

# Antioksidacijska aktivnost divlje borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.)

---

Soče, Mirela

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:373356>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Mirela Soče

1131/USH

**ANTIOKSIDACIJSKA  
AKTIVNOST  
DIVLJE BOROVNICE (*Vaccinium  
myrtillus* L.)**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji na Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom Nade Vahčić, red. prof. dr. sc. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Valentine Hohnjec i ing. Renate Petrović.

Najljepše se zahvaljujem svojoj mentorici prof.dr.sc. Nadi Vahčić na stručnoj pomoći i svim korisnim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada. Također zahvaljujem Valentini Hohnjec i Renati Petrović, ing. na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada.

Posebno zahvaljujem mojim roditeljima koji su mi pružili predivan život, bezbrižno školovanje te na kraju i ovu diplomu. Mami, mojoj najvećoj heroini, hvala na strpljivosti, pomoći i predanosti. Tati, mom anđelu, hvala na nevidljivoj, najposebnijoj potpori. Nadam se da ste ponosni!

Zahvaljujem i svojim dvjema sestrama i bratu koji su me u svemu podržavali i bodrili i uvijek bili tu za mene.

Hvala i svim mojim prijateljima koji su mi također bili velika podrška. Bez njih cijeli tijek mog studiranja ne bi prošao tako lako i zabavno.

I na kraju, hvala mom dečku, koji je uljepšavao svaki dan mog studiranja i bio velika motivacija da uspješno završim ovaj rad.

Veliko hvala svima!

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda  
Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST DIVLJE BOROVNICE (*Vaccinium myrtillus* L.)

*Mirela Soče, 1131/USH*

**Sažetak:** Istraživanje je provedeno na 35 uzoraka divlje borovnice sa 7 lokacija u Primorsko-goranskoj županiji, prikupljenih u periodu od 20. lipnja do 13. srpnja 2018. godine. Određeni su antocijani i antioksidacijska aktivnost spektrofotometrijskim metodama. Antioksidacijska aktivnost je određena dvjema metodama: DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) i FRAP (redukcija željezova iona) metodom. Koncentracija antocijana iznosi 37,45 – 91,95 mg/100 g svježeg uzorka. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene DPPH i FRAP metodama iznose 8,90 – 13,74 mmol TE/100 g svježeg uzorka, odnosno 19,28 – 81,19 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g svježeg uzorka. Dobiveni rezultati pokazuju da divlje borovnice, ispitivane tijekom ovog istraživanja, imaju visok udio ukupnih antocijana te visoku antioksidacijsku aktivnost prema DPPH i FRAP metodi.

**Ključne riječi:** borovnica, bioaktivne tvari, antioksidansi, antocijani, antioksidacijski kapacitet

**Rad sadrži:** 62 stranice, 13 slika, 17 tablica, 84 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *prof. dr. sc. Nada Vahčić*

**Pomoć pri izradi:** *Valentina Hohnjec, Renata Petrović, ing.*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof.dr.sc. *Branka Levaj*
2. Prof.dr.sc. *Nada Vahčić*
3. Izv.prof.dr.sc. *Danijela Bursać Kovačević*
4. Prof.dr.sc. *Ksenija Marković* (zamjena)

**Datum obrane:** 30. rujna 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Quality Control and Nutrition  
Laboratory for Food Quality Control in Food Industry

**Scientific area:** Biotechnical Sciences  
**Scientific field:** Food Technology

### ANTIOXIDANT ACTIVITY OF WILD BLUEBERRY (*Vaccinium myrtillus* L.)

*Mirela Soče, 1131/USH*

**Abstract:** This research was conducted on thirty-five samples of wild blueberry (bilberry) from seven different locations in Primorje-Gorski Kotar County. The samples were collected in period from 20th June to 13th July in 2018. Anthocyanins and antioxidant activity by spectrophotometric methods were determined. Antioxidant activity was determined by using two methods: DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Assay) and FRAP method (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power Assay). The amount of total anthocyanins is 37,45 – 91,95 mg/100 g of fresh sample. Values of antioxidant activity, determined by DPPH and FRAP methods are 8,90 – 13,74 mmol TE/ 100 g of fresh sample, respectively 19,28 – 81,19 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g of fresh sample. The results obtained show that wild blueberries, examined during this research, have high amount of total anthocyanins and high antioxidant activity according to DPPH and FRAP method.

**Keywords:** *blueberry, bioactive compounds, antioxidants, anthocyanins, antioxidant activity*

**Thesis contains:** 62 pages, 13 figures, 17 tables, 84 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** *Nada Vahčić, PhD*

**Technical support and assistance:** *Valentina Hohnjec, Renata Petrović, eng.*

**Reviewers:**

1. PhD. *Branka Levaj*, Full professor
2. PhD. *Nada Vahčić*, Full professor
3. PhD. *Danijela Bursać Kovačević*, Associate professor
4. PhD. *Ksenija Marković*, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 30 September 2019

# SADRŽAJ:

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD.....   | 1  |
| 2. TEORIJSKI DIO .....                                     | 2  |
| 2.1. ANTIOKSIDANSI I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST .....      | 2  |
| 2.1.1. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti..... | 3  |
| 2.1.1.1. FRAP metoda .....                                 | 4  |
| 2.1.1.2. ABTS/TEAC metoda.....                             | 5  |
| 2.1.1.3. DPPH metoda .....                                 | 5  |
| 2.1.1.4. ORAC metoda .....                                 | 6  |
| 2.2. BIOAKTIVNE TVARI.....                                 | 6  |
| 2.2.1. Fenolni spojevi.....                                | 7  |
| 2.2.1.1. Flavonoidi.....                                   | 8  |
| 2.2.1.2. Neflavonoidi .....                                | 12 |
| 2.2.2. Klorofil.....                                       | 13 |
| 2.2.3. Karotenoidi .....                                   | 15 |
| 2.2.4. Alkaloidi .....                                     | 17 |
| 2.2.5. Steroli.....  | 19 |
| 2.3. BOROVNICA .....                                       | 20 |
| 2.3.1. Botanička obilježja i uzgoj.....                    | 20 |
| 2.3.2. Kemijski sastav .....                               | 21 |
| 2.3.3. Utjecaj borovnice na ljudsko zdravlje.....          | 24 |
| 2.4. BIOAKTIVNE TVARI BOROVNICE.....                       | 25 |
| 2.4.1. Fenolni spojevi.....                                | 25 |
| 2.4.2. Karotenoidi .....                                   | 27 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....                               | 28 |
| 3.1. MATERIJALI .....                                      | 28 |
| 3.1.1. Priprema otopina.....                               | 29 |
| 3.1.2. Priprema uzoraka borovnice .....                    | 29 |
| 3.1.3. Kemikalije.....                                     | 30 |
| 3.1.4. Oprema.....   | 30 |
| 3.2. METODE RADA.....                                      | 31 |
| 3.2.1. Određivanje ukupnih antocijana .....                | 31 |



|  |    |
|--|----|
| 3.2.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH (2,2-difenil-pikrilhidrazil) metodom ..... | 33 |
| 3.2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom .....                              | 35 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA.....   | 38 |
| 5. ZAKLJUČCI .....   | 54 |
| 6. LITERATURA .....  | 55 |

# 1. UVOD

Borovnica je bobičasto voće koje pripada porodici *Ericaceae*, rod *Vaccinium*. Razlikujemo šumsku ili divlju, odnosno običnu borovnicu (*Vaccinium myrtillus*) od američke borovnice (*Vaccinium corymbosum*). Kod nas je poznatija divlja odnosno šumska borovnica.

Borovnice se konzumiraju i komercijalno su dostupne gotovo isključivo kao bobice (svježe, smrznute i sušene), kao i u obliku industrijskih proizvoda (konzerve, sokovi i koncentrati) ili za proizvodnju sirupa, pita, pića i kolača. Plodovi borovnice imaju jako povoljan kemijski sastav, budući da sadrže značajnu količinu različitih biološki aktivnih spojeva. Sadrže vitamine, fenolne spojeve, ali i minerale, te se zbog toga borovnici pripisuju različiti pozitivni učinci na ljudsko zdravlje. Brojna istraživanja ukazuju da su borovnice bogate spojevima poput antocijana, kojima se pripisuju antioksidacijski, antimutageni, antikarcinogeni, protuupalni, antimikrobni učinci. Zbog visokog udjela antioksidanasa, borovnice su izvrsne i za njegu kože.

Smatraju se bogatim izvorom fenolnih spojeva, te zbog toga imaju vrlo visoku antioksidacijsku aktivnost. Plodovi borovnice sadrže različite fenolne spojeve, poput: antocijana, proantocijanidina, fenolnih kiselina, flavanola, flavonol glikozida itd.

Antioksidacijska aktivnost ili antioksidacijski kapacitet u prirodnim materijalima često se povezuje sa količinom i sastavom fenolnih spojeva u prirodnom materijalu. Budući da prirodni supstrati i različite vrste voća, pa tako i borovnice predstavljaju kompleksnu smjesu fenolnih i drugih spojeva, za određivanje antioksidacijske aktivnosti potrebno je kombinirati više različitih metoda kako bi se dobila kompletnija informacija. Najčešće metode koje se primjenjuju u određivanju antioksidacijskog kapaciteta ili aktivnosti su: DPPH, ABTS, FRAP i ORAC metoda.

Cilj ovog rada biti će određivanje ukupnih antocijana, te antioksidacijskog kapaciteta 35 uzoraka divlje borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.), sakupljenih u periodu od 20. lipnja do 13. srpnja 2018. godine na 7 lokacija Primorsko-goranske županije. Antioksidacijski kapacitet je određen primjenom dvije metode: DPPH (upotreba 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala) i FRAP (redukcija željezova iona) metode. Rezultati ovog rada će biti uspoređeni sa rezultatima sličnih istraživanja.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. ANTIOKSIDANSI I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Antioksidansi se u rječniku definiraju kao tvari koje se suprotstavljaju oksidaciji ili inhibiraju reakcije potaknute djelovanjem kisika ili peroksida, a mnoge od tih tvari (poput tokoferola) se koriste kao konzervansi u različitim proizvodima (npr. u mastima, uljima, prehrambenim proizvodima i sapunima za usporavanje razvoja užeglosti). Međutim, relevantnija je biološka definicija antioksidansa, koja ih definira kao „sintetičke ili prirodne tvari koje se dodaju proizvodima kako bi se spriječilo ili odgodilo njihovo propadanje djelovanjem kisika u zraku“ (Huang i sur., 2005).

Najjednostavnije rečeno, antioksidans je „spoj/molekula koji u relativno niskoj koncentraciji sprječava ili odgađa oksidaciju slobodnih radikala“ (Lamprecht, 2015). Slobodni radikali su nestabilne čestice koje imaju jedan ili više nesparenih slobodnih elektrona u svojim atomima te imaju stalnu potrebu za nadoknadom elektrona iz okolnih atoma, pa zbog toga potiču lančane reakcije u organizmu. Slobodni radikali i ostale reaktivne vrste kisika (ROS<sup>1</sup>) su uključeni u razvoj mnogih bolesti, poput tumora, kardiovaskularnih bolesti, astme, dijabetesa, gastrointestinalnih bolesti i drugih upalnih procesa.

Antioksidansi vrše ulogu neutralizacije slobodnih radikala i na taj način štite ljudski organizam od mogućih bolesti, ali i usporavaju kvarenje hrane bogate lipidima.

Da bi neke spojeve ubrajali u antioksidanse, oni moraju zadovoljiti dva osnovna preduvjeta:

1. moraju biti prisutni u nižoj koncentraciji u odnosu na supstrat koji se oksidira te moraju bitno usporiti ili spriječiti reakciju oksidacije uzrokovanu djelovanjem slobodnog radikala;
2. nastali radikal mora biti stabilan prema daljnjoj oksidaciji kroz intramolekularnu vodikovu vezu kako ne bi poticao lančanu reakciju.

---

<sup>1</sup> Reactive oxygen species

Najvišu antioksidacijsku aktivnost pokazuju vitamin C (askorbinska kiselina), vitamin E (tokoferol), karotenoidi, fenolni spojevi, glukozinolati, itd (Griffiths, 2016). Također pokazuju i fenolipidi, fosfolipidi, neki enzimi, proteini, itd (Chen i Xu, 2018).

Mnoge namirnice su prirodno bogate antioksidansima, poput orašastih plodova (orasi, lješnjaci, pistacije, bademi), nara, bobičastog voća, rajčice, slatkog krumpira, zelenog čaja, itd (Anonymus 1, 2019). Međutim, tijekom obrade namirnica u gotove proizvode, formiranje oksidirajućih vrsta se može povećati i antioksidacijki sustavi se mogu “preopteretiti”, što dovodi do nekontroliranih oksidacijih reakcija koje rezultiraju gubitkom kvalitete, smanjenjem trajnosti i stvaranjem potencijalno toksičnih proizvoda oksidacije. Radi zaštite kvalitete i sigurnosti hrane, antioksidansi se često dodaju u prerađenu hranu kao aditivi (Decker, 2003).

Dokazano je da antioksidansi imaju mnoge povoljne zdravstvene učinke. Oni smanjuju rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti, djeluju antikancerogeno, jačaju imunološki sustav, štite gastrointestinalni trakt, usporavaju starenje, smanjuju rizik od pojave neurodegenerativnih bolesti, itd (Srđić-Rajić i Konić Ristić, 2016).

#### 2.1.1. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti

Antioksidansi mogu donirati jedan elektron ili vodikov atom reaktivnom, slobodnom radikalu, te na taj način neutralizirati slobodni radikal (Kinsella i sur., 1993). Spojevi mogu pokazati antioksidacijsko djelovanje jednostavno reagirajući s ROS-om ili sprječavajući stvaranje ROS-a.

Da bi se odredila količina antioksidacijskih tvari i utvrdila njihova antioksidacijska aktivnost, razvijen je veliki broj metoda, koje se temelje na različitim mehanizmima obrambenog sustava antioksidanasa, poput uklanjanja ili inhibicije slobodnih radikala ili kelacije metalnih iona (koji bi u suprotnom doveli do nastajanja slobodnih radikala).

Metode kojima se najčešće uklanjaju slobodni radikali uklanjaju temelje se na dva mehanizma, prijenosu bilo vodikovog atoma ili elektrona da bi se radikal pretvorio u stabilnu vrstu. Ta dva mehanizma su:

1. HAT<sup>2</sup> - prijenos vodikovog atoma (H atom prenesen u ciljni radikal, moguće sekundarno gašenje radikalnim rekombinacijama),
2. SET<sup>3</sup> - prijenos jednog elektrona (jedan ili više elektrona prenesenih radi smanjenja ciljnih spojeva) (Silveira Coelho i sur.,2019).

SET i HAT metode mjere sposobnost neutralizacije reaktivnosti slobodnog radikala doniranjem jednog elektrona odnosno vodika. Oba mehanizma imaju isti krajnji rezultat, ali je kinetika različita (Prior i sur, 2005).

U SET metode se ubrajaju: FRAP, ABTS/TEAC, CUPRAC, DPPH, FC, itd., a u HAT metode se ubrajaju: ORAC, TRAP, TOSC, CL, PCL, CBA (metoda izbjeljivanja beta karotenom), inhibicija LDL oksidacije, itd.

#### 2.1.1.1. FRAP metoda

- eng. Ferric Ion Reducing Antioxidant Power Assay – „*Antioksidacijska moć redukcije željeza*“

FRAP metodu razvili su Benzie (1996) te Benzie i Strain (1996). Metoda se bazira na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni produkt. Reakcija se odvija u kiselom mediju, pri pH=3,6 kako bi se zadržala dobra topljivost željeza. Pri nižim pH vrijednostima smanjuje se ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a ujedno će se povećati redoks potencijal, koji će dodatno omogućiti pomak reakcije u smjeru transfera elektrona (Hagerman i sur., 1998). Redoks potencijal reakcije Fe(III)/Fe(II) iznosi 0,77V i svi spojevi sa nižim redoks potencijalom, ulazit će u reakciju redukcije željeza te tako doprinijeti konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta.

---

<sup>2</sup> Hydroden atom transfer

<sup>3</sup> Single electron transfer

### 2.1.1.2. ABTS/TEAC metoda

- eng. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay

TEAC metodu su prvi opisali Miller i Rice Evan 1993. godine, a kasnije je nadograđena ta verzija.

ABTS, oksidans, je nastao oksidacijom persulfata 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS<sub>2</sub>). Specifično, 7 mmol ABTS amonija je otopljeno u vodi i onda tretirano s 2,45 mmol kalij persulfata. Zatim se smjesu ostavi na sobnoj temperaturi 12-16 sati da se dobije tamno plava otopina. Ova otopina se razrjeđuje s etanolom ili puferom (pH 7,4) dok se ne dostigne apsorbancija 0,7 na 734 nm. 1 mL dobivene otopine se promiješa s 10 µL uzorka. Apsorbancija je očitana na 30 °C, 1, 4 i 6 min nakon miješanja na 30 °C. Razlika očitane apsorbancije se prikazuje u odnosu na koncentracije antioksidansa kako bi se dobila ravna linija. Koncentracija antioksidansa koja daje isti postotak promjene apsorbancije ABTS kao 1 mM Troloxa se smatra TEAC vrijednošću (Huang i sur., 2005).

Zbog svoje operativne jednostavnosti, TEAC metoda je bila korištena u mnogim laboratorijskim istraživanjima antioksidacijskog kapaciteta, te su izmjerene TEAC vrijednosti mnogih spojeva i uzoraka hrane (Huang i sur., 2005).

