

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Nevena Lj. Dabetić

KOMPARATIVNA ANALIZA HEMIJSKOG
SASTAVA I BIOLOŠKE AKTIVNOSTI
EKSTRAKATA PLODOVA RAZLIČITIH
SORTI VINOVE LOZE (*Vitis vinifera* L.)
DOBIJENIH PRIMENOM ORGANSKOG I
EUTEKTIČKOG RASTVARAČA

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Nevena Lj. Dabetić

COMPARATIVE ANALYSIS OF CHEMICAL
COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY
OF FRUIT EXTRACTS OBTAINED FROM
DIFFERENT GRAPE (*Vitis vinifera* L.)
VARIETIES USING ORGANIC AND
EUTECTIC SOLVENTS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

Mentor:

dr sc. Slađana Šobajić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu- Farmaceutski fakultet

Članovi komisije:

dr sc. Ivana Radojčić Redovniković, redovni profesor, Sveučilište u Zagrebu- Prehrambeno-biotehnološki fakultet

dr sc. Jelena Antić Stanković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu- Farmaceutski fakultet

dr sc. Ivana Đuričić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu- Farmaceutski fakultet

dr sc. Vanja Todorović, docent, Univerzitet u Beogradu- Farmaceutski fakultet

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija urađena je na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Katedri za bromatologiju. Ispitivanje antimikrobne i citotoksične aktivnosti ekstrakata izvršeno je na Katedri za mikrobiologiju i imunologiju. Na Katedri za farmaceutsku hemiju vršene su detaljne analize hemijskog sastava uzoraka. U saradnji sa Katedrom za analitiku lekova urađena je optimizacija procesa ekstrakcije. Priprema eutektičkog rastvarača i deo hemijske analize izvršeni su na Zavodu za biohemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Univerziteta u Zagrebu. Sadržaj tokoferola u ulju određen je na Institutu za higijenu Vojnomedicinske akademije. Ovom prilikom se zahvaljujem svim kolegama koje sam tokom izrade disertacije imala prilike da upoznam i sa kojima sam saradivala, a koji su mi nesebično pomagali i od kojih sam mnogo naučila.

Uzorci grožđa su prikupljeni zahvaljujući donacijama Vinarije Milosavljević-Vila vina (Trstenik) i Vinarije Matalj (Negotinska krajina), kao i uzorkovanjem iz vinograda Radmilovac koji se nalazi u sastavu Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu i iz vinograda Poljoprivredne škole Rajko Bosnić, Negotin. Hvala svima koji su mi izašli u susret, obezbedili polazni materijal za izvođenje eksperimenata i svojim sugestijama doprineli planiranju istraživanja.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj mentorki i članovima komisije, na pomoći, korisnim savetima i sugestijama, kao i na vremenu posvećenom svim fazama izrade ove disertacije. Smatram njihove uloge veoma značajnim za konačni izgled izdanja koje je pred vama.

Zahvaljujem se i kolegama sa Katedre za bromatologiju na uspešnoj saradnji i razumevanju, a porodici i prijateljima na strpljenju, podršci i ljubavi.

Doktorsku disertaciju posvećujem svojim roditeljima.

KOMPARATIVNA ANALIZA HEMIJSKOG SASTAVA I BIOLOŠKE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA PLODOVA RAZLIČITIH SORTI VINOVE LOZE (*Vitis vinifera* L.) DOBIJENIH PRIMENOM ORGANSKOG I EUTEKTIČKOG RASTVARAČA

Sažetak

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je ispitivanje bioaktivnih sastojaka (BAS) u ekstraktima plodova 24 sorte vinove loze (*Vitis vinifera* L.). Istraživanje je sprovedeno kroz četiri faze. Ishod prve faze bio je definisanje optimalnih uslova ultrazvučne ekstrakcije: odnos biljni materijal: rastvarač 1:10, vreme 30 min i temperatura 50 °C. U drugoj fazi vršena je analiza BAS u hidrofилnim (pokožica i semenke) i lipofilnim ekstraktima (semenke). Sadržaj polifenola je bio najveći u hidrofилnim ekstraktima semenki. Antioksidativna aktivnost ekstrakata bila je u statistički značajnoj korelaciji sa polifenolnim sadržajem ($p < 0,01$). Određen je sastav masnih kiselina (GC-FID) i tokoferola (HPLC-FD) u uljima. U okviru treće i četvrte faze izvršena je detaljna analiza hemijskog sastava (HPLC-MS/MS; UV/DAD) i bioloških aktivnosti etanolnih i eutektičkih ekstrakata (holin hlorid:limunska kiselina, ChCit) pokožice i semenki u najpotentnijim sortama grožđa sa posebnim osvrtom na razlike u efikasnosti rastvarača. Antioksidativna aktivnost je procenjivana pomoću četiri testa (DPPH, FRAP, TEAC i CUPRAC). ChCit je potencirao ekstrakciju antioksidanasa iz pokožice, dok je kod semenki etanol bio neznatno efikasniji. Citotoksična aktivnost je ispitivana na tri ćelijske linije (MRC-5, HeLa i LS 174T). ChCit ekstrakti su inhibirali rast ćelija, dok je inhibicija izostala kod etanolnih ekstrakata. Ekstrakti pokožice su ispoljili jaču citotoksičnost od ekstrakata semenki. Antimikrobna aktivnost je procenjivana na tri soja: *S.aureus*, *E.coli* i *C.albicans*. Semenke su značajnije inhibirale rast mikroorganizama od pokožice. Generalno, ChCit ekstrakti pokožice su ispoljili jači antimikrobni efekat od etanolnih ekstrakata, a u slučaju semenki, etanol je bio efikasniji.

Ključne reči: *grožđe, semenke, pokožica, ekstrakti, polifenolna jedinjenja, organski rastvarači, eutektički rastvarači, antioksidativna aktivnost, citotoksična aktivnost, antimikrobna aktivnost*

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Bromatologija

COMPARATIVE ANALYSIS OF CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF FRUIT EXTRACTS OBTAINED FROM DIFFERENT GRAPE (*Vitis vinifera* L.) VARIETIES USING ORGANIC AND EUTECTIC SOLVENTS

Abstract

The object of this doctoral dissertation is determination of bioactive compounds (BC) in fruit extracts from 24 different grape varieties (*Vitis vinifera* L.). The investigation was conducted through four phases. The outcomes of the first phase are defined optimal conditions of ultrasound extraction: ratio plant material:solvent 1:10, time 30 min and temperature 50 °C. In the second phase, BC were analyzed in hydrophilic (skins and seeds) and lipophilic (seeds) extracts. The highest total phenolic content was determined in hydrophilic seed extracts. Antioxidant activity was in a strong correlation with phenolic content ($p < 0,01$). Oils were analyzed in the term of fatty acid composition (GC-FID) and tocopherol content (HPLC-FD). The last two phases were the most important: chemical composition and biological activities of organic (acidified ethanol, EtOH) and eutectic (choline chloride: citric acid, ChCit) skin and seed extracts were evaluated. The aim of this part was to compare the extraction efficiency of two solvents. Antioxidant activity of extracts was investigated using four tests (DPPH, FRAP, TEAC and CUPRAC). ChCit potentiated the extraction of antioxidants from skins; for seeds ethanol was more effective. Cytotoxic effects were evaluated against three cell lines (MRC-5, HeLa and LS 174T). ChCit extracts inhibited cells growth, while ethanol had no effect for tested concentrations. Skin extracts exhibited higher cytotoxic potential in comparison with seed ones. Antimicrobial activity was tested against three microorganisms (*S.aureus*, *E.coli* and *C.albicans*). Seed extracts had a stronger inhibitory effect on microorganisms' development compared with skin extracts. Regarding differences between solvents, ChCit skin extracts showed higher antimicrobial activity than ethanol skin extracts, but in the case of seeds, ethanol was more efficient.

Key words: *grape, seeds, skins, extracts, polyphenols, organic solvents, eutectic solvents, antioxidant activity, cytotoxic activity, antimicrobial activity*

Scientific field: Pharmacy

Scientific subfield: Bromatology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Vinova loza	1
1.1.1. Istorijat gajenja vinove loze	1
1.1.2. Rasprostranjenost vinove loze	2
1.1.3. Vinova loza u Srbiji	3
1.1.4. Morfologija vinove loze.....	4
1.1.5. Sistematizacija vinove loze	4
1.2. Plod vinove loze (grožđe)	6
1.2.1. Ulje iz semenki grožđa.....	7
1.3. Hemijski sastav ploda vinove loze.....	8
1.3.1. Hemijski sastav ulja iz semenki grožđa	9
1.3.1.1. Masne kiseline.....	9
1.4. Najvažniji bioaktivni sastojci ploda vinove loze	11
1.4.1. Polifenolna jedinjenja	11
1.4.1.1. Flavonoidi	12
1.4.1.2. Neflavonoidi.....	15
1.4.1.3. Distribucija polifenolnih jedinjenja u plodu vinove loze.....	17
1.4.2. Ostali bioaktivni sastojci semenki grožđa.....	18
1.5. Biološka aktivnost ploda vinove loze	20
1.5.1. Antioksidativna aktivnost	20
1.5.1.1. Slobodni radikali i redoks ravnoteža.....	20
1.5.1.2. Sistemi antioksidativne zaštite	23
1.5.1.3. Antioksidativna aktivnost grožđa.....	23
1.5.2. Citotoksična aktivnost.....	24
1.5.2.1. Citotoksična aktivnost grožđa.....	25
1.5.3. Antimikrobna aktivnost.....	26
1.5.3.1. Antimikrobna aktivnost grožđa.....	27
1.6. Aspekti održivosti u vinskoj industriji	29
1.6.1. Upravljanje otpadom u vinskoj industriji.....	30
1.7. Dobijanje koncentrovanih izvora biološki aktivnih jedinjenja iz grožđa i primena zelenih rastvarača	32
1.7.1. Ekstrakcija biološki aktivnih jedinjenja.....	32
1.7.1.1. Ultrazvučna ekstrakcija.....	33
1.7.1.2. Faktori koji utiču na efikasnost ultrazvučne ekstrakcije	34

1.7.1.3. Optimizacija procesa ekstrakcije primenom eksperimentalnog dizajna	35
1.7.2. Upotreba bezbednijih rastvarača u industrijskim procesima	39
1.7.2.1. Eutektički rastvarači.....	39
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	44
3. MATERIJAL I METODE	45
3.1. Hemikalije i reagensi	45
3.1.1 Osnovni reagensi i standardi	45
3.1.2. Priprema rastvarača.....	45
3.1.2.1. Priprema eutektičkog rastvarača	46
3.1.2.2. Priprema konvencionalnog rastvarača	46
3.2. Materijal	47
3.3. Priprema uzoraka	52
3.3.1. Ekstrakcija ulja.....	52
3.3.2. Priprema ekstrakata ulja.....	52
3.3.3. Optimizacija procesa ekstrakcije polifenolnih jedinjenja primenom metode površine odgovora.....	52
3.3.4. Priprema ekstrakata pokožice i semenki grožđa	53
3.4. Određivanje sadržaja biološki aktivnih sastojaka u grožđu	54
3.4.1. Određivanje ukupnih polifenolnih jedinjenja u ekstraktima pokožice i semenki grožđa, kao i u ekstraktima ulja iz semenki grožđa	54
3.4.2. Određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima pokožice i semenki grožđa	54
3.4.3. Određivanje ukupnih flavan-3-ola u ekstraktima semenki grožđa	54
3.4.4. Određivanje ukupnih monomernih antocijana u ekstraktima pokožice grožđa	55
3.5. Određivanje profila biološki aktivnih sastojaka u grožđu	56
3.5.1. Određivanje organskih kiselina, katehina, proantocijanidina i flavonola u ekstraktima pokožice i semenki grožđa.....	56
3.5.1.1. Validacija HPLC metode za kvantifikaciju organskih kiselina, katehina i proantocijanidina.....	57
3.5.2. Određivanje antocijana u ekstraktima pokožice grožđa	60
3.5.3. Određivanje sastava masnih kiselina u uljima iz semenki grožđa	61
3.5.3.1. Ispitivanje aterogenog potencijala ulja iz semenki grožđa	61
3.6. Ispitivanje bioloških aktivnosti grožđa	63
3.6.1. Ispitivanje antioksidativnog delovanja ekstrakata grožđa	63
3.6.1.1. Određivanje antioksidativnog potencijala ekstrakata pokožice i semenki grožđa.....	63
3.6.2. Ispitivanje citotoksičnog delovanja ekstrakata pokožice i semenki grožđa.....	66
3.6.2.1. Ćelijske linije	66
3.6.2.2. Tretman ćelijskih linija	66
3.6.2.3. MTT test za određivanje preživljavanja ćelija u kulturi	66

3.6.3. Ispitivanje antimikrobnog delovanja ekstrakata pokožice i semenki grožđa.....	67
3.7. Statistička obrada podataka.....	69
4. REZULTATI I DISKUSIJA	70
4.1. Optimizacija procesa ekstrakcije polifenolnih jedinjenja primenom metode površine odgovora.....	70
4.1.1. Uticaj uslova ekstrakcije na polifenolni sadržaj	70
4.1.2. <i>Box Behnken</i> dizajn.....	71
4.1.3. Grafičko prikazivanje matematičkog modela	74
4.2. Sastav i antioksidativna aktivnost ekstrakata grožđa dobijenih korišćenjem organskih rastvarača	76
4.2.1. Ekstrakti pokožice grožđa.....	77
4.2.1.1. Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u ekstraktima pokožice grožđa	77
4.2.1.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata pokožice grožđa.....	81
4.2.2. Ekstrakti semenki grožđa	82
4.2.2.1. Hidrofilni ekstrakti semenki grožđa.....	82
4.2.2.2. Lipofilni ekstrakti semenki grožđa (ulja).....	87
4.2.4. Sortni uticaj na sadržaj polifenola u ekstraktima pokožice i semenki grožđa	103
4.3. Poređenje efikasnosti organskog i eutektičkog rastvarača analizom sastava i bioloških aktivnosti hidrofilnih ekstrakata pokožice i semenki grožđa.....	104
4.3.1. Evaluacija biotoksičnosti eutektičkih rastvarača	104
4.3.2. Hemijski sastav ekstrakata pokožice grožđa.....	106
4.3.2.1. Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antocijana u ekstraktima pokožice grožđa	106
4.3.2.2. Sastav i sadržaj organskih kiselina i najznačajnijih polifenolnih jedinjenja u ekstraktima pokožice grožđa.....	108
4.3.2.3. Sastav i sadržaj antocijana u ekstraktima pokožice grožđa	111
4.3.3. Biološke aktivnosti ekstrakata pokožice grožđa	113
4.3.3.1. Antioksidativna aktivnost ekstrakata pokožice grožđa.....	113
4.3.3.2. Citotoksična aktivnost ekstrakata pokožice grožđa	117
4.3.3.3. Antimikrobna aktivnost ekstrakata pokožice grožđa	119
4.3.4. Hemijski sastav ekstrakata semenki grožđa.....	121
4.3.4.1. Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i flavan-3-ola u ekstraktima semenki grožđa	121
4.3.4.2. Sastav i sadržaj organskih kiselina i najznačajnijih polifenolnih jedinjenja u ekstraktima semenki grožđa.....	123
4.3.5. Biološke aktivnosti ekstrakata semenki grožđa	126
4.3.5.1. Antioksidativna aktivnost ekstrakata semenki grožđa	126
4.3.5.2. Citotoksična aktivnost ekstrakata semenki grožđa	128
4.3.5.3. Antimikrobna aktivnost ekstrakata semenki grožđa	131

4.3.6. Razlike u biološkim aktivnostima organskih i eutektskih ekstrakata pokožice i semenki	133
5. ZAKLJUČCI.....	136
6. LITERATURA.....	141

1. UVOD

1.1. Vinova loza

Vinova loza je drvenasta povijuša koja pripada porodici *Vitaceae*, rodu *Vitis*. Rod *Vitis* je podjeljen na dva podroda: *Muscadinia* i *Euvitis* (po novoj klasifikaciji biljaka- *Vitis*). Podrod *Vitis* broji oko 70 vrsta, među kojima je najznačajnija evroazijska loza *Vitis vinifera* L. U okviru ove vrste izdvajaju se dve podvrste i to: *Vitis vinifera* L., ssp. *silvestris* (divlja, šumska loza) i *Vitis vinifera* L., ssp. *sativa* (gajena, kulturna, plemenita loza). Posebni uslovi sredine, veštačka hibridizacija i selekcija ubrzali su evoluciju gajene loze i uticali na raznovrsnost sorti (Žunić & Garić, 2010). Ova biljka se uzgaja više od 5000 godina zbog hranljivih i ukusnih plodova (grožđa) koji se konzumiraju sveži/prerađeni ili se koriste u proizvodnji vina, džemova, sokova, itd. Najveći procenat grožđa namenjen je vinskoj industriji. Osim toga, poslednjih godina sve je češća upotreba ulja izolovanog iz semenki grožđa, ali i različitih ekstrakata dobijenih koncentrisanjem biološki aktivnih jedinjenja prisutnih u vinskom ostatku (komini). Kako se ovo voće može koristiti na različite načine, neophodno je istaći da se sastav, nutritivna vrednost i sadržaj/profil biološki aktivnih jedinjenja značajno razlikuju u zavisnosti od načina i oblika korišćenja.

1.1.1. Istorijat gajenja vinove loze

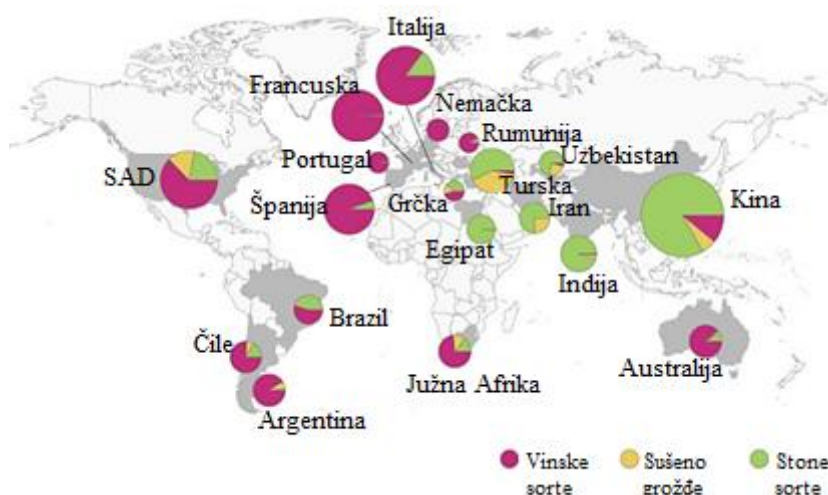
Predstavnici porodice *Vitaceae* pronađeni su u fosilnim ostacima starim između 50 i 70 miliona godina. Arheobotaničkim istraživanjima je utvrđeno da pronađeni ostaci listova i semenki pripadaju pretku vinove loze *Vitis pravifera*. U periodu mezolita pojavili su se predstavnici divlje loze, koja i danas spontano raste u Evropi, Aziji i Severnoj Africi. Smatra se da je pripitomljavanje vinove loze počelo 5500-6000 godina pre nove ere (neolit) (Marković, 2012). Neki autori zastupaju mišljenje da je uvođenje vinove loze u kulturu započeto i ranije, pre 9000 godina. U literaturi se navode različiti centri gajenja vinove loze; ipak, najveći broj autora navodi region između Crnog mora i Kaspijskog jezera (Zakavkazje) kao mesto pripitomljavanja divlje vinove loze. Ova kultura se dalje širila prema istoku do Indije, prema Zapadu do Balkanskog poluostrva i južno do Palestine i Egipta (Korać i sar., 2016). Postoji i hipoteza o multicentralnosti, zasnovana na postojanju značajnih morfoloških razlika između sorti Bliskog istoka i zapadne Evrope, a čiji zagovornici smatraju da pored ovog primarnog centra postoji jedan ili više sekundarnih centara na području Mediterana (Mullins i sar., 1992).

Za „odomaćivanje” vinove loze na Balkanskom poluostrvu zaslužni su Tračani, Feničani i Grci koji su kulturu gajenja vinove loze preneli sa Bliskog istoka. Najstarije vinogradarstvo na teritoriji naše zemlje razvilo se na području koje su nastanjivali Tračani (jug i jugoistok). Smatra se da su Rimljani najzaslužniji za masovno širenje površina pod vinovom lozom na Balkanu. Rana rimska kultura je bila pod jakim uticajem kulture starih Grka, tako da se uporedo sa širenjem Rimskog carstva, širio i kult gajenja vinove loze i proizvodnje vina (Bešlić, 2019). Vremenom, rimske provincije postale su značajni proizvođači i izvoznici kvalitetnog vina, zbog čega je car Domicijan 92. godine n.e., kako bi sprečio pad cena italijanskih vina, doneo ukaz o krčenju vinograda van Apeninskog poluostrva. Smatra se da je ovaj ukaz doprineo slabijem razvoju vinogradarstva. Tek 280. godine n.e. Car Proba (rođen u Sirmijumu, današnja Sremska Mitrovica) ukida Domicijanov ukaz i nastavlja se širenje kulture gajenja vinove loze na našim prostorima. Postoje podaci da je u vreme vladavine cara Proba podignut prvi vinograd na području Fruške gore. Sa padom Rimskog carstva (5. vek) dolazi do stagnacije, pa i blagog nazadovanja vinogradarstva. U 6. i početkom 7. veka slovenska plemena naseljavaju Balkan, i kako tamo zatiču gajenu vinovu lozu, nastavljaju sa razvijanjem vinogradarstva. U srednjem veku, vinogradarstvo opstaje i unapređuje se zahvaljujući razvoju hrišćanstva. Vino je predstavljalo značajan deo verskih obreda, dok se vinova loza gajila pri

manastirima koji su predstavljali i jedine centre obrazovanja i nauke. Za potrebe srpskih srednjovekovnih manastira osnivaju se metosi (imanja na kojima se gaji vinova loza i proizvodi vino za potrebe manastira). Hilandar, Pečka Patrijaršija, Ravanica, Studenica, Žiča, samo su neki od manastira pri kojima su oformljena ova imanja. Na području današnjeg Prizrena, Peći i Orahovca bilo je najviše metosa; okolina Belog Drima otuda nosi naziv Metohija (Marković, 2012). Za vreme duge turske vladavine na Balkanskom poluostrvu ponovo dolazi do smanjenja površina pod vinovom lozom. Ipak, smatra se da su Turci na ovo područje doneli neke ston sorte grožđa koje se i danas gaje, npr. Volovsko oko i Afuz-ali (Burić, 1972). Period od 17. do prve polovine 19. veka smatra se zlatnim dobom vinogradarstva, uprkos stalnim ratovima i krizama. U tom razdoblju, ljudi su suočeni sa naučnom i industrijskom revolucijom, različitim pronalascima i boljom komunikacijom. Vinogradarstvo se unapređuje, modernizuje i doživljava bitne transformacije (uvode se nove sorte, menjaju postupci sadnje, intenzivno se radi na hibridizaciji). Sredinom 19. veka nastupa najteži period evropskog vinogradarstva (filokserna kriza). Iz Severne Amerike prenet je insekt filoksera (*Phylloxera vastatrix*) koji napada koren vinove loze. Nakon nekoliko decenija borbe i uništenja velikog broja vinograda, ovaj problem je rešen kalemljenjem evropske, gajene loze na podloge nekih američkih vrsta i formiranjem hibrida koji su otporni na filokseru.

1.1.2. Rasprostranjenost vinove loze

Vinova loza se danas uspešno gaji širom sveta. Na godišnjem nivou proizvede se skoro 80 miliona tona. Ova biljna kultura raste na gotovo svim kontinentima, a posebno joj pogoduju umereni klimatski uslovi, zato je najviše ima u Aziji i Evropi (preko 70% od ukupne svetske proizvodnje). Sve do 2010. godine, centri gajenja vinove loze bile su evropske zemlje. Nakon toga, primat uzima Kina sa proizvodnjom od skoro 15 miliona tona vinove loze godišnje. Azijska proizvodnja vinove loze zasnovana je na stonim sortama, dok Italija, Španija i Francuska kao vodeći proizvođači vinove loze u Evropi, raspolažu značajnim vinskim sortimentom (**Slika 1**). Prema statističkim podacima Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija (eng. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO), ove tri evropske zemlje su samo tokom 2021. godine ostvarile proizvodnju od skoro 20 miliona tona vinove loze (FAO/STAT, 2021). Obzirom da se najveće količine uzgajane vinove loze (preko 90% u Francuskoj i Španiji, odnosno preko 80% u Italiji) utroši na proizvodnju vina, jasno je zbog čega se Evropa smatra centrom vinske industrije.

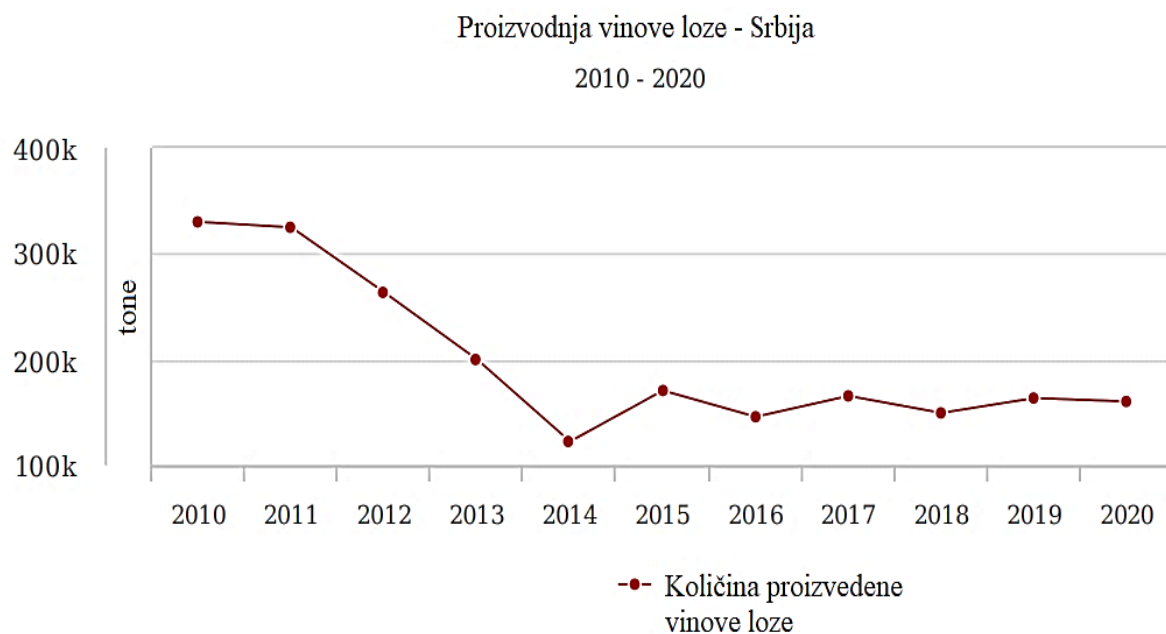


Slika 1. Rasprostranjenost vinove loze (preuzeto i prilagođeno (Međunarodna organizacija za vinovu lozu i vino (franc. *Organisation Internationale de la vigne et du vin*, (OIV, 2019))))

1.1.3. Vinova loza u Srbiji

Zahvaljujući povoljnom geografskom položaju koji se karakteriše umereno kontinentalnom klimom, Srbija ima dugu tradiciju uzgajanja vinove loze. Prema poslednjoj rejonizaciji vinogradarskih geografskih proizvodnih područja koju je izradilo Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije, naša zemlja je podeljena na 3 regiona- region Centralna Srbija, region Vojvodina i region Kosovo i Metohija. U okviru ova tri regiona nalaze se 22 rejona kojima pripada 77 vinogorja (Ivanišević i sar., 2015). Dominiraju uvedene zapadnoevropske sorte za kvalitetna bela i crvena vina. Od sorti koje se koriste za proizvodnju belih vina, najzastupljenije su Italijanski Rizling, Traminac, Rizling Rajnski, Sauvignon Blanc, Burgundac beli i Chardonay. Kada je reč o internacionalnim sortama za crvena vina, u Srbiji se najčešće gaje Gamay, Portugizer, Frankovka, Merlot, Burgundac crni i Cabernet Sauvignon. Stone sorte, poput Muscat Hamburg, Cardinal, Michele Palieri, slabije su zastupljene u sortimentu.

Na celoj teritoriji Srbije pod vinovom lozom se nalazi oko 20 hiljada hektara. Osamdesetih godina prošlog veka bilo je znatno više vinogradarskih površina, ali je kasnije izvršeno masovno uništavanje sadnica vinove loze. Nažalost, bez razvijenog programa kojim bi se sačuvao genetički potencijal, uništene su i značajne površine sa srpskim autohtonim i regionalnim sortama. Od 2015. godine, proizvodnja vinove loze u Srbiji je prilično stabilna (**Slika 2**).



Slika 2. Statistički podaci (FAO/STAT)- količine uzgajane vinove loze u Srbiji za period od 2010-2020. godine

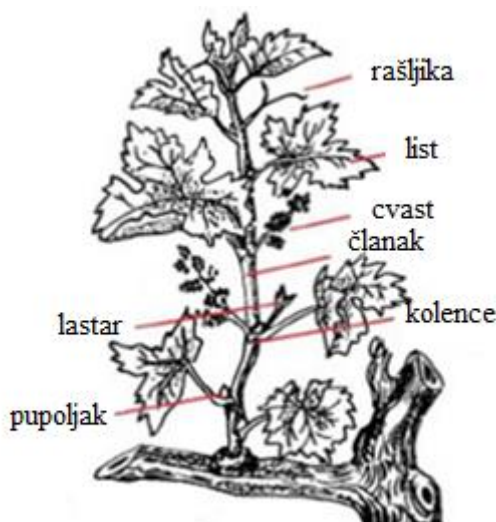
Iako dolazi do smanjenja vinogradarskih površina, tehnologija prerade grožđa se poslednjih godina unapređuje. Prateći svetske trendove, domaći proizvođači pomeraju fokus sa industrijske na selektivnu i kontrolisanu proizvodnju kvalitetnih vina. Koristi se klonski selekcionisan i sertifikovan sadni materijal i postepeno se uvode savremeni postupci u vinogradarsku praksu. To rezultira valorizacijom internacionalnih sorti i prepoznavanjem srpskih proizvođača vina i na svetskom tržištu.

Obzirom na globalnu razvijenost vinske industrije, a posebno na evropskom tržištu, jasno je da Srbija svojim skromnim učešćem ne može parirati vrhunskim proizvođačima. Ipak, ono što odlikuje

vinorodnu Srbiju je veliki broj autohtonih, regionalnih i domaćih novostvorenih sorti sa još uvek neistraženim potencijalom, zbog čega primarni cilj lokalnih proizvođača treba da bude očuvanje i razvoj vinogradarskih područja u kojima se te sorte gaje. Od belih domaćih sorti, danas su najznačajnije Smederevka, Tamjanika, Slankamenka i Kreaca, a od crvenih Prokupac, Skadarka, Tamjanika crna i Začinak.

1.1.4. Morfologija vinove loze

Vinova loza je višegodišnja, drvenasta biljka. Vegetativni organi su koren, stablo, lastari, listovi, pupoljci, okca i rašljike, dok u generativne organe spadaju cvasti sa cvetovima, bobice i semenke (Bešlić, 2019). List je značajan u sistematici, jer zahvaljujući svom polimorfizmu, predstavlja jedan od najpouzdanijih organa za identifikaciju sorti. Na osnovu izdeljenosti, list može biti trodelan, petodelan ili višedelan. Osim toga, listovi se razlikuju u pogledu oblika, veličine, maljavosti, boje, itd. Cvetovi su sitni, zeleni, sakupljeni u složene racemozne cvasti- metlice. Sa spoljašnje strane cveta je krug od pet čašičnih listića, drugi krug čine pet kruničnih listića, dok se pet prašnika nalazi u centru, kružno raspoređeni oko tučka. Tučak se razvija iz dva oplodna listića, a u svakom ima po dva semena zametka. Nakon oplodnje cvetova, iz cvasti se razvija grozd. Grozd vinove loze se sastoji od bobica i šepurine koja nastaje od glavne ose cvasti. Semenke se formiraju iz embrionove kese sa oplodnom jajnom ćelijom (Bešlić, 2019; Jančić & Lakušić, 2017; Žunić & Garić, 2010). Najvažniji organi vinove loze prikazani su na **Slici 3**.



Slika 3. Organi vinove loze

1.1.5. Sistematizacija vinove loze

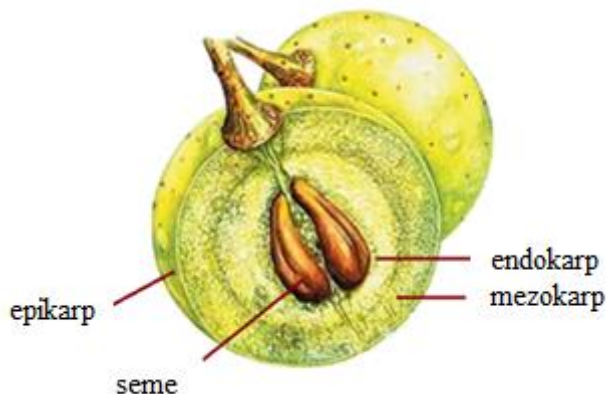
Detaljnije proučavanje sorti vinove loze, njihovo opisivanje i klasifikacija vezuju se za 19. vek. Sistematizovanje sorti vinove loze baziralo se na morfološkim karakteristikama različitih delova biljke: lista, grozda i bobice. Francuski botaničar i ampelograf *Pulliat* predložio je vreme sazrevanja ploda kao parametar za grupisanje sorti i ovakva sistematizacija je danas u širokoj upotrebi. Kao polazna osnova uzima se rana sorta Zlatna Šasla koja je vrlo zastupljena širom sveta. U odnosu na nju, sorte su podeljene u pet grupa: vrlo rane (sazrevaju pre Šasle); rane (sazrevaju otprilike u isto vreme kada i Šasla i pripadaju I epohi); srednje (sazrevaju oko dve nedelje nakon Šasle i pripadaju II epohi); pozne (sazrevaju četiri nedelje posle Šasle i pripadaju III epohi) i vrlo pozne (sazrevaju šest i više nedelja nakon Šasle i pripadaju IV epohi). Ovakva sistematizacija, bazirana na važnoj biološkoj osobini sorte, je vrlo jednostavna i u širokoj upotrebi budući da koristi vreme sazrevanja

jedne sorte kao etalon, pa se stoga može koristiti u različitim vinogradarskim regionima (Cindrić i sar., 2019)

Osim pomenutih klasifikacija, sorte se prema upotrebnoj vrednosti dele na stone i vinske sorte. Stone sorte se sistematizuju prema vremenu sazrevanja, dok vinske sorte podležu daljoj podeli na one za bela i crvena vina, te za visokokvalitetna, kvalitetna i obična vina. Sorte za visokokvalitetna vina odlikuju se visokim sadržajem šećera i specifičnom aromom. U tu grupu spadaju bele sorte poput Sauvignon Blanc, Chardonay, Tamjanika, Bagrina, odnosno crvene sorte kao što su Cabernet Sauvignon, Cabernet Fran, Burgundac crni, Vranac, Merlot. Sorte koje se koriste za proizvodnju kvalitetnih vina imaju manje šećera, i posledično niži sadržaj alkohola (ovoj grupi pripada bela sorta Smederevka, kao i crvene sorte Prokupac i Frankovka). Sorte za obična vina, poput Župljanke (bela sorta), daju velike prinose, ali po sadržaju šećera i organskih kiselina značajno su siromašnije od prve dve grupe. Postoje i tzv. bojadiseri, odnosno sorte za crvena vina koje se odlikuju prisustvom pigmenata u soku i toj grupi pripadaju sorte Gamay i Začinak. Široka rasprostranjenost vinove loze, kao i formiranje autohtonih sorti određenih regiona, usloveli su i sistematizaciju sorti prema geografskom poreklu.

1.2. Plod vinove loze (grožđe)

Plod vinove loze je bobica. Sva tri sloja perikarpa (epikarp, mezokarp i endokarp) bobice su sočna. Epikarp (pokožica ili spoljašnji omotač) čine epidermis i hipodermalni sloj. Epidermis ima sloj ćelija koje su pokrivene voštanom prevlakom (kutikulom) (Jančić & Lakušić, 2017). Anatomija ploda vinove loze data je na **Slici 4**.



Slika 4. Anatomija ploda vinove loze

Veličina i oblik bobice, boja pokožice, kao i čvrstina veze sa peteljkom su morfološke karakteristike određene biološkim odlikama vrste i sorte. Na osnovu oblika, bobica može biti spljoštena, okruglasta, ovalna i izdužena. Osim ovih osnovnih, postoje i specifični oblici- jajast, obrnuto jajast, kruškast, urmast, itd. Veličina bobice takođe zavisi od sorte vinove loze, agrotehničkih mera, klimatskih uslova; ipak, karakteristično je da vinske sorte imaju sitniju bobicu, dok se stone sorte odlikuju krupnim plodovima.

Od zametanja do pune zrelosti, bobica vinove loze prolazi kroz različite faze razvoja. Prva faza počinje odmah nakon oplodnje i karakteriše se intenzivnim rastom zelenih bobica i akumulacijom organskih kiselina (traje od 30 do 60 dana). Zelena boja bobica potiče od prisustva hlorofila u epidermalnom sloju pokožice. U drugoj fazi plod gubi hlorofil, zbog čega dolazi do promene boje bobica iz zelene u sortnu boju. Kod belih sorti grožđa dolazi do sinteze ksantofila, dok je stvaranje crveno-plavih pigmenata karakteristično za crvene sorte grožđa. Ovaj trenutak se označava kao šarak (franc. *véraison*), jer pokožica tada izgleda prošarano. Nakon šarka, odvija se treća faza rasta. Tada dolazi do intenzivnog priliva vode u parenhimske ćelije, usled čega bobice postaju sočnije i mekše. Osim toga, dolazi do promena u njihovom hemijskom sastavu; povećava se sadržaj šećera, povećava se sinteza polifenolnih i aromatičnih jedinjenja, a smanjuje se sadržaj kiselina. Bobica tada dostiže maksimalnu veličinu, a semenke započinju proces lignifikacije. Fiziološka zrelost bobice nastupa onog trenutka kada semenke završe svoj razvoj, potamne i dobiju sposobnost klijanja. Puna zrelost je momenat kada prestane nagomilavanje šećera, odnosno kada je sadržaj šećera maksimalan. Kada bobica sazri, spoljašnji sloj kutikule postaje amorfan, praškast, i tada se naziva pepeljak. Pepeljak se u punoj zrelosti ploda lako uočava kao sedefasta prevlaka na površini pokožice. Momenat pune zrelosti je sortno svojstvo, mada značajan uticaj imaju agroklimatski uslovi. Tehnološka zrelost je u trenutku kada grožđe dostigne stepen zrelosti koji je najpogodniji za određenu namenu (Korać i sar., 2016).

Pulpa, meso (mezokarp) grožđa zauzima najveći deo zrelog ploda, od 75 do čak 90% (Vujović, 2013). Mezokarp čine krupne ćelije, sa velikim vakuolama i tankim opnama, veoma bogate vodom. Ceđenjem ovih ćelija izdvaja se sok koji se naziva šira i koji je najčešće bezbojan. Jedino je kod bojadisera meso ploda crveno i zato se ovo grožđe često dodaje kako bi se povećao intenzitet boje crvenih vina.

Pokožica čini od 9 do 20% od ukupne mase zrelog ploda vinove loze (Vujović, 2013). Vinske sorte grožđa karakterišu se debljom pokožicom, stoga je i udeo ovog dela u ukupnoj masi ploda veći nego što je to slučaj kod stonih sorti. U ovom delu ploda nalaze se mirisne materije odgovorne za miris i aromu vina. Pokožica crvenih sorti je najčešće tamno plave boje, dok kod belih sorti veoma varira, pa tako postoje različite nijanse zelene, ćilibarne i žute.

U središtu ploda nalaze se **semenke**. One zauzimaju najmanji deo zrelog ploda (2-6%), ali su biološki veoma vredne zbog visoke koncentracije biološki aktivnih sastojaka (Vujović, 2013). Oplodena bobica vinove loze sadrži maksimalno četiri semenke; njihov broj je najčešće manji usled nepotpune oplodnje (Radovanović, 1986). Postoje i sorte bez semena, one se najčešće suše ili konzumiraju u svežem stanju.

1.2.1. Ulje iz semenki grožđa

Ulje iz semenki grožđa karakteriše se izuzetnim fizičko-hemijskim i senzornim osobinama. Blagotvorno delovanje ovog ulja poznato je još od 14. veka kada je u Španiji jedan arapski lekar propisao kralju Ferdinandu IV njegovu upotrebu u terapiji kožnih oboljenja. Zadovoljan učinkom, kralj je odlučio da zaštiti sastav ulja nazivajući ga „kraljevskim uljem”, ili „uljem prestola” (Sotiropoulou i sar., 2015).

Sadržaj ulja u semenkama varira, u zavisnosti od sorte vinove loze, zatim stepena zrelosti ploda, agrotehnoških i klimatskih uslova (Mironeasa i sar., 2010). Prema dostupnoj literaturi, sadržaj ulja u semenkama *Vitis vinifera* vrste kreće se u širokom opsegu, od 4 do 20% (Beveridge i sar., 2005; Crews i sar., 2006; Fernandes i sar., 2013; Matthäus, 2008; Tangolar i sar., 2009). Osim toga, i sâm tehnološki postupak koji se koristi za izdvajanje ulja utiče na prinos.

Izdvajanje ulja iz semenki može se vršiti na nekoliko različitih načina- hemijskim putem, natkritičnom ekstrakcijom sa CO₂, destilacijom, mehaničkim metodama (Mariana i sar., 2013). Mehaničkim metodama (pužna i hidraulična presa) dobija se najkvalitetnije ulje, ali je prinos veoma nizak, budući da velike količine zaostaju u pogači. Takođe, ovako dobijeno ulje je podložno mikrobiološkom kvarenju zbog visokog sadržaja vlage (Matthäus, 2008). Sa druge strane, ekstrakcija ulja rastvaračem je znatno efikasnija, i značajnija sa ekonomskog aspekta. Presovanje, a zatim ekstrakcija rastvaračem je postupak kojim se na globalnom nivou proizvodi više od polovine biljnog ulja. Nakon ekstrakcije rastvaračem (najčešće je u upotrebi heksan), ulje mora biti podvrgnuto procesu rafinacije kako bi se prečistilo od brojnih nečistoća, ali i od prisustva rastvarača. Proces rafinacije negativno utiče na senzorne karakteristike ulja, kao i na sadržaj biološki aktivnih jedinjenja. Rafinisano ulje je neutralnog mirisa i ukusa, dok se devičansko odlikuje prijatnom vinskom i voćnom aromom (Matthäus, 2008).

Ulje iz semenki grožđa obično je zelenkaste do zlatno-žute boje, dok pri dužem čuvanju boja može preći u braon. Izuzetno je stabilno na visokim temperaturama, ima visoku tačku dimljenja (216 °C) i prilikom prženja dolazi do blagog povećanja viskoziteta (Da Porto i sar., 2013). Neočekivano visoka tačka dimljenja dovodi se u vezu sa prisustvom značajnih količina zasićenih masnih kiselina. Zbog navedenih karakteristika, ulje iz semenki grožđa je našlo široku primenu u prehrambenoj industriji, dok je hladno ceđeno ulje veoma popularno u kozmetičkoj industriji.

1.3. Hemijski sastav ploda vinove loze

Plod vinove loze je bio predmet istraživanja velikog broja studija (Aubert & Chalot, 2018; Rolle i sar., 2011; Segade i sar., 2013). Pokazano je da sortna varijabilnost ima najveći uticaj na sadržaj i sastav nutritivnih i nenutritivnih komponenti u grožđu. Osim toga, brojni spoljašnji faktori, poput klimatskih uslova, primenjenih agrotehničkih mera tokom uzgajanja, uslova zemljišta, stepena zrelosti, itd., mogu definisati sastav bobice (Adams, 2006).

Generalno, grožđe se kategoriše kao voće bogato ugljenim hidratima (17%), relativno niskog glikemijskog indeksa (najčešće ispod 50) i visoke energetske vrednosti, oko 65 kcal/100g (Unusan, 2020). U zrelom plodu, sadržaj glukoze i fruktoze je jednak, dok je u prezrelom plodu dominantnija fruktoza. Šećeri se akumuliraju u vakuolama, vrlo često u formi glikozida (vezuju se za druge komponente poput antocijana). Oligosaharidi i polisaharidi se mogu naći u ćelijskom zidu.

Kada je reč o azotnim jedinjenjima, njihov sadržaj u grožđu je jako bitan, jer kao i sadržaj šećera predstavlja metabolički faktor od kog zavisi brzina fermentacije. Najveći procenat ovih jedinjenja predstavljaju slobodne amino-kiseline L-konfiguracije (50-90%), i to: alanin, γ -aminobuterna kiselina, arginin, glutaminska kiselina, prolin, serin i treonin. Prolin i arginin su najzastupljenije (Stines i sar., 2000). Sadržaj proteina u plodu vinove loze je oko 0,7 g u 100 g grožđa (*USDA FoodData Central*).

Procenat lipida u plodu vinove loze je jako nizak, sva količina nalazi se u semenkama koje predstavljaju dobar izvor ulja. Voskovi su u vidu pepeljaste prevlake prisutni na površini ploda, i njihova uloga je da štite bobicu od isušivanja tokom sušnih dana, odnosno od pojave plesni u kišnom periodu (Radovanović, 1986).

Grožđe sadrži i značajne količine alifatičnih organskih kiselina.

Plod vinove loze je bogat izvor kalijuma, gvožđa, magnezijuma i mangana. Kada je reč o vitaminima, vitamin C je dominantan, ali treba imati u vidu i prisustvo vitamina B grupe, naročito vitamina B6 i vitamina B1 (Unusan, 2020). Semenke grožđa su izvor vrednih liposolubilnih vitamina, posebno vitamina E.

Značajno je naglasiti da se delovi ploda vinove loze međusobno značajno razlikuju po svom hemijskom sastavu.

Pulpa (mezokarp) grožđa sadrži najveći procenat vode, oko 80%. Šira koja nastaje ceđenjem ploda odlikuje se velikom količinom šećera. U zavisnosti od sorte vinove loze, klimatskih uslova i primenjene agrotehnike, sadržaj šećera u širi kreće se u širokom opsegu, od 160 do 250 g/L. Organske kiseline su takođe važan sastojak šire i značajno utiču na njen kvalitet. Najzastupljenije su vinska i jabučna kiselina (više od 90% od ukupnih), dok su u manjem procentu prisutne limunska i sirćetna kiselina. Nezreli plodovi sadrže i oksalnu kiselinu. Sadržaj organskih kiselina u širi je sortno uslovljen, pa se tako sorte za kvalitetnija vina odlikuju većom kiselošću. Širu karakteriše i prisustvo brojnih azotnih jedinjenja i isparljivih materija (Blesic i sar., 2013).

Pokožica grožđa sadrži veliki procenat vode. Ovaj deo ploda, analogno pulpi, akumulira dosta šećera. Celuloza, pektini, smole i sluzi su takođe prisutni, kao i organske kiseline. Za pokožicu je karakteristično prisustvo aromatičnih jedinjenja koja su odgovorna za primarnu sortnu aromu.

Semenke grožđa su karakterističnog i veoma složenog hemijskog sastava. Predstavljaju dobar izvor vlakana (do 44%), sadrže oko 10% lipida, 10% proteina, oko 6% vlage, 4,1% skroba i 2,9% pepela (P. U. Rao, 1994). Sa aspekta iskoristljivosti, najznačajnije je ulje koje se dobija iz semenki grožđa.

1.3.1. Hemijski sastav ulja iz semenki grožđa

Hemijski sastav ulja iz semenki grožđa zavisi od velikog broja faktora, a najznačajniji je uticaj faktora sredine i stepena zrelosti semenki (Garavaglia i sar., 2016). Nezasićene masne kiseline su najzastupljenije, obično u formi triacilglicerola. Generalno, u najvećim količinama prisutan je trilinolein (do 41,8%), zatim, palmitodilinolein, oleodilinolein, dioleolinolein, palmitooleolinolein i stearooleolinolein/triolein (Bail i sar., 2008). Osim triacilglicerola (procentualna zastupljenost od 89,5 do 99,3%), u uljima iz semenki grožđa nalaze se i neznatne količine monoacilglicerola, diacilglicerola i slobodnih masnih kiselina. Ostatak pripada neosapunjivim materijama, pre svega sterolima. Tokoferoli i tokotrienoli su takođe prisutni, i to značajno više u ulju dobijenom hladnim ceđenjem (Rombaut i sar., 2014).

1.3.1.1. Masne kiseline

Osnovnu strukturu svih masnih kiselina čini lanac ugljenikovih atoma koji se završava karboksilnom grupom. Masne kiseline mogu se klasifikovati na osnovu odsustva, odnosno prisustva dvostrukih veza u lancu, pa tako postoje zasićene (eng. *Saturated Fatty Acids*, SFA) i nezasićene masne kiseline (eng. *Unsaturated Fatty Acids*, UFA). Broj dvostrukih veza definiše podelu na mononezasićene (eng. *MonoUnsaturated Fatty Acids*, MUFA) sa jednom dvostrukom vezom i polinezasićene (eng. *PolyUnsaturated Fatty Acids*, PUFA) koje u svojoj strukturi imaju dve ili više dvostrukih veza. Nezasićene masne kiseline podležu i geometrijskoj izomeriji, pa se prema prostornom rasporedu kiselinskih ostataka oko dvostruke veze dele na *cis* i *trans* izomere (Stanimirović, 1988). U prirodi se uglavnom nalaze *cis* izomeri (izuzetak je mlečna mast koja sadrži *trans* masne kiseline), dok *trans* izomeri nastaju metaboličkim procesima (mikrobiološkom aktivnošću u želucu preživara), tokom industrijskih postupaka (npr. biohidrogenizacijom ulja) ili termičkom obradom na visokim temperaturama (Calder, 2015).

Nezasićene masne kiseline se obeležavaju na dva načina. Prema IUPAC (eng. *International Union of Pure and Applied Chemistry*) nomenklaturi, numeracija C atoma vrši se od karboksilne grupe (delta kraj), dok numeracija C atoma od metil grupe (omega kraja) predstavlja ECC (eng. *End of Carbon Chain*) obeležavanje. U **Tabeli 1** su date neke od najznačajnijih masnih kiselina.

Fizičko-hemijske karakteristike masnih kiselina zavise pre svega od zasićenosti molekula. Nezasićene masne kiseline se uglavnom nalaze u namirnicama biljnog porekla i tečnog su agregatnog stanja. Prisustvo dvostrukih veza čini molekul nestabilnijim, i podložnim različitim hemijskim reakcijama. Takođe, sa porastom broja dvostrukih veza dolazi do snižavanja temperature topljenja. Osim zasićenosti, na osobine masnih kiselina veliki uticaj ima i geometrijska izomerija. *Cis* i *trans* oblici se tako značajno razlikuju, pre svega prema temperaturi topljenja i načinu metabolizma. *Cis* izomeri imaju nižu temperaturu topljenja, dok su *trans* oblici termodinamički stabilniji. U organizmu se *trans* masne kiseline metabolišu kao zasićene zbog čega se dovode u vezu sa razvojem brojnih patoloških stanja.

Masne kiseline koje se ne mogu sintetisati u organizmu, već se moraju unositi hranom, nazivaju se esencijalnim. U ovu grupu spadaju linolna (C 18:2) i α -linolenska kiselina (C 18:3). Prva pripada omega-6 seriji, dok se druga kategoriše kao omega-3 masna kiselina. Enzimskim reakcijama u organizmu dolazi do njihove konverzije u dugolančane masne kiseline sa većim brojem dvostrukih veza.

Tabela 1. Najznačajnije masne kiseline, njihovi nazivi, numeričke oznake i hemijska struktura

Naziv	Hemijski naziv	Oznaka	Struktura
Zasićene masne kiseline			
Palmitinska kiselina	Hekšadekanska	C 16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Stearinska kiselina	Oktadekanska	C 18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
Mononezasićene masne kiseline			
Palmitoleinska kiselina	9-hekšadecenska	C 16:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Oleinska kiselina	9-oktadecenska	C 18:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Polinezasićene masne kiseline			
Linolna kiselina	9,12-oktadekadienska	C 18:2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
α -linolenska kiselina	9,12,15-oktadekatrienska	C 18:3	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Arahidonska kiselina	5,8,11,14-eikozatetraenska	C 20:4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
Eikozapentaenska kiselina	5,8,11,14,17-eikozapentaenska	C 20:5	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$
Dokozaheksaenska kiselina	4,7,10,13,16,19-dokozaheksaenska	C 22:6	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_6\text{CH}_2\text{COOH}$

Ulje iz semenki grožđa pripada uljima koja u sebi sadrže najveći procenat polinezasićenih masnih kiselina, zahvaljujući visokoj zastupljenosti esencijalne linolne kiseline. Sadržaj ove kiseline u ulju iz semenki grožđa je veći od 60%. Pored linolne, u većim količinama nalazi se oleinska kiselina. Prisutne su i zasićene masne kiseline, palmitinska i stearinska. Ostale masne kiseline, poput α -linolenske, nalaze se u tragovima.

1.4. Najvažniji bioaktivni sastojci ploda vinove loze

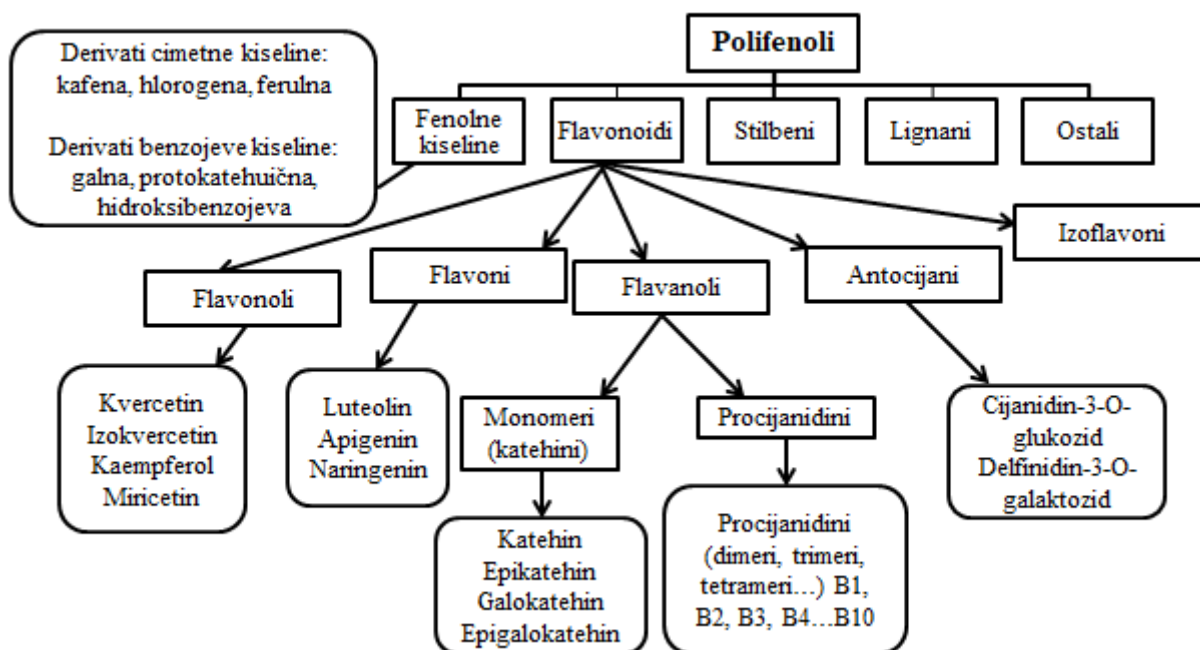
Plod vinove loze nalazi se u fokusu mnogobrojnih istraživanja, pre svega zbog prisustva različitih biološki aktivnih jedinjenja. Generalno, polifenoli su najzastupljeniji, i nalaze se u svim delovima ploda. Pored toga, semenke grožđa su bogate uljem koje predstavlja izvor nezasićenih masnih kiselina, tokoferola i fitosterola. Poslednjih godina, uporedo sa povećanjem svesti o značaju zaštite životne sredine, pažnja naučne javnosti usmerena je ka ekstrakciji kako hidrofилnih, tako i lipofilnih frakcija iz komine koja zaostaje u vinskoj industriji. Ovi ekstrakti predstavljaju koncentrovane izvore biološki aktivnih jedinjenja i mogu se koristiti u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji za dobijanje proizvoda sa dodatom vrednošću.

1.4.1. Polifenolna jedinjenja

Polifenoli se sintetišu kao sekundarni metaboliti fenilpropanoidnim putem iz amino-kiseline fenilalanina. Fenilalanin je produkt šikimatnog puta koji povezuje metabolizam ugljenih hidrata i biosintezu aromatičnih amino-kiselina i sekundarnih metabolita. Fenilpropanoidni put se završava na dva načina- iz 4-kumaroil-CoA delovanjem halkon sintaze nastaju flavonoidi, ili pod uticajem stilben sintaze nastaju stilbeni. Aktivnost halkon sintaze raste sa zrenjem ploda, zbog čega zreli plodovi imaju visok sadržaj flavonoida (očigledan primer je sadržaj antocijana u pokožici crvenih sorti). Sa druge strane, aktivnost stilben sintaze slabi, pa su zreli plodovi siromašniji u stilbenu rezveratrolu (Iriti & Faoro, 2009).

Polifenoli se češće javljaju u formi glikozida ili estara, manje u slobodnom obliku (Vermerris & Nicholson, 2008). Njihova sinteza dešava se u različitim delovima biljke u fiziološkim uslovima, ali i kao odgovor na spoljašnje uticaje poput fizičkih oštećenja, toksičnih metala, infekcija, UV zračenja, itd. Ova jedinjenja predstavljaju signalne molekule i regulišu rast, razvoj i reprodukciju biljaka (Treutter, 2006). Osim toga, odgovorna su i za organoleptičke osobine biljke, poput mirisa, ukusa i boje.

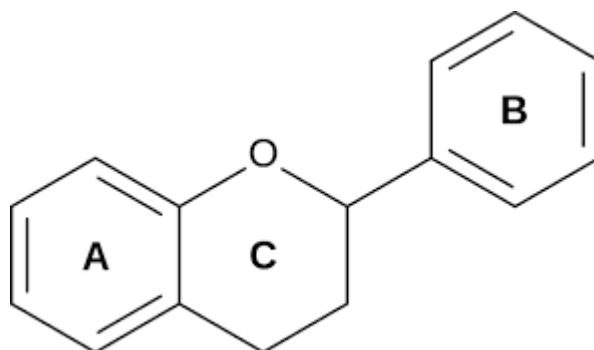
Do danas je otkriveno preko 8000 različitih polifenolnih jedinjenja. U osnovi polifenolne strukture nalazi se jedan ili više aromatičnih prstenova supstituisanih hidroksilnim grupama i drugim supstituentima. Velika raznolikost uslovlja je postojanje više različitih načina klasifikacije, stoga se podela polifenola može izvršiti na osnovu hemijske strukture, biološke funkcije, rastvorljivosti, poreklu, i lokaciji u biljkama. Bazična podela polifenolnih jedinjenja na flavonoide i neflavonoide izvršena je na osnovu broja aromatičnih prstenova i načina njihovog povezivanja (Teixeira i sar., 2013). Na **Slici 5** prikazan je primer detaljnije podele bazirane na hemijskoj strukturi polifenolnih jedinjenja (Belščak-Cvitanović i sar., 2018).



Slika 5. Klasifikacija polifenolnih jedinjenja na osnovu hemijske strukture (preuzeto i prilagođeno (Belščak-Cvitanović i sar., 2018))

1.4.1.1. Flavonoidi

Flavonoidi su najzastupljeniji sekundarni metaboliti u biljkama. Do danas je identifikovano preko 6000 različitih struktura (Dias i sar., 2021). Hemijska osnova ovih jedinjenja je flavan koji se sastoji od 15 ugljenikovih atoma. Benzenski prsten A kondenzovan je sa piranskim prstenom C, dok je benzenski prsten B povezan sa konjugovanom benzopiranskom strukturom na poziciji 2. Osnovna struktura flavonoida data je na **Slici 6**.



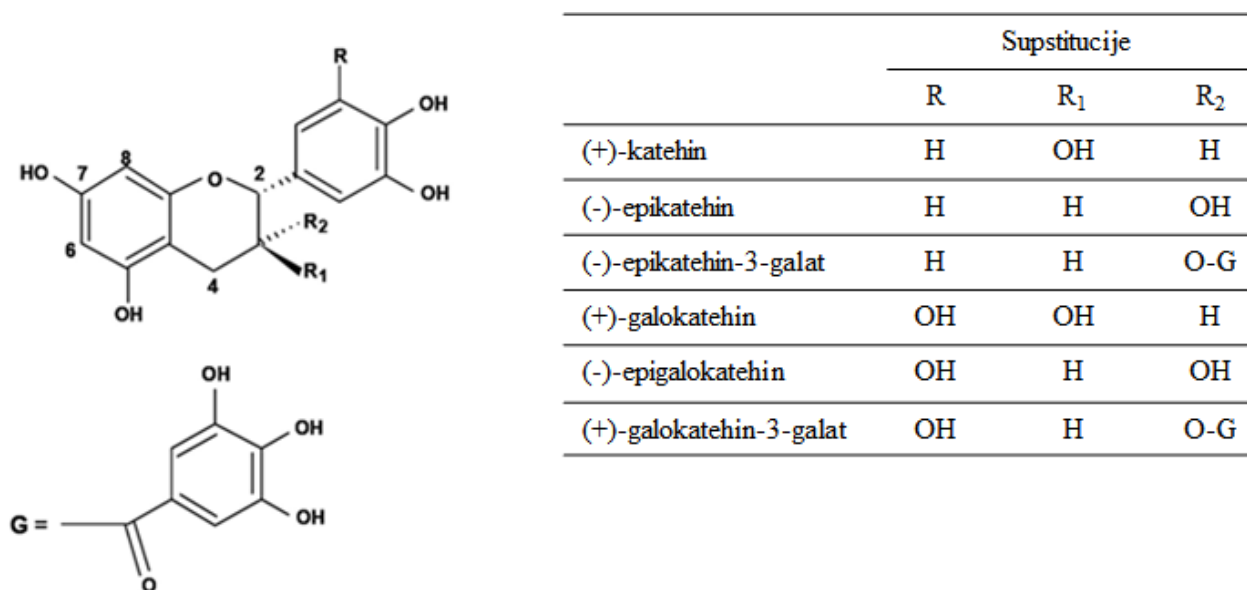
Slika 6. Osnovna struktura flavonoida

Razlike u stepenu zasićenosti C-prstena, zatim supstitucije u položaju 3, kao i hidroksilacije prstena uslovljavaju izuzetnu raznovrsnost flavonoida (Vauzour, 2012). U grožđu su u značajnijim količinama pronađeni flavan-3-oli, antocijani i flavonoli.

Flavan-3-oli

Flavan-3-oli predstavljaju najznačajniju podklasu flavonoida. Njihovu strukturu karakteriše hidroksilna grupa u položaju 3 benzopiranskog prstena. Flavan-3-oli vrlo često stupaju u reakcije sa galnom kiselinom pri čemu nastaju galati. Kondenzacijom monomernih oblika stvaraju se proantocijanidini, odnosno kondenzovani tanini. Polimerni oblici sadrže od 2 do 60 monomernih jedinica i odgovorni su za izrazito opor i adstringentan ukus pojedinih sorti vinove loze. Najčešće nastaju povezivanjem monomernih flavan-3-ola na mestima C4-C8 ili C4-C6.

Najznačajnija monomerna jedinjenja iz grupe flavan-3-ola prisutna u plodu vinove loze data su na **Slici 7**.

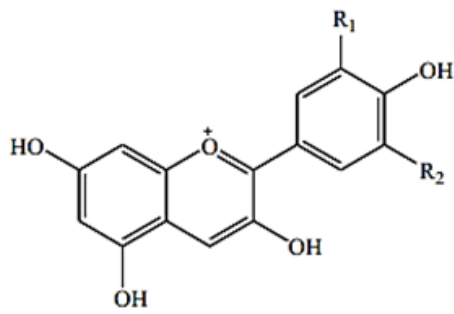


Slika 7. Hemijske strukture najznačajnijih monomernih flavan-3-ola u plodu vinove loze

Antocijani

Antocijani (grč. *ἄνθος*, cvet; grč. *κρᾶνός*, plav) su polarni molekuli i najčešće se nalaze u obliku glikozida flavonijum katjona (2-fenilbenzopirilijum). Glikozilacija molekula na položajima C3 i C5 značajno utiče na percepciju boje, pa su tako intenzivnije obojeni molekuli sa jednom šećernom komponentom u položaju 3, nego 3,5 diglikozidi. Acetilovanje glukoze dodatno povećava stabilnost molekula (Mazza & Brouillard, 1987). Antocijani predstavljaju prirodne biljne pigmente odgovorne za oranž, crvenu, plavu i purpurnu boju velikog broja biljaka. Svaki molekul ima svoju karakterističnu nijansu, npr. delfinidin je plavičasto-crvene boje, dok je cijanidin povezan sa crvenkastom bojom. Zahvaljujući njihovom prisustvu, atraktivna boja privlači insekte, dolazi do oprašivanja i raznošenja semena čime se omogućava opstanak biljne vrste. Osim toga, ova jedinjenja su snažni fitoaleksini, štite biljku od patogena, fizičkih oštećenja, UV zračenja, slobodnih radikala, itd. Imaju ulogu i u modulaciji signalnih puteva (Flamini i sar., 2013).

U plodu *Vitis vinifera* vrsta nalaze se samo 3-O-glikozidi, kao posledica mutacije gena odgovornog za sintezu enzima koji je neophodan za glikozilaciju u položaju 5 (Jánváry i sar., 2009). Najznačajnija jedinjenja iz grupe antocijana prisutna u plodu vinove loze data su na **Slici 8**.



	Supstitucije		boja
	R	R ₁	
cijanidin	OH	H	narandžasto-crvena
delfinidin	OH	OH	plavičasto-crvena
malvidin	OCH ₃	OCH ₃	plavičasto-crvena
pelargonidin	H	H	narandžasta
peonidin	OCH ₃	H	crvena
petunidin	OCH ₃	OH	plavičasto-crvena

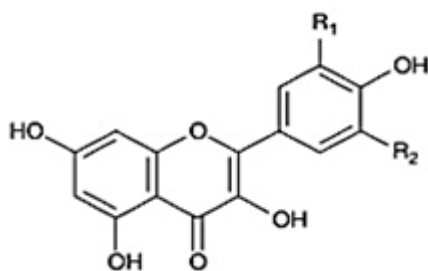
Slika 8. Hemijske strukture najznačajnijih antocijana u plodu vinove loze

Sadržaj antocijana u grožđu zavisi od velikog broja faktora, poput vrste zemljišta, klimatskih uslova, načina gajenja, itd. Sortna varijabilnost u najvećoj meri utiče na antocijanski profil.

Flavonoli

Flavonoli su pigmenti žute boje kojima pripadaju sva jedinjenja koja u osnovi imaju 3-hidroksiflavon, a međusobno se razlikuju u zavisnosti od broja i prirode supstituenata na B prstenu. Smatra se da prisustvo flavonola doprinosi gorkom ukusu namirnica (Rodríguez Montealegre i sar., 2006).

Flavonoli su značajna komponenta ploda vinove loze (**Slika 9**).



	Supstitucije	
	R	R ₁
kaempferol	H	H
kvercetin	OH	H
miricetin	OH	OH
izoramnetin	OCH ₃	H

Slika 9. Hemijske strukture najznačajnijih flavonola u plodu vinove loze

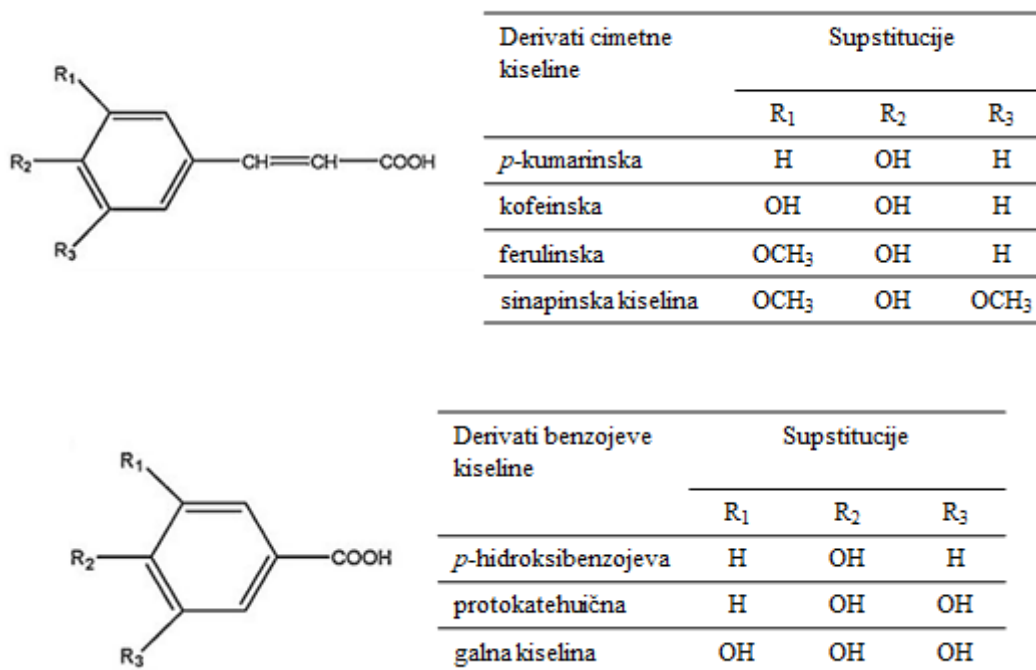
Najveći uticaj na sadržaj i sastav flavonola u grožđu imaju klimatski uslovi. Sintaza ovih jedinjenja je intenzivnija kod biljaka koje rastu u toplijim krajevima, odnosno kod onih koje su izložene sunčevoj svetlosti, što je i očekivano, budući da flavonoli imaju značajnu ulogu u zaštiti biljaka od svetlosti i UV zračenja (Flamini i sar., 2013).

1.4.1.2. Neflavonoidi

Fenolne kiseline i stilbeni su najznačajniji iz grupe neflavonoida i ova jedinjenja se karakterišu jednostavnim strukturama. Sadržaj svih neflavonoidnih jedinjenja u najvećoj meri zavisi od sorte vinove loze.

