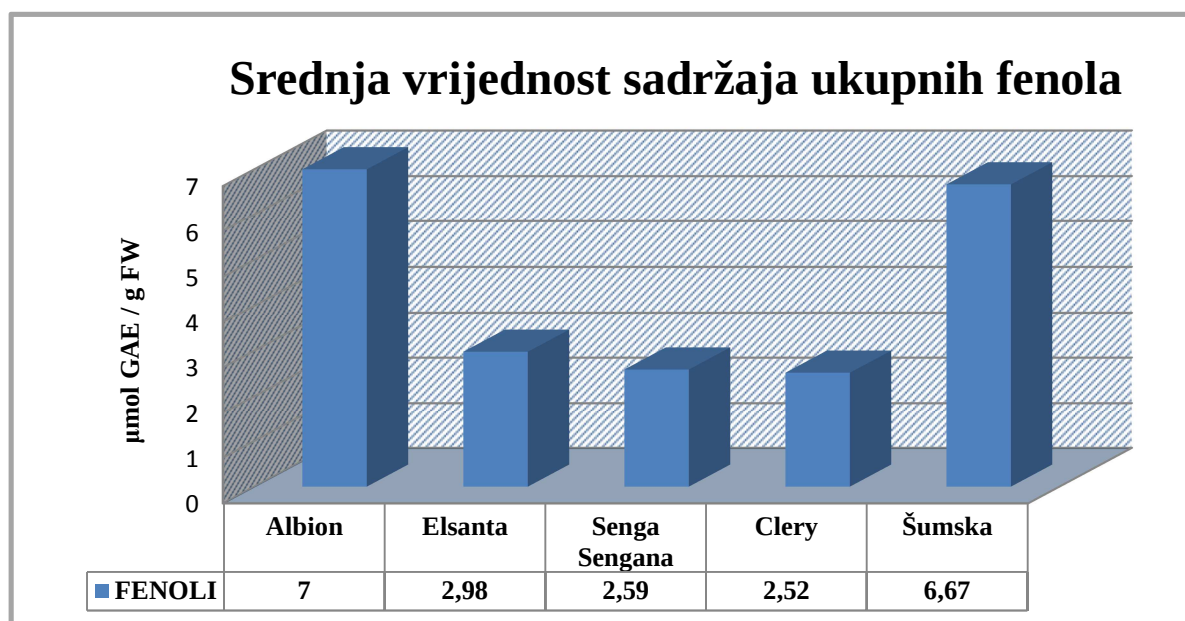
U Tablici 4. predstavljeni su rezultati mjerenja ukupnih fenola, flavonoida i flavonola sorti Alibon, Elsanta, Senga Sengana, Cleary i Šumska. Količina ukupnih fenola u sortama Elsanta, Senga Sengana i Cleary je bila slična i statistički značajno niža nego u sortama Alibon i Šumska, sadržaj fenola u navedenim sortama kretao se od 2,52 do 7,3 $\mu\text{mol GEA/g}_{\text{FW}}$ (442-1242ng GEA/g_{FW}).

Tablica 4. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i flavonola u uzorcima različitih sorti jagode (*Fragaria vesca*)

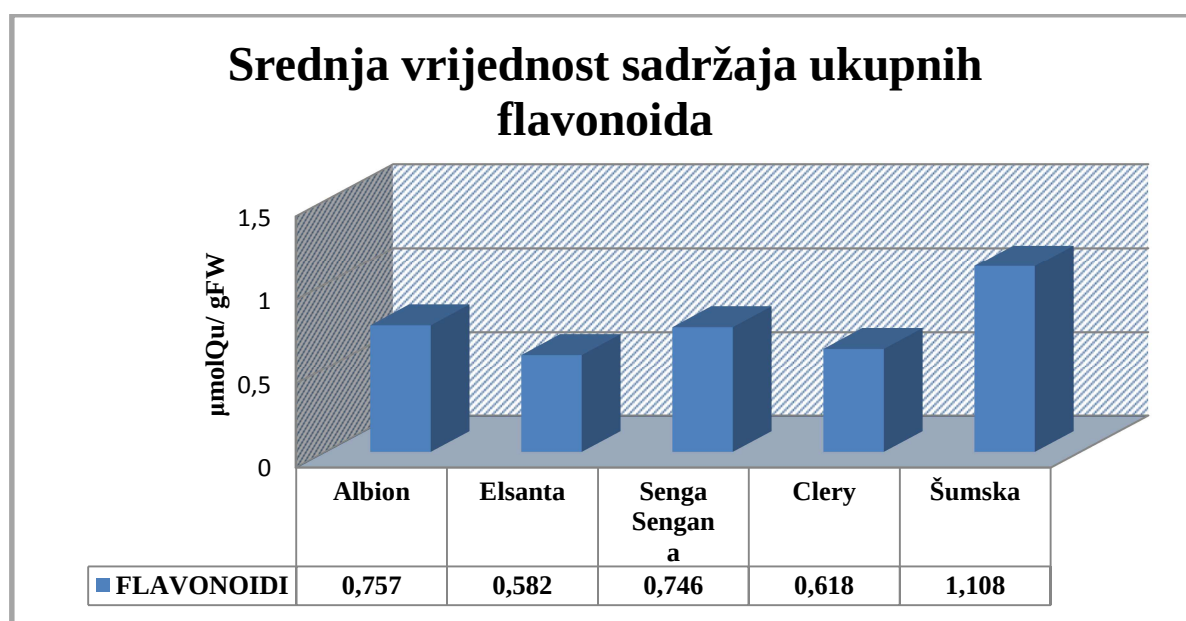
Određivani parametri	Sorta jagoda				
	Albion	Elsanta	Senga Sengana	Cleary	Šumska
Fenoli, $\mu\text{molGEA/g}_{\text{FW}}$	7,00^a±0,60	2,99^b±0,38	2,59^b±0,24	2,52^b±0,25	6,68^b±0,51
Flavonoidi, $\mu\text{molGEA/g}_{\text{FW}}$	0,75^a±0,06	0,58^c±0,03	0,75^a±0,01	0,62^c±0,01	1,11^a±0,06
Flavonoli, $\mu\text{molGEA/g}_{\text{FW}}$	1,14^a±0,16	0,66^b±0,10	0,67^b±0,03	0,61^b±0,14	1,24^a±0,02

Srednje vrijednosti ± standardna devijacija tri nezavisna mjerenja; različita mala slova označavaju statistički značajnu razliku uz nivo pouzdanosti od 95%

FW – svježa masa (fresh weight)



Slika 22. Srednje vrijednosti sadržaja ukupnih fenola u različitim sortama jagoda

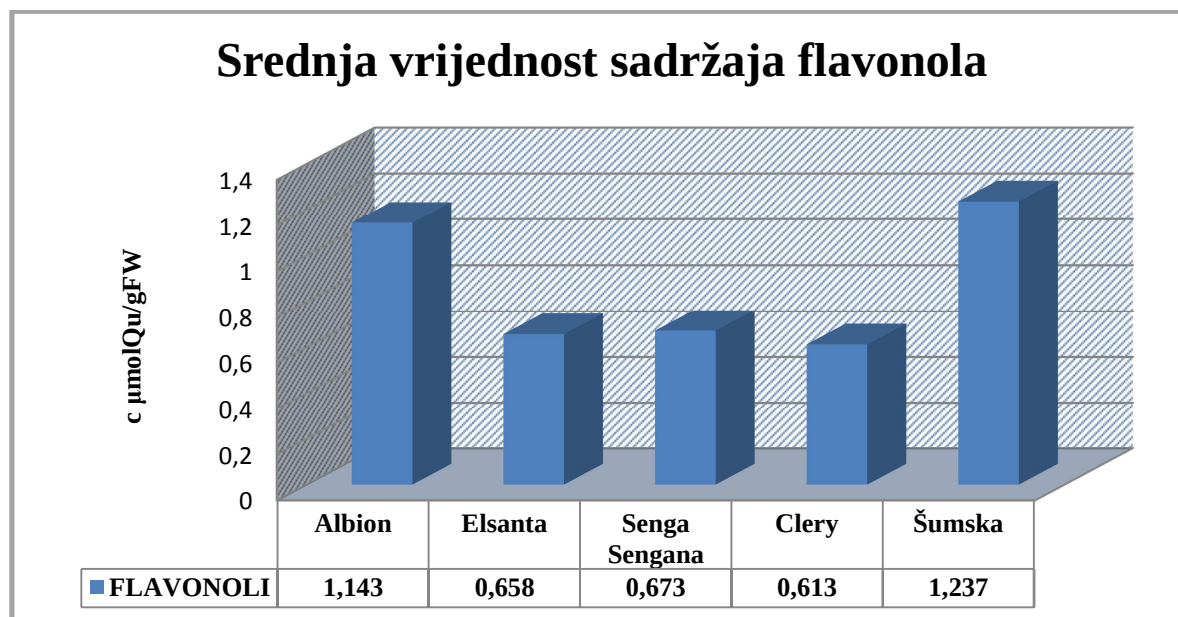


Slika 23. Srednje vrijednosti sadržaja ukupnih flavonola u različitim sortama jagoda

Rezultati su bili u skladu sa literarnim podacima za sadržaj ukupnih fenola za različite sorte jagoda koji su se kretali od 96 mg/100 g_{FW} do 133 mg/100 g_{FW} (Torronen, Maatta, 2002).