### 2.1.1.3. DPPH metoda

- eng. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Assay

Metoda se temelji na uporabi stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. To je jedan od nekoliko stabilnih dušičnih radikala, koji zbog nesparenog elektrona postiže apsorpcijski maksimum u vidljivom dijelu spektra (517 nm) i ljubičaste je boje. Ova metoda mjeri sposobnost smanjivanja sposobnosti antioksidansa prema DPPH. Promjena ljubičaste boje u žutu posljedica je sparivanja nesparenog elektrona DPPH radikala s vodikom antioksidansa, stvarajući reducirani oblik DPPH-H. Promjena boje se prati mjerenjem apsorbancije pri 517 nm na spektrofotometru (Prior i sur., 2005).

#### 2.1.1.4. ORAC metoda

- eng. Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay

Izvorno, ovu metodu su razvili Cutler i Cao, a prvi test je koristio B-phycoerythrin (B-PE, fluorescentni protein) kao probu. Međutim ovaj test je pokazao neke nedostatke, predugo trajanje i velik radni intezitet, osobito za analize velikog broja uzoraka, pa su istraživači pronašli način da poboljšaju, odnosno izmjene ovu metodu (Huang i sur., 2005).

Detaljnu proceduru visoko propusne ORAC metode s fluorescentnim čitačima su opisali Huang i suradnici 2002. godine. Općenito, uzorci, kontrola i standard (Trolox s 4 ili 5 različitih koncentracija za izradu baždarnog dijagrama) se miješaju s otopinom fluoresceina i inkubiraju na konstantnoj temperaturi (37 °C) prije dodatka AAPH otopine, koja inicira reakciju. Intezitet fluorescencije se mjeri pri 491 nm, svake minute tijekom 35 minuta pri sobnim uvjetima (pH 7,4, 37 °C). Kako reakcija napreduje, troši se fluorescein i smanjuje se njegov intezitet. U prisutnosti antioksidansa, raspad fluoresceina je inhibiran (Huang i sur., 2002).

## 2.2. BIOAKTIVNE TVARI

Bioaktivni spojevi pojavljuju se u malim količinama u hrani i smatraju se nenutritivnim, ali vitalnim sastojcima za održavanje ljudskog zdravlja (Patil i sur., 2009). Istraživanje bioaktivnih sastojaka za ljudsku potrošnju povećalo se u nedavnoj prošlosti zbog svijesti potrošača o njihovim povezanim koristima u vezi sa održavanjem zdravlja (Silveira Coelho i sur., 2019).

Bioaktivni spojevi mogu potjecati iz biljnih i životinjskih izvora, a međusobno se razlikuju po kemijskoj strukturi i funkciji koju obavljaju u organizmu. Skupina bioaktivnih tvari, odnosno spojeva je vrlo velika i raznolika, a neki primjeri skupina bioaktivnih tvari su:

- fenoli,
- klorofil,
- alkaloidi,
- steroli,
- karoteonoidi i drugi.

Najpoznatije nenutritivne bioaktivne tvari su: likopen u rajčici i lubenici,  $\beta$ -karoten u mrkvi, marelici i breskvama, indol i karabinol u brokuli, lutein u kukuruzu, alicin u češnjaku, i mnoge druge. Sve bioaktivne tvari, ako se unose u organizam u dovoljnim (odgovarajućim) količinama, imaju povoljan utjecaj na zdravlje pojedinih sustava u organizmu (gastrointestinalni, imunološki, kardiovaskularni, živčani, endokrini), kao i na zdravlje cjelokupnog organizma (Anonymus 2, 2015).

### 2.2.1. Fenolni spojevi

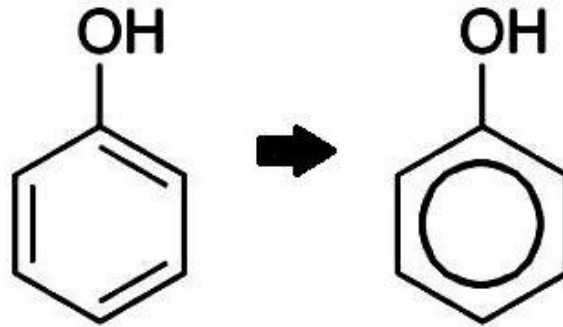
Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti koji se najčešće nalaze u biljkama. Imaju vrlo važnu ulogu u rastu i razmnožavanju biljaka, štiteći ih od patogena i predatora. Također, fenolni spojevi pridonose boji i senzorskim svojstvima voća, ali i povrća (Morandi Vuolo i sur., 2019).

Budući da su odgovorni za regulaciju najvažnijih procesa, kao što su regulacija rasta, vezanje pojedinih komponenti na staničnu stijenkku, biosinteza lignina, otpornost biljnog tkiva na različita oštećenja, nastajanje boje, okusa i arome svojstvene za pojedinu vrstu voća te utječu na gorčinu i trpkost, utječu na kvalitetu voća. (Gabrielska i sur., 1999)

Ekološki faktori, svjetlost, temperatura, agrotehničke mjere, uvjeti dozrijevanja te uvjeti skladištenja i obrade svakako utječu na sastav i koncentraciju fenolnih spojeva u biljkama (Kim i sur., 2001). Sadržaj nekih fenolnih spojeva može se povećati u uvjetima stresa, UV zračenja, patogenih stanja, ozljede, zagađenja zraka i ekstremnim uvjetima.

Fenolni spojevi se definiraju kao prirodni metaboliti koji nastaju biogenetski ili iz šikimata/fenilpropanoida. Struktura fenolnih spojeva se sastoji od hidroksilne skupine (-OH) vezane izravno na aromatski ugljikovodik. Najjednostavniji takav spoj je fenol ( $C_6H_5OH$ ) (slika 1.), a mogu se kretati od jednostavnih fenolnih molekula do visoko polimeriziranih spojeva.

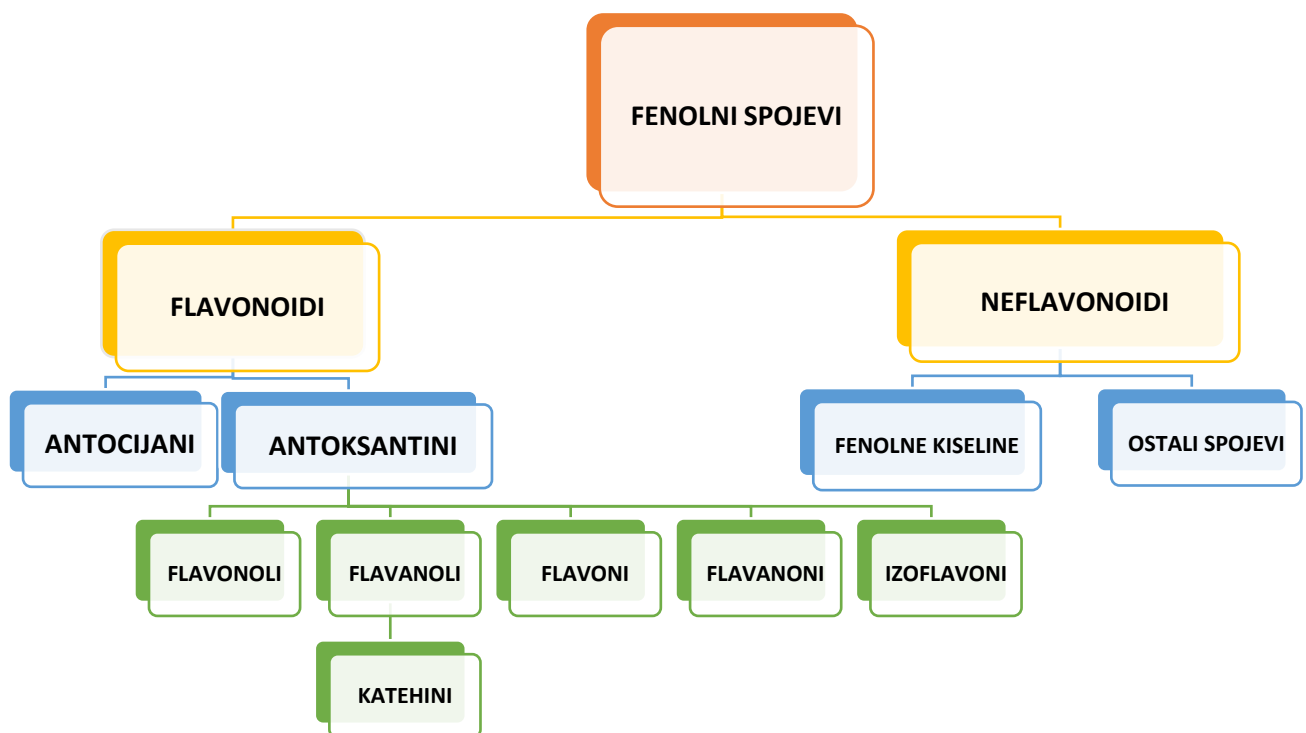




**Slika 1.** Struktura fenola (Anonymus 3, 2018)

Zbog njihove strukturne raznolikosti, postoji velik broj različitih fenolnih spojeva koji se pojavljuju u prirodi, a prema osnovnoj kemijskoj strukturi, prikazanoj na slici 2., se dijele na:

- flavonoide,
- neflavonoide (fenolne kiseline i srodne spojeve).

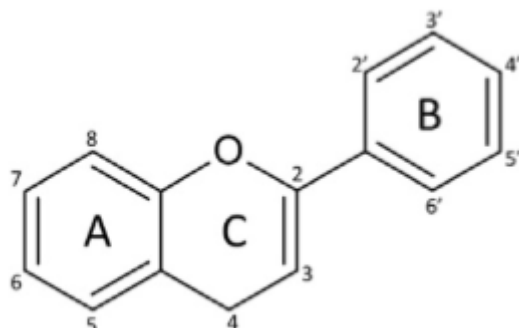


**Slika 2.** Podjela fenolnih spojeva (Ramassamy, 2006)

### 2.2.1.1. Flavonoidi

Flavonoidi čine najveću skupinu fenolnih spojeva. Oni čine više od 6000 spojeva unutar više od 8000 fenolnih spojeva koji su pronađeni u biljkama (Morandi Vuolo i sur., 2019).

Osnovnu strukturu flavonoida, prikazanu na slici 3., čini difenilpropan (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub>) odnosno 1-fenil-3-(2-hidroksifenil)propan-1-ol iz kojeg gubitkom vode i zatvaranjem C-prstena rezultira flavan iz kojeg se izvodi određeni broj osnovnih struktura (Kazazić, 2004).

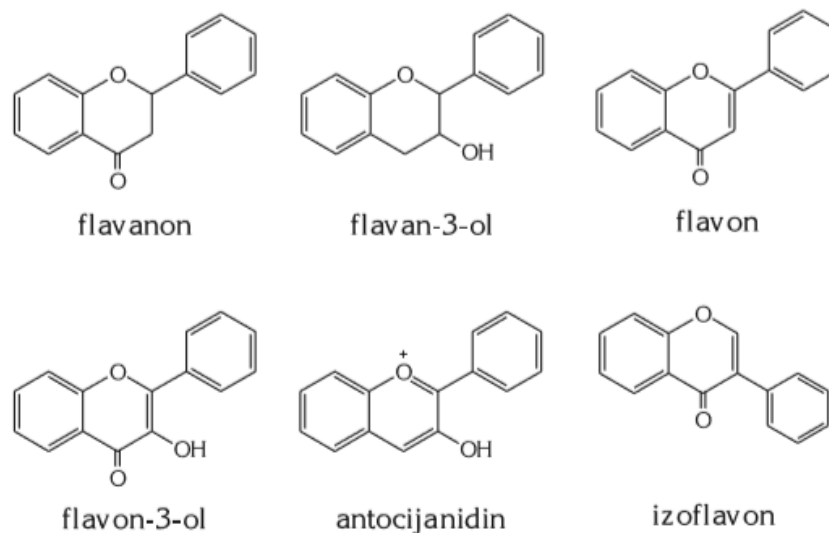


**Slika 3.** Osnovna struktura flavonoida (de la Rosa i sur., 2019)

Ovisno o broju i položaju vezanih hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i stupnju oksidacije centralnog C-prstena flavonoidi se dijele u „razrede“ (slika 4.), kao što su:

- flavonoli,
- flavoni,
- flavanoni,
- flavanoli (katehini),
- izoflavoni,
- flavanonoli i
- antocijanidini (antocijani).

Varijacije A i B prstena dovode do različitih spojeva unutar razreda flavonoida (Morandi Vuolo i sur., 2019).



**Slika 4.** Skupine flavonoida (Kazazić, 2004)

Broj flavonoida prisutnih u voću i povrću može varirati ovisno o sorti, klimatskim uvjetima, dijelu biljke, uzgoju i stupnju zrelosti. Flavonoidi u hrani nisu odgovorni samo za boju, oni također sudjeluju u kreiranju okusa, zaštiti lipidne peroksidacije, enzima i vitaminskih komponenti. Proces kuhanja i prerade može mijenjati sadržaj i udio flavonoida, a i sami uvjeti skladištenja također mogu utjecati na promjenu količine flavonoida u određenoj namirnici (Ferrer i sur., 2008).

Širok raspon različitih bioloških aktivnosti, uključujući antibakterijsko, vazodilacijsko, antiinflamatorno i antikancerogeno djelovanje posredovano različitim mehanizmima, povezano je s flavonoidnim spojevima. Zbog razlika u kemijskoj strukturi, bioraspoloživosti, distribuciji i metabolizmu, različiti flavonoidni spojevi mogu imati različite učinke na ljudsko zdravlje (Knekt i sur., 2002). Međutim, još nije provedeno dovoljno istraživanja kako bi se pripisala određena ljekovita svojstva pojedinim flavonoidnim spojevima.

- Antocijani

Antocijani su najveća skupina biljnih pigmenata topljivih u vodi. Njihova boja se kreće od ružičasto-narančaste preko crvene do ljubičaste i plave, a boja varira s promjenom pH (Sui i sur., 2018). Prisutni su u skoro svim vrstama biljaka i mogu se naći u bilo kojem biljnom tkivu, iako se najčešće nalaze u voću i cvjetovima. Antocijani su široko rasprostranjeni u ljudskoj prehrani putem biljnih namirnica, a često se koriste i kao prirodna bojila.

Budući da pripadaju flavonoidima, antocijani imaju karakterističan ugljični kostur C6-C3-C6. Njihova osnovna struktura se sastoji od aglikona (poznatog kao antocijanidin) izvedenog iz 2-fenil-benzopirilium (flavilijum) kostura različito hidroksiliranog/metoksiliranog (Santos-Buelga i Gonzalez-Paramas, 2018). Antocijanini se razlikuju po broju prisutnih hidroksilnih i/ili metoksi skupina, tipovima, brojevima, mjestima vezanja šećera za molekulu, te vrstama i brojevima alifatskih ili aromatskih kiselina vezanih za šećere u molekula. Najčešći šećeri su glukoza, ramnoza, galaktoza, arabinoza, ksiloza i homogeni ili heterogeni di- i trisaharidi nastali kao glikozidi tih šećera. Kiseline koje su najčešće uključene u acilaciju šećera su aromatske kiseline uključujući p-kumarinsku, kafeinsku, ferulinsku, sinapsinsku, galnu, ili p-hidroksibenzojevu kiselinu, i/ili alifatsku kiselinu, octenu, jabučna, jantarnu kiselinu itd (Damodaran, Parkin i Fennema, 2008). U prirodi je identificirano oko 30 antocijanidina, iako ih je samo 6 visoko rasprostranjeno, s više od 90% antocijanina baziranih na njima; a to su: cijanidin, delfinidin, pelargonidin, petunidin, peonidin i malvidin (Santos-Buelga i Gonzalez-Paramas, 2018).

Antocijani na svom centralnom prstenu imaju pozitivan naboj pa imaju svojstvo iona (flavilijum iona) i po tome se razlikuju od svih ostalih flavonoida, iako su kao polihidroksi spojevi veoma slični flavonolima.

Poznati su kao prirodni antioksidansi zbog svoje sposobnosti doniranja protona visoko reaktivnim slobodnim radikalima. U biljkama antocijani djeluju kao fotoprotektanti, koji štite biljke od slobodnih radikala nastalih tijekom procesa fotosinteze. Antioksidacijskoj aktivnosti antocijana pridonosi njihova kemijska struktura: broj i organizacija fenilnih skupina, dostupnost elektronsko-donirajućih i elektron-povlačećih skupina u strukturi prstena, stupanj strukturne konjugacije i pozitivni naboj antocijana. Antocijani sprječavaju daljnju generaciju radikala i štite stanice od oksidativnog oštećenja koje je često povezano sa starenjem i raznim bolestima uzrokovanim oksidativnim stresom (Sui i sur., 2018).

Zbog svoje visoke antioksidacijske aktivnosti i protuupalnog djelovanja, antioksidansi imaju mnoge pozitivne učinke na zdravlje.

Faktori koji utječu na stabilnost antocijana su:

- pH vrijednost,
- prisustvo kisika,
- svjetlost,
- povišena temperatura,
- sumporni dioksid,
- askorbinska kiselina i vodikov peroksid,
- ionizirajuće zračenje,
- ioni metala,
- šećeri i produkti njihove razgradnje (Santos-Buelga i Gonzalez-Paramas, 2018).

#### *2.2.1.2. Neflavonoidi*

Neflavonoidi su spojevi jednostavnije građe od one flavonoida i u ovu skupinu fenolnih spojeva ubrajamo: fenolne kiseline, stilbene i lignane. Postoje i neki spojevi sa složenim kemijskim strukturama i visokim molekularnim težinama.