Fenolne kiseline

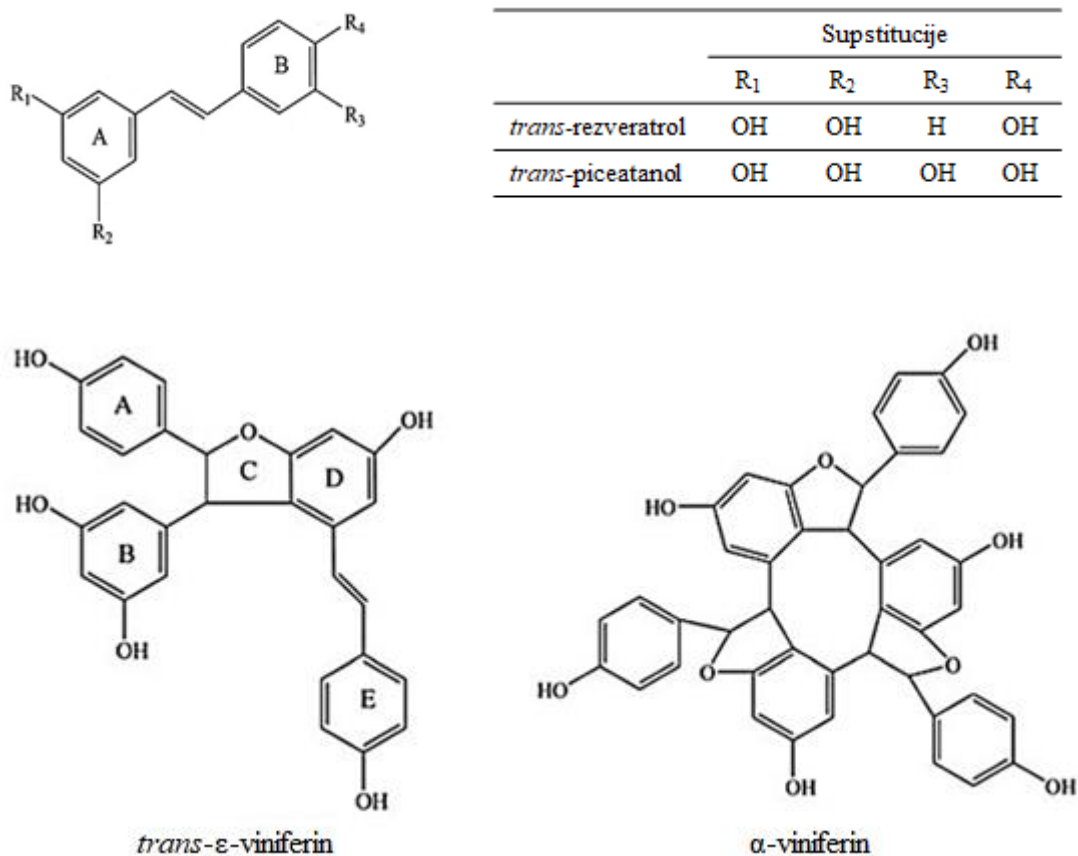
Fenolne kiseline sadrže fenolni prsten za koji je vezan bočni niz i dele se na hidrokscimetne kiseline (C6-C3 struktura) i hidroksibenzojeve kiseline (C6-C1 struktura), odnosno njihove derivate. Ova jedinjenja se u grožđu nalaze slobodna, ili češće u konjugovanoj formi, u vidu estara vinske kiseline (Cosme i sar., 2018) (**Slika 10**).



Slika 10. Hemijske strukture najznačajnijih fenolnih kiselina u plodu vinove loze

Stilbeni

Stilbene karakteriše jednostavna struktura- C6-C2-C6. Ova jedinjenja predstavljaju značajne fitoaleksine vinove loze. Pored monomera, prisutni su oligomeri, odnosno polimeri ovih jedinjenja- viniferini. Viniferini nastaju polimerizacijom rezveratrola delovanjem enzima peroksidaze (Jean-Denis i sar., 2006). Na **Slici 11** dati su najznačajniji predstavnici stilbena u plodu vinove loze.



Slika 11. Hemijske strukture najznačajnijih stilbena u plodu vinove loze

1.4.1.3. Distribucija polifenolnih jedinjenja u plodu vinove loze

Polifenolna jedinjenja su različito distribuirana u različitim delovima ploda vinove loze. U **Tabeli 2** su sumirani do sada najznačajniji literaturni podaci o sastavu i sadržaju polifenolnih jedinjenja u grožđu.

Tabela 2. Najznačajniji literaturni podaci o sadržaju polifenola u pojedinim delovima grožđa

Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja određen spektrofotometrijskom metodom					
Pulpa	Semenke	Pokožica	Jedinica	Poreklo	Referenca
Bele sorte vinove loze					
1,46-1,92	108-109	8,71-29,9	mg GAE/g svežeg uzorka	Makedonija	(Ivanova i sar., 2011)
		435-1294	mg GAE/kg	Hrvatska	(Katalinić i sar., 2010)
0,07-0,15	47,55-96,89	0,39-3,71	mg GAE/g zamrznutog uzorka (pokožica i pulpa)/suvog uzorka (sem.)	Srbija	(Pantelić i sar., 2016)
0,40-0,82	116-183	22,7-49,3	g GAE/kg suvog uzorka (semenke i pokožica)/L (pulpa)	Italija	(Baiano & Terracone, 2011)
Crvene sorte vinove loze					
2,17-2,32	124-139	33,3-48,3	mg GAE/g svežeg uzorka	Makedonija	(Ivanova i sar., 2011)
		63,2-129	mg GAE/g	Čile	(Lutz i sar., 2011)
		731-3486	mg GAE/kg	Hrvatska	(Katalinić i sar., 2010)
0,07-0,20	38,02-102,98	7,21-12,32	mg GAE/g zamrznutog uzorka (pokožica i pulpa)/suvog uzorka (sem.)	Srbija	(Pantelić i sar., 2016)
	15,79-19,79	0,57-40,20	mg GAE/g suvog uzorka	Iran	(Farhadi i sar., 2016)
	8,5-22,5	0,8-2,9	mg GAE/g suvog uzorka	Čile	(Obreque-Slier i sar., 2010)
	99,28	25,24	mg GAE/g suvog uzorka	Kina	(Xu i sar., 2010)
0,35-0,62	111-189	33,1-62,9	g GAE/kg suvog uzorka (semenke i pokožica)/L (pulpa)	Italija	(Baiano & Terracone, 2011)

*GAE- eng. *Gallic Acid Equivalents*

Pulpa ploda sadrži najmanje polifenolnih jedinjenja. U nešto većem procentu prisutne su fenolne kiseline, polifenolna jedinjenja iz grupe neflavonoida. Hidroksicimetine kiseline su zastupljenije, i to kofeinska i ferulinska kiselina, a u manjem procentu *p*-kumarinska. Derivati hidroksibenzojeve kiseline su prisutni u značajno manjim količinama.

U pokožici grožđa se sintetišu specifična polifenolna jedinjenja, i ovaj deo ploda se karakteriše najvećom varijabilnošću. Antocijani se nalaze pre svega u pokožici crvenih sorti grožđa. Vrlo često su locirani zajedno sa taninima u ćelijama hipodermalnog sloja pokožice (Conde i sar., 2007). Osim antocijana, pokožica sadrži značajne količine flavonola. Kvercetin, kaempferol i u manjoj meri

izoramnetin su prisutni i u belim i u crvenim sortama vinove loze, dok je miricetin svojstven crvenom grožđu (Zhu i sar., 2012). Iako se stilbeni najviše akumuliraju u korenu, izdancima i lišću, nezanemarljive količine nalaze se i u pokožici ploda vinove loze (Flamini i sar., 2013; Zhu i sar., 2012). Rezveratrol (monomer) je najznačajniji predstavnik ove grupe.

Najviše polifenolnih jedinjenja skoncentrisano je u semenkama grožđa. Ovaj deo ploda pre svega karakteriše prisustvo monomernih i polimernih oblika flavan-3-ola. Najzastupljeniji monomerni oblici u semenkama grožđa su (+)-katehin, (-)-epikatehin i epikatehin-3-galat (Mander, 2010; Unusan, 2020).

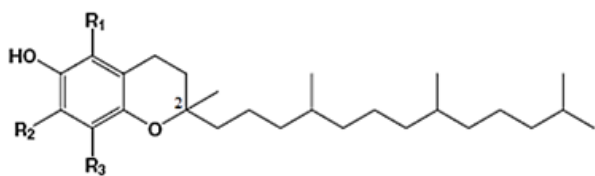
Ulje iz semenki grožđa sadrži male količine polifenola. Ipak, ova jedinjenja značajno doprinose, ne samo senzornom ukusu, već i oksidativnoj stabilnosti ulja. Jedno istraživanje je pokazalo da ulje dobijeno iz semenki belih sorti ima manje polifenolnih jedinjenja od ulja iz crvenih sorti (Bail i sar., 2008).

1.4.2. Ostali bioaktivni sastojci semenki grožđa

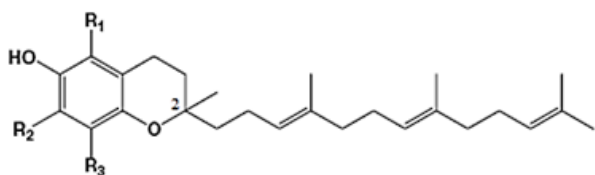
Ulje iz semenki grožđa sadrži biološki aktivne lipofilne konstituente, poput esencijalne linolne kiseline, tokoferola i fitosterola.

Linolna kiselina ima brojne uloge u organizmu. Predstavlja izvor energije. Osim toga, može se esterifikovati i formirati neutralne i polarne lipide kao što su fosfolipidi, triacilgliceroli i estri holesterola. Kao deo membranskih fosfolipida, linolna kiselina funkcioniše kao strukturna komponenta za održavanje određenog nivoa fluidnosti ćelijske membrane. Kada se oslobodi iz membranskih fosfolipida, može biti enzimski metabolisana u različite derivate koji su uključeni u brojne fiziološke procese. Reakcijama elongacije i desaturacije dolazi do njene konverzije u arahidonsku kiselinu (eng. *Arachidonic Acid*, ARA), koja je prekursor eikozanoida. Eikozanoidi imaju važnu ulogu u razvoju inflamacije, budući da nastaju kao odgovor na oštećenje ili izlaganje nekom štetnom uticaju. Kontrolisani i odgovarajući inflamatorni odgovor je poželjan u akutnim stanjima (Fredman & Tabas, 2017). Sa druge strane, intenzivan inflamatorni odgovor može rezultirati nastankom određenih patoloških stanja (Dennis & Norris, 2015).

Ulje iz semenki grožđa je važan izvor vitamina E. Vitamin E je liposolubilni vitamin i obuhvata osam jedinjenja različitih hemijskih struktura- četiri tokoferola i četiri tokotrienola (Traber & Packer, 1995). U osnovi strukture vitamina E nalazi se hromanski prsten i izoprenski bočni lanac (**Slika 12**). Razlika između dve klase vitamina E je u bočnom lancu koji je kod tokoferola zasićen, a kod tokotrienola nezasićen. U zavisnosti od rasporeda supstituenata na hromanskom prstenu, razlikuju se α , β , γ i δ izomeri. Humani organizam nema sposobnost sinteze ovih jedinjenja, zbog čega se odgovarajuće koncentracije vitamina E u organizmu postižu dijetarnim unosom i suplementacijom (najčešće u obliku α -tokoferil acetata).



	Supstitucije		
	R ₁	R ₂	R ₃
α -tokoferol	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β -tokoferol	CH ₃	H	CH ₃
γ -tokoferol	H	CH ₃	CH ₃
δ -tokoferol	H	H	CH ₃



	Supstitucije		
	R ₁	R ₂	R ₃
α -tokotrienol	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β -tokotrienol	CH ₃	H	CH ₃
γ -tokotrienol	H	CH ₃	CH ₃
δ -tokotrienol	H	H	CH ₃

Slika 12. Hemijske strukture individualnih izoformi vitamina E

Smatra se da 100 grama nerafinisanog ulja iz semenki grožđa sadrži do 50 mg vitamina E (Martin i sar., 2020). Sortna varijabilnost i uslovi gajenja vinove loze u velikoj meri utiču na sadržaj vitamina E; u literaturi su dostupni različiti podaci o količini ovog vitamina u ulju iz semenki grožđa (Beveridge i sar., 2005; Crews i sar., 2006; Demirtas i sar., 2013; Fernandes i sar., 2013; Harbeoui i sar., 2018). Stepem zrelosti ploda, odnosno semenki, definiše prisustvo i količine određenih izomera vitamina E. Primećeno je da sadržaj tokotrienola raste sa zrenjem ploda, dok sadržaj tokoferola opada. Takođe, vitamin E je veoma osetljivo jedinjenje, pa sadržaj može varirati ukoliko prilikom analize dođe do degradacije molekula usled izloženosti svetlosti i kiseoniku. Generalno, γ -tokotrienol dominira među tokotrienolima, dok je α -tokoferol najzastupljeniji iz grupe tokoferola (Beveridge i sar., 2005). Ulje iz semenki grožđa u sebi sadrži određene količine γ -tokoferola koji se retko nalazi u drugim uljima, a značajan je, jer poseduje snažno antioksidativno delovanje.

Na kraju, potrebno je pomenuti da ulje iz semenki grožđa sadrži od 2 do 11 mg fitosterola po gramu ulja. Najzastupljeniji je β -sitosterol sa sadržajem i do 65% od ukupnih fitosterola. Osim njega, u značajnijim količinama prisutan je stigmasterol (oko 10%). Ostali fitosteroli, poput sitostanola, δ -5-avenasterola i δ -7-estigmastenola su takođe kvantifikovani, ali u znatno manjim koncentracijama (Garavaglia i sar., 2016).

1.5. Biološka aktivnost ploda vinove loze

Veliki broj *in vitro* ispitivanja u ćelijskim kulturama, animalne, ali i epidemiološke studije potvrdile su pozitivne zdravstvene efekte vinove loze, posebno ploda i različitih proizvoda dobijenih preradom ove biljke (Iriti & Faoro, 2009).

Osamdesetih godina prošlog veka je utvrđeno da populacija koja naseljava jug Francuske ima znatno nižu incidencu kardiovaskularnih bolesti od drugih razvijenih zemalja, iako je njihova ishrana bogata zasićenim masnim kiselinama. Opisana pojava, nazvana „Francuski paradoks”, objašnjena je umerenim unosom crvenog vina koje sadrži značajne količine polifenola. Osim kardioprotektivnog delovanja, polifenoli prisutni u grožđu mogu imati i druge pozitivne zdravstvene efekte. Ova jedinjenja koja se nalaze u svim delovima vinove loze su pre svega snažni antioksidansi, zbog čega poseduju antiinflamatornu, antimikrobnu, antialergijsku, antihipertenzivnu i citotoksičnu aktivnost, što je i dokazano mnogobrojnim studijama (Cushnie & Lamb, 2005; Harborne & Williams, 2000).

S obzirom da je sadržaj polifenola u ulju iz semenki grožđa skroman, pozitivni zdravstveni efekti konzumiranja ove namirnice povezuju se sa prisustvom liposolubilnih biološki aktivnih jedinjenja (Garavaglia i sar., 2016). Ulje iz semenki grožđa se smatra kardioprotektivnim agensom, jer je bogato vitaminom E, fitosterolima i linolnom kiselinom (Kolar i sar., 2019). Vitamin E je snažni antioksidans koji inhibira procese peroksidacije i kontroliše stvaranje slobodnih radikala (Gagic i sar., 2014). Fitosteroli snižavaju ukupni i LDL holesterol, inhibicijom apsorpcije intestinalnog holesterola, uključujući i recirkulišući endogeni bilijarni holesterol (Ostlund, 2002). Osim toga, fitosteroli mogu smanjiti oslobađanje proinflamatornih citokina iz makrofaga aktiviranih od strane oksidisanih LDL čestica (Vivancos & Moreno, 2008). Linolna kiselina je značajna sa aspekta inflamacije; Američko udruženje za srce (eng. *American Heart Association*, AHA) je 2009. godine izdalo preporuke da minimum 5-10% energetske unosa iz ω 6 PUFA (prvenstveno linolne kiseline) smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti (Harris i sar., 2009). Ranije sprovedene studije su pokazale da ulje iz semenki grožđa deluje neuro i hepatoprotektivno (Ismail i sar., 2015, 2016). Konzumacija ovog ulja pokazala se korisnom i kod pacijenata sa insulinskom rezistencijom (Irandoost i sar., 2013; X. Lai i sar., 2014).

U nastavku će biti obrađeni mehanizmi najznačajnijih bioloških aktivnosti grožđa.

1.5.1. Antioksidativna aktivnost

Poslednjih decenija smatra se da je oksidativni stres jedan od najznačajnijih faktora za nastanak brojnih patoloških stanja (kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti, katarakta, autizam, kancer, dijabetes, itd.). Iz tog razloga, jedinjenja koja poseduju antioksidativnu aktivnost dobijaju sve više pažnje, kako naučne zajednice, tako i opšte populacije.

1.5.1.1. Slobodni radikali i redoks ravnoteža

Slobodni radikali su atomi, molekuli ili joni sa nesparenim elektronima koji su veoma nestabilni i reaktivni, pa lako stupaju u hemijske reakcije sa drugim molekulima. Nalaze se u svim ćelijama, u niskim, ali detektabilnim koncentracijama (Halliwell & Gutteridge, 2015; Sies, 1993). Nastaju u fiziološkim uslovima, tokom aerobnih metaboličkih procesa (Shivakumar & Yogendra Kumar, 2018), ali su i medijatori brojnih patoloških stanja. Iako su u početku smatrani isključivo štetnim produktima metabolizma, kasnije je brojnim istraživanjima pokazano da slobodni radikali učestvuju kako u unutarćelijskoj signalizaciji, tako i u različitim metaboličkim procesima (Zhang i sar., 2016).

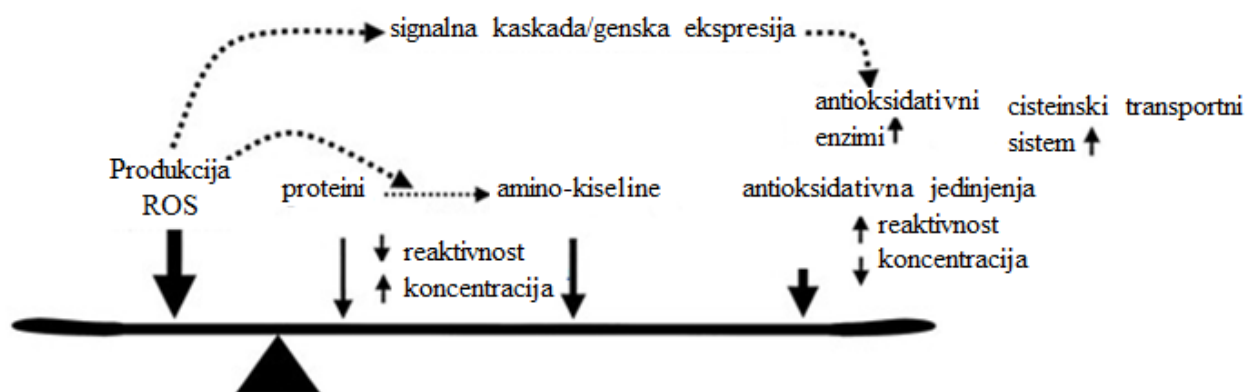
Reaktivne kiseonične vrste (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS) čine značajnu grupu slobodnih radikala i tu pored slobodnih radikala spadaju i njihovi ne-radikalni intermedijeri. U **Tabeli 3** su prikazani najznačajniji ROS u biološkim sistemima i njihovo procenjeno vreme poluraspada.

Tabela 3. Procenjena vremena poluraspada i hemijske reakcije nastanka određenih reaktivnih kiseoničnih vrsta (preuzeto i prilagođeno (Sies, 1993))

Reaktivne kiseonične vrste	Vreme poluraspada (s)	Reakcije
superoksid anjon ($O_2^{\cdot-}$)	(enzimski)	$O_2 + 1e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$
hidroksil radikal (OH^{\cdot})	10^{-9}	$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^-$ $H_2O_2 + Cu^+ \rightarrow Cu^{2+} + OH^{\cdot} + OH^-$ $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^{\cdot} + OH^-$
peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$)	0,05-1	$NO + O_2^{\cdot-} \rightarrow ONOO^{\cdot}$
singlet kiseonik (1O_2)	10^{-5}	$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2 H^+ \rightarrow ^1O_2 + H_2O_2$ $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 + H^+ \rightarrow ^1O_2 + H_2O + OH^-$
vodonik peroksid H_2O_2	(enzimski)	$O_2 + 2e^- \rightarrow H_2O_2$ $2 O_2^{\cdot-} + 2 H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$

Vreme poluraspada u velikoj meri određuje ponašanje radikala. Na primer, hidroksil radikal je veoma reaktivan, ali sa kratkim vremenom poluraspada, zbog čega su njegove reakcije difuzno ograničene; dešavaju se praktično na mestu generisanja radikala. Radikali sa dužim vremenom poluraspada su stabilniji i mogu da dovedu do oštećenja ciljanih molekula, čak i kada su oni dosta udaljeni od mesta generisanja radikala.

Mehanizmi redoks homeostaze

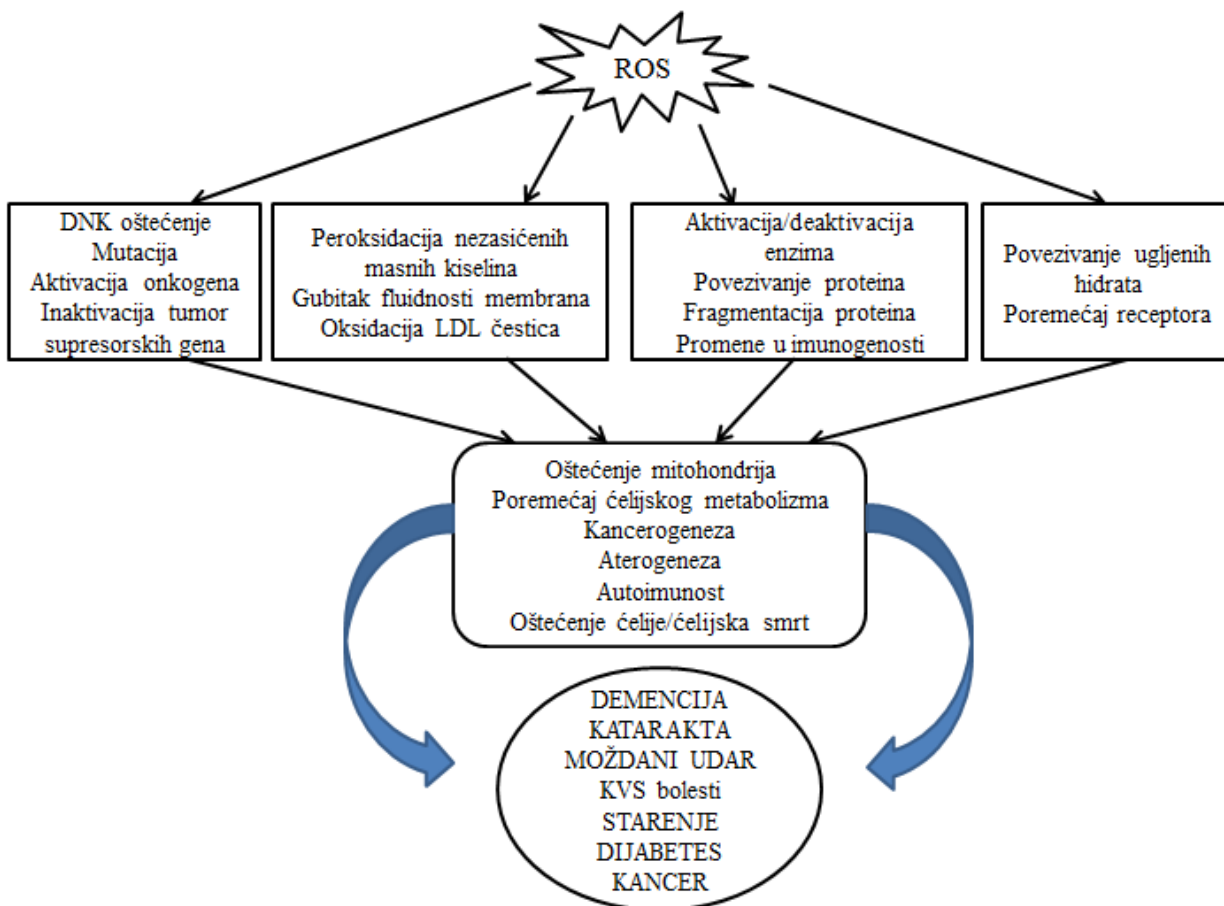


Slika 13. Ravnoteža između produkcije ROS i različitih sistema za njihovo uklanjanje (preuzeto i prilagođeno (Dröge, 2002))

Koncentracija slobodnih radikala u ćelijama zavisi od ravnoteže između njihove produkcije i njihovog klirensa od strane različitih antioksidanasa (**Slika 13**). Antioksidansi su definisani kao supstance prisutne u niskim koncentracijama koje imaju sposobnost da se "takmiče" sa drugim jedinjenjima koja mogu da se oksiduju, odnosno da svojom oksidacijom odlože ili spreče oksidaciju drugih jedinjenja (Halliwell & Gutteridge, 2015). Ova definicija uključuje enzime i neenzimske antioksidanse. Pored njih, u uklanjanju slobodnih radikala učestvuju i jedinjenja koja imaju

relativno nisku antioksidativnu aktivnost, ali su prisutna u visokim koncentracijama poput slobodnih amino kiselina, peptida i proteina (Dröge, 2002).

Povećana produkcija slobodnih radikala, uz neadekvatan odgovor sistema antioksidativne zaštite narušava redoks ravnotežu što rezultuje oksidativnim stresom. Oksidativni stres dovodi do oštećenja ćelija usled reakcije slobodnih radikala sa DNK, proteinima ili lipidima ćelijske membrane (Çetinkaya i sar., 2012; Gulcin, 2020). Osim toga, slobodni radikali privlače različite medijatore inflamacije i na taj način doprinose generalnom inflamatornom odgovoru i oštećenju tkiva. Različite reaktivne forme mogu doprineti oksidativnom oštećenju ćelija; među njima, derivati kiseonika su najznačajniji (**Slika 14**).



Slika 14. Reaktivne kiseonične vrste oštećuju ključne biološke strukture i na taj način povećavaju rizik od nastanka hroničnih nezaraznih bolesti (preuzeto i prilagođeno (Benzie, 2000))

1.5.1.2. Sistemi antioksidativne zaštite

Slobodni radikali nastali u višku neselektivno oštećuju ćelije, zbog čega su u cilju zaštite razvijeni različiti endogeni i egzogeni antioksidativni sistemi. Oni se mogu podeliti u tri osnovne grupe: antioksidativni enzimi, antioksidansi koji prekidaju lanac stvaranja slobodnih radikala i proteini koji vezuju prelazne metale (Young, 2001).

Antioksidativni enzimi u svojoj strukturi imaju prelazni metal koji menjanjem svog oksidativnog stanja prenosi elektrone u toku procesa inaktivacije radikala. Neki od najznačajnijih su: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GSH-Px), glutation S-transferaza (GST) i glutation reduktaza (GR).

Antioksidansi koji prekidaju lanac stvaranja slobodnih radikala su mali molekuli koji mogu da prime ili da doniraju elektron, pri čemu u reakciji sa slobodnim radikalima stvaraju stabilne proizvode. Lanac stvaranja slobodnih radikala može se prekinuti na dva načina- tako što će reakcijom dva radikala nastati stabilan proizvod ili će radikali biti neutralisani od strane antioksidansa. Antioksidansi mogu biti lipofilni i hidrofilni. Lipofilni su ključni za prekid lipidne peroksidacije i tu spadaju vitamin E (tokoferoli), karotenoidi, ubihinol-10 (redukovana forma koenzima Q10). Hidrofilni antioksidansi su askorbat, mokraćna kiselina, redukovani glutation i drugi proteini sa tiolnim grupama (Young, 2001).

Proteini koji vezuju prelazne metale onemogućavaju metalnim jonom katalizovanu degradaciju vodonik peroksida. Transferin, feritin i ceruloplazmin vezuju gvožđe, odnosno bakar, čime se održava niska koncentracija ovih jona u plazmi, odnosno minimizira stvaranje hidroksil radikala. Ceruloplazmin ispoljava svoj antioksidativni efekat i enzimski, tako što katalizuje oksidaciju dvovalentnog gvožđa. Kako je za Fentonovu reakciju neophodan dvovalentni jon gvožđa, ceruloplazmin brzim prevođenjem gvožđa u trovalentni oblik, inhibira ovaj proces (Atanasiu i sar., 1998).

1.5.1.3. Antioksidativna aktivnost grožđa

Antioksidativna aktivnost grožđa potvrđena je brojnim studijama (Zeghad i sar., 2019). S obzirom da različiti delovi ploda sadrže različita biološki aktivna jedinjenja, najčešće su analizirani odvojeno. Hidrofilni ekstrakti ploda su bogati polifenolima, koji se smatraju nosiocima antioksidativne aktivnosti. Lipofilne frakcije sadrže male količine polifenolnih jedinjenja, ali su prisutna druga biološki aktivna jedinjenja zbog čega je i ulje iz semenki grožđa prepoznato kao antioksidativni agens.

Polifenolna jedinjenja ostvaruju antioksidativni efekat različitim mehanizmima. Najčešće direktnim „hvatanjem” slobodnih radikala i to transferom atoma vodonika (*eng. Hydrogen Atom Transfer- HAT*) ili prenosom elektrona (*eng. Single Electron Transfer- SET*) (Belščak-Cvitanović i sar., 2018). Takođe, imaju sposobnost da preveniraju stvaranje slobodnih radikala, i to na dva načina. Mogu da maskiraju (heliraju) metalne jone i tako onemogućavaju njihovo prooksidativno delovanje, kao što je npr. slučaj sa kvercetinom i jonima gvožđa (Gulcin, 2020). Drugi način je inhibicijom ili redukovanjem aktivnosti enzima poput telomeraze (Naasani i sar., 2003), lipooksigenaze (Sadik i sar., 2003), ksantin oksidaze, NADPH oksidaze, mijeloperoksidaze i ciklooksigenaze (Bräunlich i sar., 2013; De Camargo i sar., 2019; O’Leary i sar., 2004). Dokazano je da neka jedinjenja, poput kurkumina i epigalokatehin galata, imaju sposobnost da aktiviraju antioksidativne enzimske sisteme (Chu, 2014). Kao mogući mehanizam antioksidativnog delovanja polifenola pominje se i regeneracija membranski vezanih antioksidanasa (Belščak-Cvitanović i sar., 2018).

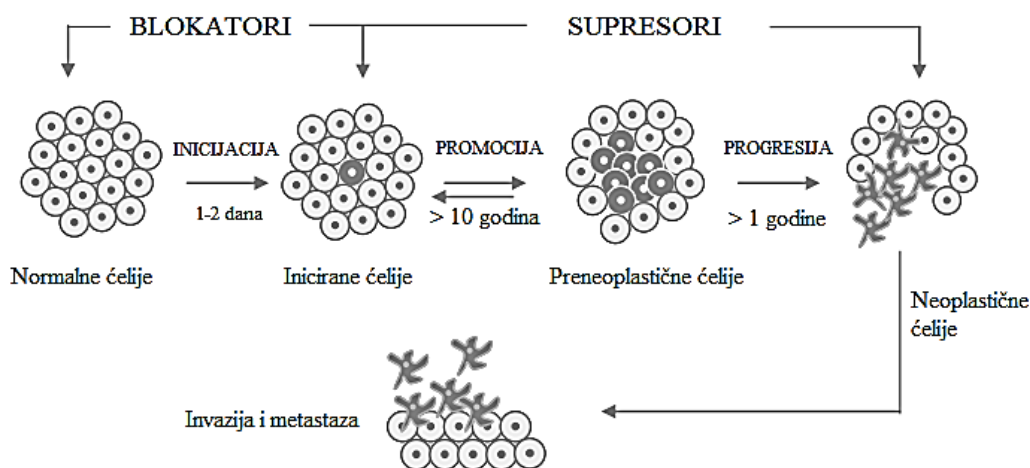
Obzirom da se pod pojmom polifenoli podrazumevaju jedinjenja različite hemijske strukture, jasno je da među njima postoje značajne razlike u antioksidativnoj aktivnosti. Pokazano je da su najjači antioksidansi jedinjenja koja poseduju hidroksilne grupe u orto položaju B prstena (npr. katehin, luteolin i kvercetin), zatim u meta položaju A prstena (npr. kaempferol, apigenin), kao i jedinjenja koja se odlikuju dvostrukom vezom u kombinaciji sa keto i hidroksilnom grupom u C prstenu i prisustvom orto dihidroksi strukture u B prstenu (kvercetin). Glikozilacija jedinjenja smanjuje njihovu antioksidativnu aktivnost. Sposobnost heliranja metala imaju oni polifenoli sa orto difenolnim grupama u 3',4'-dihidroksi poziciji B prstena, kao i jedinjenja keto strukture (4-keto, 3-hidroksi ili 4-keto i 5-hidroksi) u C prstenu flavonola (Rice-Evans i sar., 1997).

Nedvosmisleno je pokazano da semenke grožđa, odnosno ekstrakti semenki poseduju najjaču antioksidativnu aktivnost, što je očekivano, jer je u semenkama koncentrisano najviše polifenolnih jedinjenja (Sochorova i sar., 2020). Ovaj deo ploda je okarakterisan i kao potencijalni antiinflamatorni agens (Cádiz-Gurrea i sar., 2017; Simonetti i sar., 2014, 2017). Jaka antioksidativna svojstva imaju i ekstrakti pokožice crvenih sorti (Pavić i sar., 2019; Yilmaz i sar., 2015). Konačno, iako je distribucija polifenolnih jedinjenja u pulpi grožđa skromna, izvesna antioksidativna aktivnost primećena je i kod ovog dela ploda (Yilmaz i sar., 2015). Jedna studija bavila se ispitivanjem antioksidativne aktivnosti različitih delova ploda velikog broja sorti koje se gaje na našem području (Pantelić i sar., 2016). Ipak, nedostaju podaci o srpskim domaćim sortama, poput Tamjanike, Smederevke, Crne Tamjanike, Začinka, Bagrine, Župljanke i Jagode.

Kada je reč o ulju, lipofilni konstituenti poput vitamina E i fitosterola značajno doprinose antioksidativnoj aktivnosti. Jedinjenja vitamina E, tokoferoli i tokotrienoli, inhibiraju propagaciju lipidne peroksidacije "gašenjem" peroksil radikala (Krinsky, 1992). Fitosteroli utiču na smanjenje oksidativnog stresa povećanjem aktivnosti antioksidativnih enzima (Woyengo i sar., 2009). Hidrofilni ekstrakti ulja koji u sebi sadrže polifenolna jedinjenja takođe ispoljavaju izvesnu antioksidativnu aktivnost. U literaturi se nalazi skroman broj podataka o antioksidativnoj aktivnosti hidrofilnih frakcija ulja, i ne postoji istraživanje koje se bavilo poređenjem ulja dobijenih iz semenki velikog broja različitih sorti vinove loze.

1.5.2. Citotoksična aktivnost

Maligne bolesti su drugi vodeći uzrok mortaliteta i morbiditeta u svetu. Incidenca kancera je u porastu; samo u toku 2020. godine na svetskom nivou zabeleženo 19,3 miliona novih slučajeva (Sung i sar., 2021). Pored genetskih predispozicija i faktora životne sredine, smatra se da ishrana ima veliki uticaj na razvoj maligniteta. U industrijski razvijenim zemljama, u kojima je ishrana stanovništva bazirana na životinjskim namirnicama i rafinisanim šećerima, najčešći su karcinomi dojke, prostate, debelog creva i rektuma. U zemljama u razvoju, najzastupljeniji su karcinomi želuca i jetre, a u ishrani stanovništva dominiraju žitarice/skrobne namirnice (Iriti & Faoro, 2009). Razvoj neoplastičnih promena je višestepeni proces koji se odvija u tri različite, vremenski određene i povezane faze (inicijacija, promocija i progresija) i rezultira nekontrolisanom i naglom deobom ćelija (**Slika 15**).



Slika 15. Faze kancerogeneze. Ciljna mesta hemoterapeutika (preuzeto i prilagođeno (Iriti & Faoro, 2009))

Oksidativni stres je povezan sa svim fazama ćelijske transformacije. Kao što je već pomenuto, narušavanje redoks ravnoteže, odnosno nagomilavanje slobodnih radikala dovodi do akutnih i hroničnih oksidativnih oštećenja. Akutni oksidativni stres može izazvati ireverzibilno oštećenje DNK molekula što dovodi do stvaranja novih mutacija i iniciranja procesa kancerogeneze. Takođe, akutno oštećenje uzrokuje selektivnu smrt ćelija, odnosno kompenzatornu ćelijsku proliferaciju. Ovo potencijalno dovodi do formiranja novih preneoplastičnih ćelija i/ili do selektivne klonske ekspanzije latentno iniciranih preneoplastičnih ćelija. Hronična oštećenja mogu dovesti do promena u kontrolnim mehanizmima rasta. Sumirano, oksidativni stres modifikuje međućelijsku komunikaciju, utiče na aktivnost različitih enzima, menja strukturu i funkciju ćelijske membrane, kao i gensku ekspresiju. Sve navedeno je uključeno u procese nastanka i razvoja malignih ćelija (Klaunig i sar., 1998). Ove ćelije se karakterišu ubrzanim metabolizmom i kako bi opstale i održale visok stepen proliferacije, potrebne su im visoke koncentracije ROS (Sosa i sar., 2013).

Imajući u vidu rastuću incidencu karcinoma, prevencija nastanka je od primarnog značaja javnog zdravlja. Patologija malignih bolesti je izuzetno kompleksna, zbog čega pronalaženje efikasnih, a bezbednih agenasa kojima bi se prevenirao nastanak ili usporio razvoj karcinoma predstavlja pravi izazov. Od preventivnih do alternativnih ko-terapijskih mogućnosti često se pominju biološki aktivni sastojci biljnog materijala. Ova jedinjenja se smatraju potentnim hemopreventivnim agensima jer imaju sposobnost sprečavanja, zaustavljanja ili povlačenja procesa kancerogeneze. Blokatori su jedinjenja koja zaustavljaju inicijaciju kancerogeneze, dok se pod terminom supresora podrazumevaju biološki aktivna jedinjenja koja utiču na promociju i progresiju kancerogeneze i tako inhibiraju malignu transformaciju iniciranih ćelija (**Slika 15**).

1.5.2.1. Citotoksična aktivnost grožđa

Citotoksična svojstva grožđa pripisuju se prisutnim polifenolnim jedinjenjima koja inhibiraju malignu transformaciju uticajem na sve tri faze kancerogeneze. Ovi prirodni antioksidansi učestvuju u uklanjanju slobodnih radikala, pa tako imaju uticaj na oksido-redukcionu ravnotežu, čime modulišu različite puteve ćelijske signalizacije. Osim što mogu sprečiti fazu inicijacije, polifenoli deluju kao snažni supresori i sprečavaju razvoj neoplastičnih ćelija. Na molekularnom nivou, mehanizmi odgovorni za antiproliferativni efekat aktivnih principa grožđa uključuju aktivaciju tumor supresorskog gena p53, aktivaciju transkripcionog faktora proteina 1 (AP-1) koji reguliše ekspresiju gena kao odgovor na različite stimulse, zatim supresiju nuklearnog faktora kapa beta

(NF- κ B), iniciranje apoptoze delovanjem na PI3K-Akt i MAPK signalne puteve i zaustavljanje ćelijskog ciklusa (Yang & Xiao, 2013). Unutar ćelija, ova jedinjenja mogu ispoljiti prooksidativno delovanje. Naime, redukovane forme polifenola ponašaju se kao antioksidansi, dok oksidovani oblici, na primer fenoksil radikali mogu delovati prooksidativno i tako inhibirati preživljavanje malignih ćelija (citotoksičnost) (Galati & O'Brien, 2004). Antitumorsko delovanje polifenolnih jedinjenja potvrđeno je brojnim studijama. Najveći broj njih bavio se *in vitro* ispitivanjima, pri čemu su najkonzistentniji rezultati dobijeni evaluiranjem efekata pojedinačnih jedinjenja. Nažalost, terapijski efekat je veoma često nemoguće proceniti, jer hemijska struktura polifenolnih jedinjenja definiše njihov stepen apsorpcije, distribuciju, metabolizam i ekskreciju, i posledično bioraspoloživost (Bravo, 2009). Niskomolekularna jedinjenja imaju veću bioraspoloživost u poređenju sa na primer polimernim proantocijanidinima. Molekuli velike mase se ne mogu lako apsorbovati, zbog čega nepromenjeni dospevaju do creva gde mogu ispoljiti protektivno delovanje štiteći lipide, proteine i ugljene hidrate od oksidativnih oštećenja (Hagerman i sar., 1998). Ekstrakti biljaka su takođe bili predmet različitih istraživanja, ali su se dobijeni rezultati značajno razlikovali, budući da je u ekstraktima prisutan veliki broj različitih struktura i da su interakcije među njima nepoznate. Biljke ispoljavaju citotoksični efekat na dozno-zavisni način i visoko su selektivne, stoga njihovo delovanje u velikoj meri zavisi od prirode kancerskih ćelija (Sabbar Dahham i sar., 2015).

Inhibitorni efekat različitih sorti grožđa ispitivan je na više ćelijskih kultura i rezultati su bili afirmativni, iako ne u potpunosti konzistentni (Yang i sar., 2009). Inhibitorna aktivnost je bila različitog intenziteta u zavisnosti od ćelijske linije, ali i od ispitivane sorte grožđa. Ova pojava može se objasniti sortnom varijabilnošću u pogledu profila polifenola, samim tim i različitim afinitetom prema različitim organima, što rezultira selektivnim ispoljavanjem antitumorske aktivnosti. Podataka o citotoksičnoj aktivnosti autohtonih sorti vinove loze je veoma malo i uglavnom su istraživanja rađena na najčešće korišćenim ćelijskim kulturama (Milinčić i sar., 2021; Pintać i sar., 2019).

Teško je identifikovati konstituente odgovorne za antikancerogena svojstva ekstrakata, budući da se u njima nalaze brojna jedinjenja koja mogu stupiti u različite interakcije. Najveći broj do sada izvedenih studija sugerise da je rezveratrol jedinjenje odgovorno za citotoksičnu aktivnost grožđa. Osim rezveratrola, smatra se da i flavan-3-oli, kao i proantocijanidini poseduju određeni hemoterapijski potencijal (Y. K. Rao i sar., 2007).

1.5.3. Antimikrobna aktivnost

Infekcije su patološka stanja izazvana prodorom infektivnog uzročnika u organizam domaćina, njegovim razmnožavanjem i produkcijom toksina koji oštećuju tkivo. Antimikrobni agensi koriste se sa ciljem da potpuno unište patogene mikroorganizme ili da zaustave njihov rast i razmnožavanje. Gram negativne bakterije su zbog svoje strukture značajno otpornije na delovanje antimikrobnih agenasa od Gram pozitivnih bakterija. Gram negativne bakterije imaju omotač sagrađen od 3 sloja. Prvi sloj je spoljašnja membrana koja predstavlja zaštitu i specifična je za Gram negativne bakterije. Sastoji se od fosfolipida, lipopolisaharida i proteina poput porina koji omogućavaju prolazak malih molekula. Drugi sloj je peptidoglikan koji je čvrst i određuje oblik ćelije, a sastoji se od jedinica disaharida N-acetil glukozamin-N-acetilmuramska kiselina. Treći sloj je unutrašnja membrana, odnosno fosfolipidni dvosloj (Silhavy i sar., 2010). Svetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization*, WHO) je 2017. godine predstavila listu prioriternih patogena, grupisanih u tri kategorije u zavisnosti od njihove rezistencije na antimikrobne agense i najviše navedenih patogena pripada grupi Gram negativnih bakterija.

Takođe, problem predstavlja i stečena rezistencija na antimikrobne agense koja se uglavnom razvija usled neopravdane i/ili nepravilne upotrebe antibiotika, kao deo adaptacije i mutacije kod aktivnih

ćelija patogena. Uprkos merama Svetske zdravstvene organizacije i aktivnostima javnih zdravstvenih ustanova, upotreba antimikrobnih lekova u poljoprivredi, veterini i humanoj medicini i dalje je relativno visoka. Antimikrobna rezistencija dovodi do produženog toka bolesti, povećava rizik od daljegširenja otpornih mikroorganizama, povećava mortalitet i finansijske troškove.

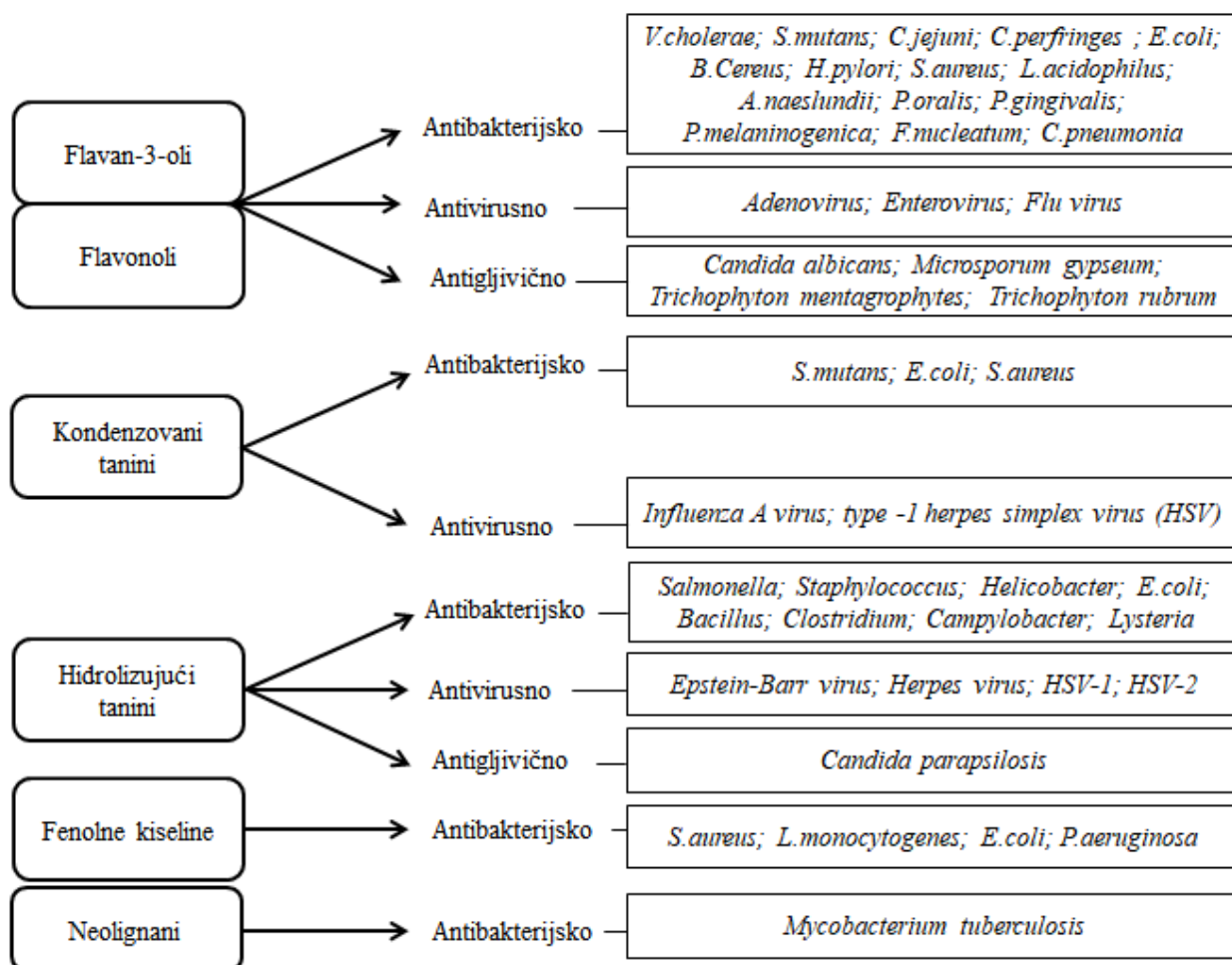
Istraživanja u ovoj oblasti za cilj imaju pronalazak i razvoj antimikrobnih agenasa koji bi bili delotvorni protiv rezistentnih patogena (Breijyeh i sar., 2020). Poslednjih godina, pažnja naučne zajednice se usmerava ka standardizovanim ekstraktima biljaka kao potencijalnim izvorima efikasnih i netoksičnih antimikrobnih agenasa. Polifenolna jedinjenja, terpenoidi, etarska ulja, zatim alkaloidi, lektini, polipeptidi, poliacetileni, masne kiseline, jednostavni šećeri i organske kiseline inhibitorno deluju na različite mikroorganizme (Cowan, 1999).

Vekovima se materije koje sadrže polifenole kao biološki aktivna jedinjenja upotrebljavaju u terapiji različitih infekcija. Pokazano je da ekstrakti bogati polifenolnim jedinjenjima imaju veći potencijal od izolovanih komponenti (Serra i sar., 2008).

1.5.3.1. Antimikrobna aktivnost grožda

Polifenolna jedinjenja različitim mehanizmima utiču na rast bakterija, mogu modifikovati njihove strukture, patogeni kapacitet ili metabolizam što rezultuje bakteriostatskim ili baktericidnim efektom (Laganà i sar., 2019). Smatra se da je osnova njihovog antibakterijskog delovanja formiranje vodoničnih ili kovalentnih veza sa membranskim proteinima bakterije kao što su adhezini i transportni proteini, pri čemu se suprimira adhezija bakterija na mukozne membrane i sprečava dalji rast mikroorganizama (Kumar & Pandey, 2013). Osim toga, polifenolna jedinjenja mogu, vezivanjem za membranske proteine bakterija, menjati strukturu membrane, dovesti do curenja sadržaja iz ćelije, i konačno do ćelijske smrti (Negi, 2012). Dokazano je da polifenolna jedinjenja izazivaju ćelijska oštećenja i zatvaranjem jonskih kanala, inhibicijom rada efluks pumpi i inhibicijom energetskeg metabolizma bakterija (inhibicijom određenih enzima, poput ATP sintaze) (Guendouze-Bouchefa i sar., 2015; Laganà i sar., 2019). Određena polifenolna jedinjenja mogu uticati na DNK bakterijske ćelije inhibicijom DNK giraze ili modifikacijom gena koji učestvuju u regulaciji faktora virulencije (Ohemeng i sar., 1993).

Antimikrobno delovanje polifenola potvrđeno je brojnim studijama (Bouarab Chibane i sar., 2019; Cowan, 1999; Daglia, 2012; Gyawali & Ibrahim, 2014). Na **Slici 16** su prikazani antimikrobni efekti pojedinih polifenolnih jedinjenja. Ovakva generalizacija, iako korisna, nije u potpunosti opravdana, budući da su uočene brojne razlike u antimikrobnoj aktivnosti između jedinjenja u okviru iste grupe.



Slika 16. Antimikrobni efekti polifenolnih jedinjenja (preuzeto i prilagođeno (Daglia, 2012))

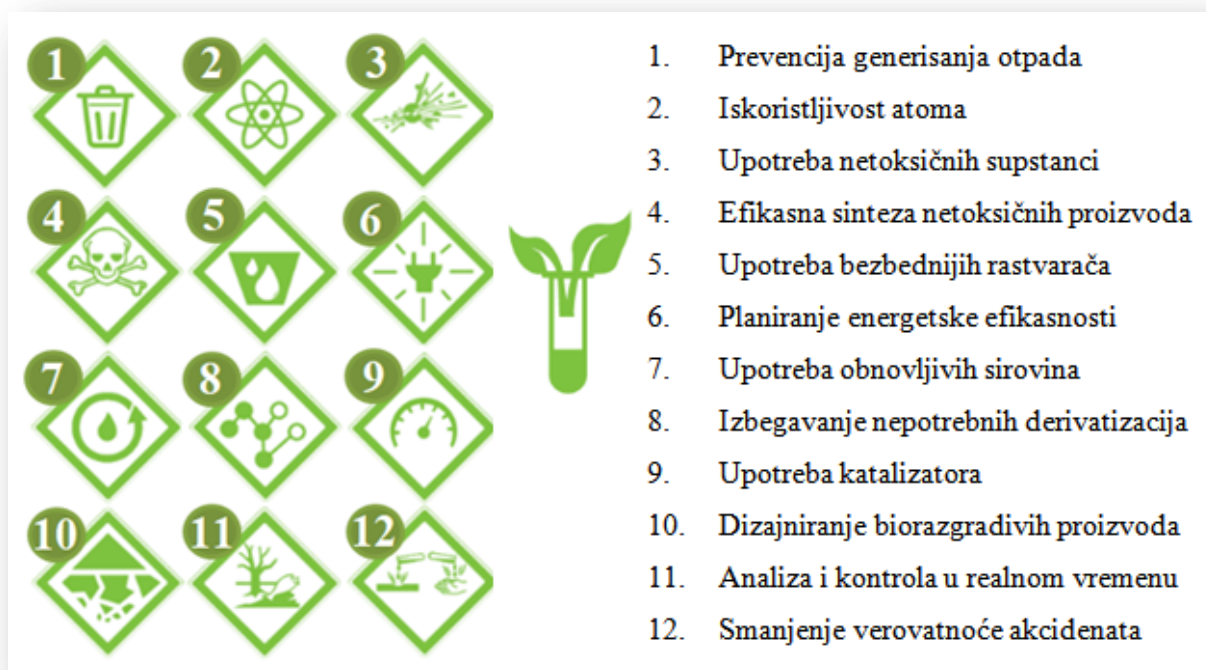
Fenolna grupa smatra se odgovornom za antimikrobnu aktivnost, a specifičnije razlike u hemijskoj strukturi polifenolnih jedinjenja definišu prirodu antimikrobnog delovanja (P. Lai & Roy, 2004). Na primer, od položaja OH grupe na fenolnom prstenu zavisi intenzitet antibakterijske aktivnosti; jedinjenja sa OH grupom u meta položaju su aktivnija od onih kod kojih se OH grupa nalazi u orto položaju. Takođe, i broj OH grupa utiče na antibakterijska svojstva, npr. kofeinska kiselina koja u svojoj strukturi ima dve OH grupe jači antibiotik od *p*-kumarinske kiseline. Acetatne grupe povećavaju sposobnost fenolne grupe da vrši denaturaciju proteina i povećavaju njenu elektronegativnost, zbog čega poseduju jaču antimikrobnu aktivnost od svojih neesterifikovanih analoga. Galoilne grupe izazivaju značajno oštećenje ćelijske membrane, zato se polifenoli esterifikovani galnom kiselinom smatraju veoma aktivnim protiv različitih patogenih mikroorganizama. Antimikrobna aktivnost polifenolnih jedinjenja se povećava sa povećanjem njihovog lipofilnog karaktera što može biti direktno povezano sa interakcijom polifenola i bakterijske membrane (Gyawali & Ibrahim, 2014).

Dosadašnja ispitivanja antimikrobnog delovanja ploda vinove loze, delova ploda, odnosno njihovih ekstrakata, rezultirala su afirmativnim nalazima (Butkhup i sar., 2016; Garavaglia i sar., 2016; Hassan i sar., 2019; Katalinić i sar., 2010; Olejar i sar., 2019; V. Silva i sar., 2018). Ipak, podataka o antimikrobnoj aktivnosti autohtonih sorti je znatno manje. Koliko je poznato, neke od njih, poput Začinka i Bagrine, nisu nikada ispitane.

1.6. Aspekti održivosti u vinskoj industriji

Prema definiciji Ujedinjenih nacija iz 1987. godine, održivi razvoj se definiše kao razvoj koji zadovoljava sadašnje potrebe, bez ugrožavanja sposobnosti budućih naraštaja da zadovolje sopstvene potrebe (Izveštaj Ujedinjenih nacija, 1987). Nekoliko godina kasnije, koncept održivosti okarakterisan je kroz tri dimenzije- ekonomska, socijalna i ekološka održivost (Svetski samit Ujedinjenih nacija, 2005). Poslednja se u velikoj meri oslanja na zelenu hemiju.

Paul Anastas i John Warner su pojam zelene hemije uveli krajem prošlog veka, kao odgovor na globalni porast količine otpada i zagađenja, a sa ciljem uspostavljanja održivog razvoja. Zelena (održiva) hemija odnosi se na planiranje i kreiranje hemijskih proizvodnih procesa tokom kojih se smanjuje ili čak eliminiše negativni uticaj na okolinu. Primena ovog koncepta proteže se kroz celokupni životni ciklus proizvoda, uključujući njegov dizajn, proizvodnju, upotrebu i konačno, odlaganje. Zelena hemija bazirana je na 12 osnovnih principa prikazanih na **Slici 17** (Anastas & Warner, 1998).



Slika 17. Dvanaest osnovnih principa zelene hemije

Kada je reč o proizvodnji vina, jasno je da pojam održivosti treba da obuhvata kako industrijske procese, tako i sve ono što prethodi industriji ili sledi nakon industrije (Baiano, 2021). Gajenje vinove loze zahteva intenzivno korišćenje zemljišta i vode, kao i upotrebu pesticida, zbog čega je implementacija održivog razvoja neophodna i u ovoj fazi. Sa ciljem definisanja koncepta održivosti koji može biti primenjen na vinogradarstvo i proizvodnju vina, Međunarodna organizacija za vinovu lozu i vino (OIV) i Međunarodna federacija vina i alkoholnih pića (franc. *Federation Internationale des Vins et Spiritueux*, FIVS) razvile su smernice za održivo vinogradarstvo (OIV, 2008), odnosno Globalne principe održivosti sektora vina (FIVS, 2016).

S obzirom na razmere negativnog ekološkog uticaja vinske industrije, održiva proizvodnja vina postavlja se kao imperativ. Postoji nekoliko ključnih mesta na kojima je moguće izvršiti izmene, kako bi se primenili principi cirkularne ekonomije.

Prilikom vinifikacije dolazi do emisije gasova sa efektom staklene bašte (eng. *GreenHouse Gases*, GHG), kao što su ugljen-dioksid, metan, azot-suboksid, fluorougljovodonici i sumpor heksafluorid. Smatra se da je na globalnom nivou vinska industrija odgovorna za oko 0,3% emisije gasova sa efektom staklene bašte (Amienyo i sar., 2014; Rugani i sar., 2013). Poslednjih godina 20. veka pokrenute su brojne inicijative sa ciljem da se spreči dalje povećanje emisije GHG, čime bi se izbegle globalne klimatske promene (Okvirna konvencija Ujedinjenih nacija o promeni klime, Kjoto protokol, Pariski sporazum).

U svim fazama proizvodnog ciklusa vina nastaju veoma toksične otpadne vode. Količina otpadnih voda koja se generiše u vinskoj industriji zavisi od sezone, vrste vina koje se proizvodi i samog tehnološkog procesa. Prosečan protok otpadnih voda je 3,05 m³ po toni grožđa, odnosno 2,86 m³ po m³ vina. U prošlosti, otpadne vode su se ispuštale u zemljište, dok se danas tretiraju različitim aerobnim i/ili anaerobnim procesima pre direktnog ili indirektnog puštanja u okruženje (Bolzonella i sar., 2019).

Konačno, proizvodnja vina za sobom ostavlja veliku količinu čvrstog organskog otpada (komine). Komina nije toksična, ali sadrži organske materije i zbog količine koja se generiše, njeno odlaganje zahteva poseban pristup. Približno polovina svetske proizvodnje grožđa upotrebi se u vinskoj industriji. Na globalnom nivou, u toku jedne godine, proizvede se oko 27 biliona litara vina. Količina otpada zavisi od sorte vinove loze, zatim načina presovanja i fermentacionih koraka (Beres i sar., 2017). Smatra se da nakon postupka vinifikacije, zaostane od 5 do 10 miliona tona otpada (Matthäus, 2008).

1.6.1. Upravljanje otpadom u vinskoj industriji

Najveći procenat otpada u industriji vina čine semenke i pokožica grožđa i to su ujedno biološki najvredniji delovi ploda. Procenjeno je da se otpad nakon ceđenja grožđa sa peteljkom sastoji od oko 30% peteljki, 30% semenki i 40% pokožice i pulpe (Nair & Pullammanappallil, 2003).

Na sastav komine utiče veliki broj faktora. Generalno, komina je izuzetno bogata dijetnim vlaknima koja čine čak tri četvrtine ukupne suve materije. Osim toga, komina sadrži visok procenat proteina (12,2%) i lipida (13,5%) (Llobera & Cañellas, 2007). Količina šećera u komini zavisi od samog procesa vinifikacije. Prilikom proizvodnje belog vina, generiše se otpad koji sadrži visok procenat prostih šećera (38%), dok komina zaostala nakon proizvodnje crvenog vina sadrži znatno manje šećera, ali veći procenat alkohola. Sadržaji šećera i alkohola uzimaju se u obzir prilikom upotrebe komine kao stočne hrane. Osim nutrijenata, komina sadrži i organske kiseline, različita polifenolna jedinjenja, pigmente i minerale (Muhlack i sar., 2018; Yu & Ahmedna, 2013).

Komina proizvedena u vinskoj industriji je još uvek nedovoljno iskorišćena i zbog prisustva organskih materija ima izuzetno štetan uticaj na životnu sredinu i globalne klimatske promene. Upotreba komine, odnosno njena valorizacija vraćanjem u proizvodnju je značajna sa ekološkog i ekonomskog aspekta, i predstavlja najjednostavniji primer cirkularne ili zelene ekonomije koji je u potpunosti suprotnosti sa do sada korišćenim linearnim modelom (**Slika 18**).

LINEARNA EKONOMIJA



CIRKULARNA EKONOMIJA



Slika 18. Linearna vs cirkularna ekonomija

Linearna ekonomija predstavlja otvoren ciklus, koji se karakteriše eksploatacijom sirovina uz veliku potrošnju energije i stvaranje velike količine otpada. Ovakav pristup je sa svih aspekata neodrživ; generisani otpad predstavlja ekološki, ekonomski i socijalni problem. Svest o potrebi da se reši problem otpada postojala je decenijama unazad. Još 60-ih godina prošlog veka postalo je jasno da je neophodno u potpunosti promeniti dotadašnji sistem upravljanja otpadom. Mnogo godina kasnije pominje se koncept cirkularne ekonomije. Cirkularna ekonomija definiše se kao obnovljiva industrijska ekonomija koja ima izmenjen koncept proizvodnje i potrošnje kada je u pitanju dizajn, upotreba resursa i stvaranje otpada. U konceptu cirkularne ekonomije otpad ne postoji, već se nastali proizvodi koriste kao sirovine za isti ili drugi proizvodni proces. Jedna studija je utvrdila da bi potpun prelazak na cirkularnu ekonomiju smanjio emisiju gasova staklene bašte za čak 70% (Stahel, 2016).

Tradicionalno, otpad industrije vina se eksploatiše za stočnu hranu (Brenes i sar., 2016; Dwyer i sar., 2014) i kao kompost (Santos i sar., 2016). U manjoj meri, komina se koristi kao sirovina za dobijanje etanola, pigmenata i tartarata (Braga i sar., 2002). Dokazano je i da se komina grožđa može koristiti u formi gela kao biosorbent za uklanjanje Cr (VI) iz vode (Chand i sar., 2009). Savremen pristup je korišćenje komine za poboljšanje toplotne izolacije u građevinarstvu, ali ovakav način iskorišćenja komine je i dalje jako redak (Muñoz i sar., 2014).

Izolovanje biološki aktivnih jedinjenja iz vinskog otpada i njihova kasnija primena u kozmetičkoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji doprinosi postizanju održivog razvoja vinske industrije na globalnom nivou. Komina se takođe može koristiti i kao sirovina za dobijanje ulja, obzirom da sadrži značajne količine (Beres i sar., 2017; Dwyer i sar., 2014). Poslednjih godina, sprovedene su brojne studije sa ciljem valorizacije komine kao sirovine za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja (Barba i sar., 2015; Boussetta i sar., 2011; De La Cerda-Carrasco i sar., 2015; Fontana i sar., 2013; Hixson i sar., 2016; Otero-Pareja i sar., 2015).

Postoji još jedno mesto za primenu pristupa zelene hemije i povećanje održivosti pri preradi grožđa ili komine, a to je primena tzv. „zelenih” umesto konvencionalnih organskih rastvarača koji zagađuju životnu sredinu, za dobijanje proizvoda sa koncentrovanim sadržajem biološki aktivnih jedinjenja.

1.7. Dobijanje koncentrovanih izvora biološki aktivnih jedinjenja iz grožđa i primena zelenih rastvarača

Ekstrakcija biološki aktivnih jedinjenja iz ploda grožđa ili iz komine predstavlja jedan od novijih pristupa za postizanje održivog razvoja vinske industrije. Ovakav način iskorišćenja otpada rezultuje nastankom koncentrovanih izvora nutrijenata, odnosno ekstrakata, koji se mogu upotrebiti u dizajniranju prehrambenih ili kozmetičkih proizvoda sa dodatom vrednošću, a čime se u potpunosti zadovoljava princip cirkularne ekonomije.

U nastavku će biti reči o različitim metodama ekstrakcije, zatim o optimizaciji procesa ekstrakcije, sa ciljem postizanja energetske efikasnosti (šesti princip zelene hemije), kao i o novim, alternativnim rastvaračima koji imaju veliki potencijal da zamene konvencionalne rastvarače (peti princip zelene hemije).

1.7.1. Ekstrakcija biološki aktivnih jedinjenja

Procesi ekstrakcije koriste se sa ciljem izdvajanja, identifikacije i koncentrisanja biološki aktivnih jedinjenja. Biljni ekstrakti se definišu kao jedinjenja i/ili mešavina jedinjenja dobijenih bilo kojim postupkom ekstrakcije iz svežih ili sušenih biljaka, ili delova biljaka: lišća, cvetova, semenki, korena i kore. Aktivni sastojci se u ekstraktima nalaze zajedno sa drugim materijama prisutnim u biljnoj masi i mogu se koristiti ili kao ukupni ekstrakt ili se za izolovanje aktivnih sastojaka koriste različite metode razdvajanja. Metode ekstrakcije koje se koriste u takvim procesima obuhvataju: destilaciju, ekstrakciju rastvaračem i hladnu kompresiju. Destilacija se uglavnom koristi za dobijanje etarskih ulja. Ekstrakcija rastvaračem podrazumeva prevođenje određenog jedinjenja iz jedne faze u kojoj je rastvoreno ili suspendovano, u drugu, tečnu fazu. Princip preraspodele zasniva se na različitoj rastvorljivosti jedinjenja u dve faze koje se međusobno ne mešaju. Hladna kompresija se uglavnom koristi za dobijanje biljnih ulja i zasniva se na pritisku biljnog materijala kako bi se izbacio tečni sadržaj (J. Mason i sar., 2011; Vinatoru i sar., 1999).

Iako su postupci ekstrakcije prvobitno prilagođeni laboratorijskim uslovima, danas su prisutni u gotovo svim industrijskim granama, a naročito u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Tradicionalne metode ekstrakcije poput maceracije, digestije i perkolacije, imaju niz nedostataka kao što su: mali prinos, nedovoljna selektivnost, visoka potrošnja energije zbog izrazito dugog vremena ekstrakcije i intenzivnog zagrevanja i/ili mešanja tokom ekstrakcije, upotreba organskih rastvarača, ali i mogućnost njihovog prisustva u gotovom proizvodu (Chemat i sar., 2017; Rombaut i sar., 2014).

Kako bi se eliminisali pomenuti nedostaci tradicionalnih metoda razvijene su savremenije, ekološki prihvatljivije metode, kao što su ekstrakcija pomoću ultrazvuka, ekstrakcija pomoću mikrotalasa, ekstrakcija fluidima u subkritičnom i superkritičnom stanju i ubrzana ekstrakcija rastvaračem. Ove tehnike imaju ogroman „zeleni” potencijal, jer daju veći prinos ekstrakcije, kvalitetnije ekstrakte uz smanjenje ili eliminaciju toksičnih rastvarača. Pomenute savremene metode mogu se koristiti kao predtreatman u cilju razaranja ćelijskog zida, čime se povećava permeabilnost ćelijske membrane i efikasnost ekstrakcije. Smatraju se hladnim metodama, jer ne zahtevaju veliko povećanje temperature, što je značajno sa aspekta stabilnosti ekstrahovanih jedinjenja. Promoviše se njihova upotreba u kombinaciji sa novim, alternativnijim i „zelenijim” rastvaračima, što u potpunosti zadovoljava principe zelene hemije (Tiwari, 2015).

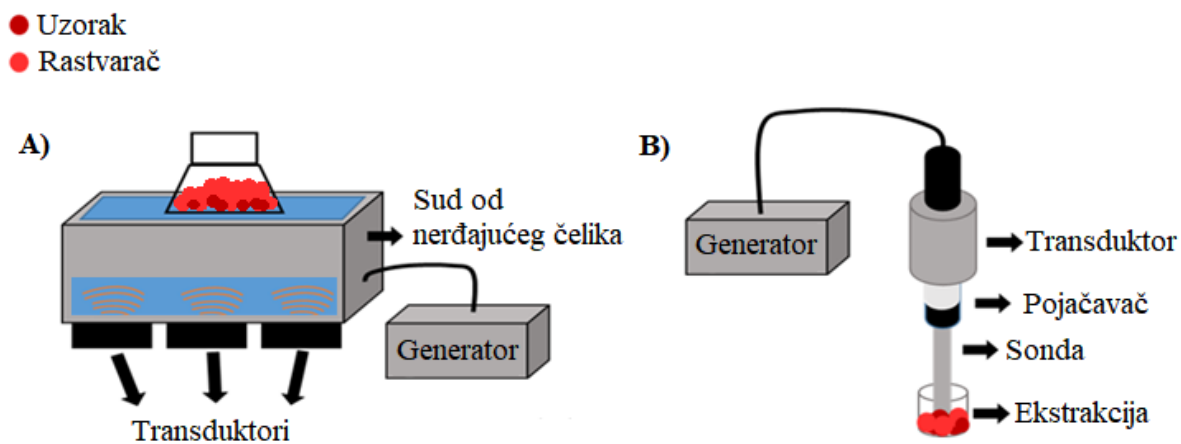
1.7.1.1. Ultrazvučna ekstrakcija

U industrijskim procesima koriste se različite ekstrakcione metode. Poslednjih decenija raste upotreba ekstrakcije ultrazvučnim talasima (eng. *Ultrasound Assisted Extraction*, UAE), jer je uočeno da ima niz prednosti u odnosu na druge metode. Ovaj pristup podrazumeva korišćenje ultrazvuka u metodi ekstrakcije rastvaračem sa ciljem povećanja efikasnosti (J. Mason i sar., 2011). Ultrazvučna ekstrakcija je veoma jednostavna, brza, podrazumeva malu energetska potrošnju, nižu emisiju gasova i značajno je jeftinija od nekih novijih ekstrakcionih tehnika poput ekstrakcije superkritičnim fluidom ili ubrzane ekstrakcije rastvaračem. Primenom ultrazvuka (visokog intenziteta, 10-1000 W/cm²) postiže se visok prinos ekstrakcije uz redukovanu potrošnju rastvarača (Chemat i sar., 2017). Upotreba ultrazvuka u industriji za izolovanje različitih molekula, poput polisaharida, peptida, proteina, različitih pigmenata i bioaktivnih jedinjenja predstavlja ključni pristup za postizanje principa zelene hemije (Tiwari, 2015).

Ultrazvučna ekstrakcija je visoko efikasna zahvaljujući akustičnoj kavitaciji, koja predstavlja osnovnu pogonsku silu UAE. Kada se ultrazvuk širi kroz određeni medijum on indukuje seriju visoko-pritisnih (kompresija) i nisko-pritisnih (dekompresija) talasa (McClements, 1995). Kada ciklus dekompresije nadvlada privlačne sile molekula tečnosti dolazi do formiranja, a kasnije rasta i simetrične implozije, mehurića ispunjenih vazduhom. Ovaj fenomen stvaranja, širenja i implozivnog kolapsa mikromehurića u ultrazvukom ozračenim tečnostima poznat je kao "akustična kavitacija". Ultrazvuk, odnosno akustična kavitacija izaziva mehaničke, hemijske i biohemijske promene u medijumu kroz koji prolazi (Mason & Peters, 2002). Promene temperature i pritiska koje nastaju usled implozija izazivaju oštećenje ćelijskog zida čime se povećava permeabilnost ćelija, što rezultira pojačanim prodiranjem rastvarača u ćelije i povećanim prenosom ciljnih jedinjenja u rastvarač (Mason & Peters, 2002; Shirsath i sar., 2012; Tiwari, 2015). Ukoliko do implozije dođe u neposrednoj blizini čvrste faze, kavitacioni mehurići se deformišu i stvara se mlaz velike brzine koji udara u površinu čvrste faze, uklanja čestice sa nje ili uzrokuje njeno potpuno razaranje (Lauterborn & Ohl, 1997).