Međutim rezultati ovog istraživanja su ipak bili niži od rezultata drugih istraživača (Voća i sur., 2008; Pineli i sur., 2011), koji su ispitivali sadržaj ukupnih fenola različitih sorti jagoda porjeklom iz različitih zemljama i čije su se vrijednosti kretale od 96 do 223 mg GAE/100 g_{FW}. Na slici 22. vidi se da se sadržaj flavonoida kretao od 0,58 do 1,11 μmolQc/g_{FW}.

Sorte Albion i Senga Sengana su imale statistički niži sadržaj flavonoida od sorte Šumske jagode a veći sadržaj od sorti Elsanta i Cleary (Slika 22).



Slika 23. Srednje vrijednosti sadržaja ukupnih fenoida u različitim sortama jagoda

Izmjerene vrijednosti flavonoida su bile u skladu sa literarnim podacima (Lin i sur., 2007, Voća i sur, 2008). Vrijednosti sadržaja flavonola u različitim sortama prikazanih na slkici (Slika 23.) varirale su od 0,61 do 1.24 $\mu\text{molQc/g}_{\text{FW}}$. Sorte Alsanta, Senga Sengana i Cleary su imale značajno niži sadržaj flavonola i fenola u odnosu na sorte Albion i Šumska. Vrijednosti koje navodi Lal (2013) za različite sorte su bile više od sadržaja flavonola sorti koje su analizirane u ovom radu. Plodovi jagode predstavljaju bogat izvor prirodnih antioksidansa, osobito fenolnih spojeva s izraženim antioksidativnim i antiproliferativnim djelovanjem (Wang i sur., 1996; Guo i sur., 2003; Meyers i sur., 2003). Različiti oblici fenolnih spojeva poput: elaginske kiseline, elagitanina, galotanina, glikozida elaginske kiseline, flavanola, kumarilni glikozida, flavonola (kvercetin i glikozidi), antocijanina (cijanidin glikozidi, pelargonidin) sadržani su u plodovima jagoda (Anttonen 2007).

Razlog visokog antioksidativnog kapaciteta jagoda je rezultat visokog sadržaja fenolnih spojeva u njenom plodu (Heinonen i sur., 1998; Tsao i sur., 2003), dok je doprinos askorbinske kiseline procijenjen na samo 15% (Wang i sur., 1996). Koncentracija fenolnih spojeva ovisi o vrsti voća, okolišnim faktorima (svjetlost i temperatura), zrelosti ploda (Waterhouse i Walzem, 1998; Kalt i sur., 1999; Wang i Lin, 2000).

Kada je riječ o plodovima jagoda ovisno o sorti jagode varira koncentracija fenolnih spojeva u rasponu od 205 (Camp Dover) do 318 (Dover) $\text{mg}/100 \text{ g}_{\text{FW}}$, s prosječnom vrijednosti od 241

mg/100 g_{FW} (Da Silva Pinto i sur., 2008). Rezultati ostalih istraživanja su: za sortu Driscoll vrijednosti su bile 330 mg GEA/100 g_{FW} (Proteggente i sur., 2002), za sortu Chandler vrijednosti su bile 161-295 mg GEA/100 g_{FW} (Heinonen i sur., 1998). Temperatura skladištenja je faktor koji također utječe na koncentraciju fenola u plodovima jagoda (Ayala-Zavala i sur., 2004). Ayala-Zavala i sur. (2004) su u svom istraživanju dokazali da plodovi jagoda (*Fragaria x vesca* sorta Chandler) koji su bili skladišteni pri 5 i 10 °C imali višu koncentraciju fenola od plodova koji su bili skladišteni pri 0 °C. Plodovi jagoda, malina i višanja koji su skladišteni pri temperaturi 25 °C na kraju skladištenja su imali značajno viši ukupni fenolni sadržaj, za razliku od plodova koji su skladišteni pri temperaturi 4 °C (Piljac-Težarec i Šamec, 2011).

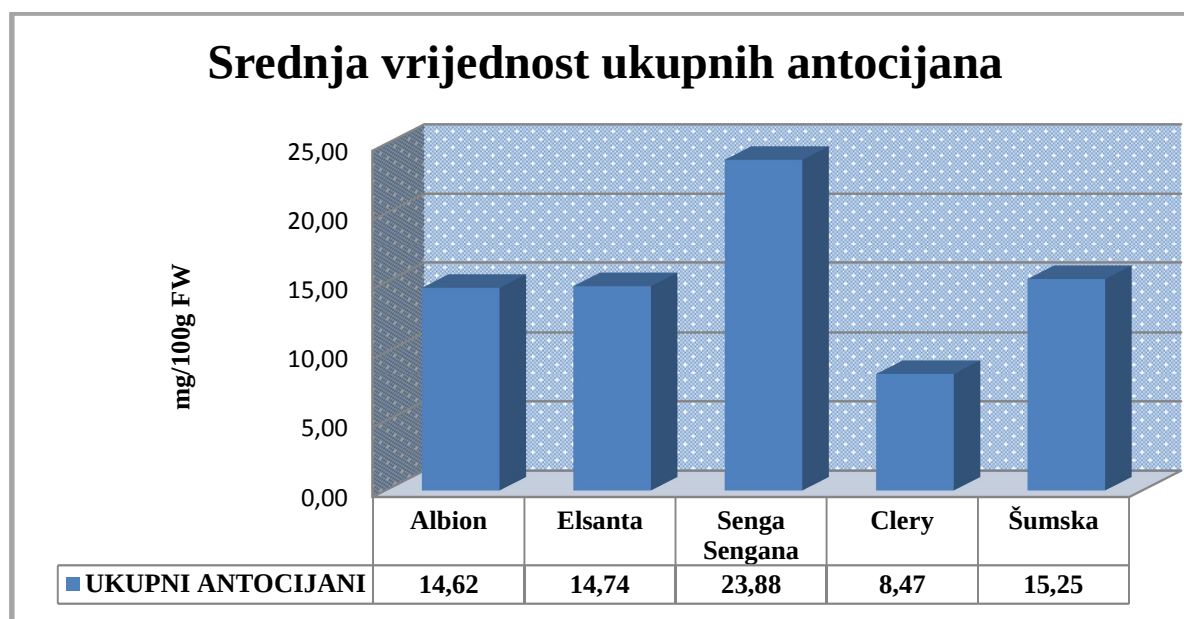
5.2. Sadržaj ukupnih i monomernih antocijana

Izmjereni sadržaj ukupnih i monomernih antocijana u različitim sortama jagode su predstavljeni u Tablici 5. i na slikama 25. i 26.