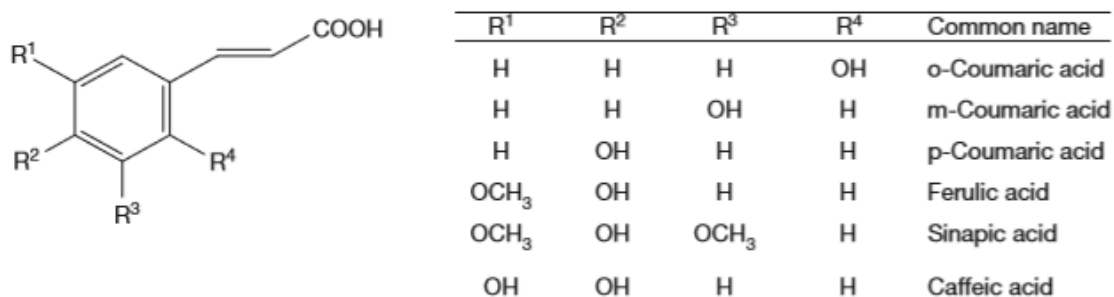
Najvažnija skupina neflavonoida u voću i povrću su fenolne kiseline, koje sadrže jednu fenilnu skupinu supstituiranu s jednom karboksilnom skupinom i jednom ili više hidroksilnih skupina. Fenolne kiseline mogu se dalje podijeliti na:

- hidroksibenzojeve kiseline (C6-C1),
- hidroksicimetne kiseline (C6-C3), te
- njihove derivate.

Međusobno se razlikuju po duljini lanca koji sadrži karboksilnu skupinu (de la Rosa i sur., 2019), a razlike u strukturi između pojedinih hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina posljedica su stupnja hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena (Macheix i sur., 1990).

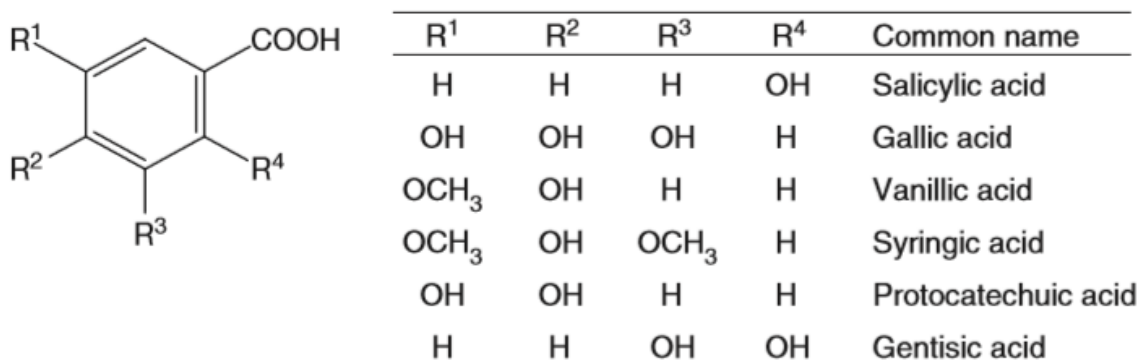
Pojedini pripadnici ove skupine spojeva se nalaze u namirnicama te se smatraju izuzetno važnim za ljudsko zdravlje. Među njima spoj resveratrol je stilben koji je karakterističan za grožđe i crno vino; elaginska kiselina i njezini derivati koji se nalaze u bobičastom voću, npr. jagode i maline, te u kožici različitih orašastih plodova (Tsao, 2010).

Glavne hidroksicimetne kiseline su, prikazane na slici 5., su: p-kumarinska kiselina (4-hidroksicimetna), kafeinska (3,4-dihidroksicimetna), ferulinska (4-hidroksi-3-metoksicimetna) i sinapinska (3,5-dimetoksi-4-hidroksicimetna) kiselina.



**Slika 5.** Najčešće hidroksicimetne kiseline prisutne u hrani (Murkovic, 2016)

Glavne hidroksibenzojeve kiseline, prikazane na slici 6., su: galna, p-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska, protokatehinska, elaginska, salicilna kiselina.

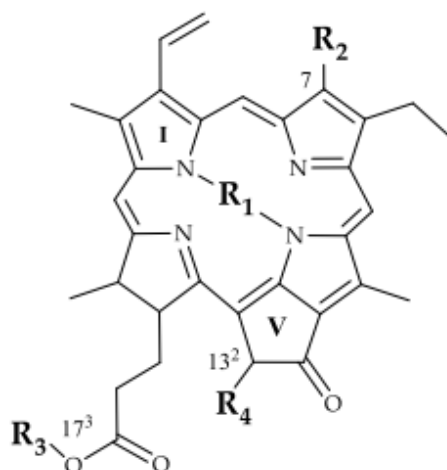


**Slika 6.** Najčešće hidroksibenzojeve kiseline prisutne u hrani (Murkovic, 2016)

### 2.2.2. Klorofil

Klorofil je prirodni zeleni pigment koji se nalazi u fotosintetskim organizmima kao što su biljke i alge. Najčešće se nalazi u kloroplastima, i odgovoran je za proces fotosinteze. Uz sunčevu energiju, ugljikov dioksid i vodu stvara kisik i jednostavni šećer (glukozu). Klorofil ima vrlo važnu ulogu u prehrani ljudi, budući da se konzumira kao dio voća i povrća (Yilmaz i Gökmen, 2016).

Osnovna kemijska struktura klorofila (slika 7.) je ciklički tetrapiol. Četiri pirola, od kojih svaki sadrži četiri ugljika i jedan dušik, su međusobno povezana na ugljikovim atomima preko jednog ugljičnog mosta. Četiri dušika su okrenuta prema unutra, stvarajući rupu koja je idealna za vezanje metalnih iona. U klorofilima, ovaj središnji metal je gotovo uvijek magnezij (Mg) (Scheer, 2013).



**Slika 7.** Osnovna struktura molekule klorofila (Viera i sur., 2019)

U prirodi je poznato pet vrsta klorofila, poznatih kao klorofil a, b, c, d i e. Osim tih pet vrsta, posljednjih godina je identificiran i klorofil f (Yilmaz i Gökmen, 2016). Najzastupljeniji klorofili u biljaka su klorofil a i b, dok su klorofil c, d i f pronađeni u određenim mikroalgama, algama i kod nekoliko vrsta fotosintetskih bakterija (Queiroz Zepka i sur., 2019).

Molekula klorofila je jako nestabilna, a njena stabilnost uvelike ovisi o uvjetima skladištenja i obrade biljaka kao što su pH, temperatura, kisik, metali i enzimi (Yilmaz i Gökmen, 2016).

Posljednjih godina, uvelike se istražuju bioaktivna svojstva klorofila i njihov utjecaj na zdravlje ljudi. Takva bioaktivna svojstva koja se pripisuju klorofilu i njegovim katabolitima se sastoje od prevencije raka, antioksidacijskih i antimutagenih aktivnosti, hvatanja mutagena, modulacije metabolizma ksenobiotika, indukcije apoptoze, antimikrobnih svojstava i antinflatorne aktivnosti. Međutim, potrebno je provesti još istraživanja kako bi se sa sigurnošću mogla utvrditi povezanost konzumacije klorofila sa navedenim svojstvima (Queiroz Zepka i sur., 2019).

### 2.2.3. Karotenoidi

Karotenoidi su skupina žutih, narančastih i crvenih pigmentnih spojeva koje sintetiziraju biljke i mikroorganizmi (Rao i Rao, 2007). Iako u puno manjoj mjeri nego klorofili, također pridonose procesu fotosinteze, ali nisu ograničeni samo na fotosintetske organizme. Rašireniji su te strukturno i funkcionalno raznovrsniji od klorofila. Trenutno je poznato više od 800 prirodnih karotenoida (Scheer, 2013), a voće i povrće je najvažniji izvor karotenoida u ljudskoj prehrani (Rao i Rao, 2007).

Kemijski, većina karotenoida su tetraterpeni: dvije C<sub>20</sub> jedinice (izvorno geranil-geraniol) spojene rep-na-rep na lanac od 32 ugljikova atoma koji nose osam bočnih metil lanaca. Često, ovaj osnovni ugljikov C<sub>40</sub> kostur je zadržan ili malo izmijenjen, na primjer ciklizacijom na jednom ili oba kraja (Scheer, 2013).

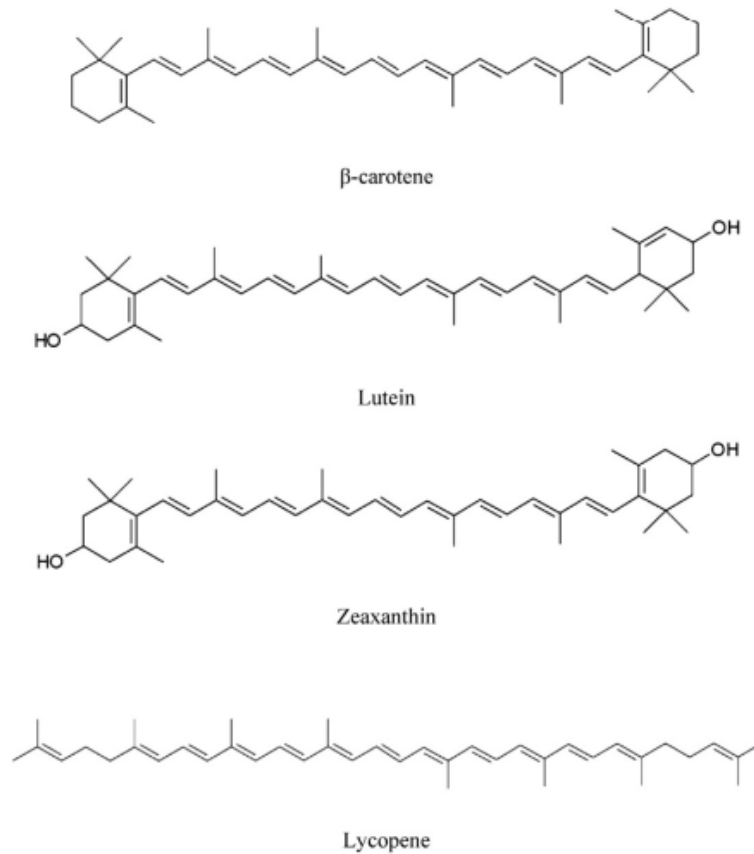
Na osnovu strukture, karotenoidi se dijele u dvije skupine:

- karoteni i
- ksantofili.

Različite strukture karotenoida, prirodno posjeduju i različita fizikalna, kemijska i funkcionalna svojstva kao i različitu stabilnost.

Najzastupljeniji karotenoidi u ljudskoj prehrani su (slika 8.):  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten, likopen, lutein i zeaksantin (Ngamwonglumlert i Devahastin, 2018).





**Slika 8.** Kemijske strukture najčešćih karotenoida u hrani (Ngamwonglumlert i Devahastin, 2018)

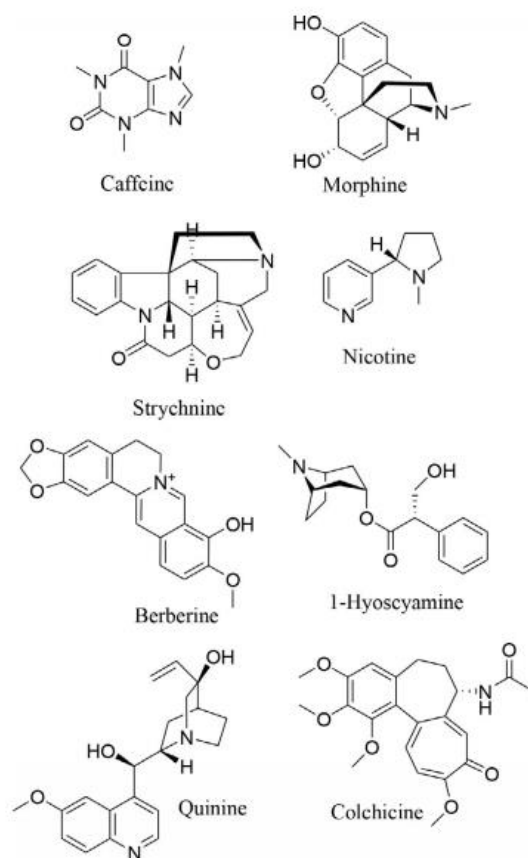
Karotenoidi imaju dosta korisnih funkcija. Oni, na primjer pomažu u privlačenju insekata oprašivača na cvijeće, ukazuju na zrelost voća, apsorbiraju vidljivu svjetlost u fotosintezi i sprječavaju oštećenja stanica inducirana svjetlošću u slučajevima fotosintetskih biljaka, algi i bakterija (Lerfall, 2016). Također su bitni za ljudsko zdravlje. Na primjer, lutein i zeaksantin u ljudskim očima odgovorni su za filtriranje visokonaponskih valnih duljina plavog svjetla, što dovodi do smanjenja oksidacijskog stresa na mrežnici (Roberts i sur., 2009). Karotenoidi imaju i antioksidacijska svojstva, što im je i najjače bioaktivno svojstvo, te mogu posredovati u regulaciji rasta stanica, moduliranju ekspresije gena itd. Između ostalog mogu djelovati antikancerogeno, spriječiti kardiovaskularna oboljenja, suzbiti osteoporozu, smanjiti krvni pritisak, spriječiti neplodnost kod muškaraca, te spriječiti neurodegenerativna oboljenja uključujući Alzheimerovu bolest (Rao i Rao, 2007).

#### 2.2.4. Alkaloidi

Alkaloidi su ciklički organski spojevi s dušikom, uglavnom biljnog podrijetla. Većina alkaloida je biosintetski izvedena iz aminokiselina kao što su fenilalanin, tirozin, triptofan, ornitin i lizin. Alkaloidi predstavljaju široku paletu kemijskih struktura. Poznato je oko 20.000 alkaloida, od kojih je većina izolirana iz biljaka. Ali alkaloidi su također pronađeni u mikroorganizmima, morskim organizmima kao što su alge, dinoflagelati i u kopnenim životinjama kao što su insekti, salamanderi i žabe (Coqueiro i Verpoorte, 2015).

Alkaloidi se najčešće u biljkama nalaze u obliku soli, rijetko kao slobodne baze. Uglavnom su vezani za kiseline (nespecifične: jabučna, vinska, limunska ili specifične: mekonska, akonitinska, helidonska) u obliku hidrosolubilnih soli. Međutim, neki alkaloidi (kao npr. kofein, hinin) vezani su za tanine u obliku nerastvorljivih tanata.

Često se klasificiraju prema molekularnom kosturu, na primjer, dvije najveće skupine su indol alkaloidi i izokinolinski alkaloidi (svaki više od 4000 spojeva). Druge važne skupine su tropanski alkaloidi (300 spojeva), steroidni alkaloidi (450 spojeva), piridinski (250 spojeva) i pirolizidinski alkaloidi (570 spojeva) (Coqueiro i Verpoorte, 2015). Strukture nekih alkaloida su prikazane na slici 9.



**Slika 9.** Kemijska struktura nekih vrsta alkaloida (Coqueiro i Verpoorte, 2015)

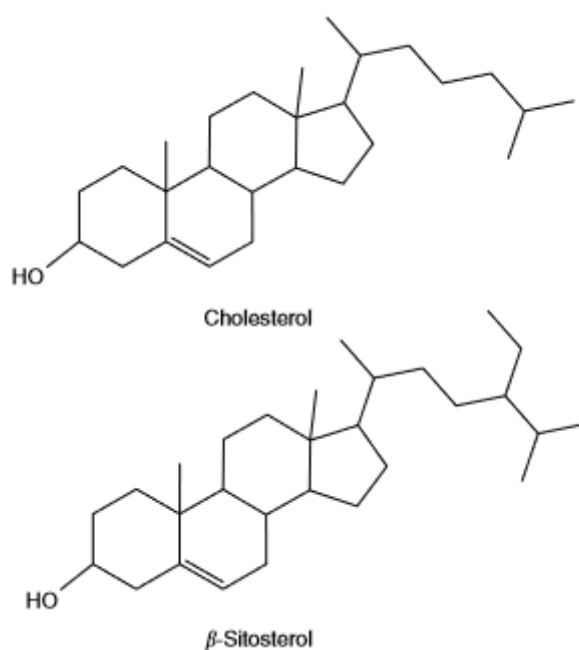
Alkaloidi su supstance poznate po svojoj biološkoj aktivnosti čak od početaka svjetske civilizacije. Koristili su se u tradicionalnoj biljnoj medicini pri liječenju različitih bolesti, te kao toksini u oružju tijekom plemenskih ratova i lova. I dan danas se rade istraživanja na temu biološke aktivnosti alkaloida (Zhao i sur., 2019), a oni se mogu okarakterizirati kao najkorisniji i najopasniji proizvodi prirode (Aniszewski, 2015).

Mnogi alkaloidi imaju jake biološke aktivnosti kod ljudi. To se djelomično može objasniti strukturalnim odnosom s važnim signalnim spojevima (neurotransmiterima) kao što su dopamin, acetilkolin, noradrenalin i serotonin. Činjenica da su alkaloidi topljivi u vodi pod kiselim uvjetima i topljivi u lipidima pod neutralnim i bazičnim uvjetima daju im jedinstvena svojstva za medicinsku uporabu, jer se mogu transportirati u protoniziranom obliku i mogu prelaziti membrane u neutralnom obliku. Zapravo, većina sintetskih lijekova sadrži jedan ili više tercijarnih dušika. Brojni alkaloidi imaju komercijalni interes kao lijekovi ili kao oruđe u farmakološkim studijama. Koriste se i čisti spojevi i biljke (ili njihovi ekstrakti) koji sadrže alkaloide. Nadalje, neki alkaloidi su široko rasprostranjeni kao droga (npr. meskalin, kokain, psilocibin, psilocin, morfij i njegov polusintetički derivat heroin), kao doping spojevi (npr.

strijnin, efedrin, kofein), i kao otrovi (npr. strijnin, pirolizidin alkaloidi, konin, nikotin, tetrodotoksin). Prema tome, metode za određivanje alkaloida mogu se naći u sasvim različitim kontekstima, uglavnom ovisnim o matricama u kojima se nalaze alkaloidi (Coqueiro i Verpoorte, 2015).