Kavitacioni mehurići sadrže pare rastvarača i gasove rastvorene u rastvaraču. Akustična kavitacija može izazvati stvaranje reaktivnih radikala (HO• i H•) koji se akumuliraju na površini mehurića (Schmitt i sar., 1929). Nastali radikali su nestabilni i podležu lančanim hemijskim reakcijama koje generišu nova reaktivna jedinjenja, što na kraju može dovesti do degradacije ekstrakta ukoliko proces ekstrakcije traje predugo (Czechowska-Biskup i sar., 2005; Pingret i sar., 2013).

Na **Slici 19** prikazani su tipovi ultrazvučnih uređaja- ultrazvučno kupatilo i ekstraktor sa ultrazvučnom sondom. Oba uređaja zasnivaju se na upotrebi transduktora za generisanje ultrazvuka na različitim frekvencijama (Martins Strieder i sar., 2019). Ultrazvučna sonda se uranja direktno u rastvor gde se vrši sonifikacija, i tom prilikom se generiše najmanje 100 puta veća ultrazvučna snaga nego u slučaju ultrazvučnog kupatila. To je najvažnija razlika između ova dva uređaja koja ujedno i definiše njihovu namenu (H. Santos & Capelo, 2007).



Slika 19. Tipovi ultrazvučnih uređaja (preuzeto i prilagođeno (Martins Strieder i sar., 2019))
a) ultrazvučno kupatilo i b) ekstraktor sa ultrazvučnom sondom

1.7.1.2. Faktori koji utiču na efikasnost ultrazvučne ekstrakcije

Postoji nekoliko faktora koje treba uzeti u obzir prilikom planiranja procesa ultrazvučne ekstrakcije (**Tabela 4**). Na sposobnost ultrazvuka da izazove kavitaciju utiču parametri koji su direktno povezani sa ultrazvučnim uređajem, kao što su frekvencija, talasna dužina i amplituda, zatim snaga i intenzitet. Dizajn reaktora (veličina i oblik) kao i oblik sonde takođe mogu uticati na ultrazvučni proces (Pingret i sar., 2013; Tiwari, 2015). Parametri kao što su vreme, temperatura, izbor rastvarača, odnos materijala i rastvarača mogu definisati efikasnost ekstrakcije (Caldas i sar., 2018; S. Wang i sar., 2007).

Tabela 4. Ključni uticaji spoljašnjih faktora na UAE ((Flannigan & Suslick, 2010; Paniwnyk, 2017; H. Santos & Capelo, 2007; Tiwari, 2015))

Spoljašnji faktori	Ključni uticaji
Amplituda Intenzitet	<ul style="list-style-type: none"> • Visoka amplituda izaziva eroziju sonde; smanjuje stvaranje kavitacije • Visoka amplituda je poželjna kod izrazito viskoznih tečnosti (npr. ulja) • Visok intenzitet može podstaći degradaciju ekstrahovanih jedinjenja
Frekvencija	<ul style="list-style-type: none"> • Izabrana frekvencija zajedno sa ultrazvučnim intenzitetom određuje stvaranje kavitacionih mehurića • Veći prinosi ekstrakcije postižu se pri nižim frekvencijama • Više frekvencije povećavaju stvaranje slobodnih radikala
Temperatura	<ul style="list-style-type: none"> • Visoka temperatura povećava brzinu difuzije rastvarača • Niska temperatura pojačava kavitaciju
Vreme	<ul style="list-style-type: none"> • Dugo vreme ekstrakcije povećava prinos; može uzrokovati degradaciju ekstrahovanih jedinjenja
Rastvarač	<ul style="list-style-type: none"> • Viskozni rastvarač smanjuje prag kavitacije • Lako isparljivi rastvarač može ispariti ukoliko ekstrakcija na visokoj temperaturi traje dugo • Polaritet i rastvorljivost ciljanog jedinjenja u rastvaraču • Pritisak pare i površinski napon rastvarača utiču na kavitaciju (niži napon pare povezan je sa intenzivnijom implozijom mehurića)
Matriks	<ul style="list-style-type: none"> • Veličina čestica • Interakcija matriksa i rastvarača • Odnos materijal:rastvarač

1.7.1.3. Optimizacija procesa ekstrakcije primenom eksperimentalnog dizajna

Imajući u vidu principe zelene hemije i težnju da proces ekstrakcije rezultira maksimalnim prinosom, a uz minimalnu potrošnju energije, neophodno je ispitati uticaj različitih faktora na odgovor koji treba optimizovati tj. maksimizirati. Postupak optimizacije primenom tzv. *one-factor-at-a-time* pristupa, kod koga se jedan faktor varira na više nivoa, dok su drugi faktori fiksirani na jednom konstantnom nivou, ima dosta nedostataka. Ovakav pristup zahteva veći utrošak energije, više vremena, ekonomski je neisplativ i što je najvažnije ne analizira interakcije koje postoje između faktora. Višefaktorske metode optimizacije smanjuju broj eksperimenata, štede vreme i novac, a dobija se detaljan uvid u kombinovani efekat analiziranih faktora .(Baş & Boyacı, 2007)

Metoda površine odgovora (eng. *Response Surface Methodology*, RSM) je najčešće korišćena i najrelevantnija višefaktorska metoda optimizacije. Termin metoda površina odgovora povezan je sa grafičkim predstavljanjem matematičkog modela (Baş & Boyacı, 2007). Razvijena je pedesetih godina prošlog veka (Bezerra i sar., 2008). Osim što značajno smanjuje broj eksperimenata, RSM omogućava i potpuno objašnjenje ponašanja sistema, kao i predviđanje odgovora. Ova metoda ispituje uticaj više faktora na jednu ili više zavisno promenljivih. Kombinacijom matematičkih i statističkih metoda RSM generiše matematički model koji najadekvatnije opisuje hemijski ili biohemijski proces i istovremeno omogućava optimizaciju procesa predlažući nivoe promenljivih koji će dati željeni odgovor sistema. Kada je potrebno istovremeno uzeti u obzir veći broj odgovora, RSM može da se koristi u kombinaciji sa funkcijom poželjnih odgovora (Bezerra i sar., 2008; Vining i sar., 2005). Osim za optimizaciju, RSM se koristi i za određivanje kinetičkih konstanti i ispitivanje stabilnosti odnosno kinetike enzima (Boyacı, 2005; Mustafa Beyan i sar., 2021). RSM se oslanja na metodologiju eksperimentalnog dizajna (eng. *Design of Experiments*, DoE) čime se omogućava smanjenje broja eksperimenata, a povećava količina relevantnih i statistički značajnih podataka. Osnovni koraci u procesu optimizacije ekstrakcije primenom RSM su sledeći (Baş & Boyacı, 2007):

1. Izbor zavisnih i nezavisnih promenljivih, kao i njihovih nivoa

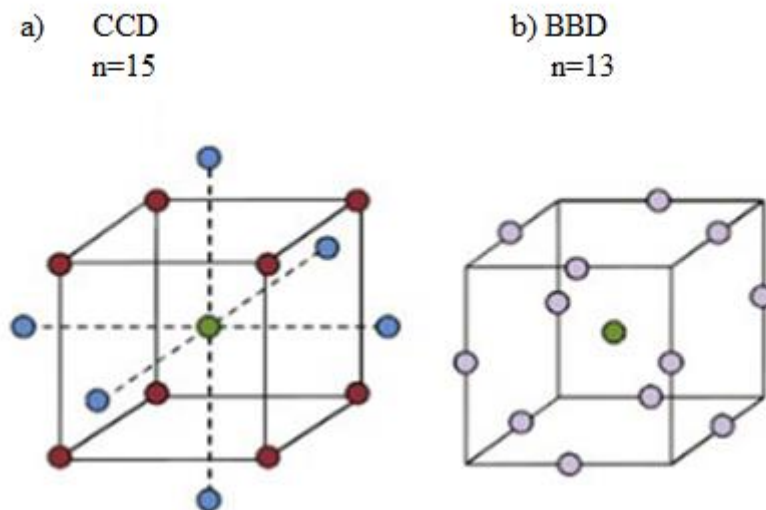
Izbor zavisnih (izlaznih) i nezavisnih (ulaznih) promenljivih, kao i nivoa na kojima će se one varirati zavisi od metode ekstrakcije koja se optimizuje i prethodnog iskustva istraživača. Kako veliki broj faktora utiče na proces ekstrakcije, nemoguće je kontrolisati svaki od njih, već prilikom izbora treba uzeti u obzir one faktore koji imaju najveći uticaj. Vrednosti izlaznih promenljivih direktno zavise od nivoa nezavisnih promenljivih, samim tim, pogrešan izbor nivoa rezultuje neuspešnom optimizacijom. Nakon odabira promenljivih, sistem generiše njihove kodirane vrednosti. Standardna jednačina za kodiranje realnih vrednosti parametara data je u nastavku:

$$X = \frac{X - (X_{max} + X_{min})/2}{(X_{max} - X_{min})/2} \quad (1)$$

- X - kodirana vrednost promenljive
- X - realna vrednost promenljive
- X_{max} - maksimalna vrednost realne vrednosti promenljive
- X_{min} - minimalna vrednost realne vrednosti promenljive

2. Izbor eksperimentalnog dizajna, izvođenje eksperimenata prema definisanom planu, statistička analiza dobijenih podataka i formiranje matematičkog modela

Drugi korak RSM je izbor odgovarajućeg eksperimentalnog dizajna. Eksperimentalni dizajn predstavlja set eksperimenata definisan matricom koja je formirana kombinacijom različitih nivoa nezavisnih promenljivih. U zavisnosti od izbora eksperimentalnih tačaka, broja nivoa nezavisnih promenljivih, broja blokova i eksperimenata razlikujemo veliki broj eksperimentalnih dizajna. Najčešće su u upotrebi centralni kompozicioni dizajn (eng. *Central Composite Design*, CCD) i *Box-Behnken* dizajn (eng. *Box Behnken Design*, BBD) (Hanrahan & Lu, 2006). Kod CCD se određuju koeficijenti kvadratnog modela aproksimativne funkcije čiji maksimum ili minimum definišu optimalne vrednosti faktora. BBD ne sadrži kombinacije parametara u kojima su faktori na svojim najvišim ili najnižim nivoima čime se izbegavaju ekstremni radni uslovi pri kojima može doći do znatnih odstupanja i proces optimizacije se postiže uz manji broj eksperimenata (**Slika 20**).



Slika 20. Šematski prikaz RSM drugog reda; a) Centralni kompozicioni dizajn (CCD); b) *Box-Behnken* dizajn (BBD) (preuzeto i prilagođeno (Asghar Bataleblu, 2020))

Odabirom BBD, faktori se variraju na 3 nivoa (-1, 0, 1), na podjednakoj udaljenosti među nivoima. Ovakav dizajn kombinuje faktore u tzv. blokove, zbog čega se kategoriše kao nepotpun, ali je veoma efikasan budući da značajno smanjuje broj eksperimenata. Nakon odabira dizajna, izvode se eksperimenti prema definisanoj matrici odnosno planu. Dobijeni rezultati se zatim tumače i statistički analiziraju.

Matematički model je rezultat statističke obrade dobijenih rezultata i predstavlja aproksimaciju realne zavisnosti faktora i odgovora sistema korišćenjem regresije obično u formi polinoma (Bezerra i sar., 2008). Takve polinomijalne funkcije uključuju interakcije između variranih procesnih parametara (polinomi prvog reda), kao i kvadratne efekte promenljivih (polinomi drugog reda). Jednačina kvadratnog modela:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2)$$

- β_i i β_j - regresioni koeficijenti efekata glavnih faktora
- β_{ii} - regresioni koeficijent kvadratnog efekta
- β_{ij} - regresioni koeficijent interakcije
- x_i i x_j - promenljive

Regresioni koeficijenti u kvadratnoj jednačini određuju se metodom najmanjih kvadrata (Donohue i sar., 1995).

Odnos između nezavisnih i zavisnih promenljivih opisuje se matematičkim modelom. Međutim, neophodno je proveriti da li model adekvatno opisuje tu vezu, kao i kolika je tačnost predviđanja. Primenom analize varijanse (ANOVA) moguće je proveriti adekvatnost modela, ali i značajnost

glavnih faktora, interakcija i kvadratnih uticaja ispitivanih faktora. ANOVA poredi varijacije u okviru eksperimentalnih rezultata, pri čemu izvori varijabilnosti mogu biti: model, faktori, interakcije među faktorima, kvadratni članovi faktora, ostaci (reziduali), odstupanje od modela, greška i ukupna korekcija modela, zbog čega svi ovi parametri podležu analizi.

Najvažniji parametri za procenu statističke značajnosti analiziranih parametara su F i p vrednosti. Veća F vrednost ukazuje na veću značajnost parametra. Sa druge strane, p vrednosti manje od 0,05 (interval poverenja od 95%), odnosno 0,01 (interval poverenja od 99%), ukazuju na nivo statističke značajnosti. Odstupanje od modela (eng. *Lack of Fit*) ispituje da li su razlike između vrednosti dobijenih eksperimentalnim putem i onih koje predviđa model statistički neznačajne ($p > 0,05$), odnosno da li neslaganje može biti objašnjeno eksperimentalnom greškom. Procenat ukupnih varijacija predloženog modela, odnosno fitovanje eksperimentalnih i predviđenih vrednosti, ispituje se pomoću koeficijenta determinacije (R^2), njegove prilagođene ($adj. R^2$) i predviđene vrednosti ($pred. R^2$). Adekvatnost matematičkog modela se postiže ukoliko su R^2 i $adj. R^2$ bliži jedinici, a razlika između $adj. R^2$ i $pred. R^2$ manja od 0,2.

Za procenu ponovljivosti modela koriste se koeficijent varijacije (eng. *Coefficient of Variation, C.V.*) i PRESS (eng. *Predicted Residual Error Sum of Squares*). $C.V.$ vrednosti manje od 10% i PRESS vrednosti veće od četiri ukazuju da je model ponovljiv.

Efekti glavnih faktora i interakcija ispitivanih faktora analiziraju se na osnovu apsolutnih vrednosti koeficijenata matematičkog modela. Veća vrednost apsolutne vrednosti koeficijenta ukazuje na veći uticaj faktora na odgovore sistema. Pozitivan predznak ukazuje da povećanje vrednosti faktora dovodi do povećanja odgovora sistema, dok negativan predznak ukazuje da povećanje vrednosti faktora dovodi do smanjenja zavisno promenljive (Bezerra i sar., 2008).

3. Grafički prikaz matematičkog modela i optimizacija bazirana na modelu

Grafički prikaz jednačine modela može se dati u formi dvodimenzionalnog (2D) i trodimenzionalnog (3D) dijagrama i njihova primena je posebno korisna za interpretaciju efekata interakcija ispitivanih faktora (Nwabueze, 2010). 2D dijagram je u konturnom obliku, i predstavlja prikaz odgovora sistema na variranje jednog faktora (x -osa), dok druga dva faktora ostaju konstantna na nultom nivou. Centar elipsi ili krugova na kontur dijagramu predstavlja maksimum ili minimum odziva. Kontur dijagram u obliku hiperbole ili parabole ima tačku ukrštanja koja ne predstavlja ni maksimum, ni minimum odziva (Baş & Boyacı, 2007). 3D dijagram prikazuje interakcije dva faktora i odgovor sistema za sve nivoe ovih promenljivih, pa se nekada može koristiti i za određivanje optimalnih uslova ispitivanog procesa.

Na osnovu matematičkog modela i njegovih grafičkih prikaza vrši se optimizacija procesa, odnosno definisanje uslova pri kojima se postiže maksimalni odgovor sistema.

1.7.2. Upotreba bezbednijih rastvarača u industrijskim procesima

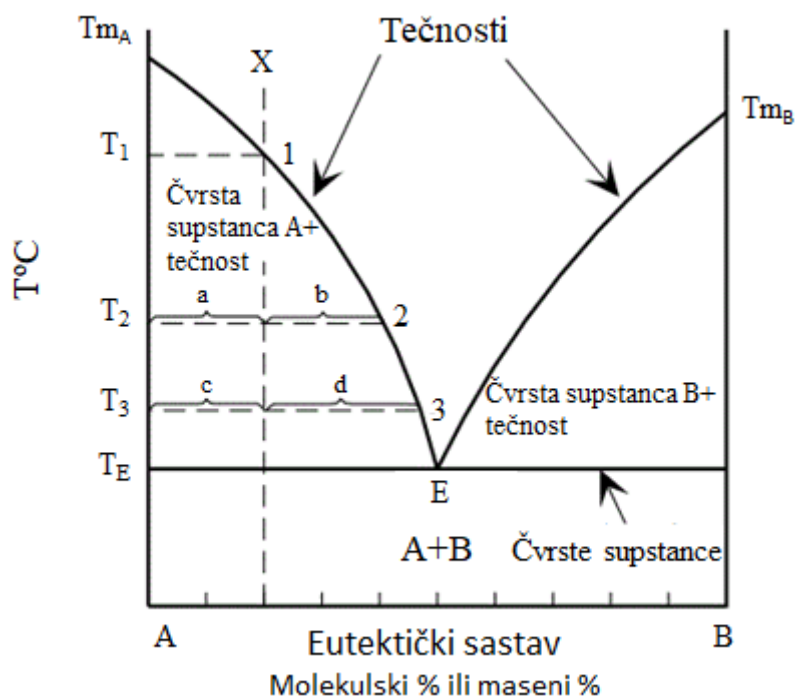
Laboratorijski, ali i industrijski procesi ekstrakcije iz biljnog materijala zahtevaju upotrebu rastvarača u gotovo svim fazama proizvodnog ciklusa. Koriste se uglavnom organski rastvarači, poput metanola, etanola, acetona, hloroforma, heksana, itd. Pomenuta jedinjenja imaju nepovoljan ekotoksikološki profil, zbog čega se poslednjih godina savetuje dizajniranje i sinteza alternativnih rastvarača koji zadovoljavaju ekonomske i tehnološke zahteve. Ovaj pristup je u skladu sa petim principom zelene hemije, budući da zeleni rastvarači imaju niz, pre svega ekoloških, prednosti u odnosu na široko primenjivane konvencionalne rastvarače.

Jonske tečnosti (eng. *Ionic Liquids*, IL) se smatraju prvim sintetisanim „zelenim” rastvaračima. To su nevodene organske soli, koje se sastoje samo od jona i tečne su na temperaturi nižoj od 100 °C. IL su stabilna jedinjenja, ekološki prihvatljivija od konvencionalnih rastvarača, imaju nizak stepen zapaljivosti i isparljivosti, kao i veliku toplotnu provodljivost (Troter i sar., 2016). Ipak, upotreba jonskih tečnosti ima i niz nedostataka, poput velikih finansijskih troškova, kao i poteškoća prilikom rukovanja, čuvanja i skladištenja. Neke IL su slabije biorazgradive, ali i rastvorljive u vodi, što potencijalno predstavlja ozbiljan ekološki problem (Thuy Pham i sar., 2010).

Eutektički rastvarači (eng. *Deep Eutectic Solvents*, DES) su prvi put opisani početkom 21. veka (Abbott i sar., 2001) i predstavljaju alternativu IL (Liu i sar., 2018). Pojam eutektički potiče od grčkih reči „ευ” što znači lako i „τήξις” što znači topljenje. U zavisnosti od komponenata i karakteristika eutektičkih smeša, u literaturi se često mogu naći nazivi poput smeše niske temperature faznog prelaza (eng. *Low Transition Temperature Mixtures*, LTTM) (Francisco i sar., 2013; Gonzalez i sar., 2013), ili prirodne eutektičke smeše (eng. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES). NADES su zapravo podgrupa DES, i predstavljaju smeše jedinjenja koja potiču iz prirodnih izvora. Termini DES i NADES se danas uglavnom koriste kao sinonimi.

1.7.2.1. Eutektički rastvarači

Eutektički rastvarači su u osnovi soli koje se dobijaju kombinacijom najmanje dva jedinjenja u određenom molarnom odnosu kako bi se formirala eutektička smeša koju karakteriše tačka topljenja ispod 100 °C (Cvjetko Bubalo i sar., 2015). Za razliku od jonskih tečnosti kod kojih se dva jedinjenja vezuju elektrostatičkim silama između anjona i katjona, kod eutektičkih rastvarača dolazi do formiranja vodoničnih veza ili veza metalnih halogenida preko anjona iz soli. Smeša jedinjenja koja ulaze u sastav eutektičkog rastvarača je tečnog agregatnog stanja i ima znatno nižu tačku topljenja od samih jedinjenja ponaosob. Usled nekovalentnih intermolekulskih interakcija između komponenti, smanjuje se energija sistema, što se karakteriše sniženjem tačke topljenja smeše. Na **Slici 21** je prikazan fazni dijagram binarne eutektičke smeše.

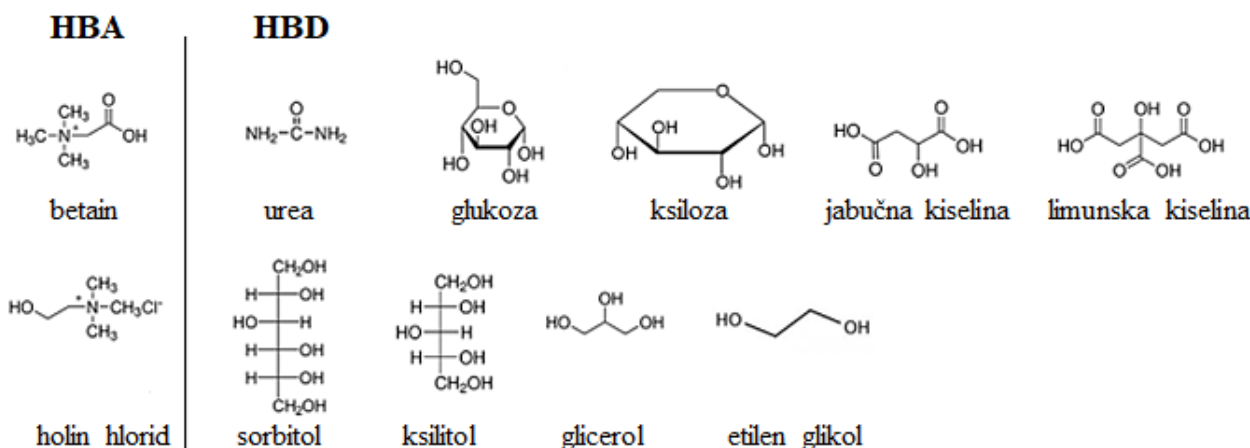


Slika 21. Fazni dijagram binarne eutektičke smeše

NADES imaju ogroman potencijal da smanje upotrebu ili čak u potpunosti zamene toksične organske rastvarače, koji čine oko 60% svih industrijskih emisija (Cvjetko Bubalo i sar., 2015). Mogu se smatrati idealnim „zelenim” rastvaračima, sa velikim potencijalom za industrijsku primenu, jer poseduju visok stepen biorazgradivosti, netoksični su, nezapaljivi i neisparljivi, hemijski i termički stabilni, mogu da se recikliraju, dostupni su i ekonomski prihvatljivi. Prilikom sinteze ovih rastvarača moguće je prilagoditi njihove fizičko-hemijske karakteristike, kao što su polarnost, viskozitet i gustina. Na taj način povećava se selektivnost rastvarača, a samim tim i ekonomičnost i efikasnost ekstrakcije (Radošević i sar., 2016). Ovi rastvarači, odnosno ekstrakti dobijeni njihovom primenom, su još uvek nedovoljno istraženi, ali se pretpostavlja da će zbog svog zelenog potencijala predstavljati fokus budućih istraživanja.

Tipovi eutektičkih rastvarača

Podela eutektičkih rastvarača izvršena je na osnovu prirode komponenata. Tipu 1 pripadaju rastvarači nastali kombinovanjem organske i anhidrovane metalne soli. Glavna karakteristika ove grupe je formiranje kompleksnog anjona. Najčešće se kao prva komponenta koriste supstituisane kvaternarne amonijum soli, dok metalni halogenidi (Zn, Se, Fe, Al, Ga, In) predstavljaju drugu komponentu. Tip 2 eutektičkih rastvarača nastaje kombinacijom organske soli i hidrata metalnih soli (halogenida). Relativno niske cene rastvarača iz ove grupe, kao i njihova stabilnost, čine ih posebno pogodnim za upotrebu u industriji. Tipu 3 eutektičkih rastvarača pripadaju kombinacije organske soli i donora vodonične veze i ovaj tip je najčešće u upotrebi. Prva komponenta je uglavnom kvaternarna amonijum so (holin hlorid ili etilamonijum hlorid), dok amidi (urea), šećeri (glukoza, ksiloza), šećerni alkoholi (ksilitol, sorbitol), polihidroksilni alkoholi (etilen glikol i glicerol) i karboksilne kiseline (jabučna, limunska kiselina) čine drugu komponentu sistema. Kvaternarne amonijum soli su akceptori vodonika (eng. *Hydrogen Bond Acceptor*, HBA), dok drugo jedinjenje smeše po svojoj hemijskoj strukturi ima osobine donora vodonika (eng. *Hydrogen Bond Donor*, HBD). Na **Slici 22** prikazane su hemijske strukture najčešćih konstituenata tipa 3 eutektičkih rastvarača.



Slika 22. Hemijske strukture najčešćih konstituenata tipa 3 eutektičkih rastvarača

Legenda: HBA- eng. *Hydrogen Bond Acceptor*, akceptor vodonika; HBD- eng. *Hydrogen Bond Donor*, donor vodonika

Tip 4 eutektičkih rastvarača kao prvu komponentu sadrži metalni halogenid koji u ovom slučaju predstavlja zamenu za organsku so, dok se kao druga komponenta koristi donor vodonika, najčešće, acetamid, 1,6-heksandiol, urea i 1,2-etandiol. Vodonična veza nastaje tako što jedan ili više halogenih anjona izmetalnog halogenida biva kompleksiran od strane donora, koji potom povlači anjon(e) od metalnog centra. Ovaj tip eutektičkih rastvarača je najmanje proučavan.

Priprema eutektičkih rastvarača

Eutektički rastvarači se pripremaju relativno jednostavno, mešanjem komponenti, pri čemu nije neophodan dodatni rastvarač i nema formiranja nusproizvoda, stoga ove reakcije karakteriše dobra ekonomija atoma (drugi princip zelene hemije).

Najčešće korišćene metode za pripremu eutektičkih rastvarača su mešanje uz zagrevanje, mlevenje, uparavanje i sušenje zamrzavanjem. Prvi način je najjednostavniji, odmere se određene mase komponenti, prenesu u odgovarajući sud i uz mešanje zagrevaju na temperaturi od 50 do 80 °C do formiranja homogene smeše (obično je za ovaj proces potrebno par sati). Ovakav postupak može potencijalno dovesti do stvaranja nusproizvoda ukoliko se kao HBD koriste organske kiseline, zbog čega se u tom slučaju preporučuje priprema mlevenjem ili mešanje na nižoj temperaturi. Priprema uparavanjem zahteva upotrebu rotacionog vakuum uparivača, nakon čega se uzorak čuva u eksikatoru sa silika gelom. Sušenje zamrzavanjem podrazumeva zamrzavanje vodenih rastvora pojedinačnih komponenti eutektičke smeše, najkompleksniji je postupak i najređe se koristi. U literaturi se takođe navodi priprema eutektičkih rastvarača korišćenjem ultrazvuka i mikrotalasa kao alternativnih izvora energije, čime se značajno skraćuje postupak. Poznata je i priprema NADES u atmosferi spore struje azota kao inertnog gasa. Eutektički rastvarači se čuvaju u zatvorenim posudama do upotrebe kako ne bi vezali vlagu iz vazduha.

Fizičko-hemijske karakteristike eutektičkih rastvarača

NADES su na sobnoj temperaturi viskozne i guste tečnosti što otežava njihovu laboratorijsku primenu. Viskozitet predstavlja poseban problem u težnji inkorporiranja ovih rastvarača u industrijske procese, budući da visok viskozitet sa sobom nosi nižu ekstrakcionu efikasnost uz povećane energetske zahteve. Generalno, najviskoziji su eutektički rastvarači sa šećerom, dok su najmanje viskozni oni sa polihidroksilnim alkoholom kao HBD komponentom. Polarnost je takođe bitna determinišuća karakteristika prirodnih eutektičkih rastvarača, jer direktno utiče na polje primene. NADES koji sadrži organske kiseline karakteriše se visokom polarnošću, sa druge strane, najmanje su polarne one smeše na bazi polihidroksilnih alkohola. Pored viskoziteta, gustine i

polarnosti, upotrebu NADES određuje pH vrednost rastvarača. Kao što je i očekivano, priroda samih konstituenata određuje pH vrednosti smeše. Tako npr. NADES na bazi organskih kiselina imaju pH vrednost nižu od 3, dok se ostali karakterišu kao slabo kiseli, neutralni ili čak bazni rastvarači.

Dodatkom vode, značajno se menjaju fizičko-hemijske karakteristike prirodnih eutektičkih smeša. Npr. gustina i viskozitet se smanjuju u prisustvu vode, što je značajno jer se time olakšava njihova primena (Panić, Radić Stojković, i sar., 2019). Takođe, dodatak vode izrazito kiselim eutektičkim rastvaračima povećava njihovu pH vrednost, dok alkalnim rastvaračima smanjuje pH vrednost. Prilikom dodavanja vode treba biti oprezan, jer njen višak dovodi do raskidanja vodoničnih veza, čime se gubi eutektički karakter.

Ekološka prihvatljivost eutektičkih rastvarača

Eutektički rastvarači se dobijaju od prirodnih sirovina čija je netoksičnost potvrđena više puta. Međutim, bezbednost konstituenata ne implicira i bezbednost smeše, jer postoji mogućnost sinergističkog efekta samih komponenti. Toksičnost eutektičkih rastvarača bila je predmet velikog broja studija. Utvrđeno je da, u zavisnosti od strukture, NADES poseduju nisku do umerenu toksičnost. Ispitivana je biorazgradivost određenih eutektičkih rastvarača korišćenjem mikroorganizama iz otpadnih voda, i pokazano je da su svi analizirani rastvarači lako biorazgradivi, kao i da postoji značajna korelacija između toksičnosti i biorazgradivosti. Važno je napomenuti i da se NADES karakterišu gotovo nultim naponom pare što minimizira rizik od zagađenja vazduha za razliku od organskih rastvarača.

Primena eutektičkih rastvarača u ekstrakciji polifenolnih jedinjenja

Poslednjih godina, eutektički rastvarači našli su primenu u različitim procesima. Mogu se koristiti u sintezi organskih jedinjenja (Shaabani & Hooshmand, 2016), sintezi polimera (Mota-Morales i sar., 2011), različitim separacionim procesima (Gonzalez i sar., 2013), u pripremi nanomaterijala (Liao i sar., 2008), itd. Primena eutektičkih rastvarača u ekstrakciji različitih biološki aktivnih jedinjenja potencijalno zadovoljava više principa zelene hemije; smanjuje se potrošnja energije, omogućava se korišćenje obnovljivih prirodnih sirovina i obezbeđuje se kvalitetan proizvod.

Efikasnost ekstrakcije zavisi od fizičko-hemijskih karakteristika eutektičke smeše, zbog čega je izbor rastvarača jedna od kritičnih tačaka prilikom postavljanja postupka ekstrakcije. Generalno, struktura ciljanih jedinjenja definiše odabir ekstrakcionog rastvarača. Slična polarnost ciljanih molekula i NADES povećava efikasnost ekstrakcije, ali ona zavisi i od pH vrednosti rastvarača, gustine, pa i osobina samog materijala koji se podvrgava ekstrakciji. Osim ekstrakcione efikasnosti, važan parametar koji treba uzeti u obzir pri izboru rastvarača je i stabilnost ekstrahovanih jedinjenja u njemu. Na primer, pokazano je da odgovarajući NADES obezbeđuje veću stabilnost izolovanih antocijana nego konvencionalni rastvarači (etanol i voda) (Dai i sar., 2016).

Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja upotrebom eutektičkih rastvarača privlači veliku pažnju naučne zajednice. U **Tabeli 5** je sumirano nekoliko studija koje su se bavile ispitivanjem efikasnosti eutektičkih rastvarača na bazi hlorida u ekstrakciji polifenolnih jedinjenja.

Tabela 5. Studije novijeg datuma koje su se bavile ispitivanjem efikasnosti eutektičkih rastvarača na bazi holin hlorida u ekstrakciji polifenolnih jedinjenja

Biljni materijal	Ispitivani eutektički rastvarači	Metoda ekstrakcije	Ciljana jedinjenja	Referenca
Kakao proizvodi	ChLa; BLa; ChGly; BGly; ChB1,4; BB1,4	Ekstrakcija zagrevanjem uz mešanje Ultrazvučna ekstrakcija	Ukupni polifenoli	(Ruesgas-Ramón i sar., 2020)
Zeleni čaj	ChEG	Ekstrakcija zagrevanjem uz mešanje	Prinos polifenolnih jedinjenja	(Cui i sar., 2021)
List masline	ChLa, ChOx, ChTa, ChB1,4; ChEG; ChXyl; ChP1,2; ChMalt; ChU	Mikrotalasna ekstrakcija	Ukupni polifenoli	(Alañón i sar., 2020)
Komina masline	ChCit; ChLa; ChMalt; ChGly	Mehaničko mešanje Mikrotalasna ekstrakcija Ultrazvučna ekstrakcija Ekstrakcija pod visokim hidrostatskim pritiskom	Ukupni polifenoli	(Chanioti & Tzia, 2018)
Kora pomorandže	ChEG	Ekstrakcija uz mešanje	Ukupni polifenoli	(Panić, Andlar, i sar., 2021)
Komina borovnice	ChOx	Pulsna ultrazvučna ekstrakcija	Ukupni antocijani	(Fu i sar., 2021)
Borovnica	ChCitGly	Ekstrakcija zagrevanjem u vodenom kupatilu	Ukupni antocijani	(D. T. D. Silva i sar., 2020)
Pokožica grožđa	ChGly; ChGly; ChOx; ChMa; ChSor; ChProMa	Mikrotalasna ekstrakcija Ultrazvučna ekstrakcija	Flavonoli Flavan-3-oli Antocijani	(Cvjetko Bubalo i sar., 2016)
Pokožica grožđa	ChMa; ChCit; ChGly; ChGlc; ChFru; ChGal; ChRib; ChSuc; ChMalt; ChMal	Ultrazvučna ekstrakcija	Ukupni polifenoli i ukupni antocijani	(Jeong i sar., 2015)
Listovi šafranike	ChOx; ChEG; ChB1,4; ChH1,6	Ultrazvučna ekstrakcija	Ukupni flavonoidi	(X.-H. Wang & Wang, 2019)
Kurkuma	ChLa	Ekstrakcija ultrazvučnom sondom	Kurkuminoidi	(Patil i sar., 2021)
Ruzmarin	ChP1,2	Ekstrakcija zagrevanjem uz mešanje	Ukupni polifenoli	(Wojeicchowski i sar., 2021)
Propolis	ChCitTa	Ultrazvučna ekstrakcija Mikrotalasna ekstrakcija	Ukupni flavonoidi i kondenzovani tanini	(Koutsoukos i sar., 2019)

Legenda: Ch- eng. *choline chloride*, holin hlorid; B- eng. *betaine*, betain; La- eng. *lactic acid*, mlečna kiselina; Gly- eng. *glycerol*, glicerol; B1,4- eng. *1,4-butanediol*, 1,4-butandiol; EG- eng. *ethylene glycol*, etilen glikol; Ox- eng. *oxalic acid*, oksalna kiselina; Ta- eng. *tartaric acid*, vinska kiselina; Xyl- eng. *xylose*, ksiloza; P1,2- eng. *1,2-propanediol*, 1,2-propandiol; Malt- eng. *maltose*, maltoza; U- eng. *urea*, urea; Cit- eng. *citric acid*; limunska kiselina; Sor- eng. *sorbitol*, sorbitol; Pro- eng. *proline*, prolin; Ma- eng. *malic acid*, jabučna kiselina; Glc- eng. *glucose*, glukoza; Fru- eng. *fructose*, fruktoza; Gal- eng. *galactose*, galaktoza; Rib- eng. *ribose*, riboza; Suc- eng. *sucrose*, sukroza; Mal- eng. *maltitol*, maltitol; H1,6- eng. *1,6-hexanediol*, 1,6-heksandiol

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Tema ove doktorske disertacije u skladu je sa aktuelnim pravcima istraživanja u oblasti bromatologije, s obzirom da obuhvata optimizaciju procesa ekstrakcije; komparativnu analizu ekstrakata različitih delova ploda vinove loze; upotrebu ekološki prihvatljivog rastvarača; detaljno ispitivanje sastava i biološke aktivnosti ekstrakata dobijenih primenom konvencionalnog i eutektičkog rastvarača, kao i njihovo poređenje. Ispitivanja su organizovana kroz nekoliko faza i analiziran je veliki broj domaćih i introdukovanih sorti vinove loze.

Prva faza istraživanja imala je za cilj optimizaciju procesa ekstrakcije polifenolnih jedinjenja, odnosno definisanje uslova pod kojima će se postići maksimalna ekstraktivna efikasnost.

Druga faza predstavljala je komparativnu analizu ekstrakata 24 domaće i introdukovane sorte vinove loze, pri čemu su odvojeno posmatrani različiti delovi ploda (pokožica i semenke). U ovoj fazi doktorske disertacije korišćeni su konvencionalni rastvarači. Ekstrakti pokožice dobijeni su pomoću hidrofilnog rastvarača, a semenke su zbog visokog sadržaja ulja predstavljale sirovinu za dobijanje dve vrste ekstrakata- lipofilnih koji su dobijeni korišćenjem hidrofobnog organskog rastvarača i hidrofilnih koji su pripremljeni analogno ekstraktima pokožice. Cilj je bio da se dobijeni ekstrakti ispituju u pogledu polifenolnog sadržaja i antioksidativnog potencijala i da se izdvoje sorte vinove loze sa najvećim biološkim potencijalom. Lipofilni ekstrakti semenki (ulja) analizirani su kao izvori esencijalnih masnih kiselina i tokoferola.

Treća faza. Na osnovu rezultata dobijenih iz druge faze, uzorci identifikovanih najpotentnijih sorti vinove loze su prikupljeni naredne godine. U ovoj fazi izvršena je ekstrakcija biološki aktivnih jedinjenja iz pokožica i semenki klasičnim organskim rastvaračem i eutektičkim rastvaračem na bazi holin-hlorida. Cilj treće faze bio je detaljna fitohemijska analiza ekstrakata i komparativna procena efikasnosti korišćenih rastvarača.

U okviru **četvrte faze** ispitivana je biološka aktivnost ekstrakata dobijenih u trećoj fazi i to: antioksidativni, citotoksični i antimikrobni potencijal. Posebna pažnja usmerena je na identifikovanje jedinjenja odgovornih za biološku aktivnost grožđa.

3. MATERIJAL I METODE

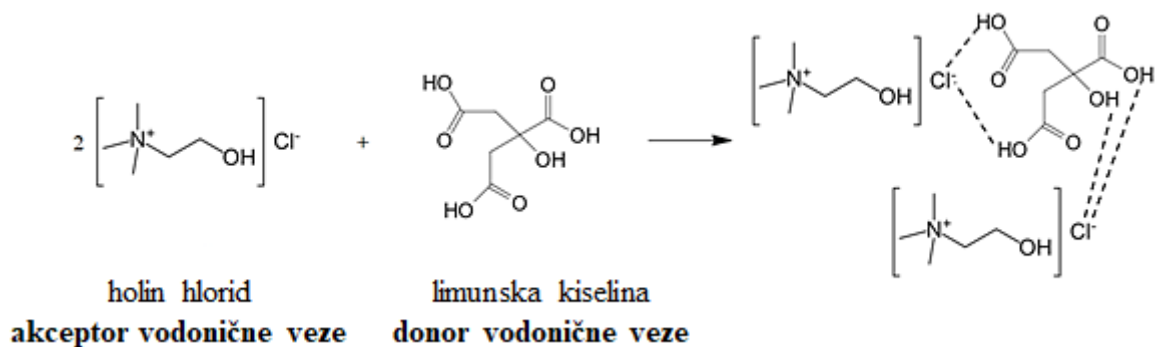
3.1. Hemikalije i reagensi

3.1.1 Osnovni reagensi i standardi

- Limunska kiselina, (\pm)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina (Troloks), 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin (TPTZ), 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) di-amonijumova so (ABTS), neokuproin, MTT reagens (tetrazolijumska so, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid), natrijum-dodecilsulfat- Sigma-Aldrich (*St. Louis, USA*)
- Galna kiselina (čistoće 98%), holin hlorid, 4-dimetilamino-cinamaldehyd i metanska kiselina- Acros Organics (*New Jersey, USA*)
- Hlorovodonična kiselina, pirogalol, *Folin-Ciocalteu* reagens (FC), kalijum hidroksid, natrijum karbonat, gvožđe-(III)-hlorid-6-hidrat, kalijum persulfat proizvodi su kompanije Merck (*Darmstadt, Germany*)
- Standardne supstance korišćene u okviru ovog rada: jabučna kiselina, vinska kiselina, galna kiselina i limunska kiselina- Acros Organics (*New Jersey, USA*); protokatehnična kiselina, (+)-katehin, (-)-epikatehin, kvercetin, rutin, procijanidin B1 i procijanidin B2- Sigma-Aldrich (*St. Louis, USA*); galokatehin i epigalokatehin- Fluka (*Buchs, Switzerland*); malvidin-3-O-glukozid- Polyphenols AS (*Sandnes, Norway*); tokoferoli- Supelco (*Bellefonte, Pennsylvania, USA*)
- Etanol (HPLC stepena čistoće), glacijalna sirćetna kiselina i hlorovodonična kiselina- Fisher Chemicals (*Fair Lawn, New Jersey*)
- Acetonitril- J.T. Baker (*Gliwice, Poland*)
- Visoko prečišćena voda- TKA GenPure (*Niederelbert, Germany*)
- Svi standardni sojevi mikroorganizama, kao i sve korišćene ćelijske linije- *American Type Culture Collection* (ATCC) (*Manasas, USA*)
- *Mueller-Hinton* i *Sabouraud* bujon- Lab M Limited (*Bury, Lancashire, UK*)

3.1.2. Priprema rastvarača

Jedan od ciljeva ove doktorske disertacije bio je procena ekstrakcione efikasnosti prirodnog eutektičkog rastvarača (eng. *Natural Deep Eutectic Solvent*, NADES). U tu svrhu, izvršena je sinteza NADES, i to kombinovanjem akceptora vodonične veze (holin hlorid; 2-hidroksi-etil-trimetil-amonijum hlorid, ChCl) i donora vodonične veze (limunska kiselina; eng. *Citric Acid*, Cit) u molskom udelu 2:1 (**Slika 23**).



Slika 23. Šematski prikaz sinteze NADES

Rastvarač holin hlorid: limunska kiselina (ChCit) izabran je na osnovu ranijih istraživanja koja su nedvosmisleno pokazala da ovaj tip eutektičkih rastvarača (kvaternarna amonijumova so i organska kiselina) poseduje povoljne osobine- jeftin je, stabilan, jednostavan za pripremu, ekološki održiv i odlikuje se visokom ekstraktivnom sposobnošću (Panić, Radić Stojković, i sar., 2019). Efikasnost ovog alternativnog i eko-prihvatljivijeg rešenja poređena je sa široko korišćenim organskim rastvaračem u ekstrakciji polifenola- etanolom.

3.1.2.1. Priprema eutektičkog rastvarača

ChCit pripremljen je jednostavnom metodom zagrevanja, uz minimalne modifikacije (Abbott i sar., 2001). Sa ciljem smanjenja gustine rastvarača, NADES je pripremljen uz dodatak 30% vode. ChCl je prvo osušen u vakuum koncentratoru (Savant SPD131DDA SpeedVac Concentrator, Thermo scientific, USA) na 60 °C u trajanju od 24 h. Zatim su odmerene obe komponente- holin hlorid i limunska kiselina, u molarnom odnosu 2:1, i prenete u pogodan zatvoren sud (balon). Smeša je zagrevana uz dodatak vode na temperaturi od 50 °C (oko 2 h), uz mešanje, do formiranja homogene, bezbojne tečnosti.

3.1.2.2. Priprema konvencionalnog rastvarača

Kao konvencionalni rastvarač korišćen je acidifikovani etanol. Dodatkom kiseline, pH vrednost etanola se tendenciozno smanjuje, kako bi se dodatno favorizovala ekstrakcija nekih polifenolnih jedinjenja (npr. antocijani prisutni u pokožici crvenih sorti grožđa su osetljivi na promenu pH vrednosti; pri nižim pH vrednostima nalaze u obliku stabilnog flavilijum katjona, dok se pri visokim pH vrednostima odvija njihova degradacija). Rastvarač korišćen u ovoj disertaciji dobijen je mešanjem etanola, destilovane vode i sirćetne kiseline (70:29,8:0,2; v/v/v).

3.2. Materijal

Eksperimentalni deo započet je opsežnom studijom koja je obuhvatila 24 najčešće gajene sorte vinove loze na teritoriji Srbije. Izabrane su većinom vinske sorte, ali je ispitivanje sprovedeno i na par stonih sorti.

U **Tabeli 6** su prikazane osnovne karakteristike odabranih uzoraka grožđa, uključujući kategoriju, sinonime, poreklo i rasprostranjenost, izgled bobice i vreme sazrevanja.

Tabela 6. Osnovne karakteristike odabranih sorti (Ivanišević i sar., 2015; Žunić & Garić, 2010)

Sorta	Kategorija	Sinonimi	Poreklo i rasprostranjenost	Izgled bobice	Epoha sazrevanja
Sorte za bela vina					
Sauvignon Blanc	Sorta za visokokvalitetna - vrhunska bela vina	Sauvignon bianco, Sauvignon blanc, Petit Sauvignon, Gros Sauvignon, Sauvignon, Muškatni silvanac	Potiće iz Francuske. Gaji se u Francuskoj, Italiji, Nemačkoj, Austriji, Mađarskoj, Rumuniji, Bugarskoj, SAD, Rusiji, Australiji, Sloveniji, Srbiji, itd.	Male ili srednje veličine, okrugla ili izduženo okrugla; pokožica je srednje debljine, žutozelene boje, sa dosta tačkica; pupak i pepeljak su umereno izraženi.	Krajem II epohe, srednje pozna sorta
Tamjanika	Sorta za visokokvalitetna - vrhunska bela vina	Tamjanika bela, Muscat blanc, Muscat frontignan, Muscato Bianco, Moscato Canelli, itd.	Poreklo nije utvrđeno. Gaji se u Francuskoj, Italiji, Nemačkoj, SAD, Bugarskoj, Rumuniji, Rusiji, Srbiji, itd.	Srednje veličine, okrugla; pokožica je žutozelene boje, srednje posuta pepeljkom, sa slabo izraženim pupkom i sitnim belim tačkicama.	Krajem III epohe, pozna sorta
Rizling Rajnski	Sorta za visokokvalitetna - vrhunska bela vina	Riesling blanc, Gentil aromatique, Petit Riesling, Petit Rhin, Riesling renano, Rajna i rizling, itd.	Potiće iz Nemačke. Gaji se u Francuskoj, Italiji, Švajcarskoj, Austriji, Mađarskoj, Rumuniji, Srbiji, Australiji, SAD, Rusiji, Sloveniji, itd.	Mala ili srednje veličine, okrugla; pokožica je zelenožuta, protkana žilicama, prozirna, posuta pepeljkom, sa tačkicama.	III epoha, pozna sorta
Italijanski Rizling	Sorta za visokokvalitetna - vrhunska bela vina	Rizling talijanski, Graševina, Grašica, Laški Rizling, Welschriesling, Riesling italico, Riesling Italien white	Potiće iz Francuske. Gaji se u Nemačkoj, Italiji, Mađarskoj, Austriji, Sloveniji, Češkoj, Bugarskoj, Sloveniji, Hrvatskoj, Srbiji, itd.	Mala, okrugla; pokožica debela, prozračna, protkana sitnim žilicama, zelenožute boje, pokrivena pepeljkom i sa veoma izraženim pupkom. Puna semenki.	III epoha, pozna sorta
Smederevka	Sorta za kvalitetno belo vino	Belina, Belina krupna, Dimijat, Dimiat, Galan, Zoumiatico, Dertonia, Szemendriai zold	Autohtona balkanska sorta. Gaji se u Bugarskoj, Rusiji, Moldaviji, Makedoniji, Grčkoj, Srbiji i Turskoj.	Srednje veličine ili grupna, ovalna; pokožica srednje debljine, žutozelene boje, na sunčanoj strani sa ćilibarnim mrljama.	IV epoha, veoma pozna sorta
Chardonay	Sorta za visokokvalitetna - vrhunska bela vina	Chardonnay blanc, Chablis, Pinot Blanc chardonnay, Arboisier, Morillon blanc, itd.	Potiće iz Francuske. Gaji se u Francuskoj, Španiji, SAD. U manjem obimu prisutna je u Italiji, Nemačkoj, Austriji, Mađarskoj, Rumuniji, Bugarskoj, Rusiji, itd.	Mala, okrugla, sočna; pokožica debela, žutobele boje.	II epoha, srednje pozna sorta
Bagrina crvena	Sorta za visokokvalitetna - vrhunska bela vina	Bagrina krajinska, Bragina rošiu, Bragina rara, itd.	Stara balkanska sorta. Gaji se u Srbiji (Timočkoj krajini), Rumuniji i u Bugarskoj.	Srednje veličine, okrugla; pokožica tanka, prozračna, blede ružičaste boje, pokrivena pepeljkom.	III epoha, pozna sorta

Sorta	Kategorija	Sinonimi	Poreklo i rasprostranjenost	Izgled bobice	Epoha sazrevanja
<i>Župljanka</i>	Nova sorta za bela vina stvorena u Sremskim Karlovcima	Beli prokupac	Stvorena je ukrštanjem Prokupca i Burgundca crnog. Gaji se u vinogradima Hercegovine i Dalmacije. U Srbiji je najrasprostranjenija u Vojvodini.	Srednje veličine, ovalnog oblika; pokožica je zelenožute boje, izražene mrke tačkice	III epoha, pozna sorta
Sorte za crvena vina					
Gamay	Sorta vinove loze tipa bojadisera	Gamay tenturier, Gamay Freaux, Game freo, Barvarica	Potiče iz Francuske. Pretpostavlja se da je mutacija sorte Gamay Noir. Gaji se u svim vinogradarskim zemljama u kojima su zastupljene crne sorte.	Okrugla, mala ili srednje veličine, jajastog oblika; pokožica je tanka, plave do tamno plave boje, posuta pepeljkom.	Između II i III epohe, srednje pozna sorta
Vranac	Sorta za visokokvalitetna-vrhunska crvena vina	Vranac crmnički, Vranac crnogorski, Vranac prhljavac, Vranec, Vranac, Kratošija	Autohtona sorta Crne Gore. Gaji se u Crnoj Gori, Makedoniji, Srbiji, Dalmaciji i Hercegovini.	Srednje veličine, okrugla ili ovalna; pokožica je crnoplave boje.	III epoha, pozna sorta
Burgundac crni	Sorta za visokokvalitetna-vrhunska crvena vina	Pinot Noir, Blau Burgunder, Pignola, Pino Čornij, Burgundske modre, itd.	Potiče iz Francuske. Gaji se u Austriji, Nemačkoj, Slovačkoj, Švajcarskoj, Mađarskoj, Rumuniji, Srbiji, Crnoj Gori, Hrvatskoj, Sloveniji, itd.	Mala, okrugla, sočna; pokožica je tamno plave boje, sa dosta pepeljka, bez tačkica.	Krajem I epohe, rana sorta
<i>Začinak</i>	Sorta vinove loze tipa bojadisera	Začinjak, Negotinsko crno	Autohtona sorta Negotinske krajine. Gaji se u Timočkoj krajini, i sporadično u Bugarskoj i Makedoniji.	Mala ili srednje veličine, izduženo okrugla ili okrugla; pokožica je tamno plave boje, glatka, sa pepeljkom.	III epoha, pozna sorta
<i>Crna Tamjanika</i>	Sorta za crvena vina lokalnog i regionalnog značaja	Muskat ruža, Rosenmuskateller blauer, Moscato della rose nero	Autohtona sorta Srbije. Gaji se u krajinskom podrejonu i negotinskom vinogorju.	Mala, okrugla; pokožica je tamno plave boje.	Krajem II epohe
Merlot	Sorta za visokokvalitetna-vrhunska crvena vina	Merlo, Plant Medoc, Merlaut, Merlot Blauer, Merlot Nero, Merlo, Merlot Black	Potiče iz Francuske. Gaji se u Francuskoj, Španiji, Italiji, Rusiji, Ukrajini, Moldaviji, Australiji, SAD, Rumuniji, Makedoniji, Srbiji, Crnoj Gori, itd.	Mala, okrugla ili neznatno izdužena; pokožica je tamno plave boje, posuta obilnim pepeljkom.	III epoha, pozna sorta
<i>Prokupac</i>	Sorta za kvalitetna crvena vina	Prokupka, Rskavac, Kameničarka, Crnka, Niševka, Zarčin	Autohtona sorta Srbije. Gaji se u Makedoniji, u manjem obimu u Bugarskoj i Rusiji.	Srednje veličine, okrugla ili blago pljosnata; pokožica debela, tamno plave boje, sa tačkicama i posuta pepeljkom	III/IV epoha, veoma pozna sorta

Sorta	Kategorija	Sinonimi	Poreklo i rasprostranjenost	Izgled bobice	Epoha sazrevanja
Frankovka	Sorta za kvalitetna crvena vina	Frankovka crna, Limberger blauer, Modra frankinja, Moravka, Kekfrankos	Poreklo nije utvrđeno. Pretpostavlja se da potiče iz Austrije. Gaji se u Austriji, Francuskoj, Nemačkoj, Italiji, Mađarskoj, Slovačkoj, Češkoj, Rumuniji, Sloveniji, Hrvatskoj i Srbiji.	Srednje veličine, okrugla; pokožica je debela, tamnoplave boje, posuta obilnim pepeljkom.	III epoha, pozna sorta
Cabernet Fran	Sorta za visokokvalitetna-vrhunska crvena vina	Carbonet, Gros Cabernet, Gros Vidure, Veron, Carmenet, itd.	Potiče iz Francuske. Gaji se u Francuskoj, Italiji, Španiji, Rusiji, Ukrajini, Moldaviji, Rumuniji, Bugarskoj, Portugaliji, Sloveniji, Hrvatskoj, Srbiji.	Mala, okrugla; pokožica je tamnoplave do crnoplave boje, posuta pepeljkom.	III epoha, pozna sorta
Cabernet Sauvignon	Sorta za visokokvalitetna-vrhunska crvena vina	Petit Cabernet, Petit Vidure	Potiče iz Francuske. Gaji se u Francuskoj, Italiji, Španiji, Rusiji, Ukrajini, Moldaviji, Rumuniji, Bugarskoj, Mađarskoj, Srbiji, SAD, Čileu, Argentini, itd.	Mala, okrugla ili blago izdužena; pokožica tamno plave boje, posuta pepeljkom.	III epoha, pozna sorta
Shiraz	Sorta za crvena vina lokalnog i regionalnog značaja	Petit sirrah, Syra, Balsamina, Durif, itd.	Pretpostavlja se da je sorta iz Irana prenesena u Francusku.	Mala, ovalna; pokožica je tamno plave boje sa obilnim pepeljkom.	II epoha, srednje pozna sorta
Stone sorte					
Michele Palieri	Stona sorta	Michel Palieri, Michele Palieri	Stvorena je u Italiji, ukrštanjem sorti Ribier i Red malaga.	Srednje krupna do krupna, ovalna; pokožica je tamno plave boje.	Tokom II ili početkom III epohe
Afuz-ali	Stona sorta	Carigradsko grožđe, Bejrutska urma, Čilibar, Hafiz Ali, Datier De Bevrouth, Bolgar, itd.	Potiče iz Male Azije. Gaji se u Francuskoj, Italiji, Rusiji, Ukrajini, Grčkoj, Maroku, Alžiru, Bugarskoj, Makedoniji, Srbiji, itd.	Velika, izdužena; pokožica je žutozelene boje, posuta tačkicama i pepeljkom.	Krajem III ili početkom IV epohe, pozna je sorta
Jagoda	Stona sorta	Ranka jagoda, Tamjanika Jagodarka	Srpska autohtona sorta.	Srednje krupna do krupna; pokožica je žute boje.	II epoha, srednje pozna sorta
Muskat Hamburg	Stona sorta	Black Muskat, Moscato di Amburgo, Muskat de Hambourg, Hamburški muskat, itd.	Stvorena je u Engleskoj, ukrštanjem sorti Aleksandrijski muskat i Tirolan crni. Gaji se u Španiji, SAD, Francuskoj, Italiji, Australiji, Rusiji, Ukrajini, Moldaviji, Bugarskoj, Makedoniji, Srbiji, itd.	Velika, ovalna i neujednačene veličine; pokožica je tanka ili srednje debljine, plavocrvene boje, bez tačkica, izraženog pupka, posuta obilnim pepeljkom.	Krajem II i početkom III epohe, pozna sorta

Sorta	Kategorija	Sinonimi	Poreklo i rasprostranjenost	Izgled bobice	Epoha sazrevanja
Drenak crveni	Stona sorta	Solunski drenak, Razaklija, Valandovski drenak, Strumički drenak, Razaki, Parmak, Rosaki	Potiče iz Azije. Gaji se u Turskoj, Bugarskoj, Grčkoj, Crnoj Gori, Makedoniji, Srbiji.	Velika, tvrda, jajasta; pokožica debela, neprozirna, otvoreno crvene boje, bez tačkica, posuta obilnim pepeljkom.	IV epoha, veoma pozna sorta

**Italic* stilom su obeležene domaće sorte

3.3. Priprema uzoraka

Nakon berbe, bobice su odvojene od peteljki, oprane i osušene. Zatim su delovi ploda (pokožica i semenke) manuelno razdvojeni. Pre pripreme ekstrakata, pokožica je liofilizovana, a semenke su sušene na sobnoj temperaturi sve do pada sadržaja vlage ispod 10%.



Slika 24. Priprema uzoraka

a) liofilizacija pokožice; b) sušenje semenki

3.3.1. Ekstrakcija ulja

Izolovanje ulja iz semenki grožđa izvršeno je metodom po *Soxhlet*-u. Ova metoda priznata je kao standardna metoda za analizu sadržaja lipida u uzorcima biljnog i životinjskog porekla od strane Asocijacije analitičkih hemičara (eng. *Association of Official Analytical Chemists*, AOAC) (Dean, 2009). Aparatura po *Soxhlet*-u sastoji se od balona, ekstraktora i kondenzatora. Balon je pre postavljanja eksperimenta doveden do konstantne mase sušenjem na 105 °C. Osušene semenke su prvo samlevene, a zatim je odgovarajuća količina uzorka (oko 20 g) stavljena u čauru ekstraktora i podvrgnuta ponovljenom ispiranju (perkolaciji) pomoću organskog rastvarača (hloroform). Proces ekstrakcije trajao je 6 sati, pri čemu je maksimalna temperatura bila 70 °C. Određivanje ukupnih lipida vršeno je gravimetrijski, nakon što je hloroform sa ekstrahovanim lipidima uparen na vakuum uparivaču (BUCHI, Rotavapor R-100, *Switzerland*). Balon je posle uparavanja sušen do konstantne mase u vakuum sušnici na sobnoj temperaturi, nakon čega je određen sadržaj u balonu. Sadržaj ulja je izražen u %.

3.3.2. Priprema ekstrakata ulja

Polifenolna jedinjenja, prisutna u ulju iz semenki grožđa, ekstrahovana su metanolom metodom po *Parry*-ju, uz određene modifikacije (Parry i sar., 2005). Postupak ekstrakcije zahtevao je ultrazvučno homogenizovanje dve faze, ulja i metanola (odnos 2:10; *m/v*) u trajanju od 30 sekundi (ultrazvučnom sondom). Homogenat je centrifugiran 10 min na 3381 rcf (Eppendorf, Centrifuge 5424 R, *Hamburg, Germany*), da bi zatim supernatant bio dekantovan i korišćen za dalju analizu.

3.3.3. Optimizacija procesa ekstrakcije polifenolnih jedinjenja primenom metode površine odgovora

U cilju optimizacije procesa ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz semenki grožđa, kao i procene individualnih i kombinovanih uticaja ispitivanih faktora primenjen je *Box-Behnken* dizajn sa 16 eksperimenata koji su uključivali i četiri ponavljanja u centralnoj tački. Za definisanje optimalnih uslova primenjena je metoda površine odgovora (eng. *Response Surface Methodology*, RSM) (Bezerra i sar., 2008).

Ultrazvučna ekstrakcija je izvršena na obezmašćenim semenkama dve sorte vinove loze (Merlot i Italijanski Rizling), na konstantnoj frekvenci od 59 kHz. Acidifikovani etanol (70%) je korišćen kao

rastvarač za ekstrakciju. Tri faktora (nezavisno promenljive) varirana su na 3 nivoa: A- odnos uzorak:rastvarač (1:10, 2:10 i 3:10; m/v), B- vreme trajanja ekstrakcije (20, 30 i 40 minuta) i C- temperatura na kojoj je izvedena ekstrakcija (25, 50 i 75 °C). Kao odgovor sistema odabran je ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja određen *Folin-Ciocalteu* metodom. Matrica i plan eksperimenta prikazani su u **Tabeli 7**.

Tabela 7. Matrica i plan eksperimenta za optimizaciju procesa ekstrakcije primenom *Box-Behnken* dizajna

№	Kodirane vrednosti faktora			Realne vrednosti faktora		
	A	B	C	A odnos uzorak:rastvarač (m/v)	B vreme (min)	C temperatura (°C)
1	-1	0	1	1:10	30	75
2	0	0	0	2:10	30	50
3	0	-1	-1	2:10	20	25
4	1	-1	0	3:10	20	50
5	0	1	-1	2:10	40	25
6	0	0	0	2:10	30	50
7	1	1	0	3:10	40	50
8	0	0	0	2:10	30	50
9	-1	1	0	1:10	40	50
10	1	0	-1	3:10	30	25
11	-1	-1	0	1:10	20	50
12	0	-1	1	2:10	20	75
13	0	0	0	2:10	30	50
14	1	0	1	3:10	30	75
15	-1	0	-1	1:10	30	25
16	0	1	1	2:10	40	75

3.3.4. Priprema ekstrakata pokožice i semenki grožđa

Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja iz pokožice i semenki grožđa vršena je ultrazvučnom metodom. Proces ekstrakcije je optimizovan metodom površine odgovora, stoga su eksperimenti postavljeni uz prethodno određene optimalne uslove. U erlenmajere je odmereno oko 5 g uzorka- semenke koje su prethodno usitnjene i obezmašćene, odnosno liofilizovana i usitnjena pokožica. Zatim je dodato 50 mL rastvarača. Kao rastvarač korišćen je razblaženi acidifikovani etanol (etanol:voda:sirćetna kiselina (70:29,8:0,2; $v/v/v$), odnosno holin hlorid:limunska kiselina (2:1). Sadržaj je snažno promešan. Nakon vorteksiranja, erlenmajeri su postavljeni u ultrazvučno kupatilo (FALC, *Treviglio, Italy*). Ekstrakcija je vršena na 50 °C i 59 kHz, u trajanju od 30 minuta. Nakon toga, sadržaj je centrifugiran 15 minuta na 4430 rcf (Hermle Z 206 A, *Wehingen, Germany*) i supernatant je korišćen za dalju analizu.

3.4. Određivanje sadržaja biološki aktivnih sastojaka u grožđu

3.4.1. Određivanje ukupnih polifenolnih jedinjenja u ekstraktima pokožice i semenki grožđa, kao i u ekstraktima ulja iz semenki grožđa

Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja (eng. *Total Phenolic Content*, TPC) u ekstraktima pokožice i semenki grožđa određen je metodom po *Folin-Ciocalteu*-u na mikrotitracionoj ploči (eng. *Microtiter Plate*, MTP) (Attard, 2013). Isti postupak primenjen je i za metanolne ekstrakte ulja. Ekstrakti pokožice i semenki su razblaženi, dok je metanolni ekstrakt ulja uliven u bazenčiće bez prethodnog razblaživanja. Uzorci (10 μ L) su zatim pomešani sa 100 μ L FC reagensa (komercijalni reagens razblažen deset puta). Nakon toga dodat je vodeni rastvor Na_2CO_3 (80 μ L, 7,5%) u cilju postizanja bazne sredine (pH 10) koja je neophodna za oksido-redukcionu reakciju između polifenolnih jedinjenja i FC reagensa. Mikrotitraciona ploča je zaštićena od svetlosti i ostavljena da se inkubira 60 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, apsorbancija reakcione smeše merena je na MTP čitaču (BIOTEK, USA, ELx800 Absorbance Microplate Reader), na talasnoj dužini od 630 nm. Slepna proba pripremljena je na isti način, samo što je umesto razblaženog uzorka u bazenčiće uliven rastvarač za ekstrakciju. Sadržaj polifenolnih jedinjenja određen je metodom kalibracione krive, korišćenjem galne kiseline (0,1 g/L) kao standarda. Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenata galne kiseline po gramu ulja/liofilizata (pokožica)/ suve materije (semenke) (mg GAE/g). Kalibraciona kriva ($y=0,0024x-0,0012$), pripremljena na osnovu radnih rastvora galne kiseline u opsegu koncentracija od 10 do 90 mg/mL, pokazala je dobru linearnost ($R^2=0,9982$).

3.4.2. Određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima pokožice i semenki grožđa

Sadržaj ukupnih flavonoida (eng. *Total Flavonoid Content*, TFC) u ekstraktima pokožice i semenki grožđa određen je kolorimetrijskom metodom sa aluminijum hloridom koja je prilagođena mikrotitracionoj ploči (Zhishen i sar., 1999). Ovaj test se zasniva na stvaranju obojenog kompleksa flavonoid-aluminijum. Ekstrakti semenki su razblaženi 50 puta. Ekstrakti pokožice crvenih sorti grožđa su razblaženi 10 puta, a ekstrakti pokožice belih sorti u bazenčiće mikrotitracione ploče pipetirani su nerazblaženi (po 10 μ L). Nakon toga, uliveno je 200 μ L destilovane vode i 30 μ L 5% rastvora NaNO_2 . Posle 5 minuta inkubacije na 37 °C, smeši je dodato 30 μ L 10% rastvora AlCl_3 , a 6 minuta kasnije i 20 μ L 1 M rastvora NaOH . Merenje apsorbancije reakcione smeše izvršeno je na MTP čitaču na talasnoj dužini od 490 nm u odnosu na slepu probu. Kao standard korišćen je (-)-epikatehin (1 mg/L) u opsegu koncentracija 100-800 mg/L, i na osnovu apsorbancije različitih koncentracija standarda razvijena kalibraciona kriva ($y=0,0009x+0,0133$; $R^2=0,9921$). Rezultati su izraženi u miligramima ekvivalenata epikatehina po gramu liofilizata/suve materije (mg EE/g).

3.4.3. Određivanje ukupnih flavan-3-ola u ekstraktima semenki grožđa

Određivanje sadržaja ukupnih flavan-3-ola zasniva se na reakciji između DMAC reagensa (4-dimetilamino-cinamaldehyd) i flavan-3-ola (monomera, dimera i oligomera) tokom koje dolazi do razvijanja zelene boje reakcione smeše (Payne i sar., 2010). DMAC reagens pripremljen je na sledeći način: 3 mL koncentrovane hlorovodonične kiseline razblaženo je sa 27 mL etanola i dobijeni rastvor je ostavljen da se ohladi na 4 °C u trajanju od 15 minuta. Nakon toga, 0,03 g 4-dimetilamino-cinamaldehyda je rastvoreno u pripremljenom rastvoru. Ekstrakti semenki grožđa su razblaženi 1000 puta, da bi potom bili uliveni u bazenčiće mikrotitracione ploče (50 μ L). Odmah zatim, dodato je 250 μ L DMAC reagensa i intenzitet razvijene boje meren je na MTP čitaču (talasna dužina 630 nm) u odnosu na slepu probu (rastvarač). Izračunavanja su vršena pomoću standarda procijanidina B1 (opseg koncentracija 2,5-200 mg/L). Kalibraciona kriva $y=0,0069x-0,0007$ pokazala je odličnu linearnost $R^2=0,9998$. Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenata procijanidina B1 po gramu suve materije (mg PB1E/g).

3.4.4. Određivanje ukupnih monomernih antocijana u ekstraktima pokožice grožđa

Sadržaj ukupnih antocijana ispitivan je pH diferencijalnom AOAC metodom koja se zasniva na strukturnoj promeni hromofora antocijana pri promeni pH vrednosti sredine (Lee i sar., 2005). Apsorbancija rastvora koji sadrži antocijane meri se na dve talasne dužine pri različitim pH vrednostima (pH 1 i pH 4,5). Razlika u apsorbanciji na talasnoj dužini od 520 nm proporcionalna je koncentraciji antocijana.

U cilju određivanja sadržaja monomernih antocijana u ekstraktima pokožice crvenih sorti grožđa, uzorci su razblaženi na 2 načina: 0,025 M rastvorom KCl (pH 1) i 0,4 M rastvorom acetatnog pufera (pH 4,5), kako bi se dobila apsorbancija finalnih rastvora između 0,2 i 0,7. Nakon 15 minuta merene su apsorbancije dobijenih rastvora na 520 nm i 700 nm.

Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenta malvidin-3-glukozida po gramu liofilizata (mg Mal3GE/g).

Izračunavanja su vršena korišćenjem sledeće jednačine:

$$\text{Sadržaj ukupnih antocijana} = \frac{A * M * DF * 10^3}{\epsilon * l}$$

(3)

- $A = [(A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1}] - [(A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4,5}]$
- M- molarna masa (za malvidin-3-glukozid je 528,9 g/mol)
- DF- faktor razblaženja
- l- dužina pređenog puta zraka svetlosti (cm)
- ϵ - molarni ekstinkcioni koeficijent (za malvidin-3-glukozid iznosi 34300 L/mol cm)

3.5. Određivanje profila biološki aktivnih sastojaka u grožđu

3.5.1. Određivanje organskih kiselina, katehina, proantocijanidina i flavonola u ekstraktima pokožice i semenki grožđa

Određivanje organskih kiselina, katehina, proantocijanidina i flavonola izvršeno je tečnom hromatografijom visoke rezolucije (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), uz detekciju analita masenom spektrometrijom (MS). Korišćena je ranije opisana metoda uz neznatne modifikacije (Mena i sar., 2012). Analize su rađene na Accela 1000 tečnom hromatografu (Thermo Scientific) opremljenom kvaternom pumpom, autosemplerom i fotodiodnim detektorom (eng. *Photodiode Array Detector*, PDA). Tečni hromatograf je dodatno bio spregnut sa TSQ Quantum Access Max masenim analizatorom (Thermo Fisher Scientific Inc., *San Jose, USA*), a kao jonski izvor korišćen je elektrosprej jonizator sa zagrevanjem (eng. *Heated ElectroSpray Ionization*, HESI). Razdvajanje jedinjenja izvedeno je pomoću Pursuit 3 PFP 150x4,6 mm kolone (Agilent Technologies, *Netherlands*). Sistem rastvarača imao je konstantan protok od 800 $\mu\text{L}/\text{min}$. Mobilna faza sastojala se od rastvarača A (0,1% mravlja kiselina u dejonizovanoj vodi) i rastvarača B (acetonitril). Gradijentno eluiranje je sprovedeno na sledeći način: rastvarač B 0 min/5%, 22 min/35%, 24 min/100%, 25 min/5%, nakon čega je usledilo petominutno izokratsko eluiranje kolone. Injekcioni volumen je bio 5 μL (etanolni i ChCit ekstrakti semenki su razblaženi 10, odnosno 5 puta, dok su ekstrakti pokožice u hromatografsku kolonu injektovani nerazblaženi). PDA detekcija sprovedena je u opsegu od 200 do 400 nm, kao i na jednoj fiksnoj talasnoj dužini (280 nm). Maseni detektor je podešen da detektuje odgovarajuće jone (m/z) u negativnom modu. Temperatura isparivača je podešena na 400 °C, dok je temperatura kapilare podešena na 300 °C. Za raspršivanje mobilne faze korišćen je azot, kao gas nosač (50 arbitražnih jedinica) i kao pomoćni gas (10 arbitražnih jedinica). Automatska optimizacija parametara vršena je pomoću TSQ Tune Software (Thermo Electron Corporation, *Hemel Hempstead, UK*). Prikupljanje i obrada rezultata MS analize obavljani su primenom metode praćenja odabranih reakcija jonskog prelaza (eng. *Selective Reaction Monitoring*, SRM) korišćenjem softvera Xcalibur 1.3 (Thermo Electron Corporation, *Hemel Hempstead, UK*). Helijum je upotrebljen kao kolizioni gas pri pritisku od 1,5 mTorr.