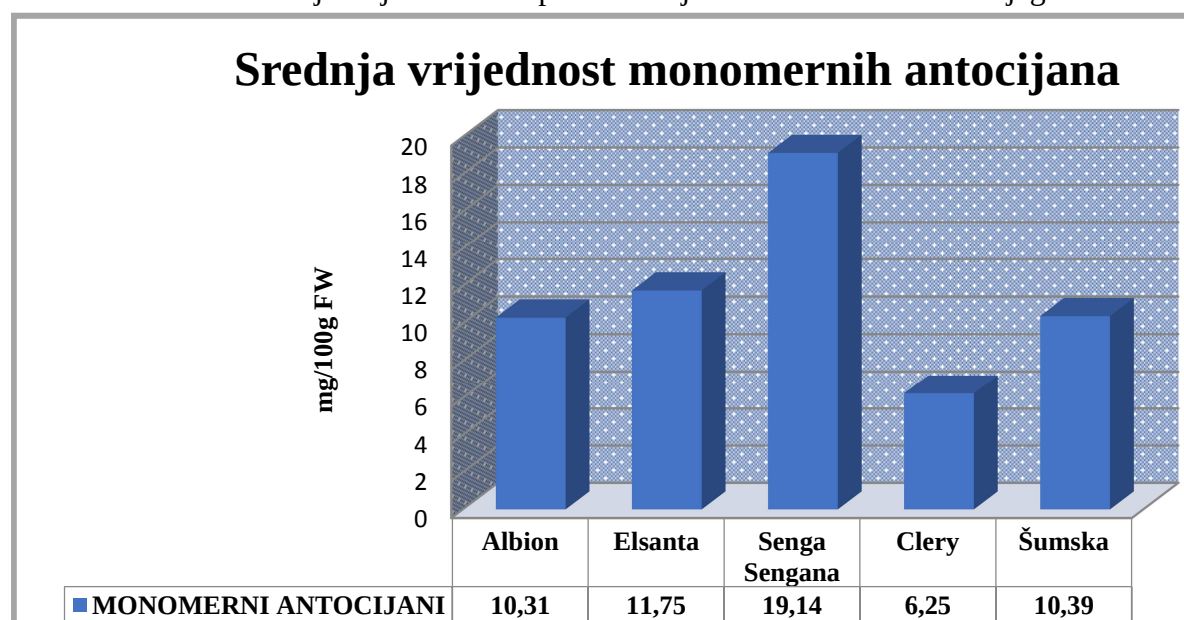
Tablica 5. Sadržaj ukupnih i monomernih antocijana u uzorcima različitih sorti jagode (*Fragaria vesca*)

Određivani parametri	Sorta jagoda				
	Albion	Elsanta	Senga Sengana	Clery	Šumska
Antocijani ukupni, mg/100g_{FW}	14,62^a±0,16	14,74^a±0,91	23,88^b±2,52	8,47^c±0,67	15,25^a±1,13
Antocijani monomerni, mg/100g_{FW}	10,31^a±0,78	11,75^a±0,98	19,14^b±1,43	6,25^c±0,72	10,39^a±0,62
Indeks degradacije	1,42^a±0,01	1,25^b±0,03	1,24^b±0,06	1,35^{a,b}±0,05	1,47^a±0,06

Srednje vrijednosti ± standardna devijacija tri nezavisna mjerenja; različita mala slova označavaju statistički značajnu razliku uz nivo pouzdanosti od 95%



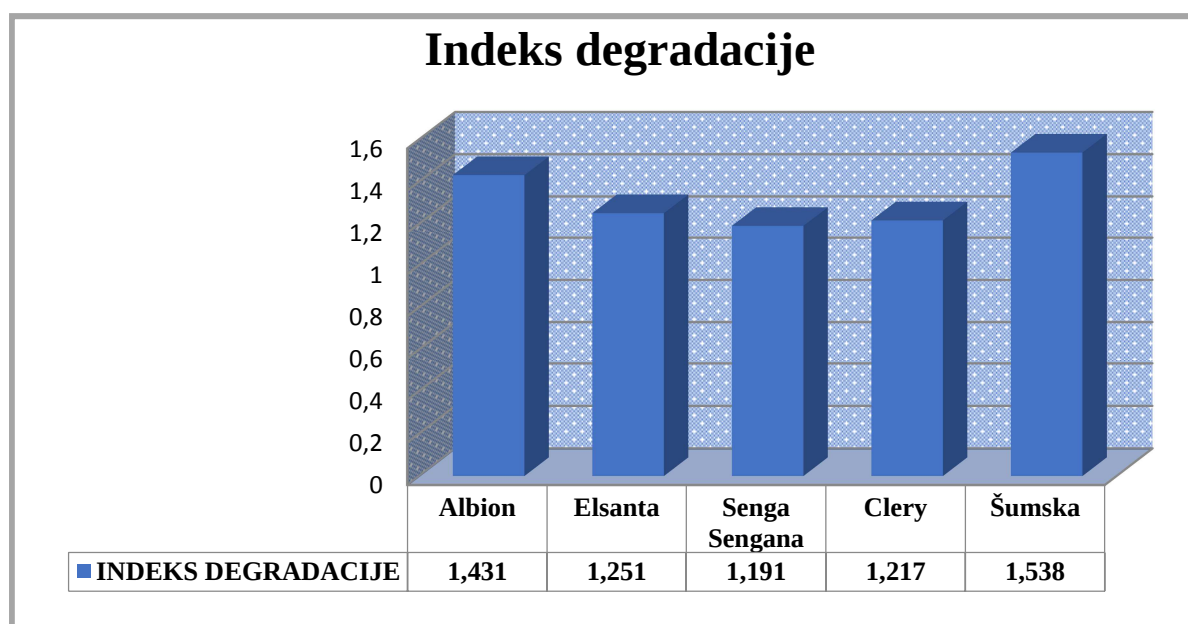
Slika 25. Srednje vrijednosti ukupnih antocijana u različitim sortama jagoda



Slika 26. Srednja vrijednost monomernih antocijana u različitim sortama jagoda

Sadržaj ukupnih antocijana kretao se u rasponu od 8,47 do 23,88 mg/100g_{FW}, dok je sadržaj monomernih antocijana bio u rasponu od 6,25 do 19,14 mg/100g_{FW}. Najveći sadržaj ukupnih i monomernih antocijana je imala sorta Senga Sengana a najmanji sorta Cleary. Sadržaj ukupnih i monomernih antocijana bio je unutar literarni vrijednosti (Pelayo-Zaldivar i sur., 2004.; Voća i sur.; 2008.; Dobričević i sur., 2014). Milivojević (2011) također ukazuje na određene razlike u sadržaju ukupnih fenola, flavonoida i antocijana ovisno od sorte, načina uzgoja, nivoa zrelosti kod berbe, klimatskih uvjeta i geografskih lokacija.

Na Slici 27. je predstavljen indeks degradacije koji se kretao od 1,191 do 1,538. Veće vrijednosti indeksa degradacije ukazuju da je veća degradiranost antocijana, dok su manje vrijednosti indeksa degradacije, pokazatelji manje degradacije i veće očuvanosti monomernih antocijana. Kod uzorka sorte Šumske jagode vrijednost indeksa degradacije je najveća, dok najmanju vrijednost ima sorta Senga Sengana, ali ne postoji statistički značajna razlika između analiziranih sorti (Slika 27).