### 2.2.5. Steroli

Steroli su derivati steroida. Svi ti nepolarni lipidi se sastoje od tri prstena sa šest ugljika i pet ugljikovih prstena vezanih za alifatski lanac. Steroli imaju hidroksilnu skupinu vezanu za ugljik 3 prstena A. Nalaze se u biljakama (fitosteroli) i životinjama (zoosteroli). Glavni sterol koji se nalazi u životinjskim lipidima je kolesterol. Za razliku od životinjskih, biljni lipidi sadrže brojne sterole s prevladavajućim  $\beta$ -sitosterolom i stigmasterolom (Damodaran, Parkin i Fennema, 2008). Kemijska struktura kolesterola i  $\beta$ -sitosterola je prikazana na slici 9.



**Slika 10.** Kemijska struktura važnijih sterola u hrani (Damodaran, Parkin i Fennema, 2008)

Kolesterol ima više uloga u organizmu, i pozitivnih i negativnih. Pozitivna je to što rast stanica sisavaca ovisi o razini kolesterola u staničnoj membrani. Bez kolesterola, stanice sisavaca ne mogu rasti. Zbog njegove važnosti, mnoge stanice, kojima je za rast potreban kolesterol, ga same sintetiziraju kako bi zadovoljile svoje specifične molekularne potrebe. Međutim, kolesterol također ima ulogu koja je smrtonosna za sisavce, osobito za ljude. Visoke razine

serumskog kolesterola, osobito u obliku cirkulirajućih lipoproteina niske gustoće, mogu dovesti do razvoja aterosklerotskih plakova na stijenkama arterija. Kada ti plakovi začepi koronarne arterije koje hrane srčane mišiće, neki srčani mišići odumiru kao posljedica. To dovodi do infarkta miokarda ili srčanog udara, što može uzrokovati smrt (Yeagle, 2016).

Fitosteroli, kao i kolesterol, imaju vrlo važnu ulogu u strukturi i funkcijama stanične membrane. Oni reguliraju fluidnost membrane i vjerojatno imaju ulogu u adaptaciji membrane na temperaturu. Fitosteroli također, imaju ulogu u staničnoj diferencijaciji i proliferaciji. Međutim, najvažnija uloga biljnih sterola je snižavanje razine serumskog kolesterola, kako ne bi došlo do štetnih posljedica u organizmu (Piironen i sur., 2000).

## **2.3. BOROVNICA**

### 2.3.1. Botanička obilježja i uzgoj

Borovnica je bobičasto voće koje botanički pripada porodici *Ericaceae*, rod *Vaccinium* (Anonymus 4, 2000). Razlikujemo:

- šumsku ili samoniklu borovnicu, odnosno običnu borovnicu (*Vaccinium myrtillus*) čiji se plodovi skupljaju u šumi, i
- američku borovnicu (*Vaccinium corymbosum*) koja se uzgaja kao kultivirana voćka i od koje je do danas oplemenjivanjem izdvojen velik broj gospodarski vrijednih sorti.

Rod *Vaccinium*, broji oko 130 vrsta. Kod nas je najpoznatija vrsta *Vaccinium myrtillus* L. poznata pod imenom obična ili šumska borovnica.

Obična ili divlja borovnica (*Vaccinium myrtillus* L.) je višegodišnji grm, prosječne visine 35-60 cm. Raste u crnogoričnim šumama, močvarama i livadama sjeverne Europe i Amerike, ali je prisutna i u Aziji. Cvjeta od travnja do lipnja, proizvodeći okruglo plavo/crno voće (promjera 5-9 mm) s mnogo sjemenki koje dozrijeva od srpnja do rujna. (Nabavi, 2018). Razvoj plodova obično traje od 8 do 10 tjedana od cvatnje, varirajući između godina, a faza zrenja traje 2-3 tjedna tijekom kojih je akumulacija antocijaninskih pigmenta brza. Omekšavanje tkiva i nakupljanje okusnih spojeva i aromatičnih hlapljivih tvari javljaju se u isto vrijeme kada i druge karakteristike povezane s dozrijevanjem (Simmonds, 2016). Na slici 11. je prikazan plod divlje borovnice.



**Slika 11.** Divlja (obična) borovnica (*Vaccinium myrtillus* L.) (Zoratti i sur., 2015)

Engleski naziv borovnice, blueberry, potječe od intezivne plave boje plodova, i dolazi od danske riječi "bollebar" što u prijevodu znači tamna bobica (Nabavi, 2018).

### 2.3.2. Kemijski sastav

Kemijski sastav borovnice u velikoj mjeri ovisi o okolišnim uvjetima, stupnjem zrelosti, kao i uvjetima skladištenja. Veliki utjecaj na okus, miris i boju ima kemijski sastav divlje borovnice, u kojem prevladava voda s 85,48 g/100 g i ugljikohidrati s 12,31 g/100 g (USDA, 2019). Zbog navedenog, energetska vrijednost borovnica je jako niska – 61 kcal/100 g, odnosno 255 kJ/100 g. Od ukupno 12,31% ugljikohidrata, 2,6 g je prehrambenih vlakana, koji smanjuju razinu kolesterola i glukoze u krvi, bitno utječući tako na ljudsko zdravlje. Zahvaljujući prisutnim vlaknima, borovnica izaziva efekt sitosti i pozitivno se utječe na probavu smanjujući tako rizik od crijevnih bolesti.

U tablici 1. je prikazan kemijski sastav 100 g svježe divlje borovnice (USDA 2019).

**Tablica 1.** Kemijski sastav 100 g svježe divlje/obične borovnice (USDA, 2019)

| SASTAV                    | JEDINICA | VRIJEDNOST    |
|---------------------------|----------|---------------|
| <b>Energija</b>           | kcal/kJ  | <b>61/255</b> |
| <b>Voda</b>               | g        | <b>85,48</b>  |
| <b>Ugljikohidrati</b>     | g        | <b>12,31</b>  |
| <b>Prehrambena vlakna</b> | g        | <b>2,6</b>    |
| <b>Šećeri</b>             | g        | <b>6,46</b>   |
| <b>Proteini</b>           | g        | <b>1,22</b>   |
| <b>Ukupni lipidi</b>      | g        | <b>0,76</b>   |

U tablici 2. su dani rezultati sastava vitamina ploda divlje borovnice (USDA, 2019), a vidljivo je da u plodu borovnice dominira vitamin C (askorbinska kiselina).

**Tablica 2.** Vitamini ploda svježe divlje/obične borovnice (USDA, 2019)

| SASTAV                           | JEDINICA | VRIJEDNOST   |
|----------------------------------|----------|--------------|
| <b>Askorbinska kiselina (C)</b>  | mg       | <b>18,3</b>  |
| <b>Niacin (B3)</b>               | mg       | <b>0,597</b> |
| <b>Riboflavin (B2)</b>           | mg       | <b>0,414</b> |
| <b>Tiamin (B1)</b>               | mg       | <b>0,067</b> |
| <b>Pantotenska kiselina (B5)</b> | mg       | <b>0,265</b> |
| <b>Piridoksin (B6)</b>           | mg       | <b>0,026</b> |
| <b>Folati (B9)</b>               | µg       | <b>33</b>    |
| <b>Kobalamin (B12)</b>           | µg       | <b>0</b>     |
| <b>Vitamin A</b>                 | µg       | <b>6</b>     |
| <b>Vitamin E</b>                 | µg       | <b>1,69</b>  |
| <b>Vitamin D</b>                 | µg       | <b>0</b>     |
| <b>Vitamin K</b>                 | µg       | <b>17,2</b>  |

Plod borovnice također sadrži i mineralne tvari, čija je uloga u ljudskoj prehrani vrlo važna, budući da čine neophodne strukturne komponente, sudjeluju u različitim enzimskim sustavima, učestvuju u ravnoteži tekućine, u staničnoj funkciji, neurotransmisiji i u mnogim metaboličkim procesima. Od mineralnih tvari potrebnih ljudskom organizmu razlikuju se: makroelementi, mikroelementi ili elementi u tragu. U tablici 3. su prikazane koncentracije pojedinih mineralnih tvari u plodu svježe obične borovnice (USDA, 2019). Makroelementi prisutni u plodu borovnice su: natrij, kalij, kalcij, magnezij i fosfor, a mikroelementi: željezo, cink, bakar i mangan. Međutim vidljive su jako velike razlike u koncentracijama pojedinih mineralnih tvari. Cu, Zn, Fe su prisutni u koncentracijama 0,03 – 0,37 mg/100 g, dok najveću koncentraciju ima K, 75 mg/100 g.

**Tablica 3.** Minerali ploda divlje/obične borovnice (USDA, 2019)

| SASTAV              | JEDINICA | VRIJEDNOST |
|---------------------|----------|------------|
| <b>Kalcij, Ca</b>   | mg       | 13         |
| <b>Željezo, Fe</b>  | mg       | 0,37       |
| <b>Magnezij, Mg</b> | mg       | 7          |
| <b>Fosfor, P</b>    | mg       | 29         |
| <b>Kalij, K</b>     | mg       | 75         |
| <b>Natrij, Na</b>   | mg       | 6          |
| <b>Cink, Zu</b>     | mg       | 0,2        |
| <b>Bakar, Cu</b>    | mg       | 0,03       |
| <b>Mangan, Mn</b>   | mg       | 2          |

Uz spomenuti vitamin C, kalij, fosfor i ostale tvari kojima je bogata borovnica, važno je napomenuti kako je borovnica izvrstan izvor antocijana i drugih flavonoida (Prior i sur., 1998), koji joj daju antioksidacijska svojstva.

Zbog velike količine prisutnih vitamina, minerala, vlakana i antioksidansa, plod borovnice ima mnoga ljekovita svojstva (Prior i sur., 1998).



### 2.3.3. Utjecaj borovnice na ljudsko zdravlje

Borovnica se oduvijek koristi u ljudskoj prehrani i dokazi o njenoj upotrebi sežu u daleku prošlost (prije Srednjeg Vijeka). Borovnice se konzumiraju i komercijalno su dostupne gotovo isključivo kao bobice (svježe, smrznute i sušene), kao i u obliku industrijskih proizvoda (konzerve, sokovi i koncentрати) ili za proizvodnju sirupa, pita, pića i kolača. Umjesto toga, lišće se koristi uglavnom u pripremi ukrasa i proizvodnji čaja (Smeriglio i sur., 2018).

Posljednjih godina brojne studije su dokazale zdravstvene prednosti borovnica i drugih vrsta roda *Vaccinium* (Simmonds, 2016). Zdravstvene koristi bobičastog voća postale su široko prihvaćene nakon izvješća o najvećoj antioksidacijskoj aktivnosti povezanoj s visokim sadržajem fenolnih spojeva, osobito u *Vaccinium* bobicama, u usporedbi s drugim vrstama voća i povrća (Prior i sur., 1998). Za ove spojeve je navedeno da posjeduju različite zdravstveno korisne aktivnosti, uključujući antioksidacijske, antimutagene, antikarcinogene, protuupalne, antiproliferativne i antimikrobne učinke (Landete, 2012).

Borovnice su odličan izvor vitamina C, bioflavonoida, folne kiseline, kalija, kalcija i željeza. Također, imaju i visok postotak vlakana zbog čega pozitivno utječu na kvalitetnu probavu, smanjujući rizik od crijevnih bolesti. Zahvaljujući vlaknima, korisne su pri dijetama za mršavljenje, jer stvaraju osjećaj sitosti. Izuzetno su korisne za jačanje krvnih žila (Dujmović Purgar i sur., 2007).

Zbog visokog udjela antioksidanasa, borovnice su izvrsne za njegu kože. Ovi mali antioksidacijski pokretači doprinose zdravlju kolagenog matriksa neutralizirajući enzime koji uništavaju vezivno tkivo i uklanjajući slobodne radikale. Kao posljedica toga, borovnice su izvrsne za sprječavanje nastanka bora i starenja kože, kao i pri anticelulitnoj prehrani. Zahvaljujući antocijaninima i drugim antioksidansima koje sadrže, borovnice također sprječavaju nastanak modrica i ubrzavaju njihovo zacjeljivanje (Anonymus 5, 2019).

Osim što se koriste kao hrana, borovnice se široko koriste za poboljšanje vida i smanjenje propusnosti krvnih žila i krhkosti kapilara. Osim toga, imaju nekoliko blagotvornih učinaka na ljudsko zdravlje, iako je najveći interes bio usmjeren na antioksidacijske učinke vezane uz sadržaj antocijana (Nabavi, 2018).

Ljekovita svojstva ne pokazuje samo plod borovnice, već i listovi. Oni su također bogati fenolnim spojevima (Cyboran i sur., 2013). Ehlenfeldt i Prior (2001) navode da je udio fenolnih

spojeva i ukupnih antioksidanasa čak veći u listovima nego u plodu borovnice (Martz i sur., 2010). Listovi borovnice sadrže i tanine, hlapljive tvari i druge spojeve za koje se zna da imaju povoljne učinke na ljudsko zdravlje. Dokazana je njihova uloga u prevenciji pojave mreene, preranog starenja i anemije (Seeram i sur., 2006). Analitička ispitivanja pokazuju da listovi *Vaccinium myrtillus* L. sadrže mnogo manje antocijanidina nego plodovi, ali su jednako bogati drugim bioaktivnim spojevima, među kojima su i hidroksicimetne kiseline (Riihinen, 2008). Također pokazalo se da tvari koje se nalaze u lišću borovnice ne liječe dijabetes (Helmstädter i Schuster, 2010), ali pomažu pri liječenju, snižavajući koncentraciju lipida (Cignarella i sur., 1996).

Iako postoje mnoge studije koje su istraživale zdravstvene učinke ekstrakta borovnice i njenih derivata, još uvijek nedostaju dobro osmišljeni pokusi u kojima se koriste standardizirani ekstrakti borovnice. U svjetlu toga, neophodno je povećati kliničke studije kako bi se u potpunosti dokazala ljekovita svojstva borovnice (Nabavi, 2018).

## **2.4. BIOAKTIVNE TVARI BOROVNICE**

Sadržaj bioaktivnih tvari u običnoj borovnici ovisi o nizu faktora, kao što su klimatski uvjeti, stupanj zrelosti, uvjeti i mjesto uzgoja, postupak obrade i skladištenja (Đilas i sur., 2010). Poznato je da borovnica sadrži jako puno bioaktivnih tvari, koje imaju pozitivne zdravstvene učinke. Zbog toga su tijekom godina provedena mnoga životinjska, klinička i fitokemijska istraživanja na tu temu (Helmstädter i Schuster, 2010).

Ta istraživanja (Baj i sur., 1983; Puupponen-Pimiä i sur., 2005; Dragović-Uzelac i sur., 2010; Saral i sur., 2015; Okan i sur., 2018; Ayaz i sur., 2005; Bunea i sur., 2012) su pokazala prisutnost fenolnih spojeva kao što su flavonoidi i fenolne kiseline, karotenoida, i mnogih drugih spojeva. Većina tih spojeva posjeduje i antioksidacijska svojstva, koja su također bila predmet znanstvenih istraživanja.

### **2.4.1. Fenolni spojevi**

Borovnice se smatraju bogatim izvorom fenolnih spojeva, te zbog toga imaju vrlo visoku antioksidacijsku aktivnost (Prior i sur., 1998). Plodovi borovnice sadrže različite fenolne spojeve, poput: antocijana, proantocijanidina, fenolnih kiselina, flavanola, flavonol glikozida

itd (Ayaz i sur., 2005). Od fenolnih spojeva koji su pronađeni u borovnici određeni su različiti glikozidi cijanidina, peonidina, petunidina i malvidina i to -3-galaktozidi, -3-arabinozidi te -3-glukozidi (Prior i sur., 2001; Gu i sur., 2002). Antocijani u borovnicama predstavljaju jednu od najvažnijih skupina, jer čine čak 90% od ukupnih fenola u njima, pa je provedeno mnogo istraživanja na tu temu (Gao i Mazza, 1994; Može i sur., 2011; Veberic i sur., 2015). Obična borovnica sadrži antocijanine u kožici ali i u mesu, zbog čega ima značajno veće količine antocijanina u odnosu na druge vrste roda *Vaccinium* (Riihinen i sur, 2008). Prvo i najopsežnije istraživanje na tu temu su uradili Baj i sur. (1983), koji su identificirali da borovnica sadrži 15 antocijana: malvidin 3-galaktozid, delfinidin 3-galaktozid, delfinidin 3-arabinozid, petunidin 3-galaktozid, petunidin 3-arabinozid, malvidin 3-arabinozid, cijanidin 3-glukozid, cijanidin 3-galaktozid, cijanidin 3-arabinozid, delfinidin 3-glukozid, malvidin 3-glukozid, peonidin 3-glukozid, peonidin 3-galaktozid, peonidin 3-arabinozid i peonidin 3-glukozid.

Također, znanstvena istraživanja ukazuju da borovnice sadrže i fenolne kiseline u značajnim količinama (Azar i sur., 1987; Brasanac-Vukanovic i sur., 2018), a najzastupljenije su hidroksicimetne kiseline i njihovi derivati: kafeinska (3,4-dihidroksicimetna), p-kumarinska, ferulinska kiselina i klorogenska kiselina. Od hidroksibenzojevih kiselina najzastupljenija je galna kiselina (Azar i sur., 1987). Azar i sur. (1987) su u borovnici pronašli i flavanol glikozide: kvercetin, izokvercetin, hiperin i astragalin (Shahidi i Nacz, 2004). Uz katehin, miricetin i kvercetin Sellappan i sur. (2002) odredili su i kamferol.