3.5.1.1. Validacija HPLC metode za kvantifikaciju organskih kiselina, katehina i proantocijanidina

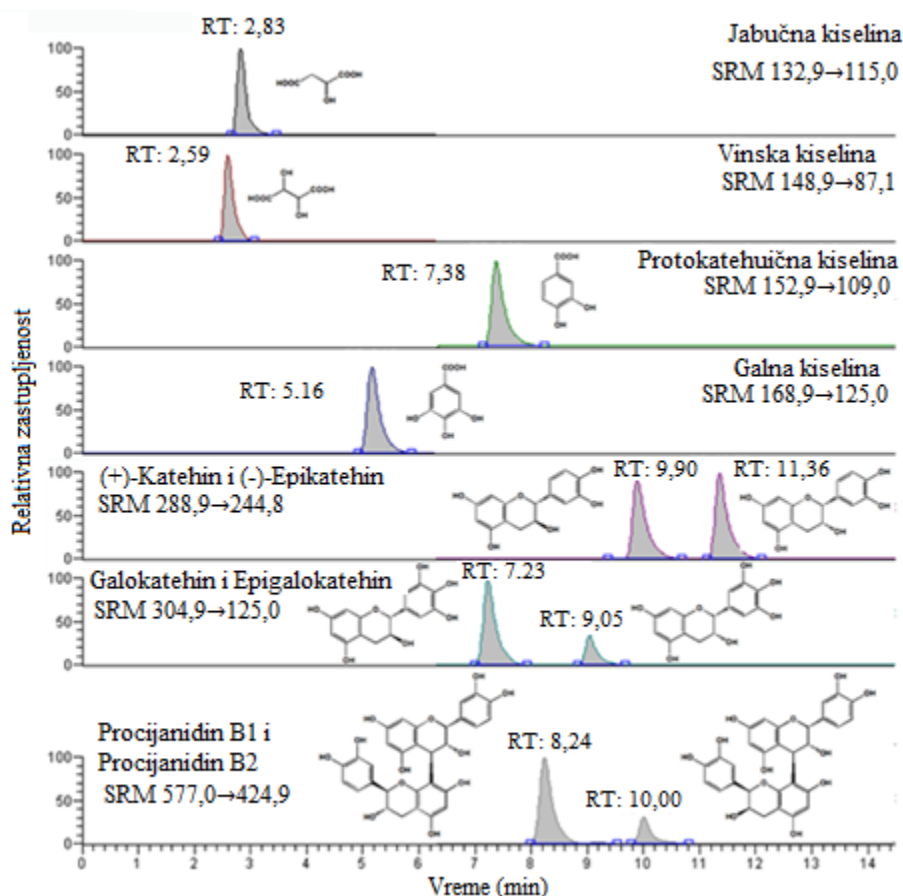
Modifikovana HPLC metoda, prilagođena za kvantifikaciju organskih kiselina, katehina i proantocijanidina u semenkama i pokožici grožđa je validirana čime je utvrđeno da je pogodna za kvantifikaciju ovih jedinjenja.

U **Tabeli 8** prikazane su molekulske formule kvantifikovanih jedinjenja, njihovi nazivi i retenciona vremena, zatim m/z vrednosti molekulskih jona $[M-H]^-$, m/z vrednosti fragmentih jona (MS/MS) i koliziona energije. Integracija pikova i kalibracije izvedene su korišćenjem softvera LC Quan™ (Version 2.5.6, Thermo Electron Corporation, Hemel Hempstead, UK).

Tabela 8. Parametri korišćeni za identifikaciju jedinjenja

Jedinjenje	Formula	Retenciono vreme (min)	$[M-H]^-$ Molekulski jon (m/z)	MS/MS Fragmentni jon (m/z)	Koliziona energija (V)
Vinska kiselina	$C_4H_6O_6$	2,59	148,9	103,1	13
Jabučna kiselina	$C_4H_6O_5$	2,83	132,9	115,0	14
Galna kiselina	$C_7H_6O_5$	5,16	168,9	125,0	16
Galokatehin	$C_{15}H_{14}O_7$	7,23	304,8	124,9	21
Protokatehuidna kiselina	$C_7H_6O_4$	7,38	152,9	109,0	14
Procijanidin B1	$C_{30}H_{26}O_{12}$	8,24	577,0	288,8	27
Epigalokatehin	$C_{15}H_{14}O_7$	9,05	304,9	125,0	25
(+)-Katehin	$C_{15}H_{14}O_6$	9,90	288,9	244,8	18
Procijanidin B2	$C_{30}H_{26}O_{12}$	10,00	577,0	288,8	27
(-)-Epikatehin	$C_{15}H_{14}O_6$	11,36	288,9	244,9	17

Obrasci fragmentacije molekulskih jona bili su u skladu sa literaturnim podacima. Deprotonovani jon $[M-H]^-$ jabučne kiseline uočen na m/z 133 tipično proizvodi fragmentni jon na m/z 115 što odgovara gubitku H_2O . Dalje, vinska kiselina fragmentiše kombinacijom 2 gubitka (COO i H_2O) $[M-H-62]^-$ pri čemu se dobija produkt jon na m/z 87. Hidroksibenzojeve kiseline (galna i protokatehuidna kiselina) imale su iste prelaze kao rezultat gubitka COO (m/z 169→125 i 153→109). (+)-Katehin i (-)-epikatehin su pokazali pikove deprotonovanih jona $[M-H]^-$ na m/z 289 i isti obrazac fragmentacije (m/z 245), što odgovara gubitku $(CH)_2OH$ grupe $[M-H-44]^-$. Dva pika karakteristična za galokatehin i epigalokatehin sa deprotonovanim jonom $[M-H]^-$ na m/z 305 pokazala su obrazac fragmentacije koji odgovara neutralnom gubitku trihidroksibenzojevog prstena (produkt jon m/z 125). Jedinjenja sa masom deprotonovanih molekula na m/z 577 pripadaju dimerima (procijanidinima B1 i B2) pri čemu su, kao rezultat kidanja, interflavanske veze nastali joni sa $m/z=289$ $[M-H-288]^-$. Na **Slici 25** prikazani su hromatogrami standarda.



Slika 25. HPLC-MS/MS hromatogrami standarda

Kalibracione krive konstruisane su integracijom pikova dobijenih tokom analiza serijskih razblaženja odgovarajućih standarda (x osa- koncentracije standarda, y osa- površine pikova). Opsezi koncentracija standarda, kao i jednačine kalibracionih kriva, dati su u **Tabeli 9**.

Tabela 9. Kalibracione krive standarda

Jedinjenje	Opseg koncentracija (mg/L)	Jednačina kalibracione krive
Vinska kiselina	0,6-60	$y=28078x+48520$
Jabučna kiselina	2-100	$y=42868x+279878$
Galna kiselina	0,2-20	$y=73157x+40746$
Galokatehin	0,2-10	$y=19056x-5054,9$
Protokatehuidna kiselina	0,02-2	$y=169349x+9223,2$
Procijanidin B1	0,1-100	$y=27233x+7839,3$
Epigalokatehin	0,1-100	$y=8962,7x-154,43$
(+)-Katehin	2-200	$y=22311x+79977$
Procijanidin B2	0,16-160	$y=3576,3x+5640,5$
(-)-Epikatehin	2-200	$y=22734x+132115$

Validacija je izvršena na etanolnim ekstraktima semenki u skladu sa ICH smernicama (poglavlje Q2 (R1)) (Swartz & Krull, 2012). Određivani parametri validacije su: linearnost, limit detekcije, limit kvantifikacije, preciznost i tačnost (**Tabela 10**).

Cilj ispitivanja linearnosti je utvrđivanje linearnog opsega metode, odnosno opsega koncentracija unutar kog postoji linearna zavisnost signala od koncentracije analita. Linearnost je procenjivana pomoću serije razblaženja standarda. Kalibracione krive su bile linearne u širokom opsegu koncentracija (koeficijenti determinacije, odnosno R^2 vrednosti kretale su se od 0,992 do 0,9998).

Limit detekcije (eng. *Limit of Detection*, LoD), predstavlja najnižu koncentraciju analita koja može biti pouzdano detektovana datom metodom. Sinonimi za detekcioni limit su osetljivost, analitička osetljivost, minimalni detekcioni limit, donji limit detekcije, itd. Limit kvantifikacije (eng. *Limit of Quantification*, LoQ) je najniži nivo analita u uzorku koji može da se odredi (kvantifikuje) sa prihvatljivom preciznošću i tačnošću. LOD i LOQ su određivani manuelno, pomoću odnosa signala i šuma aparata za rastvore najniže/poznate koncentracije. Postupak određivanja LoD i LoQ podrazumeva merenje signala u rastvorima različitih koncentracija, pri čemu odnos signal:šum ne sme biti manji od 3 za LoD, odnosno od 10 za LoQ. Za limit kvantifikacije postoji i dodatni uslov, a to je da relativna standardna devijacija (eng. *Relative Standard Deviation*, RSD) vrednost šest merenja bude manja od 20%. LoD i LoQ su izražene u mg/L.

Preciznost metode predstavlja stepen rasipanja podataka oko centralne vrednosti, odnosno slaganje rezultata nezavisnih merenja i prihvaćene referentne vrednosti. Ovaj validacioni parametar se izražava kao RSD dobijenih vrednosti za obogaćene (spajkovane) uzorke. Na osnovu dobijenih RSD vrednosti, nižih od 20%, može se zaključiti da je analitička metoda precizna.

Tačnost je slaganje rezultata merenja određene veličine sa tačnom vrednošću te veličine. Tačnost se određuje tzv. *recovery* testom pomoću spajkovanih uzoraka i izražava se kao procentualni opseg. Minimalni *recovery* predstavlja odstupanje minimalne vrednosti od zadate vrednosti, dok se maksimalni *recovery* izračunava odstupanjem maksimalne vrednosti od zadate vrednosti. Tačnost metode je između ovih *recovery* vrednosti. Validirana metoda je imala zadovoljavajuću tačnost, *recovery* vrednosti su se kretale u opsegu od 63,6 do 119,34%.

Tabela 10. Parametri validacije HPLC-MS/MS metode

	Linearnost R ²	LoD (mg/L)	LoQ (mg/L)	*Nominalna koncentracija	Tačnost (%)	Preciznost (RSD)
Vinska kiselina	0,9945	0,20	0,6	21,55+0,54	63,60-65,58	1,37
				21,55+2,70	81,64-106,74	12,35
				21,55+5,40	97,25-102,42	2,46
Jabučna kiselina	0,992	0,08	0,25	20,10+1,80	75,82-81,05	2,62
				20,10+9,00	80,88-83,25	1,18
				20,10+18,00	83,01-84,65	0,82
Galna kiselina	0,9976	0,07	0,2	10,65+0,18	77,71-79,84	1,35
				10,65+0,90	79,73-84,97	3,20
				10,65+1,80	85,00-87,60	1,51
Galokatehin	0,9949	0,07	0,2	0,20+0,18	80,13-94,74	18,87
				0,20+0,90	82,09-84,43	1,91
				0,20+1,80	108,03-110,11	1,05
Protokatehnična kiselina	0,9998	0,01	0,02	0,050+0,018	64,44-73,73	3,87
				0,050+0,090	84,60-105,90	7,26
				0,050+0,180	93,09-101,17	3,30
Procijanidin B1	0,9998	0,03	0,1	26,30+0,09	75,66-78,41	2,00
				26,30+0,45	77,58-81,47	2,75
				26,30+0,90	81,91-82,60	0,45
Epigalokatehin	0,9969	0,03	0,1	0,29+0,09	78,75-90,03	14,93
				0,29+0,45	64,78-74,96	11,51
				0,29+0,90	102,56-116,56	8,56
(+)-Katehin	0,9994	0,17	0,5	44,78+1,80	76,45-79,69	1,71
				44,78+9,00	88,74-91,51	1,34
				44,78+18,00	99,31-103,59	1,93
Procijanidin B2	0,9981	0,05	0,16	3,050+0,144	66,07-70,17	2,11
				3,050+0,720	79,69-80,98	0,62
				3,050+1,440	86,67-97,41	5,54
(-)-Epikatehin	0,9978	0,67	2	35,59+1,80	89,79-94,63	2,37
				35,59+9,00	105,71-110,39	1,85
				35,59+18,00	114,10-119,34	1,98

*Koncentracija u opterećenim uzorcima (određena koncentracija jedinjenja u ekstraktima semenki+poznata koncentracija standarda)

Legenda: LoD- eng. *Limit of Detection*; LoQ- eng. *Limit of Quantification*; RSD- eng. *Relative Standard Deviation*

3.5.2. Određivanje antocijana u ekstraktima pokožice grožđa

Antocijani prisutni u pokožici crvenih sorti grožđa su identifikovani i kvantifikovani korišćenjem HPLC sistema (1260 Infinity II, Agilent, USA) spregnutim sa detektorom diodnog niza (eng. *Diode Array Detector*, DAD; UV/DAD, 1260 Infinity II, Agilent, USA) i autosemplerom (1260 Infinity II, Agilent, USA) (Panić, Gunjević, i sar., 2021). Razdvajanje je izvršeno na Poroshell 120 SB C18 koloni (150 mm, 4,6 mm, 5 µm; Agilent, USA). Mobilna faza sastojala se od rastvarača A (0,25% sirćetna kiselina u destilovanoj vodi) i rastvarača B (acetonitril). Gradijentno eluiranje je bilo modifikovano na sledeći način: 0-7,5 min 10% B, 7,5-15 min od 10% do 15% B i 15-25 min od 15% do 10% B. Brzina protoka je bila 1 mL/min. Injekcioni volumen je bio 15 µL i uzorci su uvek pre injektovanja u kolonu filtrirani kroz 0,22 µm politetrafluoroetilenske filtere. Temperatura kolone je održavana na 40 °C. UV-DAD akvizicije su sprovedene u opsegu od 200 do 600 nm, dok su hromatogrami antocijana zabeleženi na talasnoj dužini od 520 nm. Upoređena su retencionna vremena i spektralni podaci eksternih standarda. Kvantifikacija je izvršena korišćenjem standarda malvidin 3-O-monoglukozida i kalibracione krive konstruisane u opsegu koncentracija 3-300 mg/L. Rezultati su izraženi kao miligrami malvidin 3-O-monoglukozid ekvivalenta po gramu suve materije (mg Mal3GE/g).

3.5.3. Određivanje sastava masnih kiselina u uljima iz semenki grožđa

Sastav masnih kiselina u uljima dobijenim iz semenki grožđa analiziran je metodom gasne hromatografije, nakon derivatizacije masnih kiselina u isparljive metil-estre (Ichihara & Fukubayashi, 2010). Postupak transesterifikacije vršen je u staklenim epruvetama i zahtevao je odmeravanje 200 µl ulja, zatim 1,5 mL metanola i 0,3 ml 8% HCl. Sadržaj je vorteksiran, a zatim su epruvete postavljene u vodeno kupatilo na 100 °C u trajanju od 60 minuta. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi, smeši je dodato 1 mL destilovane vode, zatim 1 mL heksana, i epruvete su vorteksirane. Centrifugiranjem se izdvajaju dve faze, a gornji, heksanski sloj se koristi za analizu sastava masnih kiselina. Metodom gasne hromatografije (Agilent Technologies 7890A) pomoću plameno jonizacionog detektora određeni su metil estri masnih kiselina. Korišćena je kapilarna kolona CP-Sil 88 (100 m×0.25 mm×0.2 µm), a helijum je bio noseći gas (protok 1 mL/min). Inicijalna temperatura kolone bila je 80 °C i povećavala se linearno za 4 °C/min do 220 °C. Ta temperatura je zadržana 5 minuta, nakon čega se na isti način povećavala do 240 °C. Zadržavanje na 240 °C bilo je u trajanju od 10 minuta. Temperatura injektora je bila 250 °C, a detektora 270 °C. Identifikacija masnih kiselina vršena je na osnovu retencionih vremena standardne smeše masnih kiselina (Supelco FAME Mix, Bellefonte, USA), i rezultati su prikazani kao % udeo pojedinačnih masnih kiselina u odnosu na ukupne metil estre masnih kiselina.

Stabilnost ulja procenjena je na osnovu COX vrednosti (eng. *Calculated OXidizability*), koje se računaju na osnovu % udeo UFA u ulju, prema jednačini (Fatemi & Hammond, 1980):

$$COX = \frac{[C\ 18:1(\%) + 10,3 * C\ 18:2(\%) + 21,6 * C\ 18:3(\%)]}{100} \quad (4)$$

3.5.3.1. Ispitivanje aterogenog potencijala ulja iz semenki grožđa

Sa ciljem da se ispita aterogeni potencijal ulja iz semenki grožđa i potencijalni uticaj na razvoj koronarne bolesti srca, izračunati su: odnos hipo- i hiperholesterolemijskih masnih kiselina (eng. *Hypocholesterolemic/Hypercholesterolemic fatty acids*, H/H), indeks aterogenosti (eng. *Index of Atherogenicity*, AI) i indeks trombogenosti (eng. *Index of Thrombogenicity*, TI). H/H odnos dobijen je korišćenjem sledeće formule (Cunha i sar., 2019):

$$\frac{H}{H} = \frac{C18:1\omega9 + C18:2\omega6 + C20:4\omega6 + C18:3\omega3 + C20:5\omega3 + C22:5\omega3 + C22:6\omega3}{C14:0 + C16:0} \quad (5)$$

AI i TI su izračunati pomoću formula (Ulbricht & Southgate, 1991):

$$AI = \frac{C12:0 + 4(C14:0) + C16:0}{\sum MUFA + \sum \omega - 6 + \sum \omega - 3} \quad (6)$$

$$TI = \frac{C14:0 + C16:0 + C18:0}{0,5(\sum MUFA) + 0,5(\sum \omega - 6) + 3(\sum \omega - 3) + (\sum \omega - 3 / \sum \omega - 6)} \quad (7)$$

3.5.4. Određivanje sastava tokoferola u uljima iz semenki grožđa

Sastav tokoferola određen je prethodno opisanom metodom, uz neznatne modifikacije (Rabrenović i sar., 2014). Pirogalol (0,12 g), 96% etanol (20 mL) i 8,9 M KOH (3 mL) dodati su uzorku ulja (0,5 mL). Proces saponifikacije vršen je uz mešanje na 60 °C u trajanju od 30 minuta. Nakon toga, sadržaj je ohlađen, prebačen u normalni sud i dopunjen do crte etanolom. Alikvot je ekstrahovan heksanom i ekstrakt je uparen u struji azota. Suvi ekstrakt je rekonstituisan u 4 mL metanola, a zatim filtriran kroz membranski filter (Cronus Syringe Filter Nylon 25 mm, 0.45 µm, *Cronus, UK*). Analiza sastava tokoferola vršena je na HPLC uređaju (HPLC, Waters M600E, *USA*) spregnutim sa fluorescentnim detektorom (RF 535, Shimadzu, *Japan*). HPLC sistem je ispiran mobilnom fazom oko 30 minuta pri protoku od 0,3 mL/min, a zatim je protok postepeno podizan do definisane vrednosti 15 minuta pre početka rada. 10 µL uzorka je injektovano u uređaj. Kao mobilna faza korišćen je 95% metanol (protok 1,2 mL/min). Talasna dužina ekscitacije bila je 290 nm, dok je talasna dužina emisije bila podešena na 330 nm. Tokoferoli su identifikovani na osnovu retencionih vremena eksternih standarda, dok je kvantifikacija izvršena prema površinama njihovih pikova. Rezultati su prikazani kao mg pojedinačnih izomera tokoferola po kg ulja (mg/kg).

3.6. Ispitivanje bioloških aktivnosti grožđa

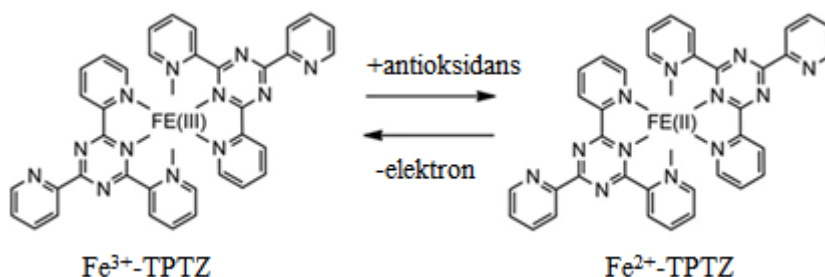
3.6.1. Ispitivanje antioksidativnog delovanja ekstrakata grožđa

3.6.1.1. Određivanje antioksidativnog potencijala ekstrakata pokožice i semenki grožđa

Antioksidativni potencijal ekstrakata ispitan je korišćenjem 4 različita *in vitro* testa.

3.6.1.1.1. FRAP (eng. Ferric Reducing Antioxidant Power) metoda

FRAP mikro-metoda urađena je u skladu sa prethodno opisanom procedurom (Bolanos De La Torre i sar., 2015), uz minimalne modifikacije. Ova metoda zasniva se na doniranju elektrona od strane antioksidanasa u kiseloj sredini pri čemu dolazi do redukcije kompleksa feri-tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) i nastanka kompleksa fero-tripiridiltriazina (Fe^{2+} -TPTZ) intenzivno plave boje (Slika 26).

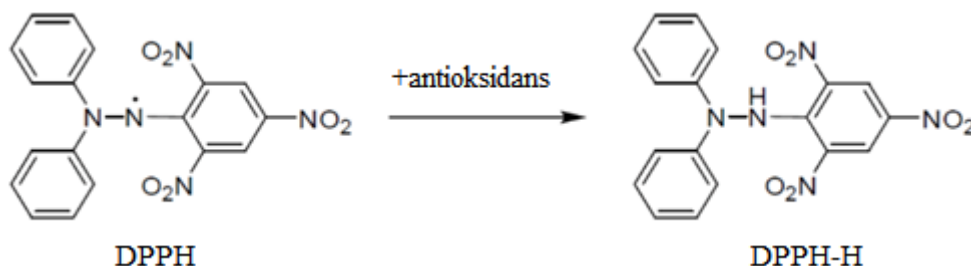


Slika 26. Mehanizam na kome se zasniva FRAP test (preuzeto i prilagođeno (Xiao i sar., 2020))

FRAP radni rastvor pripremljen je mešanjem acetatnog pufera (pH 3,6), 10 mM TPTZ rastvora (2,4,6-tripiridil-s-triazina) u 40 mM HCl i 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ u odnosu 10:1:1. Radni rastvor je pre upotrebe zagrevan na 37 °C. Razblaženi uzorci su uliveni u bazenčiće mikrotitracione ploče (20 μl). Odmah potom, uzorcima je dodato 280 μL FRAP radnog rastvora nakon čega je reakciona smeša ostavljena da se inkubira 30 minuta na 37 °C, uz blago mešanje. Apsorbancija obojenog proizvoda merena je na MTP čitaču na talasnoj dužini od 630 nm. Kalibraciona kriva ($y=0,8542x+0,0724$; $R^2=0,9988$) konstruisana je korišćenjem Troloksa ((±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina) kao standardne supstance u opsegu koncentracija od 0,1 do 1 mmol/L. Rezultati su izraženi kao milimolovi Troloks ekvivalenta po gramu liofilizata/suve materije (mmol TE/g).

3.6.1.1.2. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metoda

Antioksidativni potencijal ekstrakata određen je pomoću prethodno opisane DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) mikro-metode uz neznatne modifikacije (Norma i sar., 2014). Princip ovog testa se zasniva na ispitivanju reaktivnosti potencijalnih antioksidanasa sa slobodnim DPPH radikalom (Slika 27).



Slika 27. Mehanizam na kome se zasniva DPPH test (preuzeto i prilagođeno (Xiao i sar., 2020))

Za potrebe ovog testa radni rastvor je pripremljen *ex tempore* zbog njegove nestabilnosti, a priprema se tako što se rastvor DPPH ($1,86 \times 10^{-4}$ mol/L DPPH u etanolu) i acetatni pufer (0,1 M) pomešaju u odnosu 2:1 (v/v). Za vreme trajanja testa posuda sa pripremljenim radnim rastvorom je bila zaštićena od svetlosti. Prethodno razblaženi ekstrakti su uliveni u bazenčice mikrotitracione ploče (7 μ L), a zatim je dodato 193 μ L radnog rastvora DPPH. Nakon 60 minuta inkubacije na tamnom mestu i sobnoj temperaturi, izmerena je apsorbancija na 490 nm u odnosu na slepu probu. Kao standardna supstanca korišćen je rastvor Troloksa u opsegu koncentracija 0,1-1,2 mmol/L, a izračunavanja su vršena metodom kalibracione krive ($y=44,284x-2,1475$; $R^2=0,999$).

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{\text{Asp} - \text{Au}}{\text{Asp}} * 100$$

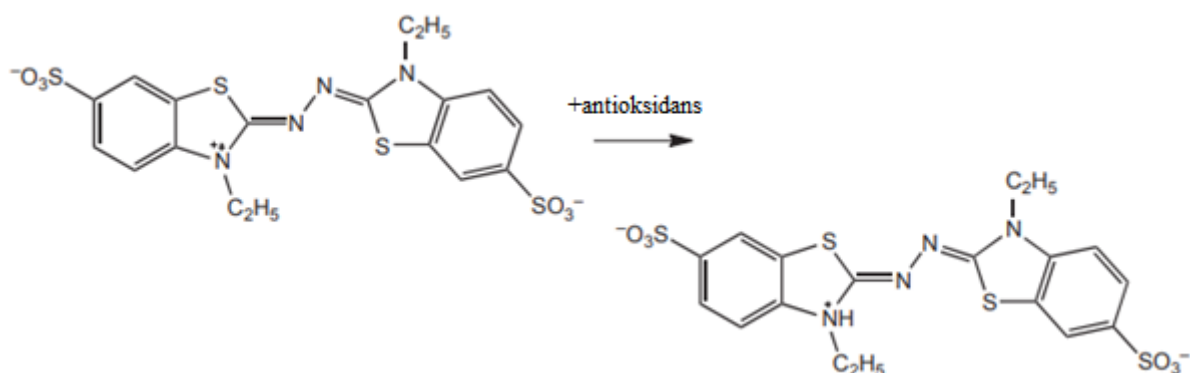
(8)

- Asp- Apsorbancija slepe probe
- Au- Apsorbancija uzorka

Rezultati su izraženi kao milimolovi Troloks ekvivalentata po gramu liofilizata/suve materije (mmol TE/g). U slučaju metanolnih ekstrakata ulja iz semenki grožđa, rezultati su izraženi kao mikromolovi Troloks ekvivalentata po gramu ulja (μ mol TE/g).

3.6.1.1.3. ABTS/TEAC (eng. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) metoda

TEAC metoda zasnovana je na dekolorizaciji plavo-zelenog ABTS (2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) radikala u prisustvu antioksidanasa (**Slika 28**).



Slika 28. Mehanizam na kome se zasniva TEAC test (preuzeto i prilagođeno (Hernández-Rodríguez i sar., 2019))

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata vršeno je u skladu sa metodom koja je prilagođena mikrotitracionoj ploči (Pastoriza i sar., 2011). Najpre su pripremljeni osnovni ABTS rastvor (7 mM) i rastvor kalijum peroksodisulfata (2,45 mM) u 5 mM fosfatnom puferu (pH 7,4). Ova dva rastvora su zatim pomešana u jednakim zapreminama i smeša je ostavljena zaštićena od svetlosti na sobnoj temperaturi tokom noći kako bi se omogućilo stvaranje slobodnih radikala. Nakon 12 do 16 sati, pripremljen je radni rastvor tako da smeša razblažena fosfatnim puferom ($\sim 1/80$; v/v) pokazuje apsorbanciju u opsegu od 0,68 do 0,72 na 734 nm. U bazenčice mikrotitracione ploče uliveno je 20 μ L razblaženog uzorka i 280 μ L radnog rastvora ABTS-a. Reakciona smeša je ostavljena da se inkubira na sobnoj temperaturi i nakon tačno 6 minuta apsorbancija je merena pomoću MTP čitača na 630 nm. Kalibraciona kriva ($y=322,43x-3,7061$; $R^2=0,9983$) razvijena je korišćenjem Troloksa kao standarda (0,02 do 0,15 mmol/L).

U ovom slučaju kriva pokazuje zavisnost procenta inhibicije od koncentracije, pri čemu se procenat računa prema sledećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{\text{Asp} - \text{Au}}{\text{Asp}} * 100$$

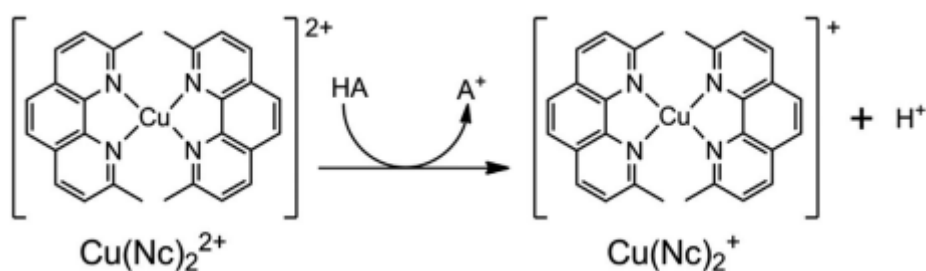
(9)

- Asp- Apsorbancija slepe probe
- Au- Apsorbancija uzorka

Rezultati su izraženi kao milimolovi Troloks ekvivalenta po gramu liofilizata/suve materije (mmol TE/g).

3.6.1.1.4. CUPRAC (eng. *Cupric Reducing Antioxidant Capacity*) metoda

CUPRAC test izveden je u skladu sa prethodno opisanom procedurom uz neznatne modifikacije (Zengin i sar., 2014). Ova metoda zasniva se na sposobnosti antioksidanasa da redukuju Cu^{2+} do Cu^+ . CUPRAC test je u osnovi reakcija oksidacije reaktivne aromatične hidroksilne grupe polifenola do odgovarajućeg hinona, prilikom čega dolazi do redukcije Cu(II)-neokuproina do intenzivno obojenog Cu(I)-neokuproin helata (**Slika 29**).



Slika 29. Mehanizam na kome se zasniva CUPRAC test (preuzeto (Xiao i sar., 2020))

Razblaženi uzorci uliveni su u bazenčiće mikrotitracione ploče (67 μL), a zatim je dodato 61 μL rastvora CuCl_2 (0,01 M), 61 μL vodenog rastvora amonijum acetatnog pufera (1 M, pH 7) i 61 μL etanolnog rastvora neokuproina ($7,5 \times 10^{-3}$ M). Reakciona smeša je ostavljena 30 minuta na sobnoj temperaturi da se inkubira uz blago mešanje nakon čega je merena apsorbancija na MTP čitaču (450 nm) u odnosu na slepu probu. Standardna kriva ($y=1,4453x+0,0467$) konstruisana pomoću rastvora Troloksa (opseg koncentracija od 0,025 do 0,4 mmol/L) pokazala je dobru linearnost $R^2=0,9899$. Rezultati su izraženi u milimolovima Troloks ekvivalenta po gramu liofilizata/suve materije (mmol TE/g).

3.6.2. Ispitivanje citotoksičnog delovanja ekstrakata pokožice i semenki grožđa

3.6.2.1. Čelijske linije

Citotoksična aktivnost ekstrakata pokožice i semenki grožđa ispitivana je na dve humane maligne čelijske linije: HeLa (adenokarcinom cerviksa) i LS 174T (adenokarcinom kolona). U cilju procene selektivnosti ekstrakata, evaluiran je i efekat na čelijskoj liniji normalnih fibroblasta pluća, MRC-5. Identičan postupak sproveden je i prilikom ispitivanja citotoksične aktivnosti rastvarača ChCit. Čelijske linije održavane su u kulturi u vidu monosloja u hranljivom medijumu RPMI 1640 pH 7,2 (eng. *Roswell Park Memorial Institute*). Hranljivom medijumu dodat je termički inaktivisan (56 °C u trajanju od 30 minuta) 10% fetalni goveđi serum (eng. *Fetal Bovine Serum*, FBS), zatim L-glutamin (3 mM), streptomycin (100 µg/mL), penicilin (100 IU/mL) i 25 mM HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan-sulfonska kiselina). Sve ćelije su gajene u inkubatoru na 37 °C, u sredini zasićenoj vodenom parom i obogaćenoj 5% CO₂.

3.6.2.2. Tretman čelijskih linija

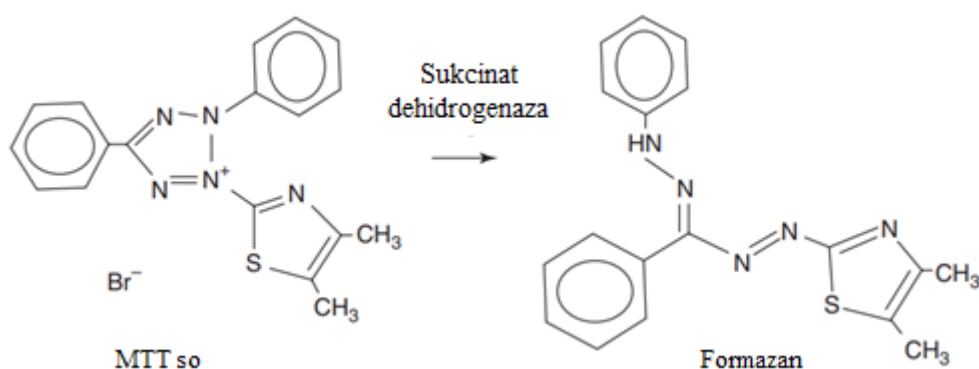
Zasejavanje ćelija vršeno je u mikrotitracionim pločama sa 96 bazena. HeLa ćelije su ravnomerno zasejane u gustini od 2000 ćelija po bazenu; LS 174T ćelije u gustini od 7000 ćelija po bazenu i MRC-5 u gustini od 5000 ćelija po bazenu, u 100 µl podloge. Nakon inkubacije od 24 h, tokom koje dolazi do adhezije ćelija, ćelije su tretirane sa po 50 µL rastvora ispitivanih ekstrakata. Kontrolni bazeni sadržali su samo žive ćelije.

Ispitivani etanolni ekstrakti pokožice i semenki crvenih sorti grožđa (0,1 g/mL) najpre su upareni do suva, da bi zatim bili rekonstituisani u hranljivom medijumu do iste koncentracije. Dobijeni rastvori su zatim razblaženi hranljivim medijumom do finalnih koncentracija- 200, 100, 50, 25 i 12,5 µg/mL. ChCit ekstrakti su razblaživani do istih finalnih koncentracija bez prethodnog uparavanja.

Ćelije su dalje inkubirane 72 h pod istim uslovima koji su korišćeni i za održavanje čelijskih linija.

3.6.2.3. MTT test za određivanje preživljavanja ćelija u kulturi

Citotoksični efekat ispitivanih ekstrakata, odnosno njihov uticaj na preživljavanje ćelija određen je pomoću MTT (eng. *Microculture Tetrazolium Test*) kolorimetrijskog testa. Ova metoda razvijena je davne 1983. godine (Mosmann, 1983), da bi kasnije bila modifikovana i prilagođena (Ohno & Abe, 1991). Ispitivanje preživljavanja ćelija zasniva se na redukciji MTT reagensa (tetrazolijumska so, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid). Ovaj reagens žute boje se u prisustvu vijabilnih, metabolički aktivnih ćelija, odnosno mitohondrijalne sukcinat dehidrogenaze, redukuje, pri čemu se razvija nerastvorni, ljubičasto obojen formazan (**Slika 30**).



Slika 30. Mehanizam na kome se zasniva MTT test (preuzeto i prilagođeno (Inayat-Hussain i sar., 2009))

Nakon inkubacije ćelija u trajanju od 72h, u bazenčiće mikrotitracione ploče je dodato po 10 μ L rastvora MTT reagensa u fosfatnom puferu (eng. *Phosphate Buffered Saline*, PBS), koncentracije 5 mg/mL. Uzorci su zatim inkubirani još 4h pod istim uslovima, nakon čega je u svaki bazenčić dodato 100 μ L rastvora 10% natrijum-dodecilsulfata (eng. *Sodium Dodecyl Sulphate*, SDS) u cilju rastvaranja nastalog formazana. Smatra se da je količina rastvorenog formazana, odnosno intenzitet nastale ljubičaste boje direktno proporcionalan broju metabolički aktivnih ćelija. Nakon 24 h, apsorbancija je merena na MTP čitaču na talasnoj dužini od 570 nm. Kao slepa proba korišćen je hranljivi medijum uz dodatak različitih koncentracija uzoraka, bez ćelija. Za kontrolni uzorak (ćelije u medijumu) slepa proba je hranljivi medijum bez ćelija.

Ćelijsko preživljavanje (eng. *Survival*, S) predstavlja odnos broja živih ćelija prisutnih nakon dejstva agensa i broja živih ćelija u kontrolnom ćelijskom uzorku, pomnožen sa 100. Izražava se u % i određuje korišćenjem formule:

$$S(\%) = \frac{(A_t - A_s)}{(A_k - A_s)} \times 100$$

(10)

- A_t - apsorbancija tretiranih uzoraka
- A_k - apsorbancija kontrolnih uzoraka
- A_s - apsorbancija slepe probe

IC₅₀ vrednosti predstavljaju meru citotoksične aktivnosti agensa. U ovom slučaju definisane su kao koncentracije ispitivanih ekstrakata koje inhibiraju preživljavanje 50% ciljnih ćelija u odnosu na kontrolu.

3.6.3. Ispitivanje antimikrobnog delovanja ekstrakata pokožice i semenki grožđa

Antimikrobna aktivnost odabranih ekstrakata pokožice i semenki grožđa testirana je na 3 mikroorganizma i to: Gram pozitivnoj bakteriji *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, Gram negativnoj bakteriji *Escherichia coli* ATCC 8739 i gljivici *Candida albicans* ATCC 10231. Antimikrobna aktivnost rastvarača ChCit ispitivana je na isti način. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) određene su bujon mikrodilucionom metodom prema smernicama Evropskog Komiteta za ispitivanje antimikrobne osetljivosti (eng. *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST).

Suspenzije mikroorganizama napravljene su od svežih kultura. Jedna kolonija svakog soja suspendovana je u fiziološkom rastvoru do gustine od 0,5 po McFarland standardu (Bio-Merieux, France), što odgovara koncentraciji mikroorganizama od $1,5 \times 10^8$ CFU/mL (eng. *Colony Forming Unit*, CFU). Serijska razblaženja uzoraka (0,6-0,04 mg/mL) pripremljena su u odgovarajućoj podlozi. *Mueller-Hinton* bujon (MHB) korišćen je za ispitivanje osetljivosti bakterija, a *Sabouraud* bujon (SB) za ispitivanje osetljivosti *C. albicans*. Uzorci su zatim u duplikatu uliveni u bazenčice mikrotitracione ploče i inokulisani sa prethodno pripremljenim suspenzijama mikroorganizama (5×10^5 CFU/mL) do konačne zapremine (200 μ L). Uporedo je, takođe u duplikatu, postavljena pozitivna kontrola (samo mikroorganizmi u medijumu), kao i negativna kontrola (samo medijum sa uzorcima).

Nakon inkubacije u aerobnim uslovima na 35 °C i u trajanju od 20 h, određena je minimalna inhibitorna koncentracija, odnosno najniža koncentracija uzorka koja inhibira vidljiv rast mikroorganizama u bazenčićima mikrotitracionih ploča (odsustvo zamućenja ili vidljiv rast mikroorganizama).

3.7. Statistička obrada podataka

U cilju potpunog sagledavanja antioksidativne aktivnosti različitih ekstrakata ploda grožđa, i radi lakšeg poređenja velikog broja podataka, matematičkim putem je izračunat antioksidativni kompozitni indeks (eng. *Antioxidant Composite Index*, ACI). ACI vrednosti određene su na sledeći način:

Vrednost od 100% dodeljena je najvišem rezultatu antioksidativne aktivnosti za svaki test (DPPH, FRAP, TEAC, CUPRAC). Nakon toga, indeks antioksidativnog potencijala je računat za sve ostale rezultate u jednom testu korišćenjem formule:

$$\text{Indeks antioksidativnog potencijala (\%)} = \frac{\text{rezultat za uzorak}}{\text{najbolji rezultat}} * 100 \quad (11)$$

Srednja vrednost indeksa antioksidativnog potencijala za 4 *in vitro* antioksidativna testa predstavlja ACI vrednost za određeni uzorak (Seeram i sar., 2008).

Metoda površine odgovora je izvedena korišćenjem Design Expert Statistical Software package 7.0.0. (Stat Ease, Inc., *Minneapolis, USA*). Za testiranje adekvatnosti modela izvedenog iz eksperimentalnih podataka upotrebljena je ANOVA.

Podaci su analizirani u programu SPSS 20 (SPSS Inc., *Chicago, USA*). Numeričke vrednosti su primarno testirane na homogenost i normalnu raspodelu. Studentov t-test i analiza varijanse (ANOVA) praćena post-hoc Tukey testom korišćeni su za evaluaciju razlike između grupa. *Pearson*-ov koeficijent korelacije, odnosno *Spearman*-ov u slučajevima kada podaci nisu bili normalno distribuirani, korišćeni su za proveru odnosa između promenljivih. U svim statističkim testovima značajnim su smatrane vrednosti $p < 0,05$. Sve analize su vršene u triplikatu i rezultati su izraženi kao srednje vrednosti sa odgovarajućim standardnim odstupanjima.

Priprema grafikona vršena je pomoću GraphPad Prism 6.

Heat mapa pripremljena je korišćenjem web servera www.heatmapper.ca.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Optimizacija procesa ekstrakcije polifenolnih jedinjenja primenom metode površine odgovora

Polifenolna jedinjenja ekstrahuju se različitim metodama, pri čemu na prinos i sastav ekstrakata utiče veliki broj faktora, poput izabrane metode, temperature, rastvarača, dužine trajanja ekstrakcije, itd. Cilj ekstrakcije je dobiti što kvalitetnije ekstrakte uz redukovanu upotrebu energije, zato je prvi deo ove doktorske disertacije podrazumevao optimizaciju ultrazvučne ekstrakcije, odnosno određivanje optimalnih vrednosti izabranih parametara koje će dati maksimalan prinos polifenolnih jedinjenja. Semenke su upotrebljene kao matriks za ispitivanje. Definisani uslovi su kasnije korišćeni i za pokožicu grožđa, kako bi se i tom delu ploda pristupilo na isti način, odnosno postigla uniformnost postupka.

4.1.1. Uticaj uslova ekstrakcije na polifenolni sadržaj

Metoda koja se koristi za ekstrakciju definiše količinu izolovanih biološki aktivnih jedinjenja, kao i sastav ekstrakata. Generalno, ultrazvučna metoda smatra se pogodnom za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja, jer rezultuje zadovoljavajućim prinosom uz malu energetska potrošnju. Parametri metode, poput vrste rastvarača upotrebljenog za ekstrakciju, temperature na kojoj se izvodi, dužine trajanja, korišćene snage, frekvencije i odnosa biljnog materijala i rastvarača, mogu uticati na prinos.

Na primer, jedna studija je ispitivala efekat različitih rastvarača na ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz semenki grožđa (Kallithraka i sar., 1995). Uočena je značajna selektivnost; upotrebom etanola dobijeni su ekstrakti bogati galnom kiselinom, dok je metanol potencirao ekstrakciju monomernih flavan-3-ola, a aceton procijanidina. Metanol i aceton dali su veće prinose ukupnih polifenola, ali s obzirom na njihovu toksičnost, za potrebe našeg istraživanja izabran je etanol. Kada je reč o koncentraciji rastvarača, istraživanje koje je obuhvatilo različita razblaženja etanola, pokazalo je da se pri sobnoj temperaturi najveća efikasnost ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz semenki grožđa postiže upotrebom 50% etanola (Shi i sar., 2002). Slični rezultati dobijeni su postupkom optimizacije uslova ekstrakcije; 47,2% etanol rezultovao je najvišim TPC vrednostima (Li i sar., 2011). Novija studija je pokazala da sa porastom koncentracije etanola raste njegova ekstrakciona moć, pa je predloženo koristiti 94% etanol (Chen i sar., 2020). Sagledavajući dostupnu literaturu, u okviru postupka optimizacije ovaj parametar je fiksiran, korišćen je acidifikovani 70% etanol (kiselost rastvarača je povećana kako bi se potencirala ekstrakcija pH zavisnih jedinjenja).

Temperatura na kojoj se vrši ekstrakcija takođe ima značajan uticaj na sadržaj polifenola, bez obzira na metodu koji se koristi za ekstrakciju. Pokazano je da efikasnost ultrazvučne ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz semenki grožđa raste sa porastom temperature (Bucić-Kojić i sar., 2009). Upotreba savremenijih metoda dovela je do istih zaključaka (Duba i sar., 2015). Ipak, polifenolna jedinjenja su termoosetljiva; na temperaturi većoj od 80 °C može doći do njihove degradacije (Antony & Farid, 2022). Jedno istraživanje je pokazalo da na ekstremno visokim temperaturama (120-240 °C), uz produženo vreme ekstrakcije dolazi do smanjenja sadržaja (+)-katehina i (-)-epikatehina (Ross i sar., 2011). Visoke temperature, čak i u fazama koje prethode ekstrakciji, mogu dovesti do značajnog smanjenja ukupnih polifenola (Larrauri i sar., 1997).

Drugi faktori, poput vremena trajanja ekstrakcije, stepena usitnjenosti biljnog materijala, sadržaja vlage i odnosa biljnog materijala i rastvarača, u većoj ili manjoj meri mogu uticati na ishod ekstrakcije.

4.1.2. *Box Behnken* dizajn

Brojna istraživanja bavila su se optimizacijom procesa ekstrakcije sa ciljem određivanja parametara koji će rezultovati maksimalnim prinosom polifenolnih jedinjenja. Razvijeni su različiti matematički modeli, kako bi se pratio efekat pojedinačnih faktora, ali i njihove međusobne interakcije. Značaj ovakvog pristupa je u velikom broju mogućih kombinacija faktora, odnosno mogućnosti optimizovanja svakog laboratorijskog postupka na individualnom nivou. Najčešće se koriste *Box Behnken* dizajn i centralni kompozicioni dizajn. Za potrebe optimizacije ultrazvučnog procesa ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz semenki grožđa odabran je *Box Behnken* eksperimentalni dizajn, kojim se, za razliku od centralnog kompozicionog dizajna, izbegavaju ekstremni uslovi koji mogu dovesti do znatnih odstupanja. Osim toga, proces optimizacije se vrši uz manji broj eksperimenata. Izbor nezavisnih promenljivih definiše broj potrebnih eksperimenata. Najčešće se optimizacija vrši kombinacijom tri faktora; u našem slučaju to su: odnos biljni materijal:rastvarač, dužina trajanja ultrazvučne ekstrakcije i temperatura. Variranje je vršeno na tri nivoa: A- odnos biljni materijal:rastvarač (1:10, 2:10 i 3:10; m/v), B- vreme trajanja ekstrakcije (20, 30 i 40 minuta) i C- temperatura na kojoj je izvedena ekstrakcija (25, 50 i 75 °C). Ovakvo postavljanje eksperimentalnog dizajna uslovalo je 16 eksperimentalnih tačaka koje su uključivale četiri ponavljanja u centralnoj tački. Replikacije u centralnoj tački izvode se u cilju procene eksperimentalne greške i radi postizanja veće tačnosti rezultata, a broj ponavljanja u centralnoj tački je najčešće četiri ili pet eksperimenata. Za grafičko predstavljanje matematičkog modela korišćena je metoda odzivnih površina (eng. *Response Surface Methodology*, RSM). Konstruisani grafikoni omogućili su vizuelizaciju odgovora sistema, čime je olakšano određivanje optimalnih uslova.

Tabela 11. Rezultati postupka optimizacije; TPC vrednosti

№	Kodirane vrednosti faktora			Odgovor sistema
	A	B	C	Ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja (mg GAE/g suve materije)
1	-1	0	1	86,24
2	0	0	0	84,22
3	0	-1	-1	79,85
4	1	-1	0	78,89
5	0	1	-1	70,97
6	0	0	0	89,70
7	1	1	0	76,95
8	0	0	0	86,41
9	-1	1	0	110,75
10	1	0	-1	53,69
11	-1	-1	0	97,92
12	0	-1	1	76,08
13	0	0	0	89,13
14	1	0	1	57,44
15	-1	0	-1	85,34
16	0	1	1	78,69

GAE- eng. *Gallic Acid Equivalents*

A- faktor odnos biljni materijal:rastvarač

B- faktor vreme trajanja ekstrakcije

C- faktor temperature

Ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja nakon procesa ekstrakcije varirao je od 53,69 do 110,75 mg GAE/g suve materije (**Tabela 11**). Eksperimentalni podaci su aproksimirani kvadratnim modelom koji daje adekvatan opis veze između odgovora sistema i odabranih faktora. Obzirom na loše slaganje između *adj. R²* i *pred. R²*, izvršeno je korigovanje modela, odnosno isključen je kvadratni faktor A². Jednačina (12) prikazuje korigovani kvadratni model za kodirane vrednosti faktora.

$$\begin{aligned}
 \text{TPC} = & 86,87 - 14,16 \times A + 0,58 \times B + 1,08 \times C - 3,69 \times A \times B + 0,71 \times A \times C + 2,87 \times B \times C + 4,74 \\
 & \times B^2 - 15,71 \times C^2
 \end{aligned}
 \tag{12}$$

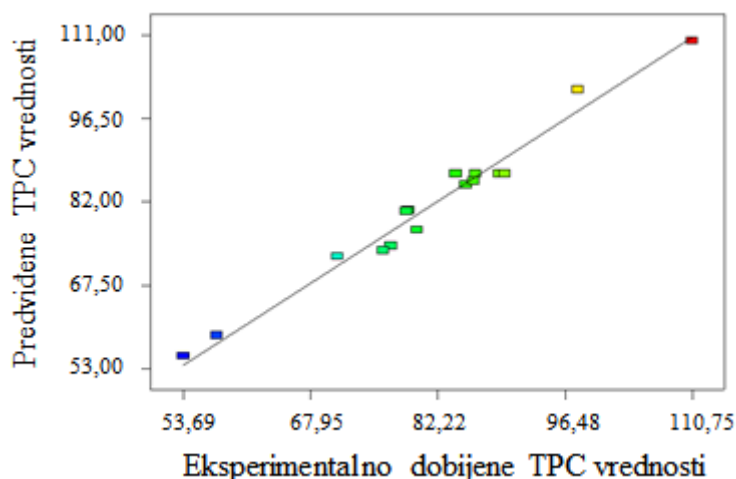
Analiza apsolutnih vrednosti koeficijenata izračunatih za kodirane vrednosti faktora omogućava procenu prirode i obima uticaja efekata faktora na odabrani odgovor- što je vrednost koeficijenta veća, veći je i uticaj faktora na odgovor. Na osnovu predznaka koeficijenta utvrđuje se da li je uticaj faktora na odgovore pozitivan (povećava odgovor) ili negativan (smanjuje odgovor). Na isti način tumače se i efekti interakcija faktora. Značaj uticaja faktora i faktorskih interakcija procenjuje se Studentovim t-testom, a smatra se da je koeficijent modela značajan za $p < 0,05$. Validnost modela potvrđena je ANOVA testom, *lack-of-fit* testom i vrednostima koeficijenata determinacije (**Tabela 12**).

Tabela 12. Analiza varijanse (ANOVA) modela za predviđanje sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja nakon ekstrakcije

Parametar modela	Suma kvadrata	Broj stepeni slobode	F vrednost	<i>p</i> vrednost
Model	2782,20	8	36,17	<0,0001
A	1604,06	1	166,81	<0,0001
B	2,67	1	0,28	0,6148
C	9,25	1	0,96	0,3594
AB	54,57	1	5,67	0,0487
AC	2,04	1	0,21	0,6589
BC	32,93	1	3,42	0,1067
B²	89,89	1	9,35	0,0184
C²	986,78	1	102,62	<0,0001
Cor Total	2849,51	15		
Ostatak	67,31	7		
Odstupanje od modela	47,97	4	1,86	0,3188
R²	<i>Adj. R²</i>	<i>Pred. R²</i>	<i>C.V.%</i>	<i>PRESS</i>
0,9764	0,9494	0,8203	3,81	512,11

Analizom varijanse ustanovljeno je da je prikazan model statistički značajan (*p* vrednost niža od 0,05) i da ima statistički neznačajno odstupanje od modela (*p*=0,32). Statistička analiza je pokazala da na odgovor sistema najznačajniji uticaj ima odnos biljni materijal:rastvarač (A). Vreme ekstrakcije (B) je imalo najmanji uticaj na prinos polifenolnih jedinjenja, ali interakcija sa odnosom biljni materijal:rastvarač ukazuje na činjenicu da se mora obratiti pažnja i na ovaj faktor. Kada koeficijent ima negativan predznak ova interakcija smanjuje vrednost odgovora sistema. Od značaja su i kvadratni članovi vreme (B²) i temperatura (C²). Značajnost kvadratnih članova ukazuje na nelinearnost efekata B i C.

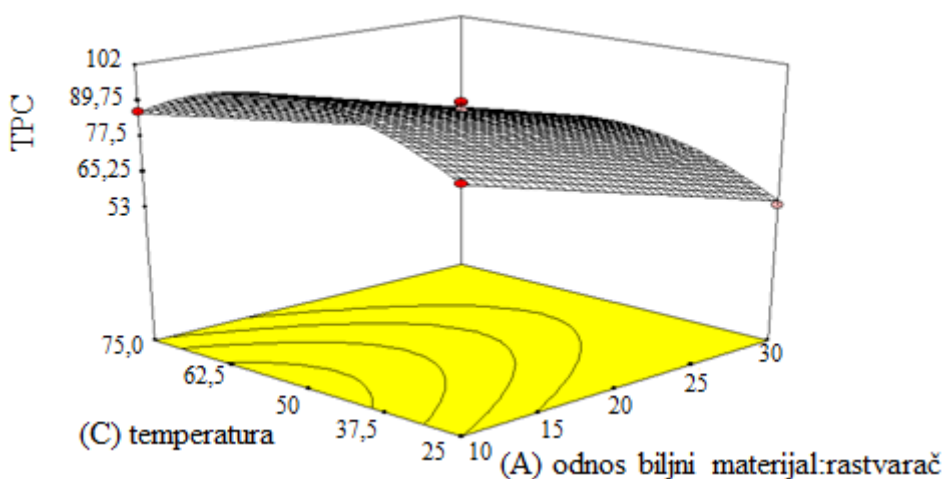
Na osnovu *R*² vrednosti dolazi se do zaključka da se 97,64% varijacija vrednosti odgovora može objasniti modelom. Na osnovu vrednosti koeficijenta varijacije (C.V.=3,81%) može se zaključiti da su razlike između eksperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti odgovora male, što takođe potvrđuje adekvatnost modela za predviđanje prinosa ekstrakcije polifenolnih jedinjenja (**Slika 31**).



Slika 31. Usklađenost predviđenih i eksperimentalno dobijenih TPC vrednosti (sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja izražen je u mg GAE/g suve materije)
 TPC- eng. *Total Phenolic Content*; GAE- eng. *Gallic Acid Equivalents*

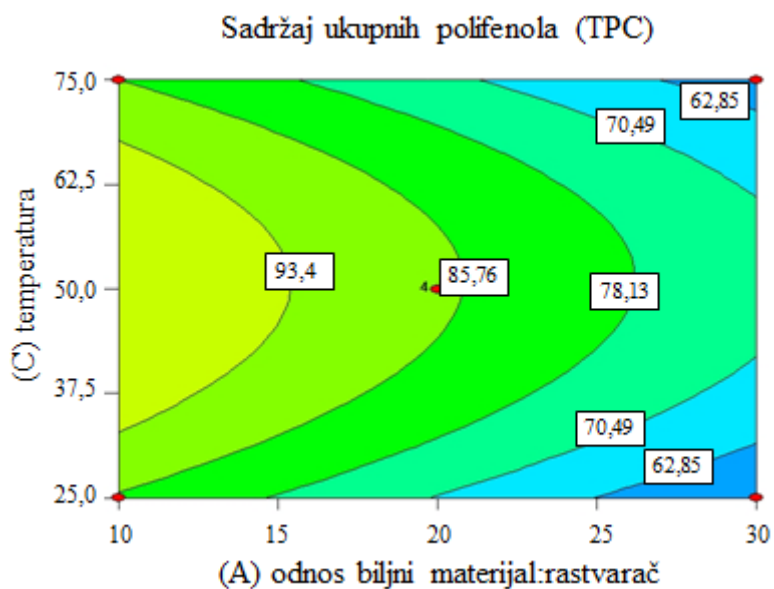
4.1.3. Grafičko prikazivanje matematičkog modela

Da bi se odredile optimalne vrednosti faktora koje će rezultirati maksimalnim prinosom ekstrakcije, grafički je prikazana zavisnost odgovora sistema od odnosa biljni materijal:rastvarač (A) i temperature na kojoj je vršena ekstrakcije (C). Vreme ekstrakcije (B) fiksirano je na 30 min (srednji nivo), budući da ovaj faktor ima najmanji uticaj na prinos polifenolnih jedinjenja. Dobijeni 3D grafik prikazan je na **Slici 32**. Kao što se može primetiti sa 3D grafika, faktor temperatura ima manji uticaj na ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja, u odnosu na faktor odnos biljni materijal:rastvarač. TPC vrednosti rastu sa porastom temperature, ali samo do određene vrednosti, kada se primećuje blagi pad koji je najverovatnije posledica degradacije ekstrahovanih polifenola usled povećanja temperature.



Slika 32. 3D grafikon površine odgovora za sadržaj ukupnih polifenola nakon ultrazvučne ekstrakcije u funkciji odnosa biljni materijal: rastvarač (A) i temperature (C) pri vremenu od 30 minuta (sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja izražen je u mg GAE/g suve materije)
 TPC- eng. *Total Phenolic Content*; GAE- eng. *Gallic Acid Equivalents*

2D grafikon (**Slika 33**) omogućava lakšu vizuelizaciju eksperimentalnog prostora.



Slika 33. 2D grafikon površine odgovora za sadržaj ukupnih polifenola nakon ultrazvučne ekstrakcije u funkciji odnosa biljni materijal:rastvarač (A) i temperature (C) pri vremenu od 30 min (sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja izražen je u mg GAE/g suve materije)
 TPC- eng. *Total Phenolic Content*; GAE- eng. *Gallic Acid Equivalents*

Na grafikonu je svetlo zelenom bojom označena zona sa maksimalnim odgovorom sistema. Može se zaključiti da se najveći prinos polifenolnih jedinjenja postiže u temperaturnom intervalu od 35 do 65 °C. Stoga su kao optimalni uslovi ekstrakcije odabrani: temperatura 50 °C, vreme trajanja ekstrakcije 30 minuta i odnos biljni materijal:rastvarač 1:10 (*m/v*). Odabrana temperatura nalazi se u sredini optimalnog regiona čime je obezbeđena robusnost ekstrakcije, pošto vreme trajanja ekstrakcije u optimalnom regionu nema uticaja na odgovor sistema.

4.2. Sastav i antioksidativna aktivnost ekstrakata grožđa dobijenih korišćenjem organskih rastvarača

Veliki genetički diverzitet vinove loze uslovljava postojanje značajnih razlika u hemijskom sastavu ploda između sorti. Kako hemijski sastav definiše biološku aktivnost, potencijalna upotreba grožđa zavisi od sorte. Prvi deo istraživanja sproveden je sa ciljem identifikacije sorti vinove loze čiji ekstrakti imaju najveći potencijal. Ispitano je ukupno 24 sorti najčešće gajenih na teritoriji Srbije.

Posebno je važno naglasiti da je ovim radom obuhvaćeno osam domaćih sorti (Tamjanika, Smederevka, Bagrina crvena, Župljanka, Začinak, Crna Tamjanika, Prokupac i Jagoda). Poreklo nekih starih balkanskih sorti, poput Tamjanike, Smederevke i Bagrine crvene nije zvanično utvrđeno, premda ih brojni autori svrstavaju u srpske autohtone sorte (Beslic i sar., 2012; Natić i sar., 2021; Pantelić i sar., 2017). Prokupac je najrasprostranjenija zvanično priznata srpska autohtona sorta. Ukrštanjem Prokupca i Crnog Burgundca u Institutu za vinogradarstvo i voćarstvo u Sremskim Karlovcima stvorena je domaća sorta Župljanka. Domaće srpske sorte su retko ispitivane, zato je malo podataka o njihovom hemijskom sastavu i potencijalu.

Pored domaćih sorti, uporedo su ispitivane i najpoznatije introdukovane sorte, koje se osim u Srbiji uspešno gaje širom sveta.

Uzorkovanje je izvršeno u trenutku tehnološke zrelosti plodova (berbe 2016 i 2017). Sve sorte gajene su u vinogradarskom regionu Centralna Srbija.

Radi lakše analize, sorte su klasifikovane u tri kategorije- sorte za bela vina, sorte za crvena vina i stone sorte.

- **Sorte za bela vina:** Sauvignon Blanc, Tamjanika, Rizling Rajnski, Italijanski Rizling, Smederevka, Chardonay, Bagrina crvena, Župljanka;
- **Sorte za crvena vina:** Gamay, Vranac, Burgundac crni, Začinak, Crna Tamjanika, Merlot, Prokupac, Frankovka, Cabernet Fran, Cabernet Sauvignon, Shiraz;
- **Stone sorte:** Michele Palieri, Afuz-ali, Jagoda, Muskat Hamburg, Drenak crveni.

Nakon berbe, izolovani su delovi ploda sa najvećim potencijalom, odnosno semenke i pokožica. Literaturno je pokazano da se u ovim delovima nalazi najviše polifenolnih jedinjenja. Osim toga, semenke su značajan izvor ulja izvanrednih fizičko-hemijskih karakteristika.

Pokožica je liofilizovana i upotrebljena kao sirovina za dobijanje etanolnih ekstrakata. Semenke su osušene i samlevene, nakon čega su Soxhlet metodom izdvojene lipofilne frakcije, odnosno ulje. Obezmašćen ostatak je iskorišćen za pripremu hidrofilnih (etanolnih) ekstrakata. Izvršeno je ispitivanje etanolnih ekstrakata pokožice i semenki, kao i metanolnih ekstrakata ulja u pogledu sadržaja ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti. Sadržaj ukupnih polifenola određen je Folin-Ciocalteu metodom, koja predstavlja osnovu hemijske analize svih uzoraka koji sadrže polifenolna jedinjenja. Antioksidativna aktivnost ispitana je pomoću 4 *in vitro* testa, koji se zasnivaju na različitim redoks reakcijama (ekstrakti ulja analizirani su samo DPPH testom). Na taj način, dobijena informacija o antioksidativnosti je sveobuhvatnija, jer u obzir uzima jedinjenja različitog mehanizma delovanja. Svi pomenuti testovi su spektrofotometrijski, jednostavni za izvođenje i precizni, zbog čega predstavljaju osnovu ovog dela istraživanja. Ulje je analizirano u pogledu prinosa kao i hemijskog sastava; masno-kiselinski profil određen je gasnom hromatografijom, dok je sistem tečne hromatografije pod visokim pritiskom korišćen za određivanje tokoferola.

4.2.1. Ekstrakti pokožice grožđa

4.2.1.1. Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u ekstraktima pokožice grožđa

Nakon liofilizacije pokožice, ekstrakcija polifenolnih jedinjenja iz ovog matriksa izvršena je pod uslovima definisanim u okviru postupka optimizacije na semenkama (poglavlje 4.1.). Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u konvencionalnim ekstraktima (acidifikovani etanol) pokožice određen je spektrofotometrijski, korišćenjem metode po *Folin Ciocalteu*. Rezultati su izraženi u miligramima ekvivalenta galne kiseline po gramu liofilizata (mg GAE/g l) i prikazani su u **Tabeli 13** kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija.

Tabela 13. Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativna aktivnost pokožice grožđa (sorte za bela vina, sorte za crvena vina i stone sorte)

Sorte za bela vina	Sauvignon Blanc	Tamjanika	Rizling Rajnski	Italijanski Rizling	Smederevka	Chardonay	Bagrina crvena	Župljanka
Ukupni polifenoli (mg GAE/g l)	4,92±0,05	9,72±0,04	13,26±0,64	6,53±0,29	10,45±0,10	5,27±0,08	4,73±0,06	9,41±0,36
DPPH test (mmol TE/g l)	0,03±0,00	0,06±0,00	0,07±0,00	0,04±0,00	0,05±0,00	0,03±0,00	0,02±0,00	0,07±0,00
FRAP test	0,04±0,00	0,09±0,00	0,13±0,00	0,06±0,00	0,10±0,00	0,05±0,00	0,04±0,00	0,08±0,00
TEAC test	0,04±0,00	0,09±0,00	0,15±0,00	0,07±0,00	0,12±0,00	0,05±0,00	0,05±0,00	0,16±0,00
CUPRAC test	0,13±0,00	0,20±0,00	0,22±0,00	0,19±0,00	0,22±0,00	0,15±0,00	0,11±0,00	0,23±0,00

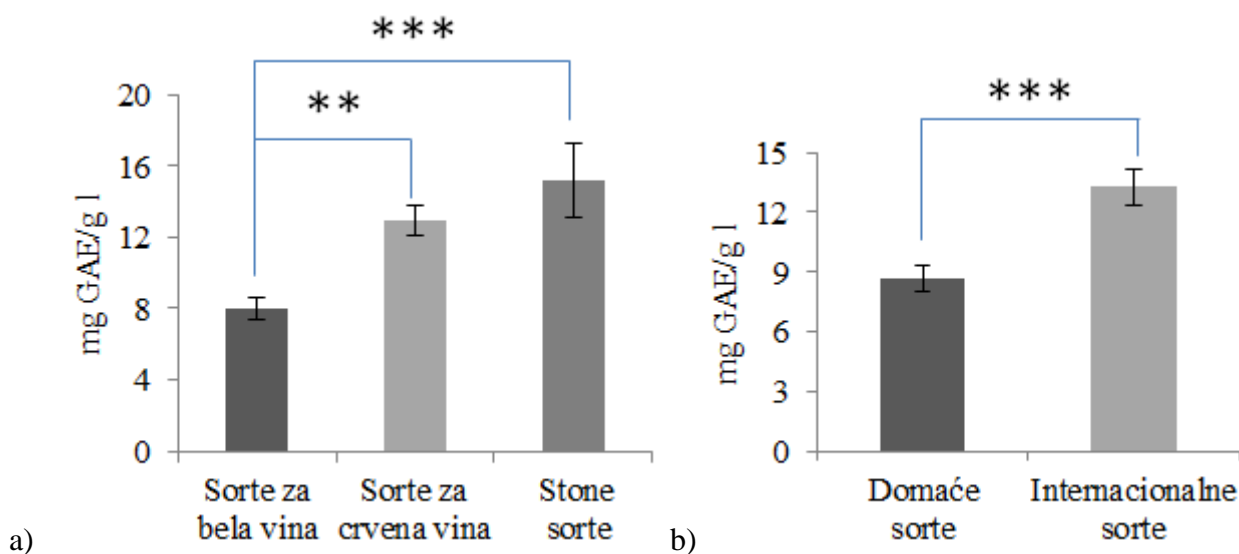
Sorte za crvena vina	Gamay	Vranac	Burgundac crni	Začinak	Crna Tamjanika	Merlot	Prokupac	Frankovka	Cabernet Fran	Cabernet Sauvignon	Shiraz
Ukupni polifenoli (mg GAE/g l)	12,49±0,25	15,89±0,03	7,46±0,29	15,00±0,49	8,46±0,02	16,21±0,23	8,74±0,19	8,56±0,45	21,25±0,13	16,01±0,32	16,14±0,09
DPPH test (mmol TE/g l)	0,07±0,00	0,13±0,00	0,07±0,00	0,12±0,00	0,05±0,00	0,11±0,00	0,09±0,00	0,08±0,00	0,10±0,00	0,13±0,00	0,13±0,00
FRAP test	0,20±0,00	0,27±0,00	0,14±0,00	0,23±0,01	0,07±0,00	0,27±0,00	0,15±0,00	0,13±0,00	0,21±0,00	0,30±0,00	0,24±0,00
TEAC test	0,11±0,00	0,33±0,00	0,18±0,00	0,32±0,00	0,08±0,00	0,32±0,01	0,21±0,00	0,18±0,00	0,25±0,00	0,32±0,00	0,30±0,00
CUPRAC test	0,19±0,00	0,46±0,00	0,35±0,01	0,44±0,01	0,13±0,00	0,45±0,00	0,37±0,00	0,31±0,00	0,41±0,00	0,45±0,01	0,44±0,00

Stone sorte	Michele Palieri	Afuz-ali	Jagoda	Muskat Hamburg	Drenak crveni
Ukupni polifenoli (mg GAE/g l)	27,21±0,57	12,50±0,17	7,12±0,23	20,99±0,07	7,92±0,07
DPPH test (mmol TE/g l)	0,09±0,00	0,05±0,00	0,04±0,00	0,10±0,01	0,01±0,00
FRAP test	0,24±0,00	0,11±0,00	0,06±0,00	0,18±0,00	0,07±0,00
TEAC test	0,30±0,00	0,14±0,00	0,07±0,00	0,22±0,00	0,09±0,00
CUPRAC test	0,44±0,00	0,23±0,00	0,19±0,00	0,42±0,00	0,20±0,00

GAE- eng. *Gallic Acid Equivalents*; l- liofilizat; TE- eng. *Trolox Equivalents*; DPPH- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; FRAP- eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*; TEAC- eng. *Trolox Equivalents Antioxidant Capacity*; CUPRAC- eng. *Cupric Reducing Antioxidant Capacity*
Italic stilom su obeležene domaće sorte; antioksidativna aktivnost je u svim testovima izražena u istim jedinicama (mmol TE/g l)

Sadržaj polifenolnih jedinjenja u ekstraktima pokožica grožđa kretao se od 4,73 (Bagrina crvena) do 27,21 mg GAE/g liofilizata (Michele Palieri). Uočene su značajne razlike u TPC vrednostima između sorti. S obzirom da su svi uzorci pripadali istom vinogradarskom regionu (Centralna Srbija) i da su prikupljeni u trenutku pune tehnološke zrelosti, smatra se da su razlike u klimatskim i agrotehničkim uslovima među sortama bile minimalne. Takođe, svi uzorci su na isti način podvrgnuti postupku ekstrakcije polifenolnih jedinjenja, zbog čega se pretpostavlja da uočene razlike u najvećoj meri potiču od sortne varijabilnosti.