Slika 27. Srednje vrijednosti indeksa degradacije antocijana u uzorcima

5.3. Antioksidativna aktivnost

5.3.1. DPPH test i ABTS test

U tablici 7. Prikazana je antioksidativna aktivnost različitih vrsta jagoda prema stabilnim DPPH I ABTS radikalima

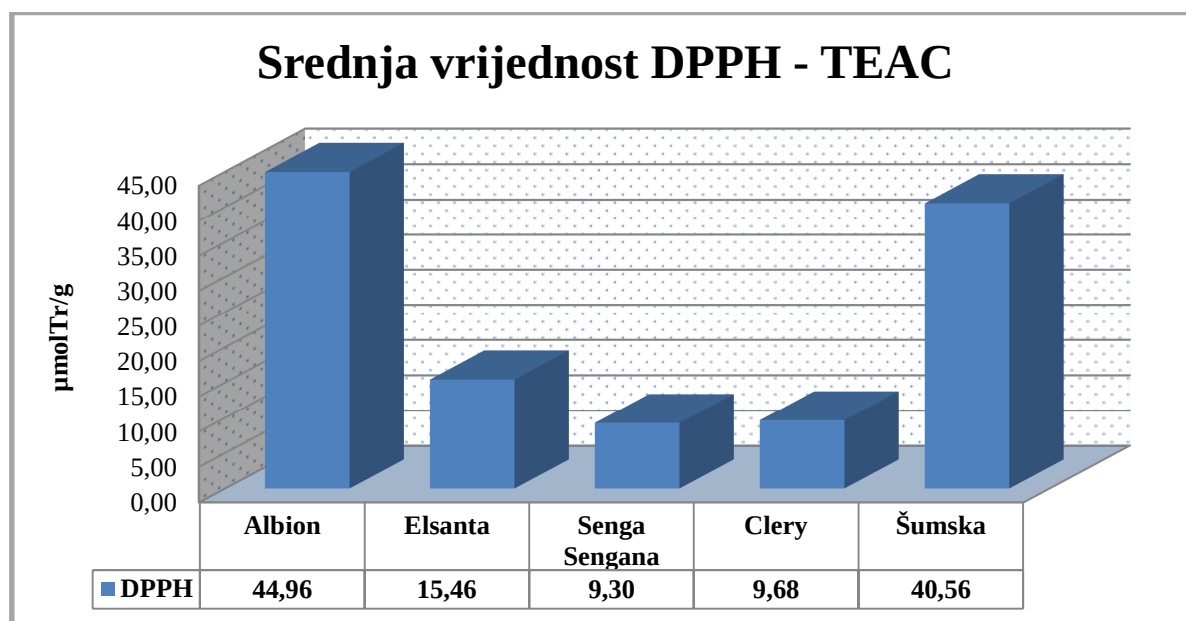
Tablica 7. Antioksidativna aktivnost uzoraka različitih sorti jagode (*Fragaria vesca*) –u odnosu na slobodni ABTS radikal i DPPH radikal

Određivani parametri	Sorta jagoda				
	Albion	Šumska	Elsanta	Senga Sengana	Clery
DPPH, $\mu\text{molTrolox/gFW}$	44,96a $\pm$ 6,24	40,56a $\pm$ 2,72	15,46b $\pm$ 1,06	9,3b $\pm$ 1,02	9,68b $\pm$ 1,69
ABTS, $\mu\text{molTrolox/gFW}$	38,74a $\pm$ 8,37	46,46a $\pm$ 0,42	27,76b $\pm$ 0,16	19,49b $\pm$ 1,48	23,26b $\pm$ 3,14

Srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija tri nezavisna mjerenja; različita mala slova označavaju statistički značajnu razliku uz nivo pouzdanosti od 95%

Na slici 28. vidimo da se vrijednosti antioksidativne aktivnosti prema DPPH radikalu kretala od 9,3 do 44,96 $\mu\text{molTrolox/g}_{\text{FW}}$.

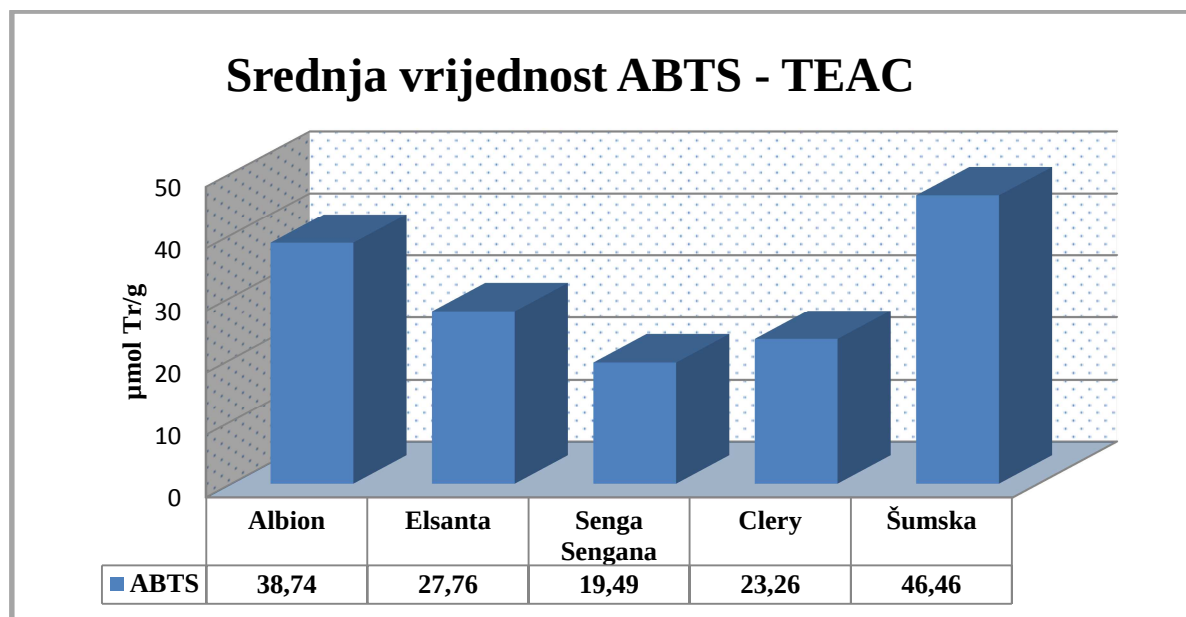
Sorta Albion imala je najveću antioksidativnu aktivnost, a sorta Senga Sengana najnižu vrijednost. Sorte Elsanta, Senga Sengana i Cleary imaju približno jednaku i statistički značajno nižu antioksidativnu aktivnost nego sorte Albion i Šumska.



Slika 28. Srednja vrijednost antioksidativne aktivnosti prema DPPH radikalu

Dobijene vrijednosti za antioksidativnu aktivnost bile su nešto veće ili jednake literaturnim i to: 8,29-11,15 (Dragović-Uzelac i sur., 2007), 6,11 (Jakobek i sur., 2007), 9,7 (Hartmann i sur., 2008), 3,53-4-42 (Voća i sur., 2008), 10,1-12-83 (Pineli i sur., 2011) i 7,94-11,38 (Yildiz i sur., 2014) $\mu\text{molTrolox/g}_{\text{FW}}$. Vrijednosti ABTS radikala za antioksidativnu aktivnost uzoraka jagode kretale su se od 19,49 do 46,46 $\mu\text{molTrolox/g}_{\text{FW}}$ pri čemu je najveću aktivnost pokazala Šumska jagoda a najnižu Senga Sengana. Sorte Elsanta, Senga Sengana i Cleary imaju antioksidativnu aktivnost prema ABTS stabilnom radikalu približno jednaku i statistički značajno nižu nego sorte Albion i Šumska. Literarne vrijednosti: 9,70 (Hartmann i sur., 2007), 12,0821 (Jakobek i sur., 2007), 26,92-30,06 (Dragović-Uzelac i sur., 2007) $\text{mmolTrolax/kg}_{\text{FW}}$ su nešto veće ili jednake vrijednostima ovog rada za antioksidativno djelovanje prema DPPH i ABTS radikalu. Nekada nazastupljeniji polifenoli su oni koji ili imaju niže stvarno djelovanje ili se slabo apsorbiraju iz crijeva ili se brzo otklanjanju iz organizma. Iz tog razloga rezultate treba tumačiti s oprezom u odnosu na doprinos ljudskom

zdravlju, jer polifenoli mogu imati ograničenu bioraspoloživost i znatno se međusobno razlikuju.



Slika 29. Srednja vrijednost antioksidativne aktivnosti prema ABTS radikalu

5.4. Korelacijska analiza

U tablici 8. prikazani su koeficijenti korelacije koji ukazuju na međusobne odnose sekundarnih metabolita u različitim vrstama jagoda i antioksidativnih testova (sadržaj ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, ukupnih flavonola, ukupnih i monomernih antocijana, DPPH i ABTS vrijednosti). Kada govorimo o aktivnosti na DPPH radikal, vidimo da postoji visoka korelacija sa sadržajem sekundarnih metabolita u jagodama.