Utvrdeno je da plodovi borovnice sadrže i strukturno kompleksnije fenolne spojeve kao što su oligomerni procijanidini B skupine, počevši od dimera do oktamera (Prior i sur., 2001). Procijanidini ili kondenzirani tanini značajni su predstavnici fenola koji su nositelji trpkog okusa, ali imaju i izrazitu značajnu biološku aktivnost, koja još nije dovoljno ispitana (Santos-Buelga i Scalbert, 2000).

Boja borovnice povezana je sa količinom polifenola, flavonoida, antocijana. Pokožica u odnosu na pulpu sadrži više fenolnih spojeva i na taj način više pridonosi antioksidacijskom kapacitetu (Sellappan i sur., 2002).

Tijekom prerade, koncentracija fenolnih spojeva u borovnici se smanjuje, jer dolazi do njihove razgradnje. Preradom dolazi do ekstrakcije fenolnih spojeva iz vakuola stanica u okolni medij u kojem egzistiraju brojni enzimi, a poznato je da su neki fenolni spojevi (katehini, fenolne kiseline i sl.) dobri supstrati za enzim polifenoloksidazu (PPO). PPO u reakciji s fenolnim spojevima, a u prisutnosti kisika katalizira reakcije enzimskog posmeđivanja čime se narušava

kvaliteta bilo svježih plodova bilo prerađevina. Fenolni spojevi u prisutnosti kisika i enzima polifenoloksidaze (PPO) prelaze u različite kinonske oblike koji polimeriziraju u nespecifične melanoidne pigmente, žute ili smeđe boje (Sellappan i sur., 2002).

#### 2.4.2. Karotenoidi

Borovnica sadrži visoke udjele karotenoida, osobito luteina, što je i prikazano u studiji o pružanju zaštite zdravlja očiju (Grover i Samson, 2013). Bunea i suradnici (2012) su analizirali udio i sastav karotenoida kod dvije vrste divljih i tri vrste kultiviranih borovnica. U obje vrste divljih borovnica su identificirani lutein,  $\beta$ -kriptoksantin i  $\beta$ -karoten. Sadržaj svih kao i ukupni karotenoidi je bio veći kod divljih u odnosu na kultivirane vrste. Ukupni sadržaj karotenoida u svim uzorcima bio je u rasponu od 215–317  $\mu\text{g}$  na 100 g voća. Osim ove studije, postoji još mali ali ograničeni broj studija o karotenoidima u borovnici, koji pokazuju slične podatke, 290  $\mu\text{g}$  na 100 g voća (Marinova i Ribarova, 2007).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

Za istraživanje su korišteni plodovi šumske ili divlje (obične) borovnice (*Vaccinium myrtillus* L). Analizirano je 35 uzoraka sa 7 različitih lokacija u Primorsko-goranskoj županiji. Uzorci su prikupljeni u periodu od 20. lipnja do 13. srpnja 2018. godine, a na svakoj lokaciji je sa površine 1m<sup>2</sup> ubrano oko 50 g svježih borovnica. Uzorci su označeni brojevima 1-35, a lokacije s kojih su ubrani uzorci su prikazane u tablici 4.

**Tablica 4.** Lokacije ubranih uzoraka divlje borovnice

| REDNI BROJ UZORKA | LOKACIJA                                      |
|-------------------|---|
| 1.-5.             | Šumarija Vrbovsko - „Jelenski jarak“          |
| 6.-10.            | Šumarija Vrbovsko - „Željezni most“ („Macan“) |
| 11.-15.           | Šumarija Skrad - „Bukov vrh“                  |
| 16.-20.           | Šumarija Ravna gora - „Javorova kosa“         |
| 21.-25.           | Šumarija Mrkopalj - „Tuk Mrkopaljski“         |
| 26.-30.           | Šumarija Mrkopalj - „Matić poljana“           |
| 31.-35.           | Šumarija Mrkopalj - „Begovo razdolje“         |

Nakon branja plodovi su dopremljeni u Laboratorij, te su pakirani u polietilenske vrećice, debljine 45 µm te su zamrznuti i skladišteni na temperaturi od -20 °C do početka analize.

Na svih 35 uzoraka su provedene analize:

- određivanje ukupnih antocijana pH-diferencijalnom metodom, te
- određivanje antioksidacijske aktivnosti pomoću dviju metoda, DPPH i FRAP.

### 3.1.1. Priprema otopina

*Otopina 2% HCl:* U odmjernoj tikvici od 500 mL razrijeđeno je 27 mL 37% HCl-a s destiliranom vodom i čuvano je između analiza na sobnoj temperaturi.

*Otapalo za ekstrakciju MeOH/2% HCl (95:5):* U odmjernoj tikvici od 1000 mL odpipetirano je 50 mL 2% HCl te nadopunjeno metanolom do oznake.

### 3.1.2. Priprema uzoraka borovnice

Uzorci borovnice odmrznuti su neposredno prije provođenja analiza pri sobnoj temperaturi. Nakon odmrzavanja plodovi su homogenizirani štapnim mikserom u laboratorijskim čašama. Zatim su pomoću špatule uzorci preneseni u plastične, zatvorene sterilne posudice, koje su označene brojem uzorka. Te posudice su skladištene u hladnjaku za vrijeme trajanja eksperimentalnog dijela.

Uzorci za analizu su pripremljeni odvagom oko 6,0000 g homogeniziranog uzorka u Erlenmeyerovu tikvicu od 300 mL. Dodano je 20 mL otapala za ekstrakciju (MeOH/2% HCl) menzурom i začepљeno. Otopina je, u Erlenmeyerovoj tikvici obloženoj aluminijskom folijom, stajala 60 minuta na magnetskoj miješalici.

Nakon 60 minuta otopina je filtrirana pod vakuumom. Dobiveni ekstrakt preљiven je u odmjernu tikvicu od 50 mL, a ostatak ekstrakta u vakuum boci je ispran s nekoliko mL otapala za ekstrakciju (MeOH/2% HCl). Talog iz Buchnerovog lijevka (zajedno s filter papirom) je preseljen u istu Erlenmeyerovu tikvicu te je dodano 20 mL otapala za ekstrakciju. Otopina u Erlenmeyerovoj tikvici je ponovno stavљena na magnetsku miješalicu, 60 minuta. Nakon toga je ponovљen postupak filtriranja, a dobiveni ekstrakt je preљiven u istu odmjernu tikvicu od 50 mL. Ostatak iz vakum boce je ispran s nekoliko mL otapala za ekstrakciju. Zatim je tikvica nadopunjena do oznake s otapalom za ekstrakciju.

Ekstrakt je između analiza čuvan na + 4 °C.

### 3.1.3. Kemikalije

- KCl pufer (pH 1,0) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina, HCl (Panreac quimica s.a.u, Barcelona, Španjolska)
- Metanol (HPLC grade, J.T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- Natrijev acetat pufer (pH 4,.5) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 0,3 M acetatni pufer, pH 3,6
- 0,5 mM otopina DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Ledena octena kiselina
- Natrijev acetat trihidrat
- 10 mM otopina 2,4,6-tripiridil-s-triazina, TPTZ (Fluka, Sigma-Aldrich, Buchs, Švicarska)
- 20 mM otopina željezova (III)-klorida, FeCl<sub>3</sub> (Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- 20mM otopina FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O (Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- 40 mM vodena otopina klorovodične kiseline, HCl (Panreac quimica s.a.u, Barcelona, Španjolska)
- Destilirana voda

### 3.1.4. Oprema

- Štapni mikser (Philips)
- Magnetska miješalica (M10103002)
- Buchnerov lijevak
- Odsisna boca
- Filter papir (21/N 80g/qm, Munktell)
- Parafilm (PM-996, USA)
- Laboratorijsko posuđe: kivete, epruvete, gumeni čepovi za epruvete, odmjerne tikvice (10, 50, 100, 250 i 500 mL), Erlenmeyerove tikvice (50, 250 mL), menzure, pipete,

propipete, staklene čaše, stakleni lijevci, žličice, stakleni štapići, stalci za epruvete, injekcijske bočice

- Tehnička vaga (tip ET 1111, Tehtnica, Železniki)
- Analitička vaga (tip AX 200, Shimadzu)
- Automatska pipeta od 20 µL, 1000 µL
- pH metar (Mettler Toledo, Crux d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Spektrofotometar (uv-1280 Shimadzu)
- Vortex (tip VV3 S40)
- Vodena kupelj (itron 16, INKO)

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Određivanje ukupnih antocijana

#### Princip metode:

Za određivanje antocijana korištena je pH-diferencijalna metoda. pH-diferencijalna metoda se zasniva na strukturnoj transformaciji kromofora antocijana u ovisnosti o promjeni pH. Antocijani podliježu reverzibilnoj strukturnoj transformaciji s promjenom pH koja se manifestira promjenom spektra apsorbancije. pH-diferencijalna metoda za određivanje antocijana omogućava brzo i točno mjerenje ukupnih antocijana, bez obzira na prisutnost polimeriziranih, degradiranih pigmenta i drugih tvari koje bi mogle smetati (Giusti i Wrolstad, 2001; Jakobek i sur., 2007).

#### Postupak određivanja:

Za analizu se koristi prethodno pripremljeni ekstrakt uzorka borovnice (otopina homogeniziranog uzorka i otopine MeOH/2% HCl).

#### 1. Priprema 2 pufera:

- Jedan s kalijevim kloridom (pH 1.0) – 0,93 g KCl u 500 mL destilirane vode, pH se podesi na 1.0 sa koncentriranom HCl
- Drugi s natrijevim acetatom (pH 4.5) – 27,215 g CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na x 3 H<sub>2</sub>O u 500 ml destilirane vode, pH se podesi na 4.5 s koncentriranom HCl



2. Pripreme se dva razrijeđenja ekstrakta borovnice
  - Prvi: 0,1 mL uzorka borovnice se pomiješa s 9,9 mL KCl pufera
  - Drugi: 0,1 mL uzorka borovnice se pomiješa s 9,9 mL natrij acetat pufera
3. Otopine se inkubiraju 15 minuta u tamnoj prostoriji na sobnoj temperaturi
4. Nakon 15 minuta mjeri se istovremeno apsorbancija na 510 i 700 nm

Na isti način se pripremi slijepa proba, ali se umjesto uzorka uzima ista količina destilirane vode.

#### Račun:

Ukupan udio antocijana izračunava se pomoću sljedeće formule:

$$c \text{ (antocijana) (mg/kg)} = (A \times M \times FR \times 1000) / \epsilon \times l \quad [1]$$

Gdje je:

A – apsorbancija uzorka, a izračunava se prema izrazu:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}4.5} \quad [2]$$

M – 449,2 g mol<sup>-1</sup>

FR – faktor razrijeđenja

ε – molarna absorbivnost; 26 900 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

l – duljina kivete, 1 cm

Rezultati određivanja udjela ukupnih antocijana izraženi su kao mg ekvivalenta cijanidin-3O-glukozida (CGE) na kg jestivog dijela uzorka (mg CGEkg<sup>-1</sup>).

### 3.2.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH (2,2-difenil-pikrilhidrazil) metodom

#### Priprema otopine DPPH i stock otopine Troloxa:

1. *Otopina DPPH*  $c=0,5$  mM: Priprema se na dan analize, tako što se 0,02 g DPPH radikala otopi u metanolu u odmjernoj tikvici od 100 mL.
2. *Stock otopina Troloxa* (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilktoman-2-karbonska kiselina)  $c=0,02$  mM: Odvažuje se 0,5 g Troloxa u odmjernoj tikvici od 100 mL i otopi u metanolu.

#### Priprema uzoraka:

Prije određivanja antioksidacijske aktivnosti prethodno pripremljeni ekstrakti uzoraka su razrijeđeni otapalom za ekstrakciju (MeOH/2% HCl). U odmjernu tikvicu od 10 mL pipetira se 0,1 mL ekstrakta te se nadopuni otapalom za ekstrakciju do oznake.

#### Postupak određivanja:

U epruvetu se otpipetira 2 mL razrijeđenog ekstrakta uzorka, 2 mL metanola te 1 mL 0,5 mM otopine DPPH. Sadržaj epruveta se promiješa na vortexu i ostavi 20 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi. Prilikom vremena inkubacije epruvete su začepljene. Nakon toga se mjeri apsorbanacija pri 517 nm, uz metanol kao slijepu probu.

Kontrolni uzorak se priprema tako da se epruvetu otpipetira 4 mL metanola i 1 mL 0,5 mM otopine DPPH (Rice-Evans i sur., 1996; Prior i sur., 2005).

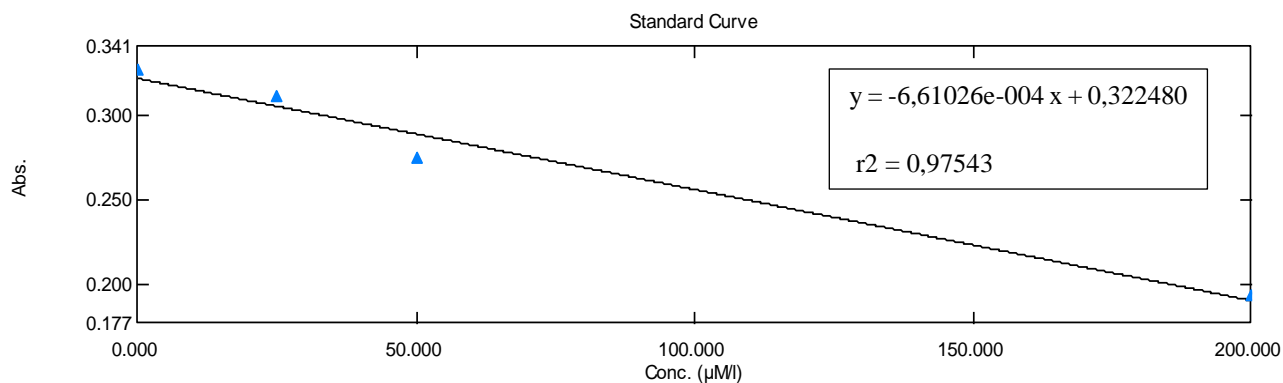
#### Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca koristi se stock otopina Troloxa. Iz navedene otopine, u odmjernim tikvicama od 50 mL, pripreme se razrijeđenja u koncentracijama od 0, 25, 50, 100, 200  $\mu$ M.

Iz svake tikvice se otpipetira 200  $\mu$ M razrijeđene otopine Troloxa, 3,8 mL metanola i 1 mL 0,5 mM otopine DPPH. Epruvete stoje 20 minuta u mraku na sobnoj temperaturi te se mjeri apsorbanacija na 517 nm uz metanol kao slijepu probu.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije spektrofotometar nacрта baždarni pravac. Na apscisi se nalaze koncentracije Trolox otopine ( $\mu\text{M}$ ), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancija pri 517 nm.

Na slici 12. je prikazana kalibracijska krivulja ekvivalenta Troloxa za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom.



**Slika 12.** Kalibracijska krivulja ekvivalenta Troloxa za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Račun:

Baždarni dijagram se nacрта pomoću računala i pri tom se dobije navedena jednažba pravca (slika 12.).

$$y = - 6,61026 e-004x + 0,322480$$

$$r^2 = 0,97543. r=0,98763$$

Gdje je:

y – apsorbancija uzorka pri 517 nm

x – ekvivalent Troloxa ( $\text{mmol L}^{-1}$ )

$r^2$  - koeficijent determinacije

### 3.2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

#### Reagensi:

1. 40 mM vodena otopina klorovodične kiseline, HCl: 330  $\mu$ L 12 M HCl razrijedi se u odmjernoj tikvici od 100 mL destiliranom vodom te nadopuni do oznake.
2. 0,3 M acetatni pufer, pH 3,6: 0,155 g natrijeva acetata trihidrata se otopi u 0,8 mL ledene ctene kiseline u odmjernoj tikvici od 50 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Čuva se pri + 4 °C.
3. 20 mM otopina željezova (III)-klorida, FeCl<sub>3</sub>: 0,0541 g FeCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O se otopi u 10 mL destilirane vode. Otopina se priprema na dan analize (svježa).
4. 10 mM otopine 2,4,6-tripiridil-s-triazina, TPTZ: 0,312 g TPTZ otopi se u odmjernoj tikvici od 10 mL s 40 mM HCl te se istom klorovodičnom kiselinom nadopuni do oznake. U potpunosti se otopi na + 50 °C u vodenoj kupelji. Otopina se uvijek priprema svježa tj. na dan određivanja. Čuva se na + 37 °C.
5. 20 mM otopina FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O: Izvaži se 0,55604 g željezo sulfata u odmjernu tikvicu od 100 mL i napuni destiliranom vodom do oznake.

#### Priprema FRAP reagensa:

Pomiješa se 50 mL acetatnog pufera s 5 mL TPTZ reagensa i 5 mL FeCl<sub>3</sub> (omjer 10:1:1).

FRAP reagens se uvijek priprema neposredn prije uporabe, a između analiza se čuva u vodenoj kupelji na + 37 °C.

#### Priprema uzoraka:

Prije određivanja antioksidacijske aktivnosti prethodno pripremljeni ekstrakti uzoraka borovnice su razrijeđeni otapalom za ekstrakciju (MeOH/2% HCl). U odmjernu tikvicu od 10 mL pipetira se 1 mL ekstrakta te se nadopuni otapalom za ekstrakciju do oznake.