Posmatranjem 3 grupe podataka (sorte za bela vina, sorte za crvena vina i stone sorte), može se primetiti da je sadržaj polifenolnih jedinjenja najniži u pokožici sorti za bela vina (srednja vrednost 8,04 mg GAE/g liofilizata). Bagrina crvena i Sauvignon Blanc su imale najmanji sadržaj polifenolnih jedinjenja (4,73 i 4,92 mg GAE/g liofilizata, redom). Ipak, varijacije u okviru grupa su velike, pa su tako u pokožici pojedinih sorti za bela vina, poput Rizlinga Rajnskog i Smederevke determinisane TPC vrednosti iznad 10 mg GAE/g liofilizata, što je bilo više nego u nekim sortama za crvena vina. U kategoriji sorti za crvena vina, pokožica sorte Cabernet Fran je imala ubedljivo najveći sadržaj polifenola (21,25 mg GAE/g liofilizata), slede Merlot, Shiraz i Cabernet Sauvignon (iznad 16 mg GAE/g liofilizata). Najniže TPC vrednosti određene su za pokožicu sorte Burgundac crni (7,46 mg GAE/g liofilizata). Najznačajnija variranja uočena su u okviru stonih sorti. Pokožice domaćih sorti Jagoda i Drenak crveni imale su najmanje polifenolnih jedinjenja (7,12 i 7,92 mg GAE/g liofilizata, redom). Neznatno veće TPC vrednosti određene su za Afuz-ali sortu (12,5 mg GAE/g liofilizata). Pokožice sorti Muskat Hamburg i Michele Palieri sadržale su značajno više polifenolnih jedinjenja (20,99 i 27,21 mg GAE/g liofilizata, redom).



Slika 34. Uporedni prikaz sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja u pokožici
a) vinskih i stonih sorti grožđa; b) domaćih i internacionalnih sorti grožđa
GAE- eng. *Gallic Acid Equivalents*; l- liofilizat; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Analizom varijanse (ANOVA) utvrđena je statistički značajna razlika između ispitivanih grupa (**Slika 34a**). Pokožica sorti za bela vina imala je značajno niži sadržaj polifenolnih jedinjenja u poređenju sa pokožicom sorti za crvena vina ($p=0,003$), što je u skladu sa dostupnim literaturnim podacima (Yilmaz i sar., 2015). Ovakav rezultat može se objasniti prisustvom određenih pigmenta (antocijana) u pokožici crvenih sorti. Statistički značajna razlika uočena je i između pokožice sorti za bela vina i pokožice stonih sorti ($p < 0,001$), pri čemu se i ona može objasniti zastupljenošću ovih pigmenta, budući da sorte Muskat Hamburg i Michele Palieri koje su izrazito bogate antocijanima,

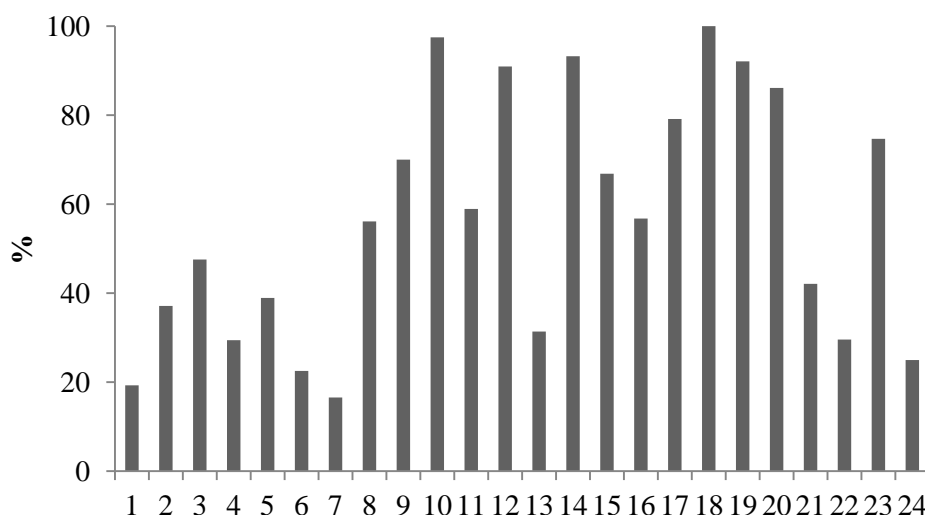
pripadaju grupi stonih sorti i uzrokuju visoku srednju TPC vrednost za ovu grupu. Dodatno, Studentov t-test je pokazao prisutnost statistički značajne razlike između pokožice domaćih i internacionalnih sorti, $p < 0,001$ (**Slika 34b**).

4.2.1.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata pokožice grožđa

Antioksidativna aktivnost ekstrakata pokožice grožđa je analizirana pomoću četiri različita testa (DPPH, FRAP, TEAC, CUPRAC). Rezultati su prikazani u milimolovima Troloks ekvivalenta po gramu liofilizata (mmol TE/g l) u **Tabeli 13**.

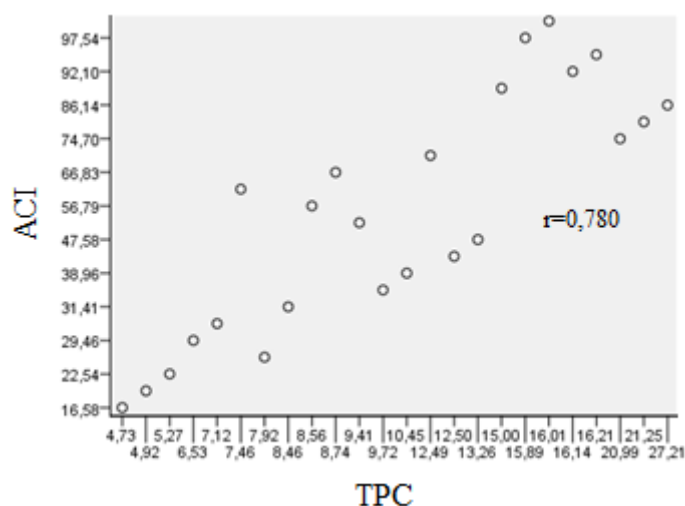
Radi lakše analize dobijenih rezultata, odnosno poređenja sorti, izračunate su vrednosti antioksidativnog kompozitnog indeksa (eng. *Antioxidant Composite Index*, ACI), na način opisan u poglavlju 3.7. Ovakav pristup omogućava šire sagledavanje antioksidativnog potencijala ekstrakata, jer sumira vrednosti dobijene pomoću četiri testa koja se zasnivaju na različitim mehanizmima antioksidativnog delovanja. ACI vrednosti dobijene za pokožice analiziranih sorti prikazane su na **Slici 35**.

Uočavaju se velike razlike između sorti, tako sorte za crvena vina poput Cabernet Sauvignon, Vranac, Merlot, Shiraz i Začinak poseduju veoma jak antioksidativni potencijal. Od stonih sorti, izdvaja se Michele Palieri, karakterističan po svojoj izrazito tamnoj pokožici. Sorte svetlije pokožice, poput Bagrine crvene, Sauvignon Blanc i Chardonay imaju niske vrednosti antioksidativnog kompozitnog indeksa i pretpostavlja se manji biološki potencijal.



Slika 35. Antioksidativna aktivnost pokožice ispitivanih sorti prikazana pomoću ACI (eng. *Antioxidant Composite Index*) vrednosti

1- Sauvignon Blanc; 2- *Tamjanika*; 3- Rizling Rajnski; 4- Italijanski Rizling; 5- *Smederevka*; 6- Chardonay; 7- *Bagrina crvena*; 8- *Župljanka*; 9- Gamay; 10- Vranac; 11- Burgundac crni; 12- *Začinak*; 13- *Crna Tamjanika*; 14- Merlot; 15- *Prokupac*; 16- Frankovka; 17- Cabernet Fran; 18- Cabernet Sauvignon; 19- Shiraz; 20- Michele Palieri; 21- Afuz-ali; 22- *Jagoda*; 23- Muskat Hamburg; 24- Drenak crveni
Italic stilom su obeležene domaće sorte



Slika 36. Korelacija između sadržaja ukupnih polifenola u pokožici grožđa i izračunatih ACI vrednosti

TPC- eng. *Total Phenolic Content* (mg GAE/g l); GAE- eng. *Gallic Acid Equivalents*; l- liofilizat; ACI- eng. *Antioxidant Composite Index* (%)

Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima pokožice bio je u statistički značajnoj korelaciji sa ACI vrednostima ($r=0,780$; $p<0,01$), čime je potvrđeno da polifenoli u velikoj meri doprinose antioksidativnoj aktivnosti ovog dela ploda (**Slika 36**).

4.2.2. Ekstrakti semenki grožđa

4.2.2.1. Hidrofilni ekstrakti semenki grožđa

4.2.2.1.1. Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u hidrofilnim ekstraktima semenki grožđa

Nakon sušenja na sobnoj temperaturi, semenke su samlevene, obezmašćene metodom po *Soxhlet*-u i ekstrakcija acidifikovanim etanolom je izvršena na način opisan u poglavlju 4.1., odnosno korišćenjem definisanih optimalnih uslova. Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u ekstraktima semenki određen je spektrofotometrijski, metodom po *Folin Ciocalteu*. Rezultati su izraženi u miligramima ekvivalenta galne kiseline po gramu suve materije (mg GAE/g sm) i prikazani su u **Tabeli 14**. kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija.

Tabela 14. Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativna aktivnost semenki grožđa (sorte za bela vina, sorte za crvena vina i stone sorte)

Sorte za bela vina	Sauvignon Blanc	Tamjanika	Rizling Rajnski	Italijanski Rizling	Smederevka	Chardonay	Bagrina crvena	Župljanka
Ukupni polifenoli (mg GAE/g sm)	85,48±2,53	82,81±1,72	124,98±0,48	84,61±0,83	102,81±2,68	98,33±2,87	105,13±2,90	114,34±1,27
DPPH test (mmol TE/g sm)	0,68±0,02	0,84±0,01	0,99±0,03	0,89±0,01	0,97±0,00	0,84±0,00	0,86±0,00	0,88±0,02
FRAP test	0,68±0,01	0,72±0,02	1,21±0,01	1,18±0,00	1,11±0,01	0,82±0,00	0,94±0,08	0,86±0,01
TEAC test	0,80±0,01	1,07±0,01	1,45±0,02	1,10±0,02	1,26±0,00	1,17±0,04	1,16±0,01	1,13±0,02
CUPRAC test	1,21±0,01	1,63±0,00	2,23±0,00	1,74±0,01	1,87±0,10	1,75±0,02	1,82±0,14	1,85±0,01

Sorte za crvena vina	Gamay	Vranac	Burgundac crni	Začinak	Crna Tamjanika	Merlot	Prokupac	Frankovka	Cabernet Fran	Cabernet Sauvignon	Shiraz
Ukupni polifenoli (mg GAE/g sm)	146,69±0,96	100,90±2,10	147,91±1,66	130,94±1,65	104,47±1,92	70,86±0,48	146,37±1,43	97,61±1,66	76,27±0,96	74,81±0,82	67,11±0,48
DPPH test (mmol TE/g sm)	1,19±0,00	0,88±0,00	1,19±0,01	0,99±0,00	0,93±0,01	0,76±0,04	1,01±0,01	1,02±0,03	0,81±0,04	0,81±0,02	0,71±0,02
FRAP test	1,81±0,00	0,87±0,01	1,63±0,06	1,10±0,03	1,28±0,01	0,80±0,03	1,60±0,00	1,32±0,00	0,91±0,00	1,01±0,03	0,73±0,01
TEAC test	2,12±0,01	1,00±0,02	1,61±0,01	1,25±0,00	1,37±0,00	1,02±0,00	1,49±0,02	1,38±0,00	0,99±0,01	0,99±0,01	0,92±0,00
CUPRAC test	3,04±0,05	1,57±0,02	2,64±0,03	1,95±0,01	1,49±0,03	1,57±0,01	2,14±0,04	2,04±0,02	1,45±0,02	1,39±0,00	1,45±0,01

Stone sorte	Michele Palieri	Afuz-ali	Jagoda	Muskat Hamburg	Drenak crveni
Ukupni polifenoli (mg GAE/g sm)	116,65±0,42	120,09±2,08	50,76±0,48	101,13±2,49	85,24±1,66
DPPH test (mmol TE/g sm)	0,88±0,04	1,03±0,00	0,55±0,00	0,92±0,00	1,03±0,01
FRAP test	1,09±0,00	1,50±0,01	0,52±0,03	1,10±0,01	1,22±0,09
TEAC test	1,06±0,08	1,44±0,01	0,53±0,01	1,28±0,05	1,17±0,06
CUPRAC test	1,58±0,05	2,33±0,02	0,72±0,00	1,95±0,00	2,00±0,02

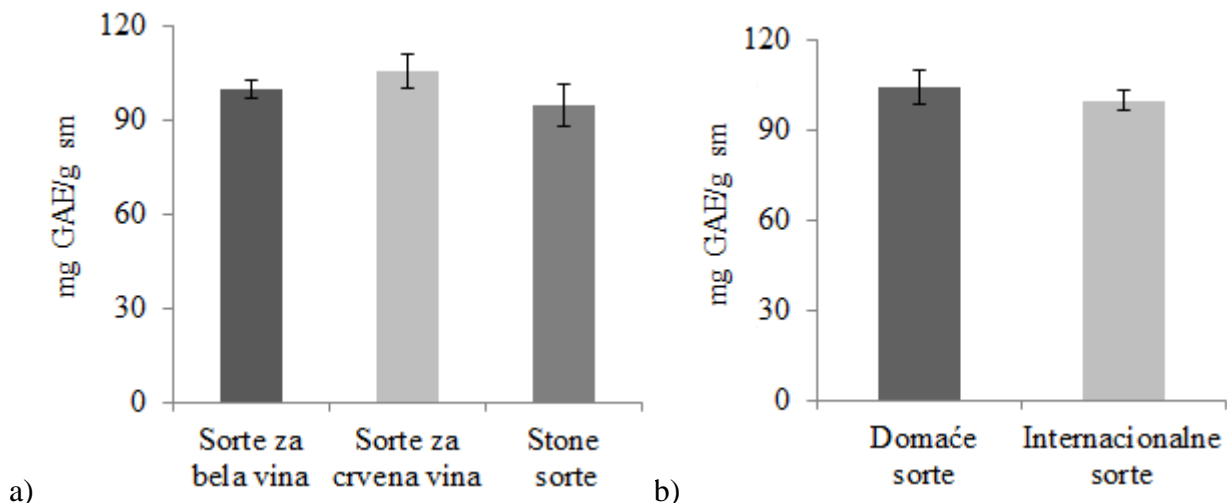
GAE- eng. *Gallic Acid Equivalents*; sm- suva materija; TE- eng. *Trolox Equivalents*; DPPH- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; FRAP- eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*; TEAC- eng. *Trolox Equivalents Antioxidant Capacity*; CUPRAC- eng. *Cupric Reducing Antioxidant Capacity*
Italic stilom su obeležene domaće sorte; antioksidativna aktivnost je u svim testovima izražena u istim jedinicama (mmol TE/g sm)

Predmet jednog istraživanja bio je sadržaj ukupnih polifenola u različitim nusproizvodima prehrambene industrije (Babbar i sar., 2011). Dokazano je da semenke grožđa imaju više polifenolnih jedinjenja od svih analiziranih uzoraka (pored semenki grožđa, studija je uključivala koru i semenke mandarine, perikarp i semenke azijske trešnje i koru banane), što je objašnjeno dominantnim prisustvom proantocijanidina. Druga studija, koja se bavila uporednom analizom različitih biljnih ekstrakata, pokazala je da semenke grožđa sadrže više polifenola od zelenog i crnog čaja, đumbira i gingka (Rababah i sar., 2004).

Naši rezultati u skladu su sa literaturnim podacima (Bozan i sar., 2008; Bucić-Kojić i sar., 2009; Pantelić i sar., 2016). U kategoriji sorti za bela vina, najveći sadržaj određen je u semenkama sorte Rizling Rajnski (124,98 mg GAE/g suve materije), zatim u sortama Župljanka, Bagrina crvena i Smederevka (114,34; 105,13 i 102,81 mg GAE/g suve materije, redom). Tamjanika je bila sorta sa najnižim vrednostima TPC (82,21 mg GAE/g sm). Među semenkama sorti za crvena vina, izdvojile su se sorte Burgundac crni, Gamay, Prokupac i Začinak (u semenkama svih navedenih sorti je sadržaj ukupnih polifenola bio veći od 130 mg GAE/g sm). Shiraz i Merlot semenke su imale najmanje polifenolnih jedinjenja (67,11 i 70,86 mg GAE/g sm, redom). Afuz-ali (120,09 mg GAE/g sm) i Michele Palieri (116,65 mg GAE/g sm) su se izdvojile u kategoriji stonih sorti. Semenke stone sorte Jagoda su imale najmanji sadržaj polifenolnih jedinjenja (50,76 mg GAE/g sm).

Poređenjem naših rezultata sa dostupnim literaturnim podacima za iste sorte, mogu se uočiti izvesne sličnosti. Semenke sorte Frankovka bile su predmet jednog istraživanja, gde se sadržaj polifenolnih jedinjenja kretao od 94,44 do 129,59 mg GAE/g suve materije, u zavisnosti od koncentracije etanola upotrebljenog za ekstrakciju (Bucić-Kojić i sar., 2009). Slično, prinos polifenolnih jedinjenja iz Frankovka semenki naših uzoraka je visok (97,61 mg GAE/g suve materije). Druga grupa naučnika je analizirala nekoliko sorti koje su obuhvaćene i ovom disertacijom. Burgundac crni (Pinot Noir) i Prokupac bile su sorte sa najvećom koncentracijom polifenola u semenkama u oba istraživanja (Pantelić i sar., 2016).

Generalno, analizom grupe podataka, nisu pokazane statistički značajne razlike između vinskih i stonih sorti, odnosno između domaćih i internacionalnih sorti (Slika 37a i 37b).



Slika 37. Uporedni prikaz sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja u semenkama
a) vinskih i stonih sorti grožđa; b) domaćih i internacionalnih sorti grožđa
GAE- eng. *Galic Acid Equivalents*; sm- suva materija

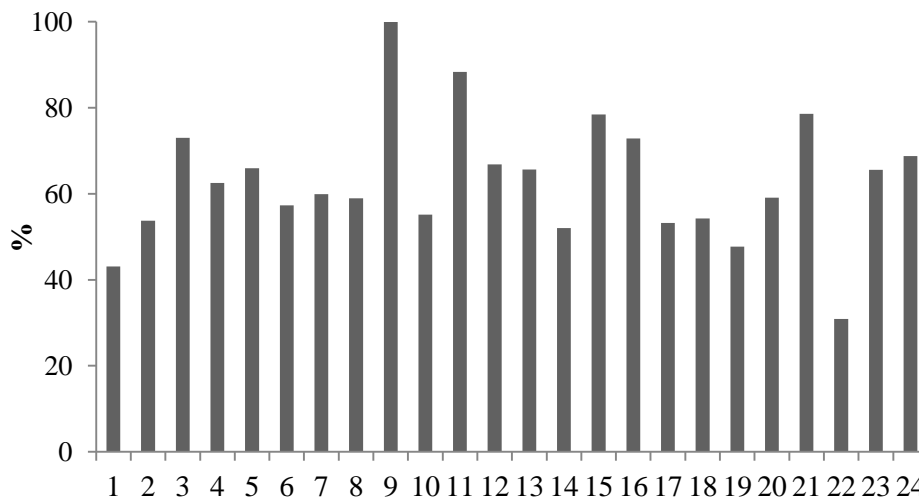
Sadržaj polifenolnih jedinjenja u ekstraktima semenki grožđa bio je višestruko veći nego u ekstraktima pokožica što je u skladu sa literaturnim podacima (Pantelić i sar., 2016). Osim toga, u semenkama je primećeno manje variranje između sorti u pogledu sadržaja polifenola. Ovakav nalaz može se objasniti na dva načina: semenke su smeštene unutar ploda, gde se manje ispoljava uticaj spoljašnje sredine, dok prisustvo antocijana u crvenim sortama grožđa implicira veći sadržaj polifenola u pokožici određenih sorti, samim tim i veće razlike.

4.2.2.1.2. Antioksidativna aktivnost hidrofilnih ekstrakata semenki grožđa

Antioksidativna aktivnost semenki grožđa je ispitivana pomoću četiri testa (DPPH, FRAP, TEAC i CUPRAC). Rezultati su izraženi u milimolovima Troloks ekvivalenta po gramu suve materije (mmol TE/g sm) prikazani su u **Tabeli 14**.

Analogno pokožici, sa ciljem lakšeg poređenja sorti, izračunate su vrednosti antioksidativnog kompozitnog indeksa (eng. *Antioxidant Composite Index*, ACI), na način opisan u poglavlju 3.7. ACI vrednosti dobijene za semenke analiziranih sorti prikazane su na **Slici 38**.

Ubedljivo najveći antioksidativni kapacitet pokazale su semenke sorte Gamay. Ova sorta bila je dominantna u gotovo svim testovima; jedino su korišćenjem DPPH testa ekstrakti semenki Burgundac crni imali veći antioksidativni potencijal. Osim ove dve sorte, značajnije ACI vrednosti određene su za sorte Afuz-ali, Prokupac, Rizling Rajnski i Frankovka (ACI>70%).

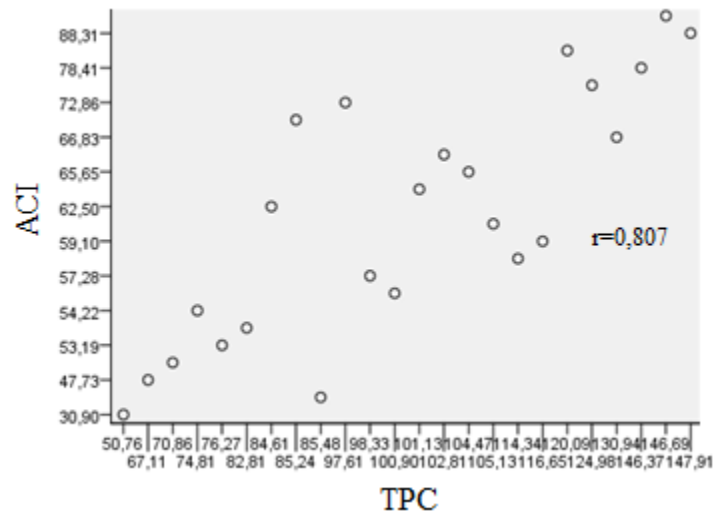


Slika 38. Antioksidativna aktivnost semenki ispitivanih sorti prikazana pomoću ACI (eng. *Antioxidant Composite Index*) vrednosti

1- Sauvignon Blanc; 2- Tamjanika; 3- Rizling Rajnski; 4- Italijanski Rizling; 5- Smederevka; 6- Chardonay; 7- Bagrina crvena; 8- Župljanka; 9- Gamay; 10- Vranac; 11- Burgundac crni; 12- Začinak; 13- Crna Tamjanika; 14- Merlot; 15- Prokupac; 16- Frankovka; 17- Cabernet Fran; 18- Cabernet Sauvignon; 19- Shiraz; 20- Michele Palieri; 21- Afuz-ali; 22- Jagoda; 23- Muskat Hamburg; 24- Drenak crveni
Italic stilom su obeležene domaće sorte

Antioksidativna aktivnost hidrofilnih ekstrakata semenki (ACI vrednosti) bila je u snažnoj pozitivnoj korelaciji sa sadržajem ukupnih polifenolnih jedinjenja ($r=0,807$; $p<0,01$) (**Slika 39**). Nešto veći koeficijent korelacije između ACI vrednosti i sadržaja ukupnih polifenola kod semenki u poređenju sa

pokožicom ukazuje na prisustvo biološki aktivnih jedinjenja nefenolne strukture u pokožici koje definitivno imaju uticaj na antioksidativnu aktivnost ovog dela ploda.



Slika 39. Korelacija između sadržaja ukupnih polifenola u semenkama grožđa i izračunatih ACI vrednosti

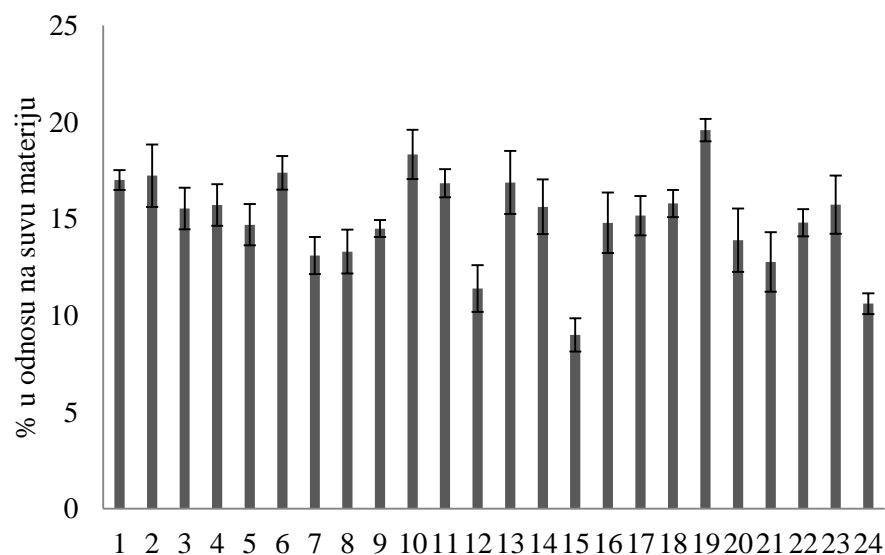
TPC- eng. *Total Phenolic Content* (mg GAE/g sm); GAE- eng. *Gallic Acid Equivalents*; sm- suva materija; ACI- eng. *Antioxidant Composite Index* (%)

Na osnovu rezultata dobijenih za hidrofилne ekstrakte, zaključuje se da su semenke grožđa bogatije polifenolnim jedinjenjima od pokožice, kao i da su sorte razlike među uzorcima semenki manje. Pokožice sorti za crvena vina imale su veći sadržaj polifenola u poređenju sa pokožicama sorti za bela vina, kao i u odnosu na neke sorte. Antioksidativna aktivnost je bila u statistički značajnoj korelaciji sa sadržajem polifenola, bez obzira na matriks, čime je potvrđeno da su ova biološki aktivna jedinjenja nosioci antioksidativne aktivnosti ploda vinove loze.

4.2.2.2. Lipofilni ekstrakti semenki grožđa (ulja)

4.2.2.2.1. Sadržaj ulja u semenkama grožđa

Ekstrakcija ulja izvršena je iz prethodno samlevenih semenki metodom po *Soxhlet*-u, uz upotrebu hloroforma. Prinos ulja je izražen u % u odnosu na suhu materiju. Rezultati su prikazani na **Slici 40** kao srednja vrednost tri ponavljanja uz odgovarajuće standardne devijacije.



Slika 40. Sadržaj ulja u semenkama grožđa

1- Sauvignon Blanc; 2- *Tamjanika*; 3- Rizling Rajnski; 4- Italijanski Rizling; 5- *Smederevka*; 6- Chardonay; 7- *Bagrina crvena*; 8- *Župljanka*; 9- Gamay; 10- Vranac; 11- Burgundac crni; 12- *Začinak*; 13- *Crna Tamjanika*; 14- Merlot; 15- *Prokupac*; 16- Frankovka; 17- Cabernet Fran; 18- Cabernet Sauvignon; 19- Shiraz; 20- Michele Palieri; 21- Afuz-ali; 22- *Jagoda*; 23- Muskat Hamburg; 24- Drenak crveni
Italic stilom su obeležene domaće sorte

Najbogatije uljem bile su semenke sorte Shiraz (19,59%), dok je sorta Prokupac imala najmanji sadržaj ulja (9,00%). Visokim sadržajem istakle su se i sorte Vranac, Chardonay, Crna Tamjanika i Burgundac crni (prinos ulja veći od 16%). Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima koji pokazuju da sadržaj ulja u semenkama grožđa može varirati u širokom opsegu, od 4 do 20%, i da najviše zavisi od sorte vinove loze (Beveridge i sar., 2005; Demirtas i sar., 2013; Fernandes i sar., 2013).

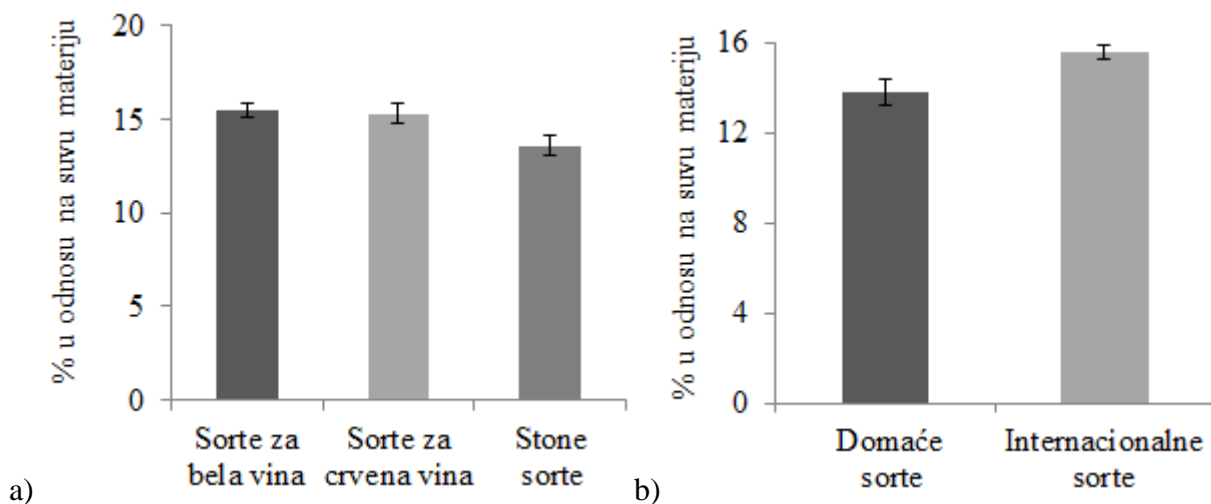
Pored sortne varijabilnosti, na prinos ulja mogu uticati: stepen zrelosti ploda, zatim tehnološki postupak koji se koristi za izdvajanje ulja, kao i agrotehnoški i klimatski uslovi (Mironeasa i sar., 2010; Rubio i sar., 2009).

Nezreli plodovi imaju značajno manje ulja u semenkama nego plodovi neposredno pre faze šarka. Od tog trenutka, pa do pune zrelosti, nije bilo značajnog povećanja u prinosu ulja, tj. postignut je plato (Rubio i sar., 2009). Svi uzorci analizirani u okviru ove doktorske disertacije su prikupljeni u trenutku pune zrelosti, kako bi se eliminisao faktor zrenja ploda.

Tehnološki postupak koji se koristi za izdvajanje ulja takođe može uticati na prinos (Mironeasa i sar., 2010). Ceđenjem i presovanjem dobija se manji prinos ulja u poređenju sa ekstrakcijom organskim rastvaračima. Sa ekološkog aspekta prihvatljivije metode izolovanja ulja, poput superkritične ekstrakcije, daju takođe veliki prinos, ali su i dalje manje u upotrebi, zbog visoke cene. Industrijski, ulje se najčešće proizvodi kombinacijom dve metode, presovanjem, a zatim ekstrakcijom organskim rastvaračem, nakon čega se eliminiše organski rastvarač. Naši rezultati su u skladu sa literaturnim podacima o prinosu ulja iz semenki grožđa nakon ekstrakcije organskim rastvaračima (Beveridge i sar., 2005; Fernandes i sar., 2013).

Uporednom analizom vinskih i stonih sorti, uočen je nešto viši sadržaj ulja u semenkama vinskih sorti u poređenju sa semenkama stonih sorti (**Slika 41a**). Ipak, usled visokih standardnih devijacija ta razlika nije bila statistički značajna. Ranije istraživanje (Baydar & Akkurt, 2001) koje je za cilj imalo poređenje sadržaja i sastava ulja iz semenki stonih i vinskih sorti, takođe nije rezultovalo značajnim razlikama između ove dve grupe.

Kada se porede sorte na osnovu njihovog porekla, veće količine ulja sadržale su semenke internacionalnih u odnosu na semenke domaćih sorti (**Slika 41b**), ali ponovo bez statističke značajnosti. U literaturi nije dostupno puno podataka o domaćim sortama i teško je izvesti zaključak imajući u vidu relativno mali broj domaćih sorti obuhvaćenih ovim ispitivanjem, kao i variranja u okviru grupa.



Slika 41. Uporedni prikaz sadržaja ulja u semenkama
a) vinskih i stonih sorti grožđa; b) domaćih i internacionalnih sorti grožđa

4.2.2.2.2. Sastav masnih kiselina u ulju iz semenki grožđa

Masno-kiselinski sastav ulja određen je gasnom hromatografijom. Identifikovano je ukupno šest masnih kiselina u uljima iz semenki grožđa. Njihova zastupljenost određena je na osnovu površine dobijenih pikova, a rezultati su izraženi u % od ukupnih metil estara masnih kiselina i prikazani su kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija (**Tabela 15**).

Tabela 15. Masno-kiselinski sastav ispitivanih ulja (sorte za bela vina, sorte za crvena vina i stone sorte)

Sorte za bela vina	Sauvignon Blanc	Tamjanika	Rizling Rajnski	Italijanski Rizling	Smederevka	Chardonay	Bagrina crvena	Župljanka
16:0	11,0±0,1	11,4±0,4	11,3±0,2	10,2±0,2	9,9±0,1	10,5±0,1	12,4±0,0	11,3±0,3
18:0	4,9±0,1	4,8±0,2	4,7±0,1	4,7±0,1	4,7±0,0	4,4±0,1	4,2±0,1	5,1±0,0
18:1 (n-9)	15,3±0,3	18,9±0,1	15,4±0,8	16,8±0,1	16,7±0,1	17,4±0,2	16,9 ±0,0	14,4±0,1
18:1 (n-7)	0,8±0,1	0,9±0,1	0,7±0,0	0,6±0,1	0,8±0,1	0,9±0,1	1,8±0,1	1,0±0,1
18:2	67,4±0,2	62,8±0,8	66,0±0,2	66,2±0,2	67,3±0,1	65,6±0,4	63,0±0,2	64,8±0,1
18:3	0,5±0,1	0,8±0,1	0,8±0,0	0,9±0,0	0,5±0,0	0,4±0,0	0,8±0,0	1,4±0,1

Sorte za crvena vina	Gamay	Vranac	Burgundac crni	Začinak	Crna Tamjanika	Merlot	Prokupac	Frankovka	Cabernet Fran	Cabernet Sauvignon	Shiraz
16:0	12,2±0,8	10,8±0,1	10,7±0,1	15,5±0,1	10,5±0,1	11,0±0,0	12,5±0,1	11,4±0,1	11,4±0,1	10,6±0,3	11,5±0,2
18:0	4,3±0,4	5,7±0,3	5,2±0,0	4,6±0,0	5,0±0,0	4,3±0,0	5,2±0,2	5,4±0,0	5,9±0,1	6,5±0,0	5,1±0,1
18:1 (n-9)	18,7±0,3	15,9±0,2	18,5±0,0	16,2±0,6	14,5±0,3	14,6±0,2	15,1±0,4	17,0±0,0	13,6±0,0	15,5 ±0,1	20,2±0,8
18:1 (n-7)	1,0±0,0	0,5±0,0	0,8 ±0,0	0,8±0,0	0,8±0,0	1,2±0,1	1,1±0,0	1,2±0,1	0,7±0,0	0,7±0,0	1,5±0,0
18:2	62,3±0,5	64,5±0,4	63,1±0,7	60,7±0,4	67,2±0,9	67,6±0,0	64,8±0,1	63,6±0,6	66,1±0,3	65,0±0,0	60,1±0,6
18:3	0,8±0,0	1,4±0,1	1,0±0,1	1,2±0,1	0,5±0,0	1,1±0,0	0,8±0,0	0,8±0,0	1,4±0,2	0,8±0,1	1,0 ±0,0

Stone sorte	Michele Palieri	Afuz-ali	<i>Jagoda</i>	Muskat Hamburg	Drenak crveni
16:0	12,5±0,2	13,8±0,3	11,0±0,1	12,2±0,1	10,9±0,2
18:0	5,7±0,0	7,3±0,2	4,8±0,1	7,0±0,1	4,8±0,1
18:1 (n-9)	17,7±0,4	18,4±0,1	19,2±0,3	16,9±0,2	12,8±0,1
18:1 (n-7)	1,0±0,1	0,7±0,1	1,7±0,0	2,1±0,2	1,7±0,0
18:2	61,9±1,3	57,6±0,0	61,4±0,1	60,2±1,1	67,4±0,1
18:3	0,5±0,0	0,6±0,0	1,7±0,0	0,3±0,0	1,0 ±0,0

16:0- palmitinska kiselina; 18:0- stearinska kiselina; 18:1 (n-9)- izomer oleinske kiseline; 18:1 (n-7)- izomer oleinske kiseline; 18:2- linolna kiselina; 18:3- α- linolenska kiselina

Italic stilom su obeležene domaće sorte

Ulje iz semenki grožđa pripada grupi ulja koja su bogata polinezasićenim masnim kiselinama, i to podgrupi koja obuhvata ulja sa izrazito visokim procentom linolne kiseline (više od 60%). Podela je izvršena na 80 različitih biljnih ulja, a obzirom na sličnu zastupljenost masnih kiselina, u istu podgrupu su svrstana: ulje noćurka, ulje iz semenki dinje, duvana, paprike, šafranike itd. (Dubois i sar., 2007). Dobijeni rezultati za 24 ispitane sorte grožđa u ovom istraživanju bili su u skladu sa očekivanim. Procentualna zastupljenost linolne kiseline kretala se u rasponu od 57,6 do 67,6%. Najniža vrednost primećena je u ulju dobijenom iz semenki stonice sorte Afuz-ali. U svim ostalim uzorcima ova kiselina je bila prisutna sa više od 60% od ukupnih metil estara masnih kiselina. Ulja iz semenki sorti Smederevka, Crna Tamjanika, Sauvignon Blanc, Merlot i Drenak crveni izdvojila su se sa najvišim procentom linolne kiseline (preko 67% od ukupnih metil estara masnih kiselina).

Osim linolne, ispitivana ulja su imala i značajan procenat oleinske kiseline (C 18:1). Sadržaj C 18:1 u uljima bio je u skladu sa literaturnim podacima prema kojima je zastupljenost oleinske kiseline u uljima iz semenki grožđa varirao od 16,07 do 24,88% (Pardo i sar., 2009). Druga studija dala je homogenije rezultate; procentualna zastupljenost oleinske kiseline je bila od 18,14 do 22,88% (Tangolar i sar., 2009). U okviru našeg istraživanja, u uljima su identifikovana dva izomera oleinske kiseline; n-9 i n-7. n-7 izomer je bio neznatno zastupljen; jedino je ulje iz semenki sorte Muskat Hamburg sadržalo nešto veći procenat (2,1%). Procentualna zastupljenost n-9 izomera je značajno varirala među uljima iz različitih sorti. Drenak crveni je imao najniži procenat (12,8%), a kao ulje sa najvišim sadržajem C 18:1, n-9 identifikovano je ulje iz semenki Shiraz sorte (20,2%). Udeli linolne i oleinske kiseline bili su u negativnoj korelaciji ($r = -0,688$; $p < 0,01$), čime su potvrđeni rezultati ranijih istraživanja (Baydar & Akkurt, 2001; Sabir i sar., 2012).

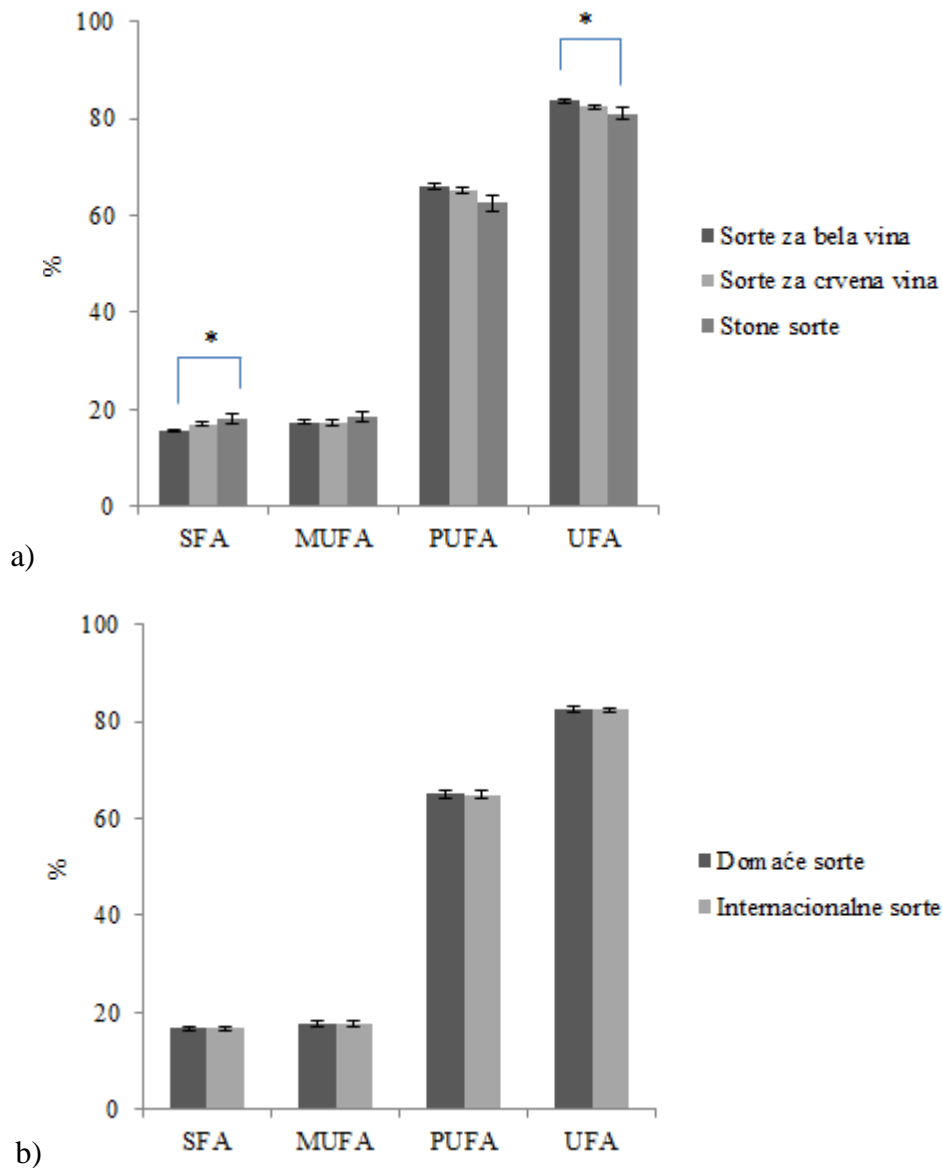
U analiziranim uljima identifikovane su i zasićene masne kiseline: palmitinska (C 16:0) i stearinska kiselina (C 18:0). Palmitinska kiselina je bila zastupljenija, što je u skladu sa prethodnim nalazima (Al Juhaimi i sar., 2017; Baydar & Akkurt, 2001; Crews i sar., 2006; Dimić i sar., 2020; Pardo i sar., 2009; Tangolar i sar., 2009). Procentualni udeo C 16:0 kretao se u širokom opsegu, od $9,9 \pm 0,1$ (Smederevka) do $15,5 \pm 0,1\%$ (Zaćinak). Ranija istraživanja masno-kiselinskog sastava ulja iz semenki grožđa su pokazala da je palmitinska kiselina uglavnom zastupljena sa manje od 10%. Ipak, poznato je da sortna varijabilnost može značajno uticati i na sadržaj C 16:0 u ulju iz semenki grožđa. U okviru jednog istraživanja procentualna zastupljenost palmitinske kiseline varirala je od 7,15 do 18,24% (Al Juhaimi i sar., 2017).

Stearinska kiselina je bila prisutna u manjem procentu i sa manjim sortnim variranjima (srednja vrednost $5,1 \pm 0,8\%$). Nešto značajniji udeo stearinske kiseline primećen je u stonim sortama grožđa Muskat Hamburg i Afuz-ali (7,0 i 7,3%, redom). Dobijeni rezultati su bili u korelaciji sa literaturnim podacima (Baydar & Akkurt, 2001; Crews i sar., 2006; Lachman i sar., 2015; Wen i sar., 2016).

Polinezasićena α -linolenska kiselina (C 18:3) je bila zastupljena sa skromnim udelom (od 0,3 do 1,7%). Domaća stona sorta Jagoda dala je ulje sa najvećim procentom ove masne kiseline. U poređenju sa literaturnim podacima zastupljenost α -linolenske kiseline u analiziranim uljima je bila veća. Osim Jagode, i neke vinske sorte su se izdvojile sa sadržajem C 18:3. Vranac, Cabernet Fran, Zaćinak i Merlot (sorte za crvena vina) i Župljanka (sorta za bela vina) su sadržale više od 1% α -linolenske kiseline.

Smatra se da sortna varijabilnost ima najveći uticaj na sastav masnih kiselina (Wen i sar., 2016). Pored toga, na procentualnu zastupljenost masnih kiselina mogu uticati agroklimatski uslovi, kao i način uzgajanja (Sabir i sar., 2012).

Uočene su razlike u sastavu masnih kiselina između vinskih i stonih sorti. Ulje dobijeno iz semenki stonih sorti je imalo veći procenat zasićenih masnih kiselina (SFA), dok su se ulja vinskih sorti odlikovala većim procentom nezasićenih (UFA) i polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) (**Slika 42a**). Statistička značajnost uočena je između sorti za bela vina i stonih sorti (SFA i UFA). Jedna studija bavila se poređenjem ulja iz semenki stonih i vinskih sorti i primećen je isti trend, ali bez statističke značajnosti (Baydar & Akkurt, 2001). Poređenjem ulja koja su dobijena iz semenki domaćih i internacionalnih sorti grožđa, nisu uočene statistički značajne razlike u pogledu procentualne zastupljenosti pojedinih klasa masnih kiselina (**Slika 42b**).

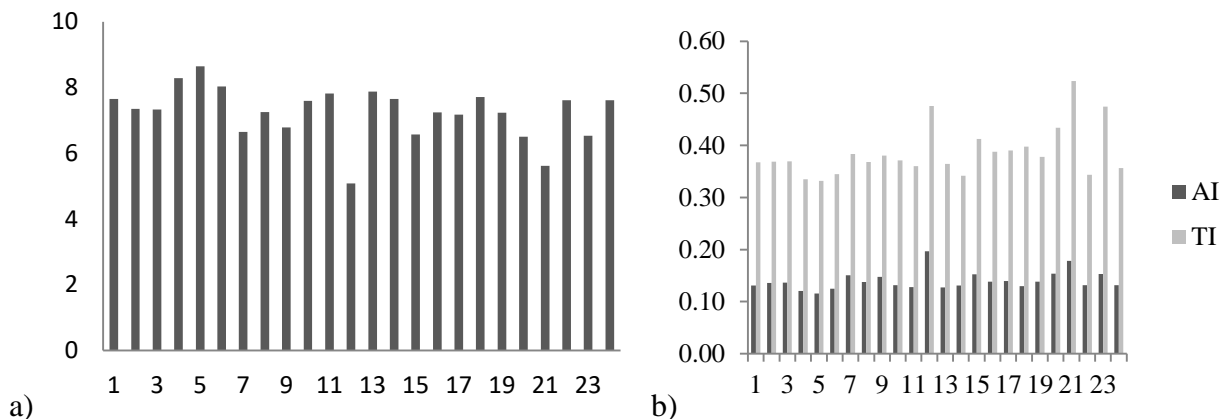


Slika 42. Upporedni prikaz procentualne zastupljenosti zasićenih masnih kiselina (SFA), mononezasićenih masnih kiselina (MUFA), polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) i nezasićenih masnih kiselina (UFA) u uljima iz semenki

a) vinskih i stonih sorti grožđa; b) domaćih i internacionalnih sorti

* $p < 0,05$

Masno-kiselinski sastav je značajan za procenu funkcionalnog kvaliteta ulja. Sadržaj pojedinačnih masnih kiselina ne definiše kvalitet ulja, već se kao parametar kvaliteta vrlo često koristi odnos polinezasićenih i zasićenih masnih kiselina (PUFA/SFA). Kako se samo određene SFA smatraju aterogenim (C 12:0, C 14:0 i C 16:0), sa ciljem da se ispita aterogeni potencijal ulja iz semenki grožđa računat je odnos hipo- i hiperholesterolemijskih masnih kiselina (H/H), zatim indeks aterogenosti (AI), kao i indeks trombogenosti (TI). Na **Slici 43** su prikazane dobijene vrednosti. H/H odnos je varirao, od 5,07 (Začinak) do 8,64 (Smederevka). Veće vrednosti H/H su značajne sa nutritivnog aspekta, s obzirom da one oslikavaju efekat masnih kiselina na metabolizam holesterola. Na primer, ulje iz lanenog semena odlikuje se visokim H/H vrednostima, zbog čega se smatra najvrednijim. Rezultati dobijeni za ulje iz semenki grožđa su komparabilni sa onima određenim za susamovo i maslinovo ulje (Hashempour-Baltork i sar., 2018). U poređnom analizom više sorti, može se primetiti da se osim Smederevke, izdvajaju i ulja dobijena iz semenki sorti Italijanski Rizling i Chardonay (**Slika 43a**).

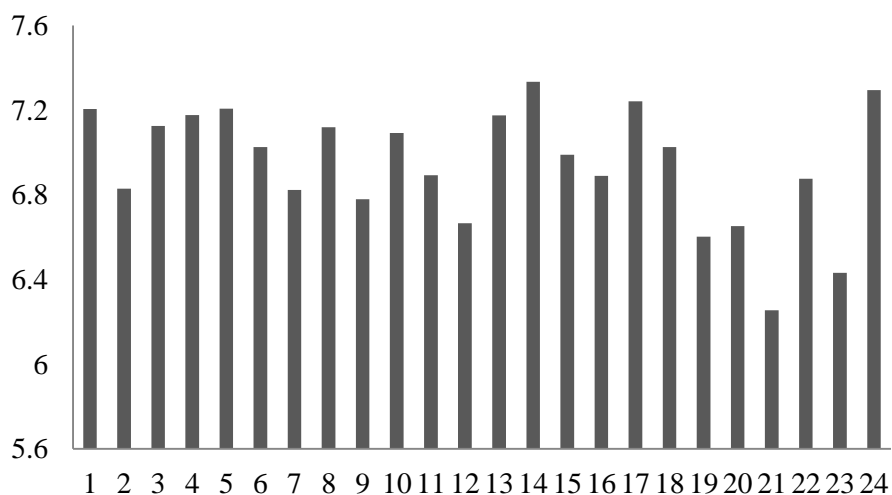


Slika 43. a) Odnos hipo- i hiperholesterolemijskih masnih kiselina (H/H); b) Indeks aterogenosti (AI) i indeks trombogenosti (TI) u ispitivanim uljima

1- Sauvignon Blanc; 2- *Tamjanika*; 3- Rizling Rajnski; 4- Italijanski Rizling; 5- Smederevka; 6- Chardonay; 7- *Bagrina crvena*; 8- *Župljanka*; 9- Gamay; 10- Vranac; 11- Burgundac crni; 12- Začinak; 13- *Crna Tamjanika*; 14- Merlot; 15- *Prokupac*; 16- Frankovka; 17- Cabernet Fran; 18- Cabernet Sauvignon; 19- Shiraz; 20- Michele Palieri; 21- Afuz-ali; 22- *Jagoda*; 23- Muskat Hamburg; 24- *Drenak crveni*
Italic stilom su obeležene domaće sorte

AI i TI vrednosti koriste se kao dobri prediktori ili faktori rizika za nastanak različitih kardiovaskularnih bolesti. Suprotno H/H odnosu, niske vrednosti ovih indeksa smatraju se poželjnim. Vrednosti za AI i TI su bile ispod jedinice za sve analizirane uzorke (**Slika 43b**). Smederevka, Italijanski Rizling i Chardonay su imale najniže AI i TI vrednosti.

Neophodno je naglasiti da masno-kiselinski sastav utiče na stabilnost ulja. Oksidativna stabilnost najviše zavisi od sadržaja polinezasićenih masnih kiselina. Nizak sadržaj ALA čini ulje iz semenki grožđa otpornijim na spoljašnje faktore. COX (eng. *Calculated OXidizability*) vrednosti su računane kako bi se analizirala i uporedila oksidativna stabilnost ulja dobijenog iz semenki različitih sorti vinove loze (**Slika 44**). Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima za ista ulja (Sabir i sar., 2012). Niže COX vrednosti ukazuju na veću stabilnost ulja (Afuz-ali, Muskat Hamburg). Kao najnestabilnija izdvojila su se ulja Merlot i Drenak crveni.



Slika 44. COX (eng. *Calculated OXidizability*) vrednosti ispitivanih ulja

1- Sauvignon Blanc; 2- *Tamjanika*; 3- Rizling Rajnski; 4- Italijanski Rizling; 5- *Smederevka*; 6- Chardonay; 7- *Bagrina crvena*; 8- *Župljanka*; 9- Gamay; 10- Vranac; 11- Burgundac crni; 12- *Začinak*; 13- *Crna Tamjanika*; 14- Merlot; 15- *Prokupac*; 16- Frankovka; 17- Cabernet Fran; 18- Cabernet Sauvignon; 19- Shiraz; 20- Michele Palieri; 21- Afuz-ali; 22- *Jagoda*; 23- Muskat Hamburg; 24- Drenak crveni
Italic stilom su obeležene domaće sorte

4.2.2.2.3. Sastav i sadržaj tokoferola u ulju iz semenki grožđa

Sadržaj tokoferola određen je HPLC metodom. Izolovane su i kvantifikovane tri frakcije- α -, $\beta+\gamma$ - i δ - tokoferol. Rezultati su izraženi u miligramima po kilogramu ulja i u **Tabeli 16** su prikazani kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija.

Tabela 16. Sadržaj tokoferola u uljima iz semenki grožđa (sorte za bela vina, sorte za crvena vina i stone sorte)

Sorte za bela vina	Sauvignon Blanc	Tamjanika	Rizling Rajnski	Italijanski Rizling	Smederevka	Chardonay	Bagrina crvena	Župljanka
α (mg/kg ulja)	8,53±0,36	21,77±1,53	27,03±3,84	50,57±1,66	90,97±2,69	52,47±3,37	1,53±0,04	2,41±0,02
$\beta+\gamma$	18,87±0,70	2,37±0,06	nd	0,73±0,06	31,07±1,18	9,37±1,29	0,31±0,01	0,62±0,03
δ	nd	4,33±0,12	nd	2,03±0,12	30,50±0,35	11,40±0,85	nd	nd
zbir	27,39±0,88	28,47±1,40	27,03±3,84	53,33±1,50	152,53±3,67	73,23±5,39	1,84±0,06	3,03±0,05

Sorte za crvena vina	Gamay	Vranac	Burgundac crni	Začinak	Crna Tamjanika	Merlot	Prokupac	Frankovka	Cabernet Fran	Cabernet Sauvignon	Shiraz
α (mg/kg ulja)	4,13±0,03	8,18±0,04	11,26±0,37	13,69±0,02	2,61 ±0,02	17,11±0,15	10,24±0,48	14,92±0,11	4,85±0,08	17,88±0,53	25,69±0,98
$\beta+\gamma$	1,49±0,13	6,97±0,24	10,21±0,30	6,03±0,04	1,22±0,03	5,83±0,05	1,81±0,29	8,09±0,12	2,00±0,14	9,10±0,28	19,13±1,60
δ	nd	nd	0,59±0,02	nd	nd	0,50±0,01	nd	0,58±0,00	0,37±0,02	0,78±0,01	1,36±0,09
zbir	5,62±0,10	15,15±0,28	22,05±0,64	19,72±0,02	3,84±0,05	23,44±0,11	12,05±0,18	23,59±0,02	7,22±0,24	27,75±0,27	46,19±2,68

Stone sorte	Michele Palieri	Afuz-ali	<i>Jagoda</i>	Muskat Hamburg	Drenak crveni
<i>α</i> (mg/kg ulja)	14,05±0,08	8,12±0,03	19,55±0,06	6,95±0,21	58,07±0,10
<i>β+γ</i>	1,55±0,00	3,56±0,02	9,05±0,07	1,69±0,13	21,07±0,10
<i>δ</i>	nd	nd	0,77±0,01	nd	0,80 ±0,01
zbir	15,60±0,08	11,68±0,01	29,37±0,14	8,64±0,08	79,95±0,21

nd- nije detektovano

Italic stilom su obeležene domaće sorte; sadržaj svih izomera tokoferola je izražen u istim jedinicama (mg/kg ulja)

α -tokoferol je bio najzastupljeniji u gotovo svim uzorcima (izuzetak je ulje dobijeno iz sorte Sauvignon Blanc, u kome su zabeležene najveće koncentracije β + γ -tokoferola). Dominacija α oblika u ulju iz semenki grožđa je u skladu sa literaturnim podacima. U okviru ispitivanja sastava 30 različitih ulja, α -tokoferol je bio najzastupljeniji izomer tokoferola u 12 uzoraka. β izomer je bio najprisutniji u 10 uzoraka, γ -tokoferol u 6, a δ -tokoferol u samo 2 ispitivana uzorka (Crews i sar., 2006). Najviši sadržaj u našim uljima pronađen je u sorti Smederevka (90,97 mg/kg), Drenak crveni (58,07 mg/kg), Chardonay (52,47 mg/kg) i Italijanski Rizling (50,57 mg/kg). Ulja sorti Bagrina crvena, Župljanka i Crna Tamjanika su imala znatno niži sadržaj α -tokoferola (1,53; 2,41 i 2,61 mg/kg, redom).

Sadržaj ostalih oblika vitamina E je bio manji; jedino su se ulja dobijena iz semenki sorti Smederevka, Drenak Crveni, Shiraz i Sauvignon Blanc izdvojila sa značajnijim količinama β + γ oblika. U sorti Smederevka određen je ubedljivo najveći sadržaj β + γ -tokoferola (31,07 mg/kg), dok su ostale pomenute sorte imale oko 20 mg/kg ovog oblika.

δ - tokoferol je determinisan u pojedinim uzorcima. Bele sorte vinove loze, poput Smederevke i Chardonay-a dale su ulje sa najvećim sadržajem δ -tokoferola (30,50 i 11,40 mg/kg, redom). Prema CODEX Alimentarius-u, ovaj oblik je u uljima iz semenki grožđa prisutan u tragovima, od nedetektabilnih količina, do 4 mg/kg. Brojne studije su, analogno našim rezultatima, pokazale da sadržaj ovog oblika može značajno varirati. Literaturni podaci pokazuju da je u pojedinim uzorcima ulja iz semenki grožđa prisutno do 88 mg/kg δ -tokoferola (Kamm i sar., 2001).

Sadržaj ukupnih tokoferola kretao se u širokom opsegu, od 1,84 (Bagrina crvena) do 152,53 mg po kg ulja (Smederevka). Najviše, kao i najniže vrednosti pronađene su u uljima dobijenim iz semenki sorti za bela vina.

Tokoferoli su jedinjenja veoma osetljiva na oksidaciju, samim tim, do njihove degradacije i promene u sadržaju, može doći usled različitih postupaka pripreme/čuvanja (Dionisi i sar., 1995). Pokazano je i da sam postupak ekstrakcije ulja može uticati na sadržaj tokoferola (Dimić i sar., 2020). Ipak, kada se u obzir uzme postupak izolovanja ulja i sortna varijabilnost, može se primetiti da je uticaj sorte dosta značajniji (Beveridge i sar., 2005).

Ranija istraživanja su pokazala da nema razlike u hemijskom sastavu između ulja dobijenog iz semenki stonih i semenki vinskih sorti (Baydar & Akkurt, 2001). Naši rezultati su veoma nehomogeni i u skladu su sa pretpostavkom da sorta vinove loze određuje sadržaj tokoferola u ulju. Kako su standardne devijacije u grupama podataka veoma velike, nije bilo moguće analizirati uticaj sezone, porediti domaće i internacionalne, odnosno vinske i stonih sorte grožđa.

Većina studija koje su se bavile ispitivanjem sadržaja vitamina E u ulju iz semenki, u svom fokusu su imale široko rasprostranjene internacionalne sorte vinove loze. Jednim ispitivanjem obuhvaćena su ulja dobijena iz semenki 9 sorti vinove loze gajene u Tunisu (Harbeoui i sar., 2018). Između ostalih, analizirali su i ulja internacionalnih sorti Merlot i Shiraz. Iako su količine tokoferola bile nešto više nego u našim uljima, prisutan je određen trend. Analogno našim rezultatima, semenke Shiraz sorte sadržale su više nego dvostruko veće količine tokoferola u poređenju sa Merlot sortom. Ispitivanjem sastava ulja iz semenki sorti Merlot i Cabernet Sauvignon uočen je veći sadržaj tokoferola u Cabernet Sauvignon sorti. (Wen i sar., 2016). Naši rezultati su niži, ali je primećen isti trend.

4.2.2.2.4. Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u ulju iz semenki grožđa

Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u ulju i antioksidativna aktivnost određeni su u metanolnim ekstraktima ulja (priprema ekstrakata opisana je u poglavlju 3.3.2).

Rezultati su izraženi u miligramima ekvivalenta galne kiseline po gramu ulja (mg GAE/g ulja) i prikazani su u **Tabeli 17** kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija.

Tabela 17. Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativna aktivnost ulja iz semenki grožđa (sorte za bela vina, sorte za crvena vina i stone sorte)

Sorte za bela vina	Sauvignon Blanc	Tamjanika	Rizling Rajnski	Italijanski Rizling	Smederevka	Chardonay	Bagrina crvena	Župljanka
Ukupni polifenoli (mg GAE/g ulja)	1,00±0,04	0,76±0,02	0,94±0,06	0,91±0,02	1,04±0,05	0,73±0,04	0,29±0,00	1,04±0,12
DPPH test (μmol TE/g ulja)	1,83±0,01	1,47±0,01	1,75±0,02	1,64±0,00	1,77±0,00	1,02±0,02	1,03±0,00	1,61±0,03

Sorte za crvena vina	Gamay	Vranac	Burgundac crni	Začinak	Crna Tamjanika	Merlot	Prokupac	Frankovka	Cabernet Fran	Cabernet Sauvignon	Shiraz
Ukupni polifenoli (mg GAE/g ulja)	0,29±0,01	0,96±0,03	0,32±0,05	0,27±0,05	0,28±0,02	0,63±0,07	1,05±0,04	0,88±0,01	0,92±0,02	0,99±0,05	0,87±0,01
DPPH test (μmol TE/g ulja)	0,83±0,06	1,75±0,00	1,03±0,02	0,83±0,00	1,09±0,00	1,69±0,02	1,24±0,00	1,79±0,02	1,67±0,02	2,03±0,00	1,72±0,02

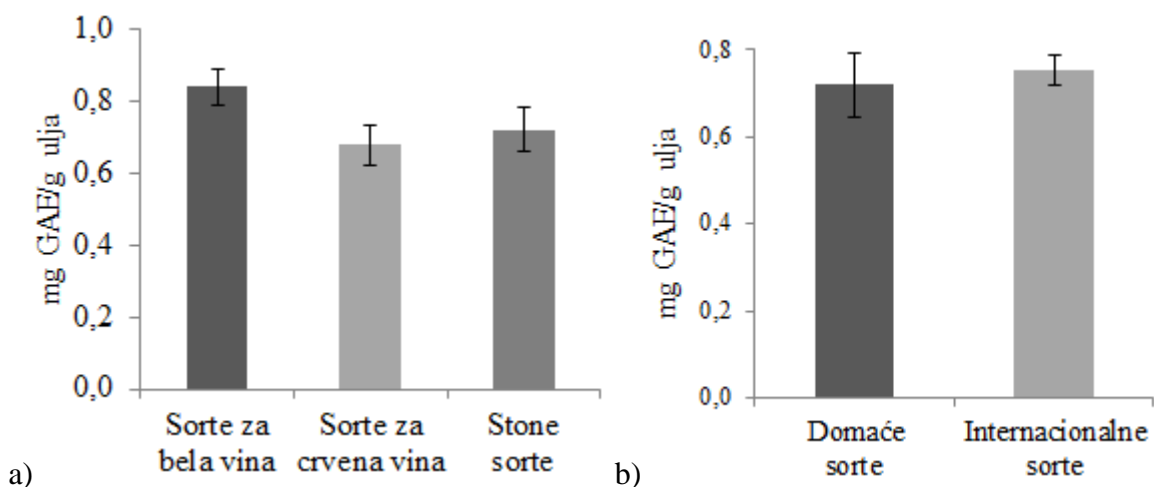
Stone sorte	Michele Palieri	Afuz-ali	Jagoda	Muskat Hamburg	Drenak crveni
Ukupni polifenoli (mg GAE/g ulja)	0,46±0,03	0,84±0,06	1,03±0,02	0,46±0,02	0,82±0,06
DPPH test (μmol TE/g ulja)	1,25±0,00	2,53±0,00	1,68±0,3	1,14±0,02	1,78±0,00

GAE- eng. *Gallic Acid Equivalents*; TE- eng. *Trolox Equivalents*; DPPH- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
Italic stilom su obeležene domaće sorte

TPC vrednosti su varirale u širokom opsegu. U okviru ulja iz semenki sorti za bela vina, Bagrina crvena je imala najniži sadržaj ukupnih polifenola (0,29 mg GAE/g), dok su ulja sa najvećim sadržajem ukupnih polifenola dobijena iz semenki sorti Smederevka i Župljanka (1,04 mg GAE/g). Bogato polifenolima bilo je i ulje sorte Sauvignon Blanc. Slične vrednosti su zabeležene u sortama za crvena vina- Začinak ulje je bilo najsiromašnije polifenolnim jedinjenjima (0,27 mg GAE/g), zatim ulja Crne Tamjanike i Gamay. U semenkama srpske autohtone sorte Prokupac određene su najveće količine polifenola (1,05 mg GAE/g). Sadržaj ukupnih polifenola u stonim sortama kretao se od 0,46 do 1,03 mg GAE/g; najveće vrednosti nađene su u ulju iz semenki domaće sorte Jagoda.

Dobijeni rezultati su uporedivi ili neznatno viši od literaturnih podataka za ulja iz semenki grožđa (Harbeoui i sar., 2018; Kapcsándi i sar., 2021; Konuskan i sar., 2019; Lutterodt i sar., 2011). Jedna od navedenih studija bavila se analizom metanolnih ekstrakata hladno ceđenih ulja dobijenih iz semenki različitih sorti; između ostalih, ispitivanjem je obuhvaćena i internacionalna sorta Chardonay (Lutterodt i sar., 2011). Iako je naš postupak izolovanja ulja podrazumevao ekstrakciju na višoj temperaturi, dobijene su veće vrednosti za istu sortu (0,73 vs 0,23 mg GAE/g ulja). Kasnije je pokazano da Soxhlet metoda ekstrakcije ulja zaista rezultuje većim prinosem polifenola u poređenju sa metodom hladnog ceđenja (Konuskan i sar., 2019). U okviru istog istraživanja analiziran je uticaj sorte varijabilnosti na TPC vrednosti i uočen je identičan poredak za tri sorte obuhvaćene ovom doktorskom disertacijom, odnosno pokazano je da je ulje sorte Cabernet Sauvignon bogatije polifenolima od Shiraz i Merlot sorti. Druga studija je ukazala na veći sadržaj polifenola u ulju iz semenki Shiraz u poređenju sa Merlot sortom, što je i kod nas bio slučaj (Harbeoui i sar., 2018). U etanolnim ekstraktima ulja zabeležena su značajna variranja između sorti u pogledu polifenolnog sadržaja (Kapcsándi i sar., 2021). Na primer, u kategoriji sorti za bela vina, Italijanski Rizling je sadržao gotovo dvostruko više polifenola od sorti Sauvignon Blanc i Rizling Rajnski. Među sortama za crvena vina, dominirala je sorta Merlot; Cabernet Fran i Burgundac crni su sadržale značajno manje polifenola. Naši rezultati su bili homogeniji, nisu primećene velike razlike između ovih sorti, jedino se ulje iz semenki Burgundac crni izdvojilo sa nižim sadržajem. Izostanak sličnosti može se objasniti upotrebom različitih rastvarača za dobijanje ekstrakata.

Na **Slici 45a** prikazane su razlike između sorti za bela vina, sorti za crvena vina i stonih sorti u pogledu sadržaja polifenolnih jedinjenja u uljima iz semenki. **Slika 45b** prikazuje razlike između domaćih i internacionalnih sorti. Statistička značajnost nije dokazana.



Slika 45. Uporedni prikaz sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja u uljima iz semenki a) vinskih i stonih sorti grožđa; b) domaćih i internacionalnih sorti

GAE- eng. Gallic Acid Equivalents

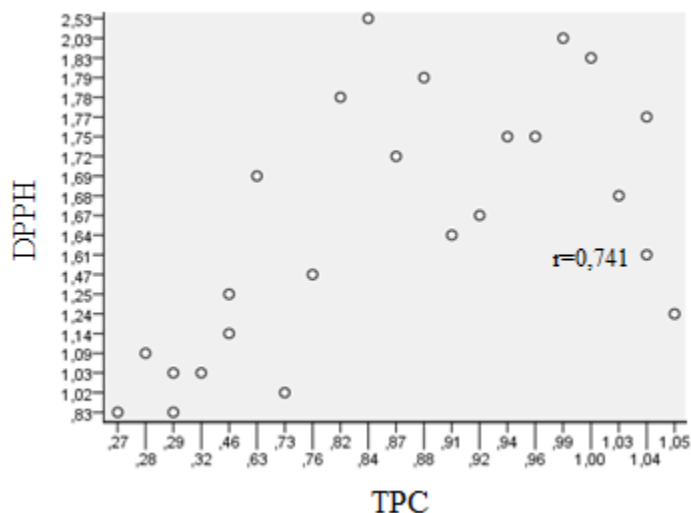
4.2.2.2.5. Antioksidativna aktivnost ulja iz semenki grožđa

Antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata ispitana je spektrofotometrijski, DPPH testom. Rezultati su izraženi u mikromolovima Trolox ekvivalentata po gramu ulja ($\mu\text{mol TE/g}$) i prikazani su u **Tabeli 17** kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija.

Biljna ulja u sebi sadrže veliki broj strukturno različitih biološki aktivnih jedinjenja, zbog čega je veoma teško proceniti koja od njih su odgovorna za antioksidativnost. Ispitivanjem antiradikalske aktivnosti velikog broja različitih ulja, tj. u metanolu rastvorljivih i nerastvorljivih frakcija ulja, pokazano je da metanolni ekstrakti kukuruznog, sojinog i maslinovog ulja imaju veći antioksidativni kapacitet od metanolnih ekstrakata ulja iz semenki grožđa (Tuberoso i sar., 2007). Uočeno je i da lipofilne frakcije imaju jaču antioksidativnu aktivnost u poređenju sa metanolnim, ali i da postoji snažna korelacija između antioksidativne aktivnosti lipofilne frakcije i tokoferola, kao i polinezasićenih masnih kiselina (Tuberoso i sar., 2007). Sa druge strane, antioksidativna aktivnost hidrofilne frakcije ulja potiče od jedinjenja rastvornih u vodi, poput fenolnih kiselina i flavonoida (Shinagawa i sar., 2017). U drugoj studiji pak nije pronađena statistički značajna korelacija između sadržaja tokoferola/karotenoida i antioksidativne aktivnosti lipofilne frakcije, kao ni između sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti hidrofilne frakcije ispitivanog ulja (Chirinos i sar., 2013). Zaključak je bio da antioksidativni kapacitet ulja potiče od individualnih, aditivnih, sinergističkih i antagonističkih efekata prisutnih jedinjenja, bez obzira na njihovu prirodu (hidrofilni ili lipofilni karakter).