Tablica 8. Koeficijent korelacije sadržaja sekundarnih metabolita i antioksidativnih testova u različitim vrstama jagoda

	Fenoli	Flavonoidi	Flavonoli	Antocijani ukupni	Antocijani monomerni	ID	DPPH	ABTS
Fenoli	1	0,659	0,975	-0,076	-0,23	0,849	0,998	0,933
Flavonoidi		1	0,808	0,209	0,06	0,711	0,654	0,759
Flavonoli			1	-0,003	-0,166	0,869	0,936	0,943
Antocijani ukupni				1	0,986	-0,42	-0,101	-0,204
Antocijani monomerni					1	-0,564	-0,25	-0,353
ID						1	0,844	0,881
DPPH							1	0,932
ABTS								1

Ukupni fenoli i flavonoli, $r=0,998$ pokazuju vrlo visoku vrijednost korelacionog koeficijenta, i neznatno različitu, za razliku od flavonoida koji su imali znatno niže vrijednost $r=0,654$.

Vrijednosti ukupnih i monomernih antocijana su se kretale od, $-0,101$ i $-0,25$, te su bile niske i negative dok je korelacija sa indeksom degradacije antocijana visoka, i iznosila je $r=-0,844p$. Aktivnost jedinjenja prema stabilnom ABTS radikalu pokazuje visoku korelaciju. Najveću korelaciju pokazuju flavonoli i ukupni fenoli $r=0,943$ i $r=0,933$, redom, pa flavonoidi $r=0,101$ i $r=0,25$ redom. Vrlo visoka korelacija $r=0,881$ je bila između antioksidativne aktivnosti prema ABTS radikalu i indeksa degradacije antocijana. U skladu sa literarnim podacima (Lal i sur., 2013; Yildiz i sur., 2014) također je bila visoka pozitivna korelacija između ukupnih fenola i ukupnog antioksidativnog djelovanja (DPPH, ABTS). S obzirom na ove rezultate možemo zaključiti da je antioksidativna aktivnost više povezana s ukupnim sadržajem fenola i flavonola nego s ukupnim sadržajem flavonoida i antocijana. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima drugih istraživanja (Giovanelli i Buratti, 2009). Kada je riječ o antocijanima i njihovom utjecaju na antioksidativnu aktivnost rezultati ukazuju da moramo uzeti u obzir odnos ukupnih i monomernih antocijana odnosno indeks degradacije, a ne ukupne sadržaje ovih spojeva.

Također postoji visoka korelacija između ukupnog sadržaja fenola i DPPH i ABTS s obzirom da se oba ispitivanja oslanjaju na isti reakcijski mehanizam. U svojim istraživanjima Wang i suradnici (1996) su pokazali da je antioksidativna aktivnost različitih vrsta voća direktno proporcionalna koncentraciji fenolnih spojeva. Povezanost antioksidativne aktivnosti i koncentracije fenola pokazali su u svom radu Connor i suradnici (2002) za 9 sorti borovnica gdje su našli značajnu pozitivnu korelaciju $r = 0,2199$. Wang i Lin (2000) su pokazali linearnu korelaciju između ukupne antioksidativne aktivnosti i koncentracije fenola u plodovima kupina ($r = 0,961$) i malina ($r = 0,911$). Takođe, Deighton i sur. (2000) su u svojim istraživanjima pokazali prividni linearni odnos između antioksidativne aktivnosti i ukupnih fenola ($r = 0,965$) u kupinama, pri čemu je sadržaj antocijanina imao mali utjecaj na antioksidativnu aktivnost ($r = 0,588$) dok je askorbinska kiselina u maloj mjeri doprinijela antioksidativnoj aktivnosti. Odnos između antioksidativne aktivnosti i trajnosti sedam sorti jagoda su ispitivali Hébert i Willemot (1997) i predložili su da antioksidativna aktivnost ima utjecaj na kakvoću i trajnost plodova.

6. ZAKLJUČAK

Nakon završenog istraživanja može se zaključiti da kod različitih sorti jagoda postoji razlika antioksidativnoj aktivnosti i sadržaju različitih sekundarnih metabolita, na što nam ukazuju dobijene vrijednosti mjerenih parametra. Rezultati provedenog istraživanja pokazuju i visoku pozitivnu korelaciju između antioksidativne aktivnosti i sadržaja ukupnih fenola, flavonola i flavonoida. Iz mnogih drugih ekspermentalnih istraživanja poznato je da jagode zaštitno pozitivno djeluju na ljudsko zdravlje. Razlog tome je svakako u velikoj količini prirodnih antioksidativnih komponenti poput polifenolni spojeva koje ova voćka posjeduje. Antocijani su jedni od značajnijih antioksidativnih polifenolnih spojeva jagoda. Rezultat visoke količine antocijana u ovom voću je anažna antioksidacijska aktivnost. Možemo reći da će rezultati ovoga rada svakako pružiti bolji uvid u mehanizam antioksidacijskog djelovanja polifenola iz jagode.

7. LITERATURA

- Ahmad, P., Jaleel, C. A., Azooz, M. M., Nabi, G. (2009): Generation of ROS and non-enzymatic antioxidants during abiotic stress in plants. *Botany Research International*, 2, 11-20.
- Anderson, O. M. i Jordheim, M. (2006) The anthocyanins. U: Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications (Anderson, O. M. i Markham, K. R., ured.), CRC Press, BocaRaton, str. 472-551.
- Andlar M. (2011): Utjecaj fenolnih spojeva na rast i aktivnost bakterija mliječne kiseline. Hrvatska znanstvena bibliografija 517929. <http://biblio.irb.hr/517929>
- Anttonen JM. (2007): Evaluation of Means to Increase the Content of Bioactive Phenolic Compounds in Soft Fruits. *Natural Environmental Sciences* 208: 93.
- Apel, K., Hirt, H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review Plant Biology*, 55, 373-399.
- Ayala-Zavala JF, Wang SY, Wang CY, Gonzalez-Aguilar GA. (2004): Effect of temperature on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *Lebensm Wiss u Technol* 37: 687-695
- Barnes, P. J. (1990): Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*, 9, 235-243.
- Biswas, M. K., Biswas, A. K. Ghosh, P. K., Haldar, A. (2009): A pentacyclic triterpenoid possessing analgesic and anti-inflammatory activities from the fruits of *Dregea volubilis*. *Pharmacognosy Magazine*, 5 (19), 64-68.
- Block G, Patterson B, Sapers GM. (1992): Varietal differences in distribution of quercetin and kaempferol in onion (*Allium cepa*) tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32:274– 276.
- Boudet AM. 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* 68:2722-2735.
- Bravo, L. (1998): Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317-333.
- Britton, G. (1983): The biochemistry of natural pigments. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Cao G, Sofic E, Prior RL. (1996): Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44:3426-3431.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A. Galán-Vidal, C. A. (2009): Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859-871.
- Connor AM, Luby JJ, Hancock JF, Berkheimer S, Hanson EJ. (2002). Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 893–898.
- Čakarić D. Primjena cikličke voltametrije u određivanju antioksidativne aktivnosti bioloških uzoraka, Zagreb, FKIT, 2009.
- Dai, J., Mumper, R. (2010): Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15: 7313-7352
- Dashek, W. V. (2006): Biomolecules II: Biologically important molecules. In: Dashek, W. V, Harrison, M. (ur.), *Plant cell biology*. Science Publishers, Enfield, NH, USA, 76-106.
- Da Silva Pinto M, Lajolo MF, Genovese IM. (2008.): Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Food Chemistry* 107: 1629– 1635
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Montagu, M. V., Inzé, D., Breusegem, F. V. (2000): Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57, 779-795.
- Deighton N, Brennan R, Finn C, Davies HV., (2000): Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 80: 1307-1313.
- De Pascual, T., Sanchez, B. S. (2008): Anthocyanins, from plant to health, *Phytochemistry. Rev*, vol. 7, 281–299
- Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok F, Rice-Evans C, Roberfroid M. (1998.): Functional food science and defence against reactive oxygen species. *British Journal of Nutrition* 80:77-112.