### Postupak određivanja:

U epruvetu se redom otpipetira: 240  $\mu\text{L}$  destilirane vode, 80  $\mu\text{L}$  uzorka te 2080  $\mu\text{L}$  FRAP reagensa, dobro se promiješa te termostatira 5 minuta u vodenoj kupelji na + 37 °C. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, a umjesto uzorka se stavlja otapalo za ekstrakciju (MeOH/2% HCl).

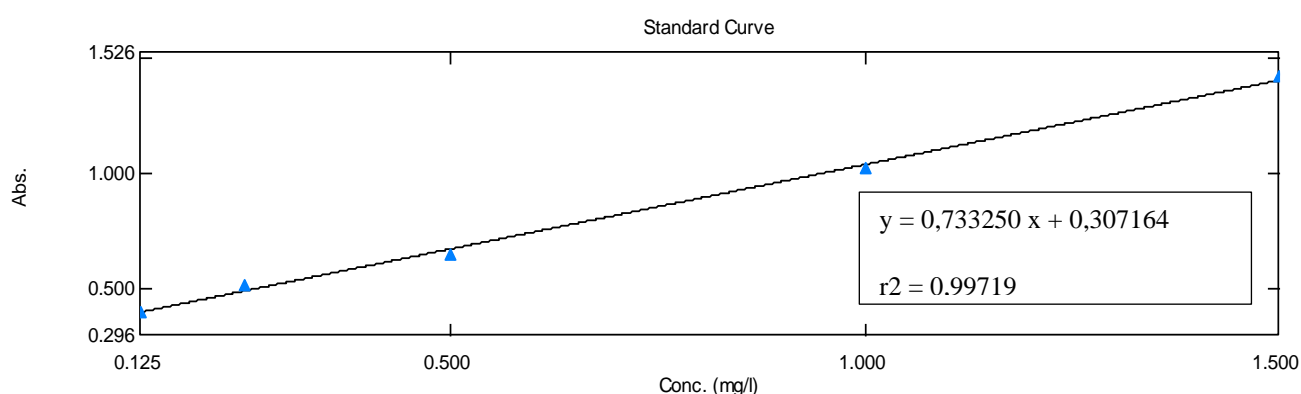
Nakon 5 minuta, izmjeri se apsorbancija pri 595 nm (Benzie i Strain, 1996).

### Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca pripreme se standardne otopine  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , tako da koncentracije u odmjernim tikvicama iznose 0,125, 0,250, 0,500, 1,000, 1,500 i 2,000 mM. Postupak je isti kao i za uzorak, samo što se umjesto uzorka dodaju priređene koncentracije otopine  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ .

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija spektrofotometar nacрта baždarni pravac, tako što su na apscisu nanešene koncentracije standardne otopine  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  (mM), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancija pri 595 nm.

Na slici 13. je prikazana kalibracijska krivulja željezova sulfata za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom.



**Slika 13.** Kalibracijska krivulja željezova sulfata za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Račun:

Baždarni dijagram se nacrtala pomoću računala i pritom se dobije navedena jednačina (slika 13.):

$$y = 0,733250x + 0,307164$$

$$r^2 = 0,99719, r = 0,99859$$

Gdje je:

y – apsorbancija uzorka pri 595 nm

x – koncentracija standardne otopine  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  ( $\text{mmol L}^{-1}$ )

$r^2$  - koeficijent determinacije

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Tijekom ovog istraživanja analizirano je 35 uzoraka divlje/obične borovnice sa 7 različitih lokacija u Primorsko-goranskoj županiji. Sa svake lokacije je bilo po 5 uzoraka. Određen je udio ukupnih antocijana ploda borovnice, te antioksidacijska aktivnost pomoću dviju metoda: DPPH i FRAP metode. Sve analize su provedene u tri paralelna mjerenja.

U *tablicama 5., 6., 7., 8., 9., 10. i 11.* su prikazani rezultati ukupnih antocijana i antioksidacijske aktivnosti za uzorke divlje borovnice s pojedinih lokacija s kojih su izuzeti.

Rezultati za ukupne antocijane su prikazani u mg/100 g uzorka. Rezultati za DPPH metodu su iskazani u mmol Trolox ekvivalenta na 100 grama svježeg uzorka, za FRAP metodu su iskazani u mmol Fe<sup>2+</sup> iona na 100 grama svježeg uzorka.

U *tablici 12.* je prikazana deskriptivna statistička analiza za rezultate dobivenih koncentracija antocijana u uzorcima divlje borovnice sa svih 7 lokacija.

*Tablica 13.* prikazuje deskriptivnu statističku analizu za dobivene rezultate antioksidacijske aktivnosti uzorke divlje borovnice sa svih 7 lokacija, određenih DPPH metodom.

*Tablica 14.* prikazuje deskriptivnu statističku analizu za antioksidacijsku aktivnost uzoraka sa svih 7 lokacija, određenih FRAP metodom.

U *tablici 15.* je prikazana analiza varijance podataka (ANOVA) o udjelu ukupnih antocijana u svim istraživanim uzorcima borovnice.

*Tablica 16.* prikazuje analizu varijance podataka o antioksidacijskoj aktivnosti određenoj DPPH metodom u svim istraživanim uzorcima borovnice, a *tablica 17.* analizu varijance podataka o antioksidacijskoj aktivnosti određenoj FRAP metodom u svim istraživanim uzorcima borovnice.

**Tablica 5.** Rezultati ukupnih antocijana i antioksidacijske aktivnosti za uzorke divlje borovnice s lokacije Šumarija Vrbovsko - „Jelenski Jarak“

| ŠUMARIJA VRBOVSKO – „JELENSKI JARAK“ |                               |                                    |                         |  |
|--------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|-------------------------|--|
|                                      |                               | UKUPNI<br>ANTOCIJANI<br>(mg/100 g) | DPPH (mmol<br>TE/100 g) | FRAP (mmol<br>Fe <sup>2+</sup> /100 g) |
| <b>BROJ<br/>UZORKA</b>               | <b>1</b>                      | 73,67                              | 9,18                    | 76,01                                  |
|                                      | <b>2</b>                      | 46,62                              | 12,80                   | 38,02                                  |
|                                      | <b>3</b>                      | 37,45                              | 12,70                   | 22,06                                  |
|                                      | <b>4</b>                      | 78,70                              | 9,30                    | 19,28                                  |
|                                      | <b>5</b>                      | 47,16                              | 12,02                   | 28,48                                  |
|                                      | <b>SREDNJA<br/>VRIJEDNOST</b> | <b>56,72</b>                       | <b>11,20</b>            | <b>36,77</b>                           |

Tablica 5. prikazuje rezultate ukupnih antocijana i antioksidacijske aktivnosti uzorke 1-5 s lokacije Šumarija Vrbovsko „Jelenski Jarak“. Srednja vrijednost ukupnih antocijana iznosi 56,72 mg/100 g. Srednja vrijednost antioksidacijske aktivnosti uzoraka borovnice prema DPPH metodi iznosi 11,20 mmol TE/100 g uzorka. Prema FRAP metodi prosječna antioksidacijska aktivnost iznosi 36,77 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g uzorka.

Iz tablice 5. je vidljivo da je udio ukupnih antocijana najveći u uzorku broj 4 (78,70 mg/100 g). Uzorak broj 2 ima najveću antioksidacijsku aktivnost prema DPPH metodi (12,80 mmol TE/100 g). Prema FRAP metodi najveću antioksidacijsku aktivnost pokazuje uzorak broj 1 (76,01 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g).



**Tablica 6.** Rezultati ukupnih antocijana i antioksidacijske aktivnosti za uzorke divlje borovnice s lokacije Šumarija Vrbovsko - „Željezni most - Macan“

| ŠUMARIJA VRBOVSKO – „ŽELJEZNI MOST - MACAN“ |                               |                                    |                         |  |
|---|-------------------------------|------------------------------------|-------------------------|--|
|   |                               | UKUPNI<br>ANTOCIJANI<br>(mg/100 g) | DPPH (mmol<br>TE/100 g) | FRAP (mmol<br>Fe <sup>2+</sup> /100 g) |
| BROJ<br>UZORKA                              | 6                             | 66,12                              | 11,90                   | 40,48                                  |
|   | 7                             | 66,43                              | 8,90                    | 47,14                                  |
|   | 8                             | 73,10                              | 10,63                   | 53,20                                  |
|   | 9                             | 57,76                              | 10,23                   | 29,55                                  |
|   | 10                            | 60,98                              | 13,01                   | 47,34                                  |
|   | <b>SREDNJA<br/>VRIJEDNOST</b> | <b>64,88</b>                       | <b>10,93</b>            | <b>43,54</b>                           |

Tablica 6. prikazuje rezultate ukupnih antocijana i antioksidacijske aktivnosti za uzorke 6-10 s lokacije Šumarija Vrbovsko „Željezni most - Macan“. Srednja vrijednost ukupnih antocijana iznosi 64,88 mg/100 g. Srednja vrijednost antioksidacijske aktivnosti uzoraka borovnice prema DPPH metodi iznosi 10,93 mmol TE/100 g uzorka. Prema FRAP metodi prosječna antioksidacijska aktivnost iznosi 43,54 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g uzorka.

Iz tablice 6. je vidljivo da je udio ukupnih antocijana najveći u uzorku broj 8 (73,10 mg/100 g). Uzorak broj 10 ima najveću antioksidacijsku aktivnost prema DPPH metodi (13,01 mmol TE/100 g), dok prema FRAP metodi najveću antioksidacijsku aktivnost pokazuje uzorak broj 8 (53,20 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g).

**Tablica 7.** Rezultati ukupnih antocijana i antioksidacijske aktivnosti za uzorke divlje borovnice s lokacije Šumarija Skrad - „Bukov vrh“

| <b>ŠUMARIJA SKRAD – „BUKOV VRH“</b> |                               |   |                                 |  |
|-------------------------------------|-------------------------------|---|---------------------------------|--|
|                                     |                               | <b>UKUPNI<br/>ANTOCIJANI<br/>(mg/100 g)</b> | <b>DPPH (mmol<br/>TE/100 g)</b> | <b>FRAP (mmol<br/>Fe<sup>2+</sup>/100 g)</b> |
| <b>BROJ<br/>UZORKA</b>              | <b>11</b>                     | 59,93                                       | 13,27                           | 31,31  |
|                                     | <b>12</b>                     | 91,95                                       | 10,11                           | 70,91  |
|                                     | <b>13</b>                     | 71,28                                       | 11,02                           | 58,89  |
|                                     | <b>14</b>                     | 64,65                                       | 11,52                           | 39,65  |
|                                     | <b>15</b>                     | 73,94                                       | 11,68                           | 47,79  |
|                                     | <b>SREDNJA<br/>VRIJEDNOST</b> | <b>72,35</b>                                | <b>11,52</b>                    | <b>49,71</b>                                 |

Tablica 7. prikazuje rezultate ukupnih antocijana i antioksidacijske aktivnosti za uzorke 11-15 s lokacije Šumarija Skrad „Bukov vrh“. Srednja vrijednost ukupnih antocijana iznosi 72,35 mg/100 g, a srednja vrijednost antioksidacijske aktivnosti uzoraka borovnice prema DPPH metodi iznosi 11,52 mmol TE/100 g uzorka. Prema FRAP metodi prosječna antioksidacijska aktivnost iznosi 49,71 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g uzorka.

Iz tablice 7. je vidljivo da uzorak broj 12 ima najveći udio antocijana (73,10 mg/100 g). Uzorak broj 11 ima najveću antioksidacijsku aktivnost prema DPPH metodi (13,27 mmol TE/100 g). Prema FRAP metodi najveću antioksidacijsku aktivnost pokazuje uzorak broj 12 (70,91 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g).

**Tablica 8.** Rezultati ukupnih antocijana i antioksidacijske aktivnosti za uzorke divlje borovnice s lokacije Šumarija Ravna Gora - „Javorova Kosa“

| <b>ŠUMARIJA RAVNA GORA – „JAVOROVA KOSA“</b> |                               |   |                                 |  |
|--|-------------------------------|---|---------------------------------|--|
|  |                               | <b>UKUPNI<br/>ANTOCIJANI<br/>(mg/100 g)</b> | <b>DPPH (mmol<br/>TE/100 g)</b> | <b>FRAP (mmol<br/>Fe<sup>2+</sup>/100 g)</b> |
| <b>BROJ<br/>UZORKA</b>                       | <b>16</b>                     | 66,05                                       | 11,66                           | 71,23  |
|  | <b>17</b>                     | 48,03                                       | 11,98                           | 32,72  |
|  | <b>18</b>                     | 76,67                                       | 9,77                            | 81,19  |
|  | <b>19</b>                     | 62,10                                       | 11,04                           | 38,08  |
|  | <b>20</b>                     | 63,31                                       | 11,24                           | 50,89  |
|  | <b>SREDNJA<br/>VRIJEDNOST</b> | <b>63,23</b>                                | <b>11,14</b>                    | <b>54,82</b>                                 |

Tablica 8. prikazuje rezultate ukupnih antocijana i antioksidacijske aktivnosti za uzorke 16-20 s lokacije Šumarija Ravna Gora „Javorova Kosa“. Srednja vrijednost ukupnih antocijana iznosi 63,23 mg/100 g. Srednja vrijednost antioksidacijske aktivnosti uzoraka borovnice prema DPPH metodi iznosi 11,14 mmol TE/100 g uzorka. Prema FRAP metodi prosječna antioksidacijska aktivnost iznosi 54,82 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g uzorka.

Iz tablice 8. je vidljivo da uzorak broj 12 ima najveći udio antocijana (76,67 mg/100 g). Uzorak broj 17 ima najveću antioksidacijsku aktivnost prema DPPH metodi (11,98 mmol TE/100 g). Prema FRAP metodi najveću antioksidacijsku aktivnost pokazuje uzorak broj 18 (81,19 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g).

**Tablica 9.** Rezultati ukupnih antocijana i antioksidacijske aktivnosti za uzorke divlje borovnice s lokacije Šumarija Mrkopalj -,Tuk Mrkopaljski“

| ŠUMARIJA MRKOPALJ – „TUK MRKOPALJSKI“ |    |                                    |                         |  |
|---------------------------------------|----|------------------------------------|-------------------------|--|
|                                       |    | UKUPNI<br>ANTOCIJANI<br>(mg/100 g) | DPPH (mmol<br>TE/100 g) | FRAP (mmol<br>Fe <sup>2+</sup> /100 g) |
| BROJ<br>UZORKA                        | 21 | 64,30                              | 10,49                   | 75,51                                  |
|                                       | 22 | 59,64                              | 10,64                   | 28,67                                  |
|                                       | 23 | 43,44                              | 10,83                   | 19,63                                  |
|                                       | 24 | 52,65                              | 10,57                   | 35,18                                  |
|                                       | 25 | 44,93                              | 11,77                   | 38,40                                  |
| SREDNJA<br>VRIJEDNOST                 |    | <b>52,99</b>                       | <b>10,86</b>            | <b>39,48</b>                           |

Tablica 9. prikazuje rezultate ukupnih antocijana i antioksidacijske aktivnosti za uzorke 21-25 s lokacije Šumarija Mrkopalj „Tuk Mrkopaljski“. Srednja vrijednost ukupnih antocijana iznosi 52,99 mg/100 g. Srednja vrijednost antioksidacijske aktivnosti uzoraka borovnice prema DPPH metodi iznosi 10,86 mmol TE/100 g uzorka. Prema FRAP metodi prosječna antioksidacijska aktivnost iznosi 39,48 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g uzorka.

Iz tablice 9. je vidljivo da uzorak broj 21 ima i najveći udio antocijana (64,30 mg/100 g). Uzorak broj 25 ima najveću antioksidacijsku aktivnost prema DPPH metodi (11,77 mmol TE/100 g). Prema FRAP metodi najveću antioksidacijsku aktivnost pokazuje uzorak broj 21 (75,51 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g).

**Tablica 10.** Rezultati ukupnih antocijana i antioksidacijske aktivnosti za uzorke divlje borovnice s lokacije Šumarija Mrkopalj - „Matić Poljana“

| <b>ŠUMARIJA MRKOPALJ – „MATIĆ POLJANA“</b> |                               |   |                                 |  |
|--|-------------------------------|---|---------------------------------|--|
|  |                               | <b>UKUPNI<br/>ANTOCIJANI<br/>(mg/100 g)</b> | <b>DPPH (mmol<br/>TE/100 g)</b> | <b>FRAP (mmol<br/>Fe<sup>2+</sup>/100 g)</b> |
| <b>BROJ<br/>UZORKA</b>                     | <b>26</b>                     | 57,96                                       | 11,80                           | 34,30  |
|  | <b>27</b>                     | 48,65                                       | 10,62                           | 73,51  |
|  | <b>28</b>                     | 40,07                                       | 12,79                           | 35,45  |
|  | <b>29</b>                     | 47,98                                       | 13,74                           | 29,80  |
|  | <b>30</b>                     | 54,46                                       | 12,57                           | 54,23  |
|  | <b>SREDNJA<br/>VRIJEDNOST</b> | <b>49,83</b>                                | <b>12,30</b>                    | <b>45,46</b>                                 |

Tablica 10. prikazuje rezultate ukupnih antocijana i antioksidacijske aktivnosti za uzorke 26-30 s lokacije Šumarija Mrkopalj „Matić Poljana“. Srednja vrijednost ukupnih antocijana iznosi 49,83 mg/100 g. Srednja vrijednost antioksidacijske aktivnosti uzoraka borovnice prema DPPH metodi iznosi 12,30 mmol TE/100 g uzorka. Prema FRAP metodi prosječna antioksidacijska aktivnost iznosi 45,46 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g uzorka.