Vrednosti za antioksidativnu aktivnost metanolnih ekstrakata ulja su se značajno razlikovale u zavisnosti od sorte grožđa. Gamay i Začinak su sorte sa najnižim DPPH vrednostima ($0,83 \mu\text{mol TE/g}$ ulja). Ulje dobijeno iz semenki stone sorte Afuz-ali imalo je višestruko jači antioksidativni potencijal ($2,53 \mu\text{mol TE/g}$ ulja). U kategoriji sorti za bela vina, najveću antioksidativnu aktivnost imalo je ulje sorte Sauvignon Blanc.

Antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata bila je u snažnoj pozitivnoj korelaciji sa sadržajem ukupnih polifenolnih jedinjenja ($r=0,741$; $p<0,01$) (**Slika 46**).

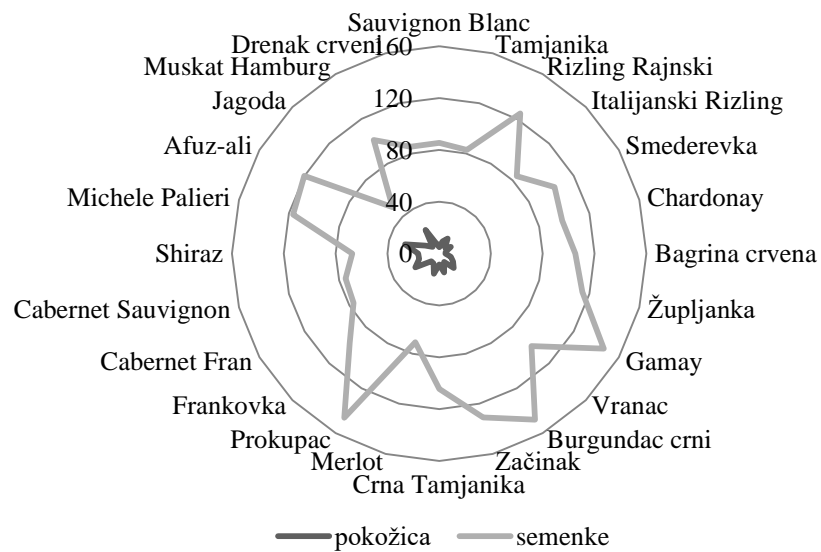


Slika 46. Korelacija između sadržaja ukupnih polifenola u uljima iz semenki grožđa i antioksidativnih aktivnosti izračunatih DPPH testom

TPC- eng. *Total Phenolic Content* (mg GAE/g ulja); GAE- eng. *Gallic Acid Equivalents*; DPPH- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil ($\mu\text{mol TE/g}$ ulja); TE- eng. *Trolox Equivalents*

4.2.4. Sortni uticaj na sadržaj polifenola u ekstraktima pokožice i semenki grožđa

Na osnovu analize sadržaja polifenolnih jedinjenja u ekstraktima pokožice i semenki može se zaključiti da su hidrofilni ekstrakti značajno bogatiji polifenolima, i da poseduju značajno veći antioksidativni potencijal od lipofilnih ekstrakata (ovi rezultati predstavljeni su u okviru poglavlja 4.2). U hidrofilnim ekstraktima semenki je koncentrisano najviše ovih biološki aktivnih jedinjenja. Polifenolni sadržaj u ekstraktima pokožice je bio sortno uslovljen; pokožice crvenih sorti imale su veći sadržaj polifenolnih jedinjenja od pokožica belih sorti, a kao rezultat toga i jaču antioksidativnu aktivnost. **Slika 47** prikazuje sorte razlike u pogledu sadržaja polifenolnih jedinjenja u hidrofilnim ekstraktima semenki i pokožice.



Slika 47. Sadržaj ukupnih polifenola u hidrofilnim ekstraktima semenki i pokožice- analiza sortnog uticaja

Sadržaj ukupnih polifenola izražen je kao mg GAE/g liofilizata za pokožicu, odnosno mg GAE/g suve materije za semenke; GAE- eng. *Gallic Acid Equivalents*

4.3. Poređenje efikasnosti organskog i eutektičkog rastvarača analizom sastava i bioloških aktivnosti hidrofилnih ekstrakata pokožice i semenki grožđa

U nastavku istraživanja urađena je detaljna fitohemijska analiza ekstrakata pokožice i semenki. Na osnovu rezultata prvog dela istraživanja, odabrane su sorte za crvena vina: Gamay, Vranac, Burgundac crni, Začinak, Crna Tamjanika, Prokupac, Frankovka i Shiraz. Prikupljanje uzoraka izvršeno je u trenutku tehnološke zrelosti (berba 2018) i sve sorte su pripadale istom Vinogradarskom regionu (Centralna Srbija). Poseban akcenat stavljen je na izbor rastvarača, stoga je treća faza istraživanja imala za cilj poređenje konvencionalnog rastvarača (acidifikovani etanol) i eutektičkog rastvarača (ChCit) u pogledu efikasnosti ekstrakcije polifenola. Ova jedinjenja su nosioci biološke aktivnosti ploda vinove loze, budući da je dokazano da poseduju antioksidativna, antiinflamatorna, antikancerogena, antimikrobna, antivirusna, kardioprotektivna, neuroprotektivna i hepatoprotektivna svojstva (Georgiev i sar., 2014). U okviru četvrte faze izvršena je komparacija bioloških aktivnosti konvencionalnih i eutektičkih ekstrakata.

Kada govorimo o izboru rastvarača, etanol se smatra veoma pogodnim za ultrazvučnu ekstrakciju polifenola iz grožđa (Drosou i sar., 2015). Poslednjih godina, usled povećane težnje za zamenom organskih rastvarača, pojavljuju se različita alternativna rešenja. Brojne studije su pokazale da NADES imaju veliki potencijal za izolovanje polifenolnih jedinjenja. NADES koji u sebi sadrži holin hlorid i organsku kiselinu smatra se veoma perspektivnim za ekstrakciju katehina (Alrugaibah i sar., 2021), i antocijana (Radošević i sar., 2016). Pokazano je da rastvarač holin hlorid:limunska kiselina u molarnom odnosu 2:1 i sa dodatkom 30% vode predstavlja efikasan izbor za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz komine grožđa (Panić, Radić Stojković, i sar., 2019).

Postupak ekstrakcije polifenola iz liofilizovanih pokožica i osušenih semenki izvršen je u ultrazvučnom kupatilu, uz uslove definisane procesom optimizacije (poglavlje 4.1.).

4.3.1. Evaluacija biotoksičnosti eutektičkih rastvarača

Eutektički rastvarači se sastoje od prirodnih jedinjenja, poseduju visok bezbedonosni profil, što potencijalno smanjuje potrebu za nepotrebnim koracima prečišćavanja. Međutim, još uvek je mali broj radova koji govore u prilog tome da su NADES potpuno bezbedni za ljudsko zdravlje i za životnu sredinu.

Jedna studija koja se bavila evaluacijom toksičnosti NADES-a koristeći CCO riblju ćelijsku liniju i MCF-7 adenokarcinom dojke, pokazala je da rastvarači na bazi holin hlorida generalno nisu toksični (izuzetak je NADES sa oksalnom kiselinom koji je ispoljio umerenu toksičnost) (Radošević i sar., 2015). U okviru ovog istraživanja, ispitivana je toksičnost pojedinačnih konstituenata i jedino je oksalna kiselina dovela do smanjene vijabilnosti testiranih ćelija. Ovakav nalaz objašnjen je formiranjem kristala kalcijum oksalata unutar ćelija što je imalo štetan efekat kako za normalne, tako i za maligne ćelije. Takođe je istaknuto da toksičnost NADES-a može poticati od organskih kiselina (u ovoj studiji ispitivan je NADES sa malonskom kiselinom) (Hayyan i sar., 2016). Kasnije je ispitivana citotoksičnost 5 različitih NADES-a na bazi holin hlorida prema dve kancerske ćelijske linije (HeLa i MCF-7) i pokazana je veoma niska citotoksičnost, s obzirom da su EC50 vrednosti bile iznad 2000 mg/L. Toksičnost nije pokazana ni za NADES sa organskom kiselinom (u okviru ovog istraživanja ispitivan je NADES sa holin hloridom i jabučnom kiselinom) (Radošević i sar., 2016). Isti istraživači su nekoliko godina kasnije sproveli najkompleksniju analizu citotoksičnog, antimikrobnog i

antioksidativnog delovanja prirodnih eutektičkih rastvarača. Citotoksičnost je ispitivana na dve maligne (HeLa i MCF 7) i jednoj normalnoj ćelijskoj liniji (HEK293T). Eutektički rastvarači na bazi holin hlorida sa oksalnom kiselinom, odnosno sa ureom su pokazali izvesnu toksičnost. U prvom slučaju, citotoksičnost je objašnjena stvaranjem oksalata, dok se smatra da je urea zbog izrazito visoke pH vrednosti smanjila vijabilnost malignih ćelija (Radošević i sar., 2018).

Kasnije je pokazano da toksičnost prirodnih eutektičkih rastvarača zavisi od njihove koncentracije, i da pri većim koncentracijama utiču na rast ćelija. Jedno istraživanje je u fokusu imalo uticaj ChCit ekstrakata komine grožđa, samog rastvarača, kao i njegovih konstituenata na vijabilnost HeLa i MCF-7 ćelija, pri čemu je analiziran efekat veoma visokih koncentracija. Citotoksični efekat je ispoljen na svim ćelijama, a objašnjava se niskim pH vrednostima rastvarača usled prisustva limunske kiseline (Panić, Radić Stojković, i sar., 2019). Najnovija studija obuhvatila je 12 različitih NADES rastvarača na bazi holin hlorida (Popović i sar., 2023). Između ostalih, analiziran je holin hlorid sa limunskom kiselinom (molarni odnos 1:1 i 20% vode), odnosno uticaj ovog rastvarača na preživljavanje normalnih (MRC-5) i malignih ćelija (adenokarcinom dojke i adenokarcinomi kolona). ChCit rastvarač je uticao na rast normalnih, kao i na rast tumorskih ćelija, ali su ispitivane koncentracije bile veoma visoke, analogno prethodno pomenutoj studiji. Jednim istraživanjem je utvrđeno da NADES na bazi holin hlorida sa limunskom kiselinom (molarni odnos 2:1) nema inhibični efekat na rast ispitivanih ćelija (normalna ćelija HEK-293T i maligne ćelije HeLa i MCF-7), ni pri najvećoj koncentraciji (2000 mg/L) (Panić, Radošević, i sar., 2019).

Na osnovu navedenog, može se zaključiti da su prirodni eutektički rastvarači relativno bezbedni, ali da mogu posedovati umerenu toksičnost, u zavisnosti od komponenata koje ih čine, njihovog molarnog odnosa i sadržaja vode. Generalno, rastvarači koji u sebi sadrže kiselinu, a koji su prepoznati kao najefikasniji jer imaju veliki afinitet prema polifenolnim jedinjenjima, mogu ispoljiti blagu do umerenu citotoksičnost na određenim ćelijskim linijama i pri nižim koncentracijama.

Za potrebe našeg ispitivanja, etanolni ekstrakti su uparavani do suva, a zatim rekonstituisani u medijumu. Zbog nemogućnosti uparavanja, ChCit ekstrakti su razblaživani do unapred definisanih koncentracija, pa je bilo neophodno ispitati da li sam rastvarač ima određeni efekat na ćelije. Ovakav pristup preporučen je od strane Evropske hemijske agencije koja se bavi implementacijom REACH regulacije (eng. *Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of CHemicals*- registracija, evaluacija, autorizacija i restrikcija hemikalija), a koja je neophodna pri promovisanju novih supstanci kako bi se utvrdila netoksičnost i izbegla nepotrebna upotreba laboratorijskih životinja (Petry i sar., 2006). Pored toga, na ovaj način testirana je hipoteza da potencijalne interakcije između ekstrahovanih komponenti i rastvarača mogu ishodovati promenama u toksikološkom profilu.

Ispitivanje toksičnosti rastvarača vršeno je na dve humane maligne ćelijske linije, HeLa (adenokarcinom cerviksa) i LS 174T (adenokarcinom kolona), i na jednoj normalnoj ćelijskoj liniji MRC-5 (fibroblasti pluća). HeLa su prve izolovane humane maligne ćelije. Njihova izolacija izvršena je pre više od 70 godina i od tada HeLa ćelije predstavljaju osnovu gotovo svih istraživanja kancera (Masters, 2002). Ćelije LS 174T (adenokarcinom kolona) su znatno manje ispitivane; u literaturi nema podataka o potencijalnom efektu grožđa na vijabilnost ovih ćelija. MRC-5 ćelije su izabrane kao referentne zdrave ćelije, kako bi se ispitala selektivnost uzoraka.

Naše istraživanje je pokazalo da rastvarač ChCit ima citotoksični efekat na ćelije fibroblasta pluća, jer je inhibicija preživljavanja 50% ćelija postignuta pri koncentraciji od 278,4 µg/ml. Citotoksičnost ChCit prema malignim ćelijama (HeLa i LS 174T) u okviru ispitivanih koncentracija nije ispoljena. Dobijeni rezultat bi se mogao objasniti prirodom malignih ćelija, tj. njihovom većom otpornošću, ubrzanim metabolizmom i visokim stepenom proliferacije.

4.3.2. Hemijski sastav ekstrakata pokožice grožđa

4.3.2.1. Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antocijana u ekstraktima pokožice grožđa

Ekstrakti pokožice pripremljeni su korišćenjem dva rastvarača, acidifikovanog etanola i ChCit, kako bi se izvršilo poređenje njihove efikasnosti. Sadržaji ukupnih polifenola, flavonoida i antocijana određeni u ekstraktima pokožice grožđa prikazani su u **Tabeli 18**.

Tabela 18. Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i antocijana u etanolnim i ChCit ekstraktima pokožice grožđa

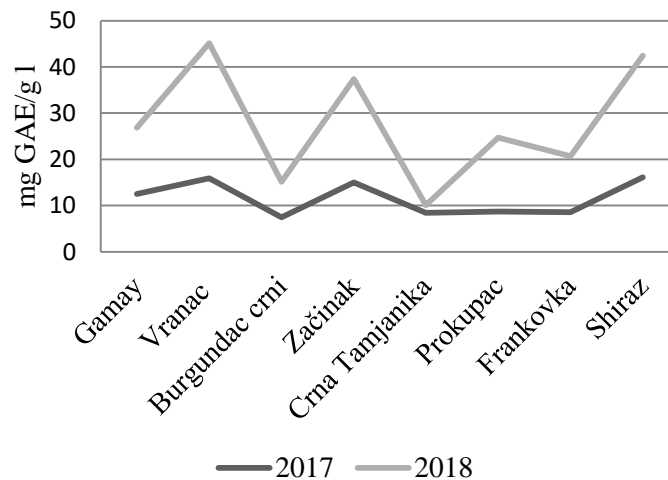
	Ukupni polifenoli (mg GAE/g l)		Ukupni flavonoidi (mg EE/g l)		Ukupni antocijani (mg Mal3GE/g l)	
	EtOH	ChCit	EtOH	ChCit	EtOH	ChCit
Gamay	26,83±0,73	31,83±0,34	37,17±1,77	69,67±1,77	5,73±0,03	7,39±0,02
Vranac	45,10±0,24	52,17±0,49	60,92±2,50	92,58±3,82	4,56±0,09	8,74±0,14
Burgundac crni	15,16±0,87	32,06±1,74	37,17±1,77	65,92±2,50	1,45±0,03	2,73±0,03
Zaćinak	37,34±0,91	53,55±2,95	58,42±3,54	79,67±1,77	3,58±0,04	7,58±0,08
Crna Tamjanika	10,10±0,60	17,69±0,34	35,92±0,00	45,92±2,50	0,78±0,01	3,11±0,04
Prokupac	24,70±0,20	40,10±0,98	50,92±0,00	76,75±6,29	1,25±0,03	1,63±0,01
Frankovka	20,68±1,05	36,08±0,20	43,92±0,00	61,75±3,82	3,79±0,09	5,03±0,14
Shiraz	42,40±0,87	62,34±0,24	68,42±0,00	90,08±6,29	4,58±0,07	8,90±0,05

EtOH- acidifikovani etanol; ChCit- eng. *choline chloride: citric acid*; GAE- eng. *Gallic Acid Equivalents*; l- liofilizat; EE- eng. *Epicatechin Equivalents*; Mal3GE- eng. *Malvidin 3-O-Glucoside Equivalents*
Italic stilom su obeležene domaće sorte

Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima pokožica je značajno varirao i kretao se od 10,10 mg GAE/g liofilizata (Crna Tamjanika) do 45,10 mg GAE/g liofilizata (Vranac). Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima za ekstrakte dobijene korišćenjem istog rastvarača (Radulescu i sar., 2020). Korišćenjem metanola dobijene su niže TPC vrednosti za pokožice crvenih sorti; od 7,21 do 12,32 mg GAE/g (Pantelić i sar., 2016). ChCit rastvarač pokazao se efikasnijim za ekstrakciju polifenola iz pokožice; dobijene su veće TPC vrednosti. Crna Tamjanika je i upotrebom zelenog rastvarača sadržala najmanje količine polifenolnih jedinjenja (17,69 mg GAE/g liofilizata), dok je ChCit ekstrakt Shiraz pokožice bio ubedljivo najbogatiji polifenolima (62,34 mg GAE/g liofilizata). Pored Shiraz sorte, visoke TPC vrednosti određene su za pokožice sorti Zaćinak i Vranac.

Posmatranjem rezultata za iste sorte iz prvog dela istraživanja može se primetiti da je pokožica svih sorti iz 2018. bogatija polifenolnim jedinjenjima, i to 2-3 puta (izuzetak je jedino Crna Tamjanika kod koje su 2018. godine utvrđene neznatno veće vrednosti). Ovaj fenomen može se objasniti klimatskim uslovima, odnosno činjenicom da je 2018. godina prema podacima Republičkog Hidrometeorološkog zavoda Srbije okarakterisana kao toplija i sa više sunčanih dana. Kako je pokožica ploda vinove loze posebno bogata flavonolima, poput kvercetina, kaempferola, izoramnetina i miricetina, i kako je njihova uloga zaštita biljaka od svetlosti i UV zračenja, pretpostavlja se da je došlo do povećane sinteze

ovih jedinjenja. Sortni uticaj je evidentan, budući da su se u obe godine istakle sorte Vranac, Shiraz i Začinak (Slika 48).



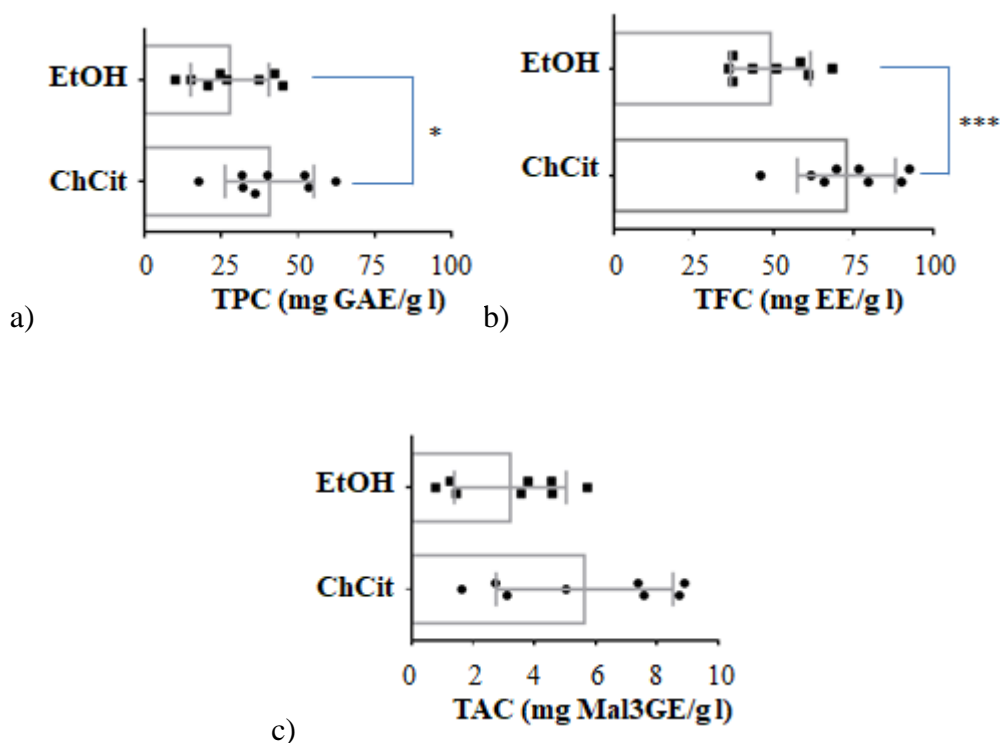
Slika 48. Uporedni prikaz sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima pokožice grožđa prikupljenim u dve uzastopne godine
GAE- eng. *Gallic Acid Equivalents*; l- liofilizat

Sadržaj ukupnih flavonoida kretao se od 35,92 do 68,42 mg EE/g liofilizata za etanolne ekstrakte, odnosno od 45,92 do 92,58 mg EE/g liofilizata za ChCit ekstrakte. Među etanolnim ekstraktima, pokožica sorte Shiraz imala je najveći sadržaj flavonoida (68,42 mg EE/g liofilizata), zatim pokožica sorte Vranac (60,92 mg EE/g liofilizata). ChCit rastvarač se pokazao efikasnijim u ekstrakciji flavonoida; sve TFC vrednosti sem one za pokožicu Crne Tamjanike su bile više od 60 mg EE/g liofilizata. Ekstrakti ChCit pokožice Shiraz sorte sadržali su najviše flavonoida- 92,58 mg EE/g liofilizata.

Sadržaj ukupnih antocijana, pigmenta karakterističnih za crvene sorte grožđa, varirao je u širokom opsegu. Upotrebom etanola, najmanje antocijana ekstrahovano je iz pokožice sorte Crna Tamjanika, zatim Prokupac i Burgundac crni (0,78; 1,25 i 1,45 mg Mal3GE/g liofilizata, redom). Najveća TAC vrednost dobijena je za Gamay pokožicu (5,73 mg Mal3GE/g liofilizata). ChCit rastvaračem dobijen je različit poredak: najmanje antocijana imala pokožica Prokupac sorte, koju slede Burgundac crni i Crna Tamjanika, dok je najviše antocijana ekstrahovano iz pokožica sorti Shiraz i Vranac (8,90 i 8,74 mg Mal3GE/g liofilizata, redom). Dobijene vrednosti su niže od literaturnih, što se potencijalno može objasniti činjenicom da su autori navedene studije koristili rastvarač izuzetno niske pH vrednosti čime se potencira ekstrakcija antocijana (Iacopini i sar., 2008).

Statistička obrada podataka pokazala je da su TPC vrednosti u veoma visokoj korelaciji sa TFC vrednostima ($r = 0,902$ i $0,919$, $p < 0,01$), za etanolne i ChCit ekstrakte, redom.

Razlike u efikasnosti ekstrakcije polifenolnih jedinjenja između rastvarača prikazane su na **Slici 49**.



Slika 49. Sadržaj a) ukupnih polifenola; b) flavonoida i c) antocijana u ekstraktima pokožice grožđa prikazani kao srednja vrednost ($n=8$) \pm SD

EtOH- acidifikovani etanol; ChCit- eng. *choline chloride: citric acid*; TPC- eng. *Total Phenolic Content*; TFC- eng. *Total Flavonoid Content*; TAC- eng. *Total Anthocyanin Content*; GAE- eng. *Gallic Acid Equivalents*; EE- eng. *Epicatechin Equivalents*; Mal3GE- eng. *Malvidin 3-Glucoside Equivalents*; l- liofilizat

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Studentov t-test je pokazao da su ChCit ekstrakti statistički značajno bogatiji polifenolnim jedinjenjima od etanolnih ekstrakata ($p < 0,05$ za TPC, odnosno $p < 0,001$ za TFC). ChCit je efikasnije ekstrahovao i antocijane (srednja vrednost TAC bila je 5,64 Mal3GE/g liofilizata za ChCit ekstrakte, odnosno 3,22 Mal3GE/g liofilizata za etanolne), ali je u slučaju TAC statistička značajnost izostala usled visokih standardnih devijacija. Pretpostavlja se da je niska pH vrednost ChCit uslovlila veću stabilnost antocijana, samim tim i veću efikasnost ovog rastvarača u ekstrakciji polifenolnih jedinjenja iz pokožice grožđa.

4.3.2.2. Sastav i sadržaj organskih kiselina i najznačajnijih polifenolnih jedinjenja u ekstraktima pokožice grožđa

Sastav i sadržaj biološki aktivnih sastojaka u etanolnim i ChCit ekstraktima pokožice određen HPLC-MS/MS analizom prikazan je u **Tabeli 19**. Identifikovano je ukupno 12 jedinjenja. Primećene razlike između sorti u sastavu biološki aktivnih jedinjenja potiču kako od genotipskih, tako i od fenotipskih karakteristika. Značajnu ulogu imaju i klimatski uslovi, sezonske varijacije vremena, stanje zemljišta i način uzgajanja (Beslic i sar., 2015; Cheng i sar., 2015).

Među kvantifikovanim organskim kiselinama, jabučna kiselina je bila najzastupljenija i njen sadržaj kretao se od 0,151 do 0,735 mg/g liofilizata za etanolne ekstrakte, odnosno od 0,022 do 0,594 mg/g liofilizata u slučaju ChCit ekstrakata. Vinska kiselina je bila prisutnija jedino u ChCit ekstraktima pokožice Gamay, Začinak i Shiraz sorti, kao i u etanolnim ekstraktima Crne Tamjanike i Shiraza.

Generalno, najveće količine organskih kiselina izolovane su iz pokožice sorte Shiraz, upotrebom etanola. Crna Tamjanika je takođe sadržala značajne količine ovih jedinjenja, bez obzira na upotrebljeni rastvarač. ChCit je bio efikasniji u ekstrakciji jabučne kiseline u nekim sortama, poput Burgundac crni i Frankovka. Galna kiselina je kvantifikovana u niskim koncentracijama u svim uzorcima. Najveći sadržaj galne kiseline određen je u etanolnim ekstraktima Prokupac pokožice (0,021 mg/g liofilizata), zatim etanolnim, odnosno ChCit ekstraktima pokožice sorti Shiraz i Crna Tamjanika (0,018 mg/g liofilizata). Protokatehnična kiselina je pronađena u tragovima (u nekim sortama je njena koncentracija bila ispod limita kvantifikacije, bez obzira na upotrebljeni rastvarač).

Flavan-3-oli su jedinjenja karakteristična za semenke grožđa, dok ih u pokožici ima znatno manje. Derivati galne kiseline su detektovani u pokožici sorti Vranac, Crna Tamjanika i Shiraz. (+)-Katehin i (-)-epikatehin su detektovani u svim sortama, ali je njihova koncentracija bila ispod limita kvantifikacije (izuzev (+)-katehina u slučaju etanolnog ekstrakta Vranac pokožice- 0,007 mg/g liofilizata). Dimeri katehina su detektovani u svim sortama. Njihove koncentracije kretale su se od 0,005 do 0,041 mg/g liofilizata za procijanidin B1 i od 0,007 do 0,065 mg/g liofilizata za procijanidin B2. Pokožica sorte Burgundac crni sadržala je najmanje ovih jedinjenja. U ChCit ekstraktima sorte Začinak i u etanolnim ekstraktima sorte Vranac kvantifikovane su najviše koncentracije (+)-katehina (ukupno 0,106 i 0,093 mg/g liofilizata, redom).

Pokožica u sebi sadrži i flavonole, polifenolna jedinjenja koja su zadužena za zaštitu biljaka i čija sinteza zavisi od velikog broja faktora. Kvantifikacija ovih jedinjenja, odnosno kvercetina i njegovog glikozida rutina, izvršena je metodom opisanom u okviru poglavlja 3.5.1., korišćenjem standarda poznate koncentracije. Kvercetin je bio zastupljeniji u skoro svim uzorcima (izuzetak su etanolni ekstrakti sorti Burgundac crni, Začinak i Prokupac u kojima je dominirao rutin) i njegova koncentracija kretala se u opsegu od 0,0001 do 0,0103 mg/g liofilizata. Jedna studija je, suprotno, pokazala da se u pokožici crvenog grožđa nalazi više glikozida (Novak i sar., 2008). ChCit ekstrakti pokožica sorti Crna Tamjanika i Frankovka su se izdvojili sa najvećim sadržajem flavonola.

Generalno, kada poredimo dva rastvarača, HPLC analiza ekstrakata dala je kontradiktorne rezultate, odnosno nije bilo moguće uočiti određene pravilnosti. Postojao je izvesni trend; etanol je najčešće potencirao ekstrakciju organskih kiselina, dok su upotrebom ChCit uglavnom dobijeni ekstrakti bogatiji flavonolima.

Tabela 19. Sadržaj organskih kiselina i najznačajnijih polifenolnih jedinjenja u etanolnim i ChCit ekstraktima pokožice grožđa

		Vinska kiselina	Jabučna kiselina	Galna kiselina	Protokatehnična kiselina	Galokatehin	Epigalokatehin	(+)- Katehin	(-)- Epikatehin	Procijanidin B1	Procijanidin B2	Rutin	Kvercetin
Gamay	EtOH	0,098	0,151	0,003	nd	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	<LoQ	0,0005
	ChCit	0,118	0,075	0,006	0,0003	nd	nd	<LoQ	<LoQ	0,005	0,037	0,0001	0,0008
Vranac	EtOH	0,183	0,251	0,014	0,001	nd	0,003	0,007	<LoQ	0,040	0,043	0,0016	0,0069
	ChCit	0,070	0,092	0,007	0,0003	nd	nd	<LoQ	<LoQ	0,010	0,007	0,0008	0,0020
Burgundac crni	EtOH	0,055	0,400	0,006	<LoQ	nd	nd	<LoQ	<LoQ	0,005	nd	0,0003	0,0001
	ChCit	0,018	0,594	0,004	nd	nd	nd	nd	<LoQ	Nd	<LoQ	0,0015	0,0039
Začinak	EtOH	0,211	0,441	0,011	0,0002	nd	nd	<LoQ	nd	0,009	nd	0,0030	0,0008
	ChCit	0,167	0,124	0,005	0,001	nd	nd	<LoQ	<LoQ	0,041	0,065	0,0019	0,0091
Crna Tamjanika	EtOH	0,776	0,620	0,008	<LoQ	0,003	nd	<LoQ	<LoQ	0,017	0,037	0,0002	0,0003
	ChCit	0,045	0,403	0,018	0,001	nd	nd	<LoQ	<LoQ	0,024	0,046	0,0018	0,0088
Prokupac	EtOH	0,167	0,735	0,021	<LoQ	nd	nd	<LoQ	<LoQ	0,021	nd	0,0008	0,0004
	ChCit	0,072	0,022	0,001	<LoQ	nd	nd	<LoQ	<LoQ	<LoQ	nd	nd	0,0001
Frankovka	EtOH	0,182	0,271	0,007	<LoQ	nd	nd	<LoQ	<LoQ	0,010	0,028	<LoQ	0,0001
	ChCit	0,047	0,359	0,008	0,001	nd	nd	<LoQ	nd	0,023	nd	0,0003	0,0103
Shiraz	EtOH	1,962	0,365	0,018	<LoQ	nd	0,003	<LoQ	<LoQ	0,020	0,021	0,0002	0,0010
	ChCit	0,115	0,100	0,001	<LoQ	0,003	nd	<LoQ	nd	<LoQ	nd	<LoQ	0,0001

Rezultati su izraženi u mg/g liofilizata i predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja. Standardna devijacija je u svim uzorcima bila manja od 5%. EtOH- acidifikovani etanol; ChCit- eng. *choline chloride: citric acid*; LoQ- eng. *Limit of Quantification*, limit kvantifikacije; nd- nije detektovano *Italic* stilom su obeležene domaće sorte

4.3.2.3. Sastav i sadržaj antocijana u ekstraktima pokožice grožđa

Antocijani, pigmenti polifenolne strukture, su definitivno jedinjenja koja izdvajaju pokožicu crvenih sorti u pogledu fitohemijskog sastava i posledično biopotencijala. Ova jedinjenja kvantifikovana su korišćenjem HPLC-UV/DAD sistema; rezultati su izraženi u miligramima malvidin 3-O-monoglukozid ekvivalenata po gramu liofilizata (mg Mal3GE/g) (**Tabela 20**).

Tabela 20. Sadržaj antocijana u etanolnim i ChCit ekstraktima pokožice grožđa

		Delfinidin 3-O-glukozid	Petunidin 3-O-glukozid	Peonidin 3-O-glukozid	Malvidin 3-O-glukozid	Zbir
Gamay	EtOH	nd	0,077	0,069	0,744	0,890
	ChCit	0,107	0,065	0,063	1,296	1,530
Vranac	EtOH	nd	nd	0,213	1,860	2,073
	ChCit	0,188	0,213	0,096	1,188	1,685
Burgundac crni	EtOH	nd	nd	nd	0,240	0,240
	ChCit	0,021	0,020	0,017	0,126	0,183
Začinak	EtOH	nd	nd	0,284	1,728	2,012
	ChCit	0,092	0,342	0,179	2,256	2,868
Crna Tamjanika	EtOH	nd	nd	nd	0,168	0,168
	ChCit	0,020	0,023	0,021	0,480	0,543
Prokupac	EtOH	nd	0,084	nd	0,456	0,540
	ChCit	0,020	0,020	0,069	0,420	0,528
Frankovka	EtOH	nd	0,096	0,152	0,750	0,998
	ChCit	0,042	0,051	0,111	1,008	1,212
Shiraz	EtOH	nd	nd	0,410	2,376	2,786
	ChCit	0,125	0,356	0,209	3,522	4,211

Rezultati su izraženi u miligramima malvidin 3-O-monoglukozid ekvivalenata po gramu liofilizata i predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja. Standardna devijacija je u svim uzorcima bila manja od 5%.

EtOH- acidifikovani etanol; ChCit- eng. *choline chloride: citric acid*; LoQ- eng. *Limit of Quantification*, limit kvantifikacije; nd- nije detektovano

Italic stilom su obeležene domaće sorte

Ukupno je identifikovano četiri različita jedinjenja. Očekivano, malvidin 3-O-glukozid je bio najzastupljeniji u svim uzorcima. Njegova koncentracija kretala se u opsegu od 0,168 do 2,376 za etanolne ekstrakte, odnosno od 0,126 do 3,522 mg Mal3GE/g liofilizata za ChCit ekstrakte. Najmanje količine ovog jedinjenja sadržale su pokožice sorti Burgundac crni, Crna Tamjanika i Prokupac, bez obzira na upotrebljeni rastvarač. Sa najvećim sadržajem malvidin 3-O-glukozida izdvojila se Shiraz sorta (2,376 i 3,522 mg Mal3GE/g liofilizata, etanolni i ChCit ekstrakti, redom). Ranija studija, koja se bavila ispitivanjem sadržaja antocijana u pokožici različitih sorti grožđa, dala je neznatno veće

rezultate: sadržaj malvidin 3-O-glukozida kretao se od 0,62 do 6,09 mg malvidin 3-O-glukozida/g pokožice, u zavisnosti od ispitivane sorte (Costa i sar., 2014). Slične vrednosti dobijene su u okviru drugog istraživanja, uz zabeležene male razlike između sorti (Ortega-Regules i sar., 2006). Suprotno, jedan literaturni navod ističe postojanje značajnih variranja, kako u sadržaju malvidin monoglukozida (od 47,3 do 1202 mg/kg), tako i u slučaju drugih antocijana (Kallithraka i sar., 1995). Ovakav rezultat objašnjen je činjenicom da na sadržaj i sastav antocijana utiče veliki broj faktora, pre svega sortna varijabilnost, klimatski uslovi i stepen zrelosti ploda.

Pored malvidin 3-O-glukozida, pronađene su značajnije količine petunidin 3-O-glukozida i peonidin 3-O-glukozida. Sadržaji ovih jedinjenja varirali su u širokom opsegu, pri čemu nisu uočene pravilnosti u njihovoj distribuciji. Pokožica Gamay sorte sadržala je više petunidin 3-O-glukozida, dok je pokožica Frankovke bila bogatija peonidin 3-O-glukozidom, bez obzira na upotrebljeni rastvarač. Kod ostalih sorti rastvarač je značajnije uticao na distribuciju ovih jedinjenja, odnosno primećeno je da je ChCit potencirao ekstrakciju petunidin 3-O-glukozida, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Panić, Radić Stojković, i sar., 2019).

Delfinidin 3-O-glukozid je bio zastupljen u najmanjoj količini i detektovan je jedino u ChCit ekstraktima. Najveće koncentracije pronađene su u pokožicama sorti Vranac i Shiraz; redom, 0,188 i 0,125 mg/g liofilizata delfinidin 3-O-glukozida izraženog kao Mal3GE, redom.

HPLC analiza sastava antocijana je pokazala da je ChCit efikasnije izolovao ovu grupu jedinjenja, sa izuzetkom par sorti. Utvrđeno je i da su pokožice sorti Vranac, Začinak i Shiraz najbogatije antocijanima.

Generalno, ChCit predstavlja odličnu alternativu konvencionalnim rastvaračima, budući da je pokazao veću efikasnost u ekstrakciji polifenolnih jedinjenja iz pokožice grožđa u poređenju sa acidifikovanim etanolom. Korišćenjem ChCit dobijeni su ekološki prihvatljiviji ekstrakti izuzetno bogati antocijanima koji su jedni od najzastupljenijih biološki aktivnih jedinjenja u crvenim sortama vinove loze.

Potrebno je naglasiti da se osim kvantifikovanih jedinjenja, u pokožici nalaze i druga jedinjenja polifenolne, ali i nefenolne strukture, i da je jedno od ograničenja ove doktorske disertacije nepotpuno profilisanje hemijskog sastava pokožice.

4.3.3. Biološke aktivnosti ekstrakata pokožice grožđa

Ekstrakti pokožice čiji je hemijski sastav analiziran u okviru poglavlja 4.3.2. ispitani su u pogledu bioloških aktivnosti. Antioksidativna aktivnost je ispitana korišćenjem 4 *in vitro* testa, citotoksičnost je evaluirana korišćenjem tri vrste ćelijskih linija, dok je mikrodiluciona metoda upotrebljena za analizu antimikrobnog potencijala.

4.3.3.1. Antioksidativna aktivnost ekstrakata pokožice grožđa

Antioksidativna aktivnost etanolnih i ChCit ekstrakata pokožice procenjivana je korišćenjem četiri metode (DPPH, FRAP, TEAC i CUPRAC) s obzirom da svaka od njih pokriva različite segmente antioksidativnog delovanja (**Tabela 21**).

Dobijene vrednosti kretale su se u širokom opsegu, od 0,08 (Crna Tamjanika, etanol) do 1,14 mM TE/g liofilizata pokožice (Shiraz, ChCit).

Tabela 21. Antioksidativna aktivnost etanolnih i ChCit ekstrakata pokožice grožđa

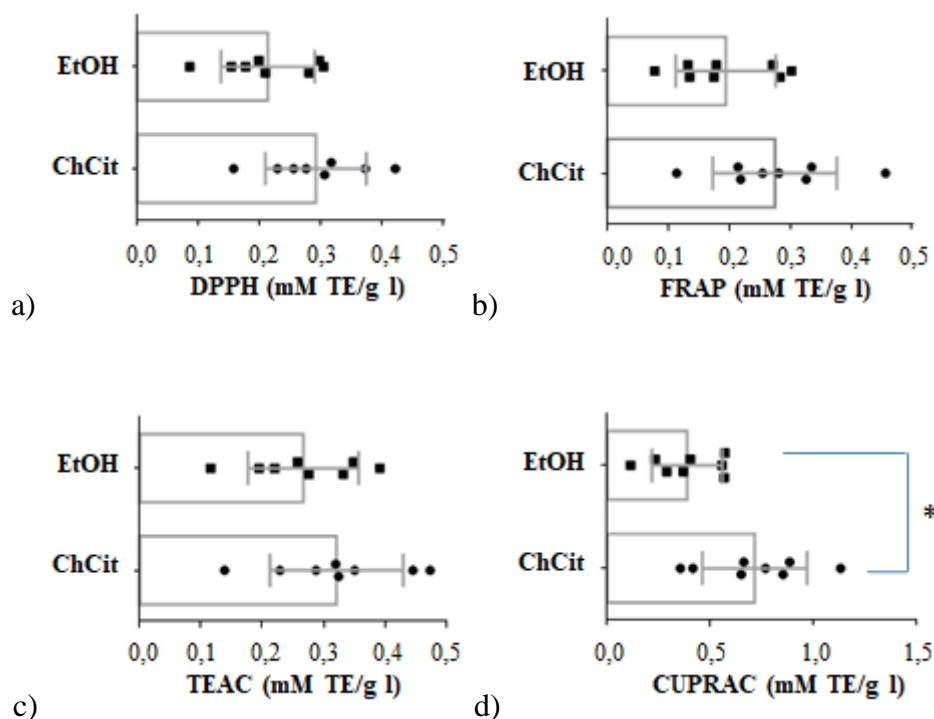
	DPPH		FRAP		TEAC		CUPRAC	
	EtOH	ChCit	EtOH	ChCit	EtOH	ChCit	EtOH	ChCit
Gamay	0,20±0,02	0,23±0,01	0,18±0,00	0,21±0,00	0,28±0,00	0,29±0,00	0,40±0,07	0,42±0,01
Vranac	0,30±0,00	0,37±0,07	0,28±0,00	0,34±0,01	0,39±0,00	0,45±0,00	0,56±0,08	0,89±0,02
Burgundac crni	0,15±0,02	0,26±0,07	0,13±0,00	0,22±0,00	0,20±0,00	0,23±0,00	0,23±0,01	0,66±0,02
Začinak	0,28±0,03	0,32±0,00	0,30±0,00	0,33±0,00	0,33±0,00	0,35±0,00	0,57±0,02	0,86±0,05
Crna Tamjanika	0,09±0,01	0,16±0,01	0,08±0,00	0,11±0,00	0,12±0,00	0,14±0,00	0,11±0,01	0,36±0,00
Prokupac	0,21±0,01	0,31±0,01	0,18±0,00	0,28±0,00	0,26±0,00	0,32±0,00	0,37±0,01	0,77±0,02
Frankovka	0,18±0,01	0,28±0,02	0,14±0,00	0,26±0,00	0,22±0,00	0,32±0,00	0,29±0,02	0,65±0,01
Shiraz	0,30±0,01	0,42±0,04	0,27±0,00	0,46±0,01	0,35±0,00	0,47±0,00	0,57±0,00	1,14±0,04

Svi rezultati izraženi su u mM TE/g liofilizata, kao srednja vrednost (n=3) ± SD

EtOH- acidifikovani etanol; ChCit- eng. *choline chloride: citric acid*; TE- eng. *Trolox equivalents*; SD- standardna devijacija; DPPH- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; FRAP- eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*; TEAC- eng. *Trolox Equivalents Antioxidant Capacity*; CUPRAC- eng. *Cupric Reducing Antioxidant Capacity*

Italic stilom su obeležene domaće sorte

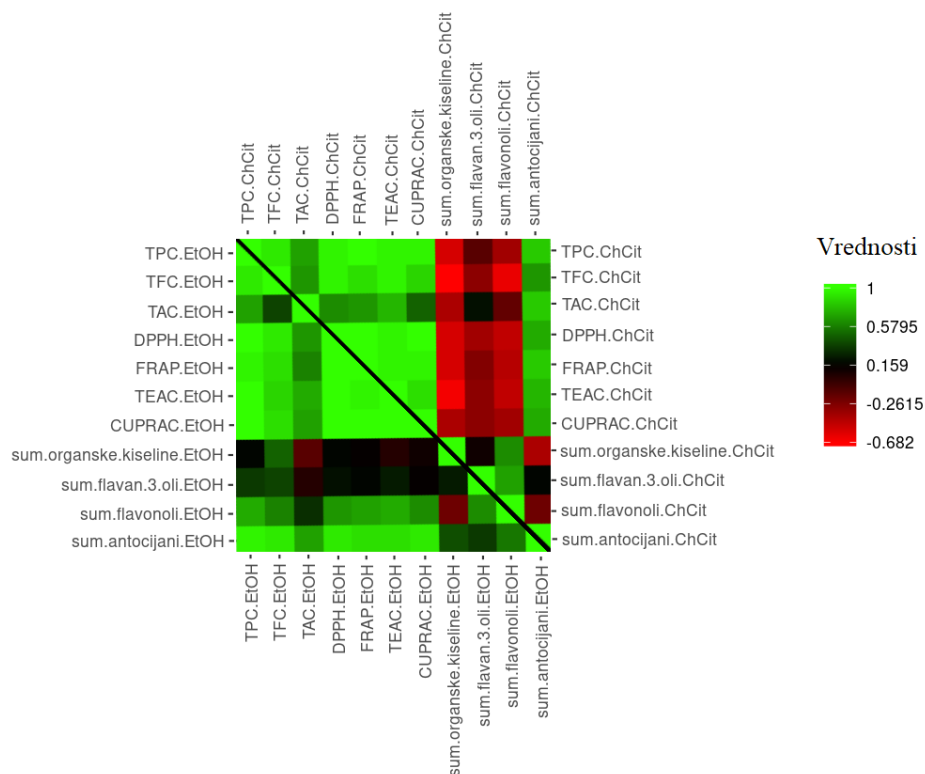
Slika 50 prikazuje srednje vrednosti (n=8) dobijene za različite rastvarače, za sva 4 testa. ChCit ekstrakti pokožice su ispoljili jaču antioksidativnu aktivnost od etanolnih ekstrakata. Ipak, statistička analiza je pokazala da među njima nema značajnih razlika, osim u slučaju CUPRAC testa ($p<0,05$). Razlike u rezultatima dobijenim testovima DPPH ($p=0,069$), FRAP ($p=0,103$) i TEAC ($p=0,297$) nisu bile značajne, pretpostavlja se zbog velikih varijacija u okviru grupa.



Slika 50. Antioksidativna aktivnost etanolnih i ChCit ekstrakata pokožice grožđa određena a) DPPH testom; b) FRAP testom; c) TEAC testom i d) CUPRAC testom prikazana kao srednja vrednost ($n=8$) \pm SD

EtOH- acidifikovani etanol; ChCit- eng. *choline chloride: citric acid*; TE- eng. *Trolox Equivalents*; l- liofilizat; SD- standardna devijacija; DPPH- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; FRAP- eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*; TEAC- eng. *Trolox Equivalents Antioxidant Capacity*; CUPRAC- eng. *Cupric Reducing Antioxidant Capacity*
 * $p < 0,05$

Sa ciljem da se vizuelizuju korelacije između antioksidativne aktivnosti i sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida, antocijana, zatim sume organskih kiselina, flavan 3-ola, flavonola i antocijana određenih HPLC metodom, pripremljena je *Heat* mapa (**Slika 51**).



Slika 51. Heat mapa korelacija između antioksidativnosti i različitih biološki aktivnih jedinjenja prisutnih u pokožici grožđa

EtOH- acidifikovani etanol; ChCit- eng. *choline chloride: citric acid*; DPPH- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; FRAP- eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*; TEAC- eng. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*; CUPRAC- eng. *Cupric Reducing Antioxidant Capacity*

Analizom rezultata dobijenih za etanolne ekstrakte, utvrđena je snažna korelacija između sva 4 testa antioksidativnosti i TPC ($0,961 < r < 0,984$; $p < 0,01$), odnosno TFC vrednosti ($0,843 < r < 0,915$; $p < 0,01$). Sadržaj ukupnih anticijana određen spektrofotometrijskom metodom nije korelirao ni sa jednim testom antioksidativnosti.

Među ChCit ekstraktima utvrđena je korelacija između antioksidativnosti i TPC, odnosno TFC vrednosti ($0,943 < r < 0,979$ i $0,858 < r < 0,934$, $p < 0,01$; redom). Takođe, pokazano je da postoji jaka korelacija između antioksidativnosti (TEAC metoda) i sadržaja ukupnih anticijana u ChCit ekstraktima pokožice.

Korelacija testova antioksidativnosti sa rezultatima HPLC analize ekstrakata dala je kontradiktorne rezultate. Antioksidativna aktivnost etanolnih ekstrakata nije bila u korelaciji sa kvantifikovanim flavan-3-olima i organskim kiselinama, ali je postojala značajna korelacija sa sadržajem anticijana ($0,871 < r < 0,919$, $p < 0,01$) kao i sadržajem flavonola ($r = 0,735$, $0,771$ i $0,783$, $p < 0,05$; za CUPRAC, DPPH i TEAC, redom, odnosno $r = 0,843$, $p < 0,01$ za FRAP metodu).. Antioksidativna aktivnost ChCit ekstrakata je bila u korelaciji sa sadržajem anticijana ($r = 0,752$, $0,770$ i $0,800$, $p < 0,05$; za CUPRAC, DPPH i TEAC metodu redom, odnosno $r = 0,857$, $p < 0,01$ za FRAP metodu).

Na osnovu Heat mape i očitanih koeficijenata korelacije može se zaključiti da antioksidativna aktivnost ekstrakata pokožice grožđa u najvećoj meri potiče od prisutnih anticijana, kao i od flavonola u slučaju etanolnih ekstrakata..

Jedna studija bavila se ispitivanjem antioksidativne aktivnosti različitih polifenolnih struktura grožđa. DPPH test je pokazao da kvercetin ispoljava jači antioksidativni efekat od npr. katehina, epikatehina i rezveratrola, kao i da ova jedinjenja u kombinaciji mogu imati antagonistički efekat (Iacopini i sar., 2008). Druga studija, koja je za cilj imala analizu jedinjenja prisutnih u vinu, je pokazala da proantocijanidini i antocijani poseduju jaču antioksidativnu aktivnost od katehina (Muselík i sar., 2007). Kada je reč o antocijanima, poznato je da hemijska struktura ovih jedinjenja, odnosno položaj i broj supstituenata, određuje intenzitet antioksidativne aktivnosti (Miguel, 2011). Tako npr. jedinjenja sa više hidroksilnih grupa ispoljavaju jaču antioksidativnu aktivnost, naročito ukoliko je supstitucija izvršena u položajima 3' i 4'. Osim hidroksilne grupe, na aktivnost utiču i prisutne metoksi grupe, pa tako malvidin 3-glukozid i petunidin 3-glukozid pokazuju manju efikasnost od cijanidin 3-rutinozida i delfinidin 3-glukozida. Antocijani se među sobom razlikuju prema afinitetu ka slobodnim radikalima, na primer delfinidin je najaktivniji protiv superoksidnog anjona (zatim cijanidin i pelargonidin), dok je protiv hidroksilnog radikala najefikasniji pelargonidin.

Kako je *Heat* mapa pokazala da najveći uticaj na antioksidativnost ekstrakata pokožice crvenih sorti grožđa imaju prisutni antocijani, ispitane su korelacije između sadržaja ovih jedinjenja i urađenih *in vitro* testova antioksidativnosti (**Tabela 22**). Gotovo sva identifikovana jedinjenja su bila u statistički značajnoj korelaciji sa antioksidativnim testovima ($0,555 > r > 0,815$, $p < 0,05$), pri čemu je najjača korelacija primećena kod malvidin 3-O-glukozida. Ovim je pre svega pokazano da antioksidativnu aktivnost definišu jedinjenja koja su najzastupljenija, a zatim i brojne interakcije među njima.

Tabela 22. Korelacije između antioksidativnog potencijala i sadržaja različitih antocijana prisutnih u ekstraktima pokožice grožđa

	DPPH	FRAP	TEAC	CUPRAC	Delfinidin 3-O-glukozid	Petunidin 3-O-glukozid	Peonidin 3-O-glukozid	Malvidin 3-O-glukozid
DPPH	1	,978**	,953**	,956**	,626**	,596*	,555*	,748**
		,000	,000	,000	0,010	,015	,026	,001
	16	16	16	16	16	16	16	16
FRAP		1	,944**	,945**	,605*	,636**	,573*	,815**
			,000	,000	,013	,008	,020	,000
		16	16	16	16	16	16	16
TEAC			1	,853**	,605*	,571*	,591*	,779**
				,000	,013	,021	,016	,000
			16	16	16	16	16	16
CUPRAC				1	,666**	,692**	,394	,670**
					,005	,003	,131	,005
				16	16	16	16	16
Delfinidin 3-O-glukozid					1	,733**	,014	,428
						,001	,958	,098
					16	16	16	16
Petunidin 3-O-glukozid						1	,139	,613*
							,607	,012
						16	16	16
Peonidin 3-O-glukozid							1	,779**
								,000
							16	16
Malvidin 3-O-glukozid								1
								16

DPPH- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; FRAP- eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*; TEAC- eng. *Trolox Equivalents Antioxidant Capacity*; CUPRAC- eng. *Cupric Reducing Antioxidant Capacity*

4.3.3.2. Citotoksična aktivnost ekstrakata pokožice grožđa

Citotoksična aktivnost ChCit i etanolnih ekstrakata pokožice grožđa ispitivana je na dve humane maligne ćelijske linije, LS 174T (adenokarcinom kolona) i HeLa (adenokarcinom cerviksa), kao i na jednoj normalnoj ćelijskoj liniji MRC-5 (fibroblasti pluća).

ChCit ekstrakti pokožice grožđa pokazali su umerenu citotoksičnu aktivnost prema odabranim ćelijskim linijama nakon inkubacije u trajanju od 72h. Etanolni ekstrakti nisu ispoljili značajnu citotoksičnost, odnosno nije došlo do inhibicije preživljavanja 50% ciljnih ćelija u odnosu na kontrolu ni upotrebom najkoncentrovanijeg ekstrakta (**Tabela 23**). Pretpostavlja se da je prvi uzrok veće aktivnosti ChCit ekstrakata izražena kiselost rastvarača (pH 0,6), a posledično i ekstrakata, koja ne pogoduje rastu ćelija (Panić, Radić Stojković, i sar., 2019). Inhibitorni efekat samog rastvarača potvrđen je ispitivanjem njegove biotoksičnosti kada je utvrđeno da ChCit deluje citotoksično na ćelije fibroblasta pluća (IC₅₀=278,4 µg/ml), ali ne i na maligne ćelije. Ovaj rastvarač, zajedno sa ekstrahovanim polifenolnim jedinjenjima, inhibirao je rast svih ispitivanih ćelijskih linija, pretpostavlja se usled sinergizma između indukovane ćelijske acidifikacije i prisustva polifenola.

Tabela 23. Koncentracije ekstrakata pokožice koje su inhibirale preživljavanje 50% ciljnih ćelija u odnosu na kontrolu nakon 72h tretmana (IC₅₀)

		Gamay	Vranac	Burgundac crni	Zaćinak	<i>Crna Tamjanika</i>	<i>Prokupac</i>	Frankovka	Shiraz
MRC-5 (µg/ml)	EtOH	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
	ChCit	234,7	83,3	173,5	175,5	324,0	304,4	267,3	331,7
HeLa (µg/ml)	EtOH	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
	ChCit	257,1	74,0	223,6	122,6	118,8	175,8	257,2	177,4
LS 174T (µg/ml)	EtOH	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
	ChCit	328,8	70,4	299,1	297,2	>400	370,8	235,2	>400

EtOH- acidifikovani etanol; ChCit- eng. *choline chloride: citric acid*

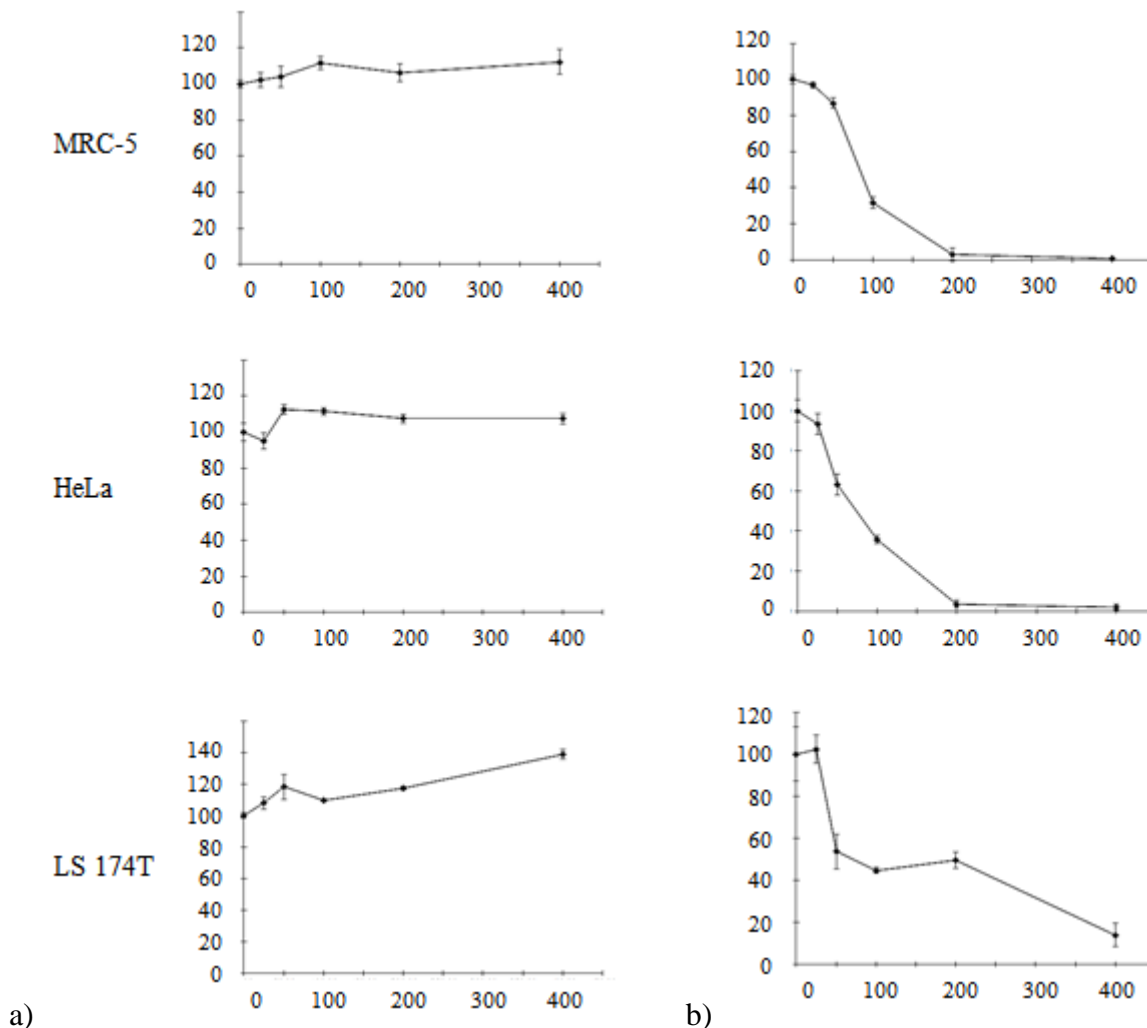
MRC-5- fibroblasti pluća; HeLa- adenokarcinom jajnika; LS 174T- adenokarcinom kolona

Italic stilom su obeležene domaće sorte

Ćelije adenokarcinoma cerviksa (HeLa) bile su najosetljivije. ChCit ekstrakti pokožice sorte Vranac, zatim Crne Tamjanike i Zaćinak pokazale su najjači citotoksični efekat (IC₅₀ vrednosti redom: 74,0; 118,8 i 122,6 µg/ml).

Ćelije adenokarcinoma kolona (LS 174T) bile su otpornije. Efekat je izostao kod pokožica sorti Crna Tamjanika i Shiraz, odnosno IC₅₀ vrednosti su bile veće od 400 µg/ml. Vranac pokožica je imala ubedljivo najjači inhibitorni efekat na preživljavanje ćelija (IC₅₀=70,4 µg/ml).

Na **Slici 52** su prikazani % ćelijskog preživljavanja za sve tri ispitivane ćelijske linije (MRC-5, HeLa i LS 174T), pod uticajem a) etanolnih i b) ChCit ekstrakata pokožice na primeru Vranac sorte koja je pokazala najjaču aktivnost MTT testom, bez obzira na ispitivanu ćelijsku kulturu.



Slika 52. Procenat ćelijskog preživljavanja MRC-5, HeLa i LS 174T ćelija pod uticajem a) etanolnih i b) ChCit ekstrakata pokožice Vranac sorte

MRC-5- fibroblasti pluća; HeLa- adenokarcinom jajnika; LS 174T- adenokarcinom kolona

Brojne studije na ćelijskim modelima su u fokusu imale poređenje efikasnosti različitih delova ploda vinove loze u pogledu inhibicije rasta i preživljavanja malignih ćelija. Pokazano je da pokožica ima jači inhibitorski efekat na rast HeLa ćelija od semenki, pulpe i soka (Morré & Morré, 2006). Nedavna studija, koja se bavila ispitivanjem komine Prokupac sorte i odvojenih delova komine, u pogledu antioksidativne i citotoksične aktivnosti, je pokazala da pokožica ispoljava najjači citotoksični efekat na Caco-2 ćelijsku liniju kolorektalnog adenokarcinoma, iako su se semenke i komina odlikovale jačom antioksidativnom aktivnošću (Milinčić i sar., 2021).

Dokazano je da ekstrakti pokožice grožđa deluju citotoksično na ćelije mišjeg karcinoma dojke (4T1 ćelijske linije), kao i na ćelije humanog hepatokarcinoma (HepG2) (De Sales i sar., 2018; Sun i sar.,

2012). Najčešće su ispitivanja vršena na konvencionalnim ekstraktima. Podataka o citotoksičnosti NADES ekstrakata je znatno manje. Jedna studija bavila se evaluacijom citotoksičnosti NADES ekstrakata pokožice grožđa na dve veoma često korišćene ćelijske linije: HeLa (karcinom cerviksa) i MCF-7 (karcinom dojke). Među ispitivanim rastvaračima na bazi holin hlorida, onaj sa organskom kiselinom (jabučna kiselina) je pokazao najveći afinitet za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja i dobijeni ekstrakti su bili biološki najaktivniji (Radošević i sar., 2016).

Mehanizam kojim pokožica deluje inhibitorno na rast malignih ćelija još uvek nije u potpunosti objašnjen. Iako se u pokožici nalaze brojni antioksidansi, ponekad ova jedinjenja mogu delovati prooksidativno. Na primer, oksidacijom flavonoida mogu nastati slobodni radikali, koji potencijalno indukuju oksidativni stres (Cao i sar., 1997). Pokazano je da ekstrakt pokožice grožđa ima sposobnost da generiše reaktivne kiseonične vrste u različitim ćelijama kolorektalnog karcinoma. Koncentracija superoksidnog anjona merena je protočnom citofluorimetrijom, i rezultati su poređeni sa efektom citostatika cisplatine. Prooksidativni efekat pokožice grožđa uočen je u svim ispitivanim ćelijskim linijama (Topalović i sar., 2020). U prilog prooksidativnoj teoriji je studija koja je efekat dozno zavisne inhibicije rasta A431 (ćelije karcinoma kože) i HaCaT ćelija (humani keratinociti) objasnila povećanom produkcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta, što je indukovalo apoptozu (Grace Nirmala i sar., 2018).

Pretpostavlja se da su prisutna polifenolna jedinjenja odgovorna za citotoksičnu aktivnost pokožice grožđa. Rezveratrol je najčešće opisivan kao agens sposoban da suprimira kancerogenezu (Clément i sar., 1998; Fulda, 2010; Radkar i sar., 2007; Wu i sar., 2019). Dokazano je da ovo jedinjenje inhibira rast HeLa ćelija i indukuje njihovu apoptozu, inhibicijom Wnt2, Notch1 i STAT3 signalnih puteva koji su krucijalni u formiranju i razvoju malignih ćelija (P. Zhang i sar., 2014). Jedna studija bavila se poređenjem antikancerskih svojstava ekstrakta pokožice *Muscadinia* grožđa (koji nije sadržao rezveratrol) i rezveratrola, a ispitivanja su vršena na ćelijskim kulturama kancera prostate u različitim fazama. Pokazano je da ekstrakti pokožice indukuju apoptozu ćelija delujući na PI3K-Akt i MAPK signalne puteve, dok rezveratrol zaustavlja ćelijski ciklus povećanjem ekspresije p21 proteina, odnosno smanjenjem ekspresije ciklin-D1 i ciklin-zavisnih kinaza 4 proteina (Hudson i sar., 2007). Rezveratrol u kombinaciji sa ekstraktom semenki grožđa, indukuje apoptozu i suprimira proliferaciju ćelija raka debelog creva p53 zavisnim mehanizmom (Radhakrishnan i sar., 2010). Neki navodi sugerišu da je citotoksična aktivnost pokožice grožđa povezana sa prisustvom d- limonena, terpenoida koji se nalazi u crvenim sortama vinove loze, obzirom da je dokazano da ovo jedinjenje indukuje apoptozu LS 174T kancerskih ćelija supresijom PI3K/Akt signalnog puta (Jia i sar., 2013).

4.3.3.3. Antimikrobna aktivnost ekstrakata pokožice grožđa

Antimikrobna aktivnost etanolnih i ChCit ekstrakata pokožice grožđa testirana je mikrodilucionom metodom na 3 mikroorganizma i to: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 i *Candida albicans* ATCC 10231. Rezultati su izraženi kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIK), odnosno najniža koncentracija uzorka koja inhibira vidljiv rast mikroorganizama.

Etanolni i ChCit ekstrakti pokožice grožđa ispoljili su antimikrobni efekat na ispitivanim sojevima (**Tabela 24**). Vrednosti MIK kretale su se od 0,04 do više od 0,6 mg/mL. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 je pokazao najveću osetljivost, mada je i sam rastvarač (ChCit) imao inhibitorni efekat na rast ove bakterije (MIK=0,3). Ubedljivo najjači antimikrobni efekat imala je pokožica Vranac, pri čemu je ChCit ekstrakt ove sorte inhibirao rast svih ispitivanih sojeva. *Escherichia coli* ATCC 8739 se pokazala kao naročito osetljiva na delovanje ChCit ekstrakta Vranac sorte (MIK=0,04 mg/mL).

Tabela 24. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) ekstrakata pokožice grožđa za ispitivane sojeve

		Minimalna inhibitorna koncentracija (mg/mL)		
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
Gamay	EtOH	0,3	>0.6	>0.6
	ChCit	0,6	0,6	0,6
Vranac	EtOH	0,3	>0.6	>0.6
	ChCit	0,3	0,04	0,6
Burgundac crni	EtOH	0,6	>0.6	>0.6
	ChCit	>0.6	>0.6	0,6
Začinak	EtOH	>0.6	>0.6	>0.6
	ChCit	0,3	>0.6	0,6
Crna Tamjanika	EtOH	0,6	>0.6	>0.6
	ChCit	0,6	>0.6	>0.6
Prokupac	EtOH	0,6	>0.6	>0.6
	ChCit	0,6	>0.6	>0.6
Frankovka	EtOH	0,6	>0.6	>0.6
	ChCit	0,6	>0.6	>0.6
Shiraz	EtOH	0,6	>0.6	>0.6
	ChCit	0,3	>0.6	>0.6
	ChCit	0,3	>0.6	>0.6

EtOH- acidifikovani etanol; ChCit- eng. *choline chloride: citric acid*
Italic stilom su obeležene domaće sorte

Analizom antimikrobnog potencijala pokožice 14 različitih sorti vinove loze uočeno je da pokožice belih sorti poseduju jaču antimikrobnu aktivnost u poređenju sa crvenim sortama, iako razlike nisu bile statistički značajne (Katalinić i sar., 2010). Istraživanje koje se bavilo komparativnom analizom pokožice organski i konvencionalno uzgajanog grožđa, je pokazalo da su svi uzorci podjednako inhibirali rast ispitivanih Gram pozitivnih bakterija sa izuzetkom *L. monocytogenes* koja je bila osetljivija na pokožicu organskog grožđa. Jači efekat pokožice organskog grožđa na *L. monocytogenes* objašnjen je većim sadržajem kvercetina u njoj (Corrales i sar., 2010). U literaturi se navode različita jedinjenja odgovorna za antimikrobnu aktivnost pokožice grožđa. Jedna studija je inhibitorni efekat pokožice grožđa na rast *L. monocytogenes*, koji je bio uporediv sa delovanjem semenki, objasnila prisustvom polimernih pigmenata, pošto je efekat bio pH zavisna (Rhodes i sar., 2006). Ispitivanjem ekstrakata različitih delova ploda vinove loze zaključeno je da pokožica grožđa ispoljava jače antimikrobno delovanje na *Helicobacter pylori* od semenki i pokožice u kombinaciji, kao i od samih semenki, i da visok sadržaj ukupnih polifenola ne implicira nužno snažniju biološku aktivnost (Brown i sar., 2009). Generalno, više literaturnih podataka idu u prilog tome da semenke ispoljavaju jači inhibitorni efekat na rast mikroorganizama u poređenju sa pokožicom (Nirmala & Narendhirakannan, 2011; V. Silva i sar., 2018; Tseng & Zhao, 2012).

Studija sprovedena davne 1960. bavila se ispitivanjem efekata antocijana prisutnih u grožđu na inhibiciju rasta više bakterijskih linija. Pokazano je da su delphinidin 3-monoglukozid, pelargonidin 3-monoglukozid i malvidin 3,5-diglukozid najefikasniji, odnosno njihovi aglikoni (Pratt i sar., 1960). U okviru opsežne studije koja je uključivala ekstrakte različitog bobičastog voća, kao i izolovana polifenolna jedinjenja (flavonole, antocijane i fenolne kiseline) pokazano je da je najaktivniji u pogledu inhibicije rasta patogena bio miricetin (Puupponen-Pimia i sar., 2001). Rezveratrol, koji se u velikom procentu nalazi u pokožici, u značajnoj meri doprinosi antimikrobnom delovanju crvenog vina (Mahady & Pendlan, 2000).

4.3.4. Hemijski sastav ekstrakata semenki grožđa

4.3.4.1. Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i flavan-3-ola u ekstraktima semenki grožđa

Etanolni i ChCit ekstrakti semenki grožđa ispitivani su u pogledu sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida i flavan-3-ola. Rezultati su prikazani u **Tabeli 25**.