- Dobričević, N., Voča, S., Žlabur, J.Š., Jakić, A., Pliestić, S., Galić, A., (2014): Kvalitet plodova jagoda sorti “Alba”, “Alibion”, “Asia”, “Clery” I “Joly” 49th International Symposium on agriculture Dubrovnik Croatia, 662-666.
- Dragović-Uzelac, V., Levaj, B., Bursać, D., Pedisić, S., Radojčić, I., Biško, A., (2007.): *Agriculturae Conspectus Scientificus* 72 (4)
- Dragović-Uzelac V, Pospišil J, Levaj B, Delonga K., (2005.): The study of phenolic profiles of raw apricots and apples and their purees by HPLC for the evaluation of apricot nectars and jams authenticity, *Food Chemistry*, 91, 373-383.
- Droge, W. (2002): Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82, 47-95.
- Dubravec K., Dubravec I. (1989.): Naše kultivirano bilje. Znanje, Zagreb: 60 str.
- Escarpa A, González MC, (1999.): Fast separation of (poly)phenolic compounds from apples and pears by high-performance liquid chromatography with diode-array detection, *Journal of Chromatography A*, 2, 301-309.
- Finkel, T., Holbrook, N. J. (2000): Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239-247.
- Galletta, G.J., Bringham, R.S. (1990.): Strawberry management. Prentice Hall, NJ, SAD
- Gamulin S, Marušić M, Kovač Z. Patofiziologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2005, str. 187-193; 408-410.
- Garcia-Salas P, Morales-Soto A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. (2010.): Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules* 15:8813-8826.
- Ghodbane S, Lahbib A, Sakly M, Abdelmelek H. Bioeffects of Static Magnetic Fields: Oxidative Stress, Genotoxic Effects, and Cancer Studies. *BioMed Research International*, 2013, 602987, 12
- Giovanelli, G., Buratti, S., (2009.): *Food Chemistry* 112, 903
- Giusti, M.; Wrolstad, R.E.; Unit F1.2: Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*: Wrolstad R.E., Eds: John Wiley and sons: New York 2001, p.p. 1-13

- Gómez-Alonso S, García-Romeroa E, Hermosín-Gutiérrez I, (2007.): HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence, *Journal of Food Composition and Analysis*, 7, 618-626.
- Guern, J., Renaudin, J. P., Brown, S. C. (1987): The compartmentation of secondary metabolites in plant cell cultures. In. Constable, F., Vasil, I. K. (ur.), *Cell culture in phytochemistry*. Academic Press, London, UK, 43-76
- Guo CJ, Yang JJ, Wei JY, Li YF, Xu J, Jiang YG. (2003.): Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research* 23: 1719-1726
- Hancock J.F. (1999). *Strawberries*. CAB International, Wallingfer, UK
- Häkkinen S, Heinonen M, Kärenlampi S, Mykkänen H, Ruuskanen J, Törrönen R, Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries, *Food Research International*, June 1999, 5, 345-353.
- Halliwell B. (1997.): Antioxidants and human disease: A general introduction. *Jurnal Nutrition Reviews* 55:44–49.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1999): *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell, B. (2006): Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic life. *Plant Physiology*, 141, 312-322.
- Halvorsen BL, Holte K, Myhrstad MCW, Barikmo I, Hvattum E, Fagertun Remberg S. (2002.): A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *Jurnal Nutrition* 132: 461.
- Hannum SM. (2004.): Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition is a food Science* 44: 1–17.
- Harborne, J.B. (1994) *The Flavonoids. Advances in Research Since*, Chapman & Hall, London, UK.
- Harborne JB, Baxter H. (1999.): *The Handbook of Natural Flavonoids*. John Wiley, Chichester
- Harborne, J. B., Williams, C. A. (2000): Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.

- Hartmann, A. Patz, C.D., Andlauer, W., Dietrich, H., Ludwig, M., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (2008) 9484
- Hancock JF (1999.): Temperate fruit crop breeding: Germplasm to genomics, Chapter: Strawberries, Publisher: Springer, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp.393-438
- Hannum SM. (2004.): Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition is a food Science* 44: 1–17.
- Havsteen BH (2002.): The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacology & Therapeutics*, 2002, 96, 67-202.
- Hébert C, Willemot C. (1997.): Antioxidant Potential and Strawberry Preservation. *Hortsci.* 32(3): 434.
- Heinonen IM, Meyer AS, Frankel EN. (1998.): Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4107-4112.
- Helen A, Rajasree CR, Krishnakumar K, Augusti KT. (2000.): Antioxidant effect of onion oil (*Allium sativum* L.) on the damage induced by nicotine in rats as compared to alphatocopher. *Tox Lett* 116:61-68.
- Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F. (1995.): Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *International Archives of Medicine* 155:381-386.
- Hoover E., Rosen C., Luby J., Wold-Burkness S. (2008.): Commercial strawberry production in Minnesota. University of Minnesota Extension, M1238: 1-11.
- <http://hirc.botanic.hr/fcd/>
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005): The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Hung, H.C., Joshipura, K.J., Jiang, R., Hu, F.B., Hunter, D., Smith-Warner, S.A., Colditz, G.A., Rosner, B., Spiegelman, D., Willett, W.C. (2004): Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *Journal of the National Cancer Institute*, 96:1577–1584.

- Hurtado-Fernández E, Gómez-Romero M, Carrasco-Pancorbo A, Fernández-Gutiérrez A, (2010.): Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, 53, 1130-1160.
- Hwang, H.J., Park, H.J., Chung, H.J., Min, H.Y., Park, E.J., Hong, J.Y., Lee, S.K. (2006): Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on cancer cell metastasis mediated by the down-regulation of matrix metalloproteinase expression in human HT1080 fibrosarcoma cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 5: 356-362.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* 126, 1821-1835.
- Jakobek, L., Šeruga, M., Novak, I., Medvidović-Kostanović, M., (2007.): *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 103 Jahrgang, Heft 8
- Kalt W. (2001.): Interspecific variation in anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity among genotypes of high bush and low bush blueberries (*Vaccinium* section *cyanococcus* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:4761-4767.
- Kalt W, Forney ChF, Martin A, Prior RL. (1999.): Antioxidant Capacity, Vitamin C, Phenolics, and Anthocyanins after Fresh Storage of Small Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4638-4644.
- Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S. (2001.): Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutation Research Journal* 488:6576.
- Klandorf H, Van Dyke K. Oxidative and Nitrosative Stresses: Their Role in Health and Disease in Man and Birds, *Oxidative Stress - Molecular Mechanisms and Biological Effects*. West Virginia, InTech, 2012, 47-60.
- Kong, J. M., Chia, L. S., Chia, T. F., Goh, N. K., Brouillard, R., (2003): Analysis and biological activities of anthocyanins, *Phytochemistry*, vol. 64 (5), 923–933
- Kukrić, Z., Jašić, M., Samelak, I. (2013): *Biohemija hrane: biološki aktivne komponente*, Tehnološki fakultet Univerziteta Banja Luka i Tehnološki fakultet Univerziteta Tuzla. PrintCom
- Ku, H.H, Brunk, U.T, Sohal, R.S. (1993): Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radical Biology Medicine*, 15:621–627.

- Kumaran, A., Karunakaran, R. J. (2007): In vitro antioxidant Activities of methanol extracts of *Phyllanthus* species from India. *LWT- Food Science and Technology*, 40 (2), 344-352
- Lal, S., Nazeer, A., Shyam, R.S., Desh, B.S., Shatma, O.C., Kumar, R., *Fruits*, 68 (5) (2013) 423
- Lampe JW. 1999. Health effects of vegetable and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *American Journal of Chemical Nutrition* 70:475-490.
- Laughton JM, Evans PJ, Moroney MA, Hoult JRS. 1991. Inhibition of mammalian lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoid and phenolic dietary additives. *Biochemical Pharmacology* 18:1673-1681.
- Lee JC, Kim HR, Kim J, Jang YS. 2002. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *Saboten*. *J Agric Food Chem* 50:6490-6496.
- Lin, J.Y., Tang, C.Y. , *Food Chem.* 101 (2007) 140
- Liyana-Pathiranan, C. M., Shahidi, F. (2005): Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*Triticum aestivum* L) as affected by gastric pH conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2433-2440.
- Madlener, S., Illmer, C., Horvath, Z., Saiko, P., Losert, A., Herbacek, I., Grusch, M., Elford, H.L., Krupitza, G., Bernhaus, A. (2007): Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Letters*, 245: 156-162.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990): *Fruit phenolics*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2008): Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- Mandal, S.M., Chakraborty, D.S. (2010): Phenolic acids act as signaling molecules in plant–microbe symbioses. *Plant Signaling and Behavior*, 5: 359-368
- Meyers KJ, Watkins CB, Pritts MP, Liu RH. 2003. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6887-6892.
- Miloš, Tvrtko (1997.): *Jagoda*. Naklada „Jurčić“, Zagreb.
- Milivojević, J., Maksimović, V., Nikolić, M., Bogdanović, J., Maletić, R., Milatović, D., *Journal of Food Quality* 34 (2011) 1