Iz tablice 10. je vidljivo da uzorak broj 26 ima najveći udio antocijana (57,96 mg/100 g). Uzorak broj 29 ima najveću antioksidacijsku aktivnost prema DPPH metodi (13,74 mmol TE/100 g). Prema FRAP metodi najveću antioksidacijsku aktivnost pokazuje uzorak broj 27 (73,51 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g).

**Tablica 11.** Rezultati ukupnih antocijana i antioksidacijske aktivnosti za uzorke divlje borovnice s lokacije Šumarija Mrkopalj - „Begovo Razdolje“

| <b>ŠUMARIJA MRKOPALJ – „BEGOVO RAZDOLJE“</b> |                               |   |                                 |  |
|--|-------------------------------|---|---------------------------------|--|
|  |                               | <b>UKUPNI<br/>ANTOCIJANI<br/>(mg/100 g)</b> | <b>DPPH (mmol<br/>TE/100 g)</b> | <b>FRAP (mmol<br/>Fe<sup>2+</sup>/100 g)</b> |
| <b>BROJ<br/>UZORKA</b>                       | <b>31</b>                     | 51,42                                       | 12,35                           | 72,61  |
|  | <b>32</b>                     | 49,63                                       | 11,84                           | 53,17  |
|  | <b>33</b>                     | 49,01                                       | 11,77                           | 55,93  |
|  | <b>34</b>                     | 70,64                                       | 11,30                           | 74,36  |
|  | <b>35</b>                     | 45,83                                       | 12,77                           | 38,80  |
|  | <b>SREDNJA<br/>VRIJEDNOST</b> | <b>53,31</b>                                | <b>12,01</b>                    | <b>58,97</b>                                 |

Tablica 11. prikazuje rezultate ukupnih antocijana i antioksidacijske aktivnosti za uzorke 31-35 s lokacije Šumarija Mrkopalj „Begovo Razdolje“. Srednja vrijednost ukupnih antocijana iznosi 53,31 mg/100 g. Prema DPPH metodi srednja vrijednost antioksidacijske aktivnosti uzoraka borovnice iznosi 12,01 mmol TE/100 g uzorka. Prema FRAP metodi prosječna antioksidacijska aktivnost iznosi 58,97 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g uzorka.

Iz tablice 11. je vidljivo da uzorak broj 34 ima najveći udio antocijana (70,64 mg/100 g). Uzorak broj 35 ima najveću antioksidacijsku aktivnost prema DPPH metodi (12,77 mmol TE/100 g). Prema FRAP metodi najveću antioksidacijsku aktivnost pokazuje uzorak broj 34 (74,36 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g).

**Tablica 12.** Deskriptivna statistička analitička analiza za rezultate ukupnih antocijana u uzorcima borovnice sa svih 7 lokacija

| UKUPNI ANTOCIJANI                         |                    |                       |                            |
|---|--------------------|-----------------------|----------------------------|
| LOKACIJE                                  | PROSJEK (mg/100 g) | STANDARDNA DEVIJACIJA | KOEFICIJENT VARIJACIJE (%) |
| Šumarija Vrbovsko „Jelenski Jarak“        | 56,72              | 18,27                 | 32,20                      |
| Šumarija Vrbovsko „Željezni most – Macan“ | 64,88              | <b>5,86</b>           | <b>9,03</b>                |
| Šumarija Skrad „Bukov vrh“                | <b>72,35</b>       | 12,26                 | 16,94                      |
| Šumarija Ravna Gora „Javorova Kosa“       | 63,23              | 10,26                 | 16,22                      |
| Šumarija Mrkopalj „Tuk Mrkopaljski“       | 52,99              | 9,06                  | 17,09                      |
| Šumarija Mrkopalj „Matić Poljana“         | 49,83              | 6,85                  | 13,74                      |
| Šumarija Mrkopalj „Begovo Razdolje“       | 53,31              | 9,90                  | 18,56                      |

Tablica 12. prikazuje deskriptivnu statističku analizu rezultata ukupnih antocijana u uzorcima borovnice sa svih 7 lokacija. Najvišu koncentraciju ukupnih antocijana pokazuju uzorci borovnice s lokacije Šumarija Skrad „Bukov vrh“ (72,35 mg/100 g). Najniža koncentracija antocijana je 49,83 mg/100 g svježeg uzorka, sa lokacije Šumarija Mrkopalj „Matić Poljana“. Najmanje odstupanje, prema standardnoj devijaciji i koeficijentu varijacije pokazuju uzorci s lokacije Šumarija Vrbovsko „Željezni most – Macan“, dok najveće odstupanje pokazuju uzorci s lokacije Šumarija Vrbovsko „Jelenski Jarak“.

Rezultati za ukupne antocijane su izraženi u mg/100 g svježeg uzorka i kreću se u rasponu od 37,45 – 91,95 mg/100 g svježeg uzorka za svih 35 uzoraka divlje borovnice.

Prema Prior i sur. (1998) koncentracija antocijana za uzorak divlje borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.) iznosi 299,6 mg/100. Rezultati su viši u odnosu na ovaj rad. De Svoza i sur. (2014) su odredili udio ukupnih fenola i antocijana u uzorcima brazilske brusnice, maline, jagode,

trešnje i borovnice. Koncentracija antocijana za borovnicu (*Vaccinium corymbosum*) iznosi 29,72 mg/100 g svježeg uzorka, što je nešto niže u odnosu na rezultate ovog rada. Rezultati su u skladu s istraživanjem Okan i sur. (2018), gdje se koncentracija antocijana u uzorcima borovnice kreće u intervalu od 22,32 – 295,06 mg/100 g svježeg uzorka. Budući da ekološki faktori, svjetlost, temperatura, agrotehničke mjere, uvjeti dozrijevanja te uvjeti skladištenja i obrade svakako utječu na sastav i koncentraciju fenolnih spojeva u biljkama (Kim i sur., 2001), u ovom slučaju antocijana, moguće je da zbog toga borovnice u istraživanju Okan i sur. (2018) imaju jako visoke koncentracije antocijana u ispitivanim uzorcima.



**Tablica 13.** Deskriptivna statistička analiza rezultata antioksidacijske aktivnosti uzoraka divlje borovnice sa svih 7 lokacija određenih DPPH metodom

| DPPH metoda                               |                         |                       |                            |
|---|-------------------------|-----------------------|----------------------------|
| LOKACIJE                                  | PROSJEK (mmol TE/100 g) | STANDARDNA DEVIJACIJA | KOEFICIJENT VARIJACIJE (%) |
| Šumarija Vrbovsko „Jelenski Jarak“        | 11,20                   | 1,81                  | 16,20                      |
| Šumarija Vrbovsko „Željezni most – Macan“ | 10,93                   | 1,58                  | 14,41                      |
| Šumarija Skrad „Bukov vrh“                | 11,52                   | 1,15                  | 9,99                       |
| Šumarija Ravna Gora „Javorova Kosa“       | 11,14                   | 0,85                  | 7,62                       |
| Šumarija Mrkopalj „Tuk Mrkopaljski“       | 10,86                   | <b>0,53</b>           | 4,83                       |
| Šumarija Mrkopalj „Matić Poljana“         | <b>12,30</b>            | 1,17                  | 9,48                       |
| Šumarija Mrkopalj „Begovo Razdolje“       | 12,01                   | 0,57                  | <b>4,72</b>                |

Tablica 13. prikazuje deskriptivnu statističku analizu prema rezultatima DPPH metode za uzorke borovnice sa svih 7 lokacija. Najvišu antioksidacijsku aktivnost prema DPPH metodi imaju uzorci s lokacije Šumarija Mrkopalj „Matić Poljana“ (12,30 mmol TE/100 g). Standardna devijacija, koja se interpretira kao prosječno odstupanje od prosjeka u apsolutnom iznosu, je najmanja kod uzoraka s lokacije Šumarija Mrkopalj „Tuk Mrkopaljski“ i iznosi 0,53. Najveća je kod uzoraka s lokacije Šumarija Vrbovsko „Jelenski Jarak“, 1,81. Koeficijent varijacije se definira kao omjer standardnog odstupanja od aritmetičke sredine (prosjeaka) i najmanji je kod uzoraka s lokacije Šumarija Mrkopalj „Begovo razdolje“, 4,72%.

Rezultati za antioksidacijsku aktivnost prema DPPH metodi su izraženi u mmol Trolox ekvivalenta (TE) u 100 g uzorka i prema usporedbi svih 35 uzoraka, kreću se u rasponu od 8,90 – 13,74 mmol TE/100 g svježeg uzorka.

Prema istraživanju Dragović-Uzelac i sur. (2010), koje je provedeno na uzorcima svježe američke borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.), antioksidacijska aktivnost se kretala u

rasponu 5,75 – 7,60 mmol TE/100 g. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti prema istraživanju Dragović-Uzelac i sur. (2010) su nešto niže nego kod uzoraka divlje borovnice u ovom radu. Jakobek i sur. (2007) su u crvenom voću: borovnici, malini, kupini, jagodi, aroniji, trešnji i višnji odredili antioksidacijski kapacitet primjenom DPPH metode. Oni su također koristili uzorke divlje borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.), a vrijednosti su iznosile su 125,52  $\mu$ mol TE/100 g svježeg ploda. Iako je korištena ista metoda pri određivanju, zbog upotrebe različitog mehanizma i vremena trajanja reakcije dobivene su različite vrijednosti. Borovnica je, nakon aronije, pokazala najveću antioksidacijsku aktivnost od ispitivanih vrsta voća (Jakobek i sur., 2007). Okan i sur. (2018) su u svom istraživanju radili usporedbu antioksidacijskog kapaciteta različitih sorti borovnice. Vrijednosti istraživanja su se razlikovale zbog primjene različitog mehanizma reakcije, a iznosile su 1,10 – 5,65 mg/mL. Najveću antioksidacijsku aktivnost su pokazali plodovi divlje borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.) prikupljeni tijekom 2013. godine (Okan i sur., 2018).

**Tablica 14.** Deskriptivna statistička analiza za antioksidacijsku aktivnost uzoraka sa svih 7 lokacija, određenih FRAP metodom

| FRAP metoda                               |  |                       |                            |
|---|--|-----------------------|----------------------------|
| LOKACIJE                                  | PROSJEK (mmol Fe <sup>2+</sup> /100 g) | STANDARDNA DEVIJACIJA | KOEFICIJENT VARIJACIJE (%) |
| Šumarija Vrbovsko „Jelenski Jarak“        | 36,77                                  | 23,09                 | 62,78                      |
| Šumarija Vrbovsko „Željezni most – Macan“ | 43,54                                  | <b>9,02</b>           | <b>20,72</b>               |
| Šumarija Skrad „Bukov vrh“                | 49,71                                  | 15,63                 | 31,44                      |
| Šumarija Ravna Gora „Javorova Kosa“       | 54,82                                  | 20,91                 | 38,14                      |
| Šumarija Mrkopalj „Tuk Mrkopaljski“       | 39,48                                  | 21,38                 | 54,16                      |
| Šumarija Mrkopalj „Matić Poljana“         | 45,46                                  | 18,26                 | 40,17                      |
| Šumarija Mrkopalj „Begovo Razdolje“       | <b>58,97</b>                           | 14,77                 | 25,04                      |

U tablici 14. su dani rezultati deskriptivne statističke analize prema FRAP metodi za uzorke divlje borovnice sa svih 7 lokacija. Najveći prosjek antioksidacijske aktivnosti imaju uzorci s lokacije Šumarija Mrkopalj „Begovo Razdolje“, 58,97 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g svježeg uzorka, dok je najmanji prosjek kod uzoraka s lokacije Šumarija Vrbovsko „Jelenski Jarak“, 36,77 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g. Najmanje odstupanje prema standardnoj devijaciji i koeficijentu varijacije pokazuju uzorci s lokacije Šumarija Vrbovsko „Željezni most – Macan“ (9,02 i 20,72%). Najveće odstupanje pokazuju uzorci s lokacije Šumarija Vrbovsko „Jelenski Jarak“ (23,09 i 62,78%).

Rezultati za FRAP metodu su izraženi u mmol Fe<sup>2+</sup> u 100 g svježeg uzorka, a kreću se u intervalu 19,28 – 81,19 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g svježeg uzorka, prema usporedbi svih 35 uzoraka divlje borovnice.

Istraživanje koje su proveli Dragović-Uzelac i sur. (2010) na uzorcima američke borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) pokazuje slične rezultate. Antioksidacijska aktivnost uzoraka svježe američke borovnice se kretala u intervalu 37,13 – 90,07 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g svježeg

uzorka, što je u skladu s istraživanjem antioksidacijske aktivnosti divlje borovnice u ovom radu. Okan i sur. (2018) su u svom istraživanju dobili različite rezultate za antioksidacijsku aktivnost uzorka divlje borovnice, prema FRAP metodi, zbog različitog mehanizma i vremena trajanja reakcije. Vrijednosti za 2 uzorka divlje borovnice (ubranih tijekom 2012. i 2013. godine) su iznosile 2830,73 i 3632,96  $\mu\text{mol}$  troloks/100 g, što kao i kod DPPH metode pokazuje najveću vrijednost izmjerene antioksidacijske aktivnosti (Okan i sur., 2018).

**Tablica 15.** Analiza varijance podataka o udjelu ukupnih antocijana u svim istraživanim uzorcima borovnice

| ANOVA                   |           |           |           |          |                |               |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|---------------|
| <i>Izvor varijacije</i> | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>P-value</i> | <i>F crit</i> |
| UZORCI                  | 307,0246  | 4         | 76,75614  | 0,595058 | 0,669616       | 2,776289      |
| LOKACIJA                | 1942,926  | 6         | 323,821   | 2,510446 | 0,049837       | 2,508189      |
| Analitička<br>pogreška  | 3095,747  | 24        | 128,9894  |          |                |               |
| Ukupno                  | 5345,697  | 34        |           |          |                |               |

Legenda:

SS – suma kvadrata odstupanja

df – stupnjevi slobode

MS – varijanca

F – Fischerov kvocijent

p-value – p-vrijednost

F crit – kritični F kvocijent

Iz tablice 15. je vidljivo da p vrijednost za uzorke iznosi 0,669616, budući da je izrečena p vrijednost  $p > 0,05$ , može se zaključiti da između različitih uzoraka nema statistički značajne razlike u udjelu ukupnih antocijana.

P vrijednost za lokacije je manja od 0,05 te iznosi 0,049837. Iz toga zaključujemo da postoji statistički značajna razlika između udjela ukupnih antocijana unutar različitih lokacija.

**Tablica 16.** Analiza varijance podataka antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom u svim istraživanim uzorcima

| ANOVA                   |           |           |           |          |                |               |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|---------------|
| <i>Izvor varijacije</i> | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>P-value</i> | <i>F crit</i> |
| UZORCI                  | 5,888726  | 4         | 1,472181  | 1,061277 | 0,397122       | 2,776289      |
| LOKACIJA                | 9,062514  | 6         | 1,510419  | 1,088842 | 0,397104       | 2,508189      |
| Analitička<br>pogreška  | 33,29231  | 24        | 1,38718   |          |                |               |
| Ukupno                  | 48,24355  | 34        |           |          |                |               |

Prema tablici 16. p vrijednost za uzorke iznosi 0,397122, što je veće od 0,05, pa se može zaključiti da između različitih uzoraka ne postoji statistički značajna razlika u antioksidacijskoj aktivnosti određenoj DPPH metodom.

Vrijednost p za lokacije je također veća od 0,05 te iznosi 0,397104, pa je vidljivo da ne postoji statistički značajna u antioksidacijskoj aktivnosti određenoj DPPH metodom, ni između različitih lokacija.

**Tablica 17.** Analiza varijance podataka antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom u svim istraživanim uzorcima borovnice

| ANOVA                   |           |           |           |          |                |               |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|---------------|
| <i>Izvor varijacije</i> | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>P-value</i> | <i>F crit</i> |
| UZORCI                  | 1428,397  | 4         | 357,0992  | 1,100083 | 0,379236       | 2,776289      |
| LOKACIJA                | 1937,324  | 6         | 322,8873  | 0,99469  | 0,451247       | 2,508189      |
| Analitička<br>pogreška  | 7790,666  | 24        | 324,6111  |          |                |               |
| Ukupno                  | 11156,39  | 34        |           |          |                |               |

Iz tablice 17. je vidljivo da p vrijednost iznosi 0,379236, što je veće od 0,05, pa se iz toga može zaključiti da između različitih uzoraka borovnice ne postoji statistički značajna razlika u antioksidacijskoj aktivnosti određenoj FRAP metodom.

P vrijednost za lokacije je također veća od 0,05, te iznosi 0,451247. Iz toga je vidljivo da ni antioksidacijskoj aktivnosti određenoj FRAP metodom, među različitim lokacijama nema statistički značajne razlike.