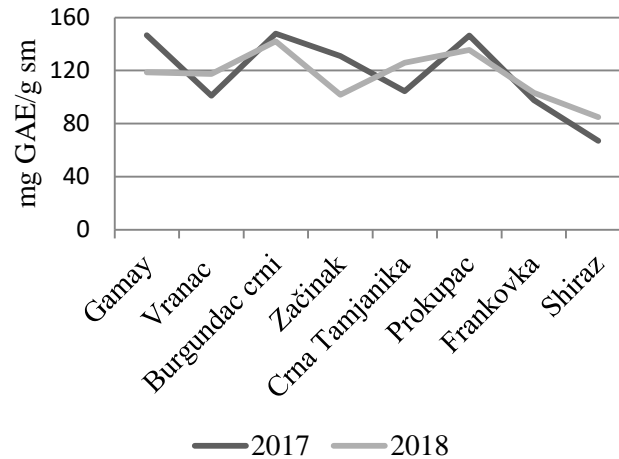
Tabela 25. Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i flavan-3-ola u etanolnim i ChCit ekstraktima semenki grožđa

	Ukupni polifenoli (mg GAE/g sm)		Ukupni flavonoidi (mg EE/g sm)		Ukupni flavan-3-oli (mg PB1E/g sm)	
	EtOH	ChCit	EtOH	ChCit	EtOH	ChCit
Gamay	118,64±1,45	115,56±1,81	95,83±2,77	76,85±2,21	120,82±2,99	96,62±1,02
Vranac	117,37±3,22	95,41±1,37	72,82±3,04	74,41±1,75	107,93±2,19	82,81±5,47
Burgundac crni	142,10±0,49	126,30±0,49	102,63±2,21	100,47±0,91	186,56±1,46	153,32±4,20
<i>Začinak</i>	101,82±1,98	90,98±3,84	64,16±3,50	70,26±1,50	99,17±2,04	81,27±3,01
<i>Crna Tamjanika</i>	125,91±3,11	114,42±3,41	69,78±0,61	67,38±0,66	121,30±2,90	99,10±3,04
<i>Prokupac</i>	135,5±1,39	116,71±1,37	85,39±0,25	82,64±2,65	116,44±0,00	102,78±1,02
Frankovka	103,24±1,19	91,75±3,52	73,54±1,14	67,05±2,18	111,24±0,83	86,18±2,50
Shiraz	84,79±1,78	86,36±3,71	44,09±1,61	47,91±1,07	70,34±0,00	70,34±1,42

EtOH- acidifikovani etanol; ChCit- eng. *choline chloride: citric acid*; GAE- eng. *gallic acid equivalents*; sm- suva materija; EE- eng. *epicatechin equivalents*; PB1E- eng. *procyanidin B1 equivalents*
Italic stilom su obeležene domaće sorte

Najviše TPC vrednosti određene su za sortu Burgundac crni, bez obzira na upotrebljeni rastvarač (142,1 i 126,3 mg GAE/g suve materije, za etanol i ChCit, redom). Ovakav rezultat bio je u skladu sa dostupnim podacima o istoj sorti (Pantelić i sar., 2016; Radulescu i sar., 2020). Semenke sorte Shiraz sadržale su najmanje polifenolnih jedinjenja, 84,79 i 86,36 mg GAE/g suve materije, za etanol i ChCit, redom. Značajno veći sadržaj polifenola u semenkama Burgundac crni u poređenju sa semenkama Shiraz uočen je i ranije (Pantelić i sar., 2016). TPC vrednosti za Vranac su neznatno veće od dostupnih literaturnih podataka za istu sortu, pretpostavlja se zbog sezonskog uticaja (Šuković i sar., 2020). Sadržaji ukupnih polifenolnih jedinjenja u semenkama ovih osam sorti su upoređeni sa vrednostima dobijenim za iste sorte prethodne godine, koje su analizirane u okviru prvog dela istraživanja. Uočena su značajna variranja u količini polifenola, uz izostanak pravilnosti. Ipak, ono što je evidentno je

postojanje značajnog uticaja sorte, budući da su npr. semenke sorti Burgudac crni i Prokupac obe sezone bile najbogatije polifenolnim jedinjenjima, dok su za semenke sorte Shiraz određene najmanje TPC vrednosti, bez obzira na godinu (**Slika 53**).

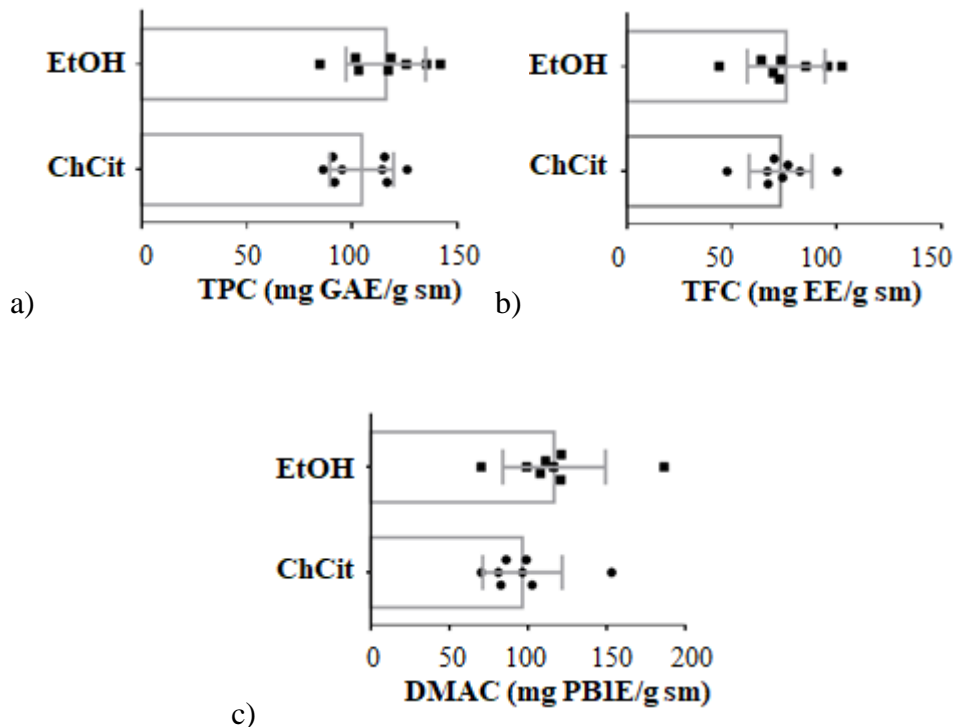


Slika 53. Uporedna analiza sadržaja ukupnih polifenola u etanolnim ekstraktima semenki grožđa prikupljenim u dve uzastopne godine
GAE- eng. *Gallic Acid Equivalents*; sm- suva materija

TFC vrednosti su bile slične za oba rastvarača; upotrebom etanola, TFC je varirao između 44,09 i 102,63 mg EE/g sm, dok su se TFC vrednosti za ChCit ekstrakte kretale od 47,91 do 100,47 mg EE/g sm. Sadržaj flavan-3-ola, najznačajnijih polifenolnih jedinjenja u semenkama grožđa, je veoma varirao između sorti.

Utvrđena je snažna korelacija između TPC i TFC, kao i između TPC i sadržaja ukupnih flavan-3-ola ($r=0,841$ i $0,905$ za etanolne ekstrakte, odnosno $r=0,881$ i $0,952$ za ChCit ekstrakte, $p<0,01$).

Razlike u efikasnosti ekstrakcije polifenolnih jedinjenja između rastvarača prikazane su na **Slici 54**. Studentov t-test je pokazao da u pogledu sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida i flavan-3-ola nema statistički značajnih razlika između rastvarača, mada je etanol pokazao malo veću efikasnost.



Slika 54. Sadržaj a) ukupnih polifenola; b) flavonoida i c) flavan-3-ola u ekstraktima semenki grožđa prikazani kao srednja vrednost ($n=8$) \pm SD
 EtOH- acidifikovani etanol; ChCit- eng. *choline chloride: citric acid*; TPC- eng. *Total Phenolic Content*; TFC- eng. *Total Flavonoid Content*; DMAC (4- dimetilaminocinamaldehyd); GAE- eng. *Galic Acid Equivalents*; EE- eng. *Epicatechin Equivalents*; PBIE- eng. *Procyanidin B1 Equivalents*; sm- suva materija

4.3.4.2. Sastav i sadržaj organskih kiselina i najznačajnijih polifenolnih jedinjenja u ekstraktima semenki grožđa

Sastav i sadržaj biološki aktivnih sastojaka u etanolnim i ChCit ekstraktima semenki određen HPLC-MS/MS analizom prikazan je u **Tabeli 26**.

Među kvantifikovanim organskim kiselinama u etanolnim ekstraktima, vinska kiselina je bila najzastupljenija u skoro svim sortama. Osim vinske kiseline, ekstrakti su sadržali i značajne količine jabučne kiseline. Profil organskih kiselina u ChCit ekstraktima je bio nešto drugačiji. ChCit ekstrakti su imali najviše jabučne kiseline, sa izuzetkom semenki Burgundac crni i Crna Tamjanika koje su okarakterisane najvišim sadržajem galne kiseline. Semenke Prokupac sorte imale su znatno veći sadržaj galne kiseline u poređenju sa drugim sortama, što je u skladu sa literaturnim podacima (Pantelić i sar., 2016). Protokatehnična kiselina je bila zastupljena u tragovima.

Kada je reč o flavan-3-olima, bez obzira na rastvarač za ekstrakciju, (+)-katehin i (-)-epikatehin su bili prisutni u najvećim količinama. Literaturni podaci o sastavu semenki grožđa su dosta različiti, pa je tako prema nekim istraživanjima (+)-katehin zastupljeniji od (-)-epikatehina (Farhadi i sar., 2016; Mandić i sar., 2008), dok druga govore u prilog dominaciji (-)-epikatehina (Bakkalbaşı i sar., 2005; Fuleki & Ricardo Da Silva, 1997). U našim uzorcima, (+)-katehin je bio prisutan u većim količinama u

skoro svim sortama, jedino su etanolni ekstrakti semenki sorti Začinak i Gamay imali više (-)-epikatehina, kao i semenke Frankovka sorte, bez obzira na upotrebljeni rastvarač. Burgundac crni semenke su imale najviše flavan-3-ola, i to 6,978 i 3,126 mg/g sm (+)-katehina, odnosno 4,782 i 1,950 mg/g sm (-)-epikatehina (etanolni i ChCit ekstrakti, redom). Dobijeni rezultati u skladu su sa dostupnim podacima o istim sortama (Pastoriza i sar., 2011). Derivati galne kiseline i katehina su bili prisutni u tragovima ili nisu detektovani. Dimerni polifenoli (procijanidini) su kvantifikovani u značajnim količinama. Izomer B1 je bio zastupljeniji u svim sortama, bez obzira na upotrebljeni rastvarač za ekstrakciju. Takav nalaz je u korelaciji sa prethodnim studijama (Ky & Teissedre, 2015; Rodríguez Montealegre i sar., 2006).

Generalno, etanol je pokazao bolju ekstrakcionu efikasnost u poređenju sa ChCit (suma kvantifikovanih jedinjenja HPLC metodom je bila mnogo veća, 70,53 vs 40,47 mg/g sm). Ipak, uočena je izvesna selektivnost oba rastvarača u ekstrakciji različitih klasa jedinjenja. ChCit je pokazao veći afinitet za ekstrakciju procijanidina iz semenki određenih sorti vinove loze. Smatra se da razlike u afinitetu potiču od fizičko-hemijskih karakteristika samih rastvarača. Iako je polaritet dva ispitivana rastvarača sličan, oni se značajno razlikuju prema viskozitetu, gustini i pH vrednostima, što definiše efikasnost ekstrakcije specifičnih jedinjenja (Panić, Radić Stojković, i sar., 2019)

Tabela 26. Sadržaj organskih kiselina i najznačajnijih polifenolnih jedinjenja u etanolnim i ChCit ekstraktima semenki grožđa

		Vinska kiselina	Jabučna kiselina	Galna kiselina	Protokatehnična kiselina	Galokatehin	Epigalokatehin	(+)- Katehin	(-)- Epikatehin	Procijanidin B1	Procijanidin B2
Gamay	EtOH	1,279	1,088	0,172	0,011	0,004	0,012	1,256	1,393	1,444	0,054
	ChCit	1,121	1,028	0,140	0,007	nd	0,001	0,672	0,494	1,350	0,027
Vranac	EtOH	1,413	0,901	0,308	0,015	nd	nd	1,309	0,623	1,134	0,012
	ChCit	0,349	0,806	0,240	0,017	nd	0,001	0,712	0,184	1,247	0,031
Burgundac crni	EtOH	1,719	1,313	0,365	0,008	0,004	nd	6,978	4,782	2,267	0,112
	ChCit	0,129	0,175	0,294	0,008	nd	0,001	3,126	1,950	3,833	0,080
Začinak	EtOH	1,228	0,362	0,580	0,019	0,003	0,010	1,238	1,406	1,083	0,018
	ChCit	0,383	0,822	0,516	0,010	nd	0,002	0,911	0,608	1,611	0,037
Crna Tamjanika	EtOH	2,844	1,526	0,470	0,008	0,004	0,018	2,000	1,595	2,162	0,026
	ChCit	0,201	<LoQ	0,326	0,014	0,004	0,005	1,018	0,494	1,743	0,049
Prokupac	EtOH	1,690	1,853	0,911	0,020	0,005	0,022	3,366	3,107	2,269	0,065
	ChCit	0,724	1,050	0,509	0,009	0,004	0,002	1,220	0,714	2,026	0,038
Frankovka	EtOH	2,501	0,640	0,275	0,002	0,003	0,026	1,709	2,950	1,337	0,065
	ChCit	0,161	0,635	0,183	0,006	0,003	0,007	0,619	0,769	1,307	0,062
Shiraz	EtOH	1,501	1,327	0,318	0,027	nd	0,005	1,250	1,080	1,617	0,013
	ChCit	0,510	0,888	0,241	0,026	nd	0,001	0,469	0,121	1,311	0,024

Rezultati su izraženi u mg/g suve materije i predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja. Standardna devijacija je u svim uzorcima bila manja od 5%.

EtOH- acidifikovani etanol; ChCit- eng. *choline chloride: citric acid*; LoQ- eng. *Limit of Quantification*, limit kvantifikacije; nd- nije detektovano

**Italic* stilom su obeležene domaće sorte

4.3.5. Biološke aktivnosti ekstrakata semenki grožđa

Ekstrakti semenki čiji je hemijski sastav analiziran u okviru poglavlja 4.3.4. ispitani su u pogledu bioloških aktivnosti (analogno ekstraktima pokožice, ispitivana je antioksidativna, citotoksična i antimikrobna aktivnost).

4.3.5.1. Antioksidativna aktivnost ekstrakata semenki grožđa

Rezultati antioksidativne aktivnosti ekstrakata semenki grožđa su prikazani u **Tabeli 27**. Antioksidativna aktivnost ispitana je pomoću četiri testa (DPPH, FRAP, TEAC i CUPRAC). Dobijene vrednosti kretale su se u opsegu od 0,56 (Shiraz, etanol) do 2,13 mM TE/g sm (Burgundac crni, ChCit).

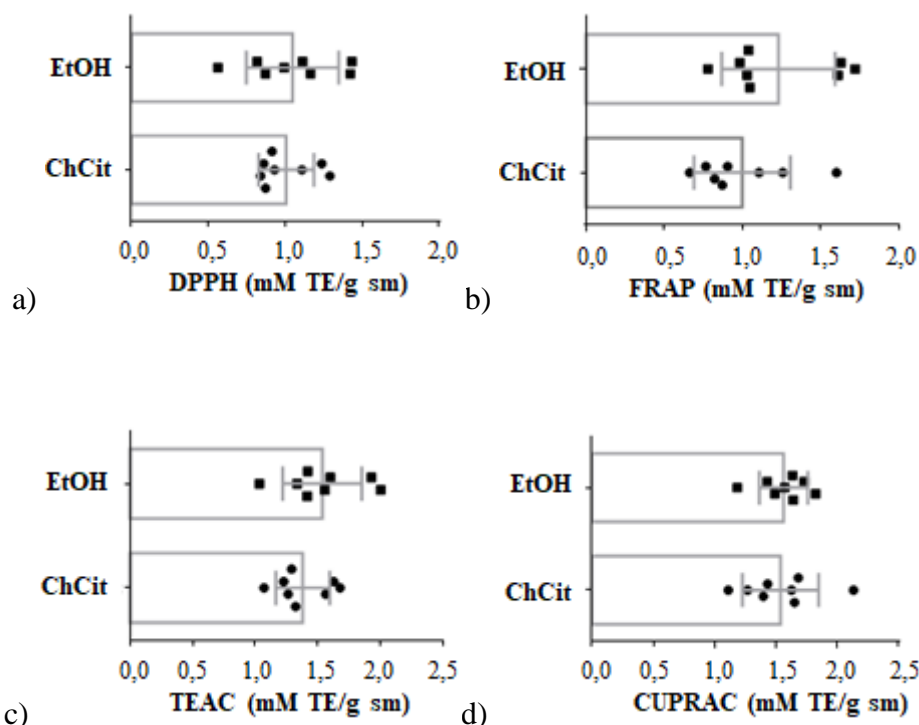
Tabela 27. Antioksidativna aktivnost etanolnih i ChCit ekstrakata semenki grožđa

	DPPH		FRAP		TEAC		CUPRAC	
	EtOH	ChCit	EtOH	ChCit	EtOH	ChCit	EtOH	ChCit
Gamay	1,17±0,01	0,92±0,03	1,05±0,00	0,77±0,04	1,56±0,03	1,23±0,01	1,57±0,02	1,43±0,02
Vranac	0,87±0,01	0,84±0,01	1,03±0,00	0,87±0,07	1,60±0,01	1,32±0,03	1,64±0,00	1,40±0,00
Burgundac crni	1,11±0,01	1,29±0,01	1,63±0,00	1,60±0,00	1,42±0,03	1,68±0,01	1,73±0,00	2,13±0,03
<i>Začinak</i>	0,82±0,02	0,87±0,01	0,98±0,01	0,91±0,05	1,34±0,02	1,29±0,01	1,49±0,01	1,65±0,04
<i>Crna Tamjanika</i>	1,42±0,03	1,24±0,04	1,72±0,01	1,26±0,04	2,00±0,03	1,63±0,01	1,82±0,01	1,68±0,00
<i>Prokupac</i>	1,44±0,03	1,11±0,03	1,61±0,02	1,11±0,01	1,93±0,00	1,57±0,01	1,64±0,03	1,63±0,03
Frankovka	1,00±0,01	0,93±0,02	1,04±0,00	0,82±0,00	1,42±0,05	1,27±0,03	1,43±0,01	1,27±0,02
Shiraz	0,56±0,01	0,86±0,00	0,78±0,03	0,66±0,00	1,03±0,01	1,07±0,01	1,19±0,03	1,11±0,02

Svi rezultati izraženi su u mM TE/g sm, kao srednja vrednost (n=3) ± SD

EtOH- acidifikovani etanol; ChCit- eng. *choline chloride: citric acid*; TE- eng. *Trolox equivalents*; sm- suva materija; SD- standardna devijacija; DPPH- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; FRAP- eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*; TEAC- eng. *Trolox Equivalents Antioxidant Capacity*; CUPRAC- eng. *Cupric Reducing Antioxidant Capacity*
Italic stilom su obeležene domaće sorte

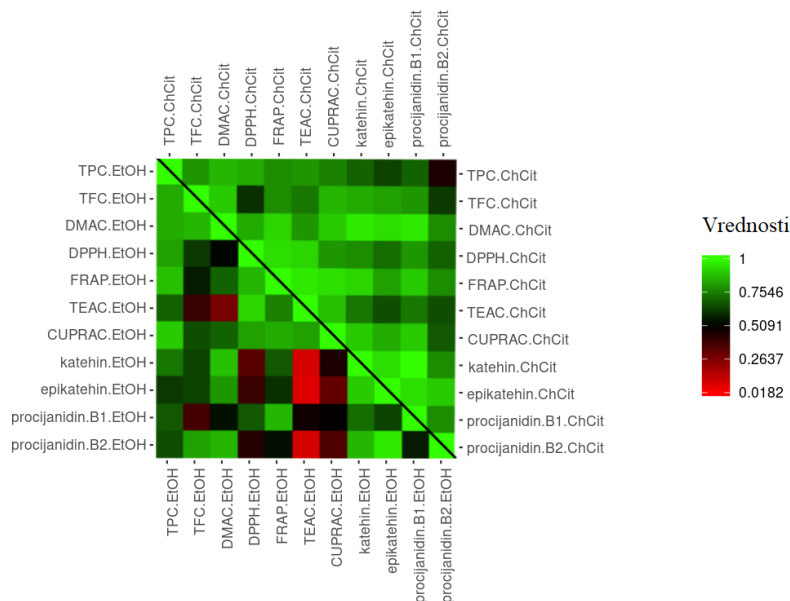
Kako bi se efikasnije procenio uticaj rastvarača na ekstrakciju jedinjenja sa antioksidativnom aktivnošću, na **Slici 55** su prikazane srednje vrednosti (n=8) dobijene za različite rastvarače, za sva 4 testa. Pokazano je da između etanola i ChCit nema statistički značajnih razlika, bez obzira na metodu; DPPH ($p = 0,7473$), FRAP ($p = 0,1906$), TEAC ($p = 0,2678$) i CUPRAC ($p = 0,8486$).



Slika 55. Antioksidativna aktivnost etanolnih i ChCit ekstrakata semenki grožđa određena a) DPPH testom; b) FRAP testom; c) TEAC testom i d) CUPRAC testom prikazana kao srednja vrednost ($n=8$) \pm SD

EtOH- acidifikovani etanol; ChCit- eng. *choline chloride: citric acid*; TE- eng. *Trolox Equivalents*; sm- suva materija; SD- standardna devijacija; DPPH- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; FRAP- eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*; TEAC- eng. *Trolox Equivalents Antioxidant Capacity*; CUPRAC- eng. *Cupric Reducing Antioxidant Capacity*

Korelacije između antioksidativnosti i različitih biološki aktivnih jedinjenja prisutnih u semenkama odabranih sorti grožđa prikazane su pomoću *Heat* mape (Slika 56). Posmatrajući ukupan sadržaj različitih klasa polifenola u etanolnim ekstraktima i njihove antioksidativne aktivnosti, značajne korelacije primećene su u samo tri slučaja (TPC i DPPH ($r = 0,808$), TPC i FRAP ($r = 0,874$), i TPC i CUPRAC test ($r = 0,884$)). Antioksidativna aktivnost ChCit ekstrakata je bila u značajnoj korelaciji sa gotovo svim polifenolnim jedinjenjima (statistička značajnost je izostala jedino u slučaju TFC i DPPH testa). Generalno, *Pearson*-ovi koeficijenti kretali su se od 0,092 za sadržaj (-)-epikatehina u etanolnim ekstraktima i antioksidativnu aktivnost određenu TEAC metodom i 0,907 za (+)-katehin u ChCit ekstraktima i antioksidativnu aktivnost ispitanu FRAP testom. ChCit ekstrakti su pokazali bolju korelaciju između antioksidativne aktivnosti i prisutnih polifenolnih jedinjenja (desna dijagonala kvadrata). Etanol je potencirao ekstrakciju nekih jedinjenja nefenolne strukture, a koja takođe poseduju antioksidativnu aktivnost.



Slika 56. Heat mapa korelacija između antioksidativnosti i različitih biološki aktivnih jedinjenja prisutnih u semenjkama grožđa

EtOH- acidifikovani etanol; ChCit- eng. *choline chloride: citric acid*; DPPH- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; FRAP- eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*; TEAC- eng. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*; CUPRAC- eng. *Cupric Reducing Antioxidant Capacity*

U jednoj studiji je primećeno da postoji snažna veza između antioksidativne aktivnosti (3 različita *in vitro* testa su korišćena) i sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida i flavan-3-ola u semenjkama i pokožici grožđa (Xu i sar., 2010).

Podataka o antioksidativnoj aktivnosti NADES ekstrakata je veoma malo (Alrugaibah i sar., 2021; Panić, Gunjević, i sar., 2021). Na osnovu predstavljenih rezultata, eutektički rastvarači se mogu smatrati pravim izborom za dobijanje ekstrakata semenki sa jakim antioksidativnim delovanjem.

4.3.5.2. Citotoksična aktivnost ekstrakata semenki grožđa

Analogno ispitivanju citotoksičnosti ekstrakata pokožice grožđa, citotoksična aktivnost ChCit i etanolnih ekstrakata semenki grožđa ispitivana je na MRC-5, HeLa i LS 174T.

Kao i u slučaju pokožice, ChCit ekstrakti semenki ispoljili su određenu citotoksičnost, dok je efekat izostao kod etanolnih ekstrakata (**Tabela 28**). Pretpostavlja se da je sinergizam između indukovane ćelijske acidifikacije i biološki aktivnih polifenolnih jedinjenja rezultovao ovakvim nalazom.

Tabela 28. Koncentracije ekstrakata semenki koje su inhibirale preživljavanje 50% ciljnih ćelija u odnosu na kontrolu nakon 72h tretmana (IC50)

		Gamay	Vranac	Burgundac crni	Začinak	<i>Crna Tamjanika</i>	<i>Prokupac</i>	Frankovka	Shiraz
MRC-5 ($\mu\text{g/ml}$)	EtOH	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
	ChCit	>400	266,5	355,9	>400	320,7	>400	398,7	>400
HeLa ($\mu\text{g/ml}$)	EtOH	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
	ChCit	390,3	329,1	294,3	299,5	362,0	>400	373,2	>400
LS 174T ($\mu\text{g/ml}$)	EtOH	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
	ChCit	265	339,0	386,4	394,1	236,7	382,5	>400	>400

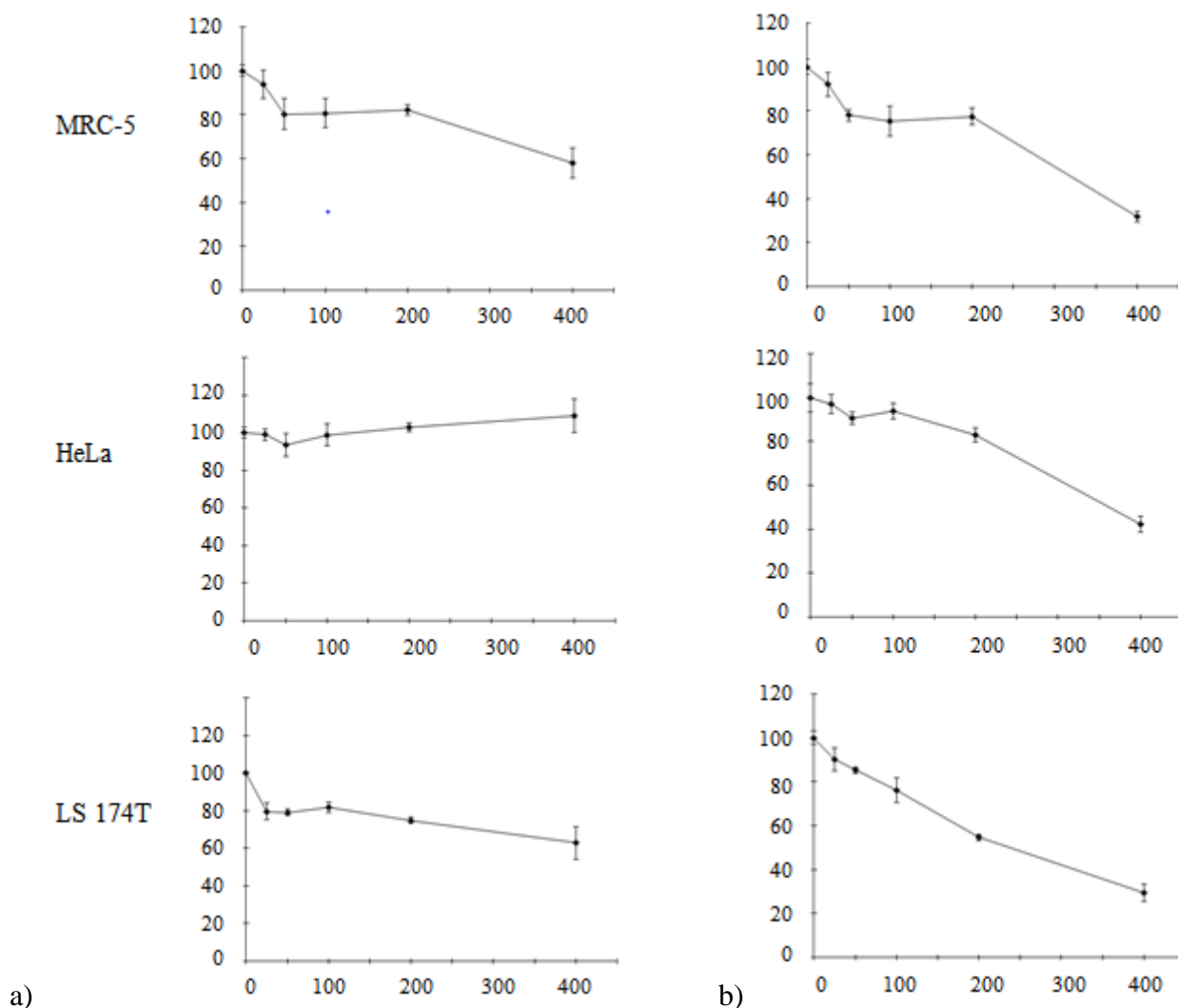
EtOH- acidifikovani etanol; ChCit- eng. *choline chloride: citric acid*

MRC-5- fibroblasti pluća; HeLa- adenokarcinom jajnika; LS 174T- adenokarcinom kolona

Italic stilom su obeležene domaće sorte

U ovom istraživanju ekstrakti semenki su pokazali manju aktivnost u poređenju sa ekstraktima pokožice. IC50 vrednosti kretale su se od 266,5 do 398,7, zatim 294,3 do 390,3 i 236,7 do 394,1 $\mu\text{g/ml}$ za MRC-5, HeLa i LS 174T, redom. Semenke sorte Shiraz nisu inhibirale rast ispitivanih ćelija, bez obzira na upotrebljeni rastvarač. Prokupac semenke su ispoljile izvesnu aktivnost samo u slučaju LS 174T ćelija. Selektivnost se jasno ogleda u sledećim primerima: ChCit ekstrakti Frankovke nisu značajnije uticali na LS 174T, dok je kod ostalih ćelija primećena inhibitorna aktivnost; semenke sorti Gamay i Začinak nisu uticale na zdrave ćelije, ali je inhibicija uočena kod malignih ćelijskih linija.

Slika 57 prikazuje procenat ćelijskog preživljavanja za sve tri ispitivane ćelijske linije (MRC-5, HeLa i LS 174T), pod uticajem a) etanolnih i b) ChCit ekstrakata semenki na primeru sorte Crna Tamjanika. Semenke ove sorte imale su najjači inhibitorni efekat na rast LS 174T ćelija (IC50=236,7 $\mu\text{g/ml}$).



Slika 57. Procenat ćelijskog preživljavanja MRC-5, HeLa i LS 174T pod uticajem a) etanolnih i b) ChCit ekstrakata semenki sorte Crna Tamjanika
MRC-5- fibroblasti pluća; HeLa- adenokarcinom jajnika; LS 174T- adenokarcinom kolona

Pojedine studije navode da su semenke deo ploda vinove loze sa najvećim citotoksičnim potencijalom (Nechita i sar., 2012). Pokazano je da semenke imaju jači inhibitorski efekat od pokožice muskat grožđa na rast ćelija humanog epidermalnog karcinoma (Grace Nirmala i sar., 2018). Smatra se takođe da ekstrakti semenki crvenog grožđa ispoljavaju veću citotoksičnost u odnosu na ekstrakte semenki belog grožđa (Igneu i sar., 2013).

Ispitivanja su uglavnom vršena na konvencionalnim ekstraktima. Prema dosadašnjim saznanjima, u literaturi nema podataka o citotoksičnoj aktivnosti ekstrakata semenki grožđa dobijenih upotrebom prirodnih eutektičkih rastvarača.

Iako su brojna istraživanja dala afirmativne rezultate, mehanizam citotoksične aktivnosti semenki još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Jedna studija koja se bavila analizom načina citotoksičnog delovanja ekstrakata semenki na ćelijama humanog karcinoma bešike je pokazala da ekstrakti ispoljavaju značajan inhibitorski efekat na vijabilnost ćelija usled indukcije oksidativnog stresa i posledične apoptoze (Raina i sar., 2013). Suprotno ovoj teoriji, drugi naučnici su isti efekat semenki grožđa

objasnili smanjenom produkcijom ROS (Decean i sar., 2016). Koncentracija azot oksida, koji se smatra regulatorom apoptoze je bila povećana u jednoj studiji koja se bavila ispitivanjem citotoksičnosti ekstrakata semenki grožđa. Smatra se da je do smrti ćelija došlo zbog prekomerne proizvodnje NO, kao i usled aktivacije endogene NO sintaze (Shao i sar., 2006). Nedavna studija je pokazala da ekstrakti semenki vinove loze svoj antitumorski efekat na hemio-rezistentan karcinom jajnika ispoljavaju ekspresijom tumor supresorskih gena koji stupaju u interakciju sa ćelijskim signalnim putevima, ćelijskim ciklusom i ćelijskom apoptozom (Homayoun i sar., 2020). Ovaj nalaz je potvrđen uz isticanje da je citotoksični efekat semenki dozno i vremenski zavisna (Aghbali i sar., 2013). Smatra se da ekstrakt semenki u opsegu koncentracija 25-50 mg/L deluje inhibitory na rast više humanih kancerskih ćelijskih linija (karcinom dojke, gastični adenokarcinom i karcinom pluća) (Ye i sar., 1999). Skorije sprovedeno istraživanje je potvrdilo efikasnost sličnih koncentracija (Zhou i sar., 2016).

Semenke različitih sorti različito utiču na vijabilnost ćelija, odnosno pretpostavlja se da njihov sastav određuje njihovu biološku aktivnost (ispitivanje je urađeno na 4 kancerske linije). Nije utvrđena statistički značajna korelacija između sadržaja ukupnih polifenola i citotoksične aktivnosti, mada je primećeno da sorte okarakterisane velikim TPC vrednostima imaju jak inhibitory efekat na rast ćelija (J. Sung & Lee, 2010). Najčešće se antitumorski efekat semenki grožđa povezuje sa delovanjem prisutnih oligomernih i polimernih flavan-3-ola (proantocijanidina). Utvrđeno je da proantocijanidini indukuju apoptozu u malignim ćelijama što je posledica povećane ekspresije tumor supresorskog proteina p53. Takođe, pokazano je da proantocijanidini dovode do smanjenja koncentracije antiapoptotičkih proteina Bcl-2 i Bcl-kl, dok je ekspresija pro-apoptotičkog proteina Bax povećana, kao i nivoi citohroma c, Apaf-1 (eng. *apoptotic protease-activating factor-1*), kaspaze-9, i odcepljene kaspaze 3 (p19 i p17) (Mantena, 2005; Roy i sar., 2005). Jedno zanimljivo istraživanje je pokazalo da iako epigalokatehin i proantocijanidini, individualno ili u kombinaciji imaju inhibitory efekat na rast malignih ćelija, citotoksičnost ekstrakta semenki grožđa potiče od ovih, ali i drugih prisutnih jedinjenja, kao i od njihovog međusobnog delovanja. Takođe, naglašeno je da efekat zavisi od tipa tumora, odnosno od njegovog histopatološkog tipa (Dinicola i sar., 2012). Primećeno je i da su npr. Caco-2 ćelije osetljivije od HT-29 ćelija (u oba slučaju u pitanju je model kancera kolona) na ekstrakte kome grožđa, odnosno semenki, kao i da njihova aktivnost najverovatnije potiče od flavan 3-ola i flavonola (Pérez-Ortiz i sar., 2019).

Ekstrakt semenki grožđa je takođe ispitivan kao adjuvantna terapija različitim hemioterapeuticima. Studija na životinjama je pokazala da proantocijanidini iz semenki imaju antitumorsko delovanje i povećavaju antitumorsku aktivnost doksorubicina, pretpostavlja se potenciranjem imunskog odgovora organizma (X.-Y. Zhang i sar., 2010). Jedno opsežno ispitivanje na Caco-2 ćelijskoj liniji uključivalo je 6 različitih frakcija proantocijanidina izolovanih iz semenki sorte Cabernet Sauvignon. Pokazano je da sve izolovane frakcije značajno smanjuju vijabilnost Caco-2 ćelija u poređenju sa kontrolom ($p < 0,05$), i da u kombinaciji sa 5-fluorouracilom, pojedine frakcije pojačavaju toksičnost citostatika. Štaviše, prilikom ispitivanja efekta samih proantocijanidina, primećeno je da neke frakcije ispoljavaju jači inhibitory efekat na vijabilnost Caco-2 ćelija u poređenju sa 5-fluorouracilom (Cheah i sar., 2014).

4.3.5.3. Antimikrobna aktivnost ekstrakata semenki grožđa

Antimikrobna aktivnost ekstrakata semenki ispitivana je mikrodilucionom metodom na tri mikroorganizma (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 i *Candida albicans* ATCC 10231). Rezultati su izraženi kao minimalna inhibitory koncentracija (MIK), u mg/mL.

Pokazano je da semenke grožđa ispoljavaju jači inhibitory efekat na rast ispitivanih mikroorganizama u odnosu na pokožicu. Ovakav nalaz je u skladu sa ranije sprovedenim istraživanjima (Nirmala &

Narendhirakannan, 2011; V. Silva i sar., 2018). Analogno je *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 bio najosetljiviji soj, mada aktivnost nije izostala ni kod *Escherichia coli* ATCC 8739 i *Candida albicans* ATCC 10231. MIK vrednosti kretale su se od 0,04 do 0,15 za *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, i od 0,075 do preko 0,6 mg/mL za *Escherichia coli* ATCC 8739 i *Candida albicans* ATCC 10231 (**Tabela 29**). Ekstrakti semenki Burgundac crni su ispoljili najjači inhibitorni efekat na rast ispitivanih mikroorganizama. Dobijeni rezultati su uporedivi sa literaturnim podacima za antimikrobnu aktivnost komine grožđa na istim patogenima (V. J. Cheng i sar., 2012).

Tabela 29. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) ekstrakata semenki grožđa za ispitivane sojeve

		Minimalna inhibitorna koncentracija (mg/mL)		
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
Gamay	EtOH	0,15	0,15	0,15
	ChCit	0,04	0,6	>0,6
Vranac	EtOH	0,15	0,15	0,075
	ChCit	0,04	>0,6	0,075
Burgundac crni	EtOH	0,04	0,15	0,15
	ChCit	0,04	0,6	>0,6
Začinak	EtOH	0,04	0,15	0,15
	ChCit	0,075	0,6	>0,6
Crna Tamjanika	EtOH	0,04	0,15	0,15
	ChCit	0,15	0,6	>0,6
Prokupac	EtOH	0,15	0,15	0,15
	ChCit	0,15	0,6	>0,6
Frankovka	EtOH	0,15	0,15	0,15
	ChCit	0,15	0,6	>0,6
Shiraz	EtOH	0,15	0,075	0,075
	ChCit	0,15	0,6	>0,6
	ChCit	0,3	>0,6	>0,6

EtOH- acidifikovani etanol; ChCit- eng. *choline chloride: citric acid*
Italic stilom su obeležene domaće sorte

Antimikrobna aktivnost semenki grožđa bila je fokus mnogobrojnih ispitivanja. Pokazano je da je ekstrakt semenki grožđa delotvorniji u slučaju Gram pozitivnih bakterija, što je očekivano uzimajući u obzir njihov strukturno jednostavan ćelijski zid (Butkhup i sar., 2016; Faisal i sar., 2015; Serra i sar., 2008). Takođe je utvrđeno da ekstrakt semenki deluje inhibitorno na rast različitih sojeva *Listeria* bakterija (Anastasiadi i sar., 2009; Bisha i sar., 2010). Pored *Listeria monocytogenes*, ekstrakt semenki grožđa inhibira rast i brojnih drugih patogena, poput *Aeromonas hydrophila* ATCC 7965, *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 3842, *Bacillus brevis* FMC 3, *Bacillus cereus* FMC 19, *Bacillus subtilis* IMG

22, *Enterococcus faecalis* ATCC 15753, *Escherichia coli* DM, *Klebsiella pneumoniae* FMC 5, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 i *Staphylococcus aureus* COWAN 1 (Baydar i sar., 2004).

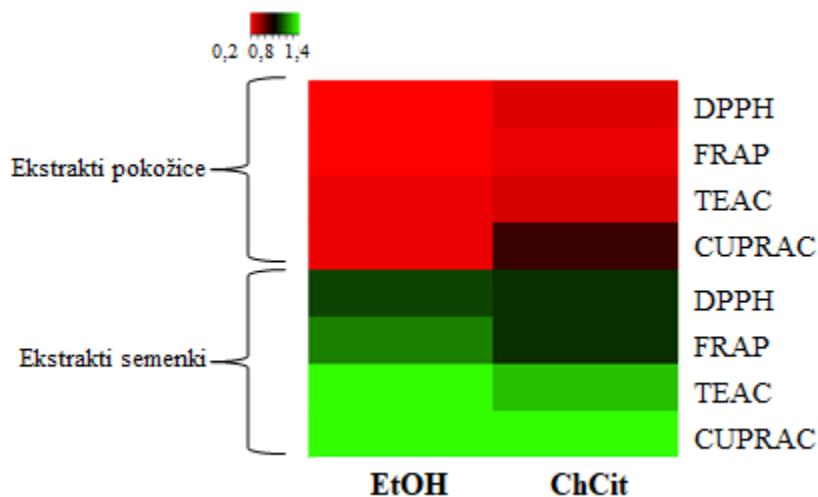
Najčešće su ekstrakti semenki pripremani upotrebom organskih rastvarača. Studije koje su za cilj imale poređenje rastvarača upotrebljenih za ekstrakciju radi dobijanja ekstrakata sa antimikrobnom aktivnošću su pokazale da nije bilo značajnih razlika među rastvaračima, ali je primećeno da ekstrakti bogatiji flavanolima i antocijanima, ispoljavaju intenzivniju antimikrobnu aktivnost (V. J. Cheng i sar., 2012). Do sličnog zaključka došlo se poređenjem acidifikovanog metanola i acidifikovanog acetona u pogledu efikasnosti ekstrakcije antimikrobnih agenasa (Jayaprakasha i sar., 2003).

Jedno istraživanje (Angelini i sar., 2022) je pokazalo da ekstrakti koji sadrže veće koncentracije katehina, ispoljavaju jaku antifungalnu aktivnost. Daljim ispitivanjem, naučnici su došli do zaključka da ovo delovanje nije isključivo posledica vezivanja katehina za lanosterol-14 α demetilazu (enzim uključen u metabolizam gljivica), pošto su za takav efekat potrebne veće koncentracije katehina, već da je u pitanju sinergizam delovanja katehina i drugih prisutnih jedinjenja. Galna kiselina je identifikovana kao jedinjenje odgovorno za inhibiciju rasta *Escherichia coli* i *Salmonella enteritidis* (Tesaki i sar., 1999). Dokazano je i da ekstrakt komine grožđa, kao i određena jedinjenja prisutna u plodu (kvercetin, galna kiselina, protokatehnična kiselina i luteolin) u kombinaciji sa antibioticima deluju sinergistički i inhibiraju rast *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* (Sanhueza i sar., 2017).

4.3.6. Razlike u biološkim aktivnostima organskih i eutektskih ekstrakata pokožice i semenki

Ispitivanja bioloških aktivnosti ekstrakata pokožice i semenki su dala heterogene nalaze, zbog čega je bilo potrebno izvršiti sublimaciju dobijenih rezultata.

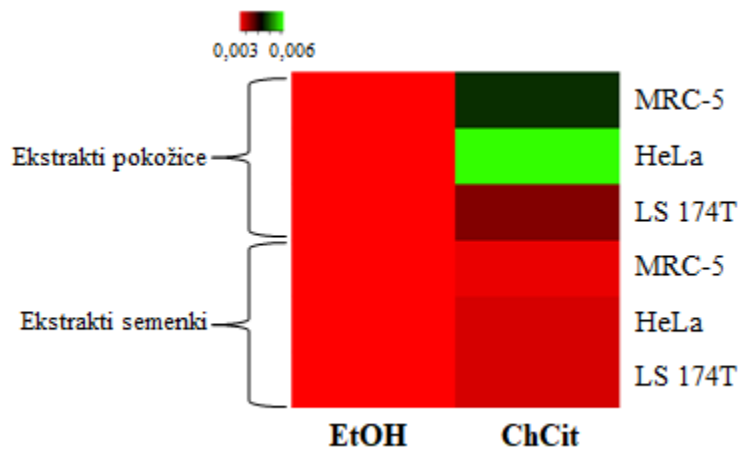
Antioksidativna aktivnost je ispitivana korišćenjem četiri različita testa. U **Tabeli 21** dati su rezultati dobijeni za etanolne i ChCit ekstrakte pokožice grožđa, dok se u **Tabeli 27** nalaze vrednosti određene za etanolne i ChCit ekstrakte semenki. Izračunate su srednje vrednosti za svaki test, i za oba rastvarača na osnovu čega je napravljena *Heat* mapa (**Slika 58**).



Slika 58. *Heat* mapa antioksidativne aktivnosti ekstrakata pokožice i semenki (poređenje efikasnosti dva rastvarača- EtOH i ChCit)

Razlike u boji potiču od većeg antioksidativnog potencijala semenki u odnosu na pokožicu (zeleno boja za ekstrakte semenki i crvena boja za ekstrakte pokožice). Kada je reč o ekstraktima pokožice (prva četiri reda), primećujemo da su ChCit ekstrakti imali jaču antioksidativnu aktivnost od etanolnih ekstrakata, bez obzira na upotrebljeni test (tamnija crvena boja). U slučaju ekstrakata semenki, tamnija zelena nijansa ukazuje na slabiju aktivnost, zbog čega zaključujemo da se etanol pokazao efikasnijim u ekstrakciji antioksidanasa iz ovog matriksa (izuzetak je CUPRAC test gde nema razlike među rastvaračima).

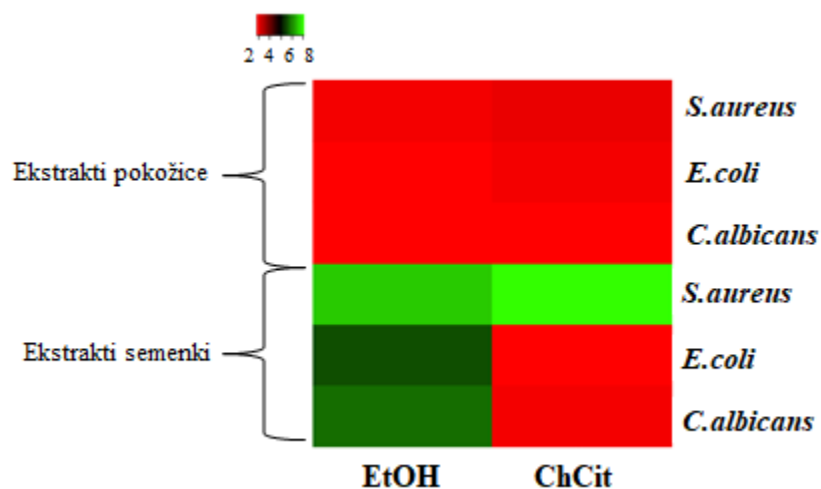
Citotoksičnost je evaluirana korišćenjem tri ćelijske linije (MRC-5, HeLa i LS 174T). Rezultati dobijeni za etanolne i ChCit ekstrakte za pokožicu i semenke prikazani su u **Tabeli 23** i u **Tabeli 28**, redom. Obzirom da se niže IC50 vrednosti odnose na veću citotoksičnu aktivnost, prvo su izračunate recipročne vrednosti. U slučajevima u kojima je citotoksičnost izostala (IC50>400 mg/mL) uzeta je granična vrednost, odnosno recipročna vrednost od 400 mg/mL. Zatim su za svaku ćelijsku liniju i svaki rastvarač izračunate srednje vrednosti za osam sorti. Na osnovu srednjih vrednosti, konstruisana je *Heat* mapa (**Slika 59**).



Slika 59. *Heat* mapa citotoksične aktivnosti ekstrakata pokožice i semenki (poređenje efikasnosti dva rastvarača- EtOH i ChCit)

Etanolni ekstrakti nisu ispoljili inhibitorni efekat na rast ćelija u okviru analiziranih koncentracija (prva kolona *Heat* mape). Ekstrakti pokožice su značajnije inhibirali rast ispitivanih ćelijskih linija, s obzirom da su izračunate srednje vrednosti veće što odgovara zelenim nijansama. HeLa ćelije su bile najosetljivije na ekstrakte pokožice. U slučaju ekstrakata semenki, značajnije je inhibiran rast malignih ćelija nego rast MRC-5.

Na kraju, kada je reč o antimikrobnoj aktivnosti ispitivanih ekstrakata, efekat je evaluiran na dva bakterijska soja i na jednom gljivičnom soju (**Tabela 24** i **Tabela 29**). Prvo su izračunate recipročne vrednosti (analogno citotoksičnoj aktivnosti i ovde je efekat jači ukoliko su vrednosti niže), a zatim je napravljena *Heat* mapa (**Slika 60**).



Slika 60. Heat mapa antimikrobne aktivnosti ekstrakata pokožice i semenki (poređenje efikasnosti dva rastvarača- EtOH i ChCit)

Ekstrakti semenki ispoljili su značajniju antimikrobnu aktivnost od ekstrakata pokožice (zelena boja). Poređenjem dva rastvarača u okviru ekstrakata pokožice, može se zaključiti da su ChCit ekstrakti ispoljili jači inhibitorski efekat na rast bakterijskih ćelija (tamnije crvene nijanse). Nije bilo razlike u aktivnosti između etanolnih i ChCit ekstrakata pokožice prema *C. albicans*. Etanolni ekstrakti su pokazali veći antimikrobni potencijal u slučaju semenki (izuzev *S. aureus*).

5. ZAKLJUČCI

Vinska industrija svake godine generiše velike količine organskog otpada što predstavlja ozbiljan problem, pre svega sa ekološkog aspekta. Otpad zaostao nakon procesa vinifikacije (komina) sastoji se od semenki i pokožice grožđa, a kako su ovi delovi ploda najbogatiji biološki aktivnim jedinjenjima, komina predstavlja biomaterijal sa ogromnim potencijalom iskorišćenja u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Na osnovu detaljne analize hemijskog sastava i biološke aktivnosti ekstrakata pokožice i semenki različitih sorti vinove loze (*Vitis vinifera*, L.), uz poseban osvrt na razlike koje potiču od upotrebljenog rastvarača („zeleni”, eutektički rastvarač je poređen sa široko korišćenim organskim rastvaračem), mogu se izvesti sledeći zaključci:



- Izvršena je optimizacija procesa ekstrakcije za hidrofilne ekstrakte i ona je pokazala da na prinos polifenolnih jedinjenja iz semenki grožđa najmanji uticaj ima dužina trajanja ekstrakcije, dok faktor odnos biljni materijal:rastvarač najviše definiše efikasnost ekstrakcije. Od značaja je i temperatura na kojoj se izvodi ekstrakcija, zatim interakcija vreme i odnos biljni materijal:rastvarač, kao i kvadratni faktori vremena i temperature.
- Utvrđeno je da sa porastom temperature raste efikasnost ekstrakcije polifenolnih jedinjenja, ali samo do određene vrednosti i da se sa porastom odnosa biljni materijal:rastvarač smanjuje ukupan sadržaj polifenola u ekstraktima.
- Određeni su optimalni uslovi, odnosno uslovi pri kojima se postiže maksimalna efikasnost ultrazvučne ekstrakcije: odnos biljni materijal: rastvarač - 1:10; vreme - 30 min, temperatura - 50 °C.



Analizirani su plodovi 24 sorte vinove loze, među kojima je osam domaćih; izvršeno je razdvajanje delova bobice (pokožica i semenke su posmatrani kao različiti entiteti), i pripremljeni su ekstrakti sa konvencionalnim rastvaračima - hidrofilni ekstrakti pokožice i hidrofilni i lipofilni ekstrakti semenki (ulja). Ekstrakti su ispitani u pogledu sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja i antioksidativnog potencijala. Antioksidativna aktivnost hidrofilnih ekstrakata ispitana je korišćenjem četiri različita testa, nakon čega su dobijene vrednosti objedinjene u vidu antioksidativnog kompozitnog indeksa (eng. *Antioxidant Composite Index*, ACI). Dodatno, određen je prinos ulja, sastav masnih kiselina i sastav i sadržaj tokoferola u uljima.

Hidrofilni ekstrakti pokožice

- Utvrđen je statistički značajno veći sadržaj polifenolnih jedinjenja u pokožicama sorti za crvena vina u poređenju sa pokožicama sorti za bela vina, kao i u pokožicama stonih sorti u odnosu na pokožice sorti za bela vina. Prisustvo pigmenta antocijana uslovalo je ove razlike.
- Domaće sorte su se odlikovale statistički značajno nižim sadržajem polifenola u ekstraktima pokožica u poređenju sa internacionalnim sortama.
- Uočene su velike razlike u ACI vrednostima između sorti. Izdvojile su se pokožice sorti za crvena vina - Cabernet Sauvignon, Vranac, Merlot, Shiraz i Začinak. Od stonih sorti, najveću antioksidativnu aktivnost ispoljila je pokožica Michele Palieri, sorte koja je karakteristična po izrazito tamnoj boji.

Hidrofilni ekstrakti semenki

- Hidrofilni ekstrakti semenki sadržali su značajno više polifenola nego ekstrakti pokožica.
- Nije bilo statistički značajnih razlika u sadržaju polifenola između ispitivanih sorti grožđa (sorte za bela vina, sorte za crvena vina i stone sorte, odnosno domaće i internacionalne sorte).
- Ubedljivo najveći antioksidativni kapacitet pokazale su semenke sorte Gamay, zatim Burgundac crni. Istakle su se ACI vrednosti određene za sorte Afuz-ali, Prokupac, Rizling Rajnski i Frankovka.

Lipofilni ekstrakti semenki (ulja)

- Prinos ulja iz semenki je značajno varirao; nije bilo statistički značajne razlike između prinosa ulja stonih i vinskih sorti, kao ni između domaćih i internacionalnih sorti.
- Identifikovano je ukupno 6 masnih kiselina u uljima, najzastupljenija je bila linolna kiselina.
- Ulje dobijeno iz semenki stonih sorti je imalo veći procenat zasićenih masnih kiselina (SFA), dok su se sa druge strane ulja vinskih sorti odlikovala većim procentom nezasićenih (UFA) i polinezasićenih masnih kiselina (PUFA). Statistička značajnost uočena je između sorti za bela vina i stonih sorti; sorte za bela vina dala su ulja sa manje zasićenih masnih kiselina (SFA), dok je zastupljenost UFA bila veća u ovim uljima. Poređenjem ulja koja su dobijena iz semenki domaćih i internacionalnih sorti grožđa, nisu uočene statistički značajne razlike u pogledu procentualne zastupljenosti pojedinih klasa masnih kiselina.
- Na osnovu masno-kiselinskog sastava izračunati su aterogeni potencijali ekstrahovanih ulja; najmanji aterogeni potencijal imala su ulja dobijena iz semenki sorti za bela vina, Smederevka, Italijanski Rizling i Chardonay, što se objašnjava malom procentualnom zastupljenošću SFA u njima.
- Izračunate COX vrednosti (parametar oksidativne stabilnosti) pokazale su da su najnestabilnija na oksidativne promene ulja iz semenki sorti Merlot i Drenak crveni usled značajnijeg prisustva nezasićenih masnih kiselina u njima.
- Određen je sastav i sadržaj tokoferola u uljima. Izolovane su tri frakcije: α - tokoferol, $\beta+\gamma$ - tokoferol i δ - tokoferol. α - tokoferol je bio najzastupljeniji u skoro svim uzorcima.
- Sadržaj ukupnih tokoferola kretao se u širokom opsegu, najveće količine su primećene u ulju sorte Smederevka.
- Lipofilni ekstrakti semenki sadržali su značajno manje polifenola nego hidrofilni ekstrakti semenki.
- Nije bilo statistički značajnih razlika u sadržaju polifenola u uljima između ispitivanih sorti grožđa (sorte za bela vina, sorte za crvena vina i stone sorte, odnosno domaće i internacionalne sorte).
- Ulje dobijeno iz semenki stone sorte Afuz-ali imalo je ubedljivo najjači antioksidativni potencijal. Kada je reč o sortama za bela vina, najveću antioksidativnu aktivnost imalo je ulje sorte Sauvignon Blanc, a u kategoriji sorti za crvena vina dominiralo je ulje Cabernet Sauvignon.



Za dalju detaljniju analizu polifenolnog sadržaja i sastava, kao i bioloških aktivnosti pokožice i semenki, odabrano je osam sorti vinove loze koje su se u prethodnom istraživanju pokazale kao najpotentnije (Gamay, Vranac, Burgundac crni, Začinak, Crna Tamjanika, Prokupac, Frankovka i Shiraz). Odabrani uzorci pripadali su kategoriji sorte za crvena vina, pri čemu su obuhvaćene tri domaće sorte koje su još uvek nedovoljno istražene (Začinak, Crna Tamjanika i Prokupac). Pripremljeni su hidrofilni ekstrakti korišćenjem organskog rastvarača (acidifikovani etanol) i eutektičkog rastvarača na bazi holin hlorida (ChCit- holin hlorid:limunska kiselina 2:1, 30% vode) kako bi se izvršilo poređenje njihove efikasnosti.

Biološka aktivnost korišćenog zelenog rastvarača

Pre početka korišćenja eutektičkog rastvarača ispitana je njegova biotoksičnost prema dve maligne ćelijske linije- HeLa i LS 174T, i prema jednoj normalnoj ćelijskoj liniji- MRC-5. Rastvarač ChCit je ispoljio citotoksični efekat na MRC-5 ćelijskoj liniji (fibroblasti pluća), pri koncentraciji od 278,44 µg/mL, dok citotoksičnost prema malignim ćelijama nije ispoljena ni pri najvećim koncentracijama. Ispitana je i antimikrobna aktivnost ChCit. Inhibitorni efekat rastvarača ChCit ispoljen je na rast Gram pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (MIK=0,3 mg/mL). *Escherichia coli* ATCC 8739 i *Candida albicans* ATCC 10231 nisu bile osetljive na delovanje ChCit (MIK>0,6 mg/mL).

Hemijski sastav ekstrakata pokožice

- Ekstrakti pokožica sorti Vranac, Shiraz i Začinak sadržali su najviše ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida, i ukupnih antocijana, bez obzira na upotrebljeni rastvarač.
- Pokazano je da su ChCit ekstrakti pokožice statistički značajno bogatiji polifenolnim jedinjenjima od etanolnih ekstrakata. ChCit je efikasnije ekstrahovao i antocijane, ali bez statističke značajnosti, usled velikih varijacija.
- Određeni su: sastav i sadržaj organskih kiselina i najznačajnijih polifenolnih jedinjenja u etanolnim i ChCit ekstraktima pokožice grožđa.
- Jabučna i vinska kiselina su bile najzastupljenije organske kiseline u svim ispitivanim uzorcima. Najčešće je u većoj koncentraciji bila prisutna jabučna, sa par izuzetaka. Galna kiselina je kvantifikovana u svim uzorcima, ali u značajno nižim koncentracijama. Protokatehnična kiselina je pronađena u tragovima. Flavan-3-oli su uglavnom bili prisutni u koncentracijama nižim od limita kvantifikacije. U kategoriji flavonola, kvantifikovana su dva jedinjenja; kvercetin je bio zastupljeniji od rutina u skoro svim uzorcima. Identifikovano je ukupno četiri jedinjenja iz grupe antocijana, malvidin-3-O-glukozid je bio dominantan.
- HPLC analiza dala je kontradiktorne rezultate kada je u pitanju efikasnost korišćenih rastvarača za ekstrakciju različitih klasa polifenolnih jedinjenja. Ipak, uočen je izvestan trend: etanol je češće potencirao ekstrakciju organskih kiselina, dok su upotrebom ChCit dobijeni ekstrakti bogatiji flavonolima i antocijanima. Veća efikasnost ChCit rastvarača u ekstrakciji ovih jedinjenja koja su karakteristična za pokožicu grožđa objašnjava veći sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja određen spektrofotometrijskim testovima u ChCit ekstraktima u poređenju sa etanolnim ekstraktima pokožice.

Biolška aktivnost ekstrakata pokožice

- ChCit ekstrakti su ispoljili jaču antioksidativnu aktivnost od etanolnih ekstrakata pokožice, pri čemu je u slučaju CUPRAC testa ta razlika imala statističku značajnost.
- Korelaciona analiza je pokazala da je antioksidativnost povezana sa sadržajem ukupnih polifenolnih jedinjenja određenih spektrofotometrijskim testovima, dok je korelacija testova antioksidativnosti sa rezultatima HPLC analize pokazala da postoji statistički značajna korelacija sa sadržajem antocijana.
- Dalja korelaciona analiza je pokazala da svi kvantifikovani antocijani značajno doprinose antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata pokožice.
- ChCit ekstrakti pokožice pokazali su umerenu citotoksičnost prema odabranim ćelijskim linijama (MRC-5, HeLa i LS 174T), dok je ista izostala kod etanolnih ekstrakata pri odabranim koncentracijama. HeLa ćelije su generalno bile najosetljivije na ekstrakte pokožice. ChCit ekstrakti sorte Vranac ispoljili su najjači citotoksični efekat. Pretpostavlja se da je citotoksičnost ekstrakata rezultat sinergizma između indukovane ćelijske acidifikacije usled korišćenja eutektičkog rastvarača i prisutnih polifenola.
- ChCit ekstrakti ispoljili su jači inhibitorski efekat na rast bakterijskih ćelija od etanolnih ekstrakata. Nije bilo razlike u aktivnosti između etanolnih i ChCit ekstrakata pokožice prema *C.albicans*. Najjači antimikrobni efekat imala je pokožica Vranac, pri čemu je ChCit ekstrakt ove sorte inhibirao rast svih ispitivanih sojeva.

Hemijski sastav ekstrakata semenki

- Najveći polifenolni sadržaj određen je za ekstrakte semenki sorti Burgundac crni, zatim Prokupac, bez obzira na upotrebljeni rastvarač.
- Etanol je pokazao malo veću ekstrakcionu efikasnost u pogledu sadržaja ukupnih polifenola, flavonoida i flavan-3-ola od ChCit, ali bez statističke značajnosti.
- Ispitan je sastav i sadržaj organskih kiselina i najznačajnijih polifenolnih jedinjenja u etanolnim i ChCit ekstraktima semenki grožđa.
- U ekstraktima semenki najzastupljenija je bila vinska kiselina, zatim jabučna i galna kiselina. Protokatehnična kiselina je pronađena u značajno manjim količinama. Flavan-3-oli su kvantifikovani u najvećim koncentracijama, uglavnom su ekstrakti sadržali više (+)-katehina od (-)-epikatehina. Dimer procijanidin B1 je bio najzastupljenije jedinjenje iz ove grupe u skoro svim uzorcima.
- Etanol je u većini slučajeva pokazao bolju ekstrakcionu efikasnost u poređenju sa ChCit.

Biolška aktivnost ekstrakata semenki

- Pokazano je da između etanolnih i ChCit ekstrakata semenki nema statistički značajnih razlika u pogledu antioksidativne aktivnosti, bez obzira na metodu, iako je etanol bio efikasniji.
- Antioksidativna aktivnost etanolnih ekstrakata bila je u statistički značajnoj korelaciji sa sadržajem ukupnih polifenola, dok je antioksidativna aktivnost ChCit ekstrakata bila u značajnoj korelaciji sa gotovo svim polifenolnim jedinjenjima.
- ChCit ekstrakti semenki pokazali su umerenu citotoksičnost prema odabranim ćelijskim linijama (MRC 5, HeLa i LS 174T), dok je ista izostala kod etanolnih ekstrakata pri definisanim koncentracijama.

- ChCit ekstrakti sorte Crna Tamjanika su se izdvojili najjačim citotoksičnim efektom. Analogno pokožici, pretpostavlja se da je citotoksičnost ChCit ekstrakata rezultat sinergizma između indukovane ćelijske acidifikacije i prisutnih polifenola.
- Etanolni ekstrakti semenki su pokazali veći antimikrobni potencijal od ChCit ekstrakata (izuzev *S.aureus* gde su ChCit ekstrakti semenki bili potentniji).
- Ekstrakti semenki Burgundac crni su ispoljili najjači inhibitorski efekat na rast ispitivanih mikroorganizama.



Heat mape napravljene na osnovu rezultata dobijenih u okviru treće i četvrte faze su pokazale da ekstrakti pokožice i semenki različitih sorti grožđa ispoljavaju selektivnu aktivnost, što se objašnjava prisustvom i koncentracijom različitih biološki aktivnih jedinjenja. Antioksidativna aktivnost ekstrakata semenki bila je značajno veća nego antioksidativna aktivnost ekstrakata pokožice, bez obzira na upotrebljeni rastvarač. ChCit je favorizovao ekstrakciju antioksidanasa iz pokožice, dok je etanol efikasnije ekstrahovao antioksidanse iz semenki. Ekstrakti pokožice su jače inhibirali rast malignih ćelija u poređenju sa ekstraktima semenki, pretpostavlja se zbog prisustva specifičnih jedinjenja. Ekstrakti semenki odlikovali su se jačom antimikrobnom aktivnošću od ekstrakata pokožice. ChCit ekstrakti pokožice imali su veći antimikrobni potencijal od etanolnih ekstrakata pokožice. Sa druge strane, etanolni ekstrakti semenki efikasnije su inhibirali rast mikroorganizama od ChCit ekstrakata semenki.



Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji su prošili znanja o sastavu i sadržaju biološki aktivnih sastojaka u različitim delovima grožđa. Ispitivanje je izvršeno na velikom broju sorti, a obzirom da su obuhvaćene i domaće sorte o kojima nema dovoljno literaturnih podataka, dat je značajan doprinos boljem razumevanju sortnog diverziteta u Srbiji. Ispitivanje efikasnosti ChCit je dalo afirmativne rezultate i otvorilo novu temu za detaljnije ispitivanje NADES-a, nakon čega bi eutektski rastvarači potencijalno našli primenu u vinskoj industriji za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz komine grožđa. Na ovaj način bi se zadovoljili principi zelene hemije i vinska industrija bi se usmerila ka uspostavljanju održivog razvoja što predstavlja imperativ 21. veka.

6. LITERATURA

- Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Munro, H. L., Rasheed, R. K., & Tambyrajah, V. (2001). Preparation of novel, moisture-stable, Lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains. *Chemical Communications*, 19, 2010–2011. <https://doi.org/10.1039/b106357j>
- Adams, D. O. (2006). Phenolics and Ripening in Grape Berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 249–256. <https://doi.org/10.5344/ajev.2006.57.3.249>
- Aghbali, A., Vosough Hosseini, S., Delaza, A. R., Kalbasi Gharavi, N., Zare Shahneh, F., Orangi, M., Bandehagh, A., & Baradaran, B. (2013). Induction of apoptosis by grape seed extract (*Vitis vinifera*) in oral squamous cell carcinoma. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 13(3), 186. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2013.2360>
- Al Juhaimi, F., Geçgel, Ü., Gülcü, M., Hamurcu, M., & Özcan, M. M. (2017). Bioactive Properties, Fatty Acid Composition and Mineral Contents of Grape Seed and Oils. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 38(2). <https://doi.org/10.21548/38-1-1042>
- Alañón, M. E., Ivanović, M., Gómez-Caravaca, A. M., Arráez-Román, D., & Segura-Carretero, A. (2020). Choline chloride derivative-based deep eutectic liquids as novel green alternative solvents for extraction of phenolic compounds from olive leaf. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 1685–1701. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.01.003>
- Alrugaibah, M., Washington, T. L., Yagiz, Y., & Gu, L. (2021). Ultrasound-assisted extraction of phenolic acids, flavonols, and flavan-3-ols from muscadine grape skins and seeds using natural deep eutectic solvents and predictive modelling by artificial neural networking. *Ultrasonics Sonochemistry*, 79, 105773. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105773>
- Amienyo, D., Camilleri, C., & Azapagic, A. (2014). Environmental impacts of consumption of Australian red wine in the UK. *Journal of Cleaner Production*, 72, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.02.044>
- Anastas, P. T., & Warner, J. C. (1998). *Green chemistry: Theory and practice*. Oxford University Press.
- Anastasiadi, M., Chorianopoulos, N. G., Nychas, G.-J. E., & Haroutounian, S. A. (2009). Antilisterial Activities of Polyphenol-Rich Extracts of Grapes and Vinification Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(2), 457–463. <https://doi.org/10.1021/jf8024979>
- Angelini, P., Flores, G. A., Piccirilli, A., Venanzoni, R., Acquaviva, A., Di Simone, S. C., Libero, M. L., Tirillini, B., Zengin, G., Chiavaroli, A., Recinella, L., Leone, S., Brunetti, L., Orlando, G., Menghini, L., & Ferrante, C. (2022). Polyphenolic composition and antimicrobial activity of extracts obtained from grape processing by-products: Between green biotechnology and nutraceutical. *Process Biochemistry*, 118, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.04.019>

- Antony, A., & Farid, M. (2022). Effect of Temperatures on Polyphenols during Extraction. *Applied Sciences*, 12(4), 2107. <https://doi.org/10.3390/app12042107>
- Asghar Bataleblu, A. (2020). Computational Intelligence and Its Applications in Uncertainty-Based Design Optimization. Y Y. Lai Zhou & M. Abdel Wahab (Yp.), *Bridge Optimization—Inspection and Condition Monitoring*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81689>
- Atanasiu, R. L., Stea, D., Mateescu, M. A., Vergely, C., Dalloz, F., Briot, F., Maupoil, V., Nadeau, R., & Rochette, L. (1998). Direct evidence of caeruloplasmin antioxidant properties. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 189(1/2), 127–135. <https://doi.org/10.1023/A:1006945713860>
- Attard, E. (2013). A rapid microtitre plate Folin-Ciocalteu method for the assessment of polyphenols. *Open Life Sciences*, 8(1), 48–53. <https://doi.org/10.2478/s11535-012-0107-3>
- Aubert, C., & Chalot, G. (2018). Chemical composition, bioactive compounds, and volatiles of six table grape varieties (*Vitis vinifera* L.). *Food Chemistry*, 240, 524–533. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.152>
- Babbar, N., Oberoi, H. S., Uppal, D. S., & Patil, R. T. (2011). Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Research International*, 44(1), 391–396. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.001>
- Baiano, A. (2021). An Overview on Sustainability in the Wine Production Chain. *Beverages*, 7(1), 15. <https://doi.org/10.3390/beverages7010015>
- Baiano, A., & Terracone, C. (2011). Varietal Differences among the Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Seven Table Grape Cultivars Grown in the South of Italy Based on Chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(18), 9815–9826. <https://doi.org/10.1021/jf203003c>
- Bail, S., Stuebiger, G., Krist, S., Unterweger, H., & Buchbauer, G. (2008). Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 108(3), 1122–1132. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.063>
- Bakkalbaşı, E., Yemiş, O., Aslanova, D., & Artık, N. (2005). Major flavan-3-ol composition and antioxidant activity of seeds from different grape cultivars grown in Turkey. *European Food Research and Technology*, 221(6), 792–797. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0050-x>
- Barba, F. J., Brianceau, S., Turk, M., Boussetta, N., & Vorobiev, E. (2015). Effect of Alternative Physical Treatments (Ultrasounds, Pulsed Electric Fields, and High-Voltage Electrical Discharges) on Selective Recovery of Bio-compounds from Fermented Grape Pomace. *Food and Bioprocess Technology*, 8(5), 1139–1148. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1482-3>
- Baş, D., & Boyacı, İ. H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 836–845. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024>
- Baydar, N. G., & Akkurt, M. (2001). *Oil Content and Oil Quality Properties of Some Grape Seeds*.