- Mimica-Dukić, N. (1997): In vivo and in vitro study of antioxidant activity of plant extracts. *Archive of Pharmacy*, 5:475-493.
- Monties, B., Lignins, U. (1989): Methods in plant biochemistry. In: Dey, P. M., Harborne, J. B. (ur.), *Botanische jahrbucher syst.* Academic Press, London, UK, 113-157.
- Mratinić E. (2012.): Jagoda. Partenon, Beograd
- Nikolić M., Milivojević J. (2010.): Jagodaste voćke, tehnologija gajenja. Naučno voćarsko društvo Srbije, Čačak.
- Ordoñez, A. L. L., Gomez, J. D., Vattuone, M. A., Isla, M. I. (2006): Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swart extracts, *Food Chemistry*, 97 (3), 452-458.
- Pelayo-Zaldivar, C., Beler, S., Kader, A.A., *J. Food Quality*, 28 (2004) 78
- Pietta P, Simonetti P, Mauri P. 1998. Antioxidant activity of selected medicinal plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:4487-4490.
- Piljac-Ţegarec J, Šamec D. 2011. Antioxidant stability of small fruits in postharvest storage at room and refrigerator temperatures. *Food Res Int* 44: 345-350.
- Pineli, L.O., Moretti, C.L., Dos Santos, M.S., Campos, A.B., Brasileiro, A.V., Cordova, A.C., Chiarello, M.D., *Journal of Food Composition and Analysis* 24 (2011) 11
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Robards K, Prenzer PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W, Phenolic compounds and their role in oxidative process in fruits, *Food Chemistry*, 1999, 66, 401-436.
- Romani A, Pinelli P, Galardi C, Sani G, Cimato A, Heimler D, Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce, *Food Chemistry*, 2002, 3, 337-342.
- Sánchez-Rodríguez E, Ruiz JM, Ferreres F, Moreno DA, Phenolic profiles of cherry tomatoes as influenced by hydric stress and rootstock technique, *Food Chemistry*, 2012, 2, 775782
- Sanz C, Perez AG, Olias R, Olias JM. (1999.): Quality of strawberries packed with perforated polypropylene. *Jurnal Food Sciences* 64(4): 748-752.

- Segundo M, Magalheas L, Reis S. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta at Science*, 2007, 613, 1-19.
- Seeram NP, Lee R, Scheuller HS, Heber D. (2006.): Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. *Food Chemistry* 97: 1–11.
- Seeram NP, Momin RA, Bourquin LD, Nair MG. 2001. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. *Phytomedicine* 8: 362-369.
- Stratil P, Klejdus B, Kuban V. 2006. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:607–616.
- Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A. R., Simonič, M., Knez, Z. (2005): Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 2, 191-198.
- Šoškić M. (2009.): Jagoda. Partenon, Beograd
- Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D.A., GarciaViguera, C. (2014) Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 15, 15638-15678.
- Tomás-Barberán FA, Espín CJ. 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 81:853-876.
- Tsao R, Yang R, Sockovie E, Zhou T. 2003. Antioxidant Phytochemicals in Cultivated and Wild Canadian Strawberries. *Acta Hort* 626:25-35.
- Tsao, R. i McCallum, J. (2009) Chemistry of Flavonoids. U: Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability (De la Rosa, L. A., AlvarezParrilla, E., Gonzalez-Aguilar, G., ured.), Blackwell Publishing, Ames, str. 131-153.
- Torronen, A.R., Maatta, K., *Acta Horticulturae* 567 (2002) 140
- Tulipani S, Mezzetti B, Capocasa F, Bompadre S, Beekwilder J, Ric de Vos C. H, Capanoglu E, Bovy A, and Battino M. 2008. Antioxidants, Phenolic Compounds, and

Nutritional Quality of Different Strawberry Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(3): 696-704.

- Turkmen N, Velioglu YS, Sari F, Polat G. 2007. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules* 12: 484-496.
- Usenik V, Fabčić J, Štampar F, Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.), *Food Chemistry*, 1, 2008, 185-192.
- Voća, S., Dobričević, N., Dragović-Uzelac, N., Duralija, B., Družić, J., Cmelik, Z., Babojelić, M.S., *Food Technology and Biotechnology*. 46 (3) (2008) 292
- Vrhovac B, Francetić I, Jakšić B, Labar B, Vucelić B. *Interna medicina*. Zagreb, Ljevak, 2003, str. 584-589; 408-409.
- Zhang Y, Seeram NP, Lee R, Feng L, and Heber D. (2008.): Isolation and Identification of Strawberry Phenolics with Antioxidant and Human Cancer Cell Antiproliferative Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 670–675.
- Zhao, J., Liu, X.J., Ma, J.W., Zheng, R.L. (2004): DNA damage in healthy term neonate. *Early Human Development*, 77:89-98.
- Wang, H., Race, E. J., Shrikhande, A. J. (2003): Anthocyanin transformation in Cabernet sauvignon wine during aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7989-7994.
- Wang H, Cao G, Prior RL. 1996. Total Antioxidant Capacity of Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 701-705.
- Wang H, Cao G, Prior RL. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 304-309.
- Wang SY, Lin HS. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 140-146.

- Wang SY, Zheng W. 2001. Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4977-4982.
- Wang SY, Feng R, Lu Y, Bowman L, Ding M. 2005. Inhibitory effect on activator protein-I, nuclear factor-kappa B, and cell transformation by extracts of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4187-4193.
- Waterhouse AL, Walzem RL. 1998. Nutrition of grape phenolics. In: Rice-Evans CA, Packer L. *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker, New York: 359-385 pp.
- Wink, M. (2003): Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64: 3-19.
- Wolfe, K., Wu, H., Liu, R. H. (2003): Antioxidant Activity of Apple Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (3), 609-614.
- Wollenweber, E. (1994): Flavones and flavonols. In: Harborne, J. B. (ur.), *The flavonoids: advances in research since 1986*. Cambridge, UK: Chapman i Hall, 259–335.
- Wrolstad, R.E. (2004): Anthocyanin Pigments- Bioactivity and Coloring Properties, *Journal of Food Science*, vol. 69, 419-425
- Yildiz, H., Ercisli, S., Hegedus, A., Akbulut, M., Topdas, E.F., Aliman, J., *ournal of Applied Botany and Food Quality* 87 (2014) 274

BIOGRAFIJA AUTORA

Iva Martić, rođena je 11.03.1990. godine u Travniku, Bosna i Hercegovina. Osnovnu i srednju školu Opću gimnaziju završava u Katoličkom školskom centru „Petar Barbarić“ u Travniku.

Prvi ciklus studija završava u travnju 2014. godine na Prirodno – matematičkom fakultetu, studijskom programu Biologija, i stekla zvanje diplomiranog biologa.

Također, na Prirodno-matematičkom fakultetu, studijskom programu Biologija 2013.godine upisuje nastavni smjer čime stječe zvanje profesora biologije.

Tijekom studiranja učestvovala je na seminaru Tempus čime je stekla certifikate iz obuke: Priprema i analiza uzorka za analizu polihlorovanih bifenila (PCB) u površinskim vodama i Uzorkovanje polutanata u površinskim vodama i sedimentu.

Neposredno nakon diplomiranja upisuje drugi ciklus studija te svoje obrazovanje usmjerava u pravcu biokemije. Koautor je rada „The content of secondary metabolites and their impact on the antioxidant activity in different varieties of strawberries“ objavljenog 2016. godine na naučnom skupu 53. SAVETOVANJE SRPSKOG HEMIJSKOG DRUŠTVA.

Iva trenutno živi i radi u Zagrebu u mliječnoj industriji Dukat d.o.o kao voditelj kvalitete.