## 5. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata istraživanja se mogu izvući sljedeći zaključci:

1. Koncentracija antocijana u plodovima borovnice je iznosila: 37,45 – 91,95 mg/100 g svježeg uzorka. Najvišu koncentraciju antocijana imali su uzorci s lokacije Šumarija Skrad „Bukov vrh“ i iznosila je prosječno 72,55 mg/100 g svježeg uzorka. Najniža koncentracija antocijana je izmjerena u uzorcima s lokacije Šumarija Mrkopalj „Matić Poljana“ s prosječnom vrijednošću 49,83 mg/100 g svježeg uzorka.
2. Antioksidacijska aktivnost uzoraka divlje borovnice prema DPPH metodi je iznosila: 8,90 – 13,74 mmol TE/100 g svježeg uzorka, a najveća antioksidacijska aktivnost je izmjerena u uzorcima s lokacije Šumarija Mrkopalj „Matić Poljana“. Iznosila je prosječno 12,30 mmol TE/100 g svježeg uzorka. Najmanju antioksidacijsku aktivnost imaju uzorci s lokacije Šumarija Mrkopalj „Tuk Mrkopaljski“, i iznosila je prosječno 10,86 mmol TE/100 g svježeg uzorka.
3. Antioksidacijska aktivnost uzoraka divlje borovnice prema FRAP metodi je iznosila: 19,28 – 81,19 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g svježeg uzorka. Najveću antioksidacijsku aktivnost imali su uzorci s lokacije Šumarija Mrkopalj „Begovo Razdolje“ s prosječnom vrijednošću 58,97 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g svježeg uzorka. Najmanju antioksidacijsku aktivnost prema FRAP metodi imali su uzorci s lokacije Šumarija Vrbovsko „Jelenski Jarak“, a iznosila je 36,77 mmol Fe<sup>2+</sup>/100 g svježeg uzorka.
4. Najmanja odstupanja rezultata istraživanja su se pokazala kod uzoraka divlje borovnice s lokacije Šumarija Vrbovsko „Željezni most – Macan“, dok su uzorci divlje borovnice s lokacije Šumarija Vrbovsko „Jelenski Jarak“ pokazali najveća odstupanja.
5. Prema analizi varijance podataka o udjelu ukupnih antocijana, te o antioksidacijskoj aktivnosti određenoj DPPH i FRAP metodom u istraživanim uzorcima borovnice, nema statistički značajne razlike između dobivenih vrijednosti različitih uzoraka borovnice, kao ni između lokacija na kojima su uzorci uzeti.
6. Dobiveni rezultati se ne razlikuju u većoj mjeri od rezultata dostupnih u literaturi.

## 6. LITERATURA

Aniszewski, T. (2015) *Alkaloids*, 2. izd., Elsevier Science, Amsterdam.

Anonymus 1, <<http://altioks.ba/namirnice-bogate-antioksidansima/>> Pristupljeno 28. lipnja 2019.

Anonymus 2, <<https://definicijahrane.hr/definicija/hranjive-tvari/bioloski-aktivne-tvari/>> Pristupljeno 30. lipnja 2019.

Anonymus 3, <<https://hr.stareyesforever.com/obrazovanje/84518-molekulyarnaya-i-strukturnaya-formula-fenola.html>> Pristupljeno 3. srpnja 2019.

Anonymus 4, <[www.botanic.hr/praktikum/indeks.htm](http://www.botanic.hr/praktikum/indeks.htm)> Pristupljeno 1. srpnja 2019.

Anonymus 5, <<https://www.healwithfood.org/health-benefits/bilberries.php>> Pristupljeno 27. lipnja 2019.

Ayaz, F. A., Hayirlioglu-Ayaz, S., Gruz, J., Novak, O., Strnad, M. (2005) Separation, Characterization, and Quantitation of Phenolic Acids in a Little-Known Blueberry (*Vaccinium arctostaphylos* L.) Fruit by HPLC-MS. *J. Agr. Food Chem.* **53**, 8116-8122.

Azar, M., Verette, E., Brun, S. (1987) Identification of Some Phenolic Compounds in Bilberry Juice *Vaccinium myrtillus*. *J. Food Sci.* **52**, 1255-1257.

Baj, A., Bombardelli, E., Gabetta, B., Martinelli, E. B. (1983) Qualitative and quantitative evaluation of *Vaccinium myrtillus* anthocyanins by high-resolution gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **279**, 365-372.

Benzie, I., Strain, J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of „Antioxidant Power: The FRAP Assay“. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76.

Brasanac-Vukanovic, S., Mutic, J., Stankovic, D. M., Arsic, I., Blagojevic, N., Vukasinovic-Pesic, V., Tadic, V. M. (2018) Wild Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L., *Ericaceae*) from Montenegro as a Source of Antioxidants for Use in the Production of Nutraceuticals. *Molecules.* **23**, 1864-1884.



- Bunea, A., Rugină, D., Pinte, A., Andrei, S., Bunea, C., Pop, R., Bele, C. (2012) Carotenoid and fatty acid profiles of bilberries and cultivated blueberries from Romania. *Chem. Pap.* **66**, 935-939.
- Chen, B., Xu, M. (2018) Natural Antioxidants in Foods. U: *Encyclopedia of Food Chemistry* (Melton, L., Varelis, P., Shahidi, F., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 180-188.
- Cignarella, A., Natasi, M., Cavalli, E., Puglisi, L. (1996) Novel lipid-lowering properties of *Vaccinium myrtillus* L. leaves, a traditional antidiabetic treatment, in several models of rat dyslipidaemia: a comparison with ciprofibrate. *Thromb. Res.* **84**, 311-322.
- Coqueiro, A., Verpoorte, R. (2015) Alkaloids. U: *Encyclopedia of Analytical Science*, 3. izd. (Worsfold, P., Townshend, A., Poole, C., Miró, M., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 77-84.
- Cyboran, S., Oszmiański, J., Kleszczyńska, H. (2013) Modification of the Lipid Phase of Biological and Model Membranes by Bilberry Leaf Extract. *Food Biophys.* **8**, 321-333.
- Damodaran, S., Parkin, K. L., Fennema, O. R. (2008) *Fennema's Food Chemistry*, 3. izd., CEC Press, London/New York.
- Decker, E. A. (2003) Natural Antioxidants In Foods. U: *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, 3. izd. (Meyers, R. A., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 335-342.
- De la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., Alvarez-Parrilla, E. (2019) Phenolic Compounds. U: *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables* (Yahia, E. M., ured.),,, str. 253-271.
- De Souza, V. R., Pimenta Pereira, P. A., Teodoro da Silva, T. L., de Oliveira Lima, L. C., Pio, R., Queiroz, F. (2014) Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chem.* **156**, 362-368.
- Dragović-Uzelac, V., Savić, Z., Brala, A., Levaj, B., Bursać Kovačević, D., Biško, A. (2010) Evaluation of Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Blueberry Cultivars (*Vaccinium corymbosum* L.) Grown in the Northwest Croatia. *Food Technol. Biotechnol.* **48**, 214-221.
- Dujmović Purgar, D., Šindrak, Z., Mihelj, D., Voća, S., Duralija, B. (2007) Rasprostranjenost roda *Vaccinium* u Hrvatskoj. *Pomologia Croatica.* **13**, 219-228.

- Dilas, S., Čanadanović-Brunet, J., Tumbas, V., Četković, G. (2010) Biološka aktivnost bobičastog voća: plenarno predavanje. *Glasnik hemičara, tehnologa i ekologa Republike Srpske*. **4**, 1-11.
- Ehlenfeldt, M. K., Prior, R. L. (2001) Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Phenolic and Anthocyanin Concentrations in Fruit and Leaf Tissues of Highbush Blueberry. *J. Agr. Food Chem.* **49**, 2222-2227.
- Ferrer, J.-L., Austin, M. B., Stewart Jr., C., Noel J. P. (2008) Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiol. Bioch.* **46**, 356-370.
- Gabrielska, J., Oszmianski, J., Komorowska, M., Langner, M. (1999) Anthocyanin extracts with antioxidant and radical scavenging effect. *Z. Naturforsch C.* **54**, 319-324.
- Gao, L., Mazza, G. (1994) Quantitation and Distribution of Simple and Acylated Anthocyanins and Other Phenolics in Blueberries. *J. Food Sci.* **59**, 1057-1059.
- Giusti, M. M., Wrolstad, R. E. (2001) Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. **00**, 1-13.
- Griffiths, H. R. (2016) Antioxidants: Characterization and Analysis. U: *Encyclopedia of Food and Health* (Caballero, B., Finglas, P. M., Toldrá, F.), Academic Press, Cambridge, str. 221-226.
- Grover, A. K., Samson, S. E. (2013) Antioxidants and Vision Health: Facts and Fiction. *Mol. Cell Biochem.* **388**, 173-183.
- Gu, L., Kelm, M., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Cunningham, D., Vannozzi, S., Prior, R. L. (2002) Fractionation of Polymeric Procyanidins from Lowbush Blueberry and Quantification of Procyanidins in Selected Foods with an Optimized Normal-Phase HPLC–MS Fluorescent Detection Method. *J. Agr. Food Chem.* **50**, 4852-4860.
- Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. V., Riechel, T. L. (1998) High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1887-1892.
- Helmstädter, A., Schuster, N. (2010) *Vaccinium myrtillus* as an antidiabetic medicinal plant – research through the ages: Review. *Pharmazie*. **65**, 315-321.

- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., Prior, R. L. (2002) High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 4437-4444.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1841-1856.
- Jakobek, L., Šeruga, M., Novak, I., Medvidović-Kosanović, M. (2007) Flavonols, Phenolic Acids and Antioxidant Activity of Some Red Fruits. *Deut. Lebensm. -Rundsch.* **103**, 369-377.
- Jakobek, L., Šeruga, M., Novak, I., Medvidović-Kosanović, M., Lukačević, I. (2008) Antioksidacijska aktivnost polifenola iz borovnice i jagode. *Pomologia Croatica.* **14**, 13-26.
- Kazazić, S. P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida: Review. *Arh. Hig. Rada Toksiko.* **55**, 279-290.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Järvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A. (2002) Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**, 560-568.
- Lamprecht, M. (2015) *Antioxidant in Sport Nutrition*, CRC Press, London/New York.
- Landete, J. M. (2012) Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health. *Cr. Rev. Food Sci.* **52**, 936-948.
- Lee, S., Sung Jung, E., Do, S.-G., Jung, G., Song, G., Song, J., Hwan Lee, C. (2014) Correlation between Species-Specific Metabolite Profiles and Bioactivities of Blueberries (*Vaccinium* spp.). *J. Agric. Food Chem.* **62**, 2126-2133.
- Lerfall, J. (2016) Carotenoids: Occurrence, Properties and Determination. U: *Encyclopedia of Food and Health* (Cabarello, B., Finglas, P. M., Toldrá, F., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 663-669.
- Macheix, J.J, Fleuriet, A., Billot, J. (1990) *Fruit Phenolics*, CRC Press, London/New York.
- Marinova, D., Ribarova, F. (2007) HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. *J. Food Compos. Anal.* **20**, 370-374.

- Martz, F., Jaakola, L., Julkunen-Tiitto, R., Stark, S. (2010) Phenolic Composition and Antioxidant Capacity of Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) Leaves in Northern Europe Following Foliar Development and Along Environmental Gradients. *J. Chem. Ecol.* **36**, 1017-1028.
- Mazza, G., Miniati, E. (1993) *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains*, CRC Press, London/New York.
- Morandi Vuolo, M., Lima, V. S., Maróstica Junior, M. R. (2019) Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. U: *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications* (Segura Campos, M., R., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge, str. 33-50.
- Može, Š., Polak, T., Gašperlin, L., Koron, D., Vanzo, A., Poklar Ulrih, N., Abram, V. (2011) Phenolics in Slovenian Bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *J. Agr. Food Chem.* **59**, 6998-7004.
- Murkovic, M. (2016) Phenolic Compounds: Occurrence, Classes, and Analysis. U: *Encyclopedia of Food and Health* (Cabarello, B., Finglas, P. M., Toldrá, F., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 346-351.
- Nabavi, S. M., Silva, A. S. (2018) *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*, Academic Press, Cambridge.
- Ngamwonglumlert, L., Devahastin, S. (2018) Carotenoids. U: *Encyclopedia of Food Chemistry* (Melton, L., Varelis, P., Shahidi, F., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 40-52.
- Okan, O. T., Deniz, I., Yayli, N., Şat, I. G., Öz, M., Hatipoğlu Serdar, G. (2018) Antioxidant Activity, Sugar Content and Phenolic Profiling of Blueberries Cultivars: A Comprehensive Comparison. *Not. Bot. Horti. Agrobo.* **46**, 639-652.
- Patil, B. S., Jayaprakasha, G. K., Chidambara Murthy, K. N., Vikram, A. (2009) Bioactive Compounds: Historical Perspectives, Opportunities, and Challenges. *J. Agr. Food Chem.* **57**, 8142-8160.
- Piirronen, V., Lindsay, D. G., Miettinen, T. A., Toviö, J., Lampi, A-M. (2000) Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition: Review. *J. Sci. Food Agr.* **80**, 939-966.
- Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G., Mainland, C. M. (1998) Antioxidant Capacity As Influenced by Total

Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species. *J. Agr. Food Chem.* **46**, 2686-2693.

Prior, R. L., Lazarus, S. A., Cao, G., Muccitelli, H., Hammerstone, J. F. (2001) Identification of Procyanidins and Anthocyanins in Blueberries and Cranberries (*Vaccinium Spp.*) Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *J. Agr. Food Chem.* **49**, 1270-1276.

Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005) Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agr. Food Chem.* **53**, 4290-4302.

Puupponen-Pimi, R., Nohynek, L., Alakomi, H. L., Oksman-Caldentey, K. M. (2005) Bioactive berry compounds - novel tools against human pathogens: Mini-review. *Appl. Microbiol. Biot.* **67**, 8-18.

Queiroz Zepka, L., Jacob-Lopes, E., Roca, M. (2019) Catabolism and bioactive properties of chlorophylls. *Current Opinion in Food Science.* **26**, 94-100.

Ramasammy, C. (2006) Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. *Eur. J. Pharmacol.* **545**, 51-64.

Rao, A. V., Rao, L. G. (2007) Carotenoids and human health: Invited review. *Pharmacol. Res.* **55**, 207-216.

Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds: Review. *Trends Plant Sci.* **2**, 152-159.

Riihinen, K., Jaakola, L., Kärenlampi, S., Hohtola, A. (2008) Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and „northblue“ blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*) *Food Chem.* **110**, 156-160.

Roberts, R. L., Green, J., Lewis, B. (2009) Lutein and zeaxanthin in eye and skin health. *Clin. Dermatol.* **27**, 195-201.

Saral, Ö., Ölmez, Z., Şahin, H. (2015) Comparison of Antioxidant Properties of Wild Blueberries (*Vaccinium arctostaphylos* L. and *Vaccinium myrtillus* L.) with Cultivated Blueberry Varieties (*Vaccinium corymbosum* L.) in Artvin Region of Turkey. *Turkish J. of Agr. - Food Sci. and Technol.* **3**, 40-44.

- Santos-Buelga, C., Gonzáles-Paramás, A. M. (2018) Anthocyanins. U: *Encyclopedia of Food Chemistry* (Melton, L., Varelis, P., Shahidi, F., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 10-21.
- Santos-Buelga, C., Scalbert, A. (2000) Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health: Review. *J. Sci. Food Agr.* **80**, 1094-1117.
- Scheer, H. (2013) Chlorophylls and Carotenoids. U: *Encyclopedia of Biological Chemistry* (Lennarz, W. J., Lane, M. D., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 498-505.
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H. S., Heber, D. (2006) Blackberry, Black Raspberry, Blueberry, Cranberry, Red Raspberry, and Strawberry Extracts Inhibit Growth and Stimulate Apoptosis of Human Cancer Cells In Vitro. *J. Agr. Food Chem.* **54**, 9329-9339.
- Sellappan, S., Akoh, C. C., Krewer, G. (2002) Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. *J. Agr. Food Chem.* **50**, 2432-2438.
- Shahidi, F., Naczk, M. (2004) *Phenolics in Food and Nutraceuticals*, CRC Press, London/New York.
- Silveira Coelho, M., Fernandes, S. S., de las Mercedes Salas-Mellado, M. (2019) Association Between Diet, Health, and the Presence of Bioactive Compounds in Foods. U: *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications* (Segura Campos, M., R., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge, str. 159-183.
- Simmonds, M. S. J., Preedy, V. R. (2016) *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*, Academic Press, Cambridge.
- Smeriglio, A., Barreca, D., Laganá, G., Bellico, E., Domenico, T. (2018) Bilberry (*Vaccinium myrtillus L.*). U: *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements* (Nabavi, S. M., Silva, A. S., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 159-163.
- Srdić-Rajić, T., Konić Ristić, A. (2016) Antioxidants: Role on Health and Prevention. U: *Encyclopedia of Food and Health* (Cabarello, B., Finglas, P. M., Toldrá, F., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 227-233.
- Sui, X., Zhang, Y., Jiang, L., Zhou, W. (2018) Anthocyanins in Food. U: *Encyclopedia of Food Chemistry* (Melton, L., Varelis, P., Shahidi, F., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 10-17.

- Tsao, R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols: Review. *Nutrients*. **2**, 1231-1246.
- U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2004. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 17. Nutrient Data Laboratory Home Page, <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data>>. Pristupljeno 10. srpnja 2019.
- Veberic, R., Slatnar, A., Bizjak, J., Stampar, F., Mikulic-Petkovsek, M. (2015) Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. *Lwt-Food Sci. Technol.* **60**, 509-517.
- Viera, I., Pérez-Gálvez, A., Roca, M. (2019) Green Natural Colorants: Review. *Molecules*. **24**, 154.
- Yeagle, P. L. (2016) *The Membranes of Cells*, 3. izd., Academic Press, Cambridge.
- Yilmaz, C., Gökmen, V. (2015) Chlorophyll. U: *Encyclopedia of Food and Health* (Caballero, B., Finglas, P. M., Toldrá, F.), Academic Press, Cambridge, str. 37-41.
- Zhao, C., Zhang, C., He, F., Zhang, W., Leng, A., Ying, X. (2019) Two new alkaloids from *Portulaca oleracea* L. and their bioactivities. *Fitoterapia*. **136**, 1-5.
- Zoratti, L., Klemettilä, H., Jaakola, L. (2015) Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) - Ecotypes. U: *Nutritional Composition of Fruit Cultivars* (Simmonds, M. S. J., Preedy, V. R., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 83-99.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Mirela Soče