- Baydar, N. G., Özkan, G., & Sađđiç, O. (2004). Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*, *15*(5), 335–339. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(03\)00083-5](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(03)00083-5)
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Baćun-Družina, V., & Komes, D. (2018). Overview of polyphenols and their properties. *Y Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00001-4>
- Benzie, I. F. F. (2000). Evolution of antioxidant defence mechanisms. *European Journal of Nutrition*, *39*(2), 53–61. <https://doi.org/10.1007/s003940070030>
- Beres, C., Costa, G. N. S., Cabezudo, I., Da Silva-James, N. K., Teles, A. S. C., Cruz, A. P. G., Mellinger-Silva, C., Tonon, R. V., Cabral, L. M. C., & Freitas, S. P. (2017). Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Management*, *68*, 581–594. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.017>
- Bešlić, Z. (2019). *Vinogradarstvo*. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu.
- Beslic, Z., Pantelic, M., Dabic, D., Todic, S., Natic, M., & Tesic, Z. (2015). Effect of vineyard floor management on water regime, growth response, yield and fruit quality in Cabernet Sauvignon. *Scientia Horticulturae*, *197*, 650–656. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.029>
- Beslic, Z., Todic, S., Nada, K., Lorenzi, S., Emanuelli, F., & Grando, M. (2012). Genetic characterization and relationships of traditional grape cultivars from Serbia. *Vitis - Geilweilerhof*, *51*, 183–189.
- Beveridge, T. H. J., Girard, B., Kopp, T., & Drover, J. C. G. (2005). Yield and Composition of Grape Seed Oils Extracted by Supercritical Carbon Dioxide and Petroleum Ether: Varietal Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(5), 1799–1804. <https://doi.org/10.1021/jf040295q>
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, *76*(5), 965–977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
- Bisha, B., Weinsattel, N., Brehm-Stecher, B. F., & Mendonca, A. (2010). Antilisterial Effects of Gravinol-S Grape Seed Extract at Low Levels in Aqueous Media and Its Potential Application as a Produce Wash. *Journal of Food Protection*, *73*(2), 266–273. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.2.266>
- Blesic, M., Dragutin, M., Radić, G., & Blesić, S. (2013). *Praktično vinogradarstvo i vinarstvo*.
- Bolanos De La Torre, A. A. S., Henderson, T., Nigam, P. S., & Owusu-Apenten, R. K. (2015). A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey. *Food Chemistry*, *174*, 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.009>

- Bolzonella, D., Papa, M., Da Ros, C., Anga Muthukumar, L., & Rosso, D. (2019). Winery wastewater treatment: A critical overview of advanced biological processes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(4), 489–507. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1573799>
- Bouarab Chibane, L., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J., & Oulahal, N. (2019). Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives: Plant polyphenols for food preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(4), 1457–1474. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9357>
- Boussetta, N., Vorobiev, E., Deloison, V., Pochez, F., Falcimaigne-Cordin, A., & Lanoisellé, J.-L. (2011). Valorisation of grape pomace by the extraction of phenolic antioxidants: Application of high voltage electrical discharges. *Food Chemistry*, 128(2), 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.035>
- Boyacı, İ. H. (2005). A new approach for determination of enzyme kinetic constants using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 25(1), 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.04.001>
- Bozan, B., Tosun, G., & Özcan, D. (2008). Study of polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antiradical activity. *Food Chemistry*, 109(2), 426–430. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.056>
- Braga, F. G., Lencart E Silva, F. A., & Alves, A. (2002). Recovery of Winery By-products in the Douro Demarcated Region: Production of Calcium Tartrate and Grape Pigments. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53(1), 41–45. <https://doi.org/10.5344/ajev.2002.53.1.41>
- Bräunlich, M., Slimestad, R., Wangensteen, H., Brede, C., Malterud, K., & Barsett, H. (2013). Extracts, Anthocyanins and Procyanidins from *Aronia melanocarpa* as Radical Scavengers and Enzyme Inhibitors. *Nutrients*, 5(3), 663–678. <https://doi.org/10.3390/nu5030663>
- Bravo, L. (2009). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
- Brejijeh, Z., Jubeh, B., & Karaman, R. (2020). Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules*, 25(6), 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>
- Brenes, A., Viveros, A., Chamorro, S., & Arija, I. (2016). Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. *Animal Feed Science and Technology*, 211, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.016>
- Brown, J. C., Huang, G., Haley-Zitlin, V., & Jiang, X. (2009). Antibacterial Effects of Grape Extracts on *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3), 848–852. <https://doi.org/10.1128/AEM.01595-08>
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Jakobek, L., & Šeruga, M. (2009). Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and colour of extract: **Phenolic extraction from grape seed**. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(12), 2394–2401. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01876.x>

- Burić, D. (1972). *Vinogradarstvo*. Radnički Univerzitet „Radivoj Ćirpanov“, Centar za dijafilm i izdavačku delatnost.
- Butkhup, L., Chowtivannakul, S., Gaensakoo, R., Prathepha, P., & Samappito, S. (2016). Study of the Phenolic Composition of Shiraz Red Grape Cultivar (*Vitis vinifera* L.) Cultivated in North-eastern Thailand and its Antioxidant and Antimicrobial Activity. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 31(2). <https://doi.org/10.21548/31-2-1405>
- Cádiz-Gurrea, M., Borrás-Linares, I., Lozano-Sánchez, J., Joven, J., Fernández-Arroyo, S., & Segura-Carretero, A. (2017). Cocoa and Grape Seed Byproducts as a Source of Antioxidant and Anti-Inflammatory Proanthocyanidins. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 376. <https://doi.org/10.3390/ijms18020376>
- Caldas, T. W., Mazza, K. E. L., Teles, A. S. C., Mattos, G. N., Brígida, A. I. S., Conte-Junior, C. A., Borguini, R. G., Godoy, R. L. O., Cabral, L. M. C., & Tonon, R. V. (2018). Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 111, 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.012>
- Calder, P. C. (2015). Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 39(1_suppl), 18S-32S. <https://doi.org/10.1177/0148607115595980>
- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5), 749–760. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00351-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00351-6)
- Çetinkaya, Y., Göçer, H., Menzek, A., & Gülçin, İ. (2012). Synthesis and Antioxidant Properties of (3,4-Dihydroxyphenyl)(2,3,4-trihydroxyphenyl)methanone and Its Derivatives. *Archiv Der Pharmazie*, 345(4), 323–334. <https://doi.org/10.1002/ardp.201100272>
- Chand, R., Narimura, K., Kawakita, H., Ohto, K., Watari, T., & Inoue, K. (2009). Grape waste as a biosorbent for removing Cr(VI) from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, 163(1), 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.084>
- Chanioti, S., & Tzia, C. (2018). Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 48, 228–239. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.07.001>
- Cheah, K. Y., Howarth, G. S., Bindon, K. A., Kennedy, J. A., & Bastian, S. E. P. (2014). Low Molecular Weight Procyanidins from Grape Seeds Enhance the Impact of 5-Fluorouracil Chemotherapy on Caco-2 Human Colon Cancer Cells. *PLoS ONE*, 9(6), e98921. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098921>
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>

- Chen, J., Thilakarathna, W. P. D. W., Astatkie, T., & Rupasinghe, H. P. V. (2020). Optimization of Catechin and Proanthocyanidin Recovery from Grape Seeds Using Microwave-Assisted Extraction. *Biomolecules*, *10*(2), 243. <https://doi.org/10.3390/biom10020243>
- Cheng, G., Fa, J.-Q., Xi, Z.-M., & Zhang, Z.-W. (2015). Research on the quality of the wine grapes in corridor area of China. *Food Science and Technology (Campinas)*, *35*(1), 38–44. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6455>
- Cheng, V. J., Bekhit, A. E.-D. A., McConnell, M., Mros, S., & Zhao, J. (2012). Effect of extraction solvent, waste fraction and grape variety on the antimicrobial and antioxidant activities of extracts from wine residue from cool climate. *Food Chemistry*, *134*(1), 474–482. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.103>
- Chirinos, R., Zuloeta, G., Pedreschi, R., Mignolet, E., Larondelle, Y., & Campos, D. (2013). Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): A seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, *141*(3), 1732–1739. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.078>
- Chu, A. (2014). Antagonism by Bioactive Polyphenols Against Inflammation: A Systematic View. *Inflammation & Allergy-Drug Targets*, *13*(1), 34–64. <https://doi.org/10.2174/1871528112666131119211002>
- Cindrić, P., Korać, N., Medić, M., & Ivanišević, D. (2019). *Ampelografija I selekcija vinove loze*. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Clément, M. V., Hirpara, J. L., Chawdhury, S. H., & Pervaiz, S. (1998). Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood*, *92*(3), 996–1002.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A. C. P., Tavares, R. M., Sousa, M. J., Agasse, A., Delrot, S., & Gerós, H. (2007). *Biochemical Changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality*.
- Corrales, M., Fernandez, A., Vizoso Pinto, M. G., Butz, P., Franz, C. M. A. P., Schuele, E., & Tauscher, B. (2010). Characterization of phenolic content, in vitro biological activity, and pesticide loads of extracts from white grape skins from organic and conventional cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(12), 3471–3476. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.09.025>
- Cosme, F., Pinto, T., & Vilela, A. (2018). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Grape Juices: A Chemical and Sensory View. *Beverages*, *4*(1), 22. <https://doi.org/10.3390/beverages4010022>
- Costa, E., Cosme, F., Jordão, A. M., & Mendes-Faia, A. (2014). Anthocyanin profile and antioxidant activity from 24 grape varieties cultivated in two Portuguese wine regions. *OENO One*, *48*(1), 51. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2014.48.1.1661>
- Cowan, M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, *12*(4), 564–582. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>

- Crews, C., Hough, P., Godward, J., Brereton, P., Lees, M., Guiet, S., & Winkelmann, W. (2006). Quantitation of the Main Constituents of Some Authentic Grape-Seed Oils of Different Origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), 6261–6265. <https://doi.org/10.1021/jf060338y>
- Cui, Z., Enjome Djocki, A. V., Yao, J., Wu, Q., Zhang, D., Nan, S., Gao, J., & Li, C. (2021). COSMO-SAC-supported evaluation of natural deep eutectic solvents for the extraction of tea polyphenols and process optimization. *Journal of Molecular Liquids*, 328, 115406. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115406>
- Cunha, V. M. B., Silva, M. P. D., Sousa, S. H. B. D., Bezerra, P. D. N., Menezes, E. G. O., Silva, N. J. N. D., Banna, D. A. D. D. S., Araújo, M. E., & Carvalho Junior, R. N. D. (2019). Bacaba-de-leque (*Oenocarpus distichus* Mart.) oil extraction using supercritical CO₂ and bioactive compounds determination in the residual pulp. *The Journal of Supercritical Fluids*, 144, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.10.010>
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343–356. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>
- Cvjetko Bubalo, M., Ćurko, N., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., & Radojčić Redovniković, I. (2016). Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 200, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.040>
- Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., & Jokić, S. (2015). Green solvents for green technologies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90(9), 1631–1639. <https://doi.org/10.1002/jctb.4668>
- Czechowska-Biskup, R., Rokita, B., Lotfy, S., Ulanski, P., & Rosiak, J. M. (2005). Degradation of chitosan and starch by 360-kHz ultrasound. *Carbohydrate Polymers*, 60(2), 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.12.001>
- Da Porto, C., Porretto, E., & Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(4), 1076–1080. <https://doi.org/10.1016/j.ulsonch.2012.12.002>
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>
- Dai, Y., Rozema, E., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2016). Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. *Journal of Chromatography A*, 1434, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.037>
- De Camargo, A. C., Biasoto, A. C. T., Schwember, A. R., Granato, D., Rasera, G. B., Franchin, M., Rosalen, P. L., Alencar, S. M., & Shahidi, F. (2019). Should we ban total phenolics and antioxidant screening methods? The link between antioxidant potential and activation of NF- κ B using phenolic compounds from grape by-products. *Food Chemistry*, 290, 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.145>

- De La Cerda-Carrasco, A., López-Solís, R., Nuñez-Kalasic, H., Peña-Neira, Á., & Obreque-Slier, E. (2015). Phenolic composition and antioxidant capacity of pomaces from four grape varieties (*Vitis vinifera* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(7), 1521–1527. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6856>
- De Sales, N., Silva Da Costa, L., Carneiro, T., Minuzzo, D., Oliveira, F., Cabral, L., Torres, A., & El-Bacha, T. (2018). Anthocyanin-Rich Grape Pomace Extract (*Vitis vinifera* L.) from Wine Industry Affects Mitochondrial Bioenergetics and Glucose Metabolism in Human Hepatocarcinoma HepG2 Cells. *Molecules*, 23(3), 611. <https://doi.org/10.3390/molecules23030611>
- Dean, J. R. (2009). *Extraction techniques in analytical sciences*. Wiley.
- Decean, H., Fischer-Fodor, E., Tatomir, C., Perde-Schrepler, M., Somfelean, L., Burz, C., Hodor, T., Orasan, R., & Virag, P. (2016). *Vitis vinifera* seeds extract for the modulation of cytosolic factors Bax- α and NF- κ B involved in UVB-induced oxidative stress and apoptosis of human skin cells. *Medicine and Pharmacy Reports*, 89(1), 72–81. <https://doi.org/10.15386/cjmed-508>
- Demirtas, I., Pelvan, E., Özdemir, İ. S., Alasalvar, C., & Ertas, E. (2013). Lipid characteristics and phenolics of native grape seed oils grown in Turkey. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(6), 641–647. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200159>
- Dennis, E. A., & Norris, P. C. (2015). Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 15(8), 511–523. <https://doi.org/10.1038/nri3859>
- Dias, M. C., Pinto, D. C. G. A., & Silva, A. M. S. (2021). Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*, 26(17), 5377. <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>
- Dimić, I., Teslić, N., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Zeković, Z., Šojić, B., Mrkonjić, Ž., Čolović, D., Montesano, D., & Pavlić, B. (2020). Innovative and Conventional Valorizations of Grape Seeds from Winery By-Products as Sustainable Source of Lipophilic Antioxidants. *Antioxidants*, 9(7), 568. <https://doi.org/10.3390/antiox9070568>
- Dinicola, S., Cucina, A., Pasqualato, A., D'Anselmi, F., Proietti, S., Lisi, E., Pasqua, G., Antonacci, D., & Bizzarri, M. (2012). Antiproliferative and Apoptotic Effects Triggered by Grape Seed Extract (GSE) versus Epigallocatechin and Procyanidins on Colon Cancer Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(1), 651–664. <https://doi.org/10.3390/ijms13010651>
- Dionisi, F., Prodollet, J., & Tagliaferri, E. (1995). Assessment of olive oil adulteration by reversed-phase high-performance liquid chromatography/ampereometric detection of tocopherols and tocotrienols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72(12), 1505–1511. <https://doi.org/10.1007/BF02577844>
- Donohue, J. M., Houck, E. C., & Myers, R. H. (1995). Simulation Designs for the Estimation of Quadratic Response Surface Gradients in the Presence of Model Misspecification. *Management Science*, 41(2), 244–262. <https://doi.org/10.1287/mnsc.41.2.244>
- Dröge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>

- Drosou, C., Kyriakopoulou, K., Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., & Krokida, M. (2015). A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Industrial Crops and Products*, 75, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.063>
- Duba, K. S., Casazza, A. A., Mohamed, H. B., Perego, P., & Fiori, L. (2015). Extraction of polyphenols from grape skins and defatted grape seeds using subcritical water: Experiments and modeling. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.01.001>
- Dubois, V., Breton, S., Linder, M., Fanni, J., & Parmentier, M. (2007). Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(7), 710–732. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700040>
- Dwyer, K., Hosseinian, F., & Rod, M. (2014). The Market Potential of Grape Waste Alternatives. *Journal of Food Research*, 3(2), 91. <https://doi.org/10.5539/jfr.v3n2p91>
- Faisal, K., Mosammad, S. S., & Heri, K. (2015). Antimicrobial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) pomace polyphenols as a source of naturally occurring bioactive components. *African Journal of Biotechnology*, 14(26), 2157–2161. <https://doi.org/10.5897/AJB2015.14617>
- FAO/STAT. (2021). <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- FAO/STAT. (/). <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>
- Farhadi, K., Esmaeilzadeh, F., Hatami, M., Forough, M., & Molaie, R. (2016). Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed, cane and leaf of five native grape cultivars in West Azerbaijan province, Iran. *Food Chemistry*, 199, 847–855. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.083>
- Fatemi, S. H., & Hammond, E. G. (1980). Analysis of oleate, linoleate and linolenate hydroperoxides in oxidized ester mixtures. *Lipids*, 15(5), 379–385. <https://doi.org/10.1007/BF02533555>
- Fernandes, L., Casal, S., Cruz, R., Pereira, J. A., & Ramalhosa, E. (2013). Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Research International*, 50(1), 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.039>
- FIVS. (2016). <https://www.fivs.org/wp-content/uploads/FIVS-Global-Wine-Producers-Environmental-Sustainability-Principles.pdf>
- Flamini, R., Mattivi, F., Rosso, M., Arapitsas, P., & Bavaresco, L. (2013). Advanced Knowledge of Three Important Classes of Grape Phenolics: Anthocyanins, Stilbenes and Flavonols. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 19651–19669. <https://doi.org/10.3390/ijms141019651>
- Flannigan, D. J., & Suslick, K. S. (2010). Inertially confined plasma in an imploding bubble. *Nature Physics*, 6(8), 598–601. <https://doi.org/10.1038/nphys1701>

- Fontana, A. R., Antonioli, A., & Bottini, R. (2013). Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(38), 8987–9003. <https://doi.org/10.1021/jf402586f>
- Francisco, M., Van Den Bruinhorst, A., Zubeir, L. F., Peters, C. J., & Kroon, M. C. (2013). A new low transition temperature mixture (LTTM) formed by choline chloride+lactic acid: Characterization as solvent for CO₂ capture. *Fluid Phase Equilibria*, *340*, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2012.12.001>
- Fredman, G., & Tabas, I. (2017). Boosting Inflammation Resolution in Atherosclerosis. *The American Journal of Pathology*, *187*(6), 1211–1221. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.01.018>
- Fu, X., Wang, D., Belwal, T., Xie, J., Xu, Y., Li, L., Zou, L., Zhang, L., & Luo, Z. (2021). Natural deep eutectic solvent enhanced pulse-ultrasonication assisted extraction as a multi-stability protective and efficient green strategy to extract anthocyanin from blueberry pomace. *LWT*, *144*, 111220. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111220>
- Fulda, S. (2010). Resveratrol and derivatives for the prevention and treatment of cancer. *Drug Discovery Today*, *15*(17–18), 757–765. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.07.005>
- Fuleki, T., & Ricardo Da Silva, J. M. (1997). Catechin and Procyanidin Composition of Seeds from Grape Cultivars Grown in Ontario. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(4), 1156–1160. <https://doi.org/10.1021/jf960493k>
- Gagic, Z., Ivkovic, B., Nikolic, K., & Agbaba, D. (2014). Application of thin layer and column chromatography in monitoring the synthesis of α -tocopheryl-lysine ester. *Arhiv Za Farmaciju*, *64*(3), 261–270. <https://doi.org/10.5937/arhfarm1403261G>
- Galati, G., & O'Brien, P. J. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine*, *37*(3), 287–303. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.034>
- Garavaglia, J., Markoski, M. M., Oliveira, A., & Marcadenti, A. (2016). Grape Seed Oil Compounds: Biological and Chemical Actions for Health. *Nutrition and Metabolic Insights*, *9*, NMIS32910. <https://doi.org/10.4137/NMIS32910>
- Georgiev, V., Ananga, A., & Tsoleva, V. (2014). Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. *Nutrients*, *6*(1), 391–415. <https://doi.org/10.3390/nu6010391>
- Gonzalez, A. S. B., Francisco, M., Jimeno, G., De Dios, S. L. G., & Kroon, M. C. (2013). Liquid–liquid equilibrium data for the systems {LTTM+benzene+hexane} and {LTTM+ethyl acetate+hexane} at different temperatures and atmospheric pressure. *Fluid Phase Equilibria*, *360*, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2013.09.010>
- Grace Nirmala, J., Evangeline Celsia, S., Swaminathan, A., Narendhirakannan, R. T., & Chatterjee, S. (2018). Cytotoxicity and apoptotic cell death induced by *Vitis vinifera* peel and seed extracts in A431 skin cancer cells. *Cytotechnology*, *70*(2), 537–554. <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0125-0>

- Guendouze-Boucheffa, N., Madani, K., Chibane, M., Boulekbache-Makhlouf, L., Hauchard, D., Kiendrebeogo, M., Stévigny, C., Okusa, P. N., & Duez, P. (2015). Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of three Ericaceae from Algeria. *Industrial Crops and Products*, 70, 459–466. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.053>
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
- Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412–429. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>
- Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W., & Riechel, T. L. (1998). High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1887–1892. <https://doi.org/10.1021/jf970975b>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine* (Fifth edition). Oxford University Press.
- Hanrahan, G., & Lu, K. (2006). Application of Factorial and Response Surface Methodology in Modern Experimental Design and Optimization. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 36(3–4), 141–151. <https://doi.org/10.1080/10408340600969478>
- Harbeoui, H., Bettaieb Rebey, I., Ouerghemmi, I., Aidi Wannas, W., Zemni, H., Zoghalmi, N., Khan, N. A., Ksouri, R., & Tounsi, M. S. (2018). Biochemical characterization and antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oils from nine Tunisian varieties. *Journal of Food Biochemistry*, 42(5), e12595. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12595>
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481–504. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00235-1)
- Harris, W. S., Mozaffarian, D., Rimm, E., Kris-Etherton, P., Rudel, L. L., Appel, L. J., Engler, M. M., Engler, M. B., & Sacks, F. (2009). Omega-6 Fatty Acids and Risk for Cardiovascular Disease: A Science Advisory From the American Heart Association Nutrition Subcommittee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*, 119(6), 902–907. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.191627>
- Hashempour-Baltork, F., Torbati, M., Azadmard-Damirchi, S., & Peter Savage, G. (2018). Chemical, Rheological and Nutritional Characteristics of Sesame and Olive Oils Blended with Linseed Oil. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 8(1), 107–113. <https://doi.org/10.15171/apb.2018.013>
- Hassan, Y. I., Kosir, V., Yin, X., Ross, K., & Diarra, M. S. (2019). Grape Pomace as a Promising Antimicrobial Alternative in Feed: A Critical Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(35), 9705–9718. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02861>
- Hayyan, M., Mbous, Y. P., Looi, C. Y., Wong, W. F., Hayyan, A., Salleh, Z., & Mohd-Ali, O. (2016). Natural deep eutectic solvents: Cytotoxic profile. *SpringerPlus*, 5(1), 913. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2575-9>

- Hernández-Rodríguez, P., Baquero, L. P., & Larrota, H. R. (2019). Flavonoids. *Y Bioactive Compounds*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00014-1>
- Hixson, J. L., Jacobs, J. L., Wilkes, E. N., & Smith, P. A. (2016). Survey of the Variation in Grape Marc Condensed Tannin Composition and Concentration and Analysis of Key Compositional Factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(38), 7076–7086. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03126>
- Homayoun, M., Ghasemnezhad Targhi, R., & Soleimani, M. (2020). Anti-proliferative and anti-apoptotic effects of grape seed extract on chemo-resistant OVCAR-3 ovarian cancer cells. *Research in Pharmaceutical Sciences*, *15*(4), 390. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.293517>
- Hudson, T. S., Hartle, D. K., Hursting, S. D., Nunez, N. P., Wang, T. T. Y., Young, H. A., Arany, P., & Green, J. E. (2007). Inhibition of Prostate Cancer Growth by Muscadine Grape Skin Extract and Resveratrol through Distinct Mechanisms. *Cancer Research*, *67*(17), 8396–8405. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4069>
- Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., & Sebastiani, L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, *21*(8), 589–598. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.03.011>
- Ichihara, K., & Fukubayashi, Y. (2010). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *Journal of Lipid Research*, *51*(3), 635–640. <https://doi.org/10.1194/jlr.D001065>
- Ignea, C., Dorobanțu, C. M., Mintoff, C. P., Branza-Nichita, N., Ladamery, M. R., Kefalas, P., & Chedea, V. S. (2013). Modulation of the antioxidant/pro-oxidant balance, cytotoxicity and antiviral actions of grape seed extracts. *Food Chemistry*, *141*(4), 3967–3976. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.094>
- Inayat-Hussain, S., Rajab, N. F., & Siew, E. L. (2009). In vitro testing of biomaterials toxicity and biocompatibility. *Y Cellular Response to Biomaterials*. Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781845695477.3.508>
- Irandoost, P., Ebrahimi-Mameghani, M., & Pirouzpanah, S. (2013). Does grape seed oil improve inflammation and insulin resistance in overweight or obese women? *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *64*(6), 706–710. <https://doi.org/10.3109/09637486.2013.775228>
- Iriti, M., & Faoro, F. (2009). Bioactivity of grape chemicals for human health. *Natural Product Communications*, *4*(5), 611–634.
- Ismail, A. F. M., Moawed, F. S. M., & Mohamed, M. A. (2015). Protective mechanism of grape seed oil on carbon tetrachloride-induced brain damage in γ -irradiated rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *153*, 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.10.005>
- Ismail, A. F. M., Salem, A. A. M., & Eassawy, M. M. T. (2016). Hepatoprotective effect of grape seed oil against carbon tetrachloride induced oxidative stress in liver of γ -irradiated rat. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *160*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.027>

- Ivanišević, D., Jakšić, D., & Korać, N. (2015). *Vinogradarski atlas*. Republički zavod za statistiku.
- Ivanova, V., Stefova, M., Vojnoski, B., Dörnyei, Á., Márk, L., Dimovska, V., Stafilov, T., & Kilár, F. (2011). Identification of polyphenolic compounds in red and white grape varieties grown in R. Macedonia and changes of their content during ripening. *Food Research International*, *44*(9), 2851–2860. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.046>
- J. Mason, T., Chemat, F., & Vinatoru, M. (2011). The Extraction of Natural Products using Ultrasound or Microwaves. *Current Organic Chemistry*, *15*(2), 237–247. <https://doi.org/10.2174/138527211793979871>
- Jančić, R., & Lakušić, B. (2017). *Botanika farmaceutika*. Lento, Beograd.
- Jánváry, L., Hoffmann, T., Pfeiffer, J., Hausmann, L., Töpfer, R., Fischer, T. C., & Schwab, W. (2009). A Double Mutation in the Anthocyanin 5- *O* -Glucosyltransferase Gene Disrupts Enzymatic Activity in *Vitis vinifera* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(9), 3512–3518. <https://doi.org/10.1021/jf900146a>
- Jayaprakasha, G. K., Selvi, T., & Sakariah, K. K. (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International*, *36*(2), 117–122. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00116-3](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00116-3)
- Jean-Denis, J. B., Pezet, R., & Tabacchi, R. (2006). Rapid analysis of stilbenes and derivatives from downy mildew-infected grapevine leaves by liquid chromatography–atmospheric pressure photoionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1112*(1–2), 263–268. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.060>
- Jeong, K. M., Zhao, J., Jin, Y., Heo, S. R., Han, S. Y., Yoo, D. E., & Lee, J. (2015). Highly efficient extraction of anthocyanins from grape skin using deep eutectic solvents as green and tunable media. *Archives of Pharmacal Research*, *38*(12), 2143–2152. <https://doi.org/10.1007/s12272-015-0678-4>
- Jia, S.-S., Xi, G.-P., Zhang, M., Chen, Y.-B., Lei, B., Dong, X.-S., & Yang, Y.-M. (2013). Induction of apoptosis by D-limonene is mediated by inactivation of Akt in LS174T human colon cancer cells. *Oncology Reports*, *29*(1), 349–354. <https://doi.org/10.3892/or.2012.2093>
- Kallithraka, S., Garcia-Viguera, C., Bridle, P., & Bakker, J. (1995). Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics. *Phytochemical Analysis*, *6*(5), 265–267. <https://doi.org/10.1002/pca.2800060509>
- Kamm, W., Dionisi, F., Hischenhuber, C., & Engel, K.-H. (2001). Authenticity assessment of fats and oils. *Food Reviews International*, *17*(3), 249–290. <https://doi.org/10.1081/FRI-100104702>
- Kapcsándi, V., Hanczné Lakatos, E., Sik, B., Linka, L. Á., & Székelyhidi, R. (2021). Characterization of fatty acid, antioxidant, and polyphenol content of grape seed oil from different *Vitis vinifera* L. varieties. *OCL*, *28*, 30. <https://doi.org/10.1051/ocl/2021017>
- Katalinić, V., Možina, S. S., Skroza, D., Generalić, I., Abramovič, H., Miloš, M., Ljubenković, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinč, P., & Boban, M. (2010). Polyphenolic profile, antioxidant

properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*, 119(2), 715–723. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.019>

- Klaunig, J. E., Xu, Y., Isenberg, J. S., Bachowski, S., Kolaja, K. L., Jiang, J., Stevenson, D. E., & Walborg, E. F. (1998). The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 106(suppl 1), 289–295. <https://doi.org/10.1289/ehp.98106s1289>
- Kolar, M. J., Konduri, S., Chang, T., Wang, H., McNerlin, C., Ohlsson, L., Härröd, M., Siegel, D., & Saghatelian, A. (2019). Linoleic acid esters of hydroxy linoleic acids are anti-inflammatory lipids found in plants and mammals. *Journal of Biological Chemistry*, 294(27), 10698–10707. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006956>
- Konuskan, D. B., Kamiloglu, O., & Demirkeseer, O. (2019). Fatty Acid Composition, Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Grape Seed Oils Obtained by Cold- Pressed and Solvent Extraction. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 53(1), 144–150. <https://doi.org/10.5530/ijper.53.1.19>
- Korać, N., Cindrić, P., Medić, M., & Ivanišević, D. (2016). *Voćarstvo i vinogradarstvo (deo vinogradarstvo)*. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Koutsoukos, S., Tsiaka, T., Tzani, A., Zoumpoulakis, P., & Detsi, A. (2019). Choline chloride and tartaric acid, a Natural Deep Eutectic Solvent for the efficient extraction of phenolic and carotenoid compounds. *Journal of Cleaner Production*, 241, 118384. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118384>
- Krinsky, N. I. (1992). Mechanism of Action of Biological Antioxidants. *Experimental Biology and Medicine*, 200(2), 248–254. <https://doi.org/10.3181/00379727-200-43429>
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Ky, I., & Teissedre, P.-L. (2015). Characterisation of Mediterranean Grape Pomace Seed and Skin Extracts: Polyphenolic Content and Antioxidant Activity. *Molecules*, 20(2), 2190–2207. <https://doi.org/10.3390/molecules20022190>
- Lachman, J., Hejtmánková, A., Táborský, J., Kotíková, Z., Pivec, V., Štralková, R., Vollmannová, A., Bojnánská, T., & Dědina, M. (2015). Evaluation of oil content and fatty acid composition in the seed of grapevine varieties. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 620–625. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.044>
- Laganà, P., Anastasi, G., Marano, F., Piccione, S., Singla, R. K., Dubey, A. K., Delia, S., Coniglio, M. A., Facciola, A., Di Pietro, A., Haddad, M. A., Al-Hiary, M., & Caruso, G. (2019). Phenolic Substances in Foods: Health Effects as Anti-Inflammatory and Antimicrobial Agents. *Journal of AOAC International*, 102(5), 1378–1387. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0131>
- Lai, P., & Roy, J. (2004). Antimicrobial and Chemopreventive Properties of Herbs and Spices. *Current Medicinal Chemistry*, 11(11), 1451–1460. <https://doi.org/10.2174/0929867043365107>

- Lai, X., Kang, X., Zeng, L., Li, J., Yang, Y., & Liu, D. (2014). The protective effects and genetic pathways of thorn grape seeds oil against high glucose-induced apoptosis in pancreatic β -cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *14*(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-10>
- Larrauri, J. A., Rupérez, P., & Saura-Calixto, F. (1997). Effect of Drying Temperature on the Stability of Polyphenols and Antioxidant Activity of Red Grape Pomace Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(4), 1390–1393. <https://doi.org/10.1021/jf960282f>
- Lauterborn, W., & Ohl, C.-D. (1997). Cavitation bubble dynamics. *Ultrasonics Sonochemistry*, *4*(2), 65–75. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(97\)00009-6](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(97)00009-6)
- Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, *88*(5), 1269–1278.
- Li, Y., Skouroumounis, G. K., Elsey, G. M., & Taylor, D. K. (2011). Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. *Food Chemistry*, *129*(2), 570–576. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.068>
- Liao, H.-G., Jiang, Y.-X., Zhou, Z.-Y., Chen, S.-P., & Sun, S.-G. (2008). Shape-Controlled Synthesis of Gold Nanoparticles in Deep Eutectic Solvents for Studies of Structure-Functionality Relationships in Electrocatalysis. *Angewandte Chemie International Edition*, *47*(47), 9100–9103. <https://doi.org/10.1002/anie.200803202>
- Liu, Y., Friesen, J. B., McAlpine, J. B., Lankin, D. C., Chen, S.-N., & Pauli, G. F. (2018). Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *Journal of Natural Products*, *81*(3), 679–690. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00945>
- Llobera, A., & Cañellas, J. (2007). Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): Pomace and stem. *Food Chemistry*, *101*(2), 659–666. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.025>
- Lutterodt, H., Slavin, M., Whent, M., Turner, E., & Yu, L. (Lucy). (2011). Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. *Food Chemistry*, *128*(2), 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.040>
- Lutz, M., Jorquera, K., Cancino, B., Ruby, R., & Henriquez, C. (2011). Phenolics and Antioxidant Capacity of Table Grape (*Vitis vinifera* L.) Cultivars Grown in Chile. *Journal of Food Science*, *76*(7), C1088–C1093. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02298.x>
- Mahady, G. B., & Pendland, S. L. (2000). Resveratrol Inhibits The Growth of Helicobacter Pylori in Vitro. *American Journal of Gastroenterology*, *95*(7), 1849. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2000.02146.x>
- Mander, L. (Yp.). (2010). *Comprehensive natural products II: Chemistry and biology*. Elsevier.

- Mandic, A. I., Đilas, S. M., Četković, G. S., Čanadanović-Brunet, J. M., & Tumbas, V. T. (2008). Polyphenolic Composition and Antioxidant Activities of Grape Seed Extract. *International Journal of Food Properties*, 11(4), 713–726. <https://doi.org/10.1080/10942910701584260>
- Mantena, S. K. (2005). Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 27(8), 1682–1691. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl030>
- Mariana, I., Ungureanu, N., Biris, S.-S., Voicu, G., & Dincă, M. (2013). *Actual methods for obtaining vegetable oil from oilseeds*.
- Marković, N. (2012). *Tehnologija gajenja vinove loze*. Beograd, Manastir Hilandar.
- Martin, M. E., Grao-Cruces, E., Millan-Linares, M. C., & Montserrat-de La Paz, S. (2020). Grape (*Vitis vinifera* L.) Seed Oil: A Functional Food from the Winemaking Industry. *Foods*, 9(10), 1360. <https://doi.org/10.3390/foods9101360>
- Martins Strieder, M., Keven Silva, E., & Angela A. Meireles, M. (2019). Specific Energy: A New Approach to Ultrasound-assisted Extraction of Natural Colorants. *Food and Public Health*, 9(2), 45–52. <https://doi.org/10.5923/j.fph.20190902.02>
- Mason, T., & Peters, D. (2002). *Practical sonochemistry*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9781782420620>
- Masters, J. R. (2002). HeLa cells 50 years on: The good, the bad and the ugly. *Nature Reviews Cancer*, 2(4), 315–319. <https://doi.org/10.1038/nrc775>
- Matthäus, B. (2008). Virgin grape seed oil: Is it really a nutritional highlight? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(7), 645–650. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700276>
- Mazza, G., & Brouillard, R. (1987). Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chemistry*, 25(3), 207–225. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(87\)90147-6](https://doi.org/10.1016/0308-8146(87)90147-6)
- McClements, D. J. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science & Technology*, 6(9), 293–299. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)89139-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89139-6)
- Mena, P., Calani, L., Dall'Asta, C., Galaverna, G., García-Viguera, C., Bruni, R., Crozier, A., & Del Rio, D. (2012). Rapid and Comprehensive Evaluation of (Poly)phenolic Compounds in Pomegranate (*Punica granatum* L.) Juice by UHPLC-MSn. *Molecules*, 17(12), 14821–14840. <https://doi.org/10.3390/molecules171214821>
- Miguel, M. G. (2011). Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*.
- Milinčić, D. D., Stanisavljević, N. S., Kostić, A. Ž., Soković Bajić, S., Kojić, M. O., Gašić, U. M., Barać, M. B., Stanojević, S. P., Lj Tešić, Ž., & Pešić, M. B. (2021). Phenolic compounds and

- biopotential of grape pomace extracts from Prokupac red grape variety. *LWT*, 138, 110739. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110739>
- Mironeasa, S., Leahu, A., Codina, G., Silviu-Gabriel, S., & Mironeasa, C. (2010). Grape seed: Physicochemical, structural characteristic and oil content. *Journal of Agroalimentary Process and Technologies*, 16, 1–6.
- Morré, D. M., & Morré, D. J. (2006). Anticancer activity of grape and grape skin extracts alone and combined with green tea infusions. *Cancer Letters*, 238(2), 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.07.011>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Mota-Morales, J. D., Gutiérrez, M. C., Sanchez, I. C., Luna-Bárceñas, G., & Del Monte, F. (2011). Frontal polymerizations carried out in deep-eutectic mixtures providing both the monomers and the polymerization medium. *Chemical Communications*, 47(18), 5328. <https://doi.org/10.1039/c1cc10391a>
- Muhlack, R. A., Potumarthi, R., & Jeffery, D. W. (2018). Sustainable wineries through waste valorisation: A review of grape marc utilisation for value-added products. *Waste Management*, 72, 99–118. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.11.011>
- Mullins, M. G., Bouquet, A., & Williams, L. E. (1992). *Biology of the grapevine*. Cambridge University Press.
- Muñoz, P., Morales, M. P., Mendivil, M. A., Juárez, M. C., & Muñoz, L. (2014). Using of waste pomace from winery industry to improve thermal insulation of fired clay bricks. Eco-friendly way of building construction. *Construction and Building Materials*, 71, 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2014.08.027>
- Muselík, J., García-Alonso, M., Martín-López, M., Žemlička, M., & Rivas-Gonzalo, J. (2007). Measurement of Antioxidant Activity of Wine Catechins, Procyanidins, Anthocyanins and Pyranoanthocyanins. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(8), 797–809. <https://doi.org/10.3390/i8080797>
- Mustefa Beyan, S., Venkatesa Prabhu, S., Mumecha, T. K., & Gameda, M. T. (2021). Production of Alkaline Proteases using *Aspergillus* sp. Isolated from Injera: RSM-GA Based Process Optimization and Enzyme Kinetics Aspect. *Current Microbiology*, 78(5), 1823–1834. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02446-4>
- Naasani, I., Oh-Hashi, F., Oh-Hara, T., Feng, W. Y., Johnston, J., Chan, K., & Tsuruo, T. (2003). Blocking telomerase by dietary polyphenols is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Research*, 63(4), 824–830.
- Nair, S., & Pullammanappallil, P. (2003). *Value added products from vineyard wastes- a review*. <https://researchportal.murdoch.edu.au/esploro/outputs/conferencePaper/Value-added-products-from-vineyard-wastes/991005541161007891#file-0>

- Natić, M., Dabić Zagorac, D., Gašić, U., Dojčinović, B., Ćirić, I., Relić, D., Todić, S., & Sredojević, M. (2021). Autochthonous and international grape varieties grown in Serbia—Phenolic and elemental composition. *Food Bioscience*, 40, 100889. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100889>
- Nechita, A., Cotea, V. V., Nechita, C.-B., Pincu, R., Mihai, C.-T., & Colibaba, C. L. (2012). Study of Cytostatic and Cytotoxic Activity of Several Polyphenolic Extracts Obtained from *Vitis vinifera*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40(1), 216. <https://doi.org/10.15835/nbha4017534>
- Negi, P. S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 156(1), 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006>
- Nirmala, J. G., & Narendhirakannan, R. T. (2011). *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of grapes (*Vitis vinifera* L.) seed and skin extracts—Muscat variety. 3(4).
- Norma, P. M., Virginia, N.-M., Ral, R.-H., Jos, C. E., & Cristbal, N. A. (2014). A microassay for quantification of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging. *African Journal of Biochemistry Research*, 8(1), 14–18. <https://doi.org/10.5897/AJBR2013.0669>
- Novak, I., Janeiro, P., Seruga, M., & Oliveira-Brett, A. M. (2008). Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta*, 630(2), 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.10.002>
- Nwabueze, T. U. (2010). Review article: Basic steps in adapting response surface methodology as mathematical modelling for bioprocess optimisation in the food systems: RSM as mathematical modelling in food systems. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(9), 1768–1776. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02256.x>
- Obreque-Slier, E., Peña-Neira, Á., López-Solís, R., Zamora-Marín, F., Ricardo-da Silva, J. M., & Laureano, O. (2010). Comparative Study of the Phenolic Composition of Seeds and Skins from Carménère and Cabernet Sauvignon Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) during Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3591–3599. <https://doi.org/10.1021/jf904314u>
- Ohemeng, K. A., Schwender, C. F., Fu, K. P., & Barrett, J. F. (1993). DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones(1). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 3(2), 225–230. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)80881-7](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)80881-7)
- Ohno, M., & Abe, T. (1991). Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *Journal of Immunological Methods*, 145(1–2), 199–203. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90327-C](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90327-C)
- OIV. (2008). <https://www.oiv.int/public/medias/2089/cst-1-2008-en.pdf>
- OIV. (2019). <https://www.oiv.int/public/medias/6782/oiv-2019-statistical-report-on-world-vitiviniculture.pdf>

- O’Leary, K. A., Pascual-Tereasa, S. D., Needs, P. W., Bao, Y.-P., O’Brien, N. M., & Williamson, G. (2004). Effect of flavonoids and Vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 551(1–2), 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.01.015>
- Olejar, K. J., Ricci, A., Swift, S., Zujovic, Z., Gordon, K. C., Fedrizzi, B., Versari, A., & Kilmartin, P. A. (2019). Characterization of an Antioxidant and Antimicrobial Extract from Cool Climate, White Grape Marc. *Antioxidants*, 8(7), 232. <https://doi.org/10.3390/antiox8070232>
- Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., López-Roca, J. M., Ros-García, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2006). Anthocyanin fingerprint of grapes: Environmental and genetic variations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(10), 1460–1467. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2511>
- Ostlund, R. E. (2002). Phytosterols in human nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 533–549. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.020702.075220>
- Otero-Pareja, M., Casas, L., Fernández-Ponce, M., Mantell, C., & Ossa, E. (2015). Green Extraction of Antioxidants from Different Varieties of Red Grape Pomace. *Molecules*, 20(6), 9686–9702. <https://doi.org/10.3390/molecules20069686>
- Panić, M., Andlar, M., Tišma, M., Rezić, T., Šibalić, D., Cvjetko Bubalo, M., & Radojčić Redovniković, I. (2021). Natural deep eutectic solvent as a unique solvent for valorisation of orange peel waste by the integrated biorefinery approach. *Waste Management*, 120, 340–350. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.11.052>
- Panić, M., Gunjević, V., Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Ganić, K. K., & Redovniković, I. R. (2021). COSMOtherm as an Effective Tool for Selection of Deep Eutectic Solvents Based Ready-To-Use Extracts from Graševina Grape Pomace. *Molecules*, 26(16), 4722. <https://doi.org/10.3390/molecules26164722>
- Panić, M., Radić Stojković, M., Kraljić, K., Škevin, D., Radojčić Redovniković, I., Gaurina Srček, V., & Radošević, K. (2019). Ready-to-use green polyphenolic extracts from food by-products. *Food Chemistry*, 283, 628–636. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.061>
- Panić, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I., Zagajski Kučan, K., Sander, A., Halambek, J., Prlić Kardum, J., & Mitar, A. (2019). Physicochemical Properties, Cytotoxicity, and Antioxidative Activity of Natural Deep Eutectic Solvents Containing Organic Acid. *Chemical & biochemical engineering quarterly*, 33(1), 1–18. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2018.1454>
- Paniwnyk, L. (2017). Applications of ultrasound in processing of liquid foods: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 794–806. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.12.025>
- Pantelić, M. M., Dabić Zagorac, D. Č., Davidović, S. M., Todić, S. R., Bešlić, Z. S., Gašić, U. M., Tešić, Ž. Lj., & Natić, M. M. (2016). Identification and quantification of phenolic compounds in berry skin, pulp, and seeds in 13 grapevine varieties grown in Serbia. *Food Chemistry*, 211, 243–252. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.051>
- Pantelić, M. M., Zagorac, D. Č. D., Ćirić, I. Ž., Pergal, M. V., Relić, D. J., Todić, S. R., & Natić, M. M. (2017). Phenolic profiles, antioxidant activity and minerals in leaves of different grapevine

- varieties grown in Serbia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.05.002>
- Pardo, J. E., Fernández, E., Rubio, M., Alvarruiz, A., & Alonso, G. L. (2009). Characterization of grape seed oil from different grape varieties (*Vitis vinifera*). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(2), 188–193. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800052>
- Parry, J., Su, L., Luther, M., Zhou, K., Yurawecz, M. P., Whittaker, P., & Yu, L. (2005). Fatty Acid Composition and Antioxidant Properties of Cold-Pressed Marionberry, Boysenberry, Red Raspberry, and Blueberry Seed Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 566–573. <https://doi.org/10.1021/jf048615t>
- Pastoriza, S., Delgado-Andrade, C., Haro, A., & Rufián-Henares, J. A. (2011). A physiologic approach to test the global antioxidant response of foods. The GAR method. *Food Chemistry*, 129(4), 1926–1932. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.009>
- Patil, S. S., Pathak, A., & Rathod, V. K. (2021). Optimization and kinetic study of ultrasound assisted deep eutectic solvent based extraction: A greener route for extraction of curcuminoids from *Curcuma longa*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105267. <https://doi.org/10.1016/j.ulsonch.2020.105267>
- Pavić, V., Kujundžić, T., Kopic, M., Jukić, V., Braun, U., Schwander, F., & Drenjančević, M. (2019). Effects of Defoliation on Phenolic Concentrations, Antioxidant and Antibacterial Activity of Grape Skin Extracts of the Varieties Blaufränkisch and Merlot (*Vitis vinifera* L.). *Molecules*, 24(13), 2444. <https://doi.org/10.3390/molecules24132444>
- Payne, M. J., Hurst, W. J., Stuart, D. A., Ou, B., Fan, E., Ji, H., & Kou, Y. (2010). Determination of total procyanidins in selected chocolate and confectionery products using DMAC. *Journal of AOAC International*, 93(1), 89–96.
- Pérez-Ortiz, J. M., Alguacil, L. F., Salas, E., Hermosín-Gutiérrez, I., Gómez-Alonso, S., & González-Martín, C. (2019). Antiproliferative and cytotoxic effects of grape pomace and grape seed extracts on colorectal cancer cell lines. *Food Science & Nutrition*, 7(9), 2948–2957. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1150>
- Petry, T., Knowles, R., & Meads, R. (2006). An analysis of the proposed REACH regulation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 44(1), 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2005.07.007>
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.-S., & Chemat, F. (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control*, 31(2), 593–606. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.039>
- Pintać, D., Četojević-Simin, D., Berežni, S., Orčić, D., Mimica-Dukić, N., & Lesjak, M. (2019). Investigation of the chemical composition and biological activity of edible grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaf varieties. *Food Chemistry*, 286, 686–695. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.049>

- Popović, B. M., Gligorijević, N., Arandelović, S., Macedo, A. C., Jurić, T., Uka, D., Mocko-Blažek, K., & Serra, A. T. (2023). Cytotoxicity profiling of choline chloride-based natural deep eutectic solvents. *RSC Advances*, *13*(6), 3520–3527. <https://doi.org/10.1039/D2RA07488E>
- Pratt, D. E., Powers, J. J., & Somaatmadja, D. (1960). ANTHOCYANINS. I. THE INFLUENCE OF STRAWBERRY AND GRAPE ANTHOCYANINS ON THE GROWTH OF CERTAIN BACTERIA. *Journal of Food Science*, *25*(1), 26–32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1960.tb17932.x>
- Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Meier, C., Kahkonen, M., Heinonen, M., Hopia, A., & Oksman-Caldentey, K.-M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, *90*(4), 494–507. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01271.x>
- Rababah, T. M., Hettiarachchy, N. S., & Horax, R. (2004). Total Phenolics and Antioxidant Activities of Fenugreek, Green Tea, Black Tea, Grape Seed, Ginger, Rosemary, Gotu Kola, and Ginkgo Extracts, Vitamin E, and *tert*-Butylhydroquinone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(16), 5183–5186. <https://doi.org/10.1021/jf049645z>
- Rabrenović, B. B., Dimić, E. B., Novaković, M. M., Tešević, V. V., & Basić, Z. N. (2014). The most important bioactive components of cold pressed oil from different pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds. *LWT - Food Science and Technology*, *55*(2), 521–527. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.019>
- Radhakrishnan, S., Reddivari, L., & Vanamala, J. (2010). Abstract 1882: Resveratrol and grape seed extract synergistically elevate human colon cancer cell apoptosis and suppress cell proliferation via upregulation of p53 and suppression of Wnt/b-catenin signaling pathways. *Cancer Research*, *70*(8_Supplement), 1882–1882. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM10-1882>
- Radkar, V., Hardej, D., Lau-Cam, C., & Billack, B. (2007). Evaluation of Resveratrol and Piceatannol Cytotoxicity in Macrophages, T Cells, and Skin Cells. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, *58*(3), 293–304. <https://doi.org/10.2478/v10004-007-0020-8>
- Radošević, K., Čanak, I., Panić, M., Markov, K., Bubalo, M. C., Frece, J., Srček, V. G., & Redovniković, I. R. (2018). Antimicrobial, cytotoxic and antioxidative evaluation of natural deep eutectic solvents. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(14), 14188–14196. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1669-z>
- Radošević, K., Ćurko, N., Gaurina Srček, V., Cvjetko Bubalo, M., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., & Radojčić Redovniković, I. (2016). Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *LWT*, *73*, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.037>
- Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Grgas, D., Landeka Dragičević, T., & Radojčić Redovniković, I. (2015). Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *112*, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.034>
- Radovanović, V. (1986). *Tehnologija vina*. Iro, Građevinska knjiga, Beograd.

- Radulescu, C., Buruleanu, L. C., Nicolescu, C. M., Olteanu, R. L., Bumbac, M., Holban, G. C., & Simal-Gandara, J. (2020). Phytochemical Profiles, Antioxidant and Antibacterial Activities of Grape (*Vitis vinifera* L.) Seeds and Skin from Organic and Conventional Vineyards. *Plants*, 9(11), 1470. <https://doi.org/10.3390/plants9111470>
- Raina, K., Tyagi, A., Kumar, D., Agarwal, R., & Agarwal, C. (2013). Role of oxidative stress in cytotoxicity of grape seed extract in human bladder cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 61, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.039>
- Rao, P. U. (1994). Nutrient composition of some less-familiar oil seeds. *Food Chemistry*, 50(4), 379–382. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90208-9](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90208-9)
- Rao, Y. K., Geethangili, M., Fang, S.-H., & Tzeng, Y.-M. (2007). Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: A comparative study. *Food and Chemical Toxicology*, 45(9), 1770–1776. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.03.012>
- Rhodes, P., Mitchell, J., Wilson, M., & Melton, L. (2006). Antilisterial activity of grape juice and grape extracts derived from *Vitis vinifera* variety Ribier. *International Journal of Food Microbiology*, 107(3), 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.022>
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152–159. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2)
- Rodríguez Montealegre, R., Romero Peces, R., Chacón Vozmediano, J. L., Martínez Gascueña, J., & García Romero, E. (2006). Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 687–693. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.05.003>
- Rolle, L., Giacosa, S., Gerbi, V., & Novello, V. (2011). Comparative Study of Texture Properties, Color Characteristics, and Chemical Composition of Ten White Table-Grape Varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62(1), 49–56. <https://doi.org/10.5344/ajev.2010.10029>
- Rombaut, N., Savoie, R., Thomasset, B., Bélliard, T., Castello, J., Van Hecke, É., & Lanoisellé, J.-L. (2014). Grape seed oil extraction: Interest of supercritical fluid extraction and gas-assisted mechanical extraction for enhancing polyphenol co-extraction in oil. *Comptes Rendus Chimie*, 17(3), 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2013.11.014>
- Ross, C. F., Hoye Jr, C., & Fernandez-Plotka, V. C. (2011). Influence of Heating on the Polyphenolic Content and Antioxidant Activity of Grape Seed Flour. *Journal of Food Science*, 76(6), C884–C890. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02280.x>
- Roy, A. M., Baliga, M. S., Elmets, C. A., & Katiyar, S. K. (2005). Grape Seed Proanthocyanidins Induce Apoptosis through p53, Bax, and Caspase 3 Pathways. *Neoplasia*, 7(1), 24–36. <https://doi.org/10.1593/neo.04412>
- Rubio, M., Alvarez-Ortí, M., Alvarruiz, A., Fernández, E., & Pardo, J. E. (2009). Characterization of Oil Obtained from Grape Seeds Collected during Berry Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2812–2815. <https://doi.org/10.1021/jf803627t>

- Ruesgas-Ramón, M., Suárez-Quiroz, M. L., González-Ríos, O., Baréa, B., Cazals, G., Figueroa-Espinoza, M. C., & Durand, E. (2020). Biomolecules extraction from coffee and cocoa by- and co-products using deep eutectic solvents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(1), 81–91. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9996>
- Rugani, B., Vázquez-Rowe, I., Benedetto, G., & Benetto, E. (2013). A comprehensive review of carbon footprint analysis as an extended environmental indicator in the wine sector. *Journal of Cleaner Production*, *54*, 61–77. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.04.036>
- Sabbar Dahham, S., Abdulkareem Abood, A., & M Shah Abdul Majid, A. (2015). *FRUITS OF HAVEN AND THEIR ROLE IN CANCER PREVENTION*. Academic Journal of Scientific Miracles. <https://doi.org/10.19138/miracles.37.5>
- Sabir, A., Unver, A., & Kara, Z. (2012). The fatty acid and tocopherol constituents of the seed oil extracted from 21 grape varieties (*Vitis* spp.): Fatty acids and tocopherols from grade seed oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *92*(9), 1982–1987. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5571>
- Sadik, C. D., Sies, H., & Schewe, T. (2003). Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: Structure–activity relations and mode of action. *Biochemical Pharmacology*, *65*(5), 773–781. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01621-0](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01621-0)
- Sanhueza, L., Melo, R., Montero, R., Maisey, K., Mendoza, L., & Wilkens, M. (2017). Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PLOS ONE*, *12*(2), e0172273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172273>
- Santos, F. T., Goufo, P., Santos, C., Botelho, D., Fonseca, J., Queirós, A., Costa, M. S. S. M., & Trindade, H. (2016). Comparison of five agro-industrial waste-based composts as growing media for lettuce: Effect on yield, phenolic compounds and vitamin C. *Food Chemistry*, *209*, 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.087>
- Santos, H., & Capelo, J. (2007). Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. *Talanta*, *73*(5), 795–802. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.05.039>
- Schmitt, F. O., Johnson, C. H., & Olson, A. R. (1929). Oxidations promoted by ultrasonic radiation. *Journal of the American Chemical Society*, *51*(2), 370–375. <https://doi.org/10.1021/ja01377a004>
- Seeram, N. P., Aviram, M., Zhang, Y., Henning, S. M., Feng, L., Dreher, M., & Heber, D. (2008). Comparison of Antioxidant Potency of Commonly Consumed Polyphenol-Rich Beverages in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(4), 1415–1422. <https://doi.org/10.1021/jf073035s>
- Segade, S. R., Giacosa, S., De Palma, L., Novello, V., Torchio, F., Gerbi, V., & Rolle, L. (2013). Effect of the cluster heterogeneity on mechanical properties, chromatic indices and chemical composition of Italia table grape berries (*Vitis vinifera* L.) sorted by flotation. *International Journal of Food Science & Technology*, *48*(1), 103–113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03164.x>

- Serra, A. T., Matias, A. A., Nunes, A. V. M., Leitão, M. C., Brito, D., Bronze, R., Silva, S., Pires, A., Crespo, M. T., San Romão, M. V., & Duarte, C. M. (2008). In vitro evaluation of olive- and grape-based natural extracts as potential preservatives for food. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(3), 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.07.011>
- Shaabani, A., & Hooshmand, S. E. (2016). Choline chloride/urea as a deep eutectic solvent/organocatalyst promoted three-component synthesis of 3-aminoimidazo-fused heterocycles via Groebke–Blackburn–Bienayme process. *Tetrahedron Letters*, 57(3), 310–313. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.12.014>
- Shao, Z. H., Hsu, C. W., Chang, W. T., Waypa, G. B., Li, J., Li, D., Li, C. Q., Anderson, T., Qin, Y., Schumacker, P. T., Becker, L. B., & Hoek, T. L. V. (2006). Cytotoxicity induced by grape seed proanthocyanidins: Role of nitric oxide. *Cell Biology and Toxicology*, 22(3), 149–158. <https://doi.org/10.1007/s10565-006-0052-x>
- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Young, J., Bryan, M., & Wu, Y. (2002). *Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. 1.*
- Shinagawa, F. B., Santana, F. C. D., Araujo, E., Purgatto, E., & Mancini-Filho, J. (2017). Chemical composition of cold pressed Brazilian grape seed oil. *Food Science and Technology*, 38(1), 164–171. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.08317>
- Shirsath, S. R., Sonawane, S. H., & Gogate, P. R. (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 53, 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.01.003>
- Shivakumar, A., & Yogendra Kumar, M. S. (2018). Critical Review on the Analytical Mechanistic Steps in the Evaluation of Antioxidant Activity. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 48(3), 214–236. <https://doi.org/10.1080/10408347.2017.1400423>
- Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, 215(2), 213–219. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18025.x>
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5), a000414–a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
- Silva, D. T. D., Pauletto, R., Cavalheiro, S. D. S., Bochi, V. C., Rodrigues, E., Weber, J., Silva, C. D. B. D., Morisso, F. D. P., Barcia, M. T., & Emanuelli, T. (2020). Natural deep eutectic solvents as a biocompatible tool for the extraction of blueberry anthocyanins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 89, 103470. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103470>
- Silva, V., Igrejas, G., Falco, V., Santos, T. P., Torres, C., Oliveira, A. M. P., Pereira, J. E., Amaral, J. S., & Poeta, P. (2018). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of phenolic compounds extracted from wine industry by-products. *Food Control*, 92, 516–522. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.031>
- Simonetti, G., D’Auria, F. D., Mulinacci, N., Innocenti, M., Antonacci, D., Angiolella, L., Santamaria, A. R., Valletta, A., Donati, L., & Pasqua, G. (2017). Anti-Dermatophyte and Anti-*Malassezia* Activity of Extracts Rich in Polymeric Flavan-3-ols Obtained from *Vitis vinifera* Seeds: Grape

Seed Extracts Against Dermatophytes and *Malassezia*. *Phytotherapy Research*, 31(1), 124–131. <https://doi.org/10.1002/ptr.5739>

Simonetti, G., Santamaria, A. R., D'Auria, F. D., Mulinacci, N., Innocenti, M., Cecchini, F., Pericolini, E., Gabrielli, E., Panella, S., Antonacci, D., Palamara, A. T., Vecchiarelli, A., & Pasqua, G. (2014). Evaluation of Anti- *Candida* Activity of *Vitis vinifera* L. Seed Extracts Obtained from Wine and Table Cultivars. *BioMed Research International*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/127021>

Sochorova, L., Prusova, B., Cebova, M., Jurikova, T., Mlcek, J., Adamkova, A., Nedomova, S., Baron, M., & Sochor, J. (2020). Health Effects of Grape Seed and Skin Extracts and Their Influence on Biochemical Markers. *Molecules*, 25(22), 5311. <https://doi.org/10.3390/molecules25225311>

Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., & LLeonart, M. E. (2013). Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Research Reviews*, 12(1), 376–390. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.10.004>

Sotiropoulou, E., Varelas, V., Liouni, M., & Nerantzis, E. (2015). *GRAPE SEED OIL: FROM A WINERY WASTE TO A VALUE ADDED COSMETIC PRODUCT-A REVIEW*.

Stahel, W. R. (2016). The circular economy. *Nature*, 531(7595), 435–438. <https://doi.org/10.1038/531435a>

Stanimirović, S. (1988). *Bromatologija*. Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Stines, A. P., Grubb, J., Gockowiak, H., Henschke, P. A., Høj, P. B., & Heeswijck, R. (2000). Proline and arginine accumulation in developing berries of *Vitis vinifera* L. in Australian vineyards: Influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(2), 150–158. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2000.tb00174.x>

Šuković, D., Knežević, B., Gašić, U., Sredojević, M., Ćirić, I., Todić, S., Mutić, J., & Tešić, Ž. (2020). Phenolic Profiles of Leaves, Grapes and Wine of Grapevine Variety Vranac (*Vitis vinifera* L.) from Montenegro. *Foods*, 9(2), 138. <https://doi.org/10.3390/foods9020138>

Sun, T., Chen, Q. Y., Wu, L. J., Yao, X. M., & Sun, X. J. (2012). Antitumor and antimetastatic activities of grape skin polyphenols in a murine model of breast cancer. *Food and Chemical Toxicology*, 50(10), 3462–3467. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.037>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Sung, J., & Lee, J. (2010). Antioxidant and antiproliferative activities of grape seeds from different cultivars. *Food Science and Biotechnology*, 19(2), 321–326. <https://doi.org/10.1007/s10068-010-0046-6>

Swartz, M. E., & Krull, I. S. (2012). *Handbook of Analytical Validation*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b12039>

- Tangolar, S. G., Özoğul, Y., Tangolar, >Semih, & Torun, A. (2009). Evaluation of fatty acid profiles and mineral content of grape seed oil of some grape genotypes. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(1), 32–39. <https://doi.org/10.1080/09637480701581551>
- Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S., & Gerós, H. (2013). Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18711–18739. <https://doi.org/10.3390/ijms140918711>
- Tesaki S., Tanabe S., Moriyama M., Fukushi E., Kawabata J., & Watanabe M. (1999). Isolation and Identification of an Antibacterial Compound from Grape and Its Application to Foods. *Journal of the agricultural chemical society of Japan*, 73(2), 125–128. <https://doi.org/10.1271/nogeikagaku1924.73.125>
- Thuy Pham, T. P., Cho, C.-W., & Yun, Y.-S. (2010). Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. *Water Research*, 44(2), 352–372. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.030>
- Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>
- Topalović, A., Knežević, M., Bajagić, B., Ivanović, L., Milašević, I., Đurović, D., Mugoša, B., Podolski-Renić, A., & Pešić, M. (2020). Grape (*Vitis vinifera* L.): Health benefits and effects of growing conditions on quality parameters. *Y Biodiversity and Biomedicine*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819541-3.00020-7>
- Traber, M., & Packer, L. (1995). Vitamin E: Beyond antioxidant function. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62(6), 1501S-1509S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/62.6.1501S>
- Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 4(3), 147–157. <https://doi.org/10.1007/s10311-006-0068-8>
- Troter, D. Z., Todorović, Z. B., Đokić-Stojanović, D. R., Stamenković, O. S., & Veljković, V. B. (2016). Application of ionic liquids and deep eutectic solvents in biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 61, 473–500. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.04.011>
- Tseng, A., & Zhao, Y. (2012). Effect of Different Drying Methods and Storage Time on the Retention of Bioactive Compounds and Antibacterial Activity of Wine Grape Pomace (Pinot Noir and Merlot). *Journal of Food Science*, 77(9), H192–H201. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02840.x>
- Tuberoso, C. I. G., Kowalczyk, A., Sarritzu, E., & Cabras, P. (2007). Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *Food Chemistry*, 103(4), 1494–1501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.014>
- Ulbricht, T. L. V., & Southgate, D. A. T. (1991). Coronary heart disease: Seven dietary factors. *The Lancet*, 338(8773), 985–992. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91846-M](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91846-M)

- Unusan, N. (2020). Proanthocyanidins in grape seeds: An updated review of their health benefits and potential uses in the food industry. *Journal of Functional Foods*, 67, 103861. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103861>
- USDA FoodData Central. (/). <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/2344732/nutrients>
- Vauzour, D. (2012). Dietary Polyphenols as Modulators of Brain Functions: Biological Actions and Molecular Mechanisms Underpinning Their Beneficial Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2012/914273>
- Vermerris, W., & Nicholson, R. L. (2008). *Phenolic compound biochemistry*. Springer.
- Vinatoru, M., Toma, M., & Mason, T. J. (1999). Ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from plants and their constituents. *Y Advances in Sonochemistry*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1569-2868\(99\)80007-2](https://doi.org/10.1016/S1569-2868(99)80007-2)
- Vining, G. G., Kowalski, S. M., & Montgomery, D. C. (2005). Response Surface Designs within a Split-Plot Structure. *Journal of Quality Technology*, 37(2), 115–129. <https://doi.org/10.1080/00224065.2005.11980310>
- Vivancos, M., & Moreno, J. J. (2008). Effect of resveratrol, tyrosol and β -sitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E₂ synthesis by RAW 264.7 macrophages. *British Journal of Nutrition*, 99(6), 1199–1207. <https://doi.org/10.1017/S0007114507876203>
- Vujović, D. (2013). *Vinogradarstvo*. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu.
- Wang, S., Chen, F., Wu, J., Wang, Z., Liao, X., & Hu, X. (2007). Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(2), 693–700. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.008>
- Wang, X.-H., & Wang, J.-P. (2019). Effective extraction with deep eutectic solvents and enrichment by macroporous adsorption resin of flavonoids from *Carthamus tinctorius* L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 176, 112804. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112804>
- Wen, X., Zhu, M., Hu, R., Zhao, J., Chen, Z., Li, J., & Ni, Y. (2016). Characterisation of seed oils from different grape cultivars grown in China. *Journal of Food Science and Technology*, 53(7), 3129–3136. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2286-9>
- Wojeicchowski, J. P., Marques, C., Igarashi-Mafra, L., Coutinho, J. A. P., & Mafra, M. R. (2021). Extraction of phenolic compounds from rosemary using choline chloride – based Deep Eutectic Solvents. *Separation and Purification Technology*, 258, 117975. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117975>
- Woyengo, T. A., Ramprasath, V. R., & Jones, P. J. H. (2009). Anticancer effects of phytosterols. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63(7), 813–820. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2009.29>

- Wu, H., Chen, L., Zhu, F., Han, X., Sun, L., & Chen, K. (2019). The Cytotoxicity Effect of Resveratrol: Cell Cycle Arrest and Induced Apoptosis of Breast Cancer 4T1 Cells. *Toxins*, *11*(12), 731. <https://doi.org/10.3390/toxins11120731>
- Xiao, F., Xu, T., Lu, B., & Liu, R. (2020). Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers*, *1*(1), 60–69. <https://doi.org/10.1002/fft2.10>
- Xu, C., Zhang, Y., Cao, L., & Lu, J. (2010). Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chemistry*, *119*(4), 1557–1565. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.042>
- Yang, J., Martinson, T. E., & Liu, R. H. (2009). Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry*, *116*(1), 332–339. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.021>
- Yang, J., & Xiao, Y.-Y. (2013). Grape Phytochemicals and Associated Health Benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *53*(11), 1202–1225. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.692408>
- Ye, X., Krohn, R. L., Liu, W., Joshi, S. S., Kuszynski, C. A., McGinn, T. R., Bagchi, M., Preuss, H. G., Stohs, S. J., & Bagchi, D. (1999). The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *196*(1–2), 99–108.
- Yilmaz, Y., Göksel, Z., Erdoğan, S. S., Öztürk, A., Atak, A., & Özer, C. (2015). Antioxidant Activity and Phenolic Content of Seed, Skin and Pulp Parts of 22 Grape (*Vitis vinifera* L.) Cultivars (4 Common and 18 Registered or Candidate for Registration): Antioxidant Activity of Grapes. *Journal of Food Processing and Preservation*, *39*(6), 1682–1691. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12399>
- Young, I. S. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, *54*(3), 176–186. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.3.176>
- Yu, J., & Ahmedna, M. (2013). Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science & Technology*, *48*(2), 221–237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x>
- Zeghad, N., Ahmed, E., Belkhiri, A., Heyden, Y. V., & Demeyer, K. (2019). Antioxidant activity of *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* and *Opuntia ficus indica* fruits cultivated in Algeria. *Heliyon*, *5*(4), e01575. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01575>
- Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., & Ceylan, R. (2014). Sideritis galatica Bornm.: A source of multifunctional agents for the management of oxidative damage, Alzheimer's's and diabetes mellitus. *Journal of Functional Foods*, *11*, 538–547. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.08.011>
- Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. (2016). ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>

- Zhang, P., Li, H., Yang, B., Yang, F., Zhang, L.-L., Kong, Q.-Y., Chen, X.-Y., Wu, M.-L., & Liu, J. (2014). Biological significance and therapeutic implication of resveratrol-inhibited Wnt, Notch and STAT3 signaling in cervical cancer cells. *Genes & Cancer*, 5(5–6), 154–164. <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.15>
- Zhang, X.-Y., Li, W.-G., Wu, Y.-J., & Gao, M.-T. (2010). Amelioration of doxorubicin-induced myocardial oxidative stress and immunosuppression by grape seed proanthocyanidins in tumour-bearing mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(8), 1043–1051. <https://doi.org/10.1211/0022357056523>
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)
- Zhou, Y., Ye, X., Shi, Y., Wang, K., & Wan, D. (2016). [Grape seed proanthocyanidins inhibits the invasion and migration of A549 lung cancer cells]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi = Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 32(2), 173–176.
- Zhu, L., Zhang, Y., Deng, J., Li, H., & Lu, J. (2012). Phenolic Concentrations and Antioxidant Properties of Wines Made from North American Grapes Grown in China. *Molecules*, 17(3), 3304–3323. <https://doi.org/10.3390/molecules17033304>
- Žunić, D., & Garić, M. (2010). *Ampelografija*. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Prištini, Kosovskoj Mitrovici.

Nevena Dabetić je rođena 20. januara 1990. godine u Kraljevu. Osnovnu i srednju školu završila je u Trsteniku, oba puta kao nosilac diplome „Vuk Karadžić“ i đak generacije. Integrisane akademske studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer farmacija, upisala je školske 2009/2010. godine. Tokom studiranja bila je dobitnik Studentske stipendije Ministarstva prosvete i sporta Republike Srbije, kao i stipendije Fonda za mlade talente grada Trstenika. Diplomirala je 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,00. Doktorske akademske studije na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, modul Bromatologija upisala je školske 2014/2015. godine.

Na radno mesto stručnog saradnika na Katedri za bromatologiju primljena je u oktobru 2015. godine. U aprilu 2018. godine je angažovana kao istraživač pripravnik na projektu „Razvoj i primena novih i tradicionalnih tehnologija u proizvodnji konkurentnih prehrambenih proizvoda sa dodatom vrednošću za domaće i evropsko tržište" koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. U zvanje istraživač saradnik izabrana je u septembru 2021. Asistent za užu naučnu oblast bromatologija postala je odlukom Izbornog veća Farmaceutskog fakulteta u oktobru 2022. godine.

Član je četiri COST akcije: CA19105 „EpiLipidNET”, CA18224 „GREENERING”, CA21122 „PROGRAMMING” i CA21139 „IMPROVE”.

Nevena Dabetić je do sada objavila četiri naučna rada u časopisima međunarodnog značaja (1 u časopisu M21a, 2 u časopisima kategorije M22 i 1 u časopisu kategorije M23) i četiri rada u časopisima nacionalnog značaja (M52). Na naučnim skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja učestvovala je sa 42 naučna rada koji su štampani u izvodu.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Невена Дабетих

Број индекса 20/14

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Компаративна анализа хемијског састава и биолошке активности екстраката плодова различитих сорти винове лозе (*Vitis vinifera* L.) добијених применом органског и еутектичког растварача

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 04.08.2023.

Н. Дабетих

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Невена Дабетић

Број индекса 20/14

Студијски програм Докторске академске студије – модул Броматологија

Наслов рада Компаративна анализа хемијског састава и биолошке активности екстраката плодова различитих сорти винове лозе (*Vitis vinifera* L.) добијених применом органског и еутектичког растварача

Ментор Проф. др Слађана Шобајић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 04.08.2023.



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Компаративна анализа хемијског састава и биолошке активности екстраката плодова различитих сорти винове лозе (*Vitis vinifera* L.) добијених применом органског и еутектичког растварача

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 04.08.2023.

Н. Радешић

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.