Izjava 1

IZJAVA O AUTORSTVU

**Izjavljujem da je
master/magistarski rad**

Naslov rada NEENZIMSKI ANTIOKSIDATIVNI STATUS JAGODE (*Fragaria vesca*)

Naslov rada na engleskom jeziku NON-ENZYMATIC ANTIOXIDANT STATUS OF
STRAWBERRY (*Fragaria vesca*)

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada
- da master/magistarski rad u cjelini ili u dijelovima, ili bilo predložen za dobivanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam koristio/la autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih autora.

U Banjoj Luci 18.06.2019.

Potpis kandidata



Izjava 2

**Izjava kojom se ovlašćuje Prirodno-matematički fakultet/ Akademija umjetnosti
Univerziteta u Banjoj Luci da master/magistarski rad učini javno dostupnim**

Ovlašćujem Prirodno-matematički fakultet/ Akademija umjetnosti Univerziteta u Banjoj
Luci da moj master/magistarski rad, pod naslovom

NEENZIMSKI ANTIOKSIDATIVNI STATUS JAGODE (*Fragaria vesca*)

koji je moje autorsko djelo, učini javno dostupnim.

Master/magistarski rad sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu,
pogodnom za trajno zadržavanje.

Moj master/magistarski rad, pohranjen u digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci,
mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence
Kreativne zajednice (Creative Commons), za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade
- ☒ 4. Autorstvo - nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na
poledini lista).

U Banjoj Luci 18.06.2019.

Potpis kandidata



Izjava 3

**Izjava o identičnosti štampane i elektronske verzije
master/magistarskog rada**

Ime i prezime autora Iva Martić

Naslov rada Neenzimski antioksidativni status jagode (*Fragaria vesca*)

Mentor prof.dr Zoran Kukrić

Izjavljujem da je štampana verzija mog master/magostarskog rada identična elektronskoj verziji koju sam predao/la za digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci.

U Banjoj Luci 18.06.2019.

Potpis kandidata



РЕПУБЛИКА СРПСКА
УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
Број: 19/4. 211/19
Датум: 04.06.2019
БАЊА ЛУКА

dr Biljana Kukavica, redovni profesor,
uža naučna oblast Biohemija i molekularna biologija, Prirodno-matematički fakultet
Univerzitet u Banjoj Luci, predsjednik
dr Zoran Kukrić, redovni profesor,
uža naučna oblast Biohemija i molekularna biologija, Tehnološki fakultet Univerzitet u Banjoj
Luci, mentor-član
dr Maksimović, docent
uža naučna oblast Botanika, Biljne nauke Prirodno-matematički fakultet Univerzitet u Banjoj
Luci, član

Odlukom Nastavno-naučnog vijeća Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Banjoj
Luci broj 19/3.1263/19 od 22.05.2019 godine imenovani smo u Komisiju za pregled, ocjenu i
odbranu završnog/master rada kandidata Ive Martić pod naslovom: "Neenzimski
antioksidativni status jagode (*Fragaria vesca*)"
Nakon pregleda predatog master rada podnosimo sljedeći:

IZVJEŠTAJ

O ocjeni urađenog master rada: "Neenzimski antioksidativni status jagode (*Fragaria vesca*)"
kandidata Ive Martić

VIJEĆU STUDIJSKOG PROGRAMA BIOLOGIJA

NASTAVNO-NAUČNOM VIJEĆU
PRIRODNO-MATEMATIČKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BANJOJ LUCI

Master rad kandidata Ive Martić je urađen u okviru II ciklusa studija smjera Biologija pod
mentorstvom prof. dr Zorana Kukrića. Rad je napisan na 60 stranica i sadrži 8 tabela i 29 slika.
Rad je ukoričen u tvrdi povež A4 formata, štampan u boji, jednostrano.
Rad sadrži: Sažetak na srpskom i engleskom jeziku, Uvod, Pregled literature, Materijal i
metode, Rezultate i diskusiju, Zaključak, Literaturu i Biografiju.

PRIKAZ ANALIZE MASTER RADA PO POGLAVLJIMA

Uvod i cilj rada (napisani na 2 stranice) sadrži osnovne pojmove o jagodi koja je predmet istraživanja master rada te cilj rada sa radnim hipotezama koje se odnose na antioksidativnu aktivnost jagode.

U poglavlju **Teorijski dio (17 stranica)** dat je pregled literaturnih podataka koji se odnosi na opis biljne vrste jagode (*Fragarium vesca*), o nastanku slobodnih radikala, oksidativnom stresu i antioksidativnom neenzimskom metabolizmu. Najviše pažnje je obrađeno na fenole kao neenzimske antioksidante. Takođe su i prikazani literaturni podaci o antioksidativnom djelovanju jagoda sa različitih klimatskih i geografskih područja.

Eksperimentalni dio (10 stranica) U ovom poglavlju je navedeno koja se oprema i hemikalije koristili u toku izrade ovog rada. Takođe opisana je priprema ekstrakta ploda jagode (4 gajene sorte i jedna divlja jagoda) u etanolu kao i metode koju su korištene u radu. Detaljno su opisane metode za određivanje ukupnih fenola, flavonoida i flavonola kao i metode za određivanje antioksidativnog kapaciteta ekstrakta (DPPH i ABTS metod).

Poglavlje **Rezultati i diskusija (18 stranica)** sadrži pregled dobijenih rezultata koji su predstavljani tabelarno i grafički. Predstavljani su rezultati za sadržaj fenola, flavonoida i flavonola, antocijana kao i antioksidativni kapacitet ekstrakta ploda jagode. Na osnovu dobijenih rezultata izvršena je korelacija između sekundarnih metabolita i antioksidativne aktivnosti etanolnog ekstrakta ploda jagode. Dobijeni rezultati su upoređeni sa dostupnim literaturnim podacima.

U poglavlju **Zaključak (1 stranica)** na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da kod različitih sorti jagoda postoji razlika u antioksidativnoj aktivnosti i sadržaju različitih sekundarnih metabolita, na što nam ukazuju dobijene vrijednosti mjernih parametara. Takođe, nađena je i visoka pozitivna korelacija između antioksidativne aktivnosti i sadržaja sekundarnih metabolita.

Na osnovu dobijenih rezultata okarakterisan je neenzimski antioksidativni metabolizam različitih sorti za uzorke prikupljene sa različitih lokaliteta srednje i zapadne Bosne i Hercegovine.

Poglavlje **Literatura (11 stranica)** sadrži 132 abecedno numerisanih referenci citiranih u radu.

OCJENA NAUČNE VALIDNOSTI

Rad sadrži važne rezultate koji se odnose na karakterizaciju neenzimskog antioksidativnog metabolizma ploda jagode. Rezultati su detaljno analizirani, diskutovani u odnosu na dostupnu literaturu i mogu imati primjenu u budućim istraživanjima iz ove oblasti.

ZAKLJUČAK I PRIJEDLOG

Na osnovu ocjene master rada: "Neenzimski antioksidativni status jagode (*Fragaria vesca*)" kandidatkinje Ive Martić, Komisija zaključuje da dati master rad predstavlja značajan doprinos proučavanju antioksidativnog metabolizma ploda jagode, biljke koja zaokuplja pažnju naučne javnosti zbog svojih hranljivih svojstava. Rad ukazuje na veoma ozbiljan pristup radu kandidata, te Komisija sa zadovoljstvom predlaže Nastavno-naučnom vijeću Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci da usvoji Izvještaj i pozitivnu ocjenu master rada Ive Martić i da prema predviđenoj proceduri zakaže javnu odbranu rada, jer su se stekli svi potrebni uslovi.

U Banjoj Luci, 1.06.2019. godine

KOMISIJA

Biljana Kukavica

dr Biljana Kukavica, redovni profesor, uža naučna oblast Biohemija i molekularna biologija, Prirodno-matematički fakultet u Banjoj Luci, predsjednik komisije

Zoran Kukrić

dr Zoran Kukrić, redovni profesor, uža naučna oblast Biohemija i molekularna biologija, Tehnološki fakultet u Banjoj Luci, mentor-član

Tanja Maksimović

dr Tanja Maksimović, docent
uža naučna oblast Botanika, Prirodno-matematički fakultet
Univerzitet u Banjoj Luci